

氏 名 三澤 宣雄

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 921 号

学位授与の日付 平成 18 年 3 月 24 日

学位授与の要件 物理科学研究科 構造分子科学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 シリコン基板表面へのタンパク質の固定化とその配向に
関する研究

論文審査委員	主 査 教授	青野 重利
	教授	宇理須 恆雄
	教授	西 信之
	助教授	信定 克幸
	教授	吉信 達夫(東北大学)

[序] 核酸や酵素(タンパク質)といった生体分子の特異的な機能を利用し、生体関連物質の検知や定量を行う素子及び装置は広義にバイオセンサーと呼ばれている。このセンサーの検出ターゲットやそのセンシング手法は様々であるが、その多くはガラスやポリマーなどの人工的な支持体と生体分子の組み合わせで構成される。近年、核酸やタンパク質などの生体分子の機能を利用したセンサーの構築が盛んに研究され始めた。マイクロアレイ技術の発達に伴い、DNAチップに代表される集積型の素子が開発、実用化され、発現プロファイルの解析や塩基多型診断にその威力を発揮している。特にシリコン基板をその支持体として利用することはシリコンが生体に不活性であるという特性だけではなく、その高度に確立された微細加工技術によりセンサーとして電子回路との融合も期待できることから大きなアドバンテージが得られることは明らかである。

生体分子を共役させた人工的な系を構築する際にはアビジン-ビオチン結合を介した表面修飾が広く用いられている。可溶性糖タンパク質の卵白由来アビジンはビタミンのひとつであるビオチンと至適条件下で解離定数が 10^{-15} M^{-1} という高い親和性で複合体を形成する。ビオチンは比較的小さい分子であるため、タンパク質のような大きな分子に標識した場合でも立体障害を起こしにくい。この性質により捕捉目的の生体高分子をビオチン修飾し、アビジンで繋ぎ止めるという手法は人工的な架橋法としてキーテクノロジーとなっている。

分子の向きに配慮した系の構築と解析は分子配向がその活性に対して強い影響を与えると考えられる抗体などでは数多く報告されているが、アビジン-ビオチン間の相互作用の利用はリンカーという位置づけが強く、配向に関して研究が進められてこなかったのが現状である。しかしながら、抗体やアビジンに限らず、固定化した生体高分子の向きがそのセンサーや検出素子として求められる感度、即ちその生体高分子の活性に著しく影響を与えていることが理解され始め、原子間力顕微鏡(AFM)による直接的な観察やクォーツ・クリスタル・マイクロバランス(QCM)、赤外分光法(FT-IR)などによる分子配向の研究が行われている。

当該研究ではシリコン基板上に生体高分子を固定化し、既存の集積回路技術との融合を見込んで、卵白由来アビジンのシリコン基板上への固定化とその評価を行った。特にその機能および配向について分子レベルで明らかにするためにAFM観察とFT-IR測定を用いた研究である。

[結果と考察] Si(100)基板をRCA洗浄後、化学酸化により SiO_2/Si 表面を調製し、エステル基末端を有するシランカップリング剤の2-(カルボメトキシ)エチルトリクロロシラン(CMETS)で修飾した。この修飾後、末端エステル基を塩酸によって加水分解することで、表面粗さが0.12 nm(rms)の平坦なカルボキシル基終端 SiO_2/Si 基板を得た。このカルボキシル基修飾基板に対し、*N*-ヒドロキシコハク酸イミドとEDCを用いた縮合反応によりアビジン側のアミノ基とアミド結合を形成させ、アビジン分子を共有結合で固定化した。

アビジン固定化 SiO_2/Si 基板をAFMにて観察した結果、大きさが均一な粒子が基板上に確認され、調製溶液のアビジン濃度の増大とともにその被覆率が増加した。大気中で観察したこの粒子の体積をAFM探針の先端曲率半径を20 nmとして計算した値(約 150 nm^3)が

大気中にて分子量から求められる値(約130 nm³)に近いことから、アビジン一分子と結論している。AFMによって観察された粒子の高さは用いた探針のバネ定数に依存せず、一様に大気中では約2 nm、緩衝溶液中では約5 nmである。しかしながら、報告されている卵白由来アビジンの結晶構造解析結果では一分子の径が5-6 nmであることから大気曝露による変性が示唆された。ビオチンで修飾したAFM探針を用いて固定化アビジン分子のビオチン結合活性を緩衝溶液中で確認したところ、観察される粒子の位置に一致して引力が働いている点がマッピングされた。これにより緩衝溶液中であれば基板表面への共有結合による固定化後でもアビジンのビオチン結合活性が維持されていることが明らかとなった。

この単分子で固定化されたアビジンに対して埋め込み金属層基板を用いた赤外反射吸収分光法(BML-IRRAS)および透過赤外吸収分光法(TIRAS)にて測定を行った結果、タンパク質のペプチド結合部分の振動に由来するアミドI領域とアミドII領域に吸収が観測された。タンパク質の各二次構造への帰属が報告されているアミドI領域においてはアビジンの二次構造の主成分であるβ-ストランドに帰属されるピーク(1636 cm⁻¹付近)の強度がBML-IRRASでは非常に弱いのにに対し、TIRASでは強く観測された。この相違は透過と反射では許容遷移モーメントが基板表面に対してそれぞれ平行、垂直と異なるため、アビジン分子が基板表面に対してある方向へ揃った分子の配置をとっていることに起因すると考えられる。無秩序な配向を持つ物理吸着アビジンの赤外スペクトルではBML-IRRASとTIRASの両者において1636 cm⁻¹付近にピークが現れたことから共有結合固定化アビジンの分子の向きが揃っていることが支持された。

アミド I 領域は主にペプチド結合のカルボニル基の伸縮振動に由来する。そこでアビジン分子の β-バレルを形成する β-ストランド中ペプチド結合に含まれる全カルボニル基の方向を原子座標から求め、その大きさを全て足し合わせることでアビジン分子全体の相対的な赤外強度として近似している。この近似を用いた分子全体の赤外強度の方位依存性の見積もりでは、この β-ストランド由来のアミド I 領域における赤外強度の変化は分子の回転角度に対して反射と透過で約 90°の位相差を持って増減を示した。この結果からアビジン分子の二回対称軸が基板表面に垂直な向きで且つ β-バレル構造が完全な変性に至らずに固定化されていると結論された。当該実験の条件下では基板のカルボキシル基と反応するアビジン分子のアミノ基は主にリジン残基側鎖の ε-アミノ基である。卵白由来アビジンのリジン残基は β-バレル両端付近に偏在するため、アビジンの共有結合固定が上記のような向きに揃う傾向があると考察している。

論文の審査結果の要旨

シリコン基板の上にタンパク質（アビジン）を固定し、その配向を赤外吸収分光とAFMにより評価したものである。固体表面を利用したタンパク質チップの信頼度が低いことが問題となっているが、その原因の一つとして、基板表面の凹凸が大きかったり、分子の配向が制御されていないことが挙げられている。このような状況を背景に、本研究では膜タンパクバイオセンサー製作の要素技術の一つとして、COOH化した固体表面へアビジンのリジン残基との反応による固定を行い、アビジンの配向が揃っていることを見だし、これにより β バレル構造のタンパク質に比較的一般的に適用できる配向制御法を見いだすとともに、固体表面に固定化されたタンパク質の新しい配向決定法を提案した。

論文は序論を含み、全体5章から構成されている。第一章ではアビジン-ビオチン相互作用やAFMや赤外分光の基礎知識と本研究の動機について述べている。第二章では酸化シリコン基板表面のカルボキシル基修飾を行い、この表面をAFMで観察し、基板表面を1nm以下の平坦度でカルボキシル化していることを確認した。このCOOH基とアビジンのアミノ基との反応により形成される共有結合によりアビジン分子を固定化した後、緩衝液中でのAFM観察によりアビジン-分子を明瞭に観察することに成功している。第三章では、AFM探針をビオチン修飾し緩衝液中で固体表面上のアビジンの分子認識（アビジン-ビオチン相互作用）像を観察し、固体表面に共有結合で固定化されても、緩衝液中ではアビジン-ビオチン活性を保持していることを確認した。第四章では同様な方法によりBML-IRRAS（埋め込み金属層基板赤外反射吸収分光）のBML基板にアビジンを固定し赤外反射吸収スペクトルを測定し、アミドIバンドを観察した。二次構造である β シートに明瞭に帰属される微細構造のほか、 3_{10} ヘリックスやUターンなどに帰属される微細構造が観察された。BML-IRRASが基板表面に垂直な遷移モーメントに感度があり、透過赤外吸収スペクトル（TIRAS）の場合基板表面に平行な遷移モーメントに感度があるという表面選択則の違いを利用して表面に吸着した分子の配向を決定することを試みた。その意図のもとに、追加の実験としてさらに上記の共有結合で形成したアビジン吸着層のTIRAS及び、物理吸着により形成した場合のBML-IRRASおよびTIRASを測定した。物理吸着で測定した場合はTIRASもBML-IRRASもアミドIバンドのピーク位置は水（D₂O）中で測定されたアミドIバンドの位置と同位体効果を考慮するとピッタリ一致し、物理吸着の場合は予想どおりランダムに配向して吸着していると結論できた。それに対して、共有結合で吸着させた場合は、BML-IRRASでは1651cm⁻¹にピークがあり、TIRASでは1637 cm⁻¹にピークが観測された。後者は物理吸着の場合や水中のピークの位置と一致し、 β シートに帰属される。このアミドIバンドのピークシフトは β バレル構造においては遷移モーメントが筒状の樽構造の中心軸に垂直な方向にほぼ向いていることから、アビジン分子が基板表面にその四面体の分子対称軸を垂直にして吸着していると仮定するとよく説明できることが判明した。実際アビジン分子のCO基の分子軸に対し垂直な成分と水平な成分との総和を計算し分子の向きによって吸収強度がどのように変化するかを計算すると、BML-IRRASとTIRASで観測されたピークシフトが分子の配向によって定性的に説明できることがわかった。この結果とAFMの観察結果はさらに、大気中では変性するものの、 β バレル構造の部分は安定にたもたれる事を示している。これらの結果はCOOH基と反応効率の高いリジン残基が β バレル構造の上部と下部に集中していることから理

にかなった結果であると言える。以上より、固体表面へのタンパク質に関し、 β バレル構造を持った分子に限られるとは言え、簡便な配向制御法を提案し、また、その配向を決定する新しい方法を提案し有用性を実証することに成功している。高い独創性と実験の信頼性から国際的な高い水準に十分達している研究成果である。審査委員会は出願論文が博士（理学）の授与に値すると全員一致で判断した。