

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19750130

研究課題名 (和文) 生分解性高分子・生体分子間相互作用の評価と実空間解析技術の開発

研究課題名 (英文) Estimation of Interaction between Degrading Enzyme and Biodegradable Polymer and Development of Its Technique

研究代表者

藤田 雅弘 (FUJITA MASAHIRO)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室 研究員

研究者番号：50342845

研究成果の概要：生分解性高分子材料の分解寿命制御技術の開発の一環として、材料表面への分解酵素の吸着メカニズムの解明を目指した。原子間力顕微鏡 (AFM) 探針に分解酵素を固定化することで酵素をプローブとして用い、材料表面との微小な吸着力を測定する新規検出法を構築してきた。*Ralstonia pickettii* T1 由来の PHB 分解酵素の野生型ならびに変異酵素を用いて、吸着部位の機能の詳細を調べた。基質材料としてポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸]とポリ(L-乳酸)を対象とし、AFM 法による吸着力測定と動的分子間力分光法、表面プラズモン共鳴法による速度論解析の観点から相互作用評価を行った。これらのことから、吸着に関与するアミノ酸残基の特定と吸着メカニズムの提案に至った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	360,000	3,360,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合科学・環境関連化学

キーワード：生分解性高分子／分解酵素／分子認識／相互作用／界面科学／原子間力顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

プラスチック製品の廃棄物処理等に起因した環境汚染が問題となる中、自然環境中で微生物により分泌される分解酵素によって加水分解される生分解性高分子材料が注目されている。なかでも糖や植物油から作られる微生物産生バイオポリエステルは、自然環境下での生分解性という特徴に加え、石油資源に頼らない次世代材料としても期待され

ており、世界的に実用化に向けた研究開発が進められている。バイオポリエステルが材料として様々な用途で利用されるためには、目的の物性 (主に力学的性質) が持続的に発揮され、使用後には速やかに分解されなければならない。分解と力学的性質の持続と相反する性能・機能を両立するためには、材料の分解寿命を制御することが必要となるが、未だ自由に制御するには至っていない。

バイオポリエステルの酵素分解は、分解酵素分子の材料表面への吸着、次いで分子鎖の加水分解と二段階で進行する固液界面での分解反応である。分解反応性は材料の固体構造に大きく依存するため、従来、分解と固体構造との相関から分解制御因子の解明を行ってきた。本研究課題では一段階目の吸着反応に着目し、酵素吸着の抑制から材料の分解寿命を延ばすという別の視点に立ち、分解酵素の吸着機構の解明を目指した。

本研究課題に先立ち、最近、原子間力顕微鏡 (AFM) 探針に分解酵素分子を固定化することで分解酵素を「プローブ」として用い、バイオポリエステル表面との微小な吸着力を直接測定する新規検出法を構築することに着手し、成功した (図 1)。この研究では、材料表面に吸着する機能を有する分解酵素の基質吸着部位 (Substrate-Binding Domain: SBD) を AFM 探針に固定化して用いた。固定化は His-tag 法により行った。この方法による固定化は、分子の配向を維持することが出来るため、固定化後も機能を有するという大きな特徴を有しており、基質吸着特異性を調べるのに非常に適していた。

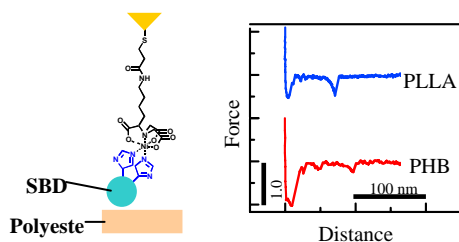


図 1. 分解酵素固定化プローブによるポリエステルとの吸着力測定. SBD:分解酵素の基質吸着部位、PLLA:ポリ(L-乳酸)、PHB:ポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸].

## 2. 研究の目的

本研究では、これまで構築してきた AFM による分子間力計測法を駆使して、野生型のみならず変異酵素も用いて相互作用評価を行い、PHB 分解酵素の吸着機構の詳細を解明することにした。さらには、固定化法の改善や測定系の最適化を行い、分解酵素のバイオポリエステル表面に対する吸着特性をマッピングする評価システムの構築のための基礎研究もあわせて検討することにした。

## 3. 研究の方法

本研究では、基質材料として代表的な微生物



図 2. PHB 分解酵素の分解反応の模式図.

物産生バイオポリエステルであるポリ[(R)-3-ヒドロキシブタン酸] (PHB) と、その分解酵素として *Ralstonia pickettii* T1 由来の PHB 分解酵素を用いた。この PHB 分解酵素は、PHB 分子鎖を加水分解する「触媒部位」、基質表面と吸着する「基質吸着部位 (SBD)」とそれらをつなぐ「リンカー領域」で構成されている (図 2)。加水分解反応は、SBD を介して基質表面に吸着し、その後触媒部位により分子鎖の切断を生じる二段階の反応と言われている。そこでこれまでの研究同様、本研究においても SBD のみを AFM 探針に His-tag により固定化する方法を採用する。この方法は、SBD が本来有する吸着機能を損なうことなく実験に供することができるのが利点である。本研究で用いる分解酵素が吸着特異性を示すその他のポリエステル試料 (ポリヒドロキシアルカン酸やポリ(L-乳酸) (PLLA)) に対しても AFM による分子間力測定を遂行した。AFM 探針を材料表面に近づけて接触させ。その後引き離す際に得られるフォースカーブ (図 1) を測定する。すべてのフォースカーブ測定はリン酸緩衝液中室温で行った。フォースカーブの極小値を破断力 (すなわち吸着力) に起因すると見なした。統計処理を行うことで一分子あたりの分子間力を見積もった。

一方で AFM 測定とは別に、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による速度論解析を行った。SPR センサーチップ上に PHB あるいは PLLA 薄膜を作製し、その基板表面に対する SBD の吸着挙動を測定、解析することで相互作用評価を行った。

## 4. 研究成果

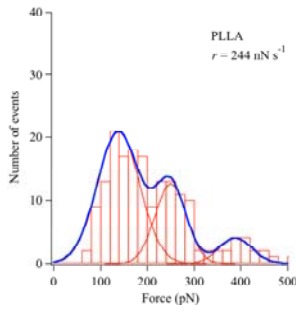


図 3. 吸着力のヒストグラムの例. 縦軸は出現頻度を表す. 最初の分布関数のピーク位置を分子間の最頻破断力とした.

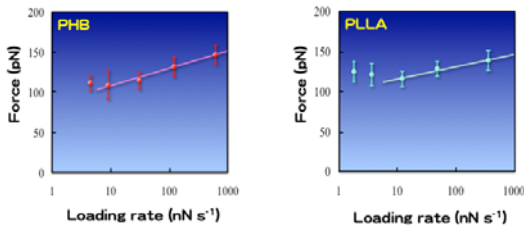


図 4. 分解酵素の吸着力 (破断力) の負荷速度依存性: (左) PHB、(右) PLLA.

AFM による分子間力計測では、いくつかの異なる負荷速度で AFM 探針を接触、引き剥がしながら測定を行った。200 回以上のフォースカーブ測定を実行し、統計処理の結果 (図 3)、一酵素あたりおよそ 100 pN 程度の大きさで PHB や PLLA に吸着することがわかった。しかし、その吸着力は負荷速度に依存した (図 3)。これは、吸着・脱離におけるエネルギー障壁が外力によりその高さを変えるためである。ゆえにこの結果に基づいて、PHB 分解酵素の吸着・脱離反応におけるポテンシャルエネルギーの分子間距離依存性を得ることができる。つまり吸着の安定性などを議論することができる。Bell-Evans のモデルによれば、破断力は負荷速度の対数に比例する。図 4 中の直線はその領域を示したものである。その結果、バイオポリエステル分解酵素の相互作用のエネルギー地形を明らかにすることができた。また PHB と PLLA との間で大き

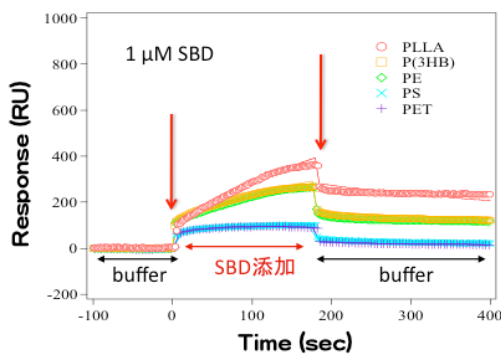


図 5. 様々な高分子材料に対する SBD の吸着挙動の SPR センサグラム.

な差異は認められなかったが、わずかながら PLLA の方が安定に吸着しうることが示唆された。しかしながら、この実験で測定される吸着力や反応エネルギー地形が、目的とする分解酵素-高分子間相互作用に由来するものなのかという問題が残る。例えばスパーサー分子の乖離や結合破断が生じていないとも限らない。そこで本研究では別の手法により上記の結果を検証した。流水下において SBD の材料表面への吸着・脱離を SPR 法により追跡することとした。

SPR による速度論解析においても相互作用のエネルギー状態を明らかにすることができるので、AFM から導きだされたそれと比較検討した。図 5 に示すように、分解酵素は PHB や PLLA に高い親和性を有していることがわかる。速度論解析の結果に基づくポテンシャルエネルギーの分子間距離依存性を調べたところ、両者は良い一致をみた。吸着状態におけるポテンシャルエネルギーあるいは吸着力の大きさを考慮すると、SBD とバイオポリエステルとの相互作用は、複数のアミノ酸残基が関与するものと考えられる。すなわち水素結合や疎水性相互作用などの複数の相互作用からなると推察できる。

次に、変異酵素を用いて、上記と同様の実験を行い、吸着に関与するアミノ酸残基を、本研究で遂行する力学的および速度論的観点から同定することを試みた。二次構造予測および親疎水性予測を行い、441 番目のロイシン (Leu) を His に置換した L441H、および 445 番目のセリン (Ser) をシステイン (Cys) に置換した S445C の変異酵素を対象として、実験を行った。円偏光二色性スペクトル測定より、変異導入による二次構造への影響が無いことを確認した。PHB ならびに PLLA の表面に対し分子間力計測を行ったところ (図 6)、L441H の吸着頻度は野生型 (WT) と比べ同等であったものの、吸着力が大幅に減少した。一方 S445C の吸着頻度は WT と比べ大幅に減少したものの、吸着力はさほど減少しなかった。これらの結果から、L441 は周辺の疎水性アミノ酸残基と共に疎水性相互作用に関与する要素であり、吸着を促進する重要な役割を担っていると考えられる。一方 S445 は基質表面のエステル基と水素結合を形成する能力があると考えられ、分解酵素が材料表面に安定して存在するための重要な役割を担っていると思われる。おそらく、このアミノ酸残基がバイオポリエステルに対する高親和性の要因と推察される。L441H 変異酵素の時に明瞭な負荷速度依存性を示さなかった理由は不明のままである。

上記の分子間力計測法では、AFM 探針への SBD の固定化量を制御していない。一回の吸

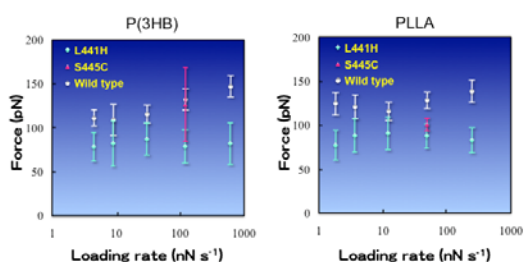


図 6. SBD 野生型 (WT) と変異酵素 (L441H および S445C) の固定化プローブを用いたときの吸着力とその負荷速度依存性：(左) PHB、(右) PLLA.

着力測定で多数の SBD が材料表面に吸着するため、分子間の破断に起因するフォースカーブ中の極小が複数出現する(例えば図 1 参照)。また、距離 0 に出現する極小は AFM 探針やスパーサー分子が関与する非特異吸着が大きく寄与する。材料表面の吸着特性のマッピングのためには、これら非特異吸着を極力排除し、望ましくは目的のシグナルが一つだけ現れるようなフォースカーブを得なければならない。そこで本研究では、SBD と結合させるスパーサー分子の探索とグラフト密度の制御を検討した。スパーサー分子の自由末端側がトリエチレングリコールからなる有機化合物の利用が有効であること、またニトリロ三酢酸 (NTA) を持たないダミー分子を適度に混合させて、最終的な SBD 固定化量を制御しうることなどが明らかとなった。定点における分子間力計測において、SBD の破断に由来する一つの極小のみを比較的良く得ることができた。しかしながら、その出現頻度が低いため、吸着特性の 2 次元マッピングが再現良く得ることは現時点ではできていない。今後さらに検討を進め、効率よく吸着特性をマッピングできる新規プローブの設計と開発が必要となる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 平石知裕、藤田 雅弘：“バイオプラスチックの分解酵素の吸着・触媒機能”、*バイオインダストリー*、**24**、71-78 (2007). 査読無
- ② N. Matsumoto, M. Fujita\*, (ほか 3 名)：“Adsorption Characteristics of P(3HB) Depolymerase as Evaluated by Surface Plasmon Resonance and Atomic Force Microscopy”, *Biomacromolecules*, **9**, 3201-3207 (2008). 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 松本 信彦：“PHB 分解酵素の基質への吸

着に関する力学的・速度論的解析”、高分子学会 (第 56 回高分子学会年次大会)、平成 19 年 5 月 29 日、京都市

- ② 松本 信彦：“力学的および速度論的手法による PHB 分解酵素の吸着メカニズム”、高分子学会 (第 56 回高分子討論会)、平成 19 年 9 月 19 日、名古屋市

- ③ 松本信彦：“原子間力顕微鏡法による PHB 分解酵素基質吸着ドメインの機能解析”、高分子学会 (第 57 回高分子年次大会)、2008 年 5 月 28 日、横浜市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田 雅弘 (FUJITA MASAHIRO)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工  
学研究室・研究員

研究者番号：50342845

### (2) 研究協力者

松本 信彦 (MATSUMOTO NOBUHIKO)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工  
学研究室・研修生 (東京工業大学大学院総  
合理工学研究科・博士後期課程大学院生)