

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24350034

研究課題名(和文)メソ細孔内過冷却水を反応分析場とする低温生化学実験系の構築

研究課題名(英文)Low-temperature biochemical experiments by utilizing supercooled-confined water within silica mesopore

研究代表者

山口 央(Yamaguchi, Akira)

茨城大学・理学部・准教授

研究者番号：10359531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、均一シリカメソ多孔体であるメソポーラスシリカ細孔内での過冷却水(概ね $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $-60^{\circ}\text{C}$ )を利用することで、バルク水溶液系では不可能である低温生化学実験系の構築にある。時間分解蛍光測定から細孔内過冷却水の微視的粘度は小さく、良好な分子拡散が可能な場であることを確認した。細孔内過冷却水中では、希薄水溶液中では熱力学的に不可能である短鎖DNA二本鎖形成が可能であることを見いだした。一方、細孔内過冷却水の凝固/融解挙動がタンパク質の細孔内吸着に依存することを見だし、細孔内タンパク質の中性子散乱測定に成功した。以上、メソポーラスシリカを利用した低温生化学実験系の有効性を実証した。

研究成果の概要(英文)：Cryobiology is one of important approach to study structure and function of biomacromolecules such as DNA, RNA, and proteins. The purpose of this study is application of supercooled confined water within mesoporous silica for low-temperature biochemical experiments. Time-resolved fluorescence study revealed good molecular diffusion within the supercooled confined water. In study on duplex formation of short-DNA fragments, it was revealed that the silica pore with supercooled water could be used to achieve the duplex formation, which could not be occurred in bulk water system. On the other hand, we found that freezing/melting behaviors of the pore water were strongly depended on the amount of protein confined inside the pore. The morphology of protein inside the pore was successfully observed by neutron scattering. These results indicated availability of mesoporous silica for the low-temperature biochemical experiments of biomacromolecules.

研究分野：分析化学

キーワード：メソ細孔 過冷却 タンパク質 DNA

1. 研究開始当初の背景

摂氏 0 以下の低温環境での生化学実験は、分子生物学の基本問題の一つであるタンパク質の構造と機能を研究するための重要なアプローチであり、低温生物物理あるいは低温生化学と呼ばれる研究分野に属する。主に疎水性相互作用によって維持されるタンパク質の高次構造は、正のエントロピー項に支えられるため、低温になるにつれて不安定になると考えられている。従って、氷核生成が抑制された特殊な低温環境水を人為的に作り出すことで、タンパク質の変性を研究することができる。また、低温水中での酵素触媒反応では一連の反応ステップが差動的に遅れるために、低温酵素反応実験は複雑な酵素触媒反応の中間体を特定する有効な手法である。低温生化学実験系を構築するためには、0 以下でも溶媒が凝固しない過冷却状態を安定的に発現させることが求められる。

メソポーラスシリカは、比較的均一な細孔構造を持つ均一メソ多孔体であり、その細孔内では過冷却水が安定的に存在可能であることが分かっている。細孔内水の凝固点は細孔サイズと構造によって変化し、概ね -20°C ~ -60 の範囲に凝固点があることが分かっている。また、X 線や中性子を利用した分光分析、および熱分析によって、細孔内過冷却水の構造、運動性、密度などに関する情報が既に得られている。このような細孔内過冷却水は、溶媒水が凝固しない低温生化学実験系として有効と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、過冷却水を内包するメソポーラスシリカ細孔内を『低温反応分析場』と位置づけ、タンパク質の機能解明に関わる『低温生化学実験系』を構築することを目的とした。具体的には、(1) メソ細孔内 (数 nm ~ 数十 nm) 過冷却環境の評価、(2) メソ細孔内低温生化学実験系の構築、の 2 課題を中心として研究を展開することとした。

3. 研究の方法

各研究課題において以下の研究を遂行した。

(1) メソ細孔内過冷却環境の評価

物質拡散、および平衡定数の温度依存性は、シリカ細孔を利用した低温反応場の特性を議論するために必要不可欠である。そこで、以下のモデル実験系を構築し、検証を行った。

細孔内過冷却水の粘性評価

粘性プローブであるローダミン色素の蛍光寿命解析から、細孔内過冷却水の粘度の推定を行った。

包接錯体平衡の温度依存性

シクロデキストリンと有機分子の包接錯体形成は、生体高分子と基質間の相互作用を考えるためのモデル反応と考えられる。そこで、シクロデキストリンとクマリン色素の包接錯体平衡を蛍光測定から検証した。

(2) メソ細孔内低温生化学実験系の構築

モデルタンパク質の選定

実験系構築に用いるモデルタンパク質の選定が必要不可欠である。そこで、バルク溶液系での挙動が既知であり、測定が容易な光捕集複合体 LH2、およびミオグロビンについてシリカ細孔内における構造と熱安定性に関する検証を行った。

DNA を用いた実験系の構築と特性評価

DNA は比較的簡単な 2 次構造をとるために、その構造の決定や安定性評価が比較的容易である。ここでは、3~5 塩基の短鎖 DNA 二重鎖、およびヘアピンループ構造をモデルとした低温生化学実験系の構築を行った。また、細孔サイズの影響を中心として、構築した実験系の特性を評価した。

4. 研究成果

(1) メソ細孔内過冷却環境の評価

細孔内過冷却水の粘性評価

メソポーラスシリカの細孔内壁に APTES (3-Aminopropyltriethoxysilane) の単分子層を形成後、ローダミンイソチオシアネートを結合させた (図 1)。APTES 修飾後の実効細孔径は 3.1 nm である。このように固定化したローダミンの時間分解蛍光を 20°C ~ 50 の温度範囲で計測した。その結果、細孔内ローダミン色素の蛍光寿命は、バルク水系とバルクアルコール系の中に位置することが分かった (図 1)。測定した蛍光寿命は、温度と粘性に関する VTF (Vogel-Tmmann-Fulcher) 式から解析し、細孔内水の微視的粘度を推定した。その結果、温度が 20, 0 についてはそれぞれ 0.55 mPa, 0.80 mPa であった。また、過冷却状態については、2.3 mPa (-30 ), 12

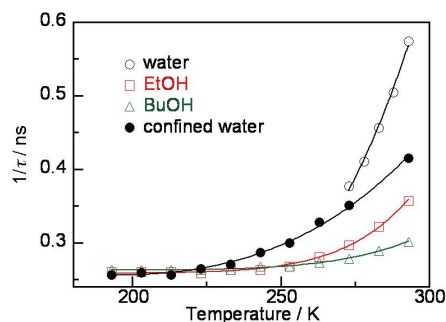
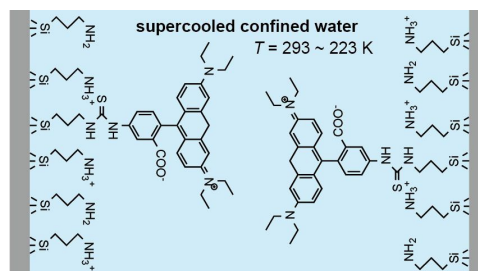


図 1 メソポーラスシリカ細孔 (細孔径 3.1 nm) 内に固定化した RhB の模式図、およびバルク溶媒系と細孔径における RhB 蛍光寿命の温度依存性

mPa (-50 )と推定された[1]。このように、過冷却水の粘度は温度低下によって一桁程度大きくなるものの、-50 においても常温のヘキサノール程度であり、溶媒粘度の面からは比較的良好な物質拡散が可能であることが分かった。以上、細孔内過冷却水が、物質拡散が関与する反応場として利用可能であることが示された。

#### 包接錯体平衡の温度依存性

細孔（細孔径：70 nm）の内壁に APTES を介してクマリン色素を固定化（図 2）し、固定化クマリンと $\beta$ -シクロデキストリン（以下、CD）間の包接錯体平衡を検証した。ここでは、包接錯体形成によるクマリン蛍光の増大を利用して、Langmuir 吸着定数（CD の表面固定化クマリンへの吸着）を算出し、その温度依存性を議論した。常温付近における吸着定数の van't Hoff プロットから解析された熱力学的パラメータは、 $-8.0 \text{ kcal mol}^{-1}$  ( $\Delta H$ )、 $-6.1 \text{ kcal mol}^{-1}$  ( $T\Delta S$ ) であり、包接錯体形成がエンタルピー駆動の発熱反応であることが分かった。これは、過冷却環境で包接錯体形成が促進されることを示唆する。実際に、-40 までの蛍光測定からその事実が確認された（図 2）。以上、過冷却環境においても、常温近傍で推定される熱力学的パラメータに従って、分子間反応が進行することが示唆された[5]。

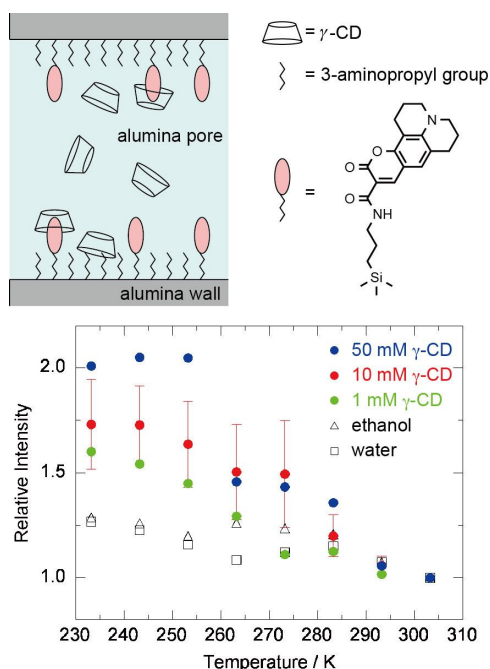


図 2 アルミナ細孔内壁に固定化したクマリン色素の模式図、および $\gamma$ -CD 存在下でのクマリン蛍光の温度依存性

#### (2) メソ細孔内低温生化学実験系の構築 モデルタンパク質の選定

光捕集複合体 LH2 は、バクテリオクロロフィル (BCh) を含む $\alpha$ 、 $\beta$ -ポリペプチドがリン

グ状に配列した膜タンパク質であり、その近赤外吸収は、リング状構造の変化を鋭敏に反映する。そこで、細孔内における LH2 の近赤外吸収スペクトル測定から、シリカ細孔内における LH2 構造安定性の特異性、および低温環境での構造を検証することを目指した。ここでは、2.4~10.4 nm の間で細孔径が異なる一連のメソポーラスシリカを合成し、そこに吸着した LH2（茨城大学大友教授より提供）の吸収スペクトルおよび円二色性スペクトルの温度依存性を測定した（図 3）。その結果、シリカ細孔内とバルク溶液分散系で、LH2 の構造と熱安定性に大きな変化が無いことが分かった。その理由として、リング状構造を形成する疎水性相互作用が LH2 の構造安定性を決定しているための推察される[7]。このように細孔内外で構造安定性に変化が無いタンパク質では、低温生化学実験系の有効性を打ち出せないと判断し、ミオグロビンを利用した実験について次に検討した。

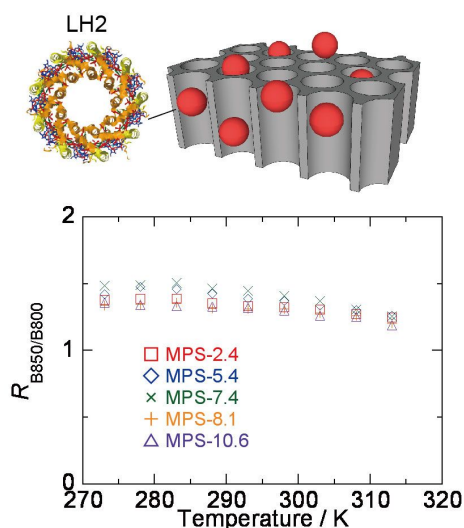


図 3 メソポーラスシリカ細孔内に導入された LH2 の模式図、および細孔径の異なるメソポーラスシリカ (MPS-xx; xx は細孔径[nm]) に吸着した LH2 の近赤外吸収 (B850 吸収帯と B800 吸収帯のピーク強度比) の温度依存性

ミオグロビンは、8 個の $\alpha$ ヘリックスが連結し、中心ヘムを取り囲む構造のタンパク質である。これについては、細孔サイズ依存して、細孔内における構造安定性が極端に変化することを吸収スペクトル測定から見いだした。また、熱分析 (DSC 測定) から、ミオグロビン自身の低温変性は-60 までの温度範囲で確認されなかったものの、ミオグロビン存在による細孔内過冷却水の凝固点変調、という興味深い結果が得られた（図 4）。以上の結果から、ミオグロビンを利用した低温生化学実験系の開拓の道を開くことができ、今後行っていく予定である。また、申請書段階で



計画していた中性子散乱測定について、ミオグロビン吸着メソポーラスシリカの測定を行った（J-PARC, 2015 年度トライアルユースで採択）。その結果、細孔内ミオグロビンの配列状態に依存した散乱スペクトル（詳細は解析中）が得られた。メソポーラスシリカ細孔内におけるタンパク質の中性子散乱測定は、この結果が初めてであり、細孔内水の集団運動やタンパク質の揺らぎ測定が可能である、中性子を利用した研究の端緒を開いた。

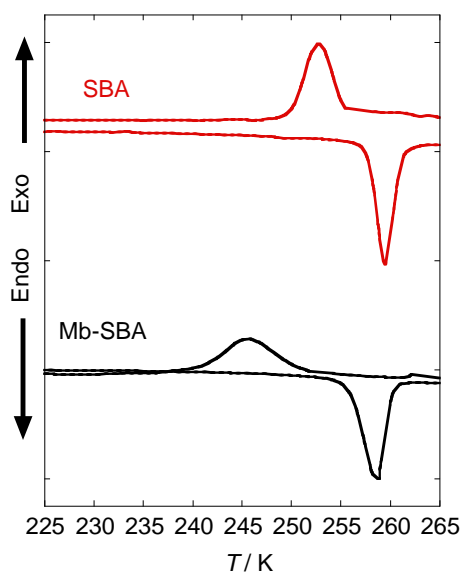


図4 Mbの細孔内吸着によるDSC応答の変化。SBA: メソポーラスシリカ, Mb-SBA: Mb吸着SBA

#### DNAを用いた実験系の構築と特性評価

DNA二重鎖形成は、塩基対数が4個以下ではその $\Delta G$ は正であり、水溶液中では自発的に進行しない。ここでは、細孔内過冷却水を利用することで、塩基対数が3の短鎖DNA二重鎖形成平衡を低温環境で制御可能であること、過冷却水を内包する細孔内で二重鎖形成が効率的に進行することを見いだした。

具体的には、アデニン、およびチミンの三量体であるDNA (AAA, TTT) をアミン (TMAP: trimethyl aminopropyl) 修飾したシリカ細孔内 (実効細孔径: 2.4 nm) に閉じ込めて、 $30^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$  の温度範囲で二重鎖形成率をFRET (蛍光共鳴エネルギー移動) 測定から測定した (図5)。図6(a)に示すようにバルク水溶液系では観測されなかったFRET応答が、細孔径で明瞭に観察できることが分かった。また、図6(b)に示すようにFRET応答は温度低下とともに大きくなり、DNA塩基数や配列依存性などの結果から、低温環境でのFRET応答増大がWatson-Click塩基対形成によるAAA/TTT二重鎖形成に起因することが

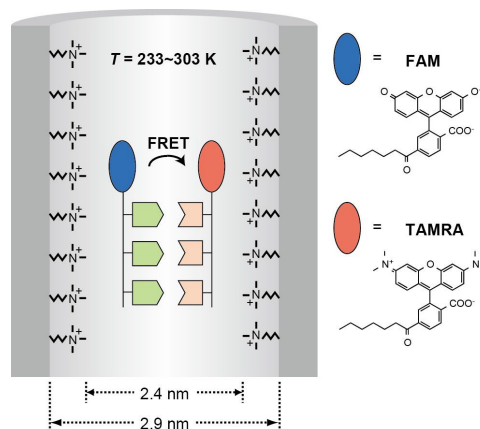


図5 TMAP修飾したシリカ細孔内に閉じ込められた3塩基DNA断片(色素修飾)の模式図

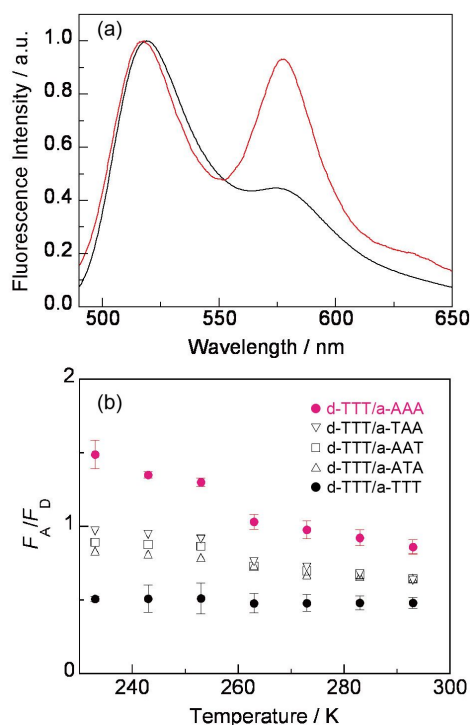


図6 (a)バルク系(黒線)と細孔系(赤線)における蛍光スペクトル(塩基配列: AAA/TTT), (b)細孔系におけるFRET応答の温度依存性

示された。また、AAA/TTT二重鎖形成率の温度依存性から推定された二重鎖形成エンタルピーは、 $-5.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ であった。このエンタルピー値は、一塩基変異を有するTAA/TTT ( $-5.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), ATA/TTT ( $-3.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), AAT/TTT ( $-4.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) とほぼ同定であった。WC塩基対が一個無い変異系において二重鎖形成エンタルピーが大きく変化しない要因としては、幾何学的な閉じ込め効果が重要な役割を果たしていると考えら

れる。一般的に変異部位の核酸塩基は二重らせん構造の外側にフリップアウトすることがある。一方、二重らせんの直径とほぼ一致したアミン修飾シリカメソ細孔(2.4 nm)では、変位部位の核酸塩基がフリップアウトできずらせん構造内部に強制的にたたみ込まれ、T:T 塩基対を形成したためと考えられる[6]。

このように、DNA 構造の大きさと細孔サイズが二重らせん構造形成に影響をおよぼすことが示唆されたため、次に、二重鎖構造形成と細孔サイズの相関を検証した。その結果、(i)二重鎖直径と細孔サイズが一致する時に二重鎖形成が安定化すること、(ii)細孔サイズが僅かに大きい場合は安定性が低下すること、(iii)細孔サイズが二重鎖直径より小さい場合は二重鎖が形成しないこと、といった興味深い結果を得た。これらの理由としては、構造形成の引力となる DNA 分子間の相互作用(水素結合、 $\pi$ - $\pi$ スタッキング)、構造形成の斥力となる DNA と細孔内壁との静電相互作用のつりあいによって構造安定性が決定されているためと考えられる。

DNA 二重鎖構造がアミン修飾したシリカ細孔内で安定化されることが分かった一方で、ヘアピンループ構造をとる DNA である (CCG)<sub>4</sub> については、細孔内で逆に不安定化することも分かった。熱変性挙動から推定される形成エンタルピーの差(バルク溶液系と細孔内系の差:  $\Delta\Delta H$ ) は  $0.8 \text{ kcal mol}^{-1}$  と小さな値であった。これらの結果から、ループ部位と細孔内壁との静電相互作用によってヘアピンループ構造が若干歪むために、細孔内で構造不安定化したことが示唆された。

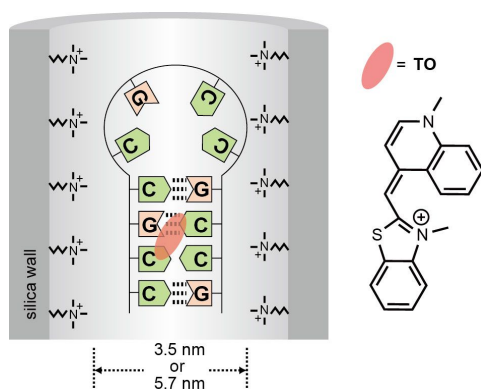


図 7 TMAP 修飾シリカ細孔内に閉じ込められた(CCG)<sub>4</sub>ヘアピンと TO 複合体の模式図

以上、本課題においては、DNA の 2 次構造形成に関する『低温生化学実験系』に成功し、そこで得られる熱力学的パラメーター ( $\Delta H$ ) から DNA 2 次構造の安定性が DNA 構造と細孔サイズに大きく依存することが分かった。開拓した『低温生化学実験系』の最大の特徴は、バルク溶液系では熱力学的に困難な DNA 2 次構造を細孔内で形成させ、その平衡

と熱力学的パラメーターを議論できる点にある。細胞内では、リボソームにおけるコドン-アンチコドン結合などバルク水溶液系では発現しない特異な高次構造が形成される。このように生物学的に意義のある高次構造を in-vitro 系で研究する手段として、シリカメソ細孔を用いた『低温生化学実験系』は有効と考えられる。

## 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 12 件)

- (1) Y. Shibuya, T. Itoh, S. Matsuura, A. Yamaguchi, “Structural Stability of Light-Harvesting Protein LH2 Adsorbed on Mesoporous Silica Supports”, *Anal. Sci.*, **31**, 1069-1074 (2015).
- (2) H. Arafune, A. Yamaguchi, M. Namekawa, Y. Sato, T. Itoh, R. Yoshida, N. Teramae, “Trinucleotide duplex formation inside a confined nanospace under supercooled conditions”, *Nature Commun.*, **5**, 5151 (2014).
- (3) A. Yamaguchi, T. Denda, “Inclusion Complexation of  $\gamma$ -Cyclodextrin and Coumarin Dye inside Alumina Nanopores Over a Temperature Range of 303 - 223 K”, *J. Phys. Chem. C*, **117**, 17567-17573 (2013).
- (4) 山口央, 渋谷祐太, 成澤淳, 滑川真人, 菅原大輝, 荒船博之, 寺前紀夫, 「メソポラスシリカ細孔構造制御と細孔内環境の評価」*分析化学*, **62**, 581-588 (2013).
- (5) H. Arafune, A. Yamaguchi, K. Hotta, T. Itoh, N. Teramae, “Encapsulation of PEG-modified Myoglobin in Hydrophobic Mesoporous Silica as Studied by Optical Waveguide Spectroscopy”, *Anal. Sci.*, **29**, 187-192 (2013).
- (6) K. Hotta, A. Yamaguchi, N. Teramae, “Deposition of Polyelectrolyte Multilayer Film on a Nanoporous Alumina Membrane for Stable Label-Free Optical Biosensing”, *J. Phys. Chem. C*, **116**, 23533-23539 (2012).
- (7) A. Yamaguchi, M. Namekawa, T. Itoh, N. Teramae, “Microviscosity of supercooled water confined within aminopropyl-modified mesoporous silica as studied by time-resolved fluorescence spectroscopy”, *Anal. Sci.*, **28**, 1065-1070 (2012).

〔学会発表〕(計 42 件)

国内外での学会・学術講演会における招待・特別講演

- (1) A. Yamaguchi, “Optical waveguide spectroscopy for study of biological events inside inorganic nanopores”, PACIFICHEM 2015, Hawaii, 19 Dec. 2015.
- (2) A. Yamaguchi, “Stabilities of DNA

secondary structures inside confined nanospace”, 2<sup>nd</sup> Asian Symposium on Analytical Sciences, Kyusyu Univ., 10, Sep., 2015.

- (3) 山口 央, 「アルミナナノ細孔を利用したバイオセンサー」, 第31回 ARS 足柄コンファレンス, いこいの村あしがら, 2014年11月20日
- (4) A. Yamaguchi, “Fabrication of Hybrid Mesoporous Membrane for Bioanalysis”, SNCPP13, Ritsumeikan Univ., 29, June, 2013.
- (5) 山口 央, 「ナノポーラス構造に基づくバイオセンシング」, 2013年真空・表面科学合同講演会, つくば国際会議場, 2013年11月27日
- (6) 山口 央, 「多孔質ナノ材料の分析化学などへの応用について」, 富山県衛生研究所合同セミナー, 富山県衛生研究所, 2012年9月18日

〔その他〕

ホームページ等

<http://anal.sci.ibaraki.ac.jp/yama/yamalab.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山口 央 (YAMAGUCHI AKIRA)

研究者番号: 10359531

茨城大学・理学部・准教授

### (2) 研究分担者

伊藤 徹二 (ITO TETSUJI)

研究者番号: 70392587

産総研・主任研究員