

電気刺激による生体分子の動きを直接観察できる 電気化学高速 AFM 装置を開発 ～バイオエレクトロニクス研究に光明～

国立大学法人東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門の大野弘幸教授、中村暢文教授らのグループは、国立大学法人金沢大学理工研究域数物科学系の内橋貴之准教授、国立大学法人東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻の五十嵐圭日子准教授らのグループとの共同チームにより、電気化学測定を行いながら電極表面の生体分子の動的挙動も同時に観察できる電気化学高速 AFM（注1）装置を開発しました。生体のエネルギー生産に関与するタンパク質であるシトクロム *c*（注2）が、電極表面に吸着していく一連の過程を、AFM 画像及び電気化学応答として本装置により世界で初めて同時観察できました。電気化学高速 AFM を用いることで電極基盤上での分子の電氣的応答に関する直接的な動態観察が可能となり、バイオセンサー開発などのバイオエレクトロニクス研究（注3）や脳神経科学の信号伝達にかかわる研究などで有用な解析ツールになるものと今後期待されます。また、この装置は、電気刺激に応答して速く動くものを直接観ることができるため、生体分子に限らず、刺激応答性材料の開発などの様々な分野で利用できます。

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究(C)（研究代表者：中村暢文）、科学技術振興機構 先端的低炭素化技術開発(ALCA)（研究代表者：五十嵐圭日子、研究分担者：中村暢文、内橋貴之）の補助を受けたものです。

本研究成果は、2月11日午後2時アメリカ東部時間（日本時間2月12日午前4時）に米国の科学雑誌 PLOS ONE オンライン版で掲載されました。

論文名：Real-time dynamic adsorption processes of cytochrome *c* on an electrode observed through electrochemical high-speed atomic force microscopy

著者名：Kouta Takeda（武田康太）、Takayuki Uchihashi（内橋貴之）、Hiroki Watanabe（渡辺大輝）、Takuya Ishida（石田卓也）、†Kiyohiko Igarashi（五十嵐圭日子）、†Nobuhumi Nakamura（中村暢文）、Hiroyuki Ohno（大野弘幸） †責任著者

掲載ページ：<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0116685>

現状：従来の解析手法ではタンパク質の速い動的挙動を AFM で観察することは困難でしたが、金沢大学の安藤教授、内橋准教授らのグループは、生体分子一分子の画像をリアルタイムで撮影できる世界初の高速原子間顕微鏡(HS-AFM)装置を開発しました。一方で東京農工大学の教授・中村教授らのグループは東京大学の五十嵐准教授らのグループと共同でタンパク質を電極上に固定したセンサーや電池の開発を行ってきました。このバイオエレクトロニクス研究において、電極上のタンパク質の吸着状態や向き、吸着量、電場をかけた際の生体分子の動的挙動を知ることは、より高性能なデバイスを作製するために非常に重要です。しかしながら、これまでこれらの情報を直接観察するためのツールがありませんでした。そこで、3グループ共同で、HS-AFM の構成を基本とし、電気化学測定装置を組み合わせた電気化学 HS-AFM 装置の開発に取り組みました。

研究体制：国立大学法人東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門、国立大学法人金沢大学理工研究域数物科学系、国立大学法人東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻の共同研究チーム。

研究成果：電気化学 HS-AFM は、HS-AFM の構成を基本に試料ステージを作用電極とし、対極、参照電極を設けた三電極系で構成し、電位を正確に制御できるようにしました(図 1)。そこで、タンパク質の電子移動の研究で盛んに行われてきたシトクロム *c* を対象とし、修飾した SAM (自己組織化単分子層) (注 4) をコーティングした金電極へのシトクロム *c* 吸着挙動とその電気化学応答について検討しました。AFM 像から、シトクロム *c* 分子が電極表面に吸着していく様子がリアルタイムで観察され、それと同調してシトクロム *c* の酸化還元由来するピーク電流値の増加がみられました(図 2)。470 秒付近の AFM 像では、急激にシトクロム *c* が吸着して層となる様子が観察されました。500 秒以後は AFM 像に大きな変化が見られなくなり、同時に電流値も定常となることから、電極表面にシトクロム *c* が単層に吸着し、それ以上の吸着は起こらないことがわかりました。この一連の AFM 像から吸着量を解析した結果、シトクロム *c* の吸着過程において正の協同性 (分子が一旦吸着すると次の分子はより吸着し易くなること) が働いていることが示唆されました。本現象は、電気化学 HS-AFM を用いることで初めて見出されたものです。

今後の展開：電位をかけたときに電極上の生体高分子がどのように動くのかを直接観測でき、また、酸化還元反応が起こった後に誘起されるタンパク質ドメイン間の動きやタンパク質-タンパク質間の動きを観測できます。分子間の電子移動と構造変化に関する詳細な情報が得られ、分子間の電子やシグナルの伝達に関する研究の新しい展開が期待できます。これらの情報を集積することが、より高感度なバイオセンサーや、より高出力のバイオ燃料電池の開発といったバイオエレクトロニクス研究につながります。また、電位をかけた後で膨張や収縮するなど構造が変化する材料について、どのようにどのくらいのスピードで動くのかをリアルタイムに観測するのもにも用いることが出来ます。新規材料の評価にも用いることができ、材料開発のための指針を与えられるものと期待されます。

(語句解説)

注 1) 高速原子間力顕微鏡 (High-Speed Atomic Force Microscopy, HS-AFM) : 金沢大学の安藤敏夫教授らのグループは、既存の AFM のイメージング速度を超高速化することに成功し、2008 年に世界最高性能の HS-AFM を開発しました。タンパク質をはじめとする生体分子の動的な振る舞いをリアルタイムで撮影することができます。

注 2) シトクロム *c* : 酸化還元能を有するヘムタンパク質のひとつです。呼吸鎖での電子伝達の重要な役割を担い、生体のエネルギー生産に関わっています。

注 3) バイオエレクトロニクス研究 : 生体材料を電子基盤上に集積化し、生物の優れた機能を利用する機能性デバイスに関する研究分野です。

注 4) 自己組織化単分子層 (Self-Assembled Monolayer, SAM) : 有機分子が基盤表面に化学吸着し、吸着した分子同士の比較的弱い相互作用によって自己組織化して形成される単分子膜のことです。分子の配向性と配列が高度にそろっており、表面側の官能基を選択することにより、目的とする物理・化学的性質を有する表面を設計することができます。

(A)



(B)

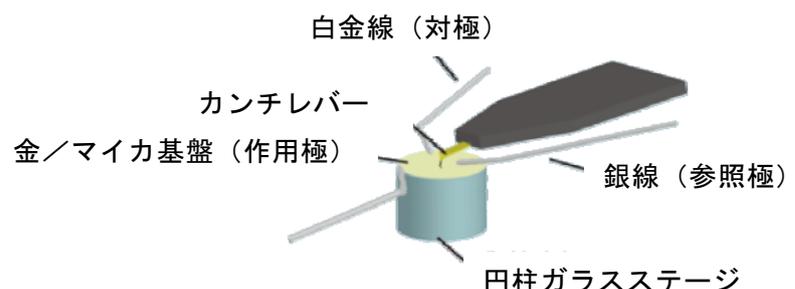


図 1 (A) AFM ヘッド部 (B) セル構成の模式図

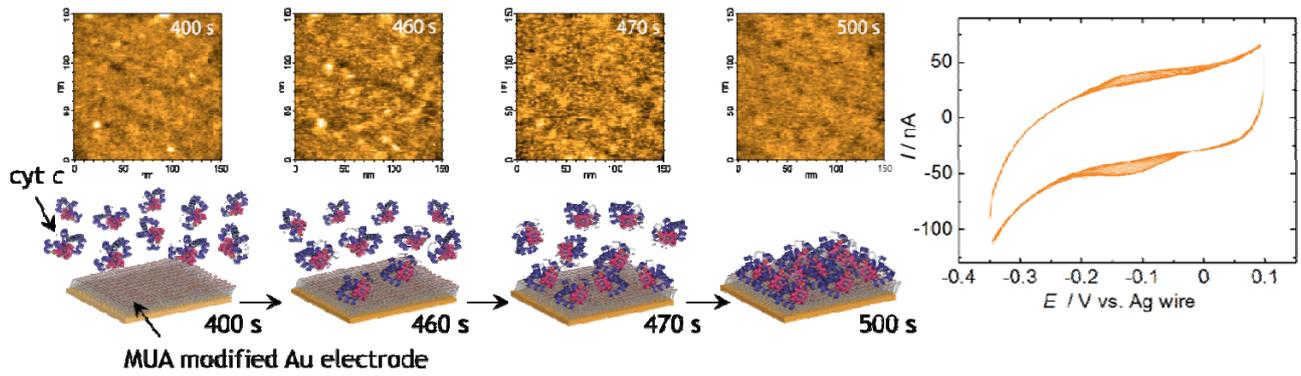


図2 SAM 修飾金電極にシトクロム *c* が吸着していく一連の AFM 画像(左上)と、その模式図 (左下)。AFM 画像で白くなっているところが相対的に高く、シトクロム *c* が吸着している。右図は、同時に測定したサイクリックボルタモグラム(特定の電位に対する応答電流をプロットしたもので、-0.11 V 付近にシトクロム *c* の酸化還元に由来した電気化学応答が増加していく様子が観察される。

◆研究に関する問い合わせ◆

東京農工大学大学院工学研究院
 生命機能科学部門 教授
 中村 暢文 (なかむら のぶふみ)
 TEL/FAX : 042-388-7482/ 042-388-7482
 E-mail: nobu1@cc.tuat.ac.jp