

# 超遠心分析法および非変性質量分析法による タンパク質間相互作用解析

内山 進\*・野田 勝紀・福井 希一

タンパク質間の相互作用を定量的に解析する場合、重要となるパラメーターは化学量論と親和定数である。超遠心分析は、この両者が正確に得られる手法である。超遠心分析の特徴は、溶液中での相互作用を直接解析できること、測定の際にタンパク質を修飾する必要がないこと、幅広い溶媒条件での測定が可能であること、解析は熱力学と流体力学に基づく強固な理論に基づいていること、などがあげられ、こうした特長から、超遠心分析は溶液中におけるタンパク質間の相互作用の定量的解析に適した手法であると認識されている。

タンパク質の相互作用により、ある特定の化学量論の複合体のみが形成される場合、相互作用解析は比較的容易である。特に、Shuckらが開発したSedfit<sup>1)</sup>やSedphat<sup>2)</sup>、さらにDemelerらが開発したUltrascan<sup>3)</sup>といった解析プログラムの登場により、従来は難しかった沈降速度法の数値解析が可能となった現在では、質の良いデータを取得すれば、信頼性が高い相互作用情報が得られるようになってきている。また、従来から利用されてきた沈降平衡法により得た測定結果を非線形フィッティングにより解析することで、相互作用の定量的パラメーターを得るアプローチも依然として有効である。まず本稿では、超遠心分析による相互作用解析として、(1) 沈降平衡法による化学量論と親和定数決定、ついで(2) 沈降速度法による化学量論と親和定数決定、について解析例を交えて記述する。

ところで、複数種類の複合体が同時に形成される場合には、複合体の種類の特定が難しく、さらに、各複合体の存在比を求めることは難しいのが現状である。また、タンパク質の自己会合においても、大きさが異なる会合体を複数種類生じる場合もあるが、こうした多分散状態を定量的に解析したケースはきわめて少ない。こうした取り扱いが難しい多分散状態をとる相互作用の解析手法として、“非変性(複合体)質量分析法”が、有力な手法として用いられつつある。非変性質量分析法は、非共有結合により相互作用する複合体の相互作用を維持したまま、質量分析を可能とする手法でオックスフォード大学のRobinsonらによって広く利用されるようになって

た<sup>4,5)</sup>。ただし、質量分析法は気相中での質量情報であり、溶液中での相互作用を本当に反映した結果となっているかについては疑問が残る。

近年、筆者らは質量分析法から得た相互作用情報を超遠心分析の数値解析の際に利用し、多分散状態であっても複合体の特定と各複合体の量比を定量的に明らかとする手法が有効であることを見だし、報告を行ってきた。

そこで、本稿では、(3) 超遠心分析法と質量分析法の結果の比較、および(4) 質量分析で求めた化学量論を超遠心分析のデータ解析に用いて、多分散状態を明らかとする手法を紹介する。なお、ここでは超遠心により沈降する溶質としてはタンパク質のみを考え、塩や緩衝成分などの沈降は考慮に入れないこととする。

## 沈降平衡法による化学量論と親和定数決定

単分散もしくは分子種が2~3程度の場合には平衡法での解析が可能である。たとえば、タンパク質AとBの相互作用によりAB複合体あるいはAB<sub>2</sub>複合体などの特定の複合体のみが形成する場合や、モノマーダイマー平衡系あるいはモノマーテトラマー平衡系のようなケースである。

回転数が数万rpm程度の遠心力場においては、分子量が10万以下のタンパク質は完全に沈降することはなく、遠心力と拡散力の釣り合いに従った濃度勾配を形成する(図1)。

平衡に達した際の分子量Mの溶質の濃度勾配は以下の式(1)で表される。

$$C_i(r) = C_i(r_0) \exp[MH(r - r_0)^2] \quad (1)$$

ここでHは、分子の偏比容、遠心速度、および測定温度により決まる定数である。

複数の分子種が存在すれば、実際に観測される濃度勾配は、すべての分子種の濃度勾配の総和となる。したがって、相互作用するAとBの2種類のタンパク質の混合溶液の場合、フリー(結合していない)のAとフリーのB、および複合体の濃度勾配の総和として観測されるが、セルの各場所での各分子種の濃度は平衡定数に従った値と

\* 著者紹介 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

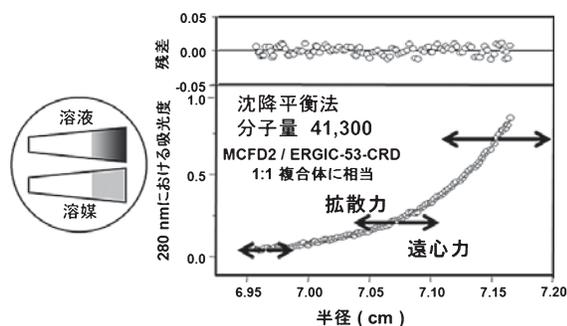


図1. 沈降平衡法による血液凝固に関連する2種類のタンパク質間相互作用の化学量論決定

なっている。たとえば、相互作用によってABの複合体が形成される場合、観測される濃度勾配  $C_{total}(r)$  は各分子種の濃度勾配の総和  $\sum C_i(r)$  となる。

したがって、観測された濃度勾配に対して、相互作用モデルに基づき各分子種の濃度勾配の総和を表すフィッティング関数を作製し、非線形フィッティングを行うことで、平衡定数の決定が可能となる。なお、化学量論の決定のみが必要な場合には、解離定数よりも十分に高い濃度で測定を行い単一成分として解析すれば、良好な結果が得られる(図1)<sup>6)</sup>。

これは、大部分の分子が複合体を形成しているため、フリーの濃度勾配の寄与が小さいため、おおむね解離定数が  $10^{-9}$  [M] より小さい系の場合には、十分に利用できるテクニックである。想定される複合体が複数種類ある場合には、化学量論が異なる相互作用モデルを構築し、非線形フィッティングを実施し、実測データとフィッティング関数との差の二乗平均 (RMSD) に基づいて、観測データに最も適合するモデルを選択することとなる。図2に示した、抗原と抗体の相互作用の解析例では、フリーの抗原とフリーの抗体、および複合体の濃度勾配を作成し、さらに各半径位置では化学平衡の関係が成り立つことを考慮し、モデル式を構築し、観測された濃度勾配を非線形フィッティングにより解析した<sup>7)</sup>。残差プロットから1:2複合体が有意に形成されていることが分かる。なお、沈降平衡法による相互作用解析の詳細は、生物工学ハンドブックに記載しているので参照されたい<sup>8)</sup>。

### 沈降速度法による化学量論決定

回転数が6万rpmの場合、半径 (r) 7cmに位置する溶液中のタンパク質には20万g以上の遠心力がかかることとなる。こうした大きな遠心力場では分子が完全に沈降するため、溶液と溶媒の界面が形成される。この界面 (移動界面と呼ばれる) の移動速度と拡大速度をリア

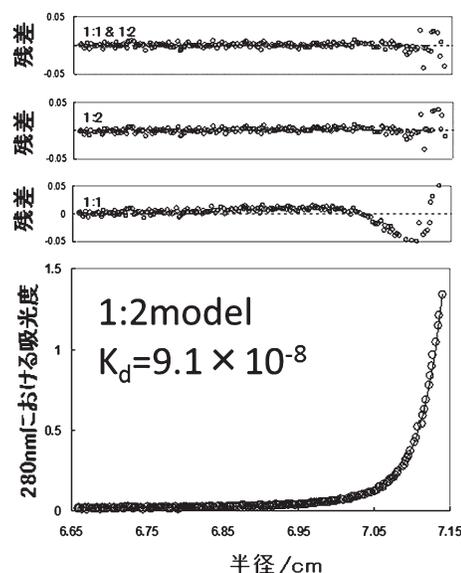


図2. 沈降平衡法によるBSAと抗BSA抗体相互作用の化学量論と解離定数の決定

ルタイムで測定した沈降挙動に基づいて、溶液中における分子の物性を解析するのが沈降速度法である(図3)。遠心力場における粒子の沈降挙動は、熱力学と流体力学の理論に基づいたLamm方程式により表される。Lamm方程式には、沈降係数 (s) と拡散定数 (D) が含まれ、sは分子の分子量と摩擦係数 (f) により決まる数値で、一方、Dはfにより決まる数値である。なお、fは分子の流体力学的形状を反映する数値である。したがって、測定データをLamm方程式により解析できれば、溶液中の分子の分子量と形状を求めることができる。

ところが、二階微分方程式であるLamm方程式の一般解 (解析解) は知られていない。そのため、沈降速度法の解析は1970年代以降大きな進捗がなかったが、2000年頃からCPUの処理能力の向上により時間微分の利用による解析<sup>9)</sup>、移動界面の直接フィッティング<sup>10)</sup>やLamm方程式の数値解をコンピュータにより求める数値解析が可能となってきた<sup>1-3)</sup>。以下に示す相互作用解析法もこうした数値解析を利用したものである。C(s)分布解析法は、Sedfitに実装されている解析法で、数値解析と最少二乗法により観測された沈降挙動に最も適合する沈降係数の分布と摩擦係数比 (流体力学的形状を反映) を求めることができる。C(s)解析では分子の形状を反映する摩擦係数比 (形状因子) を一定 (つまり形状が同一) として解析を行うため、複数種類の分子が存在する系において、各成分の分子量や形状を正確に求めることは難しい。したがって、C(s)解析により化学量論の決定したい場合には、解離定数よりも高い濃度域の溶液を調製し、

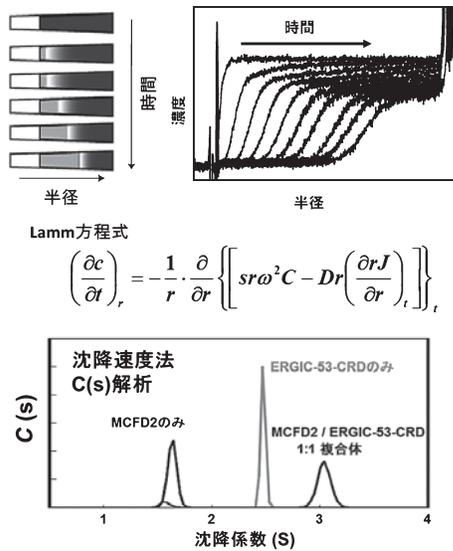


図3. 沈降速度法. (上)移動境界, (中)Lamm方程式, (下)血液凝固に関連する2種類のタンパク質間相互作用の化学量論決定.

複合体の存在比ができる限り高く、フリーの存在比が低い状況で測定を行う工夫が必要である。図3下には、血液凝固に関連する2種類のタンパク質間相互作用の解析結果の一例を示した<sup>6)</sup>。2種類のタンパク質の濃度と混合比をマトリックス状に設定し測定を行い、各ピークの大きさや位置を確認しながら、複合体が占める割合が高い測定条件でのデータから化学量論を決定した。

#### 沈降速度法による相互作用解析の注意点

解離会合を伴う相互作用系の沈降速度法では、C(s)解析を行った際のピーク位置が各成分の存在量によって移動するケースがある。これは解離速度定数 ( $k_{off}$ ) が速い場合に起こり、 $k_{off}$ が $10^{-3}(\text{sec}^{-1})$ より大きくなると、たとえ解離定数より低い濃度で測定を行っても、ピーク位置の移動が起こる<sup>11,12)</sup>。図4(左)に実例を示したが<sup>13)</sup>、このように各分子種の沈降係数が異なると分子の沈降速度が異なるため、遠心を開始すると界面付近に濃度勾配が生じ、複合体が解離するために起こる(このような場合、移動境界面は反応境界面と呼ばれる)<sup>11,12)</sup>。特に、解離定数よりも濃度が低い場合には、複合体の沈降係数は分子量と形状から予想される値よりも小さくなるために、見かけの沈降係数と形状因子から分子量を求めても、実際の化学量論の決定には至らない。したがって、相互作用解析を行う場合には、成分の濃度を変化させて、沈降係数の変化をモニターしながら、解析を進めることが重要である。

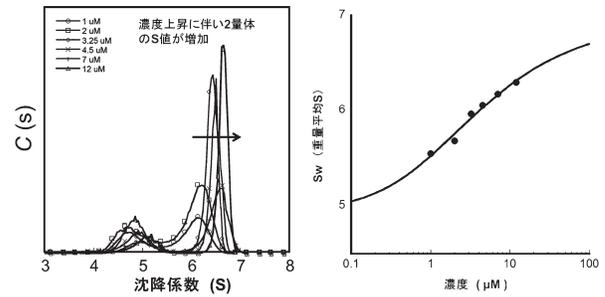


図4. セマフォリン2量体化の解離定数決定. (左)各濃度でのC(s)解析, (右)Sw (S値の重量平均)の濃度依存性と非線形フィッティングによる解離定数決定<sup>13)</sup>

#### 沈降速度法による親和定数決定

沈降係数の重量平均値 ( $Sw$ ) は存在する分子の存在比に従った数値となることが示されている。そのため、モノマーダイマーである自己会合の系の場合、濃度を変化させて各濃度での $Sw$ を求め、モノマーおよびダイマーのそれぞれの沈降係数、および平衡定数を変数として、非線形フィッティングを行うことで平衡定数を求めることができる(図4右)<sup>13)</sup>。こうした手法は解離会合を伴う自己会合系の解析において特に有効であるが、2種類以上の分子種の相互作用においても各分子種の正確な吸光係数が判明していれば、利用できる。

#### 超遠心分析法と非変性質量分析法の結果の対応関係

これまでに筆者らは、異なる解離定数( $10^{-9}$ から $10^{-6}[\text{M}]$ )を持つタンパク質間相互作用について、超遠心分析と平行して非変性質量分析法による相互作用解析を進めてきた<sup>6,7,14,15)</sup>。その結果、検出された複合体の化学量論は両者において概ね一致していた。しかしながら、質量分析においては、複合体の質量が大きくなるにつれてピーク強度が減少する傾向があり、超遠心分析と比べ、定量性が低い結果となっていた<sup>14)</sup>。

一般的に、質量分析では分子のイオン化が必要であるが、分子種ごとにイオン化効率が異なるため、定量性が低いと認識されている。さらに、質量分析で検出される複合体は真空度が高い状況での相互作用を反映した結果であるため、必ずしも溶液中での相互作用に対応する結果とならないとの指摘もある。

しかしながら、質量分析が持つ高い質量(分子量)分解能は正確な相互作用解析の実現には不可欠である。通常、非変性条件での質量分析では、タンパク質の質量の測定値は数Daから100Da程度の誤差を持つ。タンパク質の質量は多くの場合10kDa以上であり、多くの場合、

分子量分布が小さい組換え体を用いること、超遠心分析から得る分子量は数%の誤差を持つこと、を考えると、質量分析が持つ誤差は十分に許容できる範囲であり、むしろ積極的な活用が期待できるといえる。

### 質量分析法の結果を利用した超遠心速度法の解析

超遠心分析はすでに述べたように解離会合を伴う相互作用解析のために強力な手法であるが、溶液中に存在する成分が増えると、信頼性が高い解析が困難となる。図5にヒストンシャペロンNAP-1 (nucleosome assembly protein-1) についてC(s)解析により分布を求めた解析結果を示した<sup>16)</sup>。沈降係数の分布からNAP-1は少なくとも6種類以上の自己会合状態をとる系であることが分かる(図5左上)。C(s)解析で得られる結果は、各分子種の形状因子を同一と仮定した場合の結果であり、実際、NAP-1の場合も、各分子種についてC(s)解析から得た沈降係数と形状因子を用いて各分子種の分子量を求めたところ、単量体の整数倍とはならず、会合数の決定には至らなかった。

図6にNAP-1の質量分析の結果を示した。C(s)解析の結果と同様、複数種類の複合体に対応する信号が検出され、最小会合単位として2量体が検出された。さらに4量体、6量体、8量体のように連続した偶数のユニット数から構成される複合体が検出される一方で、3量体や5量体のような奇数のユニット数からなる複合体は検出されなかった。このように質量分析の結果から、NAP-1の基本会合単位は2量体であり、2量体が会合して、4、6、8、10量体といった大きな会合体を形成することが分かった。

そこで、質量分析から得た上記の結果を事前情報として利用し、可能性のある複数の相互作用モデルを構築し、プログラムSEDPHATを用いて沈降速度データの数値解析を進めた。沈降速度の測定結果との適合度合いを

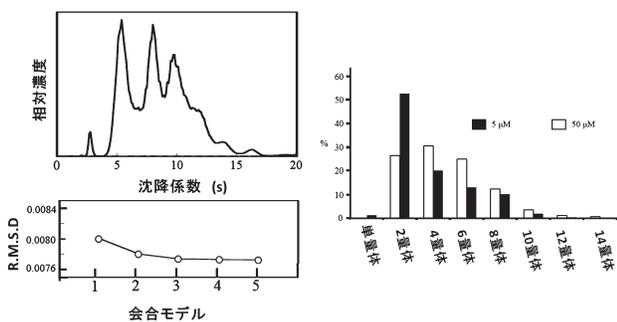


図5. (左上) NAP-1のC(s)解析, (左下) sedphatによるモデルとRMSDの関係, (右) 決定したNAP-1の存在比。

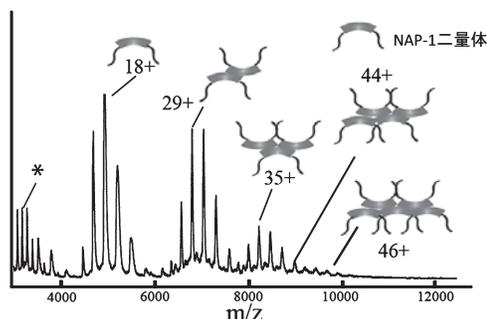


図6. 非変性条件でのNAP-1の質量分析

RMSD値により評価したところ、2-4-6-8-10-12量体モデル(会合モデル3)までは、新たに会合体の分子種を増やすごとにRMSDが減少したが、14量体以上の会合体を含むモデルではRMSDの改善は見られなかった(図5左下、会合モデル4および5)。このように、複雑な会合体が共存している場合でも、質量分析から化学量論の手がかりとなる情報を得られれば、沈降速度法の解析に利用することで分散状態を求めることが可能である。

以上、タンパク質間相互作用解析について、沈降平衡法と沈降速度法によるアプローチを解説した。さらに、分子間相互作用により、複雑な分散度を示すケースについて、非変性質量分析から得た情報を利用して、沈降速度法の数値解析を行うことで、定量的な解析が可能となった例を紹介した。今後、得られる定量的相互作用パラメーターと生物機能の関係解明が期待される。

### 文 献

- 1) Schuck, P.: *Biophys. J.*, **78**, 1606 (2000).
- 2) Houtman, J. C. D. *et al.*: *Protein Science*, **16**, 30 (2007).
- 3) Demeler, B. D. *et al.*: *Royal Society of Chemistry*, UK, p.210 (2005).
- 4) Sobott, F. *et al.*: *Anal. Chem.*, **74**, 1402 (2002).
- 5) Sobott, F. and Robinson, C. V.: *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 729 (2002).
- 6) Nishio, M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 4034 (2010).
- 7) Oda, M. *et al.*: *FEBS. J.*, **273**, 1476 (2006).
- 8) 内山 進: *生物工学ハンドブック* (日本生物工学会編), p.213, コロナ社 (2005).
- 9) Stafford, W. F.: *Anal. Biochem.*, **203**, 295 (1992).
- 10) Philo, J. S.: *Anal. Biochem.*, **279**, 151 (2000).
- 11) Gilbert, L. M. and Gilbert, G. A.: *Methods Enzymol.*, **27**, 273 (1973).
- 12) Dam, J. and Schuck, P.: *Biophysical. J.*, **89**, 651 (2005).
- 13) Nogi, T. *et al.*: *Nature*, **467**, 1123 (2010).
- 14) Oda, M. *et al.*: *Mol. Immunol.*, **47**, 352 (2009).
- 15) Shiga, D. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 18191 (2010).
- 16) Noda, M. *et al.*: *Biochem. J.*, **436**, 101 (2011).