

FM-AFM による Streptavidin 2 次元結晶の液中高分解能観察

High-resolution imaging of 2D streptavidin crystal by FM-AFM in liquids

京大工¹, 京大白眉セ², 宮本 真之¹, 木南 裕陽¹, 崔 子鵬¹, 小林 圭^{1,2}, 山田 啓文¹Dept. of Electronic Sci. & Eng., Kyoto Univ.¹, The Hakubi Center for Adv. Res., Kyoto Univ.²°M. Miyamoto¹, H. Kominami¹, Z. Cui¹, K. Kobayashi^{1,2}, H. Yamada¹E-mail: miyamoto.masayuki@piezo.kuee.kyoto-u.ac.jp

【はじめに】近年、生体分子間の特異的相互作用を利用するバイオセンサーや分子標的治療などの研究が精力的に進められているが、これら相互作用の認識部位を特定し、その相互作用の大きさを測定する手法の確立が強く求められている。一方、現在、生体分子の高分解能観察法として、液中環境において動作可能な周波数変調原子間力顕微鏡 (FM-AFM) が広く用いられつつある。われわれはこれまでに、Streptavidin (SA: 図 1(a)インセット) がマイカ基板上において 2 次元結晶化することを見だし[1]、また、Avidin-Biotin 間の相互作用の FM-AFM による評価[2]について報告してきた。2 次元結晶化した SA 分子は、特異的相互作用評価のプラットフォームとして期待されるが、その構造・機能に関する詳細な情報はまだ得られていない。本研究では、先ず FM-AFM により 2 次元 SA 分子結晶の高分解能構造観察を行ない、次に Biotin 修飾されたウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin: BSA) (BBSA) を加えることで、Streptavidin-Biotin 間の特異吸着能の評価を行なった。

【実験方法と結果】試料として、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) によって希釈した SA 分子(1 mg/ml)、BSA 分子 (約 0.1 μ M)、および BBSA 分子 (約 0.1 μ M) を使用し、観察溶液には 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.2) を用いた。カンチレバーは、Nanosensors 製の PPP-NCHAuD (パネ定数 42 N/m) を使用した。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 回リンスを行ない、非特異吸着している SA 分子を取り除き、その後に液中 FM-AFM 観察を行なった。図 1(a),(b) は、各々 2 次元 SA 分子結晶の FM-AFM 像およびその高分解能観察結果である。比較的欠陥の少ない 2 次元結晶が形成されていることが分かる。図 1(b) の AFM 像に見られる個々の SA 分子は、中央にあるくびれを境として 2 つの領域に分かれ、やや複雑な構造の上部領域には小さな 2 つの輝点が見られる。一方、下部領域は比較的単純な構造で中央に (1 つの) 輝点が見られる (図 1(b) 緑矢印)。この構造は、(a)のインセットの分子構造モデルとよく対応しており、3 つの輝点は、分子を構成する 4 つのサブユニットのうちの 3 つに対応すると考えられる。すなわち、SA 分子は、(a)の分子モデルに示されるように、長軸を基板面に水平にするように吸着していると考えられる。次に、この 2 次元 SA 結晶に BBSA を滴下し、5 分静置した後、非特異吸着している BBSA を取り除くため、観察溶液で 5 回リンスを行ない、AFM 観察を行った。得られた FM-AFM 像を図 2(a)に示す。結晶構造は見られず、丸い粒状の構造が無秩序に密集している構造が観察される。一方、BBSA の代わりに同じ手順で BSA 分子を加えた対照実験(図 2(b))では、2 次元結晶構造は変化していない。これより、BBSA の特異吸着が 2 次元結晶構造に影響を与えた可能性が示唆される。

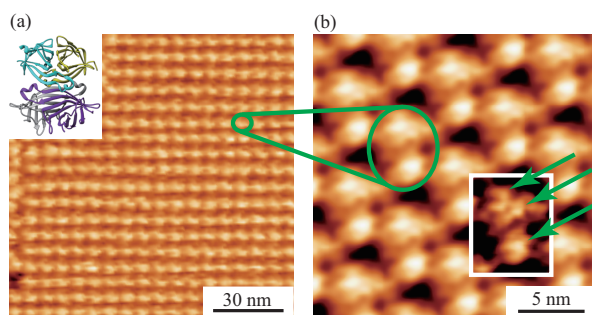


図 1: (a) 2 次元結晶化した SA 分子の液中 FM-AFM 像。インセット: SA 分子のリボンモデル。 (b) 2 次元結晶化した SA 分子の高分解能観察結果。インセット: コントラストを強調したもの。緑矢印は 3 つの輝点を示す。

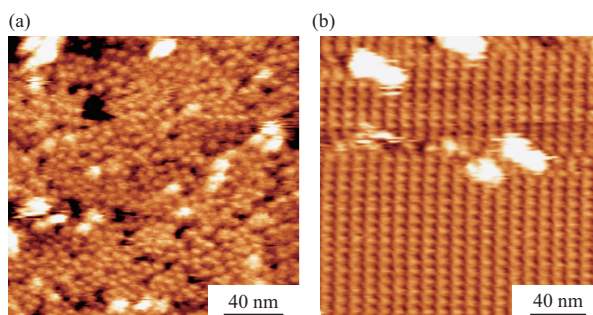


図 2: 2 次元結晶化した SA 分子に (a) BBSA (b) BSA を滴下した後の表面形状像。

[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]李、鈴木、小林、山田、2014 年第 75 回応用物理学会秋季学術講演会、19a-A8-10.