

トンネル顕微鏡の生体物質構造研究への応用

Application of tunneling microscopy to structural study of bio-materials

代表研究者 東京工業大学生命理工学部生体機構学科助手 荒川 秀雄
Res. Assist., Dept. of Biological Sciences, Fac. of Biosci. and Biotech.,
Tokyo Institute of Technology
Hideo ARAKAWA

We developed a new method to apply scanning tunneling microscope (STM) to bio-materials especially to protein. This method was not always successful in some proteins but we succeeded to get good STM image of proteins, at least in case of turtle macroglobulin. There were three major points in our method. One: We removed salts from protein solution by dialysis against water or ammonium acetate buffer. Ammonium acetate buffer was able to be volatilized. Two: We added glutaraldehyde to protein solution and incubated on graphite surface. This step was important to get good STM image of protein though it is not known what kinds of chemical reactions were occurred on graphite surface. Three: We washed the graphite surface with water before drying to remove weakly bounded protein molecules and all other impurities.

研究目的

本研究の目的は、新しいタイプの顕微鏡である走査型トンネル顕微鏡 (STM) を用いて生体物質、なかでも特にタンパク質の分子構造を解明する技術を開発することで、人工臓器の開発、バイオチップ・バイオセンサーを含むタンパク質・酵素の工学的利用、生命科学の研究に必要な技術の基礎を作ろうとするものである。

STM は 1982 年に IBM 社チューリッヒ研究所でビーニッヒ (G. Binnig) とローラー (H. Rohrer) により、導体や半導体の表面を原子レベルの分解能で観察できる顕微鏡として開発された。彼らはそのわずか 4 年後の 1986 年にこの功績によりノーベル物理学賞を受賞している。鋭く尖らせた針 (探針) を試料表面に非常に近づけ探針と試料の間に電圧をかけると、試料表面と探針との間にトンネル電流が流れる。トンネル電流は探針と試料表面の距離に極めて敏感で、例えば 1 原子の直径程度距離が変わればトンネル電流は 1000 倍も変わる。トンネル電流を一定に保ちながら探針を走査すれば探針の先端は試料表面の凹凸に沿って動くので、その動きを読みとり、コンピューター

で処理することで表面の高分解能 3 次元像が得られる。探針の位置は圧電素子によって電気的にコントロールされているので、圧電素子にかけた電圧から探針の位置を読みとることができる。分解能としては原理的には 1 Å 程度は十分可能であり、実際半導体表面についてはこの程度の分解能は達成されていて原子の並び方が観察されている。

STM の特徴は高分解能だけではなく、原理的に試料を真空中に置く必要がないことにもある。すでに導体については大気中のみならず蒸留水中や塩溶液中で表面構造が観察されており、DNA に対しても試みられている。この特徴は従来の電子顕微鏡に比べずっと生 (なま) に近い状態で試料を観察できる可能性を示しており、また顕微鏡であるので X 線結晶構造解析や NMR などとは異なり、分子の平均像ではなく個々の分子の形を捉えられる。さらに、STM では光や電子のような粒子を試料に当てることがないため、試料の損傷は小さいといわれている。電子顕微鏡や X 線結晶構造解析においてはこの試料の損傷も大きな問題点の一つである。

研究経過

1. 研究開始時の現状

STMのタンパク質やDNAへの応用は近年盛んになってきている。1985年には bacteriophage ϕ 29 を観察した報告が出ているが、1988年以降になっていくつも論文が出るようになった。recA-DNA複合体に金属膜をかぶせて観察した報告を皮切りに、何もコートしていないDNA、同じく何もコートしていない recA-DNA 複合体、さらに Z-DNA の高分解能 3次元像などが報告され始めた。DNAについてはかなり細かい構造の見えているものもあるが、タンパク質についてはその構造の見えているものはほとんどなかった。

研究開始時には STM による生体物質の観察、特にタンパク質の観察に対して以下のようないくつかの問題点があった。これらは現時点でも克服できたとはいえないが、以下に報告するようにいくつかの新しい工夫を試みることで解決に近づきつつある。

- タンパク質やその他の生体物質の STM 像が得られる原理が明確でない。
- 得られた STM 像が目的のタンパク質であるか同定がむずかしい。
- STM で観察している間にタンパク質が動いてどこかへいってしまうことがある。
- 目的のタンパク質がどのような状態で基盤上に存在しているのかわからない。

2. 研究経過

我々は研究の第一歩としてグラファイトやマイカなどの平面性のよい劈開面上にタンパク質分子を置き、これに各種金属超薄膜をかぶせて STM で観察しタンパク質の立体構造、特に高さの情報を得られる実験系の開発を考え、トンネル電流を安定して得るためにはある程度の厚みに金属膜を作る必要があり、蒸着やスパッタリングによってこの金属膜を作るとタンパク質が埋もれてしまって十分な観察ができなかった。しかし細胞に金属をスパッタしてその表面を観察すると良好な STM 像が得られるのでこの方法は細胞の観察に使える。細胞に金属をスパッタして観察するのは走査型電子顕微鏡 (SEM) でよく行われる手法

だが、SEM では高倍率を得るのがむずかしいのに対し、STM では高倍率を得るのは容易で金属粒子の大きさに制限されるところまですぐに分解能を上げられた。ただしこの場合の問題点は、STM の高さ方向のレンジが狭いため細胞一個の厚みが STM のレンジを超えてしまうことにある。そのため現段階では観察の対象を適切に選ぶ必要がある。

次には導電性を持った基盤の上にのせたタンパク質を直接 STM で観察する研究に移った。まず基盤の選択であるが、色々な素材を試してみたもののなかなかよいものがなく、結局いくつかの欠点 (柔らかくて傷つきやすい、傷が目的の STM 像と区別しにくい、etc.) を承知のうえで高結晶性のグラファイトを使用することになった。しかし、グラファイトは高価 (12 mm 角で 8 万円以上) なのでそのまま基盤にせず経済的な利用法を開発した。すなわち粘着テープをグラファイトの表面に貼り引き剥すことでグラファイトを劈開し、この粘着テープをガラス板に両面テープで張り付けて、粘着テープに張り付いたグラファイトを基盤として使用した。この方法でグラファイト板本体を使う場合に比べ桁違いに経済性が上がり、たくさんの試料を一度に調製できるようになった。粘着テープはグラファイトをきれいに引き剥せることと、次に示す ELISA 法を使うときに Tw-20 の入った緩衝液中で容易にグラファイトから剥がれる必要があり、このために粘着力の適度な強さと基材となるテープの適度な柔軟性が要求される。我々が試した範囲では Scotch のメンディングテープ CAT No. 810 が最も良い結果を得られた。

従来グラファイトにタンパク質を載せてもグラファイトに吸着しているタンパク質の量がわからず、したがってグラファイトへのタンパク質の載せ方を改良するにもその指針となるものがなかった。そこでグラファイト上のタンパク質を高感度に検出する生化学的方法を酵素免疫測定法 (ELISA 法: 抗体に結合させた酵素の反応を用いて抗原を検出する方法) を応用して開発した。この方法は通常の ELISA 法とほぼ同じ手法である

が、粘着テープ上に劈開したグラファイトを適当な大きさのデッシュに入れて行く。粘着テープは溶液中でグラファイトから剝し、グラファイトの薄膜は裏表両方をBSAでブロックする必要がある。また、最後に発色させる前にはピンセットで摘んだ部分をあらかじめ切り落とす。この方法ではグラファイトに結合したタンパク質の絶対量は正確にはわからないが、相対的な量の大小はかなり鋭敏に測定できる。

探針にはタングステン、金なども試みたが大気中での観測には白金イリジウムの針が最も結果が良かった。白金イリジウムの探針は $\phi 0.25$ mmの線を機械的に切断して作った市販のものを使用しているが、電解研磨によりより細くて高性能の探針の制作法を現在開発中で、まもなく実用化できる予定である。

STMで観察する対象となるタンパク質は、コラーゲン、免疫グロブリン、ミオシン、ヒト $\alpha 2$ -マクログロブリン($\alpha 2$ -M)なども試みているが、今のところ一番成功しているのはアオウミガメの $\alpha 2$ -Mのポリマーである。このタンパク質は血液中のプロテアーゼインヒビターであるが、プロテアーゼと反応後 37°C で長時間インキュベートするとS-S結合で縦に一つにつながったポリマーを形成する。各 $\alpha 2$ -M分子は「H」型の特徴的な形をしており他のものと容易に見分けられる。

試料調製法は本研究の最も重要な部分であるが、試行錯誤の結果「研究成果」に示すような調製法が開発された。(研究成果の項のフローチャート参照)。塩が析出するのを防止するための透析が最初の重要なポイントである。グラファイト上で試料を乾燥させた後に塩が析出して残っている状態では安定なSTM像は得られない。水には溶けずに析出する試料の場合は酢酸アンモニウムに透析すると良い。酢酸アンモニウムは揮発性なので真空中で乾燥すれば揮発して残らない。タンパク質溶液をグラファイトに載せるときにグルタルアルデヒドを添加するとうまくいくことがわかった。グルタルアルデヒドはタンパク質中のアミノ基等と反応し、化学架橋を作る架橋材であるが、グラファイトといかなる反応をするのかは現

段階ではよくわからない。しかしグルタルアルデヒド無しでは数百 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度にタンパク質があってもSTMで観察するとグラファイト表面に何も無いかのように見えていたのが、グルタルアルデヒドを入れることで数 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でタンパク質像が得られるようになった。グルタルアルデヒドでタンパク質とグラファイトの間が架橋されタンパク質が固く固定されているように思われるが、タンパク質分子内にできる架橋によってタンパク質が固くなることが影響している可能性もある。最後にタンパク質溶液をグラファイト上でそのまま乾燥させず溶液を取り除いてさらに水で洗ってから乾燥させることで良好な試料が得られる。

研究成果

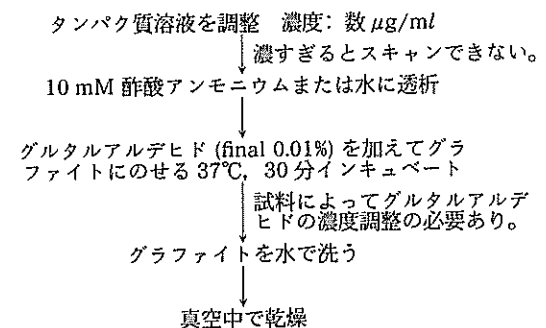
ELISA法を用いた、グラファイト上のタンパク質の半定量法の開発

酵素免疫測定法(ELISA法)を応用することによりグラファイト上に吸着させたタンパク質の半定量法を開発することができた。これによりグラファイト上に乾燥吸着させたタンパク質試料を水で洗うことができることなどもわかった。

STM用タンパク質試料調整法の開発

まだどんな試料に対しても成功する試料調製法は完成していないが、いくつかの新しい工夫を盛り込みある程度成功的なタンパク質試料調製法の開発に成功した。下にそのスキームを示す。

STM用タンパク質試料の調整法



特に、10 mM 酢酸アンモニウムまたは水に透析すること。試料をグラファイト上に載せるときに架橋剤のグルタルアルデヒドを加えること。基盤に載せた試料を水で洗ってから乾かすこと。以

上の3点は重要な独自の工夫である。

今後の課題と発展

2年前の段階では、タンパク質のSTM像は、グラファイト上でタンパク質溶液を乾かしたときになぜか結晶状に並んだタンパク質とか、グラファイト上で非生理的に重合したタンパク質の像しかなく、これらではタンパク質の存在や並びがわかるだけでタンパク質の構造情報は得られないものであった。現在では我々以外でもタンパク質を正常と思える状態でSTM観察しているグループが幾つも現れ始めたのでこれらの研究室とも協力し合って、タンパク質のSTMによる観察技術をさらに発展させていくとができるものと期待できる。

まだ現在の方法ではうまく見れないタンパク質も多いので上記手順中の細かい条件を検討している。特にポリマーにならない球状タンパク質では再現性のある像を得ることがむずかしい。またグラファイトの上にタンパク質をのせる方法にも工夫が必要で、タンパク質溶液を滴下したり、噴霧したり、あるいはグラファイトに親水化処理をしたりといろいろ試みている。

将来水溶液中でのSTM観察がされるようになると、生体分子が動き、形を変えながら活躍する姿が見られるようになるのではないかと夢が膨らむ。その意味で、原子間力顕微鏡（AFM, STMに似た装置で、トンネル電流の代わりに原子間力を用いる）を用いてフィブリンが重合していく様子を観察したドレイクの報告 [B. Drake *et al.*, *Science*, 243, 1586~1589 (1989)] は先駆的研究として興味深い。このようなことは、結晶という制限のあるX線結晶解析や時間分解能の悪いNMR、真空中に、乾いた状態またはせいぜい凍った状態で置いて観察する電子顕微鏡では決してできないことである。今後はAFMも生体物質観察のための重要な道具になっていくと思われる。我々も販売店のデモンストレーションで我々の試料をAFMで観察させてもらった経験があるが、STMとは異なる特性がありSTMと併用していくことでさらに重要な知見が得られるようになると予想される。

発表論文

1991年度日本生物物理学会で発表。投稿論文準備中。