

表面プラズモン共鳴バイオセンサーによるサツマイモ品種すいおうの 茎葉由来のカフェオイルキナ酸誘導体類と酵素との相互作用解析

波多野哲也^{1)*}・石黒 浩二²⁾・吉元 誠³⁾・氏原 邦博¹⁾・佐藤 哲生¹⁾

(¹⁾九州沖縄農研究・²⁾北海道農研・³⁾鹿児島女子短期大学)

Use of surface plasmon resonance (SPR) biosensor for the analysis of the interaction
of the cafeoylquinic acid derivatives contained in stems and leaves
of sweetpotato variety "Suioh" with the enzymes

Tetsuya HATANO¹⁾, Koji ISHIGURO²⁾, Makoto YOSHIMOTO³⁾, Kunihiro UJIHARA¹⁾ and Tetsuo SATO¹⁾

(¹⁾Natl. Agric. Res. Cent. for Kyushu Okinawa Region (KONARC),

²⁾Natl. Agric. Res. Cent. for Hokkaido Region (HNARC), ³⁾Kagoshima Women's Jr. Coll.)

茎葉利用サツマイモ品種「すいおう」は機能性成分であるカフェオイルキナ酸誘導体類を含み、II型糖尿病のモデル動物であるKK-Ayマウスを用いた糖尿病改善作用（新井ら 2007）について報告されている。また、カフェオイルキナ酸誘導体類については、 α -アミラーゼ阻害活性についても報告されており（紙谷ら 2009）、そこで用いられたカフェオイルキナ酸誘導体類はすいおう茎葉にも含まれる。そのため、すいおう茎葉にもそれらの抑制作用があることが期待される。また、ポリフェノール類には脂質酸化抑制作用があり（Chedeaら 2010）、すいおう茎葉に含まれるカフェオイルキナ酸誘導体類にも脂質酸化抑制作用があることが期待される。

機能性研究では、実際に機能があることが実証されなければならない。しかるに、試験管レベルでの効果と動物実験レベルのそれとの間には大きなギャップがある。表面プラズモン共鳴 (SPR) バイオセンサーは、生体高分子 (酵素) と生理活性成分 (基質) との相互作用をより微量のサンプルで直接的にリアルタイムな測定ができる。この手法を用いて酵素 (アミラーゼおよびリポキシゲナーゼ) と小分子阻害剤の結合を反応速度論的に解析した結果、新薬発見の過程で役に立つことが示唆されている (Nordinら 2005)。実際に酵素への作用が解析されるため、試験管レベルでの機能性発現よりもより生体レベルに近いものであり動物実験実施への橋渡しが期待される。本研究では、アミラーゼおよびリポキシゲナーゼとカフェオイルキナ酸誘導体の相互作用を定量する。前者は血糖値上昇抑制、後者は脂質劣化抑制を想定し、機能性物質を有する作物の効率的選抜の一助となることが期待される。

材料と方法

1. 試料

本研究で分析した6種のカフェオイルキナ酸 (CQA) 誘

導体は、カフェ酸 (CA)、クロロゲン酸 (chlorogenic acid, 5-O-CQA)、3-O,4-O-diCQA (3,4-diCQA)、3-O,5-O-diCQA (3,5-diCQA)、4-O,5-O-diCQA (4,5-diCQA) および3-O,4-O,5-O-triCQA (3,4,5-triCQA) である。カフェ酸は、和光純薬工業株式会社製 (大阪) を、クロロゲン酸はSigma-Aldrich社製 (Missouri, US) を、3,4-diCQA、3,5-diCQA、4,5-diCQA および3,4,5-triCQA はサツマイモ茎葉から精製後、供試した (石黒ら 2007)。その他、SPR分析用試薬として、アミンカップリングキットはGE Healthcare社製 (Buckinghamshire UK) を用いた。

2. 測定機器

SPRバイオセンサーは、Biacore T100 (GE Healthcare社製) を使用し、固定化・相互作用測定の条件設定は、機器付属のBiacore T-100 Control Software (GE Healthcare社 2007) を使用した。また、実験の開始前後にBiacore T100 Instrument Handbook Ver AAに従い、メンテナンスキット (GE Healthcare社製) を用いて、ライン洗浄 (Desorb) を行った。

3. 酵素の固定化

アミラーゼ (SIGMA α -Amylase from human, EC 3.2.1.1)、リポキシゲナーゼ (SIGMA Lipoxidase from soybean, EC 1.13.11.12) は、機器に装備されたコントロールソフトウェア (Biacore T100 Control Software) を用い、アミンカップリング法で、センサーチップ C1 (GE Healthcare社製) に以下のステップを経て、それぞれ別の流路に固定化した：表面のカルボキシル基を賦活化させるために、0.2M 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) と 50mM N-hydroxysuccinimide (NHS) の混合溶液を流速 10 μ l/min で7分間注入した。

酵素溶液としてアミラーゼおよびリポキシゲナーゼそれ

キーワード：アミラーゼ、カフェオイルキナ酸誘導体、すいおう、表面プラズモン共鳴 (SPR) バイオセンサー、リポキシゲナーゼ

*連絡責任者：kouzan@affrc.go.jp

ぞれ 0.1Uを20 μ lのMilli-Q水に溶かし、さらに10mM 酢酸緩衝液 (pH5.0) 80 μ lを加え、センサーチップに流速10 μ l/minで7分間注入して、タンパク質表面のアミノ基とセンサーチップ表面にある賦活化したカルボシル基とを結合させた。

賦活化されているがタンパク質と結合しなかった表面のカルボシル基をブロッキングするため、1M-ethanolamine-HClを流速10 μ l/minで7分間注入した。センサーチップC1を選択した理由は、一般的なセンサーチップであるCM5には、チップ内にデキストランが装着され、デキストランとカフェオイルキナ酸誘導体類との相互作用の可能性があるため、デキストランを持たないC1を選定することで、これを排除するためである (Biacore Sensor Surface Handbook)。また、タンパク質の固定化量を少なくし、アナライト (分析対象、ここではカフェオイルキナ酸誘導体類) とリガンド (ここでは酵素) の相互作用の速さよりも、アナライトの供給の速さが遅く、そのためアナライトとリガンドの相互作用ではなく、アナライトの供給の速さを測定してしまうこと (マストランスポーリミテーション) を避けるためである。

4. ランニングバッファーとサンプル溶液の作製

ランニングバッファーとして、HBS-EP+ 10X (GEヘルスケア社製) にジメチルスルホキサイド (DMSO) が最終濃度で0.6%となるように加え、Milli-Q水で希釈した溶液を用いた。その成分内容は、0.1 M HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 1.5 M NaCl, 30mM EDTA, 0.5% v/v Surfactant P20, 0.6% v/v DMSOである。

サンプル溶液として、あらかじめ20mM濃度にDMSOで希釈しておいたカフェオイルキナ酸誘導体類を、0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 μ Mの濃度となるようにランニングバッファーで希釈した。

5. 酵素とカフェオイルキナ酸誘導体類との相互作用測定法

サンプル溶液を添加時間 60秒、流速30 μ l/minで注入し、反応を計測した。サンプル溶液注入終了から140秒後に、更新溶液として20mM-NaOHを添加時間60秒、流速30 μ l/minで注入し、センサーチップ内に残ったカフェオイルキナ酸誘導体類を除去した。最初にサンプル溶液の代わりにサンプルバッファーで10回同様の操作を行った後、それぞれのカフェオイルキナ酸誘導体類の各濃度について3回試験を行った。なお、濃度と反応時間を決定するに当たり、予備実験で適切な濃度範囲を予測し、60秒の反応時間で平衡に達する事を確認した。これらの結果の解析には、機器付属の解析ソフトウェアであるBiacore T100 Evaluation Software Ver 1.1.1を用いた。

サンプル溶液等を注入していない間は、ランニングバッファーを流速10 μ l/minで注入し続けた。1種類のカフェオイルキナ酸誘導体類の濃度シリーズの測定の前後に、0,

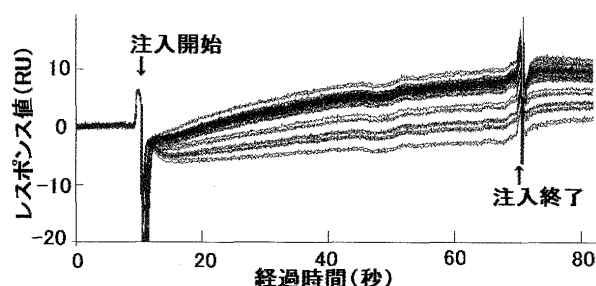
0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4%濃度のMilli-Q水で希釈したDMSOを流し溶媒補正が行えるようにした。

結果と考察

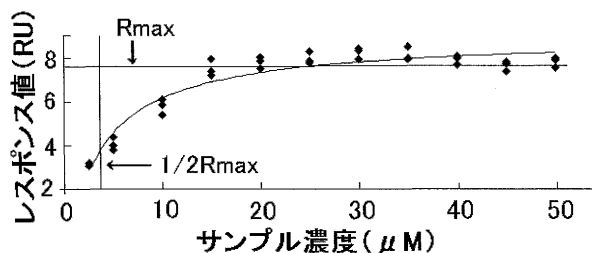
酵素の固定化によるセンサーチップC1への固定化量はアミラーゼ489.4RU, リポキシゲナーゼ545.6RUである。同様の操作をセンサーチップCM5で行い得られた固定化量が、アミラーゼ2762RU, リポキシゲナーゼ9640.1RUであり、CM5を用いた場合よりも固定化量が少ない。このことは、上述のマストランスポーリミテーションが起こりにくいことを示している。

それぞれのカフェオイルキナ酸誘導体類の濃度シリーズに対する平衡値のプロットから解離定数 (K_D) の算出を行うこととした。結果を解析し、カフェオイルキナ酸誘導体類と酵素類との結合の強さを求めるためのアフィニティ解析を以下の手順で行った: 酵素固定化フローセルの値からリファレンスセルフローセルの値を差し引いて、酵素とカフェオイルキナ酸誘導体類の反応を求めた。第1図は、3,5-diCQAの場合で、アミラーゼを固定化させたフローセルおよびリファレンスフローセルのセンサーグラムを示したものであり、実験したすべての濃度系列およびすべての繰り返したものを示した。サンプル注入をして平衡に達した時の値を読み取るために、サンプル注入終了直前のレスポンスをレスポンス値 (RU) として測定した。同様にして、試験したすべてのカフェオイルキナ酸誘導体類について、平衡状態での酵素が結合したフローセルの測定値から、リファレンスフローセルの測定値を差し引いてレスポンス値 (RU) を求めた。また、リポキシゲナーゼについては、リファレンスフローセルのレスポンス値の方がリポキシゲナーゼを固定したフローセルよりも大きかったため、溶媒補正を行った。

K_D 値の決定は、第2図のように、基質濃度をX軸に、レスポンス値をY軸にプロットした。次いで、 K_D 値は、レスポンス値がRmax (反応が平衡に達してそれ以上にならないレスポンス値、すなわちセンサー表面にある酵素がすべてカフェオイルキナ酸誘導体類と結合した時の値) の1/2



第1図 アミラーゼを固定化したフローセルのレスポンス値からリファレンスのフローセルのそれを差し引いて得られるセンサーグラム (各種濃度の3,5-diCQA溶液を注入)。図中で大きく極大極小となるのは、サンプル溶液注入開始 (10s) およびサンプル溶液注入終了 (70s)。



第2図 アミラーゼに対する3,5-diCQAの各種濃度でのレスポンス値とアフィニティ解析(平衡値解析)の結果(基質濃度をX軸に, そのレスポンス値をY軸にプロット). K_D 値は, レスポンス値が R_{max} (反応が平衡に達してそれ以上にならないレスポンス値)の1/2となる時のサンプル濃度(図中の垂直線が示す濃度)として機器付属の解析ソフトウェアを用いて算出.

第1表 SPRを用いて得られた酵素とカフェオイルキナ酸誘導体類との K_D 値(μM)

	Lipoxidase	Amylase
3-O,4-O,5-O-triCQA	0.50	1.00
3-O,4-O-diCQA	9.55	3.58
3-O,5-O-diCQA	5.15	4.79
4-O,5-O-diCQA	15.31	1.62
カフェ酸	35.50	7.62
クロロゲン酸(5-O-CQA)	11.29	1.70

となる時のアナライト濃度(第2図の垂直線が示す濃度)として機器付属の解析ソフトウェアを用いて算出した。

そのようにして得られた, カフェオイルキナ酸誘導体類とアミラーゼおよびリポキシゲナーゼとの相互作用の K_D 値を第1表に示す。いずれの酵素でも3,4,5-triCQAの K_D が最も小さかった(相互作用が強かった)。リポキシゲナーゼでは, 3,5-diCQA<3,4-diCQA<クロロゲン酸<4,5-diCQA<カフェ酸の順に大きくなった(相互作用は弱くなった)。一方, アミラーゼでは, 4,5-diCQA<クロロゲン酸<3,4-diCQA<3,5-diCQA<<カフェ酸の順に大きくなった(相互作用は弱くなった)。カフェオイル基の結合している数と位置により K_D が決定される傾向が見られた。石黒ら(2007)はサツマイモ茎葉の血圧降下作用を調べて, カフェオイルキナ酸誘導体類のアンギオテンシンI変換酵素阻害活性で3,4,5-triCQAの活性が最も高く, 3,4-diCQA>4,5-diCQA>クロロゲン酸>, 5-diCQA>カフェ酸の活性の強さが得られたとしている。いずれも3,4,5-triCQAの作用が強く, カフェ酸の作用が弱かった。酵素によって, カフェオイル基の結合している数と位置が, 活性に影響することが認められた。酵素により若干異なるが, 置換基の機作の重要性が認識された。今回は標品での酵素との相互作用解析であったが, 葉からの抽出物で相互作用解析ができれば, 試験管レベルでの機能性研究を越えた機能性作物のより効果的・効率的な選抜の一助となることが期待される。

摘要

表面プラズモン共鳴(SPR)バイオセンサーを用い, サツマイモの茎葉に含有される機能性成分: カフェオイルキナ酸(CQA)類と, アミラーゼおよびリポキシゲナーゼとの相互作用を解析した。アフィニティ解析(平衡値解析)を行った結果, 両方の酵素で3,4,5-triCQAの K_D が最も小さかった(相互作用が強かった)。リポキシゲナーゼでは, 3,5-diCQA, 3,4-diCQA, クロロゲン酸, 4,5-diCQA, カフェ酸の順に大きくなり, カフェオイル基の結合している数と位置により K_D が決定される傾向が見られた。試験管レベルでの機能性スクリーニングを越えて効果的と期待される。

引用文献

- 新井千加子・竹井恭彦・國方敏夫・宮田聡美・岩城完三・福田恵温 2007. KK-Ayマウスにおけるコタラヒムブツ, アンマロクおよびすいおうの糖尿病改善作用 食科工誌. 54: 539-545
- Chedeeaa, V. S., C. Braicub and C. Socaciua 2010. Antioxidant/prooxidant activity of a polyphenolic grape seed extract. Food Chem. 121: 132-139.
- 石黒浩二・吉元誠・鏑田仁人・高垣欣也 2007. サツマイモ茎葉の血圧降下作用. 食科工誌. 54: 45-49.
- 紙谷雄志・岩井和也・福永泰司・木村良太量・中桐理 2009. 脱カフェインコーヒー豆抽出物の糖質分解酵素阻害活性とクロロゲン酸類の寄与. 食科工誌. 56: 336-342.
- Nordin, H., M. Jungnelius, R. Karlsson and O. P. Karlsson 2005. Kinetic studies of small molecule interactions with protein kinases using biosensor technology. Anal.Biochem. 340: 359-368.
- GE Healthcare Co. 2003. Biacore Sensor Surface Handbook, Version AA. 27