DNA のナノスケール構造と電子状態

松本卓也・前田 泰・内藤泰久

川合知二

大阪大学産業科学研究所 ☎ 567 0047 大阪府茨木市美穂が丘 8 1

(2001 年 12 月 18 日受理)

Nano-scale Structure and Electronic Properties of DNA Molecules

Takuya MATSUMOTO, Yasushi MAEDA, Yasuhisa NAITOH and Tomoji KAWAI

The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University

8-1 Mihogaoka, Ibaraki, Osaka 567 0047

(Received December 18, 2001)

Non-contact atomic force microscopy (NC-AFM) has been employed to observe double-stranded DNA. Cu(111) surface is found to be useful to realize high-resolution imaging of DNA molecules without the effect of water-layer and to improve the tip shape during the scan for imaging. NC-AFM images reveal the double-helix structure whose averaged repeat distance agrees with Watson-Crick model. However, the observed height of DNA molecules is only 1 nm that is the half of natural diameter of double-stranded DNA suggesting the strong deformation due to the surface adsorption. The simultaneous measurements of frequency-shift and tunneling current indicate that DNA molecules show tunneling conductivity across the strand with the attenuation factor $\beta = 1.1$.

1. は じ め に

分子生物学とナノテクノロジーの融合により新しい分野であるナノバイオロジーが生まれつつある。その起爆剤となったのは、原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy, AFM) である。AFM の多種多様な測定モードを用いて、DNA、蛋白、酵素など、生体中で働く巨大分子の形態や分子間相互作用を単一分子レベルで調べることができる。先行して発明された走査トンネル顕微鏡と比べると、AFM 測定では、試料に電気伝導性が必要ないので、生体分子や巨大分子測定に適しているが、分解能では大きく劣るという欠点があった¹⁾。しかし、非接触原子間力顕微鏡 (Non-contact Atomic Force Microscopy, NC-AFM) が 1995 年に発明され、原子・分子分解能が達成されて状況は一変した。最近では、半導体清浄表面²⁻⁴⁾のみならず、金属酸化物⁵⁾、絶縁性イオン結晶⁶⁾、ポルフィリン単一分子⁷⁾、自己組織化膜⁸⁾など、様々な

系で高分解能画像が報告されている。本論文では、NC-AFM を用いて DNA 分子の高分解能測定を行った結果について述べる。DNA 分子は水溶性であるので、固体表面上に展開するには、電解質水溶液から試料を作成する必要がある。また、DNA の構造はかさ高いので、探針先端の形が分子画像の分解能に大きな影響を及ぼす。これらは生体分子測定で共通して要求される条件であるので、DNA の高分解能測定技術を確立しておけば、その技術は広い範囲に適用可能であると考えられる。

2. 実 験

NC-AFM 測定には、試料導入室、試料処理室、試料作製室、SPM 測定室の 4 つのチャンバーから構成された差動排気システムを用いた。SPM 測定室の背圧は 1×10^{-10} Torr である。SPM ステージおよびスキャンコントロールは日本電子製のものを使用した。周波数シフトの検出には、独自に開発した水晶振動子制御スーパーヘテロダイン位相同期ループを用いた (Fig. 1)。この回路は、0.1 Hz の周波数分解能をもち、kHz オーダーの広い範囲

E-mail: matsumoto@sanken.osaka-u.ac.jp

Fig. 1 Block diagram of crystal-controlled super-heterodyne phase-locked loop system for frequency shift detection in non-contact atomic force microscopy.

の周波数シフトに追従可能である。とくに、後述するように水溶液を扱う生体分子試料では、吸着水の影響で強い力が働くので、探針を試料にアプローチするときには数 kHz におよぶ周波数シフトに対応する必要がある。

また、大気中タッピングモード (TM-AFM) 測定にはセイコー電子製の装置を利用した。

試料は二重鎖 DNA である pBlueScript II KS (-) (STRATEGENE, 2961 塩基対) を用いた。基板には、マグネシウムイオン処理を行ったマイカ基板とマイカ上に成長した Cu(111) 薄膜基板を用いた。マイカ基板上における測定では、DNA 純水溶液を濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ に調製して 1 μl を滴下し、数分待ったのち、液滴をブロワーで吹き飛ばした。基板に Cu(111) を用いた場合は、DNA 純水溶液を 5 $\mu\text{g/ml}$ に調製し、パルスバルブから真空中に噴霧して DNA を吸着した⁹⁾。

大気中 TM-AFM 測定では、材質が Si の長方形カンチレバーで、バネ定数が 15 N/m、共振周波数 135 kHz のものを用いた。一方、真空中 NC-AFM 測定では、B ドープされた低抵抗 Si の長方形カンチレバーで、バネ定数が 30 N/m、共振周波数 300 kHz のものを使用した。このとき、チップ先端のアスペクト比を改善するために、0.1 ~ 1 μN の力で探針を Cu(111) 表面に押し当て、探針表面の SiO₂ 層を除去し、その後、STM フィードバック状態で 5 ~ 10 V の電圧を数分間印加して探針先端に針状突起を形成したものを使用した。

3. 結果と考察

3.1 マイカ基板上の DNA 観察

Fig. 2 は TM-AFM と NC-AFM 測定の結果を比較したものである¹⁰⁾。TM-AFM 像を見ると、DNA 鎖が 1 本の部分と 2 本が絡まった部分は、コントラストの差として明瞭に識別できる。しかし、この絡まった部分は、特徴のない明るい線として観察されているに過ぎず、DNA 鎖が絡まりあっている様子はわからない。これに対して、NC-AFM 像では、2 本の DNA 鎖が絡まりあう様子もはっきりと見てとることができる。また、キंक周辺では二重らせん構造が弛緩した様子も観察される。

以上の例のように、一般に、NC-AFM を用いれば、TM-AFM よりも高い分解能が容易に実現される。この分解能の差異は大気と真空という環境の違いで試料が影響を受けたものではない。後に詳述するが、マイカ基板上の吸着水は真空中においても、室温では大気中とほぼ同じ状況にある。高分解能が実現されるのは、NC-AFM は力の検出感度が極めて高く、引力領域で非接触測定が可能であるので、Fig. 3 のように、探針先端のミニチップが壊れることなく有効に働くからであると考えられている¹¹⁾。

しかし、DNA のような生体分子系では、このミニチップの能力も十分には発揮されにくい。例えば DNA の二重らせん周期 (約 3.4 nm) の観測もなかなか実現しなかった。その理由として、1 DNA 試料を水溶液から基板上に展開するため、表面吸着水の影響が大きい、2

Fig. 2 Image difference of double-stranded DNA molecules between tapping and non-contact mode atomic force microscopy. In the non-contact AFM images, the feature of tangled strands and relaxed helix can be observed.

Fig. 3 Schematic illustrations of the effect of mini-tip. Because of high sensitivity of non-contact mode operation, the mini-tip is able to trace the fine structure without destroying the mini-tip.

かさ張った分子の測定では、チップ先端のアスペクト比が小さいと、ミニチップが有効に働かない、などが考えられる。そこで、これらの要因の解決を図ることにした。

3.2 フォースカーブ測定

DNA を始めとする生体分子の測定に最も一般的に用

いられる基板はマイカである。マイカをへき開すると、簡単に原子的に平坦表面が得られる。この表面は水に強く大気中で安定であり、生体分子の付着性もよい。しかし、これらの特性は表面が親水的であることを意味しており、高分解能 AFM 測定において障害となる表面水層を除くことは容易でない。Fig. 4 に接触モードにおけるフォースカーブ測定の結果を示す¹⁰⁾。Fig. 4 (a) はマイカをへき開後、速やかに超高真空チャンバーに導入して測定したフォースカーブである。約 10 nN の強い吸着力が観測される。この試料を一昼夜、超高真空チャンバー内に放置しても、(b) のように吸着力は全く変化しない。(c) のように 100 , 30 分間の加熱を超高真空中で行った後も、4 nN 程度の吸着力が残っている。

マイカ基板は良い絶縁体であるので、表面には静電ポテンシャルが存在する。この静電ポテンシャルは試料の取り扱いの履歴により変化するが、超高真空中では、数時間で大きく変化することはない。また、カンチレバーを試料に接触させると接触帯電が起こるが、NC-AFM は文字通り非接触で引力領域における測定が可能であるので、この接触帯電を避けて、試料表面の静電ポテンシャル測定を行うことができる¹²⁾。Fig. 5 (a) は導電性チップを用いて測定したチップのバイアス電圧とフィード

Fig. 4 Force curve measurements for a mica substrate taken by a SiN cantilever (spring constant is 0.09 N/m). The force curves are for measurements made (a) in air, (b) in a vacuum in which the sample was left overnight, and (c) in a vacuum in which the sample was annealed at 100 °C for 30 min. Although the adhesion force in air could not be reduced even in a vacuum, it was diminished by annealing in a vacuum.

バック位置との関係である。このとき、周波数シフトのセットポイントは 30 Hz とした。黒丸は大気中から導入したマイカ基板、白丸は超高真空中 320 °C で 80 分間加熱処理して、表面の吸着水をできるだけ除去した後のマイカ基板についての結果である。超高真空中で加熱処理したマイカ試料では、チップバイアス -2 V でフィードバック位置は明確な極小値を示す。このとき表面ポテンシャルとチップのポテンシャルが等しくなり、静電気力は打ち消されている。ところが、加熱処理をしていないマイカ試料では、フィードバック位置は明確な極小値を示さず、チップバイアスが -3 ~ -5 V の範囲でほぼ一定の値を示す。これは、Fig. 5 (b) のモデル図に示したように、表面吸着水の存在により誘電分極が生じるため、チップにバイアスをかけても静電ポテンシャルは打ち消されず、外部電場に応じたほぼ一定の力が働くことを示唆している。このような条件では、誘電損失が発生するので、引力領域の測定であっても、カンチレバーの振動励起エネルギーが散逸することを意味している。

この状況を周波数シフトの距離の関数として示したのが Fig. 6 である。大気中から導入しただけで、加熱処理

Fig. 5 (a) Relationship between tip bias V_t and tip-surface distance $\langle z \rangle$ for untreated mica (○) and dried mica (●) surfaces. The measurements were performed under a closed-feedback setting $\Delta f = 30$ Hz. (b) Schematic view of the electrostatic potential between the tip and the surfaces of untreated mica.

Fig. 6 Variation of frequency shift Δf as a function of the tip-surface distance $\langle z \rangle$ for untreated (solid line) and heated (dashed line) mica, and Cu(111) surface after the exposure to water spray (solid circles).

していないマイカ基板では、遠距離から周波数シフトの低下が見られる(実線)。NC-AFMの高感度・高分解能は、周波数シフトの急峻な距離依存性に基づくものである。このように条件では高分解能測定は難しい。これに対して、加熱処理したマイカ基板では周波数シフトの距離依存性が急峻であるので、高分解能測定が可能である。実際、試料を熱処理してDNAの高分解能測定に成功した例も報告されている¹³⁾。しかし一般に生体由来分子は熱変性しやすく、加熱処理は分子観察の方法論として一般性を持ち得ない。また、Fig. 2で示したように、温和な加熱条件では表面水を除くことは極めて困難である。加熱なしに、高分解能観察を実現できる方法が必要である。

Cu(111)基板は高真空中で水を吸着しないことが知られている。この特性を生かし、パルスバルブからDNA水溶液を真空チャンパー内のCu(111)清浄表面に噴霧した試料についてSTM観察が行われてきた⁹⁾。この方法は、吸着水がないという点で、NC-AFM測定にも適している。Fig. 6にCu(111)表面上にDNA水溶液を噴霧した後で測定した周波数シフトの距離依存性データを示した。加熱処理を一切行っていないにもかかわらず、Cu(111)の点()は加熱処理したマイカ表面の曲線(破線)と良く一致する。この結果から、Cu(111)と真空噴霧法を利用すれば、水の問題なしに、高分解能AFMによる水溶性生体分子観察が可能であることが明らかになった。

3.3 Cu(111)表面上DNAの高分解能観察

Cu(111)面の利用はチップの形状制御という点でも有利である。一般にDNAなど生体分子はかさ高い。NC-AFM測定では試料とチップ間距離がSTMよりも近いので、チップ先端周辺のアスペクト比が分解能に及ぼす影響は深刻である。絶縁体の試料やチップを用いた測定では、チップの状態を測定中に変えるのは極めて難しい。しかし、導電性試料と導電性カンチレバーを用いれば、電界印加による原子移動を利用したアスペクト比の改善が可能である。Fig. 7は実験項で示した手順に従い、チップ先端のアスペクト比を改善した後で観測したCu(111)表面上のDNA像である¹⁴⁾。二重らせん周期に対応した凹凸がはっきり確認され、探針先鋭化が有効であることがわかった。このようにして測定したDNAの二重らせん周期の分布を示したのがFig. 7(b)のヒストグラムである。3.4 nmに分布の最大値があり、ワトソン・クリックモデルの値3.4 nmと良い一致を示す。このことから、表面吸着状態においても、DNAのらせん周期は大きく変化しないと結論できる。ただし、観測された周期は6.7 nmまで広い分布を伴っているのが溶液中

(a) Period of double-helix structure

(b)

Fig. 7 (a) The result of DNA observation by non-contact atomic force microscopy. The period of double helix structure can be clearly seen. (b) The distribution of the period of double helix structure obtained from the image. The maximum corresponds to the Watson-Crick structure, however, the broad distribution was also observed.

とは異なる。これは、吸着エネルギーのために、急な角度での折れ曲がりやねじれ等の歪をもったままDNA鎖が固定されるので、二重らせん構造が局所的に緩んだ結果と理解できる。

次にDNA鎖の高さについて検討した。これまで、AFMを用いて表面に吸着したDNA鎖の高さ計測が行われてきた。しかし、これまでの測定はタッピングモードが用いられたため、カンチレバーの圧力によるDNA鎖の変形が常に問題にされてきた。今回の測定は、非接触モードによる引力領域で行われたので、変形の問題を避けることができる。結果は、0.8 nm程度の高さが得られた。Fig. 8に示したように、試料・探針間の相互作用が、引力から斥力へ遷移する領域での測定や、斥力領域におけ

Fig. 8 The set point of non-contact mode with frequency-shift feedback in vacuum, non-contact mode with amplitude feedback in vacuum, and tapping-mode in air.

Table 1 Height values of double-stranded DNA molecules measured by tapping and non-contact mode atomic force microscopy. NC-AFM (A) and NC-AFM (Δf) mean amplitude controlled and frequency shift controlled non-contact mode experiment, respectively.

Mode	Substrate	Condition	Height (nm)
NC-AFM (A)	Cu(111)	UHV	0.8 1.0
NC-AFM (Δf)	mica	UHV	1.0
TM-AFM	mica	in air	0.8

るタッピングモード測定を比較すると、力の向き、大きさにかかわらず、一様に0.8–1.0 nm 程度の高さが得られた (Table 1)。水溶液中の DNA 分子の直径が 2 nm であることを考慮すると、表面では DNA 分子は扁平な構造をとっていることが示唆された。また、原子間力顕微鏡の通常の測定に用いる力では、DNA は変形せず、十分に剛直であることもわかった。以上の結果を総合すると、表面において DNA 分子はワトソン クリックの二重螺旋構造を維持しつつも、高さは約 2 分の 1 まで、扁平になっていると推測される。

3.4 NC-AFM/STM 同時測定

局所表面の電子的性質の研究において、走査トンネルスペクトロスコピー (Scanning Tunneling Spectroscopy, STS) が大きな役割を果たしてきた。STS を行うと、フェルミ準位近傍の状態密度分布を調べることができる。このとき、フェルミ準位付近に特別な状態密度があれば、スペクトル上のピークやショルダーとして観測できる。有機分子でも、光合成色素のように、フェルミ準位近傍にははっきりした電子準位がある場合は STS 測定が有効である。ところが、多くの生体関連分子ではフェルミ準位付近に明確な状態密度は存在しない。フェルミ付近における状態密度は、大部分が金属や半導体など固体表面

のものであり、有機分子に由来する成分は軌道混成によるわずかな染み出しに過ぎない。このような場合には、スペクトルに特別な特徴は現れない。しかし、 π 電子を持つ分子では、明らかに高い電気伝導性が報告されている。このような分子の電子的特性を明らかにするには、分子から一定距離における状態密度の大きさを検討する必要がある。STS 測定では、一定トンネル電流でフィードバックをかけるので、スペクトルは規格化されてしまい、状態密度の大きさを比較検討することはできない。

そこで、NC-AFM と STM の同時測定を行い、表面からの距離一定の条件における状態密度の比較を試みた。STM 測定においてトンネル電流 I は、座標 (x, y, z) における状態密度 $\rho(x, y, z)$ 、バイアス電圧 V の関数として

$$I \propto V \rho(x, y, z)$$

で表現される。一方、NC-AFM 測定における周波数シフト Δf は、探針 試料間のポテンシャル関数を $F(z)$ とすれば、

$$\Delta f \propto (f_0/k) F(z)$$

となる。ただし、ここで、 f_0 はカンチレバーの共鳴周波数、 k はカンチレバーのばね定数である。トンネル電流でフィードバックをかけて走査を行えば、 V と I は一定で z は同時測定なので、上記二式で共通である。STM と NC-AFM の同時測定を行うという実験操作は、式の上では、上記の二式から z 項を消去する作業と同じ意味を持つ。したがって z を消去すれば、

$$\Delta f \propto F \{ \rho(x, y) \}$$

の関係式が得られる。この式から、試料 探針間に働く力のポテンシャルの差異がなければ、周波数シフト Δf の値は局所状態密度を反映していることになる。

Fig. 9 は (a) DNA 及び (b) EDTA 凝集体 (DNA 水溶液に含まれている緩衝溶液の成分) について NC-AFM/STM 同時測定を行った結果である。EDTA 凝集体は、原子間力ではきちんと画像化されるが、トンネル電流では観測されず、ほとんど透明である。これに対して DNA 分子は、原子間力、トンネル電流ともに明瞭な画像として現れる。この結果から、DNA 凝集体に比べて、DNA 分子は電子を導きやすいことがわかる。

さらに、この測定結果から DNA の STM 像において観察される二重らせん周期のコントラストと、DNA 鎖の凹凸との関係を明らかにすることができる。Fig. 10 に、コントラストメカニズムとして考えられる 3 つのモデルを示した。モデル 1 は DNA 鎖の低い部分が明るく、高い部分が暗くなる場合である。DNA 鎖にほとんど電流を流す能力がない場合は、金属基板と接している部分の軌道混成のほうが、浮き上がった部分よりも強いので、

Fig. 9 Simultaneous observation of frequency shift and tunneling current images by multimode non-contact atomic force microscopy. EDTA aggregates (buffer molecules) are observed clearly by force, however, not observed by tunneling current because the those are insulating and don't affect tunneling process from substrate to tip. On the other hand, DNA molecules are imaged clearly by both force and tunneling current. This suggests that there is some contribution of DNA molecules for electric conduction.

STM Contrast Mechanism

Fig. 10 Possible contrast mechanisms of DNA imaging. Model 1, 2 and 3 represent orbital hybridization, electric polarization, and conduction mechanism, respectively.

STM 像では明るくなると考えられる。しかし、同時測定の結果、NC-AFM で高い部分が、STM でも高いので、このモデルは直ちに否定される。また、ここで詳細は述べないが、STM 探針位置に変調をかけて測定したトンネル障壁像の研究から、大きな電荷移動は無いことが既に明らかになっている。したがってモデル 2 も否定される。結局、DNA 自身にある程度の電気伝導性があり、DNA 鎖から探針にトンネル電流が流れることを仮定し

たモデル 3 がコントラストメカニズムについて正しい描像を与えていると考えられる。このモデルに立てば、トンネル抵抗の値から DNA 内における電子波の減衰率 β はおよそ 1.1 と見積もることができる。この伝導をバリスティックなものとするトンネリングの方向と DNA の π スタッキングの方向は直交関係にあるので、電子の運動量ベクトルの向きを考えると疑問が残る。一方、フェルミ準位近傍に明確な電子準位は存在しないので、DNA 内部で定常的電子輸送が実現されるとする考えも、矛盾を含んでいる。さらに二重らせん周期の高い部分と低い部分とで DNA と表面の接触状態がどのように異なるかなど、明確でない部分が多くあり、DNA 分子の電気伝導に関する物理的描像はまだ明らかではない。

4. まとめと展望

DNA に焦点を合わせて、NC-AFM の応用例を述べてきた。これらの結果をまとめたのが Fig. 11 である。表面吸着状態において、

- 1 DNA の二重らせん構造は維持されるものの、吸着力のために多数のキックを含んだ形で固定され、部分的には二重らせんが緩んでいること、
- 2 高さは半分程度にまで扁平になっていること、
- 3 銅基板と DNA の間で、大きな電荷移動はないこと、
- 4 DNA の直径方向の電気伝導性は、トンネリングを仮定すると $\beta = 1.1$ 程度である。

Fig. 11 Schematic illustration of DNA structure on a surface and electric conduction through DNA.

表面上で DNA は扁平であるが、このようなコンフォメーションでは、DNA 塩基のスタックは垂直ではなく、斜めにずれた形になると考えられるので、 π 電子系を介した電子輸送にも大きな影響があると考えられる。また、キंकなど局所構造と電気伝導の関係も気になるところである。

以上示してきたように、NC-AFM はこれまでの TM-AFM に比べて、遥かに高い分解能で巨大分子・生体分子を画像化することが可能である。また、NC-AFM の引力領域における高い感度を利用すれば、トンネル電流との組み合わせの他にも、ケルビンフォースや化学結合力をこれまででない精度・分解能で検出することができる。生体分子内における、電荷分布、電荷移動や化学状態は極めて重要であるので、単なる形態観察を超えて、分子生物学の内容に踏み込んだ研究も可能であると期待される。さらに、分子エレクトロニクス、バイオエレクトロニクスなどナノスケールの回路網の研究では、導体、絶縁体を問わず高い分解能で走査しながら電子状態を調べることが要求される。現状では NC-AFM は、この要請に応えることのできるほとんど唯一の計測手段であると言っても過言ではない。NC-AFM の普及とともに、これからナノスケール分子系に関する幅広い研究が展開されるであろう。

文 献

- 1) U. Landman, W.D. Luedtke, N.A. Burnham and R.J. Colton: *Science* **248**, 454 (1990).
- 2) F.J. Giessibl: *Science* **267**, 68 (1995).
- 3) Y. Sugawara, M. Ohta, H. Ueyama and S. Morita: *Science* **270**, 1646 (1995).
- 4) S. Kitamura and M. Iwatsuki: *Jpn. J. Appl. Phys.* **35**, 668 (1996).
- 5) K. Fukui, H. Onishi and Y. Iwasawa: *Phys. Rev. Lett.* **79**, 4202 (1997).
- 6) M. Reichling and C. Barth: *Phys. Rev. Lett.* **83**, 768 (1999).
- 7) Ch. Loppacher, M. Bammerlin, M. Guggisberg, E. Meyer, H.-J. Guntherodt, R. Luthi, R. Schlittler and J.K. Gimzewski: *Appl. Phys. A* **72**, S 105 (2001).
- 8) T. Fukuma, K. Kobayashi, T. Horiuchi, H. Yamada and K. Matsushige: *Appl. Phys. A* **72**, S 109 (2001).
- 9) H. Tanaka, C. Hamai, T. Kanno and T. Kawai: *Surf. Sci.* **432**, L 611 (1999).
- 10) Y. Maeda, T. Matsumoto and T. Kawai: *Appl. Surf. Sci.* **140**, 400 (1999).
- 11) T. Matsumoto, Y. Maeda, Y. Naitoh and T. Kawai: *J. Vac. Sci. Technol. B* **17**, 1941 (1999).
- 12) Y. Naitoh, Y. Maeda, T. Matsumoto and T. Kawai: *Surf. Sci.* **459**, L 446 (2000).
- 13) T. Uchihashi, M. Tanigawa, M. Ashino, Y. Sugawara, K. Yokoyama, S. Morita and M. Ishikawa: *Langmuir* **16**, 1349 (2000).
- 14) Y. Maeda, T. Matsumoto, H. Tanaka and T. Kawai: *Jpn. J. Appl. Phys.* **38**, L 1211 (1999).