

タンパク質を並べ、貼り付ける 古野泰二(医学部)

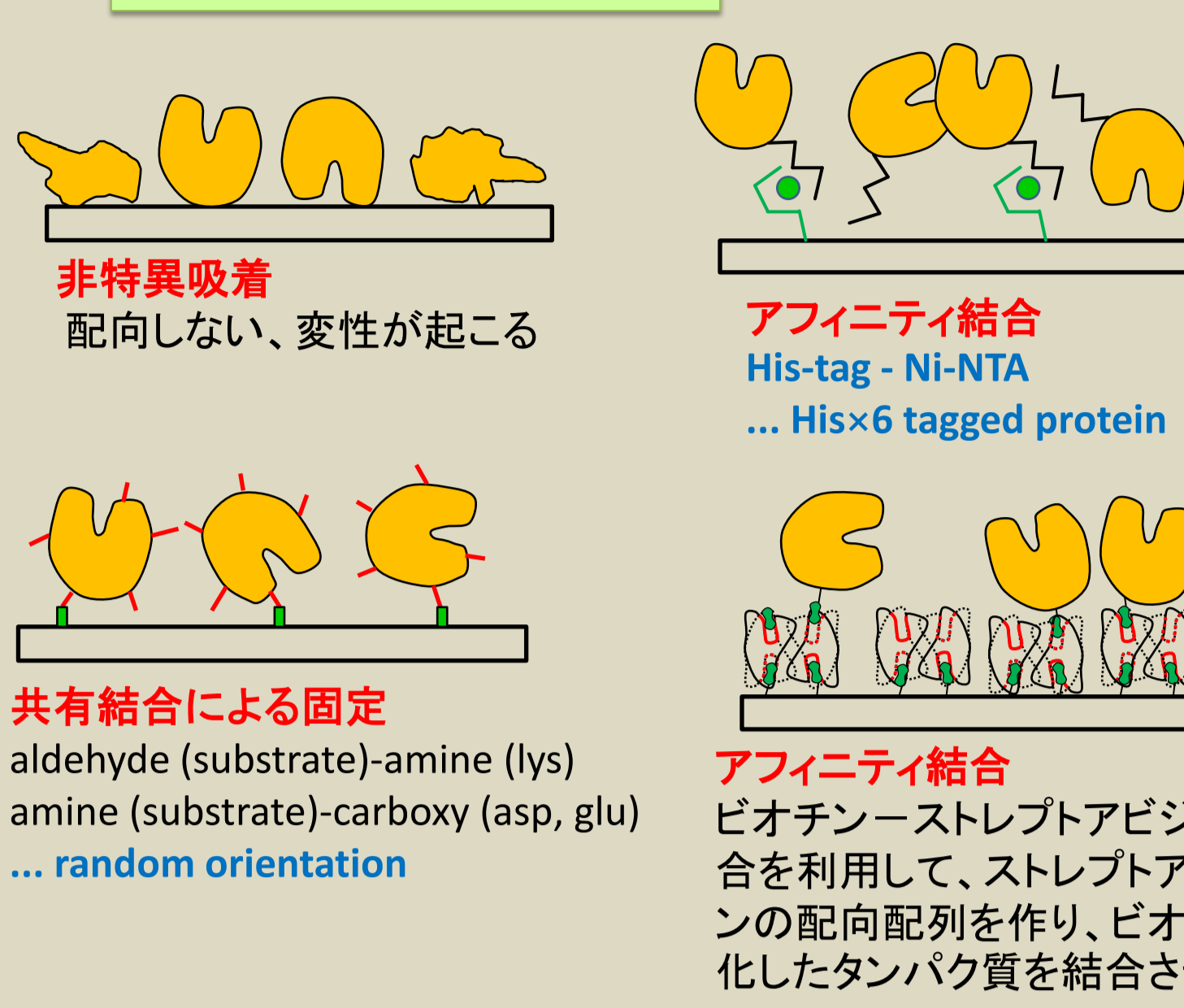
物理学の出発点: 質量、力、ニュートン方程式 $F=ma$
 分子生物学の出発点: そこにその分子が存在するのか
 分子Aと分子Bは結合するのか
 水中では、1分子レベルでの評価は難しい

研究背景

生命現象の担い手であるタンパク質分子は小さく、たとえばそれがひとつの細胞内に「存在するのか」、あるいは、「たんぱく分子Aと分子Bが結合するのか」など、低次元の問題でもそれを短時間で分析評価するのは難しい。時間とともに変化する生命現象の理解において、これらの短時間判定は重要なテクニックである。対象となる分子がガラスなどの基板表面に固定されていれば、それらに結合する抗体などの分子と蛍光法などを組み合わせ「あるなし」の判断が可能になる。現在発展中のプロテインチップの出発点であり、成功の如何は機能する状態の分子を「活かしたまま高密度に」基板に固定できるかどうかにかかっている。タンパク質の多くは、基板表面にくっただけで変性してしまう。

分子の固定法について多くの研究がなされてきたが、ここでは古くから知られている気/液界面を利用したタンパク質の単分子膜作成法と、ビオチン-アビジン結合と呼ばれる低分子とタンパク質の強い結合を利用した固定法を紹介する。基板の表面に固定する(くっつける)というのはいままでの基本的な技術であるが、プロテインチップだけでなく広い意味での分子デバイスや分析技術などにおいて重要であり、また基礎的側面からも興味深い課題である。

タンパク質の各種固定法

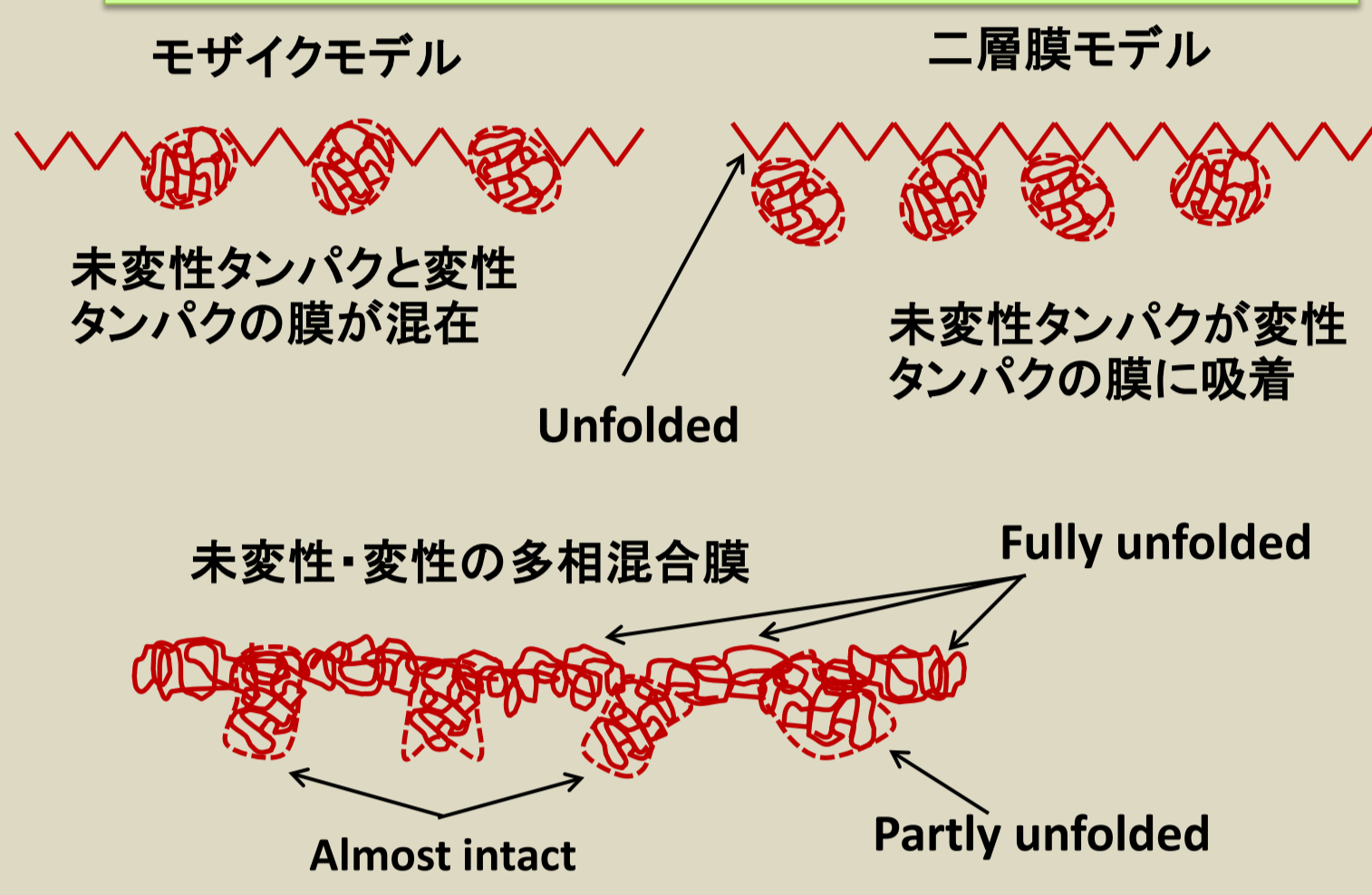


本研究で主に用いたタンパク質

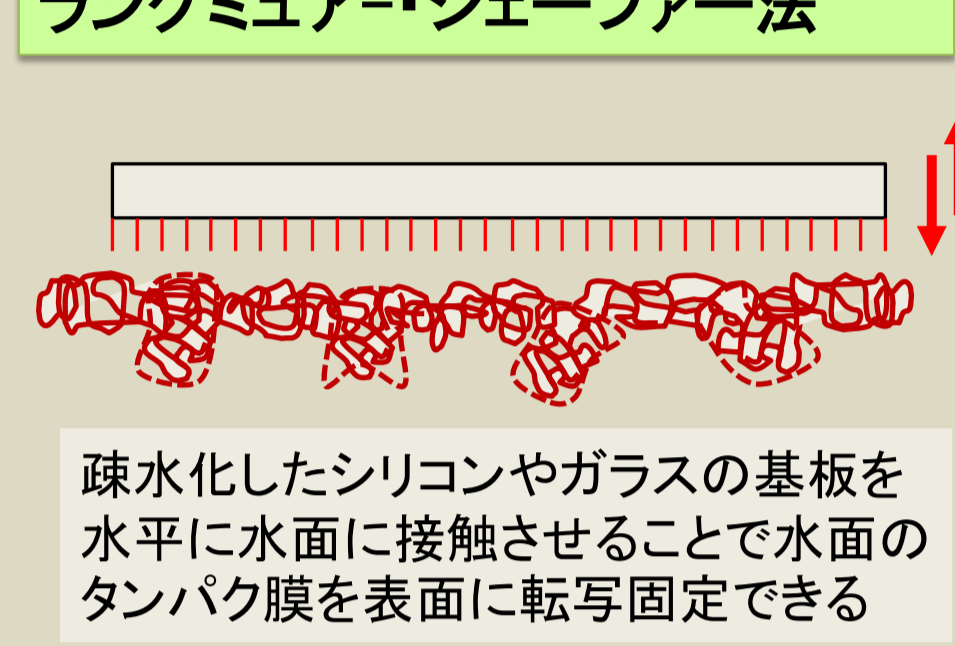
フェリチン Ferr 11ER 480 kDa 12 nm pI ~5	カタラーゼ CAT 4BLC 250 kDa 10 nm pI 5.4	アルコールデヒドロゲナーゼ AD 4W6Z 150 kDa 9 nm pI ~5.8	トリプシンインヒビター TrpI 1AVU 20 kDa 4 nm pI 4.5
牛血清アルブミン BSA 3V03 66 kDa 8 nm pI 5.3	streptavidin SAv 1SWE 60 kDa 6 nm pI 6.4	カーボニックアンヒドラーゼ CA 1V9E 29 kDa 5 nm pI 6.4	リゾチーム Lyz 2LYZ 14 kDa 4 nm pI 11.4

分子量14,000の小さなリゾチーム ~ 分子量480,000の大きなフェリチン

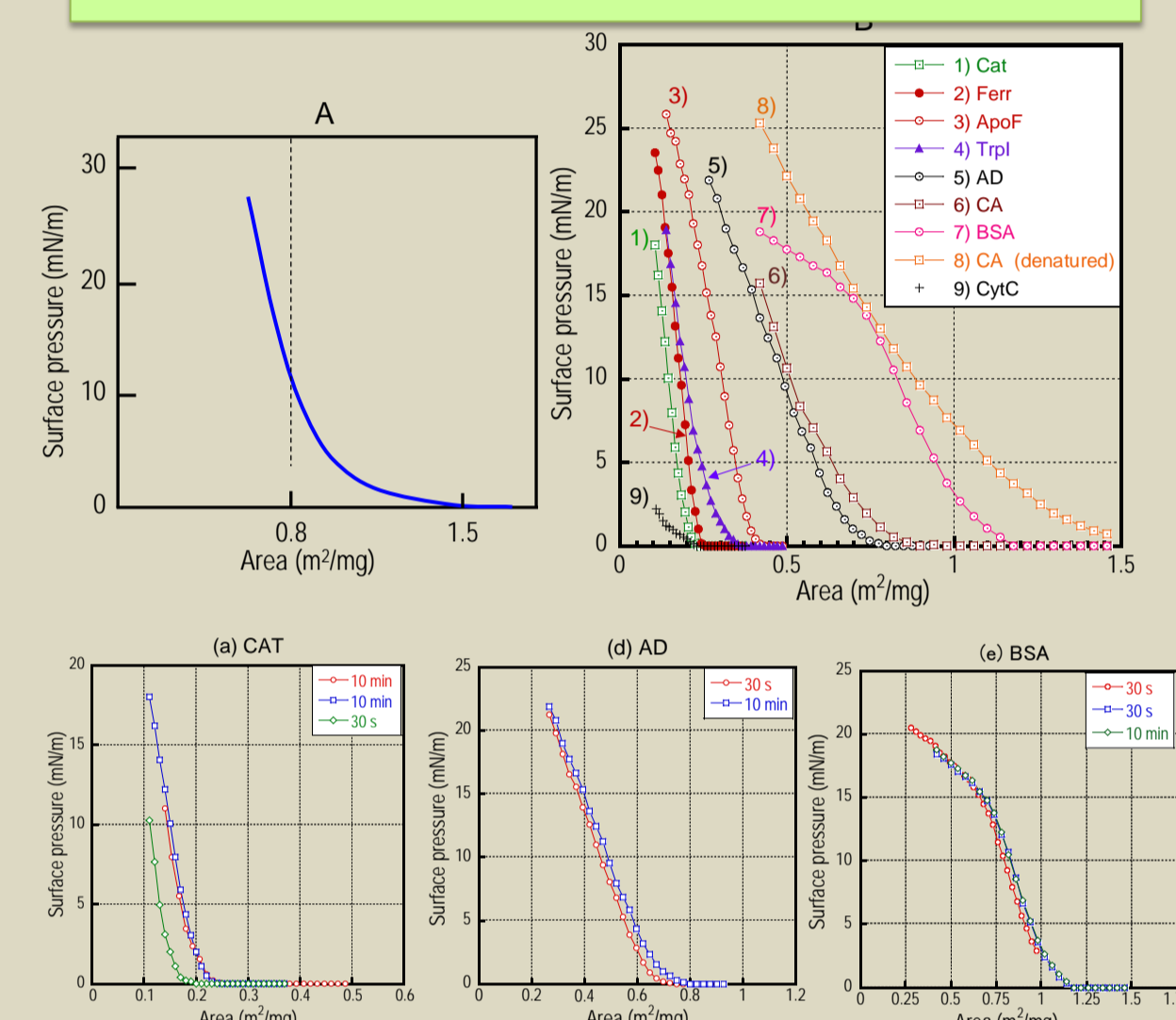
水面に展開したタンパク質の単分子膜と変性



膜転写 ラングミュアー-シェーファー法



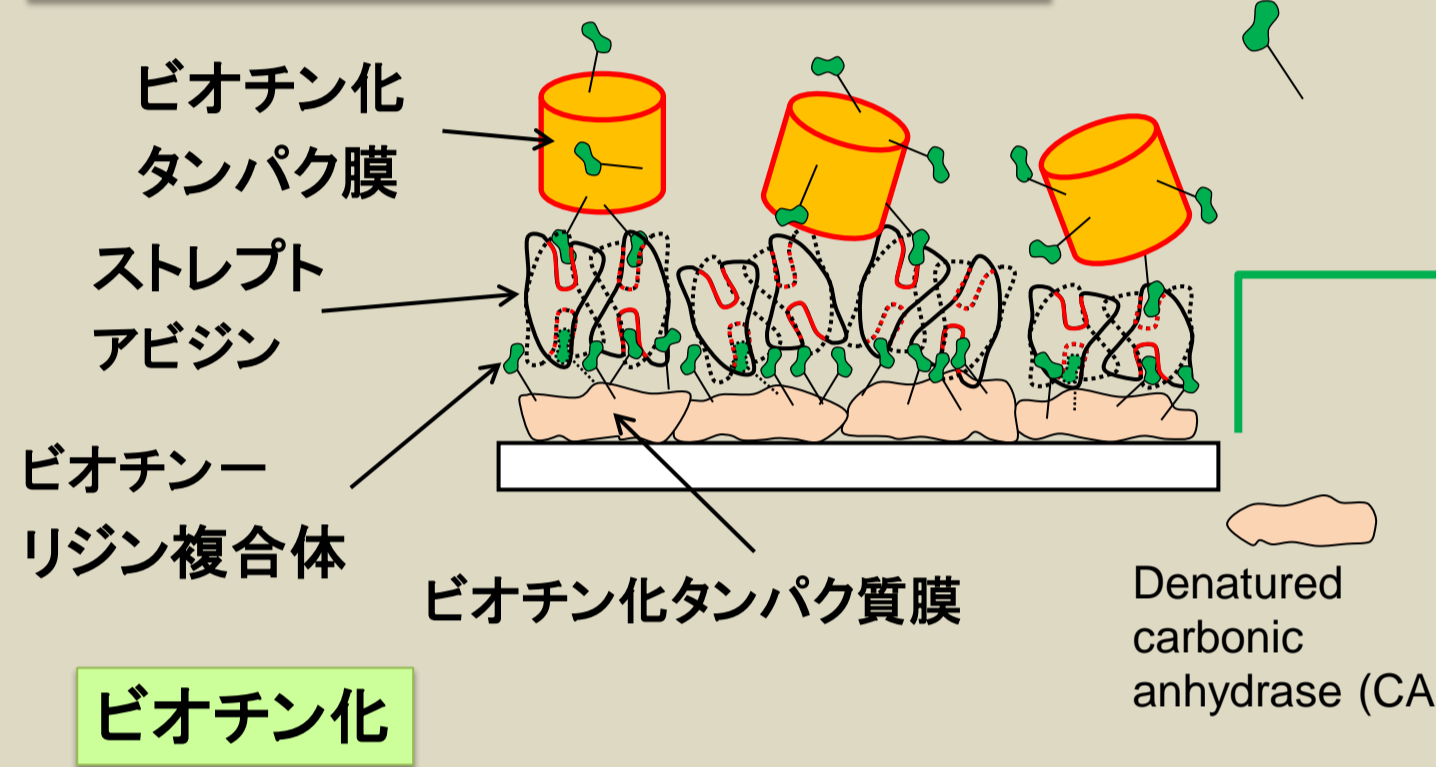
タンパク質単分子膜の面積-圧力曲線



(1) 直接展開のタンパク質膜の転写固定



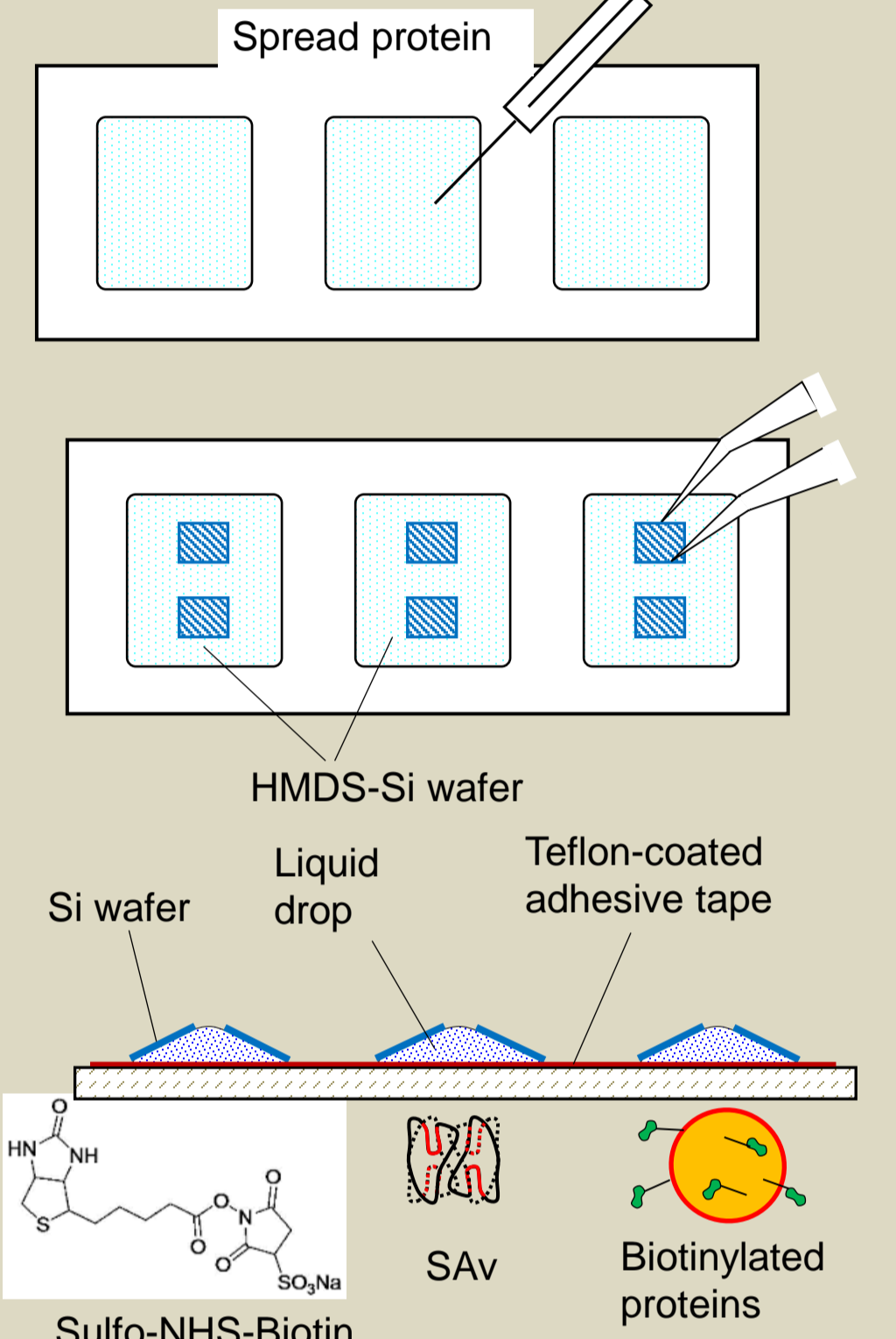
(2) ビオチン-streptavidin 反応を使ったタンパク質分子固定



ビオチン化

ビオチン(ビタミンH)はstreptavidinに極めて強く結合する。タンパク質のリジン残基をビオチン化することは容易である。変性タンパク質膜を転写後ビオチン化し、これにstreptavidinを結合させた後に、さらに、ビオチン化した目的タンパクを結合させることができる。streptavidinは4個のビオチン結合部位をもっている。

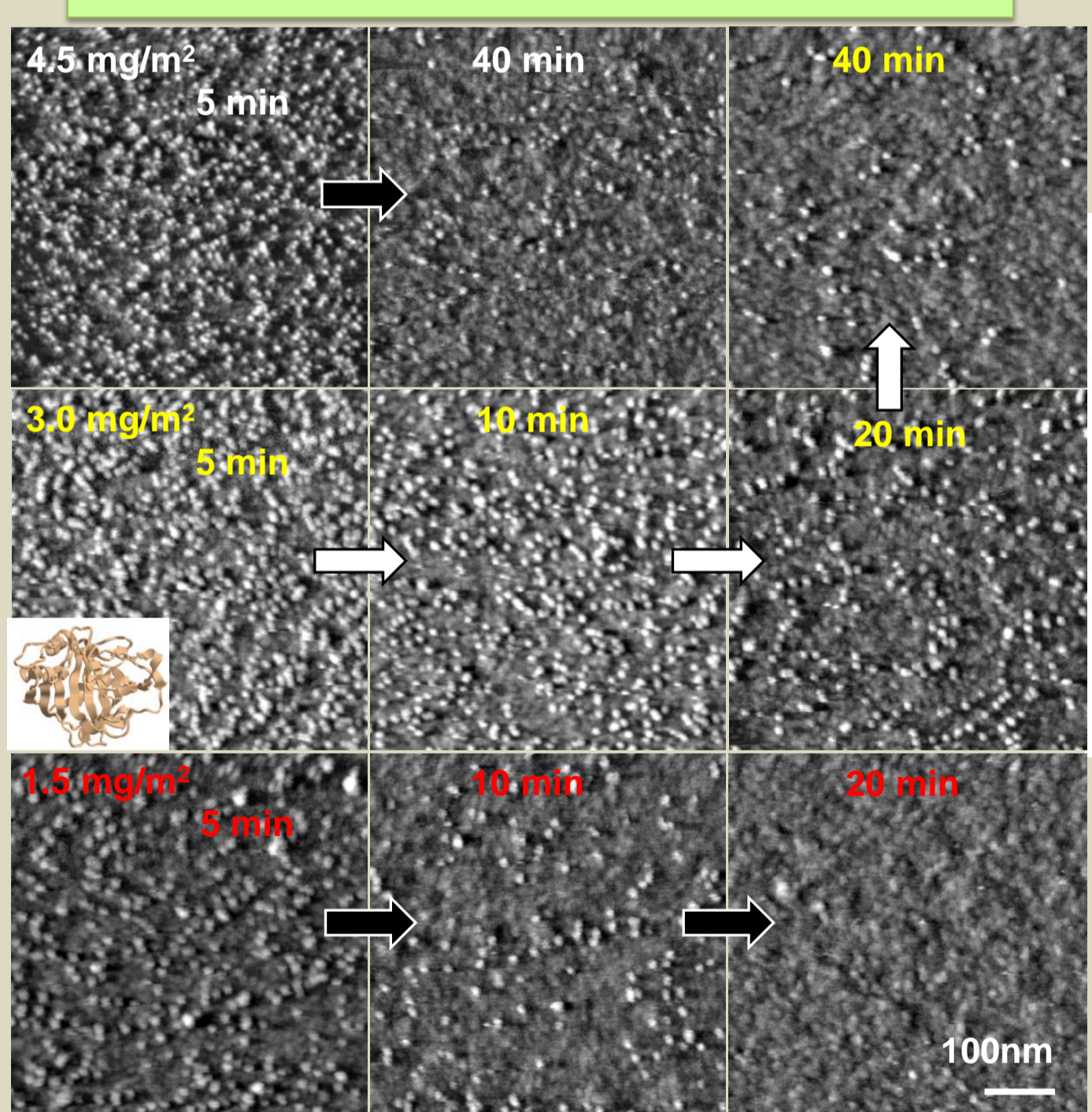
ビオチン化タンパク単分子膜へのSAvの高密度結合



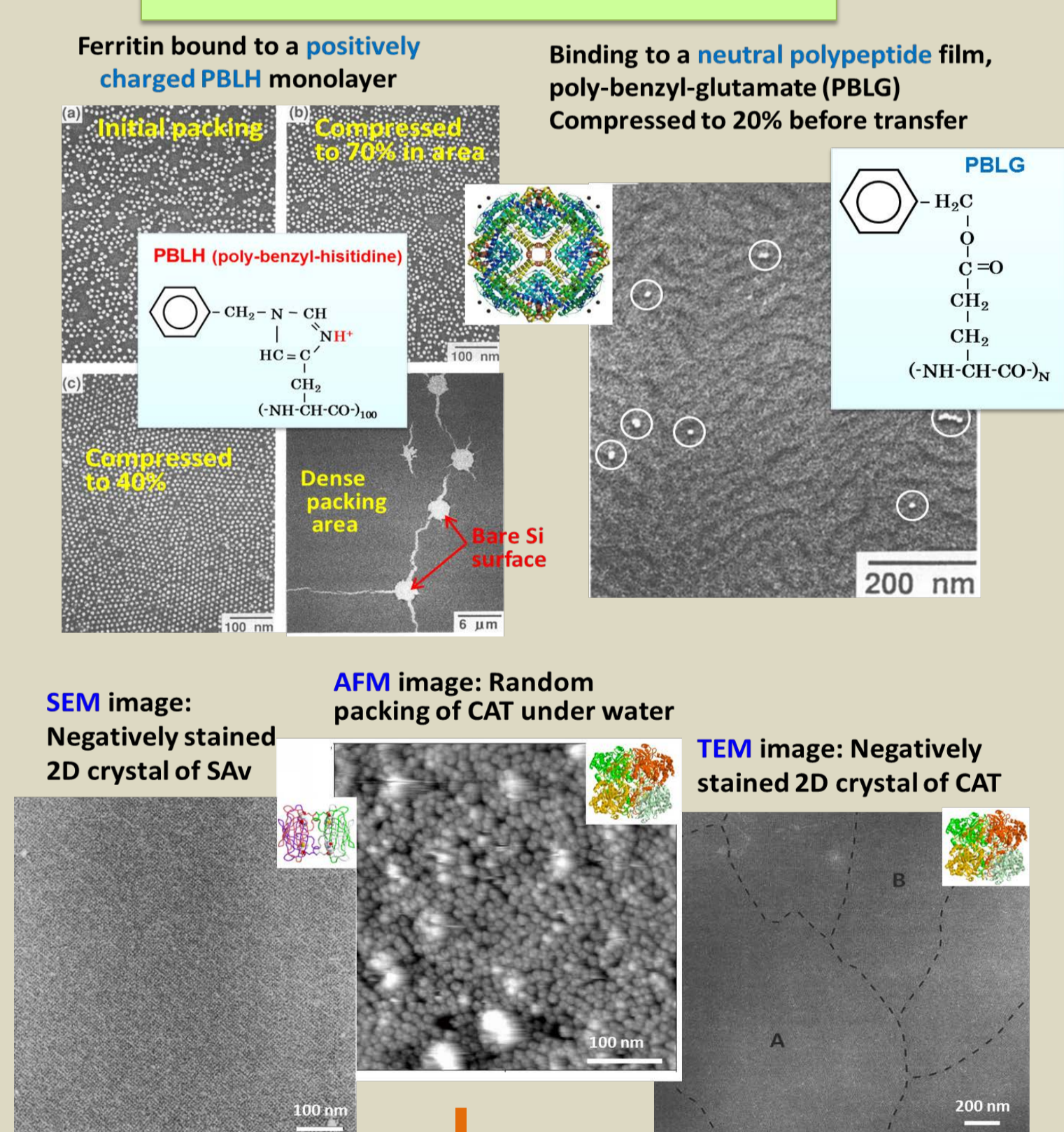
タンパク質の界面変性

静かにタンパク質水溶液を水面に展開すると、多くのタンパクが変性を起こすことが古くから知られているが、その構造については未だにはっきりしない。タンパクにより極めて速く変性するものもあるが、ほとんど変性せずそのまま水中に分散するものもある。変性した膜と未変性の粒状のタンパクとの混合膜の構造は原子間力顕微鏡を用いても明瞭な粒子像を得るのが難しい。

カーボニックアンヒドラーゼの界面変性

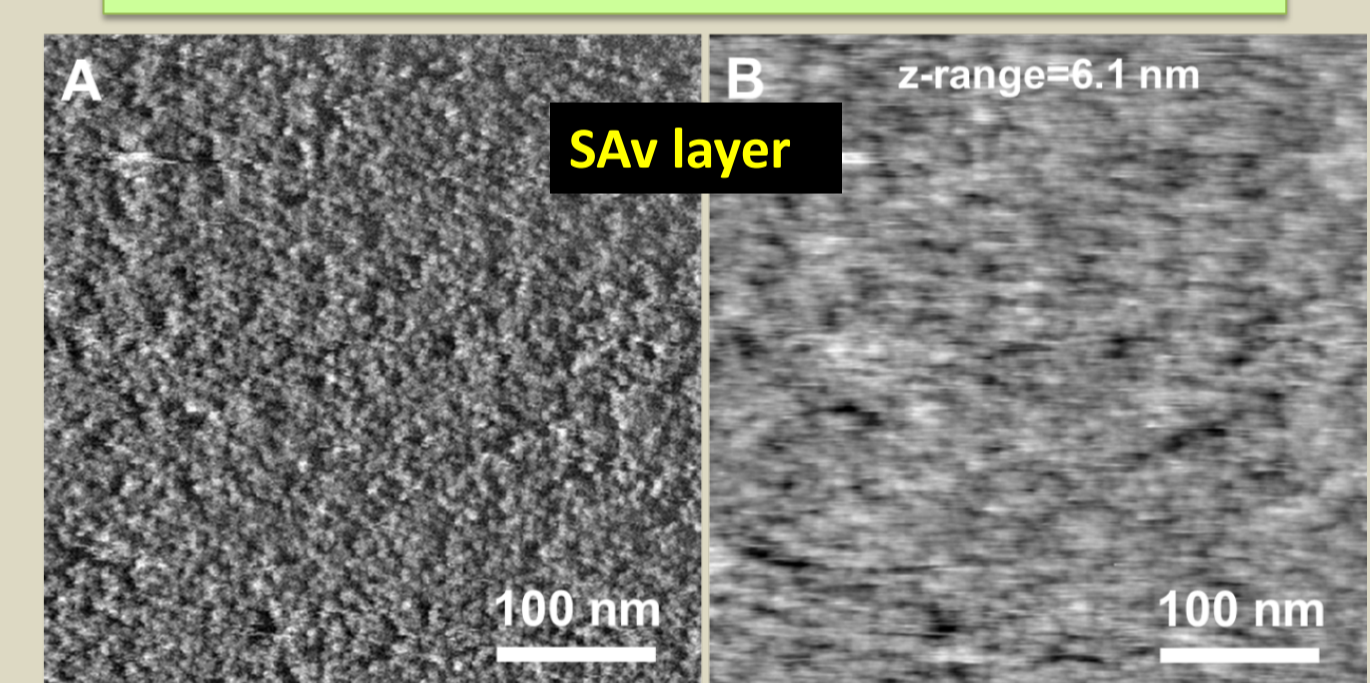


PBLH単分子膜への吸着と結晶化

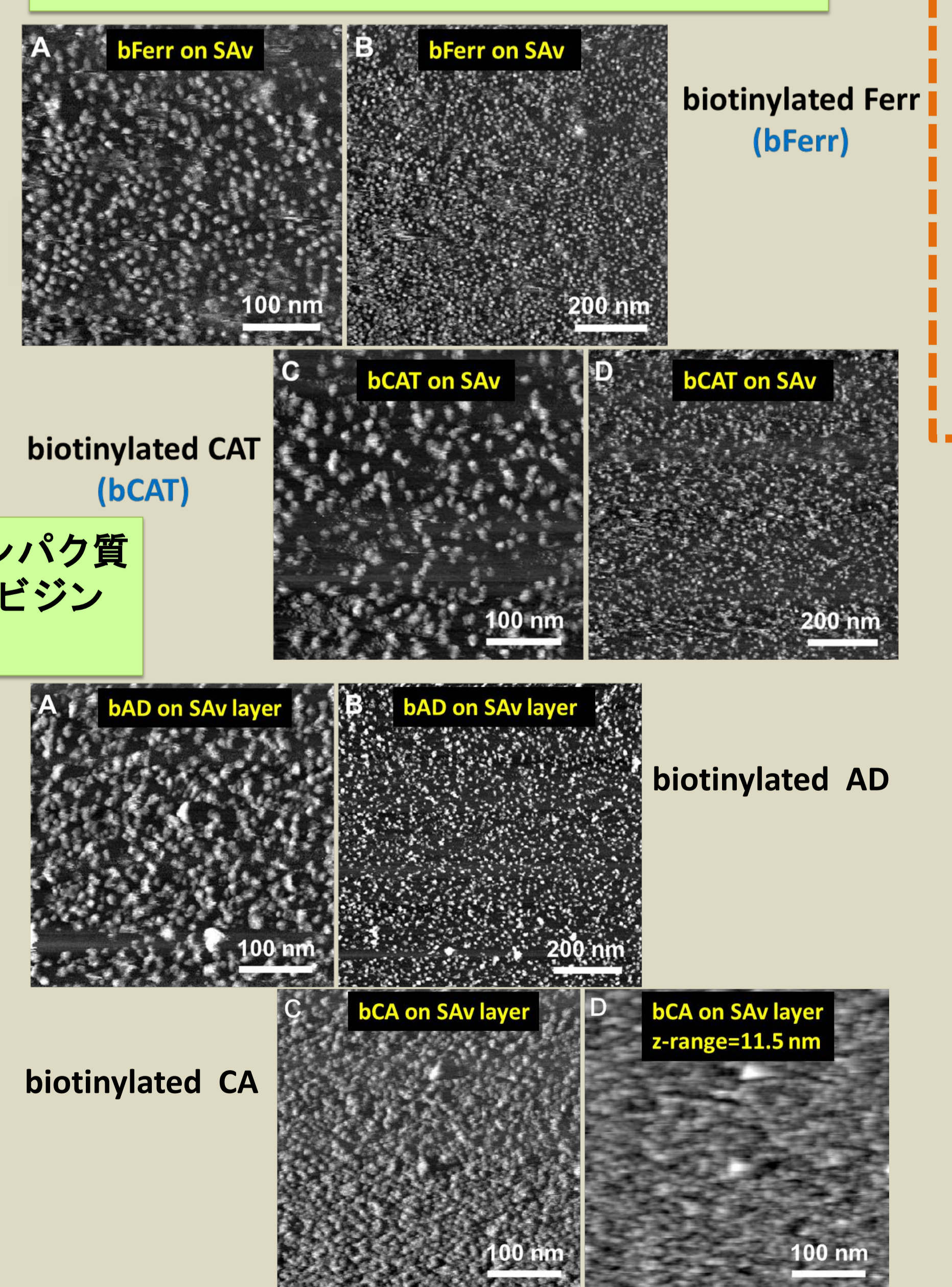


水面に展開した合成ポリペプチドの単分子膜にタンパク質を吸着させることにより、高密度の2次元配列や2次元結晶が生成した。Furuno, T. et al. 1989. Thin Solid Films. 180:23-30. Furuno, T., Sasabe, H. 1993. Biophys. J. 65:1714-1717.

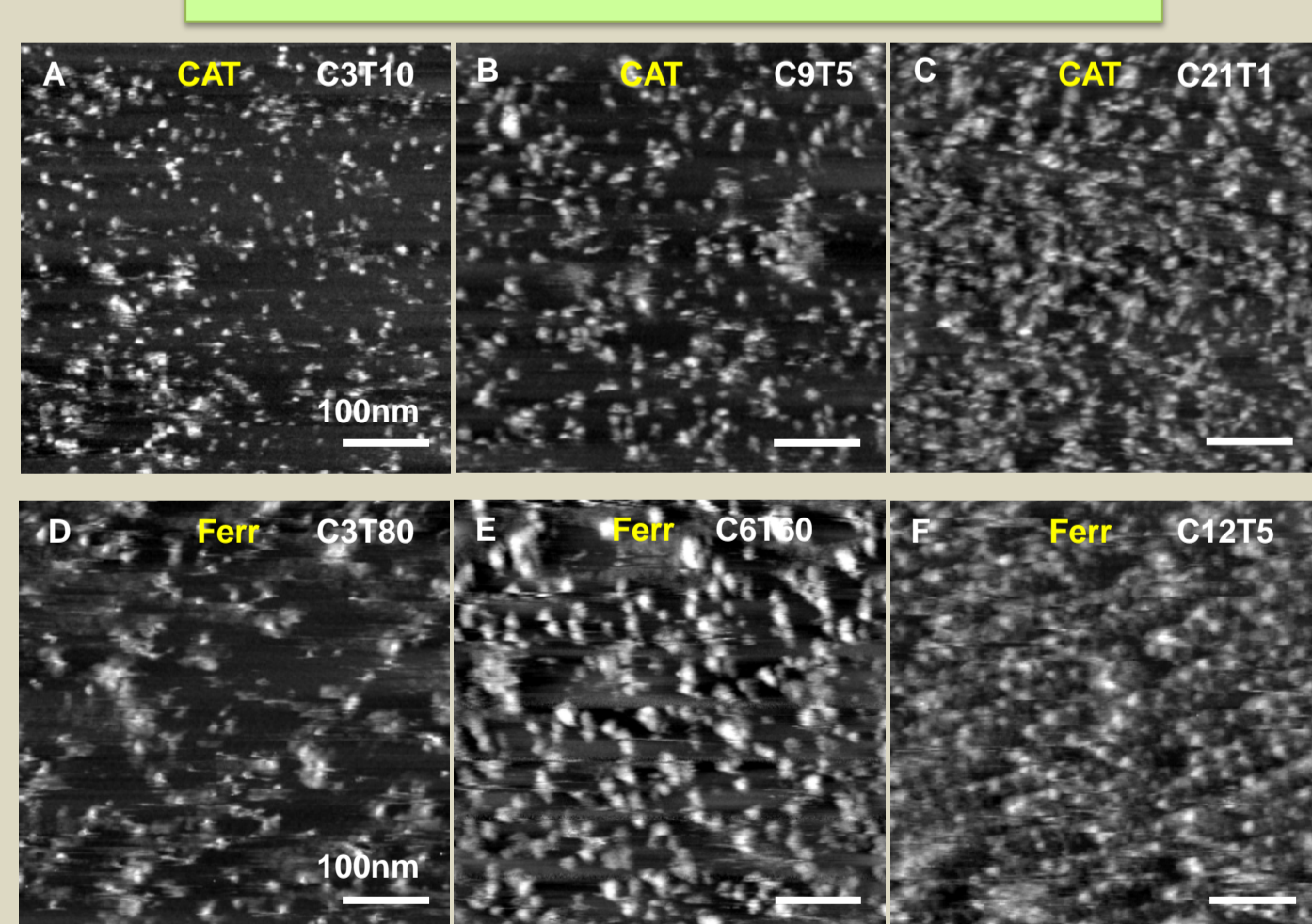
ビオチン化CA膜に高密度に結合したSAv



高密度SAv配列に結合したビオチン化タンパク質

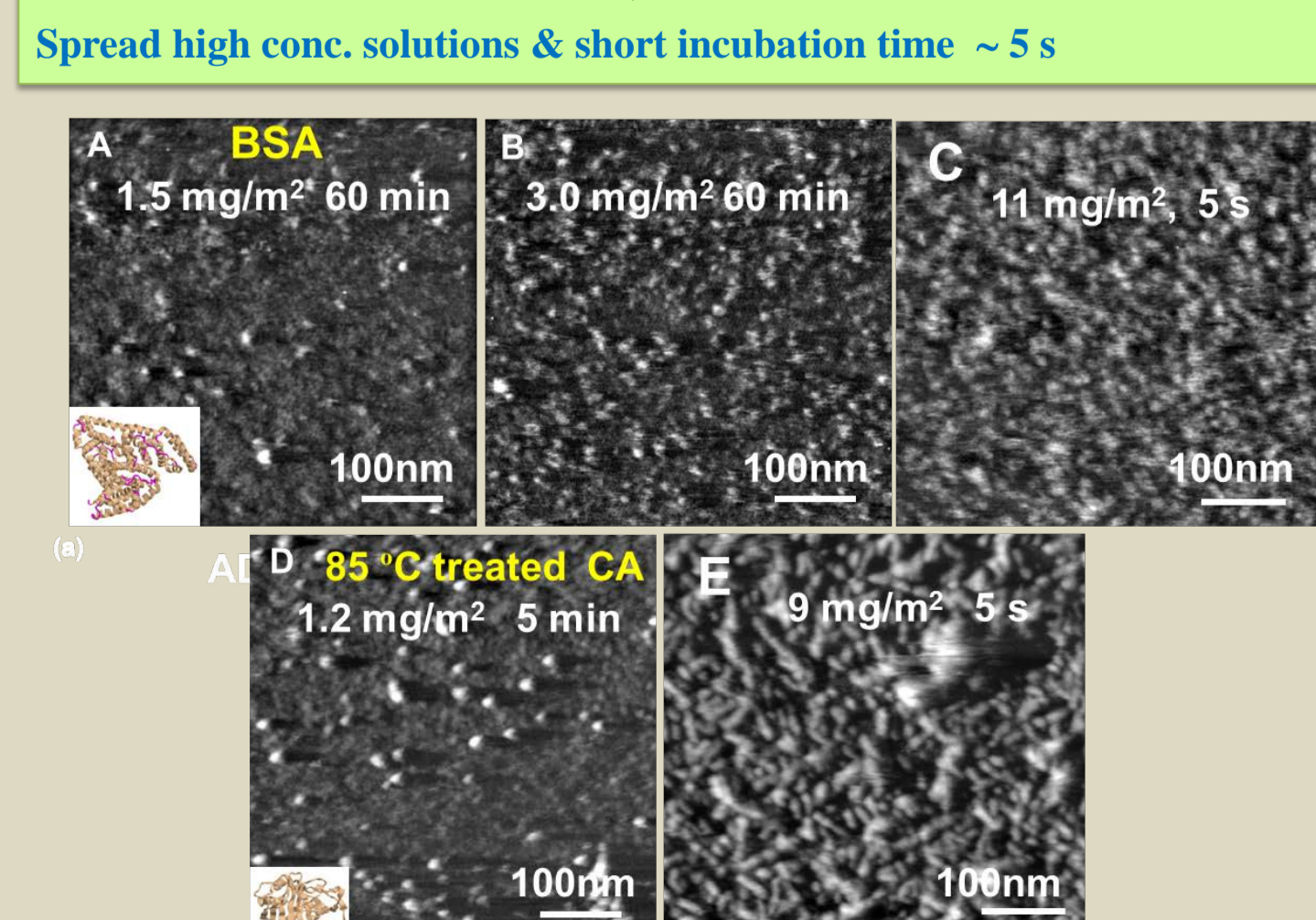


カタラーゼ、フェリチンの変性混合膜



界面変性で生成したタンパク質の膜は明瞭な粒子像を与えず、AFMのチップの汚れが頻りに発生し、像質低下が起こる。

急速に界面変性する牛血清アルブミン、カーボニックアンヒドラーゼ: BSA, CA (85 °C-treated)



水面への直接展開

ペプチド単分子膜への吸着

ビオチン化タンパク質をstreptavidin配列に結合

空気と水の界面に展開したタンパク質の膜への吸着を利用し、異なる方法でタンパク質の2次元配列を作ることができた

ビオチン化した変性タンパク質の膜にstreptavidinを結合させて2次元の高密度配列を作り、これにビオチン化した任意のタンパク質を結合させて高密度な2次元配列を作成することができた。

ビオチン化した変性タンパク質の膜にstreptavidinを結合させて2次元の高密度配列を作り、これにビオチン化した任意のタンパク質を結合させて高密度な2次元配列を作成することができた。Furuno, T. 2016. Thin Solid Films. 604:40-47.

多くのタンパク質は界面変性は急速である。転写した膜内の粒子の密度を上げるには、高濃度のタンパク質溶液を水面に展開後、短時間の内に基板表面に転写する必要がある。Furuno, T. 2014. Thin Solid Films. 552:170-179.