

表面プラズモン共鳴及び等温滴定型カロリメトリーを用いた生体分子の相互作用解析

三 谷 知 也

この度、2014年の入門講座として「数式で理解する分析化学」を企画いたしました。

日常的に使用している計測機器や分析法の原理について、私たちはその「数学的な基礎の部分」を正しく理解できているでしょうか？ また、基礎を正確に理解してこそ、分析により得られたデータを正しく解釈できるのではないでしょうか？

そこで本企画では、初中級者の読者にも理解できるように、分析化学で汎用される実験や解析の手法別に、その原理や機器計測を支えている「数式や数学」をやさしく解説し、実際の分析データへどのように反映されるかという点について説明します。また、具体的な事例に基づいて、分析データの正しい解釈法や注意点などについても解説を加える予定ですので、どうぞご期待ください。

〔「ぶんせき」編集委員会〕

数式・数学キーワード

解離定数 K_D 、結合速度定数 k_a 、解離速度定数 k_d 、カインेटクス解析、エンタルピー変化 ΔH 、エントロピー変化 ΔS 、サーモダイナミクス解析、カーブフィッティング、Mass Transport Limitation (MTL)、Calibration Free Concentration Analysis (CFCA)

1 はじめに

今日、生体分子の相互作用解析において表面プラズモン共鳴 (SPR) や等温滴定型カロリメトリー (ITC) がよく用いられるようになってきている。これらの相互作用測定技術はいずれもサンプルに標識することなく、速度論的解析 (主に SPR による) や熱力学的解析 (主に ITC による) を可能とし、相互作用をより深く理解するための装置として互いに相補的な役割を有している。さらに、単に相互作用を解析するにとどまらず、様々な応用的な測定方法が開発され利用されはじめている。しかし、それらの解析データの根源である、直接検出器から得られる情報を考えてみると、実はそれ自体では大きな意味を持たないともいえる。例えば SPR で言えば、そ

Basic Knowledge of Mathematical Theories of Analytical Chemistry—Biomolecular Interactions by Surface Plasmon Resonance and Isothermal Titration Calorimetry.

れは「屈折率変化」であり、ITC で言えば、「熱量変化」であるに過ぎない。これらのいわば“物理現象”の生データから出発して、今日のように幅広い適用例が作られ続けていることの原動力の一つは、ハードウェアの開発・改良であり、もう一つはデータの解析手法の開発、すなわちいかに数式をうまく使い有益な情報を取り出すかということである。後者は近年ますます重要視されてきている。

多くの研究者にとって、測定結果を導くためにどのような数式が用いられているかを丹念に読み解くことは骨の折れる作業であり、また直接研究成果に結びつかないこととられがちである。そこで本稿では、SPR、ITC 両測定手法で用いられている数式について、それらがいかに実際の測定条件に即すために工夫されているかということや、新しい測定手法の開発に寄与してきたかということを紹介し、その理解の重要性を論じたい。

2 測定原理

2.1 表面プラズモン共鳴 (SPR)

SPR は様々な種類の装置が開発されているが、本稿では生体分子間相互作用測定を主な目的とした装置 Biacore シリーズ (GE Healthcare) を例に解説する。本装置は、サンプルを標識することなくリアルタイムに相互作用を測定し、カインेटクス (速度論的) 解析ができるということが大きな特徴である。

本装置の測定部の配置 (図 1) と相互作用測定の一般的な流れ (図 2) を解説する。最初に二分子のうち、ど

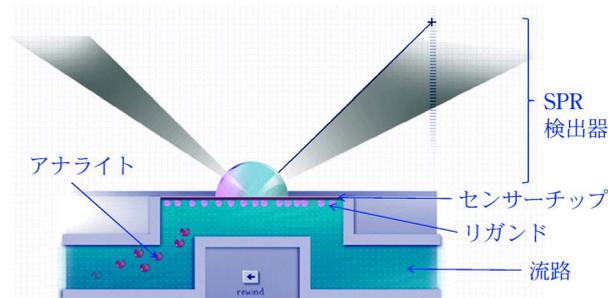


図 1 Biacore 測定部の配置

センサーチップへのリガンドの固定化

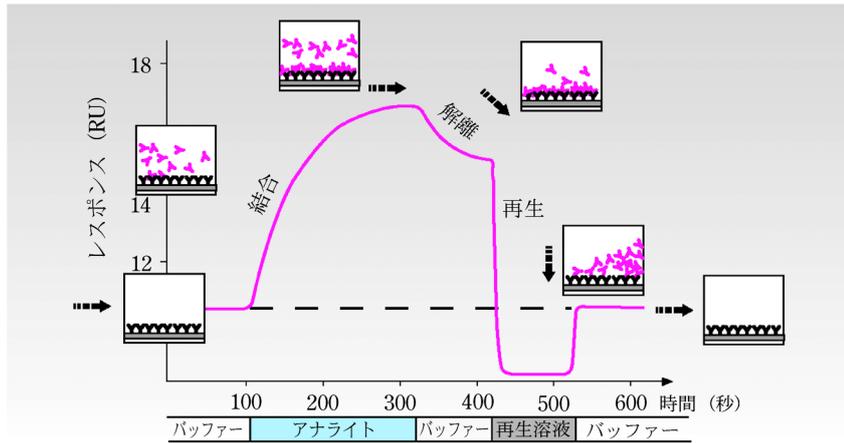
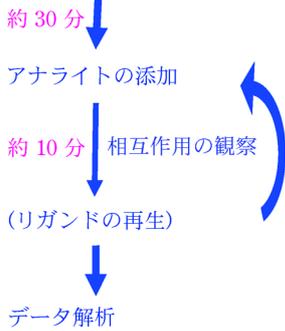


図 2 Biacore 相互作用測定の流れとセンサーグラム

ちらか一方の分子をセンサーチップと呼ばれる基板上に固定化する。固定化した分子は総称してリガンドと呼ぶ。次にもう一方の分子（アナライト）をリガンドが固定化されたセンサーチップ表面に流路を介して添加する。図 2 右図は 1 回の測定の典型的なセンサーグラム（反応曲線）であり、特異的結合反応に伴いシグナルが増加する。Biacore はセンサーチップ表面近傍の屈折率を検出し、その屈折率とセンサーチップ上の密度変化が比例関係であることを利用して¹⁾、結合現象をリアルタイムに検出する。アナライトの添加終了後、システムの流路が切り替わり、すぐに緩衝液が流れ始めることで、リガンドに結合したアナライトの解離反応を観察することができる。得られたセンサーグラムの結合・解離曲線の形状に対して、解析用ソフトウェア中の適切な相互作用反応モデルを用いた、非線形最小二乗計算によるカーブフィッティングをすることで反応速度定数を算出する。

ここで相互作用のアフィニティー（親和性）解析とカインेटクス解析の違いについて概説する。



式(1)で示される二分子間の平衡反応において、アフィニティーを定量化するのによく使われる定数、解離定数 (K_D , 単位 M) は式(2)で定義される。

$$K_D = [A][B]/[AB] \dots\dots\dots(2)$$

したがって K_D は数値が小さいほどアフィニティーは高いことになる。従来よく用いられるエンドポイントアッセイでは、アフィニティー解析のみが可能であり、複数の初期濃度の組み合わせで、平衡状態まで反応させた後に形成されている複合体の量を見積もることで解離定数を算出する。

一方カインेटクス解析においては、結合速度定数 (k_a , 単位 $M^{-1}s^{-1}$), 解離速度定数 (k_d , 単位 s^{-1}) を求めることができる。得られた k_a および k_d から式(3)

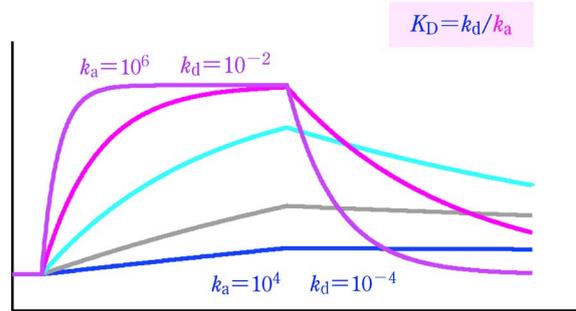


図 3 $K_D=10$ nM の様々なセンサーグラム

を用いて K_D を算出することができる。

$$K_D = k_d/k_a \dots\dots\dots(3)$$

式(3)が示すとおり K_D は結合速度定数と解離速度定数の比であるので、同じ K_D でも反応速度定数 k_a , k_d の組み合わせ数は無限にある。例えば $K_D=10$ nM の相互作用を想定した場合、 k_a , k_d の組み合わせで様々な形状のセンサーグラムが描かれるようになる(図 3)。 K_D を k_a , k_d の二つのパラメーターに分割して評価することで、より詳細な相互作用解析ができるようになる。また ELISA 法などの標識を用いたエンドポイントアッセイにおいては、 k_d の速い相互作用を検出することが困難であるが、リアルタイム測定が可能で Biacore においてはそのような解析も可能となる。

2.2 等温滴定型カロリメトリー (ITC)

生体分子間相互作用測定を主な目的とした ITC として iTC₂₀₀ (GE Healthcare) を例に解説する(図 4)。本装置は、サンプルを標識したり固定化したりすることなく、溶液状態で相互作用を測定し、サーモダイナミクス(熱力学的)解析ができるということが大きな特徴である。ITC を用いた相互作用測定の一般的な流れを解説する。相互作用を観察したい一方の分子の溶液(サンプ

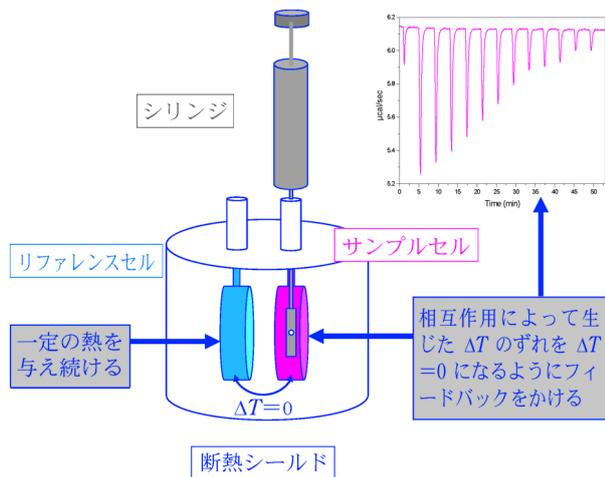


図4 iTC₂₀₀の原理とシステム概要

ル溶液と呼ぶ)をサンプルセルに、もう一方の分子の溶液(リガンド溶液と呼ぶ)を滴定シリンジにセットし、溶媒(多くの場合は水が用いられる)をリファレンスセルに入れる。セルの温度を一定に保つため、二つのセルは断熱ジャケットで覆われている。一定温度に保たれたサンプルセルに滴定シリンジ中のリガンド溶液を数μLずつ滴定し攪拌すると、分子間相互作用により結合量に正比例した熱の発生または吸収が起こり、サンプルセル中の溶液温度が変化する。ここで生じたリファレンスセルとの温度差(ΔT)を感知し、ΔTが0になるようにセル表面の微小ヒーターのon/offで調整する。ΔT=0を保持するために要したフィードバック電力を測定することで、相互作用による発熱量または吸熱量がわかる。滴定を続けることにより、結合サイトがリガンドで飽和されると観測される熱量はしだいに小さくなり、最後はリガンドの希釈熱のみが観測されるようになる。各滴定の単位滴定モル数あたりの発生熱量を縦軸に、シリンジ中のリガンドとセル中のタンパク質分子のモル比を横軸にとることで、結合等温線が得られる(図5)。結合等温線からは、解離定数(K_D)、反応の結合比(n)、エンタルピー変化(ΔH、単位:J/mol)、エントロピー変化(ΔS、単位:J/K・mol)が得られる。

これらの値や相互作用の自由エネルギー変化(ΔG、単位:J/mol)との間には以下の関係式(4)が成立する。

$$\Delta G = RT \ln K_D = \Delta H - T\Delta S \dots\dots\dots(4)$$

式(4)が示すとおり、同じK_DでもΔHとΔSの組み合わせ数は無限にあるといえる。K_DをΔHとΔSの二つのパラメーターに分割して評価することでより詳細な相互作用解析ができる。このような相互作用解析は2・1で記述したカイネティクス解析に対してサーモダイナミクス解析と呼ばれている。

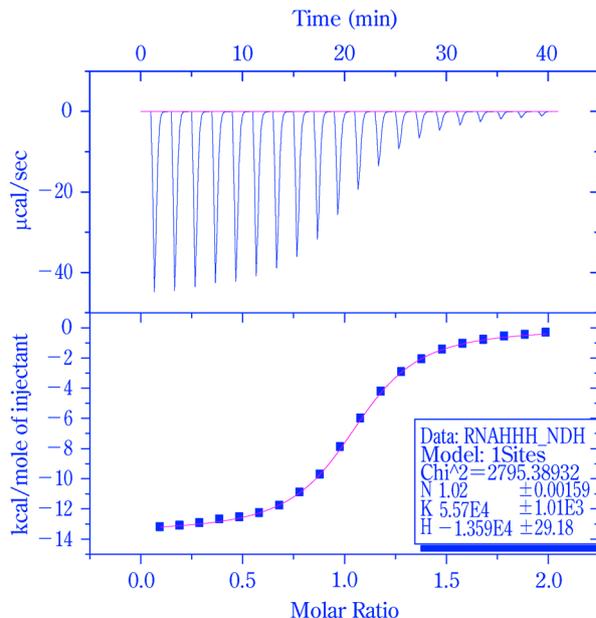
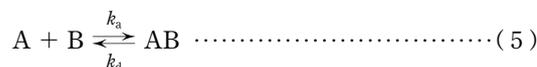


図5 ITCのデータ

3 SPR解析に寄与する数式の理解

3・1 カイネティクスの利用と数式

まず本節ではSPRの理想系におけるカイネティクス解析で用いる数式から紹介したい。分子Aと分子Bの相互作用に関し、分子B(リガンドB)を固定化したセンサーチップ上に分子A(アナライトA)溶液を添加すると複合体ABが形成されるような二分子反応は、式(5)であらわされる。



各分子のt時間後における濃度を[A], [B], [AB]とすると、時間経過とともに[AB]が増加し、ある一定の割合となったとき平衡状態に達することになる。ここで複合体の濃度変化率d[AB]/dtはk_a, k_dを用いて式(6)で表され、A, BおよびABの測定時点での濃度に依存する。

$$d[AB]/dt = k_a \cdot [A] \cdot [B] - k_d \cdot [AB] \dots\dots\dots(6)$$

ここでBiacoreのような流路を用いた測定系においては、固定化したリガンドBに液相にアナライトAを一定の濃度で供給し続けるため、式(6)において、[A]を一定値として扱うことが可能である。このアナライト濃度をC、形成された複合体濃度を結合レスポンスの変化量Rに置き換え、[B]₀(t=0でのBの濃度)を最大結合量R_{max}に対応させると、式(6)は

$$dR/dt = k_a \cdot C \cdot (R_{max} - R) - k_d \cdot R \dots\dots\dots(7)$$

と表され、これをさらに変形すると式(8)になる。

$$dR/dt = k_a \cdot C R_{\max} - (k_a C + k_d) \cdot R \dots\dots\dots (8)$$

ここで、得られたセンサーグラムに非線形最小二乗法によりカーブフィッティングさせて k_a , k_d および R_{\max} 値を算出する。式(3)よりアフィニティーの強さを示す解離定数 K_D 値を求める。

ここで、SPR から求めることができる各速度定数の活用法の代表例について紹介したい。代表的な例としては医薬品開発において、標的タンパク質に対する医薬品の結合保持時間、すなわち解離速度の“遅さ” (k_d 値の小ささ) を指標として医薬品を選出・最適化するという考え方がある。これは第一に結合保持時間の長い医薬品の薬理効果がより長時間持続し、実際に生物学的な活性との相関も報告されている例がみられることに由来する²⁾。第二に医薬品を実際に投与した時に選択性が高く目的のタンパク質にのみ結合することが期待できることにある。一般的に医薬品投与後の血中濃度は、比較的早い時間に最高血中濃度に達し、その後濃度が低下する。またこのとき、標的タンパク質以外にもアフィニティーは弱い結合するタンパク質が生体内に存在したと仮定すると、最高血中濃度に達した瞬間はいずれのタンパク質にも結合する可能性があるが、その後血中濃度が低下した時に目的とする標的タンパク質に結合しているかどうかは、解離速度の遅さにより決まることがシミュレートされている²⁾。すなわち、標的タンパク質に対する解離速度が遅い医薬品ほど副作用が少ないことが期待される。この例のほかにも、生体内の機能は様々なところで巧みに速度論的な相互作用によって制御されている。

3・2 実際の測定条件に即した数式

実際の測定条件において、正確な速度論解析をするためには、以下の条件を整えることが重要であるとされている。

- i) 固定化量をなるべく減らす。
- ii) 流速をなるべく上げる。

これは、固定化したリガンドに対して、単位時間当たり

十分な量のアナライトをフロー系で供給するための条件であるといえる。

3・1において、理想系における SPR を用いた二分子間カインेटクス解析について述べてきた (図6に青色で理想系でのセンサーグラム例を示す)。しかし、測定サンプル固有の結合速度定数や分子量などに対して上述の2条件が不十分であった場合、センサーグラムは図6の黒色のセンサーグラムのように変形する (BIAsimulation software によるシミュレート結果)。その結果、式(8)ではカーブフィッティングが十分に実測値に当てはまらず、そのため信頼性の高い計算結果を得ることができなくなる。このような現象は mass transport limitation (以下 MTL) と呼ばれている。本節では MTL 条件でのセンサーグラムの結合相の形状変化とそれを引き起こす分子の挙動、そしてそれを説明するモデル数式を関連付けて解説したい。

まず固定化量の多いセンサーチップ表面と少ない表面での環境の違いを図7に示す。固定化量の少ない測定条件では図7左のように、アナライト濃度はセンサーチップからの距離によらず均一な濃度を保っている ($[A]_{\text{bulk}}$)。これに対して右図ではセンサーチップから

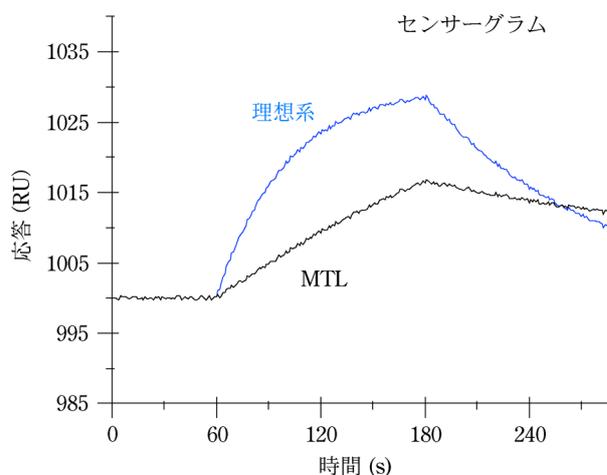


図6 MTL 条件下でのセンサーグラムの変形

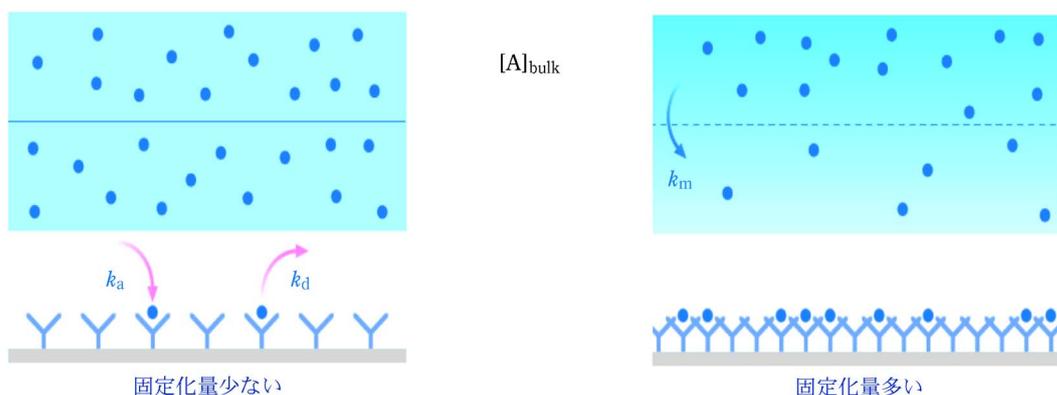


図7 固定化量の条件によるセンサーチップ表面でのアナライト濃度の違い

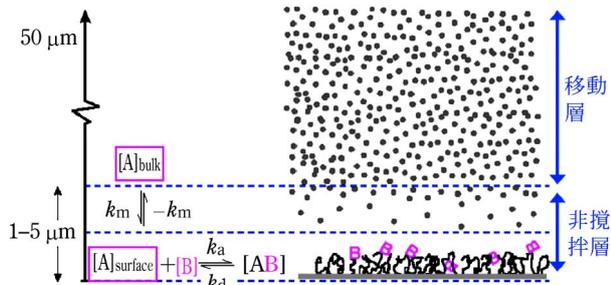


図 8 固定化量とセンサーチップ表面でのアナライト濃度 2 の関係

の距離が近いと A の濃度が低くなっている。この状態を詳細に示したのが図 8 である。この状態では固定化量が多いため A が結合するべき速度（需要量）が高くなっているにもかかわらず流路に乗って運ばれる A の量（供給量）は不足している。結果としてセンサーチップ近傍での A の濃度、 $[A]_{\text{surface}}$ の値が $[A]_{\text{bulk}}$ より低くなるという現象が起こる。これはセンサーチップ表面近傍と流路中心部の間で起こる拡散速度によって式 (9)、(10) のように記述できる。

$$[A]_{\text{bulk}} \xrightleftharpoons[k_m]{k_m} [A]_{\text{surface}} \dots\dots\dots (9)$$

$$[A]_{\text{surface}} + [B] \rightleftharpoons [AB] \dots\dots\dots (10)$$

(k_m = マストランスポート係数)

このように表され、この MTL 条件下における分子の結合速度を考えると式(11) のように記述される。

$$d[R]/dt = M_w \cdot k_m \cdot G \cdot [A]_{\text{bulk}} \dots\dots\dots (11)$$

(M_w : 分子量, k_m : マストランスポート係数, G : センサーチップ表面密度から RU への変換係数)

この式(11) のとおり、完全に MTL の作用が支配的になった条件、言い換えると結合速度が拡散律速になった条件では、数式は $[A]_{\text{bulk}}$ の一次式となり、結合カーブが直線的 (図 6) になる。理想系でのセンサーグラムからの変化の割合は、上述 i) および ii) の条件からの乖離の程度に加えて、サンプルの分子量や固有の速度論的パラメーター（特に結合速度定数 k_a ）、また、アナライト添加後の時間 t におけるリガンドの結合サイト空隙数（需要量）などによっても異なってくるが、いずれにせよ大なり小なり変形は起こる。Biacore の解析ソフトウェアには式(8)に MTL の影響を加味したモデル式（以下これを MTL 補正式と呼ぶ）が搭載されているので MTL 条件下でもカインेटクス解析を行うことが可能となる。

それでもなお、上述 i), ii) の 2 条件を可能な限り満たした条件下で測定することは重要である。カーブフィッティングは複雑な数式に対しても“収束解”を与

えてくれる非常に強力な解析方法だが、フィッティングが良好だからといって必ずしも“真の解”を与えているとは限らない。このことを常に意識することは重要である。例えば初期値の取り方などによって、真の解とは異なる極小値 (local minimum) における収束解を与えることもあるし、また見かけ上一つの解であるフィッティングの収束解の誤差範囲が非常に広がっていて信頼性に欠けることもある。MTL が優位な測定条件においては、上述のようにより拡散律速により結合される程度が高くなる。このことはすなわち、そのときのセンサーグラムの形状から見て、そのサンプル固有の結合速度定数 k_a によって決められている程度が低くなっているとも言換えられる。その結果、MTL 条件が強い環境下ではカーブフィッティングの誤差範囲が広がる。以上のような理由により MTL 補正式を用いたとしても、可能な限り上述 i), ii) を満たす条件下で測定することが望ましい。一方で装置面でも固定化量を減らした測定を可能とする高感度化や、上記のようなカーブフィッティングの信頼性を検証する機能を解析ソフトウェアに搭載するなどの開発がなされてきており、今日 MTL の問題は上記の実験条件を守ることでほとんど解決できるようになっている。

3.3 検量線を用いない活性型タンパク質濃度定量法 (calibration free concentration analysis: CFCA)

式(8)でも説明できるとおり、 k_a 、および k_d 値を得るためにはアナライトの測定濃度が正確であることが前提条件である。しかし、特にタンパク質などの生体分子を扱ううえでは、変性や凝集などにより一部のアナライト分子が結合活性を失い正確な活性タンパク質濃度を測ることが困難であることも多い。そのような場合、一般的には標品を用いて検量線を作成し、それに基づいて試験溶液中の目的タンパク質の濃度を測定する。しかし、100% 活性を有する目的タンパク質の標品を入手することは困難であることも多い。近年、Biacore を用いて、この問題を解決する画期的なタンパク質濃度定量法 (CFCA) が開発された。この CFCA は標品を用いた検量線を作成することなく活性タンパク質の濃度を測定することができる。

3.2 で述べたとおり、リガンド分子を特定の条件以上の高密度に固定化すると、MTL の作用が支配的な条件になる。この作用は、正確な結合・解離速度定数 (k_a , k_d) を求めるには、なるべく排除したいものである。しかしここで式(11)を別な視点で見ると、MTL 条件下において、アナライトの分子量と拡散定数が既知であれば、結合活性を保持するタンパク質の濃度 $[A]_{\text{bulk}}$ を算出することが可能となると言える。

同一の濃度のアナライトを MTL 条件を示す高固定化

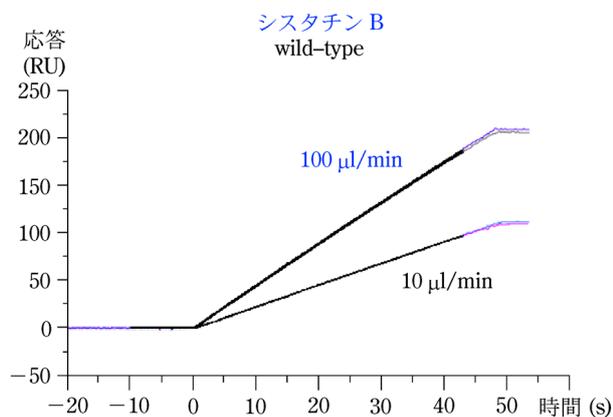


図9 CFCAでのセンサーグラム

量のセンサーチップ上に添加したところ、100 µl/minと10 µl/minの二つの流速において、まったく異なる傾きの直線的な結合のセンサーグラムが得られる(図9)。この状態ではほぼ式(11)が成立している状態になっていると推測されるが、実際にはこれらのセンサーグラムに前節で述べたMTL補正式をフィッティングすることで結合活性を有するアナライト分子の濃度 $[A]_{\text{bulk}}$ を算出する。ここで注目したいことは、同一の数式を使用しているにもかかわらず、測定条件の違いにより、信頼性の高い解が得られるパラメーターが異なってくることである。 k_a および k_d を求めるためには、可能な限りMTL条件の弱い環境下で測定したうえで、MTL補正式を用いることが適切であることを前節で述べた。これに対しCFCAで $[A]_{\text{bulk}}$ を算出するためには、MTL条件を積極的に強めることが適切となる。その理由は、前節のカイネティクス解析での説明と表裏一体であり、強いMTL条件下でのセンサーグラムはその相互作用固有のカイネティクス情報が含まれていない式(11)に近い状態の条件になっているためである。

次に、実際にCFCAを用いてタンパク質(シスタチンB、野生型および変異型、図10)の活性濃度を定量し、得られた濃度情報を用いて固定化タンパク質(パパイン)との相互作用解析を行った例を紹介する³⁾。シスタチンBの野生型および各変異型のCFCA(センサーグラム例を図9に示した)で得られた定量結果の吸光度(A_{280})を用いたタンパク質濃度定量結果に対する比較を表1に示す。タンパク質が完全に活性を有している場合はこれらの数値が100%になるはずであるが、結果はそれぞれに異なるものであった。特にCys3Ser/Leu73Gly変異体は9%の活性しかないというフィッティング結果であった。このような場合CFCAでのセンサーグラムの傾きが野生型のもの(図9)に比べて小さくなるのが観察される。ここで得られた濃度情報を用いたカイネティクス解析の結果が図11および表2である。図9と図11のセンサーグラムを比較した場合、CFCAを測定する場合とカイネティクス測定をする場

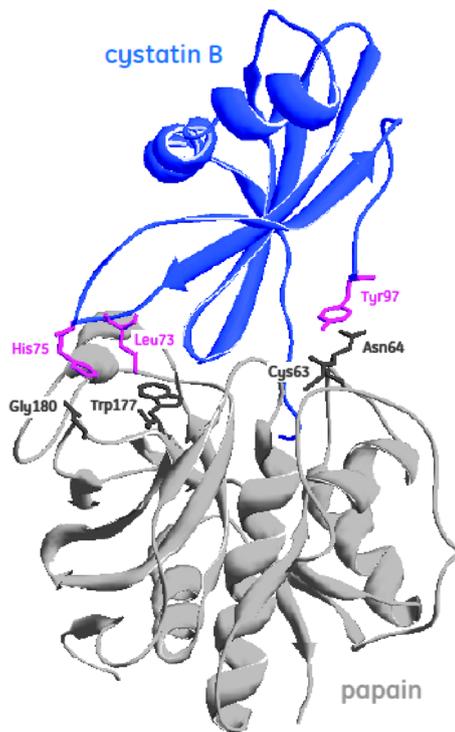


図10 シスタチンBとパパイン

表1 CFCAを用いた活性タンパク質濃度定量結果

試料	CFCA 定量値 (% 対吸光度法)
Wild type	94
Cys3Ser/His75Gly	101
Cys3Ser/Leu73Gly	9
Cys3Ser/Tyr97Ala	99
Cys3Ser	83

合でセンサーグラムのレスポンスの大きさや形状が大きく異なることがわかる。また仮に本測定でCFCAを行わなかった場合、上記変異体の K_D 値や k_a 値の真値が10倍程度異なる誤った結果を得てしまうことを示唆している。

このようにCFCAは、標品なしで活性濃度を測定することのできる迅速な手法であるため、今回示した例の他にもバイオ医薬品の安定性、バイオ医薬品製造におけるバッチ間の比較、投与量の算出など様々な場面において利用されることが期待される。

3・4 SPRを用いたサーモダイナミクス解析

サーモダイナミクス解析を行う手法としては次節で述べるITCが一般的であるが、SPRでも数式を用いて可能になる。解離定数(K_D)は以下Van't Hoff式によって

$$\ln K_D = \Delta H^\circ/RT - \Delta S^\circ/R = \Delta G^\circ/RT \dots\dots(12)$$

と表される(R :気体定数, T :絶対温度)。

複数の測定温度で K_D を算出し、その結果を図12の

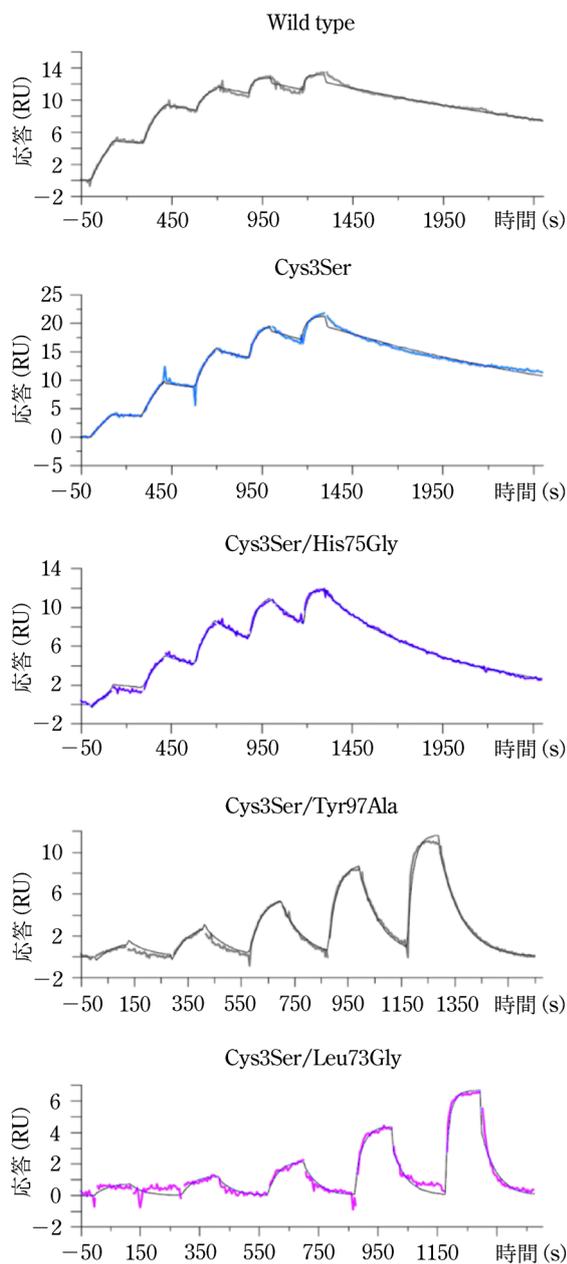


図 11 カイネティクス解析のセンサーグラム

表 2 カイネティクス解析結果

試料	$k_a (M^{-1} s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$k_D (M)$
Wild type	1.8×10^6	4.1×10^{-4}	2.3×10^{-10}
Cys3Ser	0.9×10^6	5.3×10^{-4}	5.8×10^{-10}
Cys3Ser/His75Gly	1.1×10^6	1.7×10^{-3}	1.5×10^{-9}
Cys3Ser/Tyr97Ala	1.7×10^6	1.2×10^{-2}	7.1×10^{-9}
Cys3Ser/Leu73Gly	1.1×10^6	2.3×10^{-2}	2.2×10^{-8}

Van't Hoff plot にプロットするとその傾きと切片から、相互作用のエンタルピー ΔH およびエントロピー ΔS を求めることができる。

さらに結合および解離速度定数 (k) は、Eyring plot により、

$$\ln k/T = \Delta S^\ddagger/R - \Delta H^\ddagger/RT + \ln k_B/h$$

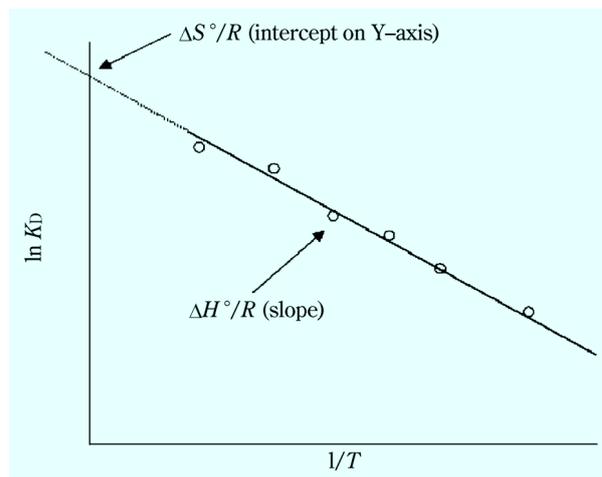


図 12 van't Hoff plot

$$\dots\dots\dots (13)$$

(k_B : ボルツマン定数, h : プランク定数)

と表され、遷移状態での物理状態を予測することができる。このように数式を用いることで SPR でもサーモダイナミクス解析が可能となる。ITC と比較した特徴は平衡状態だけでなく遷移状態におけるサーモダイナミクス解析も可能であることと、一般的には ITC よりも少量のサンプル量で測定が可能であるため、互いに補完する技術として適用することが可能である。

4 ITC を用いたサーモダイナミクス解析と数式の理解

相互作用に由来する熱収支量を直接検出することができる ITC は、サーモダイナミクス解析をするために広く使われる装置である。サーモダイナミクス解析は“何故”相互作用するのかの要因を導き出すことができる。例えば分子間相互作用において、その結合に水素結合やファンデルワールス力が関与している場合、主にエンタルピー駆動型（結合のギブズエネルギーのほとんどをエンタルピーが占めている状態）となり、疎水性相互作用が関与する場合は、エントロピーが結合を駆動すると考えられている。これらの解析により、分子間相互作用メカニズムを予測できるだけでなく、好ましい相互作用メカニズムに最適化していくうえでの強力な情報が得られる⁴⁾。特に、低分子医薬品の開発においては、エンタルピー駆動型の結合メカニズムがより特異性の高い結合であると考えられるなど、相互作用の熱力学的解析は、創薬の分野においても重要な分析手法となりつつある。

ITC も SPR と同じく相互作用を解析することができるが、溶液系での測定であること、測定データとして滴定毎の相互作用に伴う熱収支量を用いるため、数式が異なってくる。分子 M に対して分子 X を滴定した場合の結合定数 K_A （解離定数 K_D の逆数）は以下の式で定義

づけられる。

$$K_A = [MX]/[M] \cdot [X] \dots\dots\dots(14)$$

ここで分子 M の X との複合体存在比 θ は $\theta = [MX]/M_t$ で表されるため式 (14) は以下のように書き換えられる (ここで M_t は分子 M の総量)。

$$K_A = \theta/(1 - \theta) [X] \dots\dots\dots(15)$$

また、X の総量 X_t は以下の式で表される。(ここで n は結合サイト数)

$$X_t = [X] + n\theta M_t \dots\dots\dots(16)$$

両式から以下の二次方程式が導かれる

$$\theta^2 - \theta[1 + X_t/nM_t + 1/nK_A M_t] + X_t/nM_t = 0 \dots\dots\dots(17)$$

一方で、測定セルの容量 V_0 における θ に対する総熱収支量 Q は以下のように表される。

$$Q = n\theta M_t \Delta H V_0 \dots\dots\dots(18)$$

この式の θ に式 (17) の解を代入すると

$$Q = nM_t \Delta H V_0 / 2 \times [1 + X_t/nM_t + 1/nK_A M_t] - \sqrt{(1 + X_t/nM_t + 1/nK_A M_t)^2 - 4X_t/nM_t} \dots\dots\dots(19)$$

となる。(ここで V_0 は測定セル容量)

ここで得られた Q は i 番目の滴定終了時の積算熱収支量を意味するが、測定データは各滴定開始時から終了時に発生した熱量で得られる。これは理想的には $\Delta Q_{(i)} = Q_{(i)} - Q_{(i-1)}$ と表されると考えられる。しかし、実際の測定においては滴定ごとに滴定容量分の溶液が増加するので、その分の熱収支が系内に及ぼす影響を補正して以下の式で記述する。

$$\Delta Q_{(i)} = Q_{(i)} + dV_i/V_0 [(Q_{(i)} + Q_{(i-1)})/2] - Q_{(i-1)} \dots\dots\dots(20)$$

i 番目の滴定で生じた実測熱量値に対して、この式に基づいてフィッティングをすることで K_A , n , ΔH 値が算出される。

通常 20 回程度の滴定をして測定するが、これを 1 回の滴定にしてその滴定カーブから上記熱力学諸量を求める方法⁵⁾も開発され現在解析ソフトウェアに搭載されている (single injection method ; SIM)。この手法を用いることで、測定時間を短くすることが可能になった。さらに、前節において SPR を用いてサーモダイナミクス

解析をすることは数式を利用することにより可能であることを記述したが、一方で ITC でもその等温滴定曲線の形状からカーブフィッティングによりカイネティクス解析を試みた報告⁶⁾もある。実際のカイネティクスおよびサーモダイナミクス測定においては、サンプルの特性などによって SPR, ITC のどちらが適しているかが決まることも多い。例えば、固定化することで変性するようなタンパク質であれば ITC のほうが良いとなるし、サンプル量を多く用意できない場合などは SPR のほうが適しているとなるだろう。しかし、このように数式を用いて二つの異なる手法から互いに同様の数値を算出することも可能である。

5 ま と め

本稿では SPR と ITC を用いた相互作用解析で用いられている数式について記述した。ただの物理的な数値であった検出器から出力された情報に、数式を用いて命を吹き込むことによって、その活用範囲を広げることができる。また、理想系とは異なる実際の測定系に対応するため、数式では様々な補正を加え活用されている。おそらくこれは多くの他の分析装置においても共通して言うことだろう。このような解析の裏にある数式の基本を理解することにより、実際の測定においても、解析結果の信頼性の検証や、データの解釈への一助になると考えられる。

文 献

- 1) U. Jönsson, M. Malmqvist : *Advances in Biosensors*, **2**, 291 (1992).
- 2) R. A. Copeland, D. L. Pompliano, T. D. Meek : *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5** (9), 730 (2006).
- 3) E. Pol : *J. Vis. Exp.*, **37**, e1746 (2010).
- 4) C. F. Shuman, M. D. Hämmäläinen, U. H. Danielson : *J. Mol. Recognit.*, **17**, 106 (2004).
- 5) N. Markova, D. Hallén : *Anal. Biochem.*, **331** (1), 77, (2004).
- 6) D. Burnouf, E. Ennifar, S. Guedich, B. Puffer, G. Hoffmann, G. Bec, F. Disdier, M. Baltzinger, P. Dumas : *J. Am. Chem. Soc.*, **134** (1), 559 (2012).

三谷知也 (Tomoya MITANI)

GEヘルスケア・ジャパン株式会社 (〒169-0073 東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルディング)。東京理科大学大学院理工学研究科修了。

E-mail : tomoya.mitani@ge.com

