

プローブ顕微鏡による 単一分子間相互作用の解析

原稿受付 2003年6月12日
“トライボロジスト” 第49巻 第1号 (2004) 42~48

武内 修
保田 諭
重川 秀実

筑波大学 理工学系 21世紀COE
(〒305-8573 茨城県つくば市天王台1丁目1-1)
三宅 晃 司
産業技術総合研究所 機械システム研究部門
(〒305-8564 茨城県つくば市並木1丁目2-1)

1. はじめに

ナノマシン, 分子モータ, 超敏感センサ, 超高密度メモリ, 量子素子. ナノ ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) の世界で構造を制御し, 目的とする機能 (物性) を実現する試みが盛んに進められている. 多くの場合, こうした機能は構成要素の精密な位置制御や運動を含むため, ナノスケールでの摩擦・摩耗・潤滑の理解と制御は機能実現のための最重要課題となる.

さらに, 対象が微細化・精密化するにつれ, 個々の構成要素 (たとえば単一分子) のわずかな差異により, 実現される機能のすべてが左右されることが起こる. このため, 平均化された情報を得るのではなく, 個々の素子を対象として, 原子, 分子レベルで素子間の相互作用を正しく理解, 評価し制御する技術の確立が必要とされている. 実際, 単分子機械であれば, トライボロジーは分子間相互作用と同義であり, 個々の分子の個性がそのまま顔を出す. また, 溶液環境であれば, 溶媒和が分子レベルで影響を及ぼす等, 種々の環境下で極限レベルの計測技術が必要である. こうした技術として最も有望な手法の一つと考えられるのが, 本稿で紹介する原子間力顕微鏡法 (Atomic Force Microscopy: AFM)^{1,2)} を利用した分子間相互作用の解析である.

AFMは, SiNなどを材料に微細加工で作った非常に柔らかい板ばね (カンチレバー) をフォースプローブとして用い, プローブ先端に形成された針 (探針) と試料表面との間に働く微小な力 ($\sim \text{pN}$) を測定する装置である^{1,2)}. 探針や試料の表面を特定の分子で化学修飾することにより, これら分子の間に働く相互作用を単一分子レベルで測定することが可能になる.

2. フォース曲線と凝着力

図1(a)にAFMを用いて凝着力を測定する原理を示した. AFMのばねの付け根を試料に垂直方向に移動させ, ばねのたわみから探針と試料の間に働く力を検出する. 相互作用の測定では探針を試料に近づけ, 接触させ, 引き離す. 図1(b)は得られた力をばね移動量に対してプロットした模式図で, フォース曲線と呼ばれる. ばねが相互作用によりわん曲するため, ばね移動量は試料・探針間の距離変化と一致しないことに注意が必要である.

順を追ってグラフを見ていこう. (1)探針を試料に近づけていくと, (2)の時点で探針は試料からの引力に吸い寄せられ, 両者が接触するまではばねがたわむ. さらに押し込むと, 表面からの斥力で探針は自然な状態に戻り, (3)続いてばねが斥力を感じる領域に入る. (4)ある位置からばねを

Analysis of Single Molecular Interaction by Using Scanning Probe Microscope

By Osamu TAKEUCHI, Satoshi YASUDA, Hidemi SHIGEKAWA, Institute of Applied Physics, 21 st COE, University of Tsukuba (1-1, Tennodai 1-chōme, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8573, URL: <http://dora.ims.tsukuba.ac.jp>) and Koji MIYAKE, Institute of Mechanical Systems Engineering, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) (2-1, Namiki 1-chōme, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8564)

Key Words: *molecular interaction, biomolecule, molecular recognition, body-antibody reaction, scanning probe microscopy, dynamic force spectroscopy, atomic force microscopy*

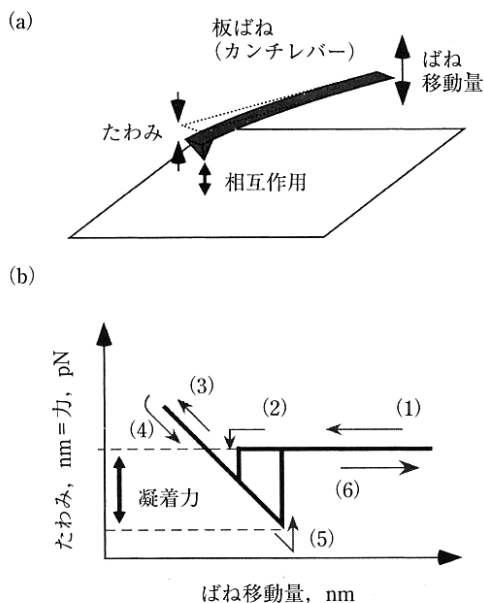


図1 AFMによる凝着力測定

引き戻すと、平衡点を通過した後、凝着力のため探針・試料間に張力が働き、(5)張力が一定の力に達すると付着面がはがれて、(6)ばねが自然な状態に戻る。(5)の時点での飛びが凝着力を与える。

例として、二つのシリカ球 (SiO_2 : 半径 $0.5\sim 2.5\ \mu\text{m}$) の間に働く凝着内を測定した結果を図2に示した³⁾。挿入図にSEM写真を示してあるように、半径 R_1 のシリカ球をAFM探針に接着し、ガラス台に固定したもう一方のシリカ球 (半径 R_2) と接触させ、引き離す。さまざまな半

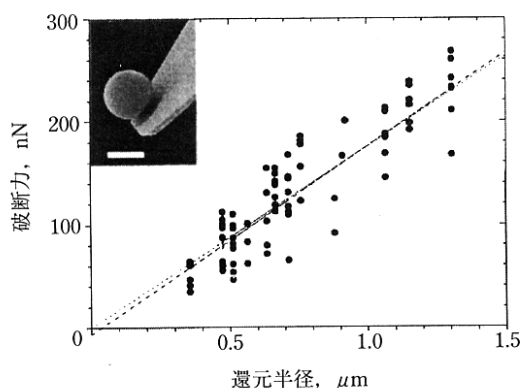


図2 二つのシリカ球に働く凝着力〔出典：文献3〕

径のシリカ球に対する実験結果から、グラフのように凝着力と還元半径 $R=R_1R_2/(R_1+R_2)$ との間に比例関係が確認された。二つの剛体球の付着力の解析に用いられるJKR理論⁴⁾では、引離し力 F_{JKR} は、 γ を有効表面エネルギーとして、 $F_{\text{JKR}}=3\pi\gamma R$ と表わされる。JKR理論は、大きく、柔らかく、高い表面エネルギーをもつ粒子に適用されるが、小さく、堅い粒子を扱ったDMT理論⁵⁾では、 $F_{\text{DMT}}=4\pi\gamma R$ と少し大きめの値になる。

実験で得たグラフの傾き $F/R\sim 0.176\ \text{N/m}$ から、表面エネルギーとして、 $\gamma\sim 0.0186\ \text{J/m}^2$ (JKR), $\sim 0.0140\ \text{J/m}^2$ (DMT) が得られる。これらは、他の手法で求められたシリカの表面エネルギーよりも多少小さく、その理由はいまだ明らかになっていないが、グラフに現われた線形性はこのスケールでJKRやDMTモデルが有用性を失っていないことを示すと考えられている。

3. 化学力顕微鏡

球状シリカの代わりに、特定の分子を探針と基板に取り付けることにより、分子間の相互作用を検出することが可能になる。この手法は化学力顕微鏡法 (Chemical Force Microscopy: CFM) と呼ばれる⁶⁾。探針や試料へ分子を固定するには、たとえばAu-Sの化学結合を利用した自己組織化単分子膜形成法を応用することができる。この場合、対象分子は一端にチオール基 (-SH) が付加され、有機溶媒に溶かされる。ここに、金コートした探針や基板を浸すと、図3のようにAu-Sの結合により分子を表面に均一に付着させることができる。

分子で修飾した探針と基板を用いてAFMのフ

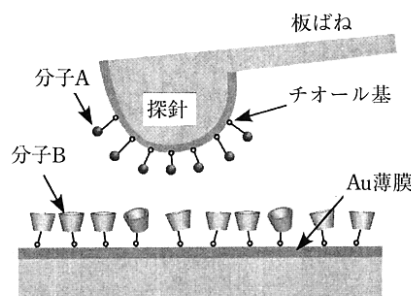


図3 化学力顕微鏡の模式図

フォース曲線を測定すると、一般には両者の間に複数の分子結合が生成し、破断する。結合が一つ一つ破断する過程でフォース曲線は階段状になるが、最後に現われる破断力の大きさは、分子対一つあたりの結合力の整数倍になることが期待される。そこで、測定を多数回繰り返し、破断力のヒストグラムを作成すると、周期的に山が現われ、その間隔から単一分子対の破断力が求められる。

例として、アビジン (avidin) とビオチン (biotin) 間の相互作用について、破断力のヒストグラムおよびその相関関数を図 4 に示した⁶⁾。この二つの生体分子は非常に強い分子結合を形成することで知られており、分子化学的なラベリングや免疫分析、ドラッグデリバリーシステムなどへの応用が行なわれている重要な系である。破断力のヒストグラムに周期構造が確認され、単一分子間力が 160 ± 20 pN として求まった。

この方法で単一分子間力を得るには、求める力の値に比べてヒストグラムのビンサイズを十分に小さくとり、なおかつ個々のビンに十分な数が入るだけの測定回数が必要となる。したがって、分子間力に対して測定値のばらつきが大きい場合、

周期構造の確認は困難である。このような場合にも、次に述べるポアソン法⁷⁾により解析ができることがある。

一つの分子結合を切断するのに必要な力を F_s 、測定領域にある分子の総数を N_{tot} 、一つの分子が測定中に結合を生成する確率を p としよう。一般に N_{tot} は探針先端の曲率半径で決まり、比較的大きな数となるが、実験では p を小さく保つことで、測定中に形成される分子結合数、つまり、破断力に寄与する分子結合数 N_{ob} を小さな値となるよう調節する。このとき、測定を繰り返したときの N_{ob} の分布はポアソン分布になるため、その平均値 μ_b と分散 σ_b^2 の間には $\mu_b = \sigma_b^2$ の関係が期待される。測定で得られる破断力は $N_{ob}F_s$ であるから、その平均値は $\mu_{ob} = \mu_b F_s$ 、分散は $\sigma_r^2 = \sigma_b^2 F_s^2$ となり、このとき $\sigma_r^2 / \mu_{ob} = (\sigma_b^2 F_s^2) / (\mu_b F_s) = F_s$ が成立する。すなわち、破断力分布の分散を平均値で割ることで、単一分子間力が求まる⁷⁾。

4. 動力学的な力の測定

化学力顕微鏡法 (CFM) が種々の系に適用される中で、CFM の破断力がカンチレバーを試料から引き離す速度に依存して変化するという報告がなされるようになった。破断力は探針の移動速度の対数に対して線形に増加した。E. EVANS はこの現象を正しく記述する理論を 1997 年に発表し、動的力分光法 (Dynamic Force Spectroscopy: DFS) という測定手法を確立した^{8,9)}。以下に、DFS の考え方を簡単に紹介する。

4.1 分子結合の寿命

分子結合は、結合を破断させるのに必要な破断エネルギー障壁 E_b によって規定される。2 分子間の結合ポテンシャルの概念図を図 5 (a) に示した。ポテンシャルの最小点が通常状態における分子結合距離を与える。分子対に外力 f が加わるとポテンシャルは図 5 (b) のように変形する。熱エネルギーを無視した議論では、 f を徐々に大きくしていくと、 f が dE/dx の最大値を越えたところでエネルギーバリアが消失し、結合が破断する。この場合、破断力 $f_{rupture}$ は $(dE/dx)_{max}$ で与えられ、引張速度に依存しないはずである。

EVANS は熱エネルギーに焦点を当てることで、

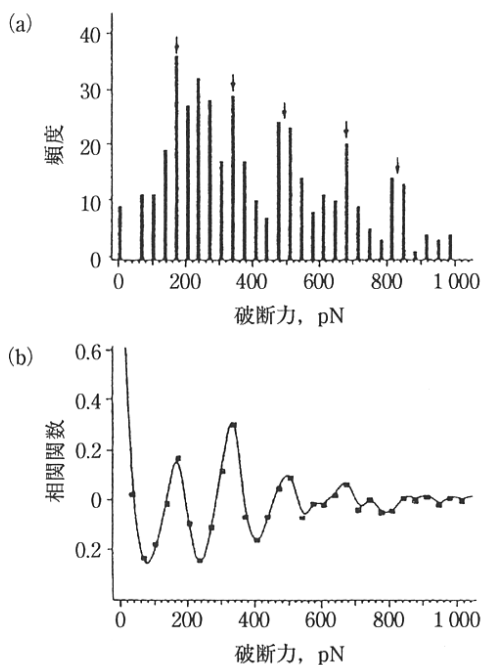


図 4 avidin-biotin 間相互作用の CFM 測定
〔出典：文献 6〕

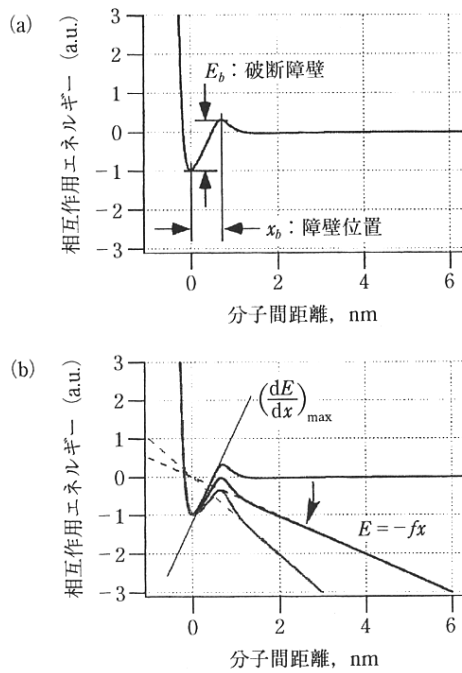


図5 分子間相互作用ポテンシャル

引張速度に依存する測定結果を次のように説明した。一般に、生命活動で重要な役割を担う分子結合は、室温あるいは体温の環境で、容易に結合・破断することができ、その絶妙なバランスが分子の機能そのものとなる。これは、分子結合の破断障壁 E_b が熱エネルギー $k_B T \sim 4 \text{ pN} \cdot \text{nm}$ (300 K) と同程度であることを意味し、このとき、分子結合は外力がなくても熱による攪乱の下で有限の自然寿命 t_{off} をもつ。BELLによれば、 $t_{\text{off}} = t_b \exp[E_b/k_B T]$ と表わすことができる¹⁰⁾。ここで、 t_b は結合ポテンシャルの形状に依存する係数で、 $k_B T$ が E_b に等しいときの寿命を与える ($1/t_b$ は試行周波数と呼ばれる)。

外力 f が加わってポテンシャルが図5 (b) のように変化すると、障壁高さは fx_b だけ減少し $E_b - fx_b$ となる (x_b は自然結合位置から測った障壁位置)。したがって、外力 f の下での結合寿命は (f による t_b の変化が無視できるとき)、

$$t_{\text{off}}(f) = t_{\text{off}}(0) \exp[-fx_b/k_B T] \quad (1)$$

と表わすことができる。CFMのように外力を徐々に増加させると、それに伴い結合寿命は短く

なり、 $fx_b < E_b$ のいずれかの時点で破断する。実際の破断点 (測定値) は理想的な条件下においても決定的ではなく、結合寿命の減少と外力の加重速度とのバランスで定まる確率分布に従って原理的なばらつきを示すことになる。

4.2 加重速度と破断力

以下では式(1)を用いて、破断障壁の高さ E_b および位置 x_b 、外力の加重速度 v_f の関数として破断力の確率分布 $p(f)$ を求める。そして、実験結果から E_b や x_b を得る手法を導出する。

加重速度を一定値 v_f と置く。すなわち、 $f(t) = v_f t$ である。始め結合状態にあった分子対が時刻 t で結合を維持している確率を $S(t)$ と書くと、いったん切れた分子対が再結合する確率が無視できるとき、 $dS/dt = -S/t_{\text{off}}(f)$ が成り立つ (寿命 t_{off} の逆数が破断速度を与える)。 $S(0) = 1$ を用いて、この微分方程式を積分すると、

$$S(t) = \exp\left[-\int_0^t t_{\text{off}}(f(t'))^{-1} dt\right] \quad (2)$$

を得る。

破断力分布 $p(f)$ は $-\partial S/\partial f$ で与えられ、

$$p(f) = \frac{S(f/v_f)}{v_f t_{\text{off}}(f)} \quad (3)$$

である。図6に示すように、破断力は広い範囲に分布することがわかる。分布の頂点を与える最頻破断力 f^* は $dp/df = 0$ を解いて、

$$f^* = \frac{k_B T}{x_b} [\ln(v_f) + \ln(t_{\text{off}}(0)) - \ln(k_B T/x_b)] \quad (4)$$

と求まる。すなわち、実験で複数の加重速度 v_f について破断力分布 $p(f)$ を測定すると、最頻破断力 f^* は加重速度の対数 $\ln(v_f)$ に比例し、比例係数から x_b が、 x 切片から結合の自然寿命

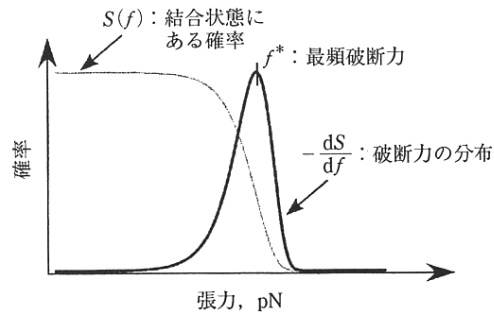


図6 加重速度一定における破断力分布

$t_{off}(0)$ が得られることになる。

4.3 実際の測定例

次に DFS の測定例を紹介する⁹⁾。この研究は破断力測定に AFM のカンチレバーではなく、マイクロピペットで圧力調節した赤血球をばねとして利用する Biomembrane Force Probe (BFP) という手法を使ったものであるが、考え方は AFM を使った場合と共通である。二つのガラスビーズを用意し、片方にアビジンまたはストレプトアビジン (streptavidin) を、もう片方にビオチンを固定する。両者を接触させ、この間に形成される分子結合の破断力を測定する。重要な点として、ガラスビーズ上での分子の密度を低くすることで、1 回の接触あたり分子結合が形成される確率を 10% 程度に設定している。この条件では 1 回の接触で複数の結合が生じる可能性を無視できるため、解析が容易になる。加重速度を 6 桁の範囲で変化させて測定した破断力分布および最頻

破断力を図 7 に示す。前節では最頻破断力と対数加重速度とに線形関係を予想したが、一般に DFS の測定結果は図 7 (b) のように折線状になる。これは現実の分子結合ポテンシャルに複数の障壁が存在するためであり、折線を形成する個々の線形セグメントから、それぞれの障壁について、位置と、高さの情報を得ることが可能である。

5. より精密な測定にむけて

図からもわかるとおり、単一分子結合の破断力は非常に小さく (10~100 pN)、これを正確に測定するためには実験上のさまざまな困難を解決する必要がある。特に、分子間結合以外のマクロスコピックな凝着力を除くための適切な試料の製作、測定精度の原理的な限界を与える熱雑音の低減、分子対に加える外力の適切な制御の 3 点が測定結果の信頼性を大きく左右する¹¹⁾。

5.1 試料の作成

DFS の試料は図 3 のように探針と基板にそれぞれ測定対象となる分子を固定して作成する。通常、これらの分子には長い分子鎖 (ポリエチレングリコール分子など、数十 nm 程度) が取り付けられ、その反対側が表面に固定される。これは、分子破断の瞬間に探針と対向基板との距離を十分に確保して、バルク同士の長距離分子間力が及ぼす影響を軽減するためである。また、分子の運動スケールに対して非常にゆっくりとしか運動できないマクロスケールのばね先端に直接分子を取り付けると、分子の自由な運動を阻害してしまい、いったん破断した分子対が再結合する確率を無視できない程度に上げてしまうので、分子鎖にはこれを抑える利点もある。さらに後述のとおり、長い分子鎖がナノスケールのゴムとして働くことで、測定精度を向上させる効果も期待できる。測定対象となる分子は探針と基板とに一定の密度で固定されるが、1 回の接触で多数の分子結合が生じることがないように、分子の密度は低く設定される。

5.2 探針のブラウン運動

DFS に用いられる非常にやわらかいばねは、水中の花粉と同様に溶媒中でブラウン運動による振動を示す。この振動は力の測定や制御に対してノイズとなるため好ましくない。ばね (フォース

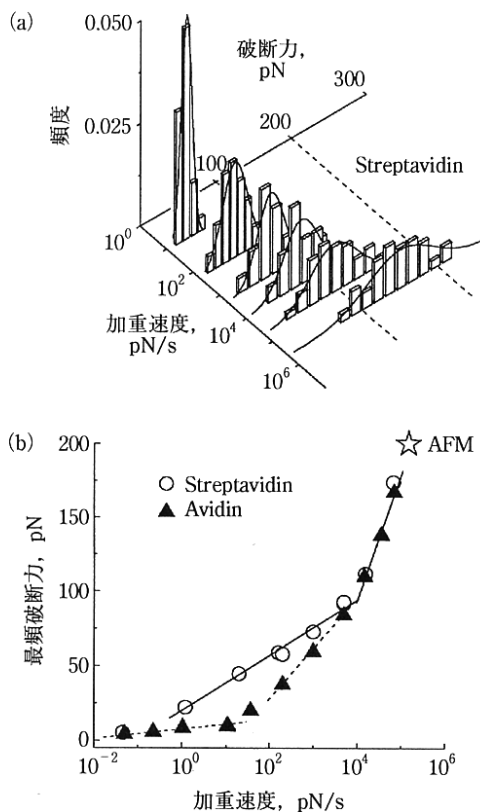


図 7 DFS の測定例 (出典: 文献 9))

プローブ) の熱振動振幅 Δx は、熱エネルギーの等分配則 $k_{fp}\Delta x^2/2 = k_B T/2$ により、 $\Delta x = \sqrt{k_B T/k_{fp}}$ として与えられる。ここで k_{fp} は用いるばねのばね定数である。対応してフォース曲線上での熱揺らぎ Δf は $k_{fp}\Delta x$ により与えられ、 $\Delta f = \sqrt{k_B T \cdot k_{fp}}$ となる。これは、揺らぎを減らすにはやわらかいばねが適することを示している。このため、これまで DFS には、最もやわらかい AFM カンチレバーよりもさらに 1~2 桁やわらかいばねが実現可能な BFP や LOT (Laser Optical Tweezers) といった手法が用いられることも多かった。

しかし、実際の測定系は図 8 に示すとおり、ばね、測定対象の分子対、分子対を基板とばねとに結び付ける分子鎖、の三つから構成されており、正確な記述には系全体を考慮した議論が必要となる。まず、探針にはばねと分子鎖との両者により力が加えられるため、運動における実効的なばね定数は $k_{fp} + k_{rub}$ となる。ここで、 k_{rub} は分子鎖のスティッフネス。すると、ばねの熱振動は、 $\Delta x = \sqrt{k_B T / (k_{fp} + k_{rub})}$ 、フォース曲線上での振幅は、 $\Delta f_{\text{apparent}} = \sqrt{k_B T \cdot k_{fp}^2 / (k_{fp} + k_{rub})}$ となり、ここでも小さな k_{fp} が小さな $\Delta f_{\text{apparent}}$ を与える。しかし、実際に分子対に力を及ぼすのが分子ゴムであることを考えると、分子結合にかかる力の揺らぎは $k_{fp}\Delta x$ で評価すべきである。われわれはこの点を始めて指摘し、結果として $\Delta f_{\text{apparent}} = \sqrt{k_B T \cdot k_{fp}^2 / (k_{fp} + k_{rub})}$ なる式を得た。この式から、やわらかいばねと硬い分子鎖を用いることが有効とされてきたこれまでの指針¹²⁾とは 180 度異なり、硬いばねと、やわらかい、すなわち長い分子鎖を用いるほど分子対にかかる力の揺らぎを小さくできることが理解される。ただし、硬いば

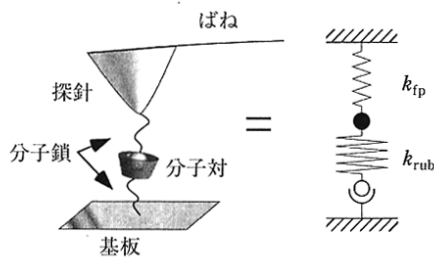


図 8 分子鎖の重要性

ねを用いると装置の安定性や、熱振動以外のノイズ成分の影響が顕著になるため、実験に際しては装置の特性を考慮したうえでフォースプローブのばね定数を慎重に決定することが必要になる。

5.3 探針位置制御

EVANS らが指摘しているように¹²⁾、硬いばねと長い分子鎖を用いた測定には新たな困難が伴う。本来 DFS は張力の加重速度 v_f を一定にしたうえで破断力分布を測定する。ところが、これまで行なわれた DFS 測定はすべて、より簡便な方法として試料に対するプローブ根元部分の移動速度 v_x を一定にして行なわれてきた。分子対を表面に固定する分子鎖部分の伸びが、プローブのたわみの変化に対して無視できる場合には $v_f = k_{fp}v_x$ の関係から、 v_x 一定は v_f 一定と同義であるが、分子鎖の伸びを考慮した場合には一般に v_f が $k_{fp}v_x$ よりも小さな値となり、分子鎖が伸びるに従って $k_{fp}v_x$ に近づくことになる。特に、プローブよりも分子鎖のスティッフネスが小さい条件ではこの影響が顕著になる。

そこでわれわれは、分子のスティッフネスが問題となる状況でも、プローブのたわみを検出してプローブ移動速度へとフィードバックすることで加重速度を一定に保つことのできる測定装置を新

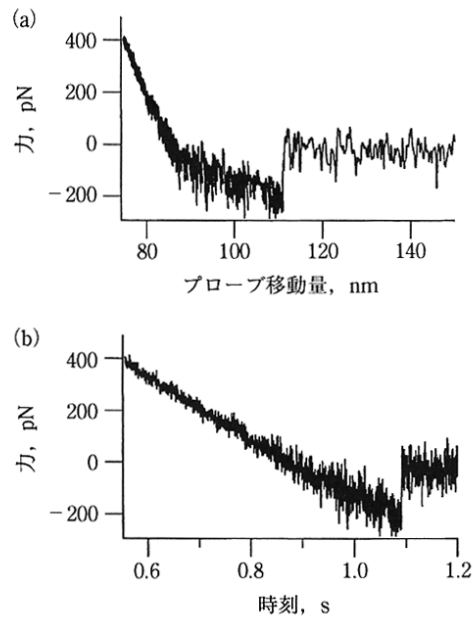


図 9 加重速度のフィードバック制御

たに開発した。図9はこの装置を用いたアビジン・ビオチン分子間力測定の実例である。測定中の張力の変化を、(a)プローブ移動量および(b)時刻に対してプロットしてある。図9(a)から分子ゴムのスティッフネスが探針・試料間距離に依存して変化するのが確認できるが、これに対応する形でプローブ移動速度を調節することにより、時間に対する加重速度変化を非常に小さく抑えられていることが図9(b)に示されている。

6. まとめ

プローブ顕微鏡を用いた単一分子間相互作用の解析法について述べてきた。こうした手法の他、 C_{60} をベアリングとした特性評価^{13,14)}、LB単分子膜の配向と摩擦力の関係¹⁵⁾、探針と試料の格子不整合により現われる超潤滑の解析¹⁶⁾等、ナノスケールのトライボロジーに関する興味深い研究が進められている。新たな技術を導入することにより、これまで明らかでなかった現象の理解が深まるだけでなく、新しい物性(機能)を創製する可能性が開けるなど、さらなる科学技術が展開することは歴史の示すところである。ナノテクノロジーの基盤となるナノスケールのトライボロジーが発展することにより、次世代の科学技術が開花することを願ってやまない。

文 献

- 1) G. BINNIG, C. F. QUATE & C. H. GERBER: Phys. Rev. Lett., **56** (1986) 930.
- 2) 森田清三: はじめてのナノプローブ技術, 工業調査会(2001); 三浦登・毛利信男・重川秀実: 朝倉物性物理シリーズ4 極限実験技術, 朝倉書店(2003).
- 3) L. -O. HEIM, J. BLUM, M. PREUSS & H. -J. BUTT: Phys. Rev. Lett., **83** (1999) 3328.
- 4) K. JOHNSON, K. KENDALL & A. ROBERTS: Proc. R. Soc. London A **324** (1971) 301.
- 5) B. DERJAGUIN, V. MULLER & Y. TOPROV: J. Colloid Interface Sci., **53** (1975) 314.
- 6) E. FLORIN, V. MOY & H. GAUB: Science, **264** (1994) 415.
- 7) Y. -S. LO, N. D. HUEFNER, W. S. CHAN, F. STEVENS, J. M. HARRIS & T. P. BEEBE, Jr.: Langmuir, **15** (1999) 1373.

- 8) E. EVANS: Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., **30** (2001) 105.
- 9) R. MERKEL, P. NASSOY, A. LEUNG, K. RITCHIE & E. EVANS: Nature, **397** (1999) 50.
- 10) G. I. BELL: Science, **200** (1978) 618.
- 11) O. TAKEUCHI, M. FUJITA, S. YASUDA, S. JARVIS & H. SHIGEKAWA: The Abstract Book of The 10th International Colloquium of Scanning Probe Microscopy (2002) 71.
- 12) E. EVANS & K. RITCHIE: Biophys. J., **76** (1999) 2439.
- 13) K. MIURA, S. KAMIYA & N. SASAKI: Phys. Rev. Lett., **90** (2003) 055509.
- 14) Q. LIANG, O. K. C. TSUI, Y. XU, H. LI & XIAO: Phys. Rev. Lett., **90** (2003) 146102.
- 15) A. BUMS & R. CARPICK: App. I. Phys. Lett., **78** (2001) 317.
- 16) M. HIRANO, K. SHINJO, R. KANEKO & Y. MURATA: Phys. Rev. Lett., **78** (1997) 1448.

著者プロフィール

武内 修



1972年生まれ。東京大学理工学部に於て博士(工学)を取得。現在、筑波大学理工学系助手。専門はプローブ顕微鏡を用いた表面物理。単一分子間相互作用の解析のほか、超短パルス光を組み込んだ時空量領域での極限計測技術の開発など。歌唱力は業界一?

保田 諭



1975年生まれ。筑波大学大学院工学研究科知能機能工学専攻博士課程修了。博士(工学)。現在、日本学術振興会特別研究員(PD)として、筑波大学重川研究室に所属。主に、自己組織化を利用した分子素子の開発と応用研究、分子間相互作用の評価に従事。趣味はスキーなど。

三宅 晃司



1970年生まれ。筑波大学大学院工学研究科物質工学専攻博士課程修了。博士(工学)。筑波大学助手を経て、現在、産業技術総合研究所機械システム研究部門研究員。自己組織化を利用した超分子の集積化、分子素子への応用研究等に従事。趣味はサッカー、バスケットボールなど。

重川 秀実



東京大学工学研究科博士課程物理工学専攻中退・博士(工学)。東京大学工学部物理工学科、筑波大学物質工学系を経て、現在、筑波大学理工学系に勤務。専門は主に走査プローブ顕微鏡を用いた極限計測・量子マニピュレーション。息抜きは映画とサウナに楽しいお酒。