

平成 22 年 4 月 6 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19710096

研究課題名 (和文) ナノバイオデバイス上固定化タンパク質構造測定法の開発

研究課題名 (英文) Development of structural analysis method for protein immobilized on nano-biodevice

研究代表者 青柳 里果 (AOYAGI SATOKA)

島根大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：20339683

研究成果の概要 (和文)：

飛行時間型二次イオン質量分析 (TOF-SIMS) による固定化タンパク質の配向評価法の確立を目指して、複数の固定化タンパク質試料をいくつかの一次イオン源で測定した。結果として、固定化したチトクロム b 5 およびリゾチウムそれぞれについて、固定化条件と一致する最表面部分が TOF-SIMS で検出されたため、TOF-SIMS による固定化タンパク質の配向評価は可能であったと考えられる。また、一次イオン源は、 C_{60}^+ のような巨大なクラスターイオンである方がタンパク質の配向や構造変化を詳細に評価できる可能性が示された。

研究成果の概要 (英文) : Immobilized-protein samples such as cytochrome b5 and lysozyme were investigated using TOF-SIMS with different primary ion sources for evaluating their orientations. Since the suggested surface side of each protein was consistent with the immobilization conditions, it is suggested that TOF-SIMS has the ability to evaluate orientation of immobilized protein molecules. Moreover, it is also indicated that the larger cluster ion source C_{60}^+ provides superior information to determine the surface part of the immobilized protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	390,000	3,490,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：タンパク質、分子認識、表面・界面物性、ナノバイオ

1. 研究開始当初の背景

近年、ナノバイオデバイスの開発が進み、高度に制御された条件下での生体高分子の

固定化が重要だが、実際にデバイス上に固定化された生体高分子が望んだように制御されているかどうか計測する手段はきわめて

少なかった。最も高感度な表面分析法の一つである飛行時間型二次イオン質量分析法 (TOF-SIMS) はタンパク質の最表面構造が検出できるはずだが、予測できないフラグメントイオンの解析法および同定法の開発とその応用が課題であった。TOF-SIMS スペクトル解析に関しては、相互情報量に基づいて、特定試料に特徴的なピーク候補を選び出す手法をすでに開発していたが、この手法の有用性を検討する必要がある。

2. 研究の目的

化学反応によって変化するタンパク質の構造を実測することを目的とした。タンパク質などの生体高分子の観察および評価は、生命科学系の基礎研究から、生体由来の材料を用いるバイオデバイスまで、広範な研究分野において重要である。しかし、特定の条件下での構造ではなく、変化するタンパク質の構造が測定できる手法は未だ一般化されていない。

そこで、本研究では、飛行時間型二次イオン質量分析法 (TOF-SIMS) を用いて、基板表面に固定化された抗体や酵素などのタンパク質の化学反応や環境変化による構造変化を計測する手法の開発を目指した。TOF-SIMS は、バイオ材料の 2nm 以下の情報が得られる非常に高感度な表面分析法であるため、タンパク質一分子層以下の情報が得られる。つまり、図 1 に示すように、固定化したタンパク質の最表面部分だけの化学構造情報が得られるため、検出された部分の構造を明らかにし、固定化タンパク質の構造と照合することにより、検出された最表面部分がわかれば、配向が評価できる。

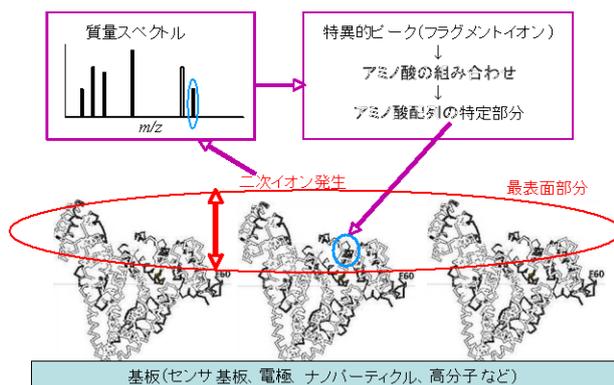


図 1：固定化タンパク質の配向評価の概念図

ただし、現状の一般的な TOF-SIMS 装置では、タンパク質のような高分子を測定する場合は、フラグメント化が避けられず、またフラグメント構造の理論的な予測が困難なため、TOF-SIMS スペクトルの解析が困難である。本研究では、これまで開発した情報エ

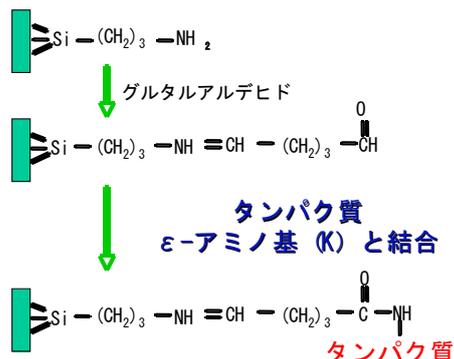
ントロピーに基づくスペクトル解析を用いて、参照試料のスペクトルと比較することにより、対象とするタンパク質に起因する二次イオンの選出を容易とし、タンパク質フラグメントとして可能な化学構造をすべて考慮することにより、TOF-SIMS で検出されたタンパク質の部分構造を決定することを試みた。

3. 研究の方法

モデル試料として、アミノ酸配列、立体構造が分かっているタンパク質の中で比較的分子量であるチトクロム b5 やリゾチムを用いた。チトクロム b5 は分子内に一つだけシステイン残基を導入し、システイン内のチオール基との相互作用によって、金基板上に自己組織的に一分子層を形成させた試料を作製した。

リゾチムは、下図に示すように、導電性基板である ITO ガラス電極基板をアミノシラン化したのち、グルタルアルデヒドを介して、タンパク質内のリシンの ε-アミノ基との共有結合で固定化させた。またタンパク質未反応基板をそれぞれ参照試料として用意した。

ITOガラス表面のOH基をアミノシラン化



それぞれの試料を凍結乾燥したのち、市販されている飛行時間型二次イオン質量分析 (TOF-SIMS) 装置で使用可能なクラスターイオン源である金クラスターイオン (Au_3^+) および C_{60}^+ と、従来から用いられているモノアトムイオン Ga^+ を用いてそれぞれの試料を測定し、得られた TOF-SIMS スペクトルを比較した。

得られた TOF-SIMS スペクトル上の全てのピークについて、それぞれ参照試料であるタンパク質を含まない試料のスペクトル上のピーク強度と比較し、タンパク質試料に特徴的な二次イオンピークを選出した。各ピーク強度について、相互情報量を計算し、参照試料と強度に確実な差があるピークを選出した。選出したピークのうち、同定可能なピークについて化学構造を決定し、タンパク質のアミノ酸配列および立体構造と照合する

ことにより、検出された面を探した。

最終的に検出された面と、固定化条件から想定される最表面が一致するかどうか検討し、TOF-SIMSによる配向評価の妥当性を検討した。

4. 研究成果

TOF-SIMS スペクトルを解析し、チトクロム b 5 試料に特徴的な二次イオンピークを解析した結果、チトクロム b 5 は、図 2 の緑の丸で示す部分が最表面部分として検出された。

チトクロム b 5 は、システイン部分で固定化し、図 2 に示すように基板に分子が倒れると、検出面が最表面に位置する。したがって、固定化条件と一致する配向が示唆されたことから、TOF-SIMS による固定化タンパク質の配向評価が有効であることが示されたと考えられる。

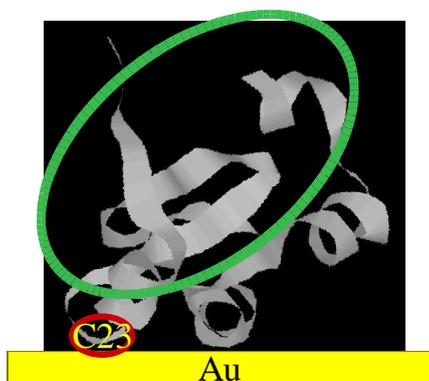


図 2 : TOF-SIMS で示唆されたチトクロム b 5 の最表面 (緑の丸)

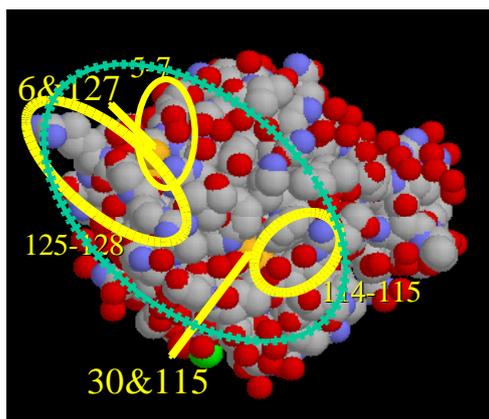


図 3 : TOF-SIMS で示唆されたリゾチウムの最表面 (黄色丸部分は検出アミノ酸残基)

リシンによって固定化したリゾチウムに関しては図 3 に示す面が TOF-SIMS 測定によって示唆された。この面の背面 (図 4) は、

リゾチウムが含む 6 つのリシンのうち 4 つを含み、リゾチウムは、この面で固定化される可能性が最も高いことから、今回の固定化条件では、図 3 が最表面となる可能性が最も高い。

したがって、リゾチウムの場合も固定化条件と一致する面が最表面として、TOF-SIMS 測定によって示唆されたことから、TOF-SIMS による配向評価は信頼性が高いと考えられる。

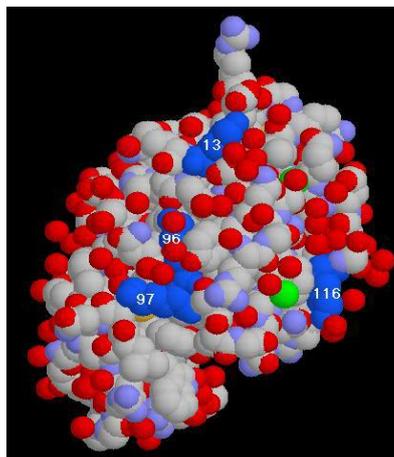


図 4 : 図 3 の背面 (青色部分はリシン)

また、一次イオン源の比較検討した結果、 C_{60}^+ を一次イオン源とする場合は、金クラスターイオンやモノアトミックイオンを使用した場合よりも、高質量の二次イオンピーク、もしくは、複数のアミノ酸残基に関わる二次イオンピークをより多く検出できた。したがって、TOF-SIMS で示唆される検出部分の決定がより小さい一次イオン源を用いた場合よりも、容易かつ明確となった。つまり、 C_{60}^+ を一次イオン源とする場合は、明確に検出部分である最表面部分を明らかにできることが示され、タンパク質の配向や構造変化を詳細に評価できる可能性が示された。ただし、 C_{60}^+ を一次イオン源とした場合も二次イオン生成時の再結合が避けられず、検出された二次イオンピークには同定できないものも多く含まれた。

一次イオン源としてクラスターイオンを用いた場合は、同加速エネルギーで照射するモノアトミックイオンに比べて一分子当たりの衝突エネルギーが抑えられるため、試料分子に対する破壊力が小さくなり、より大きなフラグメントイオンや一分子イオンが得られやすいと考えられている。今回の実験結果は、その予測と一致するものとなったが、 C_{60}^+ で発生させることのできるフラグメントイオンは金クラスターや Ga よりも相対的に大きいに過ぎず、実際には、分子量 1 万程度の比較的 low molecular weight のタンパク質の場合は、よ

く用いられている金属クラスターイオン源や場合によってはモノアトミックイオンでも可能であることが本研究で示された。ただし、分子量が 10 万を超えるようなタンパク質の最表面を決定するには十分な大きさのフラグメントイオンの発生には、 C_{60}^+ 一次イオン源も十分ではなく、さらに巨大なクラスターイオンが求められる。したがって、固定化タンパク質の詳細な構造解析には、従来のクラスターイオンよりもさらにソフトなイオン化が可能なガスクラスターイオンなどの応用が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

(1) 青柳里果、加藤信彦、工藤正博、クラスターイオン C_{60}^+ 搭載飛行時間型二次イオン質量分析法を利用した固定化リゾチウムの最表面構造評価、医工学治療、22 (1)、20-26、2010、査読あり

(2) S. Aoyagi, Masahiro Higuchi, Nobuhiko Kato, and Masahiro Kudo, Evaluation of pH-Dependent Staphylococcal Protein A Structural Change Using TOF-SIMS, e-Journal of Surface Science and Nanotechnology, 7, 715-720, 2009, 査読あり

(3) S. Aoyagi, A. Rouleau and W. Boireau, "TOF-SIMS structural characterization of self-assembly monolayer of cytochrome b5 onto gold substrate", Applied Surface Science, 255, 1071-1074, 2008, 査読あり

(4) K. Okada, S. Aoyagi, M. Dohi, N. Kato, M. Kudo, M. Tozu, T. Miyayama, N. Sanada, "Evaluation of immobilized-lysozyme by means of TOF-SIMS", Applied Surface Science, 255, 104-1106, 2008, 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

(1) Satoka Aoyagi, Koki Namekawa, Kenichiro Yamamoto, Kiyotaka Sakai, Nobuhiko Kato, Masahiro Kudo, Investigation of Molecular Surface Detection with Time-of-flight Secondary Ion Mass Spectrometry, 7th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices'09(ALC'09), 2009年12月6日-2009年12月11日、ハワイ

(2) 青柳里果、加藤信彦、工藤正博、 C_{60}^+ を用いた飛行時間型二次イオン質量分析法による固定化ポリペプチド最表面構造評価の基礎的検討、第29回表面科学学術講演会、2009年10月27日-2009年10月29日、東京

(3) Satoka Aoyagi, Nobuhiko Kato, Masahiro Kudo, Evaluation of Polypeptide-immobilized

indium-tin oxide electrode with C_{60}^+ primary ion source, The 17th International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS XVII), 2009年9月14日-2009年9月18日、トロント、カナダ

(4) 青柳里果、加藤信彦、工藤正博、飛行時間型二次イオン質量分析法を利用したタンパク質構造変化評価法の開発、日本医工学治療学会 第25回学術大会、2009年4月11日-2009年4月12日、大阪

(5) Satoka Aoyagi, Development of Protein Orientation Analysis Method with TOF-SIMS, The 14th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC2008), 2008年11月29日-12月1日、東京

(6) 青柳里果、樋口雅浩、加藤信彦、工藤正博、飛行時間型二次イオン質量分析法を用いたプロテインAのpHによる構造変化の評価、第28回表面科学会学術講演大会、2008年11月13-15日、東京

(7) S. Aoyagi, A. Rouleau and W. Boireau, "TOF-SIMS structural characterization of self-assembly monolayer of cytochrome b5 onto gold substrate", The 16th International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS XVI), 2007年10月29日、Kanazawa

[その他]

ホームページ等

<http://bioinfoenv.shimane-u.ac.jp/aoyagi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 青柳里果 (AOYAGI SATOKA)
島根大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号：20339683

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：