

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008～2009

課題番号：20686054

研究課題名（和文） マイクロ流体中での高次構造変化と触媒なき反応速度調整効果

研究課題名（英文） Chemical reactivity changes rely on microfluidic conformational changes

研究代表者

山下 健一（YAMASHITA KENICHI）

独立行政法人産業技術総合研究所・ナノテクノロジー研究部門・研究員

研究者番号：90358250

研究成果の概要（和文）：マイクロ流体に特徴的な流れの環境である層流中での化学反応性の変化において、どのような作用が効果をもたらしているのかを探った。その結果、活性化エネルギーの変化や変化のメカニズムを確認することに成功した。これらの変化は、層流によってもたらされていることを確認し、層流中での分子の形や配向の変化とそれによる分子と分子の衝突様式の変化を通じ、化学反応速度を調整していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：This research revealed the capability of changing the activation energy and kinetic parameters of chemical reactions using microchannel laminar flow. Results show that the enhancing effect of microfluidics in molecular collision accelerated the chemical reaction. Results of activation energy analysis confirmed that a change in the apparent activation energy occurred as the flow rate changed. Taken together, these results suggest that a microfluidic system is useful for performing rapid reactions by influencing the activation energy and frequency of molecular collision.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2009 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・反応工学・プロセスシステム

キーワード：新規反応場

## 1. 研究開始当初の背景

本研究課題以前より本代表者は、マイクロ流路に特徴的な流れの環境である「層流」の力学的な特徴に着目し、その中における分子の挙動の観察や理論的検証、ならび層流が創り出す特殊な化学反応場が有効に作用する

反応の探索を進めてきた。溶液が静止している状態、もしくは攪拌や乱流の状態においては、溶質分子は溶媒分子の衝突を等方的に受ける。従来のほぼすべての化学反応はこの状態が前提となっている。一方、層流中においてはこの前提自体が成り立たない。すなわち、

分子の衝突が異方的であり、特に大きな分子では、1つの分子中に加わる異なる流速作用（速い流れと遅い流れの両方に1つの分子がさらされる）が無視できなくなる。

層流中における分子の挙動に関する研究では、蛍光顕微鏡を用いた直接観察による高分子鎖の自発的な伸長と配向を報告している。この系をモデルとして、観察された現象を理論的に考察することで、層流中における分子の変形挙動は、高分子鎖に限らず、広く分子一般に起こりうる事が分かった。そのような変形が起こるかどうかは、分子の種類ではなく、溶媒の性質、流れの速さ、分子の大きさに依存する。直接的観察に適さない系については、線二色性分散(LD)スペクトルによる分析方法も報告している。また、円二色性分散(CD)スペクトル分析により、いくつかの酵素・タンパクにおいて、層流中における変形や配向現象を確認している。

一方、マイクロ流体中におけるさまざまな特徴的化学反应の間に共通する根幹的機構の理解を進めるため、熱力学解析を行った。この結果、層流は配座エントロピー調整効果を有していることが分かった。これは、分子のコンホメーションが、自発的には取りえない形態を層流中で取り、この状態から化学反应をスタートすることを意味する。すなわち、マイクロ流体による化学反应制御とは、化学反应のエントロピー制御を通じて実現できるものである。これらの結果により、層流とは、「系の秩序を制御する化学反応場」を提供するものであることが明らかとなった。また、当初想定していた巨大分子だけでなく、比較的low分子に対しても、上記エントロピー調整効果を有していることが確認されている。

上記層流の効果を体現する化学反应を見出すこと、さらにそれを産業技術として応用する研究も行った。最も単純な例として、層流中においてDNAの配列選択的2本鎖形成(ハイブリダイゼーション)が高効率化する(反応が速くなる)ことや、二本鎖の熱的安定性が上昇することを示した。また、従来報告の高分子合成に対しても、熱力学的解釈を加えることで、普遍性の高い現象であることを説明するに至っている。加えて、本申請者の所属グループや他の機関から、いくつかの酵素反応は層流中で加速、最終到達収率の向上などの報告がなされている。

## 2. 研究の目的

上記の層流中で高速化された化学反应の機構を考えると、原料系と生成系はバッチと同じであること、温度やその他溶液の条件も同じであることから、変わったことといえば活性化エネルギーの大きさであることは、容易に推察される。すなわち、層流が反

応に対して触媒類似効果を与えているということである。これが本提案課題名の「触媒なき反応速度調整効果」の由来である。

しかしながら、これを実験的に証明するためには、速度論解析を中心とした新たな研究計画と、現在とは違った機材の整備を伴う研究となる。これが本研究の骨子である。化学反応を理解し制御するには、その反応への平衡論的アプローチと速度論的アプローチによる理解が有効な組み合わせである。これまでに、平衡論的アプローチのひとつとして前述の熱力学解析を行ったのに対し、本研究は、それと車の両輪を成す速度論的アプローチに関するものである。

本研究では、マイクロ流体中での化学反应の速度論解析を通して、反応速度定数や活性化エネルギー値の測定を行い、それらの流速依存性や流路径(分子にかかる応力の大きさ)依存性、ならびに直接観察などによって得られている挙動の知見との関連性を調べることで、上記「触媒なき反応速度調整効果」の実証を行う。また、系統的な測定により、その効果の大きさや普遍性、ならびに限界について明らかにする。加えて、正の触媒効果だけでなく、負の触媒効果についても注目する。

生産技術等で用いられている多くの化学反应においては、一段の反応のみである単純反応ばかりではないと思われる。このような多段的反応をマイクロ流路で行う場合、ただ単に最終生成物に対して「反応が速くなった」と言っても、その反応のどのような段階で、層流による作用がマイクロ流体からもたらされたのかは不明となってしまう、より高次の反応機設計へのフィードバックが難しくなる。このような状況に対しては、従来の教科書的な速度論解析と組み合わせることで、マイクロ流体はどの素反応に影響を及ぼしたのかなどを知ることにつながる。

## 3. 研究の方法

(1) マイクロ流路を流れている状態を直接的(流れを止めず)に分光分析するためには、フローセル型の設備が必要であり、本研究に手整備を行った。図1は、その構成略図である。フローセルの実温度を測定し、その温度データを循環型恒温槽にフィードバック。循環型恒温槽はパソコンが指定するフローセル温度を達成するために、指定温度よりも若干低いか高い温度の水をフローセルの周囲に排出する、というものである。この自動化は、多くの恒温槽と分光光度計に標準で搭載の機能を組み合わせることで可能であり、この自動化により、迅速な研究計画の進行を実現した。フローセル部分は、SUS316のブロックに穴を開け、テフロン製のガスケットと石英ガラスを両端に配することで、マイクロ

流路とした。このフローセルは、紫外可視分光光度計で (S/N 比的に) 十分に測定可能である直径 800 $\mu\text{m}$  とし、圧力の都合で送液可能な最大流速 7cm/s において、80 まで加温したとしても、レイノルズ数は  $\sim 150$  程度であり、十分に層流状態となる。

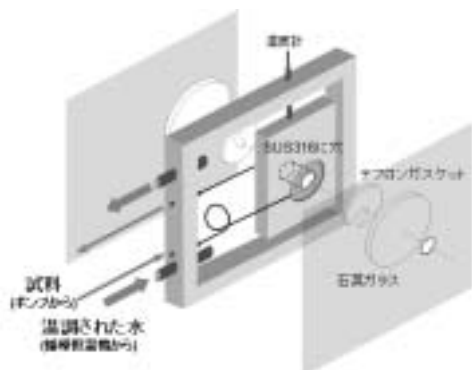


図 1 整備を行った自動温調式フローセルの構成略図。

(2) 本研究における反応速度解析には、それぞれ異なる特徴を持つ 2 種類の方法を用いた。

1 つは、昇温・降温時における反応率の変化とその違いを数学的に解析するものである。適応可能な系は限定されるものの、迅速に多数の系統的な実験が可能である。この方法は、1992 年に最初の報告 (*Biochem. 1992, 31, 9269-9278*) がなされた方法であり、その後、それぞれの目的に応じた改良が加えられながら、数百回にわたって引用されている方法で、十分に信頼性のある手法である。詳細は、数式だらけになるので省略するが、昇温・降温時それぞれにおいて、温度ごとの反応率を何らかの方法 (一般的には分光法) によって測定し、連立方程式を解くことで、各温度における速度定数を求め、アレニウスプロットから活性化エネルギー等の値を得るという方法である。自動的に進行する 1 回の測定から、1 つの反応に対する活性化エネルギーや各温度における速度定数を求めることが可能であるという簡便さがある一方、二状態遷移とみなせる反応や条件範囲においてしか適用できないという制約がある。本研究の目的を考慮すると、初めから複雑な反応系に挑むのではなく、全体を象徴するようなモデル的な系から取り組むという方針で行った。

2 つ目は、各温度における反応速度・反応率を実測定する「教科書的な」方法であり、手間はかかるものの、幅広い系に適用できる。一般に、反応速度の全反応次数は反応の原系の成分数と合致することが反応速度式の解釈から期待されるが、実際の反応では成分数よりも少ない反応次数の速度となることが多い。これは、反応式には書き表されていない

反応経路を經由する複合反応であるためである。この 2 つ目の方法は、1 つ目の方法が二状態遷移の反応速度式に基づいて計算されるのに対し、必要に応じ、測定結果に基づいて異なる反応速度式を導出することができ、本研究が目指す速度論的理解の一般化に資することができる。

(3) 本研究では上記 2 つの反応速度解析の方法を採用した。

1 つ目の方法は、二状態遷移である反応に適用可能であるが、これに当てはまる最も有名な例は、核酸の二重鎖・三重鎖形成と解離に関するものである。本研究では、最初に DNA 鎖を対象とする測定を行うこととする。DNA 鎖は直鎖高分子であり、層流の影響を受けやすい形状であり、各種長さ・配列の試料を容易に入手でき、ならびにこれまでの申請者らの研究結果と関連付けて考察できる。加えて、DNA 鎖は確立された複数の物理化学的解析手法があり、過去に報告されている反応速度論パラメータや熱力学パラメータを参照することで、本研究で整備する機材の有効性についても確認することができた。この研究の結果は、下記の 4.(1) に示す。

2 つ目の反応速度解析に対しては、酵素反応を対象とした測定を中心に検討した。これは、酵素分子が巨大で、層流の影響を受けやすいと予想されること、バッチでの反応が速すぎないこと、ミカエリス・メンテン式による解析等過去の報告の値と実験手法を参照できることなどが利点として挙げられる。この研究の結果は、下記の 4.(2) に示す。

#### 4. 研究成果

(1) 8-23 塩基対 (base pairs, bp) の長さの DNA 鎖の 2 本鎖形成・解離を対象に反応速度解析を行った。昇温時と降温時の温度-吸光度曲線を比較すると、その両方が、流速増大に伴い高温方向へシフトし、熱的安定性の変化が生じていることが分かった。また、遅い流速ではいずれの長さの場合でも、昇温時と降温時の両方がバッチでの曲線と一致していたが、流速増大に伴って「ずれ」が生じた。そのずれは、降温時のほうが、より遅い流速から生じていた。また、この曲線の解析から、反応速度定数、活性化エネルギー、平衡定数、エンタルピー変化、エントロピー変化を得た。反応速度定数においては、DNA 鎖の長さ・流速に対応した変化が見られたが、それぞれ飽和点があった。2 本鎖形成の活性化エネルギーの大きさは、流速増大に従って小さくなり、2 本鎖解離の活性化エネルギーの大きさは大きくなっていったが、短い DNA 鎖では、変化が見られなかった。エンタルピー-エントロピー補償側プロットをとったところ、その傾きは長い DNA 鎖ほど大きく、その傾きの値

は、過去の研究で報告した別の手法による測定結果と一致した。

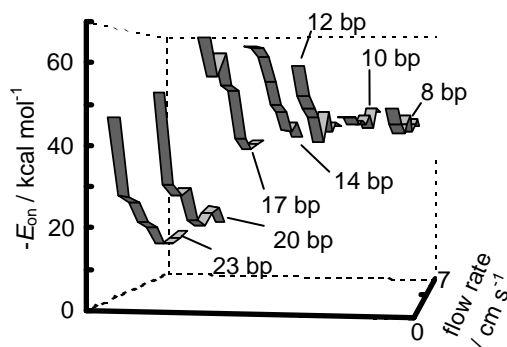


図2 長さ(8-23 bp)が異なる DNA 鎖の 2 本鎖形成の活性化エネルギーの流速依存性

(2)トリプシンによる加水分解反応をモデルとして、その反応が層流中で起こる際の詳細なメカニズムの解析を、ミカエリスメンテン解析により行った。この反応は、特に、層流中での反応速度の変化が大きいものであることが過去に報告されている。

この解析により、ミカエリスメンテン係数、最大速度、回転数の3つの値を得て、さらにこれらの値より触媒効率を計算した。その結果、最大速度と回転数という、化学反応性を直接的に示す値に変化はなかった。一方、ミカエリスメンテン係数は、流速の増大とともに小さな値となり、この結果、触媒効率が増大していることが分かった。このことはすなわち、酵素の活性部位が、基質と効率よく複合体を形成している、または視点を変えれば、「遊んでいる」酵素が少ないことを示している。このことは、酵素を固定する方法において、活性部位が隠れてしまったり、高次構造が変化させられることで活性が低下することはまったく逆の効果を得ていることを

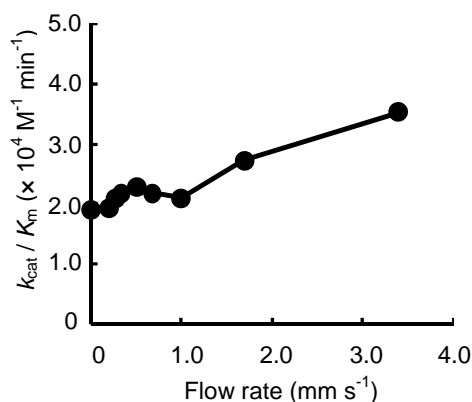


図3 層流中におけるトリプシンの加水分解反応の触媒効率の流速依存性

意味する。

他方、この酵素反応の反応速度の温度依存性から、見かけの活性化エネルギーの流速依存性を検討した。その結果、遅い流速では変化は見られなかったものの、ある流速以上で活性化エネルギーが減少することが確認された。この結果は、反応速度が流速依存性をもって変化することを、速度論解析の視点から確認できたことを意味する。

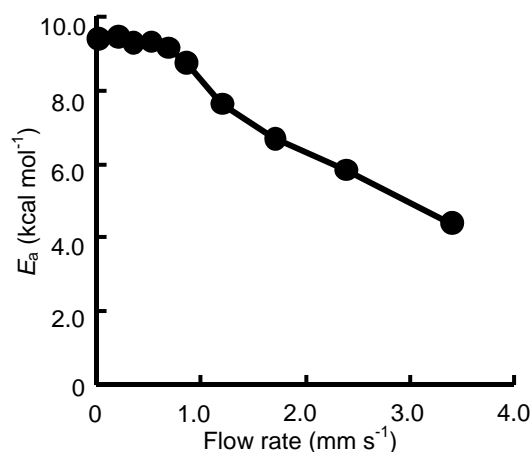


図4 層流中におけるトリプシンの加水分解反応の見かけの活性化エネルギーの流速依存性

## 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)

Kenichi Yamashita, Masaya Miyazaki, Hiroyuki Nakamura, Hideaki Maeda, "Nonimmobilized Enzyme kinetics that rely on laminar flow", *The Journal of Physical Chemistry A*, Vol.113, 165-169 (2009), 査読有

Nagata Maria Portia, Kenichi Yamashita, Masaya Miyazaki, Hiroyuki Nakamura, Hideaki Maeda, "Enhanced thermal stability and mismatch discrimination of mutation-carrying DNA duplexes and their kinetic and thermodynamic properties in microchannel laminar flow", *Analytical Biochemistry*, Vol.390, 38-45 (2009), 査読有

Kenichi Yamashita, Masaya Miyazaki, Hiroyuki Nakamura, Hideaki Maeda, "The change of activation energy in microchannel laminar flow as demonstrated by kinetic analysis of the DNA duplex-coil equilibrium", *Lab on a Chip*, Vol.8, 1171-1177 (2008), 査読有

〔学会発表〕(計1件)

山下健一, DNA 鎖の形態変化と 2 本鎖形成・解離の速度論解析, 第 17 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2008 年 5 月 21 日, 福岡市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山下 健一 (YAMASHITA KENICHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・ナノテクノロジー研究部門・研究員

研究者番号: 90358250