

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20550070

研究課題名(和文) キャピラリー電気泳動反応器による生体分子間相互作用の
総合的定量解析システム研究課題名(英文) Integrated Analytical System for Biomolecular Interactions
on the Basis of Capillary Electrophoretic Reactor

研究代表者

星野 仁 (HOSHINO HITOSHI)

東北大学・大学院環境科学研究科・教授

研究者番号：20124620

研究成果の概要(和文)：

本研究計画では、生体分子コンプレックスをはじめとする広い意味での“錯体”の結合能を総合的に定量評価するための新しい方法論の創出をその研究目標とした。キャピラリー電気泳動を反応場とした表記反応器を開発し、均一溶液中での金属錯体、生体分子複合体の解離反応速度定数の直接解析を可能とした。また反応場に配位子を添加することで錯体生成反応挙動を追跡できることを実証し、総合的定量解析システムたり得ることを実証した。

研究成果の概要(英文)：

In this research project, in the broadest sense, and other complex biological molecules, "complex" with the goal of their research to create a new methodology for quantitative evaluation of the overall binding ability. Developing a reactor with a reaction field representation capillary electrophoresis of metal complexes in homogeneous solution, which enables the direct analysis of the rate constant for dissociation of the complex biological molecules. Demonstrate the ability to track the behavior of complex formation reaction by adding a ligand to the reaction field, demonstrating that the system can obtain a comprehensive quantitative analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	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・分析化学

キーワード：キャピラリー電気泳動、金属錯体、生体分子複合体、解離反応速度解析、生成反応速度解析

1. 研究開始当初の背景

細胞内での物質間相互作用すなわち生命活動は、時間的にも空間的にも一時的な相互作用であり、その生物学的な意味を理解する上で速度論的な考察を欠くことはできない

が、現実にはそれを行うための有用な手段が欠落している。特に、均一溶液系において生体分子複合体の解離反応プロセスを直接観察し、速度パラメーターを正確に測定し得る方法は現存しない。一方、当研究グループでは、キャピラリー電気泳動分離プロセスを金

属錯体の解離反応容器として利用するという着想に基づき、金属錯体の自己解離反応速度定数の直接計測法としてキャピラリー電気泳動反応器(CER)を開発している。

2. 研究の目的

本研究計画では、生体分子コンプレックスをはじめとする広い意味での“錯体”の結合能を総合的に定量評価するための新しい方法論の創出をその研究目標としている。これまで、本研究では主としてキャピラリー電気泳動反応器(CER)を用いる“錯体”の解離反応挙動を追跡するための手法の開発に傾注してきた。これに対し、本年度はその逆反応、すなわち“錯体”の生成反応挙動を追跡するための新しい手法の創出を検討した。CERと同様、キャピラリー電気泳動(CE)分離プロセスを利用する広義の“錯体”の生成反応速度解析法を新たに考案した。

3. 研究の方法

本研究計画では、生体分子コンプレックスの結合能を総合的に定量評価するための新しい方法論を創出するためにi)動的アプローチとして、キャピラリー電気泳動反応器(CER)による生体分子コンプレックスの解離反応速度論解析の方法論を確立し、ii)静的アプローチとして、キャピラリー電気泳動(CE)を用いた生体分子コンプレックスの熱力学的平衡定数の測定法の確立を目指す。

(1) Zinc Fingerタンパク系

平衡物性や構造、その機能および諸物性に関する研究が進んでおり、それらの情報を入手しやすいこと、および、キャピラリー電気泳動への適合性の良さを勘案して、Zinc finger系をモデル物質系としてその解離反応速度解析を検討した。Zinc finger proteinを構成するZinc-fingerドメインは亜鉛と結合することによって立体構造が維持される金属タンパク(Zn(II)-Zinc-finger complex: [zfp-Zn(II)] と略)である。

(2) DNA-タンパク複合体とマイクロチップキャピラリー電気泳動反応器(μ CER)への展開

Zinc-finger protein系以外の生体分子コンプレックス系へのCERの適用としてDNA結合タンパクの一種であるsingle-stranded DNA binding protein (SSB)と一本鎖DNA(ssDNA)との複合体[SSB-ssDNA]系の解離反応速度解析を検討した。

一方、CERでは数分から数十分程度の時間スケールで進行する反応系の速度解析が可能

であるが、これよりも速い数秒から数十秒の時間スケールで進行する生体分子コンプレックスの速度論解析な可能にする方法論の開発を試みた。すなわち、大きさ数センチ角のマイクロチップ上でCERと同様の原理に基づくキャピラリー電気泳動(CE)分離および解離反応速度解析を行うマイクロチップキャピラリー電気泳動反応器(μ CER)を開発し、生体分子コンプレックス系への適用を試みた。

(3) 配位子置換CERへの展開

これまで半減期が数時間程度という極めて長い時間スケールで進行する反応系の速度を解析するための方法論は全く存在しなかった。我々はそれを可能とするための手段として、CERをベースに置換配位子による配位子交換反応をCE分離プロセスで行うことを原理とするLigand Substitution CER (LS-CER)を新たに考案した。具体的にはEDTAなど強力な配位子を泳動緩衝液に添加して行った。

(4) 生成反応速度解析法

以上(1)~(3)は解離反応速度解析であったが、本項では生成反応速度解析法の確立を目指した。試料の取り扱いの容易さやそのコスト、CEでの光学検出の容易さを勘案して、Fe(II)-1,10-フェナントロリン錯体([Fe(phen)₃]²⁺)を解析モデルとして選択した。錯形成試薬(1,10-フェナントロリン, phen)を含む泳動緩衝液で満たしたキャピラリーに、サンプルプラグとしてFe(II)溶液を注入してCE分離を行い、このとき泳動時間の増加に伴うピークの増加として観察される[Fe(phen)₃]²⁺のオンキャピラリー錯形成反応を解析して、その生成反応速度定数(k_f)を算出する方法を考案した。

4. 研究成果

(1) Zinc Fingerタンパク系

CERによる[zfp-Zn(II)]の解離反応速度論について検討を行ったところ、予想以上に[zfp-Zn(II)]の解離反応が速く、キャピラリー電気泳動の時間スケールではその解離反応を追跡できないことが分かった。そこで、逆に[zfp-Zn(II)]の解離反応が速いことを利用して、アフィニティCEの手法を用いて[zfp-Zn(II)]の熱力学的結合パラメーターである結合定数(K_b)を得ることに成功した。

(2) DNA-タンパク複合体とマイクロチップキャピラリー電気泳動反応器(μ CER)への展開

SSB-ssDNA複合体のCERを行い(図1)、解離反応速度定数(k_d)を得ることに成功した。20、25および31塩基対長のssDNA(それぞれs20, s25およびs31と略)について k_d として

$1.50 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $4.81 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $4.58 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ を得た。このように、鎖長によりSSB-ssDNA複合体の速度論的安定性が増大することが判った。一方、より鎖長の短いssDNAとSSBとの複合体について μ CERを用いて解離反応速度解析を行った(図2)。その結果半減期:数十秒でいどの高速反応の解析に成功し、その解離反応速度定数($k_d = 2.2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$)を得ることに成功した。

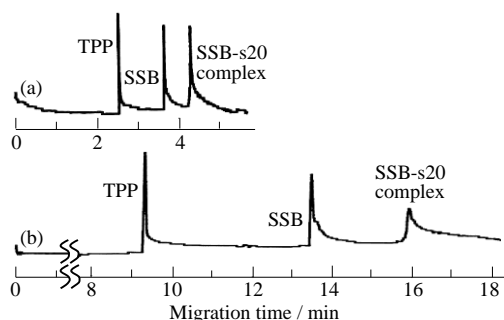


図1 SSB-s20 複合体の CER 泳動図. 緩衝剤: 15 mM リン酸緩衝剤(pH 7.3), 印加電圧: (a) 16, (b) 5 kV.

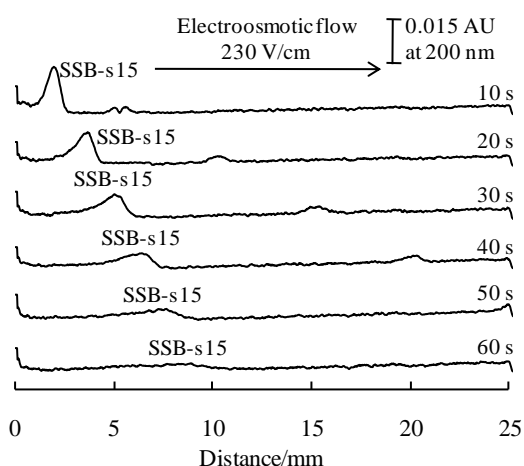


図2 SSB-s15 の μ CER 泳動図. サンプル: 0.76 mg/ml SSB, 0.023 mg/ml s15, 25 mM Tris-HCl 緩衝溶液(pH 7.5), 泳動緩衝溶液: 25 mM Tris-HCl(pH 7.5, 10 mM NaCl 含む), 印加電圧: 230 V/cm

(3) 配位子置換CERへの展開

配位子置換CERを用いて速度論的に極めて安定なTi(IV)-カテコール誘導体錯体の解離反応速度解析を行った(図3)。Ti(IV)-カテキ錯体について $k_d = 1.64 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ を、Ti(IV)-タイロン錯体について $k_d = 0.51 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ を得た。後者の半減期は3.8時間であり、通常のCERでは実質的に解析できない反応速度の解析を可能とした。

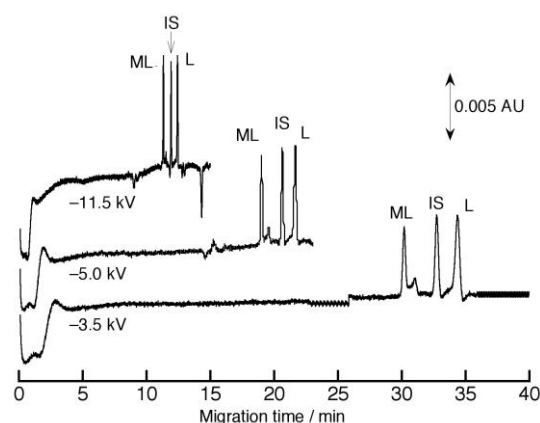


図3 チタン(IV)-タイロン錯体 $[\text{TiR}_3]^{8-}$ のLS-CER 泳動図. L: タイロン; ML: $[\text{TiR}_3]^{8-}$; IS: TCAS. 試料: $[\text{Ti}^{4+}] = 4.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{tiron}] = 1.2 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{TCAS}] = 2.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{HEPES}] = 20 \text{ mM}$ (pH 7.4). 泳動緩衝液: $[\text{NaH}_2\text{PO}_4] = 20 \text{ mM}$ (pH 7.4), $[\text{catechol}] = 6.5 \text{ mM}$. Detection wavelength: 210 nm. Capillary: poly(acrylamide) coated, $L = 52.5$, $l = 40.0 \text{ cm}$.

(4) 生成反応速度解析法

泳動緩衝溶液のpHを1.9としてCE分離を行ったところ、電気泳動図上に $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ が現れたことから、予想通りキャピラリー内で錯形成反応が進行していることが分かった。また、泳動時間の増加に伴い、 $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ のピーク高さの増加していることが分かった(図4)。さらに、これを擬一次反応として解析し、 k_f の算出を試みたところ、その値として $2.3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ を得る事に成功した。

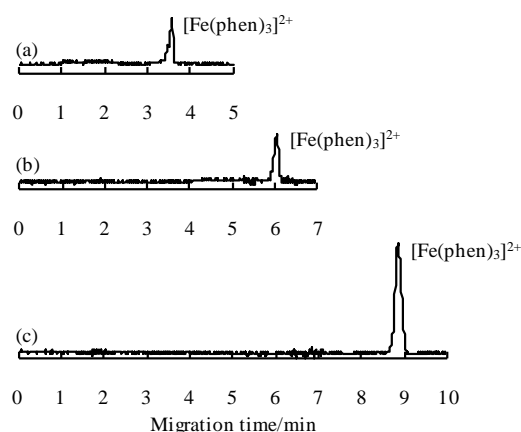


図4 $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ のオンキャピラリー錯形成反応. サンプル: 3 mM Fe^{2+} , 泳動緩衝溶液: 10 mM リン酸(pH 1.9, 2 mM phen 含む), 印加電圧: (a) 20 kV ($I = 70.7 \mu\text{A}$), (b) 14 kV ($I = 44.0 \mu\text{A}$), (c) 10 kV ($I = 29.2 \mu\text{A}$), 有効長: 35.0 cm, 検出波長: 510 nm

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 12 件)

1. Designing strategies for supramolecular luminescent complex of lanthanide-heterometal assembly, Nobuhiko Iki*, *Supramol. Chem.*, **23**(1), 2011, 160–168. (査読有)
2. pH-Responsive Switching of the Near-Infrared Absorption of the Water-Soluble Bis(o-diiminobenzo-semiquinonato)platinum(II) Complex, Atsuko Masuya, Nobuhiko Iki*, Chizuko Kabuto, Yasunori Ohba, Seigo Yamauchi, Hitoshi Hoshino, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2010**(22), 3458–3465 (2010). (査読有)
3. A Supramolecular Sensing System for Ag^I at Nanomolar Levels by Formation of Luminescent Ag^I-Tb^{III}-Thiacalix[4]arene Ternary Complex, Nobuhiko Iki*, Munehiro Ohta, Teppei Tanaka, Takayuki Horiuchi, and Hitoshi Hoshino, *New J. Chem.*, **33**, 23–25 (2009). (査読有)
4. One-step heterogeneous assembly of terbium(III) and silver(I) with thiacalix[4]arene ligands to form a cage including terbium(III) in an octa-oxygen cube, Teppei Tanaka, Nobuhiko Iki*, Takashi Kajiwara, Masahiro Yamashita and Hitoshi Hoshino, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **64**(3-4), 379–383 (2009). (査読有)
5. Expanding the Scope of CE Reactor to ssDNA-binding protein–ssDNA Complexes as Exemplified for a Tool for Direct Measurement of Dissociation Kinetics of Biomolecular Complexes, Toru Takahashi*, Kei-ichirou Ohtsuka, Yoriyuki Tomiya, Nobuhiko Iki, Hitoshi Hoshino, *Electrophoresis*, **30**(17), 3079–3085 (2009). (査読有)
6. Detection of Cationic Guest Molecules by Quenching of Luminescence of a Self-assembled Host Molecule Consisting of Tb^{III} and Calix[4]arene-*p*-tetrasulfonates, Takayuki Horiuchi, Nobuhiko Iki*, and Hitoshi Hoshino, *Anal. Chim. Acta*, **650**(2), 258–263 (2009). (査読有)
7. Ligand-Substitution Mode Capillary Electrophoretic Reactor (CER). Extending CER toward Measurement of Slow Dissociation Kinetics with a Half-Life of Hours, Nobuhiko Iki*, Mariko Takahashi, Toru Takahashi, and Hitoshi Hoshino, *Anal. Chem.*, **81**(18), 7849–7854 (2009). (査読有)
8. Non-covalent strategy for activating separation and detection functionality by use of the multifunctional host molecule thiacalixarene, N. Iki*, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **64** (1-2), 1–13 (2009). (査読有)
9. Exceptionally Long-Lived Luminescence Emitted from Tb^{III} Ion Caged in an Ag^I-Tb^{III}-Thiacalix[4]arene Supramolecular Complex in Water, Nobuhiko Iki*, Munehiro Ohta, Takayuki Horiuchi, Hitoshi Hoshino, *Chem. Asian J.*, **3**, 849–853 (2008). (査読有)
10. 水溶液中におけるテトラヒドロクルクミンの酸化安定性と酸解離特性の評価, 佐藤きよ子*, 壹岐伸彦, 高橋 透, 星野 仁, *分析化学*, **57**(4), 257–264 (2008). (査読有)
11. Hydrophobic and metal coordination interacted architecture based on *p*-tert-butylthiacalix[4]arene–potassium complex and its vapor absorption capability, Manabu Yamada, Yoshihiko Kondo, Nobuhiko Iki, Chizuko Kabuto, and Fumio Hamada*, *Tetrahedron Lett.*, **49**(24), 3906–3911 (2008). (査読有)
12. Highly Luminescent Superparamagnetic Diterbium(III) Complex Based on the Bifunctionality of *p*-tert-Butylsulfonylcalix[4]arene, Takashi Kajiwara*, Miki Hasegawa, Ayumi Ishii, Kensuke Katagiri, Munkhtsetseg Baatar, Shinya Takaishi, Nobuhiko Iki, Masahiro Yamashita, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2008**, 5565–5568. (査読有)

[学会発表] (計 31 件)

1. Highly selective and sensitive method to determine ppb levels of exchangeable Cd and Pb in soil using rapid leaching with thiacalixarene and detection with kinetic differentiation mode HPLC, N. Iki; K. Kano; H. Hoshino, Pacificchem 2010, Honolulu, USA, December 16, 2010.
2. Capillary electrophoretic reactor and microchip capillary electrophoretic reactor: Capillary electrophoresis based direct measurement method for the dissociation kinetics of metal complexes and biomolecular complexes. T. Takahashi; N. Iki; H. Hoshino, Pacificchem 2010, Honolulu, USA, December 16, 2010.
3. Supramolecular functions of luminescent complexes formed via self-assembly of silver(I), lanthanide(III), and thiacalix[4]arene in aqueous solutions, N.

Iki, First International Conference on Luminescence of Lanthanides, Odessa, Ukraine, September 7, 2010.

4. A test method for soil contamination with Cd and Pb consisting of selective extraction with thiacalixarene and detection by using atomic absorption spectrometry, Nobuhiko Iki, Keita Kano, Hitoshi Hoshino, Pittsburg Conference 2010, Orlando, Florida, USA, February 28-March 5, 2009.

[その他]

ホームページ等

<http://www.che.tohoku.ac.jp/~analchem/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

星野 仁 (HOSHINO HITOSHI)

東北大学・大学院環境科学研究科・教授
研究者番号：20124620

(2)研究分担者

壹岐 伸彦 (IKI NOBUHIKO)

東北大学・大学院環境科学研究科・准教授
研究者番号：50282108

高橋 透 (TAKAHASHI TORU)

東北大学・大学院環境科学研究科・助教
研究者番号：30361166

(3)連携研究者

なし