

グラフェン酸化物上の繋ぎ留め型脂質二重膜内での分子拡散挙動

Single Molecule Tracking in Tethered Supported Lipid Bilayer on Graphene Oxide

豊橋技科大 [○](M1)都積 清, 斎藤 駿, 手老 龍吾

Toyohashi Tech., [○]Kiyoshi Tsuzumi, Shun Saito and Ryugo Tero

E-mail: k163429@edu.tut.ac.jp, tero@tut.jp

【序】細胞膜の基本骨格である脂質二重膜内での分子拡散やドメイン形成は、細胞内外の物質輸送や情報伝達の反応場を形成する重要な素過程である。支持脂質二重膜 (supported lipid bilayer: SLB) は固体基板上に形成された人工脂質膜系であり、脂質二重膜の構造や物性の計測に用いられている。グラフェン酸化物 (graphene oxide: GO) はナノスケールで親水性・疎水性領域が混在する単原子シート材料であり、その特異的なクエンチ機能がバイオセンシングなどへ応用されている。我々はこれまでに GO 上に SLB を作製し、SLB からの蛍光がほとんど GO によりクエンチされること^[1]、その効率が GO-SLB 間の距離に依存すること^[2]を示した。本研究では固体基板と SLB 間にスペーサーとなるリンカー分子を介した繋ぎ留め型 SLB (tethered-SLB:t-SLB) を GO 上に作製し、SLB 内での蛍光一分子追跡 (SMT) を行った。

【実験】熱酸化 SiO₂/Si 基板上にドロップキャスト法で GO を担持し、GO/SiO₂/Si 基板を調製した。Pyrene butanoic acid succinimidyl ester/DMF 溶液中で 1 h 静置後、洗浄し乾燥した。その後 streptavidin (SA) 溶液、aminoethoxy ethanol 溶液中で 1 h 静置後、洗浄し SA 修飾 GO/SiO₂/Si 基板を作製した。SA 修飾 GO/SiO₂/Si 基板上に 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC)、biotinyl-N-1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphatidylethanolamine (Biotin-DPPE) および蛍光標識脂質 (ATTO532-DPPE) を混合して作製したベシクル懸濁液を滴下し、45°C で 1 h インキュベーションし、ベシクル融合法により SLB を作製した。斜入射照明系を有する倒立型蛍光顕微鏡を用い、緩衝液中で GO/SiO₂/Si 基板上の SLB の SMT 計測を 49 fps で行った。

【結果・考察】SA 修飾 GO/SiO₂/Si 基板上に作製した Biotin-DPPE 含有 DOPC-SLB を原子間力顕微鏡 (AFM) で観察したところ、SiO₂ 上の SLB からの高さが 4 nm 以上の GO 領域が観察された。SiO₂ 上での GO の高さが 1.4-2.4 nm 程度、SA の大きさが ~6 nm であることから、

GO 上に SA を介した t-SLB が形成されたことが示された。同様の操作を行った基板を蛍光顕微鏡で観察したところ、複数の GO 上で拡散する輝点が観察された。通常の SLB では GO のクエンチ機能によって蛍光が観察されないこと、GO-SLB 間の距離が離れると GO のクエンチ効率が低下することから、観察された動く輝点を t-SLB 中の脂質分子と帰属した。我々は以前、量子ドットを用いることで GO の SLB 上で一粒子追跡を行ったが、量子ドット当たりの脂質の結合数や非特異的吸着などの制御に困難な要因があった^[1]。GO 上に t-SLB を形成したことで、蛍光色素分子を用いて SMT を行うことができた。Figure. 1 に各分子の拡散距離の平均二乗変位 (MSD) の時間変位を示す (n=104)。これらから求めた平均 MSD は時間に対して一次に増加しており、その傾きから算出された拡散係数は 0.43 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ であった。SiO₂ 上の SLB (~2 $\mu\text{m}^2/\text{s}$)^[3] よりも小さい拡散係数は、SA に繋ぎ留められた Biotin-DPPE が拡散障壁として働くためと考えられる。

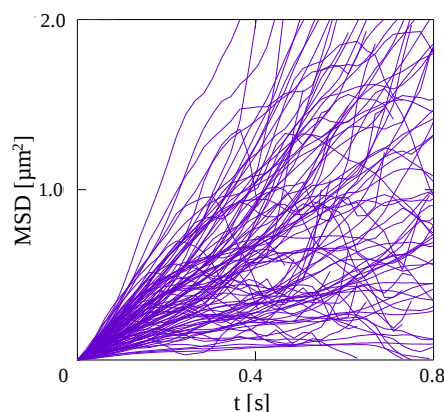


Figure. 1 MSD versus time plots of all trajectories obtained from DOPC-SLB on GO/SiO₂/Si substrate.

[1] Y. Okamoto, et al. *J. Phys.*, **54**, 04DL09 (2015).

[2] 斎藤ら 第 65 回応用物理学会 春季学術講演会 2018 年 3 月 東京.

[3] T. Motegi, et al. *Langmuir*, **33** (51), 1474 (2017).