

Title	ストレプトアビジン2次元結晶表面へのビオチン化タンパク質の結合： 原子間力顕微鏡によるイメージング
Sub Title	Binding of biotinylated proteins to the two-dimensional crystal surface of streptavidin studied by atomic force Microscopy
Author	古野, 泰二(Furuno, Taiji)
Publisher	慶應義塾大学日吉紀要刊行委員会
Publication year	2004
Jtitle	慶應義塾大学日吉紀要. 自然科学 No.35 (2004.) ,p.29- 44
JaLC DOI	
Abstract	2つの課題を中心に研究を進めた。(1)ストレプトアビジン2次元結晶膜(SA膜)作成法の開発, および(2)SA膜表面への結合によるビオチン化タンパク質の安定化を利用した1分子原子間力顕微鏡(AFM)イメージング法の開発である。課題(1)についてはこれまでの方法をリファインし, かなりの程度隙間無く基板(シリコンウエハ)表面をSA2次元結晶で覆うことができるようになった。また, AFM走査パラメータの適正化などにより, 市販のAFMプローブをそのまま用い, 再現性のよいSA結晶の高分解能イメージングが可能となった。課題(2)では, カタラーゼやフェリチンなどをビオチン化してSA膜2次元結晶面に結合固定し, AFMイメージングを試みた。SA膜はビオチン化タンパク質固定のための理想的基盤であり, これを利用した1分子AFMイメージングおよびタンパク質を利用した素子開発へと今後の展開が期待される。
Notes	
Genre	Departmental Bulletin Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN10079809-20040000-0029

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

ストレプトアビジン2次元結晶表面へのビオチン化タンパク質の結合

——原子間力顕微鏡によるイメージング——

古 野 泰 二

Binding of Biotinylated Proteins to the Two-Dimensional Crystal Surface of
Streptavidin Studied by Atomic Force Microscopy

Taiji FURUNO

2つの課題を中心に研究を進めた。(1)ストレプトアビジン2次元結晶膜(SA膜)作成法の開発, および(2)SA膜表面への結合によるビオチン化タンパク質の安定化を利用した1分子原子間力顕微鏡(AFM)イメージング法の開発である。

課題(1)についてはこれまでの方法をリファインし, かなりの程度隙間無く基板(シリコンウエハ)表面をSA2次元結晶で覆うことができるようになった。また, AFM走査パラメータの適正化などにより, 市販のAFMプローブをそのまま用い, 再現性のよいSA結晶の高分解能イメージングが可能となった。課題(2)では, カタラーゼやフェリチンなどをビオチン化してSA膜2次元結晶面に結合固定し, AFMイメージングを試みた。SA膜はビオチン化タンパク質固定のための理想的基盤であり, これを利用した1分子AFMイメージングおよびタンパク質を利用した素子開発へと今後の展開が期待される。

1. 序論

本研究では3つの重要な技術が関連し合っているので, 全体の話をつかり易くするために, 最初にそれらについて簡単に説明を加えておく。その3つとは, 「ビオチン-アビジン結合」, 「AFMバイオイメージング」および「タンパク質2次元結晶化技術」である。

1.1 ビオチン-アビジン結合^{1,2)}

ビオチン (biotin) というのは, タンパク質ではなくビタミンHの別名である。一方, アビジン (avidin) というのは分子量が1万5千ほどのサブユニットからなる4量体タンパク質で, その表面に糖鎖を結合している糖タンパク質の1種である。アビジンの各サブユニットは

慶應義塾大学医学部物理学教室 (〒223-8521 横浜市港北区日吉4-1-1) : Dept. of Phys., Keio Univ. School of Medicine, Hiyoshi Campus, 4-1-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama, Kanagawa 223-8521, Japan. [Received Oct.10, 2003] e-mail: furuno@hc.cc.keio.ac.jp

1分子のビオチンを結合するので、アビジン1分子は合計4分子のビオチンを結合できる。アビジンは卵白に多く含まれる。したがって、生卵を過剰に摂取するとビタミンH不足に陥ることがある。

生物界には、2つの分子が結合し、そして反応して第3の分子に変化したり、また、結合した2つの分子が主役となって第3の分子を変化させたり、さらには、次々に分子をつなぎ合わせていったり、といった反応が多く知られている。では、ビオチン-アビジン結合が他の分子間相互作用と大きく異なる点は何か？ それは、 10^{15}M^{-1} と言われる極めて大きな結合定数、すなわち結合の安定性であり、一度結合したビオチンはアビジンをほとんど変性状態にまで持っていけない限り解離しない。しかも、アビジン自身かなり安定なタンパク質であるから、ビオチンはアビジンに結合したまま安定に存在すると考えてよい。2つの分子が強く結合するという性質を利用して種々の応用が期待できる。このことはマクロな世界と比較してみるとよく分かる。ある構造体を組み上げていくには、接着剤、釘、ビス、鉄筋など、2つのユニットを接合し安定化する多くの物質や仕掛けが必要になる。ビオチン-アビジンも分子の世界の接着システムであり、生化学や遺伝子工学における分離精製、分析評価、医療における診断、生物物理学における試料調製など、すでに幅広く応用されている。

ところで、いま流行のナノテクノロジーの取り扱う題材は広範である。分子が絡む技術はすべてナノテクノロジーではないかとも考えられるが、ナノテクノロジーであるためには分子を“操作”するというニュアンスが必要であると言われる。このようなときに必ず必要となるのが、分子の結合や固定であり、複合体の形成である。したがって、ビオチン-アビジン技術はナノテクノロジーにおいて使えるはずであり、実際、使われ始めている。ただし、アビジンは等電点が10付近にあり、しかも糖鎖をまとっているため非特異的な吸着が起こりやすい。放線菌の1種 *Streptomyces avidinii* が生産するストレプトアビジン (Streptavidin, SA と略す) の等電点は6付近にあり、糖鎖をもたない。したがって、生理条件では非特異吸着は起こりにくく、多くの場合 avidin よりも扱いやすい。本研究では、SA 2次元結晶膜を中心に報告するが、アビジンの2次元稠密配列もすでに作成可能である。

1.2 AFMバイオイメーシング

たんぱく質1分子イメージングという観点からAFMを概観してみる。AFMは走査プローブ顕微鏡 (Scanning Probe Microscope, SPM) ファミリーの一員であり、1986年に走査トンネル電子顕微鏡 (STM) の発明でH.Rohrerとともにノーベル賞を受賞したG.Binnigの発明による³⁾。最初に発明されたSTMでは、先端の尖った導電性のプローブ (探針) と導電性試料の間に電圧をかけたとき流れる微弱な電流を利用して、試料表面の凸凹や電子状態を画像化する。いっぽうAFMは、電気を流さない物質、すなわち、絶縁体の表面に尖った探針を押し当てながら力を検出しつつ表面の凸凹を探る。あたかも目をつぶった人が杖の先で物体の表面をなぞりながら凸凹をイメージするような方法である。ただし、AFMで使われる探針 (tip) は、カンチレバー (cantilever) と呼ばれる小さな薄い板バネ (長さ0.1mm, 厚み $0.5\mu\text{m}$ 程度) の先

端に半導体リソグラフィ技術を応用して作られる。

医学、生物学、生物物理学における AFM の利用は発明とともに始まった^{4,5)}。その一番の理由は、導電性のない生体もしくは生体分子の構造を生理的条件下で直接イメージできると期待されたからである。ところが、AFM が生体分子の高分解能イメージングに役立つことがはっきりと認識されるようになったのは、今から 10 年ほど前、膜タンパク質 2 次元結晶などの高分解能像が報告されるようになってからのことであろう。では、それから 10 年経った今ではもう誰でも使える道具になったか、というところではない。タンパク質 1 分子を基板に孤立して載せたような試料では、生理条件下で分子形状を観るのはきわめて困難な状況が続いている。3 つの大きな理由があると考えられる。1) 1 分子を力学的に安定に基板に固定するのが難しい、2) 走査中の AFM ティップが分子におよぼす力は分子を大きく変形させたり基板からの脱離を引き起こす、3) ティップの先端形状が鈍で、分子が実際以上に巨大化して見えることを避けられない (ティップ先端形状と分子形状によるコンボリューション効果)。

1) の基板への固定の問題は簡単そうに見えて難しい。基板表面に化学的に架橋する方法は分子にダメージを与えやすいし、物理吸着では弱すぎて、ティップ走査のときの横方向の力に耐えられない。この問題を AFM 技術の向上により回避もしくは低減するために、2) ティップを縦方向に共振させながら走査していく方法 (タッピングモード) が開発された。この方法は横方向の力を弱めるにはよい方法であるが、水中の孤立 1 分子に対してはそれでもなお不完全である。3) のティップ先端形状については、最近のカーボンナノチューブ技術に期待するところが大きい。通常の AFM ティップ (材質はシリコンナイトライド) の先端に単層カーボンナノチューブを成長させ、AFM イメージングで使えることが報告されている⁶⁾。ただし、生理条件下 (水中) の 1 分子イメージングでは、これまでのところカーボンナノチューブによる成功例はないようである。

1.3 タンパク質 2 次元結晶化技術

通常、タンパク質の結晶といえば 3 次元結晶を指し、主たる用途は X 線結晶構造解析ということになる。タンパク質分子の機能を解析するために構造解析は必須である。シンクロトロン放射光、構造解析法、データベースの充実などのおかげで、かつては数年を要していたタンパク質の構造解析が低分解能であれば週単位で可能な時代になってきており、最終的なボトルネックは結晶化そのものであると言われる。すなわち、分子構造が細かいところまでよく見えるかどうかは、結晶の質の良し悪しにかかっているのである。構造解析時間の短縮は創薬などタンパク質応用研究にとってきわめて重要なのである。

いっぽう、膜タンパク質などは 3 次元結晶化が困難な場合が多く、むしろ 2 次元結晶化しやすい。もちろん、1 枚の 2 次元結晶を X 線結晶構造解析することは実際上無理であるが、電子顕微鏡による構造解析により、いくつかの膜タンパクでは原子分解能の構造に到達している。ただし、この技術はその特殊性によって、X 線構造解析ほど一般化されていない。また、AFM によっても膜タンパク質 2 次元結晶の表面構造がサブナノメートル分解能で解析可能であり、場

合によっては構造変化も明瞭にイメージできる⁷⁾。

膜タンパク質の電子線結晶構造解析では、結晶ドメインサイズが1 μm もあれば十分好ましいが、本研究で興味をもっているのは、マクロサイズの2次元結晶膜、もしくは基板表面を2次元結晶の集合体で覆い尽くす技術である。将来、タンパク質2次元結晶をデバイスとして利用するときには、基板表面を“覆い尽くす”ことが基盤技術として必要と考えられるからである。最近では、金属タンパク質の2次元配列を半導体デバイスへと応用するナノテクプロジェクトも始まっている。また、プロテオミクスの時代到来といわれる昨今、2次元結晶膜はプロテインチップの基盤構造のひとつとなる可能性が高い⁸⁾。

タンパク質2次元結晶膜作成技術の基本のひとつは気・液界面の利用であり、固体基板表面に直接タンパク質2次元結晶化するのは相当に困難である。気・液界面としてはヘリウム・水銀が用いられることもあるが、一般的なのは空気と水の界面である。目的タンパク質のリガンドを頭部にもつ脂質を他の流動的な脂質と混合して気・水界面に展開し、ここにタンパク質を結合させて2次元結晶化する方法、界面の脂質膜に静電的に吸着させる方法、脂質リポソームに膜タンパク質を再構成したあと界面に展開する方法などが知られている。S-layerと呼ばれるきわめて2次元結晶化しやすいタンパク質とキメラ化して2次元膜化するような複雑なプロセスを使う方法もある。われわれが採った方法は、中性pH付近で正電荷を帯びた合成ポリペプチド膜（ポリベンジルヒスチジン）に静電的に水溶性タンパク質を吸着させ結晶化する方法である⁹⁾。脂質膜にせよポリペプチド膜にせよ、界面というのはタンパク質を変性させやすい危険な場であるので、これらの方法でどんなタンパク質でも2次元結晶化できるというわけではない。いまだ推測の域を出ないが、吸着後稠密化して2次元結晶にまで到達するには、タンパク自身が安定、すなわち、丈夫でなくてはならないと考えている。

1.4 研究目的

おそらく、ミリ～センチメートルサイズのシリコン基板表面を半導体結晶並の欠陥の少ないタンパク質2次元結晶膜で覆うのは不可能と言ってよい。結晶化プロセスや気水界面から基板表面への移し取りの過程で大量の欠陥が膜内に発生するはずである。ただし、本研究ではデバイスプロセスを開発するわけではないので、ミクロンもしくはサブミクロンサイズの高結晶構造が再現性よく得られることを期待している。

こうして作成したSA膜にビオチン化タンパク質分子を結合し、SA膜が分子固定のための場として利用できることを生理条件下（水中）のAFM観察で示したい。さらには、高分解能AFMイメージングに必要な分子の安定固定にも有用であることを示したい。

1.5 応用可能性

組換えを行った遺伝子の発現解析を行うのに、最近では、基板上にDNAを小さなパッチ状に配列したDNAチップが使われることが多くなった。そこでは、目的遺伝子が作り出すmRNAの逆転写で作ったcDNAと基板に固定されたDNAとの塩基対形成を検出するという手

段が用いられる。ただし、この方法はある意味では間接的であって、mRNAの合成は必ずしも対応するタンパク質が細胞中で盛んに合成されていることを保証しない。従って、細胞内のタンパク質を微量検出できるプロテインチップ¹⁰⁾の開発・市販が望まれる。

商品化を目指し、プロテインチップ開発への企業の参入が相次いだが、抗体チップなどの製品化はまだ難しい状況である。DNAチップでは、DNA末端を単に固体表面に固定すればチップとしての機能を果たしうるわけであるが、プロテインチップのタンパク質は固定された状態で機能を維持していなければならない。ところが、固定という操作はタンパク分子の機能を劣化させる可能性が高い。単に固体表面に吸着、もしくは、分子が溶液表面に現れるだけで変性するタンパク質も多い。

本研究で用いたSA結晶膜表面がタンパク質の吸着表面として安全かどうかは明らかではない。しかし、一般に、親水性タンパク表面に他のタンパクが吸着する傾向は低いようであるし、ビオチンとタンパク表面との間にはある程度の長さのスペーサーが入れてあるので、ビオチン化タンパクにとって、SA膜表面はそれほど危険な場ではないかも知れない。さらには、タンパク質のビオチン化はマイルドな処理であり、タンパク質機能は維持されることが多いことが知られている²⁾。以上のことから、SA膜に固定されたビオチン化タンパク質は、AFMイメージングのみならずデバイス化における基盤構造としても有用と考えられる。

2. 実験方法

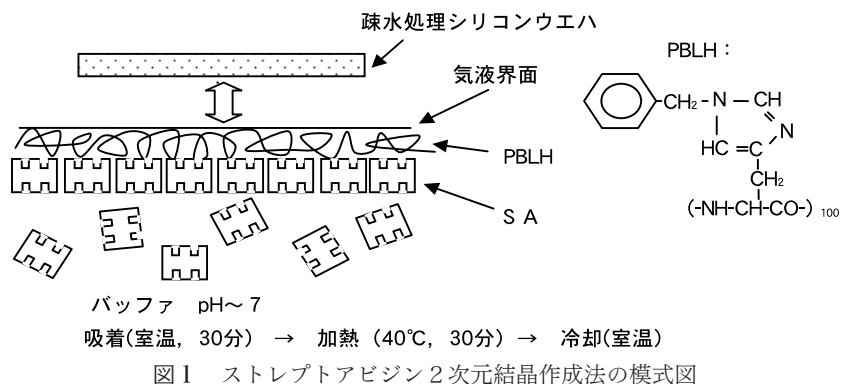
2.1 試料作成

合成ポリペプチドの1種であるポリベンジル-L-ヒスチジン (PBLH, Sigma) のクロロフォルム溶液を気・水界面に展開して単分子膜化し、水溶液側からこの膜にタンパク分子を吸着させることにより、これまで数種の水溶性タンパク質の稠密構造および2次元結晶を作成してきた⁹⁾。本研究におけるストレプトアビジンの2次元結晶化についても、基本的には既報に従ったが、実験条件について再検討し最適化を図った。

ストレプトアビジンはシグマ社のアフィニティ精製品 (P4762) を購入し、さらに分子サイズクロマトカラム (G3000XL, TOSO) で精製した。LBトラフ (内寸 $2 \times 7 \times 0.2$ cm) に満たした緩衝液 (50mM HEPES, pH7.0, タンパク濃度 $6 \sim 10 \mu\text{g/ml}$) の気液界面に、マイクロシリンジを使いPBLHクロロフォルム溶液を連続的に展開した (表面密度 $1/17$ 残基/ $\text{\AA}^2$)。室温で30分吸着させ、その後40°Cに昇温して30分保持した後冷却した。こうして界面で熱処理生成したストレプトアビジンの2次元結晶膜を水平付着法により、疎水処理したシリコンウエハ ($\sim 4 \times 5$ mm) に転写した後、純水中に冷蔵保存し、必要に応じて室温に戻して使用した (図1)。

馬脾臓フェリチン、牛肝臓カタラーゼ、およびストレプトアビジンをNHS-LC-Biotin (ピアス社) によりビオチン化した (ビオチン化度: $1.5 \sim 3$ ビオチン/タンパク)。

ビオチン化タンパク質のリン酸バッファ溶液 (100mM リン酸, 150mM NaCl, pH 7.2) を



SA 2次元結晶膜に滴下して所定時間保持し結合を待った後、純水で洗浄してAFMイメージング用試料とした。

2.2 AFMイメージング

スタンドアロン型AFM (Explorer, Topometrix社) に水中イメージング用チューブスキャナ (Z-range $0.8\mu\text{m}$) をセットし、水中タッピングモードによるイメージングを行った (共振周波数 $\sim 50\text{kHz}$; カンチレバー先端振幅 $\sim 10\text{nm}$; 振幅減衰率 1 $\sim$ 5%; ティップ走査速度 4 $\sim 20\mu\text{m/s}$)。シリコンナイトライド製カンチレバー (OMCL-TR800PS, バネ定数 0.67 N/m , オリンパス社) を使用し、トポグラフ像およびエラーシグナル (ディフレクション) 像を測定した (図2)。得られたAFM像に対する処理は走査ラインに対する傾斜補正のみとし、スムージングもしくはシャープニングは行わなかった (スキャナ未較正のため、掲載したAFM像は10%程度の長さの誤差を含む)。

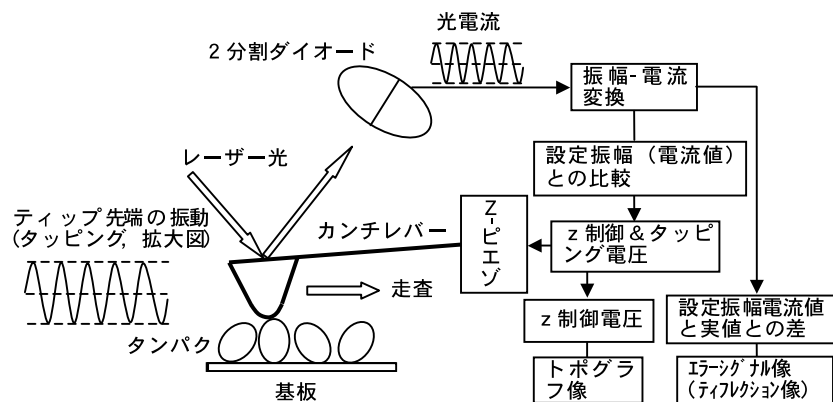


図2 タッピングモードAFMによるトポグラフ像とエラーシグナル像の取得原理

3. 結果

3.1 ストレプトアビジン 2 次元結晶の AFM 像

ストレプトアビジン 2 次元結晶の作成法と超高分解能 SEM によるイメージングについてはすでに報告済みである⁹⁾。SEM 観察においては、タンパク質 2 次元結晶をそのままでは観察できないので、重金属（メチルアミンタングステン）で負染色した。しかし、分子配列が観察されないような領域では本当に分子が存在しないのか、それとも分子が厚い染色剤に埋もれて観察できないのか、区別は容易ではなかった。ところが本研究では、移し取った膜をそのまま水中で観察するのであるから、乾燥や重金属染色によるアーティファクトは発生しない。ただし、水面から移し取るときの膜に対する大きなダメージ、および走査中ティップから分子に加わる横方向の力による分子変形や脱離の可能性は排除できない。本研究で観られた結晶ドメインサイズは 100–500nm の場合が多かった。図 3 は比較的大きな結晶ドメインを比較的シャープなティップによりイメージしたものである（ティップ先端形状については“考察”参照）。

結晶がパッチ状となり、パッチ間にはランダムに分子が吸着している場合もある（図 4）。パッチ状構造が気水界面での構造に由来するのか、それとも移し取りの際に発生したものなのかははっきりしない。AFM 像には 1 分子もしくは数分子の抜けも観察される。トポグラフィック像で明瞭に見られる分子の抜けは、ディフレクション像ではさらに明瞭に見える。結晶の有無だけであれば、トポグラフィック像よりもディフレクション像の方が鮮明に見える。AFM による試料表面のトレースが完璧であれば、ディフレクション像には構造が出現しないはずであるが、実際にはこの理想からはずれる。したがって、特に理由がない場合は、2 次元結晶のルーチンの評価にはディフレクションモードを用いる方が手軽である。

いっぽう、膜が裂けたようにみえる構造も頻繁に観察される（図 5）。隙間の部分には分子があまり見られない。全体像をフーリエ変換してみると、多くの膜片の結晶軸の方向はかなり揃っていることが分かる。移し取りの際の応力により、膜が裂けたとみるのが自然かも知れない。水面上ですでに裂けているとするならば、各結晶膜片の向きは移し取りの際にもっと不揃いになるはずであろう。

3.2 カタラーゼ 2 次元配列 — 高分解能 1 分子像

ところで、同種タンパク分子の 2 次元稠密配列を作れば、たとえ 2 次元結晶でなくとも分子形状の細かな部分をみることができる。図 6 はこのことを示すもので、気・水界面で作成したカタラーゼの 2 次元配列をシリコンウエハに移し取り、水中でタッピング AFM 観察したものである。完全にランダムな配列ではないが 2 次元結晶的ではない。図 6（挿入図）で見えるように、カタラーゼはホモ 4 量体分子（単量体の分子量～6 万）であり、222 対称性をもつ。もともと平坦に見える向きに分子を置くと、概観的には $10 \times 11 \text{ nm}$ 程度の角の落ちた角形に見える。平面上に蝶の羽のように配置した 4 つのサブユニット構造に少し捻りを加えたものと思えばよ

い。

この構造によれば、平面上に分子を置いたとき中心部は密度が低くトポグラフ像は凹んで見えるが、中心を囲む周囲部分は同等の高さには見えないはずである。実際、図6の多くの分子において、中心部は暗く（低く）、周囲は明るい部分（高い部分）と暗い部分（低い部分）の両方を持つものが多い。すなわち、多くのカタラーゼ分子の像は捻れたテトラマー分子を平面に置いたと仮定したときに予想されるトポグラフィによく対応している。このように、2次元稠密配列はティップからの横方向の力に打ち勝って、分子構造に忠実なトポグラフ像を与えうる力学的に安定な試料（構造）である。ただし、AFM実験では観察条件をまったく完全に再現することは困難であり、毎回このような忠実な像を得るのは難しいが、結晶性の評価とおよその分子形状のイメージングはかなりの高頻度で再現可能である。

3.3 ビオチン化フェリチンおよびビオチン化カタラーゼのSA膜への結合

SA膜表面でイメージされたビオチン化分子が、ビオチン-ストレプトアビジン結合によるものか、単なる非特異吸着なのかを区別しなくてはならない。しかしながら、ビオチン結合部位はSA分子内部にあるわけであるから、SA膜表面に結合した1分子をイメージすることにより直接それを判断することは原理的に不可能である。そこで、本研究ではまず、非ビオチン化フェリチンとビオチン化フェリチンのSA膜への吸着の差を同一実験条件で比較することにした。したがって、非ビオチン化フェリチンに対しては、SA膜に非特異的に弱く吸着したフェリチン分子をAFMイメージすることになる。両者のリン酸バッファ生理食塩水溶液（20 $\mu\text{g/ml}$, pH7.2）をSA膜面に滴下し10分放置した後、純水でリンスしAFMイメージを行った。非ビオチン化フェリチンでは、明らかに吸着分子数が少なく、図7(a)では ~ 200 個/ μm^2 である。その割に占有面積が大きく見えるのは、吸着数が少なく分子間が離れていてティップコンボリューション効果が顕著となったためである。一方、ビオチン化フェリチンでは、同じ吸着条件ですでに稠密パッキングを作る（図7(b)）。この2つを比較するとまったく状況が異なっていることが分かる。ビオチン化フェリチンのSA膜への結合は、PBLH法で作成する2次元結晶フェリチンの吸着密度に匹敵する。

フェリチンは分子量1.8万のサブユニット24個が集合し、外径13nmの球殻構造を作る。したがって、本実験でおこなったランダムなビオチン化処理により、SA膜に結合した各フェリチン分子はランダムに配向するとしても、対称性により各分子はほぼ同等に球状に見えるはずである。いっぽう、ビオチン化カタラーゼおよびビオチン化ストレプトアビジンについても同様の吸着実験を行った。しかし、いずれの稠密パッキング試料も各分子を明瞭に区別するのが困難な場合が多かった。特にカタラーゼではその傾向が著しく、かろうじてカタラーゼ粒子が判別できる試料もあるが（図8）、試料によってはイメージングそのものが不可能であった。図7(b)に示したフェリチンのAFM像も、PBLH膜に吸着した非ビオチン化フェリチンの稠密配列に比較すると、像質に関してかなり劣る印象である。タッピングの際のティップ先端の振動が不安定になり、これがノイズとして像に重畳されている可能性がある。検討が必要である。

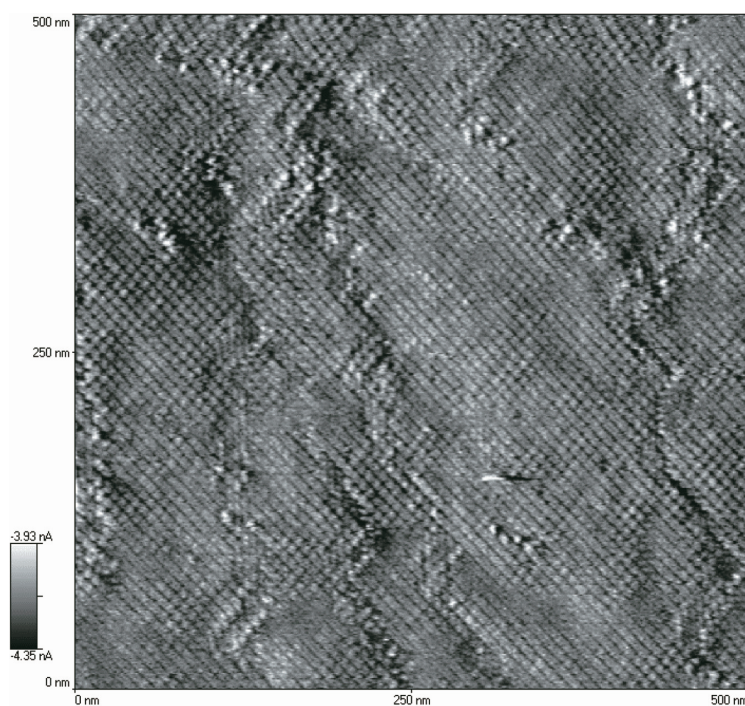


図3 SA 2次元結晶のAFM像 (ディフレーション像)。

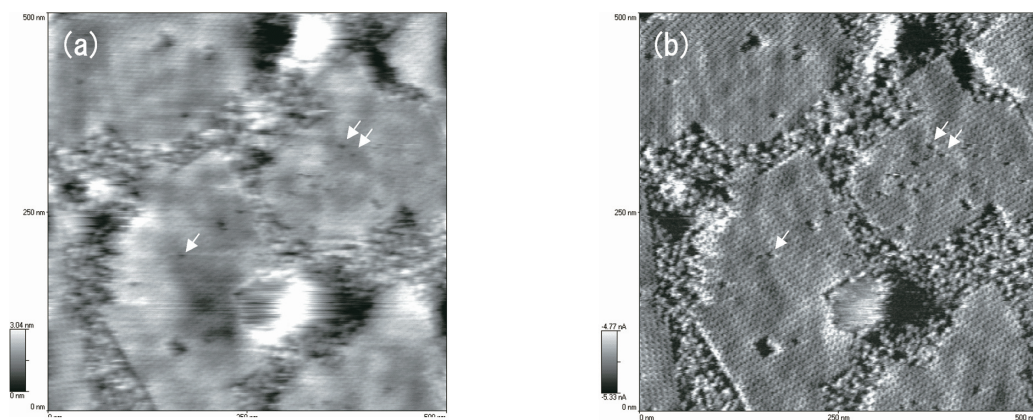


図4 パッチ状になったSA膜（トポグラフ像とディフレクション像との比較）。
(a)トポグラフ像、(b)ディフレクション像。矢印は2次元結晶中の分子欠陥を指す。

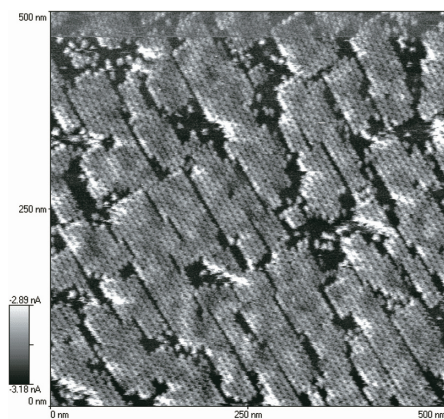


図5 水面から基板に移し取るときに起きたと思われるSA膜の断片化構造（ディフレクション像）。

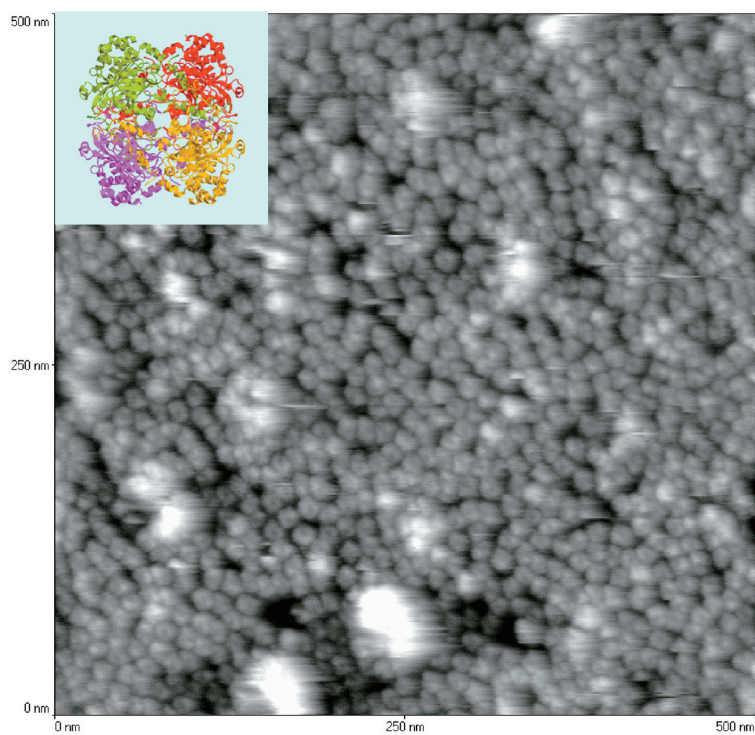


図6 稠密2次元配列したカタラーゼ（トポグラフ像）。
挿入図はカタラーゼ結晶構造のリボン模型（異なるポリペプチド鎖を色分けした）。PDB登録の4 BLC.pdbを分子表示ソフト RasTop を使って表示した。

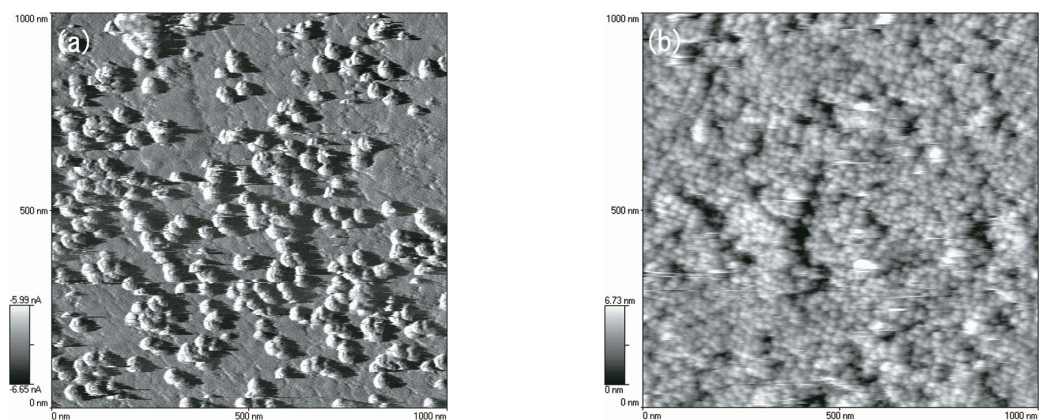


図7 SA膜へのフェリチン分子の結合。

(a)非ビオチン化フェリチン (ディフレクション像)；(b)ビオチン化フェリチン (トポグラフ像)，ビオチン化度=2.2ビオチン/フェリチン。

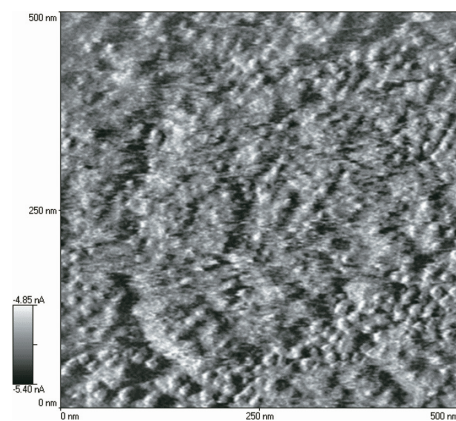


図8 ビオチン化カタラーゼのSA膜への結合。

カタラーゼ濃度 $10\mu\text{g/ml}$, PBS (pH7.2), 10分インキュベート (ビオチン化度 2.6ビオチン/カタラーゼ)。

この実験で行ったように、タンパク質表面（主にリジン残基）をランダムにビオチン化する場合には、異方的形状をもつタンパクの並びは基板面内のみならず、面に垂直な方向に関してもランダムとなる。その結果、2次元結晶と比較してイメージングは著しく難しくなるであろうし、得られた像から何かを語るのもかなり困難になると思われる。少なくとも、膜タンパク質2次元結晶に対して有効性が証明されているフーリエフィルタリング法や相関平均法は適用できない。

4. 考察

使用したシリコンナイトライドティップの先端曲率半径は15nm（メーカー保証値）である。この大きさでは数ナノメートルの大きさしかないタンパク分子（2次元集合体）の表面形状を高分解能で見えることは不可能である。ティップを薄く金属コートして超高分解能SEMで観察してみると、ティップ先端はほとんどの場合球形をしておらず、形状・大きさもいろいろである。ただし、メーカー保証値をほぼ満たしている。では、なぜこのようなティップを使って、サブナノ分解能の像が報告されているのであろうか。想像されている先端形状は図9に示すようなものである。すなわち、ティップの大まかな先端半径は15nmであるが、高分解能イメージングが可能なティップ先端はとがったとげのような形状をもつだろうという見方である。このようなティップを使っても、独立した粒子はコンボリューション効果により実寸よりもずっと大きく広がって見えてしまうが（図7(a)）、2次元結晶のように被写体表面の凸凹が均質で浅い場合には、サブナノ分解能の表面構造がAFM像に現れてくる。これは単に表面の凸凹が浅いために先端のとげが有効となるだけでなく、各分子が2次元配列の中で横方向の力に対して安定化されているという力学的要因も寄与している。高分解能でイメージング可能な試料では、ティップ先端部のうち、とげ以外の曲率半径の大きな部分（尖っていない部分）と試料面との間にも圧力が働いている（圧力を担っている）¹¹⁾。そうでないとすると、とげがタンパク分子に及ぼす圧力が高くなりすぎ、分子が大きく変形するため高分解能イメージングは到底望めない、という考え方である。ここで得られたSA 2次元結晶のイメージングでも同様な状況にあると考えられる。先端曲率半径3 nmのスーパーティップを用いてイメージしたSA膜像と較べても遜色ないし、むしろより容易く上質なイメージが得られる印象を受ける。

AFMスキヤナの走査範囲および画像ピクセル数の制限のため、ウエハに移し取ったSA膜のドメインサイズを十分に評価することはできなかったが、1 μm 程度のものはある程度の頻度で出現した。したがって、熱処理した後の気・水界面には、さらに大きな結晶ドメインが生成しているとも考えられる。いっぽう、移し取りの際には膜の破損が起きるだけでなく、基板と界面膜との間に気泡が入り、その付近では膜がほとんど基板に移し取られないという現象も頻繁に発生した。絵に描いたように、ウエハを気水界面膜にナノメートル精度で平行に付着させるのはほぼ不可能である。平行でないとすると、ウエハ面のどこか1点が水面に触れた瞬間に膜全体が一気に基板に吸い上げられる。このときの膜に対する擾乱はかなり大きなものになると

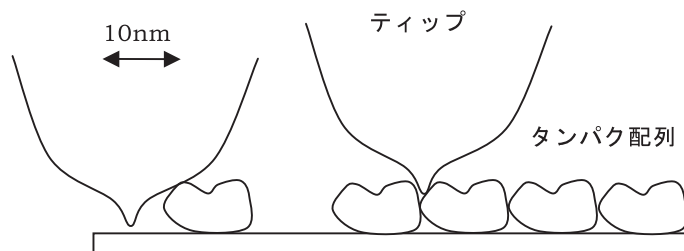


図9 先端にとげのあるティップ。

(左) ティップ-サンプル間のコンボリューション効果により、分子変形がないと仮定しても広がりのある分子像になってしまう。(右) ティップはタンパクの稠密配列表面を忠実になぞり、高分解能の像を与える。各分子は隣の分子の支援により、ティップからの横方向の力に耐えることができ、変形も抑えられる。

予想される。したがって、この点を何とか改善できない限りは、マクロな基板に膜を一様に移し取ることはできないものと推測される。この点は膜固有の力学物性も関係している可能性がある。フェリチンおよびカタラーゼの2次元結晶を同様な方法で作成しウエハに移し取ってみると、明らかにSA膜より安定で移し取りやすいという印象を受ける。また、図4（矢印）で示されたような1分子～数分子の格子欠陥は水面上ですでに存在するのか、それとも移し取りの際に発生したのか、はっきりしない。ただし、SA膜の結晶性そのものを重視するのでなければ、すなわち、図10に示したような2次元稠密配列への砲埋安定化による1分子イメージングやプロテインチップの開発を目指すのであれば、この種の結晶欠陥は問題とはならない。

さて、本研究の第一の目標は、稠密2次元配列への砲埋・安定化による1分子高分解能イメージングにある。この前提となる基板への安定な結合は、ビオチン化タンパク質をSA膜に結合させることで得られる筈である。図7(a)と(b)との比較で明らかのように、ビオチン化フェリチンのSA膜への吸着は非ビオチン化フェリチンに比較すると圧倒的に高い。したがって、ビオチン化フェリチンは特異的にSA膜に結合すると断定できる。ところが、稠密パッキングした試料の像質は低く、カタラーゼの場合などは、試料によってはまったくイメージングできないことがある。同一試料に対して何本ティップを交換しても無駄である。このような状況では、図10に示した方法で1分子を包埋して高分解能像を得るのは不可能であろう。SA膜への結合後いったい何が起きているのだろうか。断定的な解釈を可能とするデータは今のところ得られていない。ただし、分子像が不明瞭であるという事実は、分子の変性が起きている可能性を示唆する。我々はすでに、PBLH膜への吸着によりカタラーゼ2次元稠密配列にフェリチンを埋め込み、または、SA稠密配列にカタラーゼを埋め込み、それぞれのサンプルで少数派分子であるフェリチンおよびカタラーゼを多数派分子から区別してイメージング可能であることを示した¹²⁾。したがって、SA膜に結合したビオチン化タンパク1分子に対しても、その程度の像質は是非確保したいと考えている。

いったん基板に移し取ったSA膜は安定である。純水中に冷蔵保存しておけば、1～2週間は結晶試料として十分使用可能である。プロテインチップやナノテクノロジーへの応用を考えると、この耐久性は大きなメリットとなるに違いない。逆に、乾燥保存した試料を水に浸せ

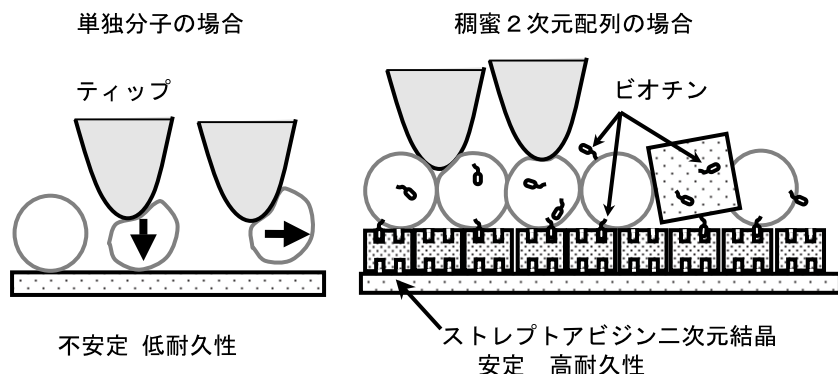


図10 1分子単独で基板に吸着している場合(左図)とビオチン化した分子をSA 2次元結晶膜に結合し、稠密配列化した場合(右図)。

物理吸着(左図)では基板との結合が弱く、ティップによる大きな分子変形だけでなく基板からの脱離も起こる。いっぽう、ビオチン化した後にSA膜に結合し、さらにビオチン化した他種のタンパク質の稠密配列に埋め込んで安定化した場合、ティップからの横方向の力に対して安定化されるだけでなく、表面構造が浅くなるため横方向の力が低減され、イメージング条件がさらに向上すると予想される。

ば機能も含めて復元する可能性もあり、この点も検討に値する。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、文部科学省科学研究費補助金(H14~16年度、基盤研究(c))および慶應義塾福澤諭吉研究補助基金(H14, H15年度)による支援を受けた。

文 献

- 1) Green, N.M.; In *Advances in Protein Chemistry* (Eds. Anfinsen, C.B. et al.) Academic Press, New York, 1975, 29, 85-133.
- 2) Savage, M.D. et al.; *Avidin-Biotin Chemistry: A handbook*, 1992, Pierce Chemical Co.
- 3) Binnig, G., Quate, C.F., and Gerber, C.; *Phys. Rev. Lett.*, 1986, 56, 930-933.
- 4) Morris, V.J., Kirby, A.R., and Gunning, A.P.; *Atomic Force Microscopy for Biologists*, 1999, Imperial College Press.
- 5) Jena, B.P. and Horber, J.K.H.; *Atomic Force Microscopy in Cell Biology*, 2002, Academic Press.
- 6) Hafner, J.H., Cheung, C.-L., Woolley, A.T., and Lieber, C.M.; *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 2001, 77, 73-110.
- 7) Müller, D.J. and Engel, A.; *J. Mol. Biol.*, 1999, 285, 1347-1351.
- 8) Templin, M.F. et al.; *TRENDS Biotechnol.*, 2002, 20, 160-166.
- 9) Furuno, T. and Sasabe, H.; *Biophys. J.*, 1993, 65, 1714-1717.

-
- 10) Albala, J.S. and H-Smith, I.; Protein Arrays, Biochips, and Proteomics, 2003, Marcel Dekker.
 - 11) Scheuring, S., et al.; Single Mol., 2001, 2, 59-67.
 - 12) T. Furuno; Jpn. J. Appl. Phys. 2000, 39, 6435-6440.