

「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)

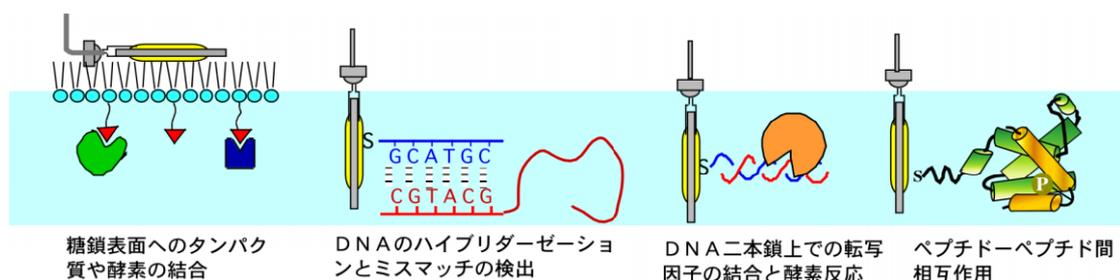
「生体分子間相互作用を連続的に検出するための
多機能型水晶発振子マルチセンサの設計と開発」

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た。

これらの成果を基にして、今年度は水晶発振子上に糖鎖を固定化し、糖加水分解酵素を加えたときの酵素反応を追跡した。その結果、酵素の糖鎖への結合課程、加水分解課程の動力学を求めることに成功した。従来の酵素反応はMichaelis-Menten式で解析してきた



が、酵素/基質複合体の生成量を求めることができないので、定常状態仮定法を用いて解析してきたが、水晶発振子法では酵素/基質複合体の生成量を追跡できるので、従来のMichaelis-Menten法ではえられなかった成果が得られ、これからの酵素反応動力学に新し

い方法論を導入できると考えられる。

また、水晶発振子表面に微弱なレーザー光を照射すると、結合している分子をレーザー光のon/offで可逆的に脱着できることがわかった。この方法を使えば、結合の弱いものから順番にレーザー光照射により脱離させ、重量変化として発振子で追跡できるシステムを構築できる。

2. 研究実施内容

2-1) 糖加水分解酵素反応の解析

a) 研究目的

糖関連酵素は、古くから食品産業などを中心としてその加水分解反応について検討されてきたが、反応を追跡する手段が発色法や液体クロマトグラフなど、限られてきたためにその反応メカニズムについてはよくわかっていない場合が多い。反応を解析する手段としてのMichaelis-Menten法では、酵素/基質複合体の生成量が追跡できないことが一つの理由である。水晶発振子マイクロバランス法を用いれば、酵素/基質複合体の生成量を直接重量変化として追跡できるので、これまでに求められなかった正確な動力学解析ができると考えられ、新しい手段になることが期待される。

b) 実験方法

27 MHz水晶発振子の金電極表面にビオチン-アビジン法を用いてアミロペクチン糖鎖を固定化した(図1)。アミロペクチンの固定化量は、酵素の結合に影響を与えないように基板面積の18% (0.46 pmol/0.049 cm²) に抑えた。25 ° C, 20 mM 酢酸緩衝液, pH 4.8, 100 mM NaClの条件で、0.1 unitのグルコアミラーゼを加えたときの振動数変化を図1に示した。

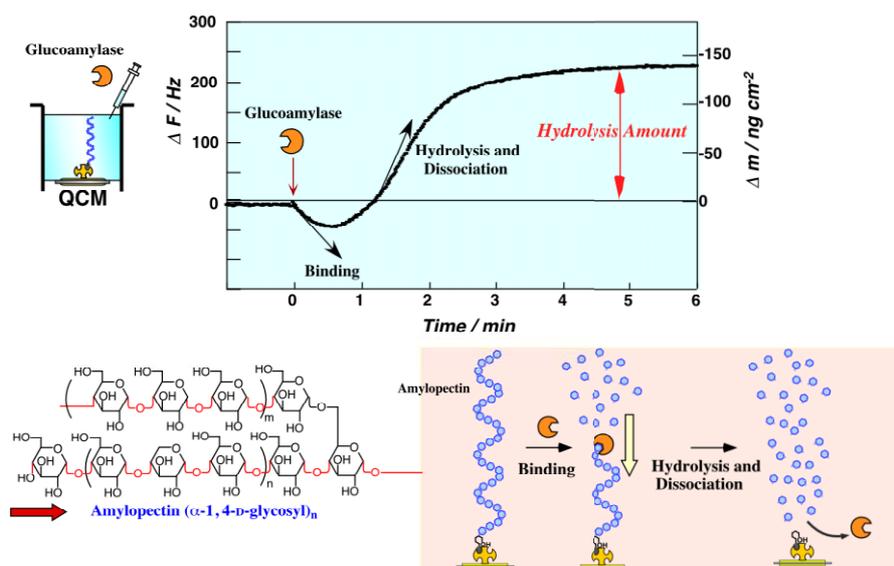


図1 アミロペクチンの固定化水晶発振子にグルコアミラーゼを添加したときの振動数変化 (25 ° C, 20 mM 酢酸緩衝液, pH 4.8, 100 mM NaCl, [amylopectin] = 0.46 pmol/0.049 cm², [glucoamilase] = 0.1 unit

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）は酵素の糖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）は糖鎖の加水分解反応を反映している。結果的に140 ng/cm²の重量減少は、固定化したアミロペクチンがほとんど加水分解した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。

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

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

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（青と黒色の実線）、実際の反応の経時変化（赤線）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_{on} ）、解離速度定数（ k_{off} ）、解離定数（ K_d ）、E S複体内での加水分解速度定数（ k_{cat} ）の各パラメーター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ーを表1にまとめた。

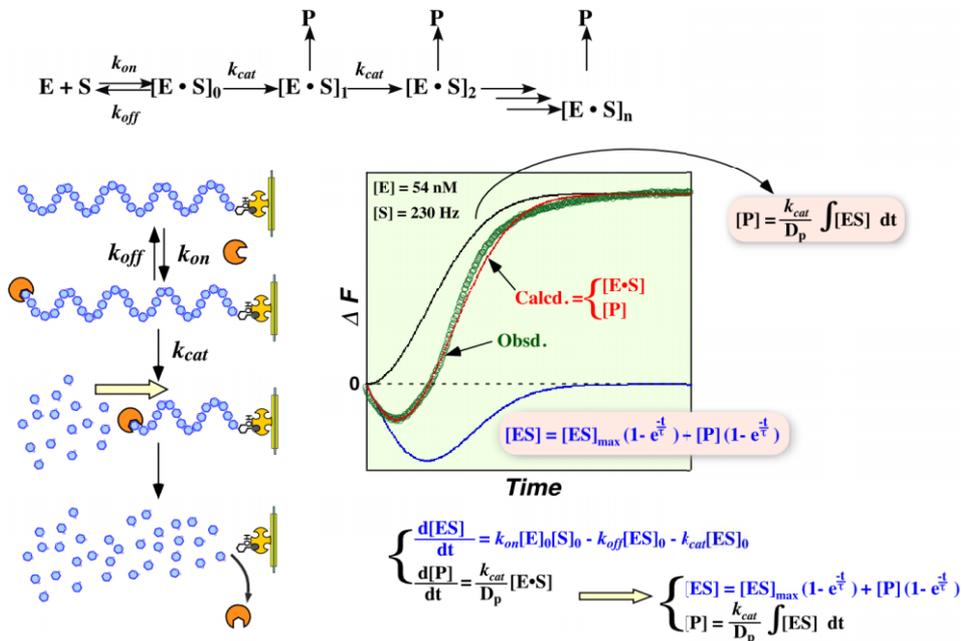
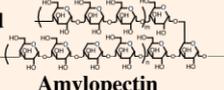
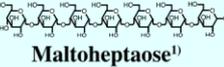


図2 酵素反応課程の反応解析とカーブフィッティング

表1 アミロペクチンのグルコアミラーゼによる加水分解の反応強力学定数

		k_{on} / $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	k_{off} / 10^{-3} s^{-1}	K_d / μM	K_m / μM	k_{cat} / s^{-1}
QCM Method 	 Amylopectin	23	0.093	4.0×10^{-3}	—	93
Michaelis-Menten Kinetics	 Maltose ¹⁾	—	—	—	120	54

1) H. -P. Fierobe et al. Biochemistry, 37, 3753 (1998)

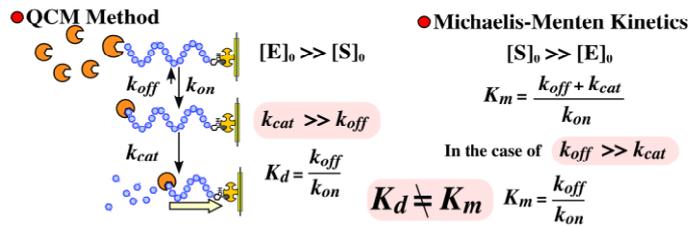


表1に示すように、水晶発振子法を用いると、酵素の糖鎖への結合と脱離の速度 (k_{on} と k_{off}) および解離定数 ($K_d = k_{off}/k_{on}$)、さらには加水分解定数 (k_{cat}) が同時に求まる。これまでは水溶液中でMichaelis-Menten式を用いて解析してきた。マルトペンタオースを基質にしたときの K_m 値と k_{cat} 値を表1にあわせて示した。Michaelis-Menten式から求めた $K_m = 1.2 \times 10^{-4} \text{ M}$ と水晶発振子で求めた $K_d = 4 \times 10^{-9} \text{ M}$ は 10^5 倍も異なった。これは、Michaelis-Menten式では、E S 複合体の生成量を追跡できないために、定常状態仮定法で K_m 値を求めている。表1の下に示すように、 $k_{off} > k_{cat}$ の時に K_m 値が解離定数として使えることがわかる。Michaelis-Menten式では k_{off} も k_{cat} も求めることができないのでこういう仮定をおいて K_m 値を算出している。水晶発振子法で求めた k_{off} と k_{cat} は各々、 $k_{off} = 9.3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ と $k_{cat} = 93 \text{ s}^{-1}$ であり、あきらかに $k_{off} < k_{cat}$ であり、Michaelis-Menten式が成り立たないことになる。すなわちアミロペクチンのグルコアミラーゼによる加水分解反応では、 $k_{off} > k_{cat}$ の仮定が成り立たなくてMichaelis-Menten式では解離定数が求められないことになる。ちなみに k_{cat} 値は両方で求めた値は 54 s^{-1} と 93 s^{-1} でほぼ一致した。

すなわち、水晶発振子法を用いることによりこれまでMichaelis-Menten法だけで解析してきた酵素反応の動力学に新しい方法論を展開できる可能性があり、一般的な方法論として展開していきたい。

2-2) 微弱なレーザー光照射による金基板上での分子の吸脱着の制御

a) 研究目的

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) レーザー光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。

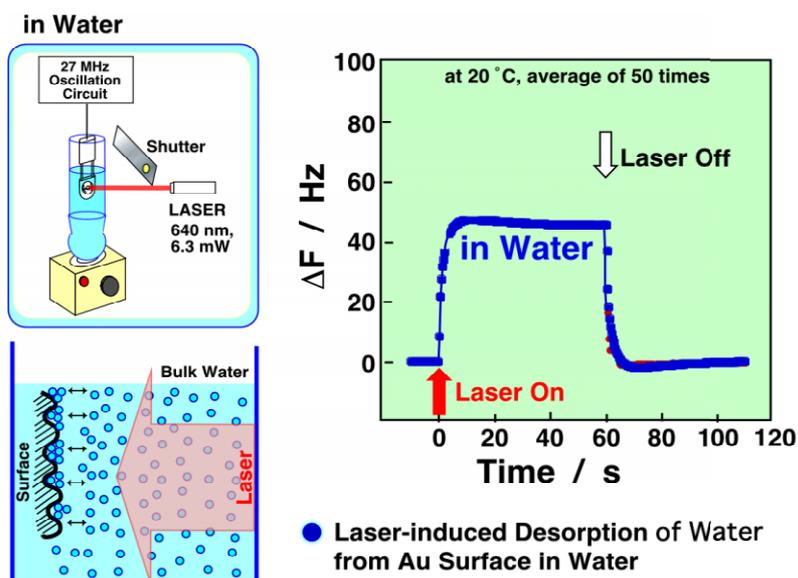


図3 水相中で27 MHz水晶発振子基板の上に極微弱レーザー光(6.3 mW, 640 nm)を照射したときの振動数変化

b) 結果と考察

図3に示すように、水晶発振子基板の上に水中で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に反応して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。

このことを利用すれば、図4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。

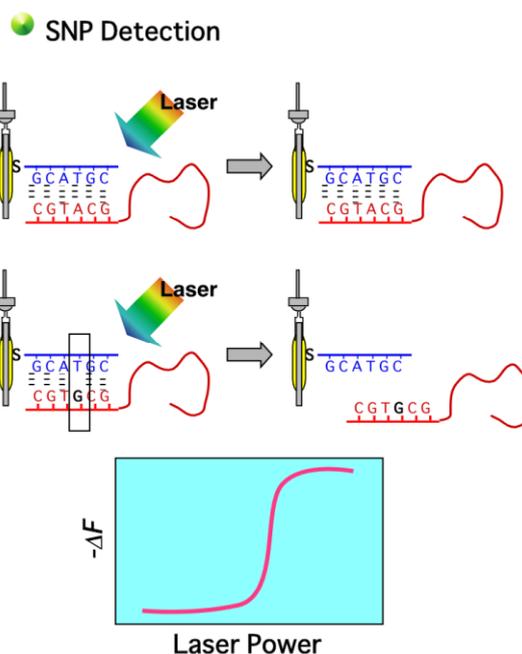


図4 レーザー光照射によるDNA一塩基多形の検出

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 (東京工業大学大学院 生命理工学研究科教授)
- ② 研究項目 : 1) DNA-タンパク質間相互作用の解明およびタンパク質の発現とタンパク質間相互作用の解明および複雑系タンパク質間相互作用の解明と構築
2) 水晶発振子と赤外赤外吸収スペクトル装置やAFM装置との多機能化

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

- S. Fukusho, H. Furusawa, and Y. Okahata, In vitro Selection and Evaluation of RNA Aptamers that recognize Arginine-rich motif Model Peptide on a Quartz-crystal Microbalance, Chem. Commun., 88-89 (2002).
- T. Mori, M. Li, A. Kobayashi, and Y. Okahata, Reversible Control of Enzymatic Transglycosylations in Supercritical Fluoroform using a Lipid-Coated b-D-Galactosidase, J. Am. Chem. Soc., 124, 1188-1189 (2002).
- Y. Hoshino, S. Tajima, H. Nakayama, and Y. Okahata, A RNA-aligned Film prepared from a RNA-Lipid Complex, Macromolecular rapid Commun., 23, 253-255 (2002).
- H. Furusawa, Y. Kitamura, N. Hagiwara, T. Turimoto, and Y. Okahata, Binding Kinetics of the Toroidal-Shaped PCNA to DNA Strands on a 27 MHz Quartz-Crystal Microbalance, ChemPhysChem., No.5, 446-448 (2002).
- H. Matsuno and Y. Okahata, Direct Monitoring of DNA Cleavages catalyzed by an ATP-dependent Deoxyribonuclease on a 27 MHz Quartz-Crystal Microbalance, Chem. Commun., 470-471 (2002).
- 渡辺 徹也、長谷川徹也、高橋 秀和、石橋 卓也、古澤 宏幸、岡畑 恵雄、杉林 堅次、水晶発振子を用いた薬物のin vitro皮膚透過迅速測定法に関する検討, 薬剤学, 62, 36-43 (2002).
- M. Tanaka, A. Mochizuki, T. Shiroya, T. Motomura, K. Shimomura, M. Ohnishi, and Y. Okahata, Study on kinetics of early stage protein adsorption on poly(2-methoxyethylacrylate) (PMEA) surface, Colloids and Surfaces A, 203, 195-204 (2002).
- H. Nishino, T. Mori, and Y. Okahata, Enzymatic silicone polymerization catalyzed by a lipid-coated lipase, Chem. Commun., 2684-2685 (2002).
- S. Takahashi, H. Matsuno, H. Furusawa, and Y. Okahata, Direct monitoring of EcoRII restriction enzyme reactions on a 27 MHz quartz-crystal microbalance, Nucleic Acids Res. Suppl., No 2, 71-72 (2002).

- A. Murakawa, S. Fukusho, H. Furusawa, and Y. Okahata, In vitro selection of N Peptide-binding RNA on a quartz-crystal microbalance, *Nucleic Acids Res. Suppl.*, No. 2, 202-208 (2002).
- H. Sota, H. Yoshimine, R. Whittier, M. Gotoh, Y. Shinohara, Y. Hasegawa, and Y. Okahata, A Versatile planar QCM-Based Sensor Design for nonlabeling Biomolecule Detection, *Anal. Chem.*, 74, 3592-3598 (2002).
- Y. Okahata, K. Tanaka, T. Kobayashi, and H. Nakayama, DNA-Lipid Complexes in Organic Solution, and DNA-aligned Cast and LB Films, *Supramolecular Chemistry of Biological Relevance*, ed. T. Kunitake, John Willey & Sons, Ltd (in press).
- 岡畑 恵雄、古澤 宏幸, 分子認識を重さで測る, 先端ウオティングシリーズ、丸善 (in press).
- 古澤 宏幸、岡畑 恵雄, 水晶発振子マイクロバランス法を用いたDNA上分子の解析, *化学と生物*, 40, 269-273 (2002).
- 岡畑 恵雄, 素描「次世代に残せるテーマ」, *高分子*, 51, 231 (2002).
- 森 俊明、岡畑 恵雄, ハイテクうらばなし テーラーメイドバイオ6 超臨界流体, *日刊工業新聞*, 6月18日号 (2002).
- 岡畑 恵雄、古澤 宏幸, 生体分子間相互作用を重さで測る, *実験医学*, 20, 2384-2385 (2002).
- 森 俊明、岡畑 恵雄, 超臨界中での酵素反応の制御, *バイオインダストリー*, 19, NO.12, 14-21 (2002).
- 岡畑 恵雄, 二分子膜, *化学便覧 (丸善)* (in press).
- 岡畑 恵雄, 3章 生体分子の超分子化, 堀池靖浩、片岡一則編 ナノテクノロジー基礎シリーズ、バイオナノテクノロジー、オーム社 (in press).
- 岡畑 恵雄, 5.4 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、中島基貴・川崎通昭・外池光雄・印藤元一編、フレグランスジャーナル社 (in press).
- 岡畑 恵雄, 古澤 宏幸, 水晶発振子マイクロバランス法 μ生体分子間相互作用を重さで測る「化学フロンティア5 生命化学のニューセントラルドグマ テーラーメイド・バイオケミストリーのめざすもの」、杉本 直己編、p247-255, *化学同人* (2002)
- 森 俊明、岡畑 恵雄, 4-3 超臨界流体中での酵素触媒反応, *超臨界流体のすべて*、荒井康彦監修、p. 543-548、*テクノシステム* (2002).
- 森 俊明、岡畑 恵雄, 酵素は超臨界流体中でも使える, 「グリーンバイオテクノロジー」海野 肇・岡畑 恵雄編、講談社サイエンティフィック, p. 52-59 (2002).
- 岡畑 恵雄, DNAをフィルムにする, 「グリーンバイオテクノロジー」海野 肇・岡畑 恵雄編、講談社サイエンティフィック, p. 145- 152 (2002).
- 岡畑 恵雄、古澤 宏幸, 3.5 水晶発振子マイクロバランス法, ポストシーケンスタンパク質実験法、大島泰郎・鈴木紘一藤井義明・村松・喬 編、pp128-137、*東京化*

学同人 (2002).
(2) 特許出願
なし