

(様式第4号)

## 実施課題名 層流環境下におけるタンパクの高次構造変化の XAFS 測定による解明

**English** XAFS measurement of conformational changes of proteins in microchannel  
laminar flow

著者氏名 山下健一

**English** Kenichi Yamashita

著者所属 独立行政法人産業技術総合研究所

**English** National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

※長期利用課題は、実施課題名の末尾に期を表す (I)、(II)、(III) を追記すること。

### 1. 概要

層流中に置かれた分子は、周辺環境から異方的な作用を受け、高次構造や配向状態の変化を起し、さらには、特殊な化学反応性の変化を起すようになる。本研究では、層流中における酵素反応の反応速度変化のメカニズムを詳細に検討するため、層流中における酵素の活性中心付近の環境の変化を XAFS 測定により捉えることを目的とする。特に今回の測定 (1日10時間) はこのような実験のための最初のビームタイム割り当てであり、XAFS 測定に用いる試薬や自作の器具等の条件検討を中心に行った。

(English)

In contrast to a batchwise system, interaction of the solute with solvent in a microchannel laminar flow is non-isotropic, suggesting that such a chemical reactivity is characteristic of solutes in a laminar condition. In this study, we examine the environment of active center of metalloproteins in a laminar flow by XAFS measurement, and elucidate the mechanisms of characteristic chemical reactivity in a laminar condition.

### 2. 背景と研究目的：

層流中に置かれた分子は、周辺環境から異方的な作用を受け、高次構造や配向状態の変化を起し<sup>1,2</sup>、さらには、特殊な化学反応性の変化を起すようになる。これまでにマイクロ流体中における様々な特徴的の化学反応を見出し<sup>3,6</sup>、そ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<sup>3,4</sup>や速度論解析<sup>5,6</sup>を行った。この結果、熱力学の視点からは、層流は配座エントロピー調整効果を有していること<sup>3,4</sup>が分かった。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。他方、速度論の視点からは、見かけの活性化エネルギーの大きさが、流速依存性を持って変化していることが明らかとなった<sup>5,6</sup>。また、当初想定していた巨大分子だけではなく、比較的的低分子に対しても、熱力学的・速度論的性質の変化が起していることが確認されている。加えて、今回測定対象としている酵素反応についても、流速で反応速度を調節できることや、その機構 (基質を効率よく捕まえている) も報告している<sup>6</sup>。

前述のとおり、層流環境中における分子の挙動に着目した点は、一連の研究の独創性の中心である。また、放射光施設を利用することで、特異な化学反応の機構を解明し、さらに新しい化学反応の概念構築へと展開しようとしている。すなわち、層流中における分子の姿の変化を捉えることで、層流を用いたプロセス設計を可能にするを旨とする。ここで言う、「分子の姿の変化」とは、配向性の変化や分子の微妙な高次構造の変化である。これまでの検討により、層流中での化学反応性の変化には、この「分子の姿の変化」を伴っていることは明らかとなっているが、どのような変化であるのかを知るまでには至っていない。そのために、定性的な議論に終始しがちであり、逆に変化を予測して反応を設計するという段階には至っていない。これまでの研究は、溶液全体を見るという視点から行い、その結果、分子の全体平均的な変化をとらえることには成功している。しかしながら、このような全体平均的な検討では、化学反応をデザインしてプロセス技術への展開を図るための一貫した知見を得

るまでには至っておらず、さらに一步踏み込むためには、層流中での個々の分子種の姿がどのように変化しているのかを知る必要に迫られている。本申込は、この点に関するものである。

層流中における分子の挙動や化学反応性の変化というサイエンティフィックな点に加え、分子を変形させたり配向させたりすることにほとんどエネルギーの投入の必要がない超省エネルギープロセスである点に注目している。

分子を好きな形に曲げたり伸ばしたり、結び目を作ったりするようなことはできないものの、層流は、マイクロ流路に溶液を流すだけという単純操作かつ単純機構により、配向性の制御に必要な最低限の（そして大半は事足りる）分子操作が可能である。すなわち、マイクロ流路は、電場や磁場やその他外力を必要とすることもなく、送液という最低限のエネルギー投入で、必要な範囲で最大級の効果を得ることが可能な化学反応器（分子の秩序を制御する、広義の反応器という意味も込めて）であると考えている。一連の研究を通して、このようなマイクロ流体の特別な性質をもって、低エネルギー投入で化学反応性と生産性を向上させるという、新しい化学反応概念を構築しようと考えている。加えて、一般論として反応速度が遅いとされる、酵素を用いた製造プロセスの効率化や制御へも応用可能であると考えている。

しかしながら、これまでの研究の中で、分子の形や配向性の変化が起こっている状態を具体的に特定できた系は限定的で、ほとんどの場合、そのようなことが起こっていることは、熱力学パラメータからして確実でも、その詳細は分からず、結果としての化学反応性の向上や物理化学的性質の変化だけが明らかとなっているだけである。本提案課題は、この「分子の形や配向性の変化」を、放射光を用いて解析し、一連の問題を解決しようとしている。このような研究の成果により、初めて「分子の挙動から有効な化学反応を組み立てる」という流れを作り出すことができ、上記の、超省エネルギーな分子操作と高機能デバイスの製造技術としての応用を完成することができる。

### 3. 実験内容（試料、実験方法の説明）

今回の測定では、ペルオキシターゼという酵素を対象とし、その水溶液の静置状態とマイクロ流路を流れている状態の2つの状態に対して X線吸収微細構造（XAFS）測定を行う。なお、今回割り当てのビームタイムは、初回であり1日10時間ということもあり、測定に用いるべき溶液の条件検討、複数種類準備したマイクロ流路形状のうち、どれが最も測定に適しているか（用いた材料のX線透過の程度という測定データの質に直結するものから、使いやすさという点も含めて）の検討を中心とする。

これまでの研究から、タンパクのような決まった高次構造を持つような巨大分子が、層流中において微小な高次構造変化を起こしているのではないかと考えている。なぜなら、これまでの研究において、層流中での酵素反応速度の変化の解析結果が、基質と効率よく結合し、反応後にすばやく解離するという状況を示しているためである。このようなことが起こるためには、活性中心への立体障害が緩和されていると推察している。上記ペルオキシターゼは、層流中での反応速度の変化が著しい酵素であるが、その活性中心には鉄元素があり、さらに3つのフェニルアラニンの「蓋」があることが知られている<sup>7</sup>。この鉄原子を対象としてXAFS測定を行うことで、静置状態と層流状態における活性中心の環境の変化を知ることが、今回の実験の最大の狙いである。具体的には、上記「蓋」と鉄原子の位置関係や、鉄周辺の溶媒和環境の変化を知ることができるのではないかと考えている。

具体的な実験条件は、事前の利用相談の中で議論した内容を基に検討を行った。測定対象とする溶液は、上記ペルオキシターゼ（horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7)）を1mM-6mM程度の範囲で数種類準備した。緩衝液は、有機酸とそのアンモニウム塩からなるような、比較的軽い元素からなるものを使用し（今回は、 $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ）、その濃度は1mM-10mMの範囲で準備した。このような溶液をマイクロ流路に送液しながら、そこにX線を照射し、XAFS測定を行

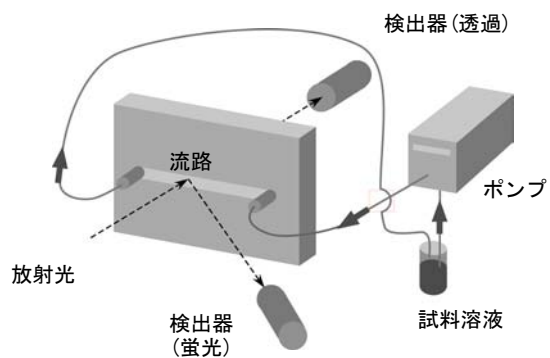


図1 今回のビームタイムで行った測定のセットアップの概略と、次回以降に予定している送液状態での測定の概略。

うことを目指す。すなわちフローセルを用いたin-situ測定である。

このフローセルは、今回の測定用に適したものを新たに準備した。具体的に検討した内容としては、ポリエチレンフィルムを窓材としたものや、機械掘削でマイクロ流路を刻設するものの2通りであった。このうち前者については、ポリエチレンフィルムのシリコンやアクリル板への熱圧着などを、示差走査熱量測定 (DSC) などを用いて検討したものの、十分な接着強度を得ることができず、今回のビームタイムでの使用を断念した。他方、後者については、厚さ1mmのアクリル板を、マイクロドリルを用いて掘削し、残り厚さ20 $\mu\text{m}$ まで掘り進むことで、「厚さ20 $\mu\text{m}$ のアクリルの窓を全体に持つマイクロ流路」とした。なお、マイクロ流路の幅は、200 $\mu\text{m}$ のものを今回の実験に用いた。

測定は、蛍光法を中心に、透過法の可否も検討した。XAFS測定に用いた機材は、BL11に設置されているものをそのまま用いた。既設の試料ホルダに、試料溶液を充てんした、前述の20 $\mu\text{m}$ 厚のアクリル窓を持つマイクロリアクタを設置し、鉄元素に適したエネルギー範囲の測定を行った。

#### 4. 実験結果と考察

今回のビームタイムでは、準備したマイクロ流体チップの使用の可否や、解析し得る範囲でできるだけ低い濃度を探索するという条件検討等を中心に行った。

まず、緩衝液について検討を行ったが、準備した $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4(\text{pH}6.6)$ は、準備していた中で最も高い濃度である10mMでもXAFS測定に影響を与えることはなかった。そのため、以下の実験では、この緩衝液を用いることとした。

ペルオキシダーゼの鉄原子を対象としたXAFS測定を始めるにあたり、蛍光法での測定を中心に行った。これは、過去の報告から蛍光法による測定が現実的であることが述べられていた<sup>8</sup>ためである。

ペルオキシダーゼの濃度については、1mMと3mMについて最初に検討を行ったが、1mMの溶液については、XANES測定にすら対応できないほど希薄であることが分かった。他方、3mMについては、XANES解析には使えそうな質のスペクトルであったが、確認できたEXAFS振動は、せいぜい4 $\text{\AA}$ 付近までという状況であり、さらなる高濃度溶液が必要であることが分かった。そこで6mMの溶液を準備し、測定を行ったところ、6 $\text{\AA}$ 付近までのEXAFS振動を、ノイズが多いながらも何とか見ることができるとはいえないか、というところまで確認することができた。今後は、さらなる高濃度溶液を用いることと、積算回数を増やす測定を行う必要があることが確認された。現実的に準備可能な濃度であるが、おそらく、ペルオキシダーゼの固体状態での「かさ高さ」の都合から、せいぜい10mM程度ではないかと考えている。

なお、ペルオキシダーゼのXANES測定については、過去の報告<sup>8</sup>があり、2mMでの測定例がある。今回の実験では、この報告と同等か、やや低濃度でも測定可能であったようで、この点は、検出器の進歩などに因るところが大きいと考えている。

今回のビームタイムでは、透過法による測定についても検討した。この測定では、20 $\mu\text{m}$ 厚のアクリル板窓を持つマイクロ流路を2枚張り合わせることで、両窓とも20 $\mu\text{m}$ 厚としたものを使用した。しかしながら、溶媒によるX線吸収が非常に強く、スペクトルを得ることすら難しい状況であった。

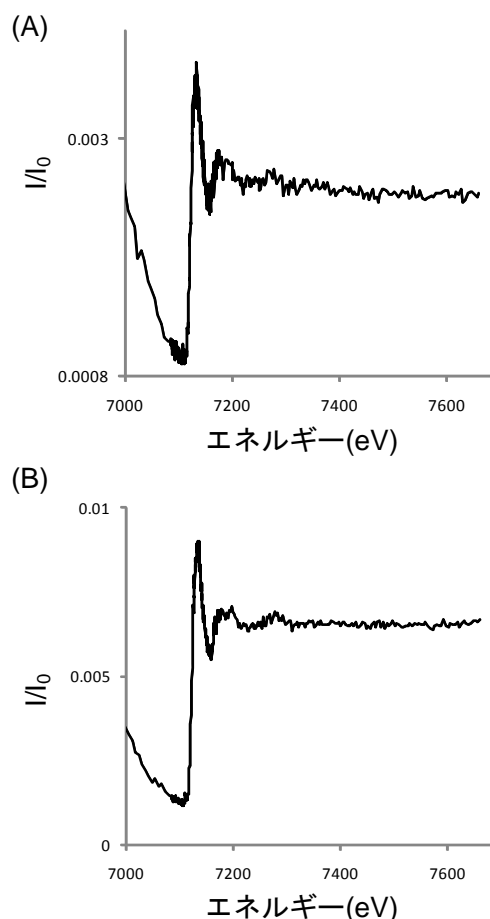


図2 ペルオキシダーゼ水溶液のXAFSスペクトル。(A)は3mM、(B)は6mMの濃度のもの。濃度が2倍になることで、全体的なノイズレベルの改善とともに、7200-7300eV付近のEXAFS振動が顕著になっている。

## 5. 今後の課題：

今回のビームタイムでは、実験に用いるマイクロ流路部材や溶液条件などの基本的な情報を得ることができた。なお、時間切れのため、ポンプを用いて流れている状態での測定をするまでには至らなかった。

近いうちに、次回ビームタイムの申請を行いたいと考えている。今回の実験で得られた条件検討結果を基に測定試料を準備の上、実験に臨む予定である。その際、積算回数などの都合から、測定時間は長めになるものと考えており、そのため、本研究の目的に沿った結果が得られるかどうかの確認ができるまでは、一条件ずつなど、短めのビームタイムを何度も獲得したいと考えている。次回は、マイクロ流路に溶液を送液しながら、すなわち層流状態での測定を行い、その結果をバッチ中での結果と比較する。このような測定によって初めて、本研究が目指す内容についての評価が可能になる。

## 6. 論文発表状況・特許状況

今回の測定によって直接的にもたらされた原著論文や特許はない。

## 7. 参考文献

- 1) K. Yamashita, Y. Yamaguchi, M. Miyazaki, H. Nakamura, H. Shimizu and H. Maeda, "Sequence-selective DNA detection using multiple laminar streams: A novel microfluidic analysis method", *Lab on a Chip*, Vol.4, 1-3 (2004)
- 2) K. Yamashita, Y. Yamaguchi, M. Miyazaki, H. Nakamura, H. Shimizu, H. Maeda, "Direct observation of long-strand DNA conformational changing in microchannel flow and microfluidic hybridization assay", *Analytical Biochemistry*, Vol.332, 274-279 (2004)
- 3) K. Yamashita, M. Miyazaki, Y. Yamaguchi, H. Nakamura, H. Maeda, "Microfluidic thermodynamics of the shift in thermal stability of DNA duplex in a microchannel laminar flow", *The Journal of Physical Chemistry B*, Vol.111, 6127-6133 (2007)
- 4) K. Yamashita, M. Miyazaki, Y. Yamaguchi, H. Nakamura, H. Maeda, "Thermodynamic properties of duplex DNA in microchannel laminar flow", *ChemPhysChem*, Vol. 8, 1307-1310 (2007)
- 5) K. Yamashita, M. Miyazaki, H. Nakamura, H. 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)
- 6) K. Yamashita, M. Miyazaki, H. Nakamura, H. Maeda, "Nonimmobilized Enzyme kinetics that rely on laminar flow", *The Journal of Physical Chemistry A*, Vol.113, 165-169 (2009)
- 7) M. Gajhede, D. J. Schuller, A. Henriksen, A. T. Smith, T. L. Poulos, "Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution", *Nature Structural Biology*, Vol. 4, 1032-1038 (1997)
- 8) 飯塚哲太郎, 井上頼直, "蛍光 XAFS 法によるタンパク質の局所構造解析", *生物物理*, Vol. 35, 255-258 (1995)

## 8. キーワード (試料及び実験方法を特定する用語を2~3)

### ・層流

流体において、その流れがいずれの場所においても一定の方向を向いている状態、またはそのような流れ。一般的には、レイノルズ数が小さい流れの状態であり、すなわち、管径が小さく、流速が小さく、密度が小さく、粘度が大きいほど層流になりやすい。

### ・ペルオキシダーゼ

一般的には、ペルオキシド構造を酸化的に切断して2つのヒドロキシル基に分解する酵素の総称であり、本実験で用いた西洋わさび由来のもののように、活性中心にヘムを有するものも多い。