

学 位 論 文 題 名

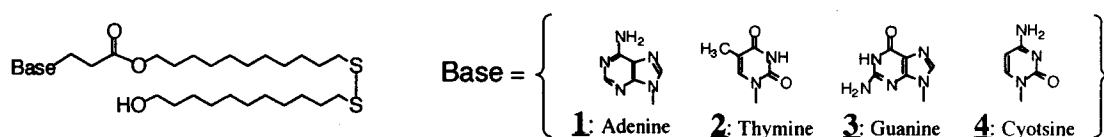
Chemical Force Microscopic Observation
of Self-Assembled Monolayers having Nucleobase

(核酸塩基を有する自己集合単分子膜の化学力顕微鏡観察)

学位論文内容の要旨

化学力顕微鏡 (CFM) は、化学修飾した AFM 探針を用いて表面分子間に働く力を直接測る手法である。これまでに CFM を用いて静電相互作用や疎水性相互作用を測定することで固体表面の官能基の識別がなされてきた。タンパクやオリゴヌクレオチド等の生体高分子の分子認識挙動の検出や、表面のキラル識別を行ったという報告もある。固体表面の分子を見分けることにおいて、CFM は高い感度と二次元方向の分解能を持った強力なツールである。本研究では、これまで評価することが困難であった、核酸塩基間に働く特異的な水素結合力を CFM により直接検出した。

核酸塩基間に働く水素結合力を測定するために、アデニン、チミン、グアニン、シトシンをそれぞれ有するジスルフィド誘導体 (1~4) を合成し、これらの化合物が Au 表面でほぼ同程度の密な自己組織化単分子膜 (SAM) を形成することを表面プラズモン共鳴法 (SPR) と水晶振動子マイクロバランス (QCM) で確認した。



チミン誘導体 2 で修飾した AFM 探針でアデニン誘導体 1 およびチミン誘導体 2 の SAM 表面 (10 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$, 64 $\times$ 64 points) を水中でフォースマッピングした結果について Figure 1 に示した。明るく見えている点が AFM 探針とサンプル基板間で強い吸着力を示した点である。同じ場所のトポグラフィーを測定したところ、暗い部分が Quartz 表面で明るい部分が SAM 表面であることが分かった。核酸塩基を有する SAM 表面は Quartz 表面よりも吸着力が強いことが分かった。また、相補的なアデニン-チミンの組み合わせの方がフォースマップに明確なコントラストがついていることから、非相補的な組み合わせよりも強い吸着力を示していることが分かる。SAM 上の 1024 点の吸着力 (pull-off) のヒストグラムも相補的なアデニン-チミンの組み合わせは大きく右にシフトしている (Figure 2)。相補的な組み合わせの吸着力は非相補的なものと比較して約 2 倍の吸着力を示した。アデニン誘導体 1 で修飾した AFM 探針でフォースマッピングした

場合も同様の結果を示した。ほぼ同程度の核酸塩基密度を有する SAM 表面において、CFM による核酸塩基の識別ができた事は重要である。

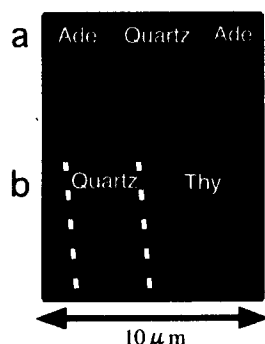


Figure. 1 Mapping of adhesion force between a thymine modified tip and adenine(a) or thymine modified gold micro electrode(b), respectively. White dots lines indicate the electrode edges observed by the topological imaging of AFM.

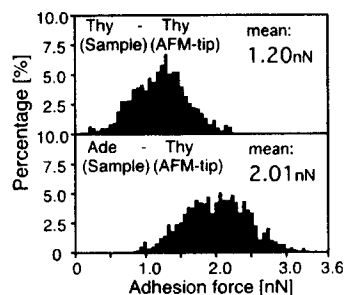


Figure. 2 Histograms for adhesion force obtained from the force-distance curves.

核酸塩基間に働く特異的な水素結合について詳しく調べるため、1で修飾した AFM 探針で 1~4の SAM のフォースマッピングを行った。各 SAM の 256 点での jump-in 力と pull-off 力の平均値を求め、Figure 3 に示した。これを見ると a) jump-in 力と b) pull-off 力で棒グラフのパターンに差があることが分かる。長距離から働く jump-in 力と AFM 探針が表面から引きはがされる時に働く pull-off 力では働く力の種類が異なっているのではないかと予想される。

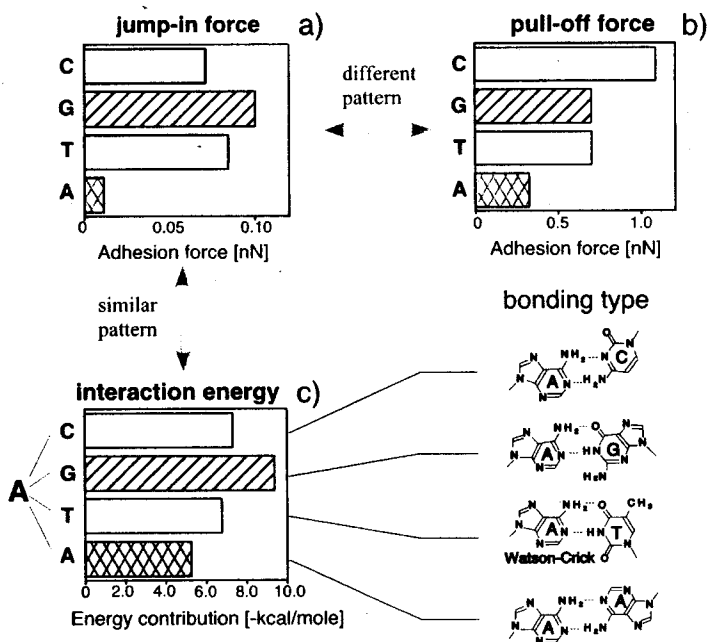


Figure 3. a) Jump-in and b) pull-off forces between adenine-modified AFM-tip and four electrodes modified with 1-4 respectively in pure water. c) Optimized interaction energies in selected base-pairs were calculated by quantum chemical methods.

それぞれの吸着力に関与している特異的な水素結合の種類について検討するため、量子化学的に計算された c) 結合エネルギーと比較した。結合エネルギーは吸着力と次元が異なるので、c) はあくまでも分子間相互作用の強さを議論する上での参考として用いた。アデニンを含む塩基対は 13 種類あるが、核酸塩基の分子占有面積と水素結合方向から、SAM 表面間で起こりうる塩基対形成は c) に示した 4 種のみと考えられる。Figure 3 の各棒グラフを比較すると、a) Jump-in

力の棒グラフと c) 結合エネルギーの棒グラフがよく似た傾向を示すことが分かった。このことは jump-in 力測定が核酸塩基間に働く特異的な水素結合を感度よく検出したことを示している。一方、pull-off 力は結合エネルギーとパターンが大きく異なっていることから、様々な相互作用が関与していると推察される (Figure 4)。以上より jump-in 力測定を用いた塩基対マッピングが期待される。

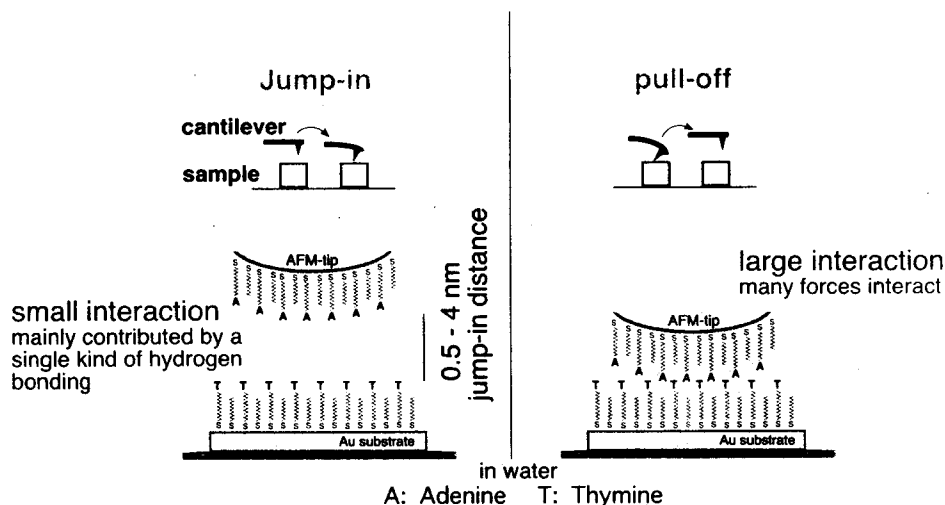


Figure 4. Schematic illustration of jump-in and pull-off force.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 下 村 政 嗣
副 査 教 授 村 越 敬
副 査 教 授 川 端 和 重
副 査 助 教 授 居 城 邦 治

学 位 論 文 題 名

Chemical Force Microscopic Observation of Self-Assembled Monolayers having Nucleobase

(核酸塩基を有する自己集合単分子膜の化学力顕微鏡観察)

化学力顕微鏡 (CFM) は、化学修飾した AFM 探針を用いて表面分子間に働く力を直接測る手法である。これまでに CFM を用いて静電相互作用や疎水性相互作用を測定することで固体表面の官能基の識別がなされてきた。タンパク質やオリゴヌクレオチド等の生体高分子の分子認識挙動の検出や、表面のキラル識別についてすでに報告されていることから、固体表面の分子を識別において、CFM は高い感度と二次元方向の分解能を持った強力なツールであると考えられる。

本論文では、これまで水中で評価することが困難であった核酸塩基間に働く特異的な水素結合力の CFM による直接検出について研究した。酸塩基間に働く水素結合力を測定するために、アデニン、チミン、グアニン、シトシンをそれぞれ有するジスルフィド誘導体を合成し、これらの化合物が Au 表面でほぼ同程度の密な自己組織化単分子膜 (SAM) を形成することを表面プラズモン共鳴法 (SPR) と水晶振動子マイクロバランス (QCM) で確認した。チミン誘導体で修飾した AFM 探針でアデニン誘導体およびチミン誘導体の SAM 表面を水中でフォースマッピングした。核酸塩基を有する SAM 表面は Quartz 表面よりも吸着力が強いことが分かった。また、相補的なアデニン-チミンの組み合わせの方がフォースマップに明確なコントラストがついていることから、非相補的な組み合わせよりも強い吸着力を示していることがわかった。相補的な組み合わせの吸着力は非相補的なものと比較して約 2 倍の吸着力を示した。それぞれの吸着力に関与している塩基対型について検討するため、量子化学的に計算された結合エネルギーと比較したところ、jump-in 力測定が核酸塩基間に働く特異的な水素結合を感度よく検出したことが示された。一方、pull-off 力は結合エネルギーとパターンが大きく異なっていることから、様々な相互作用が関与していると推察された。

これを要するに、著者は、水中での相補的な水素結合について化学力顕微鏡を用いる

ことで、塩基対形成の分子認識の新知見を得たものであり、核酸の化学のみならず分子生物学に対して貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格のあるものと認める。