

バイオレイヤー干渉法による生体分子間相互作用の測定



齊藤 貴士

1 はじめに

バイオレイヤー干渉 (bio-layer interferometry : BLI) 法は、光学センサーを利用し分子間相互作用、主に生体分子間の相互作用を観測するのに用いられる技術である。観測に用いられる光はアクティブセンサー (以降バイオセンサー、図 1A) の表面で反射され、この反射光はセンサー表面に固定された分子 (リガンド) の影響を受けるため、リガンド上に起きた分子間相互作用等の変化を、反射される光の変化としてリアルタイムに観察することができる。この技術は無標識で分子間の相互作用を観察することが可能である。この際、リガンドと相互作用する分子はアナライトと呼ばれる。BLI 法を利用し生体分子間の相互作用を測定する装置として、Forté bio 社の BLItz™ や Octet シリーズが販売されている。同様に光学センサーを利用した分子間の相互作用を観察する手法には表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance : SPR) 法があるが、大きな違いは SPR 法では反射光の屈折率の変化を利用しているのに対して、BLI 法が光の位相の変化を利用する点である。

2 BLI 法による生体分子間相互作用の観測

光ファイバーとなっているセンサーの先端に固定化された分子の情報を得る白色光干渉法自体は、目新しい技術ではない。本稿で取り上げる BLI 法はこの技術を生体分子間相互作用の解析に用いている。光ファイバーを通過する白色光はファイバーと生体分子層の界面 (図 1B, C の界面 1) および生体分子層とバッファ層の界面

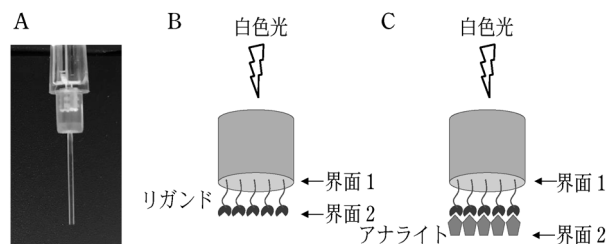


図 1 BLI 法で用いられるバイオセンサーとセンサー先端部の模式図。A : バイオセンサー。光ファイバーとなっている。B, C : バイオセンサー先端部。

Detection of Biomolecular Interactions using Bio-Layer Interferometry Method.

(図 1B, C の界面 2) の二つの面で反射される。この屈折率の異なる二つの層から反射される白色光は互いに干渉を起こす (干渉波)。バイオセンサーの先端のリガンドがアナライトと相互作用すると生体分子層の反射光の干渉波の位相が変化し、スペクトルの波長がシフトする。この変化から分子間の相互作用の情報を抽出することができる¹⁾。

BLI 法の特徴の一つは、リガンドが固定化されたセンサー上に流路でアナライト溶液を接触させる SPR 法と異なり、バイオセンサー自体を直接もしくは Deep well プレート中のアナライト溶液に浸し測定する点にある。これによりアナライト溶液の粘度などの制約が緩和され、細胞を破砕処理した可溶画分でも測定が可能である。また、アナライト中の難溶性の夾雑物により測定に不具合が生じて、アナライトと溶液を拭き取るかディスプレイサブルの Deep well プレートを交換すればよい。バイオセンサーは金の薄膜で作られる SPR 法のセンサーチップより安価に手に入れることができるが、使用期限が比較的短い。この点が今後改善されればより汎用性が向上するであろう。

BLI 法により得られる分子間相互作用の情報は結合速度定数 (k_{on})、解離速度定数 (k_{off}) などの速度論的パラメータおよび平衡解離定数 (K_D) である。これらの解析については装置に付属するアプリケーションで簡単に解析することができる。速度論的パラメータの測定では一般に以下のステップで行われる (図 2)。

① バイオセンサーへのリガンドの固定化。② アナライトの結合測定。③ アナライトの解離測定。④ バイオセンサーの再生。

縦軸には干渉波の波長のシフト (nm) をとる。① のリガンドの固定化については次節で詳しく述べる。② で使用するアナライト溶液については予想される K_D から、解析に必要な数種類の濃度について測定することが多い。一つのバイオセンサーで複数のアナライト濃度で測定を繰り返す際には、それぞれの濃度で② から④ を繰り返す。② のステップではリガンドが固定化されたバイオセンサーをアナライト溶液に浸し、BLI の変化 (図 2 の縦軸) から結合速度定数 (k_{on}) を算出する。この際、バイオセンサーをアナライト溶液に K_D が μM オーダーであれば 1~3 分程度、 K_D が nM オーダーではこれ以上の時間接触させ測定する。続いてアナライトが入っていないバッファにバイオセンサーを浸けて③ のステップに移る。このステップではリガンドからアナライトが解離する現象が観察される。 k_{off} の値は一般的に結合が強いほど小さく、アナライトが解離するのに時間がかかる。実際の測定では結合の強さを考慮して時間を設定する。 K_D が nM オーダーの相互作用では K_D は k_{on} と k_{off} の比から算出が可能で、複数の濃度で

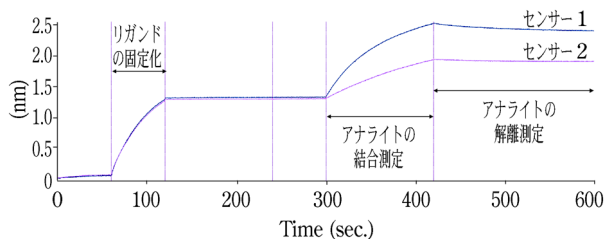


図 2 BLI 法による生体分子間の相互作用測定の結果。アナライトの濃度が異なる系を 2 本のバイオセンサーで同時に計測している。

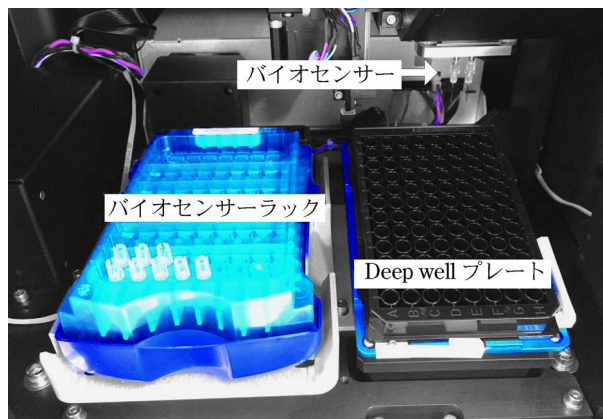


図3 Fortébio社 Octet K2 システムの内部

測定することで精度を検証できる。一方で K_D が μM オーダーの比較的弱い結合では、 k_{on} と、 k_{off} の値が非常に大きくなり、正確な値を得ることが難しくなる。この場合は、各アナライト濃度における BLI の変化量をプロットして K_D を算出する。測定中はアナライト溶液を攪拌することで、バイオセンサー近辺の局所的なアナライト分子の濃度変化を防いでいる。③のステップのバイオセンサーをバッファに浸すだけでは、アナライトを完全にリガンドから剥がすことが難しい。そこで繰り返し測定では④のステップのリガンドに結合したアナライトを剥がし、バイオセンサーを再生するための条件をあらかじめ調べておく必要がある。再生条件は高濃度の塩、低 pH もしくは高 pH のバッファや界面活性剤を用いるのが一般的であるが、この中でもできる限り温和な条件で行うのが良い。これらの操作は BLItz では手動で、Octet シリーズ (図3) では自動で行われる。

3 バイオセンサーへのリガンドの固定

実際の BLI 法による生体分子間相互作用の観測では、まずバイオセンサー表面にリガンド分子を固定化する必要がある。リガンドはタンパク質分子であることが多い。固定化には強固な分子間作用を利用した方法が考案されている。例えばタンパク質の生成で用いられる His-tag (ヒスチジンタグ融合タンパク質) やグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)-tag, Strep-tag[®] などの tag を利用した固定化がある。His-tag を利用した固定化であれば、リガンドとなるタンパク質の N 末端もしくは C 末端に 6 残基もしくは 8 残基程度のポリヒスチジン (His-tag) を付加したタンパク質を調製する。His-tag は Ni などの金属との間にキレート錯体を形成するので、バイオセンサー先端にあらかじめ Ni-NTA 等をコーティングしておけば、His-tag タンパク質を固定化できる。

タグを用いないタンパク質のバイオセンサーへの固定化法もある。この手法で持ちられるバイオセンサーの先端には、カルボン酸が露出している。このカルボン酸を N-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) とエチル (ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) で活性化する。この状態でバイオセンサーにリガンドタンパク質溶液に接触させれば、タンパク質のリジン残基の側鎖との間に共有結合が形成され、リガンドが固定化される。

抗体をリガンドとしてバイオセンサーに固定化する場合には Protein A や Protein G と抗体の相互作用を利用できる。このバイオセンサーでは先端に Protein A もし

くは Protein G がコーティングされており、必要に応じて使い分ける。Protein A はヒト免疫グロブリンの一種である IgG の 4 種類のサブクラスのうち IgG₃ を除く 3 種類と結合する。また、ウサギの IgG も強く結合するが、結合しない動物種やサブクラスもある。一方、Protein A を選択する際には注意が必要である。一方、Protein G はヒト IgG₃ をはじめより多くの生物種とそのサブクラスと結合することができるが価格面で高価になりがちである。

リガンドの固定化では相互作用の測定中にリガンドが剥がれてしまわないことが重要となるため、より強固な結合による固定化を選択することが良い実験データを得るためのポイントとなる。ここで紹介したセンサー以外にもリガンドの固定においてユニークな特徴を持つバイオセンサーが市販されており、個々の測定に適した固定化方法を選択することができる。また、IgG をビオチン化すればバイオセンサー表面がストレプトアビジンでコーティングされたバイオセンサーで固定化するなど、同一のサンプルにおいて様々な固定化法が選択できる。測定がうまくいかないときは、リガンドの固定化方法を再検討することで解決するケースもしばしば見受けられる。タンパク質-タンパク質相互作用であれば、リガンドとアナライトを逆にして測定することも可能である。

4 おわりに

本稿では BLI 法による生体分子の分子間相互作用の速度論的パラメーターの算出に注目したが、本手法はこれ以外にも主に ELISA 法が用いられているタンパク質の定量や抗体濃度の定量などにも使用できる。また、高感度の装置においては医薬品の候補化合物などの様々な低分子化合物とタンパク質との相互作用を迅速に測定することができることから、医薬品のリード化合物を探索するためのスクリーニングにも適している²⁾。ワクチン開発を目指した利用も進められ、ウイルスをバイオセンサーに捕捉させる技術が開発されている³⁾。最近では新型コロナウイルス感染症 COVID-19 の研究においても活用されている⁴⁾。BLI 法は比較的簡単な操作で実験および解析が可能であることから、今後も様々な場面での応用が期待できる。

文 献

- 1) T. Do, F. Ho, B. Heidecker, K. Witte, L. Chang, L. Lerner : *Protein Expr. Purif.*, **60**, 145 (2008).
- 2) C. A. Wartchow, F. Podlaski, S. Li, K. Rowan, X. Zhang, D. Mark, K. S. Huang : *J. Comp. Mol. Des.*, **25**, 669 (2011).
- 3) X. Xiong, R. S. Martin, L. E. Haire, S. A. Wharton, R. S. Daniels, M. S. Bennett, J. W. McCauley, P. J. Collins, P. A. Walker, J. J. Skehel, S. J. Gamblin : *Nature*, **499**, 496 (2013).
- 4) D. Wrapp, N. Wang, K. S. Corbett, J. A. Goldsmith, C. Hsieh, O. Abiona, B. S. Graham, J. S. McLellan : *Science*, **367**, 1260 (2020).

齊藤貴士 (Takashi SAROH)

北海道科学大学薬学部 (〒006-8585 北海道札幌市手稲区前田 7 条 15 丁目 4-1)。
大阪大学大学院理学研究科博士後期課程修了。博士 (理学)。《現在の研究テーマ》創薬のターゲットとなるタンパク質間相互作用の解析。《主な著書》“薬学基礎化学 ④ 化学編, ⑤ 物理編” (京都廣川書店)。《趣味》家族で過ごす時間。

