

光散乱法によるタンパク質の絶対分子量と複合体形成の解析

尾高 雅文

青い空や白い雲、真っ赤な夕日、教会の窓から差し込む光の光芒など、ごく日常に我々が目にする光景に光の散乱現象は深く関わっている。が、これらの光景を見て、光散乱を想起する人は多くないと思う。光散乱法は生体分子間相互作用解析法としては半世紀以上も以前からある技術である。しかし、生体分子の相互作用解析をする際に、光散乱法を想定する研究者はそう多くないかもしれない。光散乱法では分子のサイズ（RMS半径）、分子量、拡散係数、粒子系分布などを計測できる。前二者は本稿で述べる静的光散乱法で決定されるのに対し、後二者は動的光散乱法で決定される。動的光散乱法については他の総説を参照されたい¹⁾。静的光散乱法は生体高分子の分子量、サイズを極めてマイルドな条件で非破壊的に測定できる優れた方法である。しかし、溶液中に混在するわずかな微粒子による散乱がノイズとして大きく影響すること、分子量・分子サイズ決定にはノイズの多い低角度の光散乱強度が重要であることなどから、測定があまり簡便でなく、そのことが光散乱法の汎用性を高める障害になっていたように思われる。本稿では、始めに光散乱法の原理について簡単に解説した後、筆者らが利用している多角度光散乱法を概説し、筆者らの研究を含めた利用例を紹介する。

光散乱法の原理

$$\frac{K^*c}{R(\theta)} = \frac{1}{M} \left(1 + \frac{16\pi^2 n_0^2}{3M\lambda_0^2} \langle r_g^2 \rangle \sin^2 \left(\frac{\theta}{2} \right) + \dots \right) + 2A_2c \quad (1)$$

K^* : 光学定数 $= 4\pi^2(dn/dc)^2 n_0^2 / N_a \lambda_0^4$

n_0 : 溶媒の屈折率, N_a : アボガドロ数

λ_0 : 真空中の入射光の波長

$R(\theta)$: 過剰還元散乱強度

c : 試料濃度

M : 重量平均分子量

A_2 : 第二ビリアル係数

r_g : RMS半径

静的光散乱法の理論式は(1)のように示される。(1)式において、溶質濃度を変えていくつもの角度での光散乱を測定し、 $K^*c/R(\theta)$ を縦軸に、 $\sin^2(\theta/2)+kc$ (k は任意の定数)を横軸にプロットしたものをZimmプロット²⁾という(図1)。ここで、角度 θ を 0° に外挿したプロットと濃度を0に外挿したプロットを求めると、 $\theta \rightarrow 0$ では $\sin^2(\theta/2) \rightarrow 0$ なので傾きから A_2 を求めることができ、

$c \rightarrow 0$ では $2A_2c \rightarrow 0$ なので傾きからRMS半径 r_g を求めることができる。また、両プロットのy切片から溶質の分子量 M を決定することができるが、測定が煩雑であり、溶液中に混在する不純物の影響を受けやすいため、汎用性が高いとはいえない。

多角度光散乱法

多くの生化学実験で扱う希薄なタンパク質濃度(1 mg/ml以下)では $2A_2c$ の項は無視することができる。そこで、(1)式より、 $K^*c/R(\theta)$ を縦軸に、 $\sin^2(\theta/2)$ を横軸にプロットし、 $\sin^2(\theta/2) \rightarrow 0$ となるようにプロットすれば、y切片から分子量 M を、傾きからRMS半径 r_g を求めることができる。この方法のもっとも大きな特徴は、分子量既知の標準物質を必要としない絶対分子量測定法であることである。

Wyattは円形のフローセルの周囲に18個のフォトダイオード検出器を配置させた多角度光散乱検出器を開発し、サイズ排除クロマトグラフィーと組み合わせることにより、簡便に多角度光散乱測定を行える装置を開発した³⁾。Wyattの装置を用いたサイズ排除クロマトグラフィー-多角度光散乱測定システム(size exclusion chromatography-multi angle light scattering, SEC-MALS)の概略を示す。試料はサイズ排除HPLCカラムで分子量・粒子形によって分離された後、多角度光散乱検出器を通過し、溶質濃度の測定に用いる示差屈折率計を経由して排出される。ここで、サイズ排除HPLCカラムは試料を分画するとともに、微粒子などの除去を行うフィルター

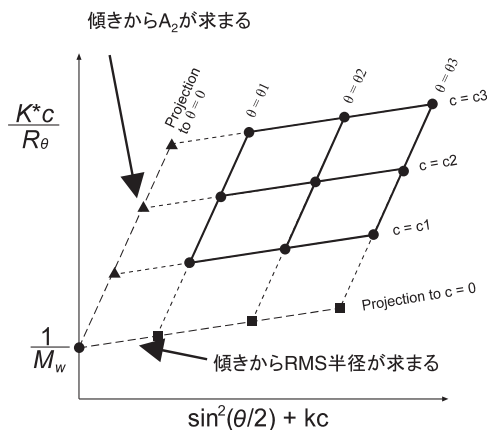


図1. Zimmプロット

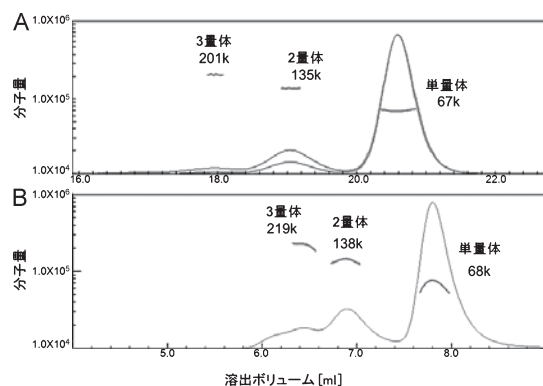


図2. SEC-MALSによるウシ血清アルブミンの分析結果. (A) DAWN-HEREOS II による分析結果. 図中のクロマトグラムは上が90°の光散乱, 下がUV吸収を示している. (B) miniDAWNによる分析結果. 図中のクロマトグラムは示差屈折率計の値を示している.

としても機能しており, 正確な光散乱の測定を可能にしている. 溶出時間ごとに得られた多角度での光散乱測定値と示差屈折率計の測定値はコンピュータに取り込まれ, $K^*c/R(\theta)$ を縦軸に, $\sin^2(\theta/2)$ を横軸にプロットして $\sin^2(\theta/2) \rightarrow 0$ に外挿することで溶質の分子量とRMS半径を求めることができる. 現在, Wyatt Technology社では18角度の同時計測が可能なDAWN-HELEOS IIと3角度の同時計測が行えるminiDAWN TREOSを販売している. 図2に両装置でウシ血清アルブミンの分子量を測定した結果を示す. ウシ血清アルブミンは分子量67kの単量体であるが, ごく一部が2量体, 3量体として存在する. このように, SEC-MALSを用いると, タンパク質溶液中の単量体, 2量体, 3量体を分離して測定することができる. 存在比の少ない3量体ではDAWN-HELEOS IIのほうが正確な値を示しているが, 3角度測定のためのminiDAWNでもそれほど見劣りしないデータを得られることがわかる. また, 同様な多量体形成は抗体などでも見られるため, SEC-MALSはタンパク質医薬の品質管理などに役立つと考えられる.

以下の2章では, SEC-MALSを利用したタンパク質会合体形成の解析例を紹介する.

Mg存在下におけるHeat Shock Protein90の会合体形成

Heat Shock Protein90 (Hsp90) は代表的な分子シャペロンの一つで, 細胞質に多く存在し, 未成熟タンパク質のフォールディングを行い, また, ステロイド系ホルモンの受容や細胞周期の制御, 細胞の増殖, 発がんに関係する. Hsp90は分子量90kのサブユニットの2量体として存在するが, 熱ショックやマグネシウムによって多量体を形成する. Moullintraffortら⁴⁾は, マグネシウム存在下で多量体を形成させた後, 架橋試薬で安定化させてサイズ排除クロマトグラフィーで分離した. 2量体の

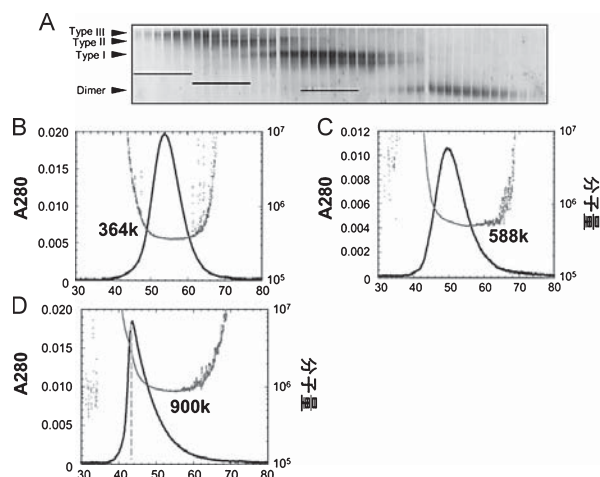


図3. SEC-MALSによるHsp90会合体形成の解析. (A) Hsp90を8 mM MgCl₂と25°C10分間インキュベート後, EDCで架橋してSuperdex S200 (1.0 × 200 cm) で分離し, NativePAGEによって解析した結果. 2量体以外に低分子量側からType I ~ IIIのフラクションが得られた. (B) ~ (D) それぞれ, Type I, II, IIIのフラクションをSEC-MALSで解析した結果. 図中のクロマトグラムはUV吸収でモニターしたものを示している.

他にタイプI-IIIの多量体のフラクションが得られたため(図3A), それぞれのフラクションがSEC-MALSで解析された(図3B-3D). その結果, タイプI-IIIの多量体は, それぞれ, 4量体, 6量体, 10量体であることがわかった. また, タイプIIIのフラクションには分子量1352k以上の巨大な複合体も含まれていた. すなわち, マグネシウムによってHsp90 2量体は4量体や6量体を形成し, 両者の会合によって10量体や更に巨大な複合体を形成することがわかった. このように, SEC-MALSを用いると, 環境変化による同一タンパク質の会合体形成過程をモニターすることができる.

上皮成長因子(EGF)刺激によるEGF受容体の会合反応

EGF受容体は種々の上皮組織に存在し, EGFの結合によって2量体を形成する. 筆者らはEGF結合に伴うEGF受容体の2量体形成反応の解離定数をSEC-MALSを用いて解析した⁵⁾. EGFとEGF受容体の化学量論比を決定するために, 41 μMのEGF受容体細胞外ドメイン(sEGFR)にEGFをモル比0, 0.6, 1.0, 1.5で反応させ, SEC-MALSで解析した. この濃度では加えたEGFはほぼ完全にsEGFRに結合する. 図4に示すように, EGF非存在下ではsEGFRは8.4 mlに単量体として溶出するが, EGF存在下では, ほぼ加えたEGF量に相当する分だけ7.8 mlの高分子量のピークとして溶出した. 各溶出ピーク中のsEGFRとEGFのモル比を解析したところ, 7.8 mlのピーク全体にわたってsEGFRはEGFをモル比1:1で結合していることが確認された. しかし, この条件ではカラム中で試料の希釈や分子量差による分離が起きる

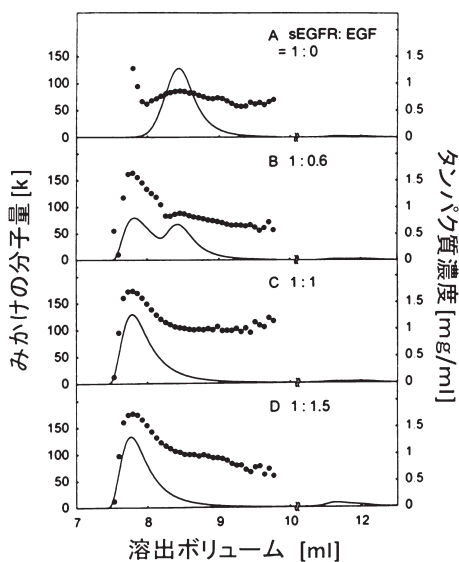


図4. EGF結合によるsEGFR2量体形成の解析. sEGFRとEGFを1:0, 1:0.6, 1:1, 1:1.5のモル比で混合後, SEC-MALSで解析した. 図中のクロマトグラムは示差屈折率計でモニターしたものを示している.

ため, 会合反応の解離定数を評価することはできない. そこで, SEC-MALSにサイズ排除クロマトグラフィーのフロンタル解析法の手法を取り入れて解析を試みた. サイズ排除HPLCカラムに一定濃度の試料を多量に注入してプラトーとして溶出させ, SEC-MALSで解析した(図5). プラトー領域の試料濃度は一定なので, 希釈による平衡の変化はない. 図5から, カラム中の試料濃度の増大に伴ってEGF・sEGFR複合体のみかけの分子量が増大することがわかった. プラトー領域での試料濃度に対するみかけの分子量変化をプロットすることにより, 2量体形成反応の解離定数を $K_{d(agg)}=2.0 \times 10^{-6}$ Mと求めることができた. このように, SEC-MALSはタンパク質の濃度依存的な会合反応の計測にも適用可能である.

おわりに

生体分子間相互作用解析法としては, 近年, 本特集で扱われているNMRや質量分析, カロリーメトリー(熱測定), 表面プラズモン共鳴(SPR), 水晶発振マイクロバランス法(QCM)などの研究・開発が精力的に行われている. しかし, これらの方法の多くは2成分以上の混合によって解析するものが多く, 同一分子の解離会合解析は比較的苦手な場合が多いと思う. それに対し, 本稿で述べたように, SEC-MALSでは溶液中の生体高分子の分子量とRMS半径を求めることができるため, 同一分子の解離会合解析に威力を発揮することができる. 同様な特徴を持つ解析法としては超遠心法, サイズ排除

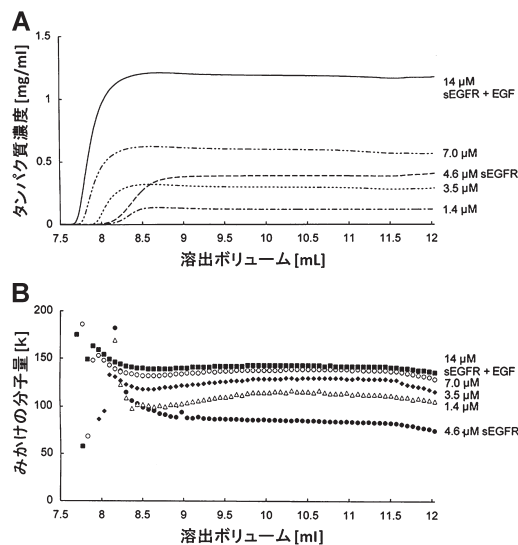


図5. EGF・sEGFR複合体の会合の濃度依存性. 各濃度のsEGFRにモル比1:1.1でEGFを加え, SEC-MALSで解析した. A. プラトー領域のクロマトグラム. B. プラトー領域のみかけの分子量の分布.

クロマトグラフィーのフロンタル解析法がある. また, 本稿ではSEC-MALSを駆使した解析法を紹介したが, 金丸の稿で扱われているコンポジション・グラジエント法を利用した多角度光散乱法を用いれば, より少量の試料で精密な生体高分子間相互作用解析が可能になると期待される. 今後, それぞれの解析法の長所を生かして組み合わせることにより, より複雑な生体高次機能の解明が可能になることを期待している.

本稿で紹介したEGF受容体2量体形成の解析は東京都臨床医学総合研究所在籍中に稲垣冬彦先生の御指導のもとで行われたものです. 測定では昭光サイエンティフィック株式会社の中村雅英氏に大変お世話になりました. また, 光散乱法の原理や多角度光散乱法の紹介では, 昭光通商サイエンティフィック株式会社の中村雅英氏, 鶴田英一氏に大変お世話になりました. お世話になった皆様, 共同研究者の皆様に心より御礼申し上げます.

文 献

- 1) 加藤博章: バイオ高性能機器・新技術利用マニュアル, p.1676, 共立出版 (2004).
- 2) Zimm, B. H.: *J. Chem. Phys.*, **16**, 1093. (1948).
- 3) Wyatt, P. J.: *Anal. Chim. Acta*, **272**, 1 (1993).
- 4) Moullintraffort, L. et al.: *J. Biol. Chem.*, **285**, 15100 (2010).
- 5) Odaka, M. et al.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **122**, 115 (1997).