

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域

「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」

研究課題

「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」

## 研究終了報告書

研究期間 平成13年10月～平成19年3月

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・大学院生命理工学研究科 教授)



## 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推進した。

水晶発振子は、電極上に物質が吸着することにより振動数が低下することが知られている。約 1 ng の物質が吸着すると 1 Hz 振動数が減少することからマイクロバランス(微量天秤)として、これまでは主に気相中でガスセンサーとして使われてきた。岡畑らは、1990年頃から水晶発振子マイクロバランス(QCM)を用いて水中で生体分子間相互作用を測定する研究を開始し、そのために水晶発振子の片面被覆や発振回路の改良を重ね、水中で±2 Hz の精度で測定できる装置を開発した。

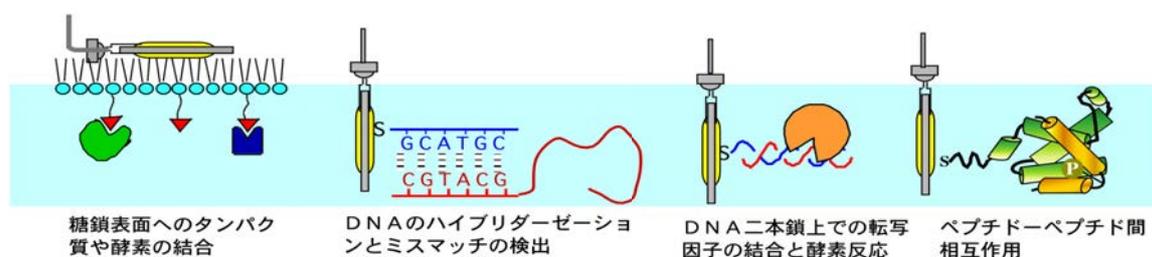


図1 水晶発振子を用いる生体分子間相互作用の定量化

この装置を用いて図1に示すように、細胞膜などの糖脂質から水面単分子膜を作製し、水晶発振子を水平に押しつけることによりタンパク質(レクチン)の結合が振動数減少(重量増加)として見られること、QCM基板上に1本鎖DNAを固定化すると相補的なDNAの結合(ハイブリダイゼーション)が見られること、二本鎖を固定化したときには塩基配列選択的なタンパク質(転写因子)の結合が見られること、ペプチドを固定化するとペプチド-ペプチド間相互作用がナノグラムレベルの重量変化として追跡できること、などを明らかにしてきた。

本研究プロジェクトでは、従来の研究成果を基にして、単純で静的な1:1の分子認識ではなく、(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な解析法を確立する、(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装置を開発する、という目標を掲げて研究を推進し、以下の成果を挙げた。

### (A) 複雑で動的な分子間相互作用や反応の定量的な解析

#### (1) DNA上での酵素反応の解析

DNAを遺伝子操作するためにはDNAポリメラーゼ、DNAリガーゼ、ヌクレアーゼ(加水分解酵素)、

制限酵素などが使われてきたが、いずれもその生成物をRIラベルしたゲルシフトアッセイから検出する方法が主で、酵素反応過程を追跡した例はほとんどなかった。

図2に示すように、DNA固定化QCMを用いれば、DNAポリメラーゼによるテンプレート鎖に沿ったDNA伸長反応や、リガーゼによるDNA結合反応などが振動数減少(重量増加)として、観察できた。

また、Exo型ヌクレアーゼによるDNA鎖先端からの加水分解反応や、制限酵素による部位特異的な切断反応が振動数増加(重量減少)として観察できた。いずれも経時変化から酵素のDNA鎖への結合、反応(伸長あるいは切断)、酵素の離脱の各反応速度を精度良く求めることが出来た。

## (2)糖鎖上での酵素反応の解析

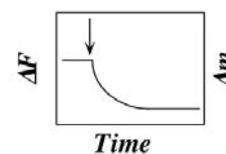
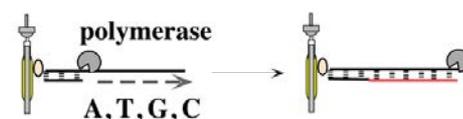
DNA上での酵素反応は、DNAがポリアニオンであり、紫外領域に吸収を持つことからゲルシフトアッセイや分光法で反応追跡が可能である。しかし糖鎖は紫外吸収が弱く、酵素反応を連続的に追跡することは難しく、これまでは生成物を比色定量するぐらいしか方法がなかった。

QCM上にアミロペクチン糖鎖を固定化し、糖加水分解酵素であるグルコアミラーゼを加えると図2下と同じように、振動数の増加(重量減少)が観察され糖鎖が切断されていく過程が追跡できた。振動数変化のカーブフィッティングを正確に行うことにより、酵素の糖鎖への結合と解離速度( $k_{on}$ と $k_{off}$ )および解離定数( $K_d$ )と糖鎖切断速度( $k_{cat}$ )が求められた。これらの動力学定数は従来のMichaelis-Menten式では求められなかった値である。

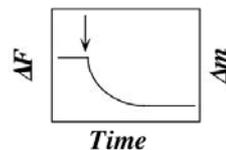
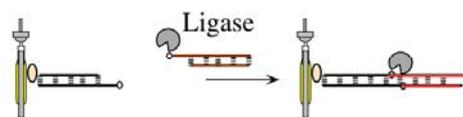
## (3)タンパク質上での酵素反応の解析

QCM基板上にタンパク質としてミオグロビンを固定化し、タンパク質のC末側から切断できるカルボキシペプチダーゼを加えると、図2下側と同じような振動数変化が見られ、酵素による切断反応が観察できた。DNA

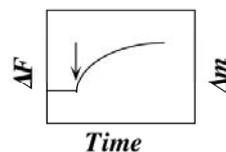
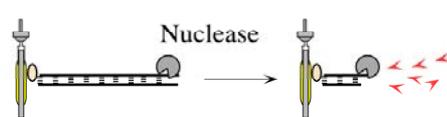
### DNAポリメラーゼによる伸長反応



### DNAリガーゼによる結合反応



### Exo型ヌクレアーゼによる末端からの切断反応



### 制限酵素による部位特異的切断反応

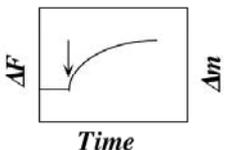
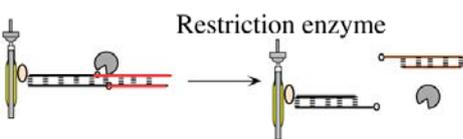


図2 QCMに固定化したDNA上での酵素反応

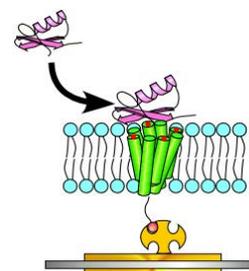


図3 QCM上に固定化したKcsAカリウムイオンチャネルへのチャンネルブロッカーペプチドの結合

や糖鎖に比べてタンパク質は3次元構造があり、pH 変化などにより基質であるタンパク質の構造が変化すると反応性が大きく変化した。

### (3) 膜タンパク質上での分子認識

これまで膜タンパク質はリポソームなどに再構成してその反応を見るのが一般的であったが、QCMを用いれば平面基板上に脂質膜に可溶化した(安定化した)状態で固定化でき、膜タンパク質に対する各種リガンドの結合を重量変化として追跡できた(図3)。

### (4) リボソームでの翻訳過程の定量化

mRNA の遺伝情報に従ってリボソーム上でタンパク質に翻訳される。翻訳開始過程には10種以上のタンパク質因子や酵素が関与し、複雑な分子間相互作用を行っている。QCM 上にmRNA を固定化し、リボソームの結合過程や開始複合体の生成過程を

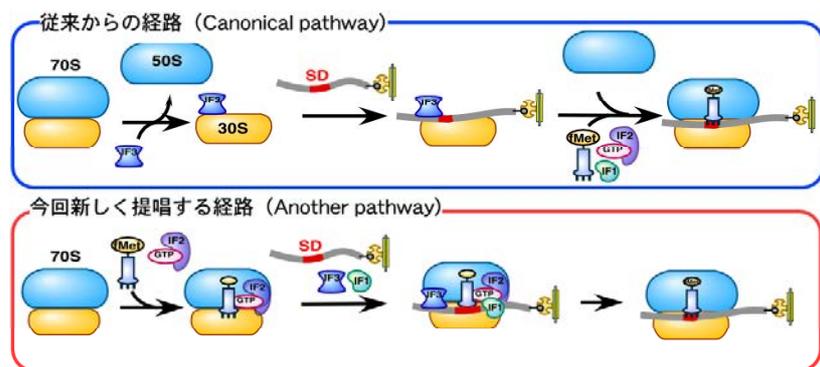


図4 mRNA 固定化 QCM 上での翻訳開始複合体の形成過程

観察した。従来は、70Sリボソームは一度30Sと50Sに解離して30SがmRNAのShine-Dargalno(SD)配列に結合すると考えられていたが、別ルートとして、70Sが解離せずそのままSD配列に結合して開始複合体を形成する経路があることが示唆された(図4)。これまでリボソーム翻訳過程は種々の分子が複雑に関与して定量的な議論がなされてこなかったが、QCM法を用いることにより重量変化として翻訳過程が解明される日も近い。

### (5) 生体分子の分子構造やコンフォメーション変化の定量化

これまでのQCMは、水晶発振子を発振回路で強制発振させたときの振動数変化を追跡したものであったが、ネットワークアナライザー法を用いて周波数スキャンすることにより発振ピークを解析して、周波数シフト値( $\Delta F$ )とエネルギー損失値( $\Delta D$ )が同時に求められる。これらの値から基板上に固定化した分子の粘弾性や水和の状態が求められることがわかった。

## (B) 多機能でかつ高感度な水晶発振子マイクロバランス装置の開発

上で述べたような複雑で動的な生体分子間相互作用を定量的に解析するために、QCM装置の安定化(ドリフトの低減)、高感度化(ノイズレベルの低減)、微量サンプルの測定に適した低容量化を実現するために図5に示した装置開発を行った。具体的には、第1世代では回路等が手作りで安定性に問題があったが、第2世代の市販機で回路のワンチップ化とペルチェ素子による温度制御を行った。

第3世代ではバッチ式ではあるがセル容量を8 mL から 0.5 mL にし、一度に4個測定できる4チャンネル化した。第4世代ではマイクロ流路に QCMを組み込んで、セル容量を10  $\mu$ Lにしてフローセル化した。この事によりノイズレベルが1/20になり、高感度化が達成できた。



図5 QCM 装置開発の経緯

## 2 研究構想及び実施体制

### (1) 研究構想

本研究プロジェクトをスタートする前に、我々は水晶発振子マイクロバランス法は水溶液中で DNA やタンパク質上での生体分子間相互作用を定量出来る優れた方法であることを見出していた。図1に示したように脂質膜-タンパク質間、DNA-DNA 間、DNA-タンパク質間などの静的で単純な分子認識がナノグラムレベルで定量できた。

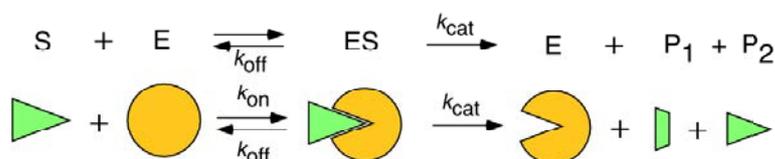
表1に、これまでの生体分子間相互作用を測定する手法をまとめた。従来のゲルシフトアッセイ法やELISA法は定性的で、なおかつ生体分子をRIや蛍光分子で修飾する必要があった。近年は被修飾で定量的に分子間相互作用が検出できる、マイクロカロリー法や表面プラズモン共鳴 (SPR) 法が注目されるようになったが、QCM法は、これらに比べて結合量をナノグラムレベルで定量出来る、経時変化から結合の動力学が求められるなどの特徴がある。すなわち結合の絶対量をナノグラムレベルで検出でき、結合の経時変化を追跡できるので、より複雑で動的な生体分子間相互作用を定量的に解析することが出来ると考えた。

表1 生体分子間相互作用の検出方法

	方法	プローブ	感度	結合の絶対量	経時変化(動力学)
相対的定量	ゲルシフトアッセイ 	ラジオアイソトープ	~ 100 pg	×	×
	ELISA 	酵素結合抗体	~ 100 pg	×	×
*絶対的定量	マイクロカロリーメトリー 	不要	~ 1 mg	×	×
	表面プラズモン共鳴(SPR) 	不要	~ 10 ng	△ RIラベル	○
	水晶発振子(QCM) 	不要	~ 10 ng	○	○

\*絶対的定量性として検量線を必要とせずに物理量を求めることが可能

### (A) 動的な酵素反応の解析



動的な生体分子間相互作用として、酵素反応を選んだ。下式に示すように酵素は基質を取り込んで分子内で反応し、基質を放出する。酵素反応はこれまでは、反応中間体である酵素・基質(ES)複合体の濃度を直接に求めるのが困難であったことから、生成物(P1 と P2)の生成速度から Michaelis-Menten 式を用いた反応解析を行ってきた。生成物の追跡にはゲルシフトアッセイや分光学的方法が主に用いられてきたが、早い反応や正確な動力学を求めることは困難であった。QCM 法を用いて基板上に基質を固定化すれば、酵素の基質への結合過程は重量増加として検出でき、ES複合体内部での基質の分解反応は重量減少として、反応後の酵素の脱離も重量減少として追跡できるので、酵素反応の各過程を定量的に解析する方法として適していると考えた。基質としてDNA、糖鎖、タンパク質を選べば各基質上での酵素反応が解析できる(森グループ)。

### (B) 膜タンパク質上での分子認識

生体分子間相互作用の大半は細胞膜上の膜タンパク質でおこっているが、膜タンパク質を界面活性剤を用いて単離することの困難さや脂質膜との再構成の困難さなどのために、その機能解析はほとんど進行していない。水晶発振子基板上に膜タンパク質を脂質膜に可溶化して安定に固定化できれば、シグナル分子の結合が重量変化として検出できる。この場合、QCM基板上への膜タンパク質の脂質膜中への固定化方法がブレークスルーとなる(古澤グループ)。

### (C) タンパク質翻訳系での複雑な分子認識

mRNAの遺伝上を基にしたタンパク質翻訳系は分子レベルでも解析されるようになり、最近では細胞を用いずに細胞からの抽出成分のみの pure な系でタンパク質の発現が可能になってきた。mRNAにリボソームと多くの開始因子が結合して開始複合体が作製されて翻訳が進行するのであるが、開始複合体の形成メカニズムもまだ分子レベルで解明されてはいない。複雑な分子間相互作用の解析として、リボソーム翻訳系に注目した。mRNAを発振子上に固定化すれば、リボソームや種々の開始複合体の結合過程を重量変化として解析できると考えた。これまでの教科書的な開始経路以外の経路も発見できることを期待している(古澤グループ)。

### (D) 生体分子の粘弾性の測定

これまでのQCM装置は発振回路を用いて発振子を強制発振させ、物質が吸着したときの振動数変化から物質の化癒着量を測定してきた。水晶発振子はネットワークアナライザーにつないで周波数スキャンすると共振周波数でコンダクタンスが最大になる。発振子上に硬い膜が乗った場合にはピーク形状を変えずに低周波数側にシフトする(図6左)、柔らかい膜が乗った場合には、柔らかい膜は発振子と一緒に振動しないのでエネルギー損失がおこる。このときにピーク幅が広がって低周波数側にシフトする(図6右)。この事を利用すれば、発振子上の乗った分子の硬さ・柔らかさ(粘弾性)や反応に伴うタンパク質のコンフォメーション変化が定量化できる。ネットワークアナライザー法を用いることにより、質量変化のみならず分子のコンフォメーション変化も追跡できることになる(川崎グループ)。

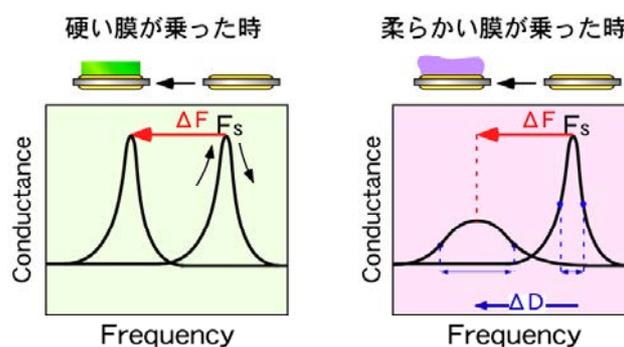


図6 ネットワークアナライザーを用いた水晶発振子の周波数スキャン

### (E) 水晶発振子測定装置の開発

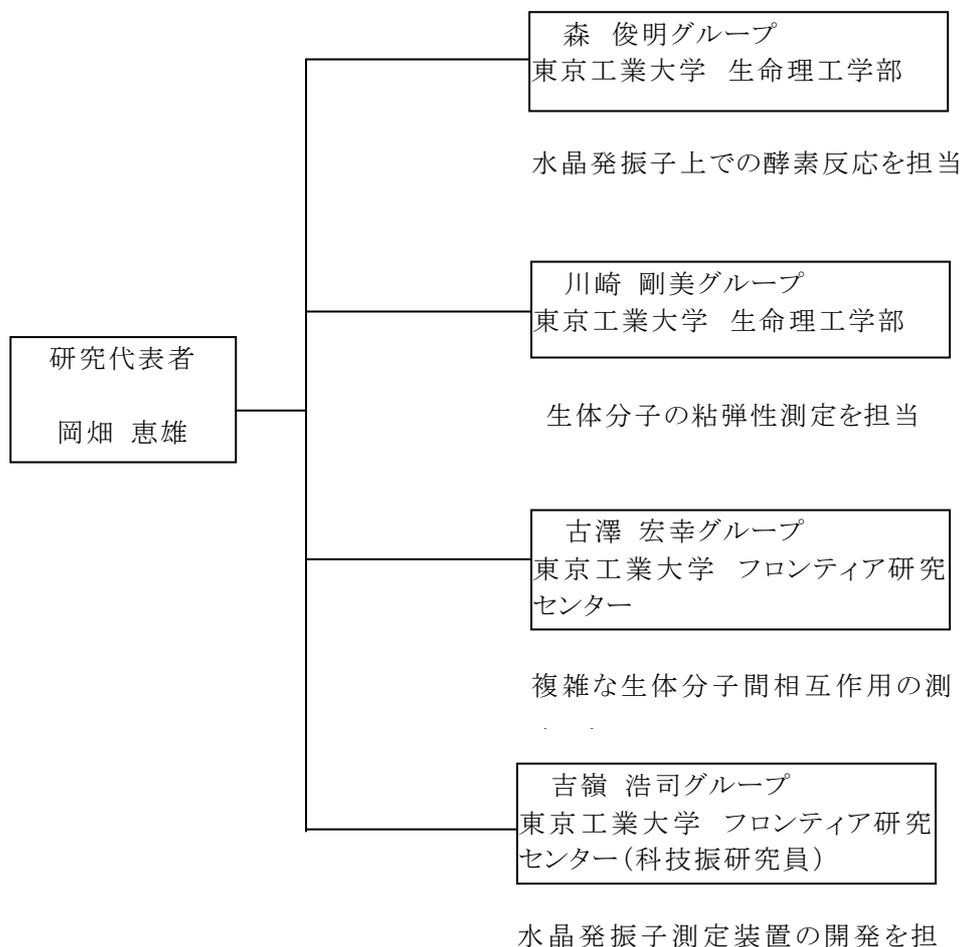
酵素反応や複雑な生体分子間相互作用を解明するためには、高感度で安定性の高い水晶発振子測定装置が必要である。

ATカットの水晶発振子はズレ振動していることから温度に対しては敏感で、これがしばしば発振子の安定性に影響を与えてきた。温度に対する安定性は水晶のカット角で決まり、これまでは AT カット発振子は  $35^{\circ}15'$  のものが使われてきた。しかしこのカット角は空気中での温度安定性に優れたカット角ではあるが、水中では必ずしも温度安定性が良いわけではない。しかし発振子は数十万個単位で生産され、カット角を変えるのは数百万円のコストがかかり、これまでは  $35^{\circ}15'$  のカット角の発振子を水中でだましだまし使ってきたのが現状である。水中でより安定な水晶発振子を得るためには水中の粘度と

密度の温度係数を考慮した発振子を設計することが必要である。コンピュータ解析により水中で安定なカット角が  $35^{\circ}59'$  付近にあることが予想できるようになったので、発振子メーカーの協力を得て、 $35^{\circ}30'$  から  $35^{\circ}60'$  のカット角の異なる発振子を試作する事を計画した(吉嶺グループ)。

装置としては、これまで発振回路やセル回りの温度制御などが手作りであったために、安定性やドリフトなどに問題があった。発振回路をワンチップ化する、周波数カウンターを基盤にして装置内に組み込む、温度制御を  $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$  から  $\pm 0.01^{\circ}\text{C}$  に向上させる、セル容量を 8 mL から 0.5 mL に低容量化する、などの改良を計画した。また、これまでのバッチ式から、マイクロ流路に組み込んだフローセル型の作成も計画した(吉嶺グループ)。

## (2) 実施体制



※このグループは、共同研究者(JSTの定義による)ではない。

当チームは、JSTの定義上は1グループ編成である。

### 3 研究実施内容及び成果

#### 3.1 水晶発振子上での酵素反応の解析(森 俊明グループ)

##### (1) 研究実施内容及び成果

##### (A) DNA 上での酵素反応解析: DNA ポリメラーゼの場合

<目的>

これまで DNA ポリメラーゼの反応は DNA を RI ラベルして伸長した DNA をゲルシフトアッセイで分析してきた。しかしこれでは生成物を追跡しているだけなので、酵素反応の反応機構は観察できていない。

水晶発振子は電極上でのナノグラムレベルの重量変化を振動数変化として追跡できるので、基板の上に突出末端をもつ DNA 二本鎖を固定化し、ポリメラーゼとモノマーを加えたときの振動数の経時変化から酵素の結合と DNA 鎖の伸長反応と酵素の伸長鎖からの脱離の各過程を追跡できる。

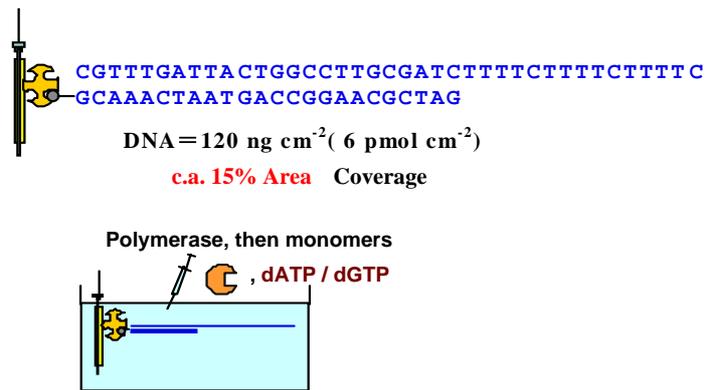


図7 水晶発振子上への固定化と実験方法

<実験方法>

27MHz 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図7に示す突出末端をもつ DNA 二本鎖を 120 ng(6 pmol/cm<sup>2</sup>)を電極面積の 15%に固定化した。大腸菌由来のポリメラーゼ (Klenow fragment)、ついでモノマー (dATP と dGTP) を水溶液中に加えたときの振動数の経時変化を追跡した。

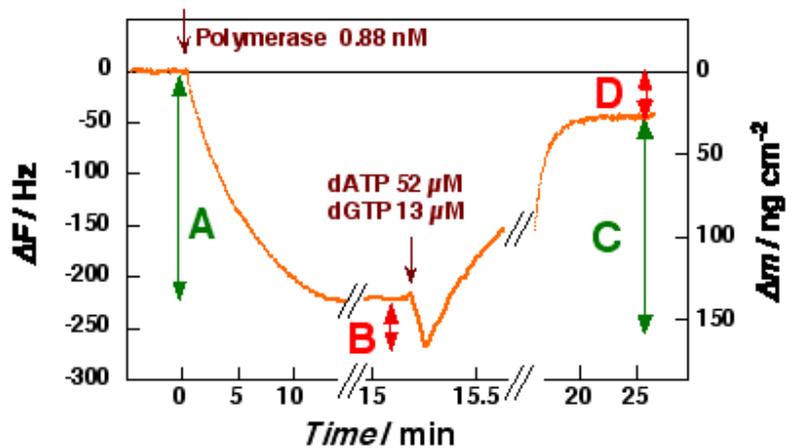


図8 ポリメラーゼ、ついでモノマー (dATP と dGTP) 加えたときの振動数の経時変化 (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM KCl, 30 °C)

<結果と考察>

突出末端をもつ DNA を固定化した水晶発振子の入った水溶液中にポリメラーゼを、ついでモノマーを添加したときに典型的な振動数変化を図8に示した。酵素を添加したときの振動数の減少(重量増加、step A)とモノマーを加えたときの振動数の減少(重量増加、step B)とそれに続く振動数上昇(重量減少、step C)の3段階が観察できた。これらの挙動は以下のように解析でき、それを模式的に図9に示した。

Step A(酵素の結合過程):ポリメラーゼを加えたときの経時的な振動数の減少は酵素のDNA鎖への結合過程を反映している。平行に達したときの結合量は  $140 \text{ ng cm}^{-2} = 2 \text{ pmol}$  であり、固定化していたDNA鎖が  $6 \text{ pmol}$  であったのでDNA鎖 3本あたり 1個の酵素が結合したことになる。突出末端の塩基配列を変化させたときの酵素の結合と脱着の速度定数を求めた。突出末端をすべてGにしたとき以外は塩基配列を変えても酵素の結合と脱離の速度定数はほとんど変化しなかった。これは酵素の結合過程は突出末端の塩基配列には依存しないことを表している。すべてGにしたときは突出末端が会合しているために酵素の結合が妨げられていると考えられる。

Step B(伸長反応の動力学):モノマーを加えたときの重量変化はポリメラーゼによる伸長反応を反映しており、 $30 \text{ ng cm}^{-2} = 6 \text{ pmol}$ の重量増加が観察された。固定化されたDNA鎖と同じモル数の重量増加が観察されたことからDNA鎖はすべて伸長していることがわかる。DNA鎖の伸長反応における突出末端の塩基配列の効果を調べた。突出末端の長さを 15 mer から 50 mer に長くすると伸長反応による重量増加(Dm)は 3.5 に増加した。濃度変化から求めた Michaelis-Menten 定数( $k_{cat}$ と  $K_m$ )は塩基配列には依存せずにはほぼ一定であった。このことは伸長反応も突出末端の塩基配列には依存していないことを示している。

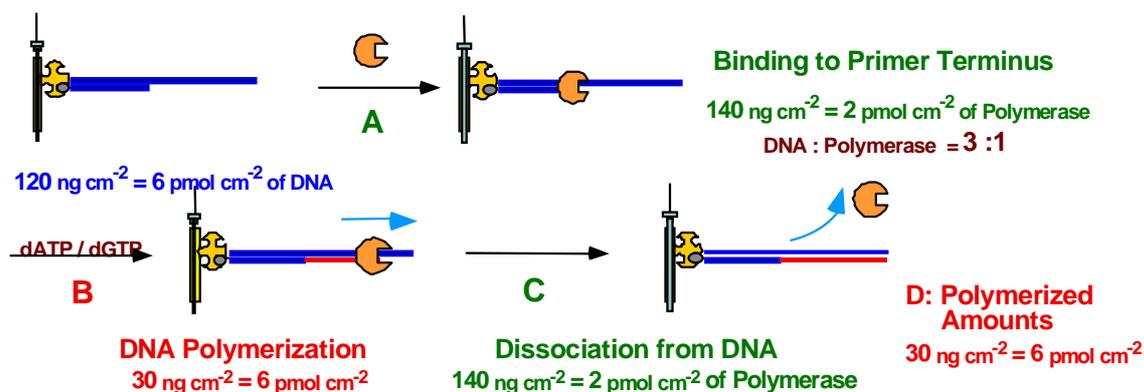


図9 ポリメラーゼの反応過程

Step C(酵素の脱離過程):伸長が終了した直後から振動数が上昇(重量の減少)が観察され、これは酵素が重合の終わったDNAから脱離していく過程と考えられる。このときの重量減少は  $140 \text{ ng cm}^{-2} = 2 \text{ pmol}$  であり、結合した酵素量と同じであった。酵素が脱離した後に残った重量(D)は  $30 \text{ ng cm}^{-2} = 6 \text{ pmol}$  であり、これは固定化しておいたDNAと同じモル数であり、反応後はDNA鎖の伸長による重量増加だけが残ることになる。

#### 各素過程の動力的解析

添加する酵素量や加えるモノマー濃度を種々変化させて各素過程の動力的定数を求めた。Step A の酵素が結合するときの結合速度定数は  $k_{on} = 105 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , 脱離の速度定数は  $k_{off} = 10^{-3} \text{ s}^{-1}$

と求められ、その結果、結合定数  $K_a = 10^8 \text{ M}^{-1}$  となった。一方、伸長が終わった DNA 鎖から酵素が離れていく Step Cでは、それぞれ  $k_{on} = 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{off} = 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $K_a = 10^6 \text{ M}^{-1}$  と求められた。結合過程の方が  $10^2$  も結合定数が大きいことは、酵素が重合が終わった DNA 鎖から  $10^2$  倍も離れやすいことを表しており、図 8 の Step C で酵素が離れていくこともよく理解できる。この  $10^2$  倍の差は、酵素の突出末端への結合は平滑末端への結合に比べて  $k_{on}$  で 10 倍大きく  $k_{off}$  で 10 倍小さいことで説明できる。また、Step B の DNA 鎖の伸長反応はモノマー (dATP/dGTP) に対して Michaelis-Menten 式に従い、 $K_m = 10^{-5} \text{ M}$ ,  $k_{cat}/K_m = 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  という値が得られ、これらの値はテンプレート部の塩基配列には依存しなかった。すなわち、基質モノマーの選択的はテンプレート部との相補的塩基対の形成で行われ、ポリメラーゼは基質特異性がなくテンプレート部に沿って重合していくことを反映している。

DNA ポリメラーゼの反応はこれまではゲルシフトアッセイを用いて行われており、酵素反応の各素過程を定量的に 1 つのデバイスで測定できたのは初めてである。

#### (B) DNA 上での酵素反応：ATP 依存型 DNAヌクレアーゼの場合

27MHz 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 DNA 二本鎖を  $120 \text{ ng/cm}^2$  (6 pmol/cm<sup>2</sup>) を電極面積の 15% に固定化した。DNA ヌクレアーゼ (Dnase)、ついで ATP を水溶液中に加えた時の振動数の経時変化を追跡した。

##### <反応の経時変化>

二本鎖 DNA を固定化した水晶発振子を入った水溶液中に DNase、ついで ATP を添加したときの典型的な振動数変化を図 10 に示した。酵素を添加したときの振動数の減少 (重量増加、step A) と ATP を加えたときの最初の振動数の上

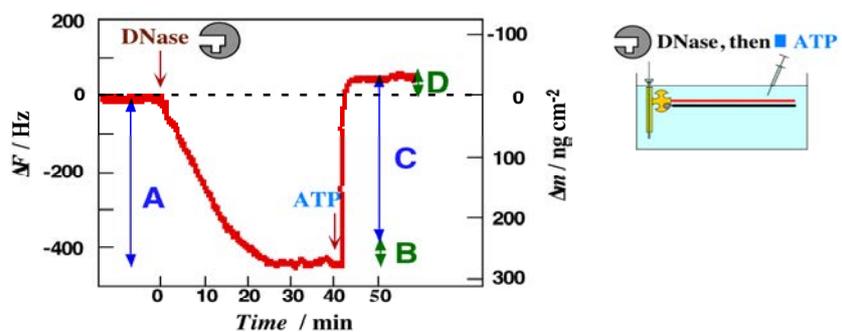


図 10 DNA 固定化発振子にヌクレアーゼ (DNase)、次いで ATP を添加したときの振動数変化

昇 (重量減少、step B) とそれに続く振動数の上昇 (step C) の 3 段階が観察できた。これらの挙動は以下のように解析でき、それを模式的に図 11 に示した。

Step A <酵素の結合過程>: DNase を加えたときの経時的な振動数の減少は酵素の DNA 鎖への結合過程を反映している。平行に達したときの結合量は  $280 \text{ ng cm}^{-2} = 1.7 \text{ pmol}$  であり、固定化していた DNA 鎖が  $60 \text{ ng cm}^{-2} = 1.9 \text{ pmol}$  であったので DNA 鎖 1 本あたり 1 個の酵素が結合したことになる。

Step B と C <加水分解と酵素の脱離過程>: ATP を加えたときの最初の急激な重量減少は ATP が

酵素に取り込まれて DNA 鎖の3'末端から加水分解が起こり、反応が終了すると酵素が一本鎖 DNA から離れる過程を反映している。反応終了後は開始時に比べて  $30 \text{ ng cm}^{-2} = 1.9 \text{ pmol cm}^{-2}$  分振動数が上昇(重量減少、D)した。これは最初に固定化した DNA 鎖の半分であることから、Dnase は DNA の3'側のみを切断し結果的に一本鎖のみが発振子上に残ったことを反映している。

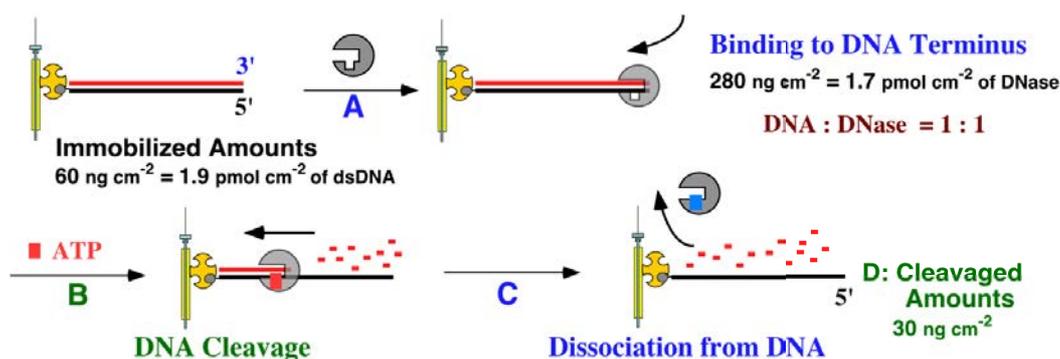


図 11 ATP 依存型 DNase の DNA 加水分解の反応機構

#### <反応の動力学>

最初の酵素結合過程では、DNase の濃度変化をして酵素の結合速度定数 ( $k_{on}$ )と脱離速度定数 ( $k_{off}$ )求めた。加水分解過程では ATP 濃度変化を行い、Michaelis-Menten 式から DNA 鎖に結合している酵素に第二の基質として ATP が取り込まれるときの  $K_m$  値と加水分解速度定数  $k_{cat}$  値を求めて図 12 にまとめた。

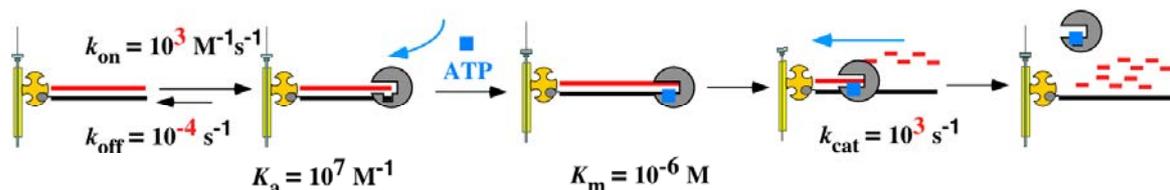


図 12 DNase 加水分解反応における各反応過程の動力学定数

これまで、DNA 上での酵素反応はゲルシフトアッセイなどの定性的な方法に限られていたが、水晶発振子マイクロバランス法を用いれば、動力学を正確に求めることができ、これからの酵素反応解析に新しい手法を提供できる。

(C) DNA上での酵素反応の解析: EcoRV 制限酵素の場合

< 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は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。

< 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積の約7%に抑えた。25 °C, pH 7.5 (10 mM Tris buffer), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> の条件下で EcoRV を加えたときの振動数変化を図 13 に示した。

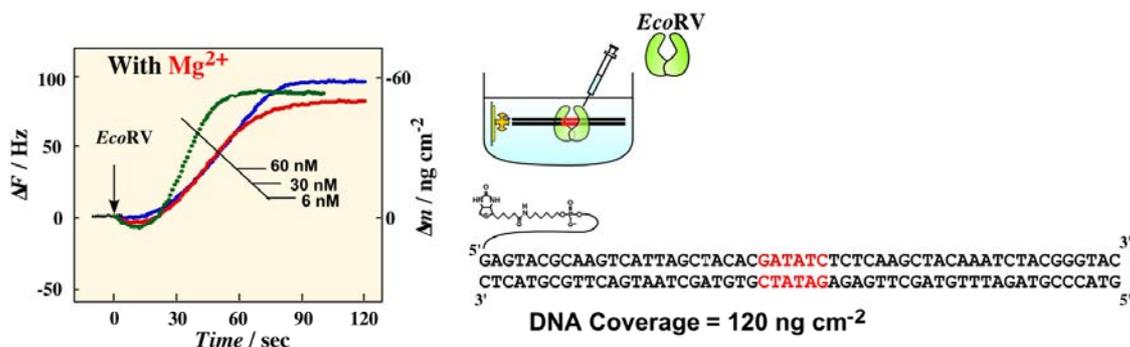
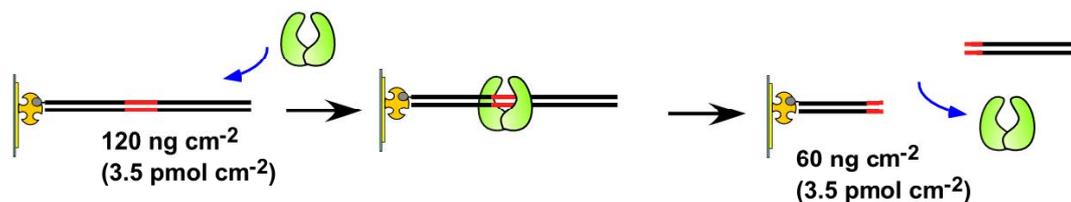


図 13 DNA二本鎖固定化水晶発振子に制限酵素 EcoRV を加えたときの振動数変化

(25°C, pH 7.5, 10 mM Tris buffer, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>)

< 結果と考察 >

図 13 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<sup>-2</sup> (3.5 pmol cm<sup>-2</sup>) であり、結果的に 60 ng cm<sup>-2</sup> (3.5 pmol cm<sup>-2</sup>) 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。

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

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

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14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( $k_f$ )、解離速度定数( $k_{-f}$ )、結合定数( $K_a$ )、ES複合体内部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2にまとめた。

表2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( $k_f$ と $k_{-f}$ )および結合定数( $K_a = k_f/k_{-f}$ )、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 $k_f$ 、 $k_{-f}$ 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。

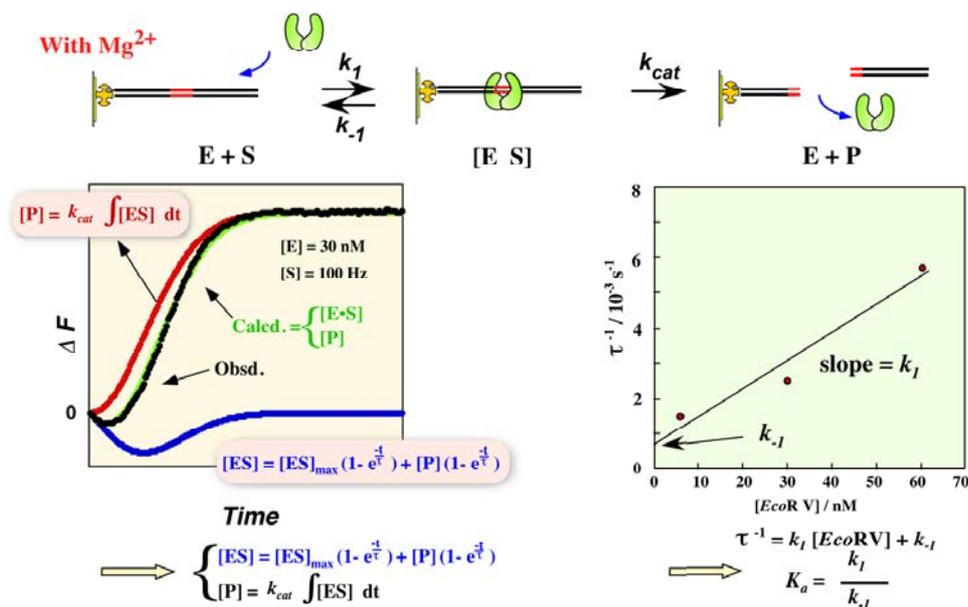
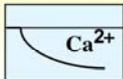
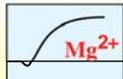


図14 EcoRVによるDNA切断の振動数変化のカーブフィッティングとその解析

表2 EcoRV によるDNA鎖切断の動力学定数

Method	$k_I$ / $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_{-I}$ / $10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$K_a$ / $10^6 \text{ M}^{-1}$	$k_{cat}$ / $\text{s}^{-1}$
QCM  $\text{Ca}^{2+}$	760	1.1	660	-
QCM  $\text{Mg}^{2+}$	79	0.71	110	0.44

(D)糖鎖上での酵素反応 : アミロペクチンのグルコアミラーゼによる加水分解

<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に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。

<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15)。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 cm<sup>2</sup>)に抑えた。

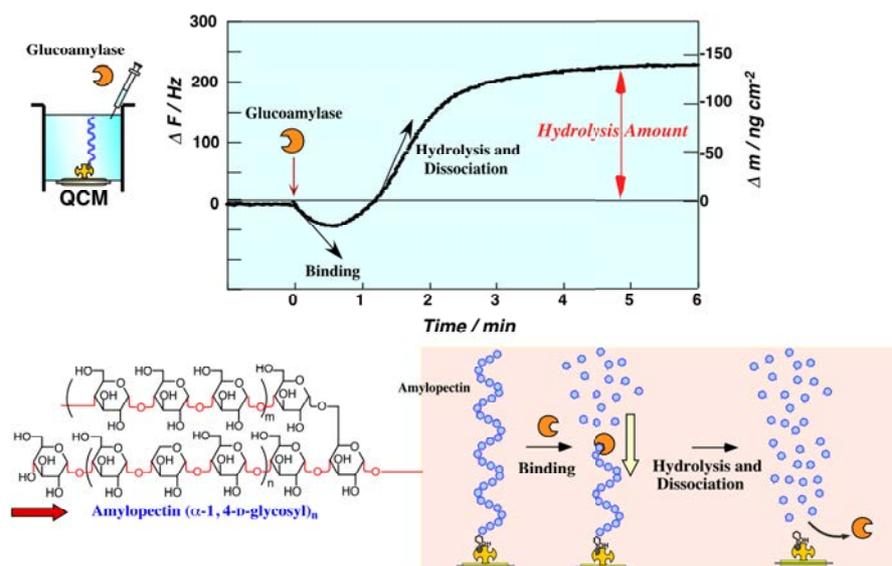


図 15 アミロペクチンの固定化水晶発振子にグルコアミラーゼを添加したときの振動数変化 (25 ° C, 20 mM 酢酸緩衝液, pH 4.8, 100 mM NaCl, [amylopectin] = 0.46 pmol/0.049 cm<sup>2</sup>, [glucoamilase] = 0.1 unit

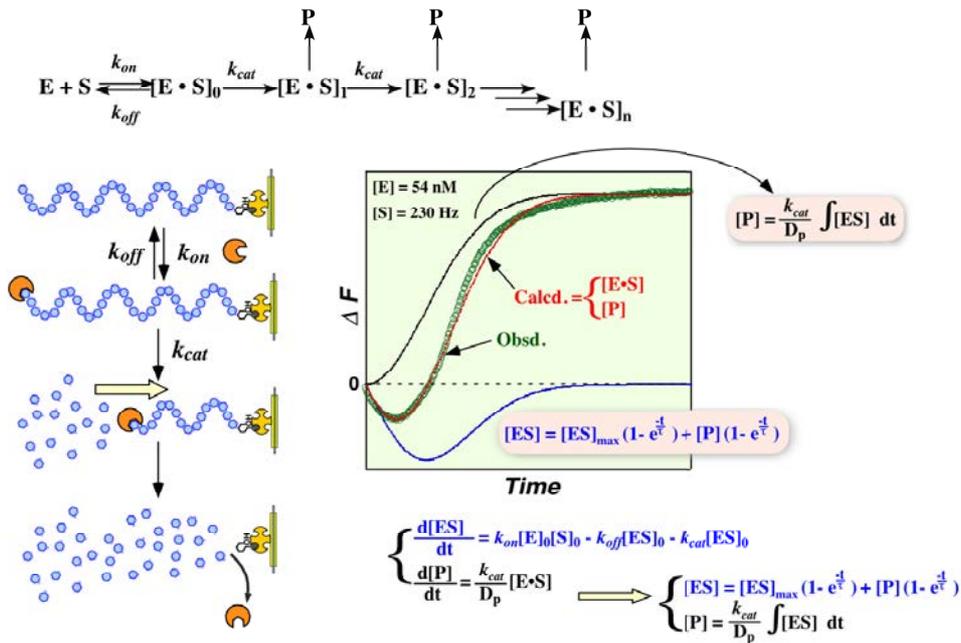


図 16 酵素反応課程の反応解析とカーブフィッティング

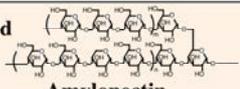
< 結果と考察 >

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15 に示した。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/cm<sup>2</sup> 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。反応のパターンとしては、上述のEcoRVによるDNA鎖の切断過程と良く似ている。酵素-基質複合体の生成量は先に述べた式(1)で表され、加水分解による生成物量は式(2)で表される。先に述べたように、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 16)。カーブフィッティングから求めた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 ( $K_d$ )、ES複体内での加水分解速度定数 ( $k_{cat}$ ) を表3にまとめた。

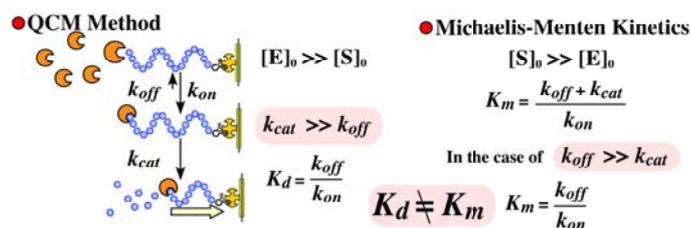
表3に示すように、水晶発振子法を用いると、酵素の糖鎖への結合と脱離の速度 ( $k_{on}$  と  $k_{off}$ ) および解離定数 ( $K_d = k_{off}/k_{on}$ )、さらには加水分解定数 ( $k_{cat}$ ) が同時に求まる。これまでは水溶液中で Michaelis-Menten 式を用いて解析してきた。マルトペンタオースを基質にしたときの  $K_m$  値と  $k_{cat}$  値を表3にあわせて示した。Michaelis-Menten 式から求めた  $K_m = 1.2 \times 10^{-4}$  M と水晶発振子で求めた  $K_d = 4 \times 10^{-9}$  M は  $10^5$  倍も異なった。これは、Michaelis-Menten 式では、ES複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3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

仮定において  $K_m$  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  $k_{cat}$  値は両者で求めた値は  $54 \text{ s}^{-1}$  と  $93 \text{ s}^{-1}$  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る。

表3 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

		$k_{on}$ / $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_{off}$ / $10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$K_d$ / $\mu\text{M}$	$K_m$ / $\mu\text{M}$	$k_{cat}$ / $\text{s}^{-1}$
QCM Method 	Amylopectin 	23	0.093	$4.0 \times 10^{-3}$	—	93
Michaelis-Menten Kinetics 	Maltoheptaose <sup>1)</sup> 	—	—	—	120	54

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



(E) 糖鎖上での酵素反応: デキストランスクラーゼによる糖鎖伸長反応

<目的>

デキストランスクラーゼはスクロースを基質にしてグルコースをデキストランの還元末端に結合させて糖鎖を伸長させることが出来る糖転移酵素の1種である。デキストランを水晶発振子基板上に固定化すれば、ショ糖を基質にして基板上で糖鎖伸長過程を重量増加として観察できる。

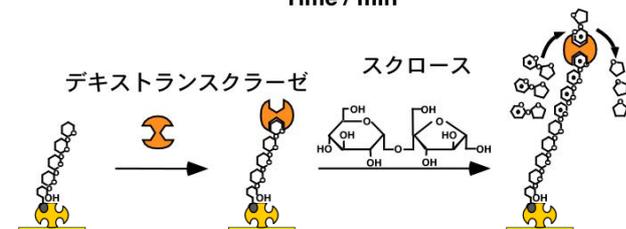
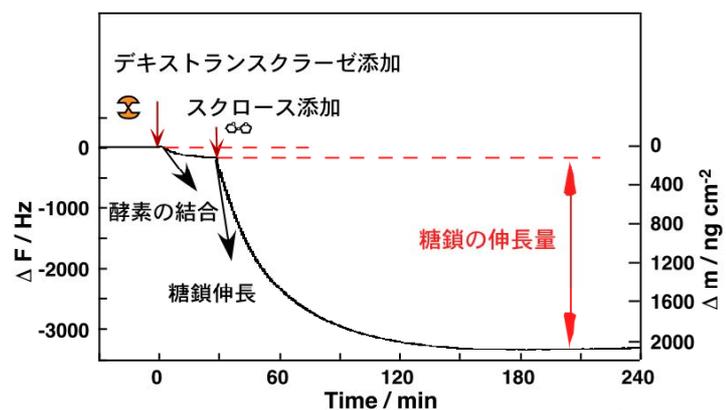


図 17 デキストラン固定化発振子上でのデキストランスクラーゼ添加による糖鎖伸長反応の観察 ([Dextransucrase]=18 nM, 10 mM Acetate Buffer (pH: 5.2), 25°C)

< 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(図17)。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。糖鎖加水分解反応と同じように、カーブフィッティングを行うことにより、動力学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  $0.11 \text{ mM}$ 、伸長の  $k_{cat}$  値は  $51 \text{ s}^{-1}$  と求められた。

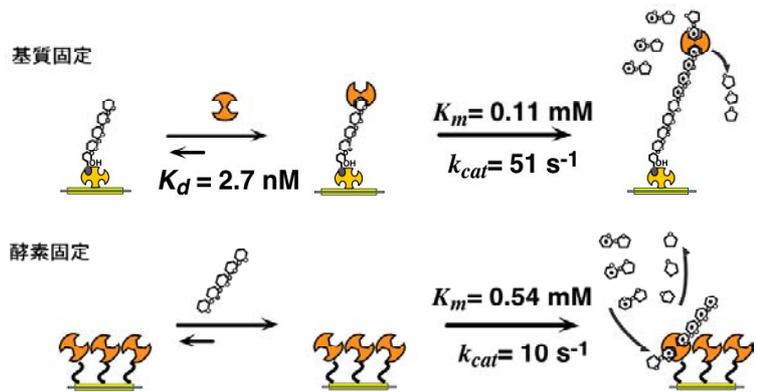


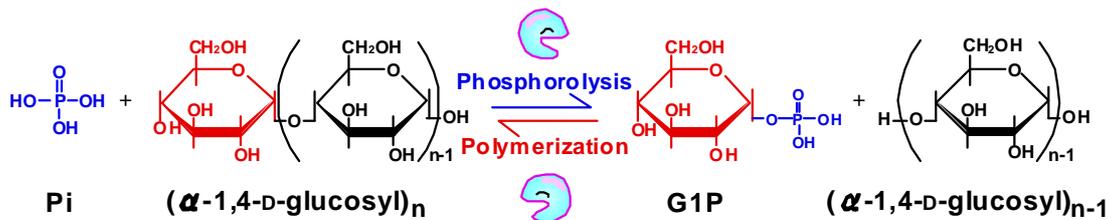
図 18 発振子上に基質を固定化したときと酵素を固定化したときの、デキストランスクラーゼによる糖鎖伸長反応の動力学定数

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18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学パラメータ( $K_m$  値は  $0.54 \text{ mM}$ 、 $k_{cat}$  値は  $10 \text{ s}^{-1}$ )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。これは酵素を基板上に固定化し生成物である糖鎖の伸長反応を直接観察した最初の例である。

(F) 糖鎖上での酵素反応の解析： フォスホリラーゼによる糖鎖の可逆的な分解と伸長反応の解析

< 目的 >

フォスホリラーゼは下式に示すようにリン酸存在下で  $\alpha$ -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チ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。図 19 に示すように、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。これは基板上的糖鎖の分解 (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。結果を表 4 にまとめた。

酵素の基質への親和性 ( $K_d = 3.2 \times 10^{-7}$  M) 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。

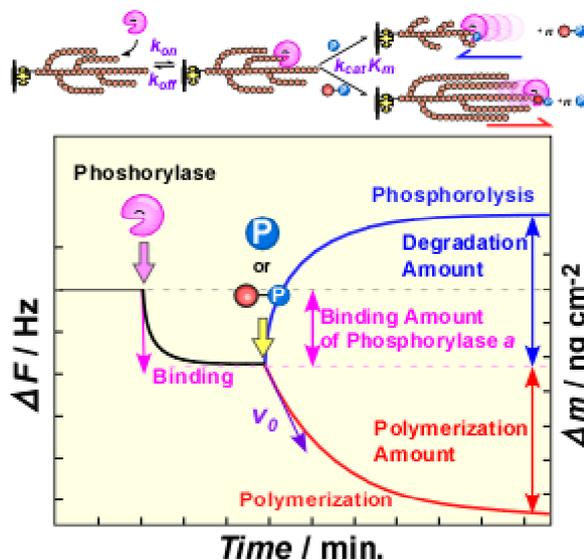


図 19 アミロペクチン固定化水晶発振子上でのフォスホリラーゼによる可逆的な糖鎖の分解 (青線) と伸長 (赤線) 反応

表 4 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		
	$k_{on} / M^{-1}s^{-1}$	$k_{off} / s^{-1}$	$K_d / nM$	$k_{cat} / s^{-1}$	$K_m / mM$	$\frac{k_{cat}}{K_m} / M^{-1}s^{-1}$
<b>Phosphorolysis</b>	$12 \times 10^3$	$3.7 \times 10^{-3}$	320	3.0	Pi : 4.1 (1.9) <sup>a)</sup>	$0.74 \times 10^3$
<b>Polymerization</b>				2.3	G1P: 2.5 (1.9) <sup>a)</sup>	$0.90 \times 10^3$

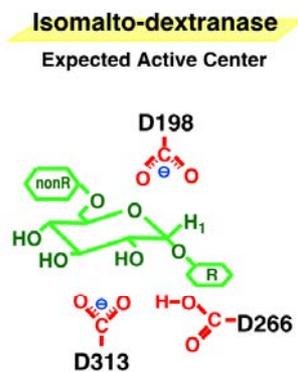
(G)糖鎖上での酵素反応の解析： 点変異イソマルトデキストラナーゼの反応解析

< 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を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ドタイプ (WT)、D313N, D198N, D266N を加えたときの振動数変化を図 20 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 5 にまとめた。

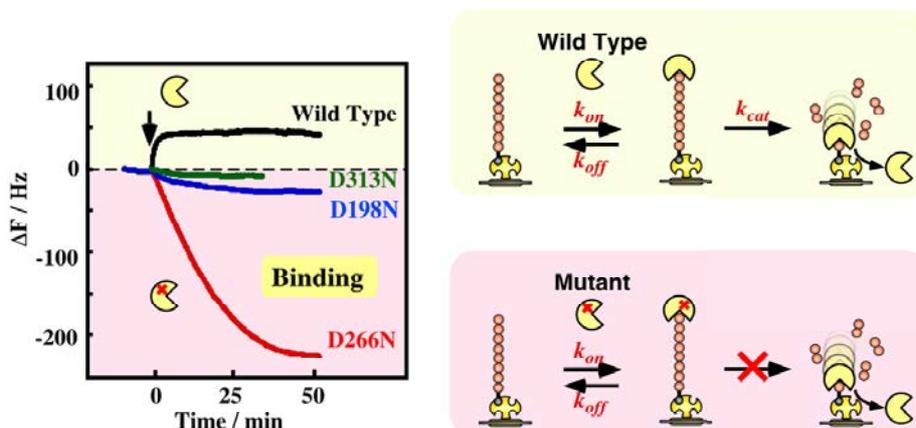


図 20 デキストラン固定化水晶発振子に Wild Type あるいは点変異イソマルトデキストラナーゼを添加したときの典型的な振動数変化

触媒活性( $k_{cat}$  値)についてはい  
ずれのアスパラギン酸(D)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(N)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

表 5 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

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

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ソ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れ、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。

#### (H)タンパク質の加水分解反応の解析

##### <目的>

DNA や糖鎖と異なり、タンパク質は3次元構造があり基質としては酵素反応の制約を受けると考えられる。ここでは、タンパク質基質としてミオグロビン(17 kDa)を選んだ。ミオグロビンは分子内に SS 結合がなく8本の  $\alpha$  ヘリックスのみからなる構造の単純なタンパク質であり、プロテアーゼによる加水分解には適した基質である。プロテアーゼとしては、C 末側からアミノ酸を1つずつ加水分解できる Exo 型のカルボキシペプチダーゼ P(CPP)を選んだ。Endo 型のプロテアーゼではタンパク質のどこを切断したのかが不明であり、水晶発振子上での重量減少から反応を追跡するには解析が困難であるという理由で Exo 型酵素を選んだ。

##### <実験方法>

ミオグロビンをビオチン化してアビジンで被覆した QCM 基板上に固定化し、カルボキシペプチダーゼを添加したときの振動数変化を追跡した。

##### <結果と考察>

ミオグロビンを固定化した水晶発振子に、カルボキシペプチダーゼ P(CPP)を添加したときの振動数変化を図21に示した。CPP を添加すると基質への酵素の結合による振動数減少(重量増加)と、それに引き続いておこる振動数増加(重量減少)が見られた(赤線)。一方、CPPの活性中心の Ser-OH 基

を共有結合型阻害剤でつぶした酵素では、基質への結合だけが見られ、加水分解反応は見られなかった(青線)。CPPによる加水分解では固定化したミオグロビンの約40%が加水分解された。

これまでの酵素反応と同様に振動数変化のカーブフィッティングから、CPPの基質への結合速度定数( $k_{on}$ )、解離速度定数( $k_{off}$ )、加水分解速度定数( $k_{cat}$ )を求めた。タンパク質基質の場合は基質の3次元構造が加水分解速度に大きな影響を与えると考え、加水分解速度のpH依存性についても調べた。各pHにおけるそれぞれの動力学パラメーターを図22右にまとめた。図22左には同条件でのZ-Phe-Tryジペプチド基質の加水分解反応をニンヒドリン

反応で追跡し、Michaelis-Menten式で解析し、 $K_m$ 値と $k_{cat}$ 値を求めてそのpH依存性を示した。

ジペプチドのCPPによる加水分解においては、 $K_m$ 値、 $k_{cat}$ 値ともにほとんどpH依存性はなかった。一方、QCM法では基質への結合速度では $k_{off}$ はほとんどpH依存性を示さなかったが、 $k_{on}$ はpH 3.7付近で最大値を示した。また $k_{cat}$ はpHの低下と共に増大した。図22右下の青線に示したように基質であるミオグロビンの $\alpha$ ヘリックス含量はpHの低下と共に減少する。すなわち、CPP酵素の $k_{cat}$ にはほとんどpH依存性はないが、pHが低下してミオグロビンの構造がランダムコイルになって行くに従い、見かけ上 $k_{cat}$ 値が増加するようになる。CPPの $k_{cat}$ にpH依存性がないことは図22左のジペプチドの $k_{cat}$ のpH依存性からもわかる。すなわちこの酵素のpH依存性は酵素の基質への結合速度 $k_{cat}$ に表れている。QCM法では $k_{on}$ 、 $k_{off}$ 、 $K_d = k_{off}/k_{on}$ 、 $k_{cat}$ のすべての動力学パラメーターが個別に求められる特徴がある。Michaelis-Menten式から求められる $K_m$ 値は $[(k_{cat} + k_{off})/k_{on}]$ で表され、 $k_{on}$ 、 $k_{off}$ 、 $k_{cat}$ 値から逆算して図22右の黒線のpH依存性で示した。ジペプチドの $K_m$ 値のpH依存性がないのに対して、ミオグロビンの場合は低pHになるに従って $K_m$ 値が増加するのは、基質のコンフォメーションが崩れるに従って $k_{cat}$ 値が増加するためである。結局、タンパク質の加水分解では、基質の3次元構造が加水分解速度に大きく影響することがわかった。

これまで水溶液中でのMichaelis-Menten式を用いての加水分解反応では、基質のコンフォメーションの影響が複雑に加水分解速度にからんでくることから、主としてジペプチドなどを基質に用いて行われてきた。しかし、QCM法を用いることにより、基質の結合過程の速度パラメーターである $k_{on}$ 、 $k_{off}$ 、

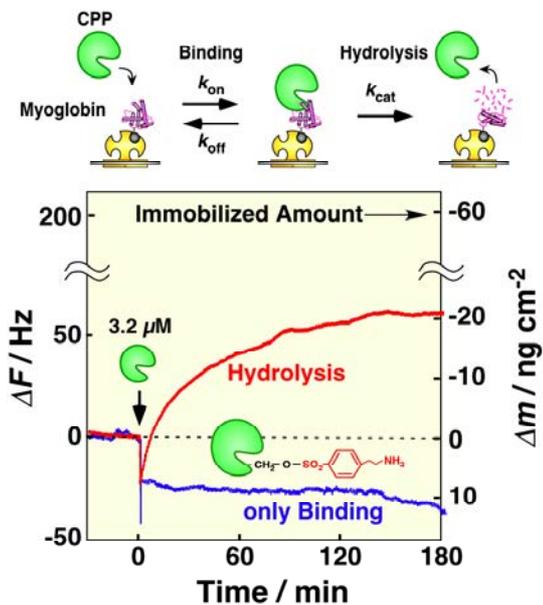


図 21 ミオグロビン固定化水晶共振子にカルボキシペプチダーゼP(CPP)を添加したときの振動数変化(CPPの活性中心を阻害した酵素では基質への結合のみが見られた)

$K_d = k_{off}/k_{on}$  値と加水分解速度のパラメーター  $k_{cat}$  値を分けて求められるので、タンパク質加水分解における基質のコンフォメーションの影響が詳細に議論できる特徴がある。

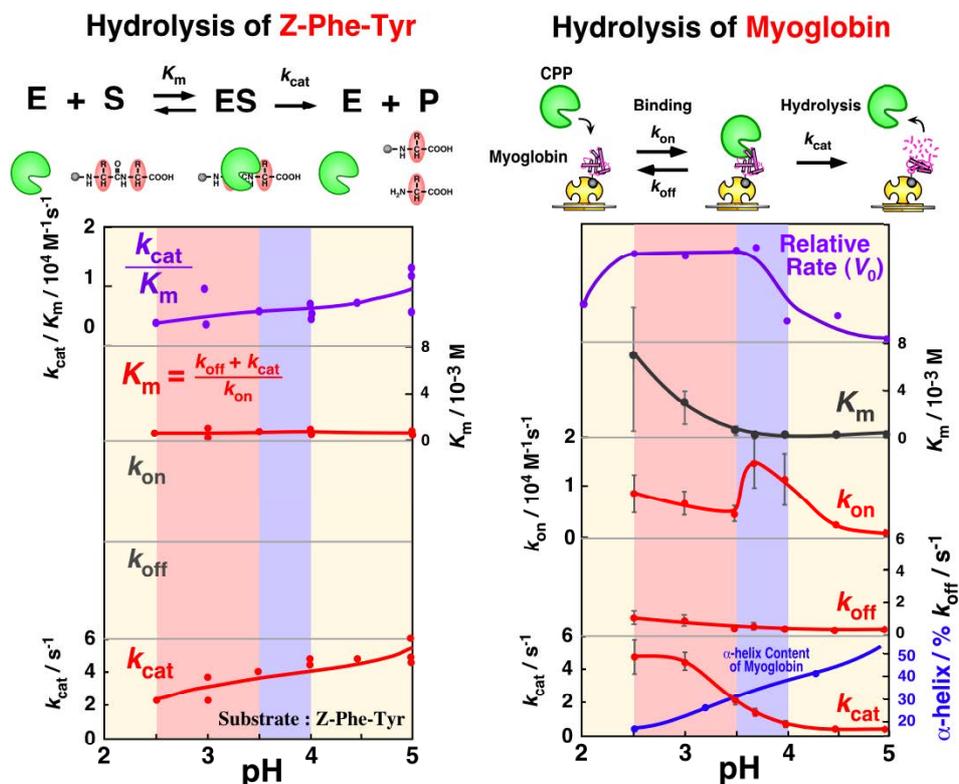


図 22 (右)ミオグロビンの水晶発振子上での加水分解速度のpH 依存性、(左) Z-Phe-Try ジペプチドの水溶液中での加水分解速度のpH 依存性

## (2) 研究成果の今後期待される効果

水晶発振子法の大きな特徴は酵素反応における反応中間体である ES コンプレックスの生成と分解速度を重量変化として求めることにある。そのために、これまで測定することが困難であった、酵素の基質への結合性のパラメーターである  $k_{on}$ 、 $k_{off}$ 、 $K_d = k_{off}/k_{on}$  値と触媒速度定数  $k_{cat}$  値を同時に求められる。従来の生成物を追跡して Michaelis-Menten 式で  $K_m$  値と  $k_{cat}$  値を求める方法に取って代わると考えられる。反応としても核酸分解、糖鎖分解と伸長、タンパク質の分解などいろいろな反応に適用できることも大きなメリットである。

## 3. 2 膜タンパク質の固定化とシグナル分子の結合 (古澤グループ)

### (1) 研究実施内容及び成果

生体内のタンパク質の40%は生体膜上にあると言われ、様々な認識や反応が行われている。膜タンパク質上で起こる認識や反応を解析するためには基板上に脂質膜内に固定化された膜タンパク質

を構築することが必要である。そのためには水晶発振子の金基板上を利用する方法が適している。

膜タンパク質としては、細菌 *Streptomyces lividans* 由来の $K^+$ イオンチャンネルタンパク質であるKcsAを選んだ。KcsAは図23に示すように、158個のアミノ酸からなる2本の膜貫通型 $\alpha$ ヘリックスの4量体から構成され、内部にカリウムイオンが通る穴が存在する。KcsAは細菌由来であるので、164番目のリジンをアスパラギン酸に変えたR64Dにはサソリ毒由来のAgitoxin2ペプチドがチャンネルブロッカーとして結合することが知られている。

#### <膜タンパク質の基板上への固定化>

膜タンパクを基板上に固定化する方法としてリポソームに再構成して基板上に吸着させる方法が知られているが、この方法では、膜タンパクの固定化量が少ない、膜タンパクの配向が制御できない、などの欠点がある。本研究では図24に示すように、KcsAのC末端側に遺伝子操作によりシステインを導入し、大腸菌で発現した。界面活性剤で可溶化したKcsAのC末端のSH基をビオチン化試薬(PEO-Iodoacetyl Biotin)でビオチン化し、アビジンを固定化したQCM基板上に固定化した。これを基板上で混合ミセル法を用いてリン脂質膜(DOPEとDOPC)と置換した。これらの操作をQCM法で重さの変化として追跡し、KcsAの固定化量と脂質膜で置換されたかどうかを確認した。ほかにも、ビオチン化脂質を一部導入したときには脂質膜の表面がアビジンで1層覆われること、蛍光脂質を導入したときには基盤全体が蛍光で光ることから、KcsAの周りが脂質膜で置き換わったことを確認した。

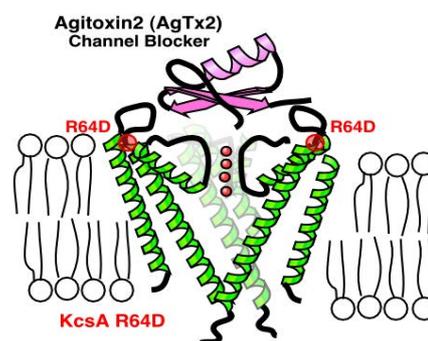


図23 膜タンパク質としてのKcsAイオンチャンネルとR64D変異体へのチャンネルブロッカーAgitoxin2の結合の模式図

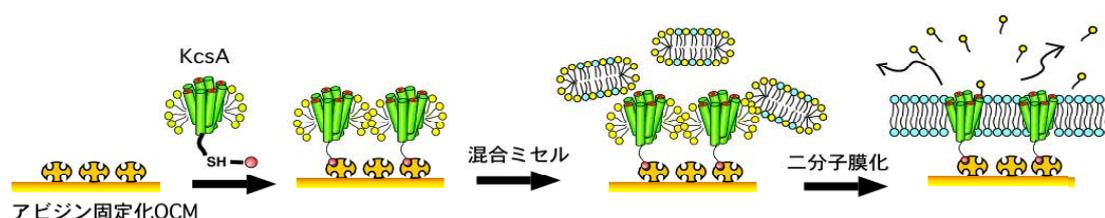


図24 QCM基板上への膜タンパク質KcsAの固定化と脂質膜置換による膜タンパク質の再構成の模式図

#### <KcsAへのAgitoxin2ペプチドの結合過程の解析>

QCM基板上に脂質二分子膜と共に固定化したAgitoxin2チャンネルブロッカーペプチドの結合はKcsAタンパク質に対してペプチドの分子量が小さいこともあって、これまで使っていた装置(AFFINIX Q4, ノイズレベル $\pm 1$  Hz、ドリフト $\pm 10$  Hz/h)では精度良く測定出来なかった。そのために、後述するように、外部からのノイズを避けるためにフローセル化し、温度を $\pm 0.001$   $^{\circ}\text{C}$ 、ノイズレベルを $\pm 0.05$

Hz、ドリフトを 0.5 Hz/h に低下した装置を作製した(図25)。

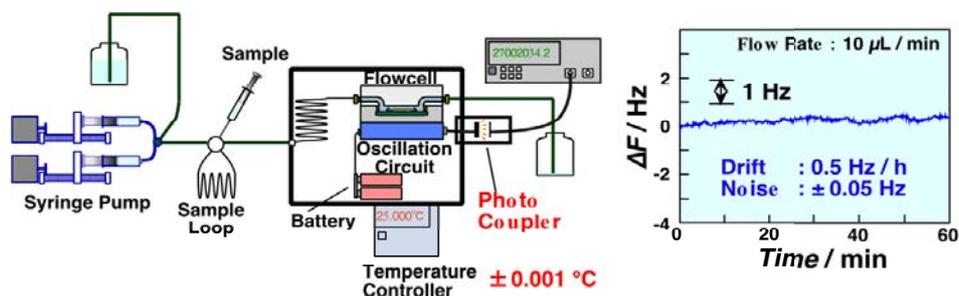


図 25 高感度フローセル型 QCM 装置の模式図

測定結果を図26に示した。Wild type (WT)の細菌由来の KcsA にはサソリ毒の Agitoxin2 はほとんど結合しないが、変異を入れた R64D 体を脂質膜に可溶化した系では Agitoxin2 は KcsA に対して1:1で結合した。一方、R64D を界面活性剤で可溶化しただけの系では Agitoxin2 は過剰に結合した。これは界面活性剤で可溶化しただけでは KcsA は変性しやすく、Agitoxin2 が非特異吸着してしまうためである。振動数変化のカーブフィッティングから求めた

結合のパラメーターは  $k_{on} = 2.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{off} = 5.7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ,  $K_a = 4.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  であった。類似の測定値がないので得られた値を直接比較することは出来ないが、 $K_a = 10^6 \text{ M}^{-1}$  という結合定数はチャンネルブロッカーの結合定数としては妥当な値である。

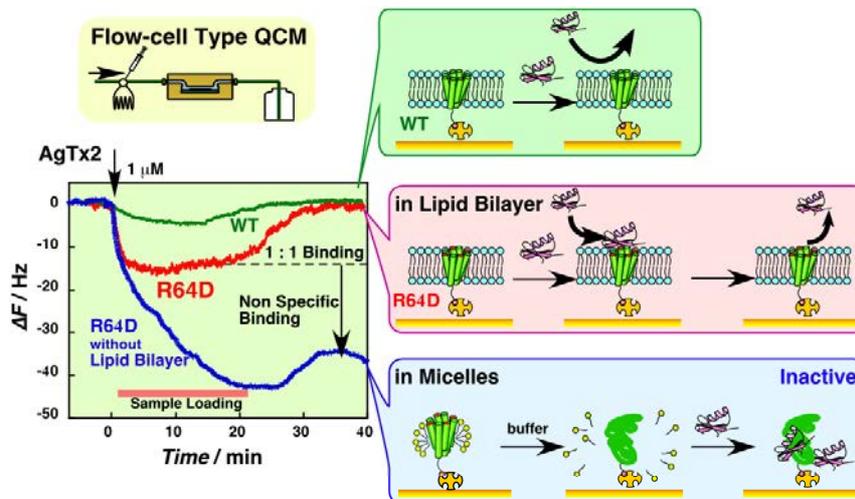


図 26 QCM 上に固定化した WT の KcsA、脂質膜に固定化した R64D の KcsA、界面活性剤に可溶化した R64D-KcsA への Agitoxin2 の結合挙動(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 μM EDTA, 100 mM NaCl, 50 mM KCl, 0.1% DDM, 25 °C, Flow Rate 25 mL/min)

## (2)研究成果の今後期待される効果

QCM 基板上に膜タンパク質を脂質二分子膜と共に高密度に配向を保ちながら固定化でき、シグナル分子の結合の動力学解析が出来たことは、今後の膜レセプターへの種々の薬物の結合挙動を解析する上に有用であり、今後の創薬分野への応用が期待できる。

### 3.3 リボソームでの翻訳過程の定量化(古澤グループ)

#### (1)研究実施内容及び成果

##### <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などまだまだ解明しなければならない課題は多い。例えば、翻訳が開始されるためには開始複合体が形成されなければならないが、その過程すら不明な点が多い。図27に示すように、教科書的には70S リボソームは開始因子 IF3 の作用により30S リボソームと50S リボソームに解離し、SD 配列を認識できる30S が最初に mRNA に結合し、ついで50S リボソームや fMet-tRNA<sub>i</sub> が結合して開始複合体が作製されると提唱されている。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。

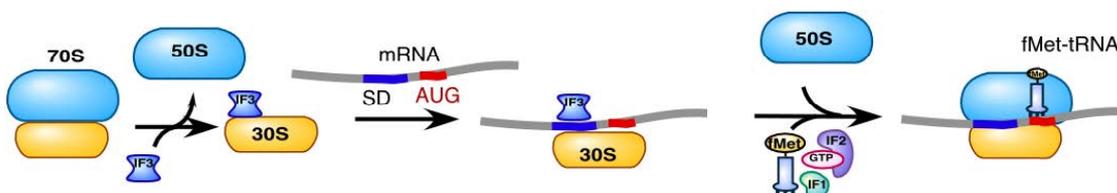


図 27 mRNA にリボソームが開始因子 (IF1, IF2, IF3) や fMet-tRNA と共に結合して開始複合体が形成される過程の予想図

##### <実験方法>

リボソームが特異的に結合する Shine-Dalgarno (SD)配列と tRNA<sub>i</sub> が結合する AUG 開始コドンを持つ mRNA を cDNA から逆転写により作製した。3' 末端にビオチンを導入し、アビジン固定化 QCM 上に固定化した。70S、50S、30S リボソームを添加した時の振動数変化を測定した。

##### <結果と考察>

図28に mRNA 固定化 QCM へのリボソームの結合挙動を示した。SD 配列を認識できる30S リボソームは mRNA に結合するが、50S リボソームにはほとんど結合しない。しかしこれまで結合しないと考えられていた70S リボソームが予想外にも mRNA に解離することなく結合することがわかった。結合過程の振動数変化から結合速度定数 ( $k_{on}$ )、解離速度定数 ( $k_{off}$ )、結合定数 ( $K_a$ ) を求めて表6にまとめた。

50S リボソームは mRNA にほとんど結合しないが、70S は30S と同じような結合定数と結合・解離速度定数で結合することがわかった(表6の Run 1-3)。また70S は SD や AUG 開始コドンを持たない mRNA や、SD 配列を anti-SD の DAN でブロックした mRNA にもほとんど結合しないので SD 配列に特

異的な結合であることがわかる (Run 4 と 5)。mRNA の5' 末端を anti-UTR でブロックした mRNA には70S が結合できないことから、70S リボソームは5' 末端から滑りながら mRNA に結合するのではなく、横方向から結合すると考えられる。AUG 開始コドンを認識する fMet-tRNA<sub>i</sub> 共存下では70S リボソームの結合定数 ( $K_a$ ) は2倍ほど上昇したが、AUG を UUG に置き換えた mRNA への  $K_a$  は1/3に低下した (Run 7 と 8)。

リボソームの片方を架橋して解離しないようにした70S は SD 配列を持つ mRNA には結合できなかった (Run 9)。しかし、AUG 開始コドンを5' 末端に持つ mRNA には結合速度は遅くなるが、結合することがわかった (Run 10)。

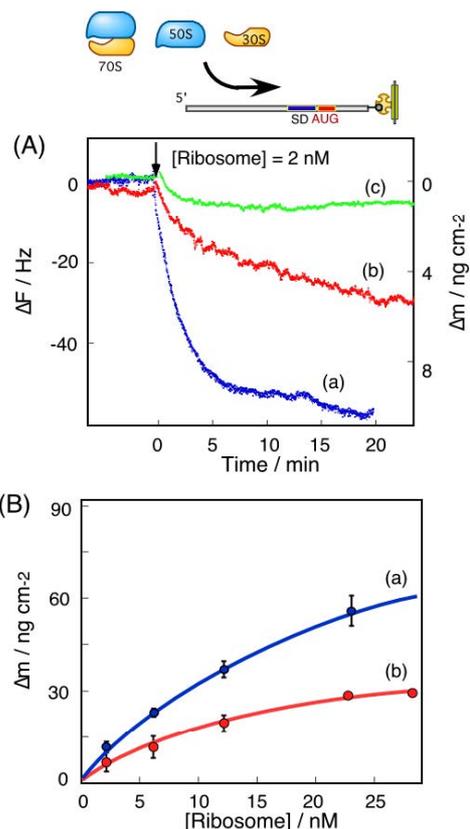


図 28 (A) mRNA 固定化 QCM への (a)70S、(b)30S、(c)50S リボソームの結合挙動と (B) (a)70S、(b)30S リボソームの飽和結合挙動 (10 mM HEPES-KOH, pH 7.3, 100 mM NH<sub>4</sub>Cl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 °C)

表 6 種々の mRNA へのリボソームの結合パラメーター<sup>a</sup>

Run	Diagram	$\Delta m_{\max}$ /ng cm <sup>-2</sup>	Molar Ratio vs 30S	$K_a$ / 10 <sup>7</sup> M <sup>-1</sup>	$k_{\text{on}}$ / 10 <sup>4</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	$k_{\text{off}}$ / 10 <sup>-4</sup> s <sup>-1</sup>
1		48	1	5.6 (6.2) <sup>b</sup>	16	27
2		—	—	—	—	—
3		110	0.8	4.3 (6.8) <sup>b</sup>	18	26
4		—	—	—	—	—
5		—	—	—	—	—
6		48	0.4	12	—	—
7		120	0.9	10	—	—
8		144	1.1	2.6	—	—
9		—	—	—	—	—
10		130	1.0	2.7 (9.2) <sup>b</sup>	5.0	5.4

<sup>a</sup> 10 mM HEPES-KOH, pH 7.3, 100 mM NH<sub>4</sub>Cl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 °C.

<sup>b</sup> Association constants determined from  $k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$ .

これらの結果は、70S リボソームは解離することなく mRNA の SD 配列に横から結合して、開始複合体を形成できることを示している。これまで、70S は一度 30S と 50S に解離してから mRNA に結合すると考えられていたが、こういう通常の経路のほかにも解離しないでそのまま mRNA に結合する経路もあり得るのではないかとということがわかった(図4参照)。

(2)研究成果の今後期待される効果

翻訳過程は多くの因子が複雑に絡み合っ mRNA の遺伝情報からタンパク質を発現している。これまで知られていなかった新しいルートで開始複合体が形成されることが重量変化として追跡することで明らかになった。今後、リボソームの伸長過程、解離過程についても検討する必要がある。

3.4 生体分子の粘弾性と水和の評価(川崎グループ)

(1)研究実施内容及び成果

<目的>

これまでの研究では水晶発振子を発振回路を用いて強制発振させ、物質が吸着したときの重量増加を振動数減少として検出していた。これとは別に水晶発振子をネットワークアナライザーに接続して周波数を掃引すると共振周波数がコンダクタンスの最大値( $F_s$ )として表れる(図29)。基板上に弾性体が吸着するとピークトップが低波数側にシフトし、このシフト量は発振回路での振動数変化と対応する。一方、基板上に粘性体が吸着すると振動エネルギーが粘性体に伝わりにくいためにエネルギー散逸が起こり、ピークはブロード化して低波数側にシフトする。エネルギー散逸の程度は  $D = (F_2 - F_1) / F_s$  のピークの広がり具合で表される。

タンパク質や DNA 鎖のような生体分子を QCM 基板上に固定化すれば、生体分子の水和により空气中に比べて大きな振動数減少( $\Delta F$ )と、生体分子の柔らかさのためにエネルギー損失( $\Delta D$ )が大きくなることが予測される。すなわち水中で種々の生体分子が基板上に結合したときの  $\Delta F$  値と  $\Delta D$  値を測定すれば、生体分子の水和の度合いと柔らかさが予測できる。

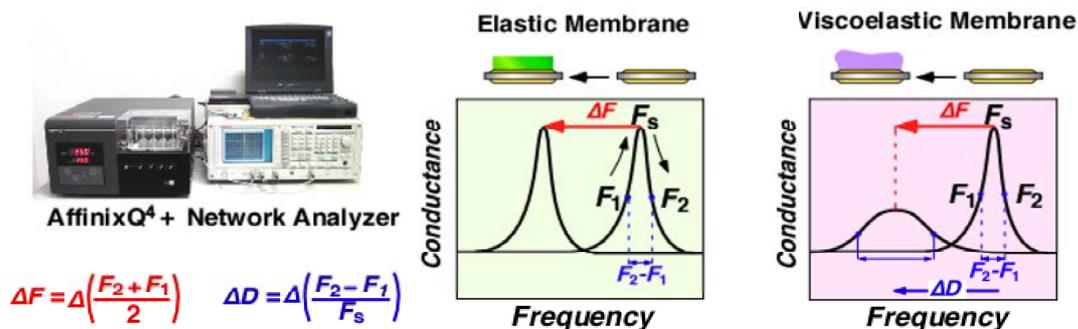


図 29 ネットワークアナライザーを用いたエネルギー散逸( $\Delta D$ )測定法の原理図

<実験方法>

図30に示すように、QCMの振動数Fとエネルギー損失値Dを、空气中、水中に浸けた時、物質が結合した時、空气中に取り出して乾燥した時に測定し、空气中で物質が結合したときの振動数変化 $\Delta F_{\text{air}}$ 、水中で結合したときの振動数変化 $\Delta F_{\text{water}}$ とエネルギー損失値 $\Delta D_{\text{water}}$ を求めた。

<結果と考察>

QCM基板上にポリスチレン高分子(PS)、BSAタンパク質、二本鎖DNAの固定化量を変化させたときの結果を図31にまとめた。PSは $\Delta F_{\text{air}}$ に対する $\Delta F_{\text{water}}$ の変化量は同じ、すなわち $\Delta F_{\text{water}}/\Delta F_{\text{air}}$ の傾きは1であり、空气中と水中での振動数変化は同じであり、疎水的な膜なので水和していないことがわかる。また、単位質量あたりのエネルギー損失値 $\Delta D_{\text{water}}/\Delta F_{\text{air}}$ はほとんど0であり、PSは硬い膜であることがわかる。また、タンパク質であるBSAを固定したときは、 $\Delta F_{\text{water}}/\Delta F_{\text{air}}=2.5$ であり、空气中に比べて2.5倍も水中で振動数変化が大きく、これは自重の $[(\Delta F_{\text{water}}/\Delta F_{\text{air}})-1]=1.5$ 倍も水和していることを表している。 $\Delta D_{\text{water}}/\Delta F_{\text{air}}=1.6 \times 10^{-6}$ と少しエネルギー損失があるが、このエネルギー損失は水和水を振っているためである。一方、DNA鎖を固定化したときは、 $\Delta F_{\text{water}}/\Delta F_{\text{air}}=6.3$ と共に $\Delta D_{\text{water}}/\Delta F_{\text{air}}=19 \times 10^{-6}$ も非常に大きくなり、DNA鎖は柔らかくて水和していることがわかった。

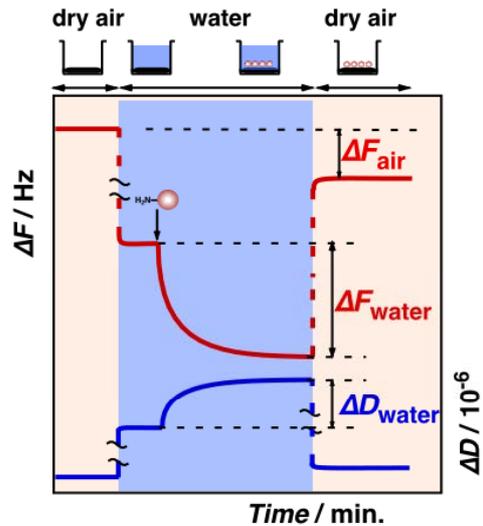


図30 QCM基板上に物質が結合したときの空气中での振動数変化( $\Delta F_{\text{air}}$ )、水中での振動数変化( $\Delta F_{\text{water}}$ )とエネルギー損失値( $\Delta D_{\text{water}}$ )の測定方法

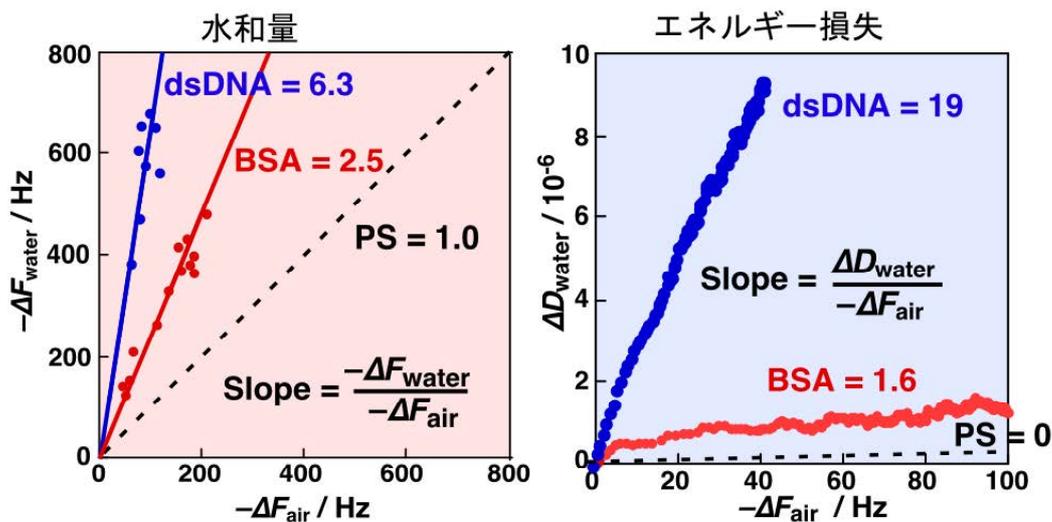


図31 QCM基板上にポリスチレン(PS)、BSAタンパク質、二本鎖DNAを固定化量( $\Delta F_{\text{air}}$ )を変化させて結合したときの(左) $\Delta F_{\text{water}}$ と(右) $\Delta D_{\text{water}}$ の変化の度合い。各々の直線の傾きはそれぞれ水和量とエネルギー損失量を表す。

種々の生体高分子を QCM 基板上に固定化し、 $\Delta F_{\text{water}}/\Delta F_{\text{air}}$  と  $\Delta D_{\text{water}}/\Delta F_{\text{air}}$  を求め、水和量  $[(\Delta F_{\text{water}}/\Delta F_{\text{air}})-1]$  に対してエネルギー損失量  $\Delta D_{\text{water}}/\Delta F_{\text{air}}$  をプロットし、図 32 にまとめた。ポリスチレン(1. PS)や金ナノ粒子(2. AuNP)は原点付近にプロットされ、水和していないで、エネルギー損失のない硬い物質であることがよくわかる。ポリジメチルシロキサン(3. PDMS)は疎水的なゴムであり、水和はしていないが、少しエネルギー損失のある柔らかい膜であることがわかる。

ニュートラビジン(4)、グルコースオキシダーゼ(5)、ミオシン(6)、ビオチン化カルモジュリン(7. Bio-Calmodulin)、ビオチン化 BSA(8. Bio-BSA)は一本の直線上にプロットされた。この直線は、硬い膜が水和したときにそのエネルギー損失が水和水を振動させるときのみにおけると仮定した理論式である。すなわち、タンパク質は各々水和量は多少異なるが、エネルギー損失のない硬い物質であることがわかる。一方、ポリエチレングリコール鎖(10, 11. PEG)、DNA 鎖(12. ssDNA, 13. dsDNA)、プルラン糖鎖(14-17)は直線から右側に大きく外れ(エネルギー損失が大きくなり)、その度合いは分子量(長さ)と共に大きくなった。すなわち、DNA 鎖や糖鎖のようにひも状の分子は柔らかく、水中で振動させたときにはエネルギー損失も大きく、水和量も多いことがわかった。

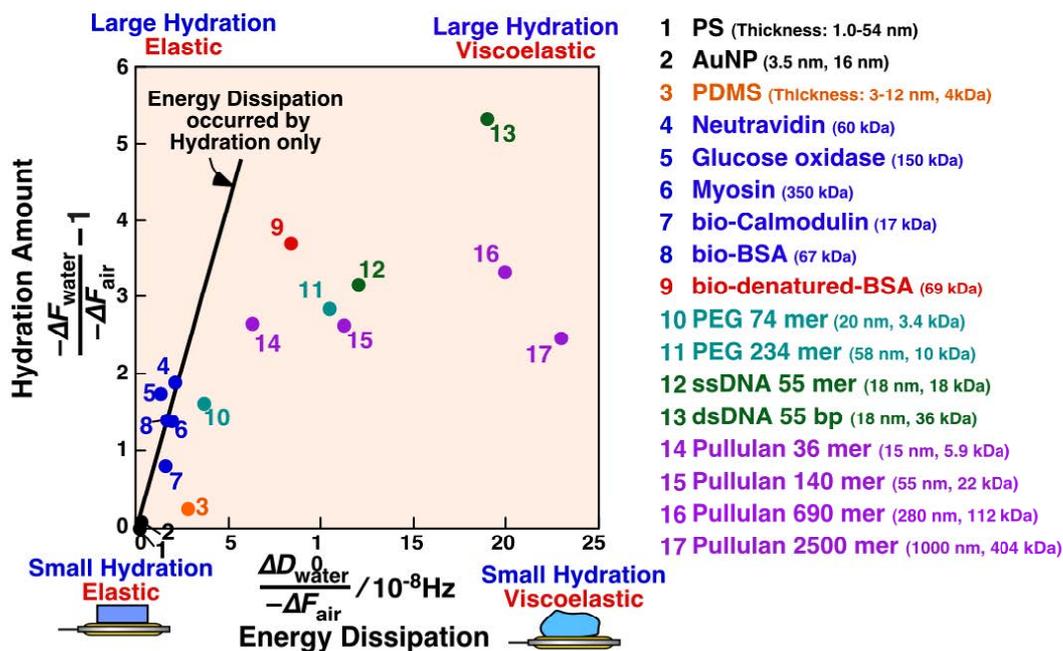


図 32 種々の生体高分子の水和量とエネルギー損失の相関関係。図中の直線は硬い膜のエネルギー損失がその水和量だけでおけると考えたときの理論式から求めたもの。

$\Delta F$  値と  $\Delta D$  値を同時に測定することにより基板上的物質の水和量やそれに伴う分子の硬さ・柔らかさが予測できることがわかった。この事を利用すれば、分子のコンフォメーション変化が予測できる。図 33 の左側には、ミオグロビンの pH を低下させたときの  $\alpha$  ヘリックスが壊れてランダムコイル状になるときの水和量とエネルギー損失値の可逆的な変化を示した。ミオグロビンはランダムコイル化することによ

り硬いコンフォメーション(直線上のプロット)から右上方向、すなわち水和量が増大しエネルギー損失も増大(柔らかくなる)する事がわかる。BSA の SS 結合をヨード酢酸と反応させて SS 結合を切断すると BSA は完全に変性し、直線上のプロットから大きく右上に外れる。

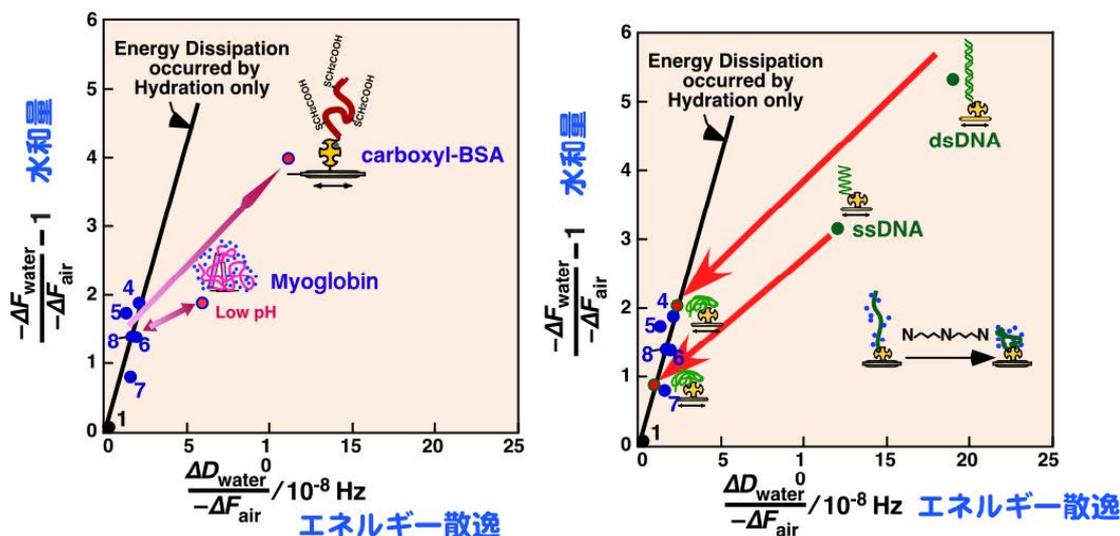


図 33 (左)タンパク質のコンフォメーション変化(変性)と(右)DNA 鎖の伸縮に対する水和量とエネルギー損失値の変化

DNA 鎖はスペルミジンなどのオリゴカチオンが結合すると収縮するといわれている。図 33 右に示すように DNA にスペルミジンを加えるとそのプロットはタンパク質の直線上に乗るように変化した。すなわち DNA 鎖は伸びた構造をしているがオリゴカチオンが結合する事により収縮し、脱水和して硬い構造になり、結果的にはタンパク質と同じくらい硬くなる事がわかる。二本鎖の dsDNA の方が一本鎖の ssDNA より伸びた構造をしており、収縮しても dsDNA の方が少し柔らかい構造になることもわかった。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

ネットワークアナライザー法を用いて  $\Delta F$  と  $\Delta D$  を同時に測定することにより QCM 基板の上に結合した生体分子の水和量と硬さが予測できることがわかった。この方法を展開すれば、分子の外部刺激によるコンフォメーション変化が追跡できる。また、タンパク質が DNA 鎖に結合する時にはそのコンフォメーションが大きく変化することが知られている。多くの酵素反応でも基質は反応の進行に伴い、酵素の形や柔らかさが変化するともいわれている。本法を発展させれば、反応の進行に伴うタンパク質や生体分子の構造変化と定量的に追跡することが出来る。

## 3.5 多機能で高感度な水晶発振子装置の開発(吉嶺グループ)

### (1) 研究実施内容及び成果

酵素反応を動的に追跡したり、膜タンパク質上に小さなシグナル分子が結合するのを追跡したり、

mRNA 上へのリボソームや開始因子の結合を観察したりするためには、高感度で安定な測定装置が必要である。

＜装置の高感度化とフロー装置化＞

我々はこれまで、**図 34**に示すように手作りの第1世代の装置、製品化した第2世代の装置 (AFFINIX Q、セル容量8 mL)、セル容量を 0.5 mL にして4チャンネル化した第3世代の装置 (AFFINIX Q4)を開発してきた。いずれも水晶発振子を固定化したセルにサンプル溶液をインジェクションするバッチ式であり、測定時間が長くとれる、装置化が簡単である、などの長所を持つ反面、濃いサンプル溶液が必要、セルがオープンであるので外部からの影響を受けやすいなどの欠点がある。しかし、AFFINIX Q でも DNA 鎖へのタンパク質、酵素、リボソームのような比較的大きな分子の結合であれば十分に測定できた。一方、レセプタータンパク質への低分子薬物の結合などの測定をするためには、10倍以上の高感度化が望まれる。

前出の**図 25** に示したように、セルと発振回路周辺の温度制御を $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ から $\pm 0.001^{\circ}\text{C}$ に精度を上げ、発振回路を光カップラーで外部ノイズから遮断し、セル容量が  $10\ \mu\text{L}$  の微量フローセル化することで、従来のバッチ式の AFFINIX Q4 のノイズレベル $\pm 1\ \text{Hz}$ 、ドリフト巾  $7\ \text{Hz/h}$  が、ノイズレベル $\pm 0.05\ \text{Hz}$ 、ドリフト巾  $0.5\ \text{Hz/h}$  に大幅に向上した。**3. 2**で述べた KcsA イオンチャネルへのチャンネルブロッカーペプチチド Agitoxin2 の結合は、バッチ式の AFFINIX Q4 では正確に求められなかったが、新しく開発したフロー式で初めて正確に測定できるようになった。高感度化(実際は低ノイズ化)する事により、これまで測定が困難であった大きな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でき、創薬化学に大きく貢献することが期待できる。

現在は、**図 35** に示すようなフローセルをマイクロ流路に組み込んだ装置を開発中である。

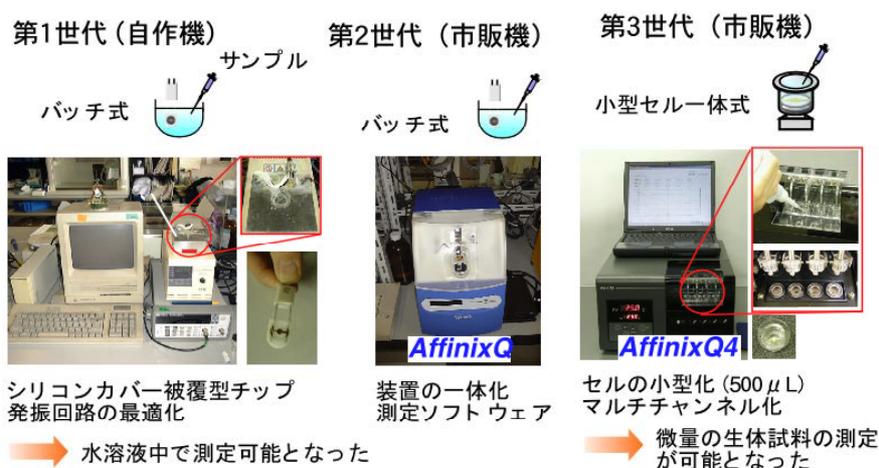


図 34 これまでのバッチ式 QCM 装置の開発の経緯

< 水晶板のカット角の変更 >

別紙参照

(2) 研究成果の今後期待される効果

マイクロ流路型測定装置はノイズレベル±0.05 Hz の高感度なので、低分子薬物の結合が観察でき、創薬分野に利用できる。水晶発振子のカット角を改良する事により水中での温度依存性が 1/100になったので、装置の小型化により手に持てるサイズになった。モバイル型のバイオセンサとして利用価値は高い。

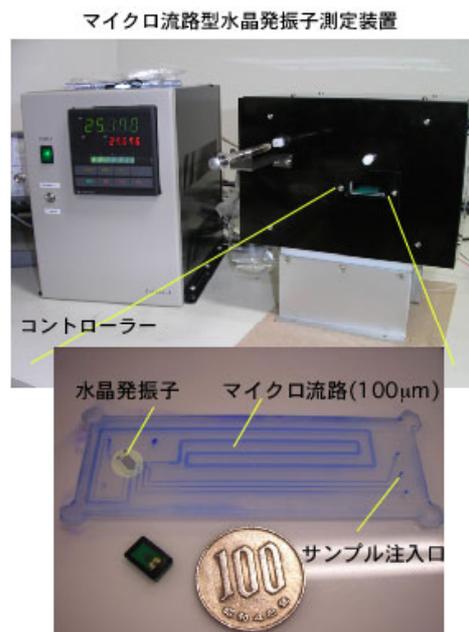


図 35 マイクロ流路化フローセル装置の試作機

4 研究参加者

① 森グループ(酵素反応の解析)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
森 俊明	東工大・生命理工	助教授	糖鎖上での酵素反応	平成 13 年 10 月 ～平成 19 年 3 月
蒲池 利章	東工大・生命理工	助教授	大腸菌から酵素の調製	平成 13 年 10 月 ～平成 16 年 3 月
仁平 高則	東工大・フロンティア	CREST 研究員	糖関連酵素の発現 と酵素反応の解析	平成 14 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
西野 秀和	東工大・生命理工	大学院生	DNA上での酵素反応	平成 14 年 4 月～ 平成 16 年 3 月
福所 しのぶ	東工大・生命理工	大学院生	DNA上での酵素反応	平成 14 年 4 月～ 平成 16 年 3 月
中山 元	東工大・生命理工	大学院生	糖鎖上での酵素反応	平成 14 年 4 月～ 平成 16 年 3 月

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
石井 雅美	東工大・生命理工	大学院生	タンパク質上での酵素反応	平成14年4月～平成16年3月

② 川崎グループ(生体分子の粘弾性の測定)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
川崎 剛美	東工大・生命理工	助手	生体分子の粘弾性の測定	平成13年10月～平成19年3月
関 隆広	東工大・資源研	助教授	ネットワークアナライザのソフト開発	平成13年10月～平成14年3月
包 山虎	東工大・フロンティア	CREST 研究員	生体分子の粘弾性の測定	平成15年4月～平成16年3月
鄭 信賀	東工大・生命理工	大学院生	糖鎖の固定化	平成14年4月～平成16年3月
佐々木 裕輔	東工大・生命理工	大学院生	生体分子の粘弾性の測定	平成14年4月～平成16年3月
小関 智光	東工大・生命理工	大学院生	生体分子の粘弾性の測定	平成14年4月～平成18年3月
五味 研二	東工大・生命理工	大学院生	生体分子の粘弾性の測定	平成14年4月～平成17年3月

③ 古澤グループ(複雑な生体分子間相互作用の測定)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
古澤 宏幸	東工大・生命理工	助手	生体分子間相互作用の測定	平成13年10月～平成19年3月
松野 寿生	東工大・フロンティア	CREST 研究員	DNAとタンパク質の相互作用	平成13年10月～平成15年3月

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
重松 秀樹	東工大・フロンティア	CREST 研究員	タンパク質の発現と精製	平成 14 年 4 月～平成 17 年 3 月
星野 友	東工大・生命理工	大学院生	タンパク質の発現と精製	平成 14 年 4 月～平成 16 年 3 月
浅岡 健太郎	東工大・生命理工	大学院生	リボソームの精製	平成 14 年 4 月～平成 16 年 3 月
村川 明子	東工大・生命理工	大学院生	リボソームの精製	平成 15 年 4 月～平成 18 年 3 月
高橋 俊太郎	東工大・生命理工	大学院生	mRNA へのリボソームの結合	平成 15 年 4 月～平成 18 年 9 月
今井 兼平	東工大・生命理工	大学院生	mRNA へのリボソームの結合	平成 15 年 4 月～平成 17 年 3 月
南出 麻子	東工大・生命理工	大学院生	mRNA へのリボソームの結合	平成 15 年 4 月～平成 17 年 3 月
三友 秀之	東工大・生命理工	大学院生	mRNA へのリボソームの結合	平成 15 年 4 月～平成 17 年 3 月
関根 朋美	東工大・生命理工	大学院生	膜タンパク質の精製	平成 15 年 4 月～平成 17 年 3 月
片田 順一	東工大・生命理工	大学院生	膜タンパク質の精製とシグナル分子の結合	平成 15 年 4 月～平成 17 年 3 月
高橋 潤	東工大・生命理工	大学院生	膜タンパク質の精製とシグナル分子の結合	平成 15 年 4 月～平成 17 年 3 月

④ 吉嶺グループ(水晶発振子測定装置の開発)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
吉嶺 浩司	東工大・フロンティア	CREST 研究員	水晶発振子測定装置の開発	平成15年7月～ 平成19年3月
藤島 礼佳	東工大・フロンティア	大学院生	水晶発振子カット角の検討	平成13年10月～ 平成15年3月
森田 瑞樹	東工大・フロンティア	大学院生	水晶発振子カット角の検討	平成14年4月～ 平成17年3月
秋田 涼子	東工大・生命理工	大学院生	水晶発振子カット角の検討	平成14年4月～ 平成16年3月
石津 縁	東工大・生命理工	大学院生	フロー型装置の開発	平成16年4月～ 平成18年3月
柴田 真吉	東工大・生命理工	大学院生	フロー型装置の開発	平成16年4月～ 平成18年3月
長谷川美玲	東工大・生命理工	大学院生	フロー型装置の開発	平成16年4月～ 平成18年3月
真中 雄一	東工大・生命理工	大学院生	マイクロ流路装置の開発	平成15年4月～ 平成18年3月
高野 広樹	東工大・生命理工	大学院生	マイクロ流路装置の開発	平成17年4月～ 平成19年3月
平野 孝充	東工大・生命理工	大学院生	マイクロ流路装置の開発	平成17年4月～ 平成19年3月
与那嶺 雄介	東工大・生命理工	大学院生	マイクロ流路装置の開発	平成17年4月～ 平成19年3月
森田 貴之	東工大・生命理工	大学院生	マイクロ流路装置の開発	平成17年4月～ 平成19年3月
豊田 百々子	東工大・生命理工	大学院生	簡易型装置の開発	平成17年4月～ 平成19年3月
磯部 英美	東工大・生命理工	大学院生	簡易型装置の開発	平成17年4月～

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
片田 順一	東工大・生命理工	大学院生	簡易型装置の開発	平成 19 年 3 月 平成 17 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
高橋 潤	東工大・生命理工	大学院生	簡易型装置の開発	平成 17 年 4 月～ 平成 19 年 3 月

## 5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
小宮山真(東大・教授)	DNA の切断についての講演	東工大・生命理工	平成 15 年 6 月
篠原 康郎(北大・助教授)	糖鎖の構造についての共同研究	東工大・フロンティア	平成 17 年 3 月 平成 18 年 3 月

## 6 成果発表等

### (1)原著論文発表 (国内誌 3 件、国際誌 52 件)

- (1) H. Matsuno, K. Niikura, and Y. Okahata, Design and Characterization of Asparagine- and Lysine-Containing Alanine-based Helical Peptides That Bind Selectively to A•T Base-Pairs of Oligonucleotides Immobilized on a 27 MHz Quartz Crystal Microbalance, *Biochemistry*, **40**, 3615-3622 (2001).
- (2) H. Matsuno, K. Niikura, and Y. Okahata, Direct Monitoring and Kinetic Studies of DNA Polymerase Reactions on a DNA-immobilized Quartz-Crystal Microbalance, *Chem. Eur. J.*, **7**, 3305-3312 (2001).
- (3) M. Naito, Y. Sasaki, T. Dewa, Y. Aoyama, and Y. Okahata, Effect of Solvation on Induce-fit Molecular Recognition in Supercritical Fluid to Organic Crystals immobilized on a Quartz Crystal Microbalance, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 11037-11041 (2001).
- (4) H. Matsuno, H. Furusawa, and Y. Okahata, Kinetic analyses of ATP-dependent deoxyribonuclease (DNase) reactions on a quartz-crystal microbalance, *Nucleic Acids Res. Suppl.*, **1**, 261-262 (2001).

- (5) M. Tanaka, A. Mochizuki, T. Motomura, K. Shimura, M. Onishi, and Y. Okahata, In Situ Studies on Protein Adsorption onto a Poly(2-methoxyethylacrylate) Surface by a Quartz Crystal Microbalance, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **193**, 145–152 (2001).
- (6) H. Kaneda, M. Takachika, K. Shinotzuka, and Y. Okahata, Adsorption to or Desorption of Beer Components from a Lipid Membrane Related to Sensory Evaluation, *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 221–226 (2001).
- (7) H. Kaneda, K. Shinotzuka, T. Kobayakawa, S. Saito, and Y. Okahata, Beer Adsorption on a Lipid Membrane as Related to Sensory Evaluation, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **59**, 167–171 (2001).
- (8) 金田 弘拳、渡 淳二、高塩 仁愛、岡畑 恵雄, 水晶発振子型脂質膜センサーを用いた渋味評価法の開発, *日本味と匂学会誌*, **8**, 457–460 (2001).
- (9) T. Mori and Y. Okahata, Preparation of a Lipid-Coated Enzyme and Activity for Reverse Hydrolysis Reactions in Homogeneous Organic Media, *Methods in Biotechnology*, vol. 15: *Enzymes in Non-aqueous Solvents: Methods and protocols*, ed. by E. N. Halling and H. L. Holland, chapter 9, p. 83–94, Humana Press, Inc. Totowa, NJ (2001).
- (10) H. Soata, H. Yoshimine, M. Gotoh, Y. Hasegawa, and Y. Okahata, a Novel Quartz-Crystal Microbalance-based Planar Sensor Design For Highly Sensitive non-Leveling Biomolecule Detection, *Micro Total Analysis Systems 2001 (Proceedings of the mTAS 2001 Symposium, Monterey, CA, 21–25 October 2001)*, ed. by J. M. Ramsey and A. Berg, pp. 579–580, Kluwer Academic Pub., Dordrecht, The Netherlands, (2001).
- (11) 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).
- (12) T. Mori, M. Li, A. Kobayashi, and Y. Okahata, Reversible Control of Enzymatic Transglycosylations in Supercritical Fluoroform using a Lipid-Coated  $\beta$ -D-Galactosidase, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 1188–1189 (2002).
- (13) 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).
- (14) 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).

- (15) 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).
- (16) 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).
- (17) 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).
- (18) H. Nishino, T. Mori, and Y. Okahata, Enzymatic silicone polymerization catalyzed by a lipid-coated lipase, *Chem. Commun.*, 2684-2685 (2002).
- (19) 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).
- (20) 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).
- (21) 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).
- (22) 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).
- (23) T. Ozeki, H. Furusawa, and Y. Okahata, In vitro selection of four way junction DNA, *Nucleic Acids Res. Suppl.*, No. 3, 257-258 (2003).
- (24) 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).
- (25) 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).
- (26) 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).
- (27) 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).
- (28) 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).
- (29) 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).
- (30) 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).
- (31) 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).
- (32) 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).
- (33) 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).
- (34) 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).
- (35) 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).
- (36) 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).
- (37) 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).
- (38) 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).
- (39) 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).
- (40) 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).
- (41) 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).
- (42) 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).
- (43) T. Kawasaki, K. Asaoka, K. Mihara, and Y. Okahata, Nonfibrous  $\beta$ -structured aggregation of an A $\beta$  model peptide (Ad-2  $\alpha$ ) on GM1/DPPC mixed monolayer surfaces, *J. Colloid Inter. Sci.*, **294**, 295-303 (2006).
- (44) Y. Hoshino, T. Kawasaki, and Y. Okahata, Effect of Ultrasound on DNA Polymerase Reactions: Monitoring on a 27-MHz Quartz Crystal Microbalance, *Biomacromolecules*, **7**, 682-685 (2006).
- (45) T. Mori, Y. Tsuchiya, and Y. Okahata, Polymerizations of Tetrafluoroethylene in Homogeneous Supercritical Fluoroform and in Detergent-free Heterogeneous Emulsion of Supercritical Fluoroform/Water, *Macromolecules*, **39**, 604-608 (2006).
- (46) T. Ozeki, H. Furusawa, and Y. Okahata, Evaluation of RNA Structures by using a Probe-immobilized 27 MHz Quartz Crystal Microbalance, *Chem. Lett.*, 46-47 (2006).
- (47) J. J. J. P. van den Beucken, M. R. J. Vos, P. C. Thune, T. Hayakawa, T. Fukushima, Y.

- Okahata, X. F. Walboomers, N. A. J. M. Sommerdijk, R. J. M. Nolte, and J. A. Jansen, Fabrication, characterization, and biological assessment of multilayered DNA-coatings for biomaterial purposes, *Biomaterials*, **27**, 691-701 (2006).
- (48) T. Fukushima, T. Hayakawa, K. Okamura, S. Takeda, Y. Inoue, K. Miyazaki, and Y. Okahata, Buffer Solution Can Control the Porosity of DNA-Chitosan Complexes, *J. Biome. Mater. Res., Part B, Applied Biomater.*, **76B**, 121-139 (2006).
- (49) Y. Inoue, T. Fukushima, T. Hayakawa, R. Ogura, H. Kaminishi, K. Miyazaki, and Y. Okahata, Antifungal activity of DNA-lipid complexes and DNA-lipid films against candida species, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, **76A**, 126-132 (2006).
- (50) J. J. J. P. van den Beucken, X. F. Walboomers, O. C. Boerman, M. R. J. Vos, N. A. J. M. Sommerdijk, T. Hayakawa, T. Fukushima, Y. Okahata, R. J. M. Nolte, J. A. Jansen, Functionalization of multilayered DNA-coatings with bone morphogenetic protein 2, *J. Controlled Release*, **113**, 63 - 72 (2006).
- (51) T. Hoshiba, C. S. Cho., A. Murakawa, Y. Okahata, and T. Akaike, The effect of natural extracellular matrix deposited on synthetic polymers on cultured primary hepatocytes, *Biomaterials*, **27**, 4519-4528 (2006).
- (52) Y. Okahata, T. Mori, and H. Furusawa, Enzyme Reactions on a 27 MHz Quartz-Crystal Microbalance, *Piezoelectric Sensors, Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors*, Springer Verlag (in press).
- (53) T. Ozeki, M. Morita, H. Yoshimine, H. Furusawa, and Y. Okahata, Hydration and Viscoelasticity Measurements of Biomolecules on a Piezoelectric Quartz Oscillator by using Admittance Analysis, *Anal. Chem.*, (in press).
- (54) S. Takahashi, H. Matsuno, H. Furusawa, and Y. Okahata, Kinetic Analyses of Divalent Cations-dependent EcoRV Digestions on a DNA-immobilized Quartz Crystal Microbalance, *Anal Biochem.*, in press
- (55) H. Mitomo, H. Shigematsu, E. Kobatake, H. Furusawa, and Y. Okahata, IgG Binding Kinetics to Oligo B Protein A Domains on Lipid Layers Immobilized on a 27 MHz Quartz-Crystal Microbalance, *J. Mol. Rec.*, in press.

(2)その他の著作物(総説、書籍などを記載してください。)

- (1) 実川 友史、岡畑 恵雄、「水晶発振子バイオセンサ」による水溶液中の生体物質の測定, 超音波Techno, No. 5, 12-16 (2001).

- (2) 岡畑 恵雄, 匂いセンサ, 「僕もノーベル賞をとるぞ」、高分子学会編、p 86-87、朝日新聞社 (2001).
- (3) 森 俊明, 岡畑 恵雄, 3.3 超臨界流体中での酵素反応, 超臨界流体, 佐古 猛編, p. 154-170、アグネ承風社 (2001).
- (4) 岡畑 恵雄, 分子認識を重さで測る, 先端ウオッチング「分子認識化学」、日本化学会 (2001).
- (5) 生体分子測定器を製品化 研究に必要で開発, 日経産業新聞、平成13年5月9日 (2001).
- (6) 岡畑 恵雄、古澤 宏幸, 分子認識を重さで測る, 先端ウオッチングシリーズ、丸善 (in press).
- (7) 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).
- (8) 岡畑 恵雄, 素描「次世代に残せるテーマ」、高分子, 51, 231 (2002).
- (9) 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).
- (10) 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).
- (11) 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, N0.12, 14-21 (2002).
- (12) 岡畑 恵雄, 古澤 宏幸, 水晶発振子マイクロバランス法 ム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)
- (13) 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).
- (14) 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).
- (15) 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).
- (16) 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).
- (17) 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).
- (18) 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).
- (19) 岡畑 恵雄, DNAフィルム, 化学装置、4月号, 60-62 (2003).

- (20) 岡畑 恵雄, 味覚や嗅覚を重さで測る, ぶんせき, No. 10, 606-609 (2003).
- (21) 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).
- (22) 岡畑 恵雄, 進むバイオとナノテクの融合, OHM, 7月号, 12-13 (2003).
- (23) 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).
- (24) 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).
- (25) 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).
- (26) 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).
- (27) 岡畑 恵雄、古澤 宏幸, 気—水界面での生体分子認識を重さで測る —水晶発振子マイクロバランス法の応用—, 表面科学, 25, No. 3, 131-138 (2004).
- (28) 岡畑 恵雄、川崎 剛美, DNA配向化フィルム, 図解 バイオ活用技術のすべて、東工大生命理工編、工業調査会, 196-199 (2004).
- (29) 森 俊明、岡畑 恵雄, 糖鎖の伸長・分解に関わる酵素反応を重さで測る, バイオインダストリー, 21, No. 5, 58-64 (2004).
- (30) 岡畑 恵雄、川崎 剛美, DNAから作るバイオフィルムの機能化, 蛋白質・核酸・酵素, 49, No. 9, 1328-1332 (2004).
- (31) 森 俊明、岡畑 恵雄, 6-6 脂質修飾酵素, 図解 バイオ活用技術のすべて、東工大編、p.220-224, 工業調査会 (2004).
- (32) 岡畑 恵雄, バイオ計測の新展開 水晶発振子を用いる生体分子間相互作用の測定, 日刊工業新聞, 31面、2004年9月14日 (2004).
- (33) 岡畑 恵雄, バイオテクノロジーとナノテクノロジーの融合, Ohm Bulletin, vol. 40, No. 165, p4-6 (2004).
- (34) 岡畑 恵雄, 二分子膜, 化学便覧 (丸善) (2004).
- (35) 岡畑 恵雄・古澤 宏幸, 水晶発振子マイクロバランス法, 蛋白質 核酸 酵素 (バイオ高性能機器・新技術利用マニュアル), 49, No. 11, 1754-1758 (2004).
- (36) 岡畑 恵雄、森 俊明, 第3章 超臨界流体中での分子認識と酵素反応, 超臨界流体の最新応用技術、p. 69-94, エヌ・ティ・エス (2004).

- (37) 川崎 剛美、岡畑 恵雄, 14. 単分子膜・LB膜とナノ材料, 超分子化学 ーナノ材料創製に向けて、中嶋直敏編、p. 143-153, 化学同人 (2004).
- (38) 日用品にナノテク駆使(超臨界流体でフッ素コーティング), 日経産業新聞、2004年12月(2004).
- (39) 岡畑 恵雄、古澤 宏幸, 3-10-2 QCMセンサー, 「先端の分析法:理工学からのバイオまで」、梅沢・澤田・寺部編、エヌティエス、(in press).

(3)学会発表(国際学会発表のみを記載した)

- (1) Yoshio Okahata and Hajime Nakayama, A DNA-aligned Cast Film and its Electron Conductivity, Electronic Interactions and Electron Dynamics in DNA, UCLA, USA, 2001 年 9 月 04-08 日.
- (2) Yoshio Okahata and Hajime Nakayama, A DNA-aligned Nanowire Film, The first Asian Symposium on Nanotechnology and Nanoscience (AsiaNANO 2001), 理化学研究所, 2001 年 10 月 9-10 日.
- (3) Y. Okahata and T. Mori, Enzyme Reactions in Supercritical Fluids by using a Lipid-coated Enzyme, Japan-Italy Symposium on New Trends in Enzyme Science and Technology, 京都, 2001 年 11 月 12,13 日.
- (4) Y. Okahata and T. Mori, Reversible Reaction Control of Lipid-coated Enzymes in Supercritical Fluid, International Meeting on the Fundamental Aspects of Supercritical Fluids, 京都, 2001 年 12 月 5-7 日.
- (5) Y. Okahata, A DNA-aligned Cast Film and its Electron Conductivity, the 201st Meeting of The Electrochemical Society, Mechanistic Aspects of Biological Electron Transfer, Philadelphia, USA, 2002 年 5 月 13-15 日.
- (6) Y. Okahata, Kinetic Studies of Molecular Recognition on DNA by Using a 27 MHz QCM, the First IEEE Sensors 2002 Conference, Orlando, USA, 2002 年 6 月 12-14 日.
- (7) Y. Okahata, Kinetic Studies of Molecular Recognition on DNA by Using a 27 MHz QCM, QCM 2002, Brighton, UK, 2002 年 7 月 24-25 日.
- (8) H. Sota, H. Yoshimine, R. F. Whittier, Y. Shinohara, L. Fägerstam, P. Fricking, M. Vangbo and Y. Okahata, A NOVEL QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE-BASED SENSOR DESIGN FORHIGHLY SENSITIVE BIOMOLECULE DETECTION, QCM 2002, Brighton, UK, 2002 年 7 月 24-25 日.
- (9) M. Naito, Y. Sasaki, T. Dewa, Y. Aoyama, and Y. Okahata, Nucleobase Molecular

- Recognition in Supercritical Carbon Dioxide by using a Highly Sensitive 27 MHz Quartz-Crystal Microbalance, QCM 2002, Brighton, UK, 2002 年 7 月 24-25 日.
- (10) 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, QCM 2002, Brighton, UK, 2002 年 7 月 24-25 日.
- (11) 岡畑 恵雄, DNA配向化フィルムやナノワイヤーの電導性, インテリジェント材料/システム国際シンポジウム, タイム24ビル(お台場), 2002 年 10 月 30 日.
- (12) Y. Okahata, H. Nakayama, S. Tajima, and S. Ujiie, Preparation of DNA-aligned Film by using its Thermotropic Liquidcrystalline Behaviors, IUPAC-PC 2002, 京都国際会議場, 2002 年 12 月 02-05 日.
- (13) J. Katada, H. Nakayama, T. Kawasaki, and Y. Okahata, Prparation of a DNA-Nanowire and its Evaluation of Electron Conductivity, IUPAC-PC 2002, 京都国際会議場, 2002 年 12 月 02-05 日.
- A. Minamide, T. Kawasaki, and Y. Okahata, Preparation and Electric Conductivity Studies of Single-Walled Carbon Nanotube /DNA Complex Film, IUPAC-PC 2002, 京都国際会議場, 2002 年 12 月 02-05 日.
- (14) Y. Okahata, Preparation of a DNA-Nanowire and Its Evaluation of Electron Conductivity, Australian Colloid & Interface Sympsium, Australia-Japan Symposium, Sydney, 2003 年 2 月 17-19 日.
- (15) Yoshio Okahata, Kinetic Studies of Molecular Recognition on DNA by using a Quartz-Crystal Microbalance, Institute of Molecular and Celluar Biology Seminar, Univ. of Lois Pasteur, 2003 年 3 月 6 日.
- (16) Yoshio Okahata, A DNA Bio-Plastic Film, Maison Universitaire, France-Japon/JSPS Liaison Office, Strasbourg, 2003 年 3 月 4 日.
- (17) T. Ozeki, H. Furusawa and Y. Okahata, In vitro selection of four way junction DNA, 国際核酸化学シンポジウム, 札幌, 2003 年 9 月 17-19 日.
- (18) Y. Okahata, Preparation of a DNA-aligned Film and its Application for Electronic Device, Sweden-Japan Bionanotechnology Workshop, 京都国際ホテル, 2003 年 11 月 9-11 日.
- (19) T. Ozeki, H. Furusawa, and Y. Okahata, In vitro selection of four way junction DNA on a QCM, The 1st International Symposium on Biomolecular Chemistry, 淡路夢舞台国際会議場, 2003 年 12 月 02-05 日.

- (20) Y. Hoshino, T. Kawasaki, and Y. Okahata, Control of Lybozyme Activity by Weak ultrasound Irradiation, The 1st International Symposium on Biomolecular Chemistry, 淡路夢舞台国際会議場, 2003年12月02-05日.
- (21) H. Shigematsu, K. Tsumoto, I. Kumagai, and Y. Okahata, Interaction Analyses of Erythropoietin Receptor and EMPI Ligand on a Quarts-Crystal Microbalance, The 1st International Symposium on Biomolecular Chemistry, 淡路夢舞台国際会議場, 2003年12月02-05日.
- (22) H. Furusawa, H. Ishii, M. ishii, and Y. Okahata, Observation of a Specific Interaction between One Residue-Replaced Leucine-Zipper Peptides, The 1st International Symposium on Biomolecular Chemistry, 淡路夢舞台国際会議場, 2003年12月02-05日.
- (23) T. Mori, H. Nishino, T. Nihira, and Y. Okahata, Direct Monitoring of Glucan Hydrolysis by Glucoamylase on a Quartz-Crystal Microbalance, The 1st International Symposium on Biomolecular Chemistry, 淡路夢舞台国際会議場, 2003年12月02-05日.
- (24) Yoshio Okahata, Gravimetric Kinetics of Enzymatic Reactions on a Quartz-Crystal Microbalance, 4th Symopjiunm on DNA/RNA Protein for nanotechnology, 淡路島夢舞台, 2003年12月2日.
- (25) Y. Okahata, K. Gomi, and T. Kawasaki, A DNA-based Electroluminescent Film, The 2004 Japan-Australia International Symposium on Colloid Science, 山口東京理科大学, 2004年9月9-11日.
- (26) Yoshio Okahata, A DNA-aligned Film and its Application for Electromaterials, The 12th International Symposium on Advanced Materials, つくば, 2004年12月7-10日.
- (27) Yoshio Okahata, A DNA-based Electroluminescence Film, Nanoelectronics and Dynamics of DNA, Honolulu (Hawaii), 2005年8月8/29-9/2日.
- (28) Yoshio Okahata, Detection of Conformation Changes of Liposomes and Proteins on a QCM, 8th Japan- Australia Colloid and Interface Symposium, Terrigal, Sydney, 2005年11月27-30日.
- (29) H. Mitomo, H. Furusawa, and Y. Okahata, Kinetic analyses of protein-protein interaction on lipid membrane using a quartz-crystal microbalance, Pacificchem 2005, Honolulu, Hawaii, 2005年12月15-20日.
- (30) Y. Okahata, Molecular Recognition on DNA immobilized on a 27 MHz Quartz-Crystal microbalance, Pacificchem 2005, Honolulu, Hawaii, 2005年12月15-20日.
- (31) Y. Okahata, In situ detection of Biomolecules by using a 27 MHz quartz-crystal microbalance,

- Pacificchem 2005, Honolulu, Hawaii, 2005 年 12 月 15-20 日.
- (32) T. Kawasaki, Y. Hoshino, Y. Ishizu, Y. Mizushiro and Y. Okahata, Effects of Ultrasound Irradiation on Thermolysin Activity, Pacificchem 2005, Honolulu, Hawaii, 2005 年 12 月 15-20 日.
- (33) T. Kawasaki, J. Katada, S. Tasaki, Y. Okahata, Laser-QCM, a Novel Tool for Surface Analyses, Pacificchem 2005, Honolulu, Hawaii, 2005 年 12 月 15-20 日.
- (34) T. Mori, Y. Sekine, and Y. Okahata, Nano-scale immobilization of polysaccharides on polymer substrates in supercritical fluid, Pacificchem 2005, Honolulu, Hawaii, 2005 年 12 月 15-20 日.
- (35) T. Mori, A. Fujishima, N. Sugiura, K. Kimata, and Y. Okahata, Direct Monitoring of carbohydrate elongations by Chondroitin Synthase on a 27-MHz Quartz-Crystal, Pacificchem 2005, Honolulu, Hawaii, 2005 年 12 月 15-20 日.
- (36) Y. Hoshino, Y. Mizushiro, T. Kawasaki, and Y. Okahata, Analysis of Weak Ultrasound Effect on DNA Polymerase Activity Using a Quartz Crystal Microbalance (QCM), Pacificchem 2005, Honolulu, Hawaii, 2005 年 12 月 15-20 日.
- (37) H. Furusawa, S. Horie, Y. Sasaki, and Y. Okahata, Effects of the number and location of a cationic amino acid residue on a DNA-peptide interaction, Pacificchem 2005, Honolulu, Hawaii, 2005 年 12 月 15-20 日.
- (38) T. Ozeki, H. Furusawa, and Y. Okahata, Hydration and viscoelasticity measurements of biomacromolecules by using FS-QCM based on impedance analysis, Pacificchem 2005, Honolulu, Hawaii, 2005 年 12 月 15-20 日.
- (39) S. Takahashi, R. Akita, H. Furusawa, T. Ueda, and Y. Okahata, Kinetic study of the initial events for protein synthesis by using a quartz crystal microbalance, Pacificchem 2005, Honolulu, Hawaii, 2005 年 12 月 15-20 日.
- (40) M. Komatsu, T. Ozeki, H. Furusawai, and Y. Okahata, In situ observation of conformation changes of proteins by using FS-QCM based on impedance analysis, Pacificchem 2005, Honolulu, Hawaii, 2005 年 12 月 15-20 日.
- (41) Y. Ishizu, M. Shibata, H. Furusawai, I. Shimada, and Y. Okahata, Analysis of a binding activity of inhibitor proteins to KcsA Channel Membrane Proteins on a QCM plate, Pacificchem 2005, Honolulu, Hawaii, 2005 年 12 月 15-20 日.
- (42) T. Hirano, Y. Kitagawa, H. Furusawa, and Y. Okahata, Evaluation of shrinkage of aquaporin-liposomes by using FS-QCM based on impedance analysis, Pacificchem 2005,

- Honolulu, Hawaii, 2005 年 12 月 15-20 日 .
- (43) M. Hasegawa, K. Imai, T. Mori, and Y. Okahata, Surface Modification by Penetrated Polymerization of Tetrafluoroethylene in Supercritical Fluids , Pacificchem 2005, Honolulu, Hawaii, 2005 年 12 月 15-20 日 .
- (44) Murakawa, T. Mori, and Y. Okahata, Kinetic Analysis of Glycogen Phosphorylase on a 27 MHz Quartz-crystal Microbalance, Pacificchem 2005, Honolulu, Hawaii, 2005 年 12 月 15-20 日 .
- (45) R. Akita, S. Takahashi, H. Furusawa, S. Umekage, T. Ueda, and Y. Okahata, Analysis of the translation elongation process for protein synthesis by using a quartz crystal microbalance, Pacificchem 2005, Honolulu, Hawaii, 2005 年 12 月 15-20 日 .
- (46) H. Yoshimine, Y. Yonamine, H. Furusawa, and Y. Okahata, Design of a quartz crystal microbalance for a flow-highly sensitive detection system and application to detection of small biomolecules, Pacificchem 2005, Honolulu, Hawaii, 2005 年 12 月 15-20 日 .
- (47) M. Shibata, T. Nihira, Y. Kang, M. Adachi, B. Mikami, T. Mori, and Y. Okahata, Gravimetric analysis of amylose hydrolysis by site-directed mutagenic beta-amylase on a 27 MHz Quartz-Crystal Microbalance, Pacificchem 2005, Honolulu, Hawaii, 2005 年 12 月 15-20 日 .
- (48) Yoshio Okahata, Detection of Biomolecular Interactions and Enzyme Reactions on a 27-Mhz Quartz-Crystal Microbalance, Maui Nanobiotech Symposium, Maui (Hawaii), 2005 年 12 月 11-15 日 .
- (49) Yoshio Okahata, Molecular Recognitions and Enzyme Reactions on a Quartz-Crystal Microbalance, International Symposium on Bio- and Nano-Electronics in Sendai, Sendai, 2006 年 3 月 2-3 日 .
- (50) H. Furusawa, M. Komatsu, T. Oseki, and Y. Okahata, In situ Monitoring of Conformation Changes of Calmodulin by Using a FS-QCM System based on Admittance Analysis, 第 20 回国際生化学・分子生物学会議, 京都国際会議場, 2006 年 6 月 19-23 日 .
- (51) H. Takano, H. Furusawa, and Y. Okahata, Kinetic Analyses of Enzymatic Protein Hydrolyses Catalyzed by Carboxypeptidase P on a Quartz-Crystal Microbalance (QCM), 第 20 回国際生化学・分子生物学会議, 京都国際会議場, 2006 年 6 月 19-23 日 .
- (52) S. Takahashi, R. Akita, H. Furusawa, Y. Shimizu, T. Ueda. and Y. Okahata, Evaluation of the initial complex formation in E.coli translation by using a quartz crystal microbalance (QCM), 第 20 回国際生化学・分子生物学会議, 京都国際会議場, 2006 年 6 月 19-23 日 .
- (53) Murakawa, N. Itano, K. Kimata, R. Kannagi, T. Mori. and Y. Okahata, Effect of Phospholipid

- for Stabilization of Hyaluronan Synthase 2 Expressed by Baculovirus-Infected Insect Cells, 第 20 回国際生化学・分子生物学会議, 京都国際会議場, 2006 年 6 月 19-23 日.
- (54) H. Mitomo, Y. Ishizu, H. Furusawa, T. Tsukasaki, H. Mori, K. Ito, and Y. Okahata, Preparation of supported lipid membrane for analyses of membrane proteins on a quartz-crystal microbalance (QCM), 第 20 回国際生化学・分子生物学会議, 京都国際会議場, 2006 年 6 月 19-23 日.
- (55) T. Mori, A. Fujishima, N. Sugiura, K. Kimata, and Y. Okahata, Direct Monitoring of carbohydrate elongations by Chondroitin Polymerase on a 27-MHz Quartz-Crystal Microbalance, International Symposium on Extracellular Glycomatrix in Health and Disease, 淡路夢舞台国際会議場, 2006 年 6 月 15-17 日.
- (56) Murakawa, N. Itano, K. Kimata, R. Kannagi, T. Mori, and Y. Okahata, Preparation of Hyaluronan Synthase 2 by Baculovirus-Infected Insect Cells Expression System, International Symposium on Extracellular Glycomatrix in Health and Disease, 淡路夢舞台国際会議場, 2006 年 6 月 15-17 日.
- (57) Yoshio Okahata, Biomolecular Interactions on a 27 MHz Quartz-Crystal Microbalance (QCM), The 1st joint Biotechnology Research Symposium between Thailand and Japan, 東工大すずかけホール, 2006 年 7 月 3 日.
- (58) Yoshio Okahata, Biomolecular Interactions on a 27 MHz Quartz-Crystal Microbalance (QCM), Tsinghua-Tokyo Tech & Shizuoka Cancer Center Triangle Symposium On Cancer Biology & Bioengineering, 静岡がんセンター, 2006 年 10 月 27 日.

(4)特許出願

なし

(5)受賞等

①受賞

なし

②新聞報道

- (1) 生体分子測定器を製品化、研究に必要で開発, 日経産業新聞、平成 13 年 5 月 9 日 (2001).
- (2) 水晶発振子を測定器に活用, 日本経済新聞、平成 14 年 4 月 10 日 (2002).
- (3) 酵素反応自在に制御, 日経産業新聞、平成 14 年 4 月 25 日 (2002).
- (4) 酵素反応速度を制御, 日刊工業新聞、平成 14 年 5 月 10 日 (2002).

- (5) においセンサー 抜群の性能、実用段階、福島民報、平成 14 年 4 月 30 日 (2002).
- (6) 人工センサー 調香師にわずかに負け、神戸新聞(夕刊)、平成 14 年 5 月 1 日 (2002).
- (7) 進むメカニズムの解明 能力高い人工センサー、中部経済新聞、平成 14 年 5 月 4 日 (2002).
- (8) 能力高い人工センサー、大分合同新聞(夕刊)、平成 14 年 5 月 13 日 (2002).
- (9) 能力高い人工センサー、高知新聞、平成 14 年 5 月 13 日 (2002).
- (10) 「人工センサー」を開発、実用段階へ、静岡新聞(夕刊)、平成 14 年 6 月 1 日 (2002).
- (11) バイオVBに財務の知恵、日本経済新聞(夕刊)、平成 14 年 9 月 12 日 (2002).
- (12) 複数試料同時に イニシウム、センサー開発、日本経済新聞、平成 14 年 9 月 13 日 (2002).
- (13) ナノグラムレベルの物質 水溶液中で効率検出、日刊工業新聞、平成 14 年 11 月 5 日 (2002).
- (14) 日本のトップ研究者(DNAQCM論文の引用件数)、日経産業新聞、平成 15 年 2 月 25 日 (2003).
- (15) SNPを効率検出 水晶発振子の振動数変化で 東工大が新手法、日刊工業新聞、平成 15 年 5 月 1 日 (2003).
- (16) 光るDNAで薄膜 天井・壁の発光材料に、日経産業新聞、平成 15 年 6 月 16 日 (2003).
- (17) プラスチック眼鏡レンズ 曇らず汚れず 東工大がフッ素処理技術、日本経済新聞、平成 15 年 6 月 16 日 (2003).
- (18) バイオ・産業化の潮流 新分野へ挑戦する食品メーカー(株)ニチロ、日本食糧新聞、平成 15 年 6 月 18 日 (2003).
- (19) 分子間相互作用解析装置 表面プラズモン共鳴法に好敵手出現、日経バイオビジネス 平成 15 年 6 月 15 日 (2003).
- (20) 糖鎖を基板上に簡易に固定、日刊工業新聞、平成 15 年 9 月 2 日 (2003).
- (21) 生体反応を経時測定 水晶発振子を使った QCM 法、化学工業日報、2003 年 10 月 27 日 (2003).
- (22) 実用化に3つのハードル 加速する大学発ベンチャーと産学連携、朝日新聞、2003 年 11 月 12 日 (2003).
- (23) 糖鎖の分解過程を観察 重さの変化追跡 医薬開発に応用、日経産業新聞、2003 年 11 月 (2003).
- (24) 日用品にナノテク駆使(超臨界流体でフッ素コーティング)、日経産業新聞、2004 年 12 月 (2004).

- (25) プラスチックに糖鎖を結合, プラスチックエージ, vol., 51 4月、p 65 (2005).
- (26) プラスチックに糖鎖結合(シャーレ再利用・細胞を大量培養), 日経産業新聞、2005年1月11日 (2005).
- (27) ビールの「こく」と「きれい」の評価 水晶発振子センサーで計測, 日経産業新聞、2005年7月1日 (2005).
- (28) 人工血管 血栓できにくく 東工大が加工技術 ヒアルロン酸で柔軟に, 日経産業新聞、平成17年2月8日 (2005).
- (29) ビールのコクとキレを数値化, 朝日新聞、平成17年5月1日 (2005).
- (30) 細胞培養、生存率高く 東工大、再生医療向けに, 日経産業新聞、平成18年5月18日 (2006).
- (31) バイオ計測新展開 水晶発振子マイクロバランス法を用いる生体分子間相互作用の測定, 日刊工業新聞、2004年9月14日 (2004).

### ③その他

なし

### (6)その他特記事項

水晶発振子測定装置として AFFINIX Q および AFFINIX Q4 を市販化した。

## 8 結び

本研究プロジェクトにより、水晶発振子を用いた生体分子間相互作用の研究は飛躍的に進んだ。その理由として、1) 専門分野に詳しい博士研究員を雇用することにより研究の伸展の度合いが大きくなった。また、学生への良い意味での影響が大きく、学生の教育のためにもなった。2) 高額の研究費が比較的自由に使え、研究が進展した。3) 高額の装置を導入でき、研究にタイムリーに役立った。4) 研究総括の相澤先生が絶えず研究の進捗状況を把握し、成果発表会での発表は刺激になった。5) 他の研究チームとの競争も良い刺激になった。

今回のプロジェクトでの成功を基にして、また新しいプロジェクト研究を立ち上げたい。

