光照射 STM の応用

—キメラタンパク質自己組織化単分子膜の光電流発生現象の解明—

中嶋 健・武田修治*・李 範煥*・王 彤**

長棟輝行*・原 正彦**・西 敏夫

東京工業大学大学院理工学研究科有機・高分子物質専攻 ☎ 152-8552 東京都目黒区大岡山 2-12-1

*東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻 ☎ 113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1

**理化学研究所フロンティア研究システム局所時空間機能研究チーム ☎ 351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

(2003 年 10 月 15 日受理)

Application of Light-Illumination STM

—Investigation of Photocurrent Generation from Self-Assembled Monolayer of Chimera Protein—

Ken NAKAJIMA, Shuji TAKEDA*, Bumhwan LEE*, Tong WANG**

Teruyuki NAGAMUNE*, Masahiko HARA** and Toshio NISHI

Department of Organic and Polymeric Materials, Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology,
2-12-1 O-okayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8552

*Department of Chemistry and Biotechnology, School of Engineering, the University of Tokyo,
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656

**Local Spatio-Temporal Functions Laboratory, Frontier Research System, RIKEN,
2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198

(Received October 15, 2003)

Single molecular photocurrent generation was investigated using a novel light-illumination scanning tunneling microscope (LI-STM) equipped with an optical fiber probe. For this study, self-assembled monolayers (SAMs) of biological photosynthesis mimicking chimera proteins composed of cytochrome b562 mutant proteins fused with a green fluorescent protein (GFP) were prepared. With light illumination, the GFP was excited, resulting in photocurrent generation due to the energy transfer to the cytochrome part instead of a typical fluorescence. Two different types of measurements were carried out employing a conventional LI-STM with a metallic probe and far-field optics, and another LI-STM in which the metallic probe was replaced with a laboratory-built doubly metal-coated optical fiber probe and thus a local near-field illumination was possible. Comparison of these two techniques indicated that the new technique was superior in sensitivity to the conventional one. Evidence of the intramolecular energy transfer at a single molecular level was shown.

1. は じ め に

アンサンブル平均の限界を乗り越え、単一ナノ構造における物性を測定しようとする試みは、近年のナノサイエンスの大きな潮流となっている。その興味深い応用例として光励起による構造、電子状態変化の検出があげられる。普通この現象の解析には、金属探針を用いた走査

型トンネル顕微鏡 (scanning tunneling microscope, STM) と遠視野光学系を組み合わせた「光照射 (光励起) STM」と呼ばれる手法が用いられる¹⁾。しかし金属探針に遠視野から光照射するこの測定法では「探針直下の領域は果たして真に光励起されているのか (一応の解釈としてナノメートルサイズのギャップ領域にしみ出した近接場光励起と考えられている)」という疑問に対して答えを与えることが大変難しく、分野における長い論争になっている。また技術的問題として、光照射に伴う探針あるい

E-mail: knakaji@polymer.titech.ac.jp

は試料の熱膨張の影響は深刻である。何故ならばこの影響によって生じる探針-試料間の距離の変化はSTMの高感度性ゆえに大きな電流変化として測定されてしまい^{2, 3)}、実際に測定したい試料からの信号変化を分離することは容易でないからである。通常、光の変調を熱膨張の影響が無視できるくらいに高速化するか、光強度を落とすかの対処がとられるがこれらによる制約は大きい。光を試料の広範囲に照射するため、有機材料に対する測定ではその消光、光損傷の問題がさらに深刻である。すなわち試料全面が常に光損傷の危険に晒されつつも真に見たい領域は光照射されていないかもしれないというジレンマがあるのである。本報告では上記の問題を解決するために、以前我々が発明した近接場光学顕微鏡 (scanning near-field optical microscope, SNOM) と STM の複合装置 (SNOM/STM) で用いた自作光ファイバー探針を光照射 STM に応用した研究について紹介する。

我々はこれまで SNOM の空間分解能 (通常は探針の開口サイズがその上限となる) を向上する目的で STM と SNOM を結合したシステムを組み上げる研究を行ってきた。具体的には Fig. 1 (c) のように開口部にも金属を蒸着した金属二重コーティング光ファイバー探針を開発し、距離制御を STM に委ね、近接場で発現する情報を SNOM モードで検出するという方法をとった。この方式を採用すると、探針-試料間距離を STM が動作する約 1 nm まで近づけることができる (通常はシアフォース制御などの方式を採用するため距離は 10 nm 程度)。その結果これまでにイルミネーションモードの散乱光像で開口サイズに規定されない高分解能 (最高 $\lambda/50$ –10 nm) を達成している^{4, 5)}。またもうひとつの利点

として、自作光ファイバー探針は後述するように化学エッチング法で開口を作成するために、開口部が Fig. 1 (b) のように突出している。先鋭化した光ファイバー全面に金属を蒸着し、試料表面に衝突させることで開口を作成する押し付け法⁶⁾の場合にできる Fig. 1 (a) のような平坦構造ができるケースとは対照的である。この構造の違いにより、過去の報告にある SNOM/STM において SNOM と STM の動作点が全く異なってしまうという問題⁷⁾も自然に回避することができた。すなわちこのような突出型光ファイバー探針を用いると、得られる SNOM 像と STM 像の位置に関してナノメートルサイズで一致する結果を得ることができる。

蛍光観察用としてさらに改良を加えた透明電極膜としてよく用いられる ITO と金の二重コーティング光ファイバー探針^{8, 9)}では、イルミネーションコレクションモードを可能にする程度のスルーputの向上に加え、「蛍光分子と探針先端の金属部分の接近に伴い無輻射的エネルギー移動が起こる」という、金属二重コーティング光ファイバー探針が持っていた本質的な問題¹⁰⁾を回避することもできた。その結果、Fig. 2 に示すように半導体ナ

Fig. 1 Conceptual drawings of (a) a conventional SNOM with an aperture probe, (b) a conventional SNOM with a protrusive aperture probe, (c) a hybrid SNOM/STM where an STM feedback is used merely for gap-distance control and (d) an LI-STM developed in this study.

Fig. 2 Fluorescence SNOM image and its cross-sectional profile of a single CdSe semiconductor nanoparticle. Higher resolution beyond aperture size was obtained by hybrid SNOM/STM.

ノ粒子からの蛍光を高感度かつ開口サイズに規定されない高分解能で検出することが可能となった。この報告ではナノ粒子（直径約5 nm）からの発光を半値全幅約20 nmで観測することができている。この時使用した探針の開口は約150 nmで、従来のSNOMならば半値全幅が150 nm程度になるはずのところである。

もしこの高分解能イメージングを可能とするSNOM/STM用光ファイバー探針を光照射STM用の探針として利用するならば（Fig. 1 (d)を参照）、上述したような問題点をすべて回避できる可能性がある。この場合蛍光観察が可能であることから容易に判断できるように、開口からの局所的近接場光照射は確実である。また探針先端でのエネルギー散逸が非常に少ないため、熱膨張の影響もほとんどないことが期待できる。以上の理由から、金属探針の代替物としてこの探針を光照射STMに応用した場合、非常に高感度の測定ができることが予想される。

本報告ではこの光ファイバー探針を有する新しい光照射STMをキメラタンパク質からの光電流発生現象へ応用した例について紹介する¹¹⁾。その卓越した高感度性を示すために、遠視野光学系とSTMを複合した従来型の装置で測定した結果¹²⁾との比較検討も行う。

2. 実験

2.1 キメラタンパク質

一分子内に複数の色素団を固定した超分子を合成し、分子内における電荷分離を誘起する試みは多い。しかしながら自然界における分子素子とも呼べる光合成反応中心では、クロロフィル（葉緑素）分子がタンパク質内部に最適化された状態で配置されているため、光合成分子システムを模倣した素子は高性能になる可能性がある。そのような分子素子を作製することは、シリコンベースで実現される素子とは異なる基盤技術創成に繋がる。また生体分子素子、生体模倣膜などの機能を解析する方法、装置、理論を構築することは生命機構の分子レベルでの理解に役立つ可能性もある。

本研究では光合成反応を模倣するために2つのタンパク質を遺伝子工学的に融合したキメラタンパク質をモデル試料として選定した。その遺伝子構築、作成手順については文献を参照されたい¹³⁾。このキメラタンパク質は以下の2つの構成要素からなる。ひとつは電子伝達系タンパク質チトクロムb562で、もうひとつは蛍光タンパク質（green fluorescent protein, GFP）である。後者はその高い量子収率のために増感剤として機能する。融合タンパク質b562-GFPでは一分子内にチトクロムb562のヘムとGFPの蛍光発色団の2種類の色素分子が近距離

で固定されているため、色素分子間の相互作用が期待できる。これまでの研究では融合タンパク質のアポ体（ヘムが複合していないため活性を失った状態、一方ヘムと結合し活性のある状態をホロ体と呼ぶ）に対して、ヘムを添加する前後のGFPからの蛍光を比較して、後者の場合に消光した結果からそれが実証されている。また後に詳説するが、時間分解蛍光測定等の分光学的測定から、ヘムと蛍光発色団の間でフェルスター型エネルギー移動（ドナーとアクセプター間の励起エネルギー移動を説明するモデルのひとつで双極子-双極子相互作用を基礎に置いているもの）が起きるためにGFP由来の蛍光が消光することがわかっている。

金基板上にb562-GFPの自己組織化単分子膜（SAM）を形成させるために、b562部分にシステイン（チオール基を持つアミノ酸）変異を導入した2つの変異体を作製した¹²⁾。一方はN22C位とG82C位の2か所に変異を導入したMutant I、もう一方はH63C位1か所だけに導入したMutant IIである。金-硫黄の強い特異的結合が期待されるために、これらの変異体金基板上で自己組織化することは明らかである。ただし導入されたシステイン残基数、位置がそれぞれ異なるため、吸着構造の詳細、単分子膜の膜質は異なることが予想される。

このキメラタンパク質が電極（金基板とSTM探針）に挟まれると光電流が発生することが期待される。何故ならばチトクロムは電子伝達系タンパク質であり、直接光励起されたGFPからのエネルギー移動により間接的に励起された状態から基底状態に遷移する際に電子をひとつ生成するからである¹⁴⁾。この光電流は実際にはトンネル電流の増加成分として検出されることになるだろう。

2.2 自己組織化単分子膜形成

金(111)表面は既に確立された真空蒸着法でマイカ基板上に作製した¹⁵⁾。キメラタンパク質SAMは、この金基板を50 mMのキメラタンパク質を含むTris-HClバッファー溶液（pH 7.5）中に16から20時間浸漬することで作製した。浸漬中は4℃恒温槽の中に保持した。

2.3 探針作製

金二重コーティング光ファイバー探針の作製手順の詳細も文献を参照されたい^{4,5)}。まず分散補償型光ファイバー（SS-DC-P、三菱電線工業）を二段階のフッ酸バッファーで化学エッチング処理し、先鋭化された単一テーパー型構造を作製する。得られた先鋭化光ファイバー探針を約0.1 Torrの低真空チェンバーに持ち込み、約100–200 nm程度の金のスパッタ層を形成する。次に“選択的樹脂コーティング法”で50–300 nmの開口を作製する¹⁶⁾。

以上の手順で通常の SNOM 操作に必要な Fig. 1 (b) のような突出型開口を持つ光ファイバー探針を形成した後、再び約 20 nm 程度の金の超薄膜を開口部に形成する。これによって Fig. 1 (c) に示したような半透明性と導電性を兼ね備えた SNOM/STM 探針が仕上がる。この探針は STM 探針として動作させることができるのみならず、同時に局所的近接場照明を可能にする理想的な光源ともなるのである。Fig. 3 に示したのは、得られた探針の電子顕微鏡 (scanning electron microscope, SEM) 写真 (S-900, 日立製作所) である。

2.4 光照射 STM 測定

従来型光照射 STM 測定のために、20 nm 程度の金をコーティングした Pt-Ir 探針を作製した。これは金二重コーティング光ファイバー探針と直接比較をするため、そしてショットキー障壁効果の影響を避けるためである。この金コーティング Pt-Ir 探針の耐久性については、実際の測定時間 (数時間) の間には問題ないことを使用後の探針を SEM 観察することで確認している。

488 nm の励起光を得るために、空冷アルゴンレーザー (163-C 12, スペクトラフィジックス) を使用した。このレーザー光を機械的に変調し (5584 A, NF 回路設計ブロック), レンズで集光した後、トンネルギャップ領域に入射角 0–30° で遠視野照明した。光電流測定時はフィードバック制御オフの分光モードに移った。I-V コ

ンバータ通過後のトンネル電流信号をロックイン検波し (5610 B, NF 回路設計ブロック), 機械的変調周波数に同期する光電流成分を分離した。

キメラタンパク質を用いた実際の測定に先立って、金コート Pt-Ir 探針と金 (111) 基板のみの測定系で変調周波数とレーザー光強度の調整を行っている。まず 100–200 ms の測定時間を有する分光モードのシングルショットの間に光電流発生現象を目視しやすくするために、変調周波数を 200 Hz に固定した。この周波数で熱膨張の影響が起きないようにレーザー光強度を調整する。ここでは 0.1 mW が最適化された値であった。

新しい光照射 STM の場合には、1 mW のレーザー光を先鋭化していない方の端面からファイバーカプラを用いて結合させた。カップリング効率および開口でのスループットの不確定性によって開口位置での近接場光強度を直接測定することは困難である (単純な見積もりは後ろの節で行う)。しかしながら、変調周波数を 50 Hz 程度まで落としても熱膨張の影響に起因できるようなどんな効果も確認しなかった。この探針が光照射 STM における金属探針の優良な代替物となり得る証拠となる結果である。

3. 結果 と 考 察

3.1 遠視野照明を使う従来型光照射 STM

Fig. 4 に Pt-Ir 探針を用いて測定した Mutant I SAM の定電流モード STM 像を示す。走査範囲は 400 nm で、

Fig. 3 SEM image of a doubly Au-coated optical fiber probe. The size of the aperture was approximately 300 nm.

Fig. 4 STM image of the chimera protein (Mutant I) SAM taken by a Pt-Ir probe. The scan size was 400 × 400 nm². $I_t = 200$ pA, $V_s = 200$ mV. Chemisorption was confirmed by the existence of depletions.

トンネル電流値, 試料側バイアス電圧はそれぞれ $I_t=200$ pA, $V_s=200$ mV である。アルカンチオール SAM の場合にもよく見受けられるデプレッション層の存在により, SAM がシステイン残基を介した化学結合によって形成されていることが保証される。Mutant II SAM でもほぼ同様の STM 像を得た。

光照射 STM 測定では, 金コート Pt-Ir 探針を試料のある点に固定し, 分光モードに移行して, バイアス電圧をある値に設定した後にトンネル電流の時間変化を測定した。どちらの変異体の場合にも変調周波数に同期するトンネル電流の増加を直接観測することはできなかった。しかしながら Fig. 5 に示すように, ロックイン検波の結果, Mutant I では光電流発生が生じていることが確認された。図で上側が Mutant I のもので, $V_s=600$ mV の時の結果である。ロックインアンプの感度と時定数はそれぞれ $V_{sens}=3$ mV および $T_{cont}=300$ ms であった。一方下側が Mutant II のもので, $V_s=1300$ mV, $V_{sens}=10$ mV, $T_{cont}=300$ ms である。これらの測定では 200 Hz の速い機械的チョッピングに加え, 5 秒間隔でレーザー光自身のオンオフを行っている。したがって Mutant I の場合にはロックイン信号が光スイッチング的振る舞いを見せているのに対し, Mutant II のほうでは測定感度にかかるほどの光電流が発生しておらず, 単なるランダム信号が得られているということになる。なお本測定では, 全体で 20 秒の測定時間の間中 200 ms ごとにフィードバック

Fig. 5 Comparison between two mutant chimera proteins for photocurrent generation investigated by the conventional LI-STM. Only Mutant I (upper) gave a stable lock-in output. Upper (Mutant I): $V_s = 600$ mV, $V_{sens} = 3$ mV, $T_{cont} = 300$ ms. Lower (Mutant II): $V_s = 1300$ mV, $V_{sens} = 10$ mV, $T_{cont} = 300$ ms.

制御を短い時間オンにして, 高さ方向の補正を行っているが, 二次元方向についてはいかなる追跡法も採用していない。そのため横方向に熱ドリフトの影響がある場合には思いがけないアーティファクトが生じる可能性があった。しかしながら, 本測定中のドリフト量はせいぜい数 nm で, 試料が 100 nm 程度の金 (111) 面のテラス上に十分均一にタンパク質が吸着している状態であることを確認しており, その影響は本実験のレベルの範囲内では問題ないものと見なしている。

これら 2 つの変異体の溶液中での分光学的データには有意な差はほとんど見受けられない。STM 像の類似性も合わせて考えれば, 光励起に対する応答の違いは単分子膜構造, 吸着構造の微妙な違いに関係するといえるのかも知れない。GFP と金属基板の距離の違いは励起状態からの金属への非輻射的エネルギー散逸の程度を変えるだろうから, 分子内エネルギー移動の効率にも影響を与えるかも知れない。現状では十分な証拠がないので, 以上のような推測にとどめておくが, 現在いくつかの対照実験(異なる励起波長, チトクロム単体での実験など)を検討中である¹²⁾。そこでは興味深い結果として試料バイアス電圧の依存性も確認しており, 分子内エネルギー移動の効果のみで議論するべきでなく, 分子内電荷移動をも視野に入れた理解が必要になってくる可能性がある。

3.2 近接場照明を使う新しい光照射 STM

Fig. 6 に新しい光照射 STM を用いた Mutant I の光励起応答の様子を示した。光電流測定中はフィードバックオフで, $V_s=500$ mV に固定してある。従来型光照射 STM で得られた結果と異なり, 光の変調に同期した光電流発生がトンネル電流成分の増加という形で明瞭に現れてい

Fig. 6 Photocurrent response of Mutant I measured by the new technique equipped with a “doubly Au-coated optical fiber probe.” The bias voltage was fixed at 500 mV. The feedback conditions were $I_t=480$ pA, $V_s=200$ mV, respectively. The synchronous photocurrent components were obtained.

る。Fig. 6 の信号はトンネル電流そのものであり、Fig. 5 のようにロックイン検波信号ではないことに注意されたい。また後に詳しく説明するが、試料側の性質で光の変調との同期は完璧ではない。なお比較のために行った金(111)表面上での測定ではこのような同期は全く得られていないので、この特徴的な振る舞いは物質由来のものであることは確実である。従来型では生信号にはこのような振る舞いは見られず、ロックイン検波によってはじめて光電流発生証拠を見ることができた。このことは2つの測定の感度に大きな違いがあることを示唆している。我々はこの違いを以下で考察するようにギャップ領域での近接場光強度の違いとして捉えようと考えている。

ここで本研究の光電流測定が単一分子レベルのものであることを主張しておきたい。光照射そのものは光ファイバー探針の開口サイズ全体をカバーするものであるが、測定している物理量が原子・分子レベルの解像度を持つトンネル電流だからである。Fig. 6 で光電流発生が光のオンオフに対して完璧に追従していない件(理由については後述)も、このコンテキストに関してはサポート材料になる。すなわち本測定がもし多数の分子からの応答を見ているならば、光電流発生が全く起きていない不応期間はほとんど隠されてしまうからである。我々はピコ秒時間分解蛍光寿命測定を行い、この融合タンパク質内のエネルギー移動モデルについて詳細の検討を既に行ってきた¹³⁾。b 562-GFP のアポ体と GFP 単体は蛍光寿命に測定精度の範囲内で違いは全く生じないが、ホロ体の場合蛍光寿命が変化した。フェルスター型のエネルギー移動を仮定するとエネルギーアクセプタのない前者二者の場合には GFP の励起状態から基底状態への遷移において項間交差、内部変換、蛍光の各速度定数を加算して、その逆数をとったものが寿命となるが、ホロ体ではそこに消光(チトクロムへのエネルギー移動とみなせる)のプロセスが加わることで寿命が変化する。計算の結果、エネルギー移動の寿命とエネルギー移動効率はそれぞれ 1.3 ns, 0.65 となった。アポ体のみおよびホロ体と GFP の等モル混合溶液中の蛍光強度を 1 とすると、ホロ体のそれが 0.3 程度になる結果も得ているが、0.65 というエネルギー移動効率はこの結果をよく説明する。

さらに光電流の妥当性のチェックを進めていく上で以下の仮定を行う。1) 金基板上でも溶液系同様のエネルギー移動がある。2) チトクロム b 562 からの電子移動が存在する。3) GFP は定常的に励起状態にある(すなわち光照射強度が十分高い)。4) エネルギー移動が律速段階である(電子移動の寿命のデータなし)。この中で最初の2つの仮定は実際に STM で光電流を観測できて

いるので、ここではこれ以上の検証は行わない。ここで検討したいのは仮定3である。もし仮定3が成立するならば、すなわち励起状態から基底状態に遷移した瞬間に系が再び励起状態に遷移できる程光強度が高いならば、1秒間にエネルギー移動の平均寿命 1.3 ns の逆数分だけ電子が生成される。したがって光電流は一分子あたり 120 pA となる。従来型測定でロックイン検波の結果から見積もった電流値は約 6 pA で全くこの仮定が正しくなく、光照射が十分でないことを示唆している。逆に平均約 1 nA の光電流値¹⁷⁾を示した新しい測定ではこの仮定は正しく、測定に関与していた分子の数が数個のオーダーであることがわかる。

従来型測定での電流値を電子の個数に変換すると 3.8×10^7 cps, 分子内での光電変換の効率を 0.1 と仮定すると必要な励起フォトンレートは 3.8×10^8 cps となる。波長 488 nm, 強度 0.1 mW の入射光をフォトンレートに換算すると約 3×10^{14} cps であり、したがってシステムの収率は 10^{-6} となる。遠視野照明ではレンズ系で直径 10 μm の程度に集光して光照射を行う。探針が存在するギャップ領域にどのような近接場が存在しているかの議論は他に譲るとして、ここでは収率を照射面積の比と単純化して考えることにすると、測定に関与していた試料サイズは 10 nm 程度ということになる。分子の大きさ(5 nm 程度)を考えるとこの大雑把な見積もりがある程度妥当であることがわかる。以上の大雑把な議論によって、この従来型測定のシステム収率の低さは、集光されたレーザー光のごく一部のみが関与しているためではないかという当初の予想が的を射たものになっていることが推測される。

光ファイバー探針を使う新しい測定の場合の仮定3の妥当性を同様に検討してみる。可能ならば開口部からの光強度を直接測定することが望ましいが、近接場光強度を直接測定することは非常に困難であるため(原理的に不可能というわけではない)、ここでは第一近似的な見積もりを与えるのみにとどめることにする。励起光は 1 mW で、カプラ部でのロス を 0.5 程度とする。コア径(10 μm)と開口サイズ(100 nm)から見積もられる面積比が 10^{-4} であり、結果開口部での励起フォトンレートは 0.05 μW (1.5×10^{11} cps) となる¹⁸⁾。分子サイズから見積もって、開口部直下には約 300 個の分子が存在する。したがって一分子当たりのフォトンレートは 5.0×10^8 cps となり、2.0 ns に一度はフォトンが来る計算になる。よって先のエネルギー移動寿命 1.3 ns と比較すると、仮定3の妥当性はある程度示せたことになる。現在ここでの議論をより詳細に行うために、特に光電流に関与する分子数を特定するために、例えば Fig. 7 に STM 像を示し

Fig. 7 STM image of Mutant I chimera proteins embedded in alkanethiol SAM. Brighter spots were corresponding to individual proteins.

たアルカンチオール SAM 中にキメラタンパク質を埋め込んだような混合系で実験を開始している。ホロ体をアポ体の中に埋め込んだような系も興味深いかも知れない。ここで再度強調しておきたいことは、このような定量的な見積もりはギャップ領域での光強度の測定を行うことが“原理的”に不可能な従来法では決して行えないものであり、ここに新しい方法の絶対的な利点があるということである。

本測定は非常に高い感度を有するため、ロックイン検波技術を併用すればさらなる高感度測定が実現する。データは示さないが、Mutant I に対して変調周波数を 1 kHz に上げ、 $T_{\text{cont}}=10$ ms に設定しても十分安定した $\text{Acos}\phi$ 信号を得ることができた。従来法では安定した信号を得るために 300 ms の時定数を設定する必要がありイメージングへの応用は絶望的であったが、新しい測定法によればイメージングも十分可能となる。この点に関しても混合 SAM の系を使ってデータ取得に励んでいるところである。

Fig. 6 に示した光電流発生には同期の不完全性および不応期間が確認できる。我々はこれを GFP のオンオフプリンキング（インターミッテンシー）に帰属できるのではないかと推察している¹⁹⁾。すなわち GFP 内部での一重項-三重項遷移に起因して、蛍光発色団がヘムとの間でのエネルギー移動を行わない期間があるかもしれないのである。シラン化処理を施したガラス基板上に吸着させた GFP 単体の全反射蛍光顕微鏡（total internal reflection fluorescence microscope, TIRFM）による一分子蛍光

観察では、ガラス基板である点、GFP の表面密度が 1 分子/ μm^2 である点など本測定とは条件が全く異なるが、ms から s の各オーダーで GFP の蛍光がオフになる期間があることがわかっている²⁰⁾。金基板上では TIRFM 測定が行えないので、本測定を SNOM で実現することを計画中である。

4. 結 論

金属二重コーティング光ファイバー探針を用いた新しい光照射 STM の性能を、光合成反応を模倣して作製したキメラタンパク質からなる SAM を試料として確認した。光電流発生現象そのものは遠視野照明を利用する従来型測定でも検出可能であったが、局所的近接場励起を可能にする新しい方法によって熱膨張効果のほとんどない、桁違いに高感度の測定が実現した。

本測定の延長線上に光電流発生現象を「蛍光」測定と同時に進行展開があり得る。例えば本実験で利用したキメラタンパク質において分子内エネルギー移動効率は 100 % ではなく、GFP の蛍光はある程度残っている。そこで同時測定を単一分子レベルで行うことができれば、分子内エネルギー移動のメカニズムの詳細にさらに肉薄できる可能性がある。現在そういった観測を可能にするべく、蛍光 SNOM に利用することを目論んで作製した ITO/金二重コーティング光ファイバー探針を用いたシステム系を構築中である。本測定がさらに一般化し、生体模倣分子素子および生体模倣膜を調べるための強力なツールとなることを願ってやまない。

謝 辞

本研究の一部は日本学術振興会による科学研究費補助金・若手研究 (B) (課題番号：14750024) のサポートの元に行われた。

文献と注

- 1) M. Volcker, W. Kreiger and H. Walther: Phys. Rev. Lett. **66**, 1717 (1991).
- 2) I. Lyubinetsky, Z. Dohnálek, V.A. Ukraintsev and J.T. Yates, Jr.: J. Appl. Phys. **82**, 4115 (1997).
- 3) A.V. Bragas, S.M. Landi, J.A. Coy and O.E. Martinez: J. Appl. Phys. **82**, 4153 (1997).
- 4) K. Nakajima, R. Micheletto, K. Mitsui, T. Isoshima, M. Hara, T. Wada, H. Sasabe and W. Knoll: Jpn. J. Appl. Phys. **38**, 3949 (1999).
- 5) 中嶋 健, Ruggero Micheletto, 三井圭太, 磯島隆史, 原 正彦, 和田達夫, 雀部博之, Wolfgang Knoll: 表面科学 **20**, 509 (1999).
- 6) T. Saiki and K. Matsuda: Appl. Phys. Lett. **74**, 2773

- (1999).
- 7) K. Lieberman and A. Lewis: Appl. Phys. Lett. **62**, 1335 (1993).
 - 8) K. Nakajima, V. Jacobsen, Y. Yamasaki, J.G. Noh, D. Fujita and M. Hara: Jpn. J. Appl. Phys. **41**, 4956 (2002).
 - 9) 中嶋 健, 原 正彦, 藤田大介: 特願 2001-343195 (平成 13 年 11 月 8 日) および特願 2002-325920 (平成 14 年 11 月 8 日).
 - 10) R.X. Bian, R.C. Dunn and X.S. Xie: Phys. Rev. Lett. **75**, 4772 (1995).
 - 11) K. Nakajima, B.H. Lee, S. Takeda, J.G. Noh, T. Nagamune and M. Hara: Jpn. J. Appl. Phys. **42**, 4861 (2003).
 - 12) B.H. Lee, S. Takeda, K. Nakajima, J.G. Noh, J.W. Choi, M. Hara and T. Nagamune: Biosensors and Bioelectronics, accepted for publication.
 - 13) S. Takeda, N. Kamiya, R. Arai and T. Nagamune: Biochem. Biophys. Res. Commun. **289**, 299 (2001).
 - 14) チトクロムの直接励起でも同じ現象を観測できるはずであるが, GFP の高い量子収率という本質的理由とチトクロムを励起するための波長が光照射 STM では使いにくいというもうひとつの理由によって, 本研究ではより複雑な系を採用した。
 - 15) J.G. Noh, T. Murase, K. Nakajima, H.W. Lee and M. Hara: J. Phys. Chem. **B 104**, 7411 (2000).
 - 16) M. Ohtsu (Ed.): “Near-Field Nano/Atom Optics and Technology” (Springer, Tokyo, 1998).
 - 17) この値は Fig. 6 を含む長時間の測定で光電流が実際に流れている期間のみで平均を取った光電流値である。
 - 18) 実際のフォトンレートは, このような単純な見積もりよりは高い可能性もある。
 - 19) R.M. Dickson, A.B. Cubitt, R.Y. Tsien and W.E. Moerner: Nature **388**, 355 (1997).
 - 20) T. Wang: private communication.