

阻害活性を利用した大豆トリプシンインヒビター (KSTI) の高感度 免疫測定系の確立と門脈血中に取り込まれた KSTI の検出

矢野稚子・山田千佳子・松田 幹*

名古屋大学大学院生命農学研究科

Establishment of Immunoassay for Soybean Trypsin Inhibitor (KSTI) Based on Its Inhibitory Activity and Its Application for the Detection of KSTI Absorbed in Portal Vein

Wakako YANO, Chikako YAMADA and Tsukasa MATSUDA

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya 464-8601

ABSTRACT

The absorption of soybean trypsin inhibitor (KSTI) from digestive tract to portal vein was investigated. To detect KSTI retaining its trypsin inhibitory activity two assay methods based on the specific binding of KSTI to trypsin were developed. An ELISA-plate was coated with bovine trypsin and incubated with KSTI added to mouse serum at varied concentrations. KSTI bound to the trypsin on the plate was detected by ELISA using anti-KSTI and POD-labeled secondary antibodies. The KSTI in serum was successfully detected at a level of 10 ng/mL, though mouse serum competitively interfered the KSTI-binding to trypsin probably due to its endogenous trypsin inhibitors. As an alternative assay method an affinity precipitation method using trypsin-coupled Sepharose was applied to precipitate KSTI from serum. The precipitate was subjected to SDS-PAGE and immunoblot using the anti-KSTI and POD-labeled secondary antibodies. KSTI was also detected by this method, and the detection limit was about a level of 50 ng/mL serum. These assay methods were applied for the detection of KSTI absorbed from intestine into portal vein. KSTI was injected into duodenum of anesthetized mice, and blood was collected from the portal vein 10-30 min later. In the serum of portal vein, KSTI retaining its trypsin inhibitory activity was detected at a level of 100-300 ng/mL. The anti-KSTI antibody detected a band with a molecular mass of about 20 kDa, corresponding to the intact protein. *Soy Protein Research, Japan* 4, 52-57, 2001.

Key words : protein absorption, soybean trypsin inhibitor (KSTI), immunoassay,
portal vein

*〒 464-8601 名古屋市千種区不老町

これまでの研究により、大豆トリプシンインヒビター (KSTI) をマウス胃内に投与すると、小腸内に未分解の状態で検出され、小腸内トリプシン活性のみならず、キモトリプシン活性およびエラスターゼ活性も顕著に阻害されることを明らかにした¹⁾。さらにKSTIは他のたん白質(卵アルブミンやオボムコイド)に比べて消化管内での分解速度が遅く、経口投与後一定時間内は未分解のまま、あるいは比較的大きなペプチドとして小腸管腔内に残存する事を観察している。本研究では、KSTIは消化管内から門脈血中に移行する可否かを明らかにするために、KSTIの持つトリプシンとの結合活性と複合体の安定性を利用したKSTIの高感度検出法を確立することを第1の目的とした。これによりトリプシン阻害活性を保持したKSTIの検出が可能となり、活性を保持したインタクトなKSTIの体内への取り込みに関する詳細な解析が可能となる。さらに、この高感度検出法を用いて、実際にマウスの消化管内に投与したKSTIの門脈血中への移行の解析を試みた。

方 法

実験材料

ウシトリプシンおよび大豆トリプシンインヒビター(KSTI)はSIGMAより、マウス(ddY)は日本SLCより購入した。トリプシン活性測定用の合成基質として用いた α -N-benzoyl-L-arginine p-nitroanilide (BAPA)はペプチド研究所より購入した。

サンドイッチELISA法による血清中のKSTIの検出

ウシトリプシン(10 μ g/mL: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0/20 mM CaCl₂)を用いてELISAプレートを4℃で一晩コーティングした後、1% BSA(ウシ血清アルブミン)/PBST(0.05% Tween 20を含むPBS)でブロッキングした。KSTIを終濃度が10~1,000 ng/mLとなるようにマウス血清に添加し、良く混合した後、PBSで10倍希釈した。各希釈溶液をwell当たり100 μ Lずつ加え、37℃で1時間反応させ、KSTIをトリプシンに結合させた。洗浄後、ウサギ抗-KSTI血清、続いて2次抗体としてPOD(peroxidase)-標識抗ウサギIgGの希釈溶液と反応させた²⁾。プレートに結合したPOD酵素活性をo-phenylenediamineを基質として用いて、492 nmの吸光度の変化により測定した。

トリプシン-Sepharoseによる親和性沈降と免疫ブロット

たん白質固定化用Sepharose (Affigel 10, Biorad)を活性化し、トリプシン(25 mg/3 mL, 0.1 M MOPS)

をAffigelに対して3倍量(v/v)加え、4℃で一晩、ゆるやかに回転させながら反応させた。続いて0.1 M グリシン(pH 8.0)により活性基をブロックした後、トリプシン用バッファー(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM CaCl₂)で洗浄し、4℃で保存した。

KSTIを終濃度0~500 ng/mLとなるように添加したマウス血清をトリプシン用バッファーで10倍に希釈した後、トリプシン-Sepharoseを加え4℃で一晩、ゆっくり回転させながら反応させた。トリプシン-Sepharoseを回収し、洗浄後、SDS-PAGEサンプルバッファーを加え加熱処理し、遠心分離により上清を回収して以下の免疫ブロットのサンプルとした。

SDS-PAGEはLaemmliの方法³⁾、免疫ブロットはTowbinらの方法⁴⁾に従って、以前の報告に述べた手順で行った¹⁾。

トリプシン阻害活性の測定

ウシトリプシン(2.0 μ g/mL)と合成基質(BAPA)を用いてKSTIとマウス血清による酵素活性の阻害を測定した⁵⁾。KSTI溶液の最終濃度を0~3.5 μ g/mL、マウスの血清最終希釈倍率が100~1,000倍となるように設定した。96穴マイクロプレートを用いて、37℃で15分間反応させた後、37℃に加温した合成基質(BAPA)を終濃度が0.2 mg/mLとなるように加え、マイクロプレート用分光光度計SOFTmax PROを用いて37℃で保温しながら405 nmの吸光度を測定した。吸光度の変化をトリプシン活性とみなし、KSTIあるいは血清を添加しないサンプルの値を基準にして相対値(%)で表した。

KSTIのtrypsinへの結合に対する血清の影響

KSTI(3 ng/mL)に終濃度が5~5000倍希釈となるようにマウス血清を加え、その中のKSTIを上記のサンドイッチELISA法により測定した。

KSTIの小腸内への投与と門脈血の採取

ddYマウス(6週齢、雌、5匹)を実験に使用した。ネブタール(10 mg/mL、マウス1個体あたり200~300 μ L)を腹腔内に注射して麻酔して開腹後、KSTI溶液(1mg/200 μ L PBS)を十二指腸内へ注射した。投与から約10分後、門脈の肝臓側から翼付静注針を挿入してそのまま固定し、静注針に連結した注射筒をゆっくり引いて門脈血を採取した。門脈血は室温で約30分間、さらに4℃で一晩静置し、遠心分離により回収した上清を門脈血血清とした。以後の実験に使用するまで-20℃で保存した。

結果と考察

血清中に添加された KSTI の検出：ELISA 法

予備的な実験により、緩衝液中の KSTI は ELISA プレート上の固相化トリプシンに定量的に結合し、抗-KSTI 抗体を用いた ELISA により高感度に検出できることが明らかとなっていた。しかし、この酵素インヒビター複合体を利用したアッセイ法を生体サンプル、特に血清サンプルに応用するには、血清に含まれる他の成分、特に血清 α 1-アンチトリプシンによってトリプシンと KSTI の結合が競合的に妨害される可能性がある。そこで、マウス血清中に添加した KSTI が、この固相化トリプシンを用いた ELISA 法によってどの程度高感度の検出できるかを調べた。異なる量の KSTI を添加したマウス血清を 10 倍あるいは 100 倍希釈して測定した結果を Fig. 1 に示す。KSTI を含む血清を 100 倍希釈すると 10 倍希釈した場合に比べて検出感度が低下するものの、10 倍希釈で測定できれば、すなわち血清が比較的多量に得られれば 100 ng/mL 程度まで検出可能であることが示された。

血清中に添加された KSTI の検出：親和性沈降法

ELISA 法により血清中の KSTI の検出が可能であることが明らかとなったため、さらにもう 1 つの方法での検出を試みた。トリプシンを Sepharose bead に固相化することにより、より多量の KSTI を血清中から回収できると考えた。異なる量の KSTI を添加したマ

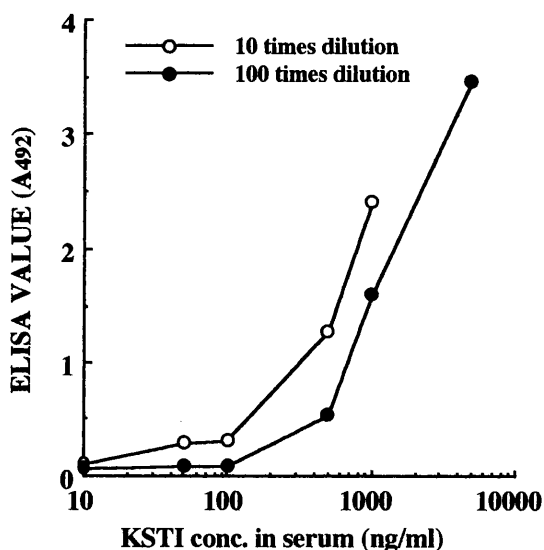


Fig. 1. Detection of KSTI added to mouse serum by an ELISA-based method. Pure KSTI (10–5000 ng) was added to 1 mL of mouse serum. After being diluted 10 or 100 times with PBS, each sample was added to the ELISA-plate coated with trypsin. The plate-bound KSTI was detected by using anti-KSTI and the POD-labeled secondary antibody as described in Materials and Methods.

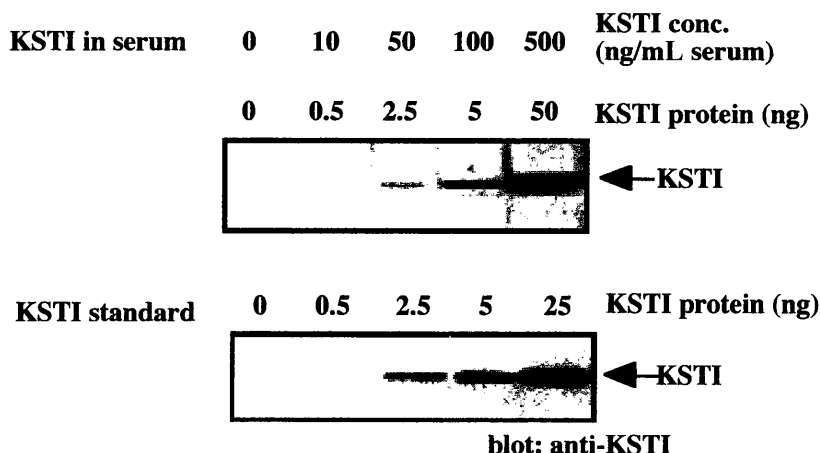


Fig. 2. Detection of KSTI added to mouse serum by affinity precipitation. Pure KSTI (10–500 ng) was added to 1 mL of mouse serum. After being diluted with PBS, each sample was incubated with trypsin-coupled Sepharose bead. KSTI bound to the Sepharose bead was precipitated, washed with PBS, and subjected to SDS-PAGE/immunoblot using anti-KSTI antibody (top). For quantitative analyses standard KSTI (0.5–25 ng) was also subjected to the SDS-PAGE/immunoblot analysis (bottom).

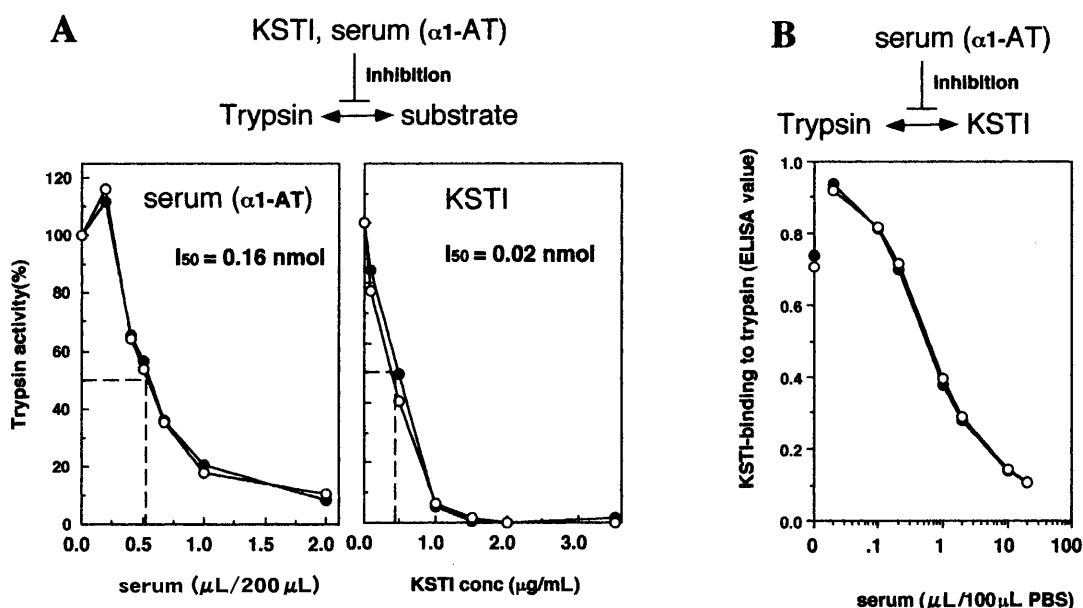


Fig. 3. Effect of serum on the KSTI-binding to trypsin.

A : Varied volumes of mouse serum and varied amount of KSTI were incubated with trypsin (2 μ g/mL), and then the trypsin activity was measured by using a synthetic substrate, BAPA. The trypsin activity was expressed as a percent ratio of the initial enzyme-reaction velocity against the sample without inhibitor.

B : Varied volumes of mouse serum were mixed with KSTI (3 ng/mL), and then the KSTI was determined by the ELISA-based method. The presence of mouse serum reduced the detection sensitivity for KSTI by the ELISA-based method.

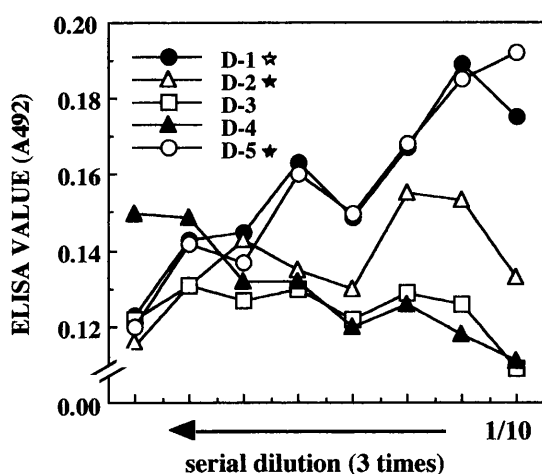


Fig. 4. Detection of KSTI in the serum from portal vein by an ELISA-based method.

Pure KSTI (1 mg) was injected into the duodenum of anesthetized mice. After the injection (about 10–30 min), blood was collected from the portal vein of each mouse. The serum was separated and subjected to the KSTI detection by the ELISA-based method. The KSTI concentrations for some sera were estimated to be about 10 ng/mL based on the standard curve (Fig. 1).

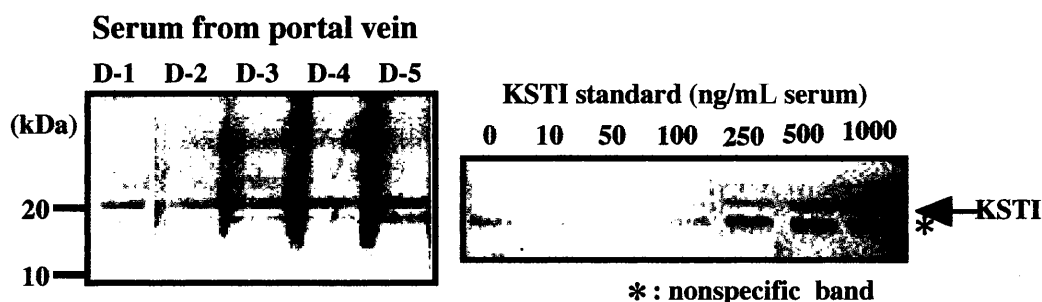


Fig. 5. Detection of KSTI in portal vein by affinity precipitation. Pure KSTI (1 mg) was injected into the duodenum of anesthetized mice. After the injection (about 10–30 min), blood was collected from the portal vein of each mouse. The serum was separated and subjected to the KSTI detection by the affinity precipitation/immunoblot method (left). The KSTI concentrations for some sera were estimated to be 100–300 ng/mL based on the standard KSTI (right).

ウス血清を10倍希釈した後、トリプシン-Sepharoseと反応させた。この酵素・インヒビター親和性沈降により回収したKSTIを免疫ブロット法で検出した。その結果、Fig. 2に示すように、KSTI量としてng程度まで、血清中の濃度として50 ng/mL程度まで検出可能であることが明らかとなった。また、血清が存在しない場合に比べて、回収率がほぼ半分程度であることも明らかとなった。

次に、ELISA法において血清成分がどの程度影響を及ぼすかをさらに詳細に検討した。まず、血清がどの程度トリプシン活性を阻害するかを測定した。Fig. 3-Aに示すように、添加する血清の量を増加させるとトリプシン活性は徐々に低下した。マウス血清中の $\alpha 1$ -アンチトリプシンを3 mg/mLと仮定し、さらに血清による阻害がすべて $\alpha 1$ -アンチトリプシンによるものと仮定すると、この条件でトリプシン活性を50%阻害するのに必要な $\alpha 1$ -アンチトリプシン量は、0.16 nmolと計算された。一方、KSTIは同じ条件で、0.02 nmolと計算された。この結果から、KSTIはトリプシンに対する親和性が強く、血清中の高濃度のインヒビターと競合してトリプシンに結合しうることが示唆された。そこで、実際にKSTIとトリプシンの結合反応系に種々の量の血清を添加して結合反応への影響を調

べた。Fig. 3-Bに示すように、血清添加量に依存してKSTIのトリプシンへの結合量が徐々に減少した。これらの結果をふまえ、血清中に添加したKSTIを標準溶液として用いて、検量線を作成することにより以下に述べる門脈血血清サンプルの解析を行うこととした。
マウス門脈血中に移行したKSTIの検出

マウスの十二指腸内にKSTIを注入した後、門脈血を回収して、その中に含まれるKSTIを上記のアッセイ法を用いて解析した。Fig. 4にELISA法により5個体からの門脈血血清について測定した結果を示す。個体ごとの変動や希釈したサンプルでの値の変動が見られるものの、3個体では明らかにKSTI陽性を示し、門脈血中にKSTIが移行していることを示唆した。ELISA値と検量線からこれらの血清中のKSTI濃度はおよそ10 ng/mL程度と推定された。次に、親和性沈降・免疫ブロット法による検出を行った。5個体の血清についての免疫ブロットの結果をFig. 5に示す。5個体すべての血清から、分子量約20,000のバンドが抗-KSTIにより検出された。この分子量はインタクトのKSTIと一致しており、標準サンプルの染色強度から、KSTIは10～100 ng/mLのレベルで門脈血中に存在することが明らかになった。

要 約

大豆トリプシンインヒビター (KSTI) を経口投与すると、腸内トリプシン活性が顕著に阻害されるのみならず、キモトリプシンおよびエラスターゼの活性も低下する。さらに、消化管内に未分解のKSTIが多量に残存することから、トリプシン阻害活性を保持したKSTIが体内に取り込まれる可能性が考えられる。そこで、経口投与したKSTIの体内への取り込みを研究するための手段と

して、まずトリプシン阻害活性を保持した KSTI を免疫化学的に検出する方法を考案した。ELISA プレートにトリプシンをコートし、そこに種々の濃度の KSTI を添加して反応させ、酵素・インヒビター複合体を形成させた。トリプシンとの親和性により結合した KSTI を抗-KSTI 抗体と酵素標識した二次抗体を用いて検出した。その結果、10 ng/mL のレベルで活性を保持した KSTI の検出が可能であることが明らかとなった。血中の $\alpha 1$ -アンチトリプシンによる KSTI の検出系への影響が推定されたが、血清中に既知濃度の KSTI を添加した標準サンプルを用いることにより、感度はやや低下するものの検出は可能であった。さらに、トリプシンを化学的に結合させた Sepharose (トリプシン-Sepharose) を用いて血清中の KSTI を親和性沈降させ、沈降物を SDS-PAGE で分離した後、抗 KSTI 抗体を用いた免疫ブロット法により解析した。KSTI はトリプシン-Sepharose により血清中から特異的に沈降され、50 ng/mL のレベルまでの検出が可能であった。これらの方法を用いて消化管内から門脈血中への KSTI の取り込みを調べた。十二指腸内に KSTI を投与した後、麻酔下で開腹して門脈血を採取して、そこに含まれる KSTI を上記の2種類の方法で分析した。KSTI は血清中に 10 ~ 100 ng/mL のレベルで存在し、インタクトの KSTI と同一の分子量のバンドとして検出された。

文 献

- 1) 二宮憲子, 山田千佳子, 松田 幹 (1999) : 大豆トリプシンインヒビターがアレルギーたん白質の *in vivo* 消化性と経口免疫原性に及ぼす影響。大豆たん白質研究, **2**, 70-75.
- 2) Engval E and Perlmann P (1971) : Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) - Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, **8**, 871-874.
- 3) Laemmli UK (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 4) Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979) : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4350-4354.
- 5) Gu J, Matsuda T, Nakamura R, Ishiguro H, Okubo I, Sasaki M and Takahashi N (1989) : Chemical deglycosylation of hen ovomucoid - Protective effect of the carbohydrate moiety on tryptic hydrolysis and heat denaturation. *J Biochem*, **106**, 66-70.