

走査型プローブ顕微鏡による 生体と食品のナノレベル計測

1. はじめに

生体は、ナノメートルサイズの様々な分子、タンパク質、DNA、脂質、糖鎖およびそれらの複合体から形作られている。生体組織の構造は、それらがもつ機能と密接に結びついており、ナノレベルの構造計測は、様々な生命現象を解明していくための有効な手段となっている。一方、食品分野ではナノレベルの構造解析は端緒についたばかりである。食品素材の微細構造は食感や食味において重要な役割を持つはずであるが、食品素材のナノレベル構造が計測された例はまだわずかであり、それぞれの食品の性質や機能性と微細構造の関係については不明な点が多く残っている。今後、食品の性質や微細構造を探っていく上で、食品のナノ構造計測の必要性は高まっていくものと思われる。

従来、食品を含む生体由来試料の高分解能構造解析装置としては、まず走査型電子顕微鏡 (SEM, Scanning electron microscope) や透過型電子顕微鏡 (TEM, transmission electron microscope) が用いられてきた。しかしながら、電子顕微鏡の場合、観察は真空中で行われ、さらに重金属による被覆や染色も必要となる。そのため、得られる観察データは、その試料が実際に機能している「生」の状態を反映しているとは言い難い。また、タンパク質については、X線構造解析やNMRによって正確な構造を決定可能であるが、すべての場合に有効なわけではなく、多大な労力・時間と大掛かりな装置が必要といった制約がある。

このような問題をクリアする高分解能計測手段としては、原子間力顕微鏡 (AFM, atomic force microscopy) に代表される走査型プローブ顕微鏡 (SPM, scanning probe microscopy) 技術が筆頭にあげられる¹⁾。SPMは、大気中や液中で試料を「生」の状態で見測可能な新しい方法であり、最近、後述のように生体計測への応用が進みつつある。

本稿では、SPM、中でもAFMと走査型近接場光顕微鏡 (SNOMまたはNSOM, Scanning near-field optical microscope) をとりあげて、それらの計測原理の概要、及び、それらによる生体試料や食品素材の実際の計測例について紹介する。

2. 走査型プローブ顕微鏡 (SPM)

2.1 SPMの種類と特徴

上記のように、SPMは、大気中や液中において、試料の表面形状をそのままの状態で見測するまったく新しい方法であり、1980年代初頭から半ばにかけて様々なタイプが登場した。SPMは、電子顕微鏡に比べ試料の前処理や操作が容易なことから、材料科学の分野においてはナノレベルの形状や構造の計測手

法として、すでに多く使用されている。SPMは、その名の通り、鋭い探針（プローブ）で試料表面を走査し、その表面の情報（凹凸、光強度、トンネル電流、摩擦係数、他）を記録し、コンピュータ上でデータを画像に再構成するのを基本的な動作原理としている。探針で試料表面を走査する際の制御方式と取得するデータの別によって様々なタイプのSPMが考案されており、それぞれに異なった名称が付けられている。例えば、1981年に開発された最初のSPMは走査型トンネル顕微鏡（STM, Scanning tunneling microscope）で、導電体と探針間のトンネル電流を検出して探針を制御している。また、1986年に登場したAFMでは探針の先端と物体間に働く極微弱な反発力（原子間力）を検出しながら、探針で物体表面を走査している。その他、探針と物体の摩擦力を検出する摩擦力顕微鏡（FFM, Friction force microscope）、探針と物体に働く磁気力を用いる磁気力顕微鏡（MFM, Magnetic force microscope）、表面電位を使うKelvinプローブ顕微鏡（KPM, Kelvin probe microscope）など様々なSPMが考案されている。また、光の情報を得るSNOMも1984年に考案されている。表1にこれらのSPMの名称と測定項目をまとめた。表中のSPMのうち、食品素材や生体試料の計測に適するのはAFMとSNOMである。

SPMは、電子顕微鏡が通常真空中で観察するのと異なり、生体試料を大気中や液中で「生」のままナノメートルレベルの分解能で計測できることを特徴としている。そのため、開発当初より生体試料への応用が期待されていたが、初期のSPMのハードウェアが、材料分野の計測のみを考慮して設計されていたことや生体試料の前処理方法も不明な点が多かったことなどから、期待通りの成果がなかなか得られなかった。しかしながら、最近になって光学顕微鏡と組み合わせた機

表1 代表的な走査型プローブ顕微鏡の種類

名称	略称（英名）	主な計測項目
走査型トンネル顕微鏡	STM (Scanning tunneling microscope)	導電性物質の形状
原子間力顕微鏡	AFM (Atomic force microscope)	絶縁物質を含む物質 表面の形状
摩擦力顕微鏡	FFM (Friction force microscope)	摩擦力の分布
マイクロ粘弾性顕微鏡	VEM (Visco-elasticity microscope)	粘弾力の分布
磁気力顕微鏡	MFM (Magnetic force microscope)	表面近傍磁場の分布
Kelvinプローブ顕微鏡	KFM (Kelvin force microscope)	表面電位の分布
走査型熱顕微鏡	SThM (Scanning thermal microscope)	温度分布
走査型近接場光学原子間力顕微鏡	SNOM (Scanning near-field optical microscope)	蛍光強度、偏光等

種や操作がさらに簡易になった機種が登場したこと、探針の制御法が大きく改善されことなどから、生体試料観察の成功例が蓄積してきている。このような状況の変化の下、SPMは、その特性と相まって今後の食品素材や生体試料の高分解能構造計測における重要な手法の一つになるものと期待されている。

2.2 AFM

AFMは、最も広く使用されているSPMであり、鋭い探針で物体表面の近傍をなぞり、その凹凸を記録し、コンピュータ上で凹凸のデータを画像に再構成するのが基本的な動作原理である。探針は半導体製造技術で作られた高さ $10\mu\text{m}$ 程度、先端径が 20nm 以下の特殊なものを使用する。現在のところ、実用的な最高の分解能は、大気中で高さ方向 0.1nm （1）程度、平面方向 0.5nm 程度、溶液中ではその十倍程度である。基本的にAFMは、物体表面の凹凸を測定しているが、凹凸の測定と同時に物体表面の弾性や粘性の分布を測定したり、微小な力を計測することも可能で、さまざまな応用が考えられている。装置本体の大きさはデスクトップ型のパソコン程度で、除振台や制御装置も含めても小型実験台ほどのスペースがあれば設置可能である。

2.3 SNOM

一方、SNOMは、近接場光と呼ばれる特殊な光を利用することにより、光学限界を超える分解能で、試料の光情報を計測するタイプのSPMである。近接場光は例えばナノメートルレベルの孔に可視光を当てた場合、孔の直径が光の波長に比べ小さいため、ほとんどの光は漏れないが、ごく一部、僅かにしみ出す光が存在する。この光を、近接場光と呼ぶ。通常の光（伝搬光）と異なり、空間を遠方まで伝搬することができず、速やかに減衰する。そのため、近接場光は、発生した領域のごく近傍のみに局在するため、その性質を上手く応用することにより、通常の光を利用する場合に比べてはるかに高い分解能での計測が可能になる。従来、SNOMとしては、探針を横振動させながら走査するシアーフォース型（SNOM/ShFM, Scanning near-field optical / shear force microscope）が多く使われていたが、筆者らがナノレベル計測に用いているのは、新たに開発された走査型近接場光学原子間力顕微鏡（SNOM/AFM, Scanning near-field optical / atomic force microscope）である。SNOM/AFMは、光ファイバーを探針として用いて使い、AFMと同じ原理によって制御することにより、光の情報の計測と同時に、高い分解能で凹凸の計測もできるように工夫した顕微鏡である。なお、前述の表1中に示したSNOMは広義の名称で、SNOM/AFMやSNOM/ShFMを含む一般名である。

図1にSNOM/AFMの探針と動作原理を示した。探針は光ファイバーを鋭く尖らせ、先端を曲げることでAFM用とほぼ同じように凹凸を計測できる（図1a）。この光ファイバー製の探針は「光プローブ」と呼ばれ、外側をアルミニウムなどの

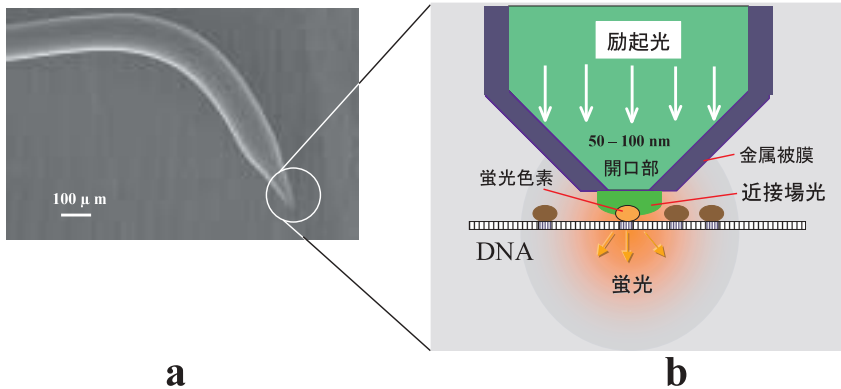


図1 走査型近接場光学原子間力顕微鏡 (SNOM/AFM) の探針と動作原理
 a. SNOM/AFMの光ファイバー製の探針 (光プローブ) の電子顕微鏡写真
 b. 光プローブ先端部分の模式図。プローブの先端には50nm程度の開口部があり、そのごく近傍に近接場光が発生し、蛍光色素を励起する。蛍光は下部に置いたレンズで集光する。

金属でコーティングされ、内部にレーザー光を通すことが可能である。光プローブの先端には50nm程度の開口があり、開口付近に発生する近接場光を使って、試料に標識した蛍光色素を励起する (図1b)。これまで、標識した蛍光色素を蛍光顕微鏡で観察可能であったが、分解能は回折限界のため数百nm以上に限られていた。しかしながらSNOM/AFMでは、50nm程度の開口を利用して、励起光をあたかもスポットライトのように絞って走査することが可能のため、分解能が飛躍的に向上し、ナノレベルの分解能で蛍光シグナルの位置を検出できる。このようにSNOM/AFMは、光の回折限界以下での蛍光標識の位置計測や分光データの取得など、多くの重要な情報を得ることができるため、従来の光学顕微鏡を超える分解能での遺伝子位置の解析計測や高精度での遺伝マーカーのマッピングなど、特にゲノム解析分野における活用が期待されている。

2.4 SPMの問題点

SPMは、様々な制御方式の探針によって液中や大気中で「生」の生体試料をナノレベルの分解能で計測できる優れた能力を持つ。しかし、その一方で探針を使用するが故の問題点もある。それは、探針自体の形状によって得られる画像が大きく異なるという点である。AFMを例にとれば、図2に示すように探針は強度維持のため一般に円錐形またはピラミッド型で、先端がある角度を持っている。したがって物体の表面を走査する際に、凹凸が大きすぎると探針の側面で物体を走査する場合が生ずる。また、回り込んだ物体の裏側は測定できず、全体の形状を正しく測定することは困難である。得られる画像は、あくまで真上から見た凹凸

像であり、探針の影響があることを考慮しなければならない。また、コンピュータによる探針制御の限界から、大きな凹凸には追従できないことがあり、探針の形状と制御の両面から表面の凹凸の大きさは重要な問題になる。なお、試料に極端な凹凸がなく平坦であれば、分解能が高いことから非常に鮮明な画像を得ることができる。現在探針に関しては、先端の角度を狭めたり、先端にカーボンナノチューブを着けてより先端径を小さくするなどの開発が行われている。

食品素材や生体試料では、表面の凹凸が大きく、不均一で、柔らかいのが特徴である。これらの特徴はSPMにとっては最も不得手とする項目である。数 μm 四方以下の範囲で高低差が数 μm 以上あるような試料も少なくなく、そのような場合には前述の探針の形状が大きく影響する。このような試料で高分解能計測を実現するには、なるべく平坦な場所を探して計測を行うことが望まれるが、そのためには、数 μm 程度、場合によっては $1\mu\text{m}$ 以下の精度で目的の場所を位置決めする必要がある。また、生体試料の柔らかさも重要な問題であり、柔軟な表面をうまく走査できるよう探針を厳密に制御したり、あるいは表面が変形しないように試料の構造をある程度固定する必要も生ずる。さらに、SNOM/AFMでの計測では、装置が高感度であるため、夾雑物に由来する非常に微弱な光でも検出してしまい、ノイズとなって本来の情報を埋もれさせてしまう恐れがある。

以上のようにSPMで食品素材や生体試料を計測するにはいくつかの解決すべき点がある。しかし、最近では、探針の制御法の改善など装置の改良が進み、操作性が大きく改善されたこと、生体試料の計測例が多くなるにつれて試料の固定法や光学顕微鏡との組み合わせ測定などの計測ノウハウが蓄積してきたことなどあって、比較的容易に高分解能計測や自然に近い状態での計測が可能になっている。SNOM/AFMによる光計測の場合でも、試料調製法や蛍光色素による標識方法、

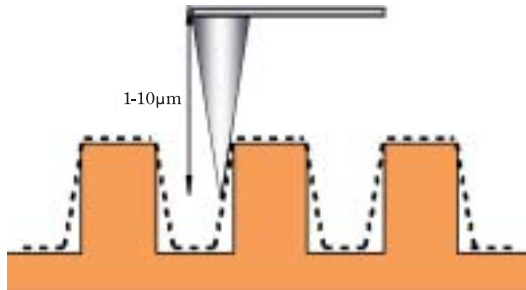


図2 AFM探針の形状と計測限界

試料の凹凸が鋭いと、探針の側面で試料を走査することになり、探針の先端は点線のような軌跡をとるので側面部分の正確な形状は計測できない。

光プローブ自体の構造，光プローブの制御方法，励起された微弱蛍光の検出法など様々な技術的な課題を検討した結果，現在では，後述のように生物試料のナノ計測が可能になっている．

3．AFMによる計測例

3.1 生体試料

AFMによる生体試料の計測については，AFMの開発以来，枚挙に暇がないほどの計測例があり，その対象はDNA，多種多様なタンパク質，染色体，細胞など多岐にわたっている．最近では，液中で計測できることを利用して，従来の光学顕微鏡以上の解像度で動物細胞の移動の様子を計測したり²⁾，生きた細胞表面の弾性率変化をマッピング計測して細胞の運動との関係を調べること³⁾も可能になっている．さらに，液中での走査速度を向上させ，ミオシンの動きを直接ビデオ相当の動画で計測することも可能になった⁴⁾．ここでは，AFM計測の具体例として，筆者らのグループで行った染色体計測について紹介する．

染色体は古くから光学顕微鏡で観察されてきたので，構造はすでに良く分かっているように思われているが，詳細な構造はほとんど明らかにされていない．AFMを使って染色体全体を計測したところ，中央部や腕部のくびれ構造（セントロメア，二次狭窄）を高分解能で計測できた（図3 a）．さらに，高倍率での計測では40-50 nm程度の超微粒子構造や超微粒子が連なった繊維状構造を直接可視化することができた（図3 b）．この繊維状構造の直径は，DNAがコアヒストンに巻き付いたヌクレオソームがさらにらせん状に凝集して構築されるソレノイド構造（30nmファイバ）の大きさとほぼ等しいことが分かった．

さらに一つの染色体に注目し，スライドガラス上で種々の濃度のNaCl水溶液でタンパク質を抽出除去し，その都度，形状の変化を計測・比較した．その結果，低濃度ではほとんど変化はなかったが，2.0 MのNaClで抽出タンパク質を除去した場合，染色体の構造のコンパクト化と高さの減少が認められた⁵⁾．このように，AFMを用いることで，タンパク質を抽出除去する前と後の画像を従来にはない高分解能で比較することが可能になり，さらに，抽出除去したタンパク質を化学的に比較することも可能である．

AFMは探針により表面を走査して形状像を得るという特性上，高分解能のデータを得るためには，夾雑物を極力排除し，清浄な表面をもつ試料を作成しなくてはならない．そのため，試料によっては特別な前処理法を開発する必要がある．前記の染色体計測の場合には，通常の光学顕微鏡観察用の試料調製法では，夾雑物が多くAFM計測には適さなかったため，SEM用の前処理方法を元に，酢酸による洗浄等の工程を導入した新しい試料調製法を開発し，染色体表面の高分解能計測に成功した⁶⁾．いずれにしてもAFMによる生体試料の計測では，試料の調整法と探針の精密な制御がポイントになる．

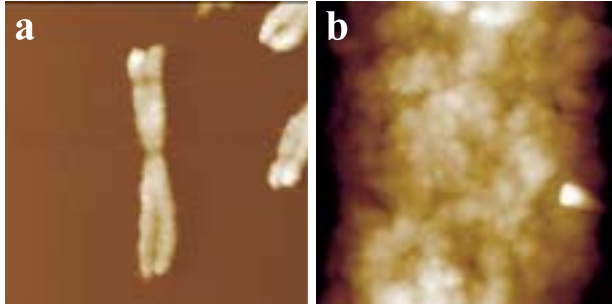


図3 オオムギ染色体表面のAFM計測

- a. オオムギ染色体の形状像．走査範囲：12 x 12 μm ．
- b. オオムギ染色体の表面の拡大像．直径約40～50nmの粒子状構造が繋がっているのが計測される．走査範囲：1 x 1 μm ．

3.2 食品素材

食品素材を直接AFMで観察する研究は、これまでいくつか散見されるものの、現在のところその例はあまり多くない。ここでは、筆者らによるデンプン粒子内構造のナノレベル計測およびオオムギ子葉鞘細胞表面の液中計測の例を示す。

デンプン粒子内の高次構造は化学分析や透過型電子顕微鏡により推定されているが、電子顕微鏡観察では、試料の固定、切片の作成、染色などの煩雑な前処理が必要であった。図4に、AFMでデンプン粒子内の高次構造を計測した例^{7,8)}を示す。水中でデンプン粒子を微粒子化した後、粒径が1 μm 以下の粒子を回収し、大気中でその表面を計測した。図4左は通常凹凸像、図4中央は偏差像である。偏差像は、探針の制御信号と実際の探針の動きとの差を表示した像で、実際は試料凹凸のエッジ部分を強調した画像となるので、形状像と併記し、試料の微細構造を解析計測することができる。これらの結果から、粒径が数十nm程度の超微粒子構造がデンプン粒子内に多数存在していることが容易に計測できた。また、これらの超微粒子が直鎖状に繋がっている構造（図4右）やレンガ状の構造も計測されており、デンプン粒子内のシングルクラスター構造を直接計測できたものと考えている。

AFMの特徴の一つに溶液中での計測がある。図5には、オオムギ子葉鞘細胞の表面を溶液中でAFM計測した例⁹⁾を示す。切り出し直後の生の細胞（図5a）に比べ、常圧大気中（図5b）と0.38 MPaのキセノンガス雰囲気下（図5c）で保存した場合細かい凹凸が計測された。一方、0.48 MPaで保存した場合には（図5d）凹凸は計測されず、切り出し直後と同等の細胞表面を維持していることが明らかになった。さらに同じ試料を、走査範囲を狭めて、さらに高い分解能で計測したところ、クチクラ層が剥離し、一次細胞壁であるセルロース繊維束と考えられる

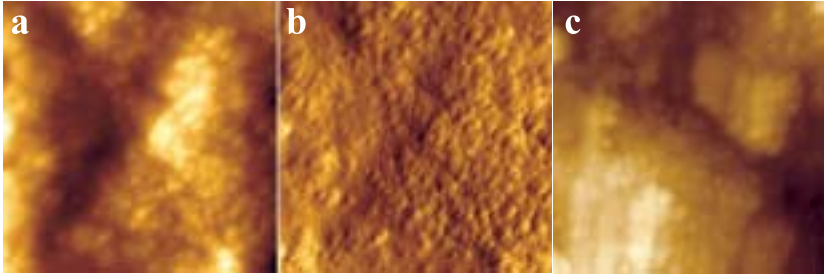


図4 デンブロン粒子内の微細構造のAFM計測

- トムロコシデンブンの凹凸像．直径20-30nmの超微粒子構造が計測できる．走査範囲：800 x 800nm，以下同様．
- トムロコシデンブンの偏差像．エッジ部分が強調され凹凸像と比較することにより超微粒子構造が明瞭になる．
- 甘藷デンブンの凹凸像．直径20-30nmの超微粒子が直鎖状の構造を取っている例．

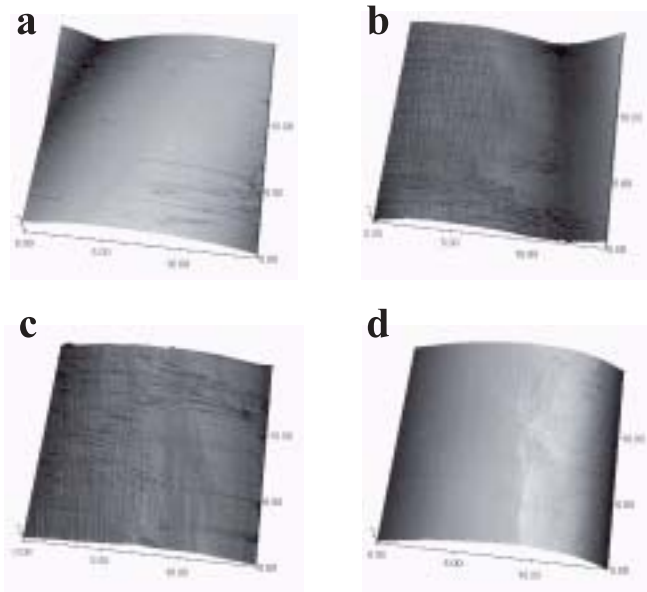


図5 オオムギ子葉鞘細胞表面の液中AFM計測

- 切り出し直後のオオムギ子葉鞘細胞表面を液中でAFMにより計測した形状像．走査範囲：15 x 15 μm 、以下同様．
- 切り出し後，常圧の大気中で保存した子葉鞘細胞の表面．
- 切り出し後，0.38Mpaのキセノンガス雰囲気中で保存した子葉鞘細胞の表面．
- 切り出し後，0.48Mpaのキセノンガス雰囲気中で保存した子葉鞘細胞の表面．

構造が計測された。これらの結果から、クチクラ層を保持できるキセノンガスの保存圧力条件が明らかになった。AFMを用いることで、水溶液中であっても細胞表面の $1\mu\text{m}$ 角の構造を高さ 50nm 程度の分解能で明らかにすることが可能である。

食品素材のAFM計測はこの他にも、例えば、セルラーゼによりセルロースが資化される過程をAFMで計測し、フィブリル化の様子を可視化してマイクロフィブリルの大きさを実測した研究¹⁰⁾、香気成分を保持した食品添加物用噴霧乾燥粒子の表面構造を直接AFMで計測して、SEMなどでは観察が難しいナノレベルでの表面構造と香気成分の揮発性との関係を解明する検討、あるいはプロセスチーズのカゼインミセルの可視化などの検討などを行っている。

4. SNOM/AFMによるゲノム解析例

4.1 DNA上の遺伝子位置の検出 (DNA-nanoFISH)

従来からDNAや染色体上の遺伝子の位置を蛍光色素で標識し、光学顕微鏡を使ってその位置を観察するFISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法が用いられている。遺伝子の存在と大まかな位置を観察する方法として利用されているが、光学顕微鏡を使用するため分解能が制限されていた。それに対して、筆者らのグループは、特定塩基配列をFISH法により蛍光標識したDNAを基板上に直線的に固定し、SNOM/AFMを用いてナノスケールで、直接的かつ効率的に計測する技術を開発した。ここでは、ファージDNA上を材料にして、蛍光標識した特定の塩基配列のDNA上での位置を高感度に計測した例を図6に示す。

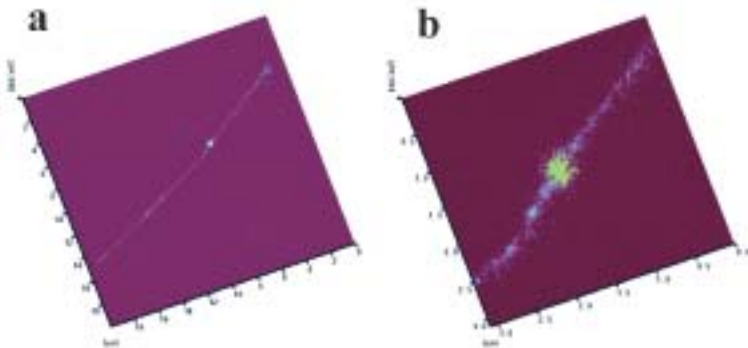


図6 特定塩基配列を標識したDNAのSNOM/AFM計測 (DNA-nanoFISH)
 a. Alexa532結合PNAで中央部の遺伝子の配列を標識したDNA。DNAはYOYO-1で染色されている。532nm励起と488nm励起を重ね合わせ像。走査範囲： $20 \times 20\mu\text{m}$ 。
 b. 標識部位の拡大図。表示範囲： $3 \times 3\mu\text{m}$ 。

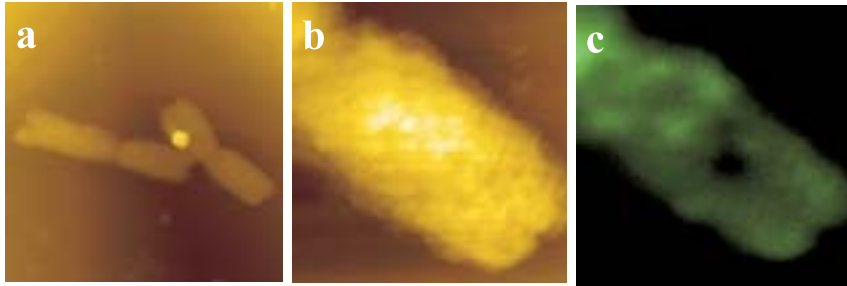


図7 蛍光バンド処理染色体のSNOM/AFM計測

- SNOM/AFMにより計測したオオムギ染色体の形状像．走査範囲：12 x 12 μm ．
- aの右側の染色体の腕部の形状像．走査範囲：4 x 4 μm ．
- bと同時計測した蛍光像．形状像では染色体表面は平坦だが、蛍光像ではスポット状に蛍光強度の強い領域がある．走査範囲：4 x 4 μm ．

ファージ^{ea47}遺伝子の先頭部の15塩基の配列にAlexsa532色素（励起波長532 nm，蛍光波長570nm）を結合したPNA（peptide nucleic acid）プローブを作成し、ハイブリダイゼーションにより標識した．ファージDNAは、2本鎖DNAの蛍光染色試薬YOYO-1（励起波長488 nm，蛍光波長510 nm）によって染色した．このDNA試料をMethyltrimethoxysilaneにて表面改質したマイカ基板¹¹⁾上に、吸上法¹²⁾により配向させた後、励起光に488および532 nmのレーザーを用いて計測した．励起された蛍光は倒立型光学顕微鏡の光学系を通してAPD（avalanche photodiode）により検出した．その結果、図6aのように、予想される位置（ファージDNAのほぼ中央部）にAlexa532の蛍光が計測された．図6bは、標識部位の拡大図であり、ターゲット遺伝子の位置が300nm以下の分解で検出されていることがわかる．以上のように、SNOM/AFMによって、わずか15塩基の領域を通常の光学顕微鏡の限界を超える分解能で計測することが可能となり、特定遺伝子マッピングの可視化の可能性が示された^{13, 14)}．

なお、この研究の過程でマイカ基板上にDNAを任意の方向に固定する方法¹⁵⁾や固定したDNA上に適当な間隔で金属超微粒子を固定する方法¹⁶⁾などを開発し、DNAをナノレベルの新素材として使える可能性を示すことができた．

4.2 染色体蛍光バンドのSNOM/AFM計測

SNOM/AFMである程度の厚さを持つ生物試料を計測した場合、試料表面で励起された蛍光が試料内部の立体構造により散乱され、強度が低下して蛍光信号を十分検出できない恐れがある．しかしながら、染色体のように数百nm程度の厚さの生物試料では、SNOM/AFMにより表面形状と蛍光強度の同時計測が可能であった¹⁷⁾．その例として、蛍光バンド処理（染色体の判別や高次構造推定のため用い

られる手法)を施した染色体の表面形状と蛍光像をSNOM/AFMにより同時に計測した結果を図7に示す。図7aはSNOM/AFMにより計測したオオムギ染色体の全体像(形状像)である。図7bとcは、そのうちの右側染色体の腕部の形状像と蛍光像を高倍率で同時測定した結果を示している。形状像では、染色体の腕部はほぼ様な厚みを持っており、顕著な高低差は計測されなかったが、蛍光像では特定の領域のみに高い蛍光強度が計測された。表面形状と蛍光強度の間には相関はなかった。以上の結果は、計測された蛍光強度分布が染色体の高低など形状に依存するのではなく、DNAの含量や塩基組成など染色体内部の高次構造を反映していること示唆している。

4.3 染色体の FISH領域のナノ計測(染色体-nanoFISH)

染色体のテロメア領域をFISHし、蛍光顕微鏡観察した場合、図8aに示すように、FISHによる蛍光は通常1つの輝点として観察される。蛍光顕微鏡観察において1つの輝点とされた領域をAFM及SNOM/AFMでナノ計測した後、同じ領域の形状をAFMで計測した例を図8b, cに示した。図8bはAFMでの形状像で、直径数十nmのクロマチンファイバーが折り重なっている様子が鮮明に計測できた。前述した通り、SNOM/AFMでも形状像は計測可能であるが、現状では光プローブの先端径が大きい(10倍以上)ため、高分解能の形状像を得るためにAFM用のシリコン探針で形状像を取り直す必要がある。図8cは、図8bのAFM計測による形状像にSNOM/AFM計測で得られた蛍光像を画像処理後に重ねた図である。その結果、光学顕微鏡ではほぼ1点であった蛍光の信号が大きく2点に分かれていることが明

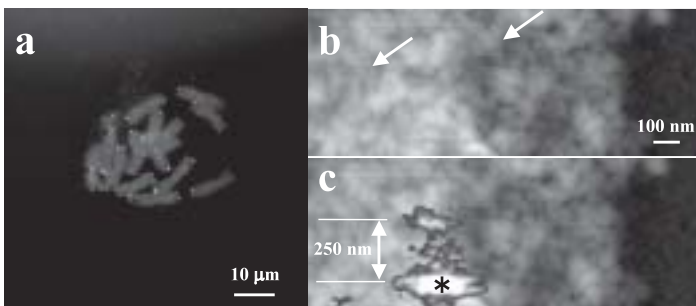


図8 テロメアFISH処理染色体のSNOM/AFM計測(染色体-nanoFISH)

- a. オオムギ染色体のテロメア領域の蛍光顕微鏡による計測例。
- b. テロメア領域のナノレベルでの形状像, AFM探針使用。矢印はクロマチンファイバーの例。
- c. bにSNOM/AFMによる蛍光像(*)を重ねた形状像。光学顕微鏡で1点にしか見えない蛍光信号が250nm離れた2点として計測された。

らかになった^{18, 19)}。また、特定のクロマチンファーバー上の蛍光信号を検出できる可能性も示唆された。

以上に示した一連の結果は、SNOM/AFMを用いることで、FISHの分解能を光学限界を超えて高められることを示すものである。筆者らの研究グループでは、この光学限界を超えるFISH法をnanoFISH（またはナノFISH）と命名し、DNAと染色体を対象にさらに検討を進めている。

5. SPMによる解析の将来

SPM、特にAFMにより液中での柔らかい試料を生のまま計測することは、生物学分野のみならず、食品分野からも非常に強く要望されながら未だ実現できていない重要な課題である。ようやくAFMメーカーでもその重要性を認識し、2003年度から装置および探針の開発プロジェクトが開始され、筆者らのグループも実際の試料を使った溶液中での計測と装置の評価で共同研究を行っている。一方、SPMは、単に「見る」だけの道具ではなく、探針によりpNレベルの力を測ったり対象物をナノメートルの距離で動かしたりすることが可能である。SPMの探針に抗体などのタンパク質を結合させてタンパク質間相互作用を定量的に検出する研究を、同じプロジェクト内で開始している。最終的には、多数の探針を使い、丁度DNAチップのイメージで、網羅的にタンパク質間の定量的相互作用計測を可能にしたいと考えている。

また、探針で生体試料から微量の物質を回収する試みも開始した。すなわち、染色体からAFMの探針を用いて直接DNAを回収し、染色体上の任意の部分の染色体物理地図構築や塩基配列解読を実現しようとする「SPMダイレクトゲノム解析法」を、農業生物資源研究所と共同で、2003年度から(独)農業・生物系特定産業技術研究機構生研センターのプロジェクトとして開始した。

1986年のAFMの発表当初から期待されていた溶液中での計測やナノ操作は、約20年を経て、ようやく実現の段階にあると考えられる。

6. おわりに

SPMは発明されてから20数年の技術である。材料科学分野では順調に発展してきたが、生物系の試料への適用には、前述したような様々な問題点があり、それらを解決していくための期間が必要であった。しかし、最近になって、探針、装置およびその制御アルゴリズムの進歩や試料調製法の改良により、ほとんどの問題がクリアできる見通しが立つようになり、SPMの生体試料への適用は急速に進んでいる。このような状況にあって、SPMが生物学分野でも認知され始めており、従来は機械系研究者がほとんどであったSPMの利用者が、生物系研究者の間でも増えつつある。

今後、SEMの発展がそうであったように、機械系研究者（装置の改良）と生物

系研究者（試料調整調製方法の改善，問題点の機械系研究者へのフィードバック等）が相互に補完することで，SPMを生物試料計測へ本格的に展開できるものと考えられる．特に，溶液中で自然に近い状態でナノレベル計測を行うことは，従来の光学顕微鏡やSEMでは考えられなかった新たな情報の収集が可能になると期待できる．

またSPMは，ナノレベルでの力測定や操作も可能になりつつあり，単なる「顕微鏡」ではなく観察から操作までをナノレベルでこなす総合ツールと捉えるべき段階に達している．生物試料の計測をより容易かつ正確に行うためのハードウェアの改良や開発も各SPMメーカーにおいて進められていることから，生物学および食品科学におけるSPMの有用性は，今後ますます大きくなると考えられる．さらなる発展を期待したい．

謝辞

本研究の一部は，(独)農業・生物系特定産業技術研究機構生研センター基礎研究推進事業，科学振興調整費，NEDO((独)新エネルギー・産業技術総合開発機構)他の補助により推進されている．

(企画調整部研究企画科長 大谷 敏郎)
(食品工学部計測工学研究室 杉山 滋)

参考文献

- 1) 日本表面科学界編：ナノテクノロジーのための走査型プローブ顕微鏡，丸善，(2002)．
- 2) T. Ushiki, S. Yamamoto, J. Hitomi, S. Ogura, T. Umemoto and M. Shigeno: Atomic force microscopy of living cells, *Jpn. J. Appl. Phys.* **39**, 3761-3764 (2000)．
- 3) M. Nagayama, H. Haga and K. Kawabata: Drastic change of local stiffness distribution correlating to cell migration in living fibroblasts, *Cell Motil Cytoskeleton*, **50**, 173-179 (2001)．
- 4) 安藤敏夫：高速原子間力顕微鏡 - 液中ナノメーター世界の高速撮影 - ，*化学と工業*，**55**，877-879 (2002)．
- 5) X-Q. Liu, S. Sugiyama, Q-Y. Xu, T. Kobori, S. Hagiwara and T. Ohtani: Atomic force microscopy study of chromosome surface structure changed by protein extraction , *Ultramicroscopy* , **94**, 217-223 (2003) ．
- 6) S. Sugiyama, T. Yoshino, H. Kanahara, M. Shichiri, D. Fukushi and T. Ohtani: Effects of acetic acid treatment on plant chromosome structures analyzed by atomic force microscopy, *Anal. Biochem*, **324**, 39-44 (2004) ．

- 7) T. Ohtani, T. Yoshino, T. Ushiki, S. Hagiwara and T. Maekawa: Atomic force microscopic imaging of rice starch granule structure in nanometer scale, *J. Electron Microscopy*, **49**, 487-489 (2000).
- 8) T. Ohtani, T. Yoshino, S. Hagiwara and T. Maekawa: High-resolution imaging of starch granule structure using atomic force microscopy, *Starch/Stärke*, **52**, 150-153 (2000).
- 9) T. Yoshino, I. Sotomei, T. Ohtani, S. Isobe, S. Oshita and T. Maekawa: Observations of xenon gas-treated barley cells in solution by atomic force microscopy, *J. Electron Microscopy*, **49**, 483-486 (2000).
- 10) 大原浩樹, 中村 博文, 野尻 宙平, 吉野 智之, 大谷 敏郎, 窪田 英俊, 河野 敏明: *Trichoderma viride*由来エンドグルカナーゼ の作用機構, 日本農芸化学会2002年度大会講演要旨, p.124, 2002.3.
- 11) M. Sasou, S. Sugiyama, T. Yoshino and T. Ohtani: Molecular flat mica surface silanized with methyltrimethoxysilane for fixing and straightening DNA, *Langmuir*, **19**, 9845-9849 (2003).
- 12) H. Nakao, H. Hayashi, T. Yoshino, S. Sugiyama, K. Otobe and T. Ohtani: Development of novel polymer-coated substrates for straightening and fixing DNA, *Nano Letters*, **2**, 475-479 (2002).
- 13) 吉野智之, 大谷敏郎: SNOM/AFMの生物試料への応用顕微鏡学会, 電子顕微鏡 (日本顕微鏡学会誌), **38**, 94-97 (2003).
- 14) J-M. Kim, T. Hirose, S. Sugiyama, T. Ohtani and H. Muramatsu: Visualizing a hybridized PNA probe on a DNA molecule with near-field optical microscopy, *Nano Letters*, **4**, 2091-2097 (2004).
- 15) H. Nakao, M. Gad, S. Sugiyama, K. Otobe. and T. Ohtani: Transfer-printing of highly aligned DNA nanowires, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 7162-7163 (2003).
- 16) H. Nakao, H. Siigi, Y. Yamamoto, S. Tokonami, T. Nagaoka, S. Sugiyama and T. Ohtani: Highly Ordered Assemblies of Au Nanoparticles Organized on DNA, *Nano Lett.* **3**, 1391-1394 (2003).
- 17) T. Yoshino, S. Sugiyama, S. Hagiwara, T. Ushiki and T. Ohtani: Simultaneous collection of topographic and fluorescent images of barley chromosomes by scanning near-field optical/atomic force microscopy, *J. Electron Microscopy*, **51**, 199-203 (2002).
- 18) D. Fukushi, M. Shichiri, S. Sugiyama, T. Yoshino, S. Hagiwara and T. Ohtani: Scanning near-field optical/atomic force microscopy detection of FISH signals beyond the optical limit, *Exp. Cell Res.*, **289**, 237-244 (2003).
- 19) T. Ohtani, M. Shichiri, D. Fukushi, S. Sugiyama, T. Yoshino, T. Kobori, S. Hagiwara, and T. Ushiki: Imaging of Chromosomes at Nano-Meter Scale

Resolution using Scanning Near- Field Optical/Atomic Force Microscopy,
Arch. Histol. Cytol., **65**, 111-120 (2002).

