

単一生体分子の力学計測とその可能性



研究ノート

影島 賢巳*

Mechanical measurement of single biomolecule and its potential

Key Words : biomolecule, folding, atomic force microscopy, modulation, viscoelasticity

1. はじめに

タンパク質に代表されるような生体分子の物性は、生命活動の鍵を握る存在として分子生物学、生物物理学の分野で重要な研究対象となっている。こうした分子は、共有結合で結ばれた一本の鎖を骨格にした高分子の構造をもっており、タンパク質の場合、その構成要素となるのは20種類のアミノ酸、DNAの場合は4種類の塩基を持ったヌクレオチドである。特にタンパク質の場合、分子種に固有なその立体構造が、機能発現と密接に結びついていることはよく知られている。一般にこの立体構造は、アミノ酸残基の配列(1次構造)に始まって、これらが空間的に構成するヘリックスやシートといった2次構造、さらに2次構造ユニットがさらに空間的に配列して形成される3次構造というように、複雑に階層化していることが知られている。この立体構造形成(フォールディング)過程の理解は非常に重要であり、分子生物学の分野で精力的に研究がなされている。フォールディングは本質的に確率過程であるため、多数の分子の平均をとる計測方法とは別に、単一分子レベルでアプローチすることによって、従来の方では見えてこなかった過程が明らかになることが期待される。そこで、単一分子計測という

考え方が生まれてくる。しかし、分子1個レベルの応答を計測できる手段というのはそう多くはない。可能性の1つは力学的な応答を計測するものである。実験的にいくつかの手法が提案されているが、そのうちのひとつとして、原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscopy; AFM)¹⁾を応用する手法がある。具体的には、図1に示すように、AFMの探針を用いて単一の生体分子を捕捉し、これに外力を及ぼして変形させながら、その力学的応答を計測しようというものである^{2,3)}。本稿では、筆者らが現在取り組んでいる、このAFMを用いた分子力学応答の計測のメカニズムと、その可能性について触れてみたい。

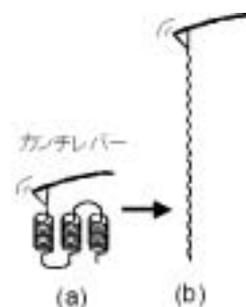


図1 AFMによる力学プロファイル計測の概念的な模式図。(a)高次立体構造を持つ分子の1端をAFMのプロープで捕捉し、プロープを引き離しながら分子に及ぼされる力の応答を計測し、(b)最終的に1本のポリペプチド(タンパク質の場合)鎖となるまで伸張する。

2. 生体分子の力学応答

従来、AFMを用いた力学的応答の計測は、AFMの探針を用いて分子を伸張・変形させ、その際の力の応答を計測する、というアプローチで行われてきた。ここで、分子の応答にどのような起源のものがあるかを考えてみることは重要である。最も直感的に思いつくのは、主鎖の弾性である。これは分子が伸張により天然状態の構造を失って、最終的に一



* Masami KAGESHIMA

1966年1月生

1993東京大学大学院・工学系研究科・物理工学専攻・第一種博士課程単位取得退学
現在、大阪大学(科学技術振興機構さきがけ研究員を兼任)、大学院工学研究科精密科学・応用物理学専攻ナノ工学講座、助教授、博士(工学)、表面・界面物性

TEL 06-6879-7854

FAX 06-6879-7856

E-mail : kage@ap.eng.osaka-u.ac.jp

本のポリペプチド鎖になる過程で作用するものであり、エントロピーに起因する弾性⁴⁾と、完全伸張状態に近づくに連れて顕著になる主鎖の共有結合の弾性が主たる成分である。これに対して、分子が変形していく過程では、鎖内でいわゆる内部摩擦⁵⁾があり、エネルギーの散逸を伴う力が作用すると考えられる。また、溶液環境下に置かれた生体分子は、溶液の分子との水和構造を作りその構造を安定化させているが、構造転移はこの水和水の構造(水和殻)の再構成を伴うため、そこでもエネルギー散逸が起こりうる。これらの作用は、距離依存のポテンシャルとして表記することの出来ない、散逸的(非保存的)な力であるはずである。そこで、AFMを用いて、これらを識別しながら計測すれば、分子の変形過程に関する知見がより詳しく得られはしないか、というのが研究の出発点である。これは、いわば粘弾性応答計測の単一分子版と見ることもできる。

3. 磁気変調方式のAFM

AFMの力センサー(カンチレバー)は非常に素性の良い振動系であるが、生体計測に不可欠な溶液環境下では、溶液の粘性抵抗によりその共振特性が著しく阻害され、これを振動させるためには大きな振動エネルギーを駆動系から付与する必要がある。この励振は溶液や周辺の機構部品の振動に容易に結合して擾乱となるため、カンチレバーの共振特性は理想的なものからは程遠いものとなるのが通常である。そこで、ここでは、通常カンチレバーの励振に用いられているのとは異なる励振方法を採用した。カンチレバーの背後、探針の直上の位置に、永久磁石の微小球を貼付して、外部から交流磁場の勾配に

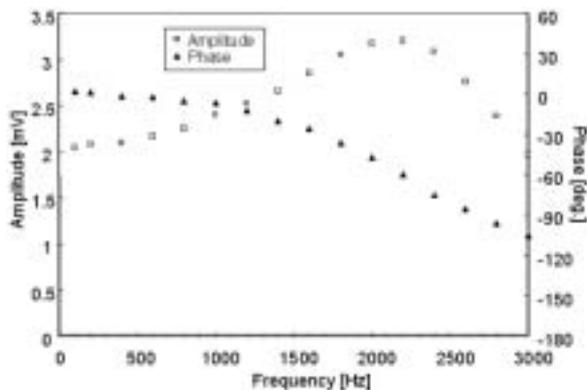


図2 磁気力により純水中で励振したAFMカンチレバーの振幅および位相

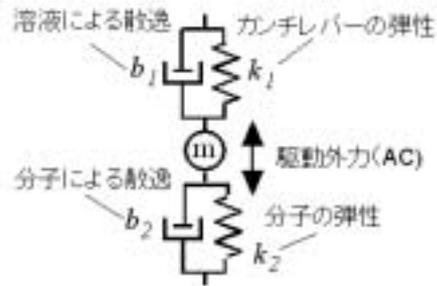


図3 液中で分子を捕捉して振動するAFMカンチレバーを表わす力学的モデル

よって励振する方法である。図2にこの方法で得られた典型的なカンチレバーの振動特性を示す。溶液環境であるため、Q値が1近くまで低下しているが、振幅・位相ともに、余分な寄生発振の一切ない共振特性を示している。この制御性の良いカンチレバー応答の実現が、本研究の重要な要素技術である。データ解析のために、実際の分子を最も単純化したモデルとして、弾性要素と粘性要素が並列に結合したVoigtモデルで表わした。一方、溶液環境で粘性抵抗を受けながら振動するカンチレバーも、その弾性定数と粘性抵抗の並列でモデル化するものとする。こうしてできた図3のような振動系の運動方程式の定常解は、励振周波数と同じ周波数を持ち、ある振幅と位相を持った応答となる。この振幅と位相には、求めたい物理量である分子の弾性係数と粘性抵抗係数の両方が含まれるため、カンチレバーの変位信号の中に含まれる励振周波数の成分を図4のようにロックイン検出することによって、いわば分子の伸張に伴う粘弾性的応答が、同時に計測できることになる。

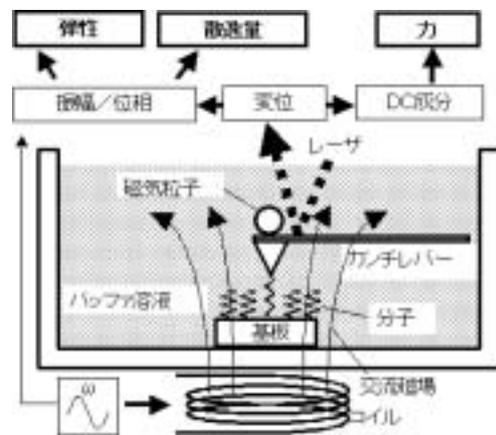


図4 磁気力変調方式AFMによる生体分子力学プロファイル計測の模式図

4. ペプチド分子 ヘリックス構造の伸張に伴う 力学プロファイル計測

この手法の最初のデモンストレーションとして、(AEAAKA)_n (Aはアラニン, Eはグルタミン酸, Kはリジンをそれぞれ意味する) のアミノ酸残基配列を持ち、ヘリックス構造をとる短いペプチド分子を試料として計測を行った⁶⁾。図5に示すのが、この分子を断裂するまで伸張しながら、分子の弾性と1周期あたりのエネルギー散逸量を、静的な力とともに計測したプロファイルである。よく見ると、弾性のデータ途中に変曲点のようなものがあり、その点を境に分子による散逸量も顕著になっている様子がうかがえる。この分子は単純なヘリックス構造をとると考えられるので、分子それ自体にこのような変曲点を生じるメカニズムがあるとは考えにくい。周辺の分子との相互作用の変化などを反映しているのではないかと推測しているが、それ以上の断定は不可能である。いずれにしろ、単一分子レベルの計測であるからこそ、たまたまこの特定分子の置かれた状況がデータに反映され得たということはいえるであろう。もう一つ重要なことは、こうした粘弾性的特徴は、静的な力のプロファイルだけでは得られない情報であるということである。

5. 今後の課題と展望

図5に示したデータは、2次構造までしか持たず、また生体分子と呼ぶには単純すぎるペプチド分子に関するものである。そこで、より大きい分子量と高次構造を持った実際の生体分子についてこの手法を適用してどのようなデータが得られるかを検証する必要がある。これについては実際に現在取り組んでいる最中である。

原理的にこの計測法はカンチレバーの共振周波数によって制約されているため、図5のデータでは、変調周波数が500Hzと低周波になっている。この周波数はヘリックス構造の巻き戻りの時間スケールに比べて十分に遅いので、分子の準静的応答を計測しているものと解釈できるが、もし変調周波数が時間スケールに近づいた時にどのような特性が現われるかは非常に興味深い。そこで、より高周波に共振を持つ微小なカンチレバーに高周波の磁気変調を加えることの出来るAFM装置を現在開発中である。

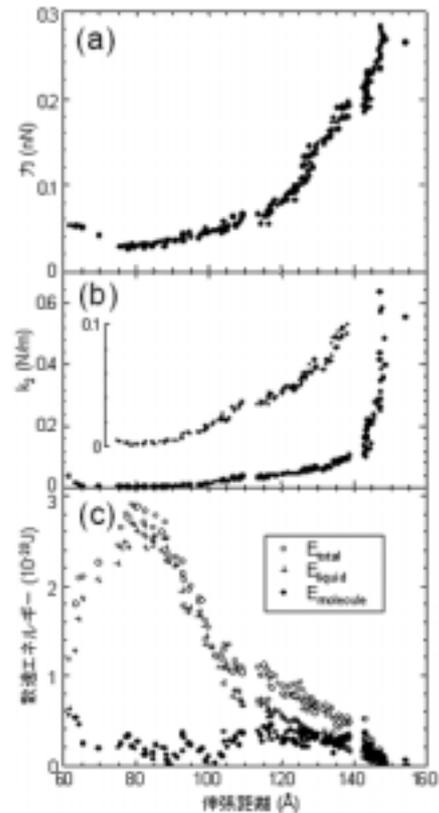


図5 ペプチド単一分子のプロファイル計測例。(a)カプロファイル。(b)弾性プロファイル。低伸張部の縦軸を拡大して挿入図として表示している。(c)散逸量プロファイル。全散逸(白丸)から溶液の粘性による散逸(十字)を差し引いて分子に起因すると考えられる散逸(黒丸)が求められる

この微小カンチレバーの採用という方向は、カンチレバーが溶液から受けるブラウン運動ノイズの低減という点でも有効であり、これによってより高感度で分子の応答が詳細に計測できることが期待される。

謝 辞

ペプチド分子の計測データは、筆者がかつて所属した産業技術総合研究所のナノテクノロジー研究部門および同ティッシュエンジニアリング研究センターのメンバーとの共同研究によるものです。ここに謝意を表します。

参考文献

- [1] 例えば日本表面科学会編「ナノテクノロジーのための走査プローブ顕微鏡」(2002, 丸善), 森田清三編著「走査型プローブ顕微鏡 - 基礎と未来予測」(2000, 丸善) など

- [2] T. R. Strick, M.-N. Dessinges, G. Charvin, N. H. Dekker, J.-F. Allemand, D. Bensimon and V. Croquette; Rep. Prog. Phys. 66 (2003) 1 and references therein.
- [3] W. Zhang and X. Zhang; Prog. Polym. Sci 28 (2003) 1271 and references therein.
- [4] 例えば久保亮五「ゴム弾性 初版復刻版」 (1995 , 裳華房)
- [5] 例えば ド・ジャン (高野宏・中西秀 訳) 「高分子の物理学」(1984 , 吉岡書店)
- [6] M. Kageshima, S. Takeda, A. Ptak, C. Nakamura, S. P. Jarvis, H. Tokumoto and J. Miyake, Jpn. J. Appl. Phys. Lett. 43 (2004) L1510.

