

論文内容の要旨

STM Molecular Tips for Electrically Pinpointing Complementary Nucleobases (和文：STM 分子探針を用いた相補的核酸塩基検出)

大城 敬人

【序】

走査型トンネル顕微鏡 (STM) は、原子分解能を持つ表面分析法として試料分子・基板の三次元的構造分析の用途に広く用いられている。しかし、従来の STM は原子の化学種や官能基の識別能に乏しかった。

1998 年に東大の梅澤らのグループによって、化学種選択的な STM 像を得ることの可能な“分子探針”が初めて報告された(*Anal. Chem.* **70**,255,(1998)). 分子探針とは、通常の STM 金探針を、試料分子と電子波動関数の重なりを生ずる分子で化学修飾して作成した STM 探針のことである。

この分子探針は、試料との間の電子波動関数の重なりを通じてトンネル電流を促進する。その結果、STM 像のコントラストの変化が起こることから、特定官能基・化学種を選択的に可視化識別することが可能となる。

本研究では、STM 分子探針の持つ化学選択性を用いて 4 種類の核酸塩基種の識別を行った (Fig. 1).

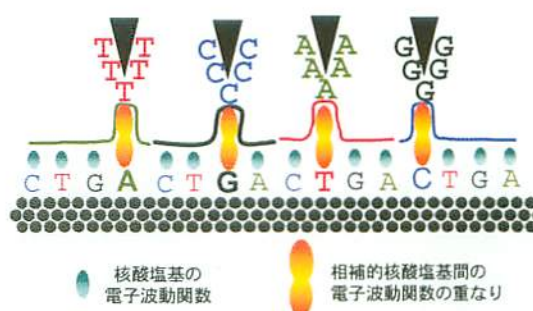


Fig.1. 4種類の核酸塩基探針による相補的核酸塩基分子の選択的識別。相補的塩基間の電子波動関数の重なりを介して探針試料間を流れるトンネル電流が増大する。この現象を利用すると、アデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)、チミン(T)探針を用いて、それぞれの相補的核酸塩基を検出することが可能となる。

核酸塩基を化学修飾した分子探針（以降、核酸塩基探針と称する）を作成し、その核酸塩基探針を用いて試料核酸塩基 SAM あるいは 18 塩基からなるペプチド核酸塩基鎖を測定した。この探針上の核酸塩基と試料相補的核酸塩基との間に生じる相補的な核酸塩基対間の電子波動関数の重なりを通じ、トンネル電流の促進がおこることから、STM 像のコントラストが増大し相補的核酸塩基のみを検出可能になると考えた。

【結果】

核酸塩基探針による核酸塩基自己集合膜(SAM)の STM 測定

核酸塩基探針は、STM 金探針にアデニン・グアニン・シトシン・ウラシルの 4 種類の核酸塩基チオール誘導体を化学修飾して作成した。試料は、核酸塩基チオール誘導体を金板上に自己組織化させた単分子膜(以下 SAM とする。)を用いた。

核酸塩基探針で STM 測定を行った結果、例えばグアニン SAM を相補的核酸塩基探針であるシトシン探針で観察した場合、顕著なトンネル電流の促進がおこり、グアニンが明るく観察された(Fig.2a,d)。このグアニン SAM 像のコントラストは、非相補的核酸塩基探針であるアデニン探針で観察した場合と比較して、2 倍になることがわかった(Fig.2b, d)。

他の核酸塩基 SAM を相補的核酸塩基探針で観察した場合でも同様に、顕著なトンネル電流の促進が起こり、核酸塩基像のコントラストは、非相補核酸塩基探針で測定した場合と比較して 2 倍になることがわかった。

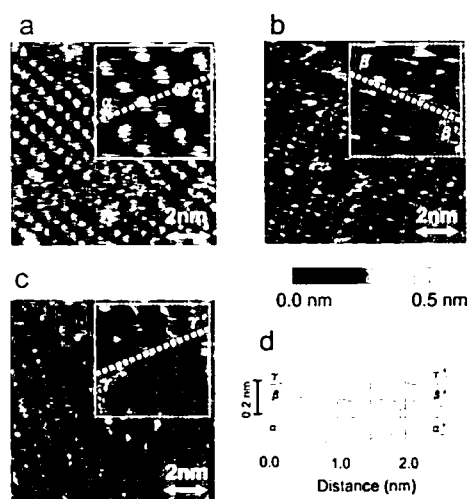


Fig. 2. 核酸塩基(グアニン)SAM の STM 像 ($15 \times 15 \text{ nm}^2$) (a)相補的核酸塩基探針であるシトシン探針で測定。(b)非相補的核酸塩基探針であるアデニン探針で測定。(c)未修飾金探針で測定。(d) (a)~(c)の STM 像の $\alpha-\alpha'$, $\beta-\beta'$, $\gamma-\gamma'$ に沿った断面図。

核酸塩基混合 SAM 中における相補的核酸塩基種の検出

次に核酸塩基探針で、相補的核酸塩基/非相補的核酸塩基の 2 種類を混合した SAM を STM 測定した。

その結果、例えばグアニンとアデニンの混合 SAM をシトシン探針で測定した場

合では、明るさの異なる二種類の核酸塩基像，すなわち、特に“明るい”核酸塩基像と“やや明るい”核酸塩基像が観察された。STM 像中での“明るい”核酸塩基像と“やや明るい”核酸塩基像それぞれの数の比は、SAM 中におけるグアニンとアデニンのモル比と一致することから、“明るく”観察された方がグアニンで、“やや明るく”観察された方が、アデニンであることがわかった。このことから、シトシン探針で測定すると、相補的核酸塩基のグアニンを検出できることが示された。また、同じ混合 SAM をウラシル探針で測定すると、その相補的核酸塩基であるアデニンを検出できることがわかった。

一方、試料と水素結合を形成しない分子探針や未修飾探針で相補・非相補核酸塩基の混合 SAM を測定しても、STM 像の明るさの違いは観察されず、相補・非相補核酸塩基は識別することは出来なかった。

STM によるペプチド核酸塩基中の相補的核酸塩基検出

ペプチド核酸塩基(以下 PNA とする)を、核酸塩基探針で STM 測定し、SAM の場合と同様に相補的核酸塩基の検出できるかどうか検証した。

試料の 18 塩基からなる PNA 鎖(配列は Fig.3 に記す)は、トリクロロベンゼン溶液に溶解させ、これを金基板の上に滴下したものを測定に用いた。

その結果、例えばシトシン探針で、チミンとグアニンを含む配列の PNA 鎖(a) (b) を測定した場合、相補的核酸塩基であるグアニンのみが、チミンと比べて著しく明るく観察された(Fig.3a,b,d)。一方、チミンのみを含む配列の PNA 鎖(c)では、すべての核酸塩基が同等の明るさで観察された(Fig.3c,d)。

以上のことから、核酸塩基探針による PNA の観察では、PNA 鎖の配列中に存在する相補的核酸塩基の検出が可能であることが示された。

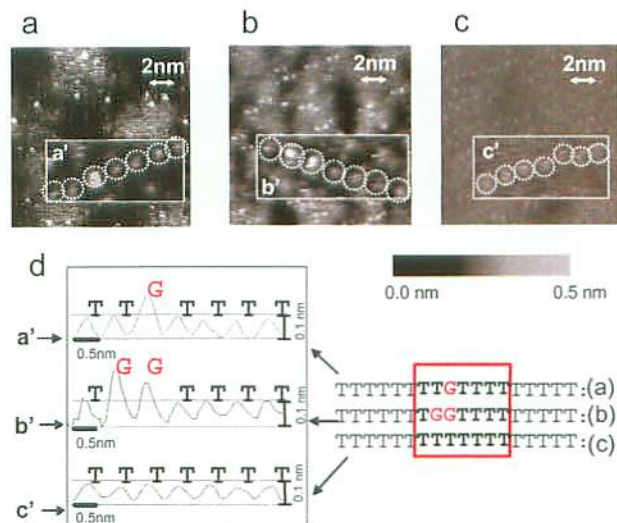


Fig. 3. 3 種類の配列のペプチド核酸(PNA)をシトシン探針で測定した STM 像 ($15 \times 15 \text{ nm}^2$). 18 塩基 PNA の配列は(a) TTT TTT TTG TTT TTT TTT, (b) TTT TTT TGG TTT TTT TTT, (c) TTT TTT TTT TTT TTT TTT. それぞれの PNA 鎖にそった断面図を(d)で示している。配列中で相補的核酸塩基であるグアニンのみが明るく観察される。

【考察】

観察された核酸塩基探針による核酸塩基 SAM および PNA 鎖の配列中の相補的核酸塩基の検出は、核酸塩基探針と試料核酸塩基間のトンネル電流の促進に基づいて行われている。

相補的核酸塩基間では、非相補的核酸塩基間よりも強い分子認識能をもつ多点水素結合が形成される。これにより生じた電子波動関数の重なりが、非相補的塩基間より生じる重なりよりも大きくなるため、より大きなトンネル電流の促進が起こる。この結果、STM 像のコントラスト変化から相補的核酸塩基のみを検出できる。

【結論】

本研究では、核酸塩基探針を用いた測定によって、核酸塩基 SAM およびペプチド核酸鎖の配列中に存在する相補的核酸塩基を検出することを可能にした。これは、探針と試料の相補的核酸塩基対間の水素結合が形成され、これによって生じた電子波動関数の重なりを介したトンネル電流の増加が起こるためである。

本研究でもちいた分子探針による分析法は、特定の官能基や化学種において、水素結合・配位結合・電荷移動相互作用に基づくトンネル電流の増加現象がおこることを利用して、様々な官能基の位置・配向性などを決定することが出来る。この分析手法は、“分子間トンネル顕微鏡”と呼ぶべきもので、膜・固体表面における化学種選択性のある一般的なイメージング法として今後大きく発展することが期待される。