

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32675

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651118

研究課題名(和文) 染色無しのタンパク質単分子の電子顕微鏡画像化

研究課題名(英文) Electron micrograph imaging of a single protein without staining

研究代表者

木村 啓作 (KIMURA, Keisaku)

法政大学・マイクロ・ナノテクノロジー研究センター・研究員

研究者番号：70106160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本申請課題の目的は「タンパク質の染色操作を行わずに、タンパク質単分子を走査透過型電子顕微鏡(STEM)を用いて確認する」ことである。この研究課題のために、本研究では、コントラストの殆どないグラフェンの親水性誘導体であるグラフェンオキシド(GO)をSTEMの基板として用い、無染色タンパク質で1nmの分解能を達成することを試みた。この結果

1. 染色無しのタンパク質単分子の電子顕微鏡画像化を可能にする0.3nm厚さの単原子層GO基板の開発；2. 低加速電圧でも分解能を低減させない試料の調製法の開発；3. サイズ20 nmのNADH酸化還元酵素1分子の確認 を達成した。

研究成果の概要(英文)：The object of this research is an imaging of a single protein molecule by a scanning transmission electron microscope (STEM) without staining. The key technology of this research is using a graphene oxide (GO) film as a substrate for STEM observation. The target resolution is 1 nm in the level of lysozyme protein. The outcome of the project were

1) Development of a single layer GO film on a Cu microgrid. 2) Preparation of protein sample on a GO single layer under low acceleration voltage without loss of resolution. 3) STEM monitoring of a single NADH ubiquinone reductase whose size is 20 nm without uranyl staining on a GO film.

研究分野：物性化学

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、ナノ構造科学

キーワード：無染色画像 電子顕微鏡基板 グラフェンオキシド 単分子タンパク質 透過走査電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

1930年代初期の電子顕微鏡の開発期に光学顕微鏡の分解能限界を破って、生物細胞の微細構造を明らかにすべく、無機化合物と同じ条件下で細胞構造を扱い、電子線損傷による失敗からしばらく生体試料への適用がされなかったのは歴史の示すところである。しかし初期のこの失敗を乗り越えて、1940年代には電子顕微鏡自体の進歩と相まって、生物試料のレプリカ法や試料への金属の蒸着法、その後、各種の染色法が開発されて、細胞微細構造を見るのに、電子顕微鏡が不可欠の道具になった。現在では生物試料に上記のような前処理を行わない方がまれであり、対象試料に応じてどのような染色法を適用するのか、多くの専門書が刊行されている。2次元周期配列体は別にして、現在、無染色で高分解能の生体微細構造を得ようとする生物学者はまずいないであろう。次の点に注意しよう。良い電子顕微鏡写真を撮影するには、顕微鏡装置だけではなく、試料の状態、試料を載せる基板、撮影の条件など全てが最適化される必要があることである。この内見過ごしてならないのは支持基板の問題である。ここに本提案の中心課題がある。

2004年にグラフェンが発見され、その発見者が2010年ノーベル物理学賞を受賞した。グラフェンは一原子層厚さの究極の薄膜基板である。しかし疎水性でありその扱いにまだデリケートなところがある。我々はその親水性バージョンであるグラフェンオキシド(GO)を取り上げ、この一原子層膜を走査透過型電子顕微鏡(STEM)の基板として使い、無染色で1nmの分解能をタンパク質を試料として達成しようとするものである。現在、この分野は発展途上であり、上記ノーベル賞受賞者が共著者の電子顕微鏡測定に関する文献が2007年に発表され、2009年にはGOを基板としてフェリチンを観察した論文が発表された。いずれも透過型電子顕微鏡を用いた論文である。我々が使用する走査透過型電子顕微鏡のビームサイズは1nm以下である。また加速電圧は10kV以下でも十分な解像力を有している。このような装置を用いた微細構造の報告は未だ無い。

2. 研究の目的

本提案は歴史の古い電子顕微鏡法に再度光をあて、タンパク質の電子顕微鏡画像化に普通用いられている染色過程を経ない、無染色の状態でのnm分解能の画像を得るのが目標である。

- (1) 天然グラファイトを出発物質とした実用的なグラフェンオキシド(GO)基板の作製法の開発
- (2) GOを基板とする構造既知の無機極微結晶のTED・XRDの検出と解析
- (3) 大きさ20nmのNADHユビキノン酸化還元酵素の画像検出
- (4) 大きさ3nmのリゾチームの画像化

3. 研究の方法

無染色での電子顕微鏡観察は生体物質では例外的な方法であるが、無機化合物においては日常的に使用される方法である。特に近年発展著しい金ナノクラスターの分野においてはサイズ1nmの粒子までもが透過型電子顕微鏡、走査透過型電子顕微鏡で確認されている。我々は過去30年間、この分野において世界をリードしてきたグループの一つである。チオレートによって自己集積的に表面修飾された25nmから1nmまでの金ナノ粒子を合成し、ポリアクリルアミド電気泳動法(PAGE)によりサイズを揃えて、またこれら粒子の結晶化を成し遂げレーザー顕微鏡、走査型顕微鏡、透過型顕微鏡による観察にとどまらず、これら粒子結晶の誘電率や電子状態、ナノサイズ領域において期待される量子サイズ効果の研究で世界をリードしてきた(科研費基盤研究AやSに多くを負っている)。我々の作製する金ナノ粒子はペプチドやアミノ酸によって覆われているため、タンパク質との相性が極めて良い。タンパク質と金ナノ粒子とのハイブリッド化合物に関しても我々のこれまでの研究テーマであり、十分な経験がある。

我々が所持している日立S-4800電界走査型電子顕微鏡は電子ビーム径が1nm以下である。しかし実際の分解能は基板や試料で広がり1nmまでは到達していない。試料での広がりや試料のnm構造を反映しており、試料からの有用な情報を与える。一方、基板での電子ビームの広がりや試料からの情報を

マスクしてしまい、電顕の本来の性能を低下させる源である。金属の蒸着や染色も試料の情報を乱す元である。これらのうち、基板での広がり、もし、基板の厚さが単原子層であれば入射電子は突き抜けるか反射するかのどちらかで多重散乱の効果は大幅に減少する（原子内での多重散乱効果は存在する）。すなわち従来の市販品の基板の分解能を大幅に越えることが期待できる。10 kV以下の低加速電圧を用いた研究はまだされていないため、特にタンパク質に特化した研究はまだ報告されておらず、世界に先駆けて単一タンパク質の電顕写真撮影に挑戦するものである。

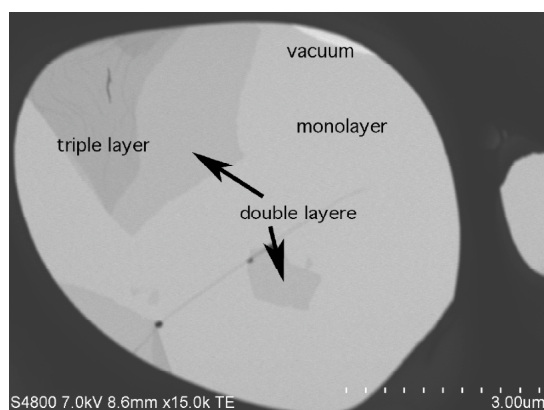
これまで透過型電子顕微鏡観察の主要な基板としてフォームバルやコロジオンなどのプラスチック基板、そして炭素薄膜が使用されてきた。前者は扱いやすく強固であること、後者は主に電子ビームに対し安定であり極めて薄い膜が得られることが特徴である。走査型電子顕微鏡では電子が透過する必要がないため、金属やドープトシリコン、HOPGなど導電性の材料が専ら用いられてきた。チャージアップを防止するには金属が最も良く、実際にX線光電子分光分野では用いられているが、タンパク質とは相互作用が強すぎる、金属からの光電子放出の背景が無視できない、等の欠点があり生体微細構造用の支持基板には用いられていない。2004年のグラフェンの発見以来、我々は単原子層膜の開発に取り組み（過去に原子番号Zが炭素(Z=6)より小さい金属ベリリウム基板(Z=4)を独自に開発し、サイズ1.2 nmの金ナノ粒子(Z=79)の電顕写真を公表している(S.Chen, K.Kimura, Langmuir, 15 (1999) 1075-1082)) 2010年グラフェンの類縁化合物であるグラフェンオキシド基板の開発に成功した。この実績の上に立って以下のような研究計画を立てた。

- (1) GOの作製法の改良と評価。特に電子ビーム耐性の改善
- (2) サイズ数ナノメートルのNaClの電子顕微鏡写真の撮影
- (3) NADH ユビキノン酸化還元酵素の画像検出

4. 研究成果

写真はマイクログリッド上に張られた

GOの10 kV STEM画像である（写真参照）。マイクログリッドの長辺は5マイクロン。上辺右に白地の真空、その下に一原子層、二原子層、三原子層がコントラスト良く識別されている。三原子層の一部には4原子層も見える。各層の厚さは0.3 nmであるので、この写真から3 nm位のサイズのタンパク質でも十分にコントラストの違いが出、0.3 nm精度の断層写真が得られることが期待される。我々は複雑な生体組織を見る以前に、まずタンパク質を対象にしてこの方法で実際にどれ位の分解能が得られるかを研究した。その後、微細構造に挑戦する段取りである。



上記計画の内 (1) GOの作製法の改良と評価に関しては関連する段階の研究が審査付きの論文誌 (Bulletin of the Chemical Society of Japan, 86 (2013) 333-338) において論文賞の受賞の荣誉に預かった（上記写真）。

すでに我々はGO基板の作製に成功しているが、電子ビームに対する耐性が充分でなくコンタミネーションに悩まされていた。この原因を探るためコンタミネーションの進行を定量的に把握し、基板処理との関係を求めた。コンタミネーション反応は一次反応速度式に従い、機構は一次式の比較的簡単なものであることが示唆され、雰囲気制御実験の結果と合わせ、酸化反応が基板安定性に影響していることを突き止めた。この結果、H24年度はAr雰囲気下での実験環境の設営に注力し、安定なGO基板が作製できるようになった。

(2) 無機ナノ粒子の作製に関しては、市販品の化粧用ミスト発生機を用いてNaClナノ粒子の発生に成功し、電子顕微鏡写真をとることができた。タンパク質が凝集しないように離散的にGO基板の上に付着させること自

体がまだ充分には確立していない技術であるが、NaClナノ粒子の成功により充分なタンパク質濃度と粒子の分散性を一挙に達成することができるようになった。

(3) より大きなタバコモザイクウイルスを用い、GO基板を用いて無染色での実験に成功した。更にNADHユビキノン酸化還元酵素（サイズが20 nm）の染色なし一分子のSTEM撮影にも成功した。現在論文執筆中である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

① Keisaku Kimura and Seiichi Sato,
“Measurement of the index of refraction of micron-meter crystals by a confocal laser microscope – Potential application of the refractive index mapping of micron-meter scale”,
Review of Scientific Instruments, 査読有, **85**
(2014) 053704-1~ -6.

② Tatsuya Sugimoto and Keisaku Kimura,
“Stability of Graphene Oxide Film to Electron Beam Irradiation and Possible Thickness Dependence of Electron Attenuation”, Bulletin of the Chemical Society of Japan, 査読有, **86**
(2013) 333-338.

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 啓作 (KIMURA, Keisaku)

法政大学・マイクロ・ナノテクノロジー研究センター・研究員

研究者番号： 7 0 1 0 6 1 6 0

(2) 研究分担者

八尾 浩史 (YAO, Hiroshi)

兵庫県立大学・物質理学研究科・准教授

研究者番号： 2 0 2 6 1 2 8 2