



H20年度ITP派遣者 帰国報告会
Debriefing Session of ITP 2008

生体分子機能工学専攻
岡畑・森研究室
真中 雄一

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

独語 Eidgenössische Technische Hochschule Zürich (ETH Zürich)

英語 Swiss Federal Institute of Technology Zurich (ETH Zurich)



Zürich市街



Zentrumキャンパス

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

独語 Eidgenössische Technische Hochschule Zürich (ETH Zürich)

英語 Swiss Federal Institute of Technology Zurich (ETH Zurich)



Hönggerbergキャンパス



Department of Materials

派遣先グループ: Polymer Chemistryグループ

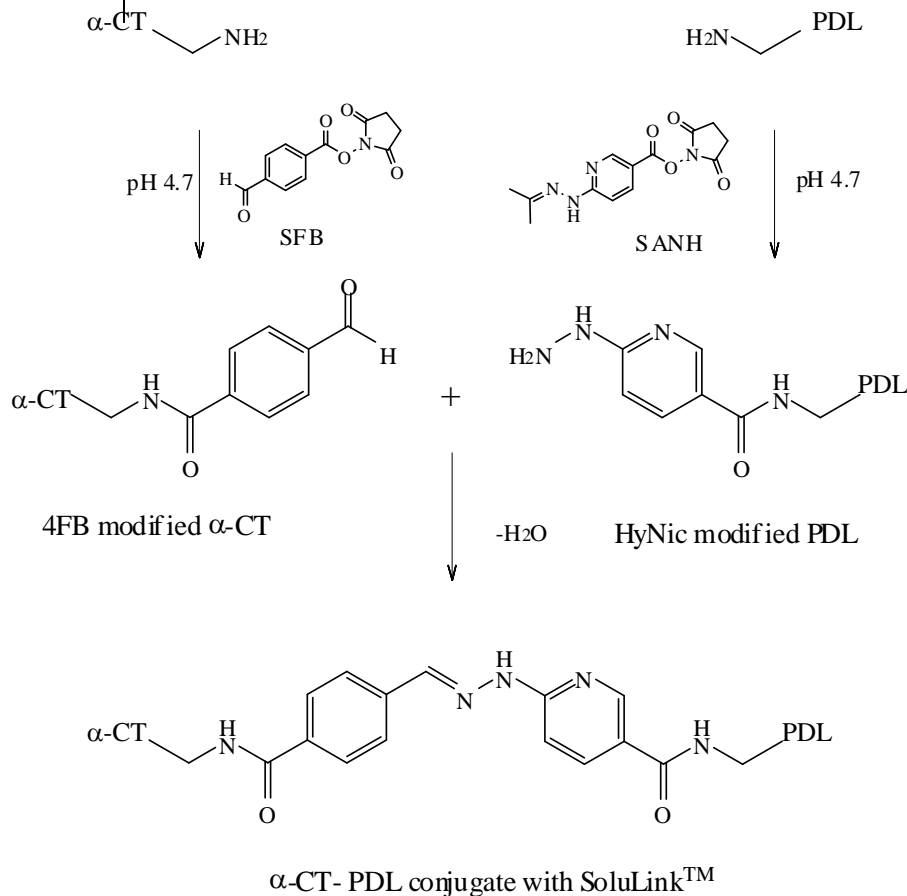


Prof. Dr. Peter Walde

専門はリポソームを利用
(内側・外側)した酵素反
応や生体模倣系の構築

ヒドラゾン結合を用いた複合体調製のスキーム

An aldehyde reacts with a hydrazine to yield a hydrazone conjugate



Advantages:

- Nucleophilic lysines can react without denaturing the proteins (enzymes)
- Reaction possible under mild conditions
- Hydrazone is stable in the pH range 2 to 11 at elevated temperatures
- The hydrazone is quantifiable spectrophotometrically

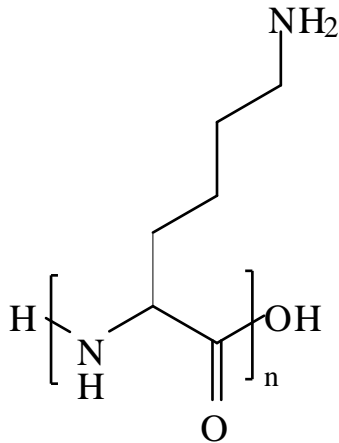
SFB: Succinimidyl 4-formylbenzoate

4FB: 4-formylbenzoate

SANH: Succinimidyl 6-hydrazinonicotinate acetone hydrazone

HyNic: 6-hydrazinonicotinate acetone hydrazone

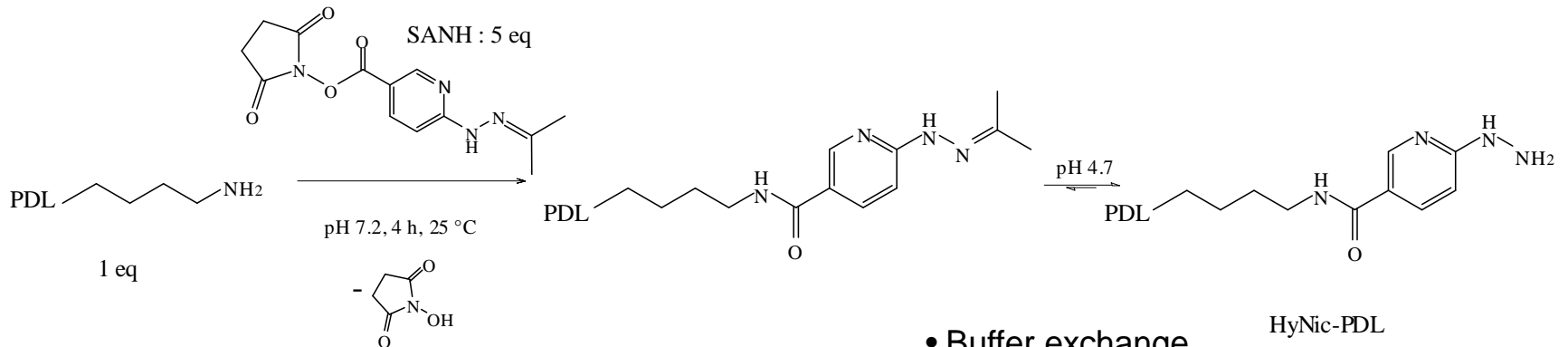
Polymer部 : Poly-D-lysine



- commercially available as hydrobromide (Sigma-Aldrich)
- $M_w = 15'000 - 30'000$ g/mol
in average about 108 repeat units (lysine residues) per chain
- pK_a of $R-NH_3^+ = 9-10$

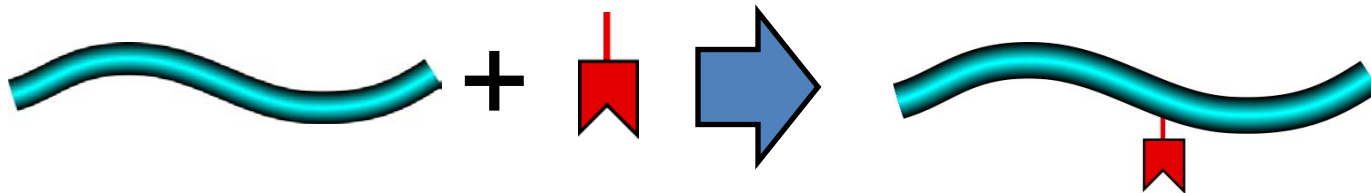
Poly-D-lysineの修飾

with the hydrazine linker:

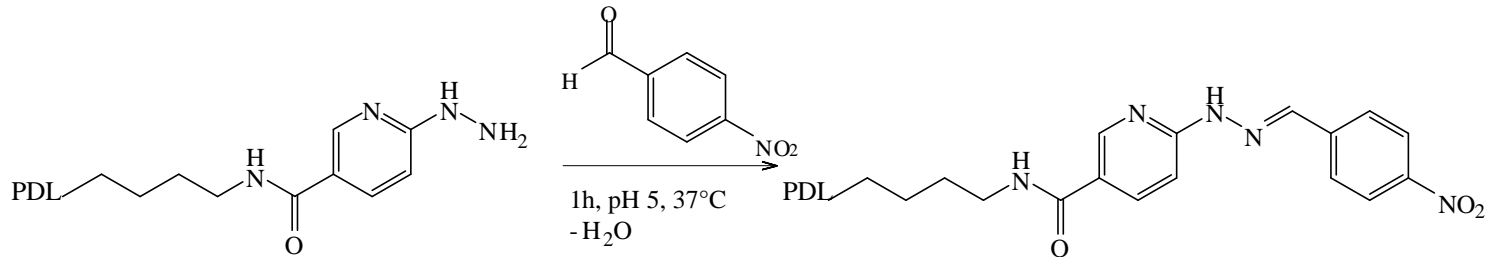


- Desalting
(by sephadex G-25 column)

- Buffer exchange
by ultrafiltration

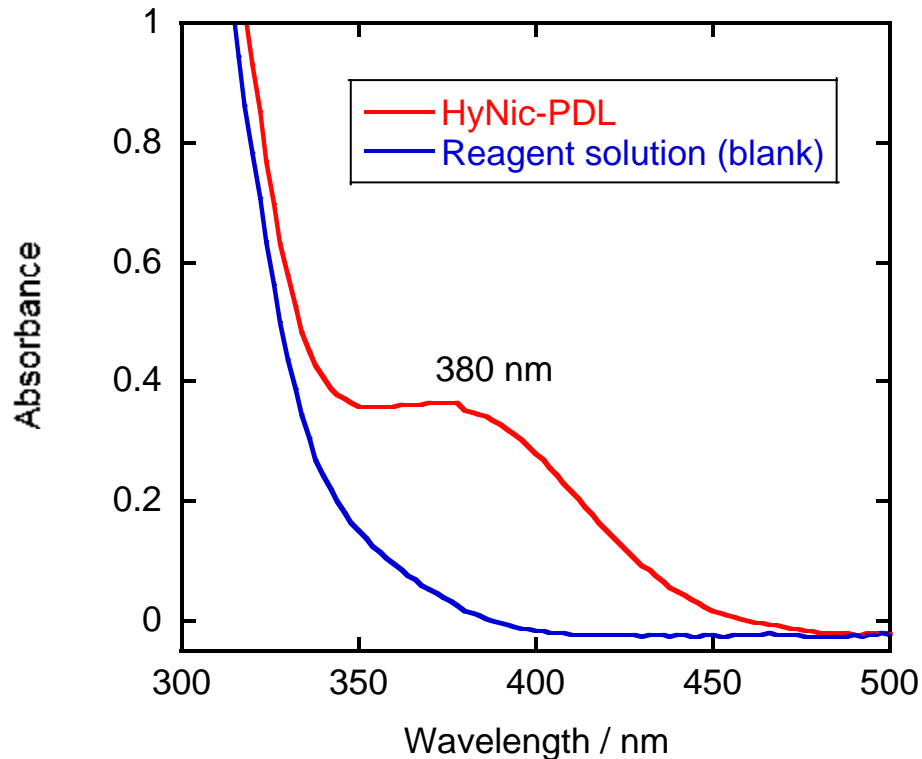


Poly-D-Lysine修飾量の定量化



HyNic-PDL

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



molar substitution ratio (MSR):

$$MSR = \frac{[HyNic]}{[PDL]}$$

Exp.	HyNic conc. /M	PDL conc. /M	MSR
1	8.0×10^{-5}	5.5×10^{-5}	1.5
2	1.1×10^{-4}	6.2×10^{-5}	1.8
3	5.2×10^{-5}	6.3×10^{-5}	0.8

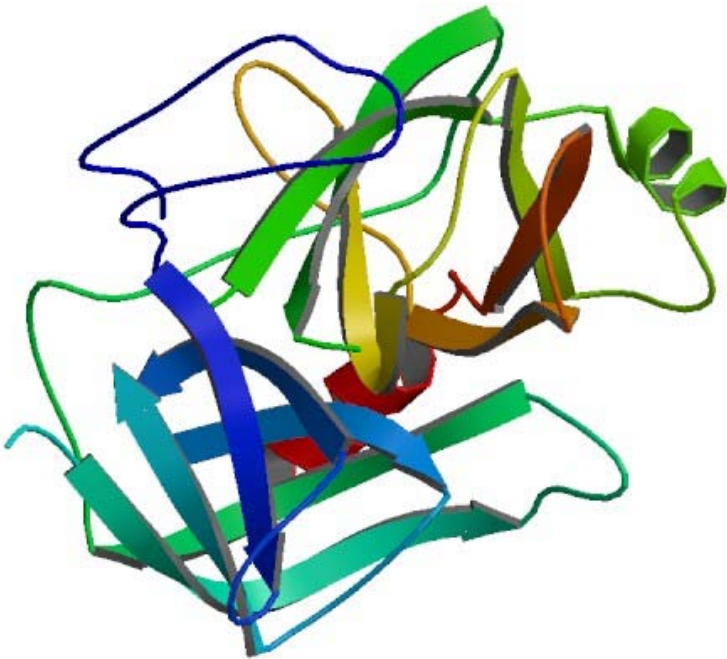
SFB reagent age

1: 30 days

2: 60 days

3: 75 days

酵素部 : α -chymotrypsin

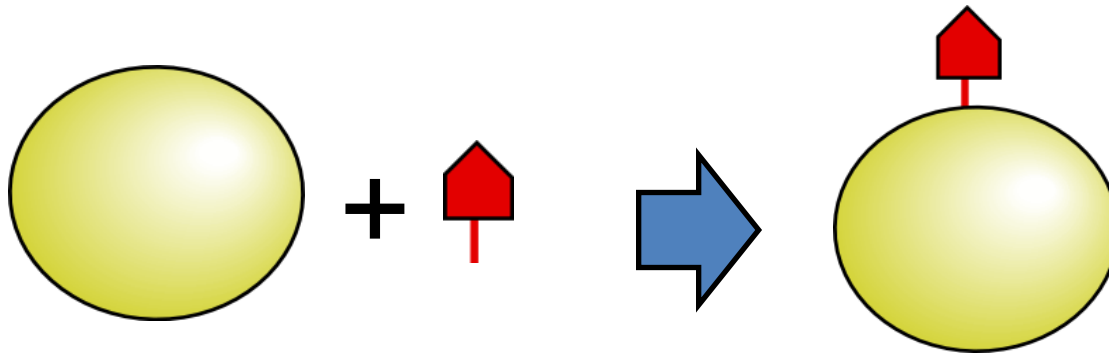
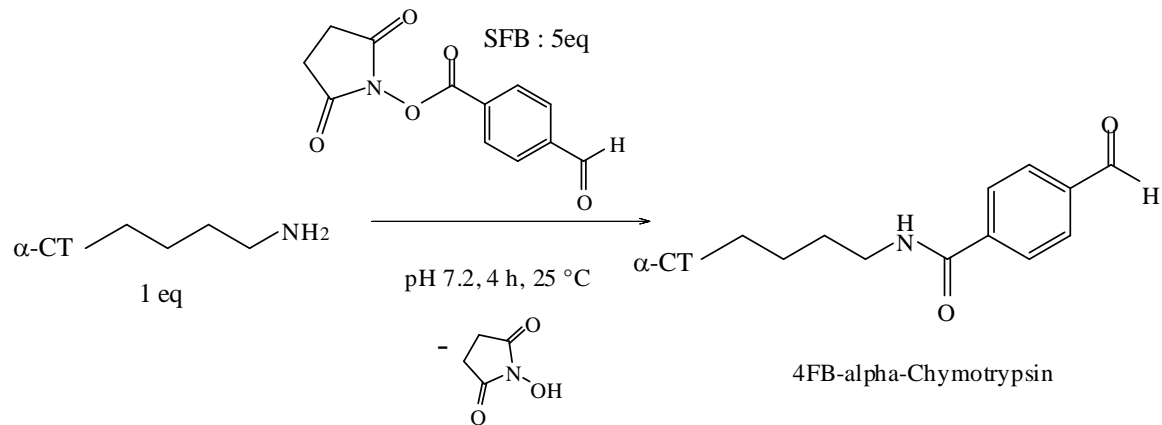


PDB ID 1chg

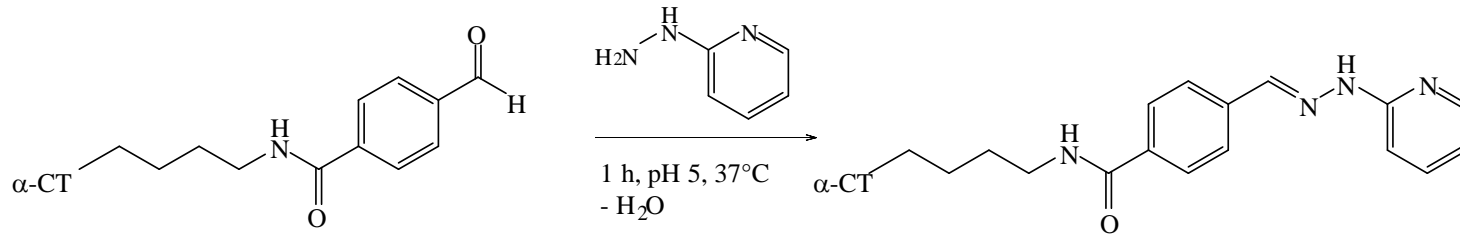
- M = 25 kDa
- Protease that catalyzes the cleavage of peptide bonds in protein`s at the carboxyl side of tyrosine, tryptophan, and phenylalanine
- 14 lysine residues (free amino groups)

α -chymotrypsinの修飾

with the aldehyde linker:

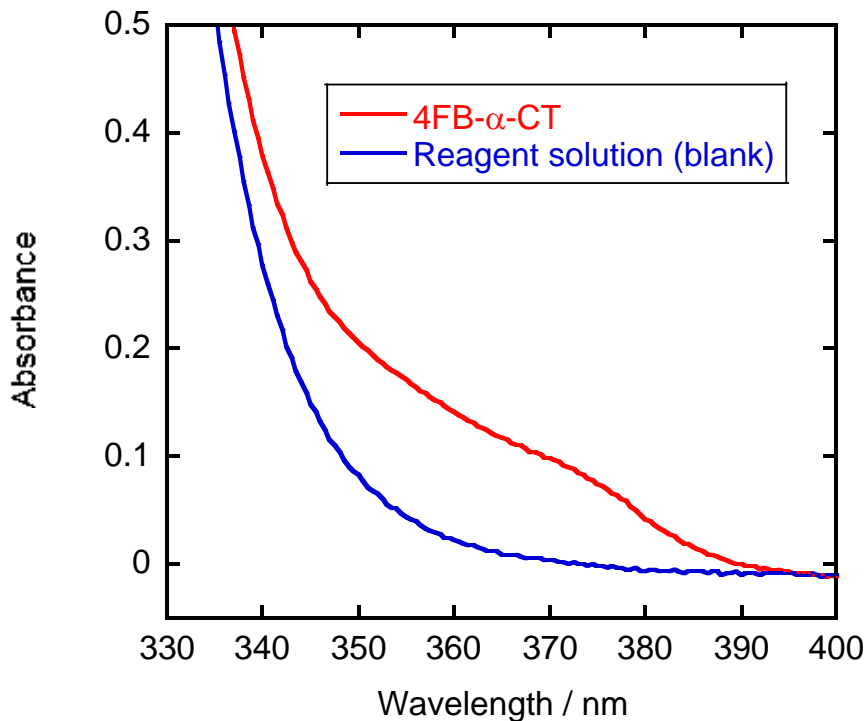


α -chymotrypsin修飾量の定量化



4FB- α -CT

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



Molar substitution ratio (MSR):

$$MSR = \frac{[4FB]}{[protein]}$$

Exp.	4FB conc. /M	Protein conc. /M	MSR
1	9.1×10^{-5}	5.8×10^{-5}	1.6
2	7.6×10^{-5}	7.1×10^{-5}	1.1
3	3.7×10^{-5}	7.4×10^{-5}	0.5

SFB reagent age

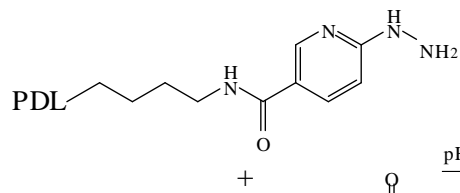
1: 60 days

2: 80 days

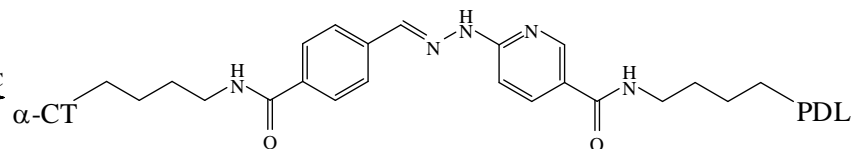
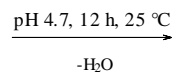
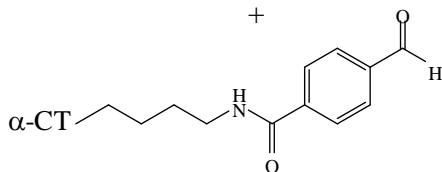
3: 95 days

複合体形成反応

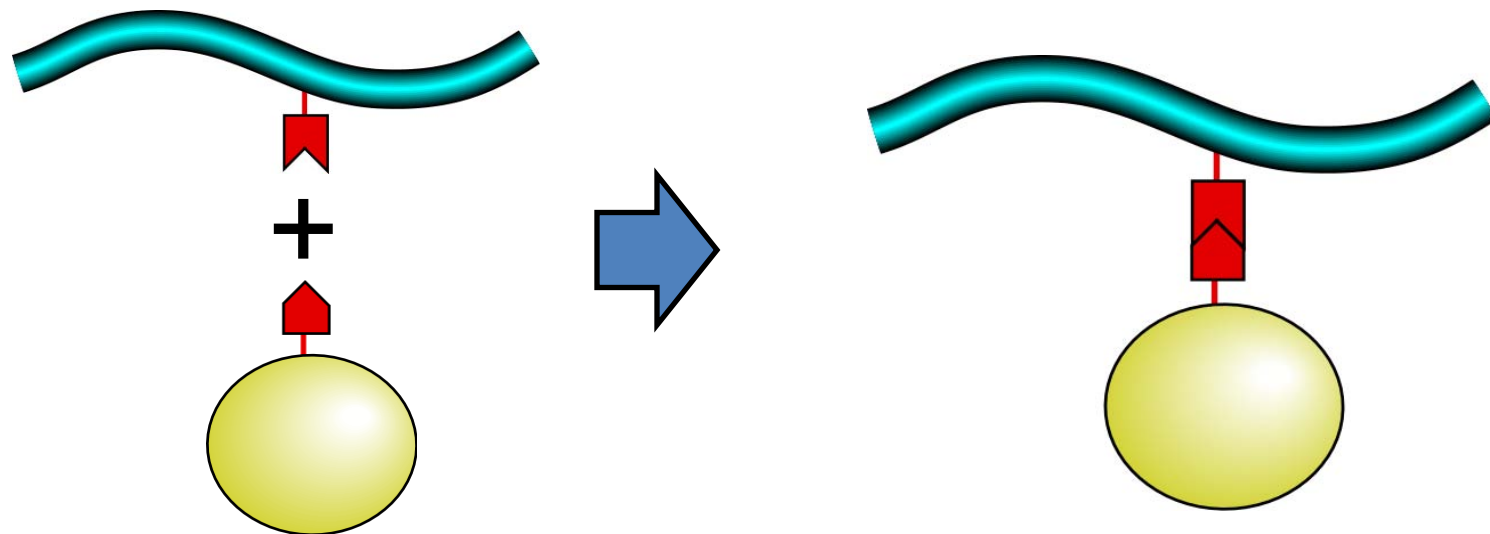
Hydrazine : 1eq
(PDL : 1.25eq)



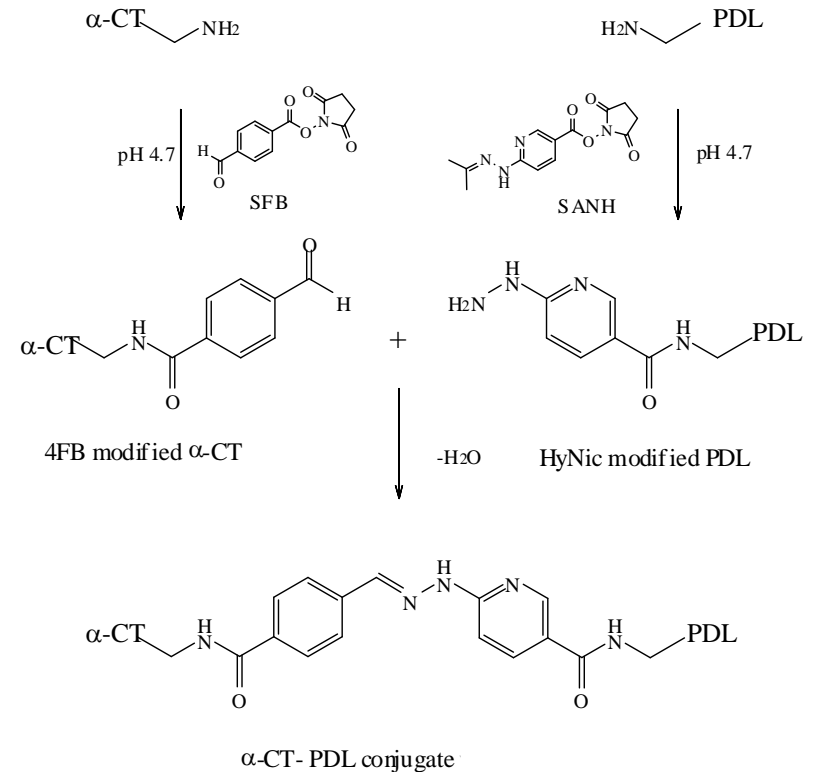
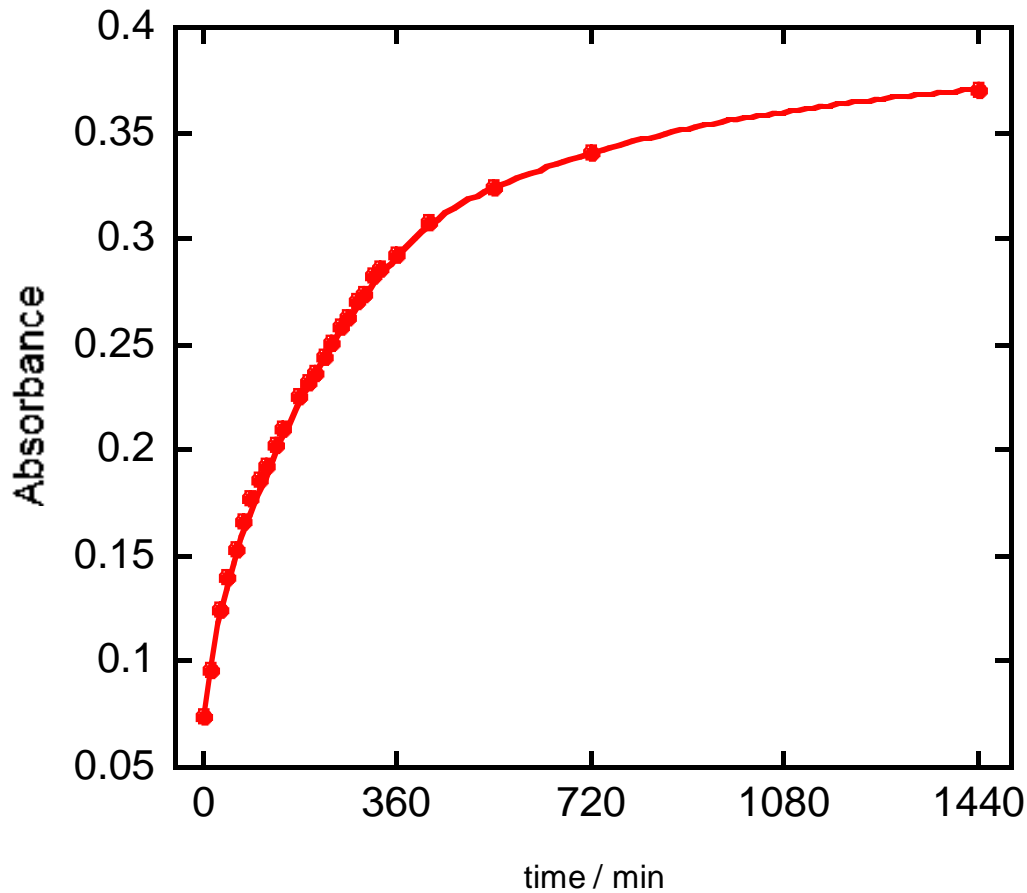
Aldehyde : 1eq
(α -CT : 2eq)



α -CT-PDL conjugate, $\lambda_{\max} = 350 \text{ nm}$, $\epsilon_{350\text{nm}} = 29'000 \text{ (Mcm)}^{-1}$



複合体形成の動力学



Kinetics of the conjugation reaction measured at $\lambda = 350$ nm

結論

- Poly-D-LysineのLysine残基量を定量評価する方法を比較した
- ヒドラゾン結合を用いたポリマー-酵素複合体の調整に成功した
- PDL- α -CT、PDL-HRP複合体の調製に成功し、複合体が活性を維持していることを確認した

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. Dr. Peter Walde教授ならびにPolymer chemistryの仲間、LabG520の仲間感謝いたします