

「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) 水晶発振子を用いて酵素反応を重さで測るという観点から、発振子上に α 1,4-グルカンであるアミロペクチンを固定化し、基質の種類により糖鎖を伸長したり分解できるフォスフォリラーゼの触媒作用を定量化することに成功した。
- (2) より複雑な生体内反応を定量化するという観点から、リボソーム翻訳過程を重さの変化として追跡することに成功した。具体的には、mRNA 固定化発振子への 30S リボソーム、開始因子 (IF1, IF2, IF3 と fMet-tRNA) の結合、50S リボソームの結合による IF1, IF2, IF3 の解離による、開始複合体の形成が定量化できた。
- (3) 水晶発振子の金基板上に極微弱な (2 mW) 赤色レーザー光を照射すると金基板上に吸着している水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を見出した。この事を利用すれば発振子上に固定化したタンパク質や生体分子をレーザー光の on/off により可逆的に吸脱着を制御できると考えられる。
- (4) 現在使用しているバッチ式の装置 (AffinixQ4) のセル容量を小さくしたフロー式の装置を開発した。AffinixQ4 に比べて測定精度が20倍も向上し、水晶発振子基板上に固定化したレセプタータンパク質への低分子薬物の結合が見られるようになった。

2. 研究実施内容

(1) 水晶発振子上での酵素反応の定量化:フォスフォリラーゼによる糖鎖の伸長と加リン酸分解反応

< 目的 > 水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法は、金電極上の質量変化を経時的に追跡できるデバイスであるので、酵素反応における酵素・基質複合体を追跡できる特徴があり、これ

までに DNA ポリメラーゼ、DNA 分解酵素、制限酵素、さらには糖鎖加水分解酵素について成果を挙げてきた。本年度は、糖鎖の伸長あるいは分解を可逆的に触媒できるフォスホリラーゼ酵素に注目した。フォスホリラーゼは図1に示すようにリン酸存在下で α -1, 4グルカン鎖を過リン酸分解できる酵素であると同時に、グルコース-6-リン酸存在下ではリン酸基を脱離しながら糖鎖の伸長がおこるという興味深い酵素である。糖鎖の分解と伸長はいずれも質量変化を伴う反応であるので、QCM 法ではその反応過程を追跡できる。

＜結果と考察＞ 水晶発振子の金基板の表面にアビズンを固定化し還元末端をビオチン化したアミロペクチンを固定化した。フォスホリラーゼを添加すると振動数の減少(重量の増加)が観察され、酵素が基質に結合する過程が観察できた。さらにリン酸を加えると大きな振動数の減少(質量の増加)が見られた。これは基板上の糖鎖の分解(加リン酸分解)を反映している。酵素が結合した時点でリン酸の代わりにグルコース-6-リン酸を加えると、重量の増加が観察され、基板上での糖鎖の伸長反応が観察された。

振動数の経時変化から酵素の糖鎖への結合時における結合速度定数(k_{on})、解離速度定数(k_{off})および解離定数(K_d)が求められた。さらに、加リン酸分解

反応での触媒速度定数(k_{cat})、リン酸基質の解離定数(K_m)とみかけの二次速度定数(k_{cat}/K_m)、さらには、糖鎖伸長反応における触媒速度定数(k_{cat})、グルコース-6-リン酸基質の解離定数(K_m)とみかけの二次速度定数(k_{cat}/K_m)が求められた。酵素の基質への親和性(K_d)は通常の糖鎖関連酵素とよく似た値であるが、興味深いのは、過リン酸分解速度における各速度定数と糖鎖伸長反応における速度定数がほぼ同じである点である。フォスホリラーゼは酵素分類上は分解酵素として分類されているが、じつは縮合活性が分解活性と同程度持っており、糖転移酵素として分類されてもおかしくないことがわかった。これまでに、同じ反応条件でフォスホリラーゼの加リン酸分解活性と糖鎖伸長活性を定量的に求めた例はなかったので、QCM 法に

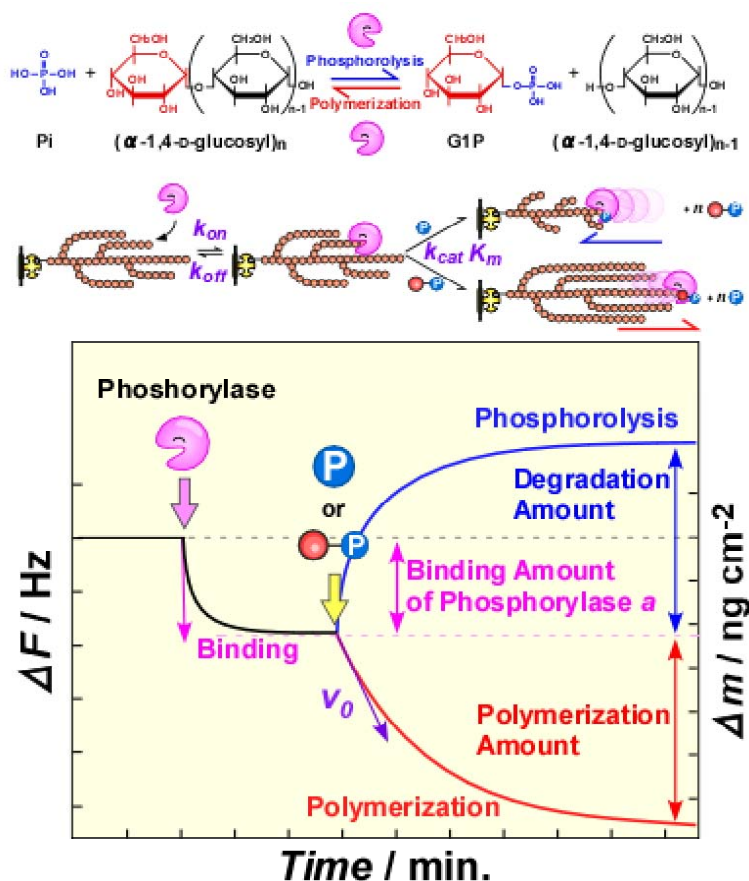


図1 水晶発振子上でのフォスホリラーゼによる糖鎖伸長・分解過程の追跡

より定量的にかつ網羅的に酵素触媒反応が求められて初めて明らかになった。

表1 フォスホリラーゼによるアミロペクチンの加リン酸分解と糖鎖伸長反応の
動力学定数

Phosphorylase from Potato 	Binding Process			Reaction Process		
	$k_{on} / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	k_{off} / s^{-1}	K_d / nM	k_{cat} / s^{-1}	K_m / mM	$\frac{k_{cat}}{K_m} / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
Phosphorolysis	12×10^3	3.7×10^{-3}	320	3.0	Pi: 4.1 (1.9) ^{a)}	0.74×10^3
Polymerization				2.3	G1P: 2.5 (1.9) ^{a)}	0.90×10^3

(2) リボソーム翻訳過程の水晶発振子による定量化

< 目的 > mRNA の遺伝情報に基づきタンパク質に翻訳される過程は、近年リボソームの X 線結晶解析がなされたことにより急速に進み、無細胞翻訳系などに実用化されつつある。しかし、分子レベルでのメカニズム、とくに mRNA にリボソームがどのような形で結合しているのかなど不明な点も多い。リボソームは RNA とタンパク質の巨大な複合体であり、質量も大きく QCM 法で測定するには適したターゲットである。

< 結果と考察 > SD 配列を持つ mRNA を発振子上に固定化し、リボソーム 30S、50S、70S および開始因子 IF1、IF2、IF3、さらに fmet-tRNA などの翻訳開始に必要な各因子の加える順序を変えて mRNA への結合の過程およびその結合定数を調べた。

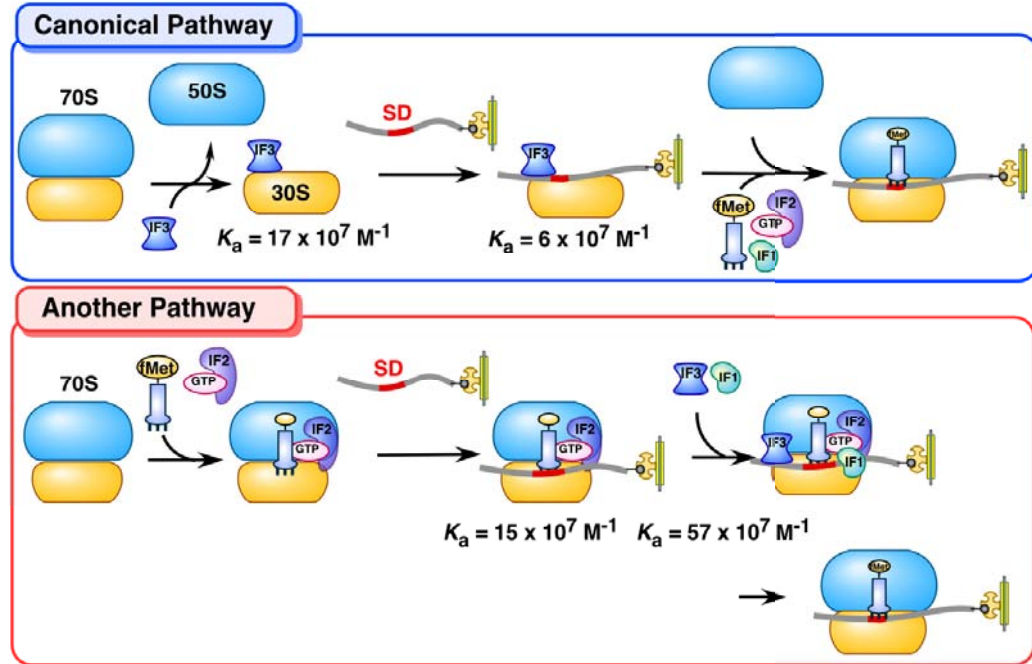
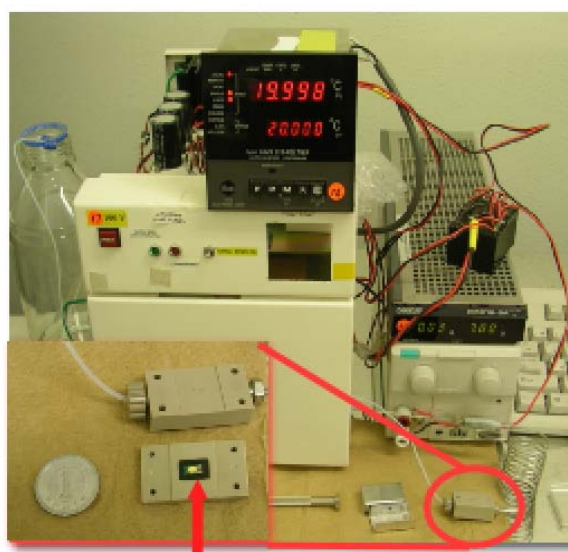


図2 翻訳過程での開始複合体形成の新しい経路の定量化

従来は Canonical 経路と呼ばれる以下の経路で開始複合体ができると考えられてきた。すなわち70SリボソームがIF3の作用により30Sに解離したあとにmRNAに結合し、そこにIF2、IF1、fmet-tRNAの各因子が結合して、最後にfmet-tRNAがリボソーム内にとどまって翻訳開始に備える。しかし、Canonical 経路とほぼ同じ結合定数を持つもう一つの経路が存在する可能性があることがわかった。すなわち、70S リボソームの状態で fmet-tRNA、IF2 がmRNA に結合し、そこに IF1 や IF3 が結合して結果的に fmet-tRNA だけがリボソームにとどまった開始複合体ができる経路である。開始複合体の形成過程を質量変化で定量的に網羅的に追跡できたことによって、新しい翻訳メカニズムを初めて提唱できた。

(3) 高感度チューブ式フロー型装置の試作

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った。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 ± 0.01 °Cに向上させた結果、ノイズレベルが1/20に減少し、セル容量も500 μ L から10 μ L に減少できたフロー型装置を試作できた(図3)。さらには、QCM フローセル部を透明なアクリル樹脂化することにも成功し、金電極上での反応を光学的手法でも追跡できる用にする予定である。この装置を用いて、水晶発振子上に固定化したConAレクチンへのマンノース(分子量120)の結合や、アビジンへのビオチン(分子量250)の結合を定量化し、レセプターへの低分子薬物の結合を評価できる目処がついた。



発振子と 発振回路

図3 高感度チューブ式フロー型 QCM 装置の試作機

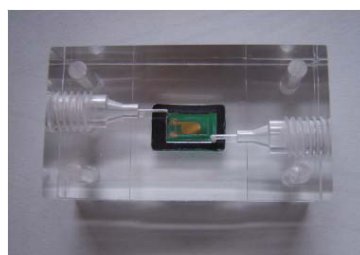


図4 アクリル製 QCM フローセル

3. 研究実施体制

(1) 「岡畑」グループ研究者名

①研究分担グループ長：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、教授）

②研究項目：

(1) 高感度フロー型水晶発振子装置の開発

(2) 生体内反応の定量的解析(酵素反応、リボソームにおける翻訳過程の解析、膜タンパク質上での分子認識など)

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

- H. Matsuno, H. Furusawa, and Y. Okahata, Kinetic Studies of DNA Cleavage Reactions catalyzed by an ATP-dependent Deoxyribonuclease on a 27-MHz Quartz-Crystal Microbalance, *Biochemistry*, **44**, 2262-2270 (2005).
- T. Nihira, M. Mizuno, T. Tonozuka, Y. Sakano, T. Mori, and Y. Okahata, Kinetic Studies of Site-Direct Mutational Isomalto-dextranase Catalyzed Hydrolytic Reactions on a 27 MHz Quartz-crystal Microbalance, *Biochemistry*, **44**, 9456-9461 (2005).
- T. Kawasaki, Y. Hoshino, Y. Ishizu, Y. Mizushiro and Y. Okahata, Control of Hydrolysis and Condensation Activities of Thermolysin by Ultrasound Irradiation, *Chem. Lett.*, **34**, 1602-1603 (2005).
- R. Takei, S. J. Seo, C. S. Cho, Y. Okahata, and T. Akaike, Adsorption behavior of poly(N-p-vinylbenzyl-4-o-beta-D-galactosyl-[1-4]-D-gluconamide) by quartz-crystal microbalance, *Colloids and Surfaces, B*, 137-140 (2005).
- Eguchi, H. Furusawa, A. Yamamoto, T. Akuta, M. Hasegawa, Y. Okahata, and M. Nakanishi, Optimization of Nuclear Localization Signal for Nuclear Transport of DNA-encapsulating Particles, *J. Controlled Release*, **104**, 507-519 (2005).
- Y. Okahata and T. Kawasaki, DNA-Lipid Complexes in Organic Solution, and DNA-aligned Cast and LB Films, Topics in Current Chemistry 260 "Immobilization of DNA on Chips I", ed by Christine Wittmann, p. 57-75, Springer-Verlag (2005).
- T. Mori and Y. Okahata, Gravimetric Analyses of Enzymatic Glucan Hydrolysis and Phosphorolysis on a 27 MHz Quartz-Crystal Microbalance, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **17**, 71-83 (2005).