

# 透過型電子顕微鏡観察における

## 界面活性剤の含まれた生体試料を用いたサンプル調製の試み

牧 貴美香

教育・研究技術支援室 分析・物質技術系

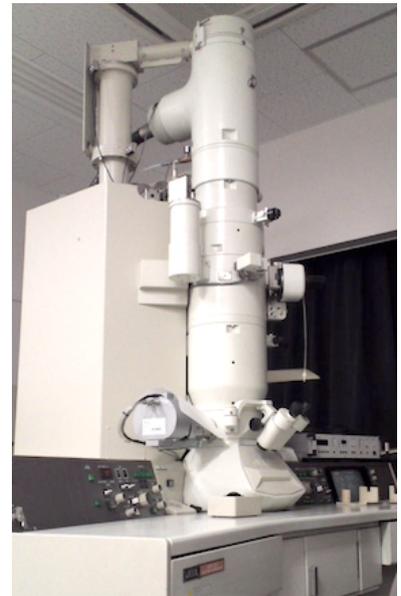
### 概要

電子顕微鏡はその高い分解能が特徴であり、光学顕微鏡とは異なり生体を構成する細胞の微細構造を分子レベルで観察することが可能である。しかし、電子顕微鏡は光の代わりに電子線を利用する性質上、筐体内を高真空に保つ必要がある。従って、観察対象は乾燥状態となり、かつ真空にも電子線にも耐えなければならない。観察対象の一つとして蛋白質があるが、蛋白質は基本的に細胞内に存在するため水溶液中に存在する。その中でも特に膜たんぱく質は細胞膜（脂質二重膜）の中に埋め込まれた形で存在し、そのため直接水溶液中に溶解させると変性してしまうため、観察用に精製する膜蛋白質は界面活性剤存在下で水溶液中に溶解させる。ところが、電子顕微鏡観察ではミセル形成そのものや、染色に対して界面活性剤が悪影響を及ぼす。観察用サンプルの善し悪しで観察レベルが決まると言われるが、実際に観察用サンプル調製は試行錯誤の繰り返しである。本発表では、この問題の解決に向けた取り組みを紹介する。

### 1 透過型電子顕微鏡について

透過型電子顕微鏡は、観察対象に電子線をあて、透過して来た電子が作り出す像を拡大して観察する顕微鏡である。加速電圧が 100kV の場合には計算上 0.0037nm の波長の電子線が得られるため、圧倒的に高い分解能を得る事が可能である。一方で電子線を光源として使用する性格上いくつかの注意点がある。電子線は電荷を持ち透過力が弱く、真空中でなければ他の粒子と相互作用するために消滅してしまうことや、放電や試料のコンタミを防ぐ理由で透過型電子顕微鏡の鏡体内を高真空に保つ必要がある。また、試料は電子線が透過出来る程度に薄くする必要がある、という点である。

図 1



### 2 観察対象のたんぱく質について

緑色イオウ細菌から分離・精製した光合成反応中心（たんぱく質）を観察対象とした。このたんぱく質の最大の特徴は、通常生体膜中に存在する、つまり膜たんぱく質であるという点である。膜蛋白質は、生理条件下において生体膜（脂質=疎水性）中に存在し活性を持つという性格上、膜たんぱく質の表面は疎水性アミノ酸で構成されており、細胞から分離精製した場合には界面活性剤を添加することでミセル化して水溶液中に溶解させる必要がある。界面活性剤が存在しない水溶液中においては、膜たんぱく質は可溶化されずに変性・凝集してしまう。※光合成：主に植物やプランクトン、藻類や光合成色素を持つ生物が行う、光エネルギーを化学エネルギーに変換する生化学反応のこと。生じた化学エネルギーが生育に使用される。

### 3 ネガティブ染色法

たんぱく質の構成元素は主に炭素、水素、酸素、窒素等の軽元素であるため、電子線を十分に散乱させられず、その結果十分なコントラストを得る事が出来ない。更に、真空中で観察する必要があることや電子線によるダメージを考慮すると、たんぱく質を水溶液状態のまま透過型電子顕微鏡にセットして観察することは普通出来ない。このように、コントラスト向上とたんぱく質保護の観点から、一般的な手法であるネガティブ染色を行い精製したたんぱく質を観察した。ネガティブ染色法は、電子線に対して透過しにくい=電子密度の高い元素（タングステンやウランなどの重金属）で染色して電子を散乱させるようにしてコントラストのはっきりした像を得る方法である。

### 4 観察結果と試行錯誤の過程

今回観察対象となる膜たんぱく質は、溶液中に界面活性剤 SM-1200(alpha.-D-Glucopyranoside, .beta.-D-fructofuranosyl, monododecanoate)を含む。そのため、ためいくつかの問題が生じた。その結果を、課題や改善点を含めて実際の結果と共に順に見ていく。本発表の観察における到達目標は、溶液中に含まれる界面活性剤が像に与える影響を可能な限り解消する事である。各溶液の組成は以下の通り。たんぱく質の溶解液：50mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM SM-1200, 60mM NaCl、たんぱく質の希釈溶液：50mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM SM-1200、ネガティブ染色液：1%酢酸ウラン、たんぱく質濃度：OD(280nm)=1.0。X線構造解析の結果から、約10nmのタル状の形状をしていることが分かっている。全てのサンプルは透過型電子顕微鏡 JEM-2010（日本電子製）（図1）を使用し、加速電圧120kVの条件で観察した。

#### 4.1 たんぱく質のみを観察する。

方法:希釈溶液で100倍希釈したたんぱく質溶液1.5 $\mu$ lを親水化したグリッドにのせて15秒静置した後、濾紙をグリッドにつけて20秒待ち余剰分を吸い取る。ネガティブ染色液を1.5 $\mu$ lグリッドにのせて30秒静置し、濾紙で余剰分を吸い取り十分に乾燥させる（以降、この作業を「ネガティブ染色する」と表記する）。なお、サンプルを濾紙で吸い取る際、吸い取りが非常に遅かった。※グリッド:透過型電子顕微鏡観察の試料台で、直径3mm、厚さ10-50 $\mu$ mの円形の網目格子、あるいは多数の孔があいた金属薄板。

結果:全体的にサンプルが厚く、像が不明瞭であり、グリッド上に何かが一面に広がっているように見える（(図2 (scale bar: 10nm))）。また形やサイズも正しくない。

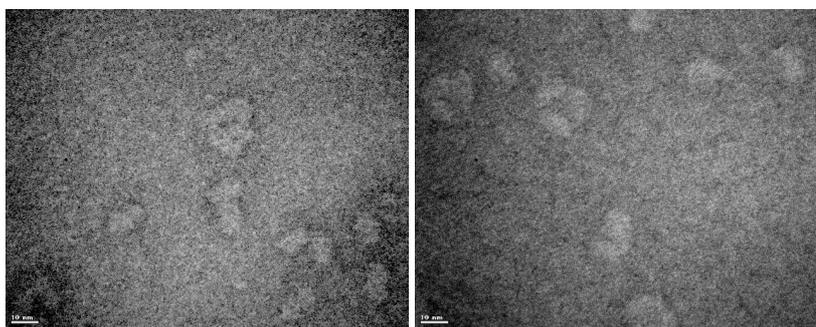


図2

#### 4.2 たんぱく質のみを観察する。＜吸い取り紙を変更する＞

方法:希釈溶液で100倍希釈したたんぱく質溶液2.0 $\mu$ lをパラフィルム上にのせる。そこに親水化したグリッドをつけることでたんぱく質をグリッドに移し30秒静置する。吸収紙をグリッドにつけてしばらく待ち、余剰分を吸い取った後、ネガティブ染色した。なお、ここで使用した吸収紙は1.5 $\mu$ lのH<sub>2</sub>O

を 20 秒ほどで素早く吸収し、不純物が含まれない紙を選別した。

結果：サンプルはまだ厚く、像が全体的に不明瞭であった。観察場所によっては界面活性剤のミセルが一面に敷き詰められた状況と推察される像が得られた。(図 3 (scale bar: 10nm)) 得られた像の形状やサイズを考えるとたんぱく質との区別は容易ではない。

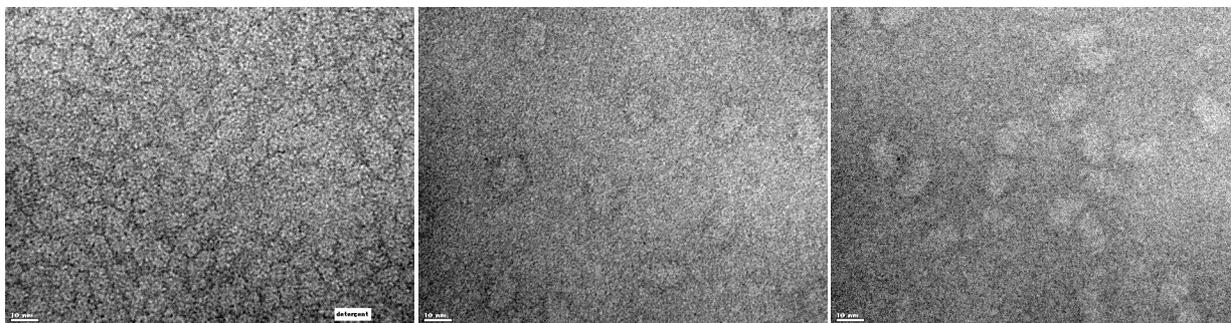


図 3

#### 4.3 たんぱく質のみを観察する。<H<sub>2</sub>O で洗浄する>

方法：希釈溶液で 100 倍希釈したたんぱく質溶液 2.0 $\mu$ l をパラフィルム上へのせる。そこに親水化したグリッドをつけることでたんぱく質をグリッドに移し 30 秒静置する。吸収紙をグリッドにつけてしばらく待ち、余剰分を吸い取る。次いで、パラフィルム上に用意した 2.0 $\mu$ l milliQ (超純水) にグリッドをつけることで milliQ をグリッドに移す。すぐに吸収紙をグリッドにつけてしばらく待ち、余剰分を吸い取後、ネガティブ染色した。milliQ の処理により界面活性剤を除去しサンプルが薄くなることを期待する。

結果：まだサンプルは厚く、像が不明瞭。グリッド上に残る界面活性剤は減少したようにも見えるが、一方でたんぱく質あるいはミセルの形やサイズが変わっている。(図 4 (scale bar: 10nm))

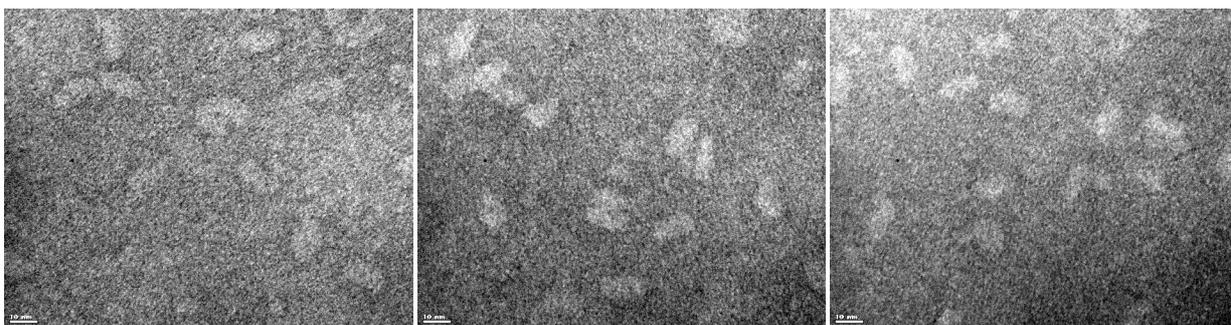


図 4

#### 4.4 希釈溶液 (界面活性剤を含むがたんぱく質は含まない) のみを観察する。

方法：パラフィルム上に用意した 10 $\mu$ l 希釈溶液に親水化したグリッドをつけることで希釈溶液をグリッドに移し 30 秒静置する。吸収紙をグリッドにつけてしばらく待ち、余剰分を吸い取り後、ネガティブ染色した。

結果：たんぱく質は存在しないため、ミセルと思われる像が得られた（図5（scale bar: 10nm））。この結果から、界面活性剤がグリッド上に残存することが確認出来た。

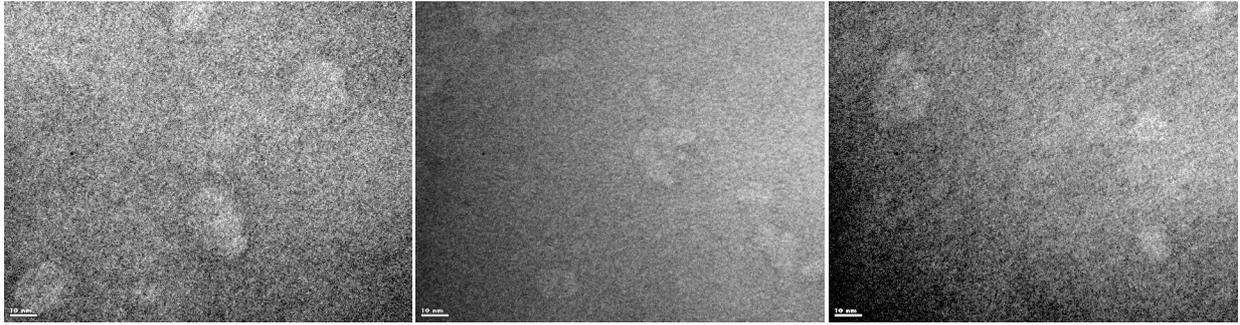


図5

#### 4.5 希釈溶液のみを観察する。＜H<sub>2</sub>Oで洗浄する＞

方法：パラフィルム上に用意した 10 $\mu$ l 希釈溶液に親水化したグリッドをつけることで希釈溶液をグリッドに移し 30 秒静置する。吸収紙をグリッドにつけてしばらく待ち、余剰分を吸い取る。パラフィルム上に用意した 10 $\mu$ l milliQ（超純水）にグリッドをつけて milliQ をグリッドに移す。すぐに吸収紙をグリッドにつけてしばらく待ち、余剰分を吸い取った後、ネガティブ染色した。

結果：サンプルとしては少し薄くなったが、ミセルサイズが小さくなった（図6（scale bar: 10nm））。また、後から洗浄するだけでは界面活性剤を除去しきれなかった。従って、界面活性剤をグリッドにつけず、かつ、たんぱく質だけをグリッドに移す方法を考案する必要があることが分かった。

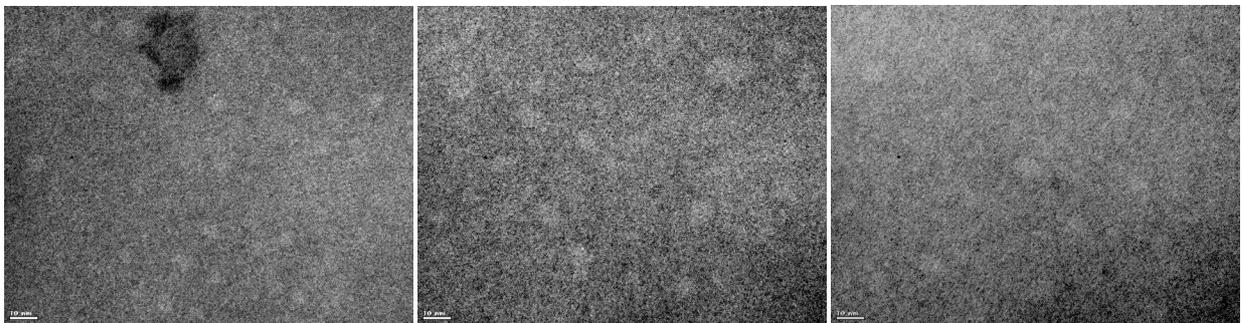


図6

#### 4.6 たんぱく質を観察する。＜グリッドに前処理する＞

方法：親水化したグリッドにあらかじめ 1.5 $\mu$ l milliQ をのせる。すぐに、パラフィルム上に用意した 5.0 $\mu$ l たんぱく質（+5nm nanogold/実験の都合による）にグリッドをつけてたんぱく質をグリッドに移し 30 秒静置する。吸収紙をグリッドにつけてしばらく待ち、余剰分を吸い取り後、ネガティブ染色した。

結果：界面活性剤をほぼ残さずに、たんぱく質だけがグリッド上に残る像を得ることができた（図7（scale bar: 20nm、右下のみ 50nm））。黒い点状に見えるのは 5nm nanogold。観察の別の目的で添加したもので、たんぱく質と結合する。この条件では nanogold に複数のたんぱく質が結合するため、花のような形に見える。

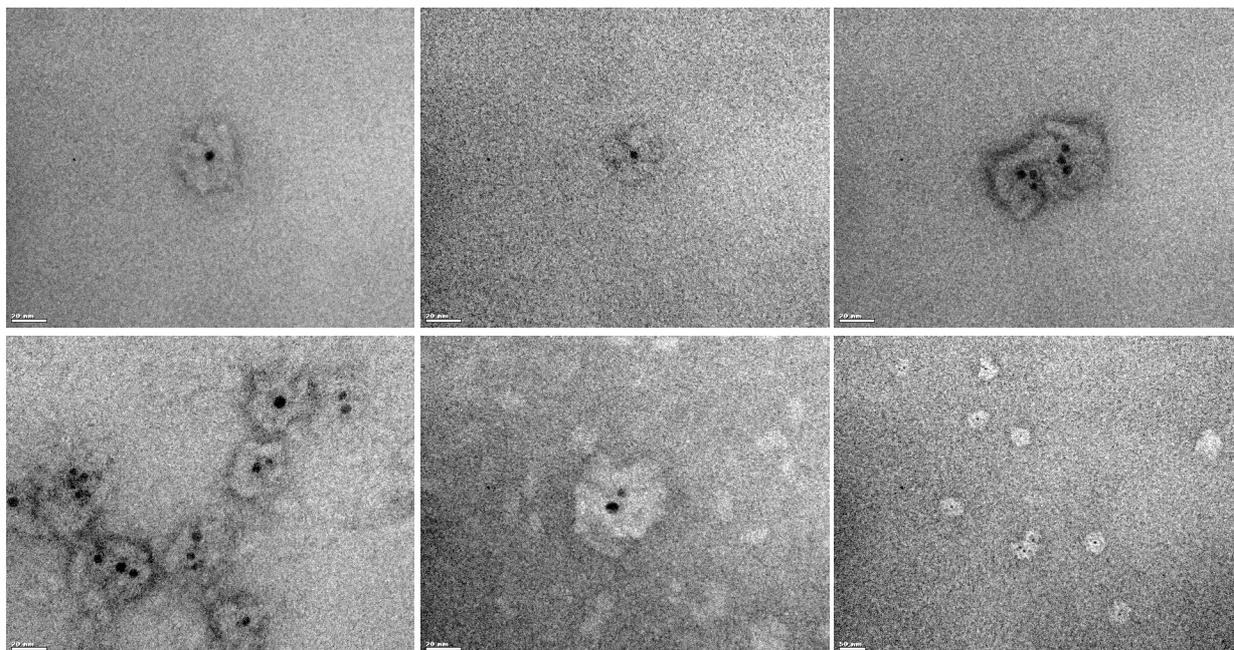


図 7

## 5 まとめ

試行錯誤の結果、最終的には「たんぱく質のみをグリッド上にのせる」という状況にある程度達成する事ができた。グリッド上にあらかじめのせた milliQ とたんぱく質溶液との界面で何らかの作用があり、うまく界面活性剤を取り除く事が出来た結果としてこのような像を得る事が出来たと推察する。この方法でうまくいった科学的根拠の追求はしていないが、電子顕微鏡観察のサンプル作製には、たんぱく質そのものの性質や Buffer 条件、また、気温や湿度などが複雑に影響し合い、単純なものではないため究極的にはその場その場での対処が必要となる。数多くの色々な方法を試し、それを自分の経験として積み重ね、知識の引き出しを一つ一つ埋めていく事が重要である。