2P317

AFMを用いた柔らかい試料上での微粒子サイズ定量法

○老川 康大¹、金 賢徹²、吉良 敦史³、岡野 和宣²、安田 賢二² (¹東大・教養・基礎科学、²東大院・総合文化・広域科学・生命環境科学、³(株)アルバック・技術開発部)

個々の細胞内のmRNA発現状態を、細胞内での空間分布を保ったまま、PCR等の増幅作業を行うことなく定量的に調べるために、我々は、蛍光色素に替わる標識として様々な大きさの金微粒子に異なる種類のプローブDNAをそれぞれ固定したものをプローブとして用いる新規手法を開発した。その際、ターゲットに結合したプローブ金微粒子の種類を同定するために、その大きさを厳密に測定する必要がある。本研究では、細胞内部のような柔らかい試料上に結合した金微粒子の定量化とサイズの識別を、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて行った。AFMはその機構として大気圧中で保湿条件下でも高い空間分解能を持つので、通常、ナノ粒子のような硬い球状物の大きさを測定することは非常に有望である。しかし、実際には細胞のような柔らかい表面上に粒子が結合した場合には試料表面自体が複雑な凹凸を持つため、この複雑な凹凸面上に粒子が配置していると従来のように基板表面からの高さ情報から粒子径を換算することは難しい。そこで、本研究では、新たな試みとして、微粒子頂点付近の曲率半径から粒子径を推定する方法を開発し、その技術の評価した。はじめに、シリコン基板上に直径20nmの金微粒子を固定して乾燥させた後にイメージングを行い、粒子の高さから直径を見積もった。次に、得られた微粒子画像の断面図を用いて、頂点付近の曲率から粒子径を見積もるのに最適な条件の検討を行った。同様の検討を様々な大きさの金微粒子を用いて行った。一方、AFMを用いて得られた結果の評価には、基板に固定した金微粒子を電界放射形走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) を用いて高分解能観察を行い、比較検討した。発表では本手法を用いて得られた結果と、この観察方法に対する長所、短所について議論を行う予定である。

K.Oikawa, H.Kim, A.Kira, K.Okano, K.Yasuda : Quantification of the size of nanoparticles on soft materials using atomic force microscopy

2P319

原子間力顕微鏡による抗体-抗原相互作用の計測

○若山 純一¹、赤沼 哲史¹、関口 博史²、大谷 敏郎¹、杉山 滋¹ (¹食総研・食品工学・計測工学、²東工大・生命理工・分子生命科学)

原子間力顕微鏡 (AFM) は、大気中または液中で生体試料をナノメートルスケールの分解能で観察することができるだけでなく、試料-探針間にはたらく力をピコニュートンからナニュートンのスケールで測定することができる。この力の大きさは分子間相互作用程度の大きさである。これまでAFMを用いて抗体-抗原分子相互作用の計測がおこなわれてきたが、抗体-抗原相互作用に由来する特異的な相互作用と物理吸着などの非特異的な相互作用を明確に区別することは困難であった。そこで今回我々は、AFMを用いて抗体-抗原相互作用を計測する際に、非特異的な相互作用を減少させて計測できる条件を探索することを目的とした。抗原にはフェリチンを、抗体としては抗フェリチン抗体 (ポリクローナル) を使用した。抗原はアルキル鎖を介して探針に結合させた。この探針に固定した抗体が活性を有しているかどうかを確かめるために、蛍光色素 (Cy3) を標識した抗原タンパク (フェリチン) と非抗原タンパク (BSA、アビジン) を探針と反応させて探針表面を蛍光顕微鏡により観察したところ、フェリチンのみが表面に結合することが確認できた。このことは、探針表面へのタンパク質の結合は非特異的な吸着ではなく、抗体による特異的なものであり、抗体の機能を損なうことなく固定できたことを意味する。次にこの探針とフェリチン (抗原) 間の吸着力のAFM計測を行い、非特異的な相互作用由来と思われる吸着力を大幅に減少させる実験溶液条件を確立した。本年度ではこれらの結果の他に、卵アレルギーの原因タンパクの一つであるオボムコイドとその抗体の相互作用の計測結果についても報告する予定である。本研究はNEDO基盤技術研究促進事業により行われている。

J. Wakayama, S. Akanuma, H. Sekiguchi, T. Ohtani and S. Sugiyama : Measurement of antigen-antibody interactions by AFM

2P318

リガンド修飾高分子を用いたAFMによる分子間相互作用力測定法

○関口 博史¹、荒川 秀雄²、杉山 滋³、猪飼 篤¹ (¹東工大・生命理工・分子生命科学、²物材機構・ナノマテ研・バイオナノマテリアル、³食総研・食品工・計測工学)

様々な生物においてそのゲノム情報が明らかになりつつある現在、生体分子間相互作用力を測定する研究は、生体システムを理解する上で重要な情報を提供するものだと考えられる。我々は一分子レベルでの生体分子間相互作用力を直接計測できるAFMに着目し、汎用的で正確な方法として図に示すような測定法を提案している。図は抗原-抗体間相互作用力を計測する場合を示す。この方法ではまず、抗原分子を直鎖高分子上へ修飾する。次に修飾された高分子を抗体分子と反応させ、分子鎖内あるいは分子鎖間で架橋する。最後に架橋された高分子鎖の延伸測定をAFMで行う。この測定によって標的分子間の結合は一つずつ引きはがされ延伸カーブ上の複数のピークとして観測される。昨年の年会では、biotin修飾したCM-Celluloseをavidin存在下で延伸測定することによってavidin-biotin間の相互作用力が見積もられる (約100pN) ことを示した。本発表ではこの方法による抗原-抗体間の相互作用力測定について述べる。抗体溶液を用いる際に抗体の基板への物理吸着が問題になったが、この問題を回避するための基板修飾法についても併せて報告する。本研究の一部はNEDO基盤技術研究促進事業のもとに行われた。

H. Sekiguchi, H. Arakawa, S. Sugiyama and A. Ikai : AFM analysis of interaction forces between bio-molecules using ligand-functionalized polymers

2P320

新しい化学/力学反応同時計測顕微鏡の開発

○有賀 隆行¹、小森 智貴¹、西川 宗²、岩根 敦子¹、柳田 敏雄^{1,2} (¹阪大院・生命機能、²CREST・ソフトナノマシン)

従来のATPase型モーターの研究では、光ピンセットを用いた運動の変位計測や蛍光色素を用いたイメージングなど、変位測定に重点をおいた1分子計測が進められてきた。近年になりそれらの計測手法を組合せた複雑な計測装置の需要が増している。とりわけ運動とATPの加水分解反応を直接関連付けた計測を行うことは、その機能を知る上で重要な役割を果たす。そこで我々は、アクチン上で連続した変位を生み出すプロセスモーターであるミオシンVを用いた同時計測を行うことにより、そのエネルギー変換機構の解明を目指している。しかし、ミオシンVでの蛍光ATPを用いたATPaseサイクルの1分子計測では、その低親和性ゆえ非常に遅い反応でしか観察できない (小森智貴ら本大会発表)。また、ミオシンIIのようなノンプロセス型と違い、プロセスモーターであるミオシンVでの変位測定では、その多段階ステップを行う間アクチンとの位置状態を変化させるわけにはいかないため、長時間ナノサイズの位置ずれも許されないという従来よりも高い安定性が求められる。

この性能を実現するため、高時間空間分解能を維持しつつも長時間での位置安定性を高めた顕微鏡の開発を新たに行った。その結果、プリズム型および対物型TIRF、ダブル光トラップ、ハロゲン光照明を用いたナノメトリを組合せ、旧来よりもはるかにS/Nを向上した同時計測顕微鏡を完成させた。また、さらなる安定性のため、熱源となるハロゲン光照明に換えてレーザー光を用いた後焦点干渉法による変位測定の導入も試みた。本大会では主に、1分子化学反応測定用のプリズム型TIRFと組合せた高精度の位置検出手法についての様々な工夫を報告する。様々な1分子測定手法をS/Nを高めつつも同時に行うことを可能にした新しい顕微鏡は、さらなる1分子計測の応用と発展に寄与するだろう。

T.Ariga, T.Komori, S.Nishikawa, A.Iwane and T.Yanagida : Development of a novel microscope for simultaneous observation of mechano-chemical coupling.