

「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 フロンティア創造共同研究センター・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) 生体内での複雑で動的な分子間相互作用や反応の定量的解析、(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2本の柱として研究を進めている。

今年度は以下の成果を上げた。

1) (A) 動的な生体内反応の解析として、糖鎖上で進行する酵素反応を解析する手法を用いて酵素に変異を導入することにより、振動数の経時変化から、各官能基が基質の結合過程に働いているのか、反応過程に働いているのかを区別できるようになった。

2) 水晶発振子の金電極上に極微弱な (6 mW) なレーザー光を照射すると金電極上に附着していた分子がレーザー光により励起されて金基板から離れ、offにすると元に戻ることが振動数変化(重量変化)から経時的に追跡できた。この事を利用すれば金電極上に固定したタンパク質や生体分子をレーザー光のon/offにより急脱着を制御できることが予測できる。

3) (B) 装置の開発では、水晶発振子の発振回路を改良し温度制御を $\pm 0.001^{\circ}\text{C}$ で制御することにより、ノイズを減らして高感度化し、フローセルと組み合わせることにより、これまで不可能だった分子量200程度の低分子化合物のレセプターへの結合過程を追跡できるようになった。

2. 研究実施内容

(1) 点変位導入酵素 (イソマルトデキストラナーゼ) の解析

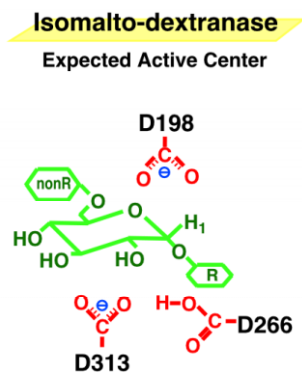
<目的>

糖加水分解酵素の活性の定量的評価法として、古くからMichaelis-Menten速度論が用いられ、反応生成物を定量することで、 K_m と k_{cat} 値を算出している。近年、アミノ酸残基の役割についてより詳細な知見を得るために変異型酵素を作製し、その活性評価やX線結晶構造解析などが盛んに検討されるようになってきているが、その際に酵素活性が活性が消失してしまった場合には、生成物が得られないのでMichaelis-Menten法では解析が出来な

い。そのために変異導入の影響についても議論できないことが多い。しかし、QCM法を用いれば、酵素・基質複合体の生成量を振動数変化として追跡できるので、酵素への点変異が基質結合過程か触媒過程に働いているのか、あるいは両者に有効なのか解析できると考えられる。

<結果と考察>

イソマルトデキストラナーゼのX線結晶構造解析はまだ行われていないので、基質の結合や触媒作用に関与する残基をガラクトース加水分解酵素（GH）ファミリー27に属する酵素のアミノ酸配列、結晶構造などをもとに分子モデリングを参考にして、活性中心近傍に存在すると推測される酸性アミノ酸残基Asp198, 266および313に注目し、これらの残基をアスパラギンに変換した変異型酵素をそれぞれ作製した。変異型酵素は、各種カラムクロマトを順次行なうことにより、電気泳動的に均一になるまで精製した。



水晶発振子基板上にデキストランを固定化し、イソマルトデキストラナーゼのワイル

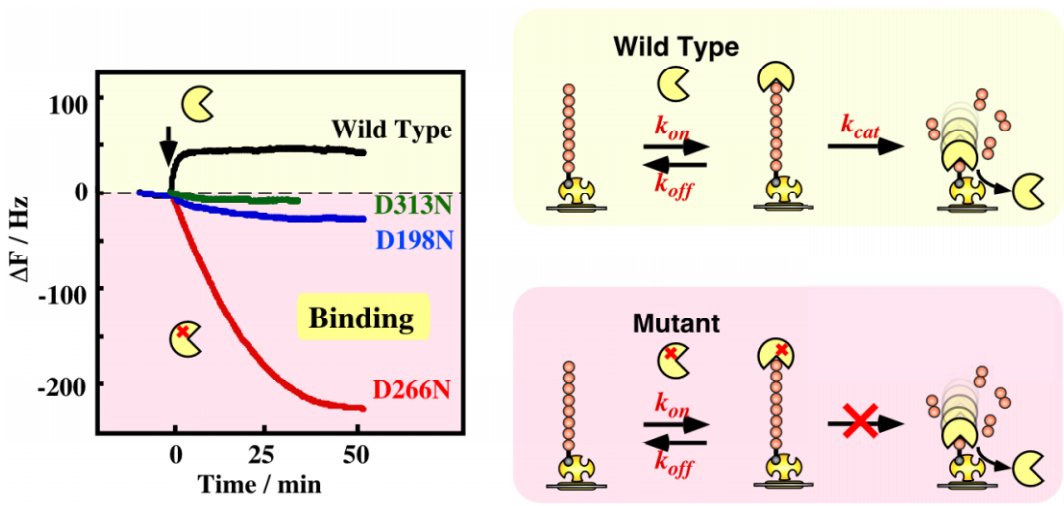


図1 デキストラン固定化水晶発振子にWild Typeあるいは点変異イソマルトデキストラナーゼを添加したときの典型的な振動数変化

ドタイプ（WT）、D313N, D198N, D266Nを加えたときの振動数変化を図1に示した。Wild Typeの時は酵素の添加と共に振動数が上昇（重量が減少）し、基質が分解していることがわかる。一方、変異を入れたいずれの酵素も振動数が減少（重

表1 点変異イソマルトデキストラナーゼによるデキストラン加水分解反応の動力学定数

	k_{on} / 10^3 M s^{-1}	k_{off} / 10^{-3} s^{-1}	K_d / 10^{-9} M	k_{cat} / s^{-1}
Wild Type	—	—	5.0	1.1
D266N	78	0.4	5.1	~0
D198N	167	39	234	~0
D313N	29	15	518	~0

量が増加)し、酵素が基質に結合するが加水分解反応が起こっていないことがわかる。振動数変化をカーブフィッティングして動力学解析したときの結果を表1にまとめた。

触媒活性(k_{cat} 値)についてはいずれのアスパラギン酸も重要な役割をしていることがわかった。D198およびD313に関しては、アスパラギンに変換することで、結合活性が低下していることが振動数変化や K_d からわかる。特にD313Nでは親和力の低下が顕著であり、本残基は触媒よりむしろ基質との結合に関与していることが推察される。反応速度パラメータと、詳細な研究がなされているファミリー13のTaka-アミラーゼの反応メカニズムをもとに、これら残基の役割を推察すると、D198は基質との結合とオキシカルベニウムカチオン中間体の安定化に、D266は一般酸塩基触媒に、D313は基質との結合・固定にそれぞれ寄与しているものと推察される。このようにQCMによる反応速度解析と部位特異的変異導入法を組み合わせることにより、アミノ酸残基の役割、さらには触媒反応メカニズムの解明につながるものと考えら、QCMは酵素の点変異解析に有効な武器になることが期待される。

(2) 微弱なレーザー照射による金基板上での分子の吸脱着の制御

<目的>

強力なレーザー光は基板上の分子を分解してしまうことはよく知られているが、極微弱な(数mW)レーザー照射は基板上の分子に摂動を与え、基板から損傷なく脱離させることができると考えられる。このことを利用すれば、水晶発振子上に吸着した生体分子の可逆的な脱着をレーザー光のon/offで制御でき、それを振動数変化として観察できることが期待できる。

<結果と考察>

図2に示すように、水晶発振子基板上に水中で6.3 mWの赤色(640 nm)のレーザー光を照射するとレーザー光のon/offに応答して50 Hzの振動数の上昇(重量の減少)が観察された。これは基板表面の水分子ほぼ一層分の重量の減少に相当する。この結果は、微弱なレーザー光の照射により基板上の分子の脱着を制御できることを表している。

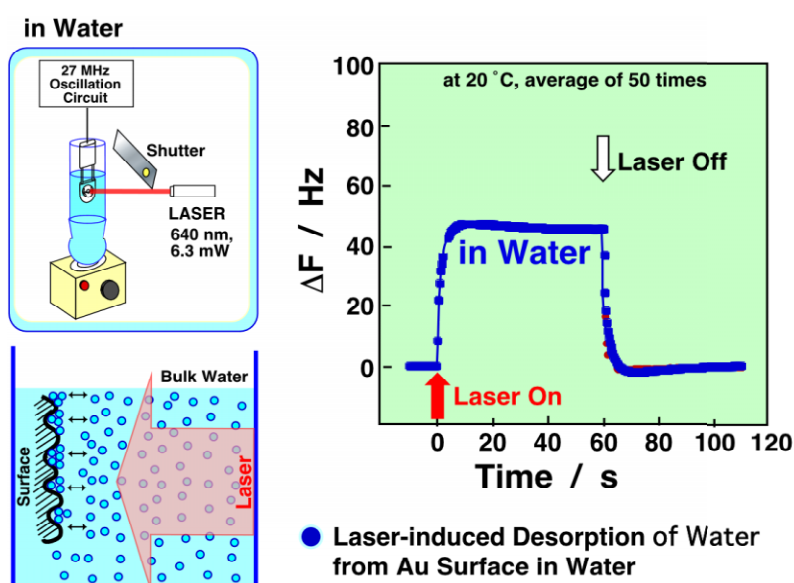


図2 水相中で27 MHz水晶発振子基板上に極微弱レーザー光(6.3 mW, 640 nm)を照射したときの振動数変化

このことを利用すれば、図3に示すようなDNAの一塩基多形を検出する事に利用できる。たとえば、ミスマッチのない塩基対の結合は強くレーザー光を照射しても二本鎖は解離しないが、ミスマッチのあるものはレーザー光の照射により容易に解離するので重量変化として検出できる。もちろんレーザーパワーを調節することにより複雑な制御が可能である。

レーザー光照射と水晶発振子を組み合わせることにより、複雑な分子間相互作用を段階的に制御できる可能性がある。

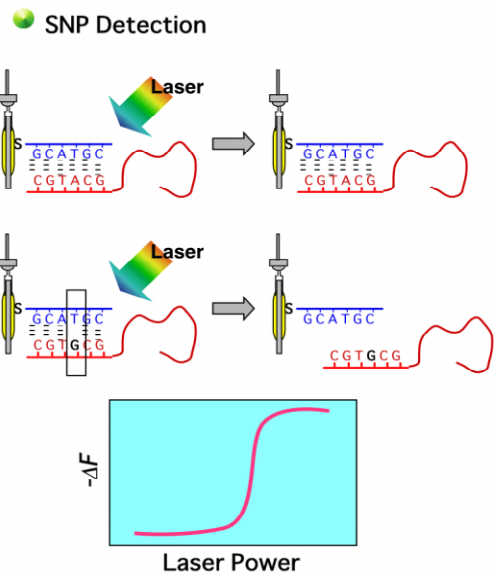


図3 レーザー光照射によるDNA一塩基多形の検出

(3) 高感度化フロー型水晶発振子装置の開発

<目的>

現在使用しているAffinix Q4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4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4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。

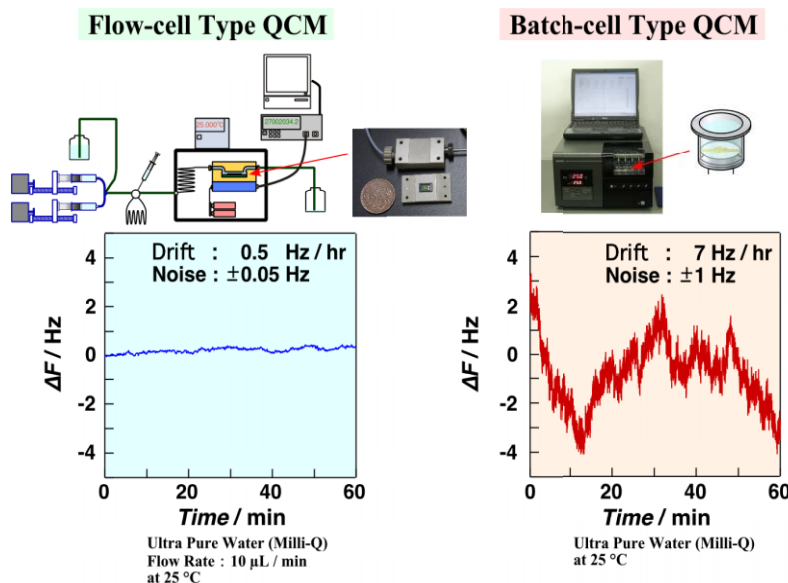


図4 従来の27 MhzQCMを用いたAffinix Q装置(右)と今回新しく開発したフロー型水晶発振子装置(左)における振動数変化のノイズ比較。左の装置では、発振回路のノイズレベルを $1/20$ にし、温度制御も $\pm 0.01^\circ\text{C}$ を実現した。

<結果と考察>

図6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、結合量に変化し、Langmuir型の飽和吸着を示した。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。

この事は、高感度フロー型の装置を用いれば、基板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。

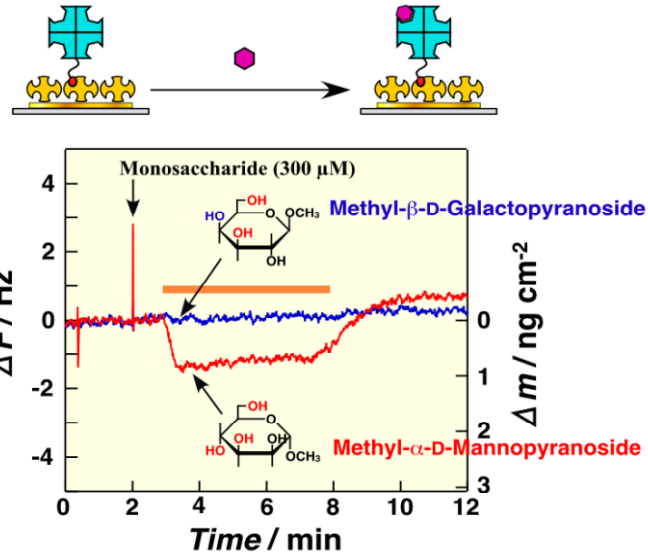


図6 高感度フロー型装置を用いたレクチンへのマンノース担当の結合挙動の観察 (10 mM HEPES (pH 7.5), 0.01 mM MnCl_2 , 0.1 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl; Flow Rate 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ at 25 °C)

3. 研究実施体制

岡畑グループ

- ① 研究分担グループ長：岡畑 恵雄（東京工業大学生命理工学研究科、教授）
- ② 研究項目：生体分子間相互作用の解明及び水晶発振子の多機能化

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文発表

- H. Nishino, T. Nihira, T. Mori, and Y. Okahata, Direct Monitoring of Enzymatic Glucan Hydrolyses on a 27-MHz Quartz-Crystal Microbalance, J. Am. Chem. Soc., 126, 2264-2265 (2004).
- H. Matsuno, H. Furusawa, and Y. Okahata, Kinetic Study of Phosphorylation-dependent Complex Formation between the Kinase-Inducible Domain (KID) of CREB and the KIX Domain of CBP on a Quartz Crystal Microbalance, Chem. Eur. J., 10, 6172-6178 (2004).
- H. Nishino, A. Murakawa, T. Mori, and Y. Okahata, Kinetic Studies of

Amylopectin Cleavage Reactions Catalyzed by Phosphorylase b using a 27 MHz Quartz Crystal Microbalance, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 14752-14757 (2004).

- T. Fukushima, T. Hayakawa, Y. Inoue, K. Miyazaki, and Y. Okahata, Interaction behavior and tensile strength of DNA-lipid films for the dental application, *Biomaterials*, 25, 5491-5497 (2004).
- T. Mori, Y. Sekine, K. Yamamoto, and Y. Okahata, Enzymatic preparation of biotinylated naturally-occurring sialylglycan and its molecular recognition on a quartz-crystal microbalance, *Chem. Commun.*, 2692-2693 (2004).