

Composition gradient法を用いた多角度光散乱装置による分子間相互作用解析

金丸 周司

近年、米国のAllen Mintonらによって、多角度光散乱装置とシリンジポンプを組み合わせた溶液中での新しい生体分子間相互作用解析法（コンポジション・グラジエント法）が開発された。本稿では、装置開発の略歴と解析原理を簡単に述べ、Wyatt Technology社から市販されたCalypso™を用いたCG-MALSによるタンパク質間相互作用解析について解説する。

CG-MALSとは

背景 多角度光散乱装置（multi angle light scattering, MALS）によるタンパク質の解離会合反応の測定は、2002年のYamaguchi & Adachiらのヘモグロビンの会合状態解析にみられるように、バッチ法で種々の濃度のサンプルを光散乱装置で計測する手法がとられていた。2005年、Attri & Mintonは、図1のような、プログラムで制御された2つのシリンジポンプをMALSとUV検出器に接続し、短時間でホモおよびヘテロのタンパク質の解離会合反応を測定する画期的な装置とその解析手法を発表した^{2,3)}。

この手法は、2つの試料溶液の濃度比を段階的に変えてMALSと濃度測定装置に順次送り込むこと（composition gradient）で、各段階での重量平均分子量と試料濃度

から2つの試料のホモおよびヘテロの会合定数を決定する方法でCG-MALSと呼ばれる。従来の相互作用解析手法と異なり、測定する試料の正確な分子量や形成される複合体の化学量論があらかじめ分からなくても、平衡定数を求めることができることが大きな特徴である。

理論 理想溶液において、溶質の分子量をM、重量濃度（g/l）をcとすると、散乱角をゼロに外挿した散乱強度 I_s は(1)式で表すことができる。

$$I_s \propto Mc \quad (1)$$

分子A、Bがさまざまなストイキオメトリーで解離会合状態をとる溶液では

$$I_s \propto M_A c_A + M_B c_B + \sum_{ij} (iM_A + jM_B) c_{ij} \quad (2)$$

となる（ i, j はそれぞれ複合体を構成する分子A、Bの数）。いま、もっとも単純な反応として $A + B \rightleftharpoons AB$ 解離会合系を考えると(2)式は以下ようになる。

$$I_s \propto M_A c_A + M_B c_B + (M_A + M_B) c_{AB} \quad (3)$$

ここで、重量濃度で表した平衡定数を K^w とすると、

$$c_{AB} = K^w c_A c_B \quad (4)$$

$$c_A^{total} / M_A = c_A / M_A + c_{AB} / M_{AB} \quad (5)$$

$$c_B^{total} / M_B = c_B / M_B + c_{AB} / M_{AB} \quad (6)$$

と表すことができ、種々の濃度比でAとBを混合した溶液から算出した重量平均分子量と試料濃度からA、B、ABの各段階における濃度を求め、 K^w が求まる。

また、 $A + B \rightleftharpoons AB$ のモル濃度で表した平衡定数 K^m は(7)式で K^w と関係づけられる。

$$K^m \equiv \frac{[AB]}{[A][B]} = \frac{M_A M_B}{M_{AB}} \cdot \frac{c_{AB}}{c_A c_B} \equiv \frac{M_A M_B}{M_{AB}} K^w \quad (7)$$

Calypso™ Hardware & Software

Attri & Mintonの発表した装置は画期的であったが、制御できるシリンジが2本しかなく、シリンジポンプの制御・データ収集・データ解析するためのソフトウェアが3つ独立していたため、その汎用性に弱点があった。

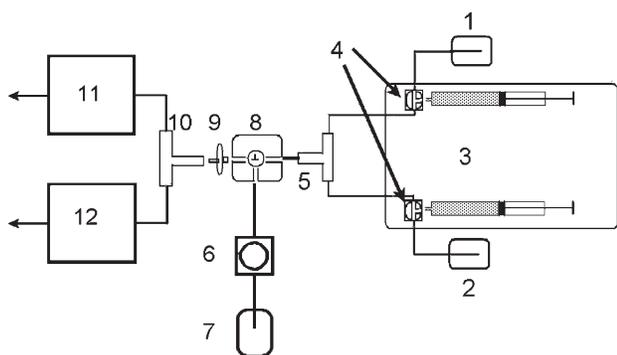


図1. CG-MALS systemの概略図。(1, 2) 試料溶液A、B、(3) プログラムで制御されたデュアルシリンジポンプ、(4) プログラムで制御されたシリンジバルブ、(5) “Mixing point”、(6) ペリスタリックポンプ、(7) ライン洗浄用緩衝液、(8) シリンジポンプとペリスタリックポンプの切り替えバルブ、(9) インラインフィルター、(10) スプリッター、(11) LS検出器、(12) UV検出器。

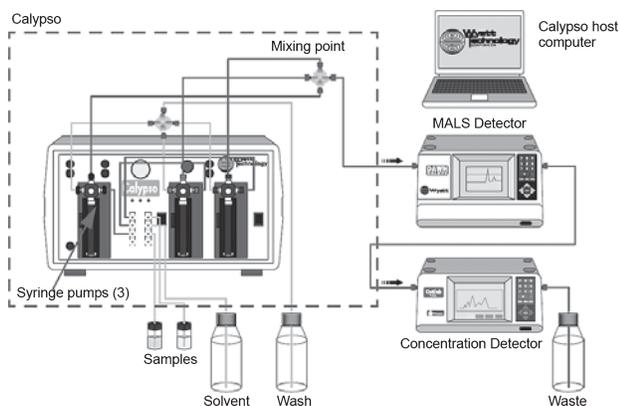


図2. Calypso™ Systemの概略図

図2に示すように、Calypso™は、シリンジポンプ3本からなるCalypso SP3 hardwareとシリンジポンプの制御、データ収集、解析を統合した1つのソフトウェアであるCalypso softwareとで構成される。3本のシリンジポンプは通常、試料2つと緩衝液に接続され、Calypso softwareでプログラムされた(後述)分量だけシリンジより押し出され、“Mixing point”で混合されてMALSと濃度検出器(通常は屈折計)に送り込まれる。この際、2台の検出器がシリアルに接続されているが、両検出器のセルに必要充分量の試料が瞬時に送出されるので、拡散による希釈は考えなくてよい。Calypso softwareはシリンジの制御と並行してデータ収集も行う。すべてのデータ収集サイクルが終了した後で、データのノイズ除去などのマニピュレーションを行い、データ解析を行う。

Calypso™を使った実験例

試料の前処理 光散乱において、溶液中に存在する小さなゴミや気泡は散乱強度が大きく、少しでも存在するとノイズの原因となる。また、濃度検出器に屈折計を利用する場合、緩衝液中に含まれる塩などにより屈折率は大きく影響を受けるのでタンパク質濃度の決定の際に注意が必要である。以上をふまえ、筆者らは通常、試料を緩衝液に対して透析し、その透析外液を測定用緩衝液として利用する。その後、測定直前にシリンジフィルター(ポアサイズ0.02 μmもしくは0.1 μm)を用いて試料と緩衝液のゴミを除去し、さらに濃縮遠心機を用いて5分ほど脱気する。

測定 測定機器すべての制御はCalypso softwareによって行う。まず、“method”セクションでシリンジポンプの動作プログラムを作成する(図3)。その詳細は、シリンジのプライミングと図2の“Mixing point”まで試料A、Bと緩衝液を誘導するために0.1 ml × 10回ずつおのおのシリンジ送液を行う(図3, 0–50 min付近)。次に

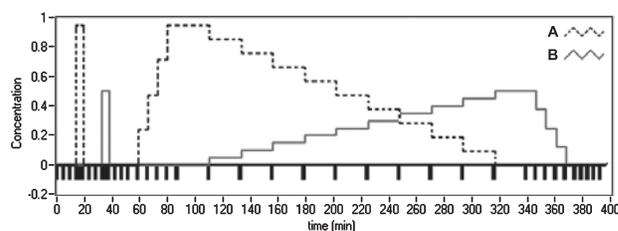


図3. 測定メソッドの例. 横軸から下に突き出した縦線はインジェクションポイント. 2つのインジェクションポイントの間は、混合したものが平衡に達するまでの計測時間である。

Aのみの自己会合の有無を調べるために4点ほどAのみのグラジエントを作成する(図3, 60–100 min付近)。そして、段階的にAを減少させながらBを増加させるA、Bの解離会合セクションを～10点程度作成する(図3, 100–320 min付近)。最後に、Bのみの自己解離会合を解析するために4点ほどBのみのグラジエントを作成する(図3, 340–370 min付近)。ここで、あらかじめAやBが自己会合しないことがわかっているならば、A、Bのみの解離会合セクションは必要ない。また、A、Bの解離会合セクションも化学量論があらかじめ他の手法で既知であれば、5点程度に減らすことも可能である。この制御プログラムは測定機器非動作時に作成でき、自動的に必要なサンプル量を算出することができるので、事前に作成し保存しておくことと便利である。

なお、本稿で用いた試料は分子量約20万のタンパク質Aと分子量約10万のタンパク質Bである。Bの酵素活性はA存在下で促進されることから、AとBの会合体の存在が期待されるが、SEC-MALSや超遠心速度法でAB複合体は観察できなかった。

測定結果 測定後の生データを図4に示す。インジェクションに由来する大きなスパイクと光散乱の細かい測定ノイズがあるが、スパイク除去とノイズ除去操作により除くことができ、実際には各段階で解離会合が平衡に達したと思われるプラトーの一部を解析に使用するので、ほとんど問題がない。この測定結果を注意深く観察すると、タンパク質濃度は直線的に減少しているのに対し、光散乱シグナルはやや弧を描いて減少していることから、AとBの会合体の存在が推測できる。

解析 測定結果から各段階でのプラトーにおけるデータポイントを選択すると、その値は自動的に“fitting”セクションに送られる。Calypso softwareで使用可能な“fitting”は、

- ・制約のない“Arbitrary Stoichiometry”
- ・化学量論1:1, “AB”
- ・化学量論2:2, “AA[BB]”
- ・化学量論2:1, 等価な結合部位 “AAB Equivalent Sits”

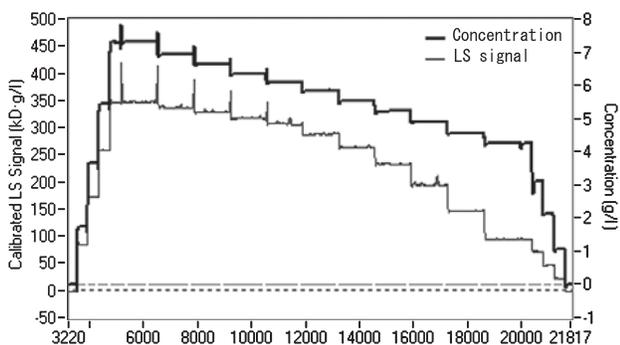


図4. CG-MALSの測定結果. 横軸はデータポイント.

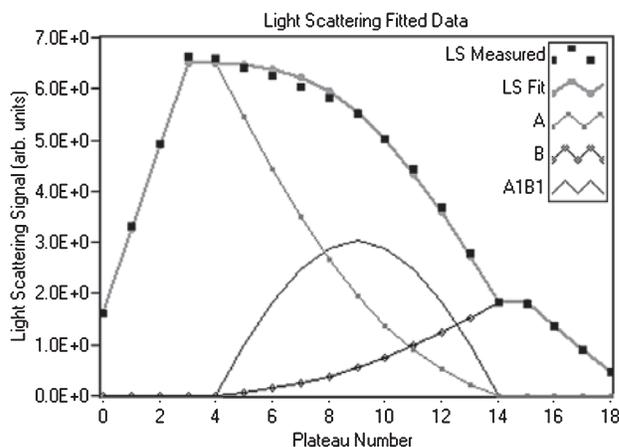
・化学量論 1:2, 等価な結合部位 “ABB Equivalent Sits”
 ・化学量論 1:n, 等価な結合部位 “1:n Equivalent Sits”
 である. 化学量論が不明な場合は, 通常 “Arbitrary Stoichiometry” を試し, 化学量論を決定する. 化学量論が分かっている場合でも, “Arbitrary Stoichiometry” を試してみても χ^2 検定値から正しい化学量論を判断できる. 本実験では, A と B は単独ではそれぞれ分子量 20 万, 10.7 万の自己会合しないタンパク質で, 1:1 の AB 複合体を形成し, その平衡定数は $2.15 \times 10^{-6} [M]$ と算出された (東京農大・新村洋一教授との共同研究, 未発表).

今後の展望

まとめ 以上, Calypso™ System を用いた CG-MALS 法は, 解離会合状態にある比較的弱い相互作用において, 各タンパク質単体とその複合体の詳細な化学量論が不明な場合でも, 会合状態を検出し, その平衡定数を求めることができる非常に画期的な装置であることが分かる. さらに, CG-MALS 法はラベル化, 固定化, カラムなどを用いることなく溶液中での分子間相互作用解析を行えることも大きな魅力である. しかしながら, 弱点もまったくないわけではない.

- ・やや多めの試料が必要である. 今回紹介した例では, A (0.95 mg/ml) を 9 ml, B (0.5 mg/ml) を 9 ml 使用した.
- ・生体試料より精製する場合, 比較的低温で各種クロマトグラムを行い, フィルターろ過の際に加圧するため, 測定時に微気泡が生じやすく, 光散乱のノイズになってしまう (最近新たに発売された, Calypso II™ はデガッサーに改良が加えられているとのことであるが詳細は不明である).
- ・Calypso™ 本体だけでなく, MALS 検出器, 濃度検出器が必要で, 新規に全装置を揃えると予算的にややきびしい.

TD-MALS 最後に, Calypso™ を使った速度論



Results					
MA [kDa]	200.2	MB [kDa]	106.5	Kd [M]	2.15E-6
Stoichiometries		log (K _{aj}) _b	LS FOM	cA FOM	cB FOM
a	b				
1	1	5.668	0.55	0.40	0.40

図5. CG-MALSのfitting解析結果

の実験を紹介する. 比較的平衡に達するのが遅い系では, 試料インジェクション後から平衡に達するまで散乱強度がゆるやかに上昇する. 種々の濃度においてこのカーブを解析することで解離会合の速度定数を求めることができる. この方法は Time Dependent-MALS (TD-MALS) と呼ばれ, Chymotrypsin に種々の濃度の AEBSF を加えて, 解離速度定数を解析している例が報告されている⁴⁾.

その他, Calypso™ を含めた Wyatt 社製品の活用法は Wyatt 社の HP⁵⁾ で Webinar (ウェブ上でのセミナー動画) が公開されている. アクセスには登録が必要であるが, Wyatt 社製品ユーザーでなくても簡単に登録できるので, 是非参考にさせていただきたい.

本稿で紹介した実験のため貴重な試料を準備してくださった, 東京農大・新村洋一教授ならびに新井俊晃君, 望月大地君, Calypso™ System を快く使用させてくださった, 昭光サイエントフィック株式会社の皆様に厚く御礼申し上げます.

文献

- 1) Yamaguchi, T. and Adachi, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **290**, 1382 (2002).
- 2) Attri, A. K. and Minton, A. P.: *Anal. Biochem.*, **346**, 132 (2005).
- 3) Attri, A. K. and Minton, A. P.: *Anal. Biochem.*, **337**, 103 (2005).
- 4) Some, D. and Hanlon, A.: *Am. Biotech. Lab.*, **28**(1), 9 (2010).
- 5) <http://www.wyatt.com/>