

A scenic landscape photograph of a valley with a river and mountains. The river flows through the center of the valley, reflecting the surrounding mountains and sky. The mountains are covered in dense forests, and the sky is a clear, light blue. The overall scene is peaceful and natural.

# H21年度ITP派遣者 帰国報告会 Debriefing Session of ITP 2009

生体分子機能工学専攻  
岡畑・森研究室 小島 泰輔

# アジア・ヨーロッパ国際連携による 環境生命工学若手研究者育成プログラム

## 環境生命工学

### 教育：将来を担う人材の育成

- ・世界的リーディング大学における最先端研究
- ・合理的な考察と説明の鍛錬
- ・チームワーク能力とリーダーシップの養成
- ・若手研究者同士の相互啓発

### 研究：持続発展可能な社会を支える新しいバイオテクノロジーの共同開発

若手育成のグローバルネットワークの構築

# 派遣先: スイス連邦工科大学チューリッヒ校

**ETH**

Eidgenössische Technische Hochschule Zürich  
Swiss Federal Institute of Technology Zurich

英語 Swiss Federal Institute of Technology Zurich (ETH Zurich)



Zürich市街



Hönggerbergキャンパス



# 派遣先グループ: Polymer Chemistryグループ



Prof. Dr. Peter Walde

専門: リポソームを利用  
(内側・外側)した酵素反  
応や生体模倣系の構築

# 派遣先グループ: Polymer Chemistryグループ

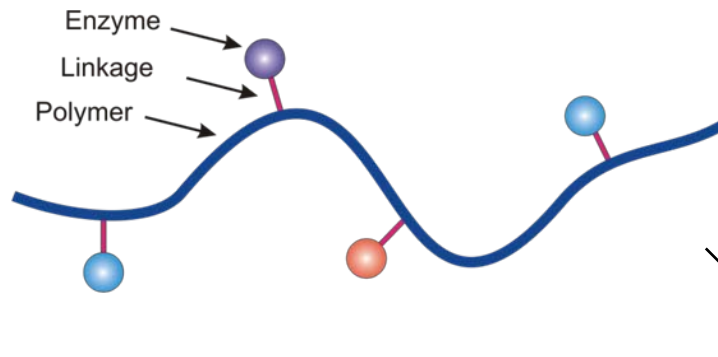


Ms. Grotzky Andrea

博士課程1年: 酵素-デン  
ドリマー複合体の調製と  
機能評価

# 参加プロジェクトの概要

Objective: preparation, quantification and characterization of **active** multi-enzyme-denpol conjugates



Non-covalent  
enzyme-polymer  
linkage

linkage: Biotin-Avidin

enzyme: Horseradish  
peroxidase (HRP)

Sara Fornera

**Covalent**  
enzyme-polymer  
linkage

linkage: SoluLink™

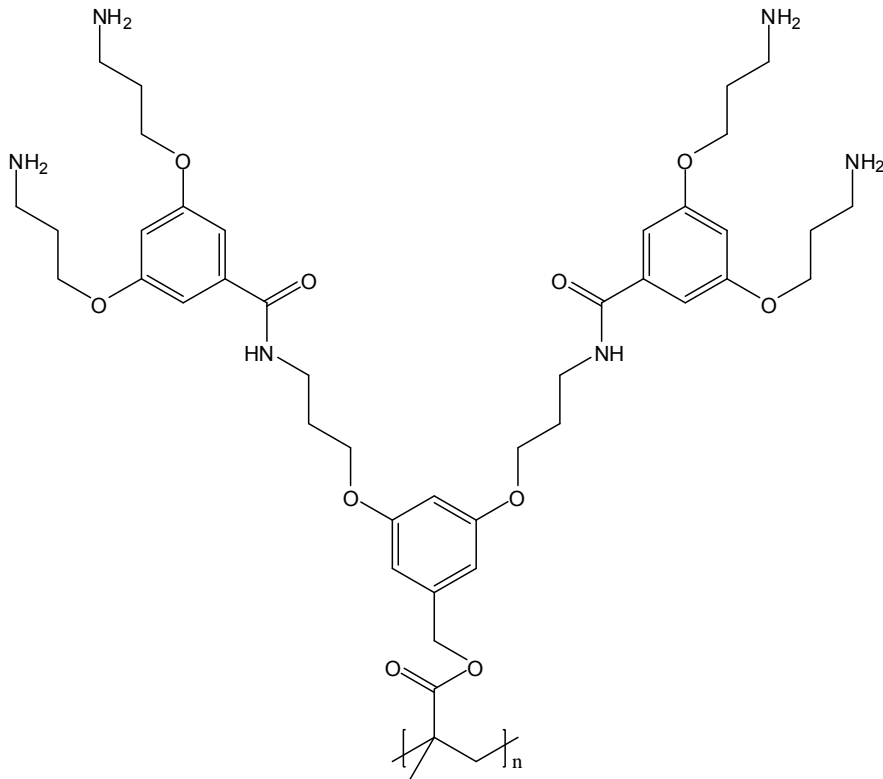
(Hydrazone bond)

enzyme: Horseradish  
peroxidase (HRP)

Andrea Grotzky

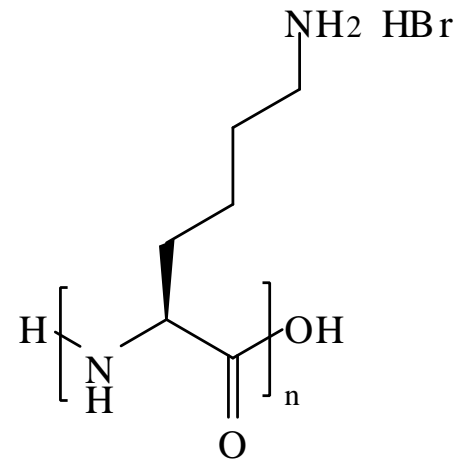
# ポリマー検討

water soluble, amine decorated denpol



PGO2 (Afang Zhang, Baozhong Zhang)  
average polymerization degree ~ 1000

poly-D-lysine as reference  
(commercially available)



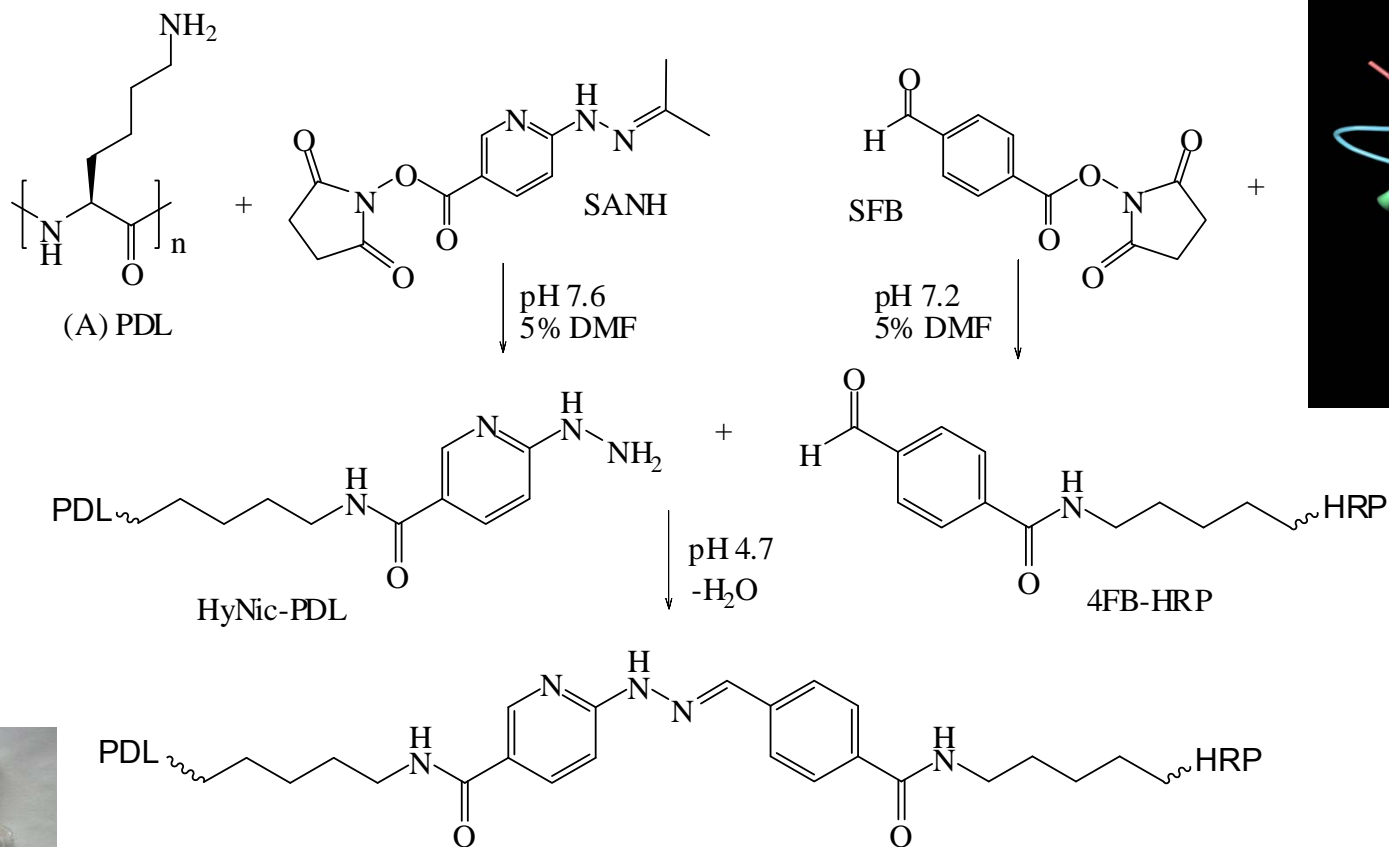
$\alpha$ -poly-D-lysine (PDL)

$M_w = 150'000 - 300'000 \text{ g/mol}$

(average 220,000 g / mol)

average polymerization degree ~ 1070

# ヒドラゾン結合による共有結合形成



(B) HRP



(C) PDL-hydrazone-HRP

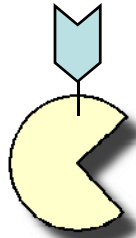
reactions under **mild** conditions:

- in aqueous solution, pH 5-7
- room temperature

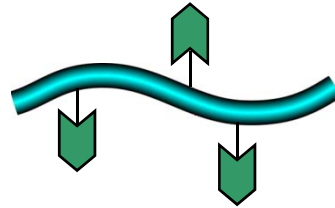


# 本研究の目的

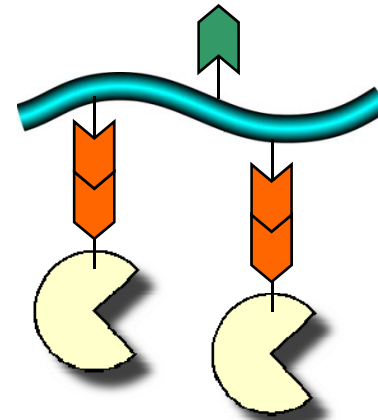
- Preparation of



4FB-HRP



HyNic-PDL



Conjugate

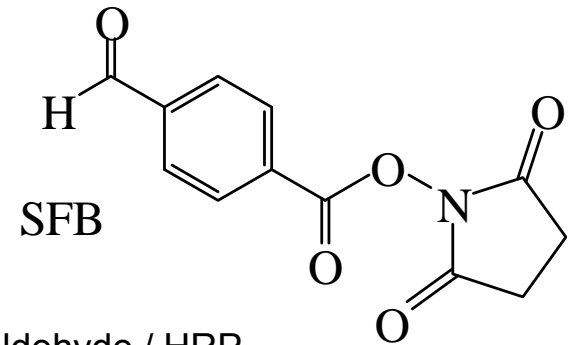
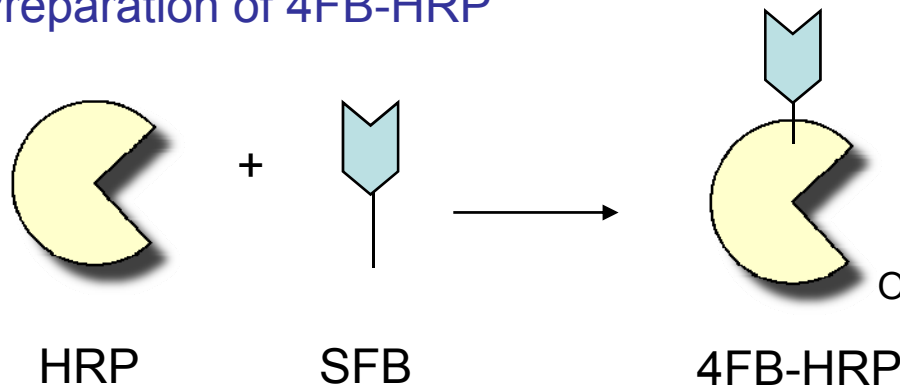
- Stability measurement

- Stability of Modified HRP, PDL and Conjugate

- Storing condition: room temperature, 4 ° C, -20 ° C

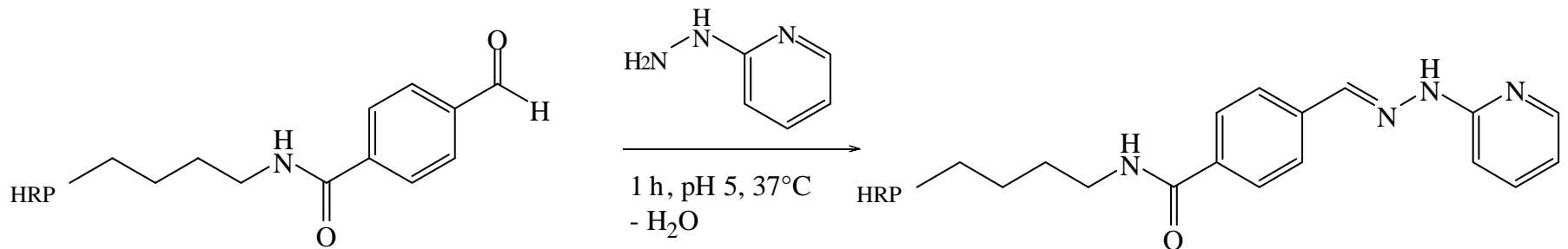
# アルデヒド修飾酵素の安定性

## 1) Preparation of 4FB-HRP



On average ~1 aldehyde / HRP

## 2) Quantification of 4FB-HRP by UV spectroscopy

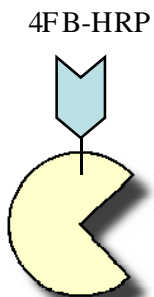


hydrazone,  $\lambda_{\max} = 350 \text{ nm}$ ,  $\epsilon_{350} = 18'000 \text{ (Mcm)}^{-1}$

(Novabiochem, *SoluLink™ Kit*)

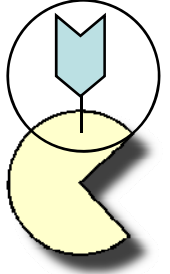
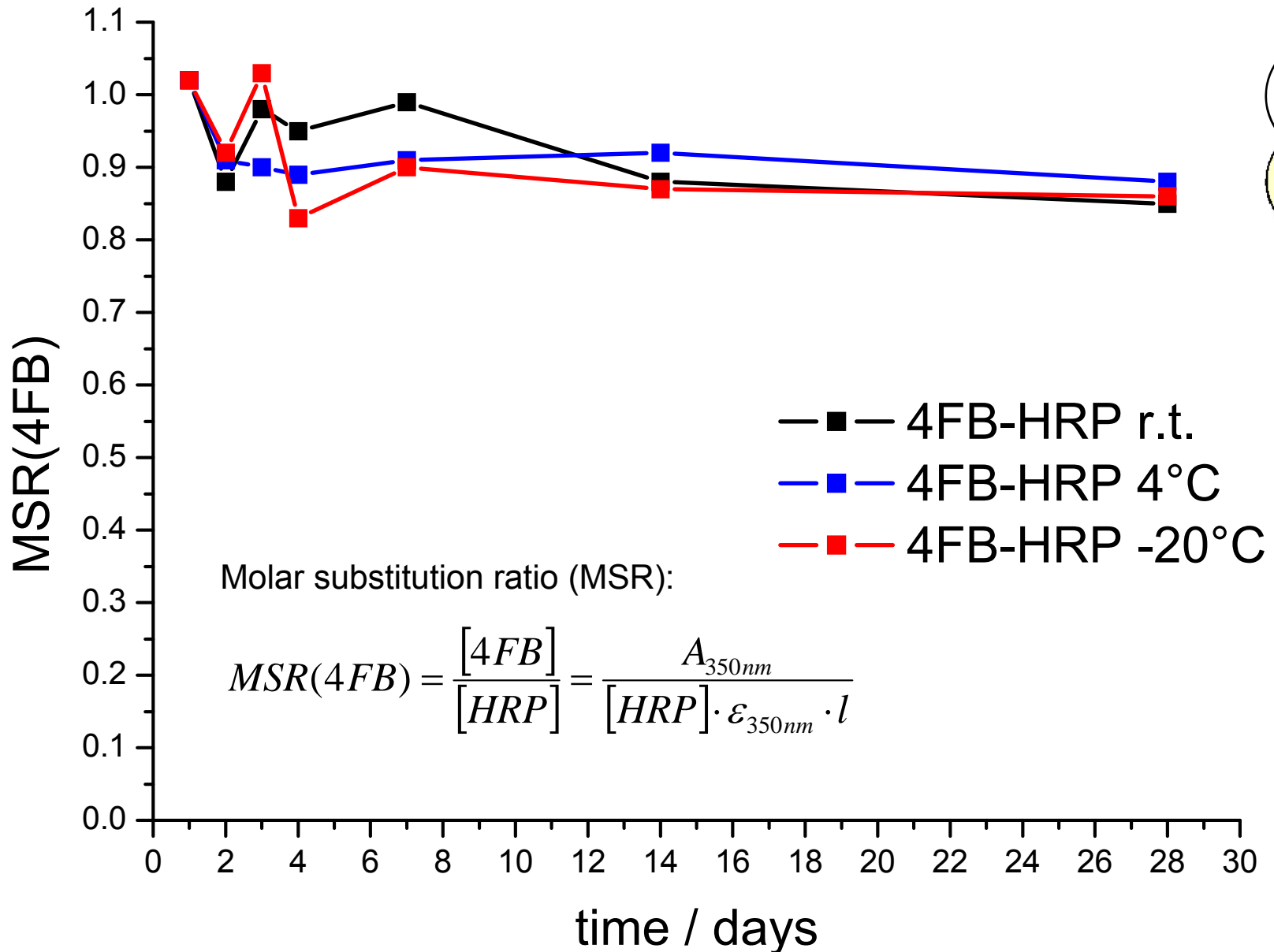
Molar substitution ratio (MSR):

$$MSR(4FB) = \frac{[4FB]}{[HRP]} = \frac{A_{350\text{nm}}}{[HRP] \cdot \epsilon_{350\text{nm}} \cdot l}$$



# アルデヒド修飾酵素の安定性

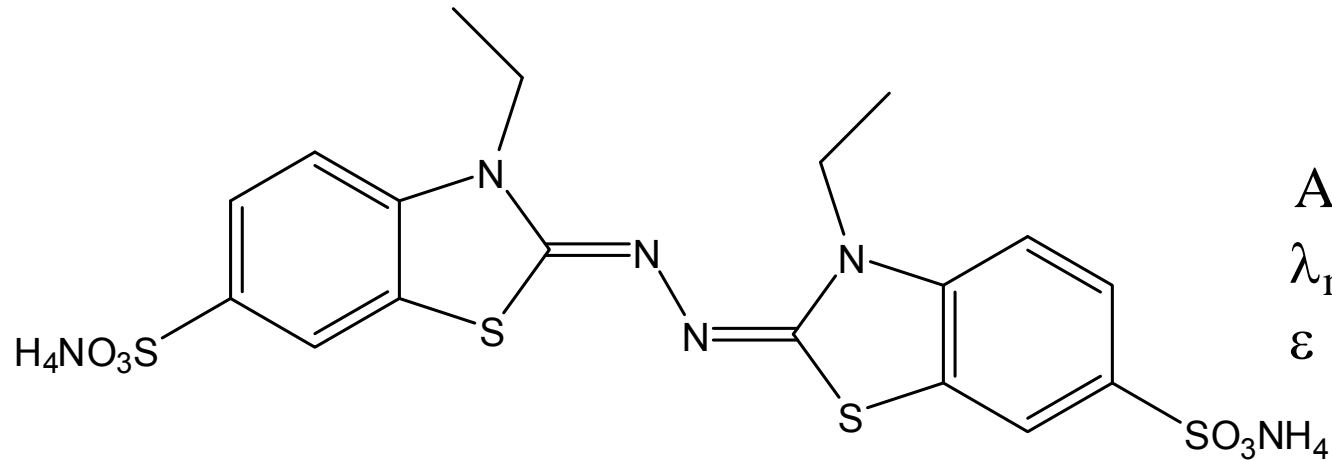
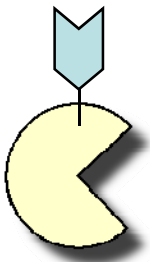
## 2) Quantification of 4FB-HRP



# アルデヒド修飾酵素の安定性

## 3) Activity of 4FB-HRP and native HRP

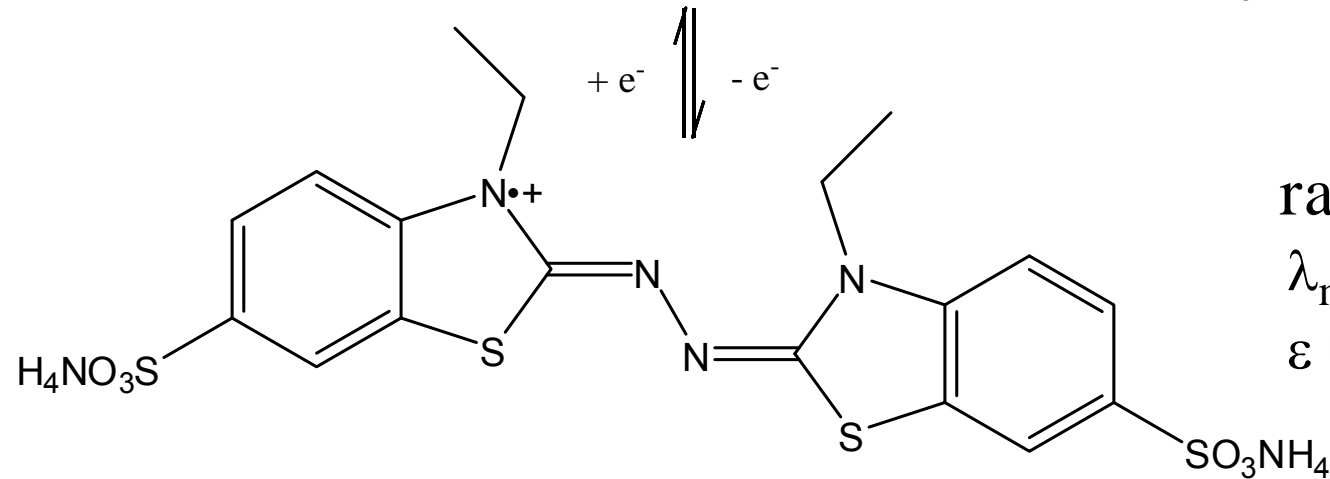
Measuring absorbance increase at 414 nm at the initial stage of the reaction and getting the slope



ABTS (I)

$$\lambda_{\max} = 340 \text{ nm}$$

$$\varepsilon = 36'000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$



radical cation (II)

$$\lambda_{\max} = \boxed{414 \text{ nm}}$$

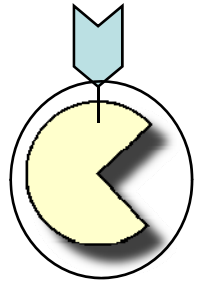
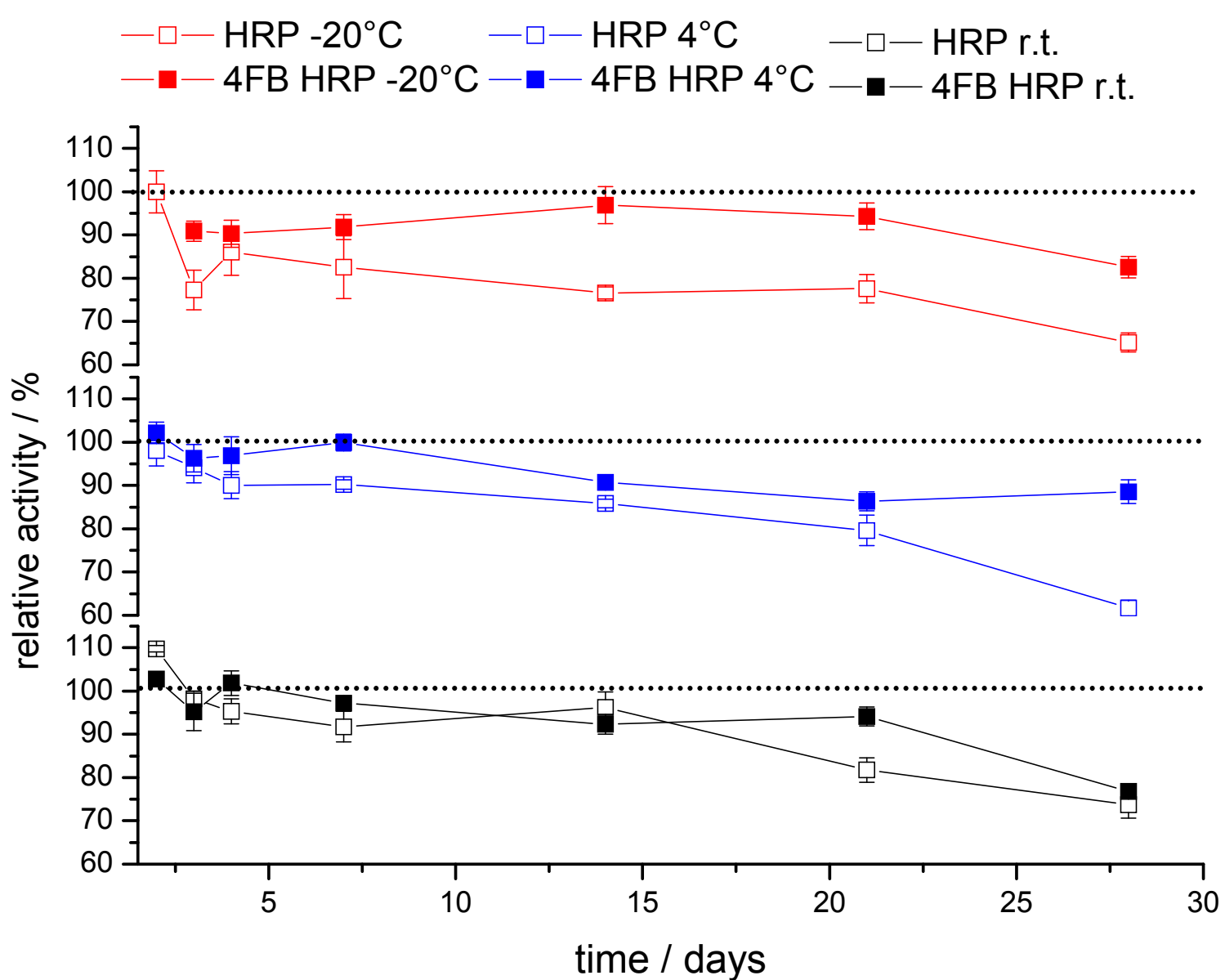
$$\varepsilon = 36'000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

[ABTS]<sub>0</sub>=0.25mM, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>0</sub>=0.05mM, [HRP]=1.1nM at room temperature  
in buffer 0.1 M phosphate pH 6.0



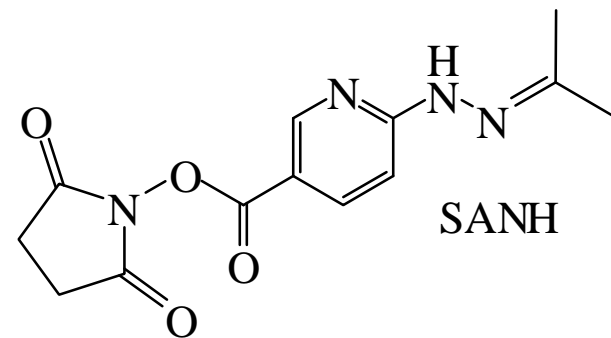
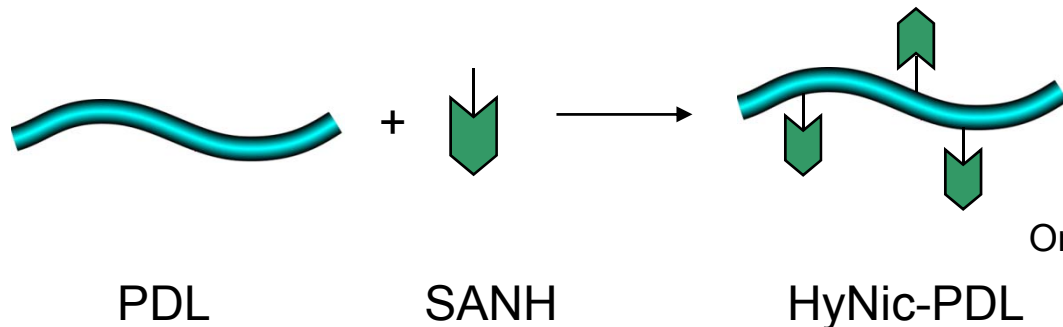
# アルデヒド修飾酵素の安定性

## 3) Activity of 4FB-HRP and native HRP stored at room temperature



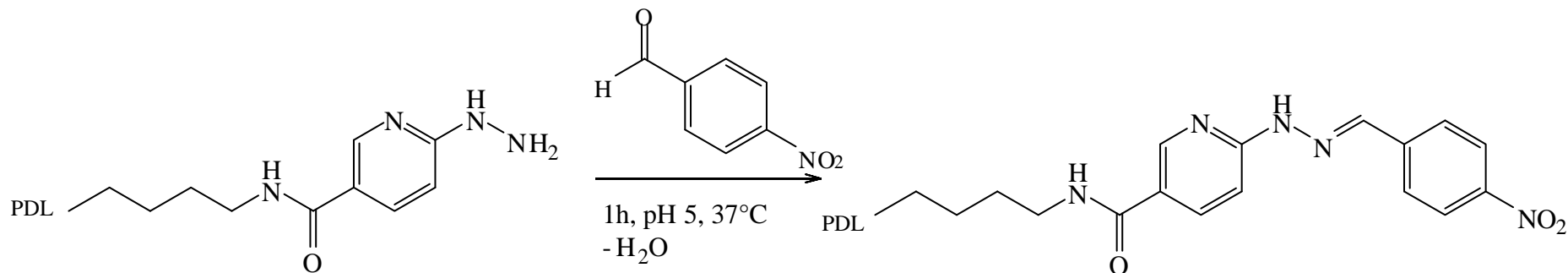
# ヒドラジン修飾ポリマーの安定性

## 1) Preparation of HyNic-PDL



On average ~3 HyNic / 100 Lys

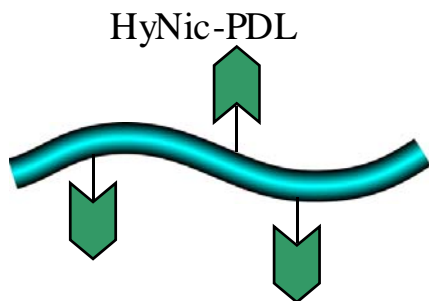
## 2) Quantification of HyNic-PDL by UV spectroscopy



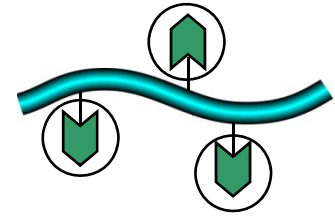
hydrazone,  $\lambda_{\text{max}} = 380 \text{ nm}$ ,  $\epsilon_{380\text{nm}} = 22'000 \text{ (Mcm)}^{-1}$

(Novabiochem, SoluLink™ Kit 2008)

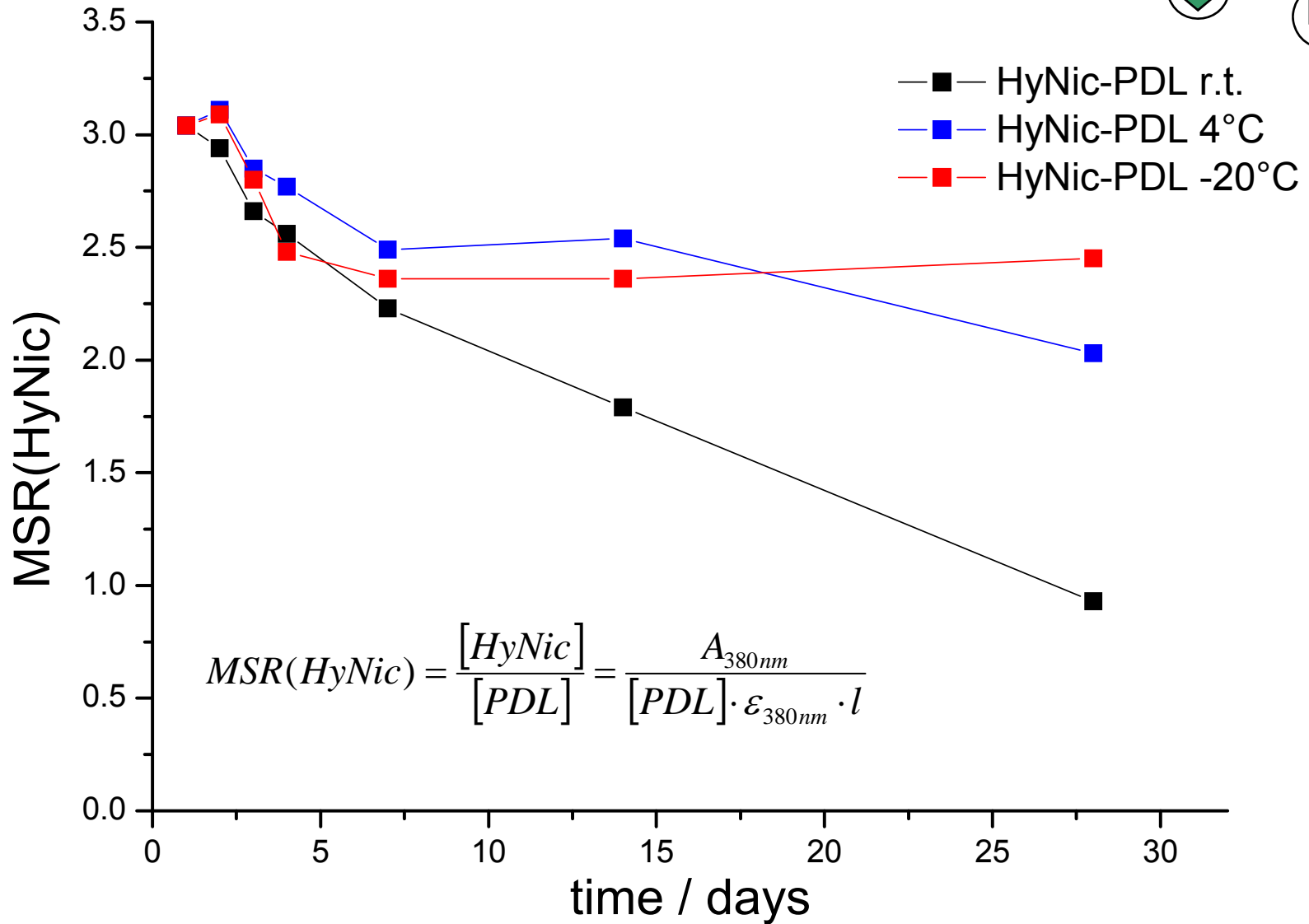
$$MSR(\text{HyNic}) = \frac{[\text{HyNic}]}{[\text{PDL}]} = \frac{A_{380\text{nm}}}{[\text{PDL}] \cdot \epsilon_{380\text{nm}} \cdot l}$$



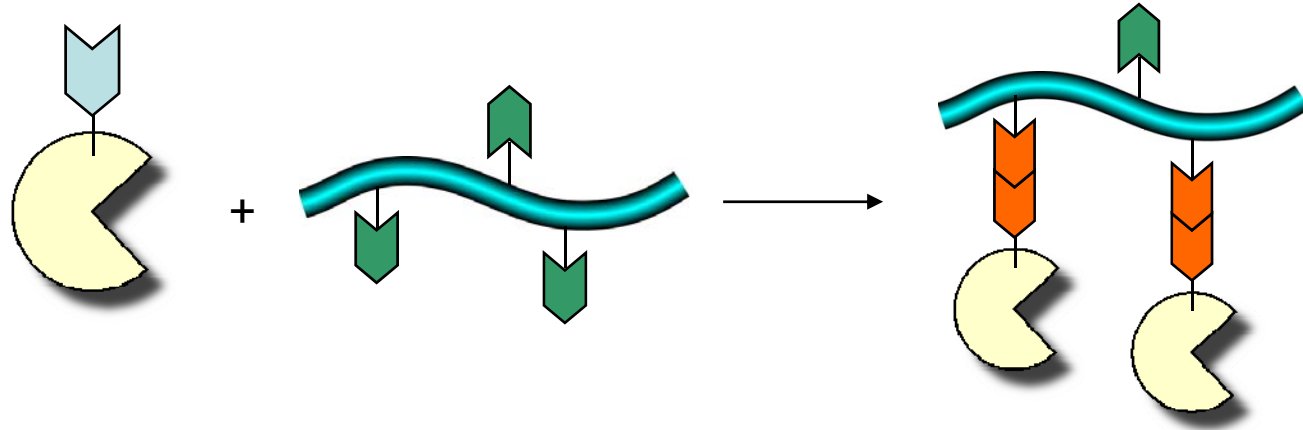
# ヒドラジン修飾ポリマーの安定性



## 2) Quantification of HyNic-PDL



# 酵素-ポリマー複合体の調製



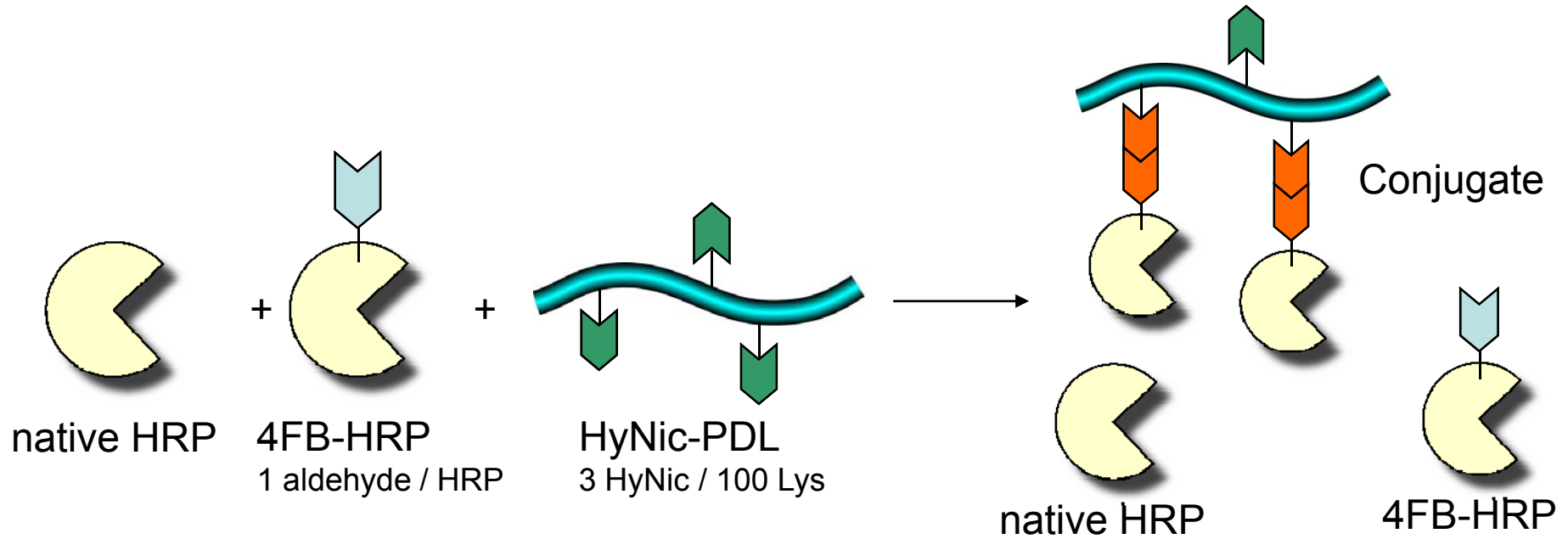
4FB-HRP  
≈1 aldehyde / HRP

HyNic-PDL  
≈3 HyNic / 100 Lys

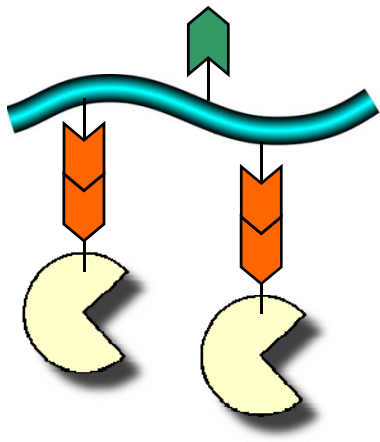
Conjugate



# 酵素-ポリマー複合体の調製



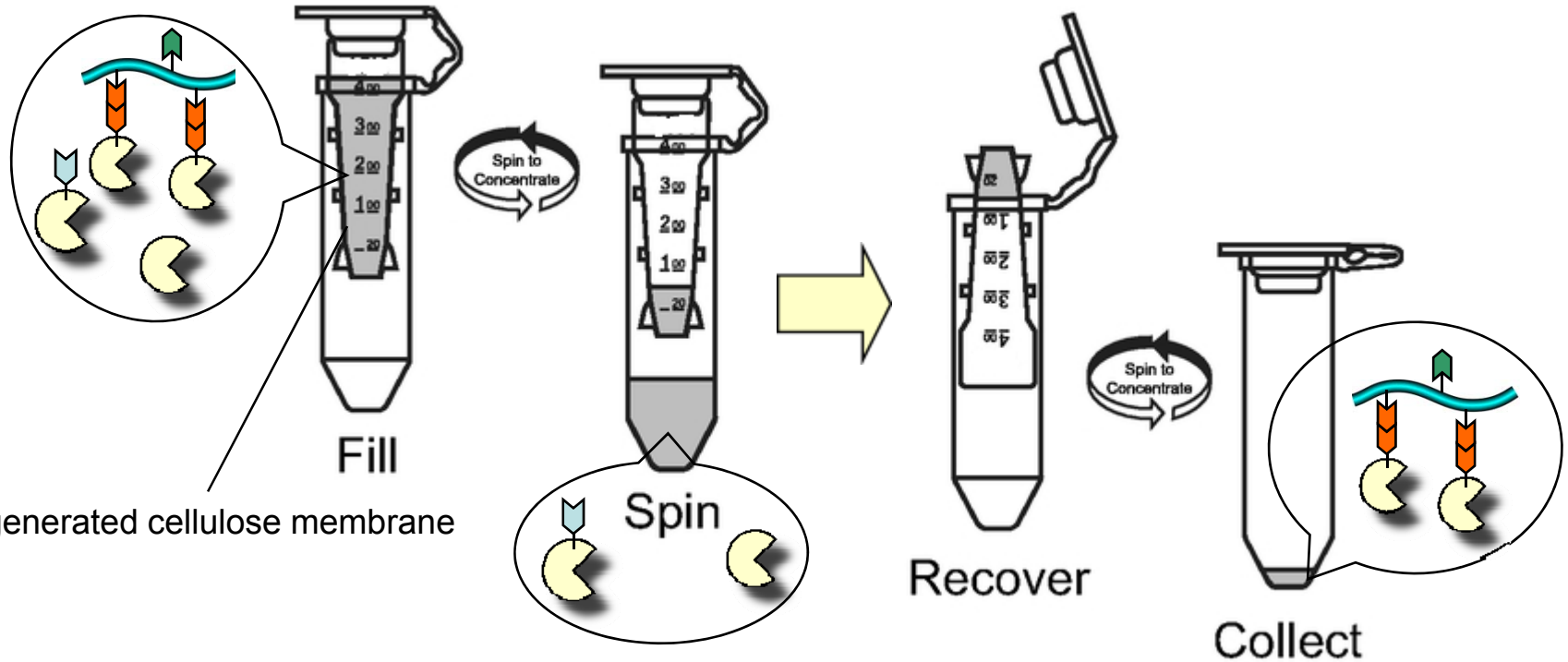
Preparative separation of free and modified enzyme with GPC is not possible



“pure” conjugate is wanted !

# 酵素-ポリマー複合体の精製

Amicon Ultra-0.5 (100,000 g / mol cut off) - 8000 rpm x 5 min

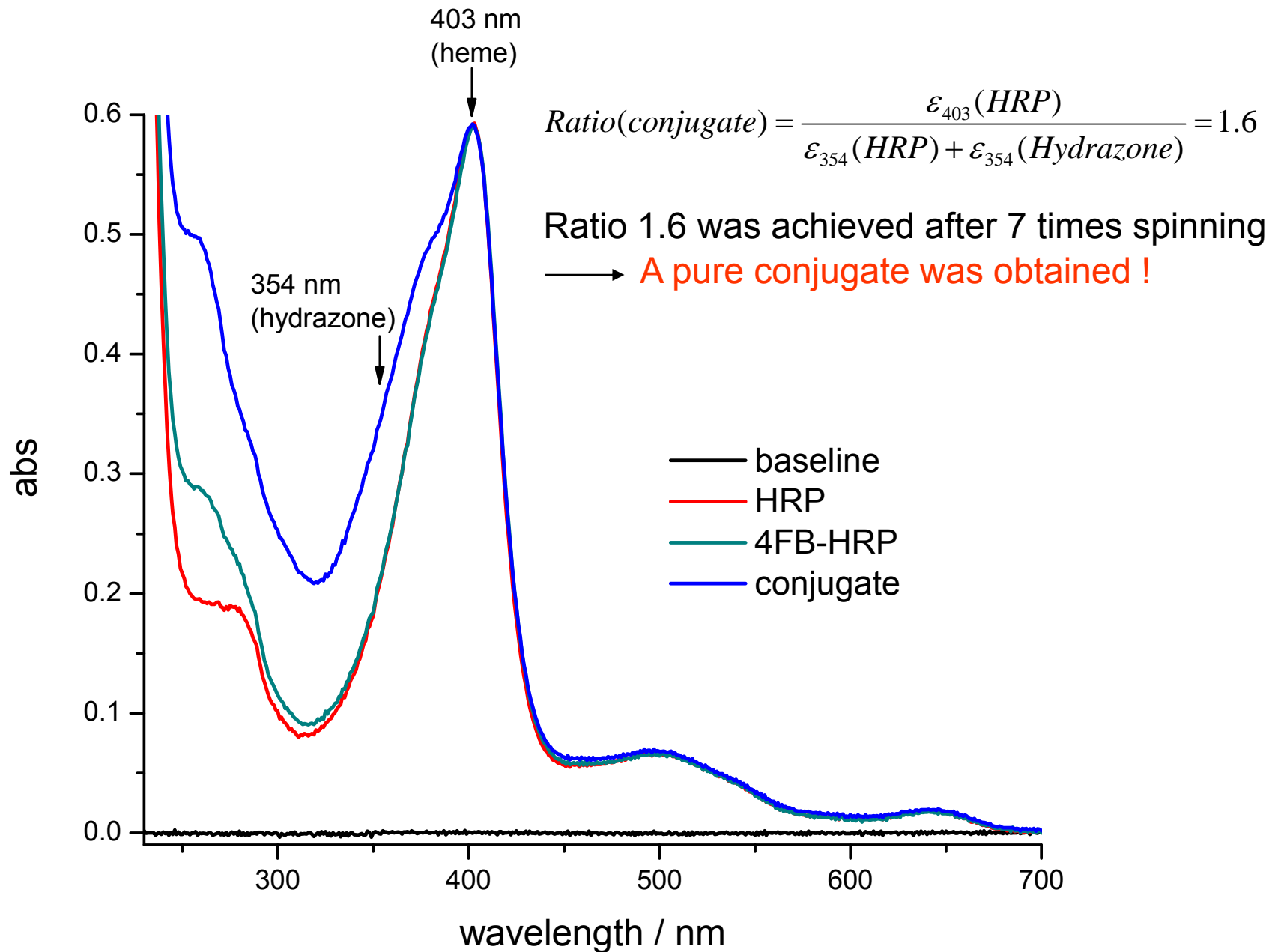


Ultrafiltration: Separation method by **molecular size and shape**

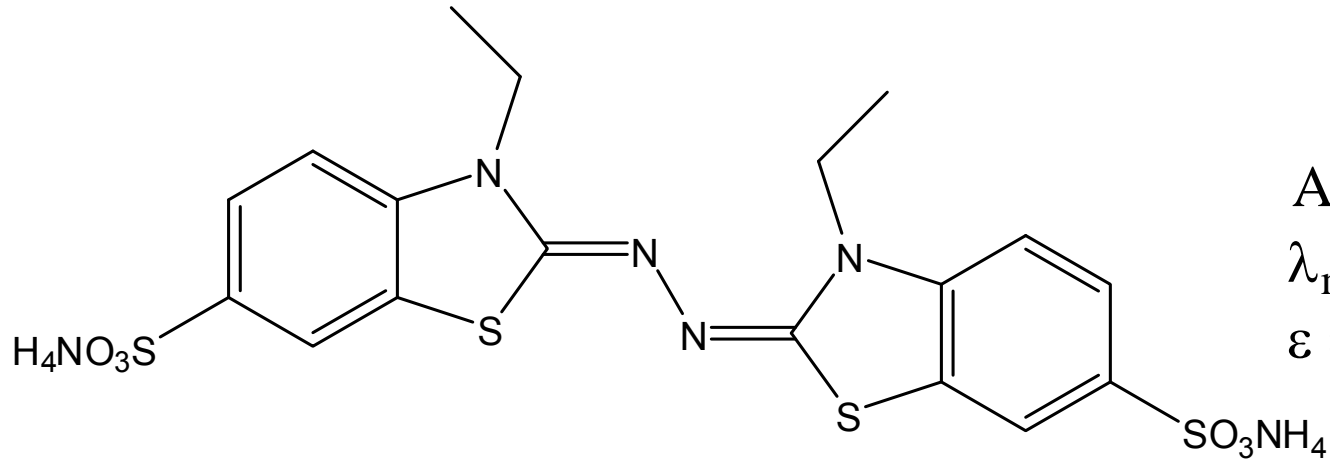
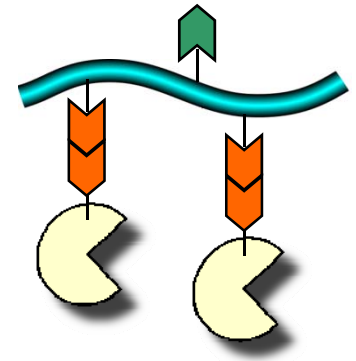
More than 100,000 g / mol globular molecules stay in the retentate and the others go through the membrane (filtrate).

- HRP = 44,000 g / mol, PDL = 150'000-300'000 g / mol
- Conjugate > 100,000 g / mol and HRP < 100,000 g / mol
- Ultrafiltration can be useful for preparative separation

# 酵素-ポリマー複合体の精製



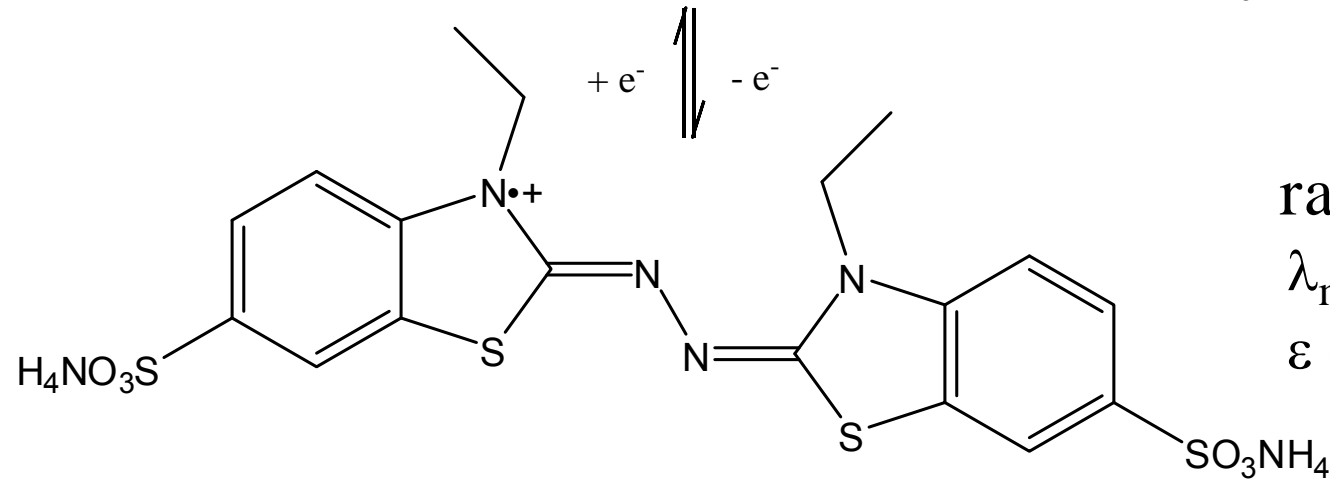
# 酵素-ポリマー複合体の安定性



ABTS (I)

$$\lambda_{\max} = 340 \text{ nm}$$

$$\varepsilon = 36'000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$



radical cation (II)

$$\lambda_{\max} = \boxed{414 \text{ nm}}$$

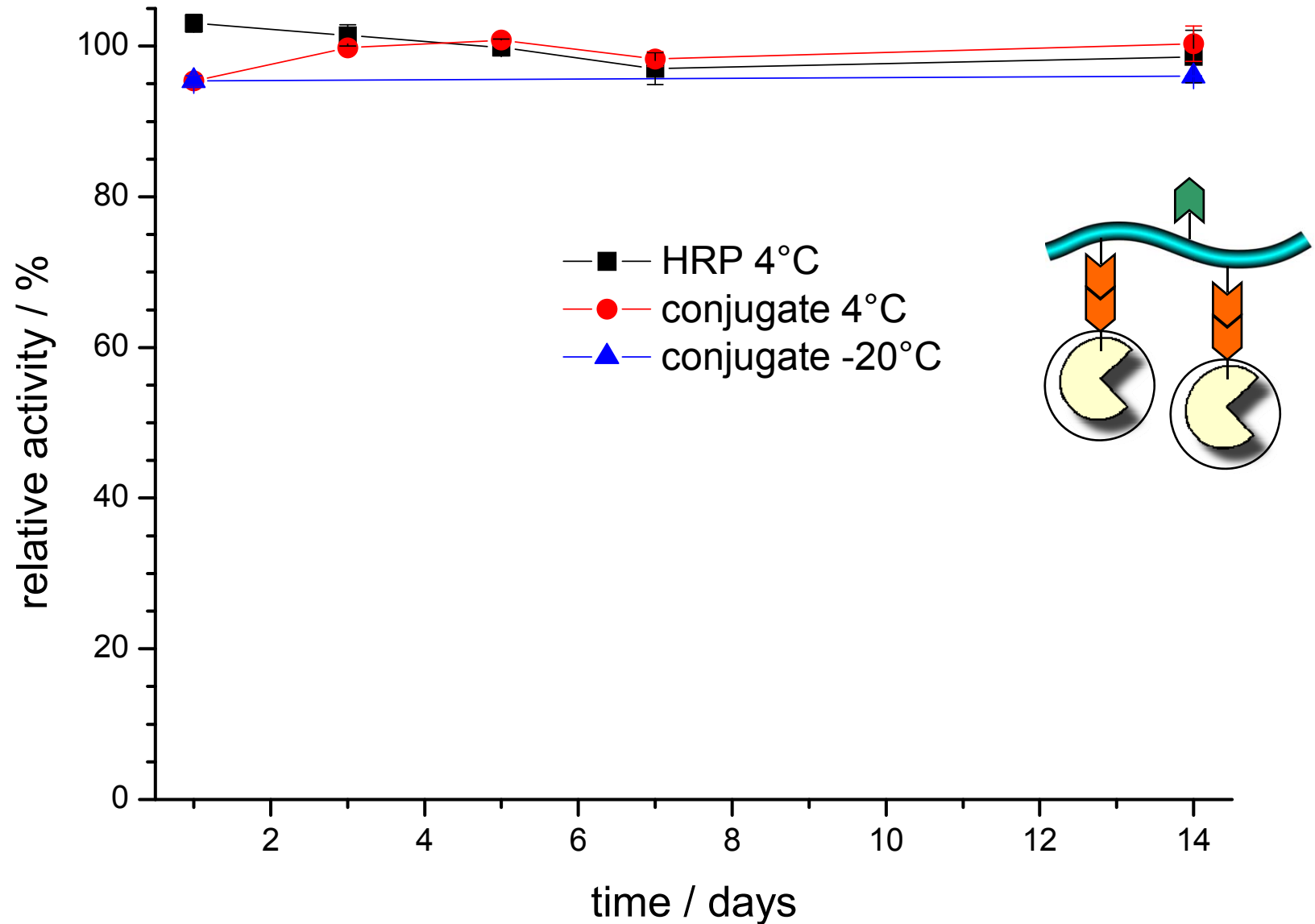
$$\varepsilon = 36'000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

[ABTS]<sub>0</sub>=0.25mM, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>0</sub>=0.05mM, [HRP]=1.1nM at room temperature  
in buffer 0.1 M phosphate pH 6.0



# 酵素-ポリマー複合体の安定性

Activity of HRP and pure conjugate



# 結論

- **修飾酵素と修飾ポリマーの安定性**

- 修飾酵素と修飾ポリマーは4°Cないし-20°Cで保存すべき
- この条件下では、1ヶ月間安定であることがわかった

- **酵素-ポリマー複合体の精製**

- 限外ろ過法によって酵素-ポリマー複合体の活性を保ったまま、精製することに成功した
- 後の等電点電気泳動を用いた分析により、精製後の複合体がピュアであることが確認された。



Polymer Chemistry Groupクリスマス会@Shulter教授宅

# 他研究室訪問その1



ÉCOLE POLYTECHNIQUE  
FÉDÉRALE DE LAUSANNE

Prof. Kai Jhonsson

専門: 蛍光共鳴エネルギー  
移動(FRET)を利用した細胞内  
生体小分子のイメージング



# 他研究室訪問その1



EPFL キャンパス



EPFL キャンパス近郊

# 他研究室訪問その1



Kai 研の日本人ポスドクの皆さん@春木さん宅

## 他研究室訪問その2



Prof. Fredrik Höök



### Chalmers工科大学

専門: 水晶発振子マイクロバ  
ランス法(QCM)と光学系を組み  
合わせた生体分子間相互作用  
の検出



## 他研究室訪問その2

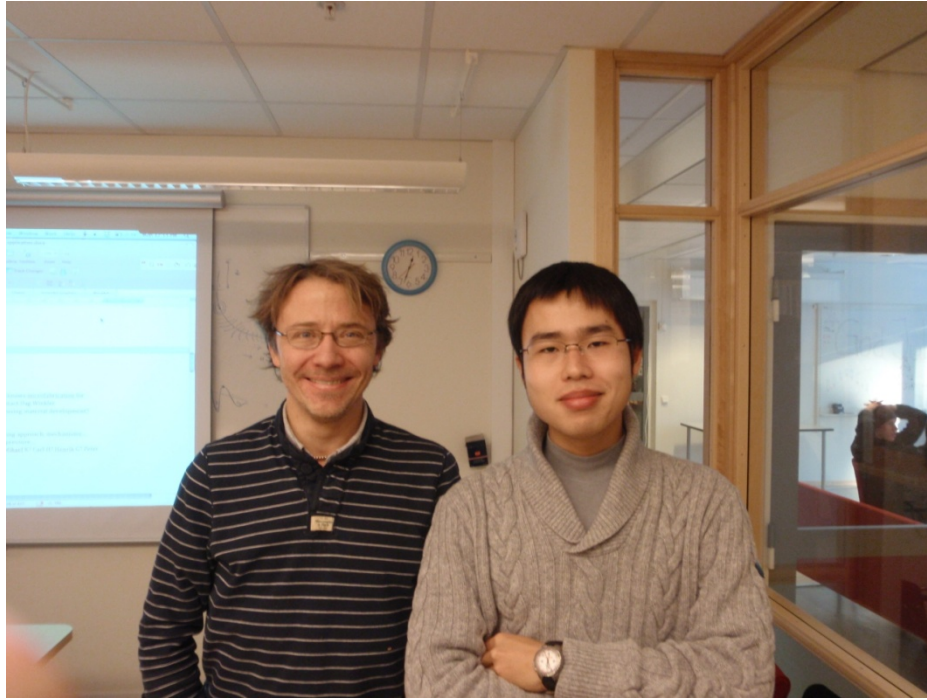


スウェーデン ストックホルム

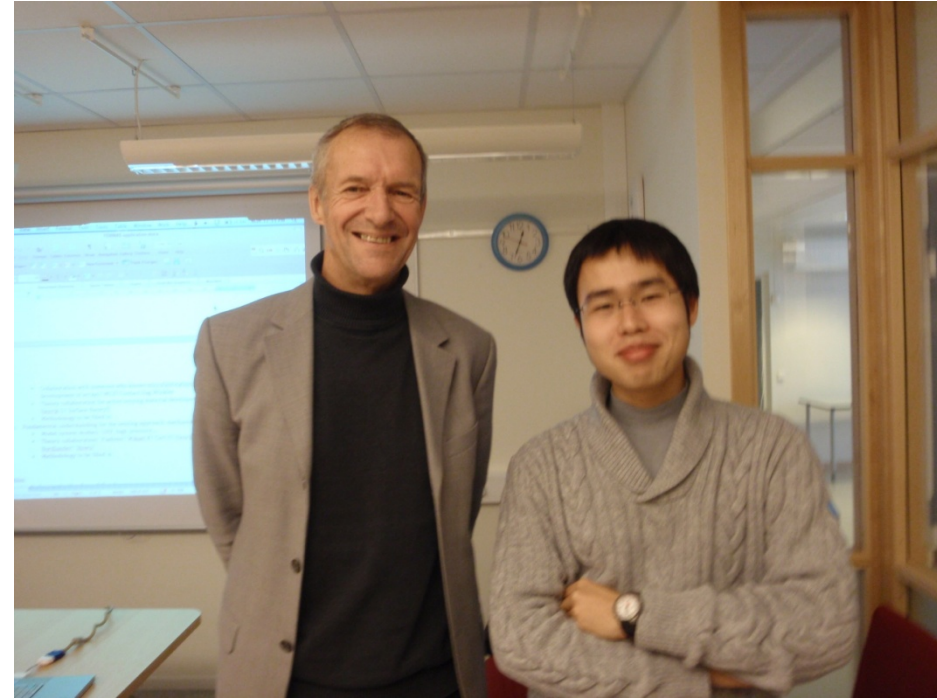


スウェーデン ヨーテボリ

## 他研究室訪問その2



Höökと私



Kasemoと私

# 謝辞

留学する機会を与えて下さった独立行政法人日本学術振興会に感謝いたします

ITPの主査である梶原将准教授、メンターを担当していただいた岡畑恵雄教授に厚く御礼申し上げます

ETHのProf. Peter Walde教授ならびにMs. Grotzky AndreaそしてLabの仲間感謝いたします