

定量的分子間相互作用解析のススメ（前編）

今中 洋行

我々が日々暮らしている社会が、複雑な人間関係を通じてつつがなく(!?)運営されているのと同じように、あらゆる生命体の生命活動は、代謝制御、転写制御、免疫応答、シグナル伝達やタンパク質品質管理といったさまざまなシステムを通じて厳密に制御されている¹⁾。近年、生体分子が関与する相互作用の総称であるインタラクトームに関して、人間社会のそれと同じく膨大な組合せによって形成されている相互作用ネットワークを包括的に理解し、生物を制御するためのマクロな視点を整理すべく、インフォマティクス的手法を利用したトップダウン的な解析が主に進められている²⁾。しかし、その根幹は個々の相互作用解析実験によるボトムアップ型の取組みの積み重ねであることは論を俟たない。そして、ミクロな視点からながめると、多様な分子が混在している細胞内外で、環境に応じて特定の相手を見つけて捕まえ(結合)、時に放す(解離)、つまり高い特異性をもって構造や配列を認識する、ダイナミックな生体分子同士や生体分子-環境分子間などの相互作用は、生体分子が進化の過程で得たきわめて優れた特徴なのである。そのため、分子間のやり取り(相互作用)の特性を解析することは、生命現象を解明し、制御するという目的のみならず、医療、創薬、環境や食品分野などにおける多様な応用目的を含め、幅広く必要とされている。

では、相互作用のキャストであるタンパク質、ペプチド、核酸、糖、脂質や化合物がそれぞれ結合・解離する現象はどのように測定し、解析すればよいのだろうか？

現在までに、非常に多くの分子間相互作用解析技術が開発されてきた。しかしながら、それぞれの解析技術は原理のみならず、さまざまな要素が異なっている。そのため、得たい情報(パラメーター)、対象とする相互作用の強さ、機器などの価格や相互作用検出感度、サンプル調製の難易度、サンプルの必要量、化学修飾・濃縮などの前処理の必要性、サンプルあたりの測定時間、測定操作の簡便性や分子固定化の有無なども事前に整理しておかなければならない。そして、実際に実験を行う場合には、相互作用の測定原理を理解しておくだけでなく、それぞれの解析手法のメリット・デメリットをどう考えるか、十分に整理したうえで、自らが必要とする情報を効率よく取得するための最適な解析手法を選択する必要

がある。つまるところ、どの方法で解析するのか、決めるのは意外と面倒なのである。

さて、相互作用検出手法の特徴はそれぞれ異なるのだが、測定によって得られる情報が定性的であるか定量的であるか、いずれかで大別できる。定性的な相互作用検出法としては、たとえば、ツーハイブリッド法、ファウエスタン法、クロマチン免疫沈降法(ChIP法)、EMSA(ゲルシフトアッセイ)やレポーターアッセイなどがあげられ、間接的にタンパク質間あるいはタンパク質-核酸間の相互作用を知ることができるが、それらの詳細については他の成書を参照されたい。本稿では、他方、特に分子間相互作用における親和性を評価できる定量的分子間相互作用解析技術に焦点をあて、その中でも現状の利用動向もふまえ、リガンド分子の固定化の有無で測定法を分類してみた。そして2回にわたってさまざまな技術について紹介しようと思う。まず、より広く利用されているリガンド分子を固定化して行う分子間相互作用解析法から始めよう。

酵素結合免疫吸着法³⁾

(Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)

おそらく、ライフサイエンス分野における分子間相互作用解析の中でもっとも汎用されている手法で、特異性がきわめて高い抗原-抗体反応を利用することが最大の特徴である。主に96穴マイクロプレートを用いるため、同時に多サンプルを処理できる利便性がある。プレートには、異なる基材、表面処理により特定の官能基が提示されているもの、あらかじめ金属キレート剤、グルタチオン、ストレプトアビジンやプロテインA、Gなどによってそれぞれ表面コーティングされたものなど、抗原や抗体を狙い通りに固定化するためのさまざまな選択肢がある。なお、本手法では、抗体に修飾した酵素の反応(あるいは蛍光色素)による発色や発光をシグナルとして検出することで相互作用を定量化する。さらに、ELISAは抗原-抗体反応を基盤にした特異性の高い相互作用検出法であるのみならず、操作に十分な洗浄が含まれているため、測定試料の純度があまり問われないのも特徴といえる。そして、ELISAの測定方法は大きく三つに分類することができ、それぞれ、a) 直接吸着法、b) サン

ドイッチ法, c) 競合法と呼ばれている(図1~3)。

a) 直接吸着法 測定対象となる標的物質(抗原)を含むサンプルを固定化基材に物理的に吸着させ、続いて抗原特異的に結合する抗体(一次抗体)を添加し、抗原-抗体反応を生じさせる。洗浄後さらに一次抗体を特異的に認識する標識抗体(二次抗体)を結合させ、酵素反応(あるいは蛍光強度)を測定することによって標的物質を間接的に定量する方法である。一次抗体として標識抗体を用いる場合は、直接法ともいう。この場合、販売品の選択肢があまり多くなく、自作する場合は一次抗体標識化の手間を要するが、二次抗体を用いる間接法に比べて操作時間は短縮される。直接吸着法は、直接法、間接法のいずれであっても一連の操作がシンプルなのだが、抗原固定化の際に共存物質の影響を受け、十分な吸着量が得られない場合がある。そのような場合はあらかじめサンプルを精製しておく必要がある。

b) サンドイッチ法 抗原を認識する抗体(キャプチャー抗体)をあらかじめ基材上に吸着させておく方法で、抗原を含む試料と相互作用させた後、抗原のキャプチャー抗体とは異なる部位を認識する抗体(一次抗体)を作用させる。最後に直接吸着法の場合と同じく標識抗体(二次抗体)を結合させる。この手法では抗原の異な

る部位を認識する二種類の抗体があらかじめ準備されている必要があるが、特異性の高い抗原-抗体反応を二重に利用するため、相互作用検出の特異性が非常に高く、高感度な検出が可能であることから、特に汎用的に利用されている。また、ELISAではないが、アレルゲンやインフルエンザウイルス検査キットなどで用いられるイムノクロマトでも、同様の原理でナノ粒子上に抗体を固定化し、定性的な標的分子の検出が行われる。

c) 競合法 キャプチャー抗体をまず固定化基材表面に吸着させておく。その一方で、測定サンプルをあらかじめ標識化しておいた抗原と混合しておく。続いて、この混合液を固定化キャプチャー抗体と作用させ、抗体との相互作用を競合させる。サンプル中の抗原量に応じて、標識化抗原の相対量が変わるため、固定化抗体への結合量に影響を及ぼす。最後に、固定化抗体に結合した(つまり測定サンプル中の抗原とは結合しなかった)標識化抗原の活性を測定することで、サンプル中の抗原との相互作用を間接的に定量する。他の2種類の方法とは異なり、この競合法ではサンプル中の抗原が多いほど検出シグナルが小さくなる。

ELISAは他の定量的相互作用解析法と比較して、測定に時間を要すること、実験再現性の精度が若干低いことや相互作用の経時変化を追跡できないため、解離定数(K_d)は算出できるものの、結合速度定数、解離速度定数を決定できないなどがデメリットとしてあげられる。しかし、メリットも多い。原理・操作が理解しやすいだけでなく、抗体の標識法も広く確立され、多様な発色・発光基質の開発も進んでいる。また、測定に必要な抗体入手の際の選択肢も非常に多い。操作に高度な技術を必要とせず、相互作用を感度良く検出できる。そして、多検体の処理にも優れている。特定の標的物質の検出を目的としたルーチン測定にも適しており、そのためのキットが数多く販売されている。さらに、高額な測定機器を必要としないこともあり、利用頻度の高い解析手法である。

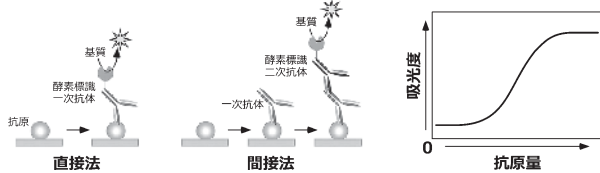


図1. 直接吸着法による測定

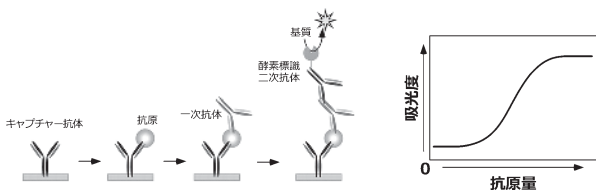


図2. サンドイッチ法による測定

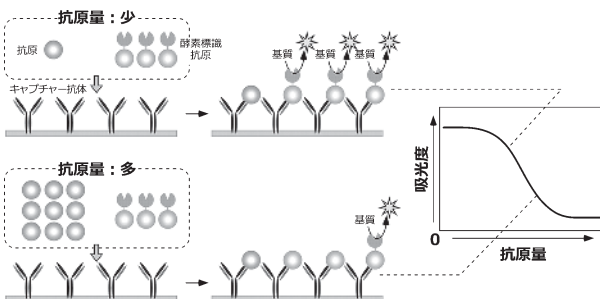


図3. 競合法による測定

表面プラズモン共鳴法⁴⁾

(Surface plasmon resonance: SPR)

分子間相互作用を非標識かつリアルタイムで検出できる技術の一つで、報告例の多さからもわかるが、ELISAを除き、もっとも技術開発が広く進められており、中でもBiacoreシリーズは汎用的に利用されている。SPRはセンサーチップ上で生じた相互作用による質量変化を、表面プラズモン共鳴という光学現象を利用して検出する方法である。センサーチップはガラス上に金の薄膜が蒸着されたもので、さまざまな修飾センサーチップが市販されており、リガンド分子をそれぞれ異なる方法で固定

化することができる。特に広く用いられているのは、カルボキシメチル（CM）基が導入されたデキストランがコーティングされたセンサーチップで、アミノ基、チオール基、カルボキシル基やアルデヒド基などさまざまな官能基を介し、リガンド分子を共有結合により固定化できる仕様となっている。

相互作用の測定は主にマイクロ流路系を介して行われ、その原理はおおよそ次の通りである（図4）。Kretschmann（クレッチマン）配置となるよう、隙間を生じないようにセットされたプリズム・ガラス面と金薄膜に対し、金表面で全反射するように光を照射した場合、境界面でエバネッセント波というエネルギー波が媒質中に染み出してくる。これが金の自由電子の集団振動であるプラズモンという電子密度波（疎密波）と波数の実部が一致した場合、表面プラズモン共鳴が励起される。その際に、特定の角度で入射した光のエネルギーが奪われ、反射光の強度が一部低下し、暗くなる。センサー部分ではこの暗くなった部分の現れる位置（共鳴角度）や特定の角度における反射率の変化を検出する。金表面における分子間相互作用によって質量変化が生じると、媒質の屈折率が変化し、表面プラズモン共鳴が励起される光の反射角度が変化する。そのため、経時的に検出された情報を分子間相互作用量（Response Unit: RU）として変換・出力することができるという仕組みである。なお、特記すべき事項として、エバネッセント波は界面からの距離に対して指数関数的に減衰するため、この現象は金表面近傍（～数百nm）にある分子のみの相互作用が反映され、それ以上離れた位置にある物質は測定に影響しないことがあげられる。

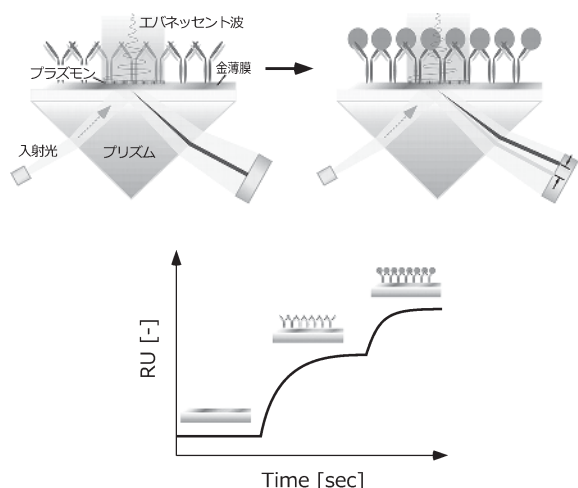


図4. 表面プラズモン共鳴法（SPR）の概要

水晶振動子マイクロバランス法⁵⁾ (Quartz crystal microbalance: QCM)

SPRと同様に分子間相互作用の非標識かつリアルタイム測定技術の一つで、所定の方向で薄く切り出された（ATカット型）水晶切片から構成される基板（水晶振動子）上における分子間相互作用による質量変化を検出するもので、いわゆる微量天秤ともいえる。

水晶は、外部から力を加えられた場合にその大きさに応じて分極するという、天然由来の圧電体材料として知られている。それと同時に、逆に電場を印加した場合には変形する逆圧電体材料としての側面がある。QCMはこの逆圧電体としての特徴を利用したものである。水晶切片の両側に金薄膜を取り付け、これをセンサーチップとする。そして、発振回路を用いてそれぞれの薄膜を介して交流電場を印加すると、水晶切片はある一定の周波数（共振周波数）で振動する。この周波数は水晶切片の厚みに反比例するため、薄い切片であるほど高い周波数の振動子が得られる。分子間相互作用の検出においては、まずセンサーチップ上にリガンド分子を固定化し、標的分子（アナライト）と作用させる。そして、質量変化に応じた水晶の周波数変化（ ΔF ）を分子間相互作用量として精密に測定する（図5）。本手法はナノグラムオーダーの質量変化を定量的に評価できるとともに、フロー計測およびバッチ計測のいずれについても測定装置があり、その利用範囲は広い。また、金薄膜上への他の素材のコーティングもできることから、多様な表面上で分子間相互作用の測定が可能となるのも特徴の一つである。さらに、水晶振動子は基本周波数の奇数倍でオーバートーン発振と呼ばれる共振が生じるため、これを利用した感度の調整も可能である。装置によっては、質量変化に加えて粘弾性の測定もでき、センサーチップ上における相互作用分子の構造特性を同時に評価できる。なお、データを定量的に取り扱うための周波数変化量を質量変

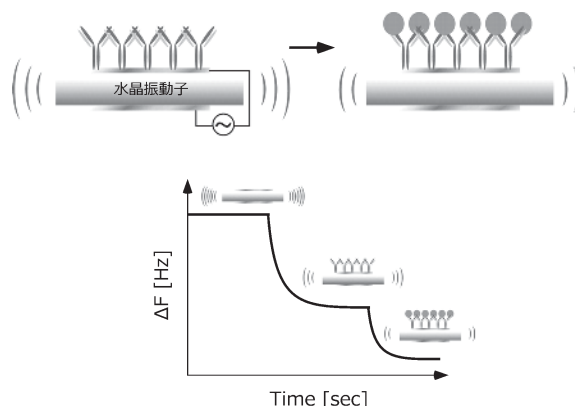


図5. 水晶振動子マイクロバランス法（QCM）の概要

化量と相関させるための理論式としては、Sauerbrey式⁶⁾やKanazawa-Gordon式⁷⁾などが知られている。

反射型干渉分光法⁸⁾

(Reflectometric interference spectroscopy: RIfS)

ナノオーダーの薄膜の膜厚測定などで利用されてきた光学技術を応用した生体分子間相互作用分析法もある。

反射型干渉分光法 (RIfS) は、非標識かつリアルタイム測定が可能な分子間相互作用測定法の一つで、その原理は次の通りである。まず、屈折率の異なる透明な薄膜から構成されるセンサーチップに白色光を照射する。それぞれの層は屈折率が異なるため、照射光は界面で屈折して透過するか、あるいは部分的に反射する。この部分的に反射した光はそれぞれ光路が異なるため位相差が生じ、波長によって互いに強め合ったり弱め合ったりする干渉を起こす。これを波長ごとの光強度として分光器で検出する (図6)。RIfSでは、生体分子層を光学的な厚みを持った薄膜と考える。つまり、リガンド分子のセンサーチップ表面への固定化ならびにアナライト分子との相互作用によって、物理的厚さと屈折率の変化が生じ、それに伴って干渉スペクトルが変調する。そのため、反射光の干渉スペクトルを経時的に測定することで、相互作用状態を追跡できる。さらに、光強度の極値を示す波長のシフト量などの解析により、動力学定数の算出ができる。なお、反射光同士による干渉特性は波長によってそれぞれ異なり、膜厚・屈折率の影響も受けることから、

技術の適用性を考慮し、照射光にはすべての波長を含む白色光が用いられている。検出深度は原理的に波長に依存するため、低分子化合物から大きなアナライト分子 (~数十 μm) が関与する相互作用まで幅広く評価ができる。加えて、測定が温度の影響を受けないことやハイスループット性が高いのも特徴としてあげられる。なお、Pall ForteBio社は、この原理を利用して開発した独自システムをBio-Layer Interferometry法 (BLI法)⁹⁾とよび、これまでに多くのセンサー素子、装置を販売している。

ここまででリガンド分子を固定化して行う定量的分子間相互作用解析法について、主なものを紹介したが、ELISAを除き、SPR、QCMおよびRIfSは、いずれも相互作用の経時変化を追跡することが可能で、解離定数 (K_d) だけでなく、結合速度定数および解離速度定数といったカイネティクス測定もできる。また相互作用検出感度のダイナミックレンジも広く、弱い相互作用から強い相互作用まで幅広く検出できる。必要なサンプル量もそれほど大きな違いはない。ただ、これらを用いた相互作用検出の感度は、ある程度、解析装置の質 (価格?) に依存する。たとえ検出原理が同じであったとしても、検出感度はそれぞれ異なるのに加え、ルーチンで測定したい場合は使用するセンサーチップの価格も大いに気になるところである。一応、どの手法で相互作用を検出するかということに関するおおまかな指針をあげると、検出対象となる標的分子に対する抗体がある場合はELISA、低分子化合物を検出したい、あるいは多検体の処理を必要とする場合はELISAあるいはRIfSが比較的適しているであろう。リガンド分子固定化手法の多彩さと機器の選択肢の豊富さではSPR、操作の簡便さ、特定の固体表面上での相互作用の検出、あるいは固液界面でのリガンド分子の構造特性 (粘弾性など) も含めて評価したい場合はQCMが選択肢の第一候補となる。しかし、先にも述べたが、周辺で利用可能な装置、予算なども含めて総合的に考慮し、手法を決定されたい。

文 献

- 1) Alberts, B. *et al.*: *Molecular Biology of THE CELL*, 6th Ed., GARLAND SCIENCE (2014).
- 2) Petrey, D. and Honig, B.: *Annu. Rev. Biophys.*, **43**, 193 (2014).
- 3) Crowther, J. R.: *Methods Mol. Biol.*, **42**, 1 (1995).
- 4) Nguyen, H. H. *et al.*: *Sensors*, **15**, 10481 (2015).
- 5) Cheng, C. I. *et al.*: *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 1947 (2012).
- 6) Sauerbrey, G.: *Z. Physik*, **155**, 206 (1959).
- 7) Kanazawa, K. K. and Gordon II, J.: *Anal. Chem.*, **57**, 1770 (1985).
- 8) Gauglitz, G.: *Anal. Bioanal. Chem.*, **381**, 141 (2005).
- 9) Concepcion, J. *et al.*: *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **12**, 791 (2009).

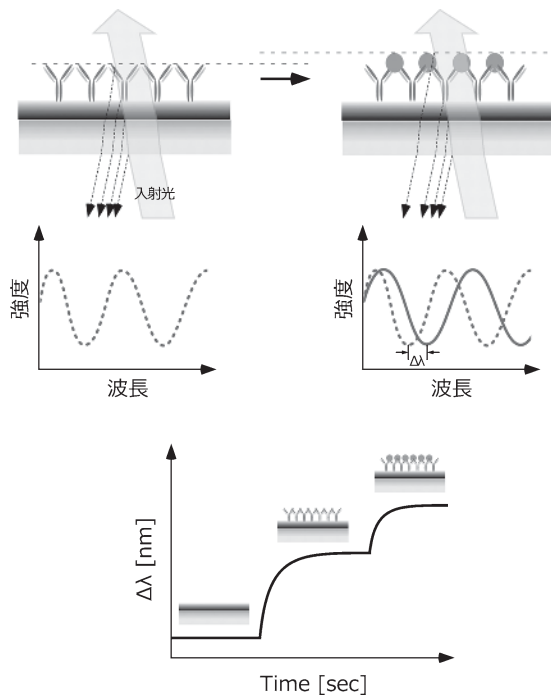


図6. 反射型干渉分光法 (RIfS) の概要