

Mass Photometry 法を用いた生体試料の分析

志 波 公 平

1 はじめに

生体試料、とりわけタンパク質などの生体高分子は、産生時に合成高分子と比較して夾雑物きょうざつを多く含んでいる。一方、その構造は複雑で、機能も構造依存性が高く、構造を正しく保っているかどうか後の活性評価に影響を与える。そのため、分析対象とするタンパク質試料の物性解析、特に純度解析は重要で、特徴的な立体構造を保ったまま、濃縮などの前処理をせずに *in situ* で測定することが求められる。また、生体高分子は合成高分子と比較して収量が著しく低く、不安定であることが多いので、生体高分子を扱う研究者が物性解析を行う際には、①できるだけ少ない量で、②できるだけ短時間で、③できるだけ試料環境を変えずに、④できるだけ多くの情報を知りたい、という要望が出てくる。

2 Mass photometry 法

Mass photometry 法（以後 MP 法）は、英国 Oxford 大学の Prof. Philipp Kukura らによって提唱された手法

で、干渉散乱顕微鏡を用いたタンパク質の化学特性・物理特性を解析する手法である¹⁾²⁾。図1に検出部分の模式図を示す。スライドガラスの下方からレーザー光を照射し、反射して返ってくる後方散乱光を検出する仕組みとなっている。この際、スライドガラスからの反射光が同時に含まれるため、これと散乱光の干渉波を解析する。このとき、検出に干渉波顕微鏡を用いることでイメージングを行う。具体的には、獲得した画像を連続して取得し、それぞれの時点における画像とその前に獲得した画像の差分解析を行い、さらにノイズ除去の処理を行うことによって1分子に由来する画像コントラストを取得する。この検出方法を interferometric scattering（以後、iSCAT）検出と呼び、得られる画像を iSCAT 画像と呼ぶ。バックグラウンド（緩衝液のみ）と、屈折率の異なる試料との間では、異なる画像コントラストが得られるため、試料が検出された際に異なるコントラスト値を持つ画像が観測される。図2には、スライドガラスに対して近づいてくるタンパク質分子との距離と、その際に観測される画像コントラストの模式図を示す。後

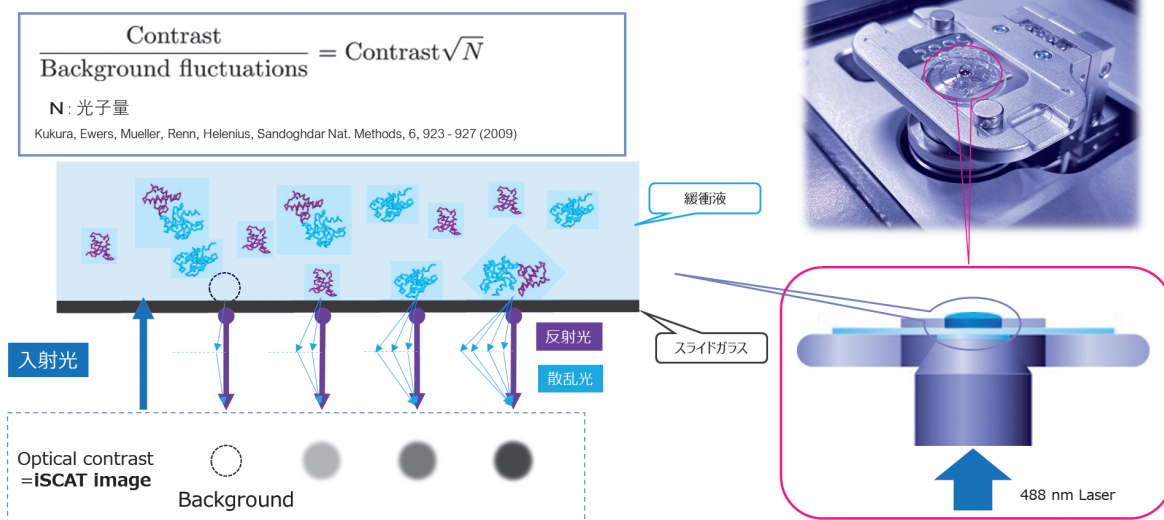


図1 Mass photometry 法の検出イメージ図

溶液中にタンパク質 A（赤色）、タンパク質 B（緑色）および A-B 複合体が存在している場合の様子とその時の iSCAT イメージ

のフレーム画像から前のフレーム画像を差し引くことによってコントラストの差が得られる（図2，左図）。スライドガラス表面から約40 nmが、iSCAT画像が得られる観測深さである。この観測領域にある分子はスライドガラスに接していなくてもiSCAT画像が観測されるが、スライドガラスに接近するにつれて、より明瞭なiSCAT画像が得られる。さらに、一旦スライドガラスに吸着すると差分解析の際に差し引かれ、獲得されるコントラスト値は低くなっていく。MP法では、それぞれの画像の位置情報も併せて解析しており、決まったエリアでの最大のコントラスト値を、そのエリアに吸着した1分子の値として定めている（図2，右図の赤枠で示した0.00 s時点が該当）。

また、MP法ではiSCAT画像が高速で取得できるため、観察領域における一連の変化を動画データとして取得することが可能である。その結果、観察領域におけるコントラスト分布を網羅的に解析できる。さらに、得られるiSCAT画像のコントラスト値が分子量にのみ依存するため²⁾、あらかじめ分子量既知の試料を計測し検量線を作成しておくことで、未知の試料のコントラスト値からその分子量を求めることができる。

厳密に言えば、コントラスト値は分子量ではなく散乱光強度に依存するので、散乱体積および分子の屈折率に依存するので、立体構造が変化した場合はiSCAT画像

に影響を与えることが予想される。しかし、立体構造変化による屈折率変化がコントラスト値に与える影響は、コントラスト値の算出による誤差よりもはるかに小さく、立体構造変化によるコントラスト値への影響は実際には無視できる程度となる。したがって、分析対象のタンパク質が折りたたまれた構造や伸びた構造などを形成していたとしても、分子量が同じであれば同じコントラスト値を示す。これは実際に130種類のタンパク質を用いて確かめられており、さらに変性剤存在下/非存在下においても変化がないことが実験的に示されている¹⁾。そのため、例えばタンパク質Aとタンパク質Bが相互作用した際には、純粋にコントラスト値の変化を分子量変化と捉えることができ、この性質を利用してタンパク質の化学量論的に結合比率を容易に算出することができる³⁾。

またMP法の特徴として、①使用する緩衝液の制限がほとんどなく、サンプルのラベル化、固定化等の処理が一切不要、②10 nM程度の試料が10 µL程度で計測可能、③測定時間は1分間で、前処理およびデータ解析を含めても数分間で完了、といった点があげられる。前項で述べたとおり、タンパク質試料は一般的に微量かつ低濃度であるものが多いため、これらのMP法の特徴は、タンパク質の物性解析に適していると思われる。表1には、溶液中のサイズ分布を計測する手法を比較した

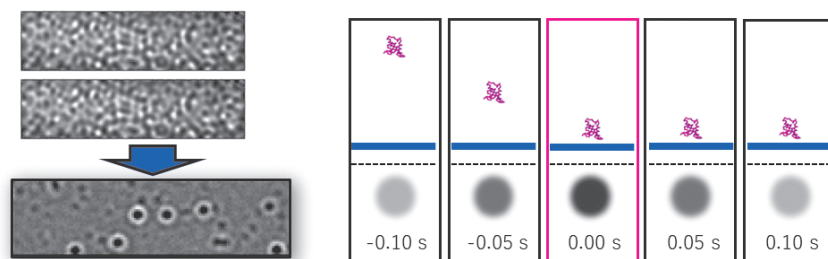


図2 MP法による1分子検出画像（左）と、1分子検出イメージ図（右）

通常の顕微鏡観察では何も像が観察されないが（左上）、差分解析を行うことでiSCAT画像を獲得する（左下）。iSCAT画像のコントラスト値は、対象分子がスライドガラスに最接近した際に最大となり、その後徐々に小さくなる（右）。

表1 溶液中サイズ分布計測手法の特徴

比較項目	Mass photometry (MP)	Dynamic Light Scattering (DLS)	Size Exclusion Chromatography Multi-Angle Light Scattering (SEC MALS)	Analytical Ultra-Centrifugation (AUC)
アウトプット	分子量分布 相対濃度 検出分子個数	粒子径 (Rh) 粒子径分布グラフ	分子量分布 (分布は SEC による)	粒子径 (Rh) 粒度分布 平均分子量 (SE 法)
サイズ単位	分子量	粒子径	分子量	粒子径
溶液中測定	◎	◎	△ (樹脂中を流れるため 厳密な溶液中かは疑問)	◎
至適サンプル濃度	1 µg/mL	500 µg/mL	1,000 µg/mL	1,000 µg/mL
必要サンプル量	10 µL	20 µL	200 µL	500 µL
測定時間	1 min	3 min	30 min	90 min

結果を示す。この表からも、MP 法が他の代表的な手法と比較して、著しく少ない試料量でも適用可能であることがわかる。

3 溶液中のタンパク質の分散性測定

多くのタンパク質は、異なるタンパク質と相互作用をすることによって機能を発揮する。例えば単量体では機能を有さないものでも、複合体を形成することにより機能を発揮するものもあれば、ある反応を起こすために基質と複合体を形成するものなど、複数の事例が存在する。そのため、機能を有する条件における複合体の分子量を知ることはタンパク質の機能を知る上で重要である。しかし、その一方で、複合体形成は別の側面をもつ。例えば、緩衝液の種類、pH、添加物などの影響によって形成される言わばアーティファクトとしての複合体である。同じタンパク質であっても分散させる緩衝液の種類によってはオリゴマーを多く含む場合がある。具体的に知られている事例としては、近年医薬分野において実際に使用されている治療用の抗体を挙げることができる。抗体医薬品中に存在する Sub-visible といわれる領域の粒子 (0.1~100 $\mu\text{m}\phi$) が免疫原性を示すことが知られてからは抗体医薬品中のオリゴマー解析が特に重要視されるようになり、それらは抗体などのタンパク質の分散性と大きく関わっていることが示された⁴⁾。特に近年、タンパク質の分散性評価が注目を集めている。分散性評価の場合、単量体から非常に大きな複合体までを含む可能性があるため、検出できるダイナミックレンジが広いことが求められる。MP 法は、幅広いダイナミックレンジを有しており、Refeyn 社の TwoMP のそれは 30~5000 kDa のレンジをもつ。図 3 には、Thyroglobulin (660 kDa) と empty AAV8 (3700 kDa) の混合物、および empty AAV8 のみの測定結果を示す。双方の試料は、

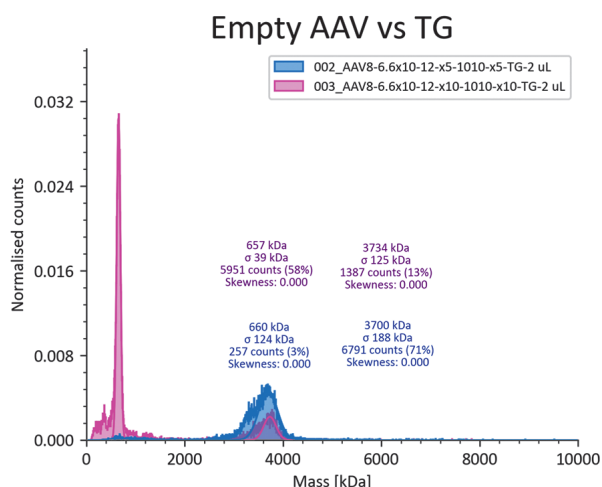


図 3 Mass photometry 法による Empty AAV8 および Thyroglobulin の混合液の測定

青および赤は混合比を変えて測定。

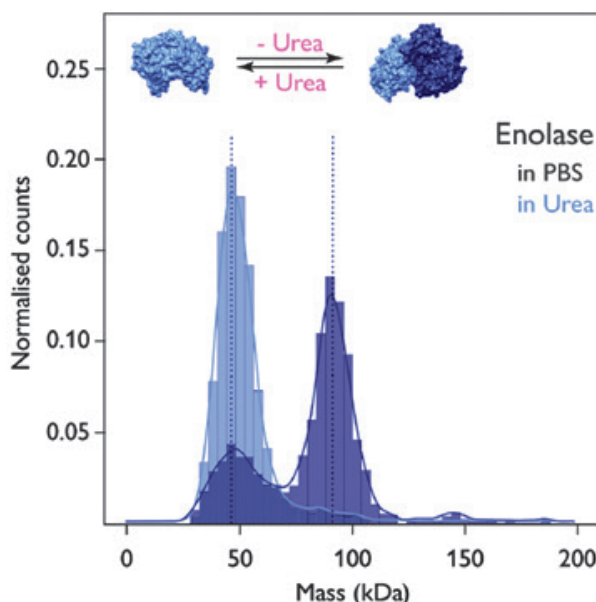


図 4 Mass photometry 法による PBS および 2 M Urea 中の Enolase の分子量分布

最終濃度において empty AAV8 の濃度をそろえて計測している。結果として、Thyroglobulin の有無にかかわらず MP 法により求めた empty AAV8 の平均分子量はほとんど影響を受けないことが分かった。一方で、Thyroglobulin 自体も、その 5 倍以上の分子量をもつ粒子が共存していても検出できることが示された。この結果は、MP 法が幅広いダイナミックレンジをもつことに加え、各粒子を定量的に検出できることを示唆している。

図 4 には Phosphate-buffered saline (以後 PBS) および変性剤である Urea-PBS 溶液中の Enolase の分子量分布を示す。Enolase は溶液中において単量体と二量体の平衡状態で存在することが知られているが、MP 法で解析した結果、PBS 中では二量体平衡状態が偏り、大部分が二量体として存在することが分かった。一方、Urea 存在下ではほぼすべてが単量体になった。この結果から、Enolase は変性剤存在下において二量体を形成できず単量体として存在することがいえる。また、それぞれの単量体のピーク位置が一致していたことから、MP 法は緩衝液中の添加物の影響をほとんど受けないことが示唆された。

4 まとめ

タンパク質の研究を行う上で、その純度や活性、物性を確認することは、研究自体を促進させるために極めて重要である。一方、タンパク質の物性解析では低濃度、少量、夾雑物の存在などが障害となる。MP 法はこれらの欠点を補い、*in situ* でタンパク質の正確な物性値や量を簡便に観測できる有用な手法である。MP 法が今後のタンパク質科学を牽引することを期待する。

文 献

- 1) G. Young, N. Hundt, D. Cole, A. Fineberg, J. Andrecka, A. Tyler, A. Olerinyova, A. Ansari, E. G. Marklund, M. P. Collier, S. A. Chndler, 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. P. Benesch, P. Kukura : *Science*, **360**, 423 (2018).
- 2) D. Cole, G. Young, A. Weigel, A. Sebesta, P. Kukura : *ACS Photonics*, **4**, 211 (2017).
- 3) F. Soltermann, E. D. B. Foley, V. Pagnoni, M. Galpin, J. L. Benesch, P. Kukura, W. B. Struwe : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **59**, 10774 (2020).
- 4) J. Carpenter, B. Cherney, A. Lubinecki, S. Ma, E. Marszal, A. M. Sluis, T. Nikolai, J. Novak, J. Ragheb, J. Simak : *Biologicals*, **38**, 602 (2010).
- 5) P. Kukura, H. Ewers, C. Muller, A. Renn, A. Helenius, V. Sandoghdar : *Nature Methods*, **6**, 923 (2009).



志波 公平 (SHIBA Kohei)

レフェイン・ジャパン株式会社 (〒657-0036 神戸市灘区桜口町 1-1-14). 九州大学大学院システム生命科学府. 工学博士. 《現在の研究テーマ》Mass photometry 法を利用した様々な条件の生体高分子の物性評価. 《趣味》バスケットボール (主に観戦).

E-mail : kohei.shiba@refeyn.com

会社ホームページ URL :

<https://refeyn.com>

原 稿 募 集

「技術紹介」の原稿を募集しています

対象：以下のような分析機器、分析手法に関する紹介・解説記事

- 1) 分析機器の特徴や性能および機器開発に関わる技術、2) 分析手法の特徴および手法開発に関わる技術、3) 分析機器および分析手法の応用例、4) 分析に必要な試薬や水および雰囲気などに関する情報・解説、5) 前処理や試料の取扱い等に関する情報・解説・注意事項、6) その他、分析機器の性能を十分に引き出すために有用な情報など

報など

新規性：本記事の内容に関しては、新規性は一切問いません。新規の装置や技術である必要はなく、既存の装置や技術に関わるもので構いません。また、社会的要求が高いテーマや関連技術については、データや知見の追加などにより繰り返し紹介していただいても構いません。

お問い合わせ先：

日本分析化学会『ぶんせき』編集委員会

[E-mail : bunseki@jsac.or.jp]