

biotin 修飾 AFM 探針による streptavidin 2 次元結晶上における特異的相互作用力マップ Spatial mapping of specific interaction on 2-dimensional streptavidin crystal by biotin-modified AFM tip 京大工¹, 京大白眉セ² °宮本 眞之¹, 木南 裕陽¹, 小林 圭^{1,2}, 山田 啓文¹

Dept. of Electronic Sci. & Eng., Kyoto Univ.¹, The Hakubi Center for Adv. Res., Kyoto Univ.²

°M. Miyamoto¹, H. Kominami¹, K. Kobayashi^{1,2}, H. Yamada¹

E-mail: miyamoto.masayuki@piezo.kuee.kyoto-u.ac.jp

【はじめに】近年、生体分子間の特異的相互作用を利用するバイオセンサや分子標的治療の確立に向けての基礎研究として、streptavidin (SA) - biotin 系についての研究が精力的に進められている。われわれは最近、マイカ基板上や脂質二重膜上において SA が 2 次元結晶を形成することを見出し、SA 2 次元結晶に biotin を相互作用させると結晶構造が乱れることを報告した[1,2]。本研究では、biotin 修飾を施した探針を用いて脂質二重膜上 SA 2 次元結晶上でフォースカーブを測定し、特異的相互作用力の検出を試みたので、その結果について報告する。

【実験方法と結果】試料として、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) によって希釈した 1 mg/ml SA 分子 (図 1 のインセット) を用いた。また脂質分子として、dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) と dioleoylphosphatidylserine (DOPS) および 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(cap-biotinyl) (biotin-cap-DOPE) を 7:2:1 の割合で混合して使用した。探針修飾分子としては、biotin 分子に自由度を与えるため、長さ 10 nm 程度の polyethylene glycol (PEG) 部を有し、N-hydroxysuccinimide (NHS) 終端された biotin-PEG-NHS 分子を用いた。実験手順としては、まずマイカ基板上に形成させた脂質二重膜に SA を滴下することで脂質二重膜上 SA 2 次元結晶を作製した。Si カンチレバー (ばね定数: 0.2 N/m) を 0.1 %の APTES (3-aminopropyltriethoxysilane)に浸漬して探針をアミノ基修飾した後、中性環境下で biotin-PEG-NHS 溶液に浸漬し、biotin 修飾探針を得た。以上より得られた試料-探針系の模式図を図 2 に示す。この系を用いて、2 次元フォースマッピング法 (探針速度: 70 nm/s) を用いてカンチレバーのたわみを記録し 2 次元フォースマップを取得した。図 3(a)に探針接近時の探針のフォースマップを、図 3(b)に探針後退時の探針のフォースマップを示す。探針を脂質二重膜上 SA2 次元結晶に接近させた後の後退させる過程に、脂質二重膜上 SA 結晶表面から 10 nm 程度まで大きなヒステリシスが見られた (図 3(b)の白枠線内)。これは、探針接近時に形成された SA-biotin 間の結合が、探針を後退させる際に切れたことを意味している。図 4 に同一領域での代表的なフォースカーブを示す。この結果から SA-biotin 間の相互作用力は約 300 pN であることが分かった。

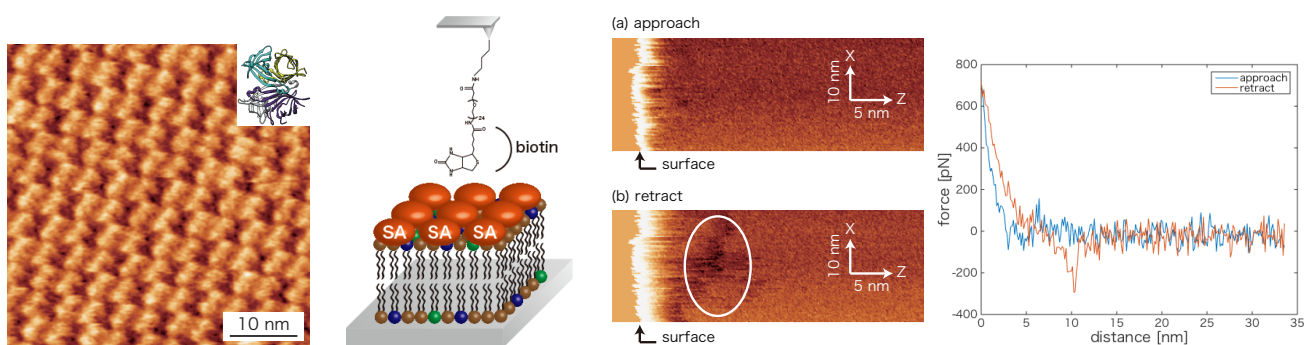


図 1 : 脂質二重膜上 SA 2 次元結晶の表面形状像。インセット:SA 分子のリボンモデル

図 2 : 本実験の模式図。測定は Tris-EDTA 緩衝液に 20 mM の $MgCl_2$ を加えた緩衝液中で行った。

図 3 : 2 次元フォースマップ。左端は SA 2 次元結晶表面を表す。(a)探針接近時。(b)探針後退時。

図 4 : 代表的なフォースカーブ。青線 : 探針接近時。赤線 : 探針後退時。

[1] 宮本他、2015 年第 62 回応用物理学会春季学術講演会、11p-D5-3.

[2] 宮本他、2015 年第 76 回応用物理学会秋季学術講演会、20p-P11-14.