

タンパク質相互作用解析： 等温滴定型熱量測定と表面プラズモン共鳴

津本 浩平

タンパク質相互作用解析が、生命科学研究はもとより、創薬研究においても、ますます重要な位置を占めるようになってきている。相互作用を定量的に解析する、という観点でいえば、等温滴定型熱量測定と表面プラズモン共鳴法は、もはやスタンダードな手法に位置づけられている。本稿では、これらの手法について、原理について述べたあと、ポリエーテル化合物特異的抗体への適用例を紹介する。

等温滴定型熱量測定：測定原理

等温滴定型熱量測定 (isothermal titration calorimetry, ITC) は結合成分を標的分子に滴下した際に起こる化学反応もしくは結合反応を観測する方法である。物質同士が結合する時には熱の発生もしくは吸収がおこるため、この熱量を測定することにより相互作用の結合定数 (K_a)、反応の結合比 (n)、エンタルピー変化 (ΔH)、およびエントロピー変化 (ΔS) が精度良く得られる。試料への化学修飾や物理的固定化などを必要とせず、自然状態に近い環境下で測定することが可能である。また、1回の実験で分子間相互作用の完全な熱力学的プロファイルを把握できることも特長の一つである。

ITCの装置内部には試料セルと参照セルが備わっており、任意の一定温度に保たれた試料セル中の標的分子溶液に対して、滴定シリンジ中のリガンド溶液を数 μl ずつ逐次滴定する。リガンドが試料セル内へ滴定されて両物質が相互作用すると、結合量に正比例した熱の発生または吸収が起こる。リガンド滴定の進行に沿って試料セル中の標的分子の結合サイトが飽和され、熱シグナルは減少して最終的にリガンドの希釈熱のみが観測されるようになる。

図1上はリガンド溶液を試料セル中の標的分子溶液へ一定回数滴下した時のデータを示しており、各滴定ピークの面積はその滴定によって発生した熱量に等しい。また、各滴定の発生熱量をセル中におけるリガンドと標的分子のモル比に対してプロットすることにより図1下のような相互作用の結合等温線が得られる。各フィッティングパラメータから、結合定数、結合比、エンタルピー

変化を求めることができる。 ΔH° は滴定曲線下の総面積とその型からデコンボリューションによって得られる。測定値として ΔH° と K が求められるので、下式よりギブスエネルギー ΔG° とエントロピー ΔS° が算出される。

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ = -RT \ln K$$

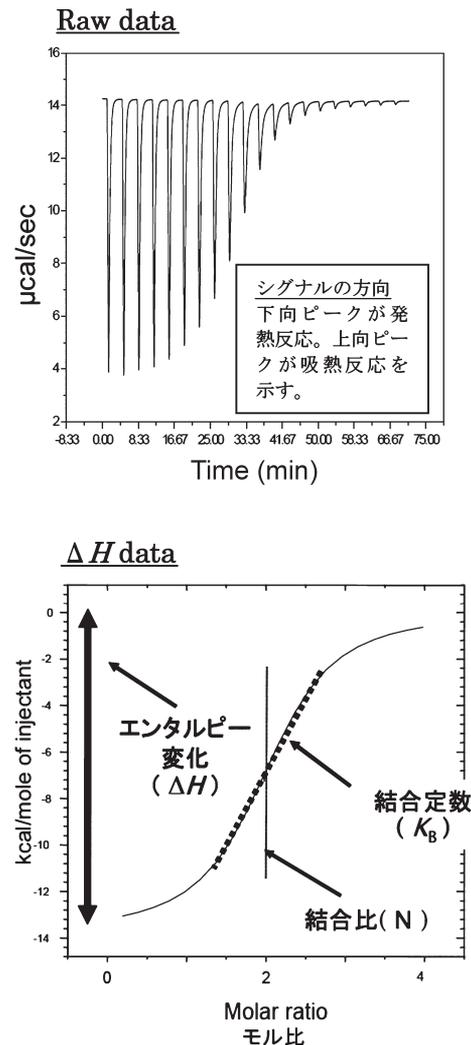


図1. ITCにより得られる生データと解析。上、実測データ例；下、解析データ例。

著者紹介 東京大学医科学研究所疾患プロテオミクスラボラトリー (教授) E-mail: tsumoto@ims.u-tokyo.ac.jp

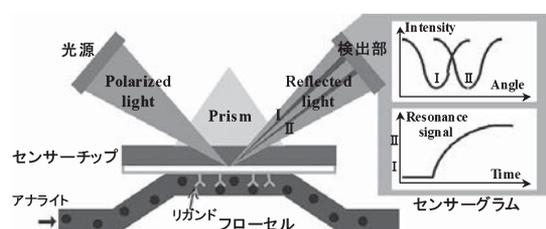


図2. 表面プラズモン共鳴法 (SPR) の検出原理

表面プラズモン共鳴分析法：測定原理

表面プラズモン共鳴分析法とは、プラズモン共鳴 (SPR) を利用して分子の相互作用をセンサーチップ上に再現することで、一切の標識を使わずにリアルタイムで結合の強さ、速さ、選択性を測定して結合速度定数、解離速度定数を算出する手法である。

分子間相互作用の反応場となるセンサーチップは、ガラスに金の薄膜が蒸着させてあり、その薄膜上にリンカー層を介してデキストランが結合している。相互作用を測定する分子の片方をデキストラン上に固定化し、マイクロ流路系を介して連続送液方式により他方の分子を含む試料溶液をある一定時間添加し続ける。基盤となる検出系を図2に示す。二分子間の相互作用は、表面プラズモンが金属/液体界面で励起した場合に起こる光学現象を利用し、二分子間の結合と解離に伴ってセンサーチップ表面で生じる微量な質量変化をSPRシグナルとして検出する。分子の固定化されていない側の金薄膜に光を全反射するように当てると、反射光の一部に反射光強度が低下した部分が観察される。これがSPRシグナルである。この光の暗い部分の現れる角度つまり屈折率は、センサーチップ上での質量に依存する。センサーチップ表面で二分子間の結合反応が起きると質量変化が生じ、光の暗い部分がIからIIにシフトする (1 mm²あたり 1 ngの物質が結合するとI→IIに0.1度シフトする)。逆に、二分子が解離することによって質量が減少すると、II→Iにその分だけ戻る。測定に際しては、溶液組成の違いに由来するバルク効果あるいは非特異的吸着の影響を除去するために、測定分子を固定化した流路の他に基準物質となる分子を固定化した流路を用意し、シグナルを差し引いたものを測定値とする。

図3に測定によって得られるセンサーグラムを示す。一般に、固定化した分子をリガンド、試料として流路に

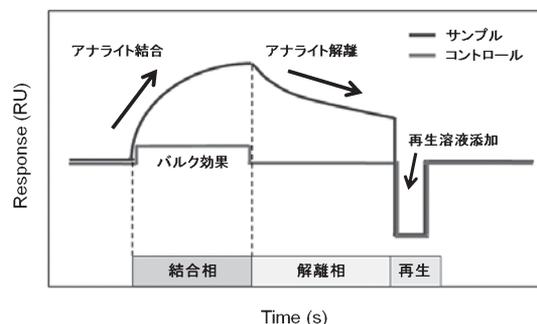


図3. SPRによって得られるセンサーグラム

流す分子をアナライトと呼ぶ。ある一定時間一定速度の連続したアナライトの添加により、リガンドが結合した流路にはアナライトの結合が見られ、コントロールの流路にはバルク効果がしばしば現れる。これが結合相であり、ここから二分子間の結合速度定数 k_{on} (1/Ms) を求めることができる。アナライトの添加が終わると、流路には緩衝液のみが流れリガンドに結合したアナライトの解離をモニターする解離相に移る。ここから、二分子間の解離速度定数 k_{off} (1/s) を求めることができる。

二手法の同一性、相補性、相違性

これら二つの手法は、上述の通り検出原理、検出法がまったく異なる。ITCが相互作用において発生するすべての発熱、吸熱を総和した熱量を測定するのに対し、SPRは基本的に質量効果を観察していることになる。しかしながら、対象としている分子が可溶性である場合は、適切な実験条件の設定で、両手法によりほぼ同様の解離定数が得られる。SPRにおいても、各種パラメータの温度依存性からファントホッフエンタルピーを求めることができ、最近では非線形系フィッティングも容易に行える。

二つの手法で得られるパラメータが異なる例も見受けられる。検出方法の相違によるほか、固定化の影響が考えられる。相互作用における分子の運動性制御が重要である系では慎重な議論が必要となろう。

SPRにおいては、相互作用における遷移状態の熱力学的パラメータを求めることができ、相互作用のおおよその特徴を読み取ることが可能である。本稿ではその詳細を割愛するが、変異体解析と組み合わせることで、相互作用過程でのアミノ酸残基の役割を議論することが可能になってきている。熱力学的パラメータの実測値とファントホッフ解析から得られる値の相補性は指摘しておくべきであろう。

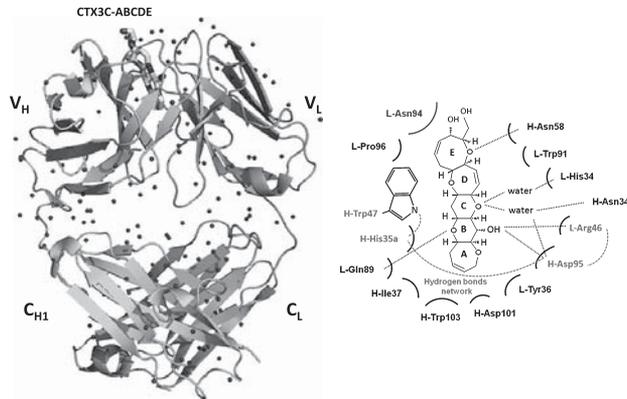


図4. 10C9-抗原複合体の結晶構造解析

研究例：ポリエーテル化合物特異的抗体の場合

シガトキシンはエーテル環がトランス縮合で連なった特異な構造を持っており、かつ生体に対し非常に強力な神経毒性を示す。平間らは、シガトキシンの検出薬あるいは中毒診断・治療薬の開発を進めている¹⁾。筆者らは、このような特徴的な分子構造を持つ毒素に対して、どのような化学構造を用意してどのような分子機構で認識するかを考察してきた。ここでは、シガトキシンCTX-3Cの部分構造であるABCDE環に対して特異的に結合できる抗体の分子認識に関する研究例^{2,3)}を紹介したい。

10C9は、抗原としてシガトキシン断片であるCTX3C-ABCDEのマウス免疫により獲得されたマウスモノクローナル抗体である。抗体IgGからパパイン消化によりFabを調製し、10C9および10C9-抗原CTX3C-ABCDE複合体の結晶化を行った。10C9単独および抗原抗体複合体についてX線結晶構造解析により、それぞれ分解能2.6, 2.3Åで立体構造を明らかにした。10C9はV_H-V_L界面に深さ11 Å程度の空孔を有しており、CTX3C-ABCDEはその抗原結合ポケットに対してA環を奥に向け縦に突き刺さるように結合することが明らかとなった(図4)。抗原抗体相互作用には図4に示すように抗体の極性残基による複数の水素結合と多数のvan der Waals相互作用が機能していることが推察できた。実際、等温滴定量熱測定によって抗原抗体相互作用形成に伴う熱力学的パラメータを算出したところ、エンタルピー変化量 ΔH は -68.4 kJmol^{-1} 、エントロピー変化量 ΔS は $-0.076 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ 、解離定数 K_d $1.1 \times 10^{-8} \text{ M}$ の親和性を持つ相互作用であることが示された。また、10C9と抗原CTX3C-ABCDEの結合比は1:1であった。

10C9の抗原認識機構について迫るため、CTX3C-

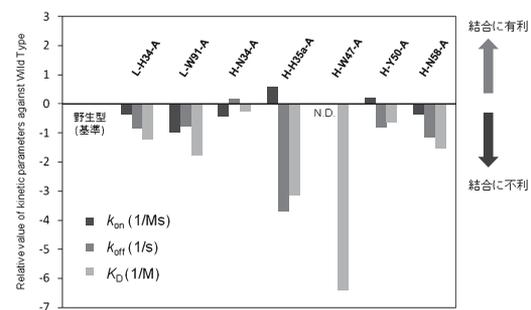


図5. 変異体を用いた相互作用の速度論的解析

ABCDEの認識に最も大きく寄与する相互作用あるいは因子を同定することを試みた。抗原結合部位周辺に存在する7つのアミノ酸残基についてアラニンスキャニングを行い、表面プラズモン共鳴法を用いてそれぞれのCTX3C-ABCDEへの結合活性を速度論的に評価した(図5)。その結果、CTX3C-ABCDEと直接あるいは間接的に水素結合を形成するアミノ酸残基への変異では野生型10C9との大差が見られなかったのに対し、抗原結合ポケットの形状維持に貢献すると考えられるH-H35aおよびH-W47への変異ではそれぞれ解離速度の200倍以上の増大と1/1000程度の結合活性の低下が観察された。以上の結果は、10C9の抗原認識には抗原結合ポケットの形状相補性が非常に重要な要素となっていること、規定通りの箇所規定通りの相互作用が協同的に機能することによって抗原認識を達成していることを示唆している。

10C9が認識し得る単位構造を表面プラズモン共鳴ならびに熱力学的解析によって抽出し、創薬ターゲットスクリーニングにおいて熱力学が果たする役割を考察する系として応用することを試みた⁴⁾。市販の低分子ライブラリーの各フラグメントについて、まずSPRを試みたところ、15個のフラグメントについて、特異的結合を示すシグナルを得た。次に、選抜されたこれらのフラグメントのおおのに対して10C9を滴下した時の反応熱を観測したところ、3つの化合物について数kcal/mol程度の発熱反応が確認された。いずれの化合物も結合定数 10^5 M^{-1} 程度の弱い相互作用ではあったものの、その化学構造から、本来の抗原であるシガトキシン断片と類似した構造的特徴を見いだすことができた。つまり、これらの化合物はいずれも連結した環状分子であること、かつ複素環であること、また特定の位置に水酸基あるいはケ

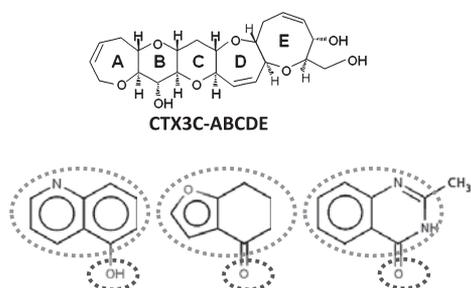


図6. CTX-3C-ABCDEとスクリーニングされた低分子フラグメントの化学構造

トン基が存在していることが共通していた(図6)。以上の結果は、10C9が認識することが可能な最小分子の構造的特徴を同定できたと同時に、低分子リード化合物探索における「発熱量」の有用性⁵⁾を示すひとつの例を提示することができたと考えている。

おわりに

本稿では、タンパク質相互作用を定量的に解析する手法としての等温滴定量熱測定ならびに表面プラズモン共鳴について、その原理と測定例を述べた。これらの手法は、生命科学研究あるいは創薬研究において、標準的に用いられつつある。タンパク質相互作用解析において、得られる熱力学情報、速度論情報の位置づけは確実に高いものになっているとあってよい。筆者らが提案できたように、発熱量がリガンドスクリーニングにおいて重要な指標になりうることも重要である。また、リガンド設計への具体的応用もますます期待が高まっている。本手法の手法により低分子創薬、抗体などのバイオ医薬品開発が加速されることを期待したい。

文 献

- 1) Oguri, H. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 7608 (2003).
- 2) Ui, M. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **283**, 19440 (2008).
- 3) Ui, M. and Tsumoto, K.: *Mol. BioSyst.*, **7**(3), 793 (2011).
- 4) Ui, M. and Tsumoto, K.: *Recent Patents Biotechnol.*, **4**(3), 183 (2011).
- 5) Velazquez-Campoy, A. and Freire, E.: *Nature Protocols*, **1**, 186 (2006).