

タンパク質間相互作用の 定量的解析手法の新展開

特集によせて

内山 進^{1*}・有坂 文雄²

近年、タンパク質の研究が盛んになってきた。ゲノムが解読され、機能未知のタンパク質の役割解明が必要になってきたこと、そして、高等真核生物の組換えタンパク質の大量調製が可能となってきたことなどがこうした現状の背景にある。多くのタンパク質は、他のタンパク質や低分子と相互作用して機能を発揮する。また、自己会合して機能を発揮するタンパク質も多数ある。したがって、タンパク質間相互作用の理解は、タンパク質の機能を知る上できわめて重要である。

タンパク質の相互作用解析には定性的な手法と定量的な手法がある。酵母ツーハイブリッド法やプルダウン法などが代表的な定性的な手法である。定量的相互作用解析の目的は、化学量論と平衡定数の取得である。平衡定数は、複数種類の分子がそれぞれ単体（フリー）の状態が存在する場合と、相互作用し複合体として存在する場合のエネルギー差に対応するため、系をマクロな観点から理解するために必須のパラメーターである。

本特集では、タンパク質の相互作用解析の「手法」に焦点をあて、各手法の特長や課題についてエキスパートによる解説を掲載した。特に、定量的相互作用パラメーターが得られる手法を中心とした。各手法は、生命現象の理解のみならず、合理的創薬などの新しいタイプのものづくりにおいても利用される重要なアプローチである。

表1に、近年の研究においてしばしば利用される定量的相互作用解析手法をまとめた。この表から明らかのように、手法ごとにカバーする解離定数の範囲が異なっている。これは、各手法の測定感度が異なるためで、原則的には、濃い溶液の測定が可能な手法は中程度の相互作用（解離定数で $10^{-8} \sim 10^{-6} \text{M}$ 程度）から弱い相互作用（ $10^{-6} \sim 10^{-4} \text{M}$ 程度）までをカバーし、薄い溶液の測定が可能な手法は、強い相互作用（ $10^{-10} \sim 10^{-8} \text{M}$ 程度）から中程度の相互作用までをカバーしている。

表1. 定量的分子間相互作用解析法の特徴

解析手法	超遠心分析 (AUC)	質量分析 (MS)	滴定型熱量計 (ITC)	分光学的手法 (蛍光, CD, LS)	NMR	CG-MALS	SPR
観測対象	沈降挙動 濃度勾配	質量 衝突断面積	結合熱	分光学的特性	化学シフト	散乱強度	表面状態
得られる パラメーター	分子量 形状 化学量論 K_D , dG , dH_{int} , K_D , K_{on} ビリアル係数	質量 形状 化学量論 相互作用部位	結合モル比 dH , dS , K_D , dG	結合モル比 K_D , dG , dH_{int} , 構造情報 構造変化	相互作用部位 結合モル比 立体構造 構造変化 K_D	分子量 化学量論 K_D ビリアル係数	結合モル比 K_{on} , K_{off} , K_D , dH_{int}
得意な解離定数 (K_D) 範囲 / M	$10^{-3} \sim 10^{-8}$	$< 10^{-8}$	$10^{-8} \sim 10^{-11}$	$10^{-8} \sim 10^{-11}$	$10^{-3} \sim 10^{-9}$	$10^{-3} \sim 10^{-6}$	$10^{-4} \sim 10^{-11}$

それぞれの解析手法の特徴を以下に要約する。分光学的手法 (CD, 蛍光, NMR など) や滴定等温型熱量計 (ITC) では、相互作用を調べたい分子の量比を変えながら、結合に伴う変化量をモニターし、ファントホッフ式などの相互作用モデルを用いて滴定曲線を解析する。分光学的手法では、相互作用パラメーターの取得に加えて、相互作用に伴う構造変化や局所的な環境変化などに関する情報も得られる。表面プラズモン共鳴 (SPR) 法や水晶振動子マイクロバランス (QCM) 法などの、分子を固定化して表面状態の変化をモニターする手法は、微小流路との組み合わせによりリアルタイムで相互作用をモニターできるため、解離・会合速度定数も得られるという特長がある。また、滴定混合装置と多角度光散乱を組み合わせた手法 (CG-MALS) が登場し、相互作用に伴う分子量変化の連続モニターが実現され、相互作用パラメーターの取得が可能となってきた。ただし、こうした手法から得られたデータの解析には、いくつかの仮定が必要であるため、慎重な取り扱いが必要である。ITCは、結合に伴う熱量変化の総和を直接測定できる手法であり、相互作用に伴う熱力学量の算定には欠かせない。

一方、超遠心分析 (AUC) や質量分析 (MS) は、相互作用により形成した複合体を、質量や形状に基づいて分離しながら、複合体を直接測定する手法で、条件が整っていれば、1回の測定から相互作用パラメーターを得ることができる。また各成分の分離を行うため、複数の成分が共存している場合でも解析が可能である。

筆者らは、本年3月10日に「第一回生体分子相互作用解析フォーラムワークショップ」を開催し、上記で紹介した相互作用解析法について国内の研究者らによる講演と参加者による討論を行った。本特集では、上記ワークショップの各講演者に執筆を依頼した。「生体分子相互作用解析フォーラム」は、本特集の編者の一人である有坂が以前より運営していたメーリングリスト「超遠心分析フォーラム」を発展解消し、有坂と内山が組織したメールおよびウェブベースの相互作用解析にフォーカスした研究会であり、現在200名以上の研究者が登録している。本特集号をご覧になり興味を持たれた方は、以下のURLにアクセスして頂ければと思う。

<http://biomoleculesinteractions.com>

* 著者紹介 ¹大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 (助教) E-mail: suchi@bio.eng.osaka-u.ac.jp
²東京工業大学大学院生命理工学研究科分子生命科学専攻 (教授)