B794

ビーズをAFMプローブとして用いた細胞接着強度の定量的測定法

○金 賢徹、鶴田 聡、荒川 秀雄、長田 俊哉、猪飼 篤（東工大 院・生命理工・分子生命科学）

我々はこれまでの研究で、原子間力顕微鏡（AFM）を用いて一細胞レベルでの接着強度測定、受容体分布測定を行えるように、直径約10 μ mのポリスチレン製ビーズをAFMカンチレバー先端に取り付けて接触面積を増やし、それをプローブとして用いることにより数多くの興味深い結果を得た¹⁾。このような測定をさらに定量的に行うためには、接触面積あたり標的分子がいくつあれば検出可能かを知ることが必須である。本研究では抗原-抗体検出系を用いて、ビーズを用いたAFM接着強度測定法の感度を見積もった。

二架性架橋剤反応産物の吸光度を測定することで、ガラス基板上に固定された抗原分子の数密度を見積もった。カンチレバー先端に取り付けたビーズに抗体を固定し、ガラス基板上に固定された抗原との相互作用を測定した。また、非特異的分子を加える事で基板の抗原数密度を調節し、各数密度での接着強度と相互作用検出確率から、AFMを用いた本研究の方法の検出感度を見積もった。その結果、接触面積あたり抗原が数分子存在すれば検出可能であるという結果を得る事ができた。この結果は、AFMを用いた本研究の手法を用いて、生きた細胞上の受容体分布を高感度に測定可能である事を示している。

1) Kim, H., et al., *Colloids and Surfaces B*, 25 (2002) 33.

KIM, H., TSURUTA, S., ARAKAWA, H., OSADA, T., IKAI, A.: Quantitative measurement of cell adhesive strength using an AFM with a microbead

B796

液中観察用AFMの高感度化

○岡嶋 孝治、徳本 洋志（北大・電子研）

原子間力顕微鏡（AFM）は、溶液中の生体試料を高い解像度で観察できる装置である。環境を選ばずに観察できるところがAFMの大きな利点であるが、任意の環境で同等の解像度が得られるわけではない。液中の分解能は大気や真空中に比べて十分ではない。AFMを高感度化させる方法に、周波数検出法（FM検出法）がある。これは、探針と試料表面との間に働く力を、共振体（通常カンチレバー）の周波数変化から検知する方法である。最近、液中でも自励発振制御が可能となることが示され^[1]、微弱力の周波数イメージングが実現された。自励発振法の主な利点として、Q値が（原理的に）無限大になるため周波数感度が良いこと、発振現象を利用するため負帰還制御系が不要でAFM装置とのカップリングが良いこと、タッピングモードに比べて時間応答が良いこと、が挙げられる。従って、液中の分解能を向上させるためには、液中で安定した自励発振系をいかに構築するかが鍵となる。現在、著者は、水晶音叉^[2]を用いて上記を満足する自励発振系の開発を行っている。過去に音叉を用いたFM-AFMが提案されたが、液中で音叉のQ値が大きく減少したため、自励発振系が実現されなかった。しかし、著者は、高いQ値（大気中で数1000）をもつ音叉は、安定した自励発振系を実現するための有用な素子になると考えている。本発表では、Q値の減少を防ぐ液中観察法、および試作装置の性能について報告する予定である。^[1] 岡嶋孝治、荒川秀雄、猪飼篤「自励発振法を用いた液中観察用原子間力顕微鏡」、原子・分子のナノ力学（森田清三編著、丸善）161-169とその参考文献、^[2] K. Karrai and R.D. Grober, *Appl. Phys. Lett.* 66 (1995) 1842, ^[3] M. Kageshima et al. *Appl. Surf. Sci.* 188 (2002) 440-444

T.Okajima and H.Tokumoto: Fabrication of a highly sensitive AFM for use in liquid environments

B795

高感度分子間力顕微鏡によるDNA相補鎖のアンジッピング測定

○廣島 通夫^{1,2}、徳永 万喜洋^{1,2,3}（¹ 理研・免疫センター、² 遺伝研、³ 総研大）

機械的に伸長させた生体分子に生ずる微小な構造変化の測定を目的として、我々は高感度の力学測定系（分子間力顕微鏡）を開発してきた。今回、この分子間力顕微鏡を用いて、DNA1分子中の相補塩基対をアンジッピングさせた時のフォースカーブを測定した。

試料はステムループを形成するようデザインした合成DNAで、ステム中には5個の塩基対が、相補でない一対の塩基を挟んで数回繰り返している。試料片端には抗体修飾基盤に固定するためのジゴキシゲン、もう一端には顕微鏡プローブと結合させるための配列を導入している。測定は、基盤およびプローブと各末端間とをそれぞれ特異的に結合させた試料DNAを、約10~20nm/secの速度で伸長させて行った。

得られたフォースカーブの概形は、FJC (freely jointed chain) モデルから予測される形状とほぼ等しかった。また、塩基対のアンジッピングが起こっていると考えられる領域を解析すると、約6nmの周期で繰り返されるピーク群が含まれていた。観測されたピーク群の数が試料に含まれる6塩基対の繰り返し数とほぼ一致すること、そして、1塩基対がアンジッピングした場合の伸長距離が約1nmであるという従来の知見から、フォースカーブ中に見られるこれらの周期性は、試料DNAの配列周期性を反映していると考えられる。さらにこの6nmの周期内においても、塩基対形成の有無に由来すると考えられる力の差がピーク間で観察されている。

従来の測定系では、塩基対レベルのアンジッピングを測定するために必要な高い感度と精度は両立し得なかった。我々の測定系は弾性定数の小さなカンチレバーの位置を光輻射圧によって制御することで、これらの条件を共に満たし、数塩基対レベルのアンジッピングを検出することに初めて成功した。

M.Hiroshima and M.Tokunaga: DNA Unzipping measurement with an ultrasensitive probe microscope

B797

軟X線領域でのL-Cysteine水溶液XAFS測定

○松村 陽平¹、八木 伸也¹、曾田 一雄¹、谷口 雅樹²（¹ 名大院工、² 広大放射光）

医療材料への応用の観点からたんぱく質の構成要素であるアミノ酸と固体表面の反応機構の解明は重要である。これまでにCu、Ni基板上におけるL-Cysteineの吸着のふるまいを硫黄のK吸収端X線吸収微細構造（X-ray Absorption Fine Structure: XAFS）測定により明らかにしてきた。一方、人体において生体分子は水とともに存在しており、水溶液の状態を明らかにする必要がある。そこで、大気圧条件下でのXAFS測定が可能なチャンパーを作製し、広島大学放射光科学研究センター（HSRC）の軟X線二結晶分光ラインBL-3の末端に設置した（図1）。この装置を用いてL-Cysteine水溶液のXAFS測定とCu、Ni基板上に吸着したL-Cysteineの水の存在下におけるXAFS測定を行った。本発表では、基板の種類によるL-Cysteineの吸着反応の違いについて議論する。

図1. 大気圧条件下XAFS測定チャンパー

Y. Matsumura, S. Yagi, K. Soda and M. Taniguchi: XAFS measurement for L-Cysteine solution in the soft X-ray region