

水晶振動子型バイオセンサーによる生体分子間 相互作用の研究

齋藤 英一^{*}, 笠原 仁^{**}, 串宮 範彦^{**}, 下村 雅人^{***}
(平成 20 年 10 月 31 日受理)

A Study on the Biomacromolecular Interactions by Quartz-Crystal Microbalance Biosensor

Eiichi Saitoh^{*}, Hitoshi Kasahara^{**}, Norihiko Kushimiya^{**}, and Masato Shimomura^{***}

Two serine protease inhibitors from soybeans, Kunitz type soybean trypsin inhibitor (STI) and Bowman-Birk inhibitor (BBI) were immobilized *via* an alkanethiol onto a gold surface on a highly sensitive 21 MHz AT-cut quartz-crystal microbalance (QCM) chip. The QCM exhibited a significant decrease in frequency responding to serine protease addition. The dissociation constants (K_d) for the interactions of STI-bovine pancreatic trypsin, BBI-bovine pancreatic trypsin, and BBI-bovine pancreatic chymotrypsin were determined, respectively, to be 47.0 nM, 83.6 nM, and 52.9 nM. The data suggest that the inhibitors were immobilized on the gold surface of QCM in a possible orientation to react with corresponding serine proteases. Based on the observations, it may be concluded that combining protease inhibitor and protease recognition events with an appropriate QCM transducer can yield sensor devices highly suitable for detection of proteases in food, clinical and biodefense areas.

Key words: Bowman-Birk type serine protease inhibitor, Chymotrypsin, Dissociation constant, Quartz crystal microbalance biosensor, Soybean trypsin inhibitor, Trypsin

1 . はじめに

生命の基本単位は細胞であり，生命現象は生体分子の統合的な化学反応である．生命現象を司る分子の最も優れた性質は高選択性の分子認識能であり，その認識反応は生命体のホメオスタシス，生理現象，思考，精神および性格なども支配する．

^{*}環境科学科 教授

^{**}大学院工学研究科 大学院生

^{***}長岡技術科学大学工学部生物系 教授

生体分子の認識能を固定化した水晶振動子マイクロバランズ(QCM)バイオセンサーは振動数の経時変化から認識される微量分子の結合量やその結合過程をナノグラムレベルで定量できる。従って、QCMバイオセンサーは生命科学、食品科学、環境科学などの分野における特定分子のセンシングに応用することができる。近年、QCMテクノロジーを応用して生体内で起り得る蛋白質-蛋白質、蛋白質-糖、蛋白質-DNA、蛋白質-RNA、DNA-DNA、DNA-RNA、糖鎖-微生物などの分子間相互作用を解析する研究が激しく展開している¹⁻⁸⁾。我々は蛋白質-蛋白質相互作用に研究の焦点を合わせる。その組合せ例として、酵素-基質、酵素-阻害剤(インヒビター)、抗体-抗原、ホルモン-レセプターなどがある。

本論文ではQCM発振装置および大豆の蛋白質分解酵素阻害剤(ボーマンバークセリンプロテアーゼインヒビターならびにクニッツ型トリプシンインヒビター)を固定化したQCMセンサーチップを作成し、ウシ膵臓由来の蛋白質分解酵素(トリプシンならびにキモトリプシン)に対する相互作用を解析したので報告する。

2. 材料と方法

2.1 試薬

ウシ膵臓トリプシン[EC. 3.4.21.4]、ウシ膵臓キモトリプシン[EC. 3.4.21.1]、大豆クニッツ型トリプシンインヒビター(STI)、大豆ボーマンバークセリンプロテアーゼインヒビター(BBI)はシグマ社(セントルイス、アメリカ)より入手した。シスタミン、*N*-シクロヘキシル-*N'*-(2-モルホリノエチル)カルボジイミドメト-*p*-トルエンスルホン酸塩(CMC)は和光純薬(大阪)から購入した。実験に供した上記以外の試薬はすべて特級もしくは生化学用試薬と同等の純度である。

2.2 QCM発振器とセンサーチップ

サンライズ工業株式会社(新潟県糸魚川市)の協力を得てQCMバイオセンサー発振器を作成した。作成したQCMバイオセンサーシステムをFig.1にしめす。表面に金蒸着が施されているATカット水晶振動子(AT cut QCM; 基本周波数, 21 MHz; サンライズ工業株式会社)をセンサーチップとして用いた³⁻⁴⁾。

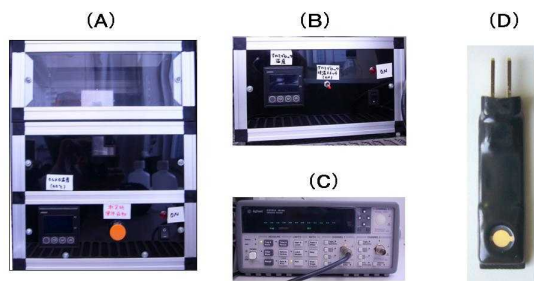


Fig. 1 QCMバイオセンサー装置の構成
(A)発振器 (B)恒温槽 (C)周波数カウンター、
(D)QCMセンサー(基本周波数, 21 MHz; $\Delta m/1\text{Hz}$, 53 pg/cm²)

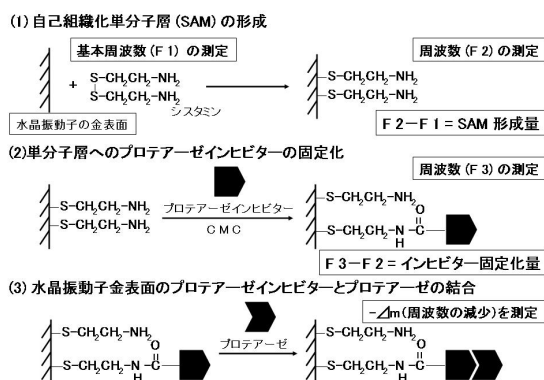


Fig. 2 QCM法による分子間相互作用の解析原理

2.3 プロテアーゼインヒビターのQCMチップ表面への固定化

QCMセンサーチップの金表面を16 mMのシスタミン水溶液に1時間浸漬することにより自己組織化単分子層(SAM)を形成した¹⁻⁸⁾。次いで、セリンプロテアーゼインヒビター(STIまたはBBI)溶液(0.02 mg/ml)とCMC溶液(0.2 mg/ml)の等量混合溶液に2時間浸漬し、蛋白質性のSTIならびにBBIをセンサーチップの金表面に形成されたSAMに固定化した。SAM形成ならびに蛋白質性プロテアーゼインヒビターの固定化に関する反応式をFig.2にしめす。

2.4 QCMバイオセンサーによる分子間相互作用の解析

固定化されたセリンプロテアーゼインヒビター(STIならびにBBI)とセリンプロテアーゼ(ウシ膵臓トリプシンならびにキモトリプシン)間における相互作用を解析するために、セリンプロテアーゼインヒビターを固定化したQCMセンサーを100 mM トリス緩衝液(pH 8.0, 25)中に浸漬させて、反応系にセリンプロテアーゼ溶液(0.1 mg/ml)を100, 100, 300, 600, 600, 600 μlずつ逐次的に添加し、セリンプロテアーゼインヒビターとセリンプロテアーゼの結合が飽和するまで周波数の変化量³⁻⁸⁾を観測した(Fig.2を参照)。

2.5 STIならびにBBIのセリンプロテアーゼに対する解離定数の決定

質量作用の法則により導かれた理論式⁵⁻⁸⁾(Fig.3を参照)に基づき、STIならびにBBIのトリプシンまたはキモトリプシンに対する解離定数 K_d (結合定数 K_a の逆数)を算出した。複数回 ($n = 3-4$)の計測を実施し、その平均値として K_d を決定した。

$$E + I \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} EI \quad (\text{質量作用の法則}) \quad \dots (1)$$

K_d , 解離定数; k_1 , 結合速度定数; k_2 , 解離速度定数; E, プロテアーゼ; I, プロテアーゼインヒビター; EI, 複合体; E_0 , Eの全質量; A, Eの分子量; V, 反応系の体積; m, QCMセンサー表面の単位面積あたりの重量変化; m_{max} , Eの最大結合量

$$[EI] = mS/AV; [E] = [E]_0 - m \cdot S/AV; [I] = (m_{max}S - mS)/AV$$

$$K_d = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]} = \frac{([E]_0 - mS/AV)(m_{max}S - mS)}{mS} \quad \dots (2)$$

($m \cdot S/AV$)($m_{max}S - mS$) が微小で無視できる条件を設定して実験を実施すれば、

$$[E]_0 = x, [E] = y \text{ とおけば, } y = \frac{x}{m_{max}} + \frac{K_d}{m_{max}} \quad \dots (4)$$

Fig. 3 解離定数の計算式

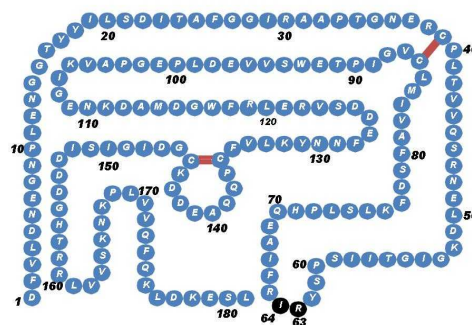


Fig. 4 STIのアミノ酸配列とトリプシン阻害部位 Arg(63)-Ile(64)はトリプシン阻害部位である。

3 . 結果

3.1 STI とウシ膵臓トリプシンの相互作用

Fig.4 に大豆由来の STI (別名;クニッツインヒビター)のアミノ酸配列とトリプシン阻害部位をしめす⁹⁾。シスタミンを介して STI を金表面に固定化した QCM チップをトリス緩衝液(pH 8.0)に浸漬させ、トリプシン(24.7 – 539.4 nM)と反応させた際の周波数の減少過程を追跡した結果を Fig.5 にしめす。Fig.5 はトリプシン濃度とトリプシン濃度 / Δm(Fig.3を参照)の値をプロットした結果である。この直線の傾きと切片の比から K_d は 54.1 nM と計算された。3 回の実験から平均値を求めることにより STI のトリプシンに対する K_d 値は 47.0 nM と決定された。

3.2 BBI とウシ膵臓トリプシンの相互作用

Fig. 7 に大豆 BBI のアミノ酸配列ならびにトリプシンとキモトリプシンの阻害部位をしめす¹⁰⁾。一分子の BBI は一分子のトリプシンならびに一分子のキモトリプシンと結合することにより両方のプロテアーゼ活性を阻害することができる。BBI を固定化したセンサーチップをトリス緩衝液(pH 8.0)に浸漬させ、トリプシン(24.7–539.4 nM)と反応させた際の周波数変化を経時的に記録した結果を Fig.8 にしめす。Fig.9 は BBI のトリプシンに対する K_d を算出するためのプロットである。この図に描かれた直線の傾きと切片の比から BBI のトリプシンに対する K_d はそれぞれ 67.8 nM と計算された。3 回の計測値を平均したところ BBI のトリプシンに対する K_d は 83.6 nM であった。

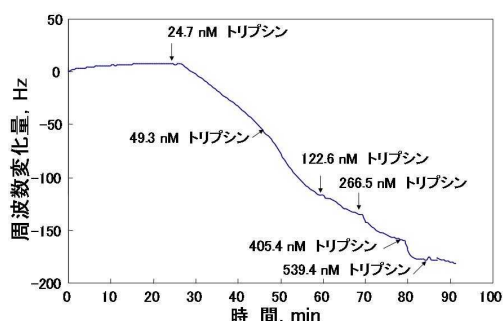


Fig. 5 STI固定化QCMセンサーチップの周波数変化 QCMセンサーチップに固定化したSTIとトリプシン(24.7–539.4 nM)を逐次的に反応させた。

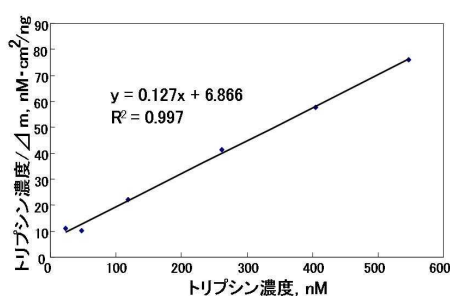


Fig. 6 STIのトリプシンに対する解離定数 この直線から積算される解離定数は $K_d = 54.1$ nMである。

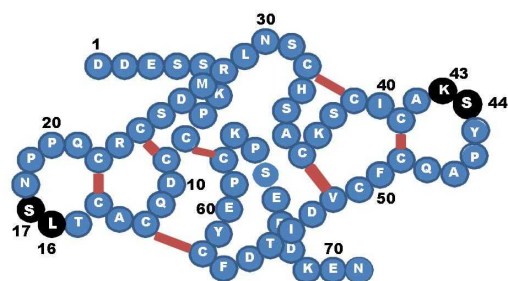


Fig. 7 BBIのアミノ酸配列とセリンプロテアーゼ阻害部位 Leu(16)-Ser(17)がキモトリプシン阻害部位、Lys(43)-Ser(44)がトリプシン阻害部位である。

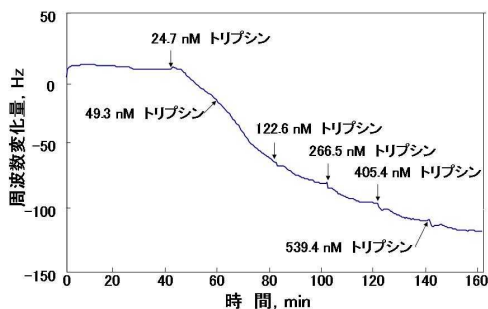


Fig. 8 BBI固定化QCMセンサーの周波数変化 QCMセンサーチップに固定化された大豆BBIにトリプシン(24.7–539.4 nM)を逐次的に反応させた。

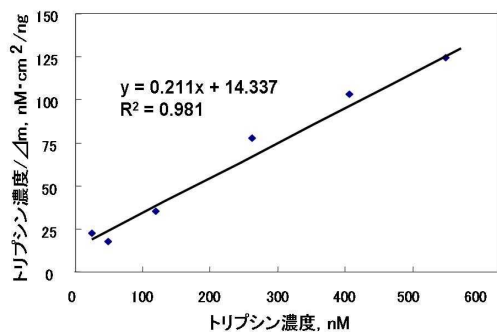


Fig. 9 BBIのトリプシンに対する解離定数の算出 この直線から算出される解離定数は67.8 nMである。

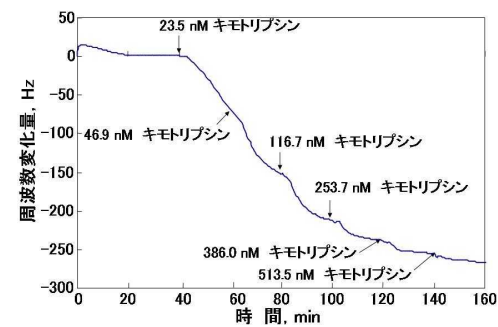


Fig. 10 BBI固定化QCMセンサーの周波数変化 QCMセンサーチップに固定化された大豆BBIにキモトリプシン(23.5–513.5 nM)を逐次的に反応させた。

3.3 BBI とウシ膵臓キモトリプシンの相互作用

BBI を固定化したセンサーチップをトリス緩衝液(pH 8.0)に浸漬させ、キモトリプシン (23.5–513.5 nM)と反応させた際の周波数変化を経時的に記録した結果を Fig.10 にしめす。Fig.11 は BBI のキモトリプシンに対する K_d を算出するためのプロットである。この図の直線の傾きと切片の比から BBI のキモトリプシンに対する K_d は 58.3 nM と計算された。4 回の実験により得られた値を平均すると、キモトリプシンに対する K_d は 52.9 nM となった。

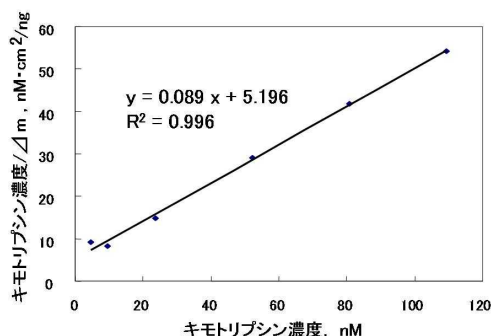


Fig. 11 BBI のキモトリプシンに対する解離定数の算出
この直線から算出される解離定数は58.3 nMである。

Table 1 QCM法で算定された K_d 値と文献値(酵素化学法)の比較

インヒビター	プロテアーゼ	測定法	解離定数(nM)
STI (Ti ^a)	トリプシン	酵素化学法	0.5
STI (Ti ^a)	トリプシン	QCM法	47.0
BBI	トリプシン	酵素化学法	0.28
BBI	トリプシン	QCM法	83.6
BBI	キモトリプシン	酵素化学法	29
BBI	キモトリプシン	QCM法	52.9

注: STIにはTi^a, Ti^b, Ti^cの遺伝的多型が存在する。
Ti^aをSTIとして測定に使用した。

4. まとめ

QCM法で決定されたSTIとBBIのトリプシンに対する K_d (47.0ならびに83.6 nM)は文献値¹¹⁻¹²⁾の100倍であったが、BBIのキモトリプシンに対するそれは52.9 nMであり、文献値とよく一致した(Table 1を参照)。以上の成績はSTIやBBIがトリプシンの活性溝に近づきにくい配向で金表面に固定化されたが、BBIの固定化配向はキモトリプシンの活性溝に対しては結合しやすい状態であったと推定される。

プロテアーゼインヒビターとプロテアーゼの分子間相互作用で認められる高選択性認識反応を適当なQCMトランスデューサーと組み合わせればセンサーデバイスを構築することが可能であると思われる。このようにして創生されたプロテアーゼセンサーは生命医学、食品科学、環境科学などの領域における重要なプロテアーゼを分析定量するのに応用できると考えられる。

最近、我々は二次元電気泳動系のリバースザイモグラフィを發明して生体試料に含まれるプロテアーゼインヒビターを包括的に解析した¹³⁾。その結果、プロテアーゼインヒビターの候補として、予想外の蛋白質が食用豆種子や食用魚皮膚の抽出液から数多く発見された。QCMバイオセンサーはプロテアーゼインヒビターの候補として同定された蛋白質のプロテアーゼに対する相互作用を究明する際に威力を発揮するものと期待される。

謝辞

本研究は平成19年度新潟工科大学学内共同研究の助成金を得て実施された。研究を完遂するにあたり、サンライズ工業株式会社に多大なご支援を賜ったことを記し感謝の意を表明する。

文献

- 1) Nishino H, Nihira T, Mori T and Okahata Y: Direct monitoring of enzymatic glucan hydrolysis on a 27-MHz quartz-crystal microbalance. *J. Am. Chem. Soc.* **126**: 2264-2265, 2004.
- 2) Shen Z, Huang M, Xiao C, Zhang Y, Zeng X and Wang PG: Non-labeled QCM biosensor for bacterial detection using carbohydrate and lectin recognitions. *Anal. Chem.* **79**: 2312-2319, 2007.
- 3) Kon K, Tsukahara N and Shimomura M: DNA sensing with a quartz crystal device for determination microorganism. *Sensors and Actuators B.* **123**: 647-650, 2007.
- 4) Oshima K, Nakajima H, Takahashi S, Kera Y, Shimomura M and Miyauchi S: Quartz crystal microbalance assay for determination of plasma vitellogenin. *Sensors and Actuators B.* **105**: 473-476, 2005.
- 5) Sato T, Serizawa T, Ohtake F, Nakamura M, Terabayashi T, Kawanishi Y and Okahata Y: Quantative measurements of the interaction between monosialoganglioside monolayers and wheat germ agglutinin (WGA) by a quartz-crystal microbalance. *Biochim. Biophys. Acta* **1380**: 82-92, 1998.
- 6) Ebara Y, Itakura K and Okahata Y: Kinetic studies of molecular recognition based on hydrogenbonding at the air-water interface by using a high sensitive quartz-crystal microbalance. *Langmuir* **12**: 165-5170, 1996.
- 7) Zhang Y, Luo S, Tang Y, Yu L, Hou K-Y, Cheng J-P, Zeng X and Wang PG: Carbohydrate-protein interactions by “clicked” carbohydrate self-assembled monolayers. *Anal. Chem.* **78**: 2001-2008, 2006.
- 8) Zhang Y, Telyatnikov V, Sathe M, Zeng X and wang PG: Studying interaction of α -gal carbohydrate antigen and proteins by quartz-crystal microbalance. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 9292-9293, 2003.
- 9) Kim S.H., Hara S, Hase S, Ikenaka T, Toda H, Kitamura K and Kaizuma N: Comparative study on amino acid sequences of Knitz-type soybean trypsin inhibitors, Ti^a , Ti^b , and Ti^c . *J. Biochem.* **98**: 435-448, 1985.
- 10) Odani S and Ikenaka T: Studies on soybean trypsin inhibitors. XI. Complete amino acid sequence and anti-proteinase sites of Bowman-Birk soybean proteinase inhibitor. *J. Biochem.* **71**: 839-848, 1972.
- 11) Freed RC and Ryan DS: Isolation and characterization of genetic variants of the Kunitz soybean trypsin inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta* **624**: 567-572, 1980.
- 12) Seidl DS and Liner IE: Isolation and properties of complexes of the Bowman-Birk soybean inhibitor with trypsin and chymotrypsin. *J. Biol. Chem.* **247**: 3533-3538, 1972.
- 13) Saitoh E, Yamamoto S, Okamoto E, Hayakawa Y, Hoshino T, Sato R, Isemura S, Ohtsubo S and Taniguchi M: Identification of cysteine proteases and screening of cysteine protease inhibitors in biological samples by a two-dimensional gel system of zymography and reverse zymography. *Anal. Chem. Ins.* **2**: 51-59, 2007.