

低周波交流電界印加による タンパク質固定のリアルタイム解析 高橋 俊介*, 侭田 陽平**, 岸 一希**. 平賀 諒太**, 大重 真彦**.***, 桂 進司**.***.1 (2021年9月21日受付: 2021年11月29日受理) Real-time Analysis of Protein Immobilization Process by Applying Low-frequency AC Electric Field Shunsuke TAKAHASHI*, Youhei MAMADA**, Kazuki KISHI**, Ryota HIRAGA**, Masahiko OSHIGE**.*** and Shinii KATSURA**.***.1

(Received September 21, 2021; Accepted November 29, 2021)

Here, we report the development of real-time monitoring system for protein immobilization, based on a Quartz Crystal Microbalance (QCM) device. In our previous report, the protein immobilization was significantly promoted by application of low frequency AC electric field, however the dynamic process of protein immobilization has not been elucidated sufficiently. To analyze the process of protein immobilization, the modification processes of the QCM surface were analyzed in real time. In measurements of immobilization process of His-DsRed and His-GFP by applying a low-frequency AC electric field, the maximum immobilization amount of protein was obtained by applying the 80 Vpp at 20 Hz. As a result of these measurements, we demonstrate that His-DsRed and His-GFP were sufficiently immobilized by applying the low-frequency AC electric field for first 300 and 400 sec.

1. はじめに

固相表面へのタンパク質の固定化は、タンパク質アレ イやバイオセンサなどの生体分子計測技術の重要な要素 となっている.これらの生体分子計測技術では、固相表 面に固定化されているタンパク質と試料中の目的物質と の相互作用が検出されている.高感度かつ広いダイナミ ックレンジの測定を可能にするためには、活性が保たれ ているタンパク質の固相表面の固定化量を増やす必要が ある¹¹.この目標を達成するためには、固相表面へのタン

キーワード:表面処理, QCM, タンパク質固定, 移動現象 * 東京電機大学理工学部理工学科生命科学系 (〒350-0394 埼玉県比企郡鳩山町石坂) Division of Life Science, School of Science and Engineering, Tokyo Denki University, Hatoyama, Hikigun, Saitama 350-0394, Japan

** 群馬大学大学院理工学府環境創生部門 (〒376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1) Department of Environmental Engineering Science, Graduate School of Science and Technology, Gunma University, 1-5-1 Tenjin-cho, Kiryu-shi, Gunma 376-8515, Japan

** 群馬大学食健康科学教育研究センター Gunma University Center for Food Science and Wellness ' katsura@gunma-u.ac.jp

DOI: https://doi.org/10.34342/iesj.2022.46.1.14

パク質の固定化量を増やす必要がある.これまでのタン パク質固定技術では、標的のタンパク質は物理吸着や化 学吸着(共有結合や架橋)によって固定化されてきた²⁵⁾. これらの固定化技術によって、タンパク質の固定化量を 増加することができるが、固相表面にタンパク質の溶液 を滴下することで実施されているため、滴下されたタン パク質は配向性が制御されずに固定化されてしまう.そ の際、固相表面に対してタンパク質の活性部位が固定化 されてしまうと、その結合活性が失われてしまうことか ら、標的分子と相互作用するタンパク質の分子数が減っ てしまい、高い検出感度が得られない原因の1つとなっ ている.したがって、タンパク質固定化技術を生体分子 計測技術として適用するためには、固定化タンパク質の 活性を維持するため、配向性を制御しながら、タンパク 質を固相表面に効率的に固定化することが重要である⁶⁷.

これまで筆者らは、固相表面へのタンパク質の配向性を 制御する技術として、Ni-NTA(nickel-nitrilotriacetic acid) 修飾基板とHis タグ(6個程度の連続するヒスチジン残基 からなるペプチド)融合タンパク質間の特異的結合に基づ いたタンパク質固定化技術を開発してきた^{&,9)}. このタン パク質固定化技術を用いることにより、標的タンパク質 に融合させたHis タグとNi-NTA との特異的な結合によ って、配向性を制御した状態での標的タンパク質の固定



図1 低周波交流電界によるタンパク質分子の輸送モデル Fig.1 A immobilization model combining electrostatic transport and subsequent molecular diffusion of protein molecules.

化が可能となった.しかし、タンパク質などの生体高分 子では拡散係数が小さいために単なる分子拡散では固相 表面への分子輸送速度が低くなり、固定化には長時間の 静置が必要となる、これらの問題を解決するために、静 電輸送とそれに伴うタンパク質の分子拡散を組合せた新 たなタンパク質の固定化技術を開発した¹⁰⁾.この技術の モデルを以下に示す. 低周波交流電界の印加によってタ ンパク質分子にクーロン力を働かせることで、タンパク 質分子はその極性により基板表面またはその対極に引き 寄せられる、その後、極性が反転すると、タンパク質溶 液に対して高い濃度勾配が形成される。これよりタンパ ク質分子の拡散速度が増大するため、分子拡散によって タンパク質が速やかに基板表面側に移動する. その後, もう一度、極性が反転すると、タンパク質が金基板側に 引き寄せられる際に、タンパク質が輸送・固定化される. このサイクルを繰り返すことで、タンパク質の固定化量 の増加が可能となる(図1)10. モデルタンパク質として, His タグ融合 Discosoma sp. Red Fluorescent Protein (His-DsRed; EX:558 nm, EM:583 nm)とHis タグ融合 Green Fluorescence Protein (His-GFP; EX: 505 nm, EM: 511 nm)を用いて、タンパク質の固定化量を評価した結果、 20 Hz, 80 Vpp の低周波交流電圧の印加によって最大の タンパク質固定化量が得られること,その最大固定化量 は、交流電界の非印加時の固定化量よりも7倍程度高い ことが示された¹⁰⁾.

以上のように、筆者らは低周波交流電界の印加による タンパク質の固定化技術の開発を進めてきたが、その固 定化プロセスの詳細はいまだに不明なままである。そこ で、本研究では、ng オーダーの質量変化の解析が可能 な水晶振動子マイクロバランス(QCM:Quartz Crystal Microbalance)を用いて、低周波交流電界を印加させな がら、QCM センサの金薄膜表面の表面処理やタンパク 質固定化のリアルタイム計測技術を開発し、タンパク質 固定化プロセスの詳細を明らかにした。

2. 実験方法・手順

2.1 His-DsRed及びHis-GFPの調製

His-DsRed と His-GFP は既往の研究に従い調製した¹⁰. 得られた His-DsRed と His-GFP の濃度は,ウシ血清アル ブミン (BSA; Bio-Rad, 500-0206)を標品としてタン パク質アッセイキット (Bio-Rad, 500-0205)を用いて, Bradford 法¹¹⁾ に従って決定した.

2.2 QCMセンサの金薄膜表面への修飾処理

QCM センサは水晶振動子表面に付着した物質により 発振周波数が減少する性質を利用するセンサであり、 Sauerbrey 式に従って周波数の減少値は付着する物質量 に比例する¹²⁾. His-DsRed 及び His-GFP を固定化するた めの前処理として,QCM センサ(サンライズ工業株式 会社 QBS-01, \$2.6 mm, 検出感度 53 pg/-1Hz)の金薄膜 表面の表面処理を行った.まず QCM センサの金薄膜表 面を洗浄するため、1Nの濃硝酸(ナカライテスク、 24412-25)の溶液に室温で1時間浸漬した.その後,金 薄膜表面を脱イオン蒸留水で洗浄し, 窒素ガス下で乾燥 させた.QCM センサを発振回路へと接続し、その発振 周波数を周波数カウンターにより記録した. QCM セン サの金薄膜表面への修飾として,金と結合を形成するチ オール基を持つ 3-Mercaptopropionic Acid (MPA;東京化 成工業, M0061)を用いた. QCM センサの金薄膜表面 に MPA を電着させるため、電圧印加装置の正極側に高 周波チョークコイル(RFC, 39 mH)を介して QCM セ ンサを接続し、陰極側に金箔基板を接続した、そして、 0.3 Mの MPA 溶液中に QCM センサの金薄膜表面を浸漬 した後、1.5 Vの直流電圧で MPA を電着させながら、発 振周波数を測定した. 電着した MPA のカルボキシル基 とニッケルイオンとの錯体を形成させることで、His タ グ融合タンパク質への特異的な結合部位を形成すること が可能となる. このため, 0.15 M の塩化ニッケル水溶 液(和光純薬工業,148-01055)に対して,QCM センサ の MPA 修飾表面を 37℃で1 晩浸漬した.

2.3 低周波交流電界印加によるHisタグ融合タンパク質 の固定化

ファンクションジェネレーター (AS ONE, 33210A) に よって周波数と電圧を調節し、高電圧アンプ(NF回路ブ ロック,4005)を用いて、印加電圧を増幅した.この高電 圧アンプに OCM センサを接続させ、1 cm の電極間距離で 接地側にアルミ板を接続させた(図2). そして, QCM セ ンサの MPA 修飾基板を 70 µg/mL の His-GFP 及び His-DaRed 溶液中で浸漬させた後、次の2つの条件下で電界 を印加した. 第一の条件として, 印加低周波の周波数の条 件を最適化するために、0,10,20,50 Hzの各周波数に 設定し,80 Vppに固定した電圧を10分間印加した.第二 の条件として、印加電圧条件を最適化するために、20 Hz の周波数に設定し、0, 20, 40, 60, 80 Vppの各電圧を10 分間印加した、印加した電圧の波形は、プローブを介して Pico Scope (Pico Technology, 4424) により計測した. また, 発振回路に QCM センサを接続し、その発振周波数を周波 数カウンターによって記録することにより、各低周波交流 電圧印加条件下での修飾基板表面上へのタンパク質の固 定化における発振周波数シフトをリアルタイムで測定した (図2). 電圧を印加後、基板を脱イオン蒸留水で洗浄し、 乾燥させないように、脱イオン蒸留水で飽和している容器 内に, 37℃, 遮光状態で1時間静置した.



図2 実験装置の概要図

Fig.2 Schematic diagram of experimental equipment.

2.4 イミダゾール処理による発振周波数シフトの測定

QCM センサの修飾基板表面へのタンパク質の固定化後, その基板表面上のニッケル錯体と His-DsRed もしくは His-GFP がタンパク質タグ特異的に結合されているかを評価す るため,100 mM のイミダゾール溶液にタンパク質固定化 基板を 15分間浸漬させ,その間の発振周波数シフトを計 測した.その後,2.5節に従い蛍光観察を行った.

2.5 固定化タンパク質の蛍光観察

固定化タンパク質の観察には、対物レンズ4倍(Nikon,

OFN25/MRH00041)を装着した倒立型蛍光顕微鏡(Nikon, TE-2000U)を使用した. His-DsRedの観察には, Nikon G-2A 蛍光フィルターセット(Excitation filter: 510-560 nm, Dichoric mirror: 575 nm, Barrier filter: 590 nm), His-GFP の観察には, Nikon B-2A 蛍光フィルターセット(Excitation filter: 450-490 nm, Dichroic mirror: 505 nm, Barrier filter: 520 nm)を使用した. 撮影には顕微鏡備え付けの デジタルカメラ(Nikon, D3200)を使用し1秒間の露 光時間で撮影された. 撮影した画像は, Image J (http:// imagej.nih.gov/ij/)で解析した.

3. 結果と考察

3.1 金薄膜表面修飾のリアルタイム測定

本研究では、電圧印加装置によって、50, 200, 300 mMの MPA 溶液を OCM センサの金薄膜表面に電着さ せたときの発振周波数シフトをリアルタイムで計測した (図3). その結果, 300 mM の MPA 溶液では, 計測開始 から 60秒程度で発振周波数が-550 Hz 程度まで急激に シフトした.この発振周波数の減少は、QCM センサの 金薄膜表面に MPA 分子が急速に結合されたことを意味 している.一方.50と200 mMの MPA 溶液では.計測 開始(印加開始)から300秒間程度かけて、発振周波数 が-250 と-500 Hz 程度までシフトしたことから, MPA 分子が金薄膜表面に徐々に結合したことが示された. 50, 200, 300 mMの MPA 溶液のときの OCM センサの 金薄膜表面への MPA 分子の固定化量は、それぞれ 241、 440, 502 ng/cm² であった. これらの結果から, MPA 溶 液の濃度増加に伴い、固定化量も増加することが示され た. しかしながら, 300 mM 以上の MPA 溶液では, QCM センサの発振が不安定化し、計測できなかった.これは、 MPA 溶液の濃度の増加によって、QCM センサを構成す る水晶振動子の等価直列抵抗の値が大きくなったため に,発振が不安定になったと推察される.



図3 MPA 固定化量の経時変化と濃度依存性

Fig.3 Time course and concentration dependence of the amount of MPA immobilization.

3.2 印加低周波交流電圧を変化させたときのHisタグ 融合タンパク質固定化のリアルタイム解析

His-DsRed 及び His-GFP の固定化における,低周波交 流電界印加の効果について検討した. 低周波交流電界の 印加条件としては、20 Hzの周波数、0, 20, 40, 60, 80 Vppの印加電圧で実施した. 図4および図5は,各 印加電圧条件下での, QCM センサの発振周波数(修飾 基板表面への His-DsRed 及び His-GFP の結合量を反映) の経時変化を示す. その結果, 20 Hz, 80 Vpp の低周波 交流電圧の印加では、計測開始(印加開始)から300秒 間程度で発振周波数は-250 Hz 程度までシフトした. 一方, 20 Hzの周波数, 0, 20, 40, 60 Vppの各低周波 交流電圧を印加したとき、計測開始から600秒間経過し ても、その発振周波数は-100Hz 程度しかシフトしなか った. これらの結果, 20 Hz, 80 Vpp の低周波交流電圧 の印加によって, 最も効率的に His-DsRed 及び His-GFP が固定化されたことが示された. これらの発振周波数シ フトから His-DsRed 及び His-GFP の固定化量を算出した 結果をまとめたグラフとその固定化タンパク質の蛍光画 像を図4および図5に示す.この結果から,20Hz,80 Vpp の低周波交流電圧印加時の His-DsRed の固定化量は 154 ng/cm² であり, His-GFP の固定化量は 85.2 ng/cm² で あった. これらの His-DsRed 及び His-GFP の固定化量は, バイオセンサとして適用するために十分な量を確保して いるが, His-DsRed と His-GFP との固定化量で 2倍程度 の差が生じた. この固定化量の差は, GFP のN 末端に 融合された His タグタンパク質が GFP の構造の表面に 近接して配置され, その His タグタンパク質と QCM セ ンサの修飾基板表面のニッケル錯体との結合が阻害され たことによるものと考えられる.

3.3 印加低周波の各周波数におけるHisタグ融合タン パク質固定化のリアルタイム解析

3.2項の結果を受けて、次に、印加低周波の周波数を 変化させたときの His-DsRed 及び His-GFP の固定化をリ アルタイムで計測した. その低周波交流電界の印加条件 は、0、10、20、50 Hz の周波数、80 Vpp の印加電圧で 実施した. 図 6 と図 7 は、各低周波交流電界の印加条件 下での、QCM センサの発振周波数(修飾基板表面への His-DsRed 及び His-GFP の結合量を反映)の経時変化を 示す. その結果、20 Hz、80 Vpp の低周波交流電圧の印 加条件では、計測開始(印加開始)からおおよそ 300秒 間程度で経過すると、発振周波数は – 250 Hz 程度まで シフトした. しかしながら、10 Hz、80 Vpp の低周波交 流電圧を印加した場合には、計測開始から 600秒間程度



図 4 各印加電圧における QCM 発振周波数の経時変化(His-DsRed の固定化量を反映)と最大固定化量 Fig.4 Time course of oscillation frequency shift reflecting immobilization amount of His-DsRed at each applied voltage.



図 5 各印加電圧における QCM 発振周波数の経時変化(His-GFP の固定化量を反映)と最大固定化量 Fig.5 Time course of oscillation frequency shift reflecting immobilization amount of His-GFP at each applied voltage.



図 6 印加低周波の各周波数における QCM 発振周波数の経時変化(His-DsRed の固定化量を反映)と最大固定化量 Fig.6 Time course of oscillation frequency shift reflecting immobilization amount of His-DsRed at each frequency of applied low frequency AC.



図 7 印加低周波の各周波数における QCM 発振周波数の経時変化(His-GFP の固定化量を反映)と最大固定化量 Fig.7 Time course of oscillation frequency shift reflecting immobilization amount of His-GFP at each frequency of applied low frequency AC.

経過しても、その発振周波数は-100 Hz 程度しかシフト しなかった. また, 電界未印加と 50 Hz, 80 Vpp の低周波 交流電圧の印加の条件では、計測開始から600秒間程度 経過しても、発振周波数のシフトは確認できなかった. こ れらの結果から、20 Hz, 80 Vpp の低周波交流電圧の印加 により最も効率的に His-DsRed 及び His-GFP の固定化が 促進されたことが示された. これは 20 Hz の周波数条件 下では、高い濃度勾配が形成されることで、タンパク質 の移動速度が増大し、その後、分子拡散によってタンパ ク質が基板表面に向かって輸送されたことを示唆する. 本手法では固定化は各サイクルに1回のみ生じるので、同 様な分子拡散が生じたとしても、低周波では固定化量が 少なくなることになる. これが 10 Hz 以下の印加低周波の 条件下では、20 Hz の印加低周波の条件下よりもタンパク 質の固定化量が減少した理由であると考えられる.一方 で、40 Hz 以上の印加低周波の条件下では、交流電界の 正負のサイクルが早くなるため、十分な濃度勾配が生ま れず,その結果としてタンパク質の拡散量が不十分とな り、タンパク質分子が輸送されなかったと考えられる、こ れらの QCM センサの周波数シフトから得られた His タグ 融合タンパク質の固定化量を算出した結果をまとめたグ ラフとその固定化タンパク質の蛍光画像を図6と図7に 示す. これらの結果から、20 Hz, 80 Vpp の低周波交流電 圧の印加で, His-DsRed 及び His-GFP の固定化量が最も 高かった. この得られた結果は,既往の我々の研究¹⁰ と 同様の結果が得られており,低周波交流電界印加による タンパク質輸送機構に関する仮説モデルを支持している.

3.4 固定化されたHisタグ融合タンパク質のイミダゾー ル処理による発振周波数シフトのリアルタイム解析

固定化 His-DsRed 及び His-GFP が,QCM センサの基 板表面に特異的に結合しているかを評価した.His-DsRed 及び His-GFP 固定化基板を 100 mM のイミダゾー ル溶液に 15分間浸漬させ,その際の発振周波数シフト をリアルタイムで計測した(図 8A).その結果,固定化 His-DsRed では,イミダゾール処理後,測定開始から 30 秒間以内で,発振周波数が+130 Hz程度までシフトした. 一方,固定化 His-GFP では,イミダゾール処理後,測定 開始から 800秒間程度で,発振周波数が+50 Hz 程度ま でシフトした.これらの発振周波数のシフトから His-DsRed と His-GFP の解離量を算出した結果,固定化量の 60%程度の His-DsRed 及び His-GFP が解離したことが示 された.この結果を裏付けるために,QCM センサの修 飾基板表面から解離した His-DsRed 及び His-GFP の蛍光 画像を図 8B に示す.蛍光観察の結果,イミダゾール処



図8 イミダゾール処理による固定化 His-DsRed 及び His-GFP の解離における周波数変化と画像

Fig.8 Oscillation Ffequency changes and images in dissociation of immobilized His-DsRed and His-GFP by imidazole treatment.

理後には固定化された His-DsRed 及び His-GFP の蛍光は ほとんど観察されなかった. His-DsRed や His-GFP の解 離における発振周波数シフトと蛍光観察との差は,変性 もしくは消光した His-DsRed や His-GFP が固定化されて いたことを示唆している. これらの結果から, His-DsRed や His-GFP は QCM センサの基板表面のニッケルイオン に対して特異的に結合していたことが示された. しかし ながら, イミダゾール処理では 40%程度の His-DsRed や His-GFP は修飾基板表面から解離しなかった. これは His タグと DsRed や GFP との立体障害がイミダゾール による His タグとニッケルとの結合の解離を阻害したこ とや QCM センサの基板表面への His-DsRed や His-GFP 分子の非特異的な結合によって生じた可能性がある.

4. おわりに

これまでのタンパク質固定化技術に関する研究の多く はタンパク質の固定化量を増加させることに着目してお り、タンパク質の固定化を拡散速度的側面から評価して いる研究はほとんどない、そこで本研究は、これまでの 研究では覆い隠されていたタンパク質が固定化されるま でのプロセスをリアルタイムで解析可能な実験系を開発 した、その結果、QCM センサの金薄膜表面への MPA の 修飾をリアルタイム計測による MPA 分子の最適濃度や 最大固定化量が明らかになった、さらに、20 Hz で 80 Vpp の低周波交流電圧の印加によって、His-DsRed 及び His-GFP の最大固定化量が得られるまでの時間が明らか になった、以上の結果、低周波交流電界を用いることで、 配向性を制御しながら、目的のタンパク質の固定化が可 能なことが示された.今後,本研究で開発した技術をタンパク質間相互作用の動的解析などが可能なバイオセン サの基盤技術として活用していきたい.

参考文献

- F. Rusmini, Z. Zhong and J. Feijen: Protein immobilization strategies for protein biochips. Biomacromolecules, 8 (2007) 1775
- H. Ge: UPA, a Universal Protein Array System for Quantitative Detection of Protein-Protein, Protein-DNA, Protein-RNA and Protein-Ligand Interactions. Nucleic Acid Res, 28 (2000) 28, e3
- L. J. Holt, K. Büssow, G. Walter and I. M. Tomlinson: Bypassing selection: Direct screening for antibody-antigen interactions using protein arrays. Nucleic Acids Res, 28 (2000) e72
- A. Pollak, H. Blumenfeld, M, Wax, R. L. Baughn and G. M. Whitesides: Enzyme immobilization by condensation copolymerization into crosslinked polyacrylamide gels. J. Am. Chem. Soc, **102** (1980) 6324
- D. Kim, K. Karns, S. Q. Tia, M. He and A. E. Her: Electrostatic protein immobilization using charged polyacrylamide gels and cationic detergent microfluidic western blotting. Anal. Chem, 84 (2012) 2533
- K. Bonroy, F. Frederix, G. Reekmans, E. Dewolf, R. De Palma, G. Borghs, P. Declerck and B, Goddeeris: Comparison of random and oriented immobilisation of antibody fragments on mixed self-assembled monolayers. J. Immunol. Methods, **312** (2006) 167
- Z. Pei, H., Anderson, A. Myrskog, G. Dunér, B, Ingemarsson and T. Aastrup: Optimizing immobilization on twodimensional carboxyl surface: PH dependence of antibody orientation and antigen binding capacity. Anal. Biochem, **398** (2010) 161
- M. Oshige, K. Yumoto, H. Miyata, S. Takahashi, M. Nakada, K. Ito, M. Tamegai, H. Kawaura and S. Katsura: Immobilization of His-tagged proteins on various solid surfaces using NTA-modified chitosan. Open J. Polym. Chem, 3 (2013) 6
- 9) H. Miyata, K. Yumoto,K. Itoh, M. Sasahara, H. Kawaura, N. Oshima, T. Suzuki, S. Takahashi, M. Oshige and S. Katsura: S. Immobilization of His-Tagged Proteins through Interaction with L-Cysteine Electrodeposited on Modified Gold Surfaces. Key Eng. Mater, **596** (2014) 219
- 10) S. Takahashi, K, Kishi, R. Hiraga, K. Hayashi, Y. Mamada, M. Oshige and S. Katsura: A new method for immobilization of his-tagged proteins with the application of low-frequency AC electric field. Sensors, **18** (2018) 784
- M. M. Bradford: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72 (1976) 248
- 12) G. Z. Sauerbrey: The use of quartz oscillators for weighing thin layers and for microweighing. Phys, **155** (1959) 206