

液中 AFM を用いた streptavidin 2 次元結晶の構造変化のその場観察

In-situ visualization of structure change of streptavidin 2D crystal by using AFM

京大工¹、京大白眉セ² °濱田 貴裕¹、木南 裕陽¹、宮本 眞之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

°T. Hamada¹, H. Kominami¹, M. Miyamoto¹, K. Kobayashi^{1,2}, H. Yamada¹

E-mail: hamada1005@piezo.kuee.kyoto-u.ac.jp

【はじめに】近年、生体分子を生理環境下において高分解能観察する手法として、液中で動作する周波数変調原子間力顕微鏡 (FM-AFM) が広く用いられている。われわれは、biotin 分子と非常に強固に特異的結合することが知られるタンパク質である streptavidin (SA: 図 1 インセット)に注目しており、これまでにマイカ基板上において 2 次元結晶化した SA の高分解能観察[1]および水和構造計測[2]について報告してきた。一方、われわれは生体分子の機能可視化へ向けて、液中 AFM に生体分子と相互作用する分子を注入し、生体分子の構造・物性の変化をその場観察できる装置の開発に取り組んでいる。本研究では、FM-AFM によりマイカ基板上および脂質二重膜上での SA 2 次元結晶の高分解能構造観察を行い (図 1)、ガラスピペットを用いて観察溶液中に biotin 分子を注入し、SA 2 次元結晶の構造変化を観察し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 のリン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解した SA 分子 (1 mg/mL) 、500 nM の biotin 溶液を使用し、観察溶液には 10 mM の MES-K 緩衝液 (pH 6.4) と 20 mM の MgCl₂ 溶液を含む TE バッファ溶液をそれぞれ用いた。図 2 にガラスピペットを用いた分子注入機構の模式図を示す。ガラスピペットは光学顕微鏡の下、慣性駆動スライダを用いてカンチレバーと数十 μm の距離に接近させることが可能となっている。へき開したマイカ基板上、もしくは作製した脂質二重膜[3]上に観察溶液と SA 分子を滴下し、20 分静置した後に観察溶液を用いて 4 回リンスを行い、液中 FM-AFM 観察を行った。脂質二重膜上に比較的欠陥の少ない SA 2 次元結晶が形成されていることを確認した後に biotin 溶液を注入し、SA 2 次元結晶の構造変化を時間経過とともに観察した。biotin 溶液注入前(図 3(a))ではスキャン範囲で全体で個々の SA 分子が観察できたが、biotin 溶液を 1.5 μL 注入した後(図 3(b))はスキャン範囲全体で個々の SA 分子が観察できず、結晶構造が壊れていることを示唆する像が得られた。これは、biotin の特異的結合により SA 分子のコンフォメーションが変化し、SA-SA 間相互作用が弱くなったためと考えられる。

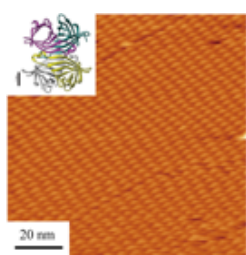


図 1: 脂質二重膜上の SA 2 次元結晶(インセット: SA 分子のリボンモデル).

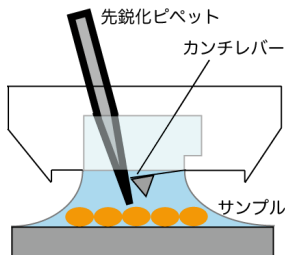


図 2: ガラスピペットを用いた分子注入機構の模式図.

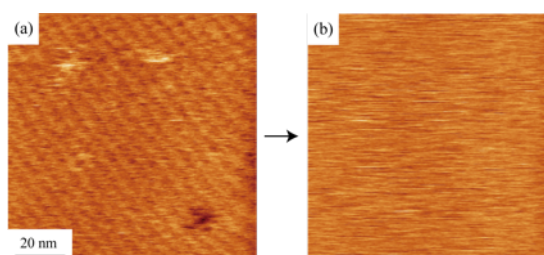


図 3: SA 2 次元結晶の FM-AFM 像. (a) biotin 注入前. (b) biotin 注入後.

[1] 崔、木南、小林、山田、2014 年第 75 回応用物理学会秋季学術講演会、18p-PA8-4.

[2] 宮本、木南、小林、山田、2015 年第 76 回応用物理学会秋季学術講演会、15a-2A-8.

[3] D.Yamamoto et al. *Nanotechnol.* **19**, 384009 (2008).