

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 生体分子間相互作用を連続的に検出するための多機能型水晶発振子マルチセンサの設計と開発

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名

研究代表者

岡畑 恵雄 ((国)東京工業大学フロンティア創造共同研究センター・大学院生命理工学研究科 教授)

主たる共同研究者

なし

3. 研究内容及び成果:

3-1. 研究課題全体

この研究は、①高感度な水晶発振子マイクロバランスを開発する、②ナノグラムレベルの重量変化の連続測定が可能その特長を生かして、生体内の分子間相互作用や酵素反応などの動的な解析を行う、という2つのテーマから構成されている。水晶発振子に吸着・結合したものの微小な重量変化を連続的に測定することが可能であるため、従来測定出来なかった反応過程などの動的な解析を可能とした点が優れている。

① 高感度な水晶発振子マイクロバランスの開発では、S/N比の向上に成功し、セルの微小化と併せて約20倍の高感度化を達成した。これによって 10ng レベルの重量変化の測定が可能となり、タンパク質レセプターへの低分子シグナル分子の結合が測定出来るようになった。さらに、水晶のカット角の改良によって温度依存性を大幅に改良し、可搬型の測定器を開発して、実証段階に入っている。

② 分子間相互作用や反応の動的な解析では、酵素反応を中心に解析が進んだ。DNA、糖鎖、タンパク質、リボソームでの反応の解析に成功し、新たな知見や、従来出来なかった動的な解析での定説などを確認している。また、周波数をスキャンすることによって共振周波数のピーク形状の違いに注目し、ピーク幅が物質の粘弾性に関係があることから、分子のコンフォメーション変化を追跡出来ることを見出している。

このように多くの成果を得ているが、装置に関する知的財産は、当領域に採択される前に出願した基本特許に集約されており、当領域での発生した知的財産は、すべてノウハウの形で蓄積されており、外部には公開されていない。

3-2. 研究課題毎

終了報告書の記載に合わせて、課題別に概要を記載する。

1) 水晶発振子上での酵素反応の解析

・DNA上、糖鎖上での酵素反応の解析

DNA操作においては、各種の酵素が重要な役割を果たしており、その反応過程の解析は非常に重要なものであるにもかかわらず、その動的な解析は殆ど行われていなかった。一方、糖鎖の加水分解などの酵素反応は、工業的に大量に行われているにも関わらず、その素反応である糖鎖上での酵素反応は、酵素/基質複合体の生成量の測定が困難であることから、正確な動力的解析が行われてこなかったようである。研究代表者らは、水晶発振子マイクロバランス法(QCM法)により、解析が可能であることを実証した。すなわち、DNAポリメラーゼによるDNA鎖の伸長反応、DNAリガーゼ、ヌクレアーゼによる結合反応、制限酵素によるDNA鎖の切断反応の解析を行い、酵素の結合過

程、反応過程、酵素の脱離過程を重量変化から解析出来ることを示した。糖鎖についても、同様な解析が可能であることを実証している。

・タンパク質の加水分解反応の解析

タンパク質の加水分解反応においてはコンフォメーションの影響があり、ペプチド結合の解析に終わっているものが多い。ミオグロビンを用いて、pHの変化に伴い加水分解の反応速度が変化することを観測し、コンフォメーションの変化が反応に与える影響を確認している。

これらの解析によって、酵素反応の速度論的な解析が可能になり、使い方を工夫することによって反応完結に必要な時間、副反応抑制などの条件設定が容易になる可能性があり、遺伝子操作のみでなく各種の生体内反応などの研究の精度や効率があがっていくことが期待出来る。さらに、従来解析に用いられてきた Michaelis-Menten 式の矛盾も明らかにしており、酵素反応の新しい解析法についての可能性を提示したといえる。

2) 膜タンパク質の固定化とシグナル分子の結合

膜タンパク質 KcsA を発振子上に固定化し、リン脂質膜を導入して生体膜上のタンパク質のモデルを作成し、Agitoxin2チャンネルブロッカーの結合過程の動的解析に成功している。今後、膜レセプターへの種々の薬物の結合挙動解析への応用の可能性を示したもので、今後の展開に期待したい。

3) リボソームでの翻訳過程の定量化

mRNAからタンパク質への翻訳過程のうち、RNAへのリボソームの結合挙動をQCM法によって解析し、30sリボソームが先に結合し開始コドンを検出した後50sリボソームが結合するという従来の考え方を確認すると共に、解離していない70sリボソームが直接RNAに結合していると考えられるケースもあることを示している。これまで知られていなかったルートがある可能性もあり、今後さらに解析が進むことを望みたい。

4) 生体分子の粘弾性と水和の評価

重量によって水晶発振子の発振周波数が変化することから、重量変化を発振周波数の変化として検出していたのに対して、粘性体や水和状態にあると振動エネルギーが散逸して観測されるコンダクタンスのピーク幅がブロードのなることから、分子の堅さや水和状態が予測出来ることが分かり、タンパク質や分子のコンフォメーション変化を追跡出来る可能性を示したことは興味深い。

5) 装置の開発

QCM装置は、研究期間に大きく進歩した。バッチ式の測定装置では、セル容量を小さくしサンプルの必要量を少なくしつつ、マルチセル化も4セルまで達成した。しかし、セル間の干渉などの問題も発生したため、それ以上のマルチ化は行っていない。従来から使用している水晶発振子は、量産品であるため空気中の使用に最適化されており、カット角が固定されている。そのため水中では温度の影響を受けやすい。従って、温度制御も重要なポイントであり、温度制御の精密化、回路雑音の遮断などでS/Nを上げ、相対的に感度を上げることに成功している。加えて、セル容量を10 μ Lに微小化してフローセル化することによって、ノイズレベルを1/20とし、シグナル分子の結合が測定出来るようになったものである。さらに、水晶発振子のカット角を変更して水中での温度依存性を1/100にすることに成功し、温度制御装置の簡略化が可能となったことから、ポータブルの測定器を開発し実証段階に入っている。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文 (原著)		口頭 (ポスター)		講演		その他 (著作など)		特許出願	
国際	国内	国際	国内	国際	国内	国際	国内	国際	国内
44	25	55	240	22	34	0	42	0	0

研究代表者が開発・改良したQCM装置による多くの反応や分子認識のダイナミックな測定成果は、国内を中心に海外でも十分な発表がなされている。DNAのポリメラーゼ、リガーゼ、ヌクレアーゼ、制限酵素などによる酵素反応や、リボソーム上での mRNA 翻訳過程の解析、タンパク質の酵素反応などの反応の追跡と結果の解析、細胞膜タンパクによる分子認識などの成果を得ている。

主要な学術雑誌(J. Am. Chem. Socなど)に、QCM法によって糖やDNAの酵素による加水分解反応の解析が収載されており、従来では解析が難しかった動力学的な解析がQCM法によって可能になることを示した。また、インピーダンスの測定によって、粘弾性の測定やタンパク分子のコンフォメーション変化等を検出できることを見いだして、センサとしての可能性を高めている。

研究期間中の特許出願件数は0であった。特許出願の対象となるのは装置に関する部分のみであるが、研究開始前に基本部分の特許を取得しており、それ以降もマルチセル化、フローセル化、回路のノイズを下げることによる高感度化などの改良がなされているが、QCM装置そのものは製品化されているため、改良はノウハウとして蓄積する方針と聞いている。装置の高感度化などは、特許化が難しい部分もあるものと理解出来るが、セルの温度補償を簡略化する画期的な方法なども開発されており、特許化も進められていくものと期待している。また、その技術により装置の簡便化が進み、ポータブルな測定器の試作が終わり、実証段階に入っている。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

ng 単位の重量変化を測定することにより、これまで定量的な解析が難しかった、生体内反応の解析に、新しい手法を具体的な測定結果を持って提示したことの意義は大きい。これにより、従来から提唱されていた理論式の具体的な解釈が可能になったものもあり、新しい解釈を必要とするものも出てくると期待される。特に、これまでその量が確認出来なかったため仮定の量としておかれていた、酵素-基質の中間体の量が測定出来ているであろうことは、反応解析において非常に画期的なことであり、今後生体反応に留まらず、多方面で利用される可能性のある技術を開発したといえる。装置の簡便化は、その応用範囲をさらに広げるものである。また、レセプターへの低分子量のシグナル分子の結合が測定可能となったことは、創薬分野への貢献を期待できるものである。

SPR などの類似用途に用いられる測定法との比較において、優位性や適用範囲などを明確にしておけば、より使いやすい測定法としての評価が確立できるように思われる。

4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

- 装置の開発においては、高感度化が重要な課題であったが、電子回路の専門家を雇用することによって、回路の雑音を低下させ、S/N比の向上により感度を一桁上げることに成功した。これが、その後の研究の進展に大きく寄与している。
- 水晶発振子のカット角を変更することによって、周波数の温度依存性を少なくする可能性があることは認識していたが、研究最終年度になって適切なカット角の水晶発振子の作成に成功し、温度補償を簡便化したポータブル対応の機器を開発し、実証段階に移っている。これにより、確実に用途が広がっていくものと思われる。