

タンパク質 2 次元結晶と走査電顕法

古 野 泰 二・雀 部 博 之

理化学研究所・フロンティア 351-01 和光市広沢 2-1

(1991 年 10 月 14 日受理)

Two-Dimensional Crystallization of Proteins Studied by Scanning Electron Microscopy

Taiji FURUNO and Hiroyuki SASABE

Frontier Research Program, RIKEN (Institute of Physical and Chemical Research),
Hirosawa, Wako, Saitama 351-01

(Received October 14, 1991)

空気/水の界面に合成ポリペプチドの 1 種であるポリベンジルヒスチジンの単分子膜を展開し、吸着を利用してフェリチンおよびカタラーゼの 2 次元結晶を作成した。これらを疎水処理したシリコンウエハに移し取り、高分解能 SEM を用いて観察した。バルク基板表面におけるタンパク質配列の解析に SEM が有効であることを示した。

はじめに

タンパク質の 2 次元結晶化は、薄膜技術のひとつである。10 年ほど前からリバイバルブームになった LB 法は 60 年の歴史をもつが、昨今の薄膜研究の隆盛に伴い、有機薄膜デバイス作製の重要な一技術とみなされるに至った。対象分子は低分子量の脂質や色素にとどまらず、合成高分子やタンパク質に及ぶ。タンパク質は古くから LB 膜の対象にされてきたが¹⁻⁴⁾、界面変性を抑制しかつ 2 次元結晶化が可能であることが示されたのは最近のことである⁵⁻⁸⁾。そこではリガンドを混入した脂質単分子膜へのタンパク質の吸着が利用される。LB 法の一変法である。清浄水銀表面を使ったタンパク質の 2 次元結晶化については本特集で吉村氏が解説されている。電子顕微鏡を使ったタンパク質の構造解析という基礎分野においても、また、タンパク質を使った薄膜デバイスへの応用という意味でも、タンパク質 2 次元結晶化技術の意義は大きい。

本稿では、吸着用単分子膜として荷電ポリペプチドを使った 2 次元結晶化およびバルク基板表面に移し取った結晶の走査電子顕微鏡解析について紹介する。

生物の分野において走査電子顕微鏡 (SEM) はおもに

大きな構造を立体的に観察するのに用いられてきた。分解能が透過電子顕微鏡 (TEM) に比べて低いためタンパク質の構造解析にはまったく手を出せなかった。5 年ほど前に分解能数オングストロームの SEM が売り出され、タンパク質の構造研究にも役立つ可能性がでてきた。TEM に比べるとまだ分解能も低く、また、電子線照射量が高く試料ダメージの問題も大きい。しかし、導電体であればどんな材質でも基板として使用可能な点で応用研究、たとえばタンパク質デバイス、を見据えたときに捨て難い可能性を秘めている。

1. 実験法

ポリペプチド単分子膜を使ったわれわれの実験法を紹介する。

1.1 基板処理

タンパク質の SEM 観察にとって十分滑らかとはいえないが、ある程度平滑で導電性があり、かつ水平付着用に表面の疎水処理が可能な基板としてシリコンウエハを用いた。シリコン表面はポリッシュして結晶面を出しても空気中では自然酸化膜が生成し凸凹になる⁹⁾。自然酸化膜は絶縁性であるが、SEM 観察の際にチャージアップして観察を妨げるほどではない。ウエハを希望の大き

さにカットし、陶器製のバスケットに並べて中性洗剤で 10 分程度超音波洗浄した。つぎに純水で超音波洗浄を数回行い、60~90°C で乾燥し、低圧水銀灯で紫外線 (185 nm) 洗浄 (UV/O₃ クリーニング) した。バイアル瓶の底に 50 μ l 程度のヘキサメチルジシラザン (HMDS) を入れ、この中にシリコン基板を室温で 1 日もしくは 50~60°C で 1 時間程度保持し、HMDS ガスで疎水化した。

1.2 トラフと単分子膜の展開

図 1 に示すような小型のトラフを用いた。タンパク溶液の表面に展開する単分子膜の Π -A 曲線はあらかじめ普通の LB トラフを用いて測定した。小型トラフでは所定の量をまいて、単分子膜の密度を調整した。このトラフにはいくつかの利点がある。まずタンパク溶液の量が少なくすむ。図に示したものでは約 4 ml であるが、1 ml の容量でも同様のものを作製できる。疎水処理したガラスバリアは水面上をスライドするので、表面の汚れのチェックが容易である。バッファが表面活性な分子を不純物として含む場合やタンパク質が界面変性しやすい場合はバリアが右端まで動かないので容易に判断できる。単分子膜を展開するときにバリアを左寄せの状態から始めることにより、界面変性したタンパク質と展開する単分子膜とが混ざり合うのを防ぐことができる。

われわれの実験では荷電単分子膜としてポリベンジルヒスチジン (PBLH, シグマ社) を用いた¹⁰⁾。PBLH 1 mg に対してジクロロ酢酸 1 μ l を加え、クロロフォルムもしくはクロロフォルム/ヘキサン (1/1 v/v) に溶解した (濃度 0.3~1.0 mg/ml)。ベンジルヒスチジン 1 残基あたり

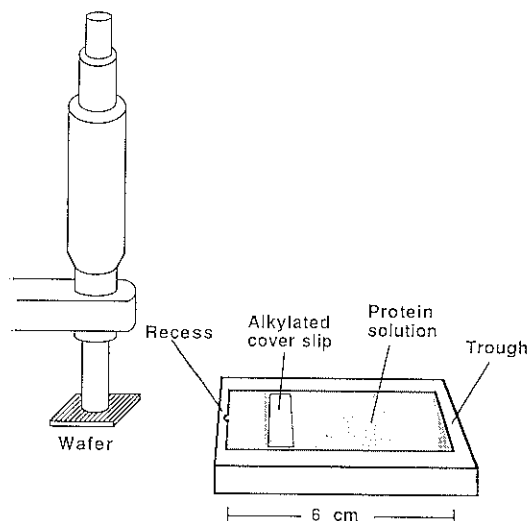


図 1 小型の LB トラフ (デルリン製)

深さ 3mm, 幅 20.4mm, 長さ 60mm。幅 10mm, 長さ 20.0mm の疎水化したカバーガラスをバリアとして用いる。

の占有面積で 14~25 Å²/残基になる量 (0.33 mg/ml で 4.5~8.0 μ l) を連続的にトラフの凹み (図 1) に注入した。タンパク質濃度は 10~50 μ g/ml に調整した。

1.3 膜の移し取りと試料処理

疎水処理したシリコン基板に水面上の膜を確実に移し取るために、直進型のマイクロメータヘッドを用いた。ヘッド先端に両面テープで基板を保持し、基板面と水面との平行性はあらかじめ調整しておいた。溶液量は水面がわずかに凸面になる程度とした。凹面だと移し取りの際に気泡が入るおそれがあるし、逆に大きく凸だと膜が大きく変形しながら基板に移し取られることになる。

試料のひとつフェリチンは内部に大きな鉄酸化物コアを抱くので無染色でも並びを観察することが可能であるが、結晶性の評価にはモリブデン酸アンモニウムもしくはリンタングステン酸で負染色した。カタラーゼは常に負染色を行って観察した。SEM では入射電子による 2 次電子発生量の場合変換が像に変換されるわけであるが、2 次電子のエネルギーは数エレクトロンボルトである。したがって、タンパク質表面を被う染色剤の厚みが大きくなるとタンパク質は隠れてしまい見えなくなる。シリコン表面に移し取った膜を負染色するには 0.1% 程度の染色剤を使い、濡れた基板を垂直にして自然乾燥するか、2% 程度の染色剤を用いた場合は基板表面を下に向けてマイクロ遠心チューブに入れ、毎分 6000 回転で 10 秒ほど回転し余分な染色剤を吹き飛ばした後に乾燥した。

公称分解能 0.7 nm の走査電顕 (日立 S-900) を用いた。SEM 観察でもっとも大きな問題のひとつは検鏡時のコンタミネーションである。加熱ホルダーを用いて試料を 60~80°C に加熱することでコンタミネーションの付着を低減した。

2. 結 果

2.1 PBLH 膜

純水上に広げられた PBLH の膜は流動的であり、圧縮・膨張 Π -A 曲線の再現性が高く履歴が小さい (図 2 (a))。すなわち、柔軟な膜である。これと比較して、水面上でアルファヘリックス構造をとるといわれている中性のポリベンジルグルタマート (PBLG) 単分子膜は単分子膜から 2 分子膜の状態 (図 2 (b) のプラトー領域) を経て崩壊するが、いちど 2 分子膜になると元には戻らず、2 回目の圧縮ではおよそ半分の占有面積から表面圧が立ち上がる。PBLH 単分子膜はタンパク質の結晶化に都合のよいいくつかの性質を有している。まず、PBLH のイミダゾール基は中性~酸性で正に荷電しており、適当な pH で酸性タンパク質の静電的吸着が期待できる。

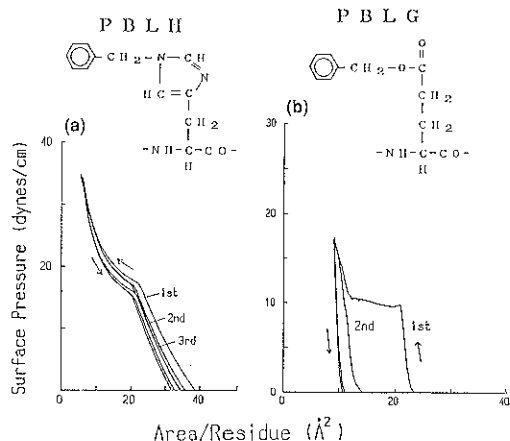


図2 PBLH および PBLG 単分子膜の圧縮・膨張 Π -A 曲線

膜がある程度流動的でタンパク質吸着後の面内拡散が期待できる。疎水性基であるベンジル基の一部は水側を向いているはずであり、タンパク質との疎水相互作用もあると思われる。吸着後の並びの安定化や界面変性の抑制に有効かもしれない。高分子の膜は一般に水平に移し取るのに適しているといわれ、低分子の水平付着で予想されるような分子反転の心配をする必要はあまりない。

2.2 フェリチン

馬脾臓フェリチン¹¹⁾(シグマ社)の等電点は4~5である。図3に示すような稠密構造を容易に作るが、各ドメインサイズはあまり大きくない。また格子の歪みも大きい。同時に作った稠密試料を0.2% モリブデン酸アンモニウムで負染色し、SEM 観察したのが図4である。染

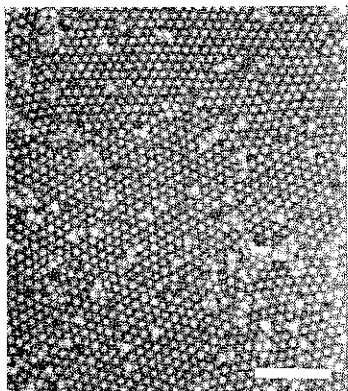


図3 フェリチン稠密パッキングのSEM像。シリコン基板に移し取って純水でリンスした後希薄なモリブデン酸アンモニウム(0.05%)で負染色した。像質は無染色像とほぼ同じである。より明るく見えるフェリチンは下地のフェリチン単分子膜の上に吸着している分子である。バー=100 nm

色が一様でなく、厚い部分ではフェリチンの並びが隠れて見えないか、もしくは淡く見える程度である。染色の均一性は重要である。この中から並びのよいところを選んで計算機回折を行った結果では、最高次3.8 nmの反射が現れるが、フーリエフィルタ像にはタンパク質部分(厚み3 nmの球殻)は認識できない(データは示さな

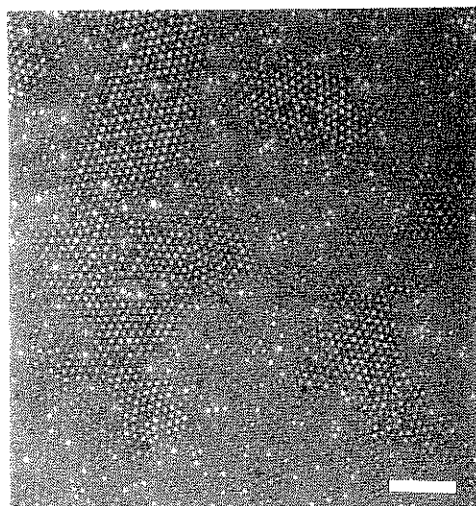


図4 0.2% モリブデン酸アンモニウムで負染色して見たフェリチンの稠密単分子膜。視野全域がフェリチンの稠密パッキングであるが、染色剤が厚い領域では分子像は隠れて見えない。バー=100 nm

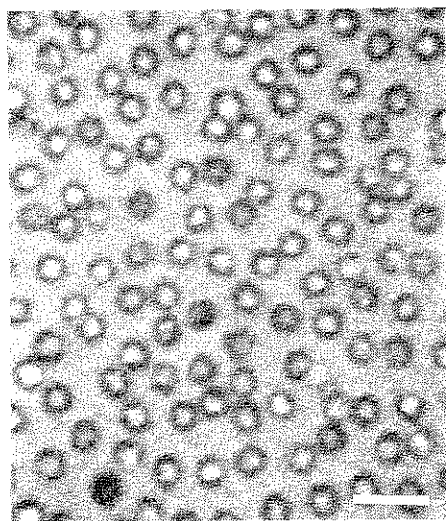


図5 稠密パッキングフェリチン単分子膜をリンタングステン酸(2.5%, pH 7.0)で負染色したSEM像。元の規則的並びが壊れているのがわかる。鉄酸化物コアを取り囲むシェル(アポフェリチン)が暗いリングに見える。コアをほとんどとらない分子も見られる。バー=30 nm

い)。しかし、潜在的には SEM でも観察可能であり、負染色試料でははっきりとこの構造を観察できる。図 5 を見ると明るい鉄酸化物コアを暗いタンパク質のリングが取り巻いていることがわかる。同時に、この試料はもとも稠密構造のフェリチン単分子膜であり、静電的に吸着していたフェリチンの並びが中性の染色処理により破壊された (PBLH からはずれた) ことを示している。

2.3 カタラーゼ

カタラーゼ (牛肝臓、ベーリンガー) は分子量 24 万、ある方向から見たワイヤフレームモデルは図 6 に示すようにおよそ 11×10 nm の長方形的なテトラマー構造の分子である¹²⁾。等電点は 5.7~5.8 であるから、pH 6~7 の範囲で PBLH の膜に吸着することが期待される。タンパク濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ 程度で結晶化を行った。カタラーゼはフェリチンのように金属を大量に内包しているわ



図 6 カタラーゼ (牛肝臓) のワイヤフレームモデル

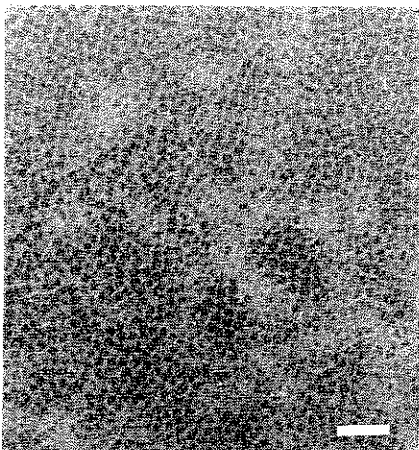


図 7 pH 6 で PBLH 単分子膜に吸着したカタラーゼの稠密パッキング (リンタングステン酸負染色)。バー=50 nm

けではない。フェリチンが特異なタンパク質である。カタラーゼの稠密パッキングはそのままではコントラストが得られないので重金属による負染色を試みた。分子表面の化学的、幾何学的理由に基づき蓄積した染色剤の空間的变化をコントラストとして観察することになる。

図 7 は PBLH に稠密吸着したカタラーゼである。pH 6 で調製したものであるが、吸着は非常に速く 10 分程度でこのような構造となる。規則的並びは見られるがそれほど大きいものではない。

図 8 は pH 4.9 で得られた構造である。吸着は遅くほぼ稠密な構造となるのに 3 時間ほどかかる。実は、図 8 に示した構造は吸着 1 時間後に水面上で室温と 35°C の間で加熱冷却を数回繰返して得たものである。室温に放置したものではせいぜい 15×30 分子程度の 2 次元結晶が最大のものであった。最適条件は pH 5.7、すなわち等電点付近にあるらしい。この pH では吸着が速く稠密

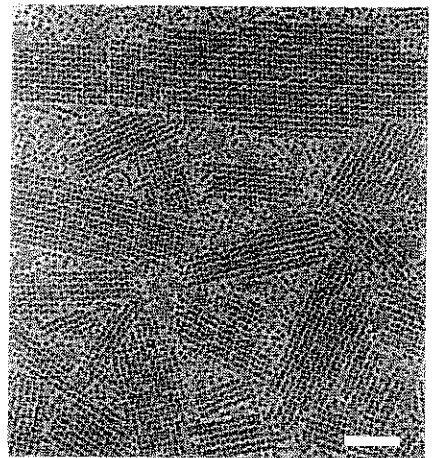


図 8 カタラーゼ 2 次元結晶のリンタングステン酸 (3.0%, pH 5.3) 負染色 SEM 像。室温で 1 時間ほど吸着させた後に、 35°C までの昇温を数回繰返し、室温でウェハに移し取った。バー=100 nm

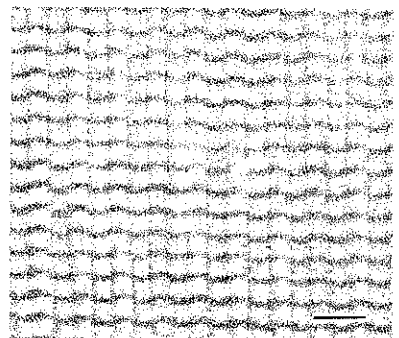


図 9 図 8 に示したカタラーゼ 2 次元結晶のフーリエフィルタ像

構造が短時間で形成されるだけでなく、同時にある程度の2次元結晶も生成する。これを同様の熱処理すると最大 150×70 分子の2次元結晶が再現性よく単分子膜として作成できるようになった¹³⁾。熱処理の工夫次第ではさらに大きなドメインとなる可能性がある。

図9は図8に示した並びのよい部分をフーリエフィルタリングした像である(回折像に現れた最高次3.4nmの反射まで使用)。各分子が長方形をしており、図6のワイヤフレームモデルとはほぼ同方向から見ていと解釈することが可能である。残念ながらフィルタ像からは4量体構造は見えてこないが、まばらに吸着したものを負染色した場合には、実像の上で4量体の形状がよくわかった¹⁴⁾。単分子膜ではないが、カタラーゼは薄板状の3次元結晶を作る。チャージアップの問題は多少あるが、その表面構造もやはり負染色によりSEM観察可能である。フーリエ像には3.0nmのスポットまで見られた¹⁴⁾。

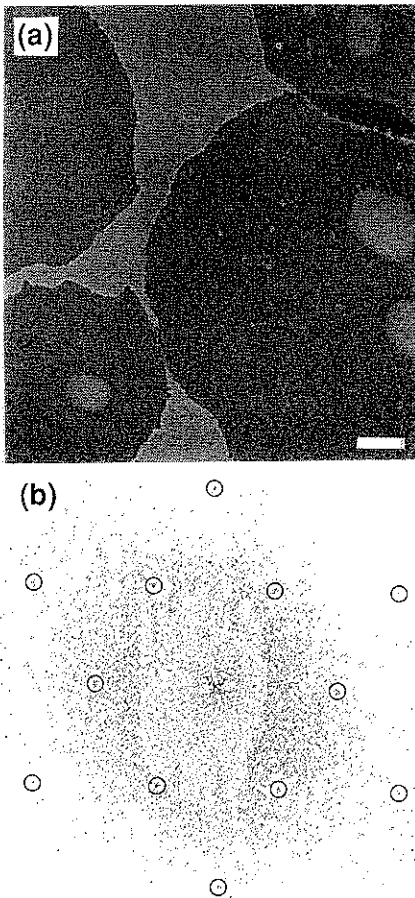


図10 (a)シリコンウエハ上での紫膜の負染色SEM像、バー=100nm、(b)コンピュータ回折像

2.4 紫 膜

紫膜は界面を使った2次元結晶化技術とは今のところ無関係であるが、果してSEMでどこまでの構造情報が得られるかという観点で調べてみた。というのは、紫膜はバクテリオロドプシン(bR)の2次元結晶¹⁶⁾であるが、bR分子の間は膜脂質で埋められており、ここに染色剤が溜るとは考えにくい。膜表面は数オングストロームの粗さしかないと考えられるから、たとえ負染色しても十分なコントラストが得られるという保証はない。タンパク質2次元結晶の中でも最もコントラストの低いものの代表であろう。図10(a)には紫膜片が数枚示されている。およそ $0.3 \mu\text{m}$ 四方の領域をCCDカメラでデジタイズしてフーリエ変換してみると図10(b)に示すような回折像が現れた。最高次は3.1nmの反射である。実像に含まれる結晶構造は、コントラストが低すぎて人間の目では認識できないが、フーリエ変換の結果はノイズに埋もれた周期構造が存在することを示している。このような低コントラスト構造をSEMがとらえたことになる。

3. 考 察

ここでは述べなかったものも含め数種のタンパク質がPBLHの単分子膜に容易に吸着した。PBLHへのタンパク質の吸着は、静電的なものだけではないかもしれない。図8に示した構造はpH4.9で得られたものであるが、このpHではPBLH、カタラーゼともに正に荷電しているはずである。疎水的な吸着も考慮する必要があるかもしれない。フェリチンについてもカタラーゼ同様、熱処理によりドメインサイズがある程度増大することをすでに確認しているが、予備的な段階である。図8では熱処理により微結晶の融合が起こっているように見えるが、今後もう少し詳細に形態変化を調べてみる必要がある。これまでリガンド化脂質を用いた2次元結晶化では脂質膜の流動性が重要であるとされている。しかし、少なくともPBLH/カタラーゼ系では事態はそう単純ではなさそうである。高温(40°C)で移し取った膜を見る限り結晶サイズも大きくないし、結晶性も良くないようである¹³⁾。

本稿で強調したい点のひとつは、'高分解能SEMを用いてバルク基板上のタンパク質の並びを解析できる'ということである。3つの試料の解析から、タンパク質試料に対してほぼ3nmの分解能を得ることは可能であるといつてよい。分解能の限界については並びの良い2次元結晶を用いて確かめる必要がある。SEMではTEMに比べて100~1,000倍の電子線照射量である。ダメージを低減するには試料を低温で観察する方法(クライオ

マイクロスコーピー) も考えられるが, 本質的には電子線照射量を1桁以上減らす必要があると思われる。通常用いられているシンチレータ, フォトマル, 長残像ブラウン管の組合せではノイズレベルが高くコントラストを上げられない。電子計数装置とフレイムメモリーの組合せをメーカーに望みたい。

最後に, われわれは当分 PBLH 膜を頼りにして, タンパク質の2次元結晶化を試みていくであろうが, この方法の一般性を見定めることを研究のひとつの柱としたい。

文 献

- 1) I. Langmuir and V.J. Schaefer: *Science* **85**, 76 (1937).
- 2) I. Langmuir and V.J. Schaefer: *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 1351 (1938).
- 3) D.F. Cheesman and J.T. Davies: *Adv. Protein Chem.* **9**, 439 (1954).
- 4) L.K. James and L.G. Augenstein: *Adv. Enzymol.* **28**, 1 (1966).
- 5) P. Fromherz: *Nature* **231**, 267 (1971).
- 6) E.E. Uzgiris and R.D. Kornberg: *Nature* **301**, 125 (1983).
- 7) H.O. Ribi, D.S. Ludwig, K.L. Mercer, G.K. Schoolnik and R.D. Kornberg: *Science* **239**, 1272 (1988).
- 8) J.P. Robinson, M.F. Schmid, D.G. Morgan and W. Chiu: *J. Mol. Biol.* **200**, 367 (1988).
- 9) A.H. Carim, M.M. Dover, C.F. Quate, R. Sinclair and C. Vorst: *Science* **237**, 630 (1987).
- 10) T. Furuno, H. Sasabe and K.M. Ulmer: *Thin Solid Films* **180**, 23 (1989).
- 11) E.C. Theil: *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 289 (1987).
- 12) M.R.N. Murthy, T.J. Reid III, A. Sicignano, N. Tanaka and M.G. Rossmann: *J. Mol. Biol.* **213**, 899 (1981).
- 13) 佐藤文乃, 豊島 近, 古野泰二, 雀部博之: 日本生物物理学会第29回年会 (1991).
- 14) T. Furuno, K.M. Ulmer and H. Sasabe: *J. Electron Microsc. Tech.*, in the press.
- 15) R. Henderson, J.M. Baldwin, T.A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann and K.H. Downing: *J. Mol. Biol.* **213**, 899 (1990).