

レーザー共焦点微分干渉顕微鏡を用いた氷結晶表面での分子ステップのその場観察

佐 崎 元*・サルバドール・ゼペダ・中坪 俊一・古川 義純

In situ Observation of Elementary Steps on Ice Crystal Surfaces by Laser Confocal Microscopy Combined with Differential Interference Contrast Microscopy

Gen SAZAKI, Salvador ZEPEDA, Shunichi NAKATSUBO and Yoshinori FURUKAWA

We combined laser confocal microscopy with differential interference contrast microscopy, and further improved the signal-noise ratio and polarization property of this microscopy. In this report, we demonstrate, by our optical microscopy, that elementary steps (the growing ends of ubiquitous molecular layers with the minimum height) of ice crystals and their dynamic behavior can be visualized directly at air-ice interfaces. We observed the appearance and lateral growth of two-dimensional (2D) islands on ice crystal surfaces. When the steps of neighboring 2D islands coalesced, the contrast of the steps always disappeared completely. We could discount the occurrence of steps too small to detect directly because we never observed the associated phenomena that would indicate their presence. Hence we concluded that 2D islands with elementary height (0.37 nm) on ice crystal surfaces could be visualized by our optical microscopy.

Key words: laser confocal microscopy, differential interference contrast microscopy, ice crystal surface, elementary step, direct visualization

光学顕微鏡の横方向の分解能は、使用する光の波長の制限を受けるため、サブミクロン程度にとどまる。しかし、試料高さ方向のわずかな高低差にコントラストを与えることには、物理的制限がない。そのため、微分干渉顕微鏡や位相差顕微鏡など、光のわずかな位相の差を強度の差に変えるための顕微法が開発され、さまざまな観察が行われてきた。本稿では、微分干渉顕微鏡とレーザー走査型共焦点顕微鏡¹⁾を組み合わせることで、反射率が1%程度の透明な結晶表面でオングストローム高さの段差を十分な感度で検出できることを紹介する²⁾。

多くの結晶は、光学顕微鏡による観察に適した表面構造をもつ。結晶は、ブロックを1つ1つ積み上げるように、分子を積み上げることで成長する。また、分子を積み上げる際には、図1に模式図を示したように、分子層の端(単位ステップとよばれる)に分子が組み込まれ、単位ステップが横方向に成長することで、結晶は1層ずつ層状に成長する(単位ステップの厚みは、分子の大きさと結晶構造から1つに定まる)。そのため、結晶の成長を理解する大本となる単位ステップの動的挙動をその場観察するには、分

子レベルで完全に平坦な結晶表面上で分子レベル高さの段差(単位ステップ)を可視化する必要がある。この際に、単位ステップの間隔が十分に(1 μm 程度以上)離れてさえいれば、光学顕微鏡の出番となる。

1. 氷結晶表面での単位ステップの可視化

氷は地球上にきわめて大量に存在するため、その相転移(成長や融解・昇華)は、地球の寒冷圏で起こるさまざまな自然現象を支配する。また、氷結晶の表面は、紫外線によるオゾン・有機物の分解や、不凍タンパク質による寒冷地の動植物の凍結防止など、多くの物理的・化学的過程の鍵を握る。そのため、氷結晶の表面を分子レベルで理解することはきわめて重要である。しかし、氷結晶の場合には、単位ステップを結晶の成長中に可視化することはこれまで誰もできず、相転移や多くの物理的・化学的過程のメカニズムは想像されるのみにとどまっていた。

その原因は、原子間力顕微鏡(AFM)などの走査型プローブ顕微鏡の使用が、氷結晶表面ではきわめて困難なことにある。氷結晶は融点直下という超高温下で成長するため、表面融解により発生する疑似液体層(固体と液体の中

北海道大学低温科学研究所(〒060-0819 札幌市北区北19条西8丁目) E-mail: sazaki@lowtem.hokudai.ac.jp

* 科学技術振興機構さきがけ研究員(兼務)

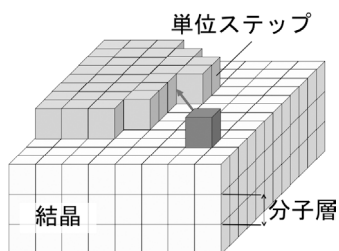


図1 結晶が層状成長する模式図.

間の性質を有する層) がカンチレバーによる走査を困難にする。そのため、試料表面に完全に非接触・非破壊である光学顕微法は、氷結晶の表面を観察するためのきわめて有望な手法になり得る。

われわれは、微分干渉顕微鏡とレーザー共焦点顕微鏡(オリンパス製 FV300) を組み合わせることで、水溶液中のタンパク質結晶表面の単位ステップ(数 ~ 6 nm 高さ)を、きわめて高いコントラストで、結晶の成長中にその場観察することに成功した³⁾。しかし、氷結晶表面の単位ステップの予想される高さは 0.37 nm と小さいため⁴⁾、レーザー共焦点微分干渉顕微鏡をさらに改良し、シグナル・ノイズ(SN) 比と微分干渉コントラストを向上させた²⁾。まず、可干渉長が $10\ \mu\text{m}$ 程度ときわめて小さい super luminescent diode (SLD, 波長 680 nm, 半値全幅 23 nm) を光源として用い、干渉縞の発生を防いだ。また、銀ナノ粒子を配列させた偏光子と偏光ビームスプリッターを用い、検光子を除去することで、光量の低下を抑えながら偏光特性を向上させた。さらに、偏光特性を落とさぬよう、倍率が 10 倍以下の対物レンズを用いた。

過飽和な水蒸気中で成長する氷結晶(雪結晶と同じ)の表面を観察した一例を図2に示す²⁾。氷結晶の六角底面上で、二次元島状の丸い分子層が多数出現し、それらが横方向に広がり互いに合体することで、氷結晶は層状に成長することがわかる(画像は 0.57 s ごとに撮影)。図中の+印で示したように、隣り合った分子層が合体すると、分子層の縁(ステップ)のコントラストは完全に消滅した(ビデオムービーを参照⁵⁾)。このような二次元島の合体に伴うステップのコントラストの消滅は、氷結晶表面上のいたるところでランダムに観察された。この結果は、現れた丸い二次元島が、氷結晶表面上での二次元核形成により生成されたことを示す。隣り合った二次元島が合体した後にステップのコントラストが完全に消滅しなかった例は、全く観察されなかった。

われわれが可視化したステップ(図2)が、高さが最も小さい単位ステップであることは、次のように証明できる。もし、氷結晶表面上に、高さが検出限界よりも低いた

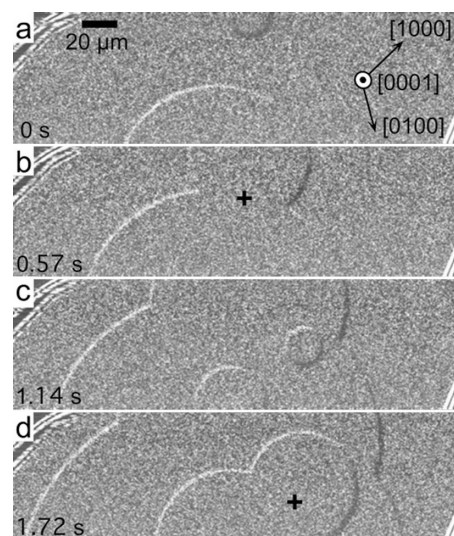


図2 氷結晶の六角底面上で、二次元島状の分子層($0.37\text{\AA}$ 厚み)が多数出現し、それらが横方向に広がることで結晶が成長する様子²⁾。画像は 0.57 秒ごとに撮影。

めに「可視化できていないステップ」があると仮定すると、可視化できるステップと可視化できないステップの衝突が必ず起こる。これら2つのステップの高さの差が検出限界よりも小さいと、これまで可視化できていたステップの一部が突然見えなくなる事態が必ず生じなければならない。また、このような事態が生じる確率は、検出限界の高さが増すとともに増大する⁶⁾。しかし、このような事態の発生は、数 100 回以上の表面観察を通じて一度も観察されなかった。この結果は、氷結晶表面上のステップの高さはすべて検出限界高さ以上であり、すべてのステップが可視化できた、すなわち氷結晶表面上で高さが最も小さい単位ステップを観察できたことを示す。

氷結晶表面上の単位ステップを AFM を用いて観察することに成功した例が、これまでに1つだけある。ゼペダは、氷結晶表面上に有機溶媒(オクタン)で覆うことで AFM 観察に成功した⁷⁾。彼が測定した単位ステップの高さ 0.29 nm は、AFM 測定の高さ方向の誤差を考慮すると、結晶構造から予想される高さ 0.37 nm とよく一致する⁴⁾。すなわち、われわれは氷結晶表面上の高さ 0.37 nm の単位ステップを、その成長中に光学的に可視化できたことになる。

本稿で紹介したレーザー共焦点微分干渉顕微鏡を用いると、氷結晶の成長・融解・昇華などの相転移機構を分子レベルで明らかにする研究が今後展開できる。また、本顕微技術は、エアロゾルやオゾンホールなどの環境破壊、不凍タンパク質による動植物の凍結防止、さらには地球温暖化などの機構解明にも役立つと期待される。

2. 結晶表面の可視化と今後の展望

結晶表面の単位ステップを光学顕微観察する際の「見え

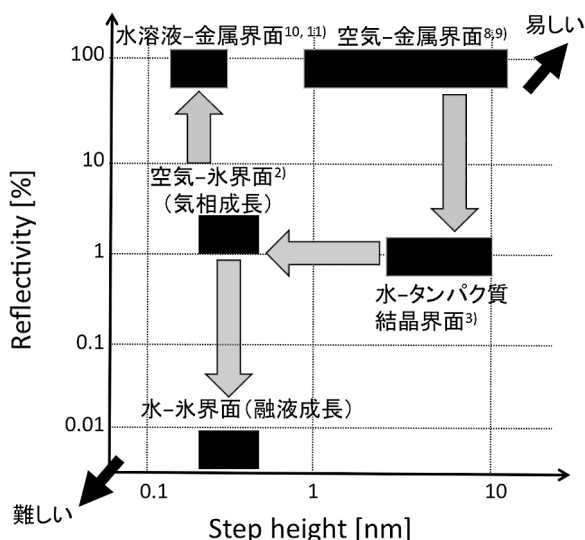


図3 反射型顕微鏡による結晶表面の単位ステップのその場観察。

具合」を定量的に評価することは難しい。しかし、反射型の光学顕微鏡の場合には、ステップの高さ（位相差に相当）と結晶表面の反射率（SN比に相当）がその指標となろう。図3にこれまでの経緯をまとめた。結晶表面の単位ステップの可視化には、1950年にGriffinが初めて成功している⁸⁾。彼は、緑柱石結晶表面上の0.8 nm高さのステップを、反射型の位相差顕微鏡を用いて可視化した。翌1951年にはAmelinckxが炭化ケイ素結晶表面上の1.5 nm高さのステップを可視化している⁹⁾。しかし、これらの観察では、SN比を向上させるために、結晶表面に銀の薄膜を蒸着し、反射率を70~90%まで増大させざるを得なかった。しかし、レーザー共焦点微分干渉顕微鏡を用いることで、反射率が1%程度の水溶液-タンパク質結晶界面や空気-氷界面で、高さが数nm~0.37 nmの単位ステップを、その成長中に観察できるようになった。また、反射率が100%近い水溶液-金結晶{111}界面では、レーザー共焦点微分干渉顕微鏡を用いて、板谷らのグループが高さ0.25 nmの単原子ステップの可視化に最近成功している^{10, 11)}。

著者自身は今後さらに、反射率が0.007%しかない水-氷界面での、分子レベルその場観察を目指している。融液と結晶との界面では、いまだ誰も分子レベルでのその場観察に成功していない。そのため、もし観察に成功すれば、界面での新たな物理現象を見いだせるかもしれないと期待している。

一方、透過型の光学顕微鏡の場合には、塚本らが観察用セルも光学系の一部として設計し、収差の除去を極めることで、位相差顕微鏡を用いて、水溶液中で成長するCdI₂

結晶表面の高さ1.4 nmのステップをその場観察することに成功している¹²⁾。また、位相差顕微鏡を用いると、水溶液中で成長しているタンパク質結晶上の数nm高さの単位ステップも観察できる¹³⁾。これらの結果は、光のわずかな位相の差を強度の差に変えるには、微分干渉顕微鏡よりも位相差顕微鏡のほうがよりすぐれていることを示唆する。そのため、もし透過型位相差顕微鏡をレーザー共焦点化できれば、高さ方向にきわめて高感度な顕微鏡になるものと予想される。

株式会社オリンパスエンジニアリングの斎藤良治氏と小林茂氏にはさまざまな技術的援助をいただいた。また、愛知学院大学の清忠師教授と産業技術総合研究所の灘浩樹博士にはさまざまな議論をしていただいた。ここに、深く感謝する。本研究は科学技術振興機構によるさきがけ研究として行われた。

文 献

- 1) T. Takamatsu and S. Fujita: "Microscopic tomography by laser scanning microscopy and its three-dimensional reconstruction," *J. Microsc.*, **149** (1988) 167-174.
- 2) G. Sazaki, S. Zepeda, S. Nakatsubo, E. Yokoyama and Y. Furukawa: "Elementary steps at the surface of ice crystals visualized by advanced optical microscopy," *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **107** (2010) 19702-19707.
- 3) G. Sazaki, T. Matsui, K. Tsukamoto, N. Usami, T. Ujihara, K. Fujiwara and K. Nakajima: "In-situ observation of elementary growth steps on the surface of protein crystals by laser confocal microscopy," *J. Cryst. Growth*, **262** (2004) 536-542.
- 4) P. V. Hobbs: *Ice Physics* (Clarendon Press, Oxford, 1974) pp. 18-44.
- 5) <http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1008866107/-/DCSupplemental>
- 6) Y. Suzuki, G. Sazaki, M. Matsumoto, M. Nagasawa, K. Nakajima and K. Tamura: "First direct observation of elementary steps on the surfaces of glucose isomerase crystals under high pressure," *Cryst. Growth Design*, **9** (2009) 4289-4295.
- 7) S. Zepeda: "Intermolecular interactions from the hydrogen bond to biological function: An atomic force microscopy study of antifreeze glycoproteins and ice," Ph. D. thesis, University of California, Davis (2004).
- 8) L. J. Griffin: "Observation of unimolecular growth steps on crystal surfaces," *Phil. Mag.*, **41** (1950) 196-199.
- 9) S. Amelinckx: "Spiral growth on carborundum crystal faces," *Nature*, **167** (1951) 939-940.
- 10) R. Wen, A. Lahiri, M. Alagurajan, A. Kuzume, S. Kobayashi and K. Itaya: "Preparation and characterization of ultra-flat single crystal surfaces of Pd(111) and Au(111) by an in situ interference optical microscopy," *J. Electroanal. Chem.*, **649** (2010) 257-260.
- 11) R. Wen, A. Lahiri, M. Azhagurajan, S. Kobayashi and K. Itaya: "A new in situ optical microscope with single atomic layer resolution for observation of electrochemical dissolution of Au (111)," *J. Am. Chem. Soc.*, **132** (2010) 13657-13659.
- 12) K. Tsukamoto: "In Situ observation of mono-molecular growth steps on crystals growing in aqueous solution. I," *J. Cryst. Growth*, **61** (1983) 199-209.
- 13) P. Dold, E. Ono, K. Tsukamoto and G. Sazaki: "Step velocity in tetragonal lysozyme growth as a function of impurity concentration and mass transport conditions," *J. Cryst. Growth*, **293** (2006) 102-109.

(2011年7月29日受理)