

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：12608
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23750183
 研究課題名（和文）生体分子の分子間相互作用における機械的力の大きさ測定
 研究課題名（英文）In situ measurements of mechanical forces in biomolecular interactions
 研究代表者
 古澤 宏幸 (Furusawa Hiroyuki)
 東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教
 研究者番号：60345395

研究成果の概要（和文）：

本研究では、生体分子間相互作用観察装置（水晶発振子デバイス）に外部から力を加えることのできる装置を組み合わせ、センサー上で形成させた生体分子複合体に外部から引っ張る力を加えたときの挙動を観察することを目的とし、(1) 他の装置を組み込みやすいフロー型水晶発振子装置を開発した、(2) 生体分子間相互作用において機械的に動く分子の例として RNA シャペロンタンパク質 Hfq の動力学解析を行い、生体分子間相互作用における機械的挙動の重要性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is development of a biosensor, which can observe biomolecular interactions, combined with a unit to investigate effects of mechanical force on biomolecules. In this study, a flow-type quartz-crystal microbalance, which can detect biomolecular interactions as a mass change, was developed as a base device combined with various units easily. In addition, kinetic analysis of RNA chaperon Hfq was performed to discuss the contribution of molecular mechanics in the biomolecular interactions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生体機能関連化学、生体分子間相互作用、機械的力、水晶発振子、RNA シャペロンタンパク質 Hfq

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに、生体分子間相互作用を観察するために水晶発振子マイクロバランス法(QCM)を開発してきた。水晶発振子は、水晶薄板の両面に金電極を蒸着し交流電圧を印加することにより水晶板を規則正しく振動させたものである。その電極上に物質

が吸着するとその質量に応じて振動数が減少することを利用して、電極上での分子間相互作用に基づく質量増加をリアルタイムに検出することができるデバイスである。

これまでに、さまざまな生体分子間相互作用を質量変化として観察できることを示してきた。一方、こうした相互作用において、分子の構造変化を引き起こし力学的な仕事

を伴っている場合があり、力学的な動きは反応効率向上や反応方向性など生体機能と密接に関わっていると考えられた。生体の高度な機能の本質を理解するには、生体分子を仕事をしている「力学的な機械」として評価することが必要なのではないかと考えた。

水晶発振子基板上で生体分子複合体を構築し、特定の部位を特定の方向に力学的な外力をかけることができれば、生体分子複体内に内在する”力”を定量的に評価でき、生体分子間相互作用において力学的な観点から理解が深まるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、分子間相互作用のパラメータとして従来の結合親和性の指標となる解離定数 K_d (M)、分子の動きの指標となる結合速度定数 k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) や解離速度定数 k_{off} (s^{-1}) に加えて、力 F (N) を加味して生体分子の挙動を記述することを目的とした。

具体的には、分子間相互作用を観察しながら同時に生体分子複合体に磁場による張力を加えることのできる装置を開発し、基板での分子の挙動をモニターしながらメカニカルに動く分子の”力”を測定することを検討することを計画した。例えば、水晶発振子基板上に二本鎖 DNA を固定化し、その DNA のもう一端を磁気ビーズでトラップすることで、外部磁場により DNA に所定の張力をかけることが可能となる。そこへ DNA と相互作用する制限酵素あるいはヒストンを添加することで結合反応を開始させる。結合反応および酵素反応は質量変化として水晶発振子の振動数で追跡し、生体分子間相互作用において張力がどのくらい影響を与えているのか、結合パラメータとの相関性、基質認識との関係を明らかにすることを考えた。

また、生体分子の中には分子間相互作用をした際に分子構造を変化させるものがある。例えば、RNA シャペロンとして知られる Hfq

は6つのモノマーが会合しドーナツ形状をしたタンパク質で、ステム-ループ状の RNA 鎖に結合するとステム-ループをほぐしてその配列に相補的な RNA との2重鎖形成を促進することが報告されている。こうした RNA をほぐす仕事をする Hfq の相互作用の様子を水晶発振子で観察し、ゆるく結ばれたステム-ループや固く結ばれたステム-ループに対してどのような結合性を示すか、構造の固さとの相関関係を調べることを検討した。

3. 研究の方法

(1) フローセル型水晶発振子装置と磁場発生装置との組み合わせることを検討した。水晶発振子装置は、水晶発振子金基板上にアクセスしやすいようにフローセル型の装置を開発し利用することとした。フローセル上に電磁石による磁場発生装置を取り付け、発生可能な張力の大きさを、必要に応じて磁気ビーズの大きさ (20nm~1 μ m) 及び磁場の大きさ (~1000G) で制御可能か検討した。

(2) RNA 構造を変化させることのできる大腸菌由来の RNA シャペロンタンパク質 Hfq を、大腸菌タンパク質発現系を利用して調製した。ステム-ループをもった RNA 鎖を水晶発振子センサー上に固定化し、Hfq を添加して結合するかどうかを質量変化として観察した。またステム-ループ RNA に対する相補鎖を添加して2本鎖 RNA 形成が促進されるかどうかを観察した。ステム-ループ RNA のステム領域の長さを変えてほぐすときに大きな力が必要な場合の Hfq のシャペロン活性がどのように影響を受けるのか、相関関係を調べた。

4. 研究成果

(1) はじめにフローセル型水晶発振子装置を作製した。従来はビーカーにセンサーチップを上から浸してサンプルをビーカーの中へ添加するバッチ型水晶発振子装置を用いていたが、センサーチップを平板化し流路の

底に組み込めるように設計変更を行い、フローシステムに組み込めるセンサーセルを開発した。センサーセルには水晶振動子を駆動するための発振回路およびサンプルを注入するサンプルループ、溶液をフローさせる送液ポンプ、廃液を回収する廃液ビンを接続した。従来のバッチ型水晶発振子装置と同等の測定結果が得られることを、DNA の二重鎖形成反応の観察を行うことで確認できた。また、フローシステムを利用して、DNA ポリメラーゼによる DNA 一塩基伸長反応の観察が可能であることを示した。

その後、平板化したセンサーチップ上に磁場発生装置として長さ 5 cm の電磁石をセットし、流路にさまざまなサイズの磁気ビーズを流す実験を行った。その結果、小さな磁気ビーズ (50 nm) をトラップするには大きな磁場が必要であり、そのため電磁石に流れる電流量を上げていくとセンサーセルに影響を与えるほどの発熱量が生じてしまうことがわかった。発熱のためセンサーセルのシグナルが安定せず、有意な情報が得られなかったため電磁石に新たに冷却装置等を追加する必要があることがわかった。そのため、磁場発生装置を組み込んだ装置開発は一旦保留とし、異なるアプローチで分子間相互作用における機械的分子挙動の効果を観察することとした。

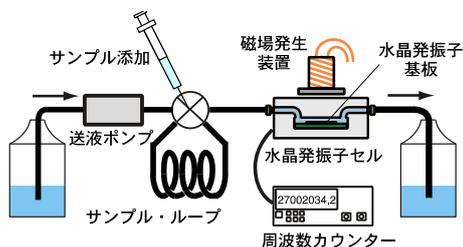
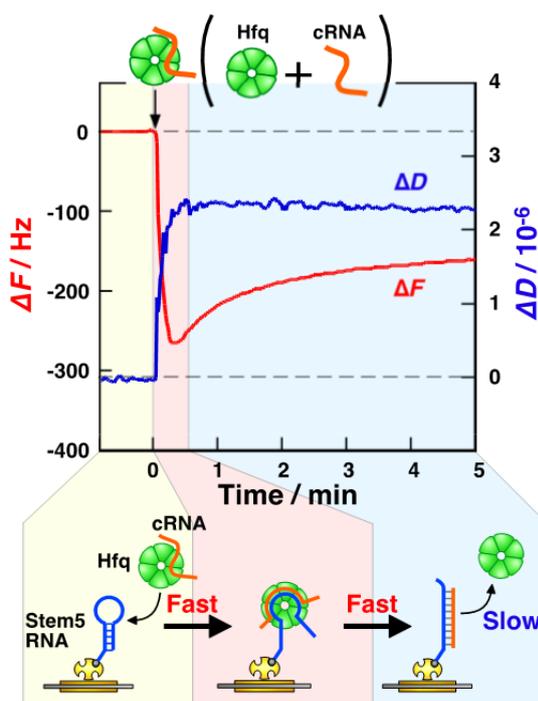


図 フローセル型水晶発振子装置の模式図

(2) 微量天秤として知られる水晶発振子にネットワークアナライザーを接続した水晶発振子アドミッタンス (QCM-A) 法を用いると、水晶発振子の振動数変化 (ΔF) から得られる質量変化だけでなく振動のエネルギー散逸

値変化 (ΔD) から基板上的物質の粘弾性変化を同時に測定できることが知られている。機械的に構造変化を起こす例として、RNA シャペロン Hfq による RNA の構造変化に注目し、標的 RNA として水晶発振子基板上に固定化したステム-ループ RNA に対して Hfq の結合挙動を質量変化として振動数変化 ΔF で追跡し RNA の構造変化を粘弾性変化としてエネルギー散逸値変化 ΔD で同時追跡することを検討した。

大腸菌タンパク質発現システムを用いて調製した Hfq と化学合成により調製した 5'-ビオチン化ステム-ループ RNA を用いて、相補鎖 RNA と Hfq を添加したときの振動数変化 ΔF と振動エネルギー散逸値変化 ΔD をモニターしたところ、5 bp のステム構造を持つ RNA (Stem5 RNA) を固定化した基板に Hfq と基板上的 RNA と相補的な cRNA を同時に添加すると、一度 ΔF が減少 (質量増加) してから ΔF が上昇 (質量減少) し、一方 ΔD が増加 (粘弾性増加) する様子が観察された。 ΔF の変化は基板上的 RNA に Hfq と cRNA が結合することによる質量増加と、その後 Hfq が解離することによる質量減少であると説明できる。 ΔD の増加はコ



コンパクトで固いステム-ループ構造から基板から細く伸びた構造のRNA二本鎖が形成されることによる粘弾性変化だと考えられる。Hfqの解離(ΔF の増加)過程では、RNAの構造変化(ΔD の変化)を伴わずにゆっくり生じていることからHfqはRNA二本鎖形成後にゆっくり解離していることがわかった。

さらに7 bpのステム構造を持つRNA(Stem7 RNA)で同様の実験を行ったところ、Hfqのステム-ループRNAへの結合及び解離挙動が5 bpのステムの場合と比較して明らかに遅くなることがわかった。ステムの長さが伸びたことによりRNA鎖をほどく力がより必要となり、HfqのRNA鎖への結合挙動に影響を与えていることが示された。

以上、水晶発振子上で機械的な分子構造変化を伴う分子間相互作用において、分子の構造変化のしやすさが相互作用の速度に影響を与えていることを示すことができた。

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3件)

(1) Kenjiro Yazawa, Hiroyuki Furusawa, and Yoshio Okahata
Mechanism of ThiolDisulfide Exchange Reactions between DsbA and DsbB over a Wide pH Range
Chem. Lett., **42**, 241-243 (2013). (査読有)
DOI: 10.1246/cl.2013.241

(2) Hiroyuki Furusawa, Kensuke Uemura, Hiroshi Yoshimine, and Yoshio Okahata
In situ monitoring of a trace intermediate during DNA phosphorylation by T4 polynucleotide kinase for transient kinetic studies
Analyst, **137**, 1334-1337 (2012). (査読有)
DOI: 10.1039/c2an16273c

(3) Hiroshi Yoshimine, Taisuke Kojima, Hiroyuki Furusawa, and Yoshio Okahata
Small Mass-Change Detectable Quartz Crystal Microbalance and Its Application to Enzymatic One-Base Elongation on DNA
Anal. Chem., **83**, 8741-8747 (2012). (査読有)
DOI: 10.1021/ac202224d

[学会発表] (計13件)

(1) 岡ノ谷 勇太、吉嶺 浩司、古澤 宏幸、岡畑 恵雄
水晶発振子上でのアミノアシル tRNA 合成酵素の反応観察
日本化学会第93春季年会、2013年3月25日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス

(2) 春原 有美子、古澤 宏幸、岡畑 恵雄
水晶発振子を用いたリボスイッチの構造変化の観察
日本化学会第93春季年会、2013年3月25日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス

(3) 辻 健太郎、古澤 宏幸、岡畑 恵雄
全反射蛍光顕微鏡を用いた脂質膜上での脂質分子と膜タンパク質の動的挙動解析
日本化学会第93春季年会、2013年3月25日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス

(4) 矢澤 健二郎、古澤 宏幸、岡畑 恵雄
大腸菌タンパク質ジスルフィド結合形成システムの電子伝達機構の解明
日本化学会第93春季年会、2013年3月25日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス

(5) 長尾 泰貴、古澤 宏幸、岡畑 恵雄
水晶発振子アドミッタンス解析法を用いたDNA構造体の物性評価
日本化学会第93春季年会、2013年3月25日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス

(6) 古澤 宏幸、吉田 亜矢、岡畑 恵雄
RNA シャペロンタンパク質 Hfq の RNA 構造変化促進過程のその場観察
第22回バイオ・高分子シンポジウム、2012年6月26日、東京大学先端科学技術研究センター

(7) 矢澤 健二郎、古澤 宏幸、岡畑 恵雄
大腸菌タンパク質ジスルフィド結合形成因子 DsbA の酸化還元反応機構
日本化学会第92春季年会、2012年3月25日、慶応義塾大学日吉キャンパス

(8) 古澤 宏幸・吉田 亜矢・岡畑 恵雄
水晶発振子を用いた水中における RNA 構造情報の取得
日本化学会第92春季年会、2012年3月26日、慶応義塾大学日吉キャンパス

(9) 吉嶺 浩司、古澤 宏幸、岡畑 恵雄
高感度フロー型水晶発振子を用いた反応における微少な質量変化の検出
日本化学会第92春季年会、2012年3月26日、慶応義塾大学日吉キャンパス

(10) 吉田 亜矢、古澤 宏幸、岡畑 恵雄
RNA シャペロンタンパク質 Hfq による RNA 二本鎖形成反応の動的解析
日本化学会第92春季年会、2012年3月25日、慶応義塾大学日吉キャンパス

(11) 古澤 宏幸
水晶発振子をツールとして生体分子のうごきをみる
日本化学会第92春季年会、2012年3月27日、慶応義塾大学日吉キャンパス

(12) 古澤 宏幸、矢澤 健二郎、岡畑 恵雄
大腸菌タンパク質ジスルフィド結合形成因子の活性評価(1)：反応機構の解明
第60回高分子討論会、2011年9月29日、岡山大学津島キャンパス

(13) 矢澤 健二郎、古澤 宏幸、岡畑 恵雄
大腸菌タンパク質ジスルフィド結合形成因子の活性評価(2)：pH変化に対する柔軟性
第60回高分子討論会、2011年9月29日、岡山大学津島キャンパス

〔図書〕(計1件)
岡畑 恵雄、森 俊明、古澤 宏幸、高橋 俊太郎

講談社
バイオセンシングのための水晶発振子マイクロバランス法
2013年3月
総 318 ページ (1-86, 158-174, 193-212, 231-245, 274-300 ページ担当)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古澤 宏幸 (Furusawa Hiroyuki)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教
研究者番号：60345395

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

()

(3) 連携研究者

()

研究者番号：