

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19710109

研究課題名（和文）機能性分子間相互作用ダイナミクス研究への展開

研究課題名（英文）Site-selective anatomy of molecular interactions using dynamic force spectroscopy

研究代表者

谷中 淳 (TANINAKA ATSUSHI)

筑波大学・大学院数理物質科学研究科・助教

研究者番号：80400638

研究成果の概要（和文）：機能性分子から分子デバイス構築などへの応用を目指す場合、相互認識により特異的な結合を形成する2分子間の相互作用を、精密に理解することが重要かつ緊急課題である。本研究では原子間力顕微鏡と動的分子間力分光法を組み合わせることにより、分子間相互作用ポテンシャルを求めた。分子鎖とタンパク質の化学結合を変化させることによって、ポテンシャルを個々に分離して測定し、機能変化および結合箇所の反応機構を解明した。

研究成果の概要（英文）：We have demonstrated a methodology that realizes the site-selective anatomy of molecular interactions at the single-molecule level. With the combination of cross-linkers and the atomic force microscope that we developed to enable a precise analysis by dynamic force spectroscopy, direct and bridged interactions at each reaction site in a typical ligand-receptor system, streptavidin-biotin complex, were clearly distinguished and individually analyzed for the first time, providing a greater understanding of step-by-step progress of the bonding process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：表面科学

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：1分子ナノ計測

## 1. 研究開始当初の背景

DNA や抗原抗体などの機能性分子から分子デバイス構築などへの応用を目指す場合、相互認識により特異的な結合を形成する2分子間の相互作用を、温度変化などの環境に対して精密に理解することが重要かつ緊急課

題である。

これら機能性分子を、単分子レベルで相互作用を取り扱う際に特に重要となるのは、互いの分子間に働く相互作用ポテンシャルを記述することである。最も扱われる実験手段は熱力学的解析である。熱力学は、物質の反

応を律するエネルギーや反応速度を巨視的に記述する場合、極めて効果的である。しかし、機能性分子の複雑な構造から生じる反応の多様性や限定性は、局所的な機能分子の性質や反応過程により決定されるため、機能解明には単分子レベルでの解析が必要になる。これまでの巨視的な反応の描写では、機能性分子の局所的な相互作用を解明することは極めて困難になる。

## 2. 研究の目的

こうした問題を解決する方法として動的分子間力分光法(Dynamic Force Spectroscopy : DFS)を用いることにより、機能分子の単分子間相互作用ポテンシャルを求め、局所的な相互作用を解明する。DFSは分子を引っ張ることで、分子間に直接動的に力を印加し、結合を破断させ、そのときの破断力と力を加える速度>Loading Rate)の関係から分子間相互作用ポテンシャルを求める手法である。DFSは特定の2分子間相互作用ポテンシャル曲線および2分子間結合寿命を導出可能である点が特に優れている。

しかし、従来のDFS測定では、サンプリングレートが1kHz程度と低いため、高速に分子を引っ張るところでは正確な破断力を見積ることができない。また、装置が特殊であり、温度変化や溶媒効果の測定には不向きであるため、環境変化に伴うポテンシャル曲線の精密な測定・評価には不十分であった。

そこで、本研究では原子間力顕微鏡(AFM)を用いてDFSを行う装置と手法の開発を行い、新しい方法で分子間相互作用ポテンシャルを求めた。AFMは原子あるいは分子というスケールの空間分解能を持ち、印加する力を高精度で制御可能という利点があり、サンプリングレートも100kHzまで高めることができる。また、これにより、目的とする温度変化や溶媒効果などの環境変化による機能性分子の局所的な相互作用を解明することができる。

## 3. 研究の方法

AFMとDFSを組み合わせ、装置を構築するにあたり、DFSの理論を考える必要がある。今、分子を引っ張って力を印加すると、印加した力によってポテンシャルカーブが変化し、印加する力の増加速度>Loading Rate)が大きくなるほどエネルギー障壁が低くなる。

$$P(f) = C \exp\left\{\frac{(f-f^*)x_b}{k_B T}\right\} \exp\left[1 - \exp\left\{\frac{(f-f^*)x_b}{k_B T}\right\}\right] \quad (1)$$

$$f^* = \frac{k_B T}{x_b} \left\{ \ln(r_0) + \ln\left(\frac{t_0 x_b}{k_B T}\right) \right\} \quad (2)$$

このとき、エネルギー障壁を越えて起こる破断は、式1のように最頻破断力 $f^*$ を中心とする確率分布で表され、最頻破断力 $f^*$ は

Loading Rateの対数と直線関係になる(式2)。

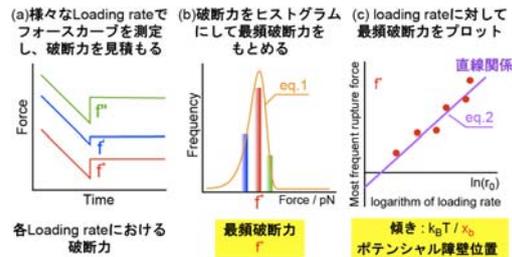
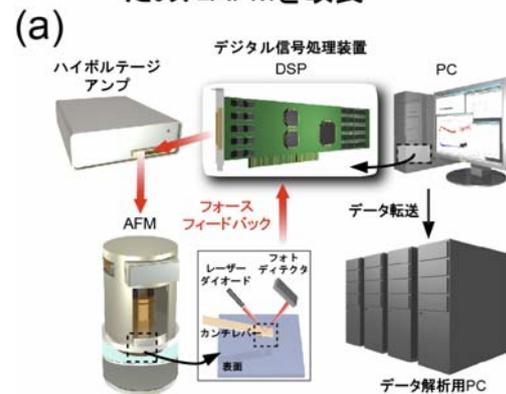


図1 DFSの測定方法

このときの傾きはエネルギー障壁の位置に依存しているため、(a) AFMを用いて破断力を測定し、(b) 最頻破断力を求め、(c) そのときの>Loading Rate)対してプロットするとエネルギー障壁の位置がわかる(図1)。

### ①>Loading rate一定を実現するためにAFMを改良



### ②>ポテンシャルを分離するために2つの反応系で測定

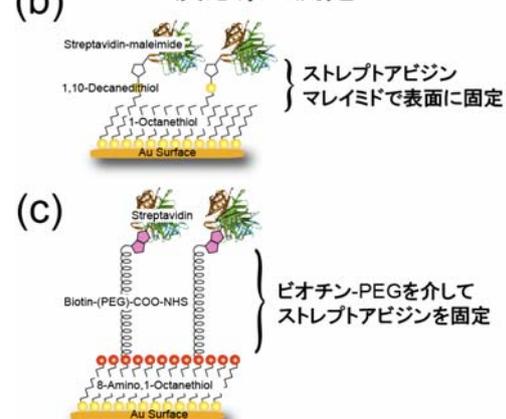


図2 DFS装置と試料の概念図

本研究では、(1)新しく開発したAFMを用いることで(図2(a))、従来行われていなかった、力の印加速度一定での精密なDFS解析を行うことを可能にし、(2)Streptavidinを表面に固定する際、Biotin-PEG分子を用いて固定する方法とmaleimide基を用いて直接固

定する方法を用い、Streptavidin-Biotin の相互作用ポテンシャルとの結合の深さを変更し、内側のポテンシャル障壁と外側のポテンシャル障壁を個々に観察することを試みた。図 2(a)、(b)および(c)に概念図を示す。

カンチレバーは Olympus 社製 Bio-Lever 0.006N/m、0.030N/m と AC-Lever 0.020N/m の 3 つを使用した。

DFS 測定は、pH7.4 0.01M リン酸緩衝溶液、pH7 0.05M 硝酸ナトリウム水溶液、pH4 0.05M フタル酸緩衝溶液および pH10 炭酸緩衝溶液の各水溶液中で行った。異なるそれぞれの印加速度  $r_0$  に対しフォースカーブを 5000~10000 回測定して破断力を見積もり、ヒストグラムを作成した。

#### 4. 研究成果

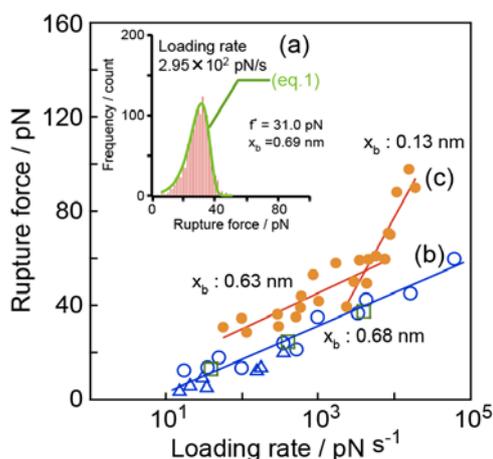


図 3 (a)破断力ヒストグラムと(b)Loading rate と最頻破断力の関係

図 3(a)に破断力のヒストグラム、(b)および(c)に Loading rate の対数に対する最頻破断力をプロットした結果を示す。図 3(b)および(c)の結果は、それぞれ図 2(b)および(c)の方法で作成した試料を用いて得られたものである。図 3(b)の傾きから、障壁位置を見積もった結果、0.68nm となった。この値は、図 3(a)のヒストグラムに式(1)をフィッティングした結果から得られた障壁位置 0.69nm によく一致しており、測定の正しさと、力の印加速度一定を精密に実現し DFS 測定を行えば 1 つのヒストグラムの幅からポテンシャル障壁位置を得ることは十分可能であることを示している。

図 3(c)では、Loading rate が  $2 \times 10^3$  pN/s 以上のところで急激に傾きが変化した。傾きから求めたポテンシャル障壁位置は 0.13nm と 0.63nm となった。これは過去に報告されているポテンシャル障壁位置である 0.12nm および 0.50nm に一致している[4]。また、0.63nm は Streptavidin-maleimide を用いた図 3(b)の障壁位置 0.68nm に一致している。以上から、

0.13nm の障壁位置は、Streptavidin の奥の反応サイトにあるポテンシャル障壁で、ASP128 や ASN23 などの深い位置にあるアミノ酸残基との直接結合から生じたポテンシャル障壁であると考えられる。0.63nm はそれよりも浅い位置にあるポテンシャル障壁であると考えられる。

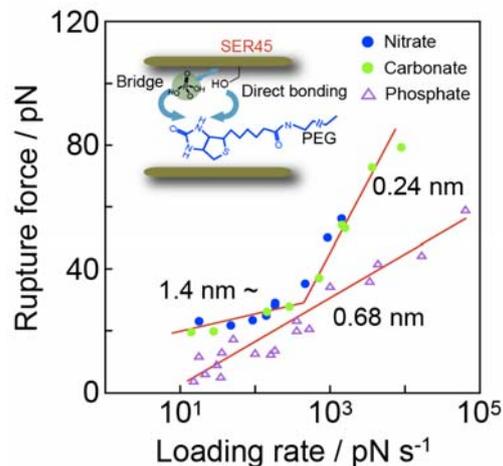
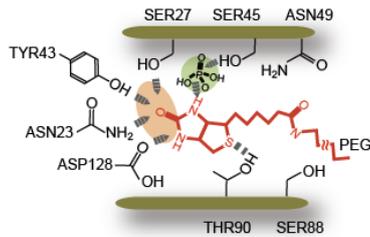


図 4 緩衝溶液を変化したときの Loading rate と最頻破断力の関係

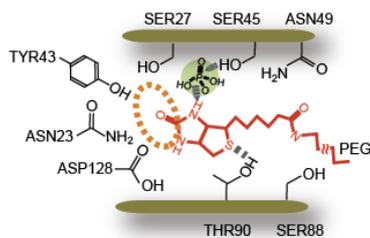
図 4 に溶液を変更したときの Loading rate の対数に対する最頻破断力をプロットした結果を示す。緩衝溶液をリン酸から硝酸ナトリウム水溶液、フタル酸および炭酸へ変更した場合、0.2-0.3nm 付近に障壁位置を確認できたが、0.6-0.7nm 付近の障壁は観察されなかった。リン酸緩衝溶液では反応系や pH によらず 0.6-0.7nm 付近の障壁を観察できたが 0.2-0.3nm 付近の障壁位置は確認できなかった。

これら結果から、0.6-0.7nm 付近の障壁は Biotin と Streptavidin のアミノ酸残基がリン酸イオンと架橋したために生じた障壁、0.2-0.3nm 付近の障壁はアミノ酸残基との直接結合から生じた障壁であると考えられる。硫酸イオンが SER27 と SER45 に架橋しているという報告があり[18]、硫酸イオンと同様の過程がリン酸イオンでも生じていると思われる。

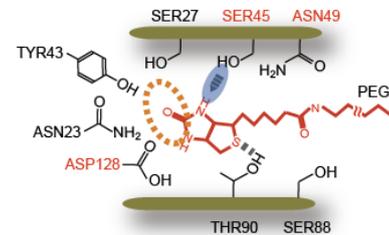
以上の結果から、精密な DFS 測定を可能にする AFM のシステムを開発し、分子の固定法と組み合わせることで、Streptavidin-Biotin 分子間相互作用ポテンシャルの詳細を解析した。Streptavidin を表面に直接固定した場合、浅い位置にあるポテンシャル障壁のみが観察され、その位置は 0.68nm で架橋による結合であることが示された。一方、Streptavidin を、PEG 分子を介して表面に固定した場合、浅いサイトに加えて深い位置にあるポテンシャル障壁も観察され、その位置は 0.13nm と、深いサイトでの結合が直接結合であることが明らかになった。また、AFM では、溶媒



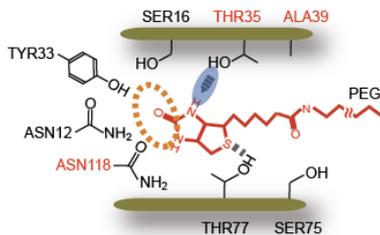
PEG-PEGのときは障壁が2つ観察される。



マレイミドで固定すると奥の障壁が観察されない。  
リン酸分子はSER45とビオチンとの間で架橋。



リン酸緩衝溶液以外のときは  
直接水素結合が見える。



ASN118に関する障壁はマレイミド固定なので見えない。  
溶液に関わらず直接水素結合が見える。  
観察された障壁はTHR35に関する障壁。

図5 局所反応機構の模式図

の種類を変えることも可能で、これまで水分子により架橋されていると考えられてきた浅いサイトの結合が、リン酸分子の架橋によることが明らかになった。これらの結果は Appl. Phys. Express 2, 2009, 085002 に報告した。

分子鎖とタンパク質の化学結合を変化させることによって、結合ポテンシャルを個々に分離して測定し、表面とタンパク質の相互作用が結合ポテンシャルの分離測定に関係していることを解明した。結合寿命がタンパク質の化学結合の状態ですべて予想通りに変化することもわかった。また、それを利用することでポテンシャル障壁の変化を測定し、機能変化および結合箇所に依存した反応機構を解

明した。さらに、より複雑な破断を示すアビジンについて、上記分離測定と溶液中のイオン種変更によって、ストレプトアビジンとは異なり、溶液中の分子が架橋することなくビオチンと結合していることを解明した。図5にDFSによって観察された局所反応機構の模式図を示す。これらの結果は Int. J. Mol. Sci. 11, 2010, 2134-2151 および Chem. Phys. Phys. Chem. に投稿中である。

温度変化によるポテンシャル曲線の差を精密に測定した。4°Cから60°Cへ徐々に温度を上げていき、結合ポテンシャルの変化を測定することで、直接結合と架橋結合との差を解析した。直接結合では温度の変化によって障壁位置に変化は現れず、架橋結合の時は障壁位置に変化が現れた。このことから、直接結合では結合ポテンシャルの変化は小さく、架橋結合の場合は架橋分子の温度に対する平衡状態を考慮して解析する必要があることがわかった。

個々のサイトでの結合の様子を詳細に解析することが可能になったことにより、分子間相互作用の反応機構を単一分子レベルで段階的に理解するなど、今後、新たな展開が期待される。

## 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3件)

1. A. Taninaka, O. Takeuchi and H. Shigekawa  
Reconsideration of Dynamic Force Spectroscopy Analysis of Streptavidin-Biotin Interactions  
International Journal of Molecular Sciences 11, 2010, 2134-2151.  
査読有

2. 谷中 淳、武内 修、重川 秀実  
原子間力顕微鏡を用いた動的分子間力分光法 —Biotin-Streptavidin 結合ポテンシャルの分離測定—  
表面科学 31, 2010, 41-47  
査読有

3. A. Taninaka, O. Takeuchi and H. Shigekawa  
Site-Selective Anatomy of Step-by-Step Reactions in Ligand-Receptor Bonding Processes Using Dynamic Force Spectroscopy  
Applied Physics Express 2, 2009, 085002  
査読有

[学会発表] (計11件)

1. Atsushi Taninaka, Osamu Takeuchi, Hidemi Shigekawa Origin of variety of microscopic interactions for biotin-streptavidin/avidin complexes clarified using Dynamic Force Spectroscopy 17th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy 2009年12月10-12日 Atagawa Heights, Shizuoka
2. 谷中 淳、武内 修、重川 秀実 動的分子間力分光法によるストレプトアビジン/アビジン-ビオチン相互作用の解析 第29回表面科学 学術講演会 2009年10月28日 タワーホール船堀
3. 谷中 淳、武内 修、重川 秀実 AFM/DFSによる機能性分子の結合ポテンシャルの分離測定を試みと展開 バイオSPM研究会 2009年9月11日 エスアイアイ・ナノテクノロジー セミナールーム
4. Atsushi Taninaka, Osamu Takeuchi, Hidemi Shigekawa Site-Selective Anatomy of Streptavidin/Avidin-Biotin Bonding Processes Using Dynamic Force Spectroscopy 第2回学際物質科学国際シンポジウム (ISIMS-2009) 2009. 3.9-10 エポカルつくば国際会議場
5. 谷中 淳、武内 修、重川 秀実 動的分子間力分光法を用いた Biotin-Streptavidin結合ポテンシャルの分離測定 第28回表面科学学術講演会(招待講演) 2008. 11.13-15 早稲田大学国際会議場
6. Atsushi Taninaka, Osamu Takeuchi, Hidemi Shigekawa Site-Selective Analysis of Biotin-Streptavidin Interactions using Atomic Force Microscopy 第4回真空・表面科学アジア・オーストラリア会議 (VASSCAA-4) 2008. 10.28-31 くにびきメッセ
7. Atsushi Taninaka, Osamu Takeuchi, Hidemi Shigekawa Investigation of Biotin-Streptavidin Interactions by Dynamic Force Spectroscopy with Precise Force Control The First International Symposium on Interdisciplinary Materials Science (ISIMS-2008) 2008. 3. 13-14 エポカル つくば国際会議場
8. Atsushi Taninaka, Osamu Takeuchi, Hidemi Shigekawa Energy Landscape of Biotin-Streptavidin Interactions Selectively Probed using Dynamic Force Spectroscopy 9th International Conference on Atomically Controlled Surfaces, Interfaces and Nanostructures (ACSIN-9) 2007. 11.11-15 Komaba Research Campus of The University of Tokyo
9. 谷中 淳、武内 修、重川 秀実 原子間力顕微鏡を用いた動的分子間力分光法による Biotin-Streptavidin結合ポテンシャルの分離測定 第27回表面科学講演大会 2007.11.1-3 東京大学生産技術研究所コンベンション
10. Atsushi Taninaka, Osamu Takeuchi, Hidemi Shigekawa Site-selective Analysis of Biotin-Streptavidin Interactions using Dynamic Force Spectroscopy ATI International Forum 2007 “Future of SPM in life Sciences” 2007.10.22-23 SII, Hall, Makuhari
11. 谷中 淳、武内 修、重川 秀実 動的分子間力分光法の改良と Biotin-Streptavidin 結合ポテンシャル分離計測の試み 2007年秋季 第68回応用物理学会学術講演会 2007. 9.4-8 北海道工業大学

[その他]  
ホームページ等

研究内容

<http://dora.bk.tsukuba.ac.jp>

雑誌論文

<http://dora.bk.tsukuba.ac.jp/results.html>

学会発表

<http://dora.bk.tsukuba.ac.jp/results-conference.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

谷中 淳 (TANINAKA ATSUSHI)

筑波大学・大学院数理物質科学研究科・助教

研究者番号：80400638