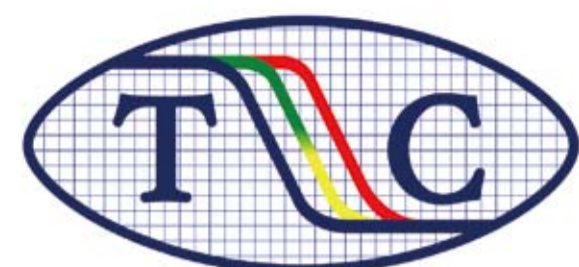


# AFM-IRによる アミロイド線維内ナノスケール構造解析の検討

## Application of AFM-IR to the nanoscale structural analysis in amyloid fibrils



株式会社日本サーマル・コンサルティング

○馬殿直樹, 浦山憲雄

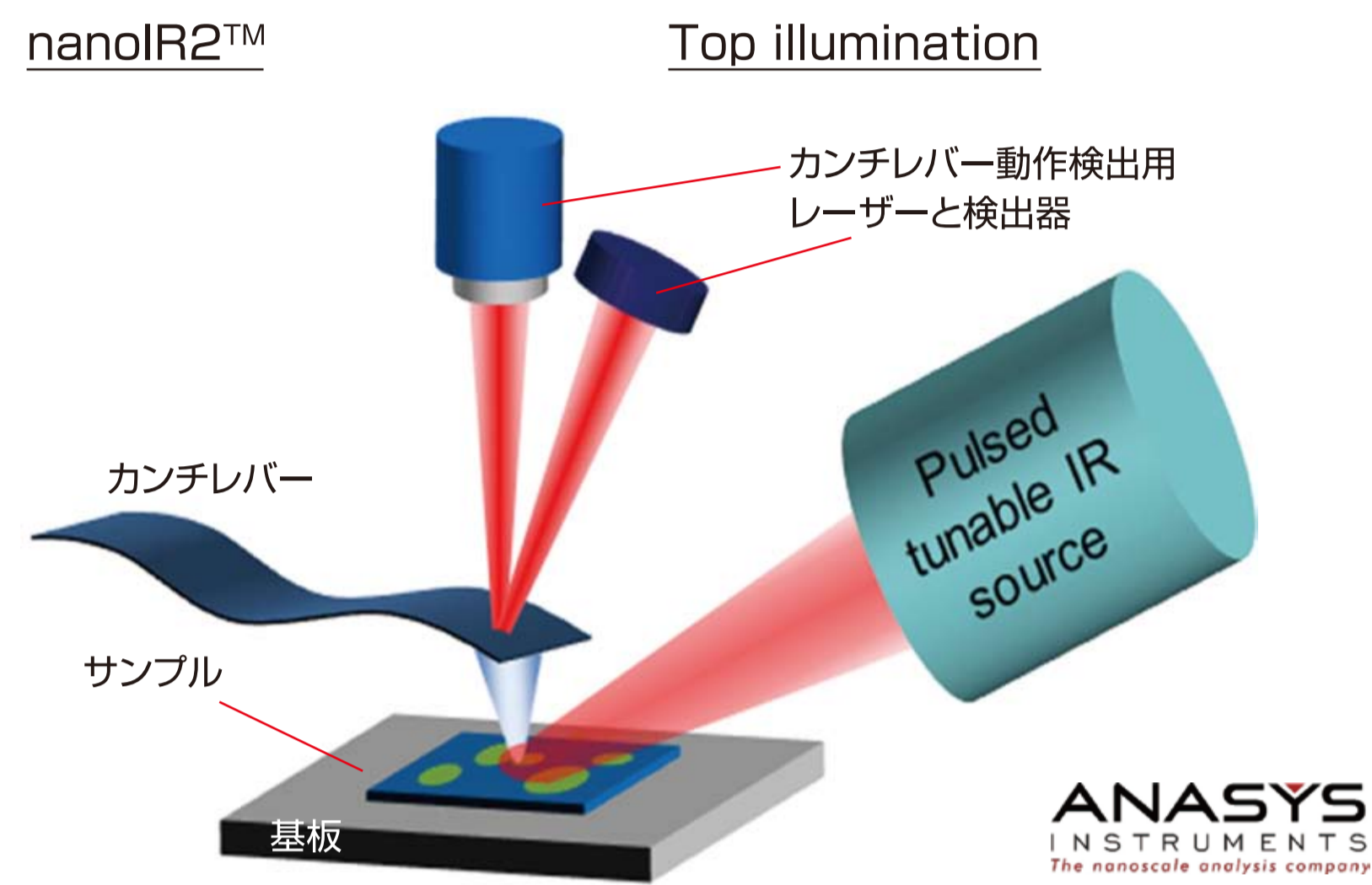
### 目的

タンパク質が繊維状の形態を形成したアミロイド線維は、様々な病気の原因と考えられている。アミロイドの形成機構解明や治療薬開発のためには線維内部の局所的な化学構造およびその分布評価が重要である。タンパク質の化学構造解析には赤外分光法が汎用されてきたが、空間分解能が約5 $\mu$ mであり、直径100nm以下の線維一本の構造分布情報を得ることは困難であった。

近年、AFMと赤外波長可変レーザーを組み合わせたAFM-IRにより、最高約10nmの空間分解能で赤外分光分析が可能になった。我々はこのAFM-IRを用いてアミロイド線維内部の化学構造分布評価を試みた。

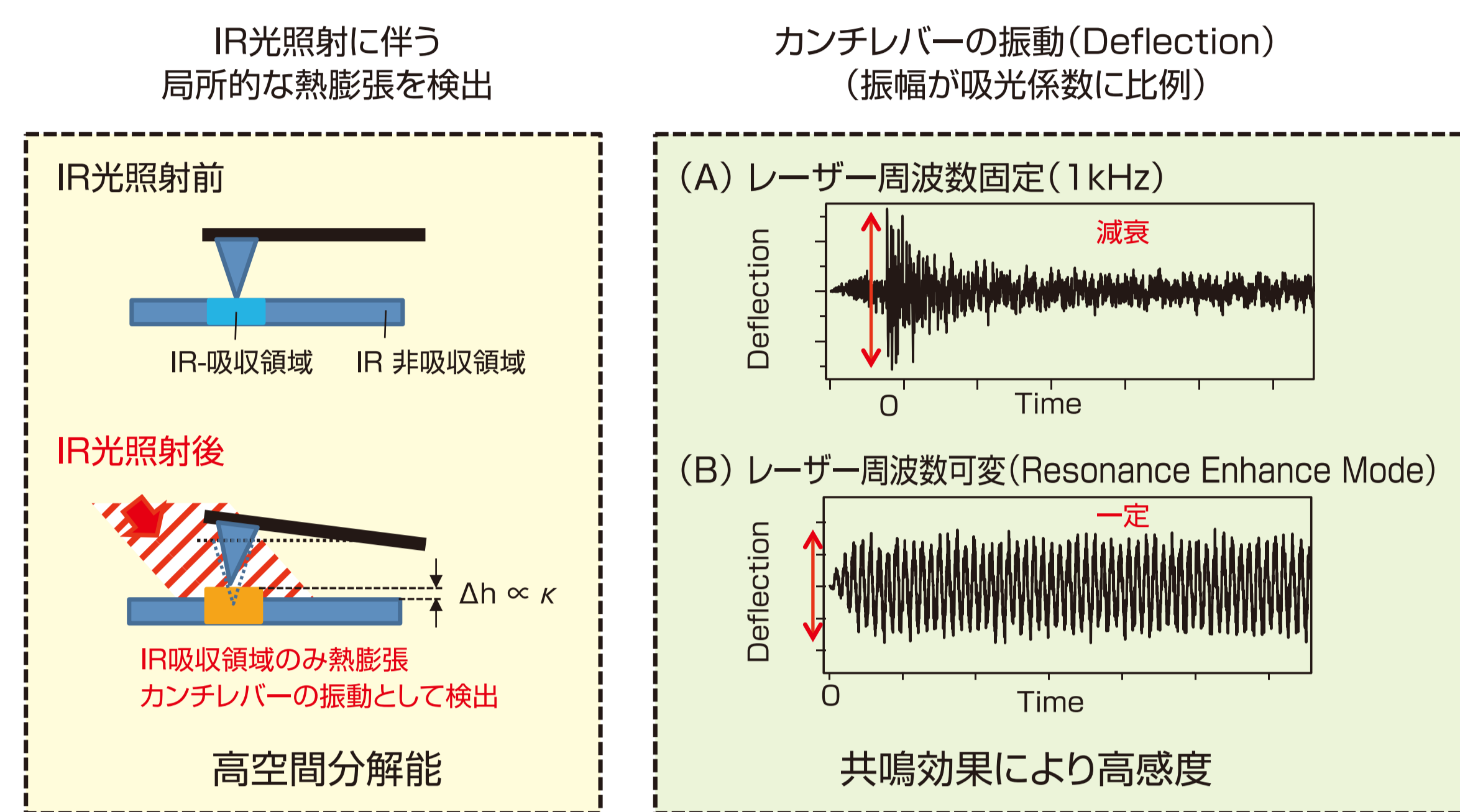
### AFM-IRとは

#### ◆ AFM-based Infrared Spectroscopy (AFM-IR)



主なIRレーザー	OPO	QCL
波数範囲 (cm <sup>-1</sup> )	850 - 4000	910 - 1900
波数分解能 (cm <sup>-1</sup> )	4	≤1
繰り返し周波数 (kHz)	1	0.1 - 500
パルスエネルギー (μJ)	2 - 100	0.1 - 2
パルス幅 (ns)	約10	40-500

OPO: Optical Parametric Oscillator QCL: Quantum Cascade Laser



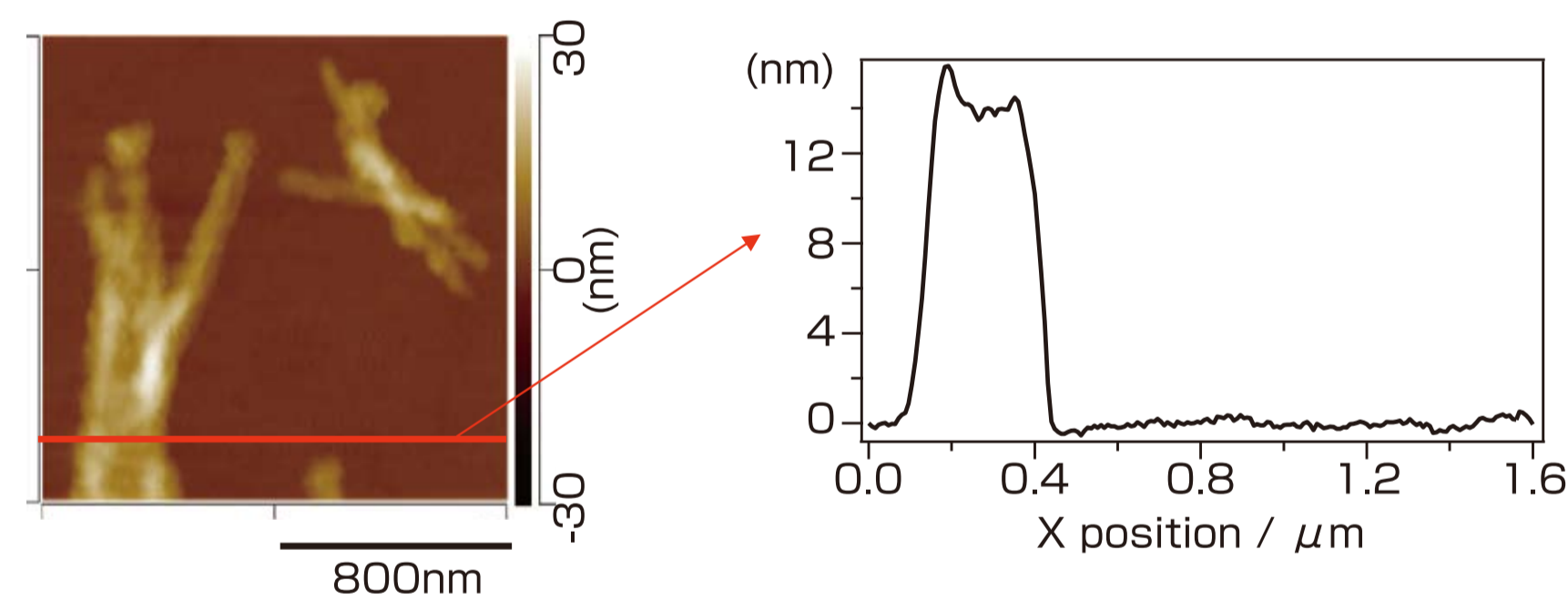
(1) スペクトル測定  
Deflectionの振幅をTunable IR laserの波数に対してプロット

(2) マッピング測定  
Tunable IR laserの波数を固定してAFMスキャン

AFM-IRスペクトル  
Rレーザー波数 / cm<sup>-1</sup>

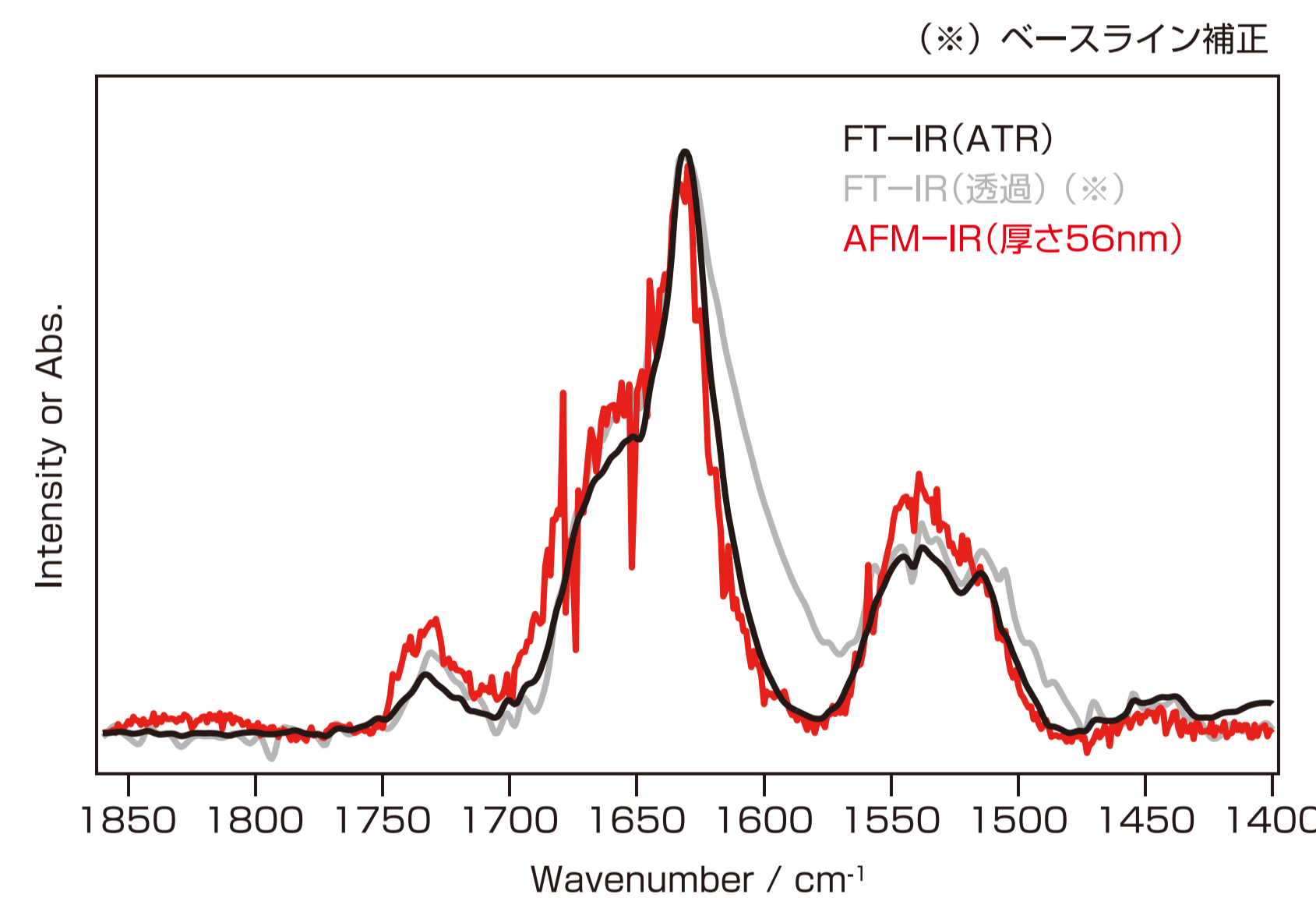
### サンプル

- 1mg/mlヒトインスリンを(25 mM HCl + 100 mM NaCl)に溶解したものを、75°Cで約4時間静置し生成したアミロイド線維(神戸大学・茶谷先生よりご提供頂いた)
- 試料溶液原液をマイクロピペットで金基板上に滴下し、水分を濾紙で吸い取って乾燥させてから測定。
- アミロイド線維幅100nm以下、長さ数 $\mu$ m、厚さは薄いところで20nm以下。



### 結果①

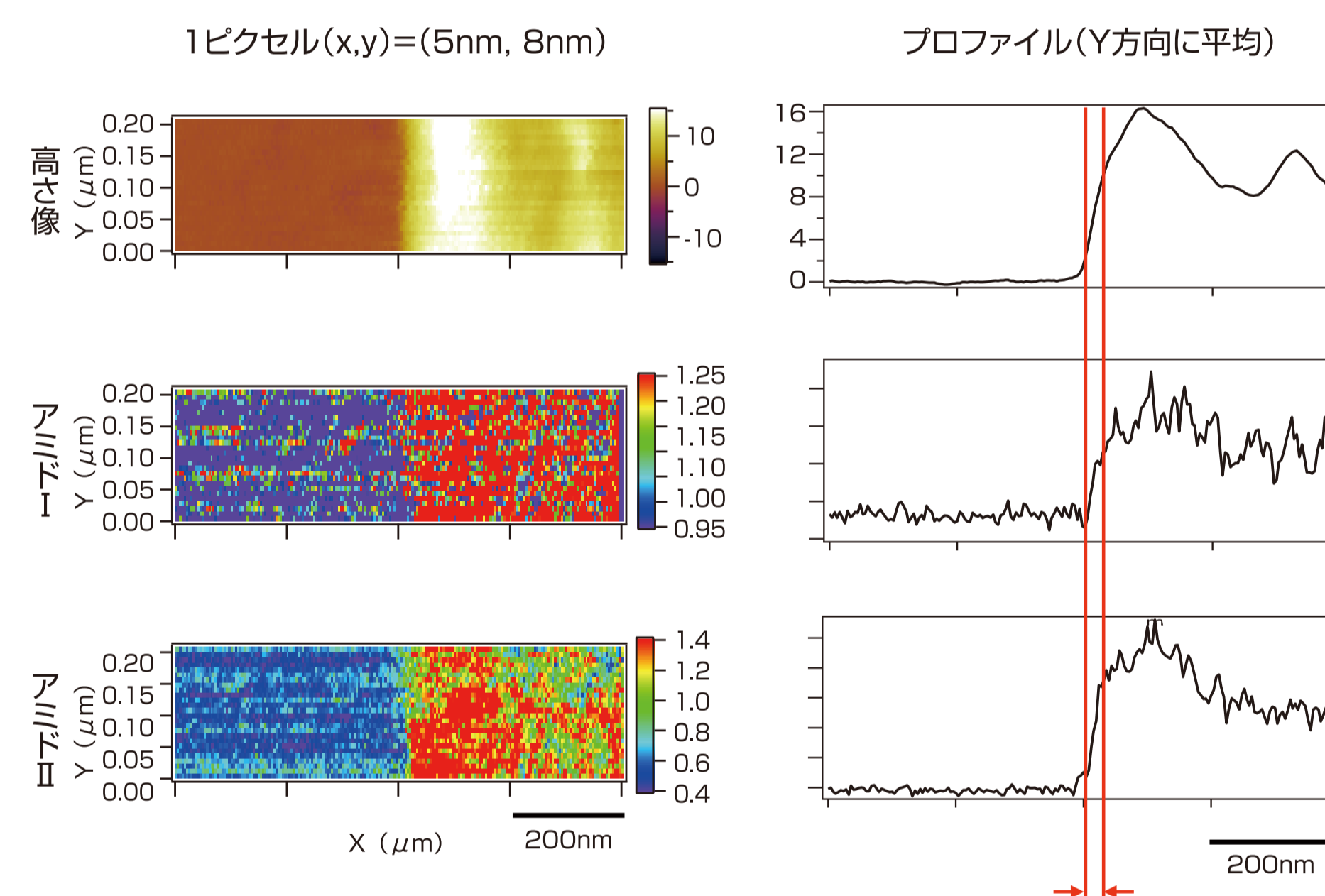
#### FT-IRスペクトル(ATR、透過)との比較



- ピーク位置、強度ともにFT-IRスペクトルと良い一致。
- AFM-IRスペクトルから二次構造量の評価が可能と考えられる。

### 結果②

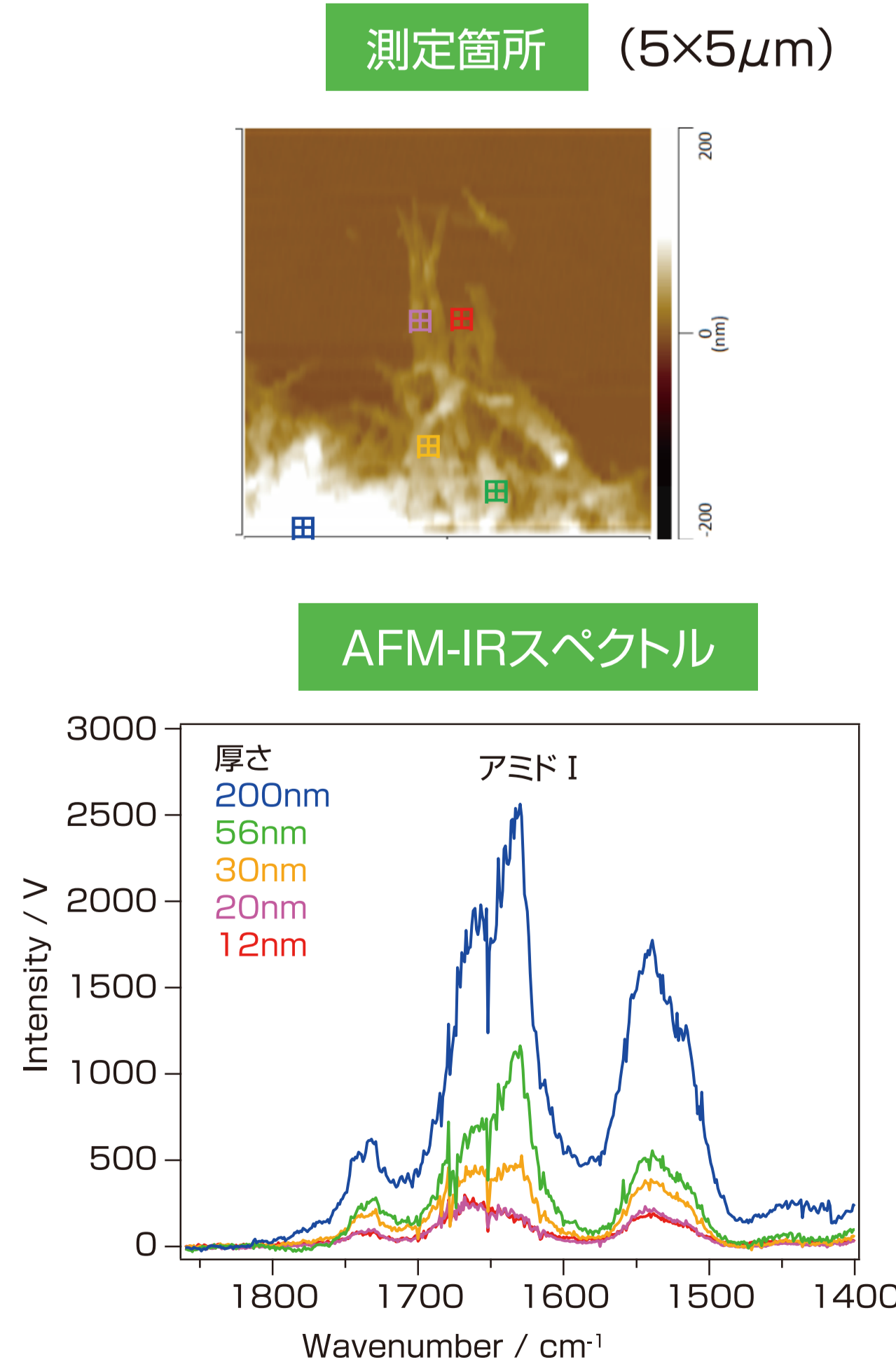
#### 空間分解能評価： アミロイド線維と基板の界面をIRマッピング測定



- 空間分解能約30nmで分析可能

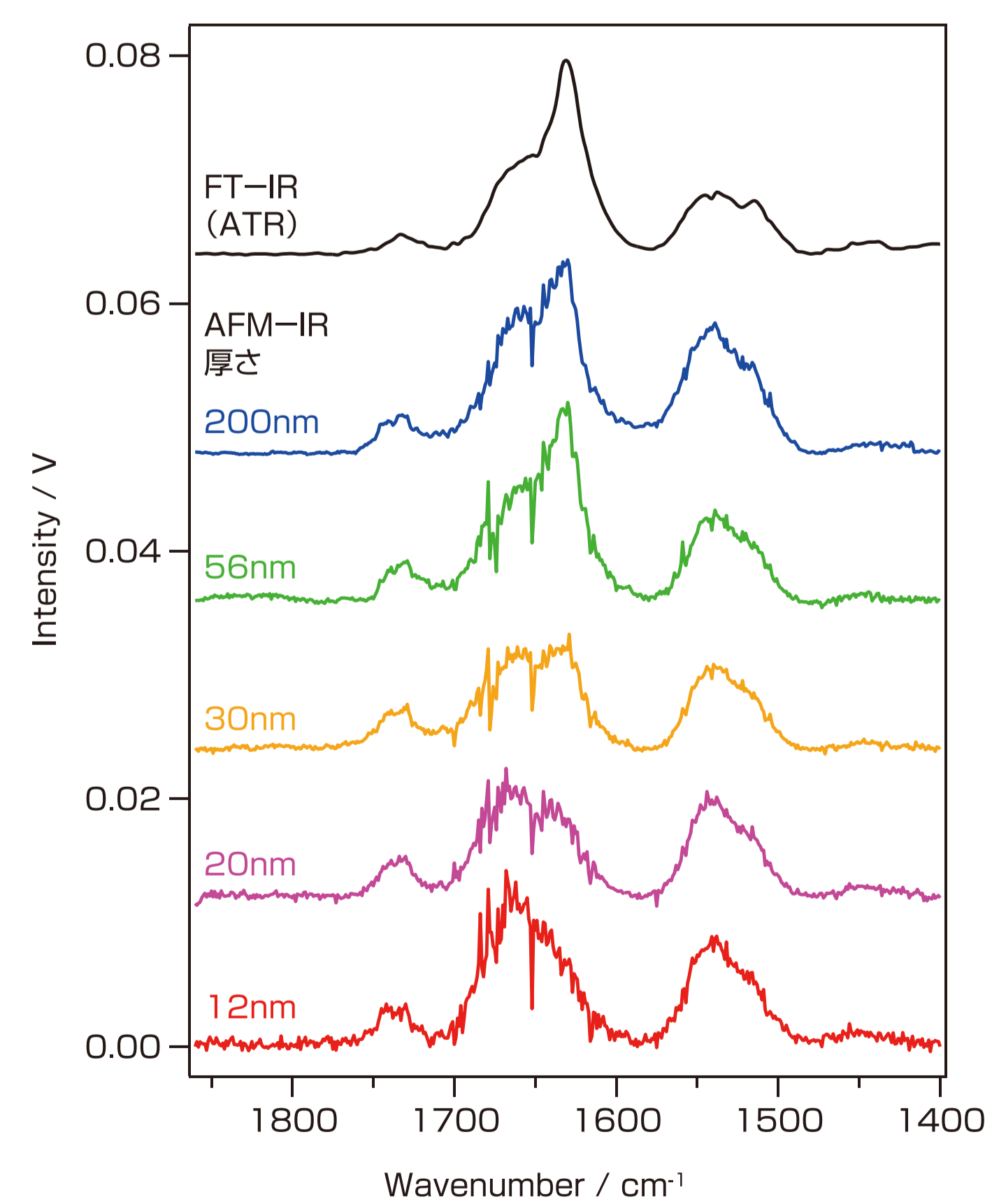
### 結果③

#### アミロイドの積層厚みによる AFM-IRスペクトルの変化



厚くなるにつれて、吸収強度が増加し、アミドIの形状が変化

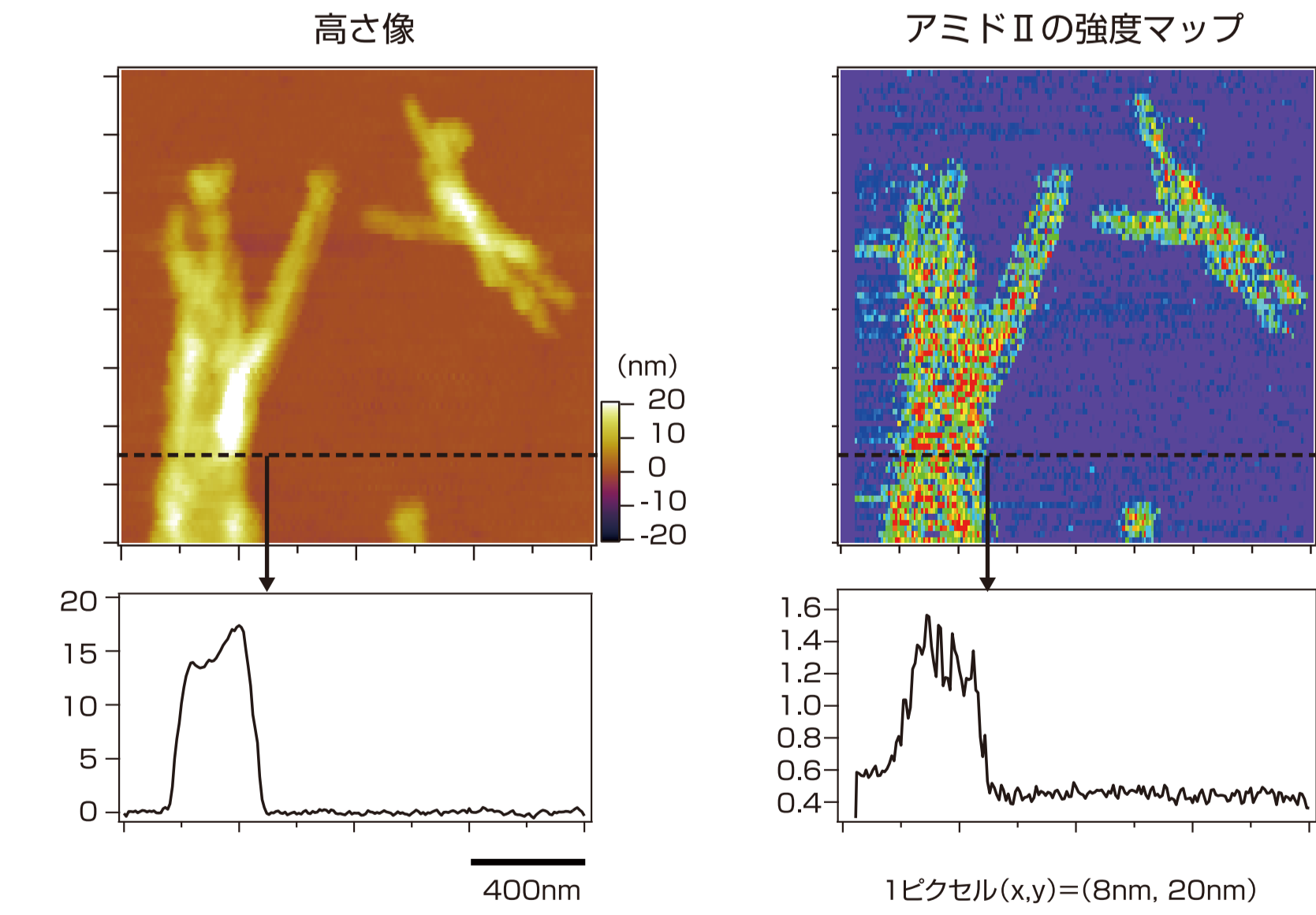
#### 強度スケールをほぼ同じにしてオフセット表示



- アミロイドの積層厚み30nm以下では、1630cm<sup>-1</sup>付近のピークが弱くなり、1660cm<sup>-1</sup>付近の強度が増加。
- 可能性として、以下が考えられる。
  - 基板界面近傍で水が多く残存している可能性(+配向性の変化(アミドI/IIの強度比変化))
  - 基板界面でアミロイドが構造変化している可能性

### 今後の予定

- 完全乾燥させて再測定
- 基板による構造変化があれば、基板の変更やコーティングを検討
- スペクトルおよびマッピング測定により、二次構造分布を可視化



### まとめ

- AFM-IRとFT-IRスペクトルは類似しており、空間分解能約30nmで二次構造評価が可能と考えられる。
- アミロイド線維の積層厚みが30nm以下になると、AFM-IRスペクトルのアミドIの形状が変化した。
- 水の信号の寄与が考えられるため、完全乾燥して再測定を予定。最終的にはマッピング測定により、二次構造分布を可視化したい。