

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20510100

研究課題名（和文） 振動と光を用いたタンパク質物性の多次元解析と機能制御

研究課題名（英文） Multi-dimensional Analysis of Protein Properties and Functional Control of Them by Using Vibration and Optical Methodologies

研究代表者

川崎 剛美（KAWASAKI TAKAYOSHI）

東京工業大学・大学院生命理子学研究科・助教

研究者番号：60334504

研究成果の概要（和文）：

水晶発振子表面の物質吸着と反応を振動数変化と、発振子表面からの光反射強度変化から同時に二元的に測定する測定装置の開発を行った。光反射強度測定的手法として、金の異常反射を増強する手法、および、チタン・酸化チタン表面を用いた反射干渉分光法を用いるシステムを構築した。

さらに、この同時測定装置を用い、表面に吸着したタンパク質、リポソーム、DNA の物性評価を行う事に成功した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have developed dual mass sensing devices using a quartz crystal microbalance and optical film thickness measuring methods. As the optical system, we utilized newly developed an enhanced anomalous reflection of Au and a reflectometric interference spectroscopy using TiO₂/Ti surface.

Furthermore, with these simultaneous measuring systems, we could evaluate the physicochemical properties of protein, liposome, and DNA that adsorbed on the surface.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：水晶発振子・金異常反射・反射干渉分光法・酵素反応・振動効果・リポソーム・DNA・粘弾性

1. 研究開始当初の背景

水晶の圧電素子としての特性を利用した、水晶発振子マイクロバランス法(QCM)は、素子表面への物質の吸着量を共振周波数の変化から測定するもので、ng/cm²オーダーの感度を持つ質量計として、溶液系において分子

間相互作用や、生体分子反応の動力学解析などに用いられてきた。

しかしながら、QCMの振動数変化には物質量のみならず溶液や吸着物自身の粘弾性にも応答していることが知られており、その振動数変化の内訳を物質量と物性変化に精密

に分離して議論することは困難であることが分かってきた。

そこで我々は、粘弾性の効果を受けず、単に物質量のみを定量化する手法として光学的な測定法を QCM と組み合わせる試みを行ってきた。光測定により物質量を定量化し、それに対する QCM の振動数応答の大きさを相対的に求めれば、その相対値が物性を示す指標となることが期待される。その光学測定の一つに金の異常反射 (AR) がある。

AR は、光学的な特性に基づき金の吸収領域付近の光反射光強度が、金表面への物質の吸着量に伴って減少するという現象を利用するものである。この方法は、単に金表面からの反射光強度を測定するだけであるので、金電極を有する QCM と組み合わせることが容易で、実際に吸着タンパク質の種類に応じて光応答と、振動数応答に差があり、その相対値は、タンパク質それぞれについてこれまで実測されていた粘弾性のパラメーターとよい相関性のあることが我々により示された。しかし、AR は QCM に比べて感度が低く、その高感度化が望まれた。

2. 研究の目的

以上の様な背景のもと、より高感度かつ QCM と容易に組み合わせ可能な光学測定の方法論を探索し、システム構築を目指すことを本研究の目的とした。さらに、QCM の振動そのものの表面化学に与える影響についても、光測定によって定量化する検討を行う事とした。

3. 研究の方法

光測定のやり方としては、これまで同様、水晶発振子電極表面からの反射光強度もしくは反射スペクトルを測定することとし、その反射光強度変化をより増強できる電極表面構成の探索を行った。具体的には、以下 3 種類の検討を行った。

(1) 金および銀と誘電体層を多重積層化し、反射特性を改変する。誘電体層の種類と膜厚、さらにその上に積層する金および銀の膜厚の最適値を探索した。

(2) 金電極上に二次元周期構造を構築し、それに金を蒸着することで局在表面プラズモン共鳴に基づく反射光強度変化の増強を図った。

(3) 実は AR は反射干渉分光法の一つであり、その意味で、金にこだわらず全く異なる光干渉層を本研究に適用する探索を行った。

以上の方法内、最適なものを選び、振動の同時測定システム構築を行い、表面吸着物質の定量化と物性評価を行った。

さらにこのシステムを用い、QCM の振動が表面化学に与える効果について定量評価を行った。

4. 研究成果

反射光強度変化の増強方法として前項に挙げた三種類の方法を検討した。

(1) 3.-(1) に関しては、誘電体層として有機無機複合体ともいえるポリヒドロアルオリゴメリックシルセスキオキサン (POSS) の一種で、プロピルアミノ基を八個有する POSS-NH₂ を合成し、これを化学的に一層金表面に固定化し、さらに金を 4 nm 程度蒸着した表面が、AR に比べ 5 倍程度の感度を有することを見出した。

(2) 3.-(2) に関しては、表面局在プラズモン共鳴による感度の上昇は認められたが、再現性が乏しいこと、さらには水晶発振子が発振しにくくなるという難点から、この手法は除外した。

(3) 3.-(3) について、反射干渉分光法を適用するための表面として、酸化チタン・チタン表面を利用することを新たに検討し、理論と実験両面からその有用性を確認した (図 1)。(1) と (3) に関しては特許出願を行った。

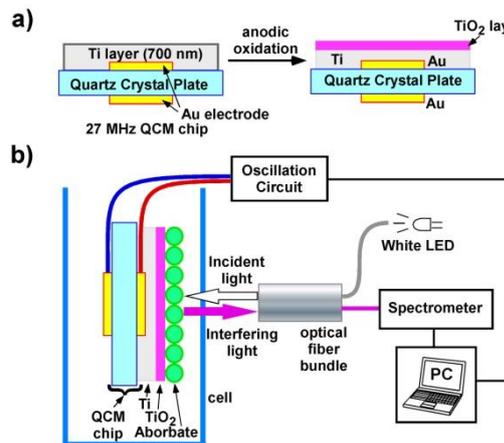


図 1 TiO₂/Ti 表面を用いた RIfS-QCM の a) 測定チップ、b) 装置図

(4) 続いて、開発した同時測定装置を用いて生体分子の物性評価を行った。生体分子としては、タンパク質、リポソーム、DNA を用いた。

図 2 に QCM と酸化チタン・チタン表面を組み合わせた RIfS-QCM を用いて、BSA, リゾチーム, RNase A を表面に固定化した場合の光学膜厚変化 ($\Delta R_{600-450}/\%$) に対する QCM の振動数変化 ($\Delta F_{\text{water}}/\text{Hz}$) をプロットしたものを示した。これまで言われてきたように、QCM の振動数変化が、物質の量だけを定量化しているのであれば、光学的な手法である RIfS を用いた結果と一次の相関性があるはずであり、またその傾きはタンパク質の種類によらず一定となるはずである。しかし、図から明らかのように、プロットは直線からずれて飽和的な曲線となり、さらにタンパク質毎に全体

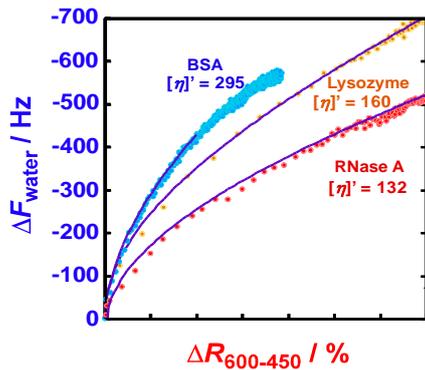


図2 TiO₂/Ti 表面を用いた RIFS-QCM のタンパク質吸着応答。

の傾きが傾きが異なっている。QCM は溶液の粘度に影響を受けることが分かっており、我々は今回、タンパク質の表面への固定化過程を、表面近傍に濃縮されたタンパク質水溶液の粘性変化を QCM が測定していると考え、このプロットを、高分子溶液粘度の高分子濃度依存性を示す Huggins 式によってフィッティングした。図に示したように、各タンパク質でのプロットから、固有粘度に相当するパラメータを得ることでできた。このパラメータはこれまで測定されている各タンパク質のモル圧縮係数と相関性のあることが分かった。

(5) さらに、様々な種類のリポソームを表面に吸着させ、その際の同時測定の応答からも、それぞれのリポソームの粘性に応じた値が得られた。

(6) また DNA に関して、一本鎖 DNA、二本鎖 DNA のそれぞれについて分子鎖長の異なる DNA の固定化実験を行ったところ、分子長に対する単位光学応答に対する QCM 応答の大きさが、高分子の分子鎖長と固有粘度との関係を示す Mark-Houwink-Sakurada 式でフィッティングできることが分かった。これは、QCM が表面近傍の DNA 溶液粘度を測定していると考えて良く、タンパク質の結果とも関連している。

(7) 表面での酵素反応の動力学測定にも本同時測定装置を利用し、酵素反応追跡を行った。各種表面吸着タンパク質を基質としたプロテアーゼ反応を調べた結果、柔らかいタンパク質基質が加水分解によって硬くなる様子が観察され、その結果 QCM と光測定で得られた反応速度は異なる場合があることが分かった。QCM は粘性変化を受けるため、実際の物質質量変化を追っているわけではなく、3-4 倍程度大きく見積もられることが分かった。

以上の結果より、本研究で開発した光反射型 QCM 同時測定装置は、生体分子の動的物性(粘弾性)評価に利用できることが明らかとなった。

(8) さらに、表面化学反応の振動効果につい

ても検討を行った。まず気相系において QCM の振動が表面に吸着している低分子の量がどのように影響を及ぼすかを光反射測定から見積もった。QCM の 27 MHz 振動の on/off によって大気条件下で表面上に吸着した吸着水の脱離と結合が起こることがわかったが(図 3)、この QCM on/off による吸着量の差(脱離量)が気相の相対湿度と比例関係にあることが分かった(図 4)。つまり振動によって或る程度の水が脱離するが、それは吸着水量に比例する、という事であると考えられる。

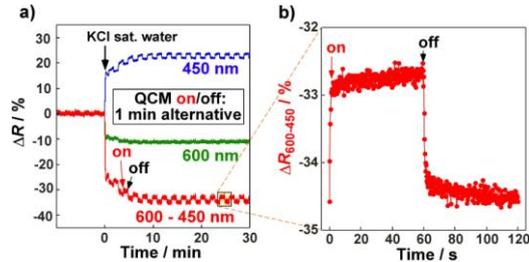


図3 TiO₂/Ti 表面の 27 MHz 振動の on/off による吸着水層の膜厚変化。

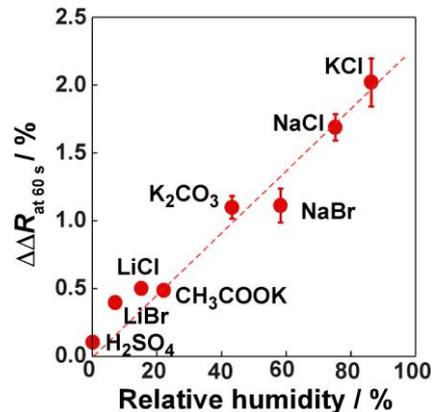


図4 TiO₂/Ti 表面の 27 MHz 振動の on/off による吸着水層の膜厚変化の相対湿度依存性。

以上のように、表面化学の振動による制御という新しい研究分野が開けていくものと期待される。

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 4 件)

① Yusuke Yonamine, Takayoshi Kawasaki, Yoshio Okahata, Covalent Modification of DNA with Azetidinium Lipids, Chemistry Letters, 39, 84-85, (2010), 査読有

② Takayoshi Kawasaki, Tetsuhiro Mochida, Jun-ichi Katada, Yoshio Okahata, Laser Response of a Quartz Crystal Microbalance: Frequency Changes Induced by Light Irradiation in the Air Phase, Analytical

Sciences, 25, 1069-1075, (2009), 査読有
③ Takayoshi Kawasaki, Momoko Toyoda, Yoshio Okahata, Pulse Frequency-dependent Regulation of the Lysozyme Reactivity under Pulsed Ultrasound Irradiation, Chemistry Letters, 38, 538-539, (2009), 査読有

④ Takayoshi Kawasaki, Momoko Toyoda, Yu Hoshino, Yoshio Okahata, Pulsed Ultrasound Effect on DNA Polymerase Reaction Monitored on a QCM, Chemistry Letters, 38, 536-537, (2009), 査読有

〔学会発表〕(計 17 件)

① 小島泰輔、川崎剛美、岡畑恵雄、光干渉-QCM 同時測定法を用いた基板上でのリポソーム物性解析、日本化学会第 91 春季年会、2011. 3. 29、神奈川大学

② 川崎剛美、岡畑恵雄、固体表面におけるプロテアーゼ反応のパルス振動効果、日本化学会第 91 春季年会、2011. 3. 27、神奈川大学

③ 川崎剛美、岡畑恵雄、低分子吸着と酵素反応における発振子表面の振動効果、第 59 回高分子討論会、2010. 9. 16、北海道大学

④ 大塚雅徳、川崎剛美、岡畑恵雄、光反射型 QCM 法による DNA 鎖の物性評価、第 59 回高分子学会年次大会、2010. 5. 26、パシフィコ横浜

⑤ 川崎剛美、田中千香子、岡畑恵雄、光反射 QCM 法を用いたタンパク質の硬さに依存する加水分解反応、第 58 回高分子討論会、2009. 9. 16、熊本大学

〔産業財産権〕

○出願状況(計 3 件)

①名称：反射光強度測定用積層構造体、反射光測定用積層構造体を含んでなる装置、並びに薄膜の膜厚及び／又は質量及び／又は粘度測定方法

発明者：川崎剛美、岡畑恵雄

権利者：東京工業大学

種類：PCT

番号：JP2011/055672

出願年月日：2011/3/10

国内外の別：国外

②名称：反射スペクトル測定用積層構造および薄膜の膜厚測定方法

発明者：川崎剛美、岡畑恵雄

権利者：東京工業大学

種類：特願

番号：2010-053556

出願年月日：2010/3/10

③名称：金属薄膜含有積層構造

発明者：川崎剛美、岡畑恵雄

権利者：東京工業大学

種類：特願

番号：2009-58611

出願年月日：2009/3/11

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 剛美 (KAWASAKI TAKAYOSHI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：60334504