

FM-AFM を用いた streptavidin-biotin 間特異的結合破断評価

Investigation of specific interaction ruptures between streptavidin-biotin by FM-AFM

京大工 堀内 孝介, 木南 裕陽, 小林 圭, 山田 啓文

Dept. of Electronic Sci. & Eng., Kyoto Univ. OK. Horiuchi, H. Kominami, K. Kobayashi, H. Yamada

E-mail: k.horiuchi.0601@piezo.kuee.kyoto-u.ac.jp

原子間力顕微鏡 (AFM) は生体分子一分子単位での分子認識評価に広く用いられており、探針先端に修飾したリガンドと基板表面に吸着させたレセプターとの相互作用力を計測することが可能な手法である。これまで、我々のグループでは周波数変調 (FM) AFM を用いて streptavidin (SA)-biotin 間相互作用力の評価を行ってきた[1]。FM-AFM は、高分解能な観察が可能な手法であるが、生体分子間相互作用評価の報告例は少なく、その詳細に関しては明らかになっていない。本研究では、脂質 2 重膜上に作製した SA 2 次元結晶に対し、biotin 分子修飾を施した探針を用いてフォースカーブ測定を行い、SA-biotin 間相互作用力の時間変化などに関する詳細な評価を行った結果について報告する。

測定試料として、DOPC : DOPS : biotin-cap-DOPE = 7 : 2 : 1 の割合で混合した脂質 2 上膜を mica 基板上に形成し、その上に 1 mg/mL の SA 溶液を滴下、20 分静置することで作製した一様な SA 2 次元結晶を用いた (Fig. 1)。また、カンチレバーは Si 製の BL-AC40TS (Olympus, ばね定数 : 0.09 N/m) を用いた。まず探針を APTES (aminopropyltriethoxysilane) 溶液を用いて表面修飾を行い、次に 1 mg/mL の biotin-PEG(polyethyleneglycol)-NHS(N-hydroxysuccinimide ester) 溶液に半日以上浸漬することで探針を biotin 修飾し、測定を行った。修飾探針を用いたフォースカーブ測定の結果を Fig. 2 に示す。Fig. 2(a) は平均たわみから求めたフォースカーブ、Fig. 2(b) はたわみと同時に取得した 2 次共振周波数の共振周波数シフトカーブである。Fig. 2(a),(b)ともに表面から 5 nm の位置で Retract カーブに変化が生じ再び Approach カーブに一致した。この結果は、探針が試料に接触し離れた後、5 nm の位置で SA-biotin 間特異的結合が破断したことを示している。また、Fig. 3(a) はフォースカーブ測定時におけるカンチレバーのたわみ信号の時間変化を計測した結果であり、特異的結合破断時の時間応答を示している。Fig. 3(b) は Fig. 3(a) の結合が破断した部分 (破線領域内) を拡大した図であり、結合破断に伴うたわみの応答は 27.6 μ s となっており、カンチレバーの 1 次共振周波数および Q 値から推察される応答速度と一致した。

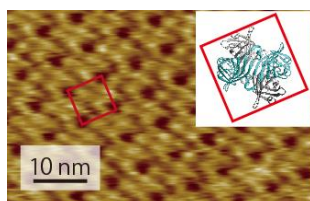


Fig. 1 Topographic image of SA 2D crystals on lipid bilayer. The red square is a unit cell of the SA 2D crystal. Inset shows a ribbon model of SA.

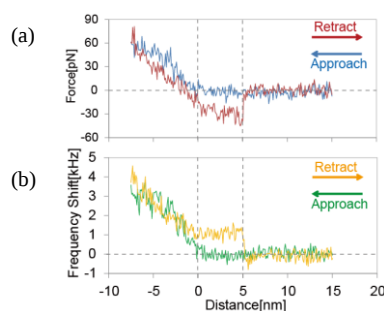


Fig. 2: Mean force (a) and frequency shift (b) curves of a rupture event.

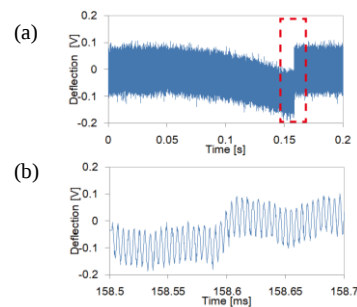


Fig. 3 Cantilever waveforms recorded at a rupture event. (a): Overview (b) Detailed view.

[1] 杉本ら, 第 7 回応用物理学会秋季学術講演会, 19p-222-11 (2018).