実験技術

生体試料の走査トンネル顕微鏡観測

名大・工・応用物理 加藤 知
工業技術院化学技術研 宮本 宏

1. はじめに

走査トンネル顕微鏡 (scanning tunneling microscope 以下 STM と略す) は、1982年に Binning ら¹⁾によって発表されて以来、短期間に長足の進歩を遂げ、現在さまざまな分野への応用が進められている。彼らが1986年には早くもノーベル物理学賞を受賞したことは、この装置の開発が表面科学の分野にいかにより大きなインパクトを与えたか如実に示している。特にここ数年間に生物関係の論文でも幾つかの注目される STM 像が発表されている。以下 STM の生体試料観察への応用²⁾の現況を概括し、併せて我々の行ったリン脂質膜表面に現われるリップル構造の観察³⁾について述べる。

2. STM による生物試料観察

STM は、2つの電極間に絶縁体が挟まれている系で電子がトンネル現象によりポテンシャル障壁を越えて電極間を流れることを利用している。このような系で、 $\sim 1 \text{ nm}$ 離れた電極間に数100mV のバイアス電圧 V をかけたとき流れるトンネル電流 I は近似的に次式で与えられる^{1),4)}。

$$I = f(V) \exp(-\sqrt{\phi} \cdot s),$$

ここで $f(V)$ は各電極における電子の分布状態を含む関数、 ϕ は平均のトンネル障壁の高さ、 s は電極間の距離で、 $f(V)$ と $\sqrt{\phi}$ は物質に固有の量である。これより、トンネル電流は電極間の距離が大きくなると指数関数的に減少することがわかる。STM の定電流モードでは、 I が一定になるように探針と導電体試料の距離 s をフィードバック制御することにより、 s 一定の面を3次元画像化している (図1)。また、 s や V を変えてトンネル電流を測定することにより試料の物性測定も可能である (スペクトロスコピー⁵⁾)。

生体試料の STM 観察では、一般に試料の弾性率が

Scanning Tunneling Microscopy of Biological Structures.

Satoru KATO, Hiroshi MIYAMOTO*

Department of Applied Physics, Nagoyd University

& *National Chemical Laboratory for Industry

図1. 走査トンネル顕微鏡の概略図。

a) 全体の構成。x 方向の一方の走査のみを画像化する。

b) 探針と試料間の拡大図。

小さいために探針との相互作用で変形が起こったり、電気伝導度が小さくはっきりした STM 像を得られない。これらの点を克服するために、試料表面に金属をコートしたり、凍結切断した試料のレプリカ膜を観察することが試みられている^{6),7)}。一方、STM は水や油などの溶液中でも観察可能であることが示され⁸⁾、生の生体試料の観察の可能性が示唆されている。最近、DNA^{9),10)}、微小管¹¹⁾、脂質の LB 膜¹²⁾⁻¹⁴⁾、リン酸化酵素¹⁵⁾、バクテリオファージ $\phi 29$ ¹⁶⁾、細胞壁¹⁷⁾、ポリ膜¹⁸⁾、アルブミン¹⁹⁾、アミノ酸²⁰⁾などが上記のような処理をしないでそのまま観察されている。これらの報告された STM 像の像質はなお低い、DNA の観察ではらせん構造が、また LB 膜では炭化水素鎖の配列の周期が見分けられる。このように分子種によっては生の試料でも観察可能であり、予想されるより電気伝導度は大きいことが示唆されている。絶縁体であるこれらの巨大分子中をトンネル電流が流れる機構は議論のあるところであるが、今後更に多くのデータが集積され、高分解能で生の像が得られるようになっていくことが期待される。

3. リップル構造の STM 観察

3.1 レプリカ膜の作製

我々は、STMの3次元高分解能の特徴を活かした試料として、相転移に伴って P_{β} と呼ばれる相で現われるリン脂質膜表面の波打ち構造(リップル構造)の観察を試みた^{21,22)}。試料作製は電子顕微鏡の凍結切断法と同様な手順に従って行い、STM像と電顕像を比較検討した。実験では、リン脂質(DPPC)リボソームを38℃(P_{β} 相)に保った試料を液体フロン中に急速凍結し、切断後白金カーボンにより40℃の角度から影付けし、さらにカーボンを90°方向から蒸着し補強した(我々の問題とする分解能ではSTMは白金面とカーボン面を区別しない)。このレプリカ膜を漂白剤に浮かせて脂質を溶解し、さらに水で洗って不純物を除き、電顕用のグリッド上にすくう、上述したようにトンネル電流は距離に対して指数関数的に減少するので、試料表面に最も近い探針先端の原子がトンネル現象を示すだけであり、全体の針の形状は試料表面の凹凸に比べてかなり巨大であると考えられる。このため凹凸が激しいと探針の異なる点でトンネル電流が流れ、像が得られない。従って高分解能の像を広範囲にわたって観察するためには、全体ができる限り平坦な面である方が有利である。また、試料濃度が低いと砂漠で針を捜すような状況に直面することになる。これらの点を考慮して、用いたリボソームは通常の電顕観察よりも高濃度で大きなリボソームを含むように調整した。

3.2 STM 観察

STMは幾つかの企業から市販されているが、我々はDigital Instruments社製のNanoscope IIを使用した²⁾。この装置の概略を図1に示す。レプリカ膜の載ったグリッドは、 ~ 1 cm角の金属板の上に銀ペーストで固定し、試料ステージにバネでとめる。円筒形のピエゾ素子に探針を装着し、試料ステージに取り付け、双眼鏡で見ながら手動で探針を試料位置に合わせる。次にトンネル電流をモニターしながら機械的な粗動でさらにピエゾ素子に電圧をかけて探針と試料間を数nm以内の距離まで近づける。ピエゾ素子でxy方向に精度良く探針を走査し定電流モードで試料表面から一定距離の位置をなぞっていく。トンネル電流を一定にするために加えた電圧を32ビットのコンピュータ(NEC)でz方向の移動距離に換算して画像化する。高分解能の像を得るためには探針の形状や走査速度($\leq$ 数Hz)、特に除振が重要である。また、コンピュータによる画像処理も欠かせない要件の一つである。

3.3 STM 像と電子顕微鏡像との比較

図2にリップル構造のSTM像と電子顕微鏡像を示す。両者とも周期が ~ 15 nmの畝状の構造が識別できる。STM像では全体の膜面の湾曲状態や畝の振幅が計測できる。電子顕微鏡のステレオ写真で3次元視した像と比較するとSTM像では膜面に垂直方向の非対称性が際だっている。また、振幅は2 $\sim$ 5nmのものが見られた。これらの特徴は探針の形状や走査速度、レプリカ膜表面への不純物の吸着等によって影響を受けると考えられ、今後どの程度のアートファクトが含まれているかさまざまな角度から検討を進めることが必要であろう。

図2. リップル構造の凍結切断レプリカ膜の観察。
a) 電子顕微鏡像。b) STM像。c) b)の断面。
畝に沿った方向に平均化してある。

4. 問題点と将来への展望

STMは、生物の研究者の究極の願望である溶液中にある生の試料をそのまましかも高分解能で観察できる可能性を秘めた画期的な顕微鏡である。現在は、なお開発が進行している未完の大型の観がある。以下に幾つかの問題点を試料作製とSTMの装置について挙げてみよう。

まず、STMの装置上の問題点としては、すでに述べたように探針の形状による像の分解能の低下や走査速度の影響、装置の安定性などがある²³⁾。さらに、生物試料のような広範囲に周期構造を持たず、低濃度で

観察することが望まれる場合には、試料位置に探針を持っていくことがむずかしい。最近、生物試料観察用のSTMが開発され始めており、光学顕微鏡との組合せや、1本の探針で広視野から局所領域へとズームすることができるものが考案されつつある^{24), 25)}。今後試料ステージ周りの温度コントロールや試料処理が容易なセルなど、操作性に優れ溶液中で生の試料を観察するのに適したSTMが開発されていくものと考えられる。

試料作製に関しては、まず第一に生物試料の電気伝導度の小さいことが高分解能のSTM像を得るのに障害となる (§1 参照)。他の問題点としては、生体試料の弾性率が小さいために探針との相互作用で変形しやすいこと、基板の種類や付着方法²⁶⁾、空気や水中の異物による基板表面および探針の汚染などが考えられる。レプリカ膜や金属被覆の場合には電気伝導や弾性の問題は改善されるが、生の状態が見られない点や分解能が金属粒子のサイズで限られてくるなどの欠点がある。

STMと並行してその極微走査技術を応用してさまざまな試料表面の状態の局所的分布を画像化する試みが行われている。原子間に働く力学的な力 (AFM: atomic force microscope²⁾) や局所的な磁場などを検出する探針顕微鏡が開発されている。AFMでは、試料が導電体である必要がないので生体試料観察に有力であると思われるが、試料の弾性的な性質が問題になるであろう。現在ではまだAFM観察を行っている研究室も少なく論文がスタートしたところである。さらに興味ある応用としては、ナノテクノロジーと呼ばれる分野が開けつつある²⁷⁾。これにより分子レベルでのマイクロマニピュレーションが可能になっていくことが期待される。現在有機分子をグラファイト基板の特定の場所に固定したり、ポリマーを切断したりすることが試みられている。こうした技術は分子間の相互作用の研究に新しい可能性を提供していくであろう。

最後に、1989年の茨城県大洗で開催されたSTMの国際会議で残念ながら日本人による生物関係の発表が一つもなかった由、この拙稿が、草創期にあるこの分野に生物物理の研究者の興味を喚起する一助となれば幸いです。

文 献

- 1) Binning, G., Rohrer, H.: 1986年のノーベル賞講演, (梶村 皓二訳 (1987) 日本物理学会誌, 42, 961-976.)
- 2) Hansma, P. K., Elings, V. B., Marti, O., Bracker, C. E. (1988) *Science*, **242**, 209-216.
- 3) 八田一郎 (1990) *パリティ*, **5**, 56-57. 1990年春の物理

学会で発表。

- 4) 桜井利夫, 小林明子, 酒井 明 (1986) 日本金属学会会報 **25**, 821-831.
- 5) Walmsley, D. G. (1987) *Surf. Sci.*, **181**, 1-26.
- 6) Amrein, M., Stasiak, A., Gross, H., Trvagliani, G. (1988) *Science*, **240**, 514-516.
- 7) Guckenberger, R., Wiegand, W., Baumeister, W., (1988) *J. Microsc.*, **152**, 795-802.
- 8) Sonnenfeld, R., Hansma, P. K. (1986) *Science*, **232**, 211-213.
- 9) Beebe, Jr., T. P., Wilson, T. E., Ogletree, F., Katz, J. E., Balhorn, R., Salmeron, M. B., Siekhaus, W. J. (1989) *Science*, **243**, 370-372.
- 10) Dunlap, D. D., Bustamante, C. (1989) *Nature*, **342**, 204-206とその引用文献を参照.
- 11) Simic-Krstic, Y., Kelley, M., Schneiker, C., Krasovich, M., McCuskey, R., Koruga, D., Hameroff, S. (1989) *FASEB J.*, **3**, 2184-2188.
- 12) Smith, D. P. E., Bryant, A., Quate, C., F. Rabe, J. P. Gerber, Ch., Swalen, J. D. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 969-972.
- 13) Eng, H. -R., Hidber, Rosenthaler, L., Staufer, U., Wiesen-danger, R., Guntherodt, H. -J., Tamm, L. (1988) *J. Vac. Sci. Technol.*, **A6**, 358-359.
- 14) Lang, C. A., Horber, K. H., Hansch, T. H. Heckland, W. M. Mohwald, H. (1988) *J. Vac. Sci. Technol.*, **A6**, 368-370.
- 15) Edstrom, R. D., Meinke, M. H., Yang, X., Yang, R., Evans, D. F. (1989) *Biochemistry*, **28**, 4939-4942.
- 16) Baro, A. M., Miranda, R., Alaman, J., Garcia, N., Binning, G., Rohrer, H., Gerber, Ch., Carrascosa, J. L. (1985) *Nature*, **315**, 253-254.
- 17) Dahn, D. C., Watanabe, M. O., Blackford, B. L. Jericho, M. H. (1988) *J. Vac. Sci. Technol.*, **A6**, 548-552.
- 18) Stemmer, A., Reichelt, R., Engel, A., Rosenbusch, J. P., Ringger, M., Hidber, H. R., Guntherodt, H. -J. (1987) *Surf. Sci.*, **181**, 394-402.
- 19) Feng, L., Hu, C. Z., Andrade, J. D. (1988) *J. Colloid Interface Sci.*, **126**, 650-653.
- 20) Feng, L., Hu, C. Z., Andrade, J. D. (1988) *J. Microsc.*, **152**, 811-816.
- 21) Tardieu, A., Luzzati, V., Reman, F. C., (1973) *J. Mol. Biol.*, **75**, 711-733.
- 22) Zasadzinski, J. A. N., Schneir, J., Gurley, J., Elings, V., Hansma, P. K. (1988) *Science*, **239**, 1013-1014.
- 23) Stedman, M. (1988) *J. Microsc.*, **152**, 611-618.
- 24) Michel, B., Travaglini, G. (1988) *J. Microsc.*, **152**, 681-685.
- 25) Guckenberger, R., Kosslinger, C., Baumeister, W. (1988) *J. Vac. Sci. Technol.*, **A6**, 383-385.
- 26) Emch, R., Nogami, J., Dovek, M. M., Lang, C. A., Quate, C. F. (1988) *J. Microsc.*, **152**, 129-135.
- 27) Franks, A. (1987) *J. Phys. E: Sci. Instrum.*, **20**, 1442-1451.