

biotin 結合による streptavidin 2 次元結晶の構造変化のその場評価

In-situ observation of structural change of streptavidin

two-dimensional crystals induced by biotin binding

濱田 貴裕¹, 宮本 眞之¹, 木南 裕陽¹, 小林 圭^{1,2}, 山田 啓文¹ (1. 京大工、2. 京大白眉セ)

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

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

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、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、液中 FM-AFM を用いた生体分子の構造・機能可視化技術の確立を目指しているが、このためには局所的に生体分子を刺激する技術が必要不可欠となる。われわれはこれまでにマイカ基板上において 2 次元結晶化した streptavidin (SA: 図 1(a)インセット) の高分解能観察および水和構造計測について報告してきた[1,2]。一方、SA 分子は biotin 分子と非常に強固に特異的結合することが知られており、SA 2 次元結晶に biotin 分子を作用させると SA 2 次元結晶が崩れることが報告されている[2,3]。本研究では、FM-AFM 装置に溶液環境変調を可能とするピペットを導入し、biotin 分子によって誘起される 2 次元 SA 分子結晶の構造変化のその場観察を行ったので、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) を用いた。また、ピペットはガラス管 (ナリシゲ: G-1) をブラー (ナリシゲ: PC-10) により引き伸ばして作製した (先端開口径: 約 700 nm)。へき開したマイカ基板上に観察溶液と SA 分子を滴下し、20 分静置した後に観察溶液を用いて 4 回リンスを行うことで非特異吸着している SA 分子を取り除き、液中 FM-AFM 観察を行った。図 1 に 2 次元 SA 分子結晶の液中 FM-AFM 像を示す。マイカ基板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が確認できた。次に、2 次元 SA 分子結晶にピペット開口部を可能な限り接近させ (約 3 mm 以下)、biotin 溶液を注入し、同一領域において 2 次元 SA 結晶の構造変化を FM-AFM により観察し、これを 25-30 分おきに 5 回繰り返した (図 2)。図 2(a)ではスキャン領域全域で 2 次元 SA 結晶が観察されたが、biotin 溶液を注入すると SA の結晶構造が徐々に崩れていく様子が観察された (図 2(b-f))。この結果より、SA 分子 2 次元結晶化の要因となる SA-SA 間相互作用が biotin が結合することで失われることが分かった。

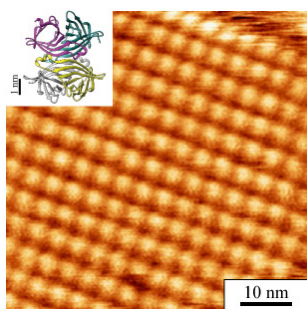


図 1: 2 次元結晶した SA 分子の液中 FM-AFM 像 (インセット: SA 分子のリボンモデル)。

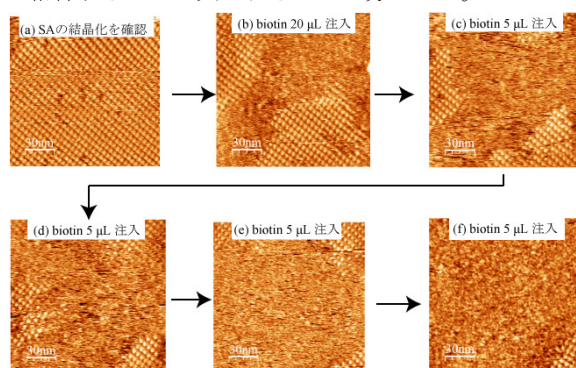


図 2: 2 次元結晶した SA 分子に biotin 溶液を滴下した際の表面形状像の変化。

[1]宮本、木南、崔、小林、山田、2014 年第 62 回応用物理学会春季学術講演会、11p-D5-3.

[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. *Nanotech.* **19**, 384009 (2008)