

フロンタル・アフィニティークロマト分析法

平林 淳

フロンタル・アフィニティークロマトグラフィー (frontal affinity chromatography, FAC) は、生物学的親和力に基づく生体分子間の相互作用を定量的に解析する手法である。通常はタンパク質の精製に用いられるアフィニティークロマトグラフィーであるが、これを定量分析に用いる術は1970年代に見いだされ、その後30年の時間を経て高性能、高スループット化が達成された。本手法の原理と特徴、とくに弱い相互作用の解析が重要視される糖結合タンパク質 (レクチン) と糖鎖への応用について概説する。

FACの原理と特徴

生体における弱い相互作用 フロンタル・アフィニティークロマト分析法は前端分析法とも呼ばれる定量アフィニティー分析法である^{1,2)}。生体物質間の相互作用を解析する手法はさまざまあるが、多くが抗原・抗体間のような強い相互作用、すなわち解離定数 (K_d) の小さい組み合わせについて適応可能であり、逆に解離定数が1 μM を超えるような弱い相互作用を高精度に解析できる方法は少ない。ましてや、解析対象が糖鎖のようにきわめて複雑で大量の均一標品を得ることが難しい場合はなおさらである。

筆者紹介 (独) 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター レクチン応用開発チーム (チーム長, 副センター長)
E-mail: jun-hirabayashi@aist.go.jp

生体において、糖鎖はファジーな細胞間認識に関与すると言われている。多種多様の細胞や分泌タンパク質（ほとんどが糖鎖でおおわれている）が相互を認識、選別するうえで早くて弱い相互作用は重要である。一度結合したら決して解離しないような強く（遅い）相互作用は瞬時の判断でプロセスされてゆく細胞間選別には適さない。FACは糖鎖とこれに結合するタンパク質（一般にレクチンと呼ばれる）との相互作用解析に適した手法である。なぜ本法が弱い相互作用解析に特に威力を発揮するのかを理解するには、まずFACの原理を学ぶ必要がある。

FACの基本式 FACでは相互作用する2つの生体分子A、Bに着目する。今、B（リガンド）を適当な濃度で固定化したアフィニティー担体をカラムに詰め、そこに一定濃度 $[A]_0$ (M) に希釈したA（アナライト）をカラム体積に対し過剰容量流し続ける。このとき、カラム流速はカラム内の動的平衡が十分保たれる程度にゆっくりと流す。もしAがBとまったく相互作用しない分子であれば、Aを含む溶液は直ちにカラムから溶出され、その濃度はやがて $[A]_0$ に達する。溶出の「重心」に相当する位置（V, ml）は溶出前端（フロント）であり、FAC分析で最も重要な測定値となる。もしAがBと相互作用する場合、Aの溶出前端は相互作用がない場合（ V_0 ）と比べ $(V-V_0)$ (ml) だけ遅れる。このとき、AB間の解離定数 K_d と $(V-V_0)$ 間には以下の関係式が成り立つ。

$$K_d = B_t / (V - V_0) - [A]_0 \quad (1)$$

ここで、 B_t はBを固定化したカラム中におけるBの有効リガンド量（mol）である。式1はFACの基本式ともいえる重要な式なので、まずこの式の誘導を試みよう。

今、分子Aが糖鎖で、カラム内に固定化されているリガンドBがレクチンだとする。Aがカラム中のBと結合・解離を繰り返す動的平衡状態にあるとき（図1）、すなわち、



であるとき、解離定数（ K_d ）は、

$$K_d = [A][B]/[AB] \quad (2)$$

ここで、 $[A]$ 、 $[B]$ は遊離形で存在するA、Bの濃度であり、 $[AB]$ はそれらの複合体の濃度である。

Bが固定化されたカラムの体積を V_c とすると、図1からAの量（mol）は上記 $(V-V_0)$ と $[A]_0$ の積に等しく、かつそれは $[AB]$ とカラム体積（ V_c ）の積に等しい。

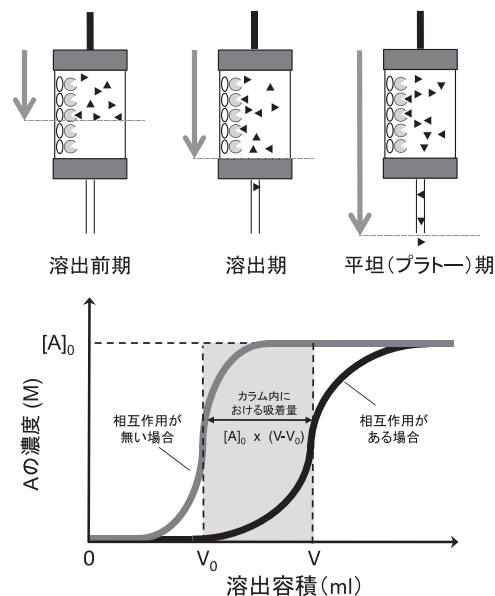


図1. FACの原理

$$(V-V_0)[A]_0 = [AB]V_c \quad (3)$$

よって、

$$[AB] = (V-V_0)[A]_0/V_c \quad (4)$$

これを式2に代入すると、式5が得られる。

$$K_d = [A][B]V_c/(V-V_0)[A]_0 \quad (5)$$

ここで、 $[B] = [B]_{total} - [AB]$ なので、式5は、

$$\begin{aligned} K_d &= [A] \{ [B]_{total} - [AB] \} V_c / (V-V_0) [A]_0 \\ &= [A] \{ [B]_{total} - (V-V_0)[A]_0/V_c \} V_c / (V-V_0) [A]_0 \\ &= [A] \{ [B]_{total} V_c / (V-V_0) [A]_0 - [A] \} \end{aligned} \quad (6)$$

となる。ここで、 $[B]_{total} V_c = B_t$ （カラムにおける有効リガンド量）とすると、式6は、

$$K_d = [A] B_t / (V-V_0) [A]_0 - [A] \quad (7)$$

となる。さて、ここで解析する対象が弱い相互作用（ $K_d > 10^{-6}$ M）を前提としていることを考えると、AB複合体の濃度 $[AB]$ は添加アナライトの初期濃度 $[A]_0$ に比べて十分に小さく、 $[AB] \ll [A]_0$ が成り立つ。すなわち、 $[A] \approx [A]_0$ となり、式7はFACの基本式（1）となる。

$$\begin{aligned} K_d &\approx [A]_0 B_t / (V-V_0) [A]_0 - [A]_0 \\ &= B_t / (V-V_0) - [A]_0 \end{aligned} \quad (1)$$

さらに、式1を変形すると式8が得られる。

$$V-V_0 = B_t / (K_d + [A]_0) \quad (8)$$

これは酵素動力学で有名な Michaelis-Menten 式と酷似している。両式は本質的に同一と考えられ、相互作用に関する有用な情報を多く含む。たとえば、 $[A]_0$ の値を限りなく小さくしていったとき ($[A]_0 \rightarrow 0$)、観察される $V-V_0$ 値は一定値 (B_t/K_d) に近づく。

$$V-V_0 = B_t/K_d \quad (9)$$

これは遅れの程度の最大値 ($V-V_0$)_{Max} が B_t/K_d (ml) であることを示す。また、式9から、結合力が2倍強ければ、あるいは B_t 値が2倍になれば、遅れの程度 ($V-V_0$) も2倍になる。一方、 $[A]_0$ が K_d (M) のとき、

$$V-V_0 = B_t/2K_d = (V-V_0)_{\text{Max}}/2 \quad (10)$$

であるから、このことは溶出の遅れ ($V-V_0$) が最大値 ($V-V_0$)_{Max} のちょうど半分になることを意味する。以上はカラムを作る際の参考にするといよい。ここでは、誌面の都合で B_t 値 (有効リガンド量, mol) を求めるための「濃度依存性解析」というプロセスについての記述を省いた。また、基本式のさらなる展開、応用についても述べる余裕がなかった。これらについては、本手法の原理開発者である笠井らによる優れた総説があるので、そちらを参考されたい。

FACのHPLCシステム化 FACの原理は1970年代に笠井らによって見いだされたが、理論も操作も簡潔な方法であったため、多くの研究者がさまざまな生体物質間の相互作用解析に用いた。その結果、本手法は精度高く解離定数 (あるいは逆数である親和定数) を求めることのできる優れた方法であることが今日では知られている。中でも、レクチンと糖鎖のように比較的弱い相互作用の計測には威力を発揮する。有名な解析例として、大山らがコンカナバリン A (ConA) と一連のアスパラギン結合型糖鎖間の解離定数を求めた報告³⁾を挙げよう。ConA はしばしば使われている代表的なレクチンで、マンノースやグルコースに特異性を持つ。しかし、この解析によって、複雑な生体内糖鎖のうち、実際にどのような構造のどの部分が認識に重要かが、初めて定量的かつ系統的に示された。生体内オリゴ糖鎖に対するレクチンの定量特異性解析という点で銘記すべき研究と言えよう。

さて、上記FACにも大きな課題があった。スループット (処理力) である。レクチンを固定化したアガロースカラム (1 ml 程度) と放射性標識した糖鎖を用い、約一日をかけて1解析を行うので研究のスピードが非常に遅い。そのスピードアップのために、筆者らは高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) との融合化を図った (図2)。FAC解析の一つの特徴はアフィニティクロマトグラ

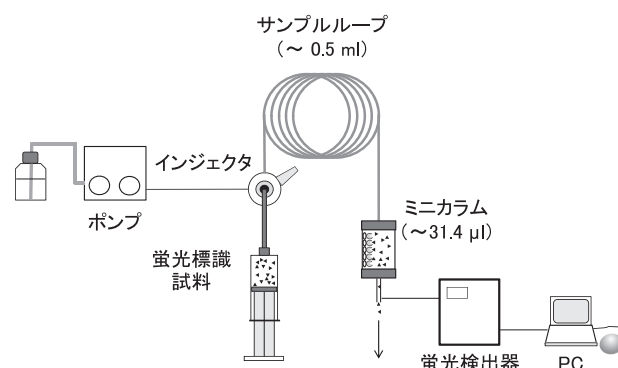


図2. 高性能FACシステムの概要

フィーでありながら、分析試料をカラム体積に対し過剰量 (容積にして10倍以上) 流すことである。このためカラム体積をできるだけ小さくし、そのためにHPLCのガードカラムとして用いられているミニチュアカラム (内径4 mm, 長さ10 mm, 体積約0.126 ml) を用いることにした。これに過剰量となる糖鎖試料を流すには一般のHPLCで用いられるサンプルループに大容量 (2 ml) のものを用いた。これでカラム体積に対し過剰容量の糖鎖溶液を流すことができる。一方糖鎖はピリジルアミノ (PA) 化された蛍光標識糖鎖 (タカラバイオ, 増田化学工業などから市販) を用いた。PA糖鎖は一般に励起308 nm, 蛍光380 nmという波長特性を持つが、安定性が高く、また糖鎖の還元末端 (ヘミアセタール基) を特異的に修飾するため、定量的な解析にたいへん適している。感度は汎用型の蛍光検出器で1 nM程度であるため、高感度・高精度なFAC解析には最適であった。

FACによる定量解析には動的平衡が成り立っていることが前提となる。これを保証することは必ずしも容易ではないが、筆者の経験では上述の内径4 mmのカラムを用いた場合、流速0.25 ml/minで解析を行う限り、ほとんどのレクチンとオリゴ糖鎖間の解析で問題は発生しなかった。2003年、筆者らは分析メーカーと共同でFAC自動分析装置を開発した。2式のカラムを相互に分析するシステムを考案し、さらに高速、高精度なFAC自動分析が可能になっている (島津製作所から受注生産)。解析結果例としては、ガレクチン^{4,5)}、DC-SIGN関連C-型レクチン⁶⁾、ランゲリン (これもC-型レクチンの一種)⁷⁾、植物レクチンの比較解析^{8,9)}などが挙げられる。FAC自動分析については詳細なプロトコールが報告されており^{10,11)}、得られたデータの解析法についても確立されている¹²⁾。

FACの高性能化がもたらしたもの 自動化装置の開発によってFACの解析スピードは格段に速くなった。

従来一日一解析であったものが、初期モデル（2000年前後）におけるマニュアル・インジェクション方式⁴⁾では一日約40解析、現在の全自動装置^{8,9)}では一晩で100解析以上をこなす。PA試薬である2-アミノピリジン以外の蛍光標識試薬も対応可能で、筆者らの経験では2-AA（2-アミノ安息香酸）、2-AB（2-アミノベンズアミド）で良好な結果を得ている。

ここで、今一度式1に戻ってみよう。今我々が解析しようとしているのはレクチン・糖鎖間に代表されるような比較的弱い相互作用 ($K_d > 10^{-6}$ M) である。PA糖鎖の検出感度は約1 nM (10^{-9} M) であることを考えると、一般に $K_d \gg [A]_0$ が成り立つ。したがって、式1は、

$$K_d = B/(V - V_0) \quad (11)$$

と簡略化できる。式11にはもはや濃度 $[A]_0$ という変数がない。このことは、 K_d 値よりずっと小さな $[A]_0$ を用いていれば、その誤差は実質上 ($V - V_0$) 値に影響しないことを意味する。一般に上述の自動FAC解析では蛍光分析が前提なので、この条件はほぼ担保される。FACは原理・操作が簡潔であるだけでなく、定量分析を行う上で最も重要な「精度」が常に高く保たれる点が他法にない利点と言える。また、通常の解析法では、弱い相互作用に対してよりたくさん解析物質（糖鎖）が必要になることが多いが、FACでは結合力の大小にかかわらず一定だ（ただし、固定化レクチンの濃度は高くする必要がある）。HPLCシステムの利点（スピード、再現性、データ処理）をそのまま活かせるため、ワンショット約5分の分析サイクルで一つの相互作用に対する K_d 値が決まっていく。

最後に、FACの高性能化で格段に進歩した事柄を2つだけ述べる。

1) FACレクチン関連データベース, LfDB 筆者らのグループでFAC解析されたレクチン、抗糖鎖抗体の数は現在まで300種以上に及ぶ。得られた相互作用データについて、筆者らは基本的に K_d 値まで算出したものを論文発表しているが、それらは同時に糖鎖科学統合データベース (<http://jcggdb.jp/>) の一環として運営されているLfDB (Lectin frontier DataBase, <http://riodb.ibase.aist.go.jp/rcmg/glycodb/LectinSearch>) に掲載している。関連遺伝子や立体構造に関する情報ともリンクを図っている。FACによる相互作用データについては、“one parameter difference”と呼んでいる機能があり、比較する糖鎖構造において「一か所だけ違い」があるものの（たとえば、 α 結合ではなく β 結合、1-2結合でなく

1-3結合、コアフコースと呼ばれる修飾の有無など）をそれぞれの糖鎖ごとに示してくれるため、構造と特異性の関係を精査するのに役立つ。

2) レクチンマイクロアレイ 本手法は最先端の糖鎖構造解析技術で現在進行するさまざまなグライコム解析で注目されつつある。最大の利点は感度の高さと簡便さである。タンパク質から糖鎖を切り離して、蛍光標識や分離精製をせず、そのまま糖鎖プロファイルと呼ぶ手法で、糖鎖構造のあらましを調べることができる。多種多様の糖鎖相互を分離する必要がなく、ありのままの形で多種類のレクチンとの相互作用を調べるのだが、得られる情報量は大変大きい。質量分析のように糖鎖構造を決定することはできないが、比較したい試料ごとの糖鎖プロファイルを迅速に解析するのに適している。病理切片や生細胞を解析することもできるため、多様な応用研究が可能だ。中でも、糖鎖がんマーカーの探索フェーズ、各種幹細胞の品質評価、糖タンパク質医薬品の製造工程でのモニタリングなど、実用化が期待できるものも多い¹³⁾。

最後に

筆者らがレクチンマイクロアレイの開発を手がけたのは2002年であり、最初のプラットフォームが完成したのはそれから3年後の2005年である¹⁴⁾。発想のヒントとなったのは実はFACであった。一揃いのレクチンを糖鎖（実際には糖タンパク質）に対し同時に相互作用させ、プロファイリングを行えば糖鎖試料ごとの「指紋」が得られるはずだと。もし、FACの高性能化が成し遂げられていなかったら、レクチンマイクロアレイの開発もずっと遅れただろう。FACの与えた恩恵は計り知れない。

文 献

- 1) Kasai, K. *et al.*: *J. Chromatogr.*, **376**, 33 (1986).
- 2) Hirabayashi, J. *et al.*: *Methods Enzymol.*, **362**, 353 (2003).
- 3) Ohyama, Y. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **260**, 6882 (1985).
- 4) Hirabayashi, J. *et al.*: *Biochim. Biophys. Acta*, **1572**, 232 (2002).
- 5) Iwaki, J. *et al.*: *Biochim. Biophys. Acta*, **1810**, 643 (2011).
- 6) Yabe, R. *et al.*: *FEBS J.*, **277**, 4010 (2010).
- 7) Tateno, H. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **285**, 6390 (2010).
- 8) Itakura, Y. *et al.*: *J. Biochem.*, **142**, 459 (2007).
- 9) Nakamura-Tsuruta, S. *et al.*: *FEBS J.*, **275**, 1227 (2008).
- 10) Nakamura-Tsuruta, S. *et al.*: *Methods Enzymol.*, **415**, 311 (2006).
- 11) Tateno, H. *et al.*: *Nat. Protoc.*, **2**, 2529 (2007).
- 12) Arata, Y. *et al.*: *J. Chromatogr. A*, **905**, 337 (2001).
- 13) Hirabayashi, J. *et al.*: *Electrophoresis*, **32**, 118 (2011).
- 14) Kuno, A. *et al.*: *Nat. Methods*, **2**, 851 (2005).