

走査型プローブ顕微鏡による生体構造の精密トポグラフィー解析

Detailed Topographic Analysis of Biological Structures with Scanning Probe Microscope

研究代表者 東京工業大学生命理工学部教授 猪飼 篤
Professor of Department of Bioscience and Biotechnology
Tokyo Institute of Technology
Atsushi Ikai

共同研究者 金沢工業大学工学部教授 西川 治
Professor of Department of Engineering
Kanazawa Institute of Technology
Osamu Nishikawa

Scanning tunneling and atomic force microscopes are two most recent and influential inventions to probe the surface topographies of organic and inorganic materials including biological structures of nanometer scale. When they are applied to the surface analysis of crystalline materials, both methods are capable of achieving atomic resolution. We applied both methods to the analysis of atomic and molecular structures of biological materials including proteins, phages, cells and chromosomes. Resolution of the obtained images was enough to give subunit structures of large proteins but not as high as was expected initially. Measurements of mechanical parameters such as Young's modulus and direct manipulation of the observed samples were more fruitful and original results obtained in this project.

える事を可能にする方法を開発する.

1 研究目的

たんぱく質をはじめとする生体分子の構造を分子・原子レベルの分解能で得ることにより、一つにはそれらの構造の形と表面構造を従来より高い精度で解析する事と目的とした。また、走査型プローブ顕微鏡によって得られる映像の分解能が高まることにより、生体構造の目的とする位置に精度良く探針を移動し、ナノメートル程度の精度をもって試料の局部的物性を測定し、また局部的に加工操作を加

2 研究経過

初年度は原子間力顕微鏡を購入し、これを使用していろいろな大きさ、形と堅さを持つ生体構造を映像化する方法を考案した。特に堅くて丸い構造を持つ酵母細胞は原子間力顕微鏡による映像化がむずかしいものの一つであったが、細胞をミリポアフィルターの穴にトラップしたり、薄い寒天層に生育させることにより、生きた状態での観察に成功した。また走査型トンネル顕微鏡を使用して脂肪酸とその誘導体の映像を得ることを試み、走査

型トンネル顕微鏡による分子映像がどの程度分子軌道法により描かれている電子の波動関数と対応するのかを検討した。

第2年度は分子レベルの分解能を向上することを主眼として、巨大たんぱく質分子であるマクログロブリンのサブユニット構造の解析をおこなった。電子顕微鏡により4個のサブユニット構造が以前から知られていたが、原子間力顕微鏡を使用することにより、同様の分解能でマクログロブリンを観察することが可能であることを示した。

第3年度はたんぱく質1分子の力学的性質の測定と染色体の構造解析および加工操作のための基礎実験をおこなった。たんぱく質に硫黄を含む架橋剤を結合すると、ともに金でコートした基板と探針の間に、Au-Sという結合を生じてサンドイッチ状態となる。この状態から、探針-基板間の距離を増して行くとたんぱく質を上下に伸張するに要する力を測定することが可能であった。この結果を利用して、たんぱく質をアミノ末端とカルボキシル末端で摘んで伸張する実験に取り組んでいる。また、染色体のナノメートルサイズの領域からDNAを取り出して、単一分子PCR法をおこなうことにより染色体の局所におけるDNA塩基配列を決定する試みを進行させている。

3 研究成果

図1の上下二つの図は、それぞれミリポアフィルタと寒天層にトラップされて生育を続ける酵母細胞である。

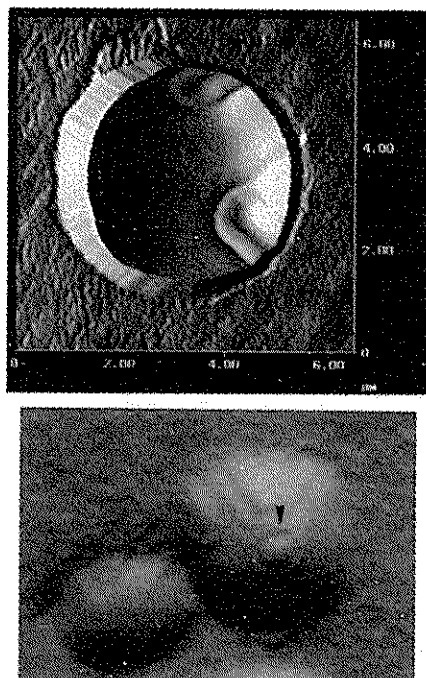


図1：ミリポアフィルタ（上）および、薄い寒天層（下）にトラップされて生育する酵母細胞。

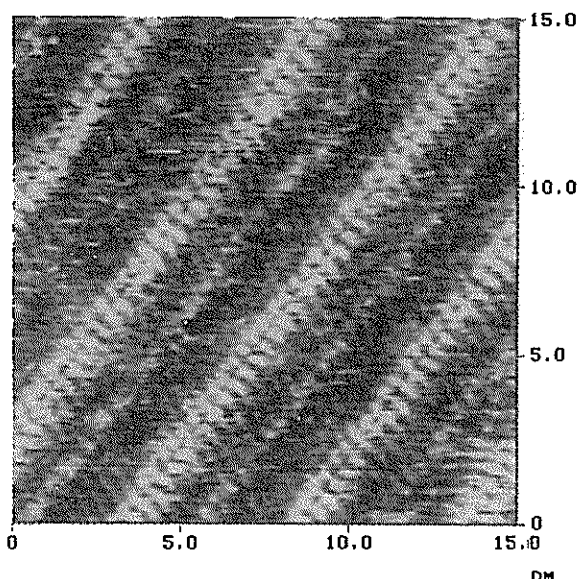


図2：走査型トンネル顕微鏡により映像化されたステアロイルアミドの映像。

また現有の走査型トンネル顕微鏡を使用して結晶基板上に配列した有機・生体分子の原子分解像を得る事に成功し、この映像を量子力学的計算から得た分子軌道の形と比較することを試みた結果を前ページの図2に示した。

図3にはたんぱく質1分子の延伸実験の結果を示すフォースカーブの測定例を挙げる。この場合のたんぱく質は細大の延伸距離がおよそ200 nmと期待される。実際の延伸距離は150 nmに中心を持つ分布をとる。この段階ではたんぱく質のどの位置に-SH基を持つ架橋剤がついているのかが不明であるため、延伸距離に分布があるのはやむを得ない。

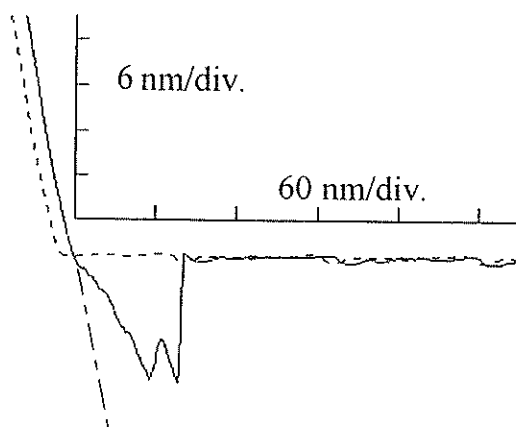


図3：単一たんぱく質分子の延伸実験におけるフォースカーブ。中央の水平線より下にでている分がカンチレバーがサンドイッチされたたんぱく質によって下方に反っている量である。この値とカンチレバーのバネ定数を使ってたんぱく質にかかっている力を知ることができる。サンドイッチされたたんぱく質の長さは横軸の値からカンチレバーの反りを差し引くことにより求められる。

図4は染色体の原子間力顕微鏡による映像である。染色体表面の凹凸模様が観察される。この染色体中のDNA成分は酸性領域で探針と相互作用が大きくなり、探針に粘り着くよ

うになるので、力学的に局所からDNAを引き出すことができる。

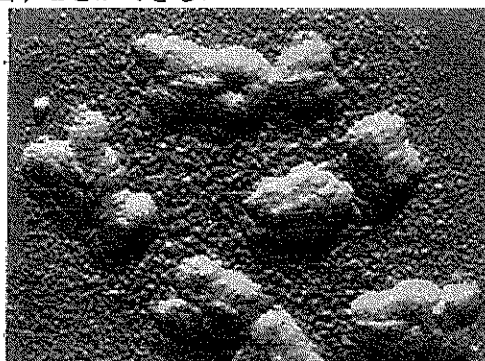


図4：ヒト培養細胞から調製した染色体試料の原子間力顕微鏡によるイメージ。

4 今後の課題と発展

今後の課題を箇条書きにして列挙すると、

1. 低温測定による分解能の改善
2. 探針と試料間の特異的相互作用の解明とそれを利用した表面物性の評価
3. 探針による試料表面の操作を通じての試料の力学物性の評価
4. 探針による試料表面の加工

などがあげられる。特にナノメートル領域に局限した力学的加工操作や化学反応を利用したナノテクノロジー開発は重要な局面となっている。我々の目標としては、本研究で得られた知見をもとに、ナノメートルあるいはサブナノメートルレベルの加工・操作技術の開発を行いたい。そのためには生体関連では染色体の加工がもっとも適したテーマであると考えられる。なぜなら、加工の結果を細胞分裂を通して増幅することが可能だからである。そのためには微小領域に局限してDNA切断酵素の機能を、一定時間だけ作用させるとか、染色体の局限された部分から採取した単一DNAをPCR法により増幅するなどの平行技

術の開拓が必要である。今後、このような分野に取り組んで新しい科学と技術の進展を図りたい。

5 発表論文リスト

1. Keita Mitsui, Masahiko Hara and Atsushi Ikai, (1966) "Mechanical unfolding of alpha-2-macroglobulin molecules with atomic force microscope", FEBS Letters 385 29-33.

2. Hideto Takeuchi, Susumu Kawauchi and Atsushi Ikai, (1966) "Differentiation of Chemically Functional Groups in Stearoyl Amide and Anilide with Scanning Tunneling Microscopy", Jpn. J. Appl. Phys. 35 3757-3758.

3. Umemura, K., Sutoh, K., Tokunaga, F., Kataoka, M., Kamikubo, H., Arakawa, H. and Ikai, A. (1996) "The structure difference of proteins isolated on substrate with different techniques as studied by the atomic force microscope" Scanning, 18 275-290.

4. Ikai, A., (1996) "Review: STM and AFM of Bio/Organic Molecules and Structures" Surface Science Reports (in print)

5. Gad, M. and Ikai, A. (1995) "Method for immobilizing microbial cells on gel surface for dynamic AFM studies" Biophys. J. 69 2226-2233.

6. Sandor, K. and Ikai, A. (1995) "A method for anchoring round shaped cells for atomic force microscope imaging" Biophys.

J. 68 1678-1680.

7. Ikai, A., Imai, K., Yoshimura, K., Tomitori, M., Nishikawa, O., Kokawa, R., Kobayashi, M. and Yamamoto, M. (1994) "Scanning tunneling microscopy/atomic force microscopy studies of bacteriophage T4 and its tail fibers" J. Vac. Sci. Technol. B 12 1478-1481.

8. Osterberg, R., Mortensen, K., and Ikai, A., (1995) Direct Observation of Humic Acid Clusters, a Nonequilibrium System with a Fractal Structure, Naturwissenschaften 82, 137-139.

9. Yoshimura, K., Arakawa, H. and Ikai, A. (1994) "Scanning tunneling imaging of bio/organic molecules and their tunneling properties: fatty acids, their derivatives and cholesteryl stearate" Jpn. J. Appl. Phys. 34 3368-3372.

10. Umemura, K., Arakawa, H. and Ikai, A. (1993) "High resolution images of cell surface using a tapping mode atomic force microscope" Jpn. J. Appl. Phys. 32 1711-1714.