

表面赤外分光法を用いた抗原抗体反応の非標識検出： 二次構造解析による特異・非特異信号の識別

平野愛弓^{1,*}・小野寺恒太¹・宮本浩一郎²・片岡正俊³

篠原康雄⁴・木村康男¹・庭野道夫¹

¹東北大学電気通信研究所 ☎ 980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2-1-1

²東北大学大学院工学研究科 ☎ 980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-05

³産業技術総合研究所四国センター ☎ 761-0395 香川県高松市林町 2217-14

⁴徳島大学ゲノム機能研究センター ☎ 770-8503 徳島県徳島市蔵本町 3-18-15

(2008 年 6 月 2 日受理)

Surface Infrared Spectroscopic Study on Label-Free Detection of Antigen-Antibody Interactions : Discrimination between Specific and Nonspecific Signals using Protein Secondary Structure Analysis

Ayumi HIRANO-IWATA^{1,*}, Kota ONODERA¹, Ko-ichiro MIYAMOTO², Masatoshi KATAOKA³,
Yasuo SHINOHARA⁴, Yasuo KIMURA¹ and Michio NIWANO¹

¹Laboratory for Nanoelectronics and Spintronics, Research Institute of Electrical Communication, Tohoku University,
2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8577

²Department of Electronic Engineering, Tohoku University, 6-6-05 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8579

³National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 2217-14 Hayashi-cho, Takamatsu, Kagawa 761-0395

⁴Institute for Genome Research, University of Tokushima, 3 Kuramoto-cho, Tokushima 770-8503

(Received June 2, 2008)

This paper reviews our recent approaches for a label-free detection of protein-protein interactions which can perform simultaneous protein conformational analysis by using infrared absorption spectroscopy in the multiple internal reflection geometry (MIR-IRAS). Using this method, the target protein was detected in aqueous solution phase based on the peak height of the protein amide I and amide II bands, while discrimination of specific and nonspecific signals is made based on the secondary structure of the target protein. An antigen-antibody interaction on semiconductor surfaces was investigated as a model system, since it is well-known that antibodies largely consist of β -sheet structures. The features of our approach using MIR-IRAS combined with protein secondary structure analysis were discussed in terms of sensitivity, capability of quantitative analysis, and specific/nonspecific discrimination.

KEYWORDS : surface infrared spectroscopy, protein-protein interaction, nonspecific adsorption, secondary structure analysis, semiconductor surfaces

1. は じ め に

タンパク質-タンパク質相互作用の迅速な検出は、プロテオミクスや創薬等のために近年ますます注目を集めている¹⁾。従来の方法としては、Yeast two-hybrid 法²⁾やプロテインチップ^{1,3)}があげられるが、これらの方法は、

* 現所属 : ☎ 980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6 東北大学大学院医工学研究科

E-mail : ahirano@bme.tohoku.ac.jp

ハイブリッドタンパク質の形成やタンパク質の標識に基づいており、標識化によりタンパク質の活性が損なわれる危険性もある。この問題は、特に分子量の小さいタンパク質やペプチドを対象とする場合には深刻であり、標識を行わずにタンパク質間相互作用を検出する方法の開発が望まれている³⁾。一方、表面プラズモン共鳴法や電気化学的検出法を用いたタンパク質間相互作用の非標識検出も報告されている³⁾。これらの方法は非常に高感度であるが、非特異的に吸着したタンパク質と測定対象タンパク質との識別は容易ではない。臨床分析におけるタンパク質の分析では試料として血清や血漿が用いられることが多く、大過剰の夾雑タンパク質の存在下で目的タンパク質のみを検出・定量する必要がある。しかし、タンパク質の非特異的吸着を除去することは難しく、タンパク質測定における大きな問題となっている⁴⁾。

一方、赤外吸収分光法は、タンパク質間相互作用を非標識に検出できるだけでなく、対象タンパク質の二次構造をも同時に解析可能な検出法であり、その対象はタンパク質の分子量によらず広く適用できる。 α -ヘリックスや β -シートといったタンパク質の二次構造を解析する手法として、赤外吸収分光法は優れた方法の一つであり、溶液中のタンパク質や吸着したタンパク質の二次構造の解析に多用されてきた⁵⁻⁸⁾。タンパク質に特有の吸収帯の中でも、二次構造解析に特によく用いられるのは波数領域 $1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ のアミド I バンドである⁹⁾。この吸収帯は、主としてアミド基の C=O 伸縮振動に由来するものであり、C=O 基が関与する水素結合の種類によって C=O 伸縮振動の周波数が変動することが知られている。したがって、C=O 伸縮振動のピーク位置を解析することにより、タンパク質の二次構造について調べることができる。

従来のタンパク質の赤外吸収分光法では、感度が低いという問題と、水 (H_2O) による吸収スペクトルの妨害という二つの問題点が指摘されてきた。水の吸収は、アミド I 領域と重なっており、タンパク質の二次構造解析においては、 H_2O の代わりに D_2O を用いることがよく行われている^{10, 11)}。近年は、短い光路長のセルを用いることにより水の吸収を定量的に差し引くことが可能になったが、そのためには $6\sim 10\text{ }\mu\text{m}$ 程度の薄いセルを用いて高濃度の試料を測定する必要があった^{6, 12)}。一方、我々は、多重内部反射型赤外吸収分光法 (MIR-IRAS) を用いることにより、 H_2O 溶液中において高感度かつ非標識にタンパク質間相互作用を検出できることを見出している¹³⁾。MIR-IRAS においては、多重回の内部反射による高感度化と同時に、表面に局在したエバネッセント場の利用による水の妨害の抑制が可能である。本稿で

は、MIR-IRAS に基づく本手法を、タンパク質の二次構造解析と組み合わせることにより、特異・非特異結合間の識別も可能な非標識検出法へと発展させた我々のアプローチ¹⁴⁾について紹介する。本研究では、タンパク質間相互作用の典型例として抗原抗体反応を選び、GaAs 基板上に固定化した抗原分子と、抗体 (抗血清中) との反応を水溶液中で追跡した。本手法について、タンパク質の固定化表面の設計、検出感度、定量性、特異・非特異信号の識別能等の観点から議論する。

2. 実験方法

2.1 試料調製

非ドープの GaAs ウェハ ($\geq 5.0 \times 10^7\text{ }\Omega\text{ cm}$) を $30 \times 10 \times 0.625\text{ mm}$ サイズに切り出し、短辺の両端を 45° に研磨した (Fig. 1a)。この GaAs プリズムを 50% 硫酸によって洗浄し、厚さ約 20 nm の SiO_2 層をスパッタリングによって積層した。UV 光を照射した後、このプリズムを 0.1% の 3-mercaptopropyl trimethoxysilane (MPTMS) 溶液に浸漬し、表面に SH 基を導入した。直ちに、20 アミノ酸 (QAFYMVGSIEEAVEEAKKLC) からなる抗原ペプチドの水溶液と反応させ、抗原の固定化を行った (Fig. 2a)。さらに、タンパク質の非特異的吸着を抑制するため、ブロッッキング剤 (PLURONIC®F-127) による表面処理を行った。同様の手順により、抗原を固定化していない GaAs プリズムも作成した (Fig. 2b)。

抗体試料としては、抗原ペプチドをニュージーランド白ウサギに注射して調整した抗血清を用いた。抗原を固定化したプリズムおよび固定化していないプリズムについて、抗血清に対する応答を比較した。

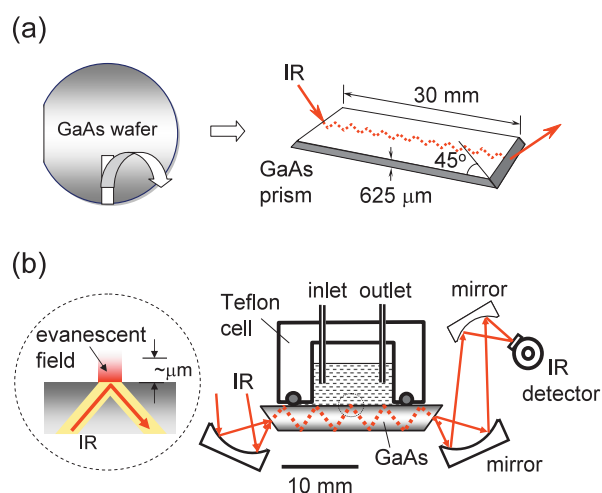


Fig. 1. (color online). GaAs prism (a) and solution cell (b) used for MIR-IRAS measurements.

2.2 MIR-IRAS 測定

測定は、BOMEM 社製フーリエ変換赤外干渉計 MB-100 を用いて行った。実験に用いた我々の測定系を Fig. 1b に示す。測定系は溶液セルと GaAs プリズムから成り、赤外光は、GaAs プリズムの一方の端面から入射し、プリズム内を多重内部反射してもう一方の端面まで伝播する。出射光は、液体窒素で冷却した HgCdTe (MCT) 検出器へと導かれる。測定はシングルビームモードで行い、スキャン回数は各スペクトル当たり 400 回、分解能は 4 cm^{-1} であった。試料室内は、水蒸気と二酸化炭素ガスを除去した空気で満たした。対象タンパク質のスペクトルは、観測されたスペクトルから、水蒸気のスペクトルを差し引いて求めた。GaAs プリズムに吸着したタンパク質の二次構造解析は、タンパク質のスペクトルの二次微分を算出することによって行った。

2.3 Enhanced Chemiluminescence (ECL) 測定

抗原ペプチドの固定化と、プリズム上での抗原抗体反応の確認は、市販の ECL 測定キット (アマシャム) を用いて行った。測定用バッファ (0.05% v/v PLURONIC® F-127, 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.0), 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween® 20) で 1000 倍に希釈した抗血清を抗原固定化プリズムと反応させた後、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) で標識した抗 immunoglobulin G (IgG) 抗体と反応させた。測定用バッファにてよく洗浄した後、ECL Western blotting 検出試薬と反応させ、暗所にて X 線フィルムを 1 分間感光させた。プリズム上で抗原抗体反応が進行した場合は、HRP 標識抗 IgG 抗体がプリズムに結合し、ECL 検出試薬中のルミノールおよび過酸化水素との化学発光反応が進行

する。その発光を X 線フィルムの感光として検出し、ECL 信号とした。

3. GaAs 基板への抗原の固定化

タンパク質-タンパク質相互作用の高感度検出のためには、自身による赤外光吸収ができるだけ低いプリズム表面上にタンパク質を効率よく固定化することが望ましい。我々は、GaAs プリズム、Si プリズム、約 20 nm の SiO_2 層を積層した GaAs プリズムについて、抗原ペプチドの固定化効率と赤外透過強度について検討を行った。ペプチドの固定化については、シランカップリング剤の MPTMS と反応させることによりプリズム表面に SH 基を導入し、さらに末端にシステイン基をもつペプチドを反応させることにより、S-S 結合を介して固定化する方法を取った。後述の二次構造解析では C=O 伸縮振動のピーク位置の解析を行うが、この固定化法では C=O 基を介さないため、二次構造解析に影響を与えないと期待される。Fig. 3 に各プリズムの赤外透過強度スペクトルと、ECL によって調べたペプチド固定化効率について示す。Si 表面においては、タンパク質の固定化法も確立しており、ペプチドの修飾に基づく強い ECL 信号が観測された。しかし、Fig. 3a のスペクトルが示すように、 1500 cm^{-1} 以下の波数領域では Si の格子吸収や自由キャリアの吸収により赤外光がほとんど透過しない。 1500 cm^{-1} 以下の波数領域には、タンパク質のアミド II バンド ($1600\sim 1480\text{ cm}^{-1}$) があり、また、アミノ酸の側鎖によっては $1480\sim 1350\text{ cm}^{-1}$ 領域に吸収をもつため、高感度検出のための基板としては不向きである。

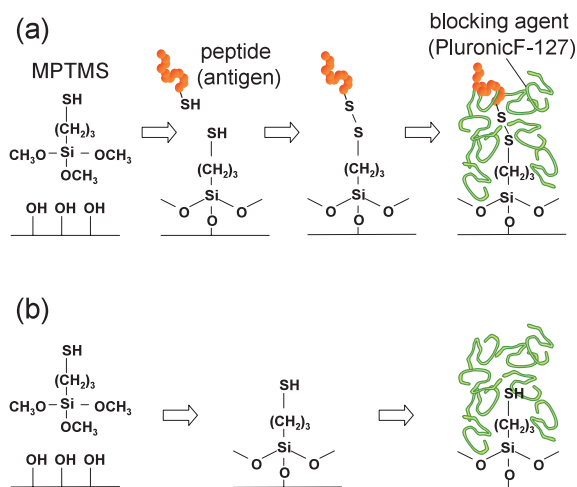


Fig. 2. (color online). Procedures for preparation of (a) antigen-immobilized and (b) antigen-unimmobilized prisms.

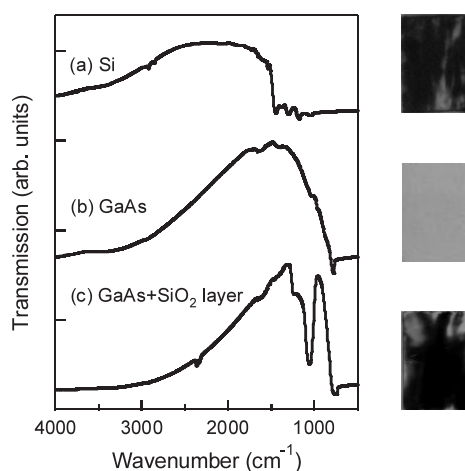


Fig. 3. (Left) Internal reflection spectra in the mid-infrared region. (a) Si, (b) GaAs, and (c) GaAs with a SiO_2 layer. (Right) ECL signals for the antigen-immobilized prisms. (top) Si, (middle) GaAs, and (bottom) GaAs with a SiO_2 layer.

GaAs プリズムは広い波数領域において赤外光をよく透過させる (Fig. 3b)。しかし、ペプチドの固定化効率率は低く、固定化に伴う ECL 信号は全く検出できなかった。一方、 SiO_2 を積層した GaAs プリズムではペプチドの固

定化が進行し、Si プリズムと同程度の ECL 信号強度が観測された。このプリズムでは、 1500 cm^{-1} 以下を含む広い波数範囲で十分な透過光強度を示した (Fig. 3c)。 1240 cm^{-1} と 1055 cm^{-1} 付近には、それぞれ SiO_2 の LO, TO フォノンモードに由来する大きな吸収¹⁵⁾が観測されたが、この吸収はタンパク質の主要な吸収ピークとは重ならないため、我々は、 SiO_2 を積層した GaAs をセンシング基板として用いることにした。

このようにしてペプチドを固定化した GaAs プリズムの MIR-IRAS スペクトルを Fig. 4a に示す。抗原を固定化したプリズムでは、アミド I およびアミド II バンドに相当する 1657 cm^{-1} と 1523 cm^{-1} に強い吸収ピークが観測された。これらのピークは、主としてポリペプチド鎖の C=O 伸縮振動 (アミド I)、N-H 面内変角振動と C-N 伸縮振動 (アミド II) に由来する¹⁶⁾。一方、抗原を固定化しなかった GaAs プリズムのスペクトルでは、残留水分によると考えられる弱い吸収が 1657 cm^{-1} 付近に観測されたのみである。以上のことから、 SiO_2 を積層した GaAs プリズムでは、検出に十分な量の抗原ペプチドが固定化されることが MIR-IRAS 測定からも確認された。

4. 抗原-抗体反応の検出と特異・非特異信号の識別

抗原-抗体の組み合わせとしては、 F_0F_1 -ATP 合成酵素の β -サブユニットの 442~460 番目のアミノ酸配列からなる 19 アミノ酸にシステインを導入した合成ペプチドと、そのペプチドをウサギに注射して調製した抗血清を用いた。このようにして調製した抗血清は、対象となる抗体 (IgG) のみならず、種々のタンパク質を含有している。夾雑タンパク質の存在下で対象の IgG のみを検出する必要があるが、ブロッキング剤を用いても非特異吸着を抑制することは難しく、検出器の側で特異的信号と非特異的信号とを識別できる方法の開発が望まれている。我々は、上述の抗原を固定化した GaAs プリズムを用いて、抗血清中での抗体の非標識検出を行い、同時にタンパク質の二次構造解析による特異・非特異信号の識別を試みた。

抗原を固定化したプリズムと抗原を固定化していないプリズムに対して抗血清を添加した時の MIR-IRAS スペクトルを Fig. 4b に示す。参照スペクトルとしては、抗血清を添加する前のスペクトルを用いている。抗原を固定化したプリズムの場合は、タンパク質に特徴的な吸収バンドであるアミド I (1639 cm^{-1}) とアミド II (1548 cm^{-1}) 領域に大きな吸収が観測された。一方、抗原を固定化していないプリズムにおいても、アミド I、アミ

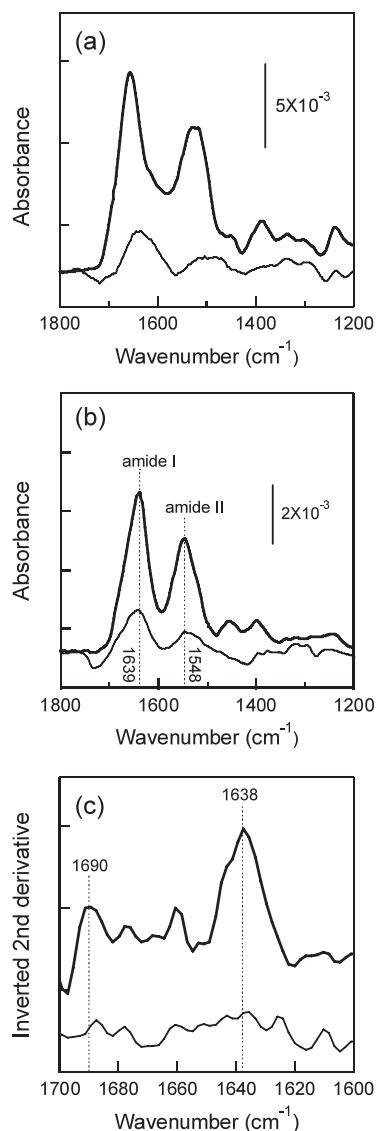


Fig. 4. Infrared absorption spectra for the antigen-immobilized (thick line) and antigen-unimmobilized (thin line) prisms. (a) Spectra collected in air before treated with PLURONIC® F-127. The references were the spectra measured before the reaction with MPTMS. (b) Spectra 1h after reaction with the antiserum. The spectra were recorded in the reaction buffer (0.05% v/v PLURONIC® F-127, 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.0), 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween® 20). References were the spectra measured before addition of the antiserum. (c) Inverted second-derivatives of panel (b). Concentration of the antiserum was a 1 : 1000 dilution. All the spectra were obtained using GaAs prisms with a SiO_2 layer.

ドII領域にスペクトル強度の増大が見られたが、その変化量は抗原を固定化したプリズムに比べて著しく小さかった。反応後のプリズムをHRP標識した抗IgG抗体(二次抗体)と反応させ、二次抗体の結合量をECL法で調べた結果、抗原を固定化したプリズムでは強いECL信号が観測された。一方、抗原を固定化していないプリズムにおいても、弱いながらもECL信号が観測された。これらの結果は、抗原を固定化したプリズムでは、抗血清中のIgGがプリズム上の抗原と結合し、一方、抗原を固定化していないプリズムにおいても、抗血清中に含まれる夾雑タンパク質が非特異的にプリズム表面上に吸着したことを示している。

次に、プリズムに結合したタンパク質の二次構造解析を行い、二次構造に基づいて特異的結合と非特異的結合との分離を試みた。二次構造解析は、Fig. 4bのスペクトルのアミドI領域の二次微分を算出し、そのピーク位置を解析することによって行った。その結果、Fig. 4cに示すように、抗原を固定化したプリズムでは、二次微分スペクトルは β -シート構造に特有の 1638 cm^{-1} 、 1690 cm^{-1} 付近のピーク^{5,7,8,10,17})を示した。抗体IgGはその大部分が β -シート構造から成ることが知られており¹⁸、本結果はこれとよく一致している。一方、抗原を固定化していないプリズムの場合は、二次微分スペクトルにはピークは見られず、特定の二次構造を示さなかった。これらの結果は、主として β -シート構造から成るIgGは、 β -シートに特有の吸収ピークを示すこと、また、非特異吸着したタンパク質も弱い吸収ピークを示すが、この信号は二次構造解析によって特異的信号との識別が可能であることを示唆している。以上の結果は、赤外吸収分光法に基づく本法は、特異・非特異信号の識別が可能なタンパク質間相互作用の非標識検出法として有用であることを示している。

さらに、MIR-IRASに基づく本法の定量性について評価を行い、抗体の濃度依存性について検討した。Fig. 5aに、アミドIおよびアミドIIバンドのピーク強度を抗体濃度に対してプロットした結果を示す。抗体濃度は抗血清の希釈率としてしかわからないため、横軸の抗体濃度は、抗血清を1000倍に希釈したときの濃度を1とし、これに対する相対値として表している。ここでプロットしたアミドIのピーク(1639 cm^{-1})は、二次微分スペクトルにおいて β -シート構造に特有なものとして現れたピークと同じ位置にある。アミドI、アミドIIバンドのピーク強度は、ともに抗体濃度に依存して直線的に増大した。その検出下限($S/N=3$)は、アミドIで希釈率36000倍、アミドIIで希釈率16000倍であり、従来のウェスタンブロットやEnzyme-Linked Immunosorbent As-

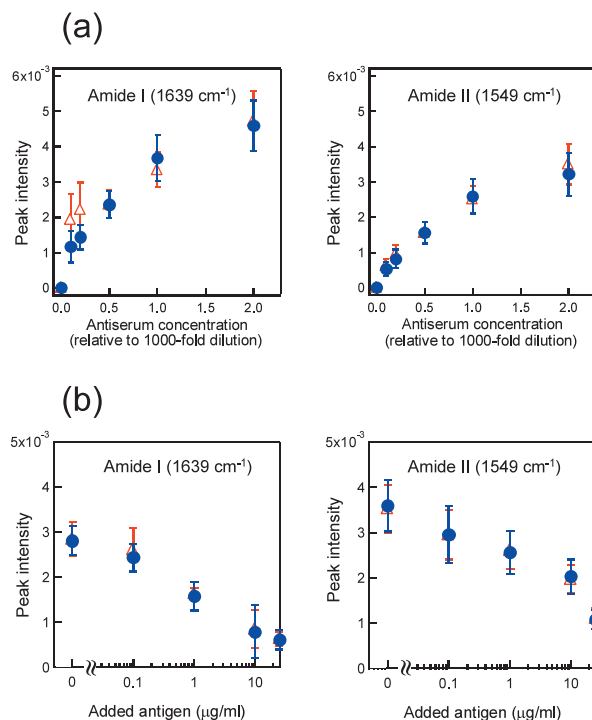


Fig. 5. (color online). (a) Antiserum concentration dependence on peak intensity at 1639 cm^{-1} and 1549 cm^{-1} ($n=4$). (b) Competition curves obtained by adding the antigen peptide to the antiserum at given concentrations ($n=3$). Peak intensity at 1639 cm^{-1} and 1549 cm^{-1} is plotted. Antiserum concentration was a 1 : 1000 dilution. Values are mean $\pm$ SEM. All the spectra were obtained using GaAs prisms with a SiO_2 layer. Peak intensity 30 min after the addition of antiserum (open triangle) and that after washing out of the antiserum (solid circle) is shown.

say (ELISA) 法と比べて^{19,20}) 同等以上の高感度検出を達成した。また、観測されたアミドI、アミドIIのピーク強度は洗浄の前後で変わらず、表面に高感度なMIR-IRASを検出に用いることにより^{21,22})、溶液バルク中に共存する抗体に影響を受けることなく、プリズム表面に結合した抗体のみを検出できることを示している。この結果は、本手法を用いることにより、洗浄を必要としない迅速なタンパク質検出が可能となることを示している。

さらに、あらかじめ一定濃度の抗原と反応させた抗血清を試料として、抗原固定化プリズムと反応させて競合実験を行った。その結果、加えた抗原の濃度の増大とともに、アミドIおよびアミドIIバンドのピーク強度が減少し、Fig. 5bに示すような競合カーブが得られた。この結果は、観測された赤外吸収ピークが、抗血清中の夾雑タンパク質の存在下においても、対象の抗原抗体反応に依存した信号となっていることを示している。また、

センシングの観点からは、競合反応系を用いることにより、抗原濃度の評価も可能であることを示唆している。

5. ま と め

MIR-IRAS による検出と二次微分スペクトルに基づく二次構造解析とを組み合わせることにより、対象タンパク質の二次構造に基づいて特異・非特異結合との識別ができる新しい非標識検出法について提案した。本手法では、アミド I およびアミド II バンドのピーク強度に基づいて対象タンパク質の濃度の定量ができ、一方、アミド I 領域の二次微分スペクトルを解析することにより特異・非特異信号の識別が可能となる。本研究では、タンパク質間相互作用の例として、 β -シート構造をもつ代表的タンパク質である抗体とその特異的抗原との反応を取り上げたが、現在その開発が精力的に行われているプロテインチップにおいては、検出反応として主に抗原抗体反応が用いられており、本手法の適用範囲は広い。また、赤外分光法に基づく二次構造解析については、近年、数学的な解析手法がますます発展しており、最新の解析法を取り入れることにより、未知のタンパク質をも含む様々なタンパク質を対象とした検出法としての発展が期待される。

謝 辞

本研究は、文部科学省科学研究費補助金基盤研究(A) (研究代表者：庭野道夫，課題番号 17206004) の支援を得て行われた。

文 献

- 1) H. Zhu and M. Snyder : *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 55 (2003).
- 2) S. Fields and O.-K. Song : *Nature* **340**, 245 (1989).
- 3) X. Yu, D. Xu and Q. Cheng : *Proteomics* **6**, 5493 (2006).
- 4) S. Spisak, Z. Tulassay, B. Molnar and A. Guttman : *Electrophoresis* **28**, 4261 (2007).
- 5) D.M. Byler and H. Susi : *Biopolymers* **25**, 469 (1986).
- 6) A. Dong, P. Huang and W.S. Caughey : *Biochemistry* **29**, 3303 (1990).
- 7) C.E. Giacomelli, M.G.E.G. Bremer and W. Norde : *J. Colloid Interface Sci.* **220**, 13 (1999).
- 8) J. Buijs, W. Norde and J.W. Th. Lichtenbelt : *Langmuir* **12**, 1605 (1996).
- 9) W.K. Surewicz, H.H. Mantsch and D. Chapman : *Biochemistry* **32**, 389 (1993).
- 10) H. Susi and M. Byler : *Methods Enzymol.* **130**, 290 (1986).
- 11) J. Zhang and Y.-B. Yan : *Anal. Biochem.* **340**, 89 (2005).
- 12) K. Rahmelow and W. Hübner : *Anal. Biochem.* **241**, 5 (1996).
- 13) A. Hirano, K. Onodera, K. Miyamoto, Y. Kimura, M. Kataoka, Y. Shinohara and M. Niwano : *Sensor Lett. in press*.
- 14) K. Onodera, A. Hirano-Iwata, K. Miyamoto, Y. Kimura, M. Kataoka, Y. Shinohara and M. Niwano : *Langmuir* **23**, 12287 (2007).
- 15) K.T. Queeney, H. Fukidome, E.E. Chaban and Y.J. Chabal : *J. Phys. Chem. B* **105**, 3903 (2001).
- 16) G. Socrates : "Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies, Tables and Charts" (John Wiley & Sons, LTD, West Sussex, 2001) p. 334.
- 17) F.-N. Fu, D.B. DeOliveira, W.R. Trumble, H.K. Sarkar and B.R. Singh : *Appl. Spectrosc.* **48**, 1432 (1994).
- 18) E.A. Padlan : *Mol. Immunol.* **31**, 169 (1994).
- 19) R. Kaur, K.L. Dikshit and M. Raje : *J. Histochem. Cytochem.* **50**, 863 (2002).
- 20) E. Majima, K. Ikawa, M. Takeda, M. Hashimoto, Y. Shinohara and H. Terada : *J. Biol. Chem.* **270**, 29548 (1995).
- 21) N.J. Harrick : "Internal Reflection Spectroscopy" (Harrick Scientific Corporation, Ossining, New York, 1987).
- 22) F.M. Mirabella Jr. and N.J. Harrick : "Internal Reflection Spectroscopy : Review and Supplement" (Harrick Scientific Corporation, Ossining, New York, 1985).