

気-水界面での生体分子認識を重さで測る

—水晶発振子マイクロバランス法の応用—

岡畑 恵雄・古澤 宏幸

東京工業大学大学院生命理工学研究科 ☎ 226-8501 神奈川県横浜市緑区長津田 4259

(2003年10月27日受理)

Gravimetry of Biomolecules at the Water-Substrate Interface

—Quartz-Crystal Microbalance—

Yoshio OKAHATA and Hiroyuki FURUSAWA

Faculty of BioScience and BioTechnology, Tokyo Institute of Technology
4259 Nagatuda, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8501

(Received October 27, 2003)

We have developed a quartz-crystal microbalance (QCM), in which fundamental frequency decreases with increasing mass on the electrode in aqueous solution. When a 27 MHz QCM is employed, a mass of 0.62 ng/cm² deposited on the electrode decreases the frequency by 1 Hz. Thus, when the host molecule is immobilized on the QCM electrode, the binding behavior of guest molecules could be observed in nanogram level in aqueous solution. In this review, we report that the biomolecular recognitions and reactions at the water-substrate interface by using the QCM technique, such as 1) protein binding to a sugar lipid monolayer at the air-water interface, and 2) oligo nucleotides binding to a nucleolipids monolayer at the air-water interface.

1. はじめに

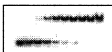
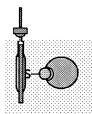
生体内での情報伝達や物質生産は生体分子間の相互作用(分子認識)が基になって成り立っている。例えば、酵素が基質を認識して物質変換をしたり、抗体が抗原分子を捕捉したり、細胞膜上の糖鎖にタンパク質が結合し情報伝達が行われたり、核内のDNA鎖のもつ遺伝情報(塩基配列)がmRNAに転写され、タンパク質に翻訳される過程など、ほとんどすべての過程で分子間の特異的な相互作用(分子認識)が行われ情報変換されている。タンパク質-タンパク質間、タンパク質-低分子基質間、糖鎖-タンパク質間、DNA-タンパク質間、などタンパク質が関与する生体分子間の相互作用を検出するには、これまでNMR、Massなどのスペクトル的方法、結晶のX線構造解析、ゲルシフトアッセイなど様々な方法が工夫されてきた。あるものは蛍光や放射線標識が必要であ

ったり、結合が終わったあとの静的な結果のみが議論されたり、定量性が問題になったり、固体状態の結果が水中に適用できるかなどが問題になったりいずれも一長一短がある。最近では分子間相互作用を定量的にその場解析する装置が注目されている。例えば、表面プラズモン共鳴装置(SPR)は金基板表面に分子が結合すると屈折率が変化することを利用して分子間相互作用を感度よく検出できる装置として注目されている。

Table 1に示すように、これまで生体分子間相互作用を検出する方法としてさまざまな原理に基づいた測定方法が利用されてきた。特異的な結合の検出には、ポリマーゲル相での移動度の違いを検出するゲルシフトアッセイ法や、抗体に結合させた酵素反応を利用するELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)法が行われてきたが、結合の時間変化を追跡するには適していない。マイクロカロリメトリー法は熱力学的な情報が得られるが結合の経時変化はわからない。一方表面プラズモン共鳴(SPR)法は水-金基板界面における屈折率の変化を検出

E-mail: yokahata@bio.titech.ac.jp

Table 1. Various detection methods for biomolecules.

	Methods		Probe	Sensitivity	Binding amount	Time courses (kinetics)
Qualitative	Gel-shift assay		Radioisotope	~ 100 pg	×	×
	ELISA		Enzyme and antibody	~ 100 pg	×	×
Quantitative	Micro calorimetry		No	~ 1 mg	×	×
	Surface prasmon resonance (SPR)		No	~ 10 ng	RI-label	○
	Quartz-crystal microbalance (QCM)		No	~ 10 ng	○	○

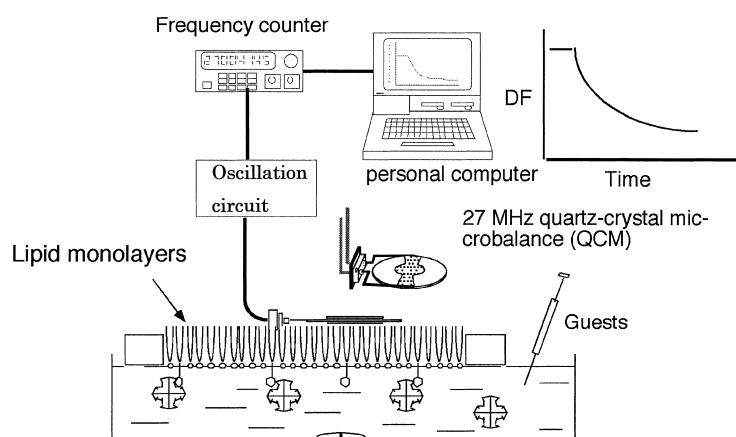


Fig. 1. Schematic illustration of a 27 MHz quartz-crystal microbalance (QCM) for the detection of biomolecules at the air-water interface.

する方法で経時的に検出できる装置が開発されたが、結合の絶対量を求めるにはそれらの屈折率を正確に知る必要があり難しい。いずれの手法も一長一短がある。

2. 水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法¹⁾

我々はこの10年間、水晶発振子が基板上に吸着した質量に比例して共鳴振動数が減少することを利用した水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法を生体分子間相互作用の検出装置として開発してきた¹⁾。装置の概略を Fig. 1 に示した²⁾。27 MHz の基本振動数をもつ水晶発振子では、160 nm 厚の水晶板の両側に金電極が蒸着され、金電極上に 0.6 ng/cm² の物質がつくと 1 Hz 振動数が低下することがわかっている。基板上にホストとなる分子を固定化すれば、ゲスト分子の結合を時間変化でナノグ

ラムレベルの高感度で追跡できることになる。振動数変化から結合量が重さでわかり、経時変化をカーブフィッティングすることにより結合速度と解離速度が同時にわかる。しかし、良いことばかりではなく、水中では水の粘性のために発振子が安定ではない、温度に対して敏感である、などの欠点もあり、これまで水中で生体分子間相互作用を安定に測定する市販品がなかった。最近、我々の技術を利用して (株) イニシウムから「AffinixQ」(セル容量 2–8 mL, 1 チャンネル) や「AffinixQ 4」(セル容量 500 μ L, 4 チャンネル) が売り出された (<http://www.initium2000.com/>)。この装置では発振回路や周波数カウンタを 1 枚の回路基板に設計して水中でも安定に発振する回路を作製し、簡単に安定に生体分子間相互作用を測定できるようになっている。これらの装置を用いれば、

手軽に、高感度で水-基板上での生体分子間相互作用をナノグラムレベルで経時変化を秒オーダーで測定できる。

本論文では、水晶発振子マイクロバランス法を用いて気-水界面での糖脂質単分子膜へのたんぱく質の結合挙動、核酸塩基を持つ脂質膜への核酸塩基の相補的な結合に焦点をあてて解説する。

3. 合成糖脂質膜表面へのタンパク質の結合²⁾

細胞膜表面での分子認識を検出するには水面単分子膜がモデルとしてよく使われる。リン脂質などの水面単分子膜へのタンパク質の吸着はこれまで、タンパク質を蛍光や放射性物質で標識し、蛍光顕微鏡観察、ラジオアイソトープ測定、単分子膜の表面圧-面積 (π -A) 曲線の変化などから検討されてきた。

我々は裸の水晶発振子の金電極側を糖脂質の水面単分子膜上に空気側から水平に付着させ、下水相にたんぱく質を添加後の振動数変化よりたんぱく質の単分子膜への吸着挙動を追跡する方法を開発した (Fig. 1)。単分子膜の疎水基が疎水性相互作用により水晶発振子の電極面に固定化され水晶板とともに振動し、下水相に加えたゲスト分子 (たんぱく質) の結合により振動数が低下する。牛血清アルブミンなどのタンパク質を水相に添加すると、タンパク質が水晶発振子下の単分子膜に吸着して振動数を減少させることにより吸着の過程を *in situ* で観察できた。この場合、タンパク質と脂質単分子膜との吸着は単なる疎水性相互作用による非特異的なものであった。糖残基を親水部にもつ糖脂質単分子膜を用いることにより糖に対して特異的に結合するタンパク質であるレクチンの結合についても検出できる。

コンカナバリン A (Con A) はグルコース、マンノースなどと特異的に結合する部位を分子内に 4 つ持つ分子量 104,000 のレクチン (タンパク質) であり、ガラクトースに対する結合能は低い。親水頭部にグルコース基を有する糖脂質単分子膜 (2 C₁₈-Glc) へのレクチンの結合挙動を *in situ* で観察した。Fig. 2 に種々の単分子膜に対する Con A の結合過程を示した。糖をもたないリン脂質 2 C₁₆PE、親水頭部にガラクトース基を有する 2 C₁₈-Gal に対しては Con A はほとんど結合しなかった (曲線 (b) と (c))。一方、グルコース基を有する 2 C₁₈-Glc : 2 C₁₈PE (40 : 60) 混合膜の場合大きな振動数変化がみられ、水相に過剰のグルコースを注入すると、非常にゆっくりとした Con A の脱着挙動がみられ、特異的な結合であることが示された (曲線 (a))。振動数変化は $-\Delta F = 66 \pm 5$ Hz であり、 $\Delta m = 31$ ng の結合量に相当する。

水相中の Con A の濃度を徐々に高くしたときの単分

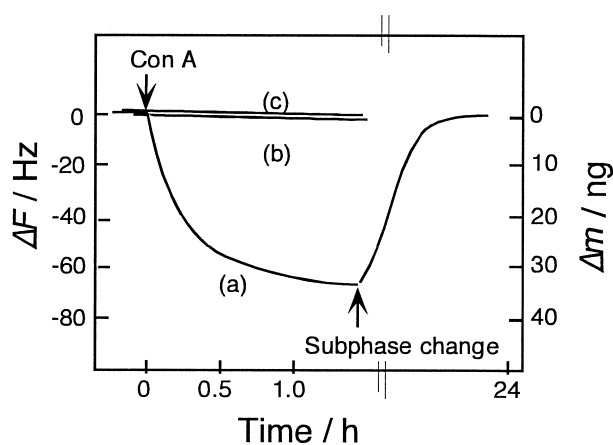
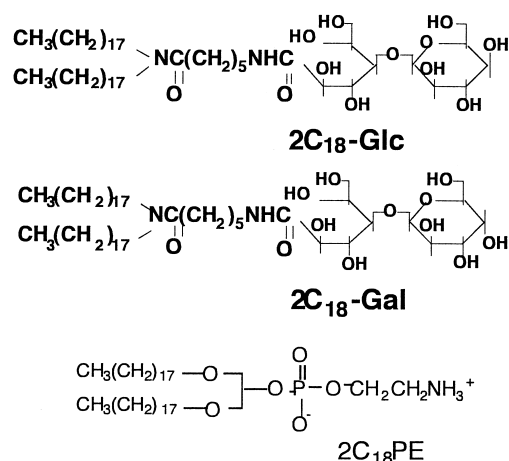


Fig. 2. Typical time-courses of frequency changes (ΔF) of a QCM on the mixed monolayer of (a) 2 C₁₈-Glc : 2 C₁₈PE = 40 : 60, (b) 2 C₁₈-Gal : 2 C₁₈PE = 40 : 60, and (c) the homo-monolayer of 2 C₁₈PE at a surface pressure of 30 mN m⁻¹, responding to the addition of Con A (10 ppm, 0.1 mM, Mw = 104,000) from aqueous solution (20 °C, pH 7.4, NaCl 150 mM, Ca²⁺ and Mn²⁺ 0.1 mM) at the first arrow. The subphase was changed to 0.1 M glucose solution at the second arrow.

子膜への結合量は Fig. 3 (a) に示すように単純な飽和型になった。Fig. 2 (b) に示すように下式を用いて飽和結合量

$$\frac{[\text{Con A}]_b}{\Delta m} = \frac{[\text{Con A}]_s}{\Delta m_{\max}} + \frac{1}{\Delta m_{\max} K_a}$$

($\Delta m_{\max}$) と結合定数 (K_a) を求めた。脂質組成にかかわらず一定であった (約 100 ng, 約 1 pmol)。Fig. 3 上に示すように、Con A は X 線結晶構造解析により $3.9 \times 4.0 \times 4.2$ nm² 大きさの蛋白質の 4 量体であり、各ユニットに 1 個、合計 4 個のグルコースに対する結合サイトを持っている³⁾。グルコースを親水基にもつ単分子膜には 4 個の結合サイトが同時に結合することは困難で、界面には 2 個の結合サイトを持っていることになる。もし

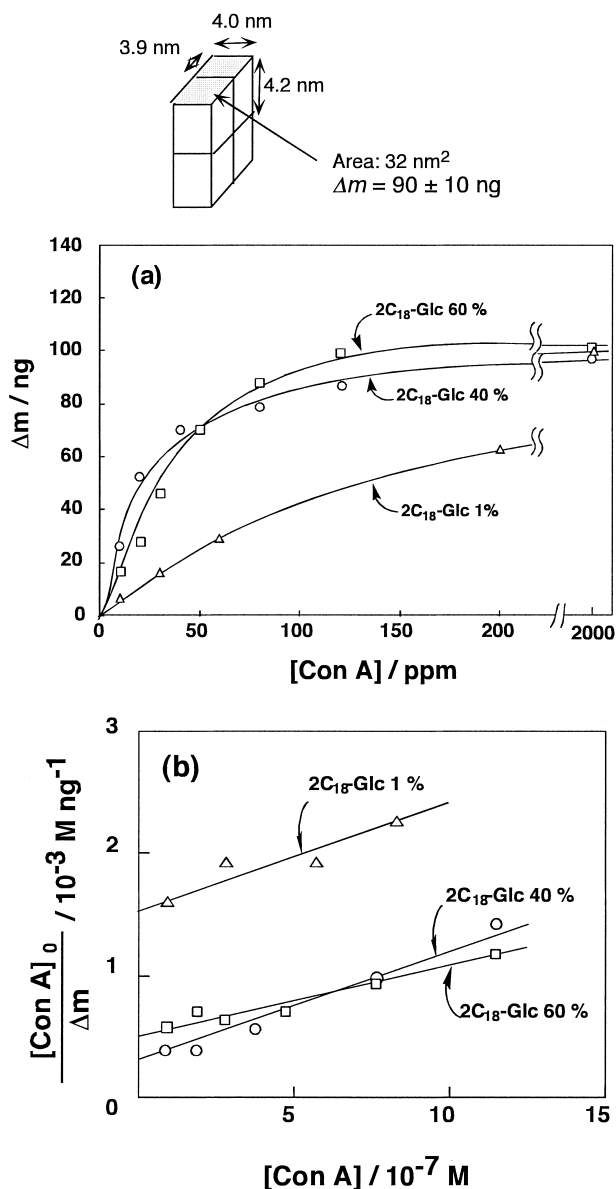


Fig. 3. (a) Saturation binding behavior of Con A to the mixed monolayer of 2 C₁₈-Glc (1, 40, and 60 mol %) and 2 C₁₈-PE depending on the concentration of Con A in the subphase (20 °C, pH 7.4, NaCl 150 mM, Ca²⁺ and Mn²⁺ 0.1 mM, at the surface pressure of 30 mN m⁻¹). (b) Linear correlation between $[Con A]_0 / \Delta m$ and $[Con A]_0$.

Con A が 2 C₁₈-Glc 混合単分子膜に 2 個の結合サイトを使って Langmuir 型の飽和吸着したとすると、90 ng の重量変化になり、 $\Delta m_{\max} = 100 \text{ ng}$ とよく一致する。

π -A カーブから、2 C₁₈-Glc : 2 C₁₈-PE 混合膜では、2 C₁₈-Glc と 2 C₁₈-PE は共に 0.4 nm² と計算でき、両者は理想混合している。Con A 2 ユニットの面積 (32 nm²) は 2 C₁₈-Glc の専有面積 (0.4 nm²) と比べて大きく、Con A 1 分子が結合すると約 80 分子の脂質分子を覆うことになる。すなわち Con A が単分子膜表面を一層覆うた

めには約 1 % の 2 C₁₈-Glc あれば十分であることになる。それ故、 $\Delta m_{\max}$ 値は混合膜中の 2 C₁₈-Glc 含量に依存せずに 1–60 % の範囲で一定であった。

2 C₁₈-Glc をレセプター分子、Con A をリガンドとすると、結合は以下の式で表される。時間 t における結合量は下式で与えられる。

$$[2 \text{ C}_{18}\text{-Glc}] + [\text{Con A}] \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} [2 \text{ C}_{18}\text{-Glc/Con A}]$$

$[2 \text{ C}_{18}\text{-Glc/Con A}] = [2 \text{ C}_{18}\text{-Glc/Con A}]_{\infty} (1 - e^{-t/\tau})$
 ここで、 $[2 \text{ C}_{18}\text{-Glc/Con A}] = \Delta m_t$ 、 $[2 \text{ C}_{18}\text{-Glc/Con A}]_{\infty} = \Delta m_{\max}$ であり、 $\tau = k[\text{Con A}] + k_{-1}$ である。Fig. 3 の結合カーブから上式に従って解離速度定数 (k_1 と k_{-1}) と結合定数 $K_a = k_1/k_{-1}$ を求め、結果を Table 2 にまとめた。動力学定数は混合膜中の 2 C₁₈-Glc 含量に依存し、2 C₁₈-Glc 含量が 5 % から増加するに従い k_1 と k_{-1} 値は徐々に減少した。結果として結合定数 K_a 値は大きくは変化しなかったが 40 % 含量の時に最大値を示した。

結合過程の模式図を Table 2 の下側に図示した。2 C₁₈-Glc 含量が低いとき (約 5 %) は、Con A の結合は自由であり k_1 が大きく、Con A の 2 個の結合可能サイトに対して 1 個の脂質しか結合していないので k_{-1} も大きい (脱離しやすい)。結果として結合定数 K_a は比較的小さい。2 C₁₈-Glc 含量が 40 % 付近では、 k_1 値は立体障害のために少し減少するが、Con A の 2 個の結合サイトが糖脂質と結合できるために k_{-1} は大きく減少する。結果として結合定数 K_a は $3.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ の最大値をとる。2 C₁₈-Glc 含量がもっと多くなると、膜面いっぱい結合した Con A 間の立体反撥などにより k_{-1} 値は少し大きくなり、結果として K_a 値は減少する。

これまで、Con A と糖脂質の結合は濁度法や、赤血球膜の沈殿などの簡易法で求められてきた^{4,5)}。みかけの結合定数は $(1-5) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ と求められており、我々の結果 ($(1-3) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) とよく一致する。

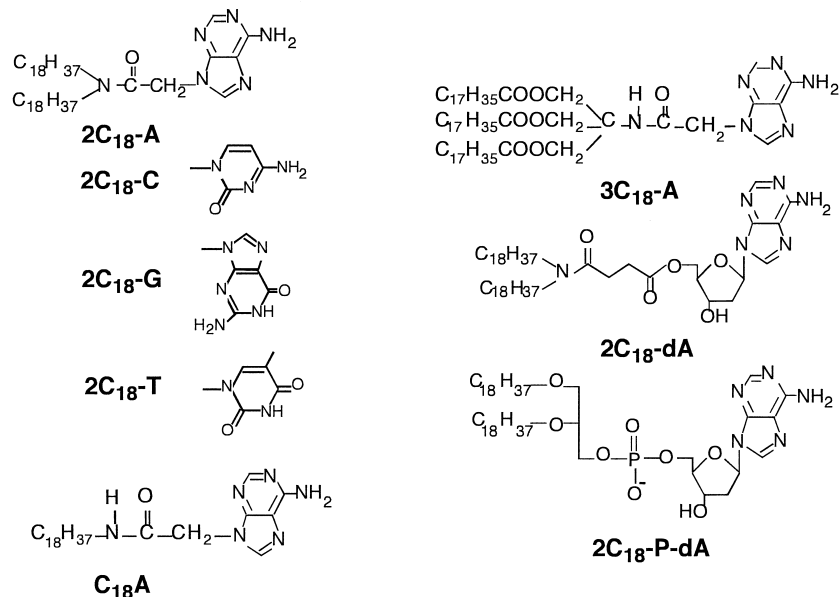
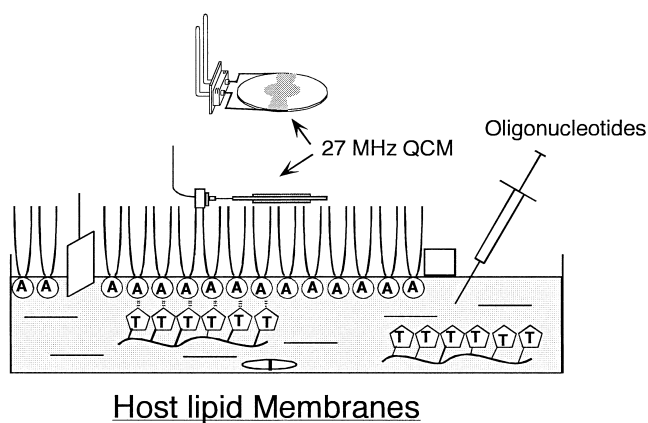
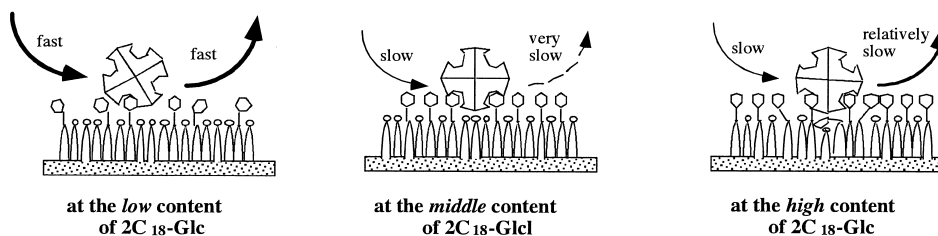
4. 気-水界面での DNA ハイブリダーゼーション

気-水界面はバルクの水溶液中とは異なり、かなり疎水的 (有機溶媒的) な環境にあるといわれている。例えば、核酸塩基であるアデニン (A) はチミン (T) とはバルクの水溶液中では水和のために相補的な水素結合を形成できないが、アデニンを親水基にもつ単分子膜を用いると気-水界面でチミンとの相補的な水素結合が観察できる^{6,7)}。

DNA は水溶液中でアデニン-チミン (A-T)、グアニン-シトシン (G-C) 間で相補的な水素結合を作り二重らせん鎖を形成することはよく知られている。相補的な

Table 2. The binding (k_1) and dissociation rate constants (k_{-1}), and association constants (K_a) of Con A with the mixed monolayer of 2 C₁₈-Glc and 2 C₁₈PE.

Monolayer content 2 C ₁₈ -Glc/2 C ₁₈ PE	$k_1/\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$k_{-1}/10^{-6} \text{s}^{-1}$	$K_a/10^6 \text{M}^{-1}$
1 : 99	—	—	—
5 : 95	1800	1400	1.3
20 : 80	420	170	2.5
40 : 60	190	61	3.1
60 : 40	250	210	1.2

**Fig. 4.** A schematic illustration of DNA hybridization between the nucleobase monolayer and oligonucleotides at the interface, and chemical structures of the monolayer-forming nucleobase lipids.

水素結合の形成には、水和を防ぎ塩基対間のスタッキングが形成されることが好ましい。そうであれば、気-水界面に核酸塩基を持つ単分子膜を形成し、核酸塩基間の距離や配向を制御してやれば、下水相に加えたオリゴ核酸と DNA 二重鎖と同じようなハイブリダイゼーション(二重鎖形成)が気-水界面でも見られるかもしれない。

Fig. 4 に示すような A, T, G, C の核酸塩基を親水部に持つジアルキル型の脂質(2 C₁₈-A, 2 C₁₈-T, 2 C₁₈-G, 2 C₁₈-C), アデニン基を親水部に持つモノ, ジ, トリアルキル型の脂質(C₁₈-A, 2 C₁₈-A, 3 C₁₈-A), ジアルキル型脂質で親水基がアデニン, デオキシアデノシン, アデノシン-5'-モノリン酸(2 C₁₈-A, 2 C₁₈-dA, 2 C₁₈-P-dA)の種々の脂質を合成し、水面単分子膜を作製した。Π-A カープから求めた専有面積は、塩基部分の大きさには依存せずに、アルキル鎖の本数だけに依存し、モノアルキル: 0.26, ジアルキル: 0.43, トリアルキル: 0.55 nm² となった。27 MHz 水晶発振子を Fig. 1 と同じように脂質膜に接して、下水相にオリゴ核酸を加えた時の振動数変化から結合量と速度を求めた。

Fig. 5 に 2 C₁₈-A と 2 C₁₈-T の単分子膜を作製し、下水相に 25 nM の 30-mer のオリゴチミジン dT₃₀, オリゴアデノシン dA₃₀, オリゴグアノシン dG₃₀, オリゴシチジン dC₃₀ を加えた時の典型的な振動数変化を示した。期待したように、アデニン基を持つ 2 C₁₈-A 膜には相補的なオリゴチミジン dT₃₀ だけが結合することがわかった (Fig. 5 (A))。同様に 2 C₁₈-T 膜には相補的な dA₃₀ だけ

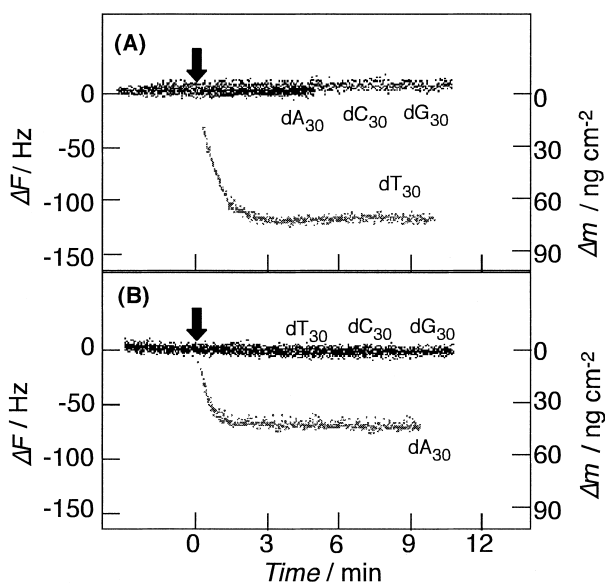


Fig. 5. Time courses of frequency decreases (mass increases) responding to the addition of 30-mer oligonucleotides (dT₃₀, dA₃₀, dG₃₀, and dC₃₀ at 25 nM) to (A) 2 C₁₈-A and (B) 2 C₁₈-T monolayers (25 , 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1.0 M NaCl).

が結合し (Fig. 5 (B)), データは示していないが, 2 C₁₈-G 膜には dC₃₀ が, 2 C₁₈-C 膜には dG₃₀ が特異的に結合した。このことは気-水界面でも核酸塩基が並んだところに相補的な水素結合が形成されることを示している。

Fig. 6 には、アデニン膜のアルキル鎖数 (C₁₈-A, 2 C₁₈-A, 3 C₁₈-A) と核酸部分の構造 (2 C₁₈-A, 2 C₁₈-dA, 2 C₁₈-P-dA) を変えたときのオリゴチミン dT₃₀ の結合挙動を示した。dT₃₀ の濃度変化に対しては典型的な飽和曲線を描き、逆数プロットから結合定数と飽和結合量を求めて Table 3 にまとめた。dT₃₀ はジアルキル型アデニ

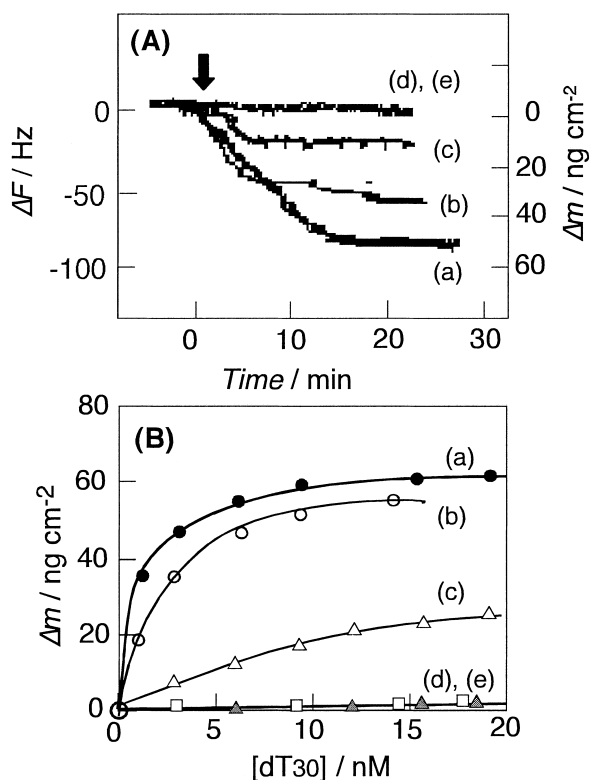


Fig. 6. (A) Time dependence of binding behavior of oligo deoxythymidine dT₃₀ and (B) saturation behavior of binding amounts (Dm) to various adenine monolayers (25 , 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1.0 M NaCl). (a) 2 C₁₈-A, (b) 2 C₁₈-dA, (c) 3 C₁₈-A, (d) C₁₈-A, and (e) 2 C₁₈-P-dA.

Table 3. Association constants (K_a) and maximum binding amounts (Dm_{max}) of dT₃₀ to the adenine lipid monolayers^a.

Lipid	$K_a / 10^5 \text{ M}^{-1}$	$Dm_{max} / \text{ng cm}^{-2}$
C ₁₈ -A	< 1	11
2 C ₁₈ -A	3000	64
3 C ₁₈ -A	100	60
2 C ₁₈ -dA	340	70
2 C ₁₈ -P-dA	< 1	12

^a 25 , 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1.0 M NaCl.

Table 4. Comparison of kinetic parameters of hybridization both at the interface and in bulk solution^a.

	$k_1/10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_{-1}/10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$K_a/10^6 \text{ M}^{-1}$
2 C ₁₈ -A + dT ₃₀ (at the interface)	480	1.3	390
dA ₃₀ + dT ₃₀ (Double strand)	230	0.11	2100

^a 25 °C, 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 0.2 M NaCl.

ン脂質によく結合し、トリアルキル型への結合は低下し、モノアルキル型にはほとんど結合しなかった。単分子膜上での専有面積が C₁₈-A = 0.26 nm², 2 C₁₈-A = 0.43 nm², 3 C₁₈-A = 0.55 nm² から計算すると各々のアデニン塩基間の距離は 0.58 nm, 0.74 nm, 0.84 nm と求められる。オリゴ核酸 dT₃₀ をのばしたときの塩基間の距離は 0.7 ± 0.1 nm と推定され、ジアルキル型脂質でのアデニン塩基間距離 0.74 nm と一致する。すなわち、ジアルキル型アデニン脂質にオリゴチミンがもっともよく結合するのは、塩基間距離が一致するためと推定される。このときの飽和結合量は $\Delta m = 64 \text{ ng cm}^{-2}$ であり、dT₃₀ のチミン基が 2 C₁₈-A のアデニン基と 1 : 1 で結合したときの予想される値 100–120 ng cm⁻² の約半分であった。このことは立体障害を考えると十分予想できる範囲である。

同じジアルキル型アデニン脂質で核酸部分の構造の効果を見たときには、dT₃₀ の結合は 2 C₁₈-A > 2 C₁₈-dA >> 2 C₁₈-P-dA の順となった (Fig. 6 と Table 3 参照)。アデノシン-5'-リン酸を持つ 2 C₁₈-P-dA の場合にはアニオン荷電があり、dT₃₀ との静電反撥のために結合が低下したと考えられる。デオキシアデノシン基を持つ 2 C₁₈-dA では塩基部分の立体障害のために 2 C₁₈-A に比べて結合定数が低下したものと考えられる。結果として、オリゴチミン dT₃₀ が気-水界面でもっともよく相補的な水素結合によるハイブリダイゼーションが観察できるのはジアルキル脂質に直接アデノシン基が付いた 2 C₁₈-A であることがわかった。

Fig. 5 や Fig. 6 の結合の経時変化から、前述したように結合速度定数 k_1 、解離速度定数 k_{-1} が求められ、結果を水溶液中での二重鎖形成の値⁸⁾と比べて Table 4 にまとめた。バルク水溶液中での dA₃₀ と dT₃₀ 間の二重鎖形成 (ハイブリダイゼーション) に比べて気-水界面での 2 C₁₈-A 単分子膜と dT₃₀ 間の相補的な水素結合の結合定数は約 1/6 に低下し、これは主として界面での解離速度定数の増加によるものであり、結合速度定数は両者でほとんど差がなかった。界面での相補的な水素結合の形成はバルク水相中に比べて、i) 界面の疎水的な (有機溶媒的な) 環境、ii) 中性脂質を用いることによるリン酸基間の静電反撥がない、などの点で有利であるが、iii) 二重鎖形成による塩基対のスタッキングによる安定化の恩

恵が受けられないという大きな欠点がある。これらを総合すると界面での相補鎖の形成では、形成速度は大差ないが、解離速度が大きくなり、これは主として塩基対のスタッキングによる安定化がないためであるといえる。

5. お わ り に

本稿では、気-水界面単分子膜へのたんぱく質や核酸の結合をナノグラムレベルで検出し、結合の経時変化から動力学解析できることを示した。水晶発振子は基本的には、基板上の質量変化をナノグラムレベルで追跡できるので重量変化を伴ういろいろな分子認識や反応を追跡してその動力学が解析できる有用なツールである^{1,9)}。また、水晶発振子のもう一つの特徴として気相中や液体中さらには超臨界流体中でも使用でき 媒体を選ばない。例えば、同じ分子認識過程を気相中や液体中で同時に測定でき、媒体による溶媒和の違いについても議論でき、今後も様々な分子認識の場で活用されることを期待している。

文 献

- 1) 総説として、江原靖人、岡畑恵雄：油化学 **43**, 796 (1994); Y. Okahata, K. Niikura, H. Furusawa and H. Matsuno: Analytical Sciences **16**, 1113 (2000); 実川友史、岡畑恵雄：超音波 Techno **5**, 12 (2001); 岡畑恵雄、古澤宏幸：「化学フロンティア 5 生命化学のニューセントラルドグマ テーラーメイド・バイオケミストリーのめざすもの」、杉本直己編 (化学同人, 2002) p. 247; 古澤宏幸、岡畑恵雄：化学と生物 **40**, 269 (2002).
- 2) Y. Ebara and Y. Okahata: J. Am. Chem. Soc. **116**, 11209 (1994); Y. Ebara and Y. Okahata: Langmuir **9**, 574 (1993).
- 3) J.W. Becker, Jr., G.W. Reeke and G.M. Edelman: Nature **259**, 406 (1976).
- 4) Y. Hirabayashi, A. Hamaoka, M. Matsumoto, T. Matsubara, M. Tagawa, S. Wakabayashi and M. Taniguchi: J. Biol. Chem. **260**, 13328 (1985).
- 5) Y. Suzuki, M. Matsunaga and M. Matsumoto: J. Biol. Chem. **260**, 1362 (1985).
- 6) K. Kurihara, K. Ohto, K. Tanaka, Y. Aoyama and T. Kunitake: J. Am. Chem. Soc. **113**, 444 (1991).
- 7) H. Kitano and H. Ringsdorf: Bull. Chem. Soc. Jpn. **58**,

- 28268 (1985).
- 8) Y. Okahata, Y. Matsunobu, K. Ijio, M. Mukai, A. Murakami and K. Makino: *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 8299 (1992); Y. Okahata, M. Kawase, K. Niikura, F. Ohtake, H. Furusawa and Y. Ebara: *Anal. Chem.* **70**, 1288 (1998).
- 9) H. Matsuno, K. Niikura and Y. Okahata: *Biochemistry* **40**, 3615 (2001); H. Matsuno, K. Niikura and Y. Okahata: *Chem. Eur. J.* **7**, 3305 (2001); H. Matsuno, H. Furusawa and Y. Okahata: *Nucleic Acids Res. Suppl.* **1**, 261 (2001); H. Furusawa, Y. Kitamura, N. Hagiwara, T. Turi-moto and Y. Okahata: *Chem. Phys. Chem.* **5**, 446 (2002); H. Matsuno and Y. Okahata: *Chem. Commun.* 470 (2002).