

博士論文

高速原子間力/一分子蛍光顕微鏡 複合機の開発

金沢大学大学院自然科学研究科

数物科学専攻

学 籍 番 号 1323102007

氏 名 福田 真悟

主任指導教員名 内橋 貴之

提 出 年 月 2016年1月7日

目次

目次	2
要旨	5
第 1 章 序論	6
1.1 研究の背景	6
1.2 本学位論文の構成	8
1.2.1 高速 AFM / 蛍光顕微鏡複合機の開発ー第 2 章ー	8
1.2.2 プローブ走査型高速 AFM のための機械的カンチレバー固定法の開発ー第 3 章ー	8
1.2.3 金属プローブによる電場増強一分子高速 AFM / 蛍光顕微鏡相関法の開発ー第 4 章ー	9
1.2.4 高速 AFM/超解像光学顕微鏡複合機の開発ー第 5 章ー	9
第 2 章 高速 AFM / 蛍光顕微鏡複合機の開発	10
2.1 目的及び概要	10
2.2 プローブ走査型高速 AFM	12
2.2.1 装置概要	12
2.2.2 レーザービームトラッキング	13
2.2.3 スキャナー	15
2.2.4 材料及び試料	16
2.2.5 ミオシン V-HMM のアクチンフィラメントに沿った歩行運動の観察	19
2.3 全反射蛍光顕微鏡(TIRFM)	31
2.3.1 概要	31
2.3.2 光学系	33
2.4 高速 AFM / 蛍光顕微鏡複合機	37

2.4.1 装置概要.....	37
2.4.2 材料及び試料.....	37
2.4.3 高速 AFM / 蛍光顕微鏡同時観察.....	38
2.5 まとめ.....	43
第 3 章 プローブ走査型高速 AFM のための機械的カンチレバー固定法の開発.....	45
3.1 目的と概要.....	45
3.2 実験.....	47
3.2.1 装置及び測定方法.....	47
3.2.2 プレートスプリングを用いたカンチレバー固定法.....	47
3.2.3 ネジを用いたカンチレバー固定治具.....	48
3.2.4 スキャナーの土台部分にカンチレバーの治具を作る方法.....	48
3.2.5 生体分子の観察.....	49
3.3 まとめ.....	60
第 4 章 金属プローブによる電場増強一分子高速 AFM/蛍光顕微鏡相関法の開発.....	61
4.1 目的と概要.....	61
4.2 実験.....	63
4.2.1 装置.....	63
4.2.2 プローブの金属修飾.....	63
4.2.3 金属修飾プローブによる蛍光の増強効果.....	64
4.2.4 蛍光色素一分子の S/N(Signal to Noise)比.....	65
4.2.5 金および銀コロイドの蛍光スペクトル解析.....	66
4.2.6 高濃度試料条件での高速 AFM/蛍光顕微鏡同時観察.....	67
4.3 考察.....	92

4.4 まとめ	95
第 5 章 高速 AFM/超解像光学顕微鏡複合機の開発.....	96
5.1 目的と概要.....	96
5.2 走査型近接場光学顕微鏡	98
5.2.1 局在表面プラズモン	98
5.2.2 走査型近接場光学顕微鏡.....	98
5.3 実験	100
5.3.1 装置および光学系.....	100
5.3.2 プロブの位置合わせ.....	101
5.3.3 レーザー光の偏光の最適化	101
5.3.4 プロブの金属修飾の最適化.....	102
5.3.5 高速 AFM / 超解像光学顕微鏡同時観察	103
5.4 まとめ	112
第 6 章 総括	113
謝辞	114
参考文献.....	115

要旨

2008年に実用レベルの高速原子間力顕微鏡(AFM)が誕生して以来、高速 AFM は精製単離されたタンパク質から生細胞まで様々な生体分子に適応され、分子の構造ダイナミクスを明らかにしてきた。高速 AFM は市販化もされ、生命科学における常用的な装置になりつつあるなかで、高速 AFM をより多機能に、より多様な試料系に適用するために別の顕微鏡技術と組み合わせた次世代型高速 AFM の開発が望まれている。その一つが光学顕微鏡との複合化である。光学顕微鏡法は、蛍光ラベルによる目的の分子の特定や低分子化合物の可視化など、高速 AFM では実行し得ない機能を有している。そのため、高速 AFM と光学顕微鏡の複合化は、高速 AFM の適用範囲を飛躍的に拡張し両手法から得られる多元的な情報から生体分子の作動機構に関する新たな知見が得られると期待される。

そこで本研究では、従来の高速 AFM の走査機構を見直し、光学顕微鏡と組み合わせることのできるプローブ走査型高速 AFM の開発を行った。具体的には、機械的なカンチレバー固定法を有する高共振周波数のスキヤナー、カンチレバーの動きを正確に追従できるレーザートラッキング法、コンパクトな光てこ光学系の開発を行った。開発したプローブ走査型高速 AFM を用いて、ミオシン V のアクチンフィラメントに沿った歩行運動、回転子のない F₁-ATPase($\alpha_3\beta_3$ 複合体)において、ATP 加水分解反応に伴い β サブユニットが協同的に構造変化する様子の観察に成功し、プローブ走査型高速 AFM が生体分子の機能を乱すことなくタンパク質の構造変化を可視化できることを証明した。

また、プローブを金属修飾することによって AFM 観察範囲内の蛍光を増強する電場増強高速 AFM / 蛍光顕微鏡画像相関法を開発し、高速 AFM で観察している分子を蛍光顕微鏡画像上で容易に特定できるようになった。その結果、蛍光ラベルしたセルロース分解酵素 (TrCel7A) が、セルロース結晶上を加水分解しながら移動する様子を高速 AFM と蛍光顕微鏡で同時に観察することに成功した。さらに、高速 AFM/超解像光学顕微鏡複合機の開発を行い、イメージングレート 3.5 秒で光の回折限界を大きく上回る空間分解能を達成する超解像光学イメージングに成功した。

第 1 章 序論

1.1 研究の背景

生命現象をつかさどる生体分子は、人工機械ではありえないほど精巧に作られ、複数種の分子が相互作用し、構造変化しながら機能を発揮している。生体分子が機能を発現する仕組みを理解するには、機能している現場を直接 “見る” ことが最も確実な方法である。ダイナミックに機能する生体分子の挙動は、高速原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope: AFM) の誕生によって、誰もが簡単に見ることができる時代になりつつある。2001 年に第一世代の高速 AFM が開発されて以来[1]、様々な低侵襲化、高速化へ向けた技術開発がなされ[2-4]、2008 年に実用レベルの装置が完成した[5]。高速 AFM は、ミオシン V のアクチンフィラメントに沿った歩行運動[6]、光に応答して構造変化するバクテリオロドプシン[7]、回転子のない F₁-ATPase におけるサブユニットの協動的な構造変化[8]やセルロース分解酵素のセルロース結晶上での運動[9]などの観察に成功し、生命科学における有用性を証明してきた。

高速 AFM が生命科学において常用的なツールとなりつつあるなかで、高速 AFM をより多機能に、より多様な試料系に適用するために別の顕微鏡技術と組み合わせた次世代型の高速 AFM の開発が望まれている。その一つが光学顕微鏡との複合化である。一分子蛍光顕微鏡法[10]では、蛍光色素一分子を可視化することができ、AFM で見ることのできない ATP などの低分子化合物を観察することができる[11-13]。高速 AFM と一分子蛍光顕微鏡を組み合わせれば、ヌクレオチドの結合/解離とそれに伴ったタンパク質の構造変化を同時に可視化することができ、詳細な化学・力学変換メカニズムを議論することが可能である。また、AFM では複数種の分子が混在する系において目的の分子を AFM 画像のみから同定することは難しいが、蛍光顕微鏡では分子を蛍光ラベルすることによって、容易に目的の分子を特定することができる。加えて、大きな光学顕微鏡視野を用いれば数十マイクロメートルに及ぶ細胞全体を捉えることができ、AFM 観察を行う場所を任意に決めることができる。さらに、AFM は試料の表面形状しか観察することができないが、光学顕微鏡は細胞内部の分子の局在を可視化することもできる。このように、光学顕微鏡は高速 AFM が実行し得ない機能を有しており、高速 AFM の弱点を補うばかりかその可能性をさらに広げる装置であると言うことができる。

これまでに、光学顕微鏡と組み合わせることができるプローブ走査型 AFM の開発は数多くのグループによって行われてきた[14-20]。しかし、それらの装置は従来の AFM と同様

に走査速度が遅く、ダイナミックに起こる生体分子の挙動を捉えることはできない。当然ながらそれらの要素技術を直接、高速 AFM に適応することも難しい。また、数はそう多くないが、高速 AFM と光学顕微鏡の複合化に関する研究は、いくつかのグループによって行われている。Suzuki らはスキャナーに、レーザー光をカンチレバーへ集光する対物レンズを取り付け、プローブ走査型高速 AFM を実現した[21]。しかし、その用途は細胞などの比較的大きな試料を対象とし、光学顕微鏡の視野を AFM 観察箇所の位置決めに使っているに過ぎない。さらに、光てこ光学系において赤色レーザーを使用しているため、一般的な一分子蛍光観察で用いられるような可視光を発する蛍光色素を使用することも難しい。Colom らは特殊なプリズムをスキャナーに取り付け、光学顕微鏡の光路を AFM 内に組み込んだ[22]。しかしながら、試料を走査するサンプル走査方式を採用しているため、AFM と光学顕微鏡で同時に観察することはできない。

このように、様々な AFM と光学顕微鏡を複合化する研究がなされてきたが、タンパク質一分子を対象とし、リアルタイムで同時に高速 AFM と光学顕微鏡で観察できる装置は存在しないのである。

1.2 本学位論文の構成

1.2.1 高速 AFM / 蛍光顕微鏡複合機の開発—第 2 章—

倒立型光学顕微鏡と組み合わせることができるプローブ走査型高速 AFM の開発を行った。光学顕微鏡と組み合わせるために高速 AFM の走査機構を、試料を走査するサンプル走査方式からカンチレバーを走査するプローブ走査方式に変更した。プローブ走査型高速 AFM を実現するために、レーザー光を正確にカンチレバーの動きへトラッキングさせるミラーフィルタ、高共振周波数のスキャナー、コンパクトで頑丈な光てこ光学系の要素技術開発を行った。プローブ走査型高速 AFM を用いて、ミオシン V がアクチンフィラメント上を歩く様子を捉えることに成功し、開発した顕微鏡が生体分子の機能を乱すことなく観察できることを証明した。高速 AFM と蛍光顕微鏡の観察視野の違いを補うために、光学顕微鏡ステージに広域スキャナーを組み込み、容易に蛍光顕微鏡画像上で高速 AFM の観察位置を特定できるようになった。開発した高速 AFM / 蛍光顕微鏡複合機を用いて、Cy3 でラベルしたミオシン V がアクチンフィラメント上を歩く様子を高速 AFM と蛍光顕微鏡で同時に観察することに成功し、開発した複合顕微鏡がタンパク質一分子レベルで高速 AFM / 蛍光顕微鏡同時観察が可能であることを実証した[23]。

1.2.2 プローブ走査型高速 AFM のための機械的カンチレバー固定法の開発—第 3 章—

開発したプローブ走査型高速 AFM が生命科学における常用的なツールとなるためには、いくつか解決しなければならない課題がある。なかでも、カンチレバーの機械的固定法の開発が最も難しく、その使用を制限している要因である。そこで本研究では、様々なカンチレバーの機械的固定機構を有したスキャナーの開発を行った。開発を通して、Z ピエゾアクチュエーター上ではなく、スキャナー土台部分に治具を設ける手法が最も簡便でピエゾアクチュエーター自身の周波数特性を低下させない手法であることがわかった[24]。この手法でカンチレバーを固定した Z スキャナーの周波数特性は、ピエゾアクチュエーター自身と同じ周波数スペクトルであった。開発したスキャナーをプローブ走査型高速 AFM に組み込み、高い時空間分解能で回転子のない F₁-ATPase ($\alpha_3\beta_3$ 複合体)とアクチンフィラメントの観察に成功し、開発したスキャナーにより生体分子のダイナミクス観察が可能であること

を証明した。

1.2.3 金属プローブによる電場増強一分子高速 AFM / 蛍光顕微鏡相

関法の開発—第 4 章—

光学顕微鏡と高速 AFM の空間分解能および観察視野には大きな隔りがある。そのため、高速 AFM と蛍光顕微鏡の同時観察において、蛍光顕微鏡画像と AFM 画像を正確に関連付けすることが困難であった。また、一分子蛍光実験では背景光を抑えるため使用できる蛍光試料の濃度が制限されるため、観察視野が制限される高速 AFM では頻度よく目的の分子を捉えることができず、効率よく観察することも難しかった。そこで、AFM プローブ近傍の蛍光を増強し AFM 観察範囲の蛍光を特定する電場増強一分子高速 AFM/蛍光顕微鏡相関法の開発を行った。プローブを金属修飾し、プローブ近傍の蛍光一分子を 2 倍程度増強することに成功した。開発した手法を用いて、比較的高濃度な蛍光試料条件下で ATP 加水分解反応に伴う GroES/EL の結合/解離、キチナーゼのキチン結晶上での運動、セルラーゼがセルロース結晶上で一方向へ動いていく様子的高速 AFM / 蛍光顕微鏡の同時観察に成功した[25]。

1.2.4 高速 AFM/超解像光学顕微鏡複合機の開発—第 5 章—

従来の光学顕微鏡の分解能は、光の回折限界のため使用するレーザー波長の半分程度までとされてきた。しかし、この分解能では細胞内小器官におけるタンパク質の分布や局在を解像することはできず、一分子蛍光観察においては蛍光ラベルした基質がタンパク質のどの部位に結合したのかを判断することも難しい。そこで本研究では、回折限界を大きく上回る空間分解能を有する走査型近接場顕微鏡とプローブ走査型高速 AFM を組み合わせた高速 AFM/超解像光学顕微鏡複合機の開発を行った。アバランシェフォトダイオードを用いて AFM プローブ位置と同期して蛍光を取得し光学像を構築した。効率よくレーザー光と AFM プローブを相互作用させるために、プローブの金属修飾法や照明法を検討した。開発した高速 AFM/超解像光学顕微鏡複合機を用いて蛍光ビーズを観察した結果、3.5 秒の時間分解能で光の回折限界を大きく上回る 87 nm の空間分解能を達成する超解像光学イメージングに成功した。

第 2 章 高速 AFM / 蛍光顕微鏡複合機の開発

2.1 目的及び概要

2001年に第1世代の高速 AFM が開発されて以来[1]、様々な高速化、低侵襲化へ向けた努力がなされ、2008年に実用レベルの高速 AFM が完成した[5]。高速 AFM は様々な生体分子に適応され、ミオシン V のアクチンフィラメントに沿った歩行運動[6]や、回転子のない F₁-ATPase の協動的なサブユニットの構造変化[8]、光に応答するバクテリオロドプシンの構造変化[7]に代表されるような既存の装置では解明することが困難であった現象を次々と明らかにしてきた[26]。しかしながら、高速 AFM では ATP などの低分子化合物を可視化することができず、タンパク質の構造変化と基質の結合/解離の関連性を詳細に議論することはできない。また、複数種のタンパク質が混在する系において観察している分子が目的の分子かどうかを AFM 画像のみから判断することは難しい。さらに、広域高速スキャナーの開発[27,28]によって細胞などの比較的大きな試料を観察できるようになったにもかかわらず、AFM では細胞表面で起こっている現象しか見ることができず、細胞内部で起こる現象と細胞表面上で起こる構造変化とを関連付けることはできない。一方で、生命科学における常用的なツールとして光学顕微鏡がある。全反射蛍光顕微鏡[10]を用いれば、タンパク質そのものの構造変化を可視化することはできないが、高い時間分解能でタンパク質一分子の動きを捉えることができる。蛍光性ヌクレオチドアナログ[29]を使えば、タンパク質の動態とそれに伴う化学反応を同時に可視化することもできる。また、観察溶液内に複数種のタンパク質が混在していても、目的の分子に蛍光プローブを付けることで容易に目的の分子を特定することもできる。さらに、遺伝子工学技術を用いて GFP (Green Fluorescence Protein)[30]などの蛍光性タンパク質を細胞内に発現させれば、AFM では見ることのできない細胞内部の情報を得ることもできる。このように光学顕微鏡は高速 AFM では実行し得ない機能を有している。よって、高速 AFM と光学顕微鏡の複合化は高速 AFM の適用範囲を飛躍的に広げ、生命科学においてさらに有用な装置になると期待される。

そこで、本研究では光学顕微鏡と同時観察可能なプローブ走査型高速 AFM を製作し、高速 AFM / 蛍光顕微鏡複合機の開発を行った。プローブ走査型高速 AFM を実現するために、様々な要素技術の開発を行った。具体的には、レーザー光をカンチレバーの動きに合わせて追従させるトラッキング法、カンチレバー走査用スキャナー、コンパクトな光てこ光学系の開発を行った。プローブ走査型高速 AFM を用いて、ミオシン V がアクチンフィラメントに沿ってプロセッシブに動く様子の観察に成功し、プローブ走査型高速 AFM が生体分

子の機能を乱すことなく、タンパク質の構造動態を可視化できることを実証した。蛍光顕微鏡の観察視野の中から、目的の場所を高速 AFM で観察するために光学顕微鏡ステージに広域スキャナーを組み込み、広域 AFM 像を仲介することで蛍光顕微鏡画像において高速 AFM の観察箇所を容易に決めることができるようになった。ミオシン V-HMM を Cy3 で染色し、アクチンフィラメントに沿った歩行運動を高速 AFM と 蛍光顕微鏡で同時に観察することに成功し、開発した複合顕微鏡がタンパク質一分子レベルで高速 AFM / 蛍光顕微鏡同時観察が可能であることを実証した[23]。

2.2 プローブ走査型高速 AFM

2.2.1 装置概要

倒立型顕微鏡と組み合わせるために高速 AFM の走査機構を一新した。従来の高速 AFM は、試料を XYZ 方向に走査するサンプル走査方式を採用しているが、この機構では光学顕微鏡と高速 AFM の同時観察を行うことができない。試料の凹凸情報を検出するカンチレバーが光学顕微鏡の視野を遮ってしまうためである。さらに、試料ステージが走査されるので、CCD カメラで光学像を取得することもできない。そこで、高速 AFM の走査機構を、サンプル走査方式からプローブ(カンチレバー)を走査するプローブ走査方式に変更した。プローブ走査方式では、高速 AFM 装置を顕微鏡上部に配置するが(図 2-1)、カンチレバーが光学顕微鏡の視野を塞ぐことなく高速 AFM 観察が可能である。また、カンチレバーを XYZ 方向に走査するので試料ステージを固定することができる。さらに、従来の高速 AFM では試料ステージが直径 1.5 mm、高さ 2 mm 程度の小さなガラスステージに限られていたが[31]、プローブ走査型では細胞培養に用いられるシャーレやスライドガラスを直接試料ステージとして使うこともできる。

図 2-1 にプローブ走査型高速 AFM の光学系を示す。カンチレバーの変位検出はサンプル走査型と同じ光でこ法を用いる。一般的な蛍光顕微鏡観察で使用される蛍光色素は可視域の蛍光を発するので、試料が発する蛍光との干渉を避けるため、AFM レーザーは波長 780 nm の近赤外レーザー(L780P010, Thorlabs, Newton, NJ, USA)を使用した。レーザー光は戻り光ノイズを軽減するために高周波重畳回路を介して駆動される[32]。レーザー光は長作動距離の対物レンズ(CFI L Plan EPI SLWD、株式会社ニコン、東京)を用いてカンチレバー(BL-AC10DS-A2, オリンパス株式会社、東京)へ集光される。対物レンズを除くすべての光学部品; コリメートレンズ(LT110P-B, Thorlabs, Newton, NJ, USA)、偏光ビームスプリッター(PBS103, Thorlabs, Newton, NJ, USA)、水晶波長板(WPQ-7800-4M, シグマ光機株式会社、大阪)、ダイクロイックミラー(NT64-464, Edmond Optics, Newton, NJ, USA)、フォーカスレンズ(LA1074-B, Thorlabs, Newton, NJ, USA)、2分割フォトダイオードセンサー(KA4PDAPCB, Graviton Inc, CA, USA)は近赤外域に波長を合わせている。

図 2-2 にプローブ走査型高速 AFM ヘッドの 3D モデルと写真を示す。高速 AFM ヘッドは上部と下部に分離することができる。AFM ヘッドの重心をなるべく低くするため、上部の部品をアルミニウム(A5052)、下部の部品をステンレス(SUS303)で製作し、AFM ヘッド上部にすべての光学部品を設置した。レーザーダイオードとコリメートレンズはアダプタ

ー(AD15F, Thorlabs, Newton, NJ, USA)で固定され、回転、縦横方向に動かすことが可能なステージ(HPT1, Thorlabs, Newton, NJ, USA)を介して AFM ヘッドに取り付けられた。ダイクロイックミラーは微細スクリューネジ(大きさ M3、ピッチ 0.20、F3ESN1P, Thorlabs, Newton, NJ, USA)で固定されており、傾きを変えることができる。対物レンズには、垂直方向に動かすことができるステージ(TSD-251C、シグマ光機株式会社、大阪)に設置され、カンチレバーへレーザー光の焦点を合わせることが可能である。AFM ヘッド下部にカンチレバーを走査するスキャナーが取り付けられた。スキャナーの土台部分は磁性のある金属(SUS410)で作られているので、AFM ヘッド下部に付けられた磁石(NSC0001、株式会社マグファイン、宮城)を介して取り外し可能である。スキャナーはマイクロメーターヘッド(MHM4-15, 株式会社ミツトヨ, 神奈川)により XY 方向に動かすことができる。AFM ヘッドは 3 点で固定され、3 点のうちの中心部分にステッピングモーター(AM1020-2R-A-0.25-8-10+12/5 2050:1, Faulhaber BmbH, Weinheim, Germany)が設置されており、カンチレバーの試料へのアプローチを行う。ステッピングモーターは専用のドライバー(AD-CM-M1S, Faulhaber BmbH, Weinheim, Germany)を用いて駆動される。

2.2.2 レーザービームトラッキング

サンプル走査型からプローブ走査型へ AFM の機構を変更するにあたって、一番の問題はカンチレバーへのレーザー光のトラッキングである。サンプル走査型では、試料ステージが走査されるのでカンチレバーは固定されており、正確に光てこ光学系でカンチレバーの変位を検出することができる。しかし、プローブ走査型ではカンチレバーが XYZ 方向に走査されるのでカンチレバーからのレーザー光の反射は一定にならず、正確にカンチレバーの変位を検出することができない。そこで、カンチレバーの動きと同期して、レーザー光を反射するミラーの傾きを制御するミラーチルトの開発を行った。図 2-3 にミラーチルトの概念図と 3D モデルを示す。ミラーチルトは 2 つのベースプレートと 4 つの同じピエゾアクチュエーター(AE0203D04、NEC Tokin 株式会社、宮城)から構成される。ミラーチルトの上部からカンチレバーを観察し、レーザー光へ位置合わせを行うために 2 つのベースプレートの中心部は穴が開いている。そのため、ミラーはダイクロイックミラー(NT64-464, Edmond Optics, NJ, USA)を用いた。上部からの視野を確保するため、2 段目のベースプレートには段差があり、そこにピエゾアクチュエーターを接着し、ダイクロイックミラーはブロックを介してピエゾアクチュエーターへ固定される。2 段目のベースプレートは、軽量化のためアルミニウム(A5052)で製作した。1 段目のベースプレート(base

plate1) に取り付けられた Y ピエゾアクチュエーターと Y'ピエゾアクチュエーターは互いに反転したのこぎり波で制御される。入力するのこぎり波の振幅はカンチレバーからの反射光が一定になるように調節する。2 段目のベースプレート(baseplate2)に取り付けられた X ピエゾアクチュエーターと X'ピエゾアクチュエーターは、互いに反転した三角波によって制御される。Y 方向と同様に、入力する三角波の振幅はカンチレバーからの反射光が一定になるように調節される。このミラーチルトの最大角度変位は、ピエゾアクチュエーターの最大変位 (100 V 印加で 3 μm)、ダイクロイックミラーの大きさ(12.5×12.5 mm²)から約 $\pm 4.8 \times 10^{-4}$ rad と見積もられた。この最大角度変位と使用する対物レンズの焦点距離 (20 mm)からレーザービームの最大変位は 19 μm と見積もることができる。この値は実測値 (約 20 μm)とよく一致した。この最大変位は、タンパク質一分子を対象とする本研究において十分な大きさである。

図 2-4 に X 方向ミラーチルトの周波数特性を示す。周波数特性の計測は、カンチレバーの土台部分にレーザー光を照射し、カンチレバーの変位を検出するための 2 分割フォトダイオードを使って、ミラーチルトの動きを周波数解析器(FRA5097, 株式会社エヌエフ回路設計ブロック、神奈川)を用いて測定した。この周波数特性の解析から、X 方向のミラーチルトの共振周波数はおよそ 2.2 kHz であることがわかった。図 2-4 に X 方向のミラーチルトの走査軌跡を示す。この測定は、周波数特性を取得した時と同様にカンチレバーの土台部分にレーザー光を照射しフォトダイオードを用いて計測した。入力した三角波の周波数は 1 kHz で、これは Y 方向に 100 ライン走査したときのフレームレート 10 frames/sec (fps) に相当する。共振周波数が低いため、ミラーの動きが大きく歪んでいる(図 2-4,a)。図 2-4 (b)に逆フーリエ補償法を用いたときのミラーチルトの動きを示す(赤線)。逆フーリエ補償法とは走査信号をフーリエ変換し、あらかじめ計測した周波数特性から得られた逆伝達関数と掛け合わせて、その信号を逆フーリエ変換して走査信号を作製する手法である[33]。逆フーリエ補償法によりミラーの動きは本来の三角波の形に近くなったが、三角波の上昇成分では内側に下降成分では外側に幾分か歪みが残っている。この歪みは、ダイクロイックミラーを接着したことによる影響と考えられ、計測された信号から歪みを逆算し入力信号に加えることで取り除くことができた(図 2-4 (b)オレンジ線)。図 2-5 に Y 方向のミラーチルトの周波数特性を示す。この周波数特性は X 方向のミラーチルトと同様の方法で計測したが、2 分割フォトダイオードで Y 方向の変位を検出するために、フォトダイオードを 90° 回転させて計測した。共振周波数は約 2.2 kHz で、高周波数側にいくつかの大きなピークが観察された。この高周波領域の大きなピークは、ベースプレート、

X および X'ピエゾアクチュエーター、ダイクロイックミラーを変位させるためだと考えられる。2.2 kHz の共振周波数は決して高くはないが、Y 方向の走査周波数はフレームレート 10 fps で 10 Hz と共振周波数に比べて十分に小さく、またのこぎり波のなかで高周波成分を含む戻り時間を長くすることで正確に動かすことができる。(図 2-5)

実際の観察に近い条件でミラーチルターのパフォーマンスを評価するために、カンチレバーにレーザー光を照射して XY 方向に走査したときの、各ピクセル位置の振幅値を画像化した。この計測は液中で行われ、カンチレバーをサイン波で励振したときの振幅値を計測した。このとき Z ピエゾアクチュエーターにフィードバック信号は入力されていない。図 2-7 に $650 \times 650 \text{ nm}^2$ の範囲を走査したときの振幅値画像を示す。この画像は 256×256 ピクセルで構成され、フレームレート 1 fps で取得された。図 2-7 (a)に示すように、ミラーチルターを動かさないときは、画像に大きな傾きがみられる。これは、カンチレバーとレーザースポットの相対位置が変化しカンチレバーからの反射光が減少したためだと考えられ、見かけ上の振幅値が 1.4 nm 変化したことになる。一方で、ミラーチルターを動かしたとき、画像は平坦であり振幅値はほとんど変化していない。このことから、比較的広い範囲を走査してもカンチレバーからの反射光を一定に保つことができることがわかった。図 2-8 にフレームレート 10 fps で $250 \times 250 \text{ nm}^2$ の範囲を 128×128 ピクセルをで走査したときの振幅値画像を示す。図 2-8 (a)に示すように、ミラーチルターを動かさないときは大きく傾いた画像が観察され、ミラーチルターを動かしたときは平坦な画像を得ることができ、振幅値をほぼ一定に保つことができていることがわかる(図 2-8, b)。この結果から、レーザートラッキングにより比較的速いイメージングスピードにおいてもカンチレバーからの反射光を一定に保つことができることがわかった。

2.2.3 スキャナー

図 2-9 にカンチレバー(プローブ)を走査するスキャナーの 3D モデルを示す。Z ピエゾアクチュエーター(AE0203D04, NEC Tokin 株式会社, 宮城)はカンチレバーにレーザー光を照射するため、スキャナーの先端部分に設置されている。高速 AFM 観察を行うとき、カンチレバーは液中にあるので、レーザー光が気/液界面で反射するのを防ぐために、カンチレバー裏面直下に低反射ガラス(D263, 松波硝子工業株式会社, 大阪)が取り付けられている。Z ピエゾアクチュエーターは X ピエゾアクチュエーター(AE0203D04, NEC Tokin 株式会社, 宮城)により変位し、X,Z ピエゾアクチュエーターを含んだ全体が Y ピエゾアクチュエーター(AE0505D08, NEC Tokin 株式会社, 宮城)によって変位する。カンチレバー励振用ピエゾ

(4.5Z4x4S-SYXC(C-82)、株式会社 富士セラミックス、静岡)は、カンチレバー近傍のスキヤナー土台部分に設置してある。Z ピエゾアクチュエーターと X ピエゾアクチュエーターには、カウンターバランス法を用いて激力による振動を低減している[1]。カンチレバーは試料に対して傾きを持たせるために、カンチレバーホルダーを介して、Z ピエゾアクチュエーターに固定されている。カンチレバーホルダーは高いヤング率を持つ炭化ケイ素で製作した。カンチレバーは瞬間接着剤を使いカンチレバーホルダーに取り付けられる。この接着剤を使ったカンチレバー固定法は、カンチレバーを容易に取り外すことができず実用レベルの装置となるために大きな障害である。この固定法に関しては第 3 章で改善し、新規の機械的固定法を開発した。開発したスキヤナーの性能を評価するため周波数特性を計測した。周波数特性は周波数解析器(FRA5097, 株式会社エヌエフ回路設計ブロック、神奈川)を用いて測定され、スキヤナーの変位はヘテロダイン式レーザー変位系(ST-3761, 岩通株式会社、神奈川)を使い計測した。スキヤナーは電圧増幅器(Z スキヤナー; M-2335, 株式会社メステック、埼玉、XY スキヤナー; HJPZ-0.1P×3, 松定プレジジョン、滋賀)を介して駆動した。図 2-10 に Z スキヤナーの周波数特性を示す。共振周波数はおよそ 100 kHz で、この値は片端を固定したときのピエゾアクチュエーター自身の共振周波数とよく一致した。図 2-11 に X および Y スキヤナーの周波数特性を示す。X スキヤナーの共振周波数は約 18 kHz であり、100 ラインを 0.1 秒で走査した時の周波数は 1 kHz になることから、この値は高速走査に関して十分な値だといえる。Y スキヤナーの共振周波数はおよそ 1 kHz であった。フレームレート 10 fps で画像を取得したときの Y 方向走査周波数は 10 Hz なので、共振周波数 1 kHz は十分な値であるといえる。カンチレバースキヤナーの XYZ 方向の圧電定数はそれぞれ、11.45 nm/V、 27.64 nm/V、 18.17 nm/V であった。同じピエゾアクチュエーターを使用した従来のサンプル走査型のスキヤナーに比べて圧電定数の値が小さくなっているが、タンパク質一分子を対象とする本研究においては十分な値である。

2.2.4 材料及び試料

洗浄カバーガラス

カバーガラス(C030401, 松波硝子工業株式会社、大阪)を硫酸 : 過酸化水素水 = 8 : 1 で混合したピラニア溶液の中に入れ、気泡がなくなるまで煮沸した。その後、1 枚ずつ超純水で濯いだ後、超純水に浸し 20 分×3 回以上超音波洗浄してピラニア溶液を完全に取り除いた。ゴミの付着を防ぐため、使う直前まで超純水中に保存した。

テフロンシート

10 × 10 mm² 程度の大きさに切り分けたテフロンシート(965383, ニラコ株式会社、東京)の中央部分を、パンチプライヤー(445-8841, RS Components, Corby, UK)を用いて 3.5 mm² の穴を切り抜いた。エタノールで 20 分×3 回の超音波洗浄の後、超純水で 20 分×3 回超音波洗浄した後に使用した。ゴミの付着を防ぐため、使う直前まで超純水中に保存した。

観察ステージ

超純水中に保存してある洗浄カバーガラスとテフロンシートに窒素を吹きかけて、乾燥させた。2 液混合のアクリル系接着剤を使い、テフロンシートを洗浄カバーガラスに接着した。接着剤の 2 液を混合する際は、ゴミの付着を防ぐため新品のピペットチップを使い、ディスポトレー(1-3145-01、アズワン株式会社、大阪)上で行った。観察ステージはゴミの付着を防ぐため、密閉容器の中に保存し準備後 1 日以内に使用した。

ミオシン V-HMM

ミオシン V は R.E.Chenny らの方法[34]によって抽出精製した。精製後、BMV Buffer (20 mM HEPES-KOH pH7.6, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 2mM mercaptoethan-ol) 中で氷中保存した。さらに、ミオシン V の尾部をのぞき HMM を得るために次の手順で消化、精製を行った。

- ・ ミオシン V を 25 °C の恒温槽に 5 分つけ、温度を均一にする。
- ・ 質量比 200 : 1 = ミオシン V : ProteinaseK (PK) になるように、バッファー(100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 20 mM Imidazole-HCl pH 7.6)に溶かした PK 溶液を加える。
- ・ 10 分後、終濃度が 100 μM になるように Phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF) を加え、反応を停止させる。
- ・ 残存する PK を限外濾過精製器(Viva Spin,VIVA Science, Gloucestershire, UK)を使い完全に除去して使用する。

F-アクチン

ウサギ骨格筋よりアセトンパウダーを調整し[35]、F-アクチンを抽出精製した[36]。

ビオチン化 F-アクチン

ウサギ骨格筋よりアセトンパウダーを調整し[35]、抽出精製した F アクチン[36] を次の手順でビオチン化した。

- ・ F-アクチンに 60 krpm, 1 時間, 4 °C の条件で超遠心分離 (HITACHI himac CS100GXL、日立製作所、東京) を行う。
- ・ 沈殿した F-アクチンを G-buffer 1 (20 mM TES-KOH pH7.0, 0.2 mM CaCl₂, 0.1 mM NaN₃, 0.2 mM ATP) でホモジナイズし、超音波 (1s, 10 回) をかける。
- ・ G-buffer 1 で透析 (3 時間×3 回) を行う。
- ・ 透析後、残存する F-アクチンを G-アクチンにするために超音波をかける。
- ・ 超遠心分離(60 krpm, 30 分, 4 °C) によって完全に F-アクチンを取り除いてから、G-アクチンの濃度を測定しその 5 倍モル濃度の biotin-PEAC₅-maleimide を加えて、25 °C で 1 時間、氷中で 4 時間反応させる。
- ・ 終濃度が 5 mM になるように DTT を加えて反応を止めた後、限外濾過精製器を用いて未反応のビオチンを完全に除去し、ビオチン化 G アクチンを精製する。
- ・ ビオチン化 G-アクチンと無修飾の G-アクチンの比が 1:50 になるように混合する。
- ・ KCl, MgCl₂ をそれぞれ、終濃度 100 mM, 2 mM にして、25 °C で 1 時間重合させビオチン化 F-アクチンを調整する。
- ・ 最後にビオチン化 F-アクチンに対してモル比 1.5 倍のファロイジンでアクチンの脱重合を阻害する。

リポソームの準備

クロロホルムに溶けている脂質を DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) : DPTAP (1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammonium-propane) : biotin-cap DPPE(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine -N-(cap biotinyl)) = 8.5 : 0.5 : 1 (質量比) で混合する。アスピレーターで、完全にクロロホルムを取り除いた後、濃度 1 mg/ml になるように超純水を加え、超音波に数分かかりリポソームを作った。作製したリポソームは、液体窒素で凍結し - 40 °C で保存した。

2.2.5 ミオシン V-HMM のアクチンフィラメントに沿った歩行運動の

観察

開発したプローブ走査型高速 AFM の性能を評価するために、ミオシン V-HMM のアクチンフィラメントに沿った歩行運動の観察を行った。ミオシン V はアクチンフィラメント上で様々な cargo 輸送を担っているモータータンパク質である[37]。ATP の加水分解で生じたエネルギーを利用し、アクチンフィラメント上を解離することなく長距離にわたって直線運動することが知られている[38]。2001 年に開発された第 1 世代の高速 AFM ではミオシンとアクチンフィラメントの弱い相互作用から観察することができなかったが、様々な低侵襲化技術の開発[2,3]を経て、2010 年にアクチンフィラメント上を歩くミオシン分子の様子を観察することに成功した[6]。このことから、ミオシン V は新しく開発したプローブ走査型高速 AFM の性能を評価するために、最適の試料であるといえる。以下に観察手順を記す。バッファーは 25 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 20 mM Imidazole-HCl (pH 7.6)を使用した。

- ・ リポソーム(DPPC:DPTAP:biotin-cap DPPE = 8.5:0.5:1)を、100 mM MgCl₂ で 0.1 mg/ml の濃度にする。ハンディソニケータで超音波をかけ、リポソームの粒子径を小さくする。
- ・ 観察ステージに、滴下し恒温槽で 40 分。70 °C でインキュベート後、室温で 3 時間反応させる
- ・ 2 ml の MilliQ で未吸着のリポソームを洗い流す。
- ・ ストレプトアビジン(5 nM)を滴下し 3 分間反応させる。
- ・ 2 ml のバッファーで、未吸着のストレプトアビジンを洗い流す。
- ・ ビオチン化-F アクチン(1 μM)を滴下し 15 分間反応させる。
- ・ 2 μM ATP を含んだバッファーで洗浄後、ミオシン V-HMM(2 nM)を滴下した後、観察を行う。

観察結果を図 2-12 に示す。ミオシン V 分子がアクチンフィラメント上をプロセッシングに移動していく様子を観察することに成功した。フレームレートは 5 fps で走査範囲は 150 × 75 nm² (100 × 40 ピクセル)である。この結果から、開発したプローブ走査型高速 AFM は生体分子の機能を乱すことなく、タンパク質が機能している様子を撮影できる性能を持つ

ことが示された。

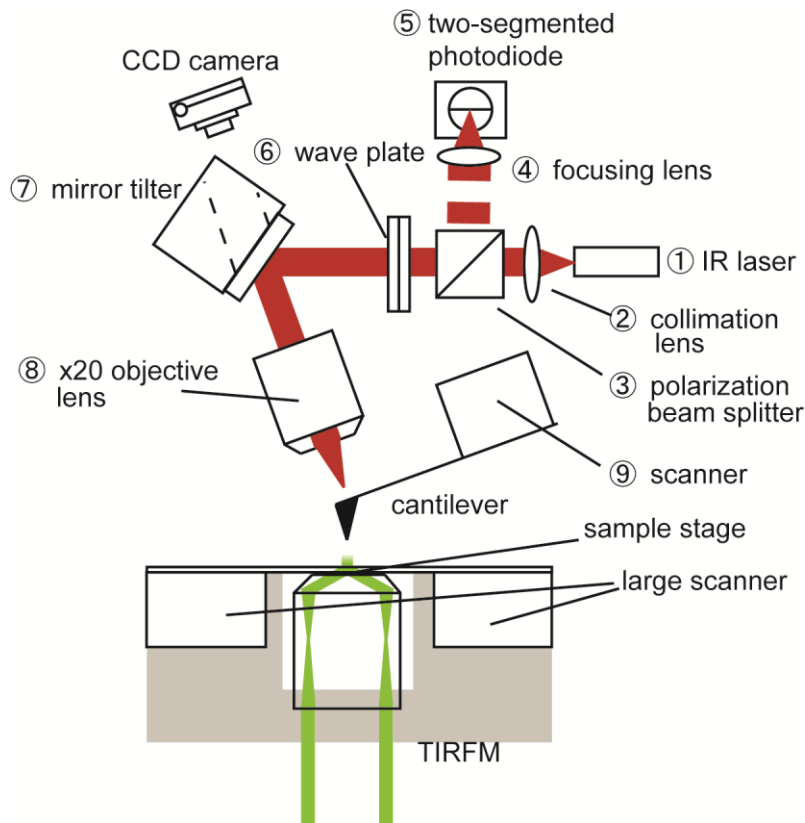


図 2-1 プロブ走査型高速 AFM の光学系

IR(波長 780 nm)レーザー①から出射されたレーザー光はコリメートレンズ②により平行光となる。レーザー光は縦方向に偏光し(p 偏光)、偏光ビームスプリッター③を透過した後に、波長板⑥で円偏光になる。そして、ミラーチルター⑦に取り付けられたダイクロイックミラーで反射して長作動距離対物レンズ⑧によってカンチレバーへ集光される。カンチレバーから反射したレーザー光は出射したときと同じ経路をたどり、波長板⑥を通過する。カンチレバーで反射されたことにより円偏光の向きは出射時と逆向きになり、波長板⑥を通過する際に横方向の偏光(s 偏光)になる。s 偏光の反射光は、偏光ビームスプリッター③によって反射され、集光レンズ④により 2 分割フォトダイオード⑤へ集光される。

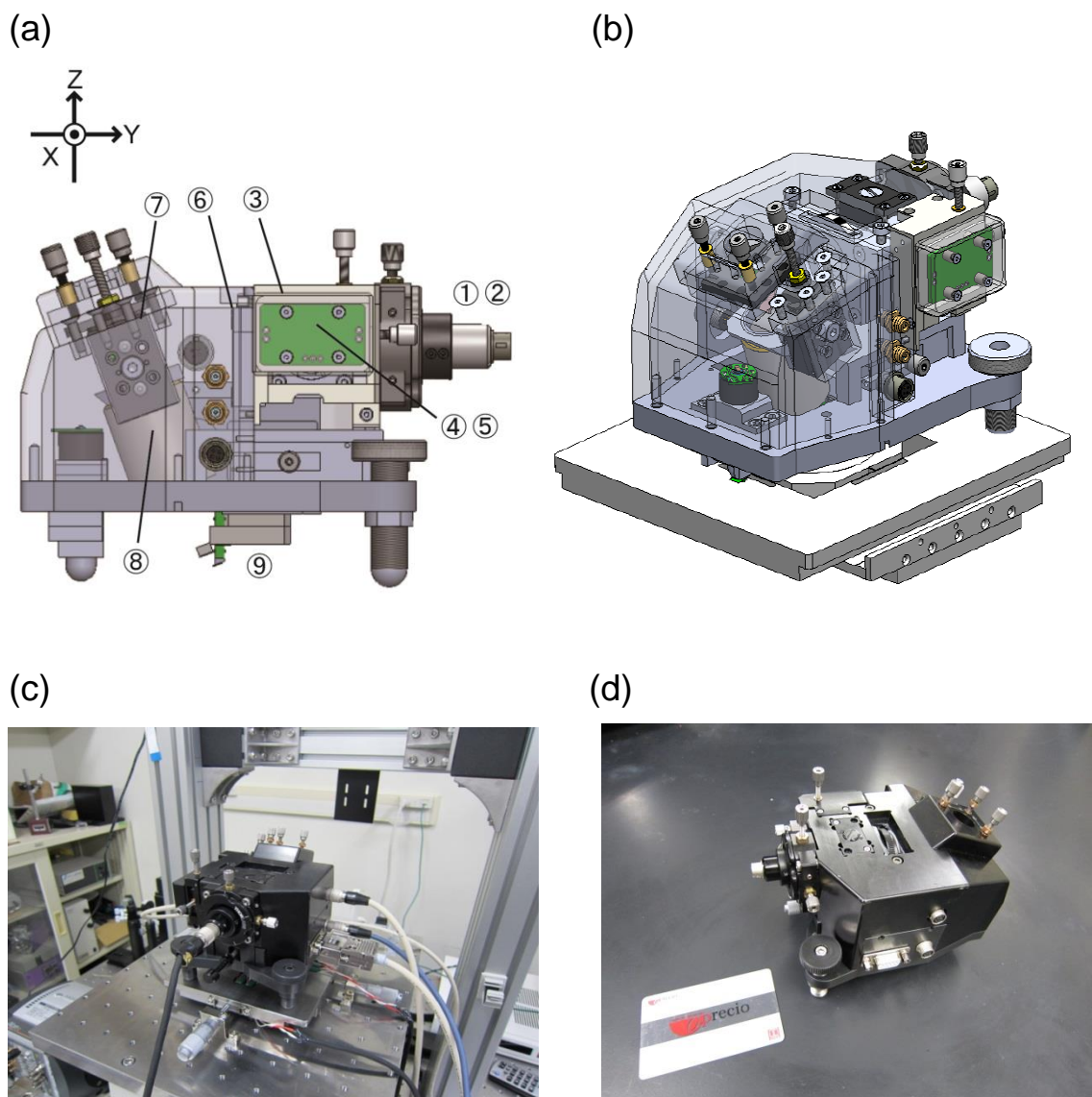


図 2-2 プロブ走査型高速 AFM の 3D モデル(a,b)、写真(c,d)

(a) 横から見たプロブ走査型高速 AFM の 3D モデル (① IR レーザー, ② コリメートレンズ, ③ 偏光ビームスプリッター, ④ 集光レンズ, ⑤ 2分割フォトダイオード, ⑥ 波長板, ⑦ ミラーチルター, ⑧ 長作動距離対物レンズ, ⑨ スキャナー)。(b) 光学顕微鏡ステージに設置されているプロブ走査型高速 AFM の 3D モデルの俯瞰図。(c),(d) プロブ走査型高速 AFM ヘッドの写真。

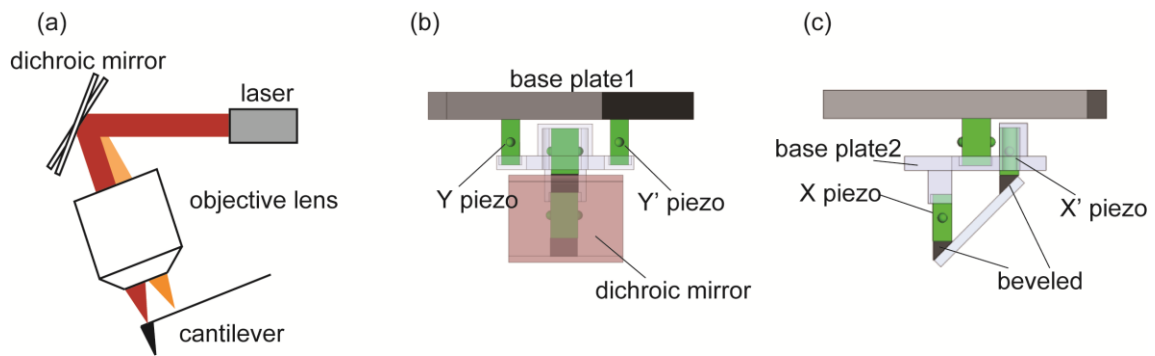


図 2-3 ミラーフィルターの概念図と 3D モデル

ミラーフィルターの(a) 概念図と(b) 正面図と(c) 側面図

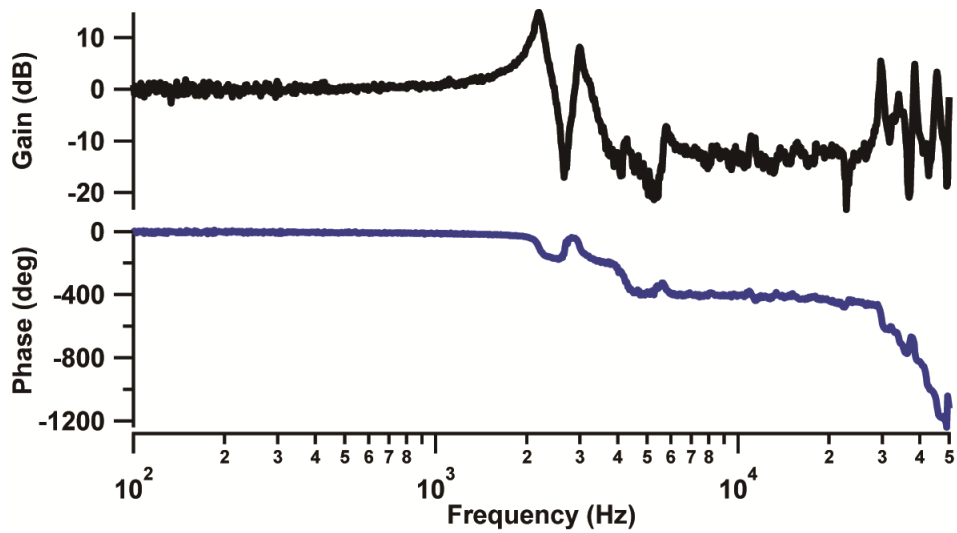


図 2-4 X 方向ミラーフィルターの周波数特性

上段はゲイン、下段は位相の周波数特性を示す。共振周波数は約 2 kHz であった。

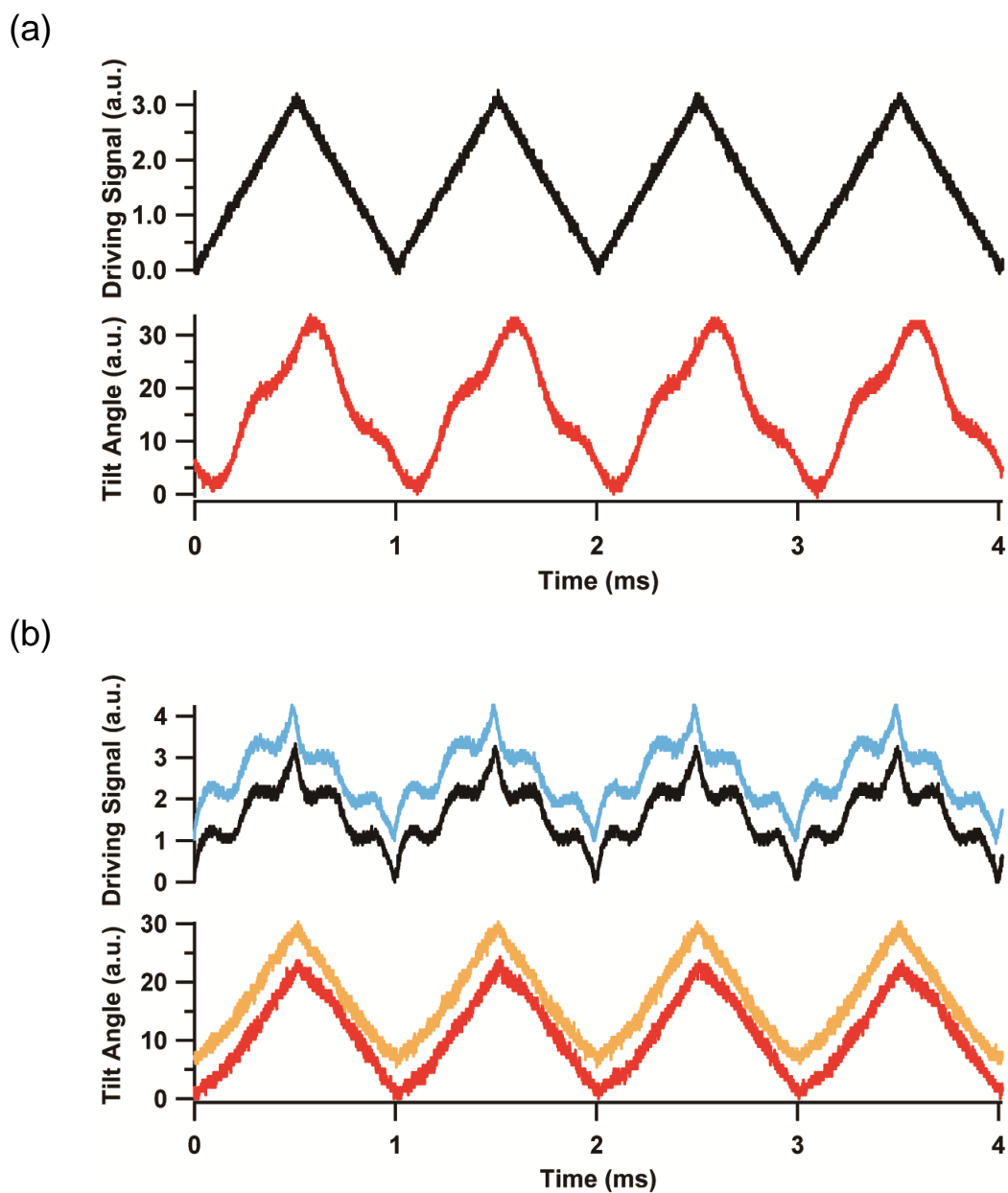


図 2-4 X 方向ミラーフィルターの走査軌跡

(a) 上段は入力信号、下段はミラーフィルターの走査軌跡を示す。(b) 上段は走査信号(黒線; 逆フーリエ補償法を用いたときの走査信号、水色線; 逆フーリエ補償法と歪み補正を用いたときの走査信号)を示す。下段は、ミラーフィルターの走査軌跡(赤線; 逆フーリエ補償法を用いたときの走査軌跡。オレンジ線; 逆フーリエ補償法と歪み補正を用いたときの走査軌跡)を示す。

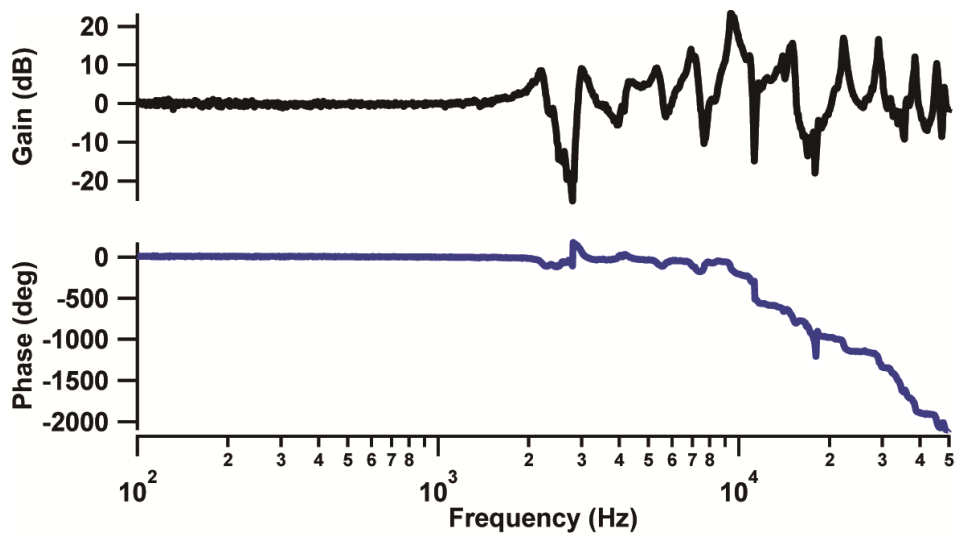


図 2-5 Y 方向ミラーフィルターの周波数特性

上段はゲイン、下段は位相の周波数特性を示す。共振周波数は約 2 kHz で高周波領域に複数のピークが見られる。

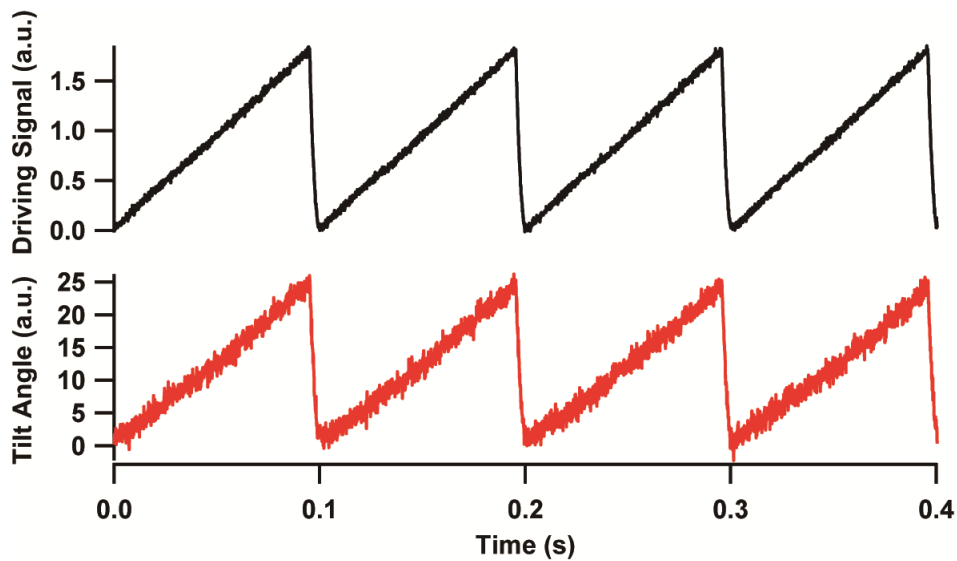


図 2-6 Y 方向ミラーフィルターの走査軌跡

上段は入力信号、下段はミラーフィルターの走査軌跡を示す。X 方向の走査信号の 10 ライン分、戻り時間を長くして計測した。走査周波数は 10 Hz であった。

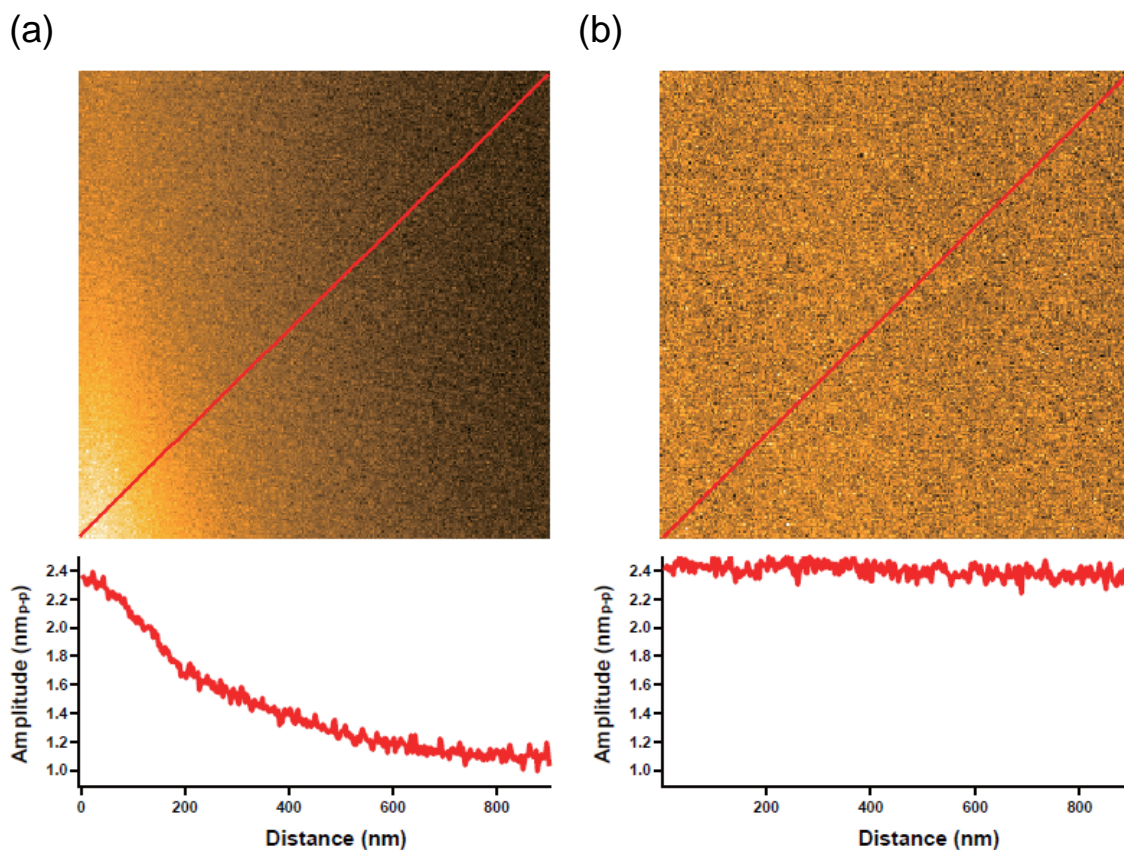


図 2-7 低速走査時のレーザートラッキング効果の検証

カンチレバーを XY 方向に走査して、振動振幅値を画像化した。走査範囲は $650 \times 650 \text{ nm}^2$ (256×256 ピクセル) でフレームレートは 1 fps であった。(a) 上段はミラーチルターを動作させない時の振幅値画像で、下段は上段の赤線で示す位置のクロスセクションを示す。(b) 上段はミラーチルターを動作させた時の振幅値画像で、下段は上段の赤線で示す位置のクロスセクションを示す。

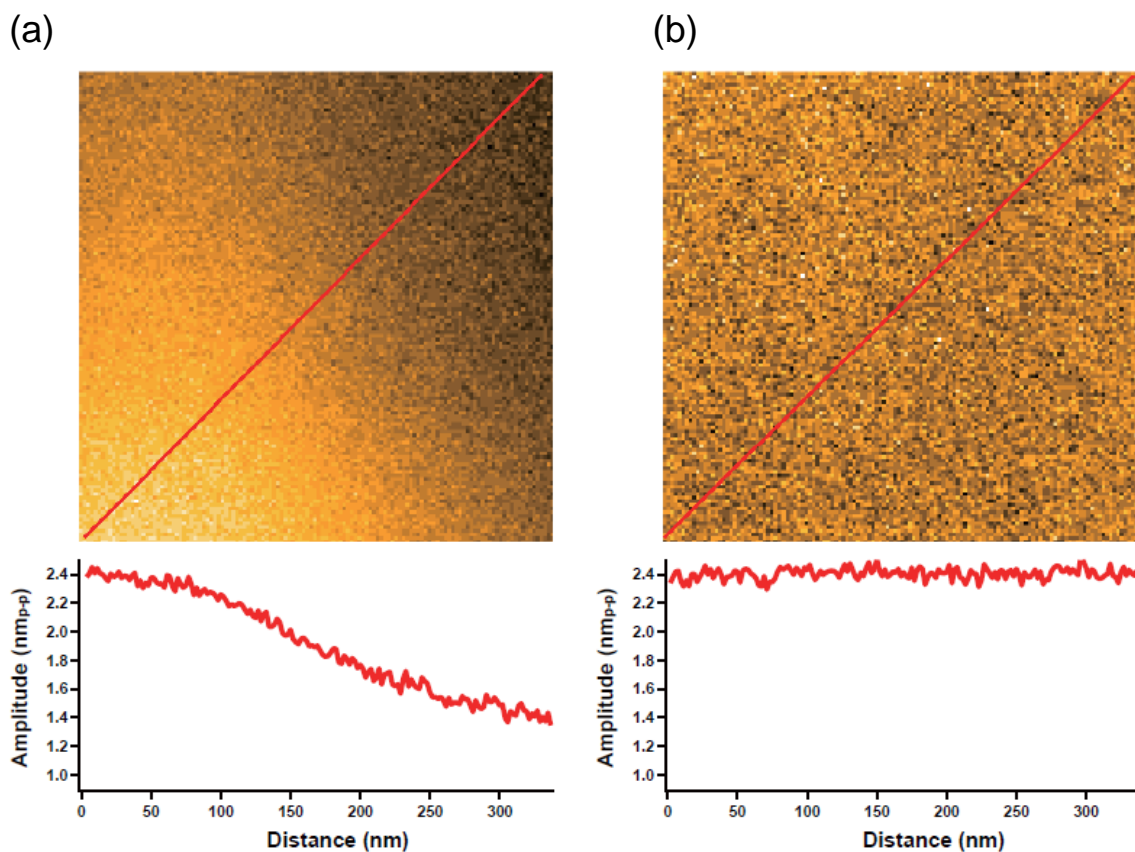


図 2-8 高速走査時のレーザートラッキング効果の検証

カンチレバーを XY 方向に走査して、振動振幅値を画像化した。走査範囲は 250×250 nm^2 (128×128 ピクセル) でフレームレートは 10 fps であった。(a) 上段はミラーチャルターを動作させない時の振幅値画像で、下段は上段の赤線で示す位置のクロスセクションを示す。(b) 上段はミラーチャルターを動作させた時の振幅値画像で、下段は上段の赤線で示す位置のクロスセクションを示す。

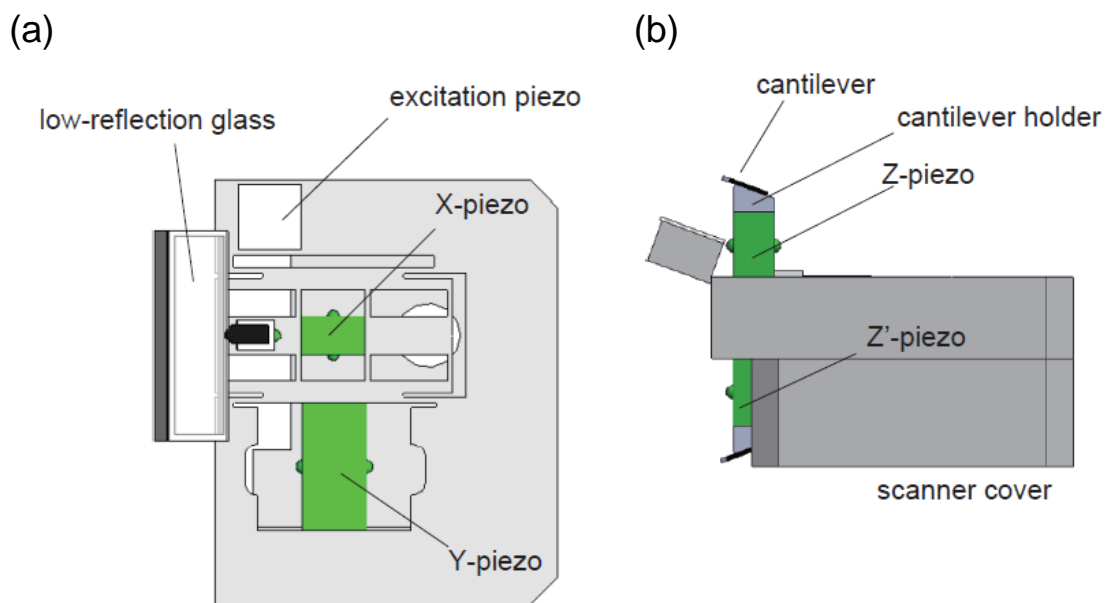


図 2-9 プロブ走査高速 AFM のスキャナーの 3D モデル

スキャナーの(a) 正面図と(b) 側面図。

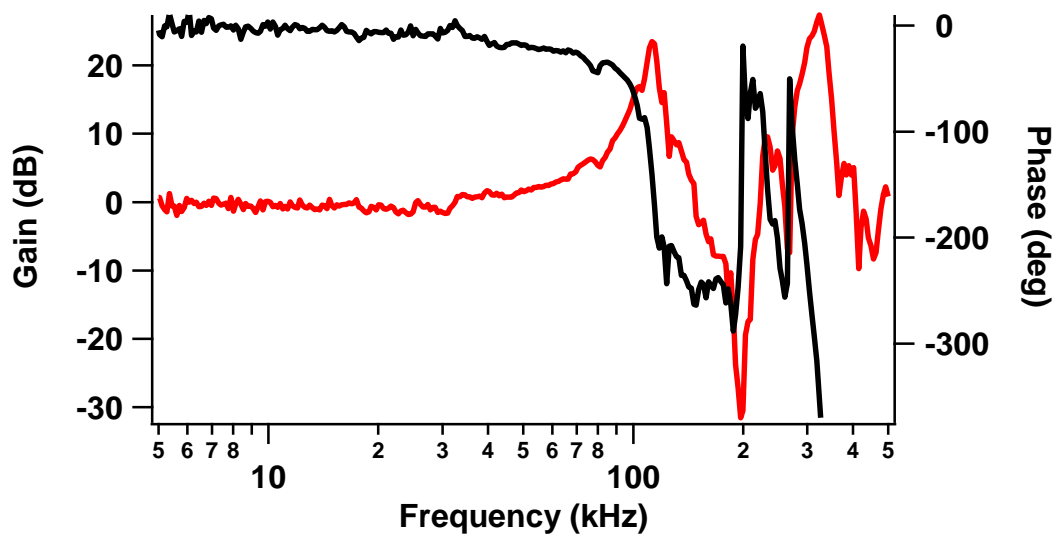


図 2-10 Z スキャナーの周波数特性

赤線はゲイン、黒線は位相の周波数特性を示す。共振周波数は約 100 kHz であった。

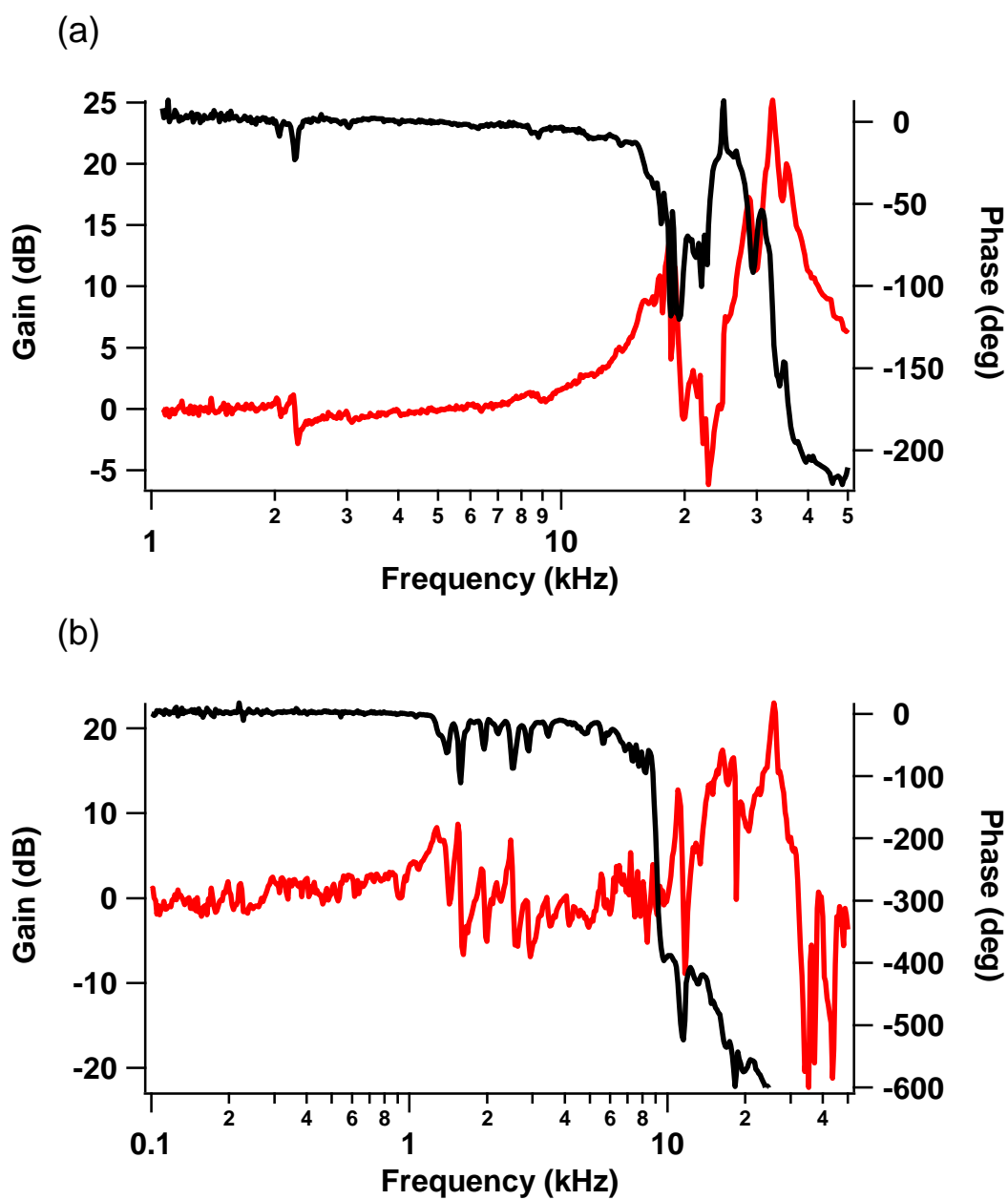


図 2-11 XY スキャナーの周波数特性

(a) X スキャナーの周波数特性。赤線はゲイン、黒線は位相の周波数特性を示す。共振周波数は約 18 kHz であった。(b) Y スキャナーの周波数特性。赤線はゲイン、黒線は位相の周波数特性を示す。共振周波数は約 1 kHz であった。

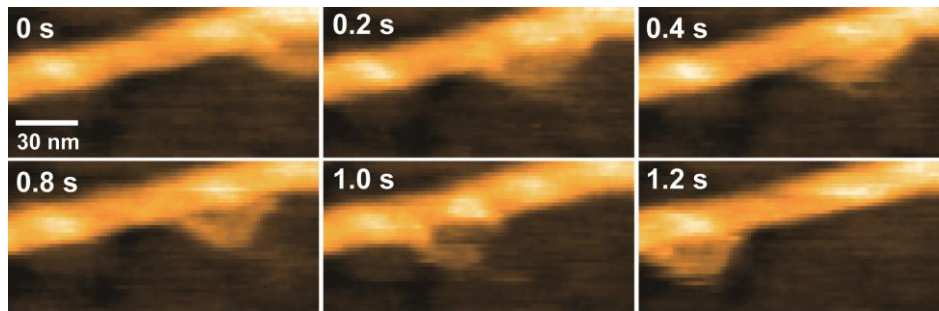


図 2-12 プローブ走査型高速 AFM で捉えたミオシン V-HMM の歩行運動

アクチンフィラメントの右端から、左端へミオシン V が動いていくのがわかる。フレームレートは 5 fps で走査範囲は $150 \times 75 \text{ nm}^2$ (100×40 ピクセル)であった。ATP 濃度は $2 \mu\text{M}$ で観察した。

2.3 全反射蛍光顕微鏡(TIRFM)

2.3.1 概要

一分子レベルでの蛍光顕微鏡を用いたタンパク質の観察では、背景光を除く必要がある。背景光の影響は夜に星空を見上げた時とよく似ている。都会のネオン街では、夜あまり星は見えないが、田舎の山奥では綺麗に見える。市販の落射型照明の焦点深度は深く、基板表面以外からの蛍光も背景光として検出してしまい、基板表面にある試料をコントラストよく観察することが難しかった。この背景光を除く手段として、基板表面から数100 nmのみしか届かない、エバネッセント光を利用する方法がよく知られている。屈折率の異なる媒質の界面に入射した光は入射角が小さい場合、反射光と透過光に分かれる。このとき入射角と屈折角の関係はスネルの法則(式2,1)に従う。

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad (2,1)$$

ここで、媒質の屈折率は n_1, n_2 、入射角は θ_1 、屈折角は θ_2 を表す。媒質の屈折率 n_1 が n_2 よりも大きい時、入射角を大きくしていくと屈折角は 90° を越え、光は透過せず媒質の界面で全反射する。屈折角が 90° になるときの入射角を臨界角 θ_c と呼び、式(2,2)で表すことができる。

$$\sin \theta_c = n_2 / n_1 \quad (2,2)$$

このとき、光が全反射する界面では高屈折率媒質側から低屈折率媒質側へ光がしみだす。このしみだした光をエバネッセント光、または近接場光と呼ぶ。エバネッセント光は界面近傍に局在し、その強度は指数関数的に減少する(式2,3)。

$$I = I_0 \exp\left(\frac{-z}{d}\right) \quad (2,3)$$

ここで、 I_0 は界面におけるエバネッセント光の強度、 z は界面からの距離、 d はエバネッセント光のしみだしの深さ（到達距離）である。しみだしの深さ d は媒質の屈折率 n_1, n_2 、光の波長 λ および入射角 θ ($\theta > \theta_c$) によって決まり、式(2,4)で表すことができる。

$$d = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{(n_1\sin\theta)^2 - n_2^2}} \quad (2,4)$$

式(2,4)に一般的な値 $n_1 = 1.52$ (ガラスの屈折率)、 $n_2 = 1.33$ (水の屈折率)、 $\theta = 75^\circ$ を代入するとしみだし深さは使用するレーザー光の波長の0.13倍となる。顕微鏡で使用されるレーザー光の波長は400~700 nmなので、しみだし深さは50~150 nmとなる。エバネッセント光を励起光として使用することで、基板表面近傍のみの蛍光を励起することができ、背景光を大幅に低減することができる。

光学顕微鏡上でエバネッセント光を発生させる手法として、プリズム型[10]と対物レンズ型[39]と呼ばれる2つの手法がある。ここでは、プローブ走査型高速AFMと組み合わせることが可能な対物レンズ型について説明する。対物レンズからの出射角度(ガラス基板への入射角度)の最大値 θ_{NA} は対物レンズの開口数(NA)によって決まり、式(2,5)で表される。

$$NA = n_1\sin\theta_{NA} \quad (2,5)$$

式(2,2)と式(2,5)から

$$\sin\theta_{NA}/\sin\theta_c = NA/n_2 \quad (2,6)$$

光を全反射させるためには、 θ_{NA} は θ_c より大きくする必要があるので、

$$\sin\theta_{NA}/\sin\theta_c \geq 1 \quad (2,7)$$

となり NA は n_2 より大きくなければならない。水の屈折率は1.33なので対物レンズの開口数は1.33よりも大きい必要があり、全反射蛍光顕微鏡では開口数が1.45~1.49の対物レンズを使用することが一般的である。対物レンズ型の全反射照明は、臨界角 θ_c 以上の領域の対物レンズ辺縁部にレーザー光を入射することで実現される。レーザー光はガラスと試料界面への入射角を一定にするために、対物レンズの後焦点面に集光され、対物レンズ出射後には平行光となる。このように形成されたエバネッセント場を用いた全反射蛍光顕微鏡は基板表面近傍のみの蛍光色素を励起することができ、落射照明法と比べて約3.2倍の蛍光シ

グナル感度を実現することができる。

2.3.2 光学系

レーザー光源は、緑色レーザー(波長:532 nm DPGL-2050F, PHOTOP Technologies. Inc, Fujian, China)を使用した。緑色レーザーは、レーザードライバー(LDC-2500S, PHOTOP Technologies. Inc, Fujian, China)により、レーザーパワーを変調することができる。光学顕微鏡筐体は倒立型顕微鏡(Eclipse Ti、株式会社ニコン、東京)を使用し、カメラはEM-C CDカメラ(Ixon3, Andor Technology, Berfast, Northern Ireland)を使用した。対物レンズは油浸対物レンズ(NA=1.49, Apo TIRF 100X/1.49 oil、株式会社ニコン、東京)を使用し、リレーレンズ(VM Lens C2.5X、株式会社ニコン、東京)を用いて倍率を250倍にした。光学顕微鏡ステージは高安定型ステージ(中興社製作所、東京)を使い、対物レンズを光学顕微鏡ステージから吊り下げるように固定ができ、筐体からの振動を分離することができる。また、振動の伝搬を防ぐため光学顕微鏡ステージは、防振パット(NSA-s15-t5, 株式会社枚方技研、大阪)を挟んで倒立型顕微鏡に設置されている。蛍光顕微鏡観察は暗室(ADR-F1、アズワン株式会社、大阪)内で行った。

図2-13に全反射蛍光顕微鏡の光学系を示す。ビームエキスパンダーによってレーザー径を広げられたレーザーはレンズL1によって平行光となり、レーザー光はレンズL2によって対物レンズ辺縁部後焦点に集光される。試料から発せられた蛍光はダイクロイックミラー(Di02-R532-25×36, Semrock, Rochester, NY, USA)とエミッションフィルター(FF01-593/40-25, Semrock, Rochester, NY, USA)により励起レーザー光が取り除かれ、顕微鏡筐体内部にあるレンズL3によってCCDカメラの受光面に集光される。図2-14に蛍光色素Cy3の蛍光一分子観察画像を示す。フレームレートは29 fpsで1ピクセルあたりの大きさは 80 nmである。個々の輝点がCy3一分子に相当する。色素の褪色のため、蛍光スポットが時間と共に減っていくのがわかる。褪色は励起された蛍光色素が、活性酸素等のラジカル種と反応して蛍光を発しない構造に不可逆的に変化することで起こる。図2-15に蛍光色素1分子の強度時間変化を示す。10秒付近で突然、背景光レベルまで蛍光強度が低下しているのがわかる。このように、不可逆的に1段階で退色が起こることが1分子の蛍光色素の特徴であり、1分子蛍光を観察していることの証明である。1分子計測によく用いられるCy3やローダミンなどの蛍光色素は、褪色するまでに $10^7 \sim 10^8$ 個程度の光子を放出することが知られている[40]。顕微鏡システム全体の光子の検出効率は1%程度ということを考えると、褪色までに放出される $10^5 \sim 10^6$ 個程度の光子を観察していることになる。励起光強度を上げると色素が励起

される頻度が高くなり多くの光子が放出されるのでシグナル強度は増加するが、退色も早く起こり観察可能時間は短くなる。量子収率が高いCy3やローダミンの場合、観察可能時間は数十秒から数分程度で時間分解能は1ミリ秒程度が限界である。

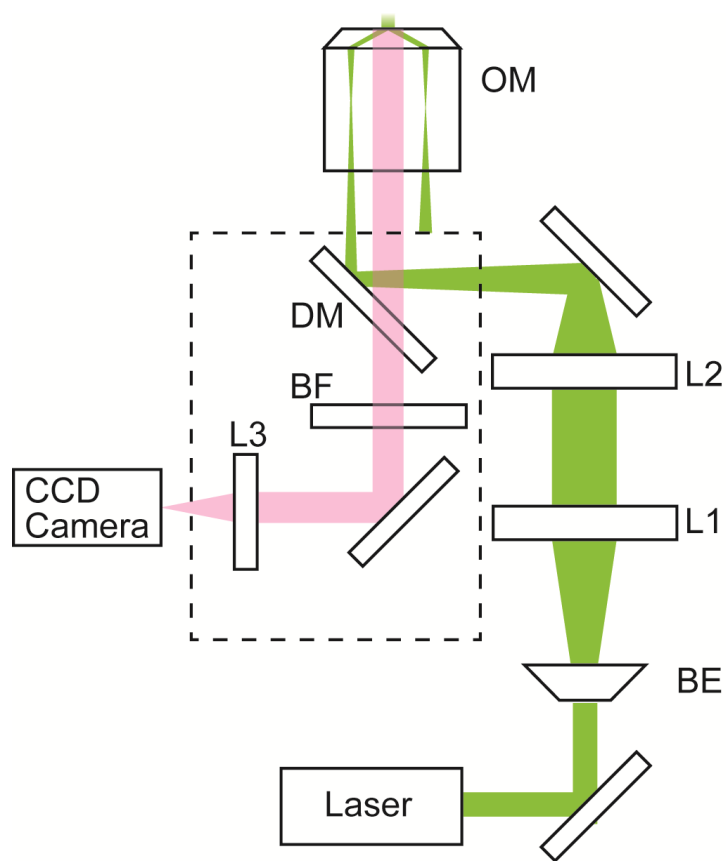


図 2-13 全反射蛍光顕微鏡の光学系

Laser; 緑色レーザー(波長; 532 nm)、BE; ビームエキスパンダー、L1; コリメートレンズ、L2; 集光するレンズ(対物レンズ後焦点へレーザー光を集光する。)、DM; ダイクロイックミラー、OM; 対物レンズ、BF; バンドパスフィルター(中心波長; 593 nm)、L3; 集光レンズ(CCDカメラに蛍光を集光する)。点線内の光学部品は、顕微鏡筐体内にある。

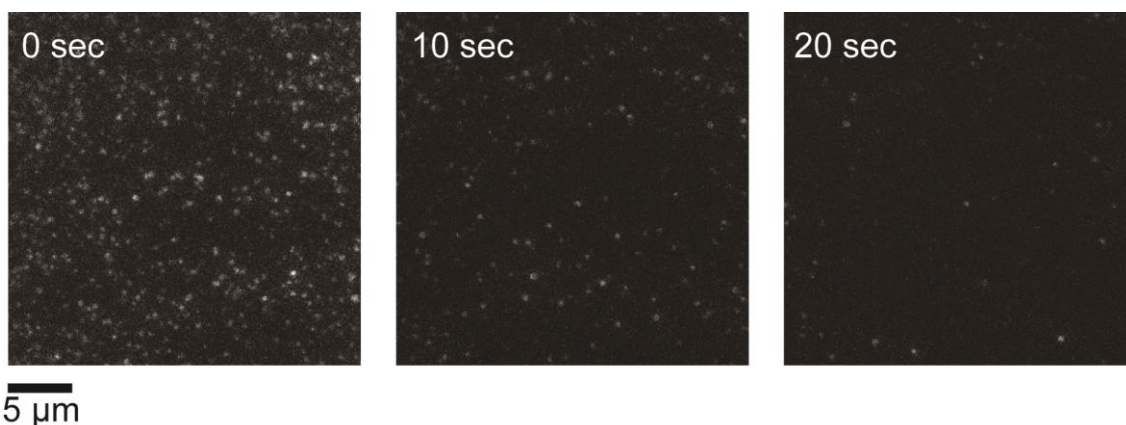


図 2-14 Cy3 蛍光色素の全反射蛍光顕微鏡(TIRFM)像

20 秒間撮影した画像のうち 10 秒間隔で画像を示す。CCD カメラの露光時間はおおよそ 30 msec でフレームレートは 29 fps であった。蛍光色素の褪色のため、時間と共に輝点の数が減っていくのがわかる。

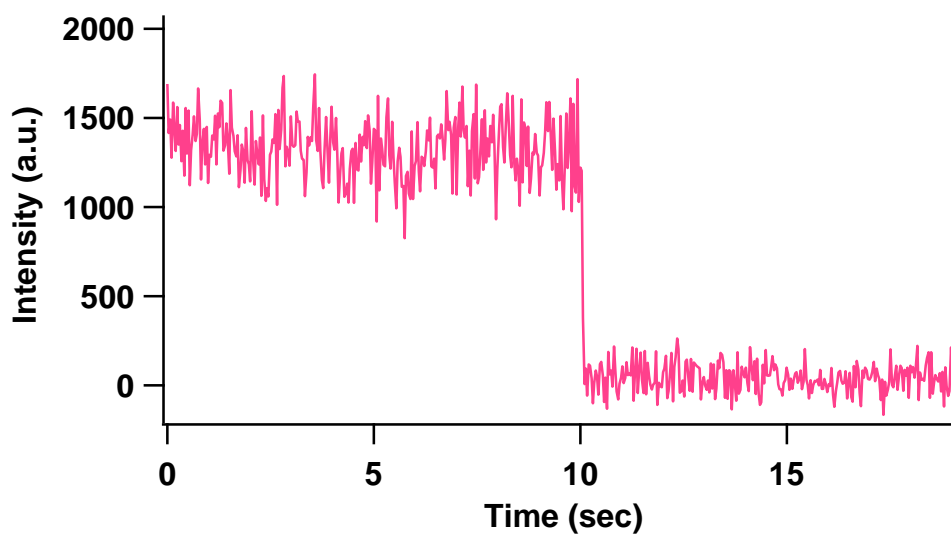


図 2-15 蛍光色素一分子の強度時間変化

蛍光スポットの重心位置を中心とする 8×8 ピクセル ($640 \times 640 \text{ nm}^2$) の蛍光強度を計測した。色素が褪色し、10 秒付近で突然背景光程度まで強度が低下している。このように一段階で色素が消光する現象が一分子蛍光の特徴である。

2.4 高速 AFM / 蛍光顕微鏡複合機

2.4.1 装置概要

プローブ走査型高速 AFM と全反射蛍光顕微鏡[10]を組み合わせた。カンチレバーの変位を検出する近赤外レーザーが蛍光顕微鏡観察する色素の蛍光と干渉するのを防ぐため、可視光を透過するローパスフィルター(BSP01-633R-25, Semrock, Rochester, NY, USA)を 2 枚、CCD カメラの前に取り付けた。また、CCD カメラはファンの振動が AFM 画像に伝搬するのを防ぐため水冷方式でを使用した。プローブ走査型高速 AFM の最大走査範囲は $650 \times 650 \text{ nm}^2$ であり、数十マイクロメートルある蛍光顕微鏡の観察範囲から高速 AFM の観察箇所を探すことは困難であり、適切な観察箇所を探すために大きく試料を動かす必要がある。そこで、光学顕微鏡ステージに、低速 AFM 観察用の広域スキャナーを取り付けた(図 2-16)。広域スキャナーは、XY スキャナー共に同じ piezoアクチュエーター(AE1010D44H4 0F、NEC Tokin 株式会社、宮城)で構成されている。この広域スキャナーは、試料を最大 $15 \mu\text{m}$ 動かすことができ、カンチレバーを固定してある Z スキャナーを使用して広域の AFM 画像を取得することも可能である。図 2-17 に広域スキャナーを用いて、撮影した大腸菌の AFM 像を示す。走査範囲は $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ (256×256 ピクセル)で 1 画像を 500 秒で取得した。

2.4.2 材料及び試料

Cy3-ミオシン V-HMM

2.2.4 で記した方法と同様にミオシン V を抽出精製し、以下の手順を用いて Cy3-ミオシン V-HMM を得た。

- ・ 限外濾過精製器(Viva-spin, VIVA Science, Gloucestershire, UK)を使い、保存してあるミオシン V からメルカプトエタノールを取り除く。
- ・ ミオシン V を $25 \text{ }^\circ\text{C}$ の恒温槽に 5 分つけ、温度を均一にする。
- ・ ミオシン V に対して、モル比 5 倍の Cy3-maleimide を加える。
- ・ 10 分後、質量比 $200 : 1 = \text{ミオシン V} : \text{ProteinaseK (PK)}$ になるように、バッファー (100 mM KCl , 2 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA , $20 \text{ mM Imidazole-HCl pH 7.6}$)に溶かした PK 溶液を加える。

- ・ 10 分後、限外濾過精製器(Viva-spin, VIVA Science, Gloucester -shire, UK)を使い、未反応の Cy3 と PK を完全に取り除いて使用する。

ビオチン化 F-アクチンの Rhodamine-Phalloidin 染色

ビオチン化 F-アクチンに対しモル比 1.5 倍になるように Rhodamine-Phalloidin のメタノール溶液をとり、アスピレーターでメタノールを完全に蒸発させる。その後、F-アクチンを加えてやさしく混ぜ合わせ、氷中にて一晩保存してから使用した。

ビオチン化 BSA

200 mM Boric Acid pH9.3 条件下で、5 mg/ml BSA (牛血清アルブミン) に対してモル比 10 倍の biotin-(AC₅)₂-Sulfo-Osu を加え、25 °C で 4 時間反応させる。未反応の biotin を、限外濾過精製器(Viva-spin, VIVA Science, Gloucestershire, UK)を使い完全に取り除いて使用した。

ニトロセルロース処理観察ステージ

ピラニア洗浄後、乾燥させたカバーガラスを 0.2 %ニトロセルロース溶液(酢酸 3-メチルブチルに対しコロジオン溶液 (2%ニトロセルロース) を 10%の割合で混合することによって 0.2%ニトロセルロース溶液とした。)に 1 分間漬ける。自然乾燥後、両面テープで、試料滴下部分を囲い使用した。

酸素除去剤

蛍光顕微鏡観察は、酸素除去剤[41]; (10 mM DTT, 25 mM glucose, 10 nM catalase, 2.5 uM Glucose oxidase)を含むバッファーで行った。

2.4.3 高速 AFM / 蛍光顕微鏡同時観察

光学顕微鏡ステージに組み込んだ広域スキャナーを用いて、蛍光顕微鏡画像から任意の場所を高速 AFM で観察できるかを確かめるために、ローダミン染色したアクチンフィラメントを広域 AFM と蛍光顕微鏡、高速 AFM で観察した。

アクチンは、細胞内外の運動や細胞小器官の固定、細胞分裂など生命に必須な基本生理機能に関わっている。細胞内では主に 2 つの状態が存在し、ひとつは球状のアクチン分子がバラバラになった単量体状態(G-アクチン)で、もうひとつは G-アクチンが二重螺旋状に

重合したフィラメント状態(F-アクチン)である。G-アクチンは、高イオン強度液に加えるとフィラメント化する。アクチンの脱重合を阻害するファロイジンにローダミンという色素が付いた、ローダミンファロイジンでアクチンの脱重合を阻害することで、アクチンフィラメント全体がローダミンで染色される。そのため、染色されたアクチンフィラメントの蛍光像は、アクチンフィラメントの構造と同じものになり、高速 AFM と蛍光顕微鏡による同視野観察の試験試料として適している。以下に観察手順を示す。観察バッファーは、100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 20 mM Imidazole-HCl (pH 7.6)を使用した。

- ・ ニトロセルロース処理観察ステージに、ビオチン化 BSA(1 μM, 10 μl)を滴下し 3 分間インキュベートする。
- ・ 未吸着のビオチン化 BSA をバッファーで洗い流し、ストレプトアビジン(2 μM, 10 μl)を滴下し、3 分間インキュベートする。
- ・ 未吸着のストレプトアビジンをバッファーで洗い流し、ローダミンファロイジンで染色したビオチン化 F-アクチン(0.2 μM, 10 μl)を滴下し 10 分間、インキュベートする。
- ・ バッファーで洗浄後、観察を行う。

広域 AFM と蛍光顕微鏡、高速 AFM から得られた同視野画像を図 2-18 に示す。光学顕微鏡像と広域 AFM 像で、同様のアクチンフィラメントの像を観察することができた。広域 AFM 像を介することで高速 AFM 像と蛍光顕微鏡像の相関関係を容易に判断することができる。低分解能のため蛍光画像では束になったアクチンフィラメントを解像することができないが、AFM 像ではそれぞれのフィラメントを解像することができている。

次に、タンパク質一分子の動きを高速AFMと蛍光顕微鏡で同時に観察できることを実証するために、Cy3でラベルしたミオシンV-HMMのアクチンフィラメントに沿った歩行運動の観察を行った。観察手順を以下に示す。観察バッファーは、25 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 20 mM Imidazole-HCl (pH 7.6)を使用した。

- ・ リポソーム(DPPC:DPTAP:biotin-cap DPPE = 8.5:0.5:1)を、100 mM MgCl₂ で 0.1 mg/ml の濃度にする。ハンディソニケータで超音波をかけ、リポソームの粒子径を小さくする。
- ・ 観察ステージに、50 μl 滴下し恒温槽で 40 分、70 °Cでインキュベートした後、室温で 3 時間反応させる

- MilliQ (2 ml)で、未吸着のリポソームを洗い流す。
- ストレプトアビジン(5 nM, 10 μ l)を滴下し、3 分間反応させる。
- バッファー(3 ml)で、未吸着のストレプトアビジンを洗い流す。
- ビオチン化-F アクチン(1 μ M, 10 μ l)を滴下し、15 分間反応させる。
- 2 μ M ATP を含んだバッファーで洗浄後、Cy3 ミオシン V-HMM(2 nM, 10 μ l)を滴下し、観察を行う。

図 2-19 に Cy3-ミオシン V-HMM のアクチンフィラメントに沿った歩行運動の高速 AFM / 蛍光顕微鏡の同時観察像を示す。0 s では、まだ AFM 画像にミオシン V が現れていないが 0.99 s の時に AFM 画像にミオシンが現れ、それと同時に蛍光顕微鏡画像に蛍光スポットが現れる。AFM 画像では、ハンドオーバーハンド運動でミオシンが右上から左下へ移動していく。一方、蛍光顕微鏡画像では、わずかに蛍光スポットが左下へ移動していく。この結果から、開発した高速 AFM / 蛍光顕微鏡複合機が、タンパク質 1 分子の動態を同時に同視野で観察できる装置であることを実証することができた[23]。

しかし、このときの観察では高速 AFM と蛍光顕微鏡の観察視野の大きさの違いから、分子の詳細な動きを解析することはできず、AFM と蛍光画像の相関は 8 フレーム(2.67 秒)のみだった。本論文第 4 章では、この観察視野の違いを克服するための手法の開発を行った。

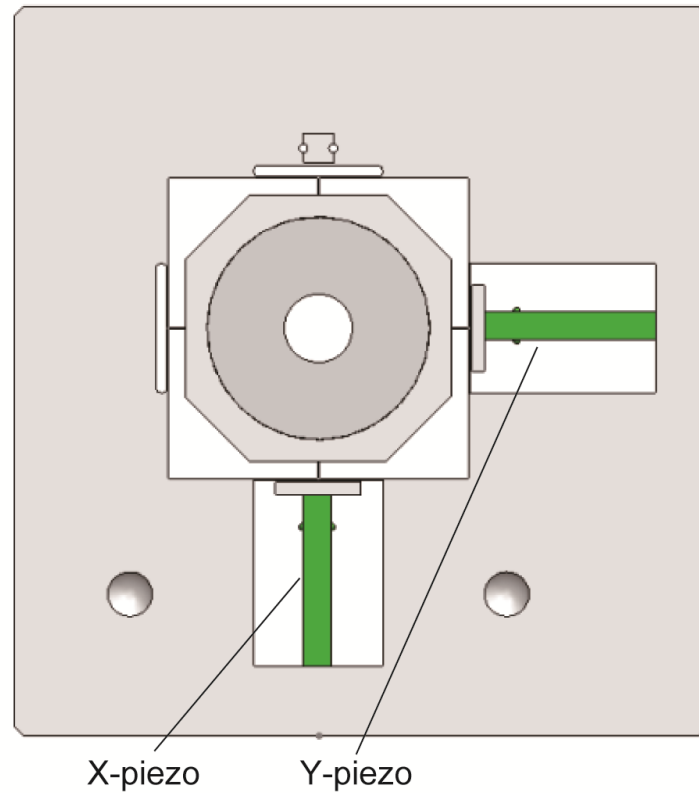


図 2-16 光学顕微鏡ステージに取り付けた広域スキャナー

X スキャナーと Y スキャナーの共振周波数はおおよそ 200 Hz であった。

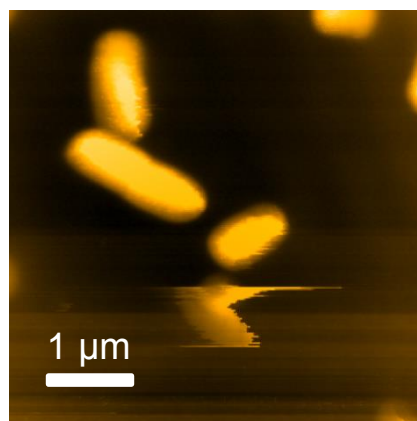


図 2-17 広域スキャナーを用いて撮影された大腸菌の AFM 像

ガラス基板を 0.1%Poly-L-Lysine コートした後、一旦乾燥させた。大腸菌を 30 分間インキュベートした後、未吸着のバクテリアを洗い流して観察した。AFM 像の走査範囲は $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ で 256×256 ピクセルで構成される。約 500 秒で画像を取得した。

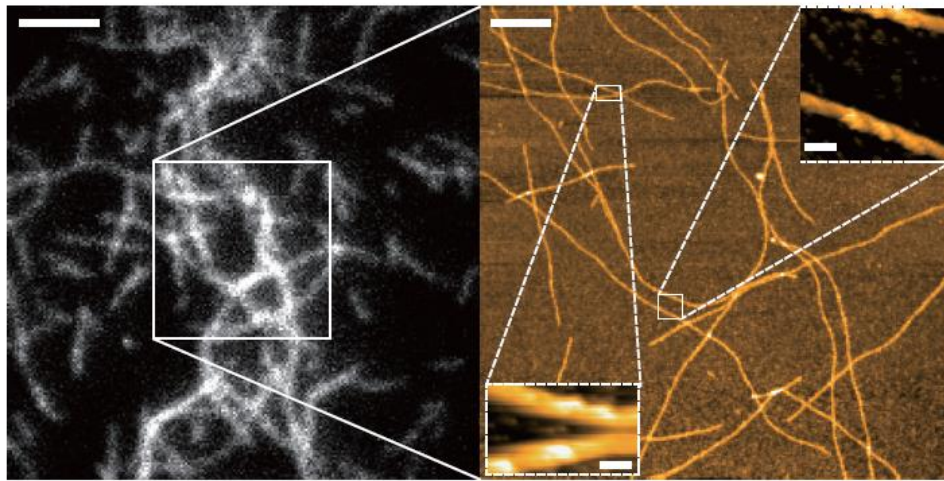


図 2-18 蛍光顕微鏡と広域 AFM、高速 AFM によるアクチンフィラメントの同視野観察

左図は蛍光顕微鏡像(スケールバー; 2 μm)、右図は広域 AFM 像(スケールバー; 500 nm)、右図内にある挿入図は高速 AFM 像(スケールバー; 40 nm)を示す。右上の高速 AFM 像のフレームレートは 2 fps で左下の画像のフレームレートは 8.3 fps であった。

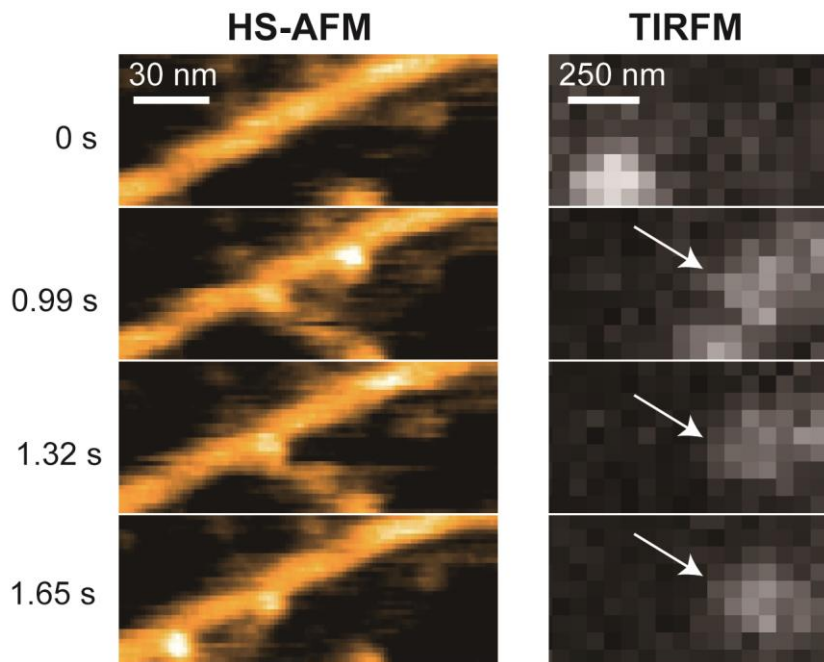


図 2-19 ミオシン V の高速 AFM / 蛍光顕微鏡による同時観察像

フレームレートは、3 fps であった。CCD カメラの露光時間を AFM の画像取得時間に設定し、AFM のトリガー信号と同時に露光を開始して、AFM と蛍光顕微鏡で画像を同時に取得した。蛍光顕微鏡画像中の矢印は AFM 画像に相当するミオシンを示している。

2.5 まとめ

一分子蛍光顕微鏡を代表とする光学顕微鏡は、ヌクレオチドなどの低分子化合物の可視化や蛍光標識による目的の分子の同定、細胞内部の観察など高速 AFM が実行し得ない機能を有している。それ故、高速 AFM と光学顕微鏡の融合は高速 AFM の適用範囲を飛躍的に拡張し、両顕微鏡から得られる多角的な情報はタンパク質の作動原理のより詳細な理解につながると期待される。しかしながら、従来の試料を走査するサンプル走査型高速 AFM では単純に光学顕微鏡と組み合わせることができず、試料ステージが絶えず XY 方向に走査されるため AFM と同時に画像を取得することができない。さらに、試料ステージの大きさに制限があり、細胞を培養するシャーレなどをそのままステージとして使用することもできなかった。

そこで、本研究では原理上すべての倒立型の顕微鏡と組み合わせることができるプローブ走査型高速 AFM の開発を行った。高速 AFM の走査機構を見直し、サンプル走査方式からプローブ走査方式に変更した。開発を通して、カンチレバー走査におけるレーザー光のトラッキング法や高共振周波数のスキャナー、コンパクトな光てこ光学系、光学顕微鏡ステージに組み込んだ広域走査スキャナーなどの要素技術の開発を行った。完成した装置を一分子蛍光顕微鏡に搭載し、Cy3 でラベルしたミオシン V がダイナミックに動く様子を高速 AFM と蛍光顕微鏡で同時に観察することに成功し、本複合顕微鏡が一分子レベルでタンパク質の挙動を同時に観察できる装置であることを実証した。

しかし、ここで開発した高速 AFM / 蛍光顕微鏡複合機には解決すべき課題が多数存在する。例えば、カンチレバーはスキャナーへ接着剤を使い固定しているが、高速 AFM 観察では頻りにカンチレバーを交換する必要があるため、接着剤を使った固定法では操作性に問題がある。また、カンチレバーを着脱する際にスキャナーやカンチレバーの破損の要因になり得る。そのため、プローブ走査型高速 AFM を実用化するためには、機械的で強固なカンチレバー固定法の開発が不可欠である。さらに、実際の観察における問題として、高速 AFM と光学顕微鏡では観察視野の大きさ、および空間分解の違いがある。一分子蛍光観察画像における 1 ピクセルの大きさは、一般的な高速 AFM 画像のピクセルと比べて 1000 倍以上大きく高速 AFM 像と光学像で相関を取ることが難しい。また、背景光の増大を防ぐため、試料を低濃度条件でしか使用することができず、観察視野の大きくない高速 AFM では効率よく計測を行うことも難しい。さらに、光の回折限界によって光学顕微鏡の空間分解能は高速 AFM と比べて大きく劣っている。高速 AFM 像と超解像分解能光学像を同時に取得することができれば生体分子の作動機構のより詳細な議論が可能となるだろう。以下

の章では、これらの課題を解決し得る装置および手法の開発を行った。

第 3 章 プローブ走査型高速 AFM のための機械的カ ンチレバー固定法の開発

3.1 目的と概要

2016 年現在、高速原子間力顕微鏡(HS-AFM)[5,26]は市販化もされ、生物物理をはじめとする様々な分野に広く普及しつつある。実際に、金沢大学グループ以外の研究室から高速 AFM を用いて得られた研究成果が数多く発表されている[42–46]。さらに、プローブ走査型高速 AFM[21,23]の誕生に伴い、従来の高速 AFM では得ることが難しかった情報を得ることができるようになった。例えば、プローブ走査型高速 AFM を全反射蛍光顕微鏡(TIRFM)[39]と組み合わせれば、タンパク質一分子レベルで高速 AFM / TIRFM 同時観察を行うことができる。蛍光性ヌクレオチドアナログ[47]を用いれば、タンパク質の構造変化と同時にヌクレオチドの結合/解離を可視化することもできる。また、プローブ走査型高速 AFM はすべての倒立型顕微鏡と組み合わせることができるので、光の回折限界を超える空間分解能を有する超解像光学顕微鏡[48]と組み合わせた高速 AFM / 超解像光学顕微鏡複合機も可能である。さらに、光トラップ技術[49,50]と組み合わせることで外力作用下にあるタンパク質の振る舞いも可視化することができる。しかしながら、プローブ走査型高速 AFM が生命科学において常用的なツールとなるためには、解決しなければならない課題がある。それは、カンチレバーの機械的な固定法の確立である。プローブ走査高速 AFM の開発段階では、接着剤を用いてカンチレバーをスキャナーへ固定していた。しかし、実際に生体試料を AFM 観察するときには、頻繁にカンチレバーを取り換える必要があり接着剤を用いた固定法では効率よく実験を行うことはできない。また、この方法ではカンチレバーを取り外す時にスキャナーやカンチレバーの破損の要因になり、実用的とは言い難い。さらに、観察中に接着剤が観察溶液に浸かることによるコンタミネーションも考えられる。このように、カンチレバーの機械的な固定法の確立は、プローブ走査型高速 AFM を使用するうえで解決しなければいけない課題なのである。

従来の試料を走査するサンプル走査型高速 AFM の Z スキャナーは、小さなガラスステージ(直径 1.5 mm、高さ 2 mm、質量 8 mg)を走査する。一方で、プローブ走査型高速 AFM の Z スキャナーは、カンチレバーホルダー(体積 $\sim 3 \times 3 \times 3 \text{ mm}^3$ 、質量 $\sim 32 \text{ mg}$)とカンチレバー(体積 $3.4 \times 2 \times 0.3 \text{ mm}^3$ 、質量 3 mg)を同時に動かす必要があり、サンプル走査型的高速 AFM と比べて大きく複雑な構造物を動かさなければならない。加えて、プローブ走査

型高速AFMのZスキャナーの周波数特性はカンチレバーを固定する治具によってさらに悪化してしまう。複雑な構造で出来た治具を用いれば、カンチレバーを強く固定することができるが、Zスキャナーの共振周波数は治具の大きな質量によって下がってしまい高速走査に適さない。一方で、小さく簡易的な構造の治具ではカンチレバーを強く固定することができず、カンチレバー土台部分に不要な振動を起こすことから使用することが難しい。

そこで本研究では、使いやすさと性能を両立すべく4種類のカンチレバー固定治具を開発し、性能を評価した。開発を通して、治具をZピエゾアクチュエーター上に取り付けるのではなくスキャナーの土台部分に設置する方法が、最も簡便でピエゾアクチュエーター自身の周波数特性を低下させない手法であることがわかった。この手法を用いた時の周波数特性は、ピエゾアクチュエーターのみをスキャナーの土台部分へ固定した時と同様の周波数スペクトルであった[24]。開発したスキャナーをプローブ走査高速AFMに組み込み、回転子のないF₁-ATPase($\alpha_3\beta_3$ 複合体)とアクチンフィラメントの観察を行った。フレームレートが12.5 fpsにおいても、タンパク質を壊すことなく観察することができ、開発したスキャナーが有用であることを証明することができた。

3.2 実験

3.2.1 装置及び測定方法

Z スキャナーの周波数特性はカンチレバーのベース部の先端、もしくはカンチレバーホルダーの先端の変位を周波数解析器(FRA5097, 株式会社エヌエフ回路設計ブロック, 神奈川県)を使って測定した。Z 方向のカンチレバーおよびカンチレバーホルダーの変位はヘテロダイン方式レーザー変位計 (ST-3761, 岩通計測株式会社, 東京)を用いて測定した[51]。Z ピエゾアクチュエーターは、電圧増幅器 (M-2335, 株式会社メステック, 埼玉)を介して駆動した。図 3-1 に測定法の模式図を示す。Z スキャナーには積層型ピエゾアクチュエーター (AE0203D04F, NEC Tokin, 宮城, 体積 $2 \times 3 \times 5 \text{ mm}^3$, 自己共振周波数 261 kHz, 最大変位 $4.6 \text{ }\mu\text{m}$)を使用した。Z ピエゾアクチュエーターは、XY スキャナーによって動かすことが可能なステージに設置した。カウンターバランス法[1]を用いるため、2 つの Z ピエゾアクチュエーターを互いに対になるように取り付けた。以下に記す、すべてのスキャナーでは、炭化ケイ素で作られたカンチレバーホルダーを Z ピエゾアクチュエーターへ装着した。カンチレバーホルダーは試料基板に対してカンチレバーが 20 度傾くように設計されている。図 3-2 にスキャナーに設置された Z ピエゾアクチュエーターの周波数特性を示す。共振周波数約 110 kHz で、この値は電化回路を用いて計測した周波数特性(図 3-3)から得られた共振周波数(222 kHz)の約半分の値であり、ピエゾアクチュエーターの片端を固定した時の共振周波数とよく一致した。

3.2.2 プレートスプリングを用いたカンチレバー固定法

図 3-4 にプレートスプリングを用いたカンチレバー固定治具の模式図を示す。柔軟性のある金属(ベリリウム銅)で作られたプレートスプリングが、カンチレバーホルダーに取り付けられている。カンチレバーはプレートスプリングとカンチレバーホルダーに挟まれて固定される。図 3-3 にこの手法を用いてカンチレバーを固定したときの Z スキャナーの周波数特性を示す。ピエゾアクチュエーター自身の共振より低い周波数領域にいくつかの大きなピークが計測された。また、図 3-5 におけるピンク色と水色の破線が示すように、カンチレバーホルダーのみのスペクトルの形状と大きく異なっている。この原因は、プレートスプリングによるカンチレバーの固定力が弱いためであると考えられる。数種類の形状のプレートスプリングを製作したが、固定力の弱さを改善することはできなかった。

3.2.3 ネジを用いたカンチレバー固定治具

図 3-6 にネジを用いたカンチレバー固定治具の模式図を示す。この方法では、カンチレバーホルダーにネジ穴(サイズ: M1.6×0.2)があり、カンチレバーはカンチレバーホルダーに設けられた隙間に挿入され、ネジで直接押さえつけられて固定される。図 3-7 にこの固定法を用いたときの周波数特性を示す。30 kHz と 50 kHz に大きなピークが計測され、さらに数 kHz の低周波数領域にいくつかの小さなピークが計測された。スペクトルの形状は、カンチレバーホルダーのみのスペクトルと大きく異なっている。このような複雑なスペクトルになる原因は、ネジの振動がカンチレバーに伝搬するためだと考えられ、カンチレバーホルダーのデザインを変更しても改善することができなかった。さらに、カンチレバーを取り付ける際に、ネジによるトルクが原因でカンチレバーの土台が頻繁に破壊され、実用化は不可能であった。

3.2.4 スキャナーの土台部分にカンチレバーの治具を作る方法

3.2.2 および 3.2.3 で述べられたように、Z ピエゾアクチュエーター上に治具を作製する手法ではピエゾアクチュエーターへ負荷される質量を抑えるため、複雑な構造を採用することができずカンチレバーを強固に固定することができなかった。その結果、Z スキャナーの性能はピエゾアクチュエーター自身の周波数スペクトルと大きくかけ離れたものになってしまった。そこで、固定治具を Z ピエゾアクチュエーター上ではなくスキャナーの土台に作製する方法を試みた。図 3-8 に新しく考案したカンチレバー固定法の模式図を示す。ネジ穴のある柱をピエゾアクチュエーター後部のスキャナーの土台部分に製作した(single-prop モデル)。柱にあるネジ穴の大きさは、M1.6×0.35、深さ 2 mm で、カンチレバーを挟むプレートはネジによって柱に固定される。アクリル変成シリコン樹脂系の接着剤(Super-X, セメダイン株式会社、東京)による弾性体がプレートの裏のカンチレバーの土台と接触する部分に取り付けられている。これはカンチレバーの土台部分とプレートを密着させ、不要な振動を抑えるためである。図 3-9 にこの手法を用いてカンチレバーを固定したときの周波数特性を示す。共振周波数はおおよそ 100 kHz であり、スペクトルの形状はカンチレバーホルダーのみのスペクトルと低周波領域の小さな振動を除いて大きな違いは見られなかった。3.2.2 および 3.2.3 で得られたスペクトルと違い、ピエゾアクチュエーター自身の周波数特性を反映したスペクトルを得ることができた。しかし、40-70 kHz の周波数領域に小さな振動が観察された。この振動は、カンチレバーを固定する力が弱い

であると考え、この固定法の改良型(two-prop モデル)を製作した。

図 3-10 に two-prop スキャナーの模式図を示す。基本的な機構は single-prop モデルと同じである。ネジ穴のある柱を Z ピエゾアクチュエーターの両側に設置した。ネジ穴の大きさは M1×0.25 で柱を貫通している。カンチレバーを押さえるプレートは、ネジによって 2 つの柱を橋渡ししている。single-prop モデルと同様に、カンチレバーの土台が接するプレートの裏側には、弾性体に取り付けられている。図 3-11 にこの固定法を用いたときの周波数特性を示す。共振周波数は約 100 kHz であり、single-prop モデルで計測された低周波領域での振動を抑えることができている。スペクトルの形状は、カンチレバーホルダーのみの形状ばかりではなく、ピエゾアクチュエーター自身のスペクトルと比べてもほとんど違いは見られなかった[24]。XY スキャナー駆動部に支柱を設置したため、スキャナーの共振周波数が支柱を設けない時と比べて、それぞれ 18 kHz から 10 kHz (X スキャナー)、1.5 kHz から 1.3 kHz (Y スキャナー)へ低下した。しかし、この X スキャナーの共振周波数の値は十分逆フーリエ関数補償法を用いることによって補償することが可能な範囲である(図 3-12)。Y スキャナーの共振周波数の値は、高速 AFM イメージングにとって十分な値である。ここで、Z ピエゾアクチュエーターを上から押さえることによる圧電定数への影響について記す。接着剤を使用してカンチレバーを固定したときの Z スキャナーの圧電定数は 18.17 nm/V である。一方で、ここで開発した Z スキャナーの圧電定数は 15.22 nm/V であり、上からピエゾアクチュエーターが押さえられるため、幾分か小さな値となっているが、接着剤を使用したときの圧電定数と比べて大きな変化は見られなかった。これは、プレートの裏側に取り付けられた弾性体によって適度な力のみカンチレバーに負荷され、ピエゾアクチュエーターは十分に伸びることができるためであると考えられる。

3.2.5 生体分子の観察

開発したスキャナー(3.2.4、two-prop モデル)をプローブ走査型高速 AFM[23]に組み込み生体分子の観察を行った。観察ステージは、カバーガラス(C030401, 松波硝子工業株式会社、大阪)に 5×5 mm²の大きさに切り取ったマイカ(990065, 株式会社ニラコ、東京)を接着剤で貼り付けて作製した。観察ステージは、使用する直前に撥水剤(FS-101Z-0.5, 株式会社フロロテクノロジー、愛知)をマイカの周りに塗布し、アルミブロック恒温槽(0063285-000, タイテック株式会社、埼玉)を用いて 50 °C で 20 分間温めて撥水剤を乾燥させてから使用した。

開発したスキャナーの有効性を証明するために、回転子のない F₁-ATPase(α₃β₃ 複合体)

の ATP 加水分解に伴う構造変化の観察を行った。F₁-ATPase は α サブユニットと β サブユニットが 3 つずつ交互に円状に配置され、その中心部に γ サブユニットが突き刺さった構造をしている。F₁-ATPase は光学顕微鏡法などによって、ATP を加水分解しながら γ サブユニットが一方方向へ回転していることが明らかとなっている[52]。2010 年に内橋、飯野ら[8]によって γ サブユニットを取り除いた $\alpha_3\beta_3$ 複合体においても ATP の加水分解に伴って β サブユニットが開閉し一方方向に伝搬していくことが明らかとなった。観察に使用した $\alpha_3\beta_3$ 複合体は自然科学研究機構岡崎統合バイオセンターの飯野亮太教授から提供していただいた。以下に観察手順を示す。

- ・ マイカを劈開し 0.1%アミノシランを滴下し 3 分間インキュベートする。
- ・ 超純水で洗浄した後、0.1%グルタルアルデヒドを滴下し 3 分間インキュベートする。
- ・ バッファーA (10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 10 mM KCl, 5 mM MgSO₄)で洗浄後、10 nM $\alpha_3\beta_3$ 複合体を滴下し 3 分間インキュベートする。
- ・ バッファーB (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM MgCl₂)で未吸着の $\alpha_3\beta_3$ 複合体を洗い流す。
- ・ カンチレバーを基板へアプローチさせた後、終濃度 2 μ M になるように ATP を加えて観察を行う。

図 3-13 に 7.14 fps で取得された $\alpha_3\beta_3$ 複合体の高速 AFM 像を示す。3 つある β サブユニットが外側に高く突き出た状態(オープン状態)と内側に引っ込んだ状態(クローズ状態)を協同的に繰り返して構造変化している様子が観察された。各画像に示す赤い丸は各画像の最も高いピクセル位置を示し、オープン状態の β サブユニットを表す。 β サブユニットが構造変化を起こす頻度は、従来の高速 AFM を用いた結果[8]とよく一致した。

次に、開発したスキャナーの達成可能な最高時間分解能を調べるために、アクチンフィラメントの観察を行った。アクチンフィラメントは第 2 章 2.4 と同じようにして調製された。観察バッファーは 25 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 20 mM Imidazole-HCl (pH 7.6)を使用した。以下に観察手順を示す。

- ・ マイカを劈開し 0.1%アミノシランを滴下し 3 分間インキュベートする。
- ・ 超純水で洗浄後、100 nM アクチンフィラメントを 30 分間インキュベートする。
- ・ 未吸着のアクチンフィラメントをバッファーで洗い流して観察を行う。

図 3-14 にそれぞれ、5, 10, 12.5 fps のフレームレートで撮影されたアクチンフィラメントの高速 AFM 像を示す。アクチンフィラメントは、アミノシランコートしたマイカ基板にゆるやかに固定されている。図 3-13 (c)では、フレームレート 12.5 fps においても、アクチンフィラメントはプローブによって破壊されることはなく、36 nm の螺旋状のピッチが綺麗に可視化されている。この結果から、プローブ走査型高速 AFM を用いて、サブ 100 ミリ秒の画像取得時間で生体分子の機能を乱すことなく観察できることを確認することができた。

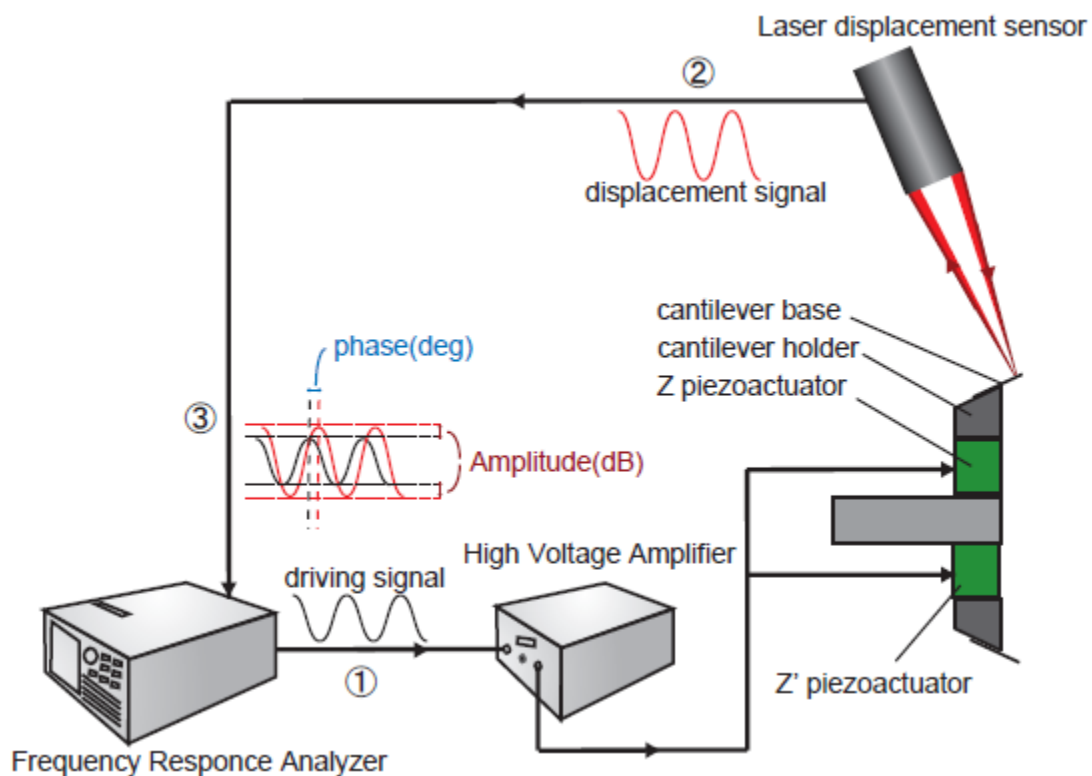


図 3-1 Z スキャナーの周波数特性を計測するときのセットアップ。

① 周波数解析器から電圧増幅器を介して、Z ピエゾアクチュエーターをサイン波で振動させる。② カンチレバーのベース部の先端に照射されたレーザー光の反射光によりカンチレバーの振動を計測する。③ ピエゾアクチュエーターへ入力したサイン波とレーザー変位計によって計測されたカンチレバーの変位を各周波数で比べて、ゲインと位相を取得する。

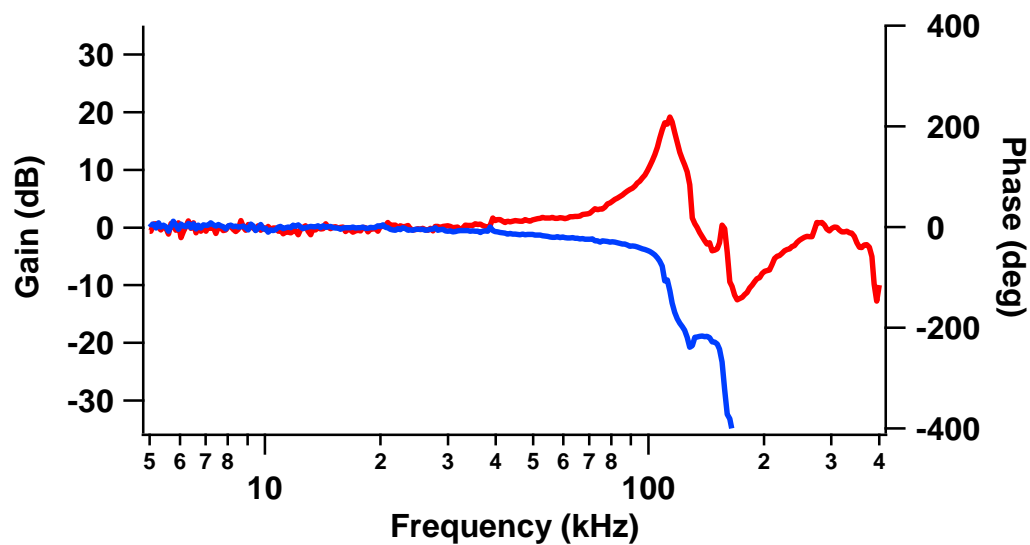


図 3-2 Z ピエゾアクチュエーターをスキャナーに取り付けたときの周波数特性

赤線がゲイン、青線が位相の周波数特性を示す。共振周波数は、約 110 kHz でこの値は
 ピエゾアクチュエーター自身の共振周波数のおおよそ半分である。

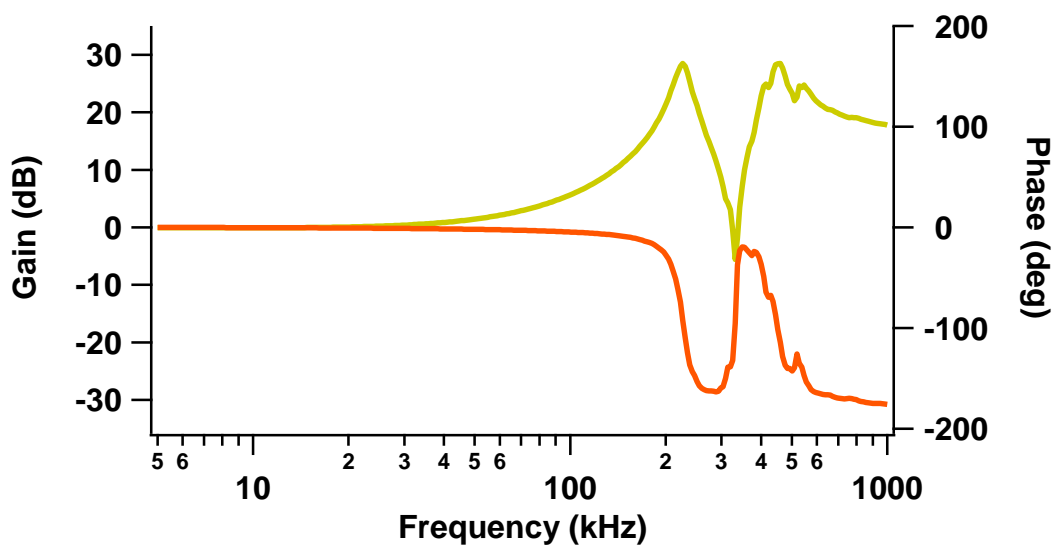


図 3-3 電荷回路を用いて測定した Z ピエゾアクチュエーターの周波数特性

黄線がゲイン、橙色線が位相の周波数特性を示す。共振周波数は 222 kHz。

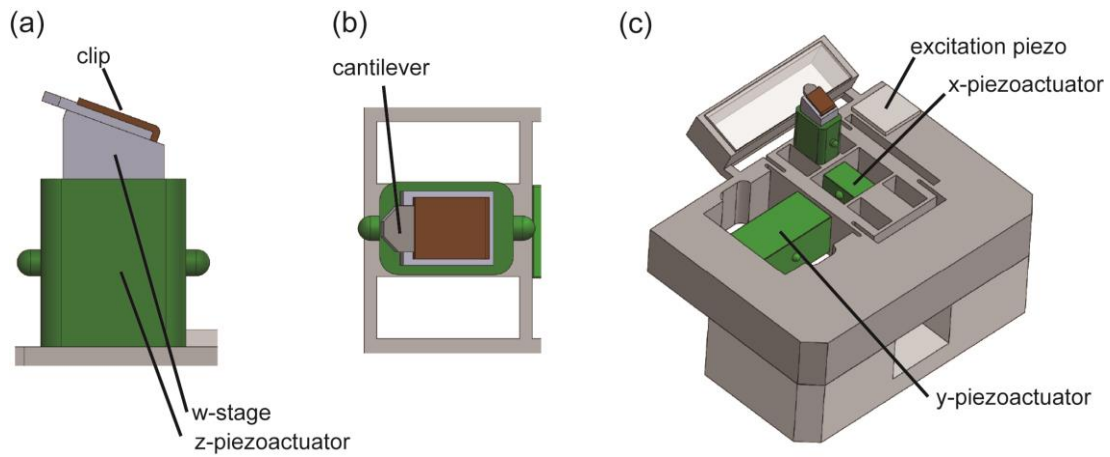


図 3-4 プレートスプリングを用いたカンチレバー固定法の模式図

(a) 横から見た図、(b) 上から見た図と(c) 全体像

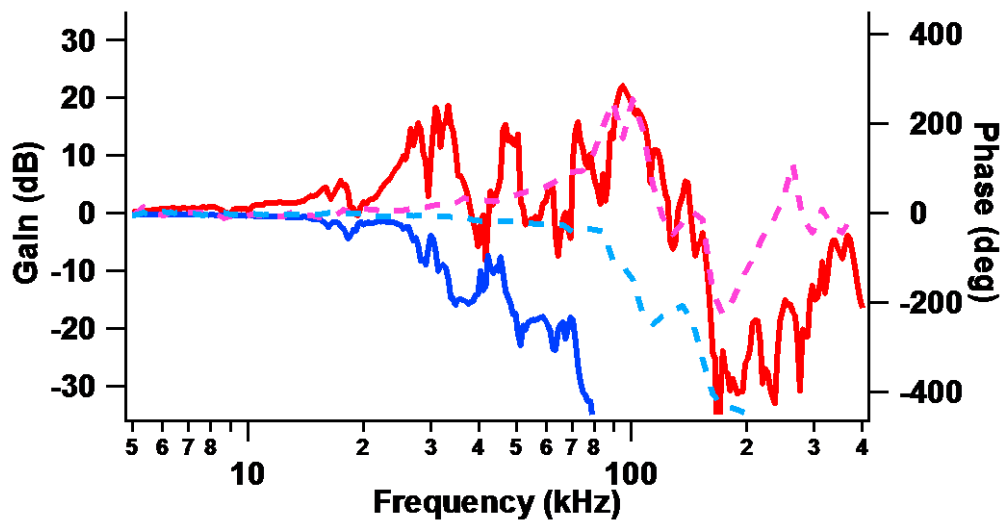


図 3-5 プレートスプリングを用いたカンチレバー固定法の周波数特性

赤実線と青実線は、それぞれカンチレバーを固定したときのゲインと位相の周波数特性を示す。ピンク破線(ゲイン)と水色破線(位相)はカンチレバーホルダーのみの周波数特性を示す。

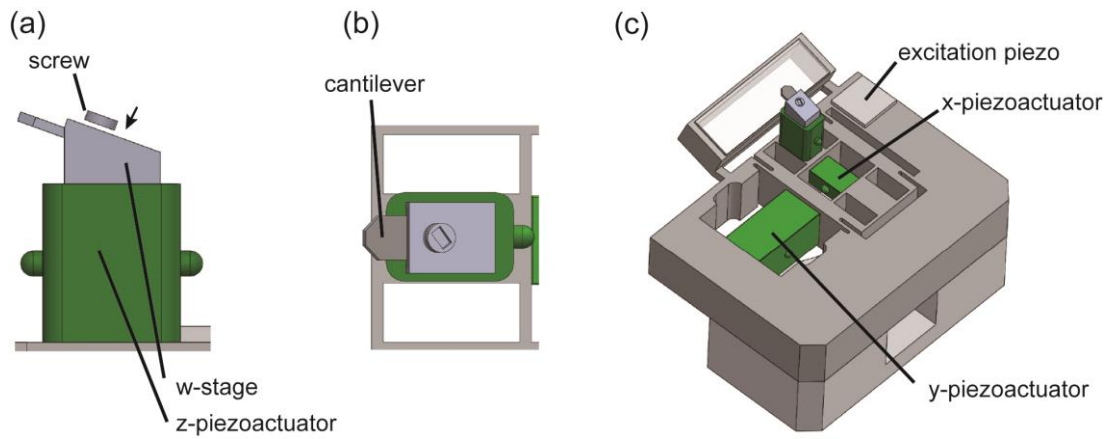


図 3-6 ネジを用いたカンチレバー固定法の模式図

(a) 横から見た図、(b) 上から見た図と(c) 全体像

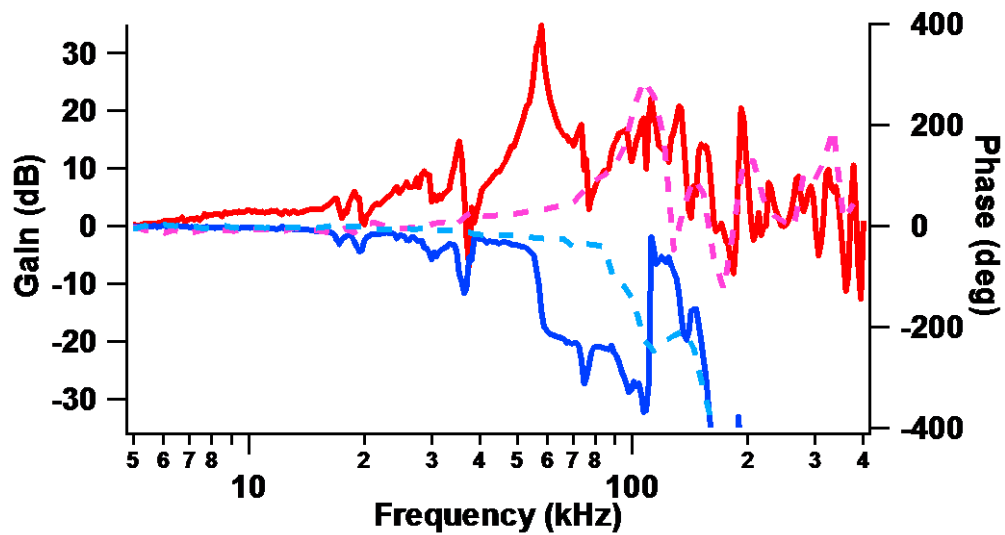


図 3-7 ネジを用いたカンチレバー固定法の周波数特性

赤実線と青実線は、それぞれカンチレバーを固定したときのゲインと位相の周波数特性を示す。ピンク破線(ゲイン)と水色破線(位相)はカンチレバーホルダーのみの周波数特性を示す。

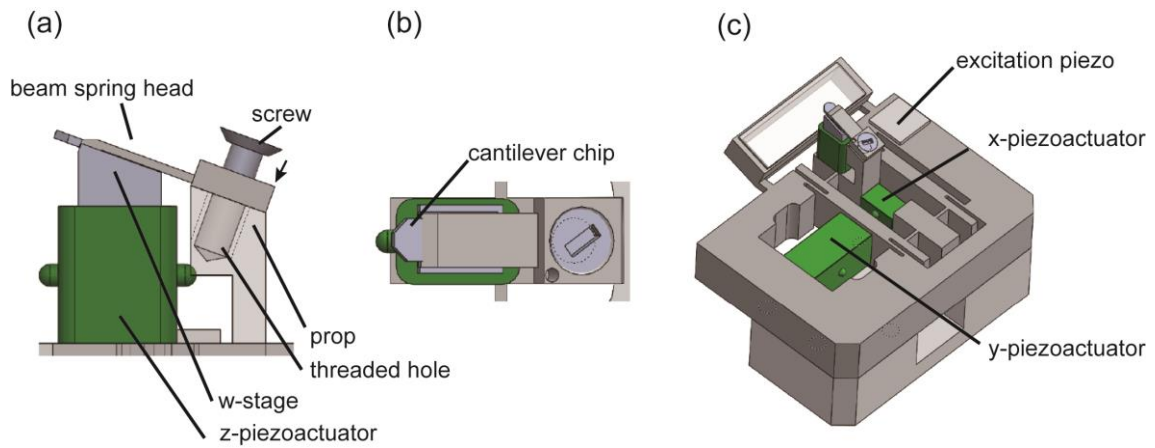


図 3-8 single-prop モデルを用いたカンチレバー固定法の模式図

(a) 横から見た図、(b) 上から見た図と(c) 全体像

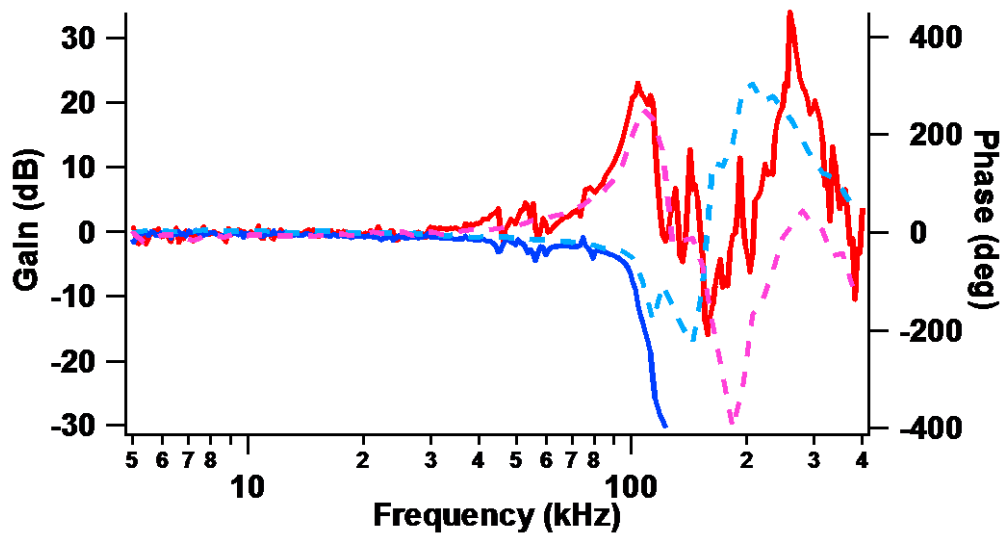


図 3-9 single-prop モデルを用いたカンチレバー固定法の周波数特性

赤実線と青実線は、それぞれカンチレバーを固定したときのゲインと位相の周波数特性を示す。ピンク破線(ゲイン)と水色破線(位相)はカンチレバーホルダーのみの周波数特性を示す。

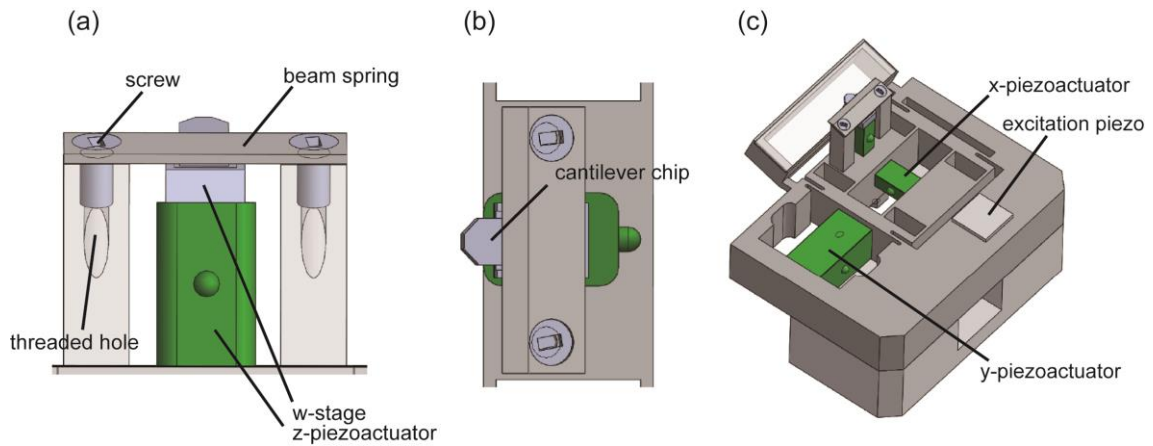


図 3-10 two-prop モデルを用いたカンチレバー固定法の模式図

(a) 横から見た図、(b) 上から見た図と(c) 全体像

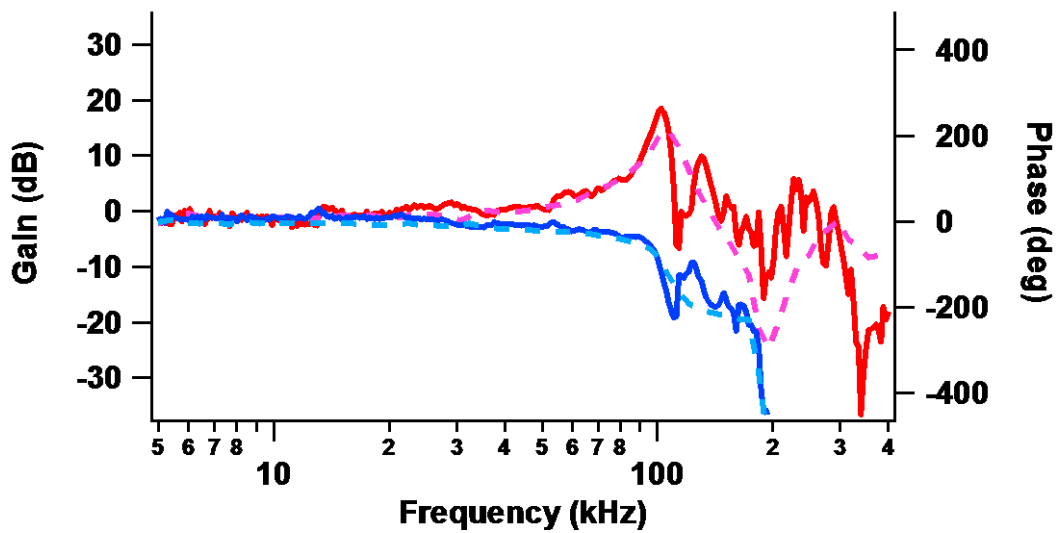


図 3-11 two-prop モデルを用いたカンチレバー固定法の周波数特性

赤実線と青実線は、それぞれカンチレバーを固定したときのゲインと位相を示す。ピンク破線(ゲイン)と水色破線(位相)はカンチレバーホルダーのみの周波数特性を示す。

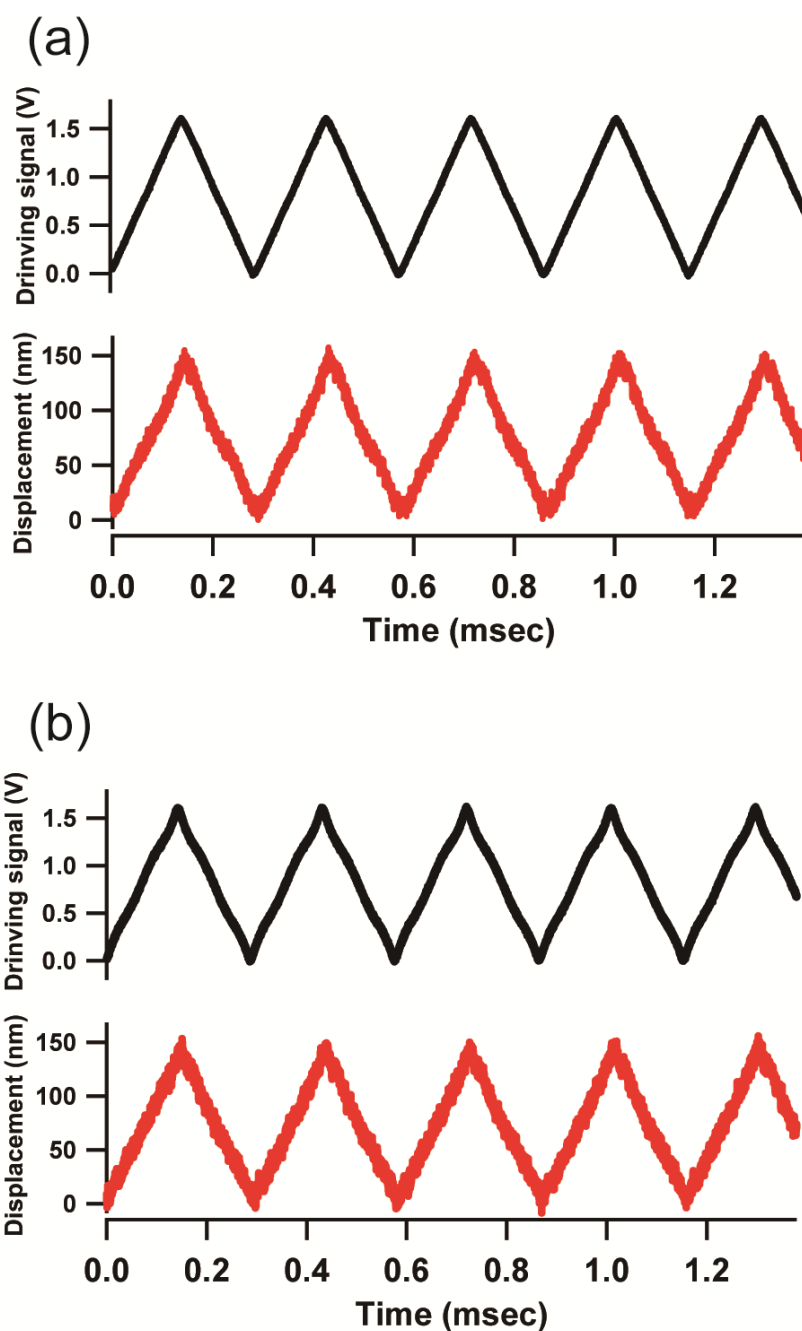


図 3-12 Two-prop モデルスキャナーの X スキャナーの走査軌跡

(a) 上段は入力走査信号、下段はスキャナーの走査軌跡を示す。通常の三角波で走査するとスキャナーの動きが歪んでいる。(b) 上段は逆フーリエ補償法を用いた時の走査信号、下段は逆フーリエ補償法を用いた時のスキャナーの走査軌跡を示す。逆フーリエ補償法を用いることでスキャナーの動きの歪みを取り除くことが出来た。走査周波数は 3.45 kHz で X スキャナーを 150 nm 走査して計測した。

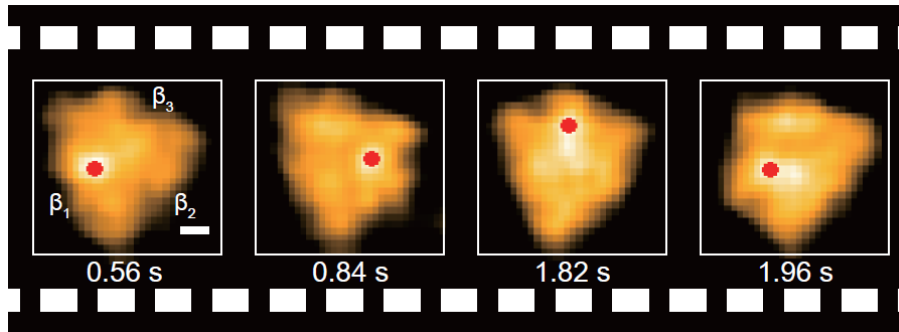


図 3-13 新しく開発したスキャナーを用いた回転子のない F₁-ATPase の高速 AFM 観察

フレームレートは 7.14 fps (0.14 sec/frame) であった。各画像の赤い丸は画像の中の最も高いピクセルを表す。スケールバーは 2 nm を表す。

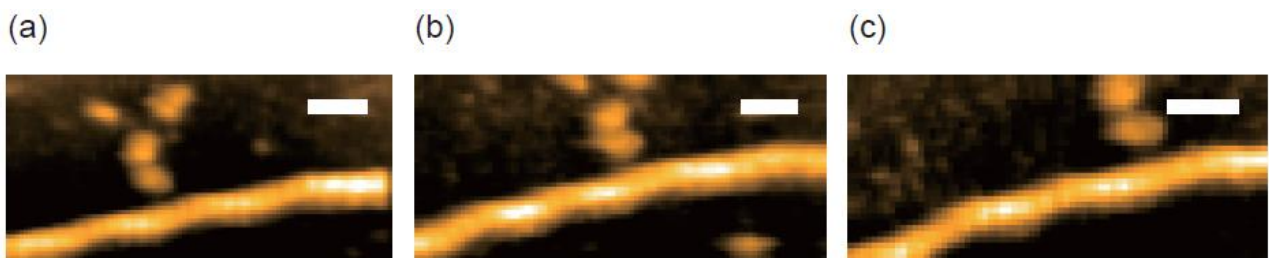


図 3-14 新しく開発したスキャナーを用いたアクチンフィラメントの高速 AFM 観察

フレームレートはそれぞれ、(a) 5 fps (0.2 sec/frame)、(b) 10 fps (0.1 sec/frame)、(c) 12.5 fps (0.08 sec/frame) であった。スケールバーは 20 nm を表す。

3.3 まとめ

プローブ走査型高速 AFM のためのカンチレバーの機械的固定法の開発を行った。様々な固定法を検討した結果、固定治具を Z ピエゾアクチュエーター上に取り付けるのではなく、スキャナーの土台部分に設置する新しい固定法を開発した。この手法を用いることで、Z スキャナーの周波数特性はピエゾアクチュエーター自身とほとんど同じ形状を実現することができた。開発したスキャナーをプローブ走査型高速 AFM に組み込み、比較的脆いたんぱく質を、生理機能を乱すことなく高い時空間分解能で観察することに成功した。

現在の Z ピエゾアクチュエーターは観察中に溶液に接触するため、防水加工されているものを使用しているが、防水加工された作動距離が短く自己共振周波数の高いピエゾアクチュエーターを用いることができれば、イメージングスピードはさらに速くできることが期待される。また、ピエゾアクチュエーター自身の固定法を変えることで、より高いフィードバック帯域が実現できるであろう [53]。

ここで開発された手法により、プローブ走査型高速 AFM を実用化するうえで最も難しいと考えられていたカンチレバーの機械的固定の問題を解決することができた。これにより、プローブ走査型高速 AFM の操作性を飛躍的に向上させることができた。さらに、本研究で開発したカンチレバー固定法は、プローブ走査型 AFM だけではなく走査型トンネル顕微鏡 [54] や走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 [55,56]、走査型近接場光顕微鏡 [27] などの他の走査型プローブ顕微鏡においても有用であるので、分子生物学や表面物理化学を初めとする様々な分野で応用されることが期待される。

第 4 章 金属プローブによる電場増強一分子高速 AFM/蛍光顕微鏡相関法の開発

4.1 目的と概要

第 3 章において、プローブ走査型高速 AFM の実用化へ向けた最大の課題と考えられるカンチレバーの機械的固定法の開発を行った[24]。これにより、プローブ走査型高速 AFM の操作性は飛躍的に向上した。しかし、プローブ走査型高速 AFM を一分子蛍光顕微鏡と組み合わせ実際の観察を行う時、まだ解決しなければならない課題が残されている。それは高速 AFM と一分子蛍光観察における空間分解能および観察視野の大きさの違いである。光の回折限界により従来の光学顕微鏡の空間分解能は 200 nm 以下である。これは高速 AFM の空間分解能に比べて大きく劣っている。また、光学顕微鏡画像を構成する 1 ピクセルの大きさは、おおよそ $5 \times 10^3 \text{ nm}^2$ であり全体の視野の大きさは $1000 \text{ }\mu\text{m}^2$ を上回る。一方で、高速 AFM 画像では 1 ピクセル、 1 nm^2 以下で構成され走査範囲は $0.05 \text{ }\mu\text{m}^2$ 以下である。このような観察視野の違いから、正確に高速 AFM 像と光学顕微鏡像を関連付けることが難しいと考えられる。この問題を解決するために第 2 章では、光学顕微鏡ステージに広域 XY スキャナーを組み込んだ。しかし、この手法は分子が基板に固定された観察系においてプローブの位置決め等には有効であったが、分子の挙動が絶えず変化する一分子観察においては有効ではなかった。第 2 章においてタンパク質一分子の高速 AFM と蛍光顕微鏡の同時観察に成功したが、その画像は数フレームに限られ正確な分子の動きの相関を取ることはできなかった。また、通常の 1 分子観察では背景光の増大を防ぐため、使用される試料濃度は数十 pM から数 nM に限られており、観察視野が制限される高速 AFM では頻度よく目的の分子を捉えることが出来ず、効率よく計測を行うことが難しかった。一方で、ナノメートルスケールの金属プローブにレーザー光を照射したとき、プローブ周辺の電場が増強され[57]、プローブ近傍の蛍光を局所的に増強することができる。この光は近接場光と呼ばれ、プローブからの距離によって大きく減衰する。近接場光は周囲に伝搬しない光であり、プローブの半径程度に局在した光の場を形成することができる。走査型近接場光顕微鏡[58–60]では、この局所的な光を使い蛍光やラマン散乱を大幅に増強し回折限界を超える光学イメージングを実現してきた[61–65]。走査型近接場光顕微鏡については第 5 章で詳しく述べる。

そこで、本研究では AFM プローブによる電場増強を利用した一分子高速 AFM/蛍光顕微

鏡相関法の開発を行った。AFM の観察範囲の電場を増強するため、プローブを金属修飾した。金属修飾したプローブで蛍光ビーズを高速 AFM と蛍光顕微鏡で同時観察した結果、プローブがない時と比べて 2 倍程度蛍光が増強され、プローブの周期と同期した蛍光の明滅を確認することができた。また、レーザー光を照射したときに金属修飾プローブから、励起光に由来する散乱光とは別の高波長領域の光が検出された。この光は光学顕微鏡視野において、AFM 観察領域を特定することに役立った。開発した手法の有効性を実証するために、比較的高濃度の蛍光試料がある条件で、蛍光ラベルしたセルロース分解酵素がセルロース上を一方向に移動する様子やキチナーゼのキチンに沿った直進運動、GroEL/ES の ATP 加水分解反応に伴う結合/解離の一分子高速 AFM/蛍光顕微鏡同時観察を行った。

4.2 実験

4.2.1 装置

高速 AFM / 蛍光顕微鏡複合機の装置構成は第 2 章で記したものと同一である。また、カンチレバー(BL-AC10DS-A2, オリンパス株式会社、東京)は、第 3 章で開発した手法で高速 AFM スキャナーに取り付けた[24]。プローブに金属ナノ粒子を接着するために、対物レンズ型の暗視野顕微鏡[66]を光学顕微鏡システムに組み込んだ。図 4-1 に対物レンズ型の暗視野顕微鏡の光学系を示す。対物レンズ型の暗視野顕微鏡は、通常的全反射蛍光顕微鏡で使われるダイクロックミラーを中心に穴の開いたミラーに取り換え、蛍光フィルターを取り除くだけで構築可能である。試料を照射するレーザー光はミラーに反射されて CCD カメラには映らないが、試料から発せられる散乱光はミラーの中心の穴を通りカメラで観察される。図 4-2 に対物レンズ型暗視野顕微鏡で撮影した 80 nm の金コロイドの暗視野顕微鏡像を示す。金コロイドは、高塩濃度条件下(1 M KCl)でガラス基板にインキュベートし、超純水で未吸着の金コロイドを洗い流して観察した。

4.2.2 プローブの金属修飾

AFM 観察範囲近傍の電場を増強するために、プローブを金属修飾した。金属修飾する方法は、プローブ先端へ金コロイドを接着する方法とプローブを金属コーティングする 2 つの手法を開発した。

はじめに、プローブ先端へ金コロイドを接着する方法について述べる。プローブはカンチレバー(BL-AC10DS-A2, オリンパス株式会社、東京)へ電子顕微鏡(SUPRA40VP, Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA)を用いて、フェノールガス雰囲気下で 2 分間電子線照射(EBD: Electron beam deposition)して作成した[31]。このとき、プローブの長さはおおよそ 1 μm 、先端の曲率半径はおおよそ 5 nm であった。金属粒子は可視域にプラズモン共鳴があること、散乱効率の高さ[67]から直径 80 nm の金コロイド(741981, Sigma-Aldrich, Poole, Dorset, UK)を使用した。図 4-3 に AFM で撮影した金コロイドの画像を示す。金コロイドは、高塩濃度条件下(1 M KCl)でガラス基板にインキュベートし、超純水で未吸着の金コロイドを洗い流して観察した。対物レンズ型の暗視野顕微鏡を用いて任意の金コロイドを AFM プローブの位置に移動し、カンチレバーの振幅値をおおよそ 0.5 nm にして、走査することで容易にプローブ先端へ金コロイドが付着することがわかった(図 4-4)。なお、金コロイドを取り

付けることによるカンチレバーの共振周波数の変化は観察されなかった。

次に、プローブを金属コーティングする方法を説明する。プローブの作成方法は、金コロイドを接着する方法と同じである。プローブの金属コーティングはマグネトロンスパッタ(MSP-20T, 株式会社真空デバイス、茨城)を用いて行った。金属コーティングによってプローブの曲率半径が大きくなることを防ぐため、通常よりも比較的長い時間(10分間)、プラズマエッチング(PE-2000, South Bay Technology, Redondo Beach, CA, USA)を行った。カンチレバーをコートする金属は、安価で散乱効率が高く可視域にプラズモン共鳴を持つ銀($\phi 50 \text{ mm}^2$, 厚さ 2 mm)を使用した。コーティングはアルゴンガス雰囲気下 $8.0 \times 10^{-1} \text{ Pa}$ 、電流 50 mA で行い、カンチレバーと銀ターゲット間の距離は 10 cm に設定した。蒸着の際は、マグネットの磁力を弱め膜厚の制御をしやすいするため、ニッケル($\phi 50 \text{ mm}^2$, 厚さ 1 mm)と銀の蒸着源を併用した。図 4-5 に銀コートしたプローブの電子顕微鏡画像を示す。蒸着の速さは、使用した電流や銀ターゲットとカンチレバーの間の距離から 3 nm/min と推定される。正確な膜の厚さは使用した電子顕微鏡の分解能では計測することができなかった。より長い時間、コーティングした方がより大きな電場増強を期待できるが、蒸着によるカンチレバーのばね定数の増加やカンチレバーの湾曲を防ぐため、蒸着時間は最大でも 2 分までとした。また、この金属コーティングによってカンチレバーの共振周波数の変化が観察された(図 4-6)が、実際の計測には問題にならない程度である。この共振周波数の変化から金属コーティング後のカンチレバーのばね定数がそれほど大きくなっていないことを確認することができる。金ナノ粒子をプローブへ取り付ける手法では、粒子がプローブのどの位置に着くか制御できなかったが、この手法では膜厚を細かく制御することができ同時に複数のプローブをコートすることができるため、より簡便で再現性の高い手法であるといえる。

4.2.3 金属修飾プローブによる蛍光の増強効果

金属修飾したプローブによる蛍光の増強効果を確認するため、Cy3 で染色した GroES の一分子蛍光観察を行った。GroES の Cy3 標識は 4.2.6 で詳しく述べる。Cy3-GroES は、直接ガラス基板に固定された。図 4-7(a, b)に Cy3-GroES の蛍光像を示す。プローブが色素の近傍にある時の最大蛍光輝度は 246 (arbitrary unit, a.u.)であった。一方で色素のみを励起した時の最大蛍光輝度は 90 (a.u.)であり 2 倍程度の蛍光増強を達成することができた。このときのレーザーパワーは $0.17 \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$ でフレームレートは 29 fps であった。また、金属プローブ自身からも蛍光の発光を観察した(図 4-7 c)。このときの最大蛍光輝度は 60 (a.u.)

であった。このプローブから発せられる光については 4.2.5 で議論する。

次に、蛍光ビーズを高速 AFM と蛍光顕微鏡で同時観察を行った。蛍光ビーズは、ニュートラアビジンでコートされた直径 40 nm の蛍光ビーズ(F-8771, Life Technologies, Gaithersburg, MD)を用いた。図 4-8 (b)に蛍光ビーズの AFM 像を示す。蛍光ビーズは直接ガラス基板に固定した後、未吸着のビーズをバッファー(20 mM HEPES-KOH(pH7.6), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂)で洗い流して観察した。図 4-8 (a)に高速 AFM / 蛍光顕微鏡同時観察を行った時の蛍光ビーズの連続蛍光像を示す。ビーズから発せられる蛍光は、金属プローブの増強効果によってプローブが最も近づいたときに明るくなり、一定の周期で明滅を繰り返した。この明滅の周期はプローブの周期とよく一致した(図 4-8,d)。様々な周期でカンチレバーを走査した結果、それぞれの周期に対応した蛍光の明滅を確認することができた(図 4-9)。

4.2.4 蛍光色素一分子の S/N(Signal to Noise)比

金属プローブ存在下で一分子蛍光の S/N 比を計測した。各レーザー強度における S/N 比は式(4,1)に示すように、蛍光スポットの強度からバックグラウンドを引き、各画像のノイズレベルで割って算出した[66,68]。

$$SNR = (I_s - I_b) / \sqrt{\sigma_s^2 + \sigma_b^2} \quad (4,1)$$

ここで、 I_s は蛍光スポットを含むシグナル強度、 I_b は画像のバックグラウンドの強度、 σ_s と σ_b はそれぞれ蛍光シグナルとバックグラウンドの標準偏差である。Cy3 ラベルした GroES をガラス基板に固定し、金属プローブを色素に近づけて蛍光を測定した。シグナル強度は蛍光スポットを中心に含む 8×8 ピクセル(616 × 616 nm²)の領域を計算した。図 4-10 に各レーザー強度における一分子蛍光の S/N 比を示す。赤色のデータが金属プローブ存在下の蛍光の S/N 比、青色のデータが金属プローブ非存在下の S/N 比である。通常の蛍光観察と比べて金属プローブ存在下では、1.4 倍から 2 倍 S/N 比が向上した。通常の蛍光観察との S/N 比の差はレーザー強度を強くすることでより大きくなった。これは、蛍光の増強度は一定であるのに対して金属プローブ自身から発せられる光が増えたためだと考えられる。

4.2.5 金および銀コロイドの蛍光スペクトル解析

4.2.3 で述べたように、蛍光観察において銀コーティングプローブおよび金コロイドからの発光を観察した。図 4-11(a)に金コロイドをガラス基板に固定し蛍光観察条件で撮影した画像を示す。このとき蛍光像は緑色レーザー (波長 532 nm) で励起し、波長 573 nm から 613 nm の光を透過するバンドパスフィルター (FF01-593/40-25, Semrock, Rochester, NY, USA) を用いて観察した。各スポットを見やすくするため図 4-11 (a) を 2 値化した画像を図 4-11 (b) に示す。図 4-11 (c) に蛍光画像と同視野の暗視野顕微鏡像を示す。図 4-11 (d) に図 4-11 (b) と (c) の重ね合わせた画像を示す。すべての散乱光スポットが蛍光スポットと重なっていることがわかる。図 4-12 (a) において白矢印で示したスポットは散乱光スポットと重なり合わなかった。これは、コンタミネーションまたは散乱光像を計測した後に基板からはずれた金コロイドだと考えられる。また、金コロイドと同様に、銀コーティングプローブからも蛍光領域の光を検出した (図 4-12)。この金コロイドからの発光について、蛍光分光器 (EP-8500, 日本分光株式会社 JASCO Corporation、東京) を用いた蛍光スペクトル解析を行った。図 4-13 に波長 530 nm の光で励起した金コロイド (直径 80 nm) の蛍光スペクトルを示す。励起波長 (530 nm) に金コロイドの散乱光に由来する鋭いピークが観察された。図 4-13 (b) に励起波長から高波長領域を拡大した蛍光スペクトルを示す。波長 625 nm の小さなピークがあることがわかる。図 4-14 に波長 488 nm の光で励起した蛍光スペクトルを示す。530 nm で励起した時と同様に励起波長に由来する鋭い大きなピークがみられ、励起波長から高波長領域に小さなピークが観察された (図 4-14b)。波長 630 nm の光で励起した時も同様に、高波長領域に小さなピークが観察された (図 4-15)。さらに、この高波長領域の小さなピークは異なる大きさの金コロイドを用いても観察され (図 4-16, 4-17)、銀コロイド (730815, Sigma-Aldrich, Poole, Dprset, UK) においても同様に高波長領域に小さなピークが観察された (図 4-18, 4-19)。これらの結果から、高波長領域の光は金属ナノ粒子に共通して存在する性質だと考えられる。しかし、実際の高速 AFM/蛍光顕微鏡同時観察において、金属プローブ自身から発せられる光は問題にならない。なぜなら、プローブからの光はとても安定しており、様々な凹凸の表面を観察してもほぼ一定であるためである (図 4-20, 4-21)。むしろ、このプローブからの発光によって、蛍光顕微鏡画像上で AFM プローブの位置を容易に特定できるようになった。

4.2.6 高濃度試料条件での高速 AFM/蛍光顕微鏡同時観察

プローブを金属修飾し、比較的高濃度蛍光試料条件下で高速 AFM / 蛍光顕微鏡同時観察を行った。蛍光顕微鏡視野における AFM 観察の位置は、プローブから発せられる蛍光領域の光と散乱光から正確に決定することが出来た。高速 AFM と蛍光顕微鏡の同時観察は、CCD カメラの露光時間を AFM の画像取得時間に合わせて同期して行った。

はじめに、GroEL と Cy3 でラベルした GroES の ATP 加水分解反応に伴う結合/解離の観察を行った。GroEL と GroES はタンパク質のフォールディングを助ける分子シャペロンである[69]。GroEL は ATP の加水分解と GroES の結合/解離によってリボソームから新生したポリペプチド鎖と結合してタンパク質が凝集することを防ぐ役割がある。GroEL は ATP の結合により、開構造をとり GroES が結合できる状態となる。GroES の結合/解離後の ADP の解離によって閉構造へと戻る[69]。この ATP 加水分解反応に伴う GroEL/ES の結合解離過程を高速 AFM と蛍光顕微鏡で同時観察を行った。観察で使用する GroEL (C7688)、GroES(C7438)と BSA (A2153) は Sigma-Aldrich から購入した。GroES の Cy3 標識は、200 mM NaHCO₃ (pH8.6) 条件下で GroES にアミノ基反応性 Cy3 (11020, Lumiprobe Corp. Hallandale Beach, FL, USA)をモル比 1:20 で加え 25 °C で 2 時間、氷中で 1 晩インキュベートして行った。未反応の Cy3 は限外濾過精製器(Viva-spin, VIVA Science, Gloucestershire, UK)を用いて完全に除去した。GroES の濃度は Lowry 法を用いて、Cy3 の濃度は 550 nm の吸光係数からそれぞれ算出した。このとき、ラベル率は 1.06 であった。観察バッファーは、20 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ を使用した。観察手順を以下に示す。

- ・ 洗浄カバーガラスを 0.1 mg/ml の poly-l-lysine でコートする。
- ・ 3 分後、超純水で洗い流し、1 mg/ml の GroEL を滴下しインキュベートする。
- ・ 3 分後、バッファーで未吸着の GroEL を洗い流した後、基板への GroES の非特異的吸着を抑制するため、0.5 mg/ml の BSA を滴下しインキュベートする。
- ・ 未吸着の BSA をバッファーで洗い流した後、33 nM の Cy3-GroES、20 μM の ATP を含むバッファーで観察を行う。

観察系の模式図を図 4-22 (a)に示す。図 4-22 (b, c)に GroEL/ES の高速 AFM / 蛍光顕微鏡による同時観察像を示す。上述したように金属修飾プローブは蛍光領域の光を発するので、蛍光分子の結合/解離をわかりやすくするため、各蛍光像から 0 s の画像を引いた差分

蛍光像を図 4-22 (d)に示す。poly-l-lysine でコートしたガラス基板へ GroEL はマイカ基板を用いた時と同じように、GroES が結合するサブユニットを上向きにして固定された[70]。図 4-22 (b)に示すように 1 s のとき GroES が矢印で示す GroEL に結合し、同時に差分蛍光像にも蛍光スポットが現れた。4 s のとき GroES は GroEL から解離し、差分蛍光像から蛍光スポットが消失した。このとき、Cy3-GroES の濃度は 33 nM であり GroES/EL の加水分解反応を一分子蛍光観察した実験と比べて約 8 倍の濃度[71]で計測することが出来た。

次に、蛍光標識したキチナーゼがキチン結晶上で運動する様子的高速 AFM と蛍光顕微鏡で同時観察を行った。キチンは、カニの甲羅やエビの殻、昆虫、キノコ、カビなどに含まれている多糖であり、地球上に 1 年間で 1000 億トンもの膨大な量が作られていると推測されている。キチナーゼはキチンを分解する酵素として知られ[72]、分解産物を栄養源として使用することができる。キチンは地球上に数多く存在する生物資源であるが、そのほとんどが有効活用されておらず、キチナーゼがキチンを分解する機構を理解することで新たな生物資源として利用できるようになることが期待されている。実験に使用したキチン、Cy3 ラベルしたキチナーゼは、自然科学研究機構岡崎統合バイオセンターの飯野亮太教授から提供していただいた。観察はリン酸バッファー(pH 6.0)で行った。ガラス基板へキチン(0.02 %, w/v, 8 μ l)をスピコーティング(3000 rpm, 10 秒、ACT-220DII、株式会社アクティブ、埼玉)によって固定した後、52 nM キチナーゼを含んだバッファーで観察を行った。図 4-23、4-24 に高速 AFM/蛍光顕微鏡同時観察像を示す。図 4-23 では、0.33 s のとき 3 つのキチナーゼがキチンへ結合し左上部へ移動した後、0.99 s で解離している。同時に取得した差分蛍光像でも 0.33 s のとき蛍光スポットが現れ、0.99 s のとき消失している。図 4-24 では、キチナーゼが 0.33 s で結合し、移動せずキチン上から解離している。同様に差分蛍光像でもキチンの結合と同時に蛍光スポットが現れ、解離とともに消失した。キチナーゼはキチンへ結合した後、移動を伴うプロダクティブな結合と移動を伴わないノンプロダクティブな結合があると考えられており、観察結果はこれらの 2 つの結合様式に対応すると考えられる。このとき Cy3-キチナーゼの濃度は 52 nM であり、一般的な一分子蛍光観察では、10 nM 以下の蛍光試料濃度で行うことを考えれば十分に高濃度ということができる。

最後に、蛍光標識したセルロース分解酵素(*TrCel7A*)がセルロース結晶上を動く様子を高速 AFM と蛍光顕微鏡で同時観察を行った。セルロースは植物細胞壁の構成成分のおおよそ半分を占め、地球上に最も多く存在する生物資源の一つであるといわれている。セルロースを分解して得られるグルコースからはバイオ燃料を抽出することができるため、新たなエネルギー源として期待されている。しかし、セルロースは極めて安定な構造をとってお

り冷水や熱水、有機溶媒にも溶けず、強酸や高温、高圧などの条件を必要とするため膨大なエネルギーを必要とすることが問題とされていた。一方で、自然界にはセルロースを常温常圧下で分解できるセルロース分解酵素(セルラーゼ)と呼ばれる酵素が存在する。主要なセルラーゼである *TrCel7A* はセルロースを分解する能力が非常に高く、最もよく研究されているセルロース分解酵素の一つである[73]。最近の高速 AFM 観察の結果から *TrCel7A* は結晶性セルロースを分解しながら連続的に運動することが明らかとなった[74]。*TrCel7A* を駆動するのはセルロース自身が持つ加水分解エネルギーであり、ATP を動力源とするミオシンやキネシンとは異なる動作機構を持つ新たな分子モーターとして注目を集めている。実験で使用した Cy3 ラベルされた *TrCel7A*、セルロースは自然科学研究機構岡崎統合バイオセンターの飯野亮太教授から提供していただいた。観察は酢酸バッファー(pH 5.0)で行った。ガラス基板へセルロース(0.02 %, w/v, 8 μ l)をスピコート(3000 rpm, 10 秒、ACT-220DII、株式会社アクティブ、埼玉)で固定した後、430 pM *TrCel7A* を含んだバッファーで観察を行った。図 4-25 に同時取得した高速 AFM /蛍光顕微鏡像を示す。0.5 s のときに高速 AFM 像で *TrCel7A* がセルロース上へ結合(青矢印)し、左方向へ移動して 18 s に解離したことがわかる。差分蛍光像でも 0.5 s に蛍光スポットが現れ 18 s で、高速 AFM 像と同時に消失した。この AFM 像と蛍光像の相関は 36 フレームの間続き、AFM と蛍光画像から得られた *TrCel7A* の移動距離はよく一致した(図 4-26)。このときの Cy3-*TrCel7A* の濃度は 430 pM であった。これは、*TrCel7A* を用いた一分子蛍光イメージング実験と比べるとおおよそ 10 倍の濃度[75]であり十分に高濃度ということが出来る。

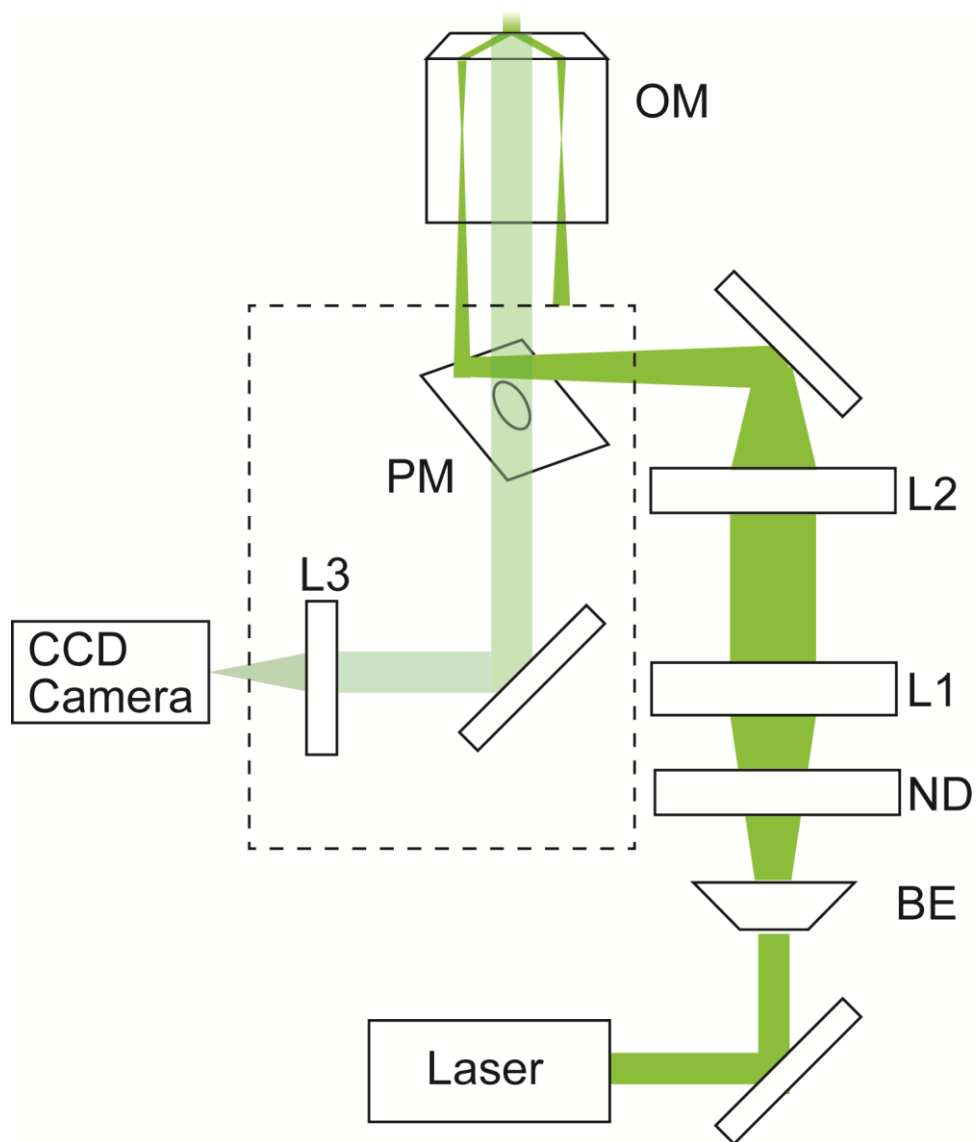


図 4-1 対物レンズ型暗視野顕微鏡の模式図

Laser; 緑色レーザー(波; 532 nm)、BE; ビームエキスパンダー、ND; 減光フィルター、L1; コリメートレンズ、L2; 集光レンズ (対物レンズの後焦点へレーザー光をずらす)、PM; 中心部に穴の開いたミラー、OM; 対物レンズ、L3; 集光レンズ (CCD カメラに蛍光を集光する)。点線内の光学部品は、顕微鏡筐体内にある。

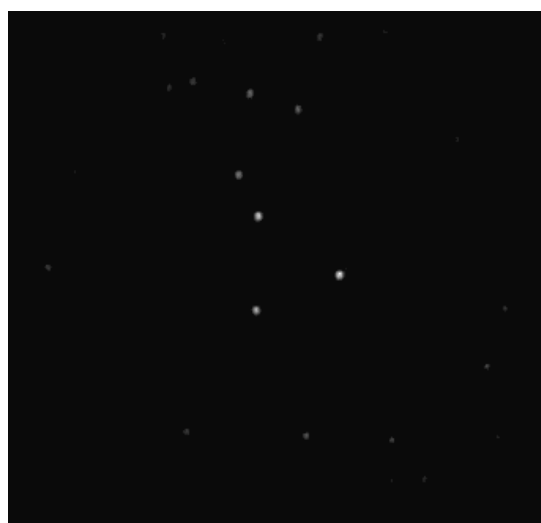


図 4-2 対物レンズ型暗視野顕微鏡で観察した直径 80 nm の金コロイド

金コロイドを 1 M KOH 条件でガラス基板へ固定した後、超純水で未吸着の金コロイドを洗い流して観察を行った。励起レーザーに 0.1 %ND フィルターを使用して撮影した。

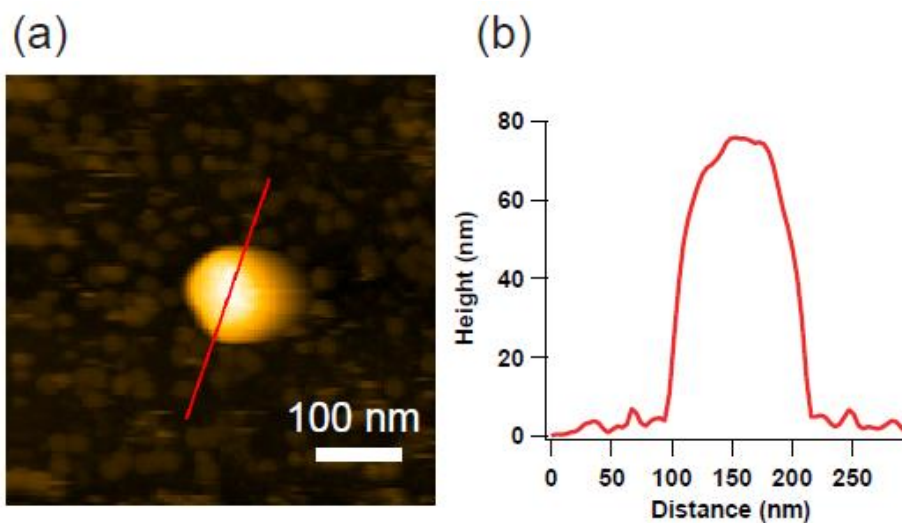


図 4-3 直径 80 nm の金コロイドの AFM 画像。

(a) 金コロイドの AFM 像。1 M KCl 条件でガラス基板へ固定した後、超純水で未吸着の金コロイドを洗い流して観察した。(b) AFM 画像(a)の赤線に沿ったクロスセクション。

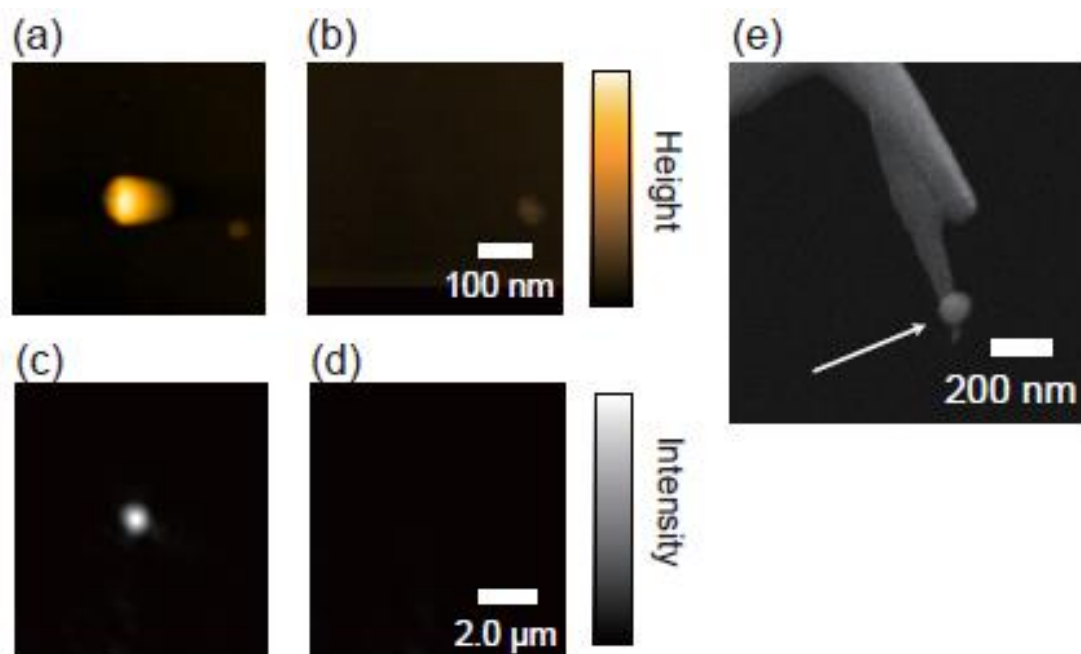


図 4-4 プローブへの金コロイドの取り付け

(a,c) プローブへ取り付ける金コロイドの(a) AFM 像と(c) 暗視野像。(b,d) プローブへ金コロイドを取り付けた後の AFM 像(d)と暗視野像(d)。(e) 金コロイド(白矢印)を取り付けたプローブの電子顕微鏡像。

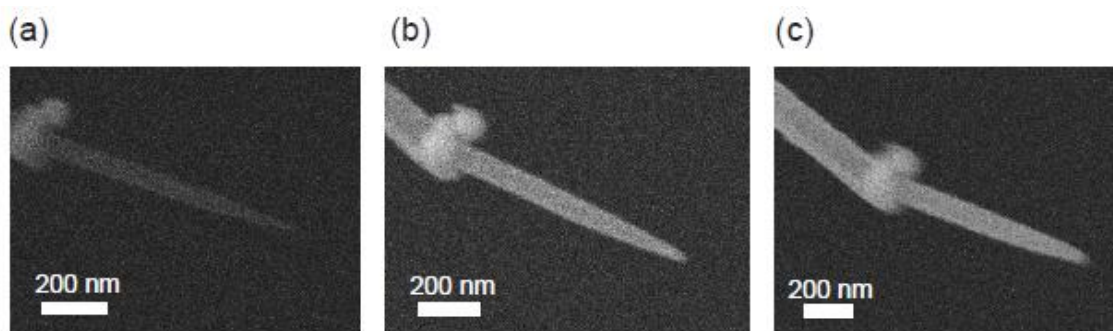


図 4-5 プローブの銀コーティング

(a) 銀コーティング前のプローブの電子顕微鏡像。(b) 1 分間銀コーティングした後のプローブ、および(c) 2 分間銀コーティングした後のプローブの電子顕微鏡像。

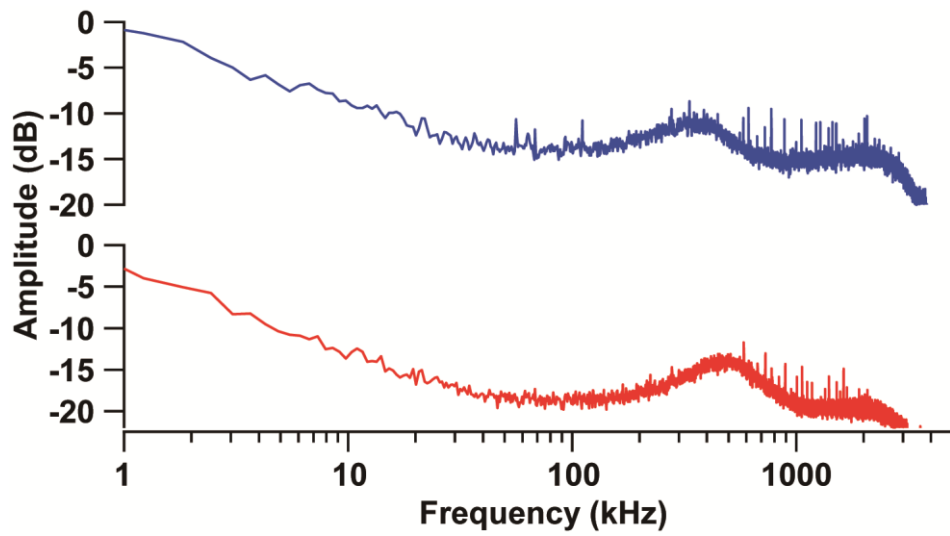


図 4-6 カンチレバーの熱揺らぎを測定

上段は金属コーティングする前のカンチレバーの熱揺らぎ、下段は 2 分間銀コーティングした後のカンチレバーの熱揺らぎを示す。共振周波数はそれぞれ、コーティング前では 360 kHz、コーティング後では 420 kHz であった。

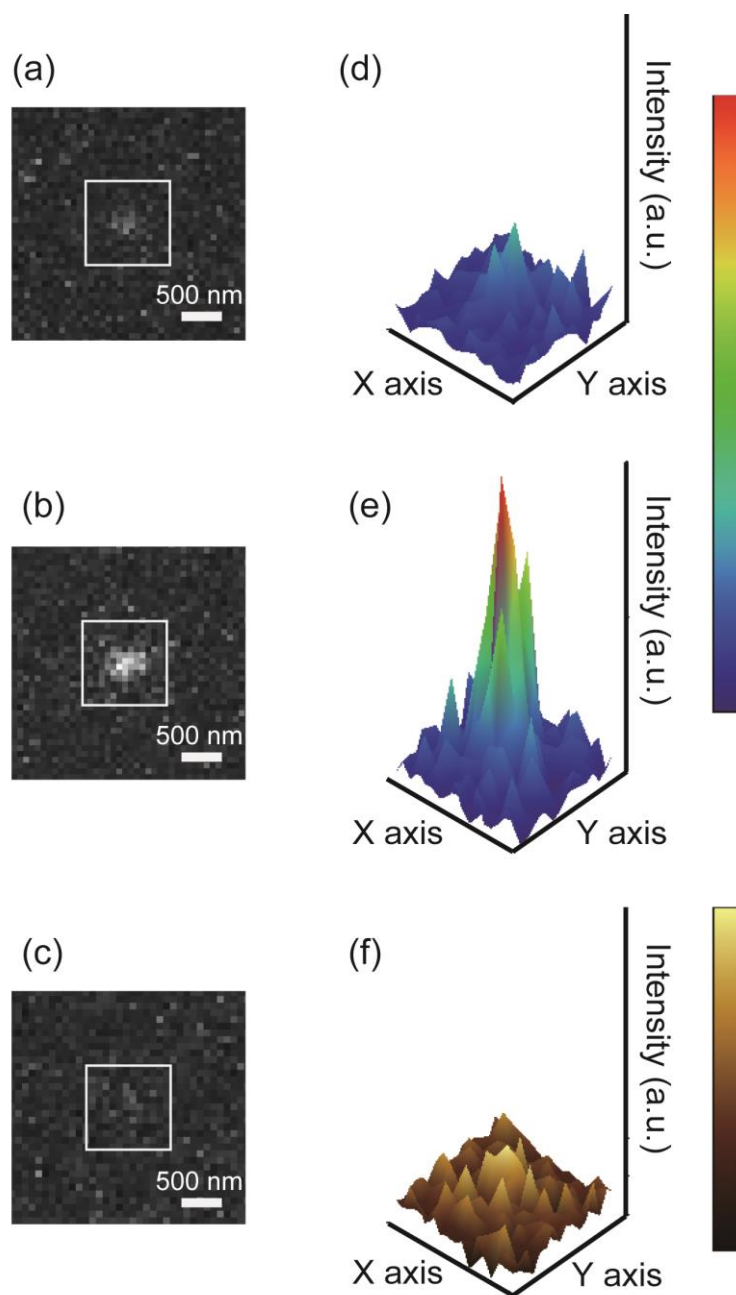


図 4-7 金属プローブによる一分子蛍光の増強

(a-c) Cy3-GroES の蛍光顕微鏡像。CCD カメラの露光時間は 29 ms で、レーザーパワーは $0.17\mu\text{W}/\mu\text{m}^2$ であった。(a) 金属プローブなし、(b) 金属プローブありのときの Cy3 の蛍光顕微鏡像。(c) 蛍光色素なしで金属プローブのみの蛍光顕微鏡像。(d-f) (a-c)中の四角の領域の 3 次元プロファイル。

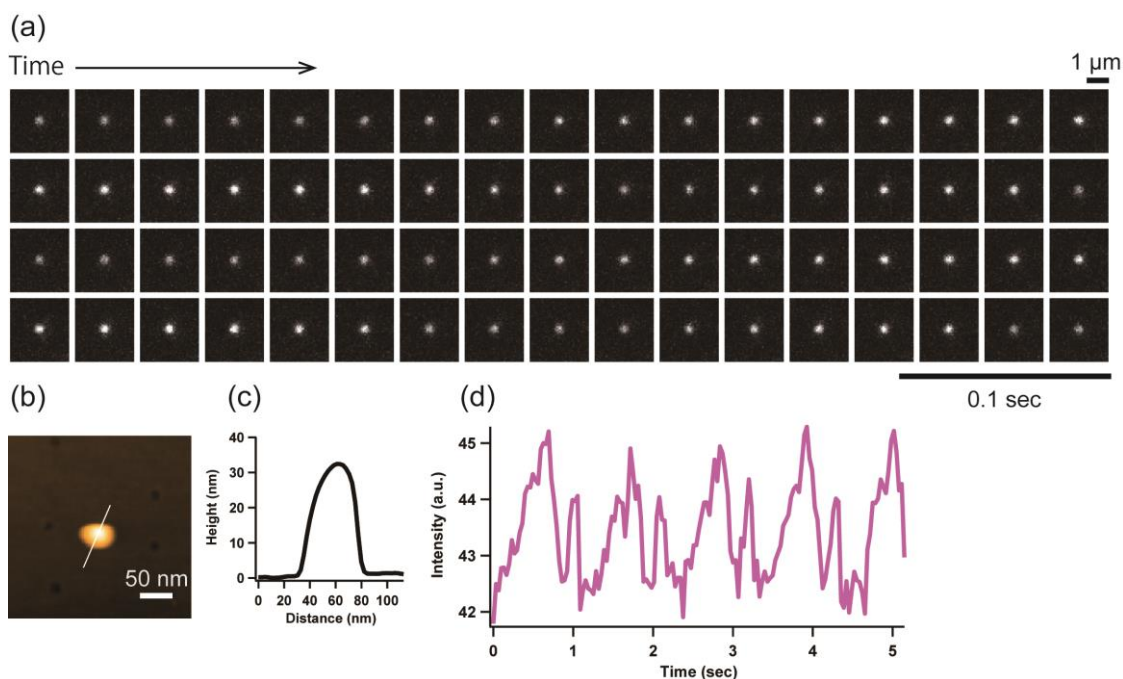


図 4-8 金属修飾プローブによる蛍光の増強

(a) 高速 AFM/蛍光顕微鏡同時観察を行った時のビーズの連続蛍光顕微鏡像。高速 AFM のフレームレートは 1 fps で、走査範囲は $300 \times 300 \text{ nm}^2$ (100×100 ピクセル)であった。蛍光画像を取得する CCD カメラのフレームレートは 29 fps であった。(b) 蛍光ビーズの AFM 像。(c) AFM 像で示した白線に沿ったラインプロファイル。(d) 蛍光ビーズの蛍光強度の時間変化。プローブの走査に同期して 1 秒の周期で振動している。

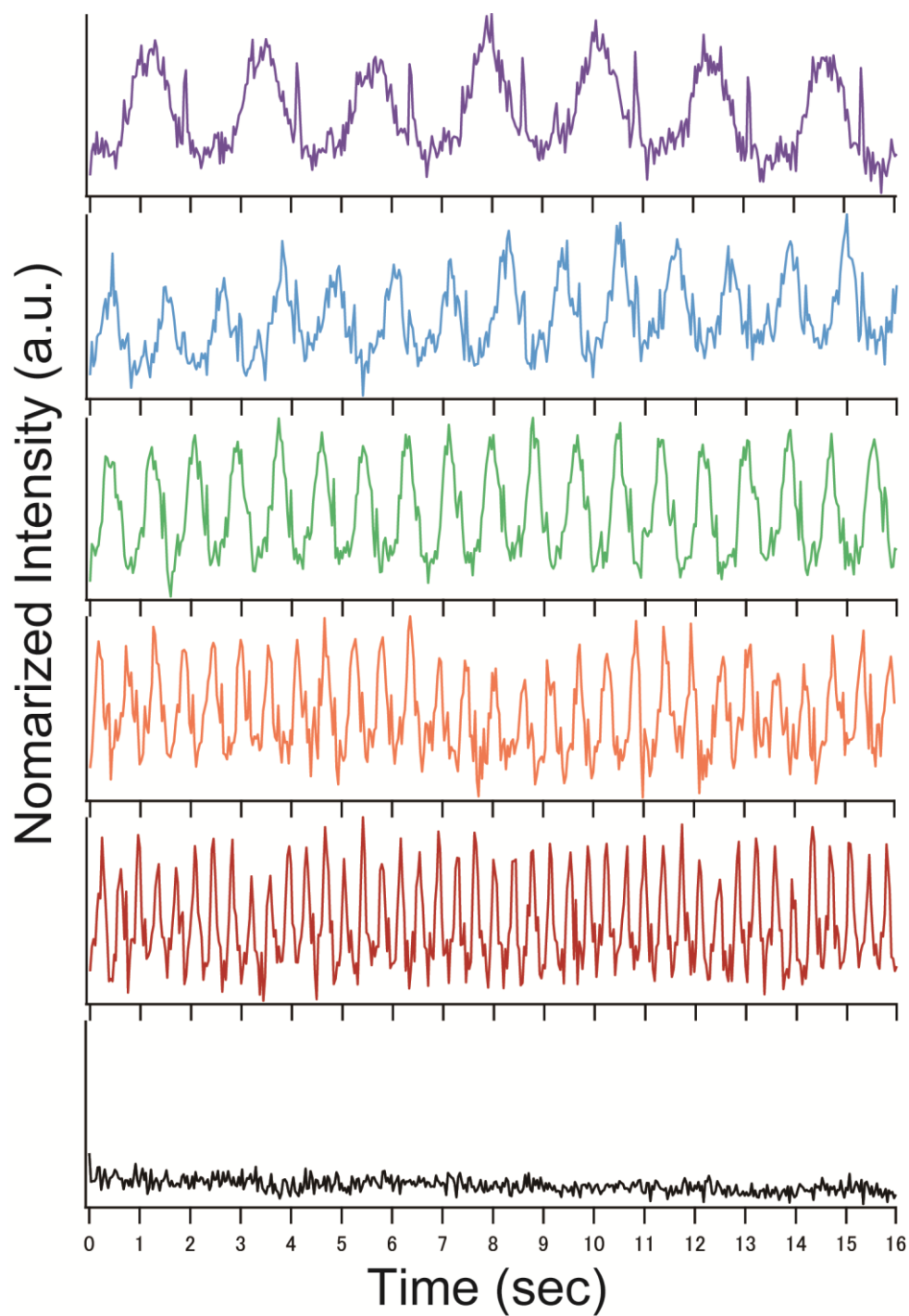


図 4-9 様々なフレームレートで蛍光ビーズの蛍光強度時間変化を計測。

カンチレバーの周期(イメージングレート)は上段からそれぞれ、2 sec, 1 sec, 0.75 sec, 0.5 sec, 0.33 sec であった。最下段はビーズがない場所をイメージングした時の蛍光強度の時間変化を示す。

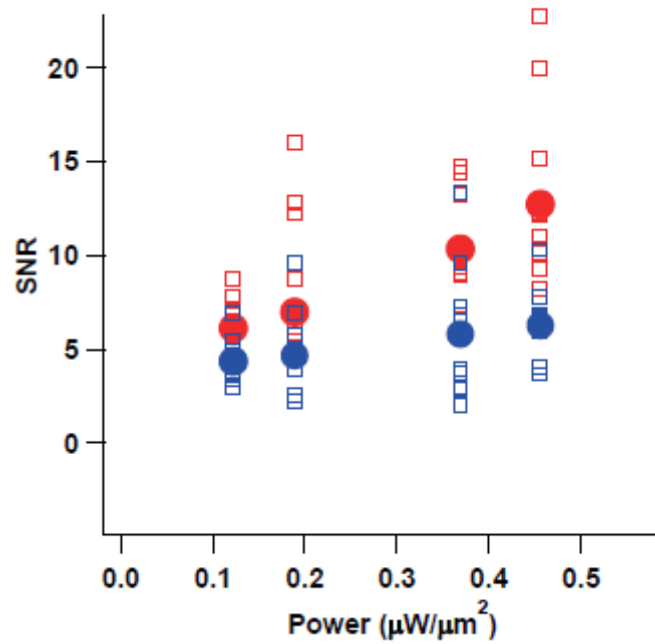


図 4-10 一分子蛍光の S/N 比を計測

赤は金属プローブ存在下、青はプローブなしの場合の S/N 比を示す。丸のデータは各レーザーパワーで測定した S/N 比の平均を示している。四角のデータは各測定での S/N 比である。

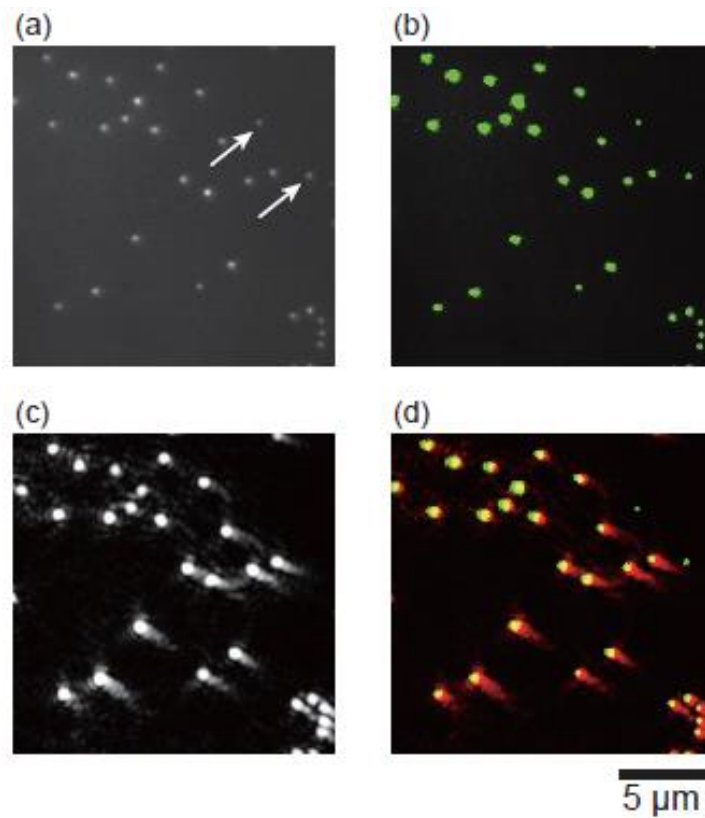


図 4-11 金コロイドの蛍光顕微鏡観察

(a) 金コロイドを蛍光顕微鏡観察条件で観察した像。白矢印で示したスポットは、暗視や顕微鏡では観察されなかった。(b) (a)の画像を2値化した像。(c) 暗視野顕微鏡で金コロイドの散乱光を観察。(d) (b)2値化した像と(c)の散乱光像を重ね合わせた像。すべての金コロイドの散乱光スポットが蛍光観察時のスポットと重なっている。

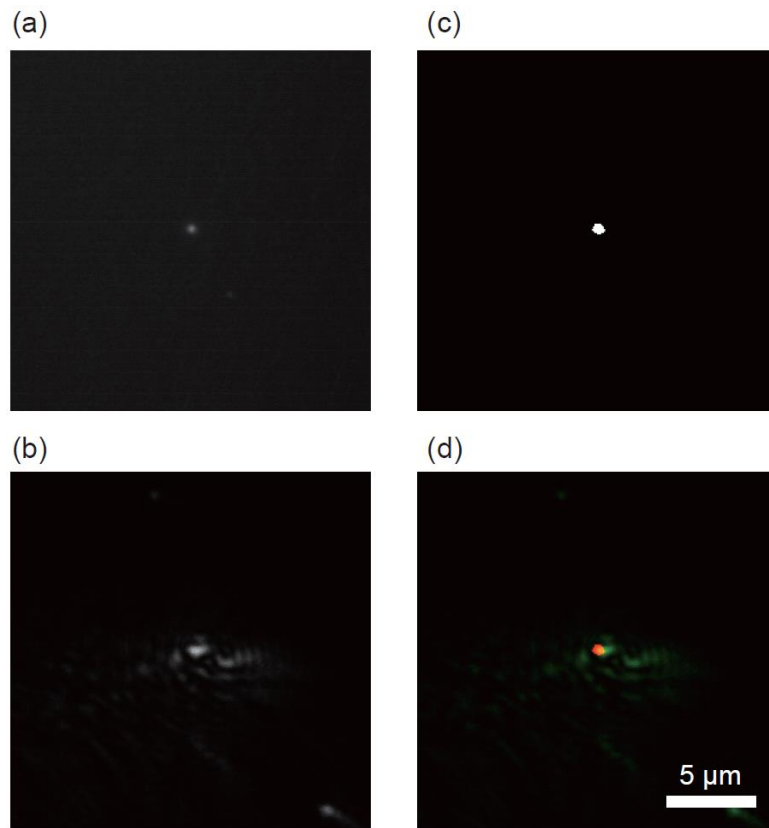


図 4-12 銀コートプローブの蛍光顕微鏡観察

(a) 銀コートプローブを蛍光顕微鏡観察条件で観察した像。(b) (a)の画像を2値化した像。
(c) 暗視野顕微鏡で銀コートプローブの散乱光を観察した像。(d) (b)の2値化画像と(c)の
散乱光画像を重ね合わせた像。銀コートプローブから発せられる散乱光が蛍光観察時のス
ポットと重なっている。

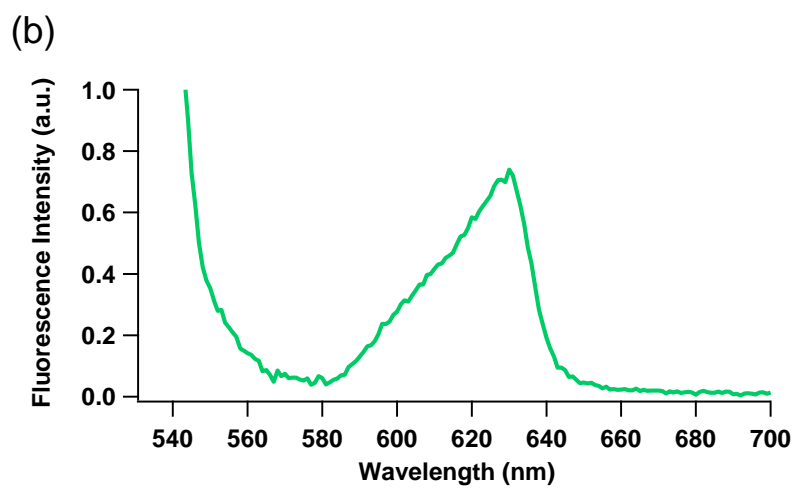
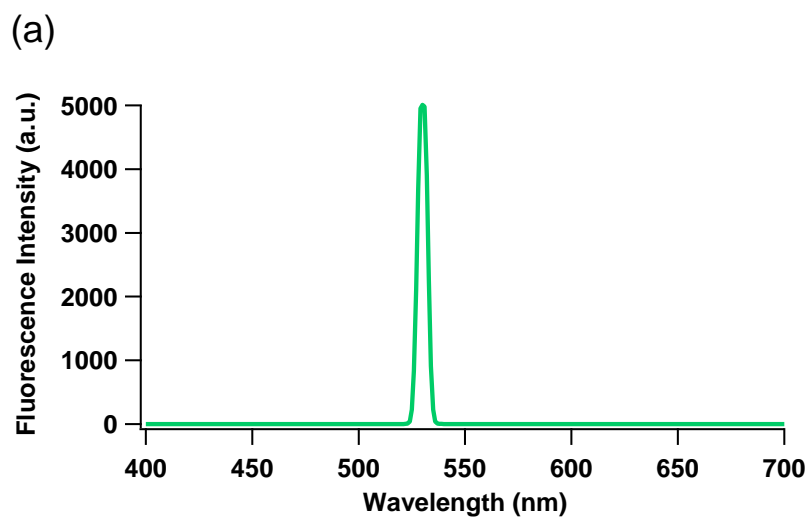


図 4-13 直径 80 nm の金コロイドの蛍光スペクトル

(a) 波長 530 nm の光で励起し、波長 400 nm から 700 nm の光を測定した。(b) (a)の波長 535 nm から 700nm の領域を拡大したスペクトル。

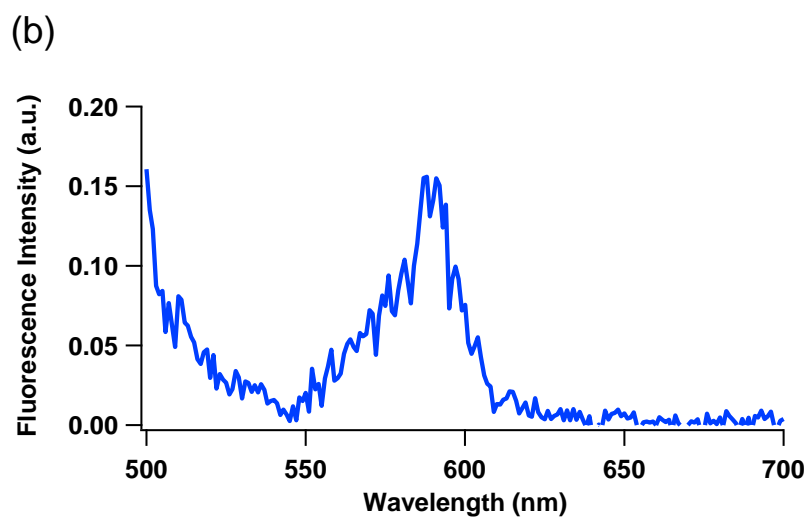
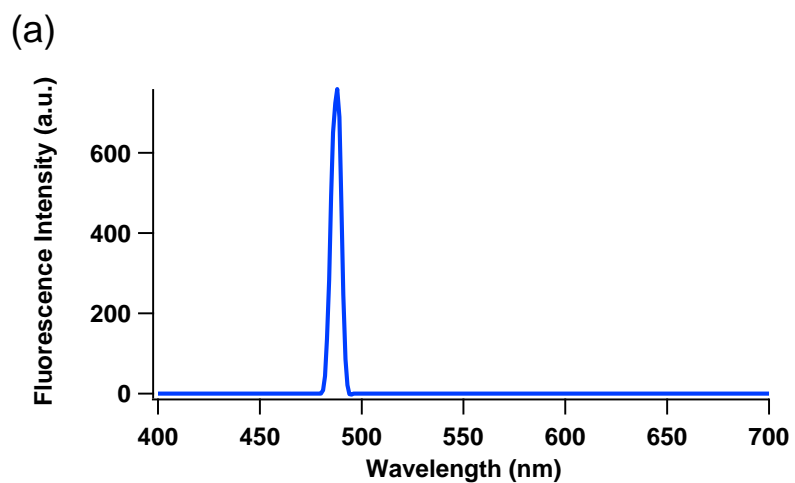


図 4-14 直径 80 nm の金コロイドの蛍光スペクトル

(a) 波長 488 nm の光で励起し、波長 400 nm から 700 nm の光を測定した。(b) (a)の波長 500 nm から 700nm の領域を拡大したスペクトル。

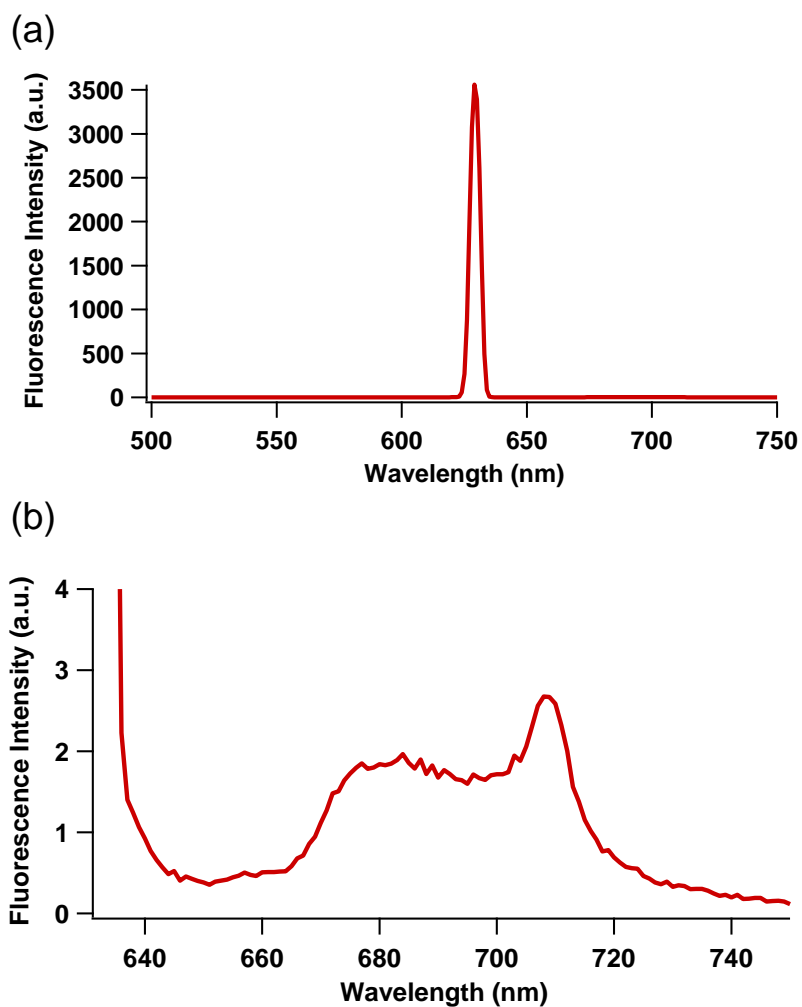


図 4-15 直径 80 nm の金コロイドの蛍光スペクトル

(a) 波長 630 nm の光で励起し、波長 500 nm から 750 nm の光を測定した。(b) (a)の波長 635 nm から 750nm の領域を拡大したスペクトル。

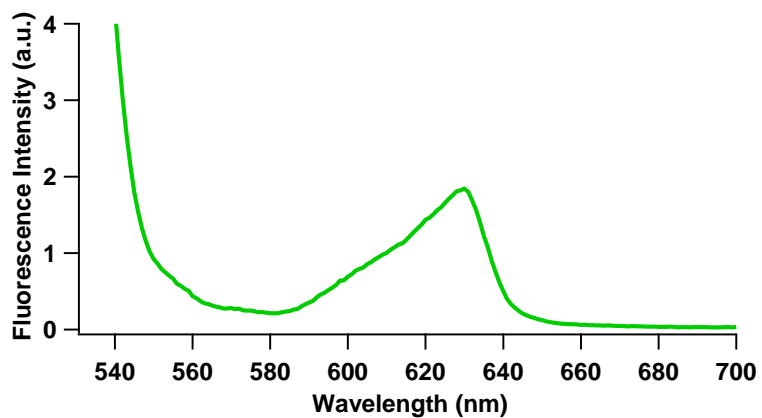


図 4-16 直径 130 nm の金コロイドの蛍光スペクトル

波長 530 nm の光で励起し、波長 540 nm から 700 nm の領域の光を測定した。

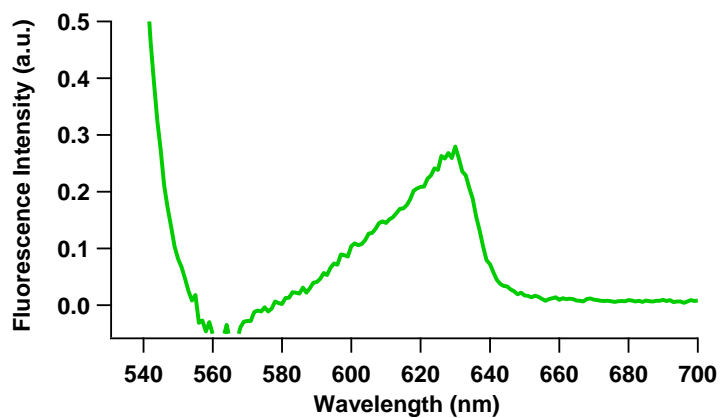


図 4-17 直径 60 nm の金コロイドの蛍光スペクトル

波長 530 nm の光で励起し、波長 540 nm から 700 nm の領域の光を測定した。

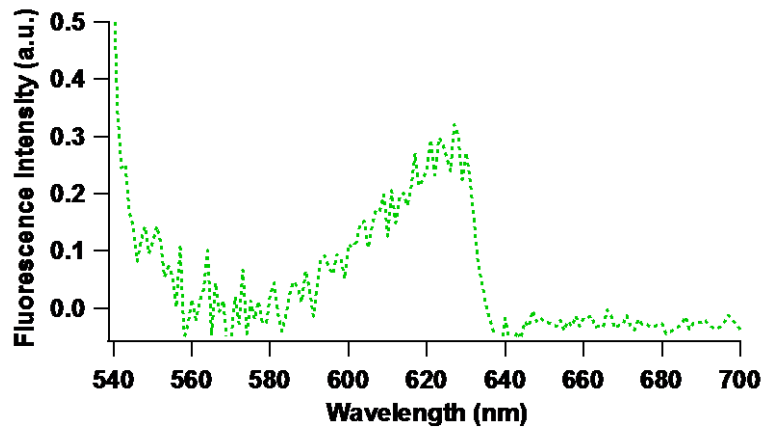


図 4-18 直径 60 nm の銀コロイドの蛍光スペクトル

波長 530 nm の光で励起し、波長 540 nm から 700 nm の領域の光を測定した。

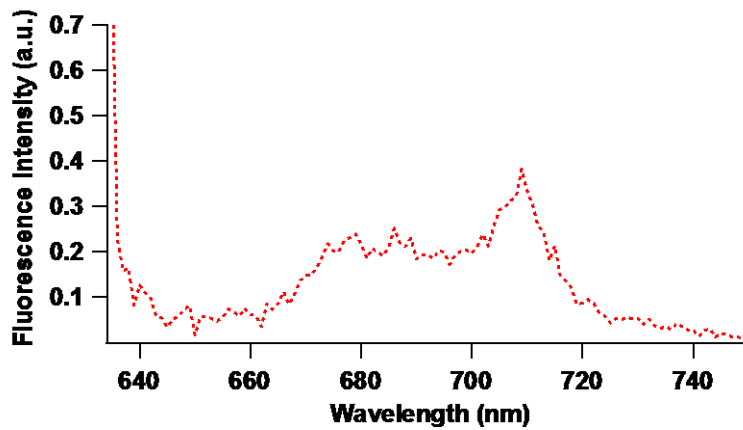


図 4-19 直径 60 nm の銀コロイドの蛍光スペクトル

波長 630 nm の光で励起し、波長 635 nm から 750 nm の領域の光を測定した。

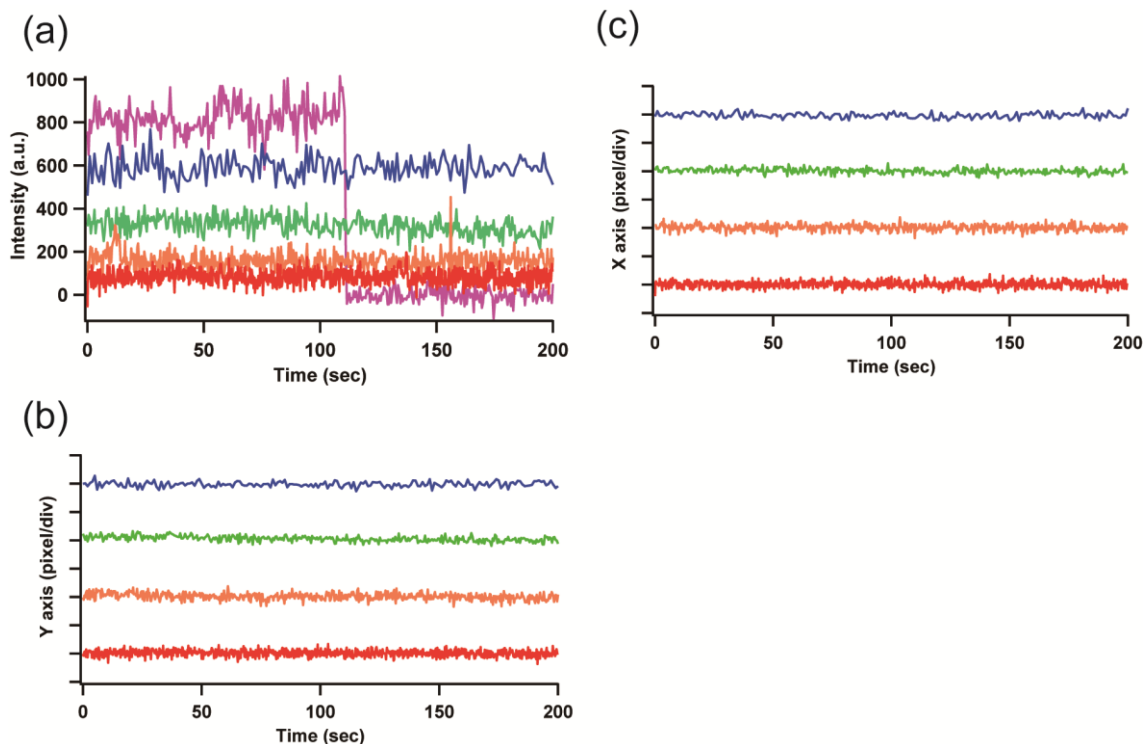


図 4-20 様々なフレームレートで走査して、金属プローブから発せられる光の安定性を検証。

(a) 様々なフレームレート(赤線; 5 fps, オレンジ線; 3 fps, 緑線; 2 fps, 青線; 1 fps)でガラス表面をイメージングした時の、金属修飾プローブから発せられる光のタイムコース(10 × 10 pixels, 1 pixel = 77 nm)。高速 AFM の走査範囲は 200 × 100 nm²であった。ピンク線は比較のための、一分子蛍光の蛍光強度のタイムコースを示し、110 s あたりで退色している。(b) 様々なフレームレート (赤線; 5 fps, オレンジ線; 3 fps, 緑線; 2 fps, 青線; 1 fps)でガラス表面をイメージングした時の、プローブから発せられる光の Y 方向に対する重心位置のタイムコース。(c) 様々なフレームレート(赤線; 5 fps, オレンジ線; 3 fps, 緑線; 2 fps, 青線; 1 fps)でガラス表面をイメージングした時の、プローブから発せられる光の X 方向に対する重心位置のタイムコース。

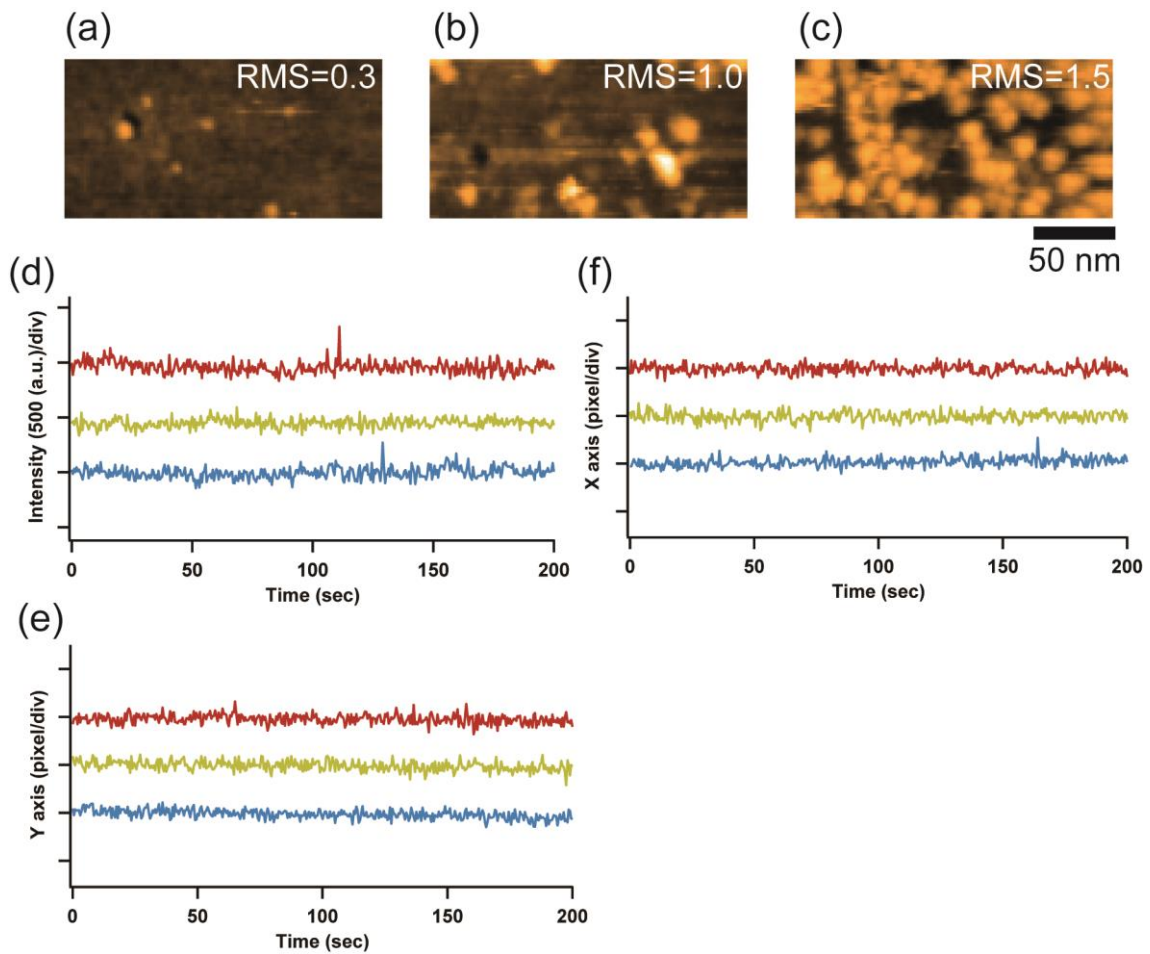


図 4-21 様々な凹凸の表面を走査した時の金属プローブからの発光の安定性を検証。

(a) ガラス表面、(b) 2.5 $\mu\text{g/ml}$ アビジン、(c) 8 $\mu\text{g/ml}$ アビジンの高速 AFM 像。フレームレートは 2 fps あった。(d) 赤、黄緑、青線は、それぞれ(a), (b), (c)の表面で測定したプローブからの発光のタイムコース(10 \times 10 pixels, 1 pixel = 77 nm)を示す。(e) 赤、黄緑、青線は、それぞれ(a), (b), (c)の表面で測定したプローブからの発光の Y 方向に対する重心位置のタイムコースを示す。(f) 赤、黄緑、青線は、それぞれ(a), (b), (c)の表面で測定したプローブからの発光の X 方向に対する重心位置のタイムコースを示す。

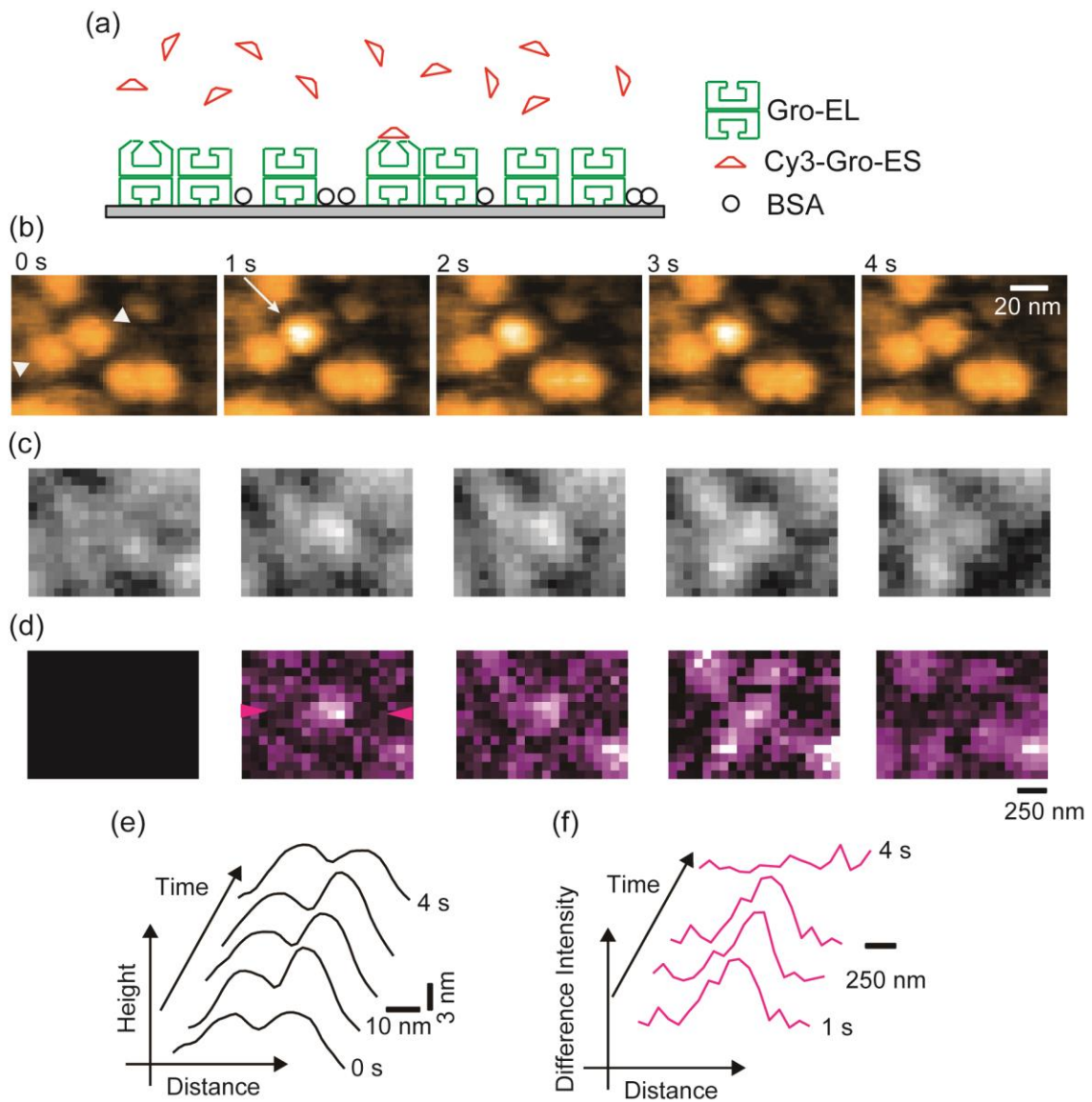


図 4-22 GroEL/ES 相互作用の高速 AFM/蛍光顕微鏡同時観察

(a) 観察系の模式図。(b) GroEL/ES の高速 AFM 像。1 s のとき GroES が GroEL に結合 (白矢印)し、4 s のときに解離している。フレームレートは 1 fps であった。(c) Cy3-GroES の蛍光顕微鏡像。(d) 蛍光像(c)から得られた差分蛍光像。各蛍光像から 0 s の像を差分して作成した。(e) AFM 像(b)で示した白矢印に沿ったラインプロファイル。(f) 差分蛍光像(d)で示したピンク矢印に沿ったラインプロファイル。

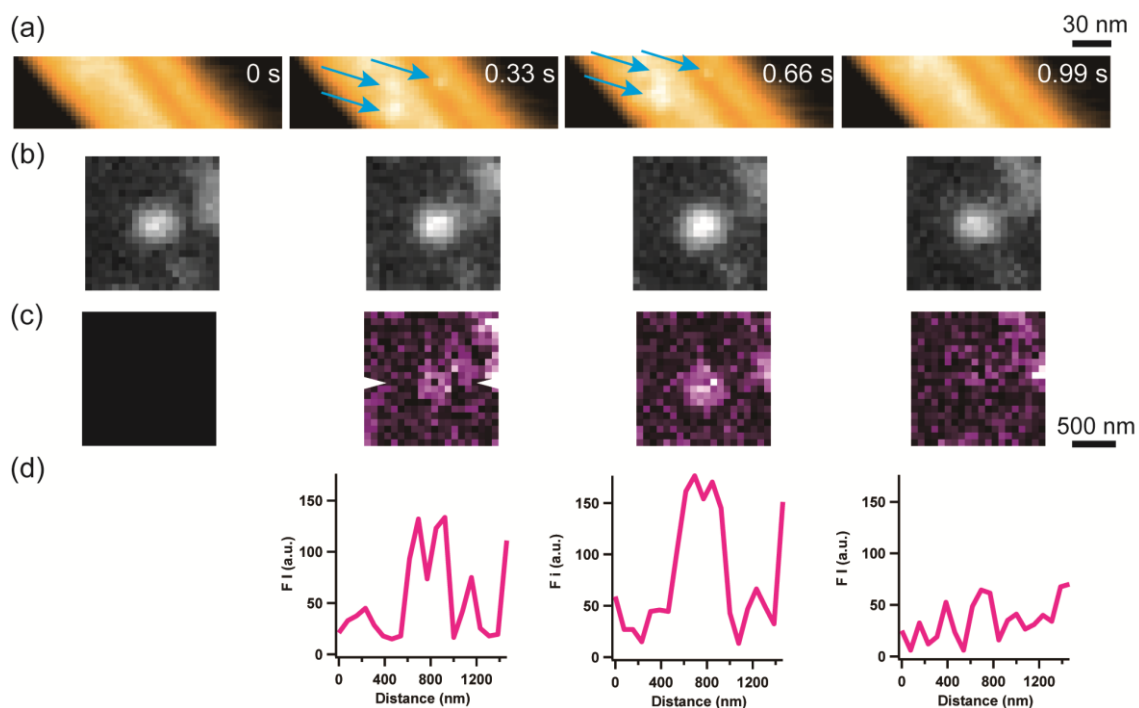


図 4-23 キチン上を動く Cy3-キチナーゼの高速 AFM/蛍光顕微鏡同時観察

(a) キチン上を動く Cy3-キチナーゼの高速 AFM 像。0.33 s のときに 3 つの Cy3-キチナーゼがキチンへ結合し左上へ移動した後、0.99 s のときにキチンから解離している。フレームレートは 3 fps であった。(b) Cy3-キチナーゼの蛍光顕微鏡像。(c) 蛍光像(b)から得られた差分蛍光像。各蛍光像から 0 s の像を差分して作成した。0.33 s のときに蛍光スポットが現れ、0.99 s のときに蛍光スポットが消失している。(d) 差分蛍光像(c)で示した白矢印に沿ったラインプロファイル。

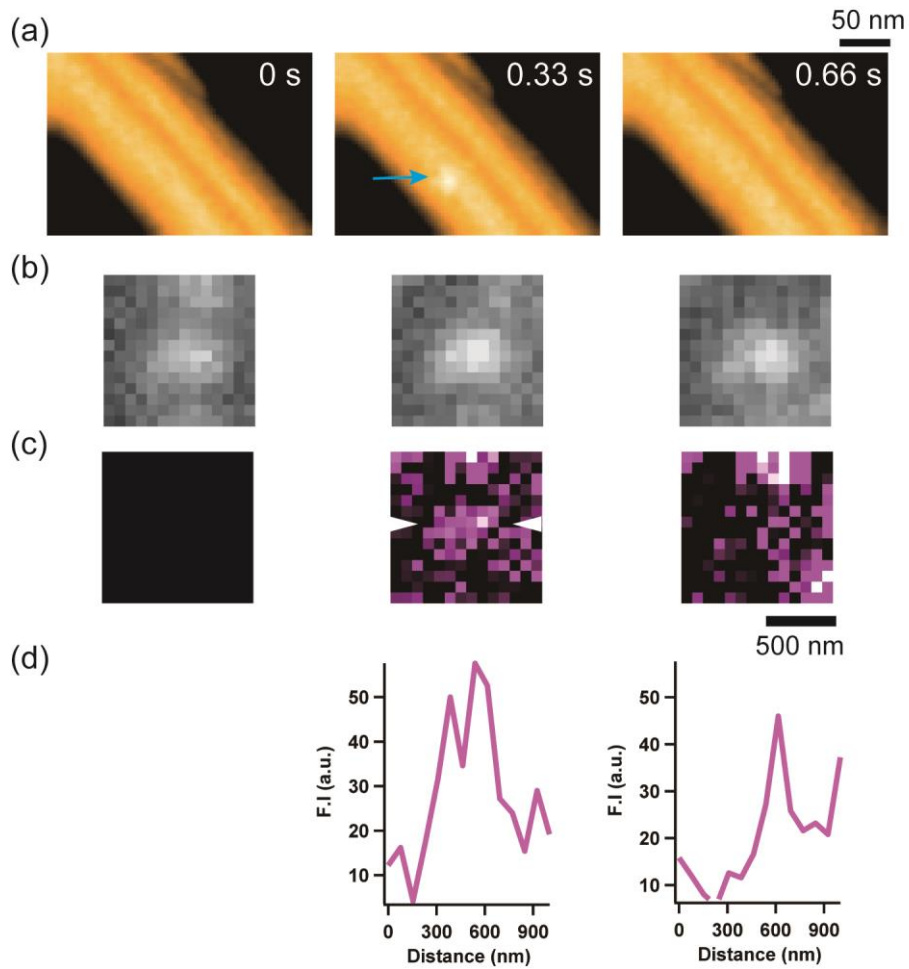


図 4-24 キチンへ結合/解離する Cy3-キチナーゼの高速 AFM/蛍光顕微鏡同時観察

(a) キチンへ結合する Cy3-キチナーゼの高速 AFM 像。0.33 s のときに Cy3-キチナーゼがキチンへ結合し、0.66 s のときに解離している。フレームレートは 3 fps であった。(b) Cy3-キチナーゼの蛍光顕微鏡像。(c) 蛍光像(b)から得られた差分蛍光像。各蛍光像から 0s の像を差分して作成した。0.33 s のときに蛍光スポットが現れ、0.66 s のときに蛍光スポットが消失している。(d) 差分蛍光像(c)で示した白矢印に沿ったラインプロファイル。

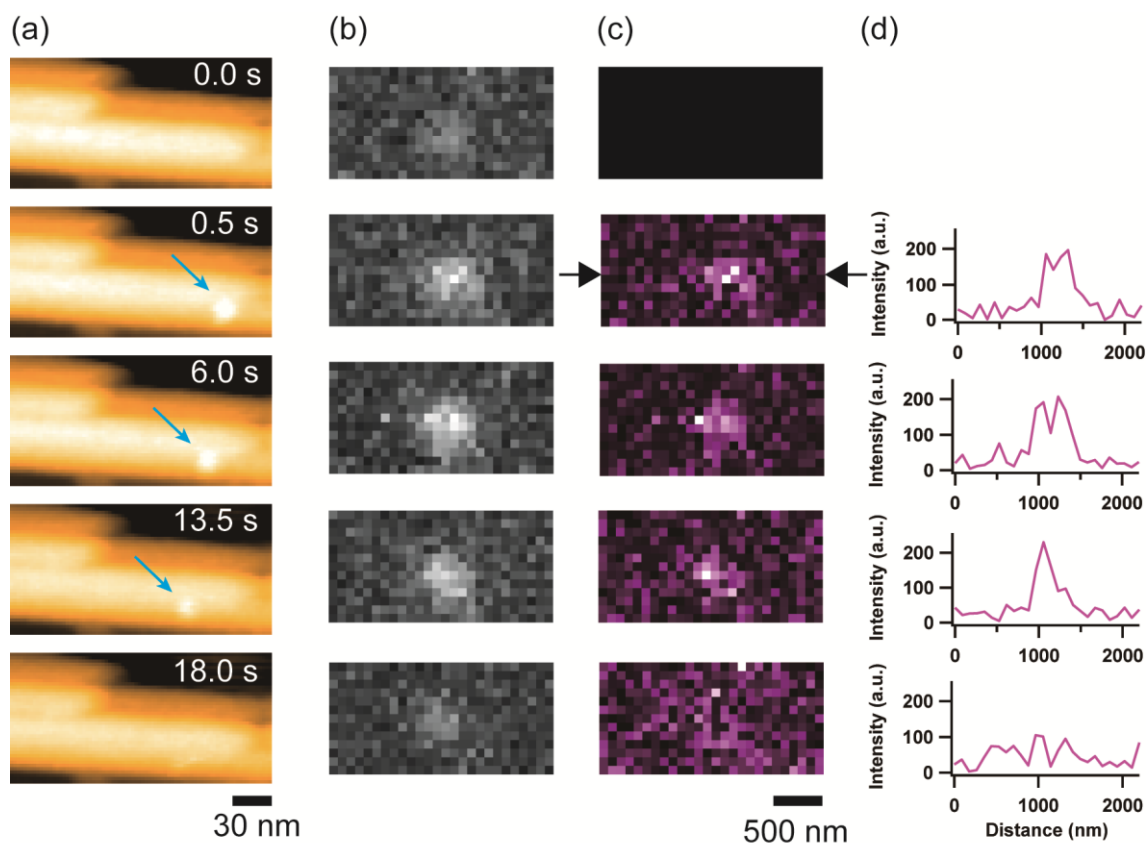


図 4-25 Cy3-*TrCel7A* の高速 AFM/蛍光顕微鏡同時観察

(a) Cy3-*TrCel7A* の高速 AFM 像。0.5 s にセルロース結晶へ結合(青矢印)し、左方向へ移動し 18.0 s にセルロースから解離している。フレームレートは 0.5 fps であった。(b) Cy3-*TrCel7A* の蛍光顕微鏡像。(c) 蛍光像(b)から得られた差分蛍光像。各蛍光像から 0.0 s の像を差分して作成した。0.5 s に蛍光スポットが現れ、高速 AFM 像の Cy3-*TrCel7A* と同時に消失している。(d) 差分蛍光像(c)で示した黒矢印に沿ったラインプロファイル。

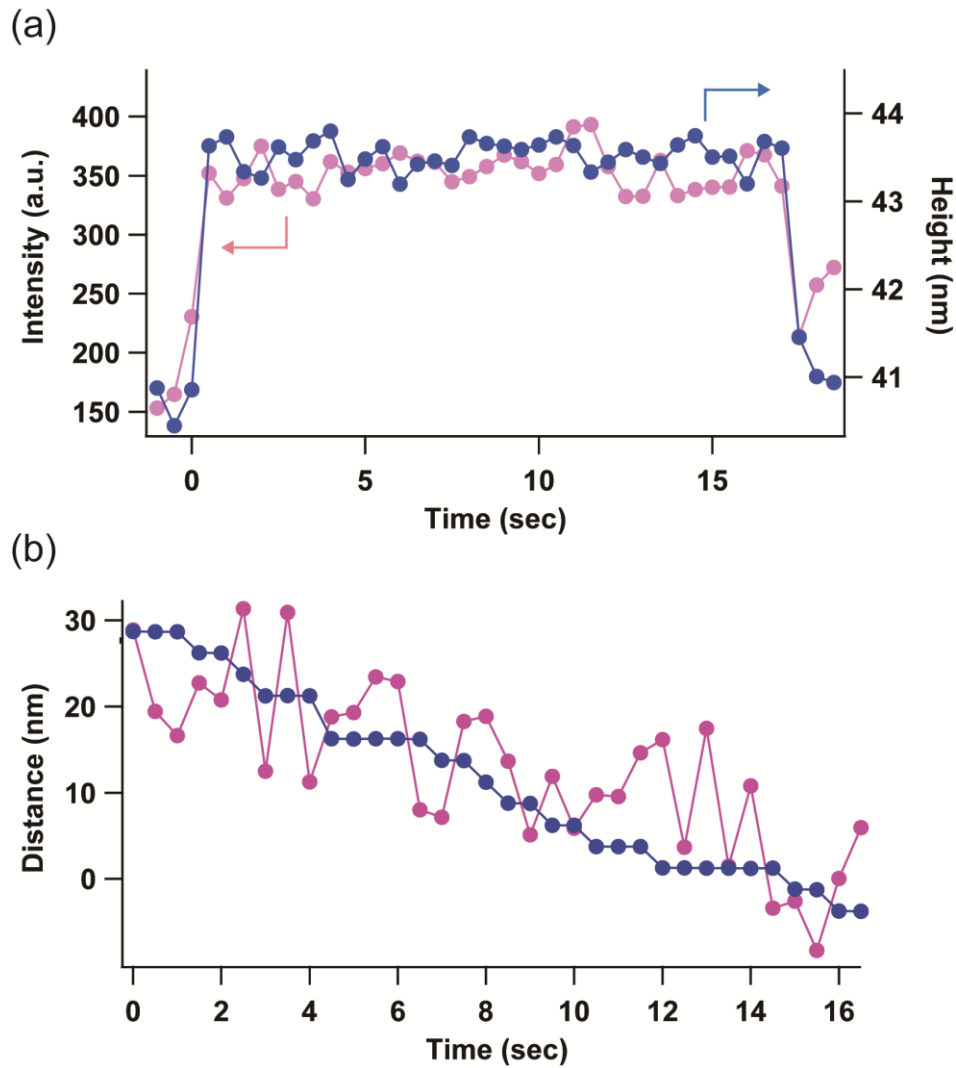


図 4-26 *TrCel7A* の運動の高速 AFM と蛍光画像の相関

(a) *Cy3-TrCel7A* が結合したセルロースの高さと蛍光強度のタイムコース。青線は、AFM 画像から得られた高さの時間変化でピンク線は 蛍光像から得られた蛍光強度の時間変化を示す。(b) *Cy3-TrCel7A* の X 方向に対する移動距離。青線は、AFM 画像の重心位置から得られた移動距離でピンク線は蛍光スポットの重心位置から得られた移動距離を示す。

4.3 考察

本研究で行った金属プローブによる蛍光増強実験では、最も良い条件でも 2 倍程度しか蛍光を増強できなかった(図 4-27)。一方で Novotny らは金コロイドを使い 8 倍[61]、Gerton らはシリコンプローブを用いて 20 倍[64]の蛍光増強を実現している。なぜ、本研究では 2 倍程度までしか増強できなかったのでしょうか？この理由は主に 4 つあると考えている。1 つめは、金コロイドをプローブに取り付ける場合、金コロイドがプローブ先端から離れた位置につくためだと考えられる。なぜなら、金コロイドからの発光は、金コロイドからの距離に強く依存し減衰するためである[61]。金コロイドをプローブ先端部に取り付けることを試みたが、基板との相互作用によってすぐにはずれてしまい、最も良い条件でもプローブ先端から 50 nm の位置であった。最も電場が増強される金コロイドと蛍光分子間の距離は 2 nm であるという[61]。2 つめの理由として、プローブを金属コートする場合には、金属コートの膜の厚さにあると考えている。4.2.2 でも述べたように本研究での金属膜の厚さは 10 nm 以下だと見積もることができる。もっと厚く金属コーティングを行えば、大きな蛍光増強を達成できると期待できるが、分厚い金属コーティングはカンチレバーの硬化を招き、やわらかな生体分子の高速イメージングに適さない。また、数十ナノメートルオーダーの金属蒸着を試みたが、長時間の金属照射によりカンチレバーが湾曲してしまい、十分な反射光を得ることができなかった。実際に、大きな電場増強を達成しているティップ増強光学顕微鏡の実験で、Yang らはプローブを 60 nm 金コーティングしている[76]。このことから、10 nm 以下の膜厚は十分に小さな値だといえる。次に考えられる理由は、プローブのプラズモン共鳴波長である。シリコンプローブを金属コーティングする前にあらかじめ酸化させ二酸化シリコン(SiO_2)にすることで、プラズモン共鳴波長を低周波側にシフトさせ、電場増強の再現性を劇的に向上させたという報告がある[77,78]。また、プローブの形状を変化させることで共鳴波長をコントロールできるという実験結果もある[79]。本研究の実験条件下で作成したプローブの主成分はアモルファスカーボンであると考えられる。このプローブに金属コーティングした時の共鳴スペクトルがどのような形状になるかはわからないが、プローブのプラズモン共鳴波長を使用するレーザー光の波長に合うように、プローブの長さや形状を検討しシリコンや二酸化シリコンでプレコーティングする必要があるかもしれない。最後に、大きな蛍光増強を達成できなかった最大の理由は、ティップ増強光学顕微鏡と本研究で行った全反射蛍光顕微鏡の照明方法の違いにあると考えている。ティップ増強光学顕微鏡の照明では、レーザー光はプローブ長軸に対して平行な偏光成分を持ちながらプローブに向かって集光する[80]。これは、レーザー光の偏光の向きとプロー

ブの長軸方向が一致した時にもっともレーザー光とプローブが相互作用し、大きな電場増強を引き起こすことができるためである[57]。一方で、全反射顕微鏡法ではレーザー光は基板面でエバネッセント場を形成し、プローブに対して垂直な偏光成分を持ち、プローブに向かって集光されない。このような照明法では、大きな電場増強は期待できないのである。

しかし、ここで行った一分子実験において2倍の蛍光増強は十分な値である。なぜなら、2倍の蛍光増強度は明るさの違いを認識するのに十分であり、実際に高速AFMと蛍光顕微鏡の同時観察において蛍光分子の結合/解離過程を観察することができたためである。本研究で重要なことは増強度ではなく、むしろ光学顕微鏡視野でのAFM観察箇所の特定である。我々は金属プローブから発せられる光を用いて、プローブ位置を正確に決定することができ、AFM観察箇所の蛍光を2倍の明るさで観察することができる。これにより、十分にAFM像と光学像の相関を取ることができるのである。

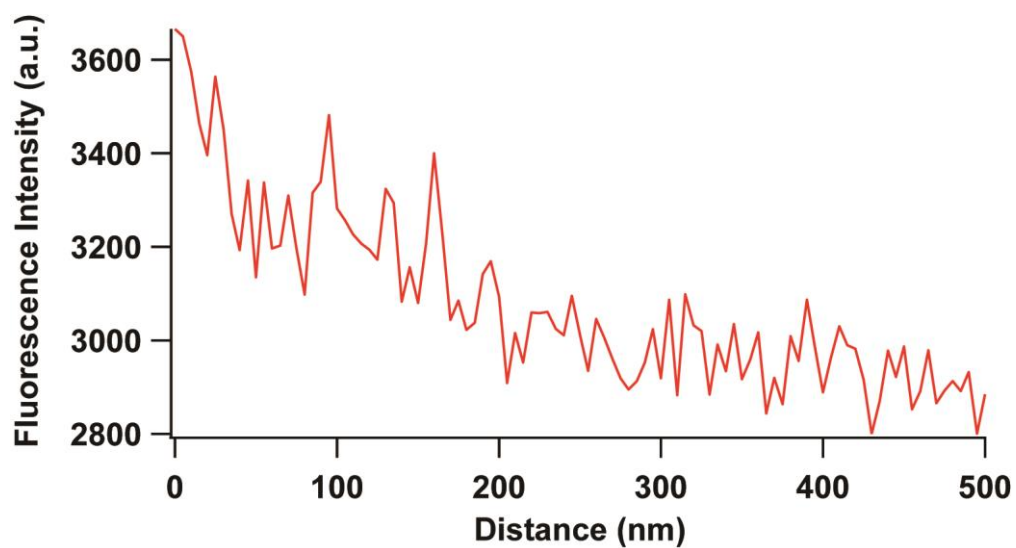


図 4-27 金属修飾プローブによる蛍光増強

アバランシェフォトダイオードを用いて、蛍光を検出した。蛍光ビーズをフォトダイオードの受光面へ移動し、基板からの金属修飾プローブの各位置(z 方向)で測定。各位置での計測時間は 100 msec であり、蛍光の増強度は 1.3 である。2 分間銀コーティングを行ったプローブで計測した。

4.4 まとめ

本研究では、高速 AFM と一分子蛍光観察実験における観察視野、およびターゲット試料濃度の差を克服するための、一分子高速 AFM/蛍光顕微鏡像相関法の開発を行った。金属修飾プローブによる電場増強を利用して AFM 観察領域近傍の蛍光を増強し、一分子蛍光を 2 倍程度増強することに成功した。光学顕微鏡観察と蛍光スペクトル解析によって、金属修飾プローブが蛍光領域の光を発していることがわかった。金属プローブによる蛍光の増強、プローブから発せられる光により容易に AFM 観察範囲内の蛍光を特定できるようになった。開発した手法を用いて比較的高濃度蛍光試料条件下で、ATP 加水分解反応に伴う GroES/EL の結合/解離、キチナーゼがキチン上で異なる 2 つの運動様式で結合する様子、セルラーゼがセルロース結晶状を一方向へ移動していく様子を高速 AFM と蛍光顕微鏡で同時観察することに成功した。

今後、本研究で開発した手法が、タンパク質の構造変化と蛍光性ヌクレオチドの同時観察や複数種のタンパク質が関与する複雑な試料系に適応され、生体分子の作動機構の解明へ貢献することを期待する。

第 5 章 高速 AFM/超解像光学顕微鏡複合機の開発

5.1 目的と概要

「光学顕微鏡でみえる構造は光の波長の半分まで。」これは光学顕微鏡の空間分解能のことを言っており、光の波の性質のため 1 点の光源から発せられた光はレンズを通った後では波として存在できる領域（光の波長の半分程度）までしか絞り込むことができないことに由来する。顕微鏡における空間分解能とは、どれだけ小さなものを観察できるかの指標であり、どの程度まで近接した 2 つの輝点を別々に解像できるかで定義される。レイリーの基準によると顕微鏡の空間分解能は次の式で表される。

$$\delta = 0.61 \frac{\lambda}{NA} \quad (5.1)$$

ここで、 λ は使用するレーザー光の波長、NA は対物レンズの開口数を表す。波長が 530 nm のレーザー、開口数が 1.4 の対物レンズを使うと分解能は 231 nm ということになる。この分解能では、せいぜい細胞内の小器官の分布が分解できる程度であり、細胞内のタンパク質の局在を解像することはできない。さらに、タンパク質一分子観察の場合、重心解析により数ナノメートルの精度で輝点の位置を特定することはできるが[81]、複数のリガンドが分子に結合した場合、分子のどの位置に結合しているのか明確に議論することは難しい。実際に代表的なモータータンパク質であるミオシン V や F₁-ATPase において、一分子蛍光顕微鏡を用いてタンパク質の動態とヌクレオチドの結合/解離の同時観察が行われているが[11][82]、分子内のヌクレオチドの位置を特定することができないため、明確な化学・力学変換メカニズムを議論することはできなかった。このことは、高速 AFM/蛍光顕微鏡同時観察においても同様で、高速 AFM でタンパク質の構造変化を可視化することはできても、ヌクレオチドがタンパク質のどのサブユニットに結合し動的変化を引き起こすのかを示すことは難しい。

一方で近年、光の回折限界を超える空間分解能を持つ超解像光学顕微鏡の開発が進められている[48]。なかでも、プローブ先端に発生する近接場光を利用する走査型近接場光顕微鏡(Scanning Near Field Optical Microscopy:SNOM)、ティップ増強光学顕微鏡は[58,59,83]、複雑な光学系や解析手法を用いることなく蛍光やラマン散乱などを高解像で計測できる強力な手法であり、回折限界を超える光学イメージングが可能である。しかしな

がら、走査型プローブ顕微鏡(Scanning Probe Microscope: SPM)を基盤技術としているため、走査速度が遅く1画像取得するのに分のオーダーを必要としていた。このことが、SNOMの生命科学分野への応用を制限してきた要因であるといえる。

そこで本研究では、プローブ走査型高速 AFM を SNOM へ適応し、高速 AFM / 超解像光学顕微鏡複合機の開発を行った。アバランシェフォトダイオードを使用して、各 XY 面におけるカンチレバーのピクセル位置と同期して蛍光を計測し AFM 像と同時に光学像を取得した。最も効率よく金属プローブとレーザー光をカップリングさせるために、試料面におけるレーザーの偏光は分割偏光素子を用いて、プローブと平行になるようにした。また、基板表面にエバネッセント場を形成させるため、レーザー光の中心部をマスクし、対物レンズの高 NA 部分にのみレーザー光を入射させた。さらに、大きな電場増強を達成するため、複数の金コロイドをとりつけたマルチコロイドプローブ、分子の光吸収反応を利用した銀ナノ粒子プローブを作製した。開発した複合顕微鏡を用いて、蛍光ビーズをイメージングした結果、3.5 秒の時間分解能で光の回折限界を大きく上回る 87 nm の空間分解能を達成することができた。再現性の低さや一分子蛍光計測における色素の退色、ブリンキングなど解決しなければならない課題はあるが、この成果から一分子レベルの超解像光学/高速 AFM 同時観察に向けた足掛かりになることが期待される。

5.2 走査型近接場光顕微鏡

5.2.1 局在表面プラズモン

金属と光の相互作用によって表面プラズモンポラリトン(Surface Plasmon Polariton ; SPP)が引き起こされる。これは金属内の自由電子が光によって振動させられるためである。分極した自由電子によって金属表面に局在化したプラズモンが発生し、光の振動数と異なる振動数の波が発生する。この波は金属表面のみに存在し、進行方向に対して垂直方向に指数関数的に減衰する(図 5-1)。これは表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance ; SPR)と呼ばれ局所的に著しく増強した電場を発生させ、光の回折限界を超える小さな領域の光を発生させることができる[84]。照射する光の波長よりも小さいナノメータースケールの金属粒子に光を当てると SPR が起き(図 5-2)、粒子表面近傍に近接場光(Near-Field Light)が発生する。これを局在表面プラズモン共鳴 (Localized Surface Plasmon Resonance ; LSPR)と呼び、LSPR の強度や共鳴波長は粒子の大きさや形状に強く依存する。

5.2.2 走査型近接場光顕微鏡

走査型近接場光顕微鏡(SNOM)とは、プローブ先端に近接場光を発生させ、試料から散乱した光を観察する走査型プローブ顕微鏡である。SNOM は、蛍光やラマン散乱を感度よく検出することができ、回折限界を超える空間分解能で光学イメージングを行うことができる強力な手法である[83]。SNOM には、いわゆる開口型[85]と散乱型[86]と呼ばれる 2 つの検出方式がある。開口型では、先端に微小な開口を持つ光ファイバプローブを用いて、開口内からレーザー光を照射しプローブ先端に発生した近接場光を試料に照射する。一方、散乱型ではプローブにシリコンや金属を用いて、プローブにレーザー光を照射して近傍に発生した近接場光を利用する。このとき、近接場光の広がり大きさが SNOM の空間分解能を決める。開口型の方がより一般的で広く使われているが、分解能や感度では散乱型の方が優れている。本研究では、簡単にプローブ走査型高速 AFM と組み合わせることができ散乱型の SNOM を採用した。

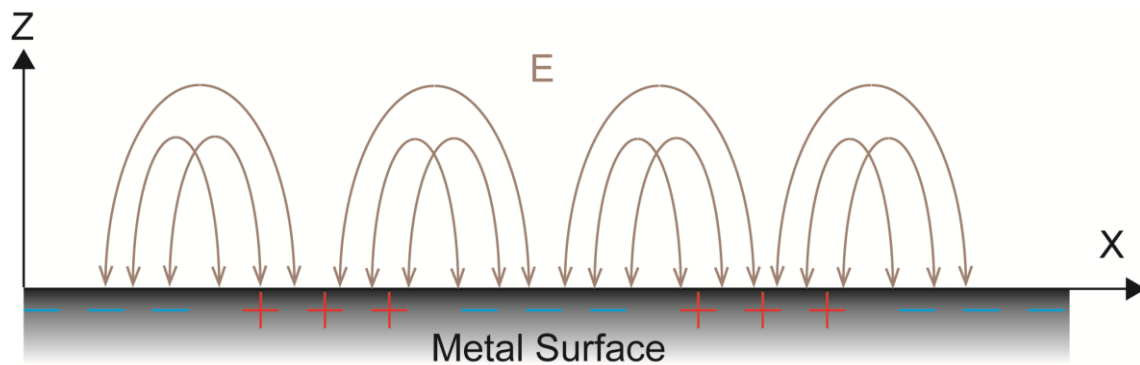


図 5-1 表面プラズモン共鳴の模式図

X 方向に光が進行し Z 方向に電場が生じる。電場の大きさは距離に対して指数関数的に減衰する。

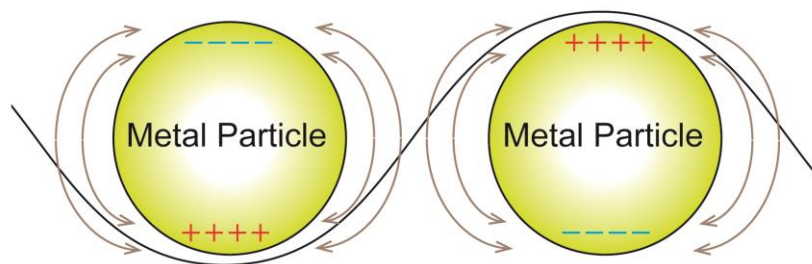


図 5-2 局在表面プラズモン共鳴の模式図

金属ナノ粒子内の自由電子が光によって分極し、局在表面プラズモン共鳴を引き起こす。

5.3 実験

5.3.1 装置および光学系

図 5-3 に走査型近接場光顕微鏡の光学系を示す。励起レーザーは波長 532 nm の緑色レーザー(DPGL-2050F, PHOTOP Technologies. Inc, Fujian, China)を使用した。光学顕微鏡筐体は倒立型顕微鏡(ECRIPSE Ti, 株式会社ニコン、東京)を使用した。レーザーパワーは、レーザードライバー(LDC-2500S, PHOTOP Technologies. Inc, Fujian, China)により、変調することが可能である。レーザー光は、ビーム径を広げたのち $\lambda/2$ 波長板(WPQ-5320-2M, シグマ光機株式会社、大阪)によって縦方向に偏光させられ、分割変更素子(Zpol-532-QzM-8, ナノフォトン株式会社、大阪)を用いて集光面において基板に対して垂直方向に偏光させられる[80]。対物レンズは開口数 (NA) 1.4 の油浸対物レンズ(APON 60XOTIRFM, オリンパス株式会社、東京)を用いた。基板表面にエバネッセント場を形成させるため、レーザーの中心部をマスクし、対物レンズの高 NA 領域にのみレーザー光が入射させられる[87]。試料から発せられた蛍光は、ダイクロイックミラー(Di02-R532-25×36, Semrock, Rochester, NY, USA)と励起レーザー光を遮断するハイパスフィルター(BLP01-532R-25, Semrock, Rochester, NY, USA)、AFM の変位検出に使用する近赤外レーザーを遮断する 2 枚のローパスフィルター(BSP01-633R-25, Semrock, Rochester, NY, USA)を介してアバランシェフォトダイオード(SPCM-AQRH-16, Excelitas Technologies Corp, Waltham, MA, USA)に集光させられる。アバランシェフォトダイオードによって計測した蛍光は、一光子ごとにパルス信号に変換されカウンターボード(PCI-632206, 株式会社インターフェース、広島)を用いて計測される。アバランシェフォトダイオードは XY ステージ(B27-100AR, 駿河精機株式会社、静岡)と Z ステージ(TSD-1201SH, シグマ光機株式会社、大阪)に搭載され XYZ 方向に動かすことができ、集光点へ露光面を合わせることができる。試料から発せられた蛍光は AFM カンチレバーの各 XY 位置と同期して計測され、光学像を構築する。画像取得ソフトウェアは、Igor Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA)と C 言語を用いて開発した。プローブ走査型高速 AFM は第 2 章で述べたものと同じである。図 5-4 (a)にフォトダイオードを使って取得したローダミン染色アクチンフィラメントの光学像を示す。試料ステージを XY 方向に走査し、各ピクセル位置で蛍光を検出し画像化した。ローダミン染色したアクチンフィラメントは第 2 章 4 と同じ方法で精製、調製して観察した。CCD カメラを使い撮影した像と同様のアクチンフィラメントの蛍光像を取得することができた (図 5-4)。このことから、構築した光学系およびソフトウェアが正常に動作していることを確認する

ことができる。なお、この計測では分割偏光素子、マスクは使用しなかった。

5.3.2 プローブの位置合わせ

効率よくプローブ先端の電場を増強するため、プローブのレーザー集光点への位置合わせはとても重要である。図 5-5 にプローブを位置合わせするための光学系を示す。ND フィルター(AND-25S, シグマ光機株式会社、大阪)によって減光させられたレーザー光はハーフミラー(BSW10R, Thorlabs, Newton, NJ, USA)によって反射され、対物レンズによって基板表面に集光される。集光されたレーザー光は CCD カメラ(IXon3, Andor Technology, Berfast, Northern Ireland)を用いて位置を確認することができる(図 5-6, a)。おおまかな位置合わせとして、マイクロメーターヘッドを用いて AFM ヘッドが搭載されている光学顕微鏡ステージを動かしてカンチレバーの位置をレーザー集光点に合わせる。カンチレバーの位置は、AFM の変位検出用レーザーの影によって確認することができる(図 5-6, b)。詳細な位置合わせとして、プローブを基板に接触させ XY 方向に走査しプローブからの散乱光を計測する。アバランシェフォトダイオードを用いてカンチレバーの XY 位置と同期して散乱光を取得し画像化した。図 5-7 (b)に金属プローブによる散乱光分布像を示す。レーザー光はプローブ長軸と同じ方向に偏光しているため、単一のスポットとしてレーザー光とプローブの相互作用が可視化され、プローブをレーザースポット中心へと合わせる事が可能である。

5.3.3 レーザー光の偏光の最適化

レーザー光の偏光が、プローブに対して平行な時に最も電場が増強される[57]。そのため、レーザー光の偏光は基板に対して垂直にならなければならない。放射状に偏光したレーザー光を対物レンズに入射し、傘をたたむように集光していくと基板に対して垂直な偏光を作製することができる[80]。放射状の偏光は、偏光素子を 8 分割し互いに対になる面を通過した光が位相を 90° 変化させるように設計した分割偏光素子(Zpol-532-QzM-8)を用いて作られる。図 5-7 プローブを基板表面で、XY 方向に走査した時の散乱光分布像を示す。放射状に偏光したレーザー光はプローブと強く相互作用し、単一のスポットとして観察された(図 5-7, b)。プローブに対して横方向に偏光したレーザー光では、偏光方向に 2 つのスポットが観察された(図 5-7, a)。これは対物レンズ集光面において、プローブに対して 2 つの平行な偏光成分があるためである。一方で、集光面に対して垂直方向の偏光を含まないアジ

マス偏光では、プローブとの相互作用は見られなかった[80]。

5.3.4 プローブの金属修飾の最適化

第 4 章で述べたように、プローブを金属コーティングする方法、金コロイドを接着する方法ともに、2 倍程度の蛍光増強しか得ることができなかった。この増強度では超解像イメージングをするのに十分とは言い難い。そこで、複数の金属ナノ粒子をプローブへ接着したマルチコロイドプローブと電子移動反応を利用した光還元銀粒子接着法の開発を行った。

複数の金属ナノ粒子をプローブへ取り付けることでより大きな電場増強を期待することができる。Höppener らは大きさの違う複数の金ナノ粒子をプローブへ取り付け 40 倍の蛍光増強に成功し、15 nm の空間分解能を実現した[88]。そこで、高速 AFM のプローブに複数の金コロイドを取り付けたマルチコロイドプローブを作製した。図 5-8 にマルチコロイドプローブの電子顕微鏡像を示す。金コロイドをプローブへ取り付ける方法 4.2.2 で記したものと同一である。このとき、カンチレバーの共振周波数は、金コロイドを 1 つ取り付ける手法と同様に変化しなかった。図 5-9 に基板からの距離に対するプローブの散乱光強度を示す。プローブからの散乱光の計測は図 5-5 の光学系を用いて行った。1 つの金コロイドを取り付けたプローブに比べてマルチコロイドプローブでは約 6 倍の散乱光を計測することができた。

光還元銀粒子接着法では、エオシン Y ニナトリウム塩（エオシン、E63003, Sigma-Aldrich, Poole, Dorset, UK）、N-メチルジエタノールアミン(MDEA, 471828, Sigma-Aldrich)、硝酸銀(AgNO₃, 209139, Sigma-Aldrich)を含む溶液中にプローブを浸した状態で光を照射し、プローブに銀粒子を接着させる。エオシンは緑色の光をよく吸収し光増感剤として働き、他の分子と反応することができ電子移動反応が進行することが知られている。アミンは電子が豊富な化合物であり、容易に酸化され α-アミノアルキルラジカルとなる。α-アミノアルキルラジカルは出発物質のアミンよりも酸化されやすい化学種であり、強力な還元剤となって溶液中の Ag⁺¹ を Ag へと変換することができる[89]。Umakoshi らはこの方法を用いてラマン散乱の大幅な増強に成功している[90]。緑色レーザーはビームエキスパンダーによって径を広げられ、プローブへ照射される。銀粒子プローブの作製は、倒立型顕微鏡に設置したプローブ走査型高速 AFM を用いて行った。具体的な手順を以下に記す。

- ・ 50 mM AgNO₃, 1 M MDEA を含む溶液にプローブを浸し、基板へアプローチさせる。

- ・ プローブをレーザー光の中心へ移動させる。
- ・ チャンバー内に $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ になるようにエオシンを加え、プローブを基板へ接触させる。
- ・ 緑色レーザーを照射する。

図 5-10 に銀粒子を接着させたプローブの電子顕微鏡像を示す。レーザー光の照射時間を長くするほど、多くの銀粒子が付着した。図 5-11 に基板からの距離に対するプローブの散乱光強度を示す。銀コーティングしたプローブに比べて 10 倍の散乱光を計測することができた。また、カンチレバーの共振周波数は銀粒子を取り付けた後でも変化しなかった。これは、銀粒子がカンチレバー全体ではなく、主にプローブやカンチレバーの縁に付くためだと考えられる[90]。

5.3.5 高速 AFM / 超解像光学顕微鏡同時観察

金属修飾したプローブを高速 AFM に装着し、高速 AFM と超解像光学顕微鏡の同時観察を行った。試料として直径 40 nm のニュートラアビジンコーティングされている蛍光ビーズ(F-8771, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)を使用した。観察バッファーは、20 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂を使用した。観察手順を以下に示す。

- ・ ガラス基板と 0.1 %アミノシランを 3 分間反応させる。
- ・ 超純水で洗浄後、0.1 mg/ml のアミノ基反応性ビオチンを滴下し 3 分間インキュベートする。
- ・ バッファーで洗浄後、0.1 %に希釈した蛍光ビーズを滴下し 3 分間インキュベートする。
- ・ 未吸着の蛍光ビーズを洗い流して観察する。

はじめに、マルチコロイドプローブを用いて観察を行った。AFM 像と光学像で同じビーズの像を観察することができた(図 5-12)。図 5-12 (c)に光学像における白矢印で示したクロスセクションを示す。光学像において 47 nm 離れて隣接する蛍光ビーズを解像することができた。この結果から空間分解能が 47 nm 以下であるといえ、光の回折限界を大きく上回る分解能を達成することができた。マルチコロイドプローブでは、プローブ先端には金コロイドがついていないので AFM 画像において大きく空間分解能が低下することはなかった。AFM 画像上の青矢印で示した球体は、光学像では観察されなかった。これは、退色し

たビーズもしくはコンタミネーションであると考えられる。このときの 1 画像取得時間は 19 秒であり、タンパク質の構造変化を捉えるのに十分な速さとは言えないが、従来の走査型近接場光顕微鏡では、1 画像取得するのに 500 秒近く必要とすることを考えれば十分に速い値であるといえる。さらにイメージング速度を上げることを試みたが、各ピクセルにおける計測時間が短くなり蛍光を安定して計測することができず、光学像を構築することができなかった。

次に、光還元法を用いた銀粒子プローブを用いて観察を行った。5 分間緑色レーザー光を照射して銀粒子を付着させたプローブを使用した。図 5-13 に蛍光ビーズの高速 AFM と光学同時観察像を示す。このとき、光学像におけるビーズの半値幅は 87 nm であった(図 5-13, c)。プローブ先端に付着した銀粒子によって AFM 像の空間分解能が大きく低下してしまった。このことによって、大きな電場増強にもかかわらず光学像において空間分解能が制限されたと考えられる。また、プローブ先端の形状が均一でないため AFM 画像と光学画像でビーズの形状が同じにならなかった。しかしながら、このときの 1 画像取得時間は 3.5 秒でありマルチコロイドプローブに比べて走査速度を大幅に向上させることができた。銀粒子プローブを用いて、これ以上の時間分解能、空間分解能を達成することはできなかったが、銀粒子接着後に短いプローブを作製するなどのプローブ製法を改良することで大きな時間空間分解能をもつ高速 AFM / 光学イメージングが達成できると期待される。

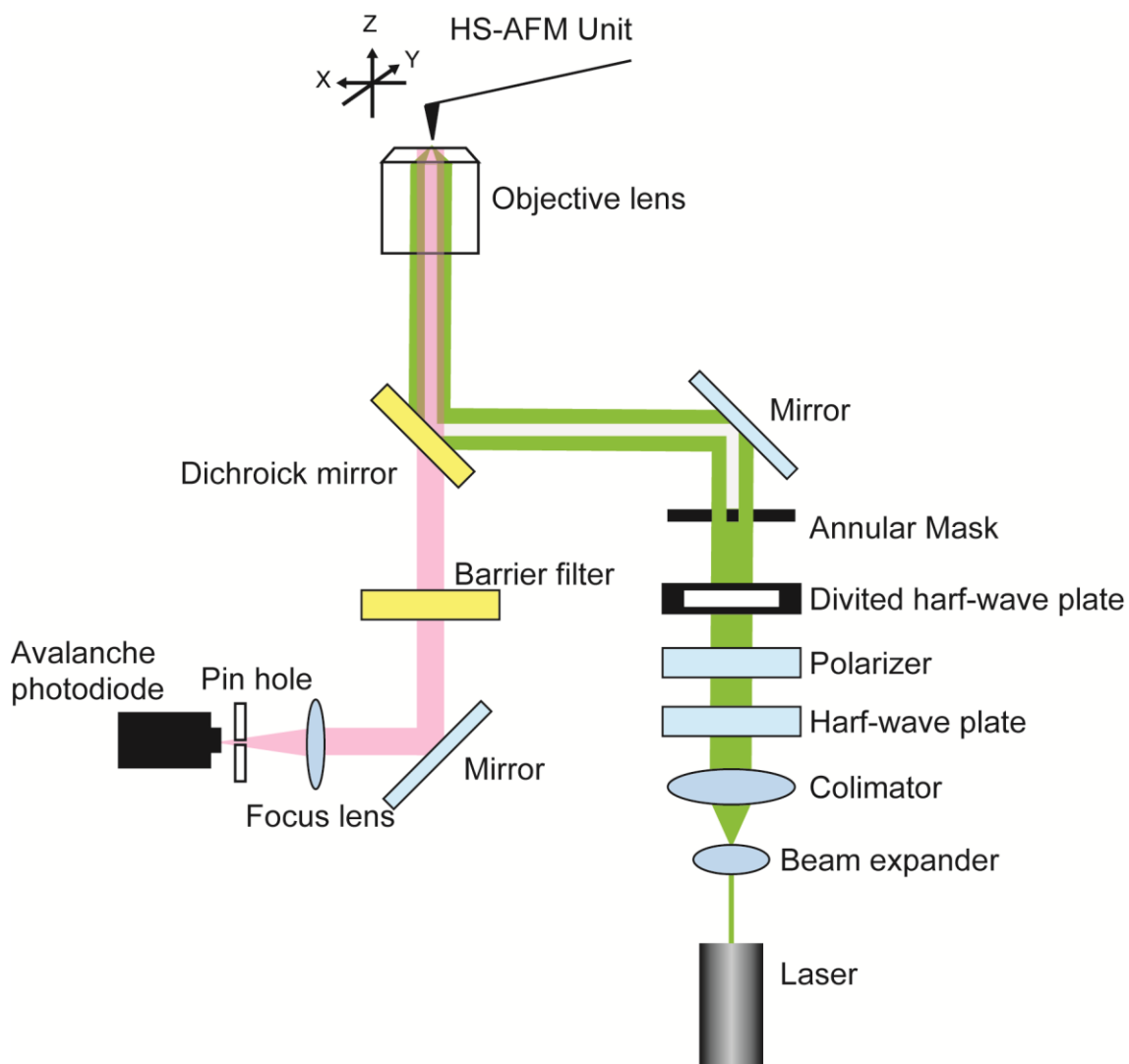


図 5-3 走査型近接場顕微鏡の模式図

レーザー光はビームエキスパンダーによって、スポット径を広げられ、分割波長板により放射状に偏光し対物レンズ焦点面で進行方向に偏光させられる。マスクによって対物レンズの高 NA 部分にのみレーザー光が入射する。試料から発せられる蛍光は、ダイクロイックミラーとバリアフィルターを透過し、顕微鏡筐体内にある集光レンズによってアバランシェフォトダイオードへ集光される。

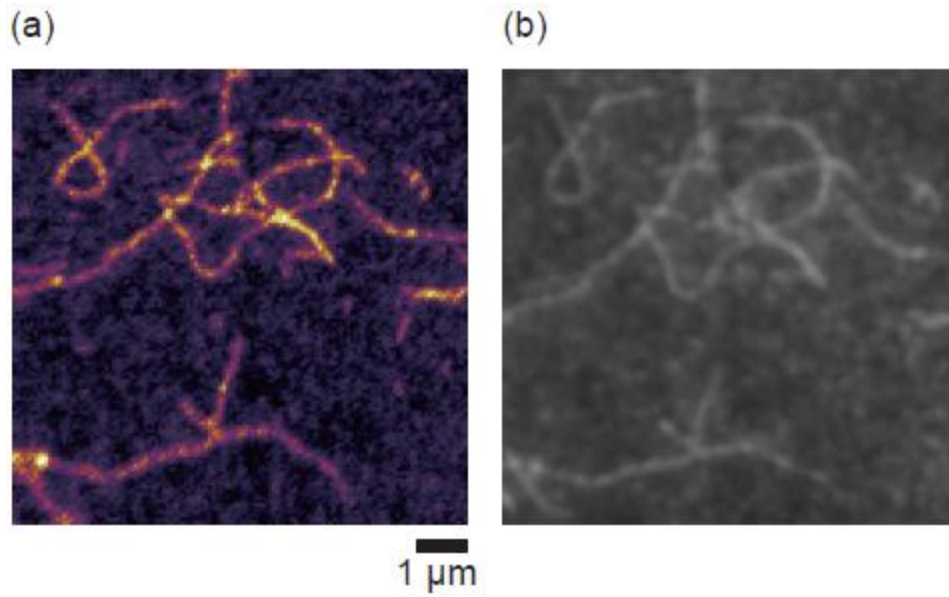


図 5-4 アバランシェフォトダイオードを使った光学イメージング

基板に固定したローダミン染色アクチンフィラメントを観察した。(a) アバランシェフォトダイオードを用いて構築した蛍光像。ステージを XY 方向に走査して、各位置での蛍光を計測し画像化した。1 ピクセルあたりの計測時間は 1.5 msec でレーザー光は画像に対して縦方向に偏光している。(b) CCD カメラを使って全反射照明で撮影した蛍光像。

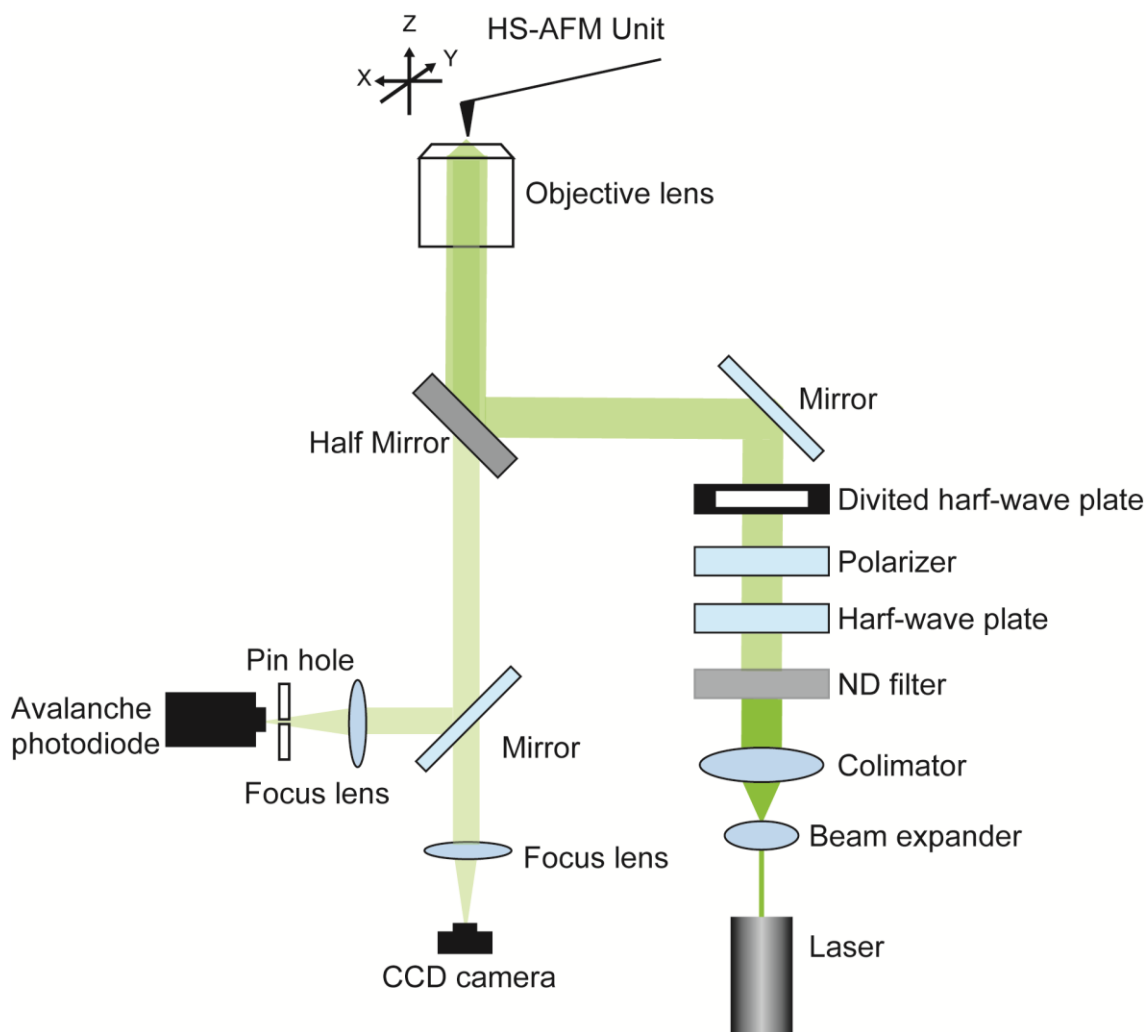


図 5-5 レーザースポットヘプローブの位置を合わせるときの光学系

レーザー光はビームエキスパンダーによってスポット径を広げられ、分割波長板により放射状に偏光し、対物レンズ焦点面で進行方向に偏光させられる。レーザーパワーは ND フィルターによって 100 分の 1 に弱められる。顕微鏡筐体内のミラーの位置を替えることで CCD カメラとアバランシェフォトダイオードを切り替えることができる。基板上的レーザースポットは CCD カメラによって観察することが出来る。プローブから発せられる散乱光はハーフミラーを透過し、顕微鏡筐体内の集光レンズによってアバランシェフォトダイオードに集光される。

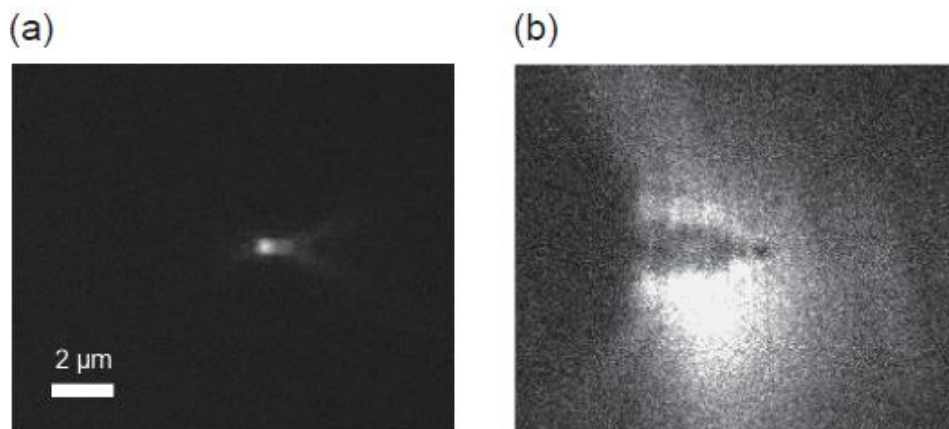


図 5-6 レーザスポットへカンチレバーの位置合わせ

(a) 集光されたレーザスポットと(b) 位置合わせされたカンチレバーの光学顕微鏡像。

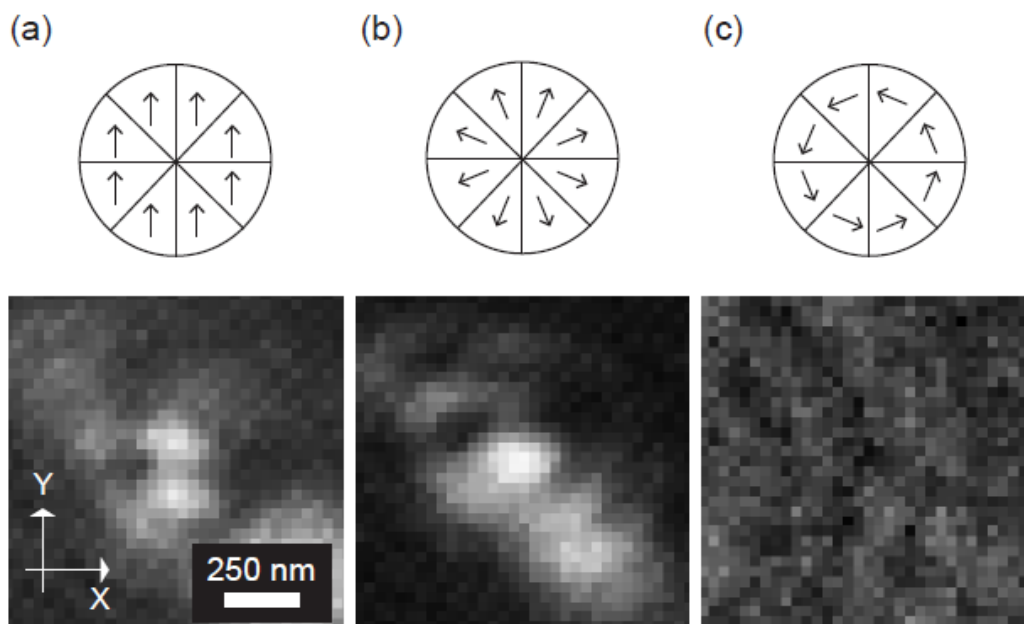


図 5-7 プローブによる電場分布を画像化

上段はレーザー光の偏光方向、下段は散乱光分布像を示す。1ピクセルあたりの計測時間は2.4 msecで銀コートプローブ(2分間コーティング)を使用した。各画像におけるレーザー光の偏光方向はそれぞれ、(a) Y方向に偏光、(b) 放射状に偏光、(c) アジマス偏光である。

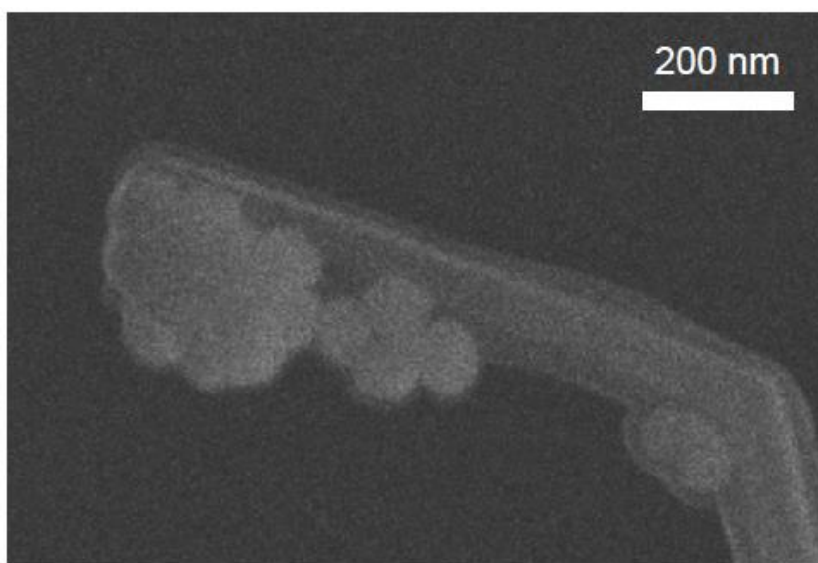


図 5-8 マルチコロイドプローブの電子顕微鏡像

複数の金コロイドをカンチレバーに取り付けた。基板と金コロイドの距離を近くするためにカンチレバーにプローブを作製しなかった。

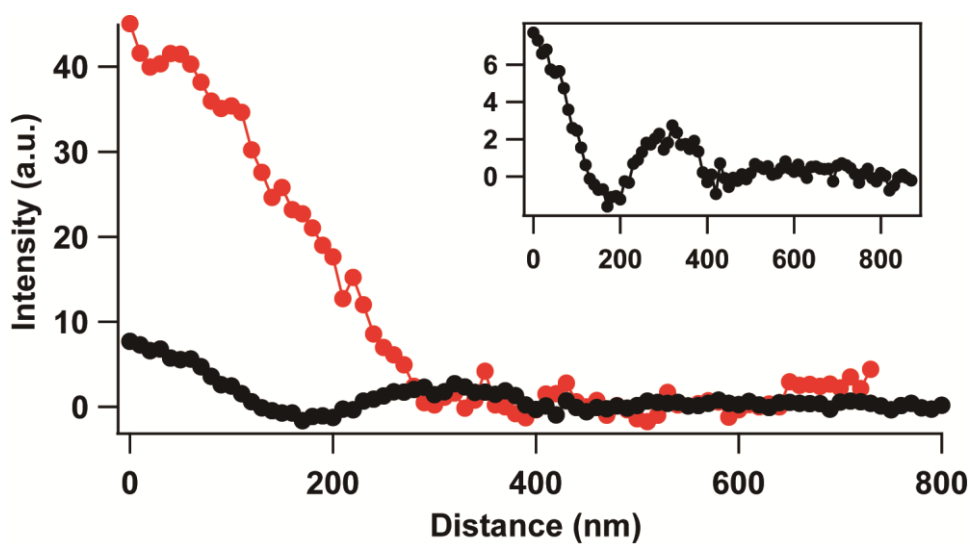


図 5-9 マルチコロイドプローブから発せられる散乱光を計測。

赤線はマルチコロイドプローブ、黒線は金コロイドを1つ取り付けたプローブによる散乱光の距離依存性を示す。挿入図は金コロイドを1つ取り付けたプローブの散乱光の拡大図を示す。各位置での計測時間は100 msecで、距離は基板からの位置を表している。

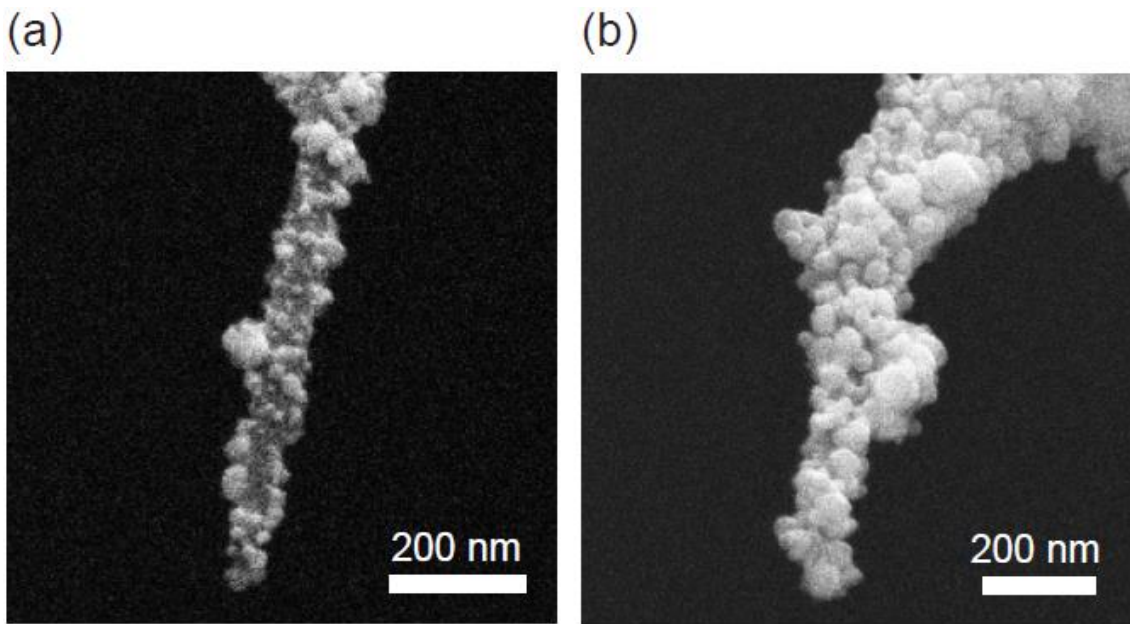


図 5-10 銀粒子還元法を用いて作成したプローブの電子顕微鏡像

(a) 3 分間、(b) 5 分間レーザー光を照射してプローブに銀粒子を付着させた。照射時間を長くするほど多くの銀粒子がプローブに付着した。緑色レーザーの強度は 5 mW/cm^2 であった。

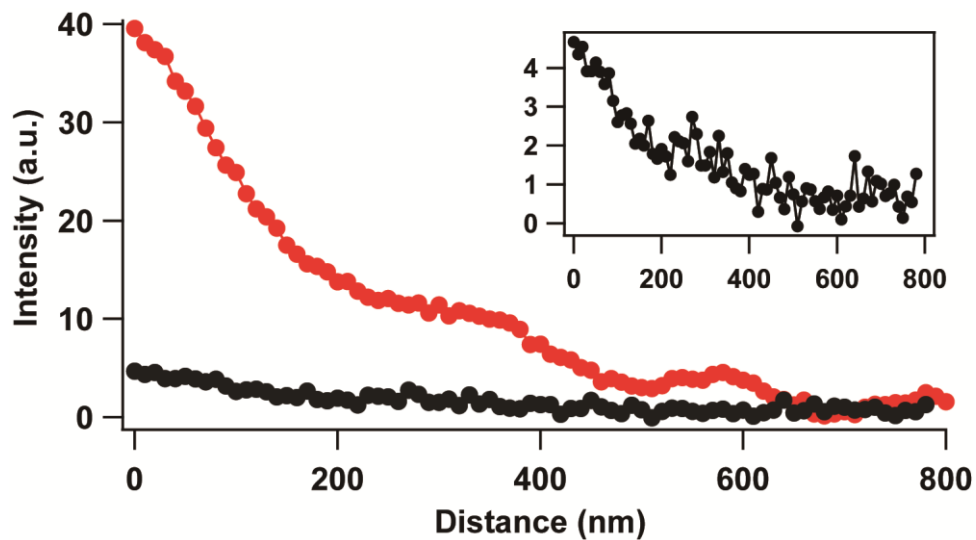


図 5-11 銀粒子プローブから発せられる散乱光を計測。

赤線は銀粒子還元法を用いたプローブ、黒線は銀コートプローブ(2分コーティング)による散乱光の距離依存性を示す。挿入図は、銀コートプローブの散乱光の拡大図を示す。各位置での計測時間は 100 msec で、距離は基板からの位置を表している。

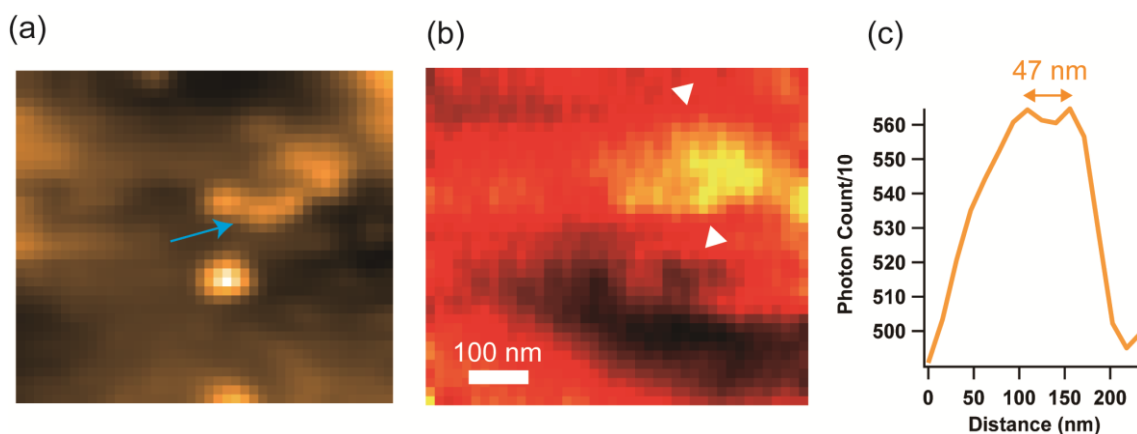


図 5-12 マルチコアプローブを用いた高速 AFM / 超解像光学顕微鏡同時観察

同時取得した(a) AFM 像、(b) 光学像と(c) 白矢印で示したクロスセクション。1 画像 19 sec で取得した。4×4 ピクセルガウシアンフィルターを適応しノイズ除去を行った。47 nm 離れたビーズを解像することが出来た。

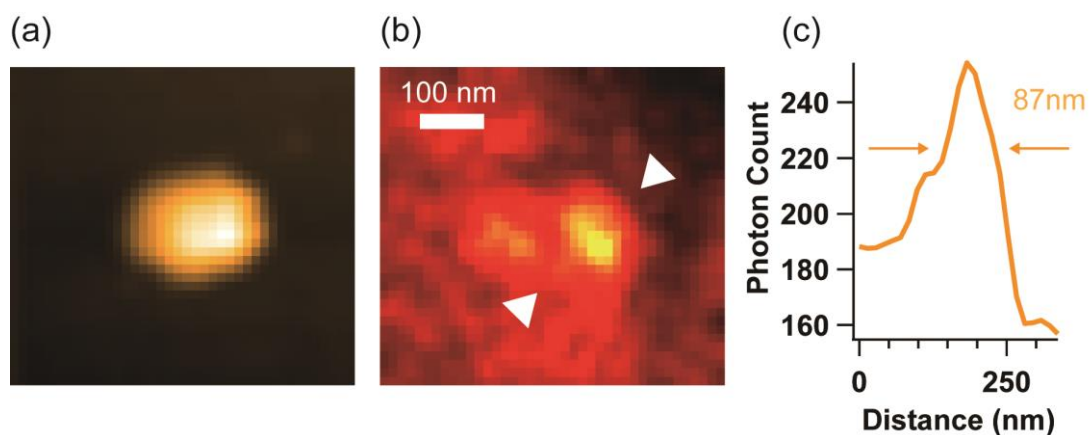


図 5-13 銀粒子プローブを用いた高速 AFM / 超解像光学顕微鏡同時観察

同時取得した(a) AFM 像、(b) 光学像と(c) 白矢印で示したクロスセクション。1 画像 3.5 sec で取得した。4×4 ピクセルガウシアンフィルターを適応しノイズ除去を行った。光学像から得られた半値幅は、87 nm であった。

5.4 まとめ

光学顕微鏡と高速 AFM では空間分解能に大きな隔りがある。そのため、高速 AFM で高い空間分解能でタンパク質を観察することができてもそれに伴う光学像の分解能が低い
ため、光学顕微鏡から得られた情報を有効に AFM 像に反映させることが難しかった。

そこで本研究では、光の回折限界を大きく上回る空間分解能を有する走査型近接場光顕
微鏡とプローブ走査型高速 AFM を組み合わせた複合顕微鏡の開発を行いこの問題の解決
に取り組んだ。分子の電子移動反応による還元作用を用いてプローブに銀粒子を付着させ、
プローブ先端に大きな電場を発生させることに成功した。開発した高速 AFM / 超解像光学
顕微鏡複合機を用いて、蛍光ビーズを観察した結果、時間分解能 3.5 秒で通常の光学顕微
鏡の空間分解能を大きく上回る 87 nm の分解能を達成することができた。この時間分解能
は報告されているスピードと比べて 100 倍以上速いスピードである。サブ 100 ミリ秒時間
分解能での一分子蛍光の超解像イメージングを行うことはできなかったが、本研究で用い
た光還元銀粒子接着法は蛍光を増強するのに有効であるし、銀粒子先端に短い針を立てる
などのひと工夫で AFM、光学像共に大きな時空間分解能の向上が期待される。

第6章 総括

一分子生理学の誕生以来、様々な顕微鏡法や一分子の補足技術が開発されてきた。タンパク質 1 分子を可視化、制御する新技術の開発によってアンサンブル平均では得ることのできない生体分子の様々な機能や働きが明らかになってきた。さらに詳細な作動機構を理解するためには、新規測定技術の開発が不可欠である。

そこで本研究では、既存の高速 AFM の機能を飛躍的に拡張する高速 AFM/光学顕微鏡複合機および、それを用いた測定手法の開発に取り組んだ。その結果、光学顕微鏡の機能を最大限に活用できる高速 AFM/光学顕微鏡複合装置が完成し、タンパク質の構造変化と同時に蛍光色素一分子を捉えることができるようになった。また、超解像光学顕微鏡と高速 AFM を組み合わせ、高い時空間分解能を有するトポグラフィック/光学イメージングの可能性を見出すことができた。今後、本研究で開発した装置、手法が生体分子の機能や働きの解明に寄与することを私は願ってやまない。

謝辞

本研究を行うにあたり、適切にご指導を下さいました金沢大学理工研究域の安藤敏夫教授、内橋貴之教授、古寺哲幸准教授、渡辺信嗣博士に心より感謝いたします。本研究を行うにあたり、適切な助言と多くの知識を与えていただいた金沢大学理工研究域の紺野宏記准教授、中山隆宏博士、自然科学研究機構岡崎統合バイオセンターの飯野亮太教授に心より感謝いたします。物品発注など様々な事務手続きで大変お世話になりました、金沢大学数物科学類秘書の森廣美さん、生物物理学研究室秘書の松本文さんに感謝いたします。また、研究に関する様々なことに協力していただいた金沢大学生物物理研究室の皆様にも感謝いたします。

最後に、大学院まで教育を受けさせて頂き、ご支援・ご協力してくださいました両親に心から感謝いたします。

参考文献

- [1] T. Ando, N. Kodera, D. Maruyama, E. Takai, K. Saito, A. Toda, A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: (2002) 12468-12472. doi:10.1073/pnas.211400898.
- [2] N. Kodera, H. Yamashita, T. Ando, Active damping of the scanner for high-speed atomic force microscopy, *Rev. Sci. Instrum.* 76 (2005) 1–5. doi:10.1063/1.1903123.
- [3] N. Kodera, M. Sakashita, T. Ando, Dynamic proportional-integral-differential controller for high-speed atomic force microscopy Dynamic proportional-integral-differential controller for high-speed atomic force microscopy, 083704 (2006) 1–7. doi:10.1063/1.2336113.
- [4] H. Yamashita, N. Kodera, A. Miyagi, T. Uchihashi, D. Yamamoto, T. Ando, Tip-sample distance control using photothermal actuation of a small cantilever for high-speed atomic force microscopy, *Rev. Sci. Instrum.* 78 (2007). doi:10.1063/1.2766825.
- [5] T. Ando, T. Uchihashi, T. Fukuma, High-speed atomic force microscopy for nano-visualization of dynamic biomolecular processes, *Prog. Surf. Sci.* 83 (2008) 337–437. doi:10.1016/j.progsurf.2008.09.001.
- [6] N. Kodera, D. Yamamoto, R. Ishikawa, T. Ando, Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy., *Nature.* 468 (2010) 72–76. doi:10.1038/nature09450.
- [7] M. Shibata, H. Yamashita, T. Uchihashi, H. Kandori, T. Ando, High-speed atomic force microscopy shows dynamic molecular processes in photoactivated bacteriorhodopsin., *Nat. Nanotechnol.* 5 (2010) 208–212. doi:10.1038/nnano.2010.7.
- [8] T. Uchihashi, R. Iino, T. Ando, H. Noji, High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F₁-ATPase., *Science.* 333 (2011) 755–758. doi:10.1126/science.1205510.
- [9] K. Igarashi, T. Uchihashi, A. Koivula, M. Wada, S. Kimura, T. Okamoto, et al., Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface., *Science.* 333 (2011) 1279–1282. doi:10.1126/science.1208386.
- [10] T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, T. Yanagida, Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution., *Nature.* 374 (1995) 555–559. doi:10.1038/374555a0.

- [11] T. Sakamoto, M.R. Webb, E. Forgacs, H.D. White, J.R. Sellers, Direct observation of the mechanochemical coupling in myosin Va during processive movement., *Nature*. 455 (2008) 128–132. doi:10.1038/nature07188.
- [12] K. Adachi, K. Oiwa, M. Yoshida, T. Nishizaka, K. Kinoshita, Controlled rotation of the F1-ATPase reveals differential and continuous binding changes for ATP synthesis, *Nat. Commun.* 3 (2012) 1022. doi:10.1038/ncomms2026.
- [13] T. Nishizaka, K. Oiwa, H. Noji, S. Kimura, E. Muneyuki, M. Yoshida, et al., Chemomechanical coupling in F1-ATPase revealed by simultaneous observation of nucleotide kinetics and rotation., *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 (2004) 142–148. doi:10.1038/nsmb721.
- [14] K.O. Van Der Werf, C. J. Putman, B.G. De Groot, F.B. Segerink, E.H. Schipper, N.F. Van Hulst, et al., Compact stand-alone atomic force microscope, *Rev. Sci. Instrum.* 64 (1993) 2892–2897. doi:10.1063/1.1144378.
- [15] C.A.J. Putman, H.G. Hansma, H.E. Gaub, P.K. Hansma, Polymerized Lb Films Imaged with a Combined Atomic Force Microscope Fluorescence Microscope, *Langmuir*. 8 (1992) 3014–3019.
- [16] S. Nishida, Y. Funabashi, A. Ikai, Combination of AFM with an objective-type total internal reflection fluorescence microscope (TIRFM) for nanomanipulation of single cells, *Ultramicroscopy*. 91 (2002) 269–274. doi:10.1016/S0304-3991(02)00108-0.
- [17] A B. Mathur, G. a Truskey, W.M. Reichert, Atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for the study of force transmission in endothelial cells., *Biophys. J.* 78 (2000) 1725–1735. doi:10.1016/S0006-3495(00)76724-5.
- [18] R. Kassies, K.O. Van Der Werf, a. Lenferink, C.N. Hunter, J.D. Olsen, V. Subramaniam, et al., Combined AFM and confocal fluorescence microscope for applications in bio-nanotechnology, *J. Microsc.* 217 (2005) 109–116. doi:10.1111/j.0022-2720.2005.01428.x.
- [19] H. Gump, S.W. Stahl, M. Strackharn, E.M. Puchner, H.E. Gaub, Ultrastable combined atomic force and total internal fluorescence microscope, *Rev. Sci. Instrum.* 80 (2009) 12–15. doi:10.1063/1.3148224.
- [20] H. Nakajima, Y. Kunioka, K. Nakano, K. Shimizu, M. Seto, T. Ando, Scanning force microscopy of the interaction events between a single molecule of heavy meromyosin and actin., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234 (1997) 178–182. doi:10.1006/bbrc.1997.6612.

- [21] Y. Suzuki, N. Sakai, A. Yoshida, Y. Uekusa, A. Yagi, Y. Imaoka, et al., High-speed atomic force microscopy combined with inverted optical microscopy for studying cellular events., *Sci. Rep.* 3 (2013) 2131. doi:10.1038/srep02131.
- [22] A. Colom, I. Casuso, F. Rico, S. Scheuring, A hybrid high-speed atomic force-optical microscope for visualizing single membrane proteins on eukaryotic cells., *Nat. Commun.* 4 (2013) 2155. doi:10.1038/ncomms3155.
- [23] S. Fukuda, T. Uchihashi, R. Iino, Y. Okazaki, M. Yoshida, K. Igarashi, et al., High-speed atomic force microscope combined with single-molecule fluorescence microscope, *Rev. Sci. Instrum.* 84 (2013). doi:10.1063/1.4813280.
- [24] S. Fukuda, T. Uchihashi, T. Ando, Method of mechanical holding of cantilever chip for tip-scan high-speed atomic force microscope, *Rev. Sci. Instrum.* 86 (2015) 063703. doi:10.1063/1.4922381.
- [25] S. Fukuda, T. Uchihashi, R. Iino T. Ando, Single-molecular collration high-speed atomic force/ fluorescence microscope imaging, *Ultramicroscopy in preparation.*
- [26] T. Ando, T. Uchihashi, S. Scheuring, Filming biomolecular processes by high-speed atomic force microscopy, *Chem. Rev.* 114 (2014) 3120–3188. doi:10.1021/cr4003837.
- [27] H. Watanabe, T. Uchihashi, T. Kobashi, M. Shibata, J. Nishiyama, R. Yasuda, et al., Wide-area scanner for high-speed atomic force microscopy, *Rev. Sci. Instrum.* 84 (2013). doi:10.1063/1.4803449.
- [28] A.P. Nievergelt, B.W. Erickson, N. Hosseini, J.D. Adams, G.E. Fantner, Studying biological membranes with extended range high-speed atomic force microscopy, *Sci. Rep.* 5 (2015) 11987. doi:10.1038/srep11987.
- [29] K. Oiwa, J.F. Eccleston, M. Anson, M. Kikumoto, C.T. Davis, G.P. Reid, et al., Comparative single-molecule and ensemble myosin enzymology: sulfoindocyanine ATP and ADP derivatives., *Biophys. J.* 78 (2000) 3048–3071. doi:10.1016/S0006-3495(00)76843-3.
- [30] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward, D.C. Prasher, Green fluorescent protein as a marker for gene expression, *Science* (80-.). 263 (1994) 802–805. doi:10.1126/science.8303295.
- [31] T. Uchihashi, N. Kodera, T. Ando, Guide to video recording of structure dynamics and dynamic processes of proteins by high-speed atomic force microscopy, *Nat. Protoc.* 7 (2012) 1193–1206. doi:10.1038/nprot.2012.047.
- [32] T. Fukuma, M. Kimura, K. Kobayashi, K. Matsushige, H. Yamada, Development of

- low noise cantilever deflection sensor for multienvironment frequency-modulation atomic force microscopy, *Rev. Sci. Instrum.* 76 (2005). doi:10.1063/1.1896938.
- [33] G. Schitter, A. Stemmer, Identification and open-loop tracking control of a piezoelectric tube scanner for high-speed scanning-probe microscopy, *IEEE Trans. Control Syst. Technol.* 12 (2004) 449–454. doi:10.1109/TCST.2004.824290.
- [34] R.E. Cheney, M.K. O’Shea, J.E. Heuser, M. V Coelho, J.S. Wolenski, E.M. Espreafico, et al., Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity., *Cell.* 75 (1993) 13–23. doi:10.1016/S0092-8674(05)80080-7.
- [35] T. Ando, H. Asai, Cooperative conformational change in F-actin filament induced by the binding of heavy meromyosin., *J. Biochem.* 79 (1976) 1043–1047.
- [36] J.A. Spudich, S. Watt, The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin., *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 4866–4871.
- [37] J.R. Sellers, C. Veigel, Walking with myosin V, *Curr. Opin. Cell Biol.* 18 (2006) 68–73. doi:10.1016/j.ceb.2005.12.014.
- [38] T. Sakamoto, I. Amitani, E. Yokota, T. Ando, Direct Observation of Processive Movement by Individual Myosin V Molecules, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272 (2000) 586–590. doi:10.1006/bbrc.2000.2819.
- [39] M. Tokunaga, K. Kitamura, K. Saito, H. Iwane, T. Yanagida, Single molecule imaging of fluorophores and enzymatic reactions achieved by objective-type total internal reflection fluorescence microscopy., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235 (1997) 47–53. doi:10.1006/bbrc.1997.6732.
- [40] X.S. Xie, J.K. Trautman, Optical studies of single molecules at room temperature., *Annu. Rev. Phys. Chem.* 49 (1998) 441–480. doi:10.1146/annurev.physchem.49.1.441.
- [41] Y. Harada, K. Sakurada, T. Aoki, D.D. Thomas, T. Yanagida, Mechanochemical coupling in actomyosin energy transduction studied by in vitro movement assay., *J. Mol. Biol.* 216 (1990) 49–68. doi:10.1016/S0022-2836(05)80060-9.
- [42] K. Noi, D. Yamamoto, S. Nishikori, K.I. Arita-Morioka, T. Kato, T. Ando, et al., High-speed atomic force microscopic observation of ATP-dependent rotation of the AAA+ chaperone p97, *Structure.* 21 (2013) 1992–2002. doi:10.1016/j.str.2013.08.017.
- [43] Y. Suzuki, M. Endo, Y. Katsuda, K. Ou, K. Hidaka, H. Sugiyama, DNA origami based visualization system for studying site-specific recombination events, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 211–218. doi:10.1021/ja408656y.

- [44] I. Casuso, J. Khao, M. Chami, P. Paul-Gilloteaux, M. Husain, J.-P. Duneau, et al., Characterization of the motion of membrane proteins using high-speed atomic force microscopy, *Nat. Nanotechnol.* 7 (2012) 525–529. doi:10.1038/nnano.2012.109.
- [45] A. Rajendran, M. Endo, H. Sugiyama, State-of-the-art high-speed atomic force microscopy for investigation of single-molecular dynamics of proteins, *Chem. Rev.* 114 (2014) 1493–1520. doi:10.1021/cr300253x.
- [46] A.J. Katan, C. Dekker, High-speed AFM reveals the dynamics of single biomolecules at the nanometer scale, *Cell.* 147 (2011) 979–982. doi:10.1016/j.cell.2011.11.017.
- [47] K. Oiwa, D.M. Jameson, J.C. Croney, C.T. Davis, J.F. Eccleston, M. Anson, The 2'-O- and 3'-O-Cy3-EDA-ATP(ADP) complexes with myosin subfragment-1 are spectroscopically distinct., *Biophys. J.* 84 (2003) 634–642. doi:10.1016/S0006-3495(03)74883-8.
- [48] L. Schermelleh, R. Heintzmann, H. Leonhardt, A guide to super-resolution fluorescence microscopy, *J. Cell Biol.* 190 (2010) 165–175. doi:10.1083/jcb.201002018.
- [49] K.C. Neuman, S.M. Block, Optical trapping., *Rev. Sci. Instrum.* 75 (2004) 2787–2809. doi:10.1063/1.1785844.
- [50] J.R. Moffitt, Y.R. Chemla, S.B. Smith, C. Bustamante, Recent advances in optical tweezers., *Annu. Rev. Biochem.* 77 (2008) 205–228. doi:10.1146/annurev.biochem.77.043007.090225.
- [51] K. Miyata, S. Usho, S. Yamada, S. Furuya, K. Yoshida, H. Asakawa, et al., Separate-type scanner and wideband high-voltage amplifier for atomic-resolution and high-speed atomic force microscopy, *Rev. Sci. Instrum.* 84 (2013). doi:10.1063/1.4802262.
- [52] H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, K. Kinosita, Direct observation of the rotation of F1-ATPase., *Nature.* 386 (1997) 299–302. doi:10.1038/386299a0.
- [53] T. Fukuma, Y. Okazaki, N. Kodera, T. Uchihashi, T. Ando, High resonance frequency force microscope scanner using inertia balance support, *Appl. Phys. Lett.* 92 (2008). doi:10.1063/1.2951594.
- [54] G. Binnig, H. Rohrer, Scanning tunneling microscopy—from birth to adolescence, *Rev. Mod. Phys.* 59 (1987) 615–625. doi:10.1103/RevModPhys.59.615.
- [55] P.K. Hansma, B. Drake, S. A. C. Gould, C.B. Prater, The Scanning Ion-Conductance Microscope, 3 (1987) 3–5.
- [56] Y.E. Korchev, C.L. Bashford, M. Milovanovic, I. Vodyanoy, M.J. Lab, Scanning ion

- conductance microscopy of living cells., *Biophys. J.* 73 (1997) 653–658.
doi:10.1016/S0006-3495(97)78100-1.
- [57] L. Novotny, R. Bian, X. Xie, Theory of Nanometric Optical Tweezers, *Phys. Rev. Lett.* 79 (1997) 645–648. doi:10.1103/PhysRevLett.79.645.
- [58] L. Novotny, Chapter 5 The history of near-field optics, *Prog. Opt.* 50 (2008) 137–184.
doi:10.1016/S0079-6638(07)50005-3.
- [59] N. Mauser, A. Hartschuh, Tip-enhanced near-field optical microscopy., *Chem. Soc. Rev.* 43 (2014) 1248–62. doi:10.1039/c3cs60258c.
- [60] B. Pettinger, P. Schambach, C.J. Villagómez, N. Scott, Tip-Enhanced Raman Spectroscopy: Near-Fields Acting on a Few Molecules, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 63 (2012) 379–399. doi:10.1146/annurev-physchem-032511-143807.
- [61] P. Anger, P. Bharadwaj, L. Novotny, Enhancement and quenching of single-molecule fluorescence, *Phys. Rev. Lett.* 96 (2006) 3–6. doi:10.1103/PhysRevLett.96.113002.
- [62] Z. Ma, J.M. Gerton, L. A. Wade, S.R. Quake, Fluorescence near-field microscopy of DNA at Sub-10A nm resolution, *Phys. Rev. Lett.* 97 (2006) 1–4.
doi:10.1103/PhysRevLett.97.260801.
- [63] T.W. Johnson, Z.J. Lapin, R. Beams, N.C. Lindquist, S.G. Rodrigo, L. Novotny, et al., Highly reproducible near-field optical imaging with sub-20-nm resolution based on template-stripped gold pyramids, *ACS Nano.* 6 (2012) 9168–9174.
doi:10.1021/nn303496g.
- [64] J.M. Gerton, L. a. Wade, G. A. Lessard, Z. Ma, S.R. Quake, Tip-enhanced fluorescence microscopy at 10 nanometer resolution, *Phys. Rev. Lett.* 93 (2004) 5–8.
doi:10.1103/PhysRevLett.93.180801.
- [65] N. Hayazawa, Y. Inouye, Z. Sekkat, S. Kawata, Metallized tip amplification of near-field Raman scattering, *Opt. Commun.* 183 (2000) 333–336.
doi:10.1016/S0030-4018(00)00894-4.
- [66] H. Ueno, S. Nishikawa, R. Iino, K. V. Tabata, S. Sakakihara, T. Yanagida, et al., Simple dark-field microscopy with nanometer spatial precision and microsecond temporal resolution, *Biophys. J.* 98 (2010) 2014–2023. doi:10.1016/j.bpj.2010.01.011.
- [67] P.K. Jain, K.S. Lee, I.H. El-Sayed, M. A. El-Sayed, Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine, *J. Phys. Chem. B.* 110 (2006) 7238–7248. doi:10.1021/jp057170o.

- [68] M.K. Cheezum, W.F. Walker, W.H. Guilford, Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles., *Biophys. J.* 81 (2001) 2378–2388. doi:10.1016/S0006-3495(01)75884-5.
- [69] H. Taguchi, Chaperonin GroEL meets the substrate protein as a “load” of the rings, *J. Biochem.* 137 (2005) 543–549. doi:10.1093/jb/mvi069.
- [70] M. Yokokawa, C. Wada, T. Ando, N. Sakai, A. Yagi, S.H. Yoshimura, et al., Fast-scanning atomic force microscopy reveals the ATP/ADP-dependent conformational changes of GroEL., *EMBO J.* 25 (2006) 4567–4576. doi:10.1038/sj.emboj.7601326.
- [71] H. Taguchi, T. Ueno, H. Tadakuma, M. Yoshida, T. Funatsu, Single-molecule observation of protein-protein interactions in the chaperonin system., *Nat. Biotechnol.* 19 (2001) 861–865. doi:10.1038/nbt0901-861.
- [72] M.N.. Ravi Kumar, A review of chitin and chitosan applications, *React. Funct. Polym.* 46 (2000) 1–27. doi:10.1016/S1381-5148(00)00038-9.
- [73] C. Divne, J. Ståhlberg, T. Reinikainen, L. Ruohonen, J.K.C. Knowles, T.T. Teeri, et al., It exhibits the strongest synergy with other Crystal Structure The Three-Dimensional of the Catalytic Core of Cellobiohydrolase from *Trichoderma reesei*, *Science* (80-.). 25 (1994) 524–528.
- [74] K. Igarashi, A. Koivula, M. Wada, S. Kimura, M. Penttila, M. Samejima, High Speed Atomic Force Microscopy Visualizes Processive Movement of *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolase I on Crystalline Cellulose, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 36186–36190. doi:10.1074/jbc.M109.034611.
- [75] Y. Shibafuji, A. Nakamura, T. Uchihashi, N. Sugimoto, S. Fukuda, H. Watanabe, et al., Single-molecule imaging analysis of elementary reaction steps of *trichoderma reesei* cellobiohydrolase i (Cel7A) hydrolyzing crystalline cellulose I_a and III_I, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 14056–14065. doi:10.1074/jbc.M113.546085.
- [76] T.J. Yang, G. a Lessard, S.R. Quake, An apertureless near-field microscope for fluorescence imaging, *Appl. Phys. Lett.* 76 (2000) 378–380. doi:10.1063/1.125759.
- [77] N. Hayazawa, T.A. Yano, S. Kawata, Highly reproducible tip-enhanced Raman scattering using an oxidized and metallized silicon cantilever tip as a tool for everyone, *J. Raman Spectrosc.* 43 (2012) 1177–1182. doi:10.1002/jrs.4032.
- [78] A. Taguchi, N. Hayazawa, Y. Saito, H. Ishitobi, A. Tarun, S. Kawata, Controlling the plasmon resonance wavelength in metal-coated probe using refractive index

- modification., *Opt. Express*. 17 (2009) 6509–6518. doi:10.1364/OE.17.006509.
- [79] I. Maouli, A. Taguchi, Y. Saito, S. Kawata, P. Verma, Optical antennas for tunable enhancement in tip-enhanced Raman spectroscopy imaging, *Opt. Express*. 18 (2010) 6–9.
- [80] N. Hayazawa, Y. Saito, S. Kawata, Detection and characterization of longitudinal field for tip-enhanced Raman spectroscopy, *Appl. Phys. Lett.* 85 (2004) 6239–6241. doi:10.1063/1.1839646.
- [81] A. Yildiz, J.N. Forkey, S.A. McKinney, T. Ha, Y.E. Goldman, P.R. Selvin, Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization., *Science*. 300 (2003) 2061–2065. doi:10.1126/science.1084398.
- [82] K. Adachi, K. Oiwa, T. Nishizaka, S. Furuike, H. Noji, H. Itoh, et al., Coupling of Rotation and Catalysis in F1-ATPase Revealed by Single-Molecule Imaging and Manipulation, *Cell*. 130 (2007) 309–321. doi:10.1016/j.cell.2007.05.020.
- [83] S. Kawata, Plasmonics for nanoimaging and nanospectroscopy, *Appl. Spectrosc.* 67 (2013) 117–125. doi:10.1366/12-06861.
- [84] P. Verma, T. Ichimura, T.A. Yano, Y. Saito, S. Kawata, Nano-imaging through tip-enhanced Raman spectroscopy: Stepping beyond the classical limits, *Laser Photonics Rev.* 4 (2010) 548–561. doi:10.1002/lpor.200910039.
- [85] E. Betzig, J.K. Trautman, Near-Field Optics: Microscopy, Spectroscopy, and Surface Modification Beyond the Diffraction Limit, *Science*. (80-.). 257 (1992) 189–195.
- [86] Y. Inouye, S. Kawata, Near-field scanning optical microscope with a metallic probe tip., *Opt. Lett.* 19 (1994) 159. doi:10.1364/OL.19.000159.
- [87] N. Hayazawa, Y. Inouye, S. Kawata, Evanescent field excitation and measurement of dye fluorescence in a metallic probe near-field scanning optical microscope, *Opt. Lett.* 24 (1999) 472–476.
- [88] C. Höppener, Z.J. Lapin, P. Bharadwaj, L. Novotny, Self-Similar Gold-Nanoparticle Antennas for a Cascaded Enhancement of the Optical Field, *Phys. Rev. Lett.* 109 (2012) 017402. doi:10.1103/PhysRevLett.109.017402.
- [89] L. Balan, J.-P. Malval, R. Schneider, D. Le Nouen, D.-J. Lougnot, In-situ fabrication of polyacrylate–silver nanocomposite through photoinduced tandem reactions involving eosin dye, *Polymer (Guildf)*. 51 (2010) 1363–1369. doi:10.1016/j.polymer.2009.05.003.
- [90] T. Umakoshi, T. Yano, Y. Saito, P. Verma, Fabrication of Near-Field Plasmonic Tip by Photoreduction for Strong Enhancement in Tip-Enhanced Raman Spectroscopy,

Appl. Phys. Express. 5 (2012) 052001. doi:10.1143/APEX.5.052001.