



Title	核酸単分子膜による分子認識
Author(s)	居城, 邦治
Citation	電子科学研究, 2, 83-87
Issue Date	1995-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/24315
Type	departmental bulletin paper
File Information	2_P83-87.pdf



核酸単分子膜による分子認識

分子認識素子研究分野 居 城 邦 治

生体内では様々な分子レベルでの認識を行っており、分子認識を理解することは分子生物学上たいへん重要である。界面での分子認識を研究するために、気液界面における塩基対形成をモデルとした、オクタデシルシトシンの気液界面単分子膜の π -A 曲線測定と蛍光顕微鏡観察を行った。オクタデシルシトシン単分子膜は、10 mM 以上の NaCl 水溶液上で安定した単分子膜を形成した。他のヌクレオシドに比べ、グアノシンを含む水溶液上では π -A 曲線は著しく変化し、オクタデシルシトシンがグアノシンを塩基対形成により認識していることが示唆された。一方、蛍光顕微鏡観察では、どのヌクレオシド水溶液上でもオクタデシルシトシン単分子膜の結晶形態は変化しており、オクタデシルシトシンは 4 種のヌクレオシドを識別していることが示唆された。しかしグアノシンとだけに特異的なキララな結晶形態が見られ、 π -A 曲線測定結果との相関が示された。

1. はじめに

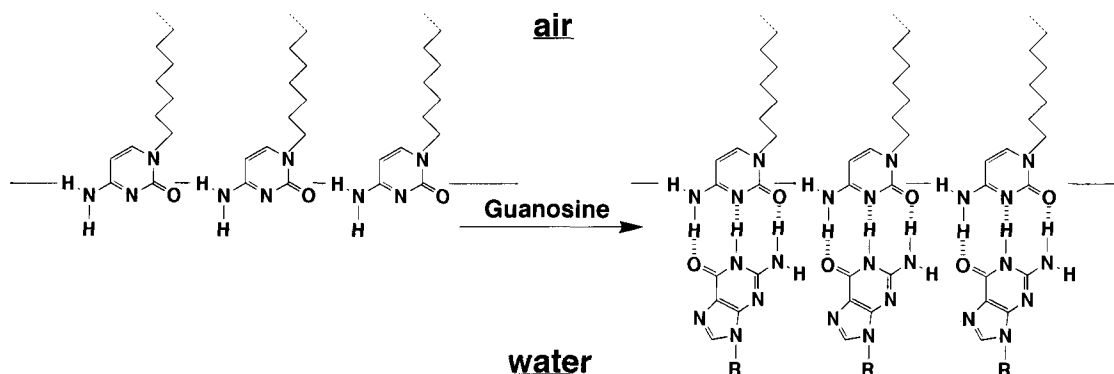
生体は分子レベルで様々な認識を通して生命維持をしている。たとえば、非自己化合物から自己を防衛する、つまり免疫の基となる抗原-抗体反応や、生体内での化学反応をつかさどる酵素反応、転写された一本鎖 DNA 同士が二重らせんになるハイブリッド形成反応などがそれである。いずれの反応も、巨大分子（タンパク質）対巨大分子、巨大分子対低分子、低分子対低分子など、特定の相手のみを認識する特異的な反応である。これらの反応は分子認識と呼ばれ、静電相互作用、水素結合、分散力、電荷移動相互作用、疎水結合を駆使した精密な認識が行われている^[1]。近年、低分子間の分子認識に対する関心は増加する一方で、これはホスト分子がゲスト分子を捕らえるホスト-ゲスト化学とも呼ばれている。これらの研究の多くは、水中や有機溶媒中での分子分散系で行われた。一方、生体内での分子認識は、タンパク質表面や生体膜表面などの界面で不均一に行われている。このような環境での分子認識の研究は重要ではあるが、あまりなされていなかった。

これまで Ringsdorf ら^[2] や国武ら^[3] は生体内界面のモデルである気液界面で、水素結合を用いた分子認識を主に表面圧-分子占有面積曲線(以下 π -A 曲線と

する)の測定により研究を行ってきた。しかし、この測定方法では界面内の一次元方向の情報しか得ることができず、分子認識の研究には不十分であると考えられる。筆者はこれまでマイクロバランスとして知られる水晶発振子電極上に一本鎖オリゴ DNA を固定化して、相補的なオリゴ DNA との協同的な水素結合によるハイブリッド形成を観察してきた^[4]。本研究では、一分子対一分子の核酸間の水素結合による分子認識に着目して、水面単分子膜を形成する核酸誘導体アルキルシトシンを合成した。水中での一分子対一分子の塩基対形成はエネルギー的に困難であることは良く知られているが、気液界面はバルクの水とは異なり誘電率がかなり低く、水素結合を形成しやすい環境である可能性は高い。そこでスキームに示すような気液界面での単分子膜と溶質間の分子認識(塩基対形成)を表面圧-分子面積曲線で観察、さらに気液界面内の二次元の情報を得ることのできる蛍光顕微鏡を用いて検討した。シトシン残基と特に安定した水素結合を形成できるグアニン誘導体の特異的に認識できると期待される。このような種々の手法の組み合わせにより、より正確な界面での分子認識過程の検討を行うことができる。

2. オクタデシルシトシン単分子膜

単分子膜の物性は π -A 曲線にはっきりと反映され



Scheme. Molecular structure and molecular recognition of alkyl cytosine at the air/water interface.

る。 π -A 曲線とは、単分子膜形成化合物の分子占有面積と表面圧力の関係を示す二次元の相図である。実験的としては、テフロン被覆した金属の水槽に水を張り、オクタデシルシトシン^[5](以下 C_{18} -Cyt と略す) のクロロホルム-エタノール混合溶液を展開し、十分に溶媒が蒸発した後に単分子膜で覆われている水面の面積が減少するようにテフロン製のバリアーで徐々に圧縮して、表面圧力の変化を記録するものである。単分子膜は、圧縮によって二次元の気体、液体、および固体の相状態を経て、分子固有の面積(極限占有面積)より小さな面積まで圧縮されると、二次元構造が崩壊し三次元の固体あるいは液体に転移する。

図1に種々の濃度の NaCl 水溶液上に展開した C_{18} -Cyt の単分子膜の π -A 曲線を示す。NaCl が 5 mM で

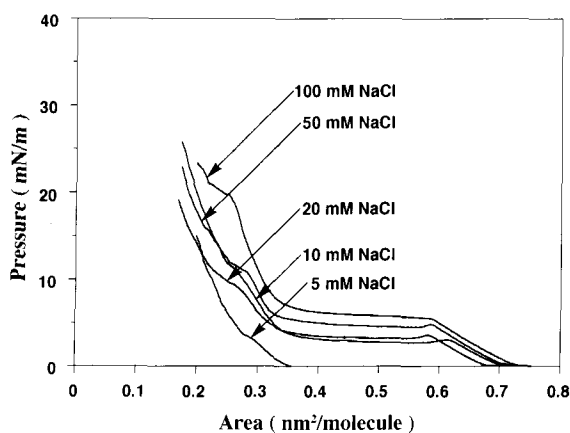


Figure 1. Effect of concentrations of NaCl on pressure-area isotherms of octadecyl cytosine at 20 °C.

の崩壊圧(二次元構造が崩壊する圧力)は約 3 mN/m と大変低く、不安定な単分子膜を形成していることがわかる。 C_{18} -Cyt のシトシン残基の親水性があまり高くないことが原因であると考えられる。それに対して NaCl 濃度を 10 mM 以上にすると、固体と液体の混在した固体-液体混合相が出現し、さらに崩壊圧も 10 mN/m 以上に上昇することから安定した単分子膜が形成されていることがわかった。一般に核酸は金属イオンと配位することが知られており、この場合もシトシン残基に Na^+ イオンが配位することにより親水性が増大して、安定した単分子膜が得られたと考えられる。

3. π -A 曲線測定によるヌクレオシドの認識

DNA や RNA では、グアニン-シトシン、アデニン-チミン(ウラシル)間で相補的な塩基対となり二重らせんを形成する。図2には、 C_{18} -Cyt と塩基対を形成すると期待されるグアノシンを含む水溶液上で測定した π -A 曲線を示す。グアノシンのみを含む水溶液上の π -A 曲線は、純水上の π -A 曲線に比べてあまり変化しておらず、どちらも不安定な単分子膜を形成した。おそらく純水上では C_{18} -Cyt は凝集しており、結果としてグアノシンと塩基対が形成できないものと思われる。それに対して 20 mM NaCl 水溶液上では、グアノシンの存在により π -A 曲線は著しく変化した。高い崩壊圧を持つ安定した単分子膜が形成されたことより、予想通り C_{18} -Cyt はグアノシンと相互作用していると考えられる。

分子認識において選択性は必要不可欠である。図3に

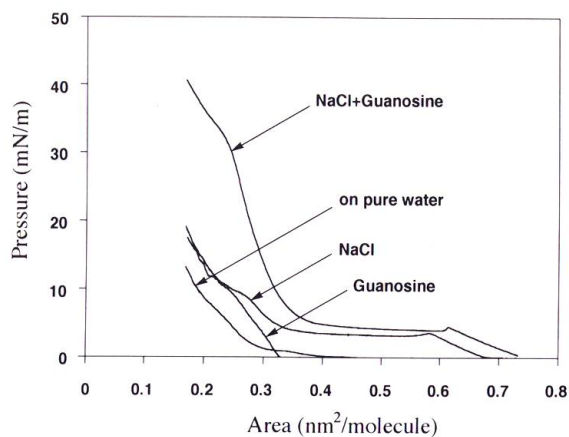


Figure 2. Pressure-area isotherms of octadecyl cytosine on 20 mM NaCl and/or 5×10^{-4} M guanosine at 20 °C.

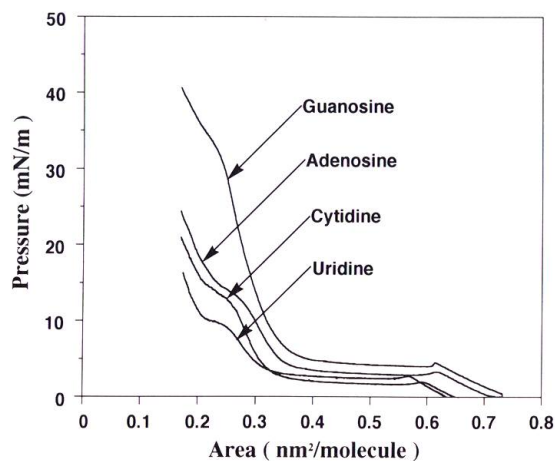


Figure 3. Pressure-area isotherms of octadecyl cytosine on 20 mM NaCl and 5×10^{-4} M nucleosides at 20 °C.

は、グアノシンの代わりにアデノシン、シチジン、ウリジンをそれぞれ含む 20 mM NaCl 水溶液上の π -A 曲線を示す。グアノシン以外のヌクレオシドでは π -A 曲線に大きな変化はなく、 C_{18} -Cyt 単分子膜と強く相互作用していないことがわかった。すなわち C_{18} -Cyt はグアノシンを特異的に認識して結合し、単分子膜の安定性を高めることが示された。

4. 蛍光顕微鏡によるオクタデシルシトシン単分子膜の直接観察

蛍光顕微鏡による気液界面単分子膜のその場観察

は、単分子膜の相状態の解明に威力を発揮し、現在では単分子膜や LB 膜の膜質制御における直接的なモニタリング法として注目されている^[6]。2 mol% のオクタデシルローダミンを蛍光プローブとして含む C_{18} -Cyt の単分子膜の直接観察を行った^[4]。低い圧力で単分子膜が流動的な状態にあるときには、蛍光プローブは単分子膜全体に均一に分布し蛍光顕微鏡の視野全体は明るく見える。一方、圧縮に伴って相転移が起こり、膜が結晶化しはじめると蛍光プローブは不純物として結晶相から流動相にはじきだされる。その結果、結晶相と流動相の明暗のコントラストとして単分子膜のイメージを得ることができる。

図 4 には 20 mM NaCl 水溶液上での C_{18} -Cyt 単分子膜の蛍光イメージを示す。直径約 15 μ m の結晶と考えられる円形ドメインが多数観察された。図 5 にはウリジン、アデノシン、シチジン、グアノシンをそれぞれ含む 20 mM NaCl 水溶液上の C_{18} -Cyt 単分子膜の蛍光イメージを示す。ただしグアノシンの場合、水面上でグアノシンによる強い消光が起きるため気液界面での直接観察はできなかつたため、ガラス基板上にラングミュアー-プロジェクト法で 1 層だけ移し取り結晶形態の観察を行った。 π -A 曲線に大きな変化がなかったウリジン、アデノシン、シチジン水溶液上でも、 C_{18} -Cyt 単分子膜の蛍光イメージは図 4 とは異なっていることがわかった。これらの相互作用は π -A 曲線は変えないものの、 C_{18} -Cyt 単分子膜の結晶成長に著しい影響を与えていると考えられる。また π -A 曲線に大きな変化

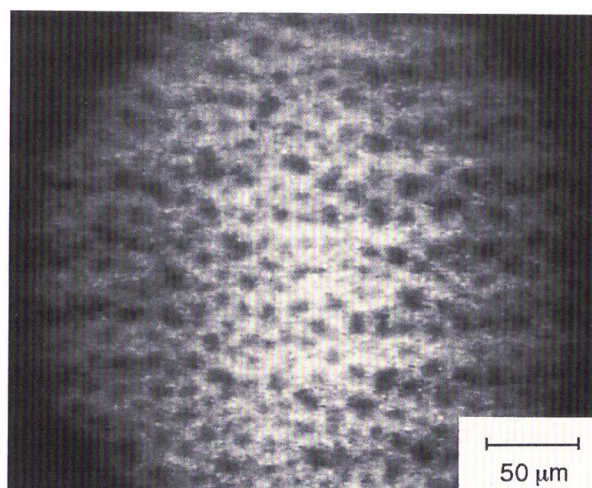
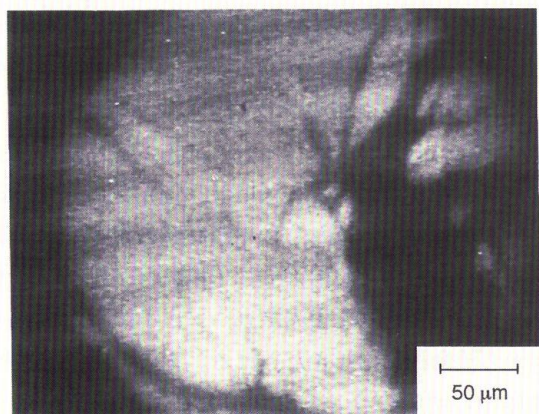
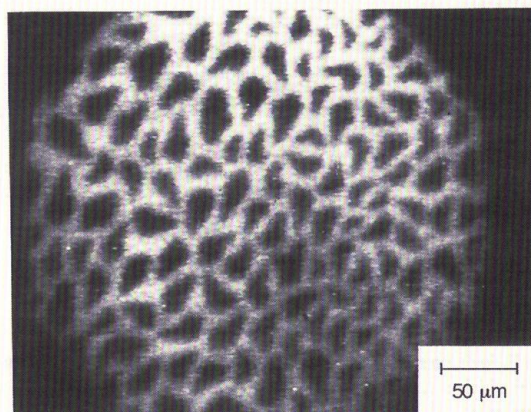


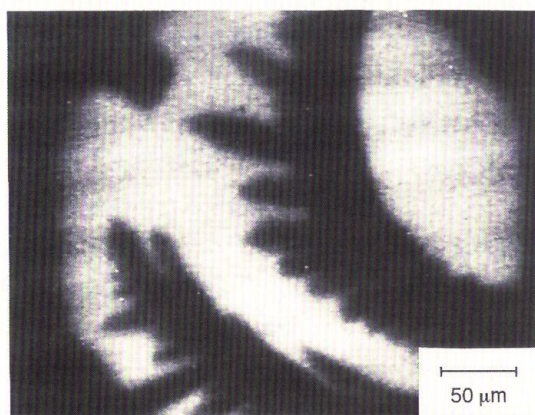
Figure 4. Fluorescent image of octadecyl cytosine monolayer on 20 mM NaCl at 20 °C.



Uridine



Adenosine



Cytidine



Guanosine

Figure 5. Fluorescent images of octadecyl cytosine monolayer on 20 mM NaCl and 5×10^{-4} M nucleosides at 20 °C.

のあったグアノシンでは、全ての結晶が同じ向きに曲がったキラルなドメインが観察された。ヌクレオシドは光学活性な D-リボースを有しており、塩基対形成後の C_{18} -Cyt とグアノシンとの複合体が水面上で圧縮されていく過程で、D-リボース残基のキラルなパッキングがおこるのかもしれない。以上のことより単分子膜の蛍光イメージは、 π -A 曲線よりも微細な相互作用を観測できる有効な手段であることがわかった。

5. まとめ

生体内の界面（タンパク質表面や生体二分子膜表面など）のモデルとなる気液界面における分子認識を調べる目的で、新たに気液界面単分子膜を形成するオクタデシルシトシン (C_{18} -Cyt) を合成して、溶質のヌクレ

オシドとの相互作用を π -A 曲線と蛍光顕微鏡観察を組み合わせで検討した。 C_{18} -Cyt 単分子膜は 10 mM 以上の NaCl 水溶液上で安定した単分子膜を形成した。他のヌクレオシドに比べ、グアノシンを含む水溶液上では π -A 曲線は著しく変化し、 C_{18} -Cyt がグアノシンを特異的に認識していることがわかった。これは温度変化の実験からも水素結合による塩基対形成の結果であると思われる。一方、蛍光顕微鏡観察では、どのヌクレオシド水溶液上でも C_{18} -Cyt の結晶形態は変化しており、 C_{18} -Cyt と 4 種のヌクレオシドとの相互作用が示唆された。しかしグアノシンでは特異的なキラルな結晶形態が見られ、特に強い認識が示された。以上のことより気液界面単分子膜における分子認識を調べるには π -A 曲線測定だけでは不十分であり、蛍光顕微

鏡観察によって補える所は大きいと思われる。今後はこのモデル認識を用いて界面での分子認識の動力学等についてさらに検討するつもりである。さらに、現在

はまだなされていないが、蛍光イメージの形態変化を数値化することができれば界面の研究は大いに進歩するものと思われる。

【参考文献】

- [1] 小宮山真, 荒木孝二: 分子認識と生体機能 (朝倉書店, 東京).
- [2] K. Kitano and H. Ringsdorf, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **58**, 2826-2828 (1985).
- [3] Y. Honda, K. Kurihara and T. Kunitake, *Chem. Lett.*, 681-684 (1991).
- [4] Y. Okahata, Y. Matsunobu, K. Ijio, M. Mukae, A. Murakami and K. Makino, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 8299-8300 (1992).
- [5] K. Tohda, T. Tange, K. Odashima, Y. Umezawa, H. Furuta and J. L. Sessler, *Anal. Chem.*, **64**, 960-964 (1992).
- [6] M. Shimomura, K. Fujii, P. Karg, W. Frey, E. Sackmann, P. Meller and H. Ringsdorf, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **27**, L1761-1763 (1988).