



岡山大学大学院
自然科学研究科
化学生命工学専攻・
助教
博士（工学）
今中洋行

1997年 京都大学工学部工業化学科卒業
1999年 京都大学大学院工学研究科
化学工学専攻修士課程修了
2003年 京都大学大学院工学研究科
合成・生物化学専攻博士課程修了
2004年 岡山大学工学部
生物機能工学科・助手
2007年 現職

ナノバイオ界面で生じる生体分子間相互作用の高度制御

はじめに

タンパク質やペプチド、核酸などの生体分子間でみられる相互作用を検出する免疫アッセイは、ライフサイエンス分野の中核技術の一つとして、現在、分析・医療診断だけではなくプロテオーム解析など幅広く利用されている。これまでに多くの基礎研究がなされており、その成果は、様々な形で活用されてきた。しかし、昨今の技術進展に伴い、その基盤現象であるバイオ分子固定化について、さらなる高機能化、高効率化が必要不可欠であり、そのための新たなブレークスルーが求められている。従来、生体分子の固体表面への固定化は、物理吸着法、共有結合法あるいはこれらを併用した方法によってなされてきた^[1]。しかし、これらの固定化法は、分子レベルから解釈すると多くの問題点が指摘される。最大の問題点は、従来法でタンパク質分子を固定化した場合、固体表面との強い相互作用により構造変化を起こし、その機能を失うだけでなく、付着状態におけるタンパク質分子の配向が、その機能発現に不利である可能性が高いことである。また、タンパク質が主として疎水性相互作用により固体表面に付着するために、付着に伴うタンパク質の変性及び共存タンパク質との競合が無視できない。そのため、免疫アッセイにおいては測定に長時間を要するだけでなく、感度の著しい低下もみられる。さらにタンパク質間相互作用の解析においては、一般的な抗原-抗体反応とは異なり、極微少な構造変化も、測定感度に大きく影響する。したがって、生体分子と固体材料界面との相互作用の制御は、機能や活性の大幅な向上を図るための重要な鍵であり、そのためには生体分子をその機能をできるだけ維持した状態で固体表面に配向制御して付着させることが不可欠といえる。そこで、本研究では、我々のグループにより独自に単離・

同定した親水性ポリスチレン(PS)表面に特異的親和性を示すペプチドタグ(PS-tag)を利用したタンパク質固定化技術^[2]を利用することを考えた。さらに、より高度にバイオ分子を固定化するため、固定化分子と固体表面との間に生じる直接的な相互作用の影響を緩和するPS-tag連結クッションタンパク質を用いたペプチド固定化をモデルとした(Fig. 1参照)。クッションタンパク質には構造安定性の高い超好熱始原菌：*Thermococcus kodakaraensis*由来のRibonuclease HIII^[3] (HII)を用いた。そして、ペプチド-タンパク質間相互作用評価モデルとして、StrepTagII(STII；ペプチド) - ストレプトアビジン (SA) またはストレプトタクチン (ST) 間相互作用解析系を適用した (Fig. 1参照)。この分子間相互作用は通常のイムノアッセイでリガンド検出に用いられる抗体に比べて、リガンドとの相互作用力が極めて小さいため、固液界面の分子配向が検出感度や最大検出量に反映されると考えられる。まず基板となるポリスチレンの親水性度が相互作用検出感度に及ぼす影響を調べた。さらに、各種クッションタンパク質などのナノバイオ界面における固定化特性およびその分子挙動について詳細に調査した。

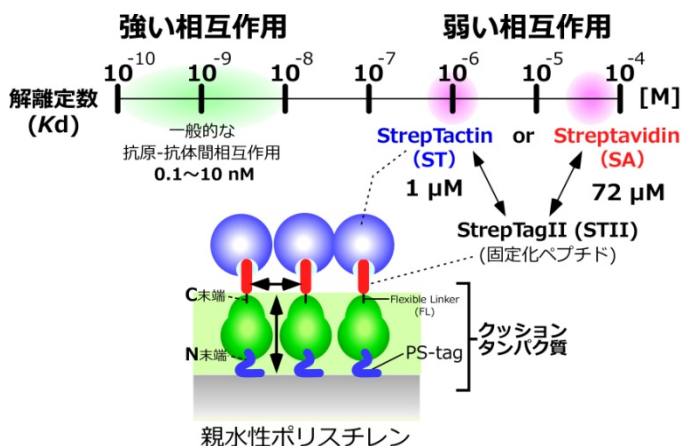


Fig. 1 クッションタンパク質を用いたペプチド-タンパク質間相互作用評価モデル

PSプレートの親水性度が相互作用検出に及ぼす影響

ペプチドサンプルを固定化する表面の親水性度を測定するため、自動接触角計(DSA 20, KRUSS)を用いて、EIA用PSプレート(Costar, Corning社製)および2種類の細胞培養用PSプレート(IWAKI, Asahi Techno Glass社製, BD Falcon, Becton Dickinson社製)の各PSプレート表面に滴下した水滴の接触角を測定した(Fig. 2)。

その結果、2種類(BD Falcon, IWAKI)のPSプレートではCostarプレートに比べて小さい接触角(それぞれ44.7°, 59.0°)を示し、親水性度が高いことがわかった。特に最も低い水の接触角を示したことから、今回用いたPSプレートの中ではBD Falconプレートが最も親水性度の高い表面を有していることがわかった。続いてクッションタンパク質を固定化する表面の親水性度

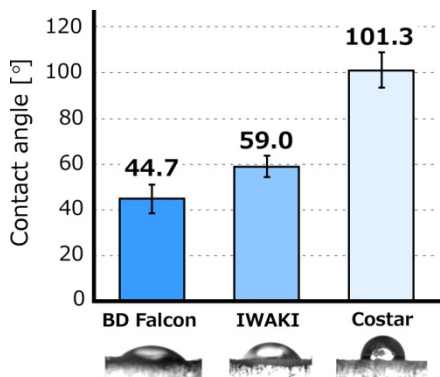


Fig. 2 各種PSプレートの接触角

を有していることがわかった。続いてクッションタンパク質を固定化する表面の親水性度

の違いが検出感度に及ぼす影響を調査すべく、これら3種類のPSプレート上にN末端にPS-tag, C末端にStrepTagIIを連結したクッションタンパク質 (PS-HII-FL-STII) を固定化し、それぞれSTII-ST, STII-SA間相互作用の検出を行った (Fig. 3).

その結果、解離定数に応じた相互作用検出感度の差が明確に見られた一方、親水性プレートである BD Falcon プレートと IWAKI プレートでは、疎水性プレート (Costar) に比べてどちらの相互作用についても最大検出量が顕著に高かった。つまり、親水性度のより高い表面上に PS-tag を介してクッションタンパク質がより高密度に固定化されたことが強く示唆される結果が得られた。

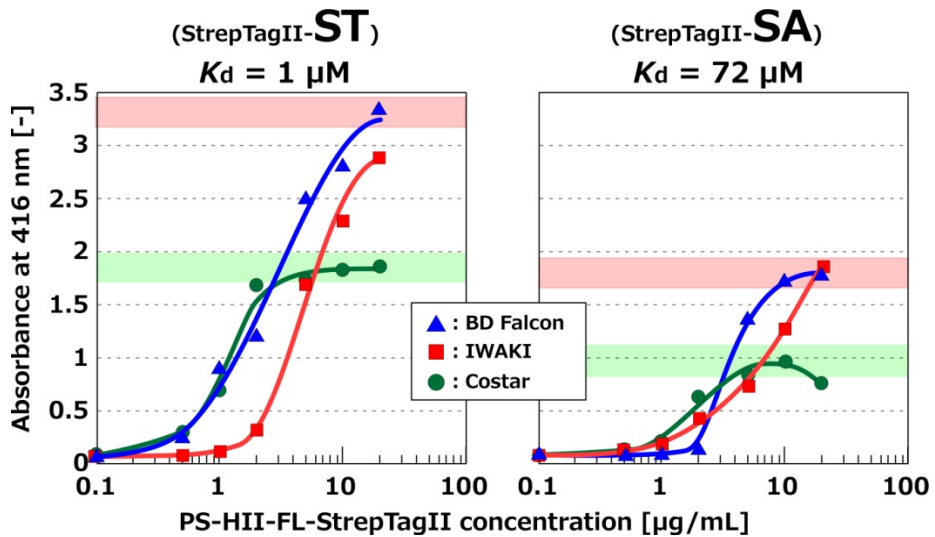


Fig. 3 各種 PS プレートに固定化したクッションタンパク質連結ペプチドの相互作用解析

また、疎水性プレート (Costar) では、クッションタンパク質が PS-tag を介さずに疎水性相互作用によって固定化され、その結果として非特異的な相互作用を生じる領域を液相表面に露出するような配向を示したため検出感が比較的高く、また、固定化における 1 分子あたりの占有面積が大きいと固定化分子数が減少し、結果として最大検出量の低下を招いたと考えられた。以上より、基板 PS 表面の親水性度が固液ナノバイオ界面における PS-tag 連結クッションタンパク質の固定化配向制御の重要な要素であることがわかった。

クッションタンパク質の固定化特性に影響を及ぼす因子の検討

等電点の異なるタンパク質を用いた競争吸着実験を行い、固定化に影響を及ぼす因子について検討した (Fig. 4)。PBS (pH 7.4) 条件下で正に荷電するクッションタンパク質 (pI=7.8) と負に荷電する PS-tag 連結 GFP (pI=5.8) を用いて競争吸着させた後、それぞれのリガンドに対する相互作用検出を行った。その結果、まず、親水性 PS プレートには PS-tag 連結タンパク質の固定化量が多いことが示された。さらに、プラズマ処理により表面が

負に荷電し親水性度が向上すると、クッションタンパク質の固定化率が増加することがわかった。したがって、PS表面へのバイオ分子固定化は、PS-tagの連結だけではなく、固定化する分子の荷電性を含め、静電的相互作用の影響が大きいことが示唆された。

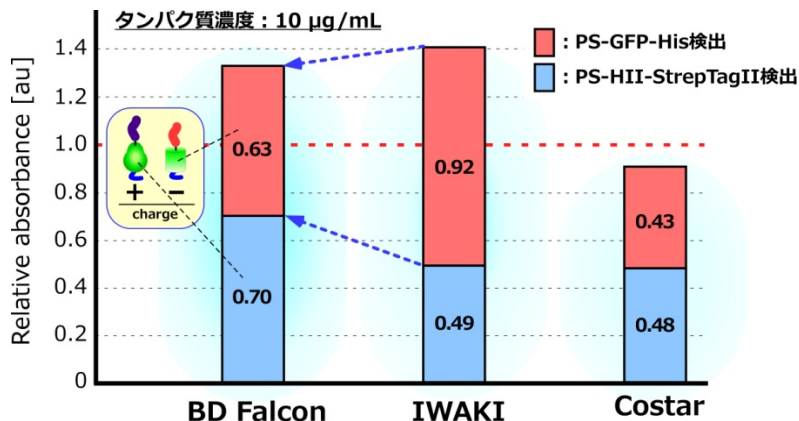


Fig. 4 異なる荷電性を有するタンパク質競争吸着が検出感度に及ぼす影響

続いて、親水性PSプレートを用いて、一般的なブロッキング剤であるBSA (pI=4.9) 共存 (2 mg/mL)がクッションタンパク質の固定化に及ぼす影響について調査した(Fig. 5)。その結果、親水性度の高いBD Falconプレートには、BSA競争吸着の有無にかかわらずStrepTagII連結クッションタンパク質が優先的に固定化されることがわかった。一方で、BD Falconプレートに比べて

親水性度が若干低いIWAKIプレートでは、BSAと競争吸着させることにより、STII-ST間相互作用の検出感度は向上し、STII-SA間相互

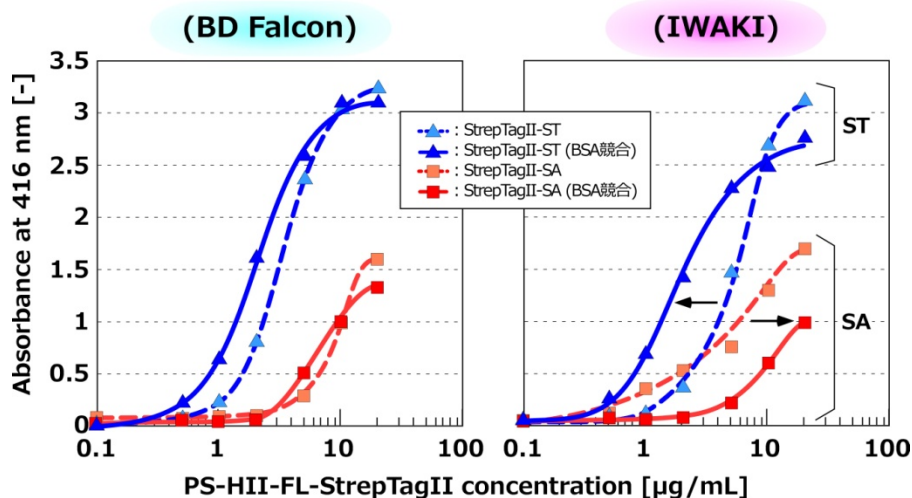


Fig. 5 BSAの競争吸着が検出感度に及ぼす影響

作用の検出は低下した。これは、BD Falconプレートの場合と比べて、正に荷電するBSAがクッションタンパク質の間により多く入り込むことによって、相互作用への影響が生じ

たためであることが示唆された。つまり, StrepTagII (STII) に対して Streptavidin (SA) の 100 倍近く強い相互作用力を有する StrepTactin (ST) では, BSA によるリガンドペプチド(STII) の配向調整 (coordination of orientation) 効果により検出感度が向上したが, 一方で STII に対する相互作用力の弱い SA は BSA の存在による立体障害の影響が大きく, 相互作用が阻害され, 検出感度が低下したと考えられた。

ペプチドの固定化形態の比較

ペプチドリガンドを含む分子の形態が親水性 PS 表面固定化後のペプチドタンパク質間相互作用検出に及ぼす影響について調査するため, クッションタンパク質をスペーサーとして挟み込む形 (PS-HII-FL-STII) と PS-tag に直接 STII を連結し, クッションタンパク質を含まない形(PS-FL-STII)のそれぞれを用いて比較検討を行った (Fig. 6)。

その結果, クッションタンパク質を介してペプチドリガンドを固定化した場合, STII-ST 間, および STII-SA 間相互作用は前述の通り, それぞれ解離定数に応じた感度で検出できた。それに比べて, クッションタンパク質を含まない形でペプチドリガンドを固定化した場合, STII-ST 間相互作用は感度の低下はみられたが検出は可能であった。しかし, 相互作用力の弱い STII-SA 間相互作用の検出は不可能であった。以上, 通常では固体表面上で検出が困難な弱いペプチドタンパク質間相互作用をペプチドリガンドと固定化表面との間にクッションタンパク質を挿入することで再現できたことから, 本手法の適用により, 固体表面上に固定化したペプチドの機能を十分に利用できる可能性が示唆された。

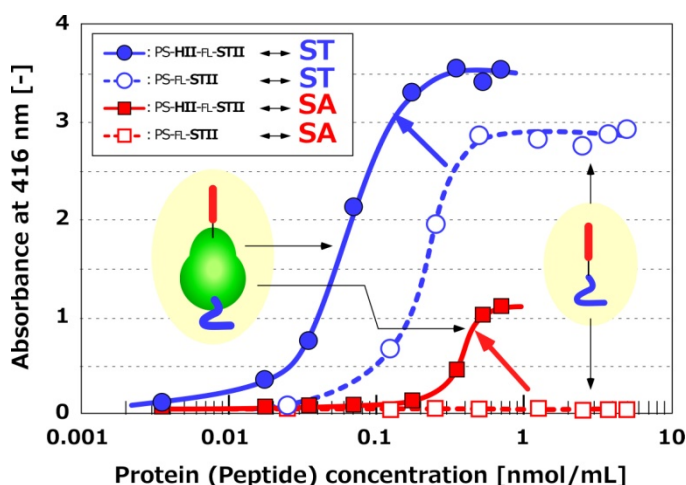


Fig. 6 ペプチドの固定化形態が検出感度に及ぼす影響

なお, クッションタンパク質を用いたペプチド固定化に関して, 親水性 PS プレートに対する表面被覆率を評価すべく MicroBCA 法による固定化量の調査を行ったところ, 密度約 $45 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ で飽和し, 計算上の表面被覆率は約 80%であった。したがって, クッションタンパク質を介した固定化法により高密度にリガンド分子を固定化できることがわかった。

おわりに

本研究で検討したクッションタンパク質を介したペプチド固定化法は、固定化対象のリガンド分子と固定化基板表面の間およびリガンド分子同士の間の距離を制御でき、基板表面との直接的な相互作用を抑制するとともに、アナライト分子との相互作用に適した配向を維持できることが強く示唆される。実際、弱い相互作用から強い相互作用にわたり非常に幅広いスペクトルの相互作用を固体表面上で再現できたことから、従来のバイオ分子間相互作用に関する問題点を克服し、バイオセンサー、生体材料、ドラッグスクリーニングなどの技術開発に適用できる有用な技術と考えられる。

謝辞

本研究を助成して頂きました財団法人サッポロ生物科学振興財団に深く感謝いたします。また、当研究を遂行するにあたり、様々な実験に取り組んでいただいた研究室の学生諸氏に御礼申し上げます。

引用文献

- [1] Nakanishi K., T. Sakiyama, Y. Kumada, K. Imamura, and H. Imanaka, *Current Proteomics*, 5(3), 161-175 (2008)
- [2] Kumada, Y., Y. Tokunaga, H. Imanaka, K. Imamura, T. Sakiyama, S. Katoh, and K. Nakanishi, *Biotechnol. Prog.*, 22(2), 401-5 (2006)
- [3] Mukaiyama, A., K. Takano, M. Haruki, M. Morikawa, and S. Kanaya, *Biochemistry*, 43, 13859-66 (2004)