

2P069

自己組織化単分子膜を利用した GFP タンパク質単分子膜形成の制御と評価 (広大院・理¹, 広大・放射光センター²)

○和田真一^{1,2}, 梶川隼平¹, 林下弘憲¹, 古賀亮介¹, 平谷篤也^{1,3}

Characterization of protein monolayers formed on controllable self-assembled monolayers using GFP

(Hiroshima Univ.) ○S. Wada, J. Kajikawa, H. Hayashita, R. Koga, A. Hiraya

【序】 固体表面へのタンパク質の高密度固定化は、タンパク質の特性を簡便に調査するのに都合が良いだけでなく、バイオセンサーやマイクロアレイ、分子エレクトロニクスといったナノデバイスへの応用に向けた理想的なタンパク質単層膜として重要であり、その固定化されたタンパク質の機能評価や相互作用を理解することが重要になっている。そのためにはタンパク質を固体表面上に非破壊に導入する必要があるが、固い金属表面と柔らかいタンパク質との間でクッション材のような役割を担い得る自己組織化単分子膜(SAMs)は、このような巨

大分子の柔軟な固定化に最適な反応場を提供する表面として大きな期待が持たれている(図 1 参照)。加えて SAM は最表面に配列した官能基を自在に修飾することができることから、例えばタンパク質と特異的な相互作用をもつ官能基で修飾すればタンパク質を SAM 表面に容易に固定化することができ、その逆に反応性が低い官能基を併用することでタンパク質の表面吸着量をコントロールすることも可能となる。本研究ではその様な反応性官能基をもつ SAM とタンパク質との相互作用および表面固定化のコントロールを評価する目的で、green fluorescent protein (GFP)を用いた蛍光発光分光、X 線光電子分光(XPS)および軟 X 線吸収分光(NEXAFS)計測を行った。

【実験】 実験は、広島大学の放射光 HiSOR BL13 を用いて XPS および NEXAFS 計測を行い、同大自然科学研究支援開発センターのフォトルミネッセンス分光計(HORIBA T64000)を用いて蛍光分光を行った。試料としては各種官能基修飾したアルカンチオールを用い、その 0.1mM エタノール溶液中に Au 基板を 1 晩浸すことで Au(111)表面上に形成した各 SAM を得た。更にその SAM 表面上に GFP のバッファー溶液(10 μ M)を滴下し、N₂雰囲気下で数時間放置後に水およびエタノールで十分に洗浄することで SAM 上に GFP 膜を形成した。

【結果と考察】 先ず、タンパク質が変性を受けることなく SAM 上に固定化できているかどうかは、GFP の場合はその蛍光スペクトルを計測することで簡易に行うことができる。GFP の単層膜と多層膜条件とでの比較から、末端カルボキシ基 SAM 上の場合で GFP 特有の蛍光スペクトルを両者で確認することができた。XPS 計測と同様にこの蛍光強度からも GFP の吸着量を相対的に見積もることができるが、SAM 末端がタンパク質と特異吸着しない(化学結合を持たない)水酸基やメチル基の場合

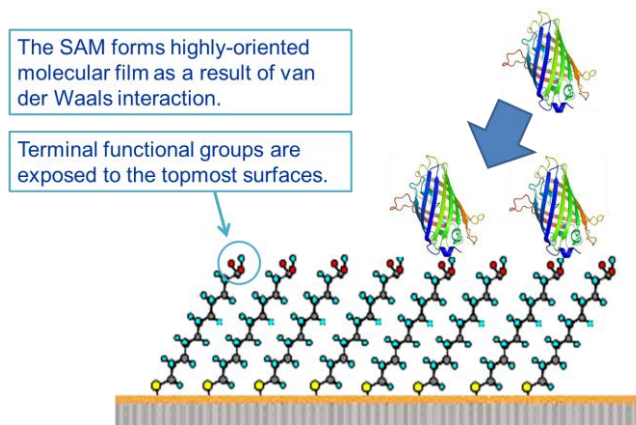


図 1. 自己組織化単分子膜(SAM)へのタンパク質(GFP)吸着の模式図。

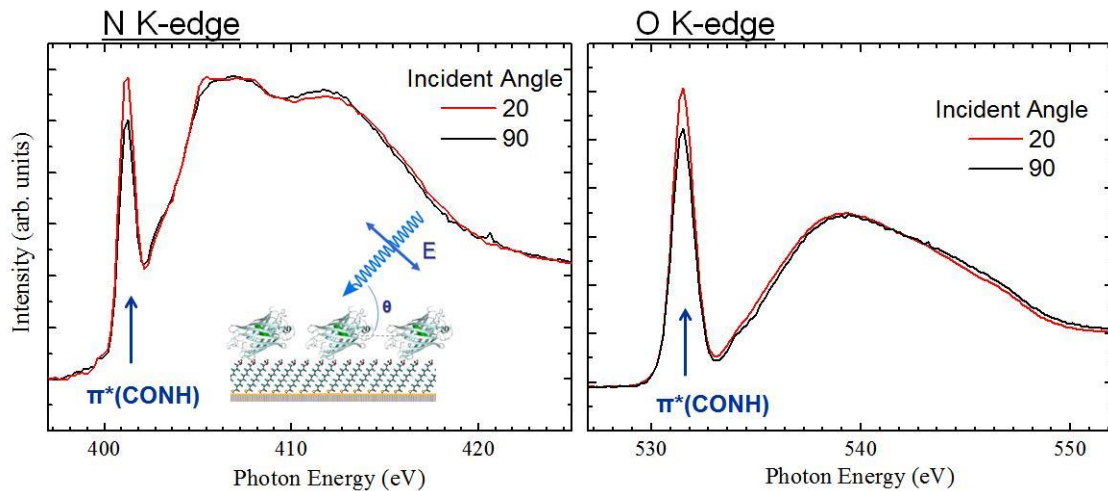


図 2. カルボキシ基修飾 SAM 上に固定化した GFP の N1s および O1s 領域における偏光依存 NEXAFS スペクトル。

でも、化学結合するカルボキシ基の場合と同程度 GFP が吸着する結果が得られた。これは水素結合や疎水相互作用といった比較的弱い結合でもその相互作用サイトの多さ故に SAM 表面上に固定化されてしまうためと考えられる。そこで、ポリエチレングリコールがタンパク質吸着の阻害剤として活用されていることから、オリゴエチレングリコールを挟んだカルボキシ基および水酸基末端の SAM を用意し蛍光スペクトルを比較したところ、水酸基修飾 SAM への GFP の吸着はカルボキシ基 SAM に比べて大きく減少した。またこれら 2 つのチオール分子を混ぜることで作成した混合 SAM を用意すると、GFP の吸着量が制御可能であることが見いだされた。

SAM は図 1 に示すように高度な配向性を有している。そこで SAM 上に固定化された GFP も何らかの配向性を有しているかを調べるため、偏光依存 NEXAFS 計測を行った。図 2 に N1s および O1s 領域で測定した NEXAFS スペクトルを示す。両領域ともに鋭いピークである $\pi^*(\text{CONH}) \leftarrow \text{N/O } 1s$ 共鳴励起でのみ偏光依存性を示し、他の共鳴励起では偏光依存性を示さないことが分かる。これは GFP が SAM 上に配向して単層膜を形成していることを示すと同時に、ペプチド由来の遷移双極子モーメントが何らかの形で GFP 内で規定できていることを示している。

GFP は 237 ものペプチド結合を有しているが、その約 60% が β シートに存在している。さらに GFP は 11 コの β シートによって構成されたバレル構造を形成していることから、ペプチド面に垂直な方向で定義できる $\pi^*(\text{CONH})$ への遷移双極子モーメントは、図 3(a) に示すような GFP の中心から放射状方向のベクトルとして定義することができる。このモデルをもとにした解析から、図 3(b) に示すように 64° 程度の傾きをもって GFP はカルボキシ基修飾 SAM 上に固定化されていることが分かった。

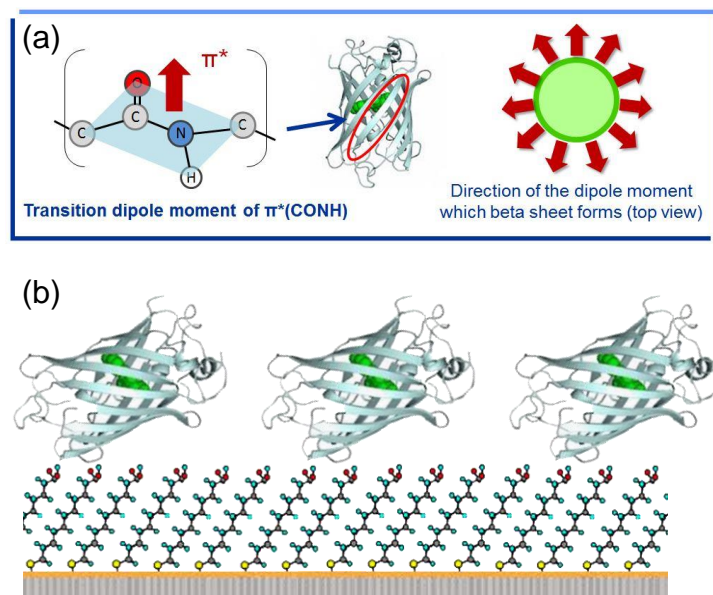


図 3. (a) GFP における $\pi^*(\text{CONH}) \leftarrow \text{N/O}(\text{peptide}) 1s$ 遷移双極子モーメントのモデル図。(b) 偏光依存 NEXAFS 測定から推定されるカルボキシ基 SAM 上に配向吸着した GFP。