

FM-AFMによる生体分子上における表面電荷と水和構造の相関の解明

京都大学工学研究科

梅田 健一

要旨

本研究では、近年発展の著しい液中動作型の周波数変調検出方式 AFM (FM-AFM) を用いて生体分子上における表面電荷と水和構造の相関を解明するために、正と負帯電の表面上に形成された局所水和構造の比較およびモデル生体試料の作製を行った。

1. 背景と目的・目標

溶液中における固体表面の表面電荷密度分布およびそれによって形成される水和構造は、リガンド-レセプター反応や抗体-抗原反応などを始めとして生体分子間の様々な特異的な相互作用を決定づける重要なファクターである。こうした現象を原子スケールで可視化し、生体機能発現メカニズムを微視的観点から明らかにすることは生物・医学の発展に繋がる。近年、本研究室の研究成果によって、走査プローブ顕微鏡 (SPM) の一種である FM-AFM が、溶液中において原子・分子スケールでの構造評価だけでなく、3D-フォースマップ法と組み合わせることで 3 次元局所水和構造および分子スケールでの 3 次元電荷密度分布を可視化することが可能となってきている[1]。本研究では、生体分子上に形成される局所水和構造と表面電荷の相関を明らかにすることを目的として行った。

2. 研究および考察

2-1. モデル試料表面における局所水和構造と表面電荷の相関の解明

まず、モデル試料として層状ケイ酸塩鉱物の一種であるクリノクロアと呼ばれる劈開性の試料を用いて実験を行った。これは正に帯電したヒドロタルサイト (HT) 層と負に帯電したマイカ (Mc) 層の交互に積層した構造となっており、スコッチテープを用いて劈開するだけで、正と負のパッチ構造を再現性良く作製することができる。100 mM KCl 水溶液中において、このドメイン構造のエッジ付近で取得したフォースマップ像を図 1(a) に示す。図 1(b) の表面形状像から 3 種類の表面が観察されていることが分かる。上から順に水和した HT、ベアな

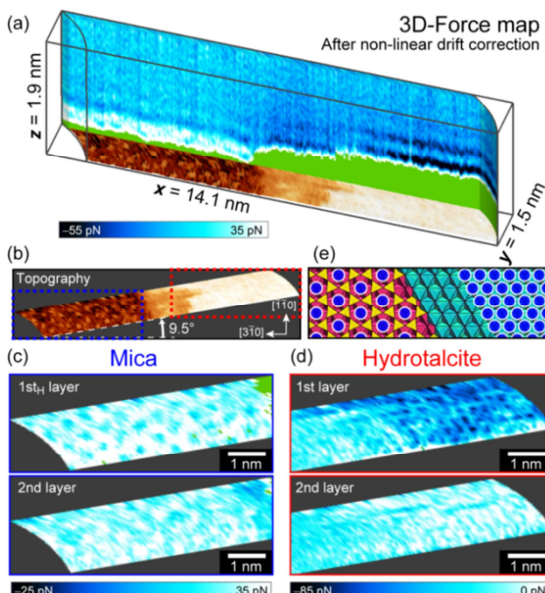


図 1: クリノクロア上で取得した (a) 3D フォースマップ像 (b) 再構成した形状像. (c) Mc および (d) HT 領域上で再構成した 2D フォースマップ像. (e) 結晶構造模式図.

HT、水和している Mc 表面であることが分かった。フォースマップ像から HT および Mc 上においてそれぞれ引力および斥力相互作用が観察されることが分かった。これは Si 探針表面が負に帯電した SiO₂ で被覆されており、それぞれの帯電状態に対応した水和交換力が観察されたと考えられる。図 1(c)(d)に示す一定高さ表面で抽出した 2D フォースマップ像から第一および第二水和層において、図 1(e)に示す結晶構造と格子周期の一致する明瞭な原子像コントラストが得られていることが分かる。共同研究先のフィンランド アールト大学の Adam S. Foster 教授のグループに分子動力学法を用いたシミュレーションを依頼し、これらの実験結果に対応する理論計算結果の取得にも成功した。

2-2. 水和構造に適したモデル生体試料の作製

上記で得られた知見を生体試料上に形成した水和構造解析に応用するために、紫外光を用いてその構造を可逆的に変化できることで知られるプロトン輸送膜タンパクの一種であるバクテリオロドプシン (bR) 膜試料の作製を行った。プロトン活性を維持するために、トレンチ構造を有するクリノクロア上に膜の展開を行った。作製した試料の観察を行った結果を図 2 に示す。このように基板の形状の影響を受けるようにして表面が観察されていることが分かる。また明瞭に分子の 3 量体の構造を観察することにも成功した。しかしながら、フォースマップ観察も行ったが、明瞭な水和構造を可視化することができなかった。これは生体試料上の水和構造が溶液条件などによって強固な構造を形成する場合とそうでない場合があり、現状ではうまく制御できていないことによると考えられる。

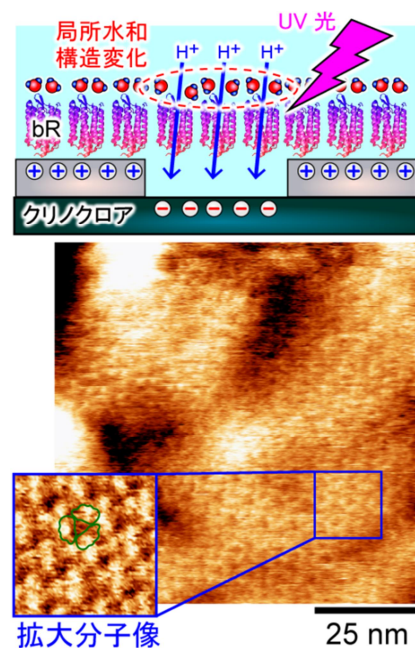


図 2: トレンチ構造上に作製した bR 分子像.

3. まとめと課題

本研究では、生体機能発現と水和構造の相関の解明を目指して、まず 2 種類の異なる表面電荷密度をもつ試料表面上において同時に局所水和構造計測を行い、局所水和構造と表面電荷密度・原子周期の相関を明らかにすることに成功した。更に生体機能と局所水和構造の相関を解明するのに適した機能性膜タンパク試料の作製に成功した。現状の課題として、鉱物系試料上においては再現性良く水和構造を観察することができているが、生体試料表面上においては、歩留まりが悪いということが挙げられる。今後は測定環境の温度を 5 °C 程度まで下げることで水和構造を安定化させることなどを模索していく必要がある。

参考文献

- [1] K. Umeda et al. *Nanotechnology*, 26, 285103 (2015).