

「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」
平成13年度採択研究代表者

岡畑 恵雄

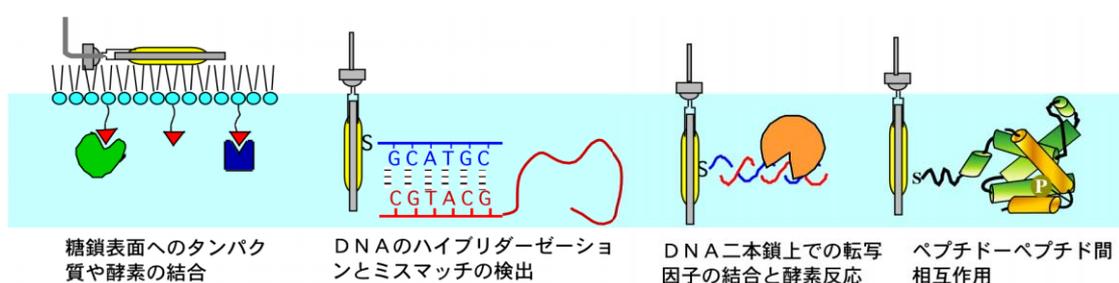
(東京工業大学大学院生命理工学研究科 教授)

「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」

1. 研究実施の概要

本プロジェクトでは、A) より複雑な生体内での分子間相互作用の解明、B) そのための多機能でかつ高感度な水晶発振子マイクロバランス法の開発、を大きな柱として研究を進めていく。

申請者らはこれまでに水晶発振子マイクロバランス法を用いて、以下に示すような種々の生体分子間相互作用を定量的に評価してきた。例えば、水晶発振子基板上に糖脂質単分子膜を固定化すれば、レクチンの結合が検出できる。DNA一本鎖を固定化すれば相補的な二本鎖形成（ハイブリダイゼーション）、二本鎖DNAを固定化すれば塩基配列特異的に結合するタンパク質の結合が追跡できる。昨年度は、DNA二本鎖を水晶発振子上に固定化し、DNAポリメラーゼを加えたときの酵素のDNA鎖への結合課程、テンプレート鎖に沿った伸長反応、重合が終わった後の酵素の脱離課程の3段階を連続的に追跡することに成功している。



これらの成果を基にして、今年度は以下の成果を上げた。

- 1) DNA鎖上での酵素反応を重さで測るという観点から、EcoRV制限酵素の反応解析を行い、酵素のDNA鎖上への塩基配列特異的な結合、DNAの切断の2過程を連続的に動力学的に解析することが出来た。
- 2) 昨年度はアミロペクチン固定化水晶発振子を用いてグルコアミラーゼによる糖鎖加水分解反応を解析したが、今年度は水晶発振子上にデキストランを固定化し、デキ

ストランスクララーゼによる糖鎖伸長反応について検討し、水晶発振子は糖鎖伸長反応の解析にも有用であることを明らかにした。

- 3) 複雑な生体分子間相互作用の定量化を目指して、リボソームの翻訳過程の速度論的研究をはじめた。SD配列を持つmRNAを固定化した水晶発振子に30S, 50S, 70Sリボソームを加えたときの振動数変化から、各リボソームのmRNAへの結合過程を観察した。
- 4) 現在使用している水晶発振子装置 Affinix Q のさらなる高感度化を目指して装置の改良を行い、フローセル化と発振回路の改良により20倍の高感度化を達成した。その結果、レクチン固定化発振子への糖一分子の結合を解析することが出来るようになった。

2. 研究実施内容

2-1) DNA固定化水晶発振子上でのEcoRV制限酵素の反応解析

a) 研究目的

DNAの部位特異的に切断する制限酵素の反応はこれまでに、ゲル電気泳動などの方法で解析されてきたが、酵素のDNA鎖への結合、DNA鎖の切断反応は個別にかなりの手間をかけて行われてきた。DNA固定化水晶発振子を用いることにより、DNA鎖への酵素の結合と切断を重量変化として経時的に連続して追跡できると考えられる。

b) 実験方法

27 MHz水晶発振子の金電極上にビオチンアビジン法を用いてEcoRVの認識サイトを分子の中程に持つ55 base pairのDNA二本鎖を固定化した。DNAの固定化量は酵素の結合に影響を与えないように基板表面の約7%に抑えた。25 °C, pH 7.5 (10 mM Tris buffer), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂の条件下でEcoRVを加えたときの振動数変化を図1に示した。

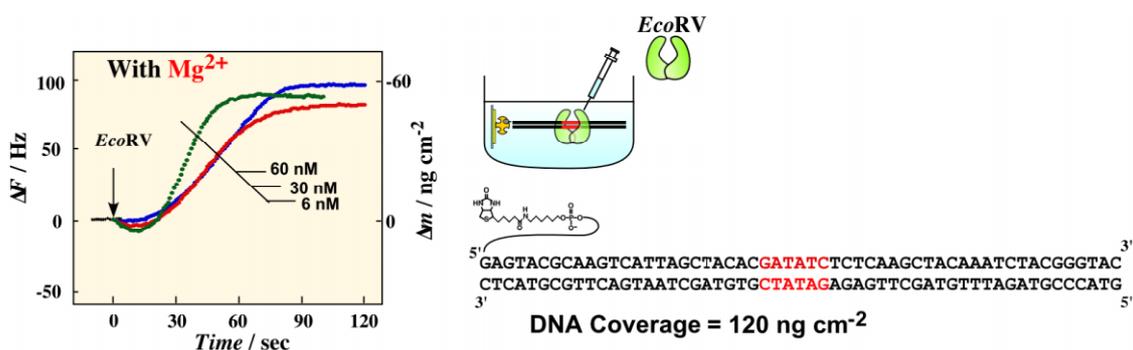
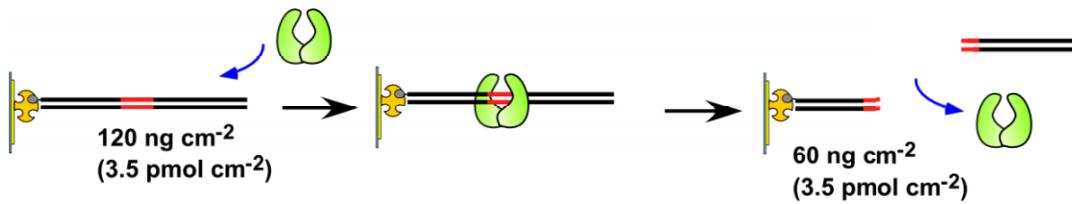


図1 DNA二本鎖固定化水晶発振子に制限酵素EcoRVを加えたときの振動数変化 (25°C, pH 7.5, 10 mM Tris buffer, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂)

c) 結果と考察

図1の酵素を加えた直後の振動数の減少(重量増加)は酵素のDNA鎖への結合課程を



表している。それに続く振動数の上昇（重量減少）はDNA鎖の加水分解反応を反映している。最初のDNA鎖の固定化量は 129 ng cm^{-2} (3.5 pmol cm^{-2})であり、結果的に 60 ng cm^{-2} (3.5 pmol cm^{-2})の重量減少は固定化したDNA鎖のすべてが切断部位で切断されていることを反映している。振動数変化は、酵素の結合、加水分解反応、酵素の脱離という連続的に進行する反応を重量変化として表している。酵素-基質複合体の生成量は式(1)で表され、加水分解による生成物量は式(2)で表される。

$$[ES] = [ES]_{\max} (1 - e^{-t/\tau}) + [P] (1 - e^{-t/\tau}) \quad (1)$$

$$[P] = \frac{k_{\text{cat}}}{D_p} \int [ES] dt \quad (2)$$

式(1)と(2)の連立方程式を解くことによって実際の反応の経時変化をカーブフィッティングできる。図2には、式(1)と(2)の経時変化と(赤と青色の実線)、実際の反応の経時変化(黒線)と、それにフィットするように酵素の糖鎖への結合速度定数(k_1)、解離速度定数(k_{-1})、結合定数(K_a)、ES複体内での加水分解速度定数(k_{cat})の各パラメータを算出して求めた曲線を緑色で示した。計算式は実際の経時変化によくフィットしたので、これらの酵素反応の各反応パラメータを表1にまとめた。

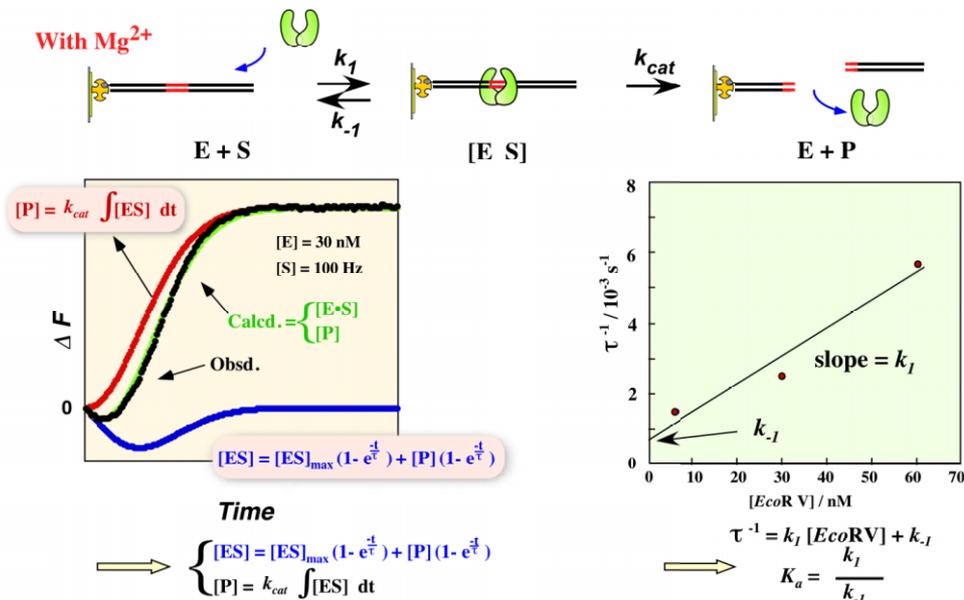
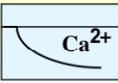
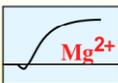


図2 EcoRVによるDNA切断の振動数変化のカーブフィッティングとその解析

表 1 に示すように、水晶発振子法を用いると、酵素の糖鎖への結合と脱離の速度 (k_1 と k_{-1}) および解離定数 ($K_a = k_1/k_{-1}$)、さらには切断速度定数 (k_{cat}) が同時に求まる。EcoRV は Mg^{2+} イオン存在下では切断反応まで触媒するが、 Ca^{2+} イオン存在下では酵素の結合のみが起こることが知られている。 Ca^{2+} イオン存在下で酵素の結合過程だけを追跡したときの k_1 、 k_{-1} および K_a の値は Mg^{2+} イオン存在下の加水分解過程までを含めた求めた値と良い一致を示した。これまではゲル電気泳動などで DNA 鎖に放射性ラベルを施して観察していたのに比べ遙かに定量的に動力学定数が求まることがわかった。

表 1 EcoRV による DNA 鎖切断の動力学定数

Method		k_1 / $10^3 M^{-1} s^{-1}$	k_{-1} / $10^{-3} s^{-1}$	K_a / $10^6 M^{-1}$	k_{cat} / s^{-1}
QCM		760	1.1	660	-
		79	0.71	110	0.44

2-2) 水晶発振子上での糖鎖伸長反応の解析

a) 研究目的

昨年度の研究で、水晶発振子上にアミロペクチンを固定化し、糖加水分解酵素であるグルコアミラーゼを添加すると、発振子上の糖鎖に結合して加水分解する過程が連続的に振動数増加（重量減少）として追跡することが出来た。今年度は、糖加水分解の逆の糖鎖伸長反応について検討した。

b) 結果と考察

デキストラン固定化基板にデキストランスクラーゼを添加すると、デキストランへの酵素の結合に伴う微少の重量増加（振動数の減少）が観察された。平衡に達した後にモノマー基質であるスクロースを添加すると大きな重量増加が認められ、重合の進行を観察することができた。DNA 鎖の切断反応と同じように、カーブフィッティングを行う

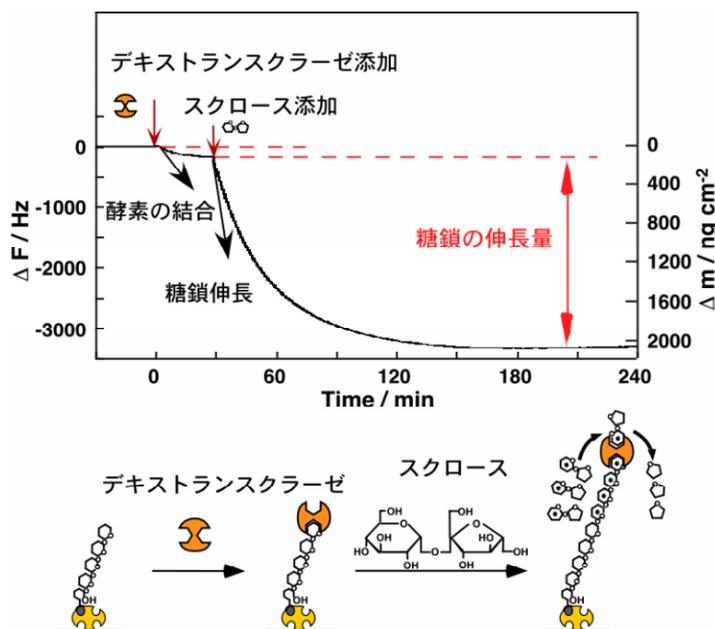


図 3 デキストラン固定化発振子上でのデキストランスクラーゼ添加による糖鎖伸長反応の観察 ([Dextranase]=18 nM, 10 mM Acetate Buffer (pH: 5.2), 25°C)

ことにより、動力的解析を行ったところ、プライマーであるデキストランへの酵素の解離定数は $K_d = 2.7 \text{ mM}$ 、スクロースに対する K_m 値は 0.11 mM 、伸長の k_{cat} 値は 51 s^{-1} と求められた。

酵素を基板に固定化して、同様な実験を行い、その結果をまとめて図4に示した。酵素を固定してプライマーとモノマー基質を添加した系の場合にも動力的パラメータ

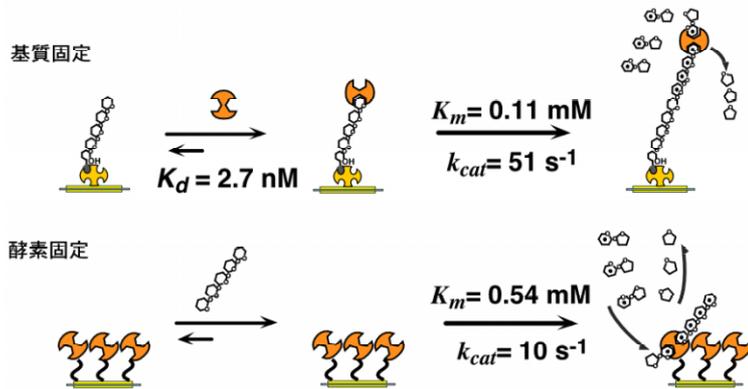


図4 発振子上に基質を固定化したときと酵素を固定化したときの、デキストランスクラーゼによる糖鎖伸長反応の動力学定数

(K_m 値は 0.54 mM , k_{cat} 値は 10 s^{-1})の大きな差異はなかったことから、いずれの方法での酵素反応が追跡できることもわかった。

2-3) 水晶発振子上を用いたリボソーム上での翻訳過程の解析

a) 研究目的

生体内で起こる複雑な分子認識及び反応過程を解析することを目的にしてリボソームでの翻訳過程を水晶発振子上で重量変化として定量化することを試みた。これまでにわかっているリボソーム翻訳開始過程のメカニズムを図5にまとめた。

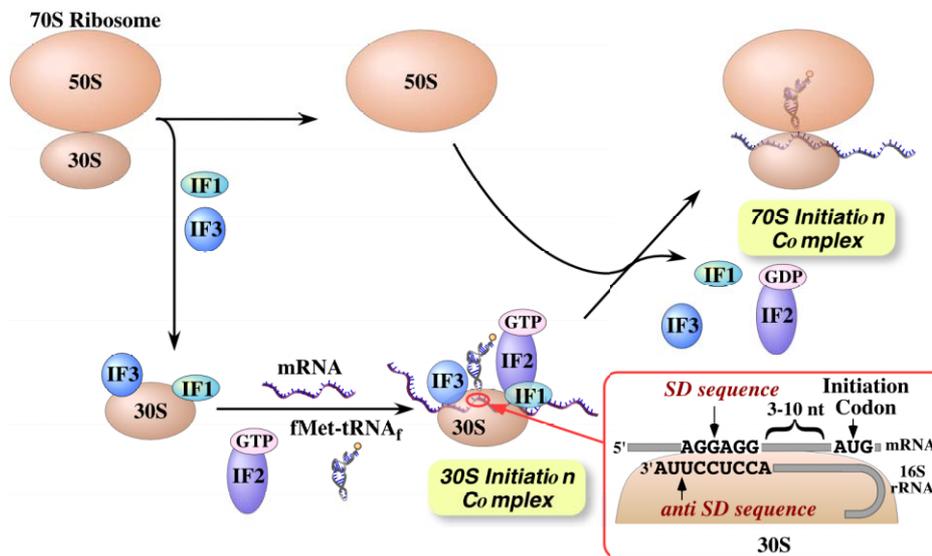


図5 リボソーム内での翻訳過程開始過程での推測されているメカニズム

リボソーム(70S)は開始因子IF1やIF3の働きにより30Sと50Sに解離して、30SがmRNAのSD配列を認識して結合し、メチオニン化t-RNAがIF2と共にmRNA上に結合し

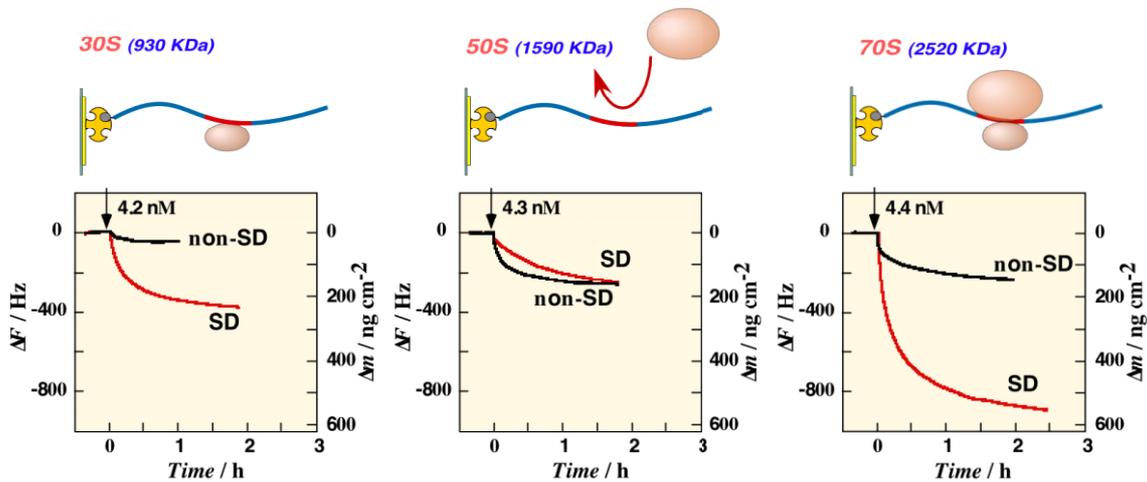


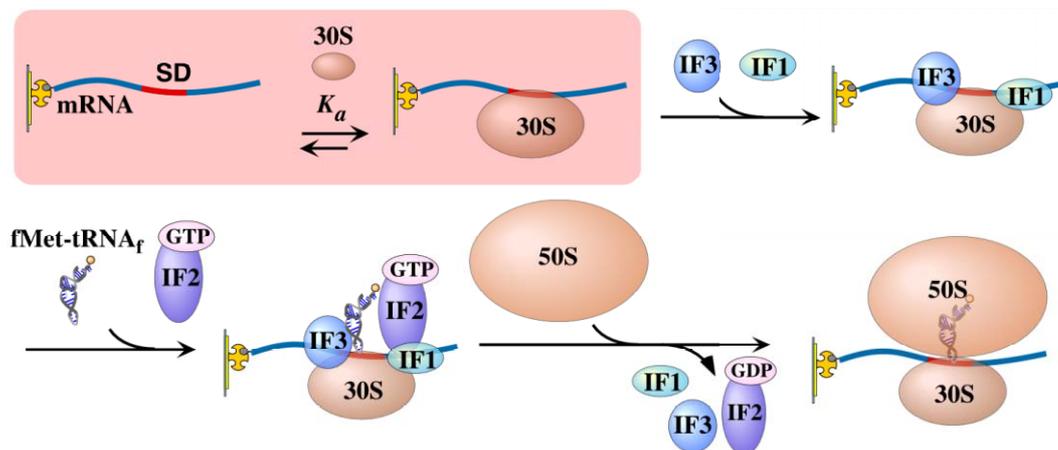
図6 mRNA固定化水晶発振子へのリボソームの結合過程の観察 (10 mM HEPES-KOH (pH 7.3), 5 mM Mg(OAc)₂, 0.5 mM CaCl₂, 25 °C)

て、さらに50Sリボソームが結合するときにIF1やIF3の開始因子が離れ、翻訳が開始されると考えられている。しかし、各過程を定量的に評価した研究例はない。本研究では、mRNAを水晶発振子上に固定化し、30S、50S、70Sリボソームの結合過程について観察した。

b) 結果と考察

mRNAを固定化した水晶発振子上への30S、50S、70Sリボソームの結合過程を図6にまとめた。30Sと70SリボソームはSD配列を持つmRNAに特異的に結合してSD配列を持たないnon-SD鎖にはほとんど結合しなかった。又、50SリボソームはSD配列にもnon-SD配列にも余り結合せず、SD配列を認識しているのは30Sであることがわかった。重量変化を解析すると、30Sと70SリボソームはSD配列を持つmRNAに1:1で結合していることがわかった。振動数の経時変化からリボソームの結合過程の動力学定数を求めたところ、30Sと70Sの結合速度はほとんど同じであり、70SでのSD配列の認識部位は30Sと同じであることがわかった。

今後は、30Sや70Sリボソームが結合した後にIF1やIF3を加えたときの振動数変化から各会誌因子がどのようにして結合するのかについて検討する予定である。



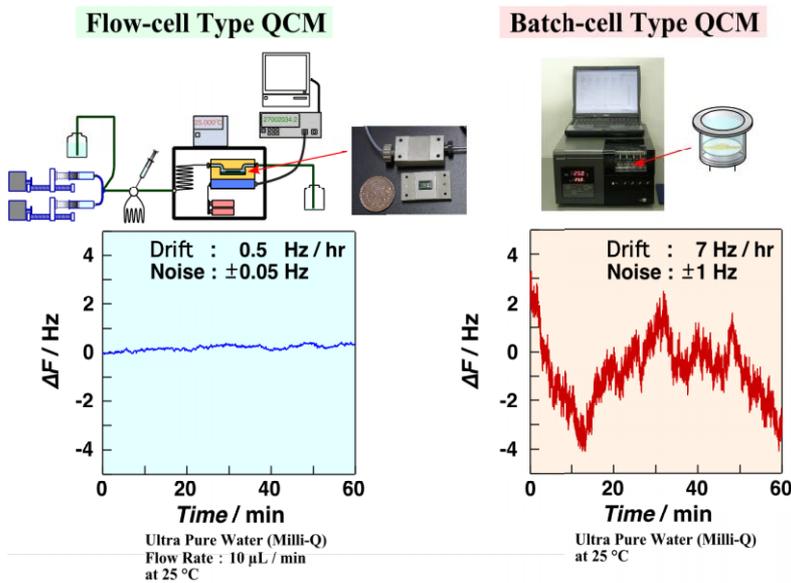


図6 従来の27 Mhz QCMを用いたAffinix Q装置(右)と今回新しく開発したフロー型水晶発振子装置(左)における振動数変化のノイズ比較。左の装置では、発振回路のノイズレベルを1/20にし、温度制御も $\pm 0.01^\circ\text{C}$ を実現した。

2-4) 高感度化フロー型水晶発振子装置の開発

a) 研究目的

現在使用しているAffinix Q水晶発振子装置では、 ± 1 Hzのノイズと ± 10 Hz/hの振動数のドリフトがあり、振動数変化が10 Hz以下の測定は困難である。例えば、図7右に示すように、従来の装置では縦軸を拡大するとノイズが目立つようになる。しかし、発振回路に光回路を導入し、外部からのノイズの侵入を防ぎ、セル付近の温度制御を $\pm 0.01^\circ\text{C}$ に向上させた結果、図6左に示すようにノイズレベルが1/20に減少した。この装置を用いれば、薬物などの低分子のレセプター蛋白質への結合過程が追跡できることが期待される。

b) 結果と考察

図7に、発振子上に固定化したCon Aレクチンへのマンノースの結合を追跡した結果を示した。Con Aには認識されないガラクトースでは結合がみられずに、マンノースの結合が1 Hzの精度で追跡できることがわかった。これはノイズレベルを ± 0.05 Hz以下に出来たためである。

加えるマンノース濃度を変化させると、結合量が変わり、Langmuir型の飽和吸着を示した

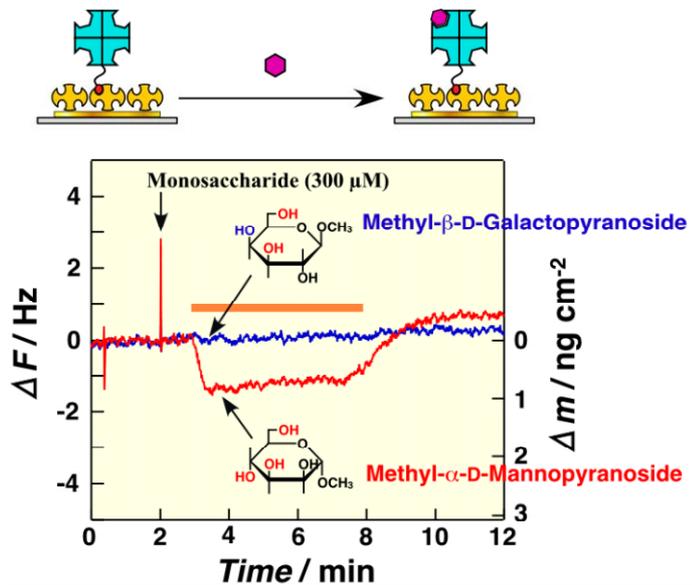


図7 高感度フロー型装置を用いたレクチンへのマンノース担当の結合挙動の観察 (10 mM HEPES (pH 7.5), 0.01 mM MnCl_2 , 0.1 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl; Flow Rate 100 μ L/min at 25 °C)

(図8)。逆数プロットから求めた飽和結合量は一分子のレクチンに対して4個のマンノースが結合していることを示した。結合定数も $8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ と求められ、従来の均一溶液中で求めた値とも一致した。

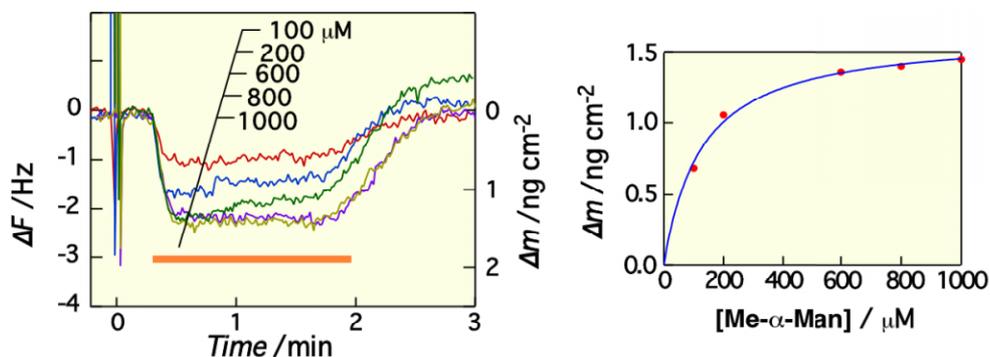


図8 Con Aレクチンへのマンノースの濃度依存的結合

この事は、高感度フロー型の装置を用いれば、基板の上に固定化したレセプター分子への低分子薬物の結合挙動を解析できることを示しており、薬物のスクリーニングに利用可能であることを示している。

3. 研究実施体制

(1) 岡畑グループ (リーダー: 岡畑 恵雄)

氏名	所属	役職	担当する研究項目
岡畑 恵雄	東工大・生命理工	教授	総括
森 俊明	東工大・生命理工	助教授	DNA-タンパク質間相互作用の解明
蒲池 利章	東工大・生命理工	講師	タンパク質の発現とタンパク質間相互作用の解明
川崎 剛美	東工大・生命理工	助手	複雑系タンパク質間相互作用の解明と構築
古澤 宏幸	東工大・生命理工	助手	水晶発振子の振幅変化の制御
松野 寿生	東工大VBL	非常勤研究員	タンパク質の調製
重松 秀樹	科学技術振興事業団		レセプタータンパク質の精製と分子認識
仁平 高則	科学技術振興事業団		マルチセンサーの設計と機能化
包 山虎	科学技術振興事業団		センサーのフローセル化

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- T. Ozeki, H. Furusawa, and Y. Okahata, In vitro selection of four way junction DNA, *Nucleic Acids Res. Suppl.*, No. 3, 257-258 (2003).
- H. Furusawa, A. Murakawa, S. Fukusho, and Y. Okahata, In vitro Selection of N Peptide-Binding RNA on a Quartz-crystal Microbalance to Study a Sequence-Specific Interaction of Peptide and Loop RNA, *ChemBioChem*, 217-220 (2003).
- Y. Inoue, T. Fukusihima, T. Hayakawa, H. Takeuchi, H. Kaminishi, K. Miyazaki, and Y. Okahata, Antibacterial characteristics of newly developed amphiphilic lipids and DNA-lipid complexes against bacteria, *J. Biomed. Mater. Res.*, 65A, 203-208 (2003).
- T. Ozeki, H. Furusawa, and Y. Okahata, in vitro Selection of Four Way Junction DNA on a QCM, *Biomolecular Chemistry*, p. 22-23, Proceedings of the ISBC 2003, Awaji, Japan, Dec. 2-5, 2003, Maruzen Co., Ltd (2003).
- Y. Hoshino, T. Kawasaki, and Y. Okahata, Control of Lybozyme Activity by Weak ultrasound Irradiation, *Biomolecular Chemistry*, p. 246-247, Proceedings of the ISBC 2003, Awaji, Japan, Dec. 2-5, 2003, Maruzen Co., Ltd (2003).
- H. Shigematsu, K. Tsumoto, I. Kumagai, and Y. Okahata, Interaction Analyses of Erythropoietin Receptor and EMPI Ligand on a Quarts-Crystal Microbalance, *Biomolecular Chemistry*, p. 238-239, Proceedings of the ISBC 2003, Awaji, Japan, Dec. 2-5, 2003, Maruzen Co., Ltd (2003).
- H. Furusawa, H. Ishii, M. ishii, and Y. Okahata, Observation of a Specific Interaction between One Residue-Replaced Leucine-Zipper Peptides, *Biomolecular Chemistry*, p. 232-233, Proceedings of the ISBC 2003, Awaji, Japan, Dec. 2-5, 2003, Maruzen Co., Ltd (2003).
- T. Mori, H. Nishino, T. Nihira, and Y. Okahata, Direct Monitoring of Glucan Hydrolysis by Glucoamylase on a Quartz-Crystal Microbalance, *Biomolecular Chemistry*, p.110-111, Proceedings of the ISBC 2003, Awaji, Japan, Dec. 2-5, 2003, Maruzen Co., Ltd (2003).
- 森 俊明、岡畑 恵雄, 超臨界流体による酵素反応の制御, *化学工業*, 54, 93-97 (2003).
- 川崎 剛美、岡畑 恵雄, サケ精子のDNAから作るバイオフィルム, *未来材料*, 3, 46-51 (2003).
- 岡畑 恵雄, DNAフィルム, *化学装置*, 4月号, 60-62 (2003).
- 岡畑 恵雄, 味覚や嗅覚を重さで測る, *ぶんせき*, No. 10, 606-609 (2003).
- 岡畑 恵雄, DNA素材—電子材料などへの応用, *テクノカレント*, No. 346, (5/15),

p. 2-11 (2003).

- 岡畑 恵雄, 進むバイオとナノテクの融合, OHM, 7月号, 12-13 (2003).
- 岡畑 恵雄、古澤 宏幸, 水晶発振子マイクロバランス法を用いるバイオセンサ, 電気学会論文誌E、123, No. 11, 459-464 (2003).
- 岡畑 恵雄, 3章 生体分子の超分子化, バイオナノテクノロジー、堀池靖浩、片岡一則編、p. 35-56, オーム社 (2003).
- 岡畑 恵雄, 第4章 脂質膜被覆水晶振動子センサー, 「アロマサイエンスシリーズ 21 匂いの特性と分析・評価」 p. 248-254, 川崎通昭・中島基貴・外池光雄編、フレグランスジャーナル社 (2003).
- 古澤 宏幸、岡畑 恵雄, 水晶発振子を用いるバイオセンサ, 食品産業のための高機能バイオセンサー、(社) 農林水産先端技術産業振興センター編、化学工業日報社, p. 18-34 (2003).

(2) 特許出願

なし