

C₆₀ クラスタ一次イオンを搭載した飛行時間型二次イオン 質量分析装置による固定化リゾチウムの最表面構造評価

工藤 正博^{*1}, 加藤 信彦^{*2}, 青柳 里果^{*3}

Surface Structural Analysis of Supported Lysozyme by Using Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometer Equipped with a C₆₀ Cluster Primary Ion Source

Masahiro KUDO^{*1}, Nobuhiko KATO^{*2}, Satoka AOYAGI^{*3},

ABSTRACT : The knowledge of the structural changes of proteins caused by chemical reactions or other factors such as pH conditions are of great importance in the development of various medical devices as well as in the basic biomolecular studies of biopolymers. The direct analysis of such structural changes with spectrometric approaches, however, is, in general, quite difficult or restricted. In this study, time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS) with a C₆₀ primary ion source, which is well-known as an extremely sensitive surface structural analysis method, was applied for the study of the partial structure of proteins. The model sample used is lysozyme supported on an aminosilanized ITO-coated glass electrode. The newly developed data analysis method of TOF-SIMS spectra, which is based on the information theory, revealed that the observed characteristic protein peaks are ejected from a specific surface portion of the protein molecule. These results show that TOF-SIMS can provide information on the configuration of protein molecules on the substrate and can be used for the analysis of the partial protein structure and its changes due to various chemical environments.

Keywords : TOF-SIMS, surface analysis, protein structure, C₆₀ cluster primary ion, lysozyme

(Received March 25, 2010)

1. はじめに

固体の最表面を高感度に観察できる手法のひとつとして、飛行時間型二次イオン質量分析法 (Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry: TOF-SIMS) ^{1,2)} はさまざまな試料の評価に用いられているが、特に原子、分子、フラグメントイオンに関する情報を含む質量スペクトルと、それらの分布をサブミクロンスケールで表す二次イオン像を得ることができるため、バイオデバイスや医療用材料に利用されることの多い生体高分子の測定への応用にも大きな期待が寄せられている (図 1)。

TOF-SIMS では、40nm～100nm 程度に絞った一次イオンビームを固体試料にスキャンしながら照射し、その一次イオンとの衝突によって試料の最表面から放出されるイオン (二次イオン) を高感度な質量分析計である飛

行時間型質量分析計 (TOF-MS) で検出する。ただし、TOF-SIMS は、同じ TOF-MS を用いるマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 法とは異なり、タンパク質のような巨大分子の場合は、イオン化の際にフラグメント化が避けられないという問題点があった。現在では、主成分分析 (Principal Component Analysis: PCA) ^{3,4)} や情報エントロピーの差 (相互情報量) ^{5,6)} などの様々なデータ解析法が TOF-SIMS に応用されるようになり、複雑なバイオ材料の解析にも TOF-SIMS の応用 ^{7,8)} が可能となった。また、TOF-SIMS では試料の最表面数ナノメートル付近の化学構造情報を得られるため、おもにタンパク質の同定に用いられる MALDI 法とは異なり、デバイス上のタンパク質の最表面の構造や配向性に直接関係する情報が得られる ^{6,9,10)}。

さらに、巨大分子の測定に有利な一次イオン源として、エネルギーを分散して与えられるため、より穏和なイオン化が期待されるクラスターイオン源 ^{11,12)} が開発され、金クラスターイオン源、ビスマスクラスターイオン源、

*1 : 理工学部教授(kudo@st.seikei.ac.jp)

*2 : 理工学部助教

*3 : 島根大学生物資源科学部地域開発科学科

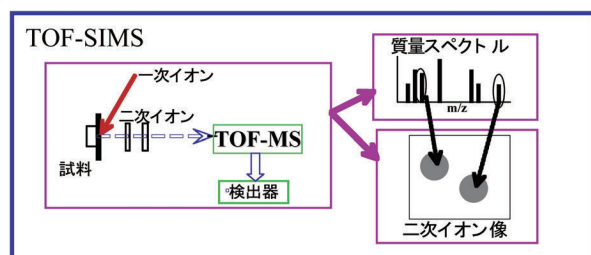


図1 飛行時間型二次イオン質量分析法の原理

C_{60} イオン源などが近年利用されるようになった。

本研究では、クラスターイオンによるタンパク質試料計測の有用性を検討するために、 C_{60} イオン源を一次イオンとして用い、トリ卵白リゾチウムを固定化した試料を測定し、リゾチウムの配向評価を行った。また、以前に金クラスターイオン源で測定した結果とも比較検討¹⁰⁾した。

2. 実験方法

2.1 試料作製

基板であるインジウムスズ酸化膜 (ITO) コーティングスライドガラス (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) をアミノプロピルトリメトキシシラン (東京化成, 東京) でアミノシラン化し、グルタルアルデヒド (和光純薬) で架橋したのち、トリ卵白リゾチウム (Sigma-Aldrich) を含む pH7.4 のリン酸緩衝液中に 30 時間浸し、リゾチウムの ϵ -アミノ基部分と共有結合させて固定化した。参照試料として、タンパク質固定化前のアミノシラン化 ITO ガラスを用意した。その後、全ての試料は、凍結乾燥器 (VD-250F, タイテック, 埼玉) で凍結乾燥した。

2.2 飛行時間型二次イオン質量分析 (TOF-SIMS)

一次イオンを C_{60}^+ とする飛行時間型二次イオン質量分析計 (TFS-2000, Physical Electronics, Eden Prairie, MN, USA) を用いて、正二次イオンスペクトルを各試料についてそれぞれ測定した。測定範囲は m/z 0~2000, ラスターサイズは 260 μ m, 測定時間は 15 分間とした。同一条件で、参照試料は同一条件で作製した 2 枚の試料

に対して 3 点, リゾチウム固定化試料は同一条件で作製した 3 枚を各 2 点の計 6 点測定した。

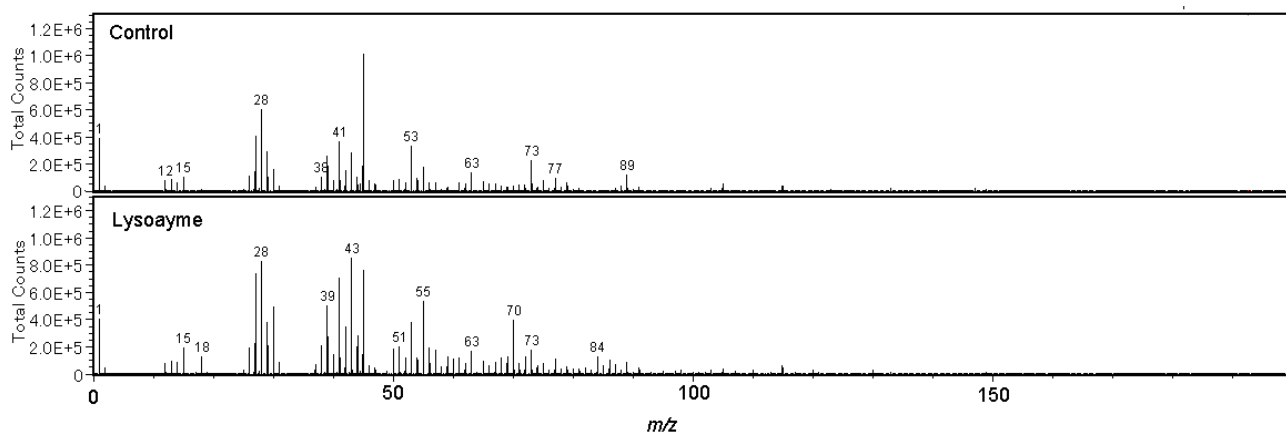
3. 結果と考察

図 2 に C_{60}^+ を一次イオン源として測定し、得られた TOF-SIMS スペクトルの代表例を示す。今回の測定条件では、 m/z 300 を超える二次イオンは高強度には検出できなかった。図 2 に示す質量範囲 m/z 0~200 に参照試料と比較して、リゾチウム固定化試料で明らかに強度が高く、タンパク質由来と考えられる二次イオンピークがいくつか検出された。これ以上の質量範囲では、今回の測定条件では同定可能な強度を持つタンパク質由来の二次イオンピークは検出できなかったため、本研究ではこの範囲の二次イオンを対象として、解析した。図 2-2 から 2-5 では、差が見られた二次イオンピーク周辺を拡大して示す。また、図 2 は参照試料、リゾチウム試料それぞれの代表的なスペクトルを示すが、他のスペクトルでもほぼ同様の結果が得られた。

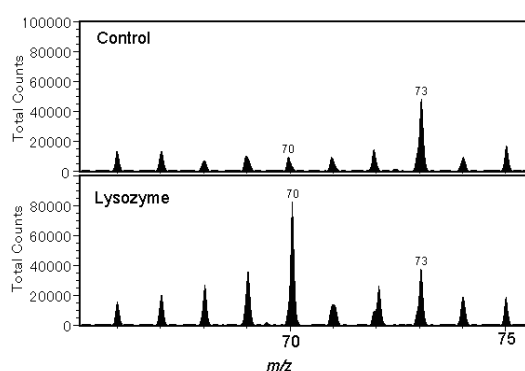
図 2 に示した二次イオンピークを中心として、今回の解析で得られたリゾチウムに由来すると考えられる二次イオンピークを表 1 に示す。各二次イオンピークの同定結果から、各二次イオンが起因するアミノ酸およびアミノ酸の組み合わせを求めた。固定化リゾチウムの最表面部分は、これらの二次イオンピークに起因するアミノ酸を含む部分と考えられる。複数のアミノ酸からなる二次イオンは、発生場所が特定されるため、表 1 の中の複数のアミノ酸の発生場所を最初に検討した。

トリ卵白リゾチウムのアミノ酸配列で、表 1 の複数のアミノ酸からなる二次イオンの発生場所となり得る箇所を下線で下記に示す。また、以前の金クラスター (Au_3^+) による測定¹⁰⁾で示唆された二次イオン発生場所を[]で示す。

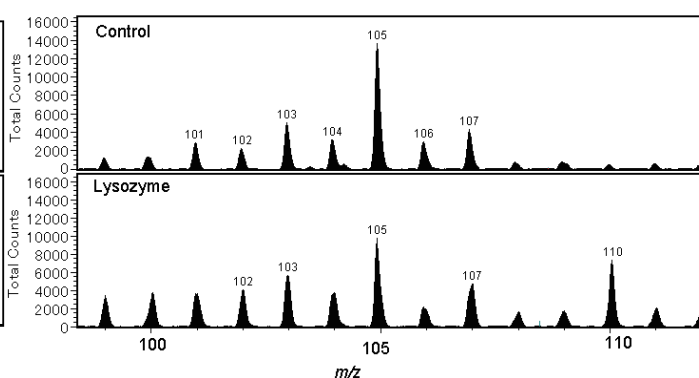
これらの箇所を多く含む面をトリ卵白リゾチウムの立体構造 (Protein Data Bank ID: 1DPW) から探したところ、図 3 に示す面が上述の 6 カ所の下線部分のうち 4 カ所を含むサイトであることが分かった。ここに含まれるアミノ酸の組み合わせを表 1 のピークと照合すると、 m/z 130 には TP (69, 70), m/z 136 には GC (126, 127), GM



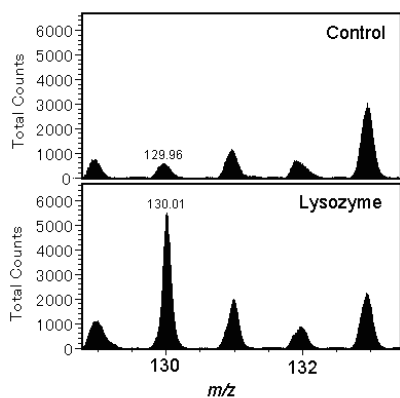
(1) m/z 0 ~ 200



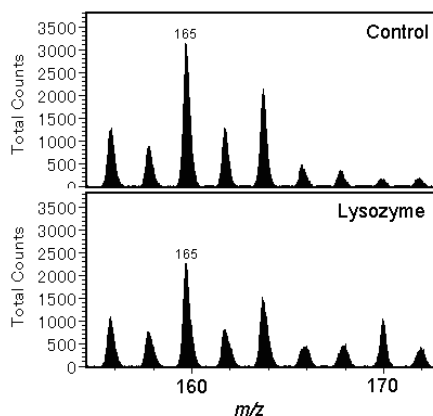
(2) : m/z 70 付近



(3) m/z 110 付近



(4) m/z 130 付近



(5) m/z 170 付近

図2 参照試料 (Control) リゾチウム固定化試料 (Lysozyme) の代表的な TOF-SIMS スペクトル

(104, 105), CK (115, 116), m/z 170にはCK (115, 116)が対応し、また他の単独のアミノ酸部分から発生したと考えられる二次イオンの発生源となるアミノ酸についても、各二次イオンピークについて1つ以上が全てこのサイトに含まれることが分かった。つまり、このサイトから、固定化リゾチウムに特異的と選ばれた全ての二次イオンが発生することが可能である。したがって、このサイト

が本研究の固定化リゾチウムの最表面と考えられる。また、このサイトは、金クラスターでの測定結果で示唆された最表面 ([GRC], [RC], [RGCR]を含むサイト) ともほぼ一致し、この背面はタンパク質の基板との結合で部分であるリシン (ϵ -アミノ基) 部分をもっとも多く含む面でもある。

結果として示唆された配向はほぼ等しいが、 C_{60}^{+} によ

って、示唆されたタンパク質試料に起因する二次イオンピークは、金クラスターイオンより得られた結果よりも

表 1 タンパク質由来二次イオンピーク

m/z	組成式	由来するアミノ酸	
		単独の場合 (配列上の 個数)	複数の場合の 組合わせ (配列上の順序)
70.07	C ₄ H ₈ N	V (6), L (8), I (6), K (6), P (2), R (11)	
82.04	C ₄ H ₆ N ₂	H (1)	
	C ₅ H ₆ O	V (6), L (8), I (6), K (6), P (2), R (11)	
84.05	C ₄ H ₆ NO	Q (3), E (2)	
84.08	C ₅ H ₁₀ N	L (8), I (6), K (6)	
	C ₂ H ₁₄ NS	C (8)	
86.10	C ₅ H ₁₂ N	L (8), I (6), K (6)	
	C ₂ H ₁₆ NS	C (8)	
110.07	C ₅ H ₈ N ₃	H (1), R (11)	
120.08	C ₈ H ₁₀ N	E (2), F(3), Y (3)	
130.07	C ₉ H ₈ N	W (6)	
	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂		TP (69, 70)
136.07	C ₄ H ₁₂ N ₂ OS	M (2)	GC (126, 127)
136.08	C ₈ H ₁₀ NO	Y (3)	
	C ₅ H ₁₄ NOS	M (2)	LC (75, 76), GM (104, 105), CK (115, 116)
	C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₃	D (7), S (10), T (7)	
170.06	C ₇ H ₈ NO	W (6)	
	C ₈ H ₁₂ NOS		MK (12, 13), LC (75, 76), CK (115, 116)
	C ₆ H ₈ N ₃ O ₃	Q (3)	

KVF[GRC]ELAA AMKRHGLDNY RGYSLGNWVC
AAKFESNFNT QATNRNTDGS TDYGILQINS
RWWCNDGRTP GSRNLCNPIC SALLSSDITA
SVNCAKKIVS DGNGGMNAWVA WRN[RC]KGTDV
QAWI[RGCR]L



図 3 リゾチウム最表面（リボン構造）と検出されたアミノ酸

明確であった。その理由は、 C_{60}^+ が金クラスターイオンより小さな衝撃でタンパク質分子をイオン化するため、より最表面に敏感にタンパク質の構造を残したフラグメントイオンの発生を可能とするためであると考えられる。したがって、クラスターイオン C_{60}^+ を一次イオン源として用いることにより、固定化タンパク質の配向評価および部分構造評価を詳細に実現する可能性があることが示された。また、クラスターイオンによるスパッタリングによって、分子内部の構造や構造変化も評価できる可能性があり、その検討にはさらなる研究が必要である。

4. 結 言

飛行時間型二次イオン質量分析法はバイオ試料の最表面 2nm 以下の情報を得ることができる高感度な表面分析法であり、特に、 C_{60}^+ などのクラスターイオンを一次イオンに用いるとタンパク質のような複雑な生体高分子の最表面構造が詳細に明らかとなる可能性が示された。この手法は、バイオデバイス上のタンパク質の配向評価や構造変化の評価に応用できると考えられる。

謝 辞

この研究の一部は、文部科学省科学研究費若手研究 (B) の助成 (課題番号 19710096) を受けて行われた。

参考文献

- 1) J. C. Vickerman, D. Briggs, TOF-SIMS : Surface

- analysis by mass spectrometry, IM Publications, UK (2001)
- 2) 二次イオン質量分析法, (丸善)第8章 177-179 (2005)
 - 3) M. S. Wagner and D. G. Castner, *Langmuir* **17**, 4649 (2001)
 - 4) A. M. Belu, D. J. Graham, D. G. Castner, *Biomaterials* **24**, 3635 (2003).
 - 5) S. Aoyagi, M. Hayama, U. Hasegawa, K. Sakai, M. Tozu, T. Hoshi and M. Kudo, *e-J. Surf. Sci. Nanotech*, **1**, 67 (2003)
 - 6) Satoka Aoyagi, “Review of TOF-SIMS bioanalysis using mutual information”, *Surface and Interface Analysis*, **41**(2) 136-142, (2009)
 - 7) Michel R, Castner D. G., 2006. *Surf. Interface Anal.*, **38**, 1386-1392.
 - 8) S. Aoyagi and M. Kudo, “Evaluation of Proteins on Bio-Devices” (“Proteins at Solid-liquid Interfaces” Edited by Philippe Dejardin) 2006 August, Springer Verlag, Berlin
 - 9) S. Aoyagi, A. Rouleau and W. Boireau, “TOF-SIMS structural characterization of self-assembly monolayer of cytochrome b5 onto gold substrate”, *Applied Surface Science*, **255**, 1071-1074 (2008)
 - 10) K. Okada, S. Aoyagi, M. Dohi, N. Kato, M. Kudo, M. Tozu, T. Miyayama, N. Sanada, “ Evaluation of immobilized-lysozyme by means of TOF-SIMS”, *Applied Surface Science*, **255**, 1104-1106 (2008)
 - 11) F. Kollmer, *Appl. Surf. Sci.*, **231-232**, 153 (2004)
 - 12) Weibel D. E., Lockyer N., Vickerman J. C., 2004. *Appl. Sur. Sci.*, **231-232**, 146-152