

くっつきやすさと離れやすさ

片倉 啓雄

はじめに

受容体とシグナル分子、抗原と抗体などの特異的な相互作用は、酵素の基質に対する特異的な反応とともに、生命現象の根幹をなしている。これらの特異的な相互作用の程度を表現する尺度としてよく知られているのが解離定数または会合定数である。これらは実は平衡の達成を前提にした静的な（時間の概念が入っていないstaticな）値である。しかし、多くの実践において反応は平衡に達しないので、動的（kinetic）に評価をする必要がある。そこで本稿では、反応速度式と、そこに用いられる速度定数の実践的な意味を解説する。

くっつきやすさと離れやすさを表現する

T星人とL星人が異文化交流のため、広場で目隠しをして歩き回り、異星人に体が触れたらペアが成立、というゲームをしている。時間あたりに成立するペアの数は、広場にいるT星人の数が多いほど、また、L星人の数が多いほど多くなる。ここでペアの数を X 、L星人の数を L 、T星人の数を T とすれば、ペアの数が増える速度 dX/dt は、 L と T の積に比例し、その比例定数を k_{on} とすれば、

$$\frac{dX}{dt} = k_{on}L \cdot T \quad \text{式1}$$

と書き表せる。ペアがある確率で破綻するとすれば、時間あたりに破綻するペアの数は、その時に広場にいるペアの数に比例する。その比例定数を k_{off} とすれば、広場にいるペアの数の変化速度は式1に破綻を表す項を書き加えて、

$$\frac{dX}{dt} = k_{on}L \cdot T - k_{off}X \quad \text{式2}$$

となる。実はこの式は、濃度 L [M]の遊離のリガンドと濃度 T [M]のターゲット分子が会合して複合体を形成する反応において、複合体濃度 X [M]の変化速度を表す式になり、 k_{on} は会合速度定数[M⁻¹s⁻¹]、 k_{off} は解離速度定数[s⁻¹]とよぶ。

静的な評価

ペアの数が増えるとフリーのL、T星人の数は減り、

逆に破綻するペアが増えるので、十分に時間が経てば、時間あたりに成立するペアと破綻するペアの数は等しくなり、平衡に達する。このとき、ペアの数は見かけ上、変化しなくなる。つまり $dX/dt = 0$ となるので、

$$\frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{L \cdot T}{X} \quad \text{式3}$$

となる。ここで

$$k_{off}/k_{on} = K_D = 1/K_A \quad \text{式4}$$

と定義すれば（本稿では結合価は1とする）、

$$X \cdot K_D = L \cdot T \quad \text{式5}$$

となる。ところで、全リガンド濃度 L_0 は複合体と遊離のリガンド濃度の和であるから（L星人の総数は、フリーのL星人とペアになったL星人の数の和）、

$$L_0 = L + X \quad \text{式6}$$

となり、同様に全ターゲット濃度 T_0 は

$$T_0 = T + X \quad \text{式7}$$

となるので、式7を用いて式5から T を消去すれば

$$X \cdot K_D = L \cdot (T_0 - X) \quad \text{式8}$$

となる。ターゲット濃度に比べてリガンドの濃度が十分大きければ、式6で X の項は無視でき、 $L_0 = L$ と近似できる。また、 X/T_0 はリガンドが結合しているターゲット分子の割合（結合率）を意味するので、それを f とすれば、式8は

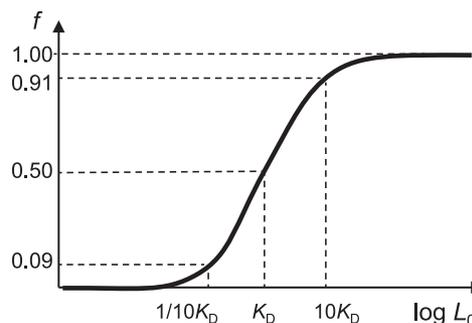


図1. 全リガンド濃度と結合率の関係

$$f = \frac{X}{T_0} = \frac{L_0}{L_0 + K_D} \quad \text{式9}$$

と書き直せる. ターゲット分子へのリガンドの結合率 f をリガンド濃度の対数に対してプロットすると図1のようになる. 式9で $L_0 = K_D$ の時, $f = 0.5$ となることから, 解離定数 K_D とは, 全ターゲットの半分に複合体を形成

表1. 会合・解離に関する定数の単位と表記

	定数	単位	表記
静的	会合(結合)定数	M^{-1}	K_A, K_a
	解離定数	M	K_D, K_d
動的	会合速度定数	$M^{-1}s^{-1}$	k_{on}, k_a, k_f, k_{+1}
	解離速度定数	s^{-1}	$k_{off}, k_d, k_b, k_{-1}$

表2. 結合率の経時変化のシミュレーション

	A	B	C	D	E	F
1	L	1.0E-09	M	p	3.0E-09	
2	T	1.0E-09	M	q	1.0E-18	
3	k_{on}	1.0E+05	$M^{-1}s^{-1}$	a	2.2E-09	
4	k_{off}	1.0E-04	s^{-1}	α	2.6E-09	
5	K_D	1.0E-09	M	β	3.8E-10	
6						
7	t_b	t_w	$t_b + t_w$	X	F_L	F_T
8	[min]	[min]	[min]	[M]	[-]	[-]
9	1	0	1	5.9E-12	5.9E-03	5.9E-03
10	3	0	3	1.8E-11	1.8E-02	1.8E-02
11	10	0	10	5.5E-11	5.5E-02	5.5E-02
12	30	0	30	1.4E-10	1.4E-01	1.4E-01
13	60	0	60	2.3E-10	2.3E-01	2.3E-01
14	60	30	90	1.9E-10	1.9E-01	1.9E-01
15	60	60	120	1.6E-10	1.6E-01	1.6E-01

式2から式5, 6を使って T と L を消去し, $t = 0$ の時 $X = 0$ とし解析的に解くと, t_b [s] 反応させた時の複合体濃度は

$$X = \frac{\alpha\beta\{1 - \exp(ak_{on}t_b)\}}{\beta - \alpha\exp(ak_{on}t_b)}$$

で与えられる. ただし $\alpha = (p + a)/2$, $\beta = (p - a)/2$, $a = \sqrt{p^2 - 4q}$, $p = L_0 + T_0 + k_{off}/k_{on}$, $q = L_0 \cdot T_0$. ターゲットが細胞表面や担体に固相化されている場合, 系を洗浄して遊離のリガンドを取り除くと, 式2の右辺第一項はゼロになるので, これを $t = 0$ の時 $X = 0$ とし解けば $X = X_0 \exp(-k_{off}t)$ となる. したがって, 有効濃度として T_0 [M] の固相化されたターゲットに対して濃度 L_0 [M] のリガンド溶液を t_b [s] 反応させ, その後 t_w [s] の洗浄した後の複合体濃度は

$$X = \frac{\alpha\beta\{1 - \exp(ak_{on}t_b)\}}{\beta - \alpha\exp(ak_{on}t_b)} \exp(-k_{off}t_w)$$

になる. 表の太枠部分に T_0 , L_0 , 会合および解離速度定数を入力し, 反応時間 t_b を適当に設定する. ELISA などのように固相化した抗体に抗原溶液を反応させた後, 未反応の抗原を取り除くために洗浄する場合はそれに要する時間 t_w を適当に設定する. $B5 = B4/B3$, $E1 = B1 + B2 + B5$, $E2 = B1 \cdot B2$, $E3 = \text{SQRT}(E1 \cdot E1 - 4 \cdot E2)$, $E4 = (E1 + E3)/2$, $E5 = (E1 - E3)/2$, $C9 = A9 + B9$, $D9 = \text{SE}\$4 \cdot \text{SE}\$5 \cdot (1 - \text{EXP}(\text{SE}\$3 \cdot \text{SE}\$3 \cdot A9 \cdot 60)) / (\text{SE}\$5 - \text{SE}\$4 \cdot \text{EXP}(\text{SE}\$3 \cdot \text{SE}\$3 \cdot A9 \cdot 60)) \cdot \text{EXP}(-\text{SE}\$4 \cdot B9 \cdot 60)$, $E9 = D9 / \text{SE}\$1$, $F9 = D9 / \text{SE}\$2$

させるのに必要なリガンド濃度ということが理解できる. ある受容体の遮断薬の場合であれば, 受容体に対する K_D が低いほど, 低用量で効果があることを意味し, 検出用の抗体であれば, 抗原に対する K_D が低いほど, より低濃度の抗原でも検出できることになる.

動的な評価

実践において, ターゲットとリガンドの反応が平衡に達することはまれであるため, 以下, 式2の実践的な意味を解説する. 速度定数は Surface Plasmon Resonance 法や Quartz Crystal Microbalance 法で調べるのが一般的だが, ELISA 法で測定することもできる^{1,2)}. なお, 会合および解離速度定数の表記にはさまざまな流儀があり, 混同しやすいので表1にまとめておく. 本稿では静的な会合定数および解離定数として K_A および K_D を, 動的な会合速度定数および解離速度定数として k_{on} および k_{off} を用いる. 多くの場合, K が大文字であれば静的, k が小文字であれば動的な定数として扱われているが, より確実には, 単位に時間が入っているか否かで判別すればよい.

会合反応のシミュレーション

K_D は平衡が達成された時の結合率に影響するパラメータだが, 式4 ($K_D = k_{off}/k_{on}$) が示すように, 同じ K_D を持つ抗体であっても k_{on} と k_{off} の値が異なる場合があり, k_{on} は会合する速さに, k_{off} は解離する速さに影響する. 式2を解くと, ターゲットとリガンドの反応の経時変化を, Excel でシミュレーションすることができる(表2). Goldbaumらは³⁾, 固定した lysozyme に対するモノクロー

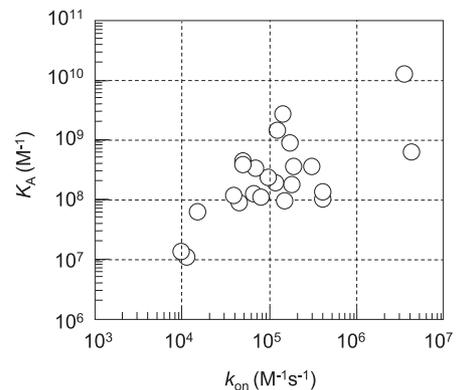


図2. 抗lysozyme抗体の K_A と k_{on} の関係. 文献1のデータを基に作成. 抗原結合部位のポケット(溝)が開いた抗体であれば, 抗原と出会う向きが多少悪くても結合できるので k_{on} は大きくなると考えられる. ポケットが開いたままだと解離しやすいが, 抗原を包み込むような induced fit が起きると k_{off} は小さくなり, K_A が大きい抗体になる.

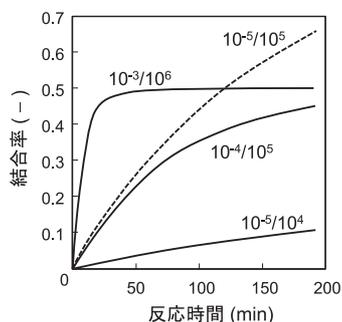


図3. 会合反応の経時変化. 数字は各抗体の k_{off} [s^{-1}]と k_{on} [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$].

ナル抗体の k_{on} は $10^4 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ の範囲にあったと報告しており、モノクローナル抗体には、同じ K_A (1価の結合の場合は K_D の逆数)を持つ抗体であっても、会合と解離が共に遅いものもあれば共に早いものもあることがわかる(図2)。ここで、同じ 10^{-9} M の K_D を持つが、 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ が $10^{-3}/10^6$ 、 $10^{-4}/10^5$ 、 $10^{-5}/10^4$ と異なる3種類の抗体があり、 10^{-9} M の抗原と反応する場合を考える。その会合反応の経時変化をExcelでシミュレーションしたものが図3と表3である。十分な時間が経過して平衡が達成されると、どの抗体も結合率は0.5に達するが、平衡時の9割の結合率に達するのに要する時間は、 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ が $10^{-3}/10^6$ の抗体では約19分であるのに対して、 $10^{-4}/10^5$ 、 $10^{-5}/10^4$ の抗体ではそれぞれ192分、1920分を要する。反応時間が30分の場合、 $10^{-3}/10^6$ の抗体は反応がほぼ終わっているのに対して、 $10^{-5}/10^4$ の抗体の結合率は2%に満たない。 K_D が一桁低い 10^{-10} M の抗体であっても、 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ が $10^{-5}/10^5$ であれば、30分後の結合率は30%にしかない。すなわち、反応時間が短い用途であれば K_D よりも k_{on} に注目して良し悪しを判断すべきなのである。

会合速度定数の実践的な意味

会合は分子と分子の出会いであるから、会合速度は双方の分子の拡散速度に依存する。先ほどの例だと、R星人が動くのが面倒でじっとしていれば、ペアが成立するかどうかはL星人の動きに依存することになる。ところで、分子の拡散速度は温度に比例し、分子径と粘度に反比例する。大小2つの分子の会合を考えると、その会合速度は小さい方の分子の拡散速度に支配されることになり、次のように実践的に重要な意味を持つ。

ビオチン-アビジンの反応 ストレプトアビジン(SA)とビオチンが特異的に強く結合する性質はさまざまな生化学実験に利用されている。その K_D は 10^{-15} M とされており、SAからのビオチン分子の k_{off} は 10^{-6} s^{-1} オーダーである。ビオチンにタンパク質やDNAを付加

表3. 速度定数が抗体の結合率に及ぼす影響

K_D [M]	k_{on} [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	$t_{90\%}$ [min]	$F_{t=30 \text{ min}}$ [-]
10^{-9}	10^6	10^{-3}	19	0.49
10^{-9}	10^5	10^{-4}	192	0.15
10^{-9}	10^4	10^{-5}	1920	0.02
10^{-10}	10^5	10^{-5}	103	0.30

した場合、会合後にビオチン分子を包み込むような構造変化ができなくなるので k_{off} は 10^{-4} s^{-1} 程度まで大きくなるものの、適当な長さのリンカーを介していれば、付加する分子のサイズは k_{off} にはほとんど影響しない⁴⁾。これに対して、 k_{on} に対しては付加する分子のサイズが大きく影響し、直径約 $1 \mu\text{m}$ のビーズに固定したSAに対するビオチン化DNAのみかけの k_{on} は、 100 bp の場合 $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であるのに対して 5 kbp になると $6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ に低下する⁴⁾。つまり、SAビーズで大きな分子を回収するなら、特に細胞などの巨大分子と会合させる際には、反応時間を十分にとるべきなのである。

高分子基質に作用する酵素 多くの酵素分子は分子サイズ $10^4 \sim 10^5 \text{ Da}$ で、分子径は $3 \sim 6 \text{ nm}$ である(経験的に分子サイズ $x \text{ kDa}$ の球状タンパク質の体積はほぼ $x \text{ nm}^3$ と近似できる)。これに対して、多くの場合、基質分子は $10^2 \sim 10^3 \text{ Da}$ で分子径 $0.5 \sim 1 \text{ nm}$ であり、酵素と基質が共に溶液中に遊離の状態が存在しているなら、両者の会合のチャンスは主として基質分子の拡散速度に依存している。しかし、基質が多糖などの巨大な分子であれば、その会合は酵素側の拡散速度に依存することになり、基質が低分子の場合に比べて会合のチャンスは少なくなる。このため、アミラーゼやセルラーゼなどは、基質との出会いの機会を活かすため、基質結合ドメインを持つものが少なくない。

固定化酵素 固定化酵素は、繰り返し利用ができ、酵素の安定性も増すが、基質が高分子である場合、固定化するべきではない。巨大な基質に対する酵素を固定化してしまうと両者の出会いの機会が激減するからである。

PCR反応 PCRでタグ配列を付加しつつ遺伝子をクローニングする場合など、長いプライマーを用いる際には、アニーリングの時間を伸ばさなくてはならない。アニーリングはテンプレート分子とプライマー分子の会合反応であるから、プライマーが長くなれば会合速度が低下し、時間的な余裕が必要になるからである。

ハイブリダイゼーション メンブレンに固定した核酸を相補的なDNA (RNA) で検出する際の反応液量はできるだけ少なくするべきである。同じ量のプローブを

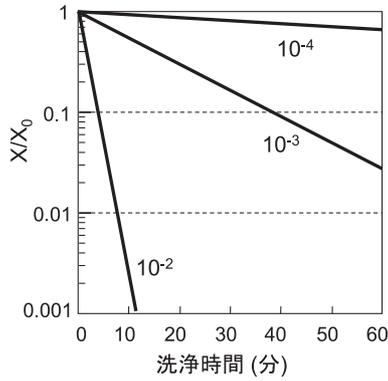


図4. 複合体の解離の経時変化

使うなら、液量が少ないほどプローブの濃度が上がり、平衡は会合側に傾くからである。また、プローブは、会合速度が低下するので、不必要に長くするべきではない。PCRのプライマーは20~25塩基程度がテンプレートとマッチすればよいが、これは伸長反応を行う70°C前後の高い温度においてさえ、この長さがあればテンプレートからの解離は無視できるほど遅いことを意味しており、言い換えれば、プローブをこれ以上長くするメリットがないことを示唆している。

解離反応のシミュレーション

リガンドとターゲットの一方が固相に固定された状態で反応させた後、系を洗浄して遊離のパートナーを除去すると、固相に形成された複合体の解離が始まる。式2の右辺第2項がゼロになるので、 $t = 0$ の時 $X = 0$ として解けば、 $\ln(X/X_0) = -k_{off}t$ となり、図4に示すように X/X_0 の自然対数を時間に対してプロットすれば、その傾きが k_{off} になる。 k_{off} が $10^{-4} s^{-1}$ であれば1時間洗浄した後も複合体の70%が残るが、 $10^{-3} s^{-1}$ だと3%しか残らず、 $10^{-2} s^{-1}$ だと4分未満で90%が解離することがわかる。

解離速度定数の実践的な意味

ELISA法 サンドイッチELISAはさまざまな物質の定量に用いられる。ポリスチレンプレートに抗体を疎水吸着させ(図5A)、これに試料溶液を加えてインキュベートし、抗原を結合させる(図5B)。洗浄して吸着しなかった物質を除去した後、一次抗体を反応させ(図5C)、洗浄して未吸着の一次抗体を除いた後、酵素標識した二次抗体を反応させる(図5D)。その後、酵素によって発色する基質を加えて一定時間反応させると、発色量は抗原量に比例するので、試料溶液中の抗原を定量することができる。ここで、Bのプロセスで遊離の抗原を除去することに注目したい。一次抗体と酵素標識抗体はそれ

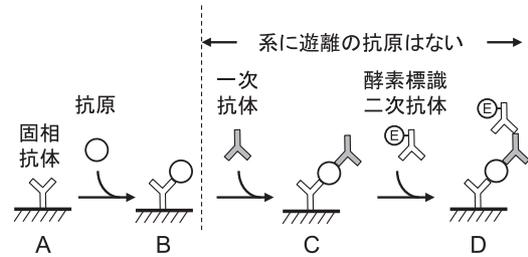


図5. サンドイッチELISA

ぞれ1時間反応させることが多いが、この間、系には遊離の抗原は実質的に存在しないので、抗原は固相抗体から解離し続ける。Dの時点で(2時間後に)複合体を半分以上残しておきたいのであれば、 k_{off} が $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ 以下の固相抗体を選ばなくてはならない($X/X_0 = \exp(-1 \times 10^{-4} \times 2 \times 60 \times 60) = 0.49$)。逆に、酵素標識抗体は、5分程度の洗浄に耐えれば、基質と反応している間の解離は問題にならないので k_{off} は多少大きくてもよく、 k_{on} で選ばばよいことになる。

ラテックス法 ウイルス粒子のような多価抗原の存在は、抗体を固定したラテックスビーズの凝集によって迅速に検出できる。この場合は洗浄操作がないので、 k_{on} に注目して抗体を選ばばよいことになる。

アフィニティクロマトグラフィー リガンド固定した担体をカラムに充填して試料溶液を流し、それに含まれるターゲットを吸着させ、不純物を洗浄・除去した後ターゲットを溶出すれば効率的な精製が行える。この溶出を遊離のリガンドを添加することによって行う場合(いわゆる拮抗溶出)、 k_{off} はある程度大きくなくてはならない。 $k_{off} = 1 \times 10^{-3} s^{-1}$ のリガンドなら、理論上10分後も半分以上のターゲットはカラムに残ったままになってしまう。ニッケルキレートカラムでHisタグを付加したタンパク質を精製する場合、イミダゾールで拮抗溶出できるので、この場合の k_{off} はかなり大きいことになる。しかし、タグをつけたタンパク質は $10^4 \sim 10^5$ Daもあるので大きな k_{on} は期待できず、親和性($K_A = k_{on}/k_{off}$)はさほど高くないことになる。ではどうやって高い回収率を達成しているのだろうか。それは、このリガンドは低分子のnitrilotriacetic acid (NTA)なので、担体のリガンド密度を高くすることができるからである。つまり、式2で L の濃度を高めることによって会合速度を稼ぎ、平衡を結合側に傾けているのである。ビオチン-アビジンの反応でSAカラムからビオチン化したターゲットを拮抗溶出できないのは、 k_{off} が非常に小さいので、溶出に「h」どころか「day」のオーダーの時間がかかってしまうからである。

おわりに

ターゲットとリガンドの会合・解離を動的に理解すれば、さまざまな生命現象のより深い理解につながり、実験の失敗や苦労も減らすことができる。本稿がその一助になれば幸いである。

文 献

- 1) Larvor, M. P. *et al.*: *J. Immunol. Methods*, **170**, 167 (1994).
- 2) Zhuang, G. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 330 (2001).
- 3) Goldbaum, F. A. *et al.*: *J. Immunol.*, **162**, 6040 (1999).
- 4) Huang, S. *et al.*: *Anal. Biochem.*, **237**, 115 (1996).