Annexin A5 2 次元結晶をテンプレートとした streptavidin ナノアレイの作製とタンパク質の特異的検出

Fabrication of streptavidin nano-array using 2D crystal of annexin A5 as a template and detection of biotinylated proteins

京大工 [1]，産総研 [2]　°木南 裕陽 [1]，小林 圭 [1]，平田 芳樹 [2]，山田 啓文 [1]

Kyoto Univ. [1], AIST [2], °Hiroaki Kominami[1], Kei Kobayashi[1], Yoshiki Hirata[2], Hirofumi Yamada[1]

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

基板上に特定の分子を固定化する技術は、タンパク質の検出や機能解析に広く用いられている。しかし、分子の配向や密度を分子スケールで制御することは困難である。その中でわれわれは脂質 2 重膜上において 3 量体を形成し、ハニカム状の 2 次元結晶を形成する annexin A5 (Fig. 1) [1] に着目し、ハニカム格子内に streptavidin を配置することで streptavidin ナノアレイの作製に成功している[2]。本研究では、annexin A5 の結晶形成条件を制御することで高密度にナノアレイを作製し、さらに作製した streptavidin ナノアレイを用いて biotin 化タンパク質を検出した結果を原子間力顕微鏡 (Atomic force microscopy: AFM) によって観察したので、報告する。

マイカ基板上に DOPC : DOPS = 2 : 1 から成る脂質 2 重膜を作製し、50 μg/mL の annexin A5 溶液を 20 μL 滴下し 20 分静置した。pH 6.0 および pH 8.0 中での AFM 観察結果を Fig. 2 に示す。annexin A5 2 次元結晶の空孔が暗点として観察され、その割合が pH 6.0 の場合 73.6%であるのに対し、pH 8.0 では 56.2%と減少した。したがって、空孔内に streptavidin を配置する場合、pH 6.0 の溶液が好ましい。さらに脂質 2 重膜を DOPC : DOPS: biotin-cap DOPE = 74 : 24 : 2 のものに変更し、streptavidin を滴下した結果を Fig. 3(a) に示す。streptavidin (輝点) が約 18 nm の間隔で配列した様子が観察された。また、biotin 修飾された BSA (biotinylated bovine serum albumin: BBSA) を滴下した結果を Fig. 3(b) に示す。streptavidin 上に輝点が観察され、その高さ (3 nm) が BBSA と一致しており、streptavidin ナノアレイ を用いた biotin 化タンパク質の特異的検出に成功した。

[1] A. Miyagi *et al. Nat. Nanotech.* **11,** 783 (2016).
[2] 木南他, 第 65 回 応用物理学会春季学術講演会, 18a-A202-1.

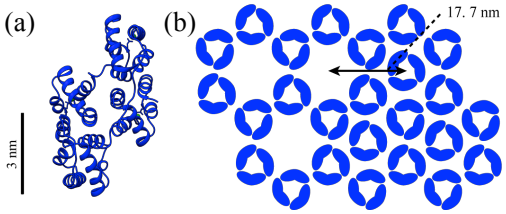

Fig. 1 (a) Ribbon model of annexin A5. (b) Schematic of 2D crystal of annexin V with a p6 symmetry.

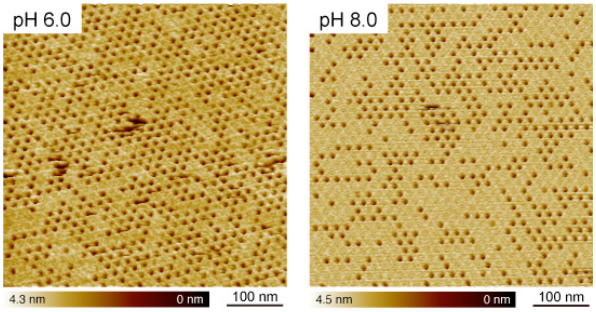

Fig. 2 AFM images of 2D crystal of annexin A5 in pH 6.0 (*left*) and pH 8.0 (*right*).

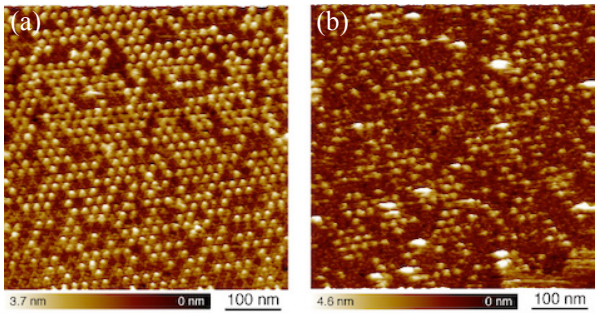

Fig. 3 (a) AFM image of streptavidin nano-array. (b) AFM image of streptavidin nano-array after deposition of BBSA.