連載企画⑩

～知っておきたい新計測法～

バイオ試料観察における液中
AFM と Q コントロール

牛木 辰男・星 治

新潟大学大学院医歯学総合研究科
顕微解剖学分野

〒951-8510 新潟県新潟市中央区旭町通 1 番町 757

(2007 年 10 月 3 日受理)

Atomic Force Microscopy in Liquid and
Its Q Control for Biological Observation

Tatsuo USHIKI and Osamu HOSHI

Division of Microscopic Anatomy and Bio-imaging,
Niigata University Graduate School of Medical
and Dental Sciences

1 Asahimachi-dori, Chuo-ku, Niigata 951-8510

(Received October 3, 2007)

The atomic force microscope (AFM) has advantages in creating topographic images of the sample surface at high resolution even in a liquid environment, and has been expected to be used as a powerful tool for observing biological samples under the condition closer to the physiological state. However, in contrast with the advances in AFM imaging under ambient conditions, it is still difficult to obtain clear images of biological samples by AFM in liquid, because the samples are usually very soft and uneven, and easily deformed during AFM operation. In this article, based upon our experience, we showed some techniques suitable for imaging biological soft samples by AFM in a liquid environment. Special attention was paid to the dynamic mode AFM for biological studies in liquid. We also introduced a Q-control technique of dynamic mode AFM in liquid, which is helpful for increasing the image quality of soft biological sample.

KEYWORDS : atomic force microscopy, contact mode, dynamic mode, Q-control, biology

1. は じ め に

原子間力顕微鏡 (AFM) は、試料の表面立体形状や物性を高分解能で観察が可能な点で、バイオ分野においてもその応用が期待され、さまざまな試みがなされてきている¹⁾。とくに AFM では、探針・試料間の相互間力を用いて画像を作ることから、真空中だけでなく大気中や液中における測定が可能である。したがって、これまでの電子顕微鏡による解析では得られないような、液中下での、より生理的な条件に近い観察が特に期待されてきた。しかし、大気中での AFM 観察は一般化してきているのに対し、実際に生体試料を液中で AFM 観察してみると、なかなか適切な測定ができないことも多いのではないだろうか。その点でバイオ試料の液中 AFM 観察についてはスタンダードな測定法が確立しているとはいいがたいし、むしろまだ暗中模索の状態にあるといったほうがよいかもしれない。そこで、本稿では、液中 AFM、とくに液中ダイナミックモード測定法について私たちの研究室で行っている方法について述べて、さらに液中 Q コントロールによる像質改善の可能性について簡単に触れることにする。

2. 試料側の特徴と制約

バイオ試料の液中 AFM 観察法について述べる前に、まず、試料側の特徴について整理しておくことにする。一般にバイオ試料は、1) ソフトであること、2) 形状がさまざまであること、3) 観察対象が何かに覆われていることが多いこと、4) 構成成分がヘテロで複雑であること、5) 表面が平坦でないこと、6) 運動するものが多いこと、などをあげることができる。これらの特徴は、じつは真空中や大気中で観察する場合でも問題になるものであるが、液中観察においてはなお一層深刻な問題である。したがって、観察においては試料側の問題を熟知し、適切な試料を選び、適切な試料調整をする必要がある。

3. コンタクトモードによる液中 AFM 観察

上で述べたように、バイオ試料にはさまざまな制約がある。とくにソフトで凸凹が激しい点が測定における最大の問題である。したがって、バイオ試料の測定においては、探針・試料間の力を可能な限り小さくするとともに、一方で大きな高低差に追従できる制御が望まれることになる。この点で、大気中 AFM 観察では、コンタクトモードは試料に強い力が加わるのでほとんど利用され

ず、ダイナミックモードが用いられている。確かに大気中でバイオ試料をコンタクトモードで観察した場合、バイオ試料は親水的なものが多いため、試料の吸着水に探針がトラップされて強い力が加わり、必然的に標本を引っかくようなことになってしまう。しかし、液中においては、このような現象は起きないため、バネ定数の小さいカンチレバーを使えば、思いのほか小さい力で安定して使用できることも多い。実際に培養細胞の液中観察にはこの方法が使われている^{2,3)}。また高低差の変化の小さい高分子観察においても、コンタクトモードによる高分解能観察が報告されている⁴⁾。

4. ダイナミックモードによる液中 AFM 観察

しかし、染色体のようにある程度の高低差があり、線維が糸玉のように巻きついた構造では、コンタクトモードで探針を走査すると、針にクロマチン線維を引っ掛けてしまい、高分解能の観察がまったく望めない。このような試料に対してはコンタクトモードよりさらにソフトな測定法が望まれる。この点で、液中でのダイナミックモード（共振モード）が期待されることになる。

ところで、液中のダイナミックモードによるバイオ試料の観察については、一部の研究者が DNA などの生体高分子における良好な測定結果を報告しているにしても、実際に自分で試みてみると、安定した測定がなかなか難しいのではないだろうか。おそらくその理由は、現在市販されている AFM で使用しているカンチレバーの特性、特に形状にあるのではないと思われる。すなわち、一般的なカンチレバーの形状は短冊形ないしピラミット型なので、いずれも液中で振動させるとダンピングが激しくなる。つまり団扇のようなカンチレバーを感度よく共振させるのにはもともと無理があるわけである。

しかし、液中でのダイナミックモード測定の条件をいろいろ検討してみると、ある程度柔らかい探針を用いて、液中における正しい共振点（大気中の共振点の 1/3 ほどの周波数）を選択すれば、安定してかなり高分解能のイメージングが可能であることがわかってきている。たとえば染色体であれば、バネ定数が 0.08~0.4 N/m 程度の V 字型カンチレバーを用い、10 kHz 近傍の共振点を選ぶことで比較的安定した観察が可能となる^{5,6)}。

ただし測定においては、最低限でも Q 値が 1~2 程度あることが必要である (Fig. 1)。この Q 値は、カンチレバーの共振特性を示す値で、カンチレバーの共振周波数変化 (Q カープ) を測定して求めることができる。Q 値が高いということは、カンチレバーが共振点で特異的に大きく振動することを意味するので、感度の高い AFM 観察が期待できる。しかし液中では、ダンピング

Fig. 1. Topographic image of human chromosomes obtained by dynamic mode AFM in phosphate buffered saline. For imaging, a V-shaped silicone nitride cantilever with a length of 120 μm and a nominal spring constant of 0.32 N/m was used. $Q = 1.847$.

により振幅が下がるので、Q 値もかなり低くなってしまふ。結果としてホルダーやカンチレバーの状態によって Q 値がでない場合もあるが、その場合でもカンチレバーを代えるなり、ホルダーのおき方を検討するなどして Q 値がでる条件を見つける必要がある。とにかく Q 値がでないのに測定しようとしたり、カンチレバーの本来の液中共振点と異なるところで動作点を選んでも、良い像は安定して得られない。

なお、測定時の探針・試料間力は、走査の際に試料表面を探針が追従できる最小の力に調整しておく必要がある。また走査スピードは、コンタクトモードに比べればはるかに遅い設定にする必要が生じる。これらについては、測定時にフォースカーブを確認し力の状態を把握したうえでシングルラインの走査を行い、その行き帰りの形状像と誤差信号像をチェックして、走査の追従の状態と発振の有無を十分把握し、各パラメータを細心に調節することで最適条件を見つける。

5. Q コントロールを用いた液中ダイナミックモード AFM 観察

最近、ダイナミックモードにおいて Q コントロールという方法が用いられるようになってきた^{7,8)}。この方法は、ごく簡単にいえば、ダイナミックモード測定時にカンチレバーの振動から速度信号を検出し、加振信号にこの情報を加えることで、カンチレバーの Q 値を制御する方法である。つまり、Q コントロール法により、カンチレバー本来の共振により決まってくる Q 値を必要に応じて高くしたり低くしたりすることができる。

ところで、上で述べたように、液中ダイナミックモード観察においては、粘性の高い水の中でカンチレバーを

(a)

(b)

Fig. 2. AFM images of human chromosomes showing the effect of Q control in a liquid condition. Fig. 2(a) was obtained by dynamic mode AFM without Q control ($Q=1.610$), while Fig. 2 (b) was obtained after increasing the Q value with Q control ($Q=4.025$). The cantilever was V-shaped with a length of $120\ \mu\text{m}$ and a nominal spring constant of $0.32\ \text{N/m}$.

振動させるために、 Q 値が $1\sim 2$ ときわめて低くなるのが一つの問題である。そこで、 Q コントロール法を用いて Q 値を上げることができれば、感度が向上し安定した液中イメージングができるのではないかと期待されるのである⁹⁾。

実際に Q コントロール法により、液中の Q 値を高める実験を行ってみると、通常 1 ないし 2 程度の Q 値を数倍程度向上させることで、多少画質が向上するようである (Fig. 2)。とはいえ、この Q コントロール法は、あくまでも通常の液中ダイナミックモード観察ができる場合、つまり Q 値が測定できて、上で述べたような液中観察条件が適正に調節可能な場合についていえること

である。その点では、 Q コントロールにより Q 値を上げる方法は、通常の液中観察の感度をあげて、安定した測定を行う目的で使用されるものと考えらるべきである。その結果、高分解能で S/N の向上が見込まれるとしても、もともと Q 値がでないような条件で Q コントロール法を用いても、せいぜいノイズを大きくするだけでよい結果は当然得られない。

6. お わ り に

私たちが試みてきた生体試料の液中 AFM 観察について、とくに液中ダイナミックモード観察とその Q コントロール法の特徴と観察法を中心に述べた。しかし、ここで解説した方法は、あくまで私の研究室での経験を述べたものに過ぎず、他からみるとレベルの低い内容が多く含まれているのかもしれない。しかし、いずれにしても、液中観察法はまだ確立されたものとはいいがたく、今後改善されなければならない問題点が多く残されているのが現状であるのは確かであろう。

一方で、冒頭にも述べたように、生体試料の液中 AFM 観察はバイオ分野においてもっとも期待される領域である。その点で、ハードとソフトの両面において、この分野の今後の更なる発展が待たれるし、AFM のバイオ応用に興味をもつ研究者が、さまざまなノウハウを共有し、液中のスタンダードな観察法を確立させることが重要になってきているのではないだろうか。

文 献

- 1) T. Ushiki : "Micromachines as Tools for Nanotechnology", ed. by H. Fujita (Springer, Berlin-Heidelberg, 2003) p. 121.
- 2) T. Ushiki, J. Hitomi, T. Umemoto, S. Yamamoto, H. Kanazawa and M. Shigeno : Arch. Histol. Cytol. **62**, 47 (1999).
- 3) T. Ushiki, S. Yamamoto, J. Hitomi, S. Ogura, T. Umemoto and M. Shigeno : Jpn. J. Appl. Phys. **39**, 3761 (2000).
- 4) D.J. Muller, J.B. Heymann, F. Oesterhelt, C. Moller, H. Gaub, G. Buldt and A. Engel : Biochim. Biophys. Acta **1460**, 27 (2000).
- 5) O. Hoshi, R. Owen, M. Miles and T. Ushiki : Cytogenet. Genome. Res. **107**, 28 (2004).
- 6) O. Hoshi, M. Shigeno and T. Ushiki : Arch. Histol. Cytol. **69**, 73 (2006).
- 7) A.D. Humphris, A.N. Round and M.J. Miles : Surf. Sci. **491**, 468 (2001).
- 8) A. Janke and T. Pompe : "Force Microscopy : Application in Biology and Medicine", ed. by B.P. Jena and J.K.H. Hörber (John Wiley & Sons, New Jersey, 2006) p. 201.
- 9) T. Ushiki, O. Hoshi, K. Iwai, E. Kimura and M. Shigeno : Arch. Histol. Cytol. **65**, 377 (2002).