

# 1. 新しい二面偏波式干渉計 (DPI) の技術を利用した低分子とタンパク質の相互作用解析

東京都老人総合研究所老化ゲノムバイオマーカー研究チーム 研究副部長<sup>1</sup>

丸文株式会社システム企画開発室<sup>2</sup>

Farfield Sensors Ltd.<sup>3</sup>

戸田 年総<sup>1</sup>, 中村 徳雄<sup>2</sup>, 吉見 陽児<sup>2</sup>, 吉谷 直栄<sup>2</sup>, Marcus J. Swann<sup>3</sup>

## はじめに

生命科学研究が目指す究極的なゴールは、私達が健康で幸せな生活を営むうえで大きな障害となっている生活習慣病などの慢性疾患や難治疾患のメカニズムを解明し、発症を抑制もしくは遅延することのできる予防医学的な技術を獲得することである。そのためには、まず生命の根源である遺伝子情報を解明する必要があるという考え方に基づいてスタートしたのが、前世紀最大の成果を生んだ国際ヒトゲノム計画<sup>1,2)</sup>である。

計画実行の過程でDNAライブラリー作成技術の向上や塩基配列分析の高速化、配列情報処理ソフトの高性能化などが急速に進み、当初の予測を大幅に上回るスピードで解読が進められた。その結果、前世紀末の2000年に全染色体の9割にあたる領域のドラフトシーケンスの解読が完了したことが国際コンソーシアムから公表され、2001年には、「Nature」<sup>3)</sup>と「Science」<sup>4)</sup>にその概要が発表された。そして、ついに2003年には、ヒトゲノム計画に参加したアメリカ、イギリス、日本、フランス、ドイツ、中国の6カ国の政府機関が、ヒトゲノムDNAの全塩基配列の解読完了を宣言するにいたったことは記憶に新しい。これにより、今後は特定の遺伝子異常によって引き起こされる遺伝病や家族性疾患、複数の遺伝子多型の組み合わせが発病のリスクを高めている生活習慣病などの原因解明に弾みがつくものと期待されている。

メカニズム的には、DNAの塩基配列がタンパク質の一次構造を決定し、それがコンフォメーションを規定し、最終的にタンパク質の機能を決定していることから、塩基配列が解読されれば生命の仕組みがすべてわかりそうなものである。しかし現状では、塩基配列の情報だけからすべてのタンパク質の機能を予測することは困難である。その最大の原因は、多くのタンパク質は様々な翻訳後修飾<sup>5,6)</sup>を受けており、これにより、わずか3万程度の遺伝子から10万種以上もの異なるタンパク質が作られることである。もう1つの理由は、タンパク質は細胞内で様々な分子と相互作用を行っており、個々のタンパク質の分子機能を推定するだけでは細胞内における実際の細胞機能を正確に理解することはできないということである。このため、実際のタンパク質の細胞内における挙動、もしくは細胞内環境に近い溶液中における挙動を直接調べることが重要となる。近年、タンパク質と各種生体分子との相互作用を解析するための原理や装置が数多く開発され市販されるようになってきているが、原理の違いによって、調べられる対象や得られる情報が異なる。特に本稿で取り上げるDPI技術は、チップ上に固定された分子が同種あるいは異種の分子と相互作用を起こした時に生じる微小な厚みと密度の変化を高感度で検出することができる機能を有しており、タンパク質の会合体形成のほかに低分子の結合によるコンフォメーションの変化をリアルタイムで観察することができるものである。

# I 原理

## 二面偏波式干渉計 (DPI) の原理

二面偏波式干渉計 (dual polarization interferometer : DPI) の原理は、200年ほど前に光が波であることを実証したYoungの干渉実験 (図1) に遡る。スリットという2つの光路を通った光は、その先で光波の位相が重なり合った位置では互いに強め合って明るくなり、半波長ずれた位置では弱め合って暗くなる。その結果、スリットの先のスクリーン上に図1のような干渉縞 (フリンジ) が現れる。スリットの状態ではタンパク質の相互作用分析に用いることはできないが、CrossやFreemanら<sup>7,8)</sup> は、図2のようにスリットを2層のガラス薄板構造に置き換え、一方にタンパク質などを固定化するための表面処理を施したセンサーチップを作製した。このガラス製センサーチップの切り口の一端からレーザー光を入射させると、他端から出た光が互いに干渉を起こして干渉縞を作る。このときガラス薄版の表面からごく近傍のところでは弱いエバネッセント光の染み出しが起きるために、センサーチップの表面に分子が結合し表面の屈折率が変化すると、エバネッセント光がその影響を受け、センサーチップ内を進む光の位相にもわずかなずれが生じ、干渉縞のずれとなって現れる。これをCCDで検出できるようにしたものが、DPIである。東京都老人総合研究所では、このDPI技術に基づいて製品化された英国Farfield Sensors社製のAnaLight Bio200 (輸入代理店: 丸文) を導入し、分析技術の開発と応用研究の実施を行っている。

図1 二面偏波式干渉計 (DPI) の基本原理であるYoungの干渉実験

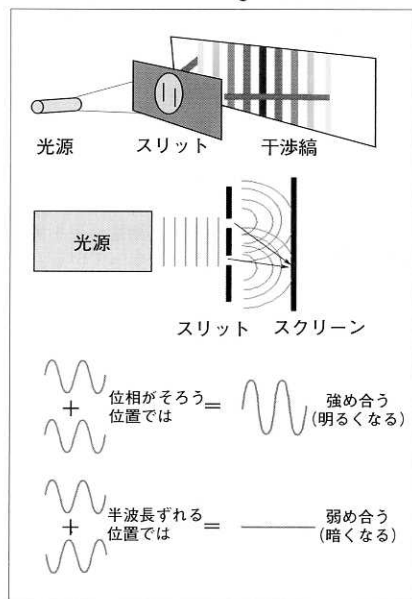
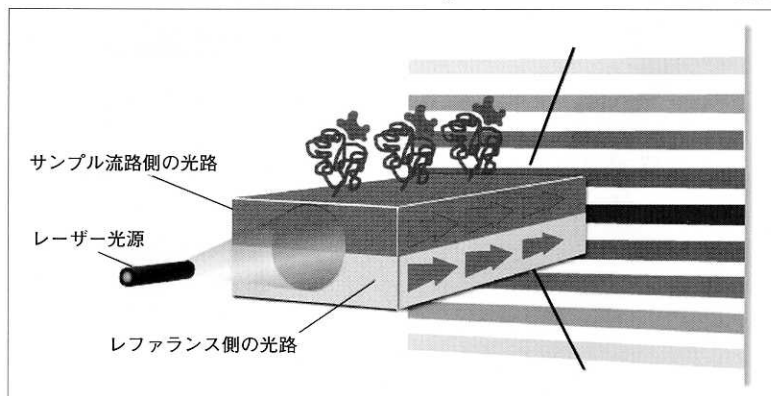


図2 DPI技術を利用して実用化されたAnaLight Bio200のセンサーチップの構造



重なり合った2層のガラス薄板がスリット代わりとなり、この中を通過した光が作る干渉縞をCCDカメラが捉える構造になっている。

### III 実験の実際および手順

#### AnaLight Bio200 による解析例

##### 〈1〉 ストレプトアビジンへのビオチンの結合<sup>9)</sup>

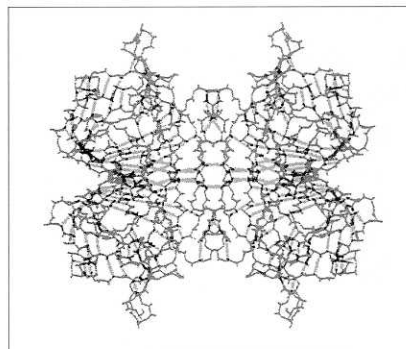
ストレプトアビジンは、通常図6のような4量体の構造をとっており、それぞれのサブユニットごとに1個の特異的ビオチン結合サイトを有している。ストレプトアビジンサブユニットの分子量は16491 Daであるのに対し、ビオチンの分子量は244 Daと非常に小さいため、ビオチンを固定化したセンサーチップ表面へのストレプトアビジンの結合を見ることは比較的容易であるが、逆にストレプトアビジンへのビオチン結合を観察するためにはセンサーの感度が相当高くなければならない。AnaLight Bio200を用いてこのような相互作用を観察する場合には、通常アミンチップ<sup>\*1</sup>（表面にアミノ基を有するセンサーチップ）を用い、オフラインで（センサーチップを装置にマウントする前にデスク上で）ビオチン化を行っておく。

- 1) デスク上にセンサーチップを置き、表面張力を利用してチップ表面に2 mg/mLのSulfo-NHS-LC-biotin（図7）溶液を載せ、室温で5分間静置してビオチンを固定化させる（図8A）。
- ↓
- 2) ビオチン固定化後のチップは、精製水、イソプロパノールの順でよく洗浄し、装置に装着する。
- ↓
- 3) 送液用のポンプシリンダー内に、十分に減圧脱気したPBSを入れ、送液を開始する。
- ↓
- 4) 送液をバッファーに戻しバックグラウンドが十分に安定したところで、バッファーに溶解したストレプトアビジンをローディングし、ビオチンを介して固定化する（図8B）<sup>\*2</sup>。
- ↓
- 5) 再び送液をバッファーに戻し、バックグラウンドが十分に安定したところで、バッファーに溶解したビオチンをローディングし、ストレプトアビジンへのビオチンの結合（図8C）を観察する。  
（結果は図11）

#### 実践ポイント\*2

AnaLight Bio200の具体的な操作法についてはここでは詳しく述べないが、測定を開始する前にセンサーチップ表面の屈折率の変化に対するレスポンスのキャリブレーションを行うために、80% EtOHおよび純水をこの順に流し、TMとTEのレベルを記録しておく。

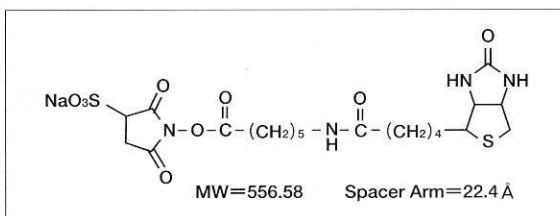
図6 ストレプトアビジンの4量体構造



#### 実践ポイント\*1

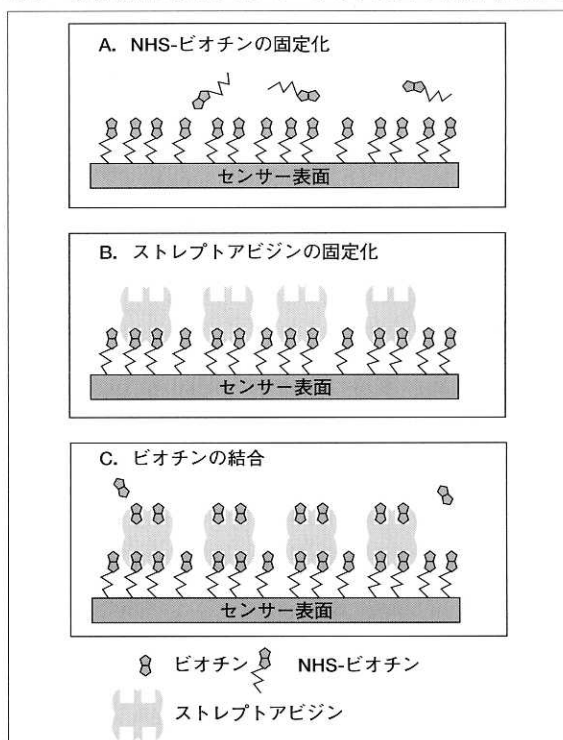
AnaLight Bio200用のセンサーチップとしては、この他にチオールチップやC18チップなども市販されているので、目的に応じて使い分けるとよい。

図7 Sulfo-NHS-LC-biotinの化学構造



Sulfo-NHS-LC-biotinには1個のスルホスクシニミド基があり、これを介してタンパク質のアミノ基に共有結合する。

図8 解析例1におけるセンサーチップ表面の状態（概念図）



## 〈2〉カルシウムの結合によるトランスグルタミナーゼのコンフォメーション変化

多くのタンパク質で、金属イオンが特異的に結合することによってコンフォメーションの変化が起きることが知られており、金属イオンもまたタンパク質の機能調節因子として重要視されているが、AnaLight Bio200はそのような金属イオンの特異的結合によるコンフォメーションの変化の解析にも利用できる。ここでは、トランスグルタミナーゼに対するカルシウムの特異的結合を解析した例を紹介する。

1) アミンチップを装置にマウントし、PBSの送液を開始する。上記の実験と同様に、80% EtOHおよび純水を流して、センサーチップのキャリブレーションを行った後、実際の分析に使用する 50mM Tris-HCl, pH 7.6 を流して、バッファの屈折率によるバックグラウンドのレスポンスを測定しておく。

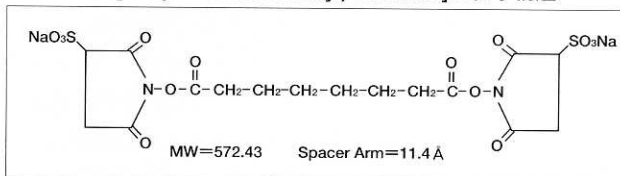


2) PBSに溶解した4mg/mL BS<sup>3</sup> (図9) を両方のチャンネルに流し、チップ表面に二価性架橋剤を結合させた後、サンプル測定用のチャンネルにだけ1mg/mL トランスグルタミナーゼ溶液を流してタンパク質を固定化する (図10A)。もう一方のコントロールチャンネルには 0.1M エタノールアミン-HCl, pH 7.6 を流しBS<sup>3</sup>の活性基をブロックする。このようにして調製された「トランスグルタミナーゼ固定化チップ」の表面に種々の濃度のCaCl<sub>2</sub>溶液を流し、カルシウムの結合によって生じるコンフォメーションの変化 (図10B) を測定することになるが、カルシウムを用いる分析にPBSは使えないので、ここでいったんシリンジポンプを止め、送液バッファを50 mM Tris-HCl, pH 7.6 に切り替える。



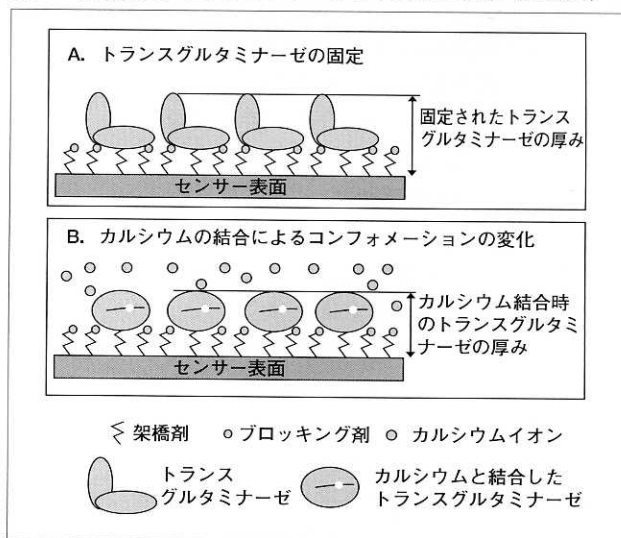
3) 両方のチャンネルに種々の濃度のCaCl<sub>2</sub> およびNaCl溶液を流し、TEとTMの変化を測定する。  
(結果は図13)

図9 BS<sup>3</sup> [Bis (Sulfosuccinimidyl) suberate]の化学構造



BS<sup>3</sup>には2個のスルホスクシニミド基があり、これを介してタンパク質のアミノ基に共有結合する。

図10 解析例2におけるセンサーチップ表面の状態 (概念図)



## IV 実験結果

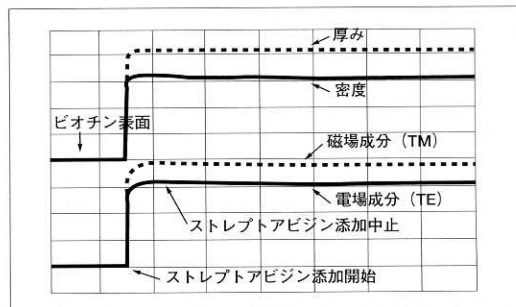
### 1. ストレプトアビジンへのビオチンの結合

測定結果の一例を図11および図12に示す。ストレプトアビジンを流すと、センサーチップ表面に固定化されたビオチンにストレプトアビジンが結合することによって、チップ表面での分子の厚みと密度の上昇が観察される(図11)。このように分子量の大きなストレプトアビジンがチップに結合する反応は、SPR法や一分子蛍光測定法によっても容易に観察できるものであるが、さらにAnaLight Bio200では、ストレプトアビジンが結合したチップの表面にビオチンを流すことによって、図12に示すようなTEとTMの変化を観察することができる。これらのシグナルを解析することによって、センサーチップ表面に結合したストレプトアビジンにさらにビオチンが結合することによって生じるコンフォメーションの変化を検出することができる。

すなわち、第1回目のビオチン添加時には、ビオチンの特異的な結合によってストレプトアビジン分子層の厚みが減少し密度は上昇する。短時間で特異的なビオチン結合サイトが飽和された後、さらに非特異的な吸着がゆっくり進行し、特異的結合によって生じた厚みと密度の変化は見かけ上いったん打ち消されるが、ビオチンの添加を中止すると、非特異的に吸着されたビオチンがゆっくり外れ、ストレプトアビジン分子の層の厚みと密度は特異的結合のみのレベルに復帰して安定する。第2回目のビオチン添加では、すでに特異的な結合サイトがビオチンで飽和されているため、非特異的な吸着によるレスポンスのみが観察される。

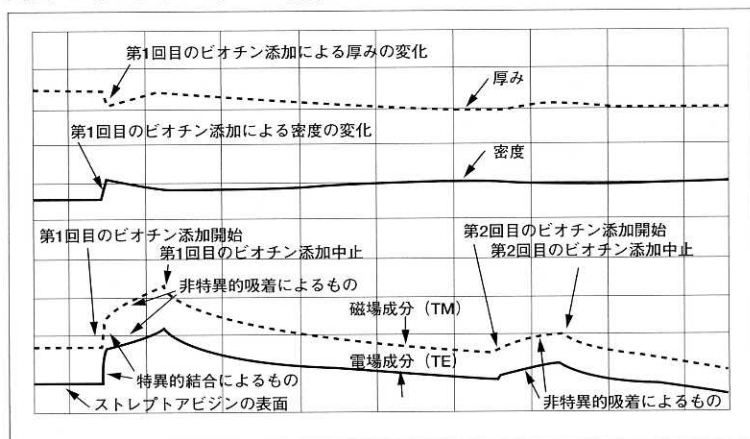
このようにAnaLight Bio200による解析によって、①ストレプトアビジンに対するビオチンの結合には親和性の高い特異的なものと親和性の低い非特異的なものがあること、②ビオチンの特異的な結合ではストレプトアビジンのコンフォメーション変化が分子層の厚みと密度の変化として観察されるが、非特異的な吸着ではそのようなコンフォメーションの変化は起きないということがわかる。このようにDPI技術を利用したAnaLight Bio200では、タンパク質と低分子の生体物質の相互作用によるタンパク質のコンフォメーション変化を高感度で検出することが可能であり、今後様々なタンパク質の機能調節因子の探索や親和性の解析において力を発揮するものと考えられる。

図11 ビオチンが固定化されたセンサーチップ表面へのストレプトアビジンの結合によるシグナルの変化



ストレプトアビジンの結合では、センサーチップ表面の厚みと密度がともに大きく上昇する。結合が強いため、バッファーに切り替えた後もその変化は安定に維持されていることがわかる。

図12 ストレプトアビジンが結合したセンサーチップ表面へのビオチンの結合

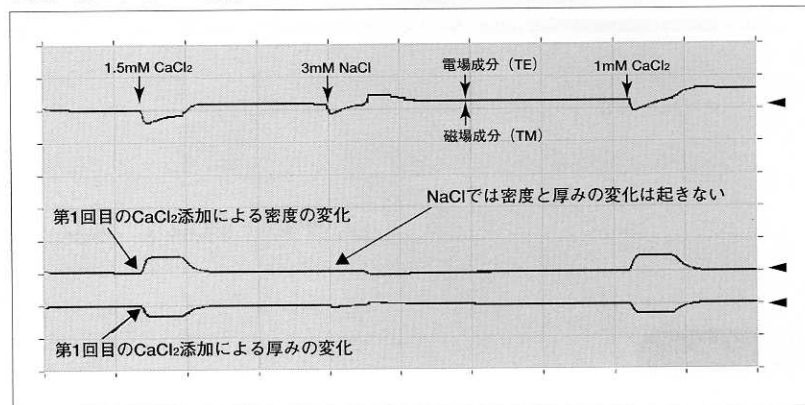


4量体構造のストレプトアビジンには、4つのビオチン結合部位があるので、センサーチップに固定化された後もそのうちの数カ所はフリーになっていると考えられる。これにビオチンを流すと、特異的な結合と非特異的な吸着が観察される。バッファーに切り替えると非特異的に吸着したビオチンは洗い流されるが、特異的に結合したものは残るために、2回目以降は非特異的な吸着のみが観察される。ストレプトアビジンに特異的にビオチンが結合すると、わずかながら密度が上昇し、厚みが減少する様子が観察される。

## 2. カルシウムの結合によるトランスグルタミナーゼのコンフォメーション変化

図13に、解析結果の一例を示す。TEとTMの変化から、センサーチップ表面に固定化されたトランスグルタミナーゼ分子はCaCl<sub>2</sub>溶液を流すと密度が上昇し、厚みが減少する。その結果、トランスグルタミナーゼ分子は、カルシウムが特異的に結合することによって、よりコンパクトなコンフォメーションに変化することが示唆された。このような変化はNaClを流した時にはみられたことから、カルシウムの結合に特異的な変化であると考えられる。

図13 カルシウムの結合によるトランスグルタミナーゼのコンフォメーション変化



### おわりに

二面偏波式干渉計の原理に基づいて開発されたAnaLight Bio200は、タンパク質間の相互作用のみならず、タンパク質と低分子の生体物質や薬物、金属イオンなどとの相互作用によるコンフォメーションの変化の解析にも利用できる。また、チップ上に流す作用物質の濃度を段階的に変化させることによって、タンパク質と作用物質との間の解離定数を求めることもできる。このようにDPI法は、リガンドを蛍光標識することなくリアルタイムでタンパク質と低分子物質間の特異的相互作用を観察できる方法であることから、今後さらに、新規タンパク質の機能解析や、阻害物質など調節因子の分析、創薬標的の探索などに幅広く利用されるものと思われる。

### 引用文献

- 1) Lewin R : Science 235, 747-748, 1987.
- 2) Palca J : Nature 325, 651, 1987.
- 3) Lander ES, Linton LM, et al : Nature 409, 860-921, 2001.
- 4) Venter JC, Adams MD, et al : Science 291, 1304-1351, 2001.
- 5) Rattan SI, Derwentzi A, et al : Ann N Y Acad Sci 663, 48-62, 1992.
- 6) Veenstra TD : Adv Protein Chem 65, 161-194, 2003.
- 7) Cross GH, Ren Y, et al : J Appl Phys 86, 6483-6488, 1999.
- 8) Cross GH, Reeves A, et al : J Phys D: Appl Phys 37, 74-80, 2004.
- 9) Swann MJ, Peel LL, et al : Anal Biochem 329, 190-198, 2004.

### 参考図書

† 中村徳雄：臨床検査 47(11), 1329-1338, 医学書院, 2003.

### 関連ホームページ

生体分子間相互作用・機能・構造解析装置 (丸文株式会社のホームページ)  
Introduction to AnaLight®Bio200 Technology  
構造変化の定量測定とサイズと密度を利用したタンパク質相互作用の化学量論比測定

<http://www.marubun.co.jp/bio/analight.jsp>  
<http://www.marubun.co.jp/bio/pdf/fs001.pdf>  
<http://www.marubun.co.jp/bio/pdf/fa007.pdf>