

単一生体分子の光散乱による分子量計測および相互作用解析



西山 嘉男

1 はじめに

光散乱測定は、ナノ-マイクロメートルスケールの物質(半導体・金属ナノ粒子, ナノカーボン, 生体高分子)のサイズを分析する手法として広く利用されている。代表的な測定法である静的光散乱法および動的光散乱法の計測対象は微粒子・高分子の分散溶液であり, 粒子の平均サイズ(およびおよそのサイズ分布)に関する情報を得ることができる。一方, 近年では Sandoghdar らによって顕微鏡下で個々の粒子の光散乱を測定する技術が進展し¹⁾, 特に散乱光を干渉計測する干渉散乱顕微鏡によって従来の方法では主要な成分に埋もれていた微量成分の解析が可能となった。さらに, Kukura らのグループは干渉計測における背景ノイズの抑制や画像データの解析方法を向上させることで, 単一の生体高分子の分子量を定量することに成功した²⁾。この単一分子の分子量を測定できる手法は分子量光度法(Mass photometry, MP)と呼ばれ, 非接触かつ無標識でタンパク質やその複合体を高感度に検出することが可能である。MPは生

体分子間相互作用を解析する新たな測定法として期待され, 本稿ではその基礎となる原理や適用例について紹介する。

2 MPの原理

MPの原理, 測定装置の概要を説明する。物質が光を散乱する効率は分極率で表され, その大きさは物質の体積に比例する。特に, アミノ酸から構成されるタンパク質の場合には分子分極率と分子量の間には非常に良い線形関係が成り立っており, そのため散乱光の大きさは各生体分子の分子量を反映したものとなる²⁾。また, 散乱光を直接検出するのではなく, より強い参照光と干渉させることで, 得られる信号(干渉成分)はより強く, 分極率, 即ち分子量に比例する大きさとなる。実際の干渉散乱顕微鏡では, カバーガラス表面の分子にレーザー光を照射し, 生じる散乱光をガラスからの反射光と干渉させて CMOS カメラで画像検出する。また, 散乱光に比べて数桁以上となる反射光の強度を減少させるために, 入射レーザー光は対物レンズ後方で集光した後に顕微鏡へ導入している。これにより, 反射光のビーム径は散乱光の大きさに比べて小さくなり, 反射光の通過する部分のみを減光することで, 背景ノイズを減らしている(図1(a))³⁾。検出される画像では, 分子が存在する場合, 図1(b)に示すように負の干渉コントラストが現れる。この値は様々な形状のタンパク質の分子量(50~1000 kDa)に対して直線的に増加し, その結果, 各分子量が計測できる。さらに, 画像検出により多数の分子量が同時に計測できるため, 一度の測定(測定時間2分程度)で分子量分布を得ることが可能である。MPの分子量分布からはタンパク質の分解や薬剤との結合に関する情報が得られ, 生体分子の純度計測や相互作用解析に適用することができる。また, 光散乱に基づくため, 既存の単一分子計測法で起こる接触や標識による問題が生じず,

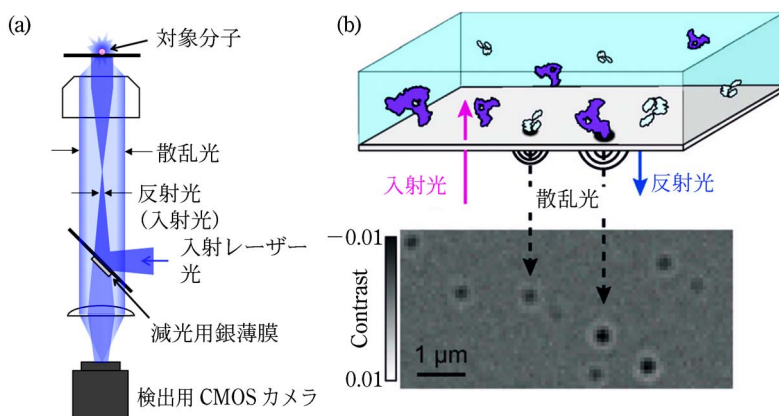


図1 MPの(a)測定装置および(b)原理の概略図

(a)は文献2)の図に変更を加えた。

必要な試料の濃度、容量は 100 nM, 10 μ L 以下と極微量である利点も備えている。MP の測定装置は Oxford 大学発のベンチャー企業 (Refeyn) より 2020 年から製品化されている⁴⁾。

3 生体分子間相互作用の解析

Kukura らは原理実証実験として MP を牛血清アルブミンに適用し、単量体とともに会合数 2~4 の多量体が形成されることを観測した²⁾。特に、個体数が単量体の 0.2% しか存在しない 4 量体においても高感度で検出されており、微量成分を計測できる MP の特性が実証されている。

また、MP の主要な適用例として様々な抗原・抗体反応が挙げられ、結合の解離定数 (K_d) を定量する手段として用いられている²⁾⁵⁾⁶⁾。抗がん剤として使用される抗体医薬トラスツマブ (TRA) に関しては、標的 (抗原) となる乳がんのマーカータンパク質である HER2 との結合が、TRA : HER2 = 1 : 1 および 1 : 2 で起こり、そのどちらも高い親和性をもつ ($K_{d1} = K_{d2} = 1.0$ nM) ことが明らかとなっている⁵⁾。また、免疫細胞に対する結合部位となる、Fc タンパク質 (Fc γ RIa) との結合も同様に研究されており、1 : 1 複合体の平衡定数 ($K_d = 26$ pM) だけでなく、速度論解析によって結合および解離の速度定数 ($k_b = 1.9 \times 10^7$ M⁻¹ s⁻¹, $k_d = 5.2 \times 10^{-4}$ s⁻¹) も定量されている。この結合の親和性は TRA の糖鎖の変性によって顕著に低下し、糖鎖部分が免疫細胞の認識に重要な役割を果たすことが報告されている。

4 おわりに

干渉散乱顕微鏡に基づく MP は、溶液中での生体分子間の相互作用を分子量の面から定量することが可能である。特に、極低濃度条件で接触、標識することなしに定量できることは従来の方法 (表面プラズモン共鳴、サ

イズ排除クロマトグラフィー等) にはない利点と言える。また、短時間で測定できるため、数分-数時間の現象に関しては速度論の解析も可能である。一方、MP では分子の構造に関して直接的な情報は得られないため、相互作用部位の特定など、分子間相互作用の詳細を明らかにする上では、NMR やクライオ電子顕微鏡といった測定法と併用することが重要になるだろう。また、ガラス基板への吸着が不可避となるため、現状では試料の濃度が 100 nM 以下に制限されている。今後この課題を解消することでより相互作用の弱い多くの生体分子間相互作用 ($K_d > 1$ μ M) に適用でき、より汎用的な分析機器として利用されると期待される。

文 献

- 1) K. Lindfors, T. Kalkbrenner, P. Stoller, V. Sandoghdar : *Phys. Rev. Lett.*, **93**, 037401 (2004).
- 2) G. Young, N. Hundt, D. Cole, A. Fineberg, J. Andrecka, A. Tyler, A. Olerinyova, E. G. Marklund, M. P. Collier, S. A. Chandler, O. Tkachenko, J. Allen, M. Crispin, N. Billington, Y. Takagi, J. R. Sellers, C. Eichmann, P. Selenko, L. Frey, R. Riek, M. R. Galpin, W. B. Struwe, J. L. P. Benesch, P. Kukura : *Science*, **360**, 423 (2018).
- 3) D. Cole, G. Young, A. Weigei, A. Sebesta, P. Kukura : *ACS Photonics*, **4**, 211 (2017).
- 4) Refeyn, <https://www.refeyn.com/>.
- 5) F. Soltermann, E. D. B. Foley, V. Pagnoni, M. Galpin, J. L. P. Benesch, P. Kukura, W. B. Struwe : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **59**, 10774 (2020).
- 6) D. Wu, G. Piszczek : *Anal. Biochem.*, **592**, 113575 (2020).



西山嘉男 (Yoshio NISHIYAMA)

金沢大学理工研究域 (〒920-1192 石川県金沢市角間町)。京都大学大学院理学研究科化学専攻修了。理学 (博士)。《現在の研究テーマ》時間分解分光分析法による金属ナノ粒子生成過程の解明。《趣味》子供とのキャッチボール。

E-mail : yosil166@se.kanazawa-u.ac.jp