

二面偏波式干渉計の高感度化と微量タンパク質結合解析

Protein-Drug Binding Analysis in Micro-Size by Using Sensitized Dual Polarization Interferometer

大高 泰靖¹⁾・涌井 博充¹⁾・内藤 大介²⁾・杉本 幹治¹⁾・澁川 明正²⁾

Hiroyasu OHTAKA, Hiromitsu WAKUI, Daisuke NAITOU, Kanji SUGIMOTO
and Akimasa SHIBUKAWA

二面偏波式干渉計 (DPI) はセンサーチップ表面の状態を観測できる新しいフロー系分析装置で、センサーチップ表面に吸着 (固定化) した物質の密度・質量・厚さの絶対量を測定できる。DPI 装置は高感度であるがゆえに、部屋の空調による温度揺らぎの影響を鋭敏に受ける。本研究では、高感度測定ができる DPI の特性を十分に生かすために、部屋の空調による室温変化の影響を回避するための対策を行い、その効果を検証した。恒温ジャケットを DPI 装置に装着することにより周囲の温度変化を遮断できたことで感度が高まり、観測データのばらつきと結合定数誤差の低減に繋がることや、タンパク質の使用量を下げても測定結果に影響がないことが判明した。さらに、改良した DPI 装置を用いて、ヒト血清アルブミン (HSA) に対する抗ヒスタミン薬 chlorpheniramine や高血圧症治療薬 propranolol (*R* 体および *S* 体) の薬物結合解析を行うことができることが判明した。

1. 序論

表面プラズモン共鳴測定 (SPR) は¹⁾、センサーチップ上に固定化した物質 (リガンド) に、相互作用があるかを観測したい物質溶液 (アナライト) をセンサーチップに流すことで、リガンドとアナライトとの結合を観測できる装置である。抗原-抗体反応や酵素-基質反応などを観測できることから、医薬品開発でも用いられている。

これに対して、二面偏波式干渉計 (DPI) は²⁻³⁾、SPR と同じくセンサーチップ表面の状態を観測できる新しいフロー系分析装置で、次の特徴をもつ。①電場・磁場の二種類の電磁波を用いることで、センサーチップ表面に

吸着 (固定化) した物質の密度・質量・厚さの絶対量を測定できる (SPR では相対量しかわからない)。②高分子 (タンパク質等) から低分子までの測定できる (SPR でも可)。③測定できる物質の厚み分解能が 0.01nm である (SPR では厚さの見積もりは不可)。このように DPI は優れた測定能力をもつが、タンパク質⁴⁻⁹⁾、脂質分子集合体¹⁰⁻¹¹⁾、DNA¹²⁾ など、主に構造変化に関する報告しかされておらず、十分な有用性が知られていない。ウシ血清アルブミン (BSA) と低分子化合物との相互作用に関する報告もあるが¹³⁾、詳細な検討がなされていなかった。そのため、本研究室の以前の研究においてヒト血清アルブミン (HSA) に対する医薬品の結合解析を行った結果、低分子医薬品の HSA に対する結合量と結合定数を得ることができ、DPI の有用性を示すことができた¹⁴⁾。

DPI 装置は感度が良いため、その測定は室温の影響を敏感に受ける。即ち、本機器が設置された部屋の空調による温度揺らぎ¹⁵⁾ に起因して、機器に付属するシリンジポンプ内の測定溶液が周期的に膨張・収縮を繰り返し、測定結果に影響を与える。この影響は計算上、打ち消されるため最終結果には影響がないが、望ましい測定ではない。

連絡先：大高泰靖 hohtaka@cis.ac.jp

1) 千葉科学大学薬学部薬学科

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

2) 千葉科学大学薬学部生命薬科学科

Department of Pharmaceutical and Life Sciences, Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

(2019年9月30日受付, 2019年12月13日受理)

本研究では、高感度測定ができるDPIの特性を十分に生かすために、部屋の空調による室温変化の影響を回避するための対策を行い、その効果を検証した。また、DPI装置はフローセルを用いているため、医薬品開発等に用いられるハイスルットスクリーニングにおいて有効であるが、高額なセンサーチップのコスト（1枚300米ドル前後）が障害となる恐れがある。そのため、本研究ではセンサーチップを再利用できるかも調査・検討した。

2. 二面偏波式干渉計の測定原理

DPI装置は、レーザー光源、偏光素子、センサーチップ、イメージセンサーからなる（図1）。センサーチップは図2のように、材質の異なる5層からなり、内2層（図中のwaveguide層）が光路となる。この光路に対してレーザー光を照射する。センサーチップ内の光路を通過した2つのレーザー光は互いに干渉し、干渉縞が現れる。この干渉縞をイメージセンサーで観測する。

レーザー光がセンサーチップ内の光路を通過する際、光は全反射を繰り返すように設計されている。全反射が起こる際、表面プラズモン共鳴測定（SPR）と同様に、非伝搬光であるエバネッセント光が生じる（図3）。エバネッセント光が観測される領域（本装置ではセンサーチップ表面から約100nmまでの領域）において媒体屈折率が変化すると、反射光の位相が変化する¹⁶⁾。

一方、測定溶液は、図1のようにセンサーチップ表面にある2つの流路（図2：Sample ChannelとReference Channel）を流れるようにデザインされている。

本測定では、Sample Channelに対してタンパク溶液を流すことでタンパク質はセンサーチップ表面に吸着する。そして、エバネッセント光が観測される領域（図3）において吸着したタンパク質により媒体屈折率が変化し、センサーチップの上段光路（図2：sensing waveguide）を通過する光の位相が変化する。その結果、下段光路（図2：reference waveguide）の光の位相と異なり、観測される干渉縞が変化する。この干渉縞の変化を追跡することで、タンパク質の吸着に伴う位相変化を求めることができる。

また、光は磁場と電場の2種類の性質を持つが（図4）、DPI装置では偏光子を用いることで磁場に関する干渉縞の位相と電場に関する位相を別々に測定できる。電場に関する干渉縞の位相も磁場に関する干渉縞の位相もセンサーチップ上の環境変化（薬物結合に伴うタンパク質の構造変化）に応じて変化するが、両成分の変化量は異なる¹⁷⁾。DPI装置では、両成分の干渉縞の位相変化を解析することにより、センサーチップ表面に吸着（固定化）した物質の平均厚みと密度を求めることができる¹⁸⁾。

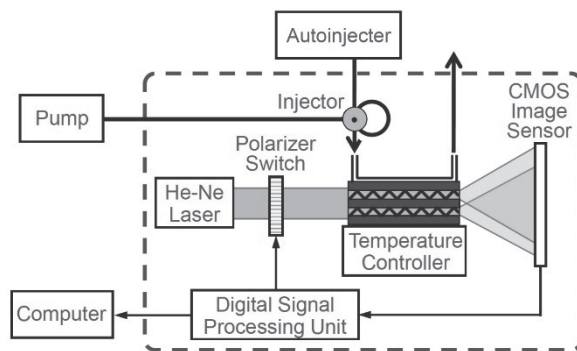


図1 DPI装置のシステム図

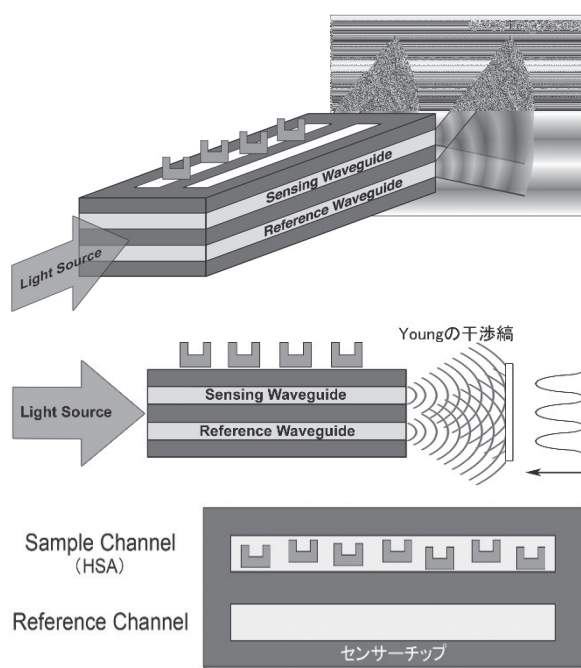


図2 センサーチップ模式図

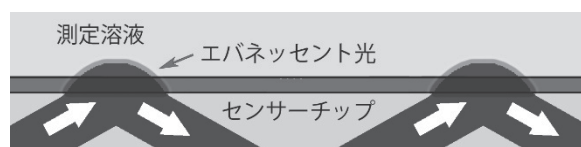


図3 センサーチップ表面に漏れ出すエバネッセント光

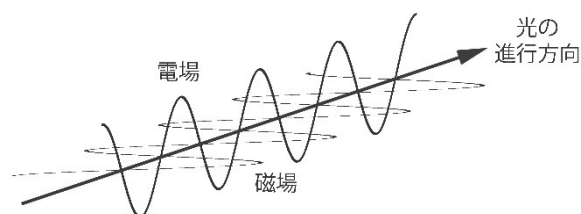


図4 光の性質

3. 機器・試薬と実験方法

【測定機器】

DPI装置として、Farfield Sensors AnaLight Bio 200を用いた。シリンジポンプとして、Harvard Apparatus PHD 2000を用いた。オートサンプラーとして、島津製作所SIL-10Aを用いた。恒温槽として、東京理化工機NCB-2500とNCB-1200を用いた。

【測定機器の恒温化】

シリンジポンプを含むDPI装置を断熱材(25mm ポリエチレン系保温板、旭化成サニーライト)で覆い、断熱した(図5)。断熱材内側の温度を一定に保つため、内部に配管を設置し、恒温槽から供給した恒温水を循環させた。DPI装置本体には廃熱のため8.6°Cの恒温冷却水を循環させ、シリンジポンプおよび測定部付近には22.4°Cの恒温水を流し、装置の恒温化を達成した。

【センサーチップ】

センサーチップとして、センサーチップ表面に何も加工

されていないFarfield Sensors FB80-unmodifiedを用いた。

【試薬】

試料タンパク質として、ヒト血清アルブミン(HSA、Sigma-Aldrich、脂肪酸フリー、Lot # 113K7601)を用いた。試料薬物として、(RS)-chlorpheniramine(東京化成工業、 $\geq 99\%$)、(R)-propranolol(Sigma-Aldrich、 $\geq 98\%$)、(S)-propranolol(Sigma-Aldrich、 $\geq 98\%$)を用いた。緩衝液調製試薬として、リン酸二水素ナトリウム二水和物(和光純薬工業、特級)、水酸化ナトリウム(和光純薬工業、特級)を用いた。調製する際に用いた精製水は、純水製造装置(Millipore Milli-Q Gradient A10、Elix UV5)で作製した。センサーチップ洗浄剤として、ヘルマネックスII(Hellma)、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS、Merck)を用いた。

【測定条件】

全ての測定は、24.0°Cの環境下で20mMリン酸緩衝液(pH 7.4)を溶媒として用いて測定を行った。

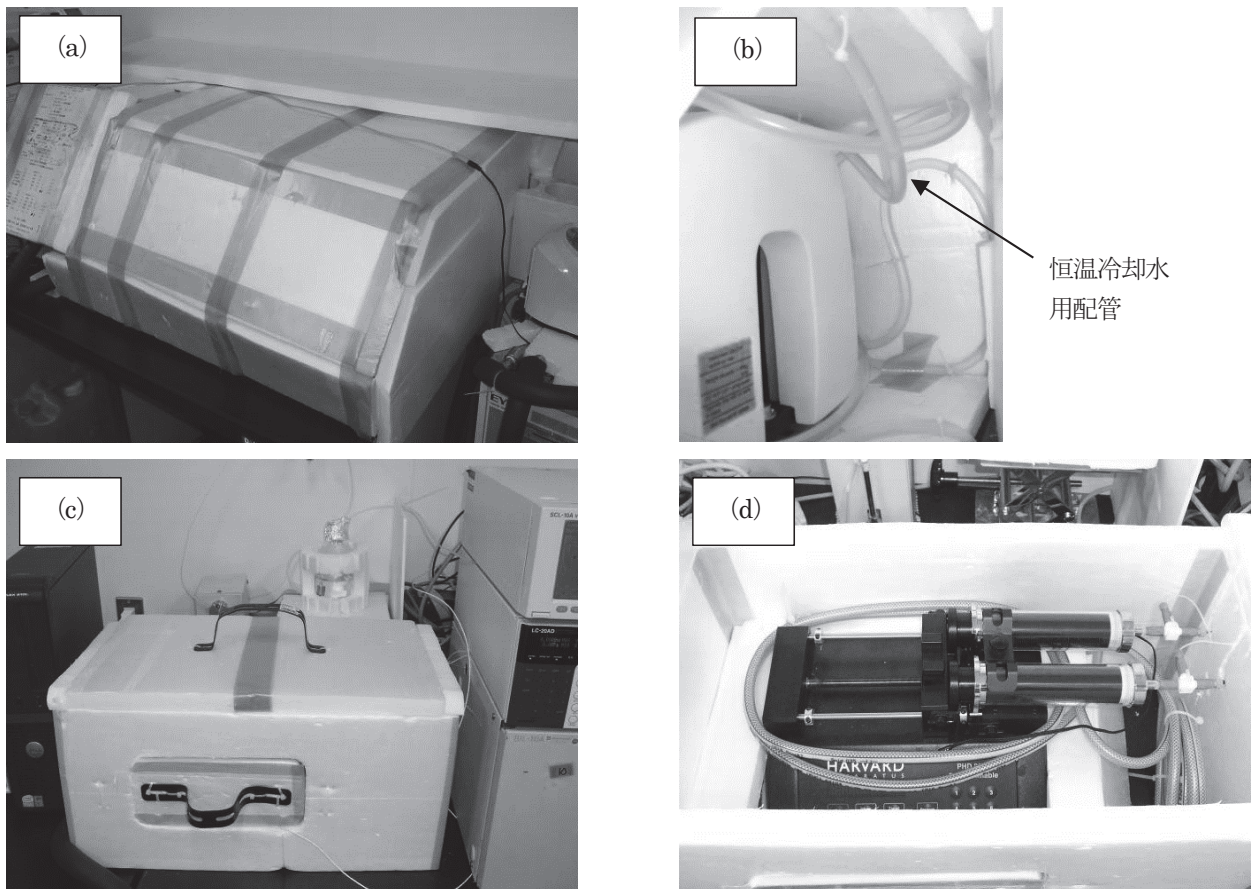


図5 恒温ジャケット装着後のDPI装置

(a)断熱材を装着したDPI装置と(b)その内部、(c)断熱材を装着したシリンジポンプと(d)その内部

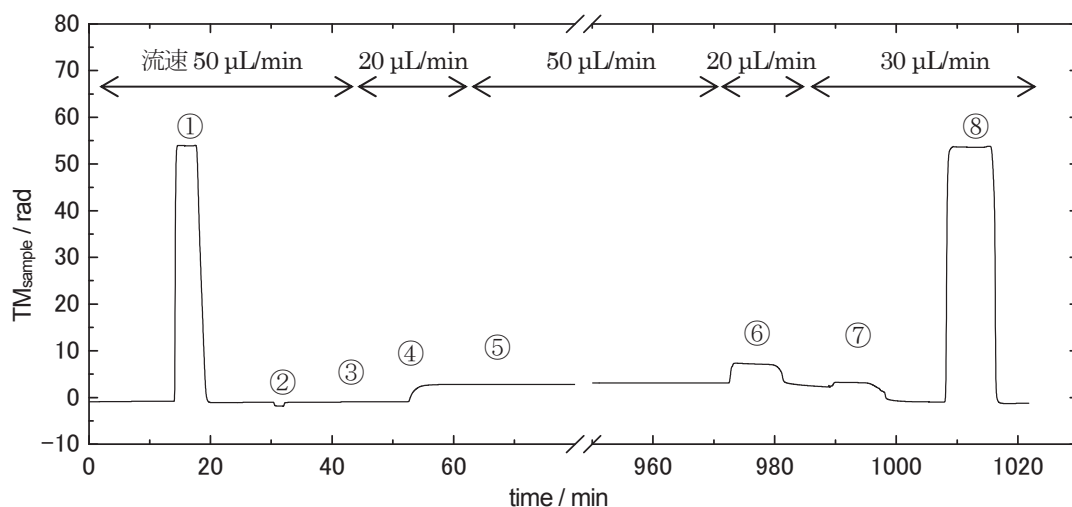


図6 センサーチップのキャリブレーションと測定操作

【センサーチップのキャリブレーション・測定操作】

センサーチップを装置本体に取り付けた後、脱ガスしたキャリアー溶液 (19.8mM リン酸緩衝液、pH 7.4) を流速50 μ L/minで流しつつ、以下に示す8つの溶液 (溶液①～溶液⑧) をオートサンプラーにより順次注入した (図6)。

- キャリアー溶液：19.8mM リン酸緩衝液、pH 7.4
 溶液①：80.0w/w% エタノール水溶液 (参照溶液)
 溶液②：精製水 (参照溶液)
 溶液③：測定溶媒 (20mM リン酸緩衝液、pH 7.4)
 (測定溶媒の屈折率測定)
 溶液④：20 μ g/mL タンパク質溶液
 溶液⑤：試料薬物溶液 (0.061～2000 μ M、16濃度)
 (試料薬物の測定、薬物ごとに繰り返し)
 溶液⑥：2v/v% ヘルマネックスII水溶液 (洗浄溶液)
 溶液⑦：2w/v% SDS水溶液 (洗浄溶液)
 溶液⑧：80w/w% エタノール水溶液 (洗浄溶液)

溶液①～③はセンサーチップのキャリブレーションを実施するために流した (それぞれ10分間、2分間、2分間)。溶液④は試料タンパク質をセンサーチップのSample Channelに吸着させるために一時的に遅い流速で流した (流速20 μ L/min、10分間) (図2)。その後、濃度が異なる試料薬物溶液 (溶液⑤、薬物濃度：61.0 nM、122 nM、244 nM、488 nM、976 nM、1.95 μ M、3.90 μ M、7.81 μ M、15.6 μ M、31.3 μ M、62.5 μ M、125 μ M、250 μ M、500 μ M、1.00mM、2.00mM) をそれぞれ2分間流し、結合測定を行った。測定終了後、センサーチップに吸着したタンパク質や薬物等を除去するため、溶液⑥を流速20 μ L/minで10分間、溶液⑦と⑧を流速30 μ L/minで10分間流した。

ここで、溶液③ (測定溶媒) は溶液④ (タンパク質溶液) や溶液⑤ (試料薬物溶液) の溶媒として使用した20mM リン酸緩衝液 (pH7.4) である。また、キャリアー溶液として測定溶媒を用いて測定を行った際に、低い薬物濃度において試料薬物溶液が流れてきた箇所 (フロー領域) を認識するのが困難であった。そこで、媒体屈折率の変化を大きくするため、測定溶媒を1v/v%だけ希釈した溶液 (19.8mM リン酸緩衝液、pH 7.4) をキャリアー溶液として使用することにより、薬物濃度が低い場合でもフロー領域を認識できるようにした。

これらの溶液を流しながら、先に記載した測定原理に基づき、センサーチップのSample ChannelとReference Channelに光の電場成分と磁場成分を照射することで干渉縞を発生させ、干渉縞の位相を観測した。以降、Sample Channelの磁場に関する位相の値を TM_{sample} 、電場に関する位相の値を TE_{sample} 、Reference Channelの磁場に関する位相の値を $TM_{\text{reference}}$ 、電場に関する位相の値を $TE_{\text{reference}}$ と略すことにする。

【DPI データ解析】

まず、80.0w/w% エタノール (溶液①) の屈折率 (1.3641, 24.0 $^{\circ}$ C) と蒸留水 (溶液②) の屈折率 (1.3326, 24.0 $^{\circ}$ C) を基準として、観測された位相の値 ϕ から式1を用いてセンサーチップ表面の屈折率 N を求めた。

$$N = N_0 + \frac{\lambda(\phi - \phi_0)}{2\pi L} \quad (1)$$

ここで、 N_0 は基準物質の屈折率 (80w/w% エタノールないし蒸留水)、 ϕ_0 は参照溶液の位相の値、 λ は入射光の波長 (633nm)、 L はセンサー部の長さ (15mm) である。

また、磁場成分を用いて観測された位相の値 ϕ_{TM} から、 ϕ_{TM} の値をみたとす厚みと密度のデータセット (図7の実線)

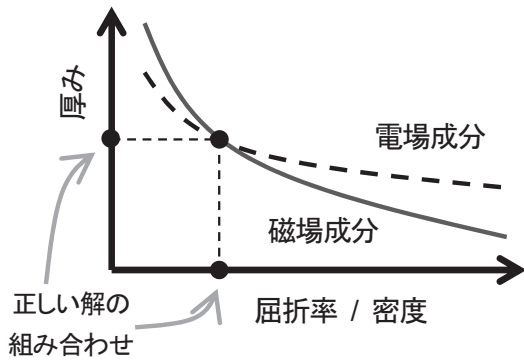


図7 厚みと密度の求め方¹⁷⁾

がMaxwellの関係式より得られる¹⁷⁾。そして、電場成分を用いて観測された位相の値 ϕ_{TE} から、同様に ϕ_{TE} の値をみたすデータセット(図7の破線)が得られる。図7の交点は ϕ_{TM} と ϕ_{TE} を同時にみたす値となり、その交点からセンサーチップ表面上の物質の厚みと密度を計算できる¹⁸⁾。

本実験では、Sample Channelの変化を観測することが目的であるため、Sample Channelのデータ(TM_{sample} 、 TE_{sample})からReference Channelのデータ($TM_{reference}$ 、 $TE_{reference}$)をそれぞれ差し引いた値(TM_{bind} 、 TE_{bind})を用いてこれらの計算を行い、センサーチップ表面上の物質の厚みと密度を計算した。これらの計算は測定装置に付属する専用ソフトウェアを用いて実行した。

次に、得られた厚み(m)と密度(g/m^3)の積から、単位面積あたりの質量 M_a (g/m^2)を計算した。一般的なタンパク質の密度は $0.71g/cm^3$ で屈折率が1.465と得られていることから²⁾、式2を用いてセンサーチップ表面上の試料タンパク質の被覆率(%)を計算した(図8)。

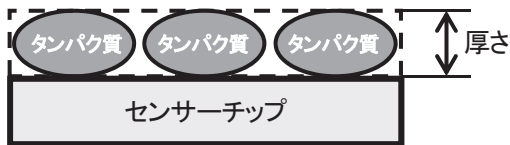


図8 タンパク質の被覆率を計算する際に用いる模式図

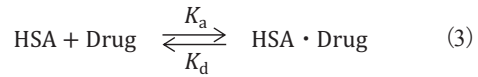
「被覆率 (%)」 = 100 ×

$$\frac{(\text{式1から計算された屈折率}N) - (\text{溶媒の屈折率}(1.3343))}{(\text{タンパク質の屈折率}(1.465)) - (\text{溶媒の屈折率}(1.3343))}$$

(2)

【結合定数解析】

HSAと薬物が式3のように結合すると、結合定数 K_a と解離定数 K_d は式4で示される。



$$K_a = \frac{1}{K_d} = \frac{[HSA \cdot Drug]}{[HSA][Drug]} \quad (4)$$

このとき、HSA1分子あたりの薬物の結合個数を N とすると、式5が成立する。ここで、 N_{max} はHSA1分子あたりの薬物の最大結合個数である。

$$N = N_{max} \times \frac{[Drug]}{K_d + [Drug]} \quad (5)$$

また、2種類の結合定数をもつ場合には、

$$N = N_{max1} \times \frac{[Drug]}{K_{d1} + [Drug]} + N_{max2} \times \frac{[Drug]}{K_{d2} + [Drug]} \quad (6)$$

となる。ここで N_{max1} 、 N_{max2} は、それぞれ、タンパク質分子上の結合部位1ないし結合部位2に結合する最大薬物数である。

HSA1分子あたりの薬物の結合個数に関する測定結果に対して式5(一成分解析)、式6(二成分解析)の理論曲線を用いて、フィッティング解析を行うことで、結合定数(K_d の逆数)および結合個数を得た。フィッティング解析は、MicroCal Originの非線形フィットプログラムを用いて実行した。

4. DPI装置の高感度化と使用タンパク質の微量化

4.1 DPI装置の恒温化によるデータ感度上昇

DPI装置は高感度であるがゆえに、部屋の空調による温度揺らぎ¹⁵⁾の影響を受け、観測データが周期変動する。その温度変化に対処するため、DPI装置を断熱材で覆い(恒温ジャケットを装着し)、装置の恒温化を行った(図5)。その結果、表1のように長周期ノイズ(周期: 10~12分間)と短周期ノイズ(周期: 2秒以下)の両方が小さくなり、S/N比をそれぞれ約4.5倍、約1.8倍改善することに成功した。このように、DPI装置を断熱化することでデータ感度の上昇が得られた。

表1 恒温ジャケット装着に伴うノイズの低減[†]

	装着前	装着後	改善度
長周期ノイズ	S/N=14	S/N=25	約1.8倍
短周期ノイズ	S/N=2	S/N=9	約4.5倍

† S/N比は、ピークの高さをノイズの振幅で除することにより求めた。ピークの高さは薬物濃度により変化するため、薬物濃度が約1 μ Mのときのピーク高さを基準とした。また、ピーク高さは使用した薬物の平均値を用いた。

4.2 センサーチップ再利用の検討

DPI装置をタンパク質-薬物結合解析に応用する場合、タンパク質が吸着したセンサーチップに薬物溶液を流すことで、センサーチップ上の屈折率変化から結合解析を行う。ただし、タンパク質は生体分子であるため、時間と共に分解・変質（構造変化）が起こるため、測定ごとにセンサーチップを交換し、タンパク質を吸着し直す必要がある。用いるセンサーチップは安価ではないため（1枚300米ドル前後）、センサーチップを再利用できるかを調査・検討した。

結合解析の測定終了後、センサーチップに吸着したタンパク質や薬物等を除去するため、当初、1 mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液を用いて洗浄した（流速20 μ L/min、10分間）。その結果、タンパク質を分解・除去するだけでなく、センサーチップ本体の厚みが減少し、センサーチップ表面を溶かしていることが判明した（本厚みは溶液①と②を用いたキャリブレーション結果から得られる）。そのため、ガラスセルの洗浄に用いられるヘルマネックスIIを用いたところ、汚れのみが除かれる一方、センサーチップ本体の厚みは変化しなかった。

センサーチップを再利用できるかを判定する指標として、センサーチップに対するタンパク質の吸着量を用いた。吸着したタンパク質は測定中、離脱しないことが確認済みである。図6の④で示されるように、タンパク質が吸着すると TM_{sample} の値は増加する。新しいセンサーチップではタンパク質の吸着により TM_{sample} は3.3 rad上昇した。一方、ヘルマネックスIIで洗浄したセンサーチップを用いた場合には2.3~2.5 rad上昇した（再利用を4回繰り返しても TM_{sample} の上昇度に変化はなかった）。よって、洗浄により吸着量は30%程度減少するものの、結合解析に必要な吸着量（ $TM_{\text{sample}} \geq 1.0$ rad）を上回るため、センサーチップ再利用が可能であることが示された。

4.3 使用タンパク質量の微量化の検討

DPI装置をタンパク質-薬物結合解析に応用する場合、 $TM_{\text{sample}} \geq 1.0$ radであれば結合解析が可能である。そこで、使用タンパク質量のさらなる微量化を目指し、タンパク質（HSA）溶液の濃度を1~1000 μ g/mLに変化させ、センサーチップ上へのタンパク質吸着量の度合いを TM_{sample} により観測した。

HSA濃度を1000、20、10、5、1 μ g/mLと減少させた結果、 TM_{sample} はそれぞれ、5.7、2.3、1.5、1.0、0.4 rad上昇した。そのため、タンパク質濃度5 μ g/mL（75 nM）以上において測定に必要な吸着量（ $TM_{\text{sample}} \geq 1.0$ rad）を満たした。従って、DPI装置では1 μ gのタンパク質量で測定できることが示された。ただし、本研究ではタンパク質濃度を20 μ g/mLに固定して実験を行った。

以上の結果から、DPI装置は周囲の温度変化に敏感で

あったため、恒温ジャケットを装着することで、周期ノイズを除去することができ、さらに、DPI装置の感度を上昇させることが判明した。

また、洗浄剤ヘルマネックスIIを用いることで、センサーチップの再使用が可能であること、また、微量なタンパク質量（1 μ g）でも解析できることが判明した。

5. HSAに対する薬物結合解析

タンパク質は分子量が数万と非常に大きな分子である。一方、医薬品や化合物の平均的な分子量は数百であり、タンパク質に比べて極めて小さい。そこで、今回改良したDPI装置がこの小さな医薬品などの化合物がタンパク質に結合した際の僅かな変化を観測できるかについて検討した。

血液中における医薬品の血漿タンパク質結合は医薬品の薬理効果発現や体内動態に影響を与えることから¹⁹⁻²⁰、試料タンパク質として、血漿タンパク質の大部分を占めるヒト血清アルブミン（HSA）を用いて、検討した。

5.1 センサーチップ表面上のHSA吸着状態

センサーチップ表面上のHSA吸着状態は、式2から計算される被覆率から予測できる。HSAを吸着させた直後の被覆率は約60%であった。薬物溶液を流し終えた時点（測定開始17時間後）でも被覆率は約60%であった。このことから、測定中HSAのセンサーチップ表面からの離脱は殆どないと考えられる。よって、被覆率から図9のようにHSAは適度な空間をもった上で吸着現象によりセンサーチップ表面に結合していると推測される。

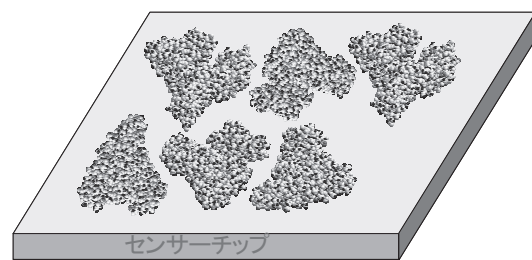


図9 推測されるセンサーチップ上のHSAの状態

5.2 薬物結合解析

HSAを吸着させたセンサーチップに抗ヒスタミン薬であるchlorpheniramine溶液（0.061~2000 μ M）を流し、4つの位相の値（ TM_{sample} 、 $TM_{\text{reference}}$ 、 TE_{sample} 、 $TE_{\text{reference}}$ ）を測定し、 TM_{bind} 、 TE_{bind} を計算した。試料薬物溶液を流した際の TM_{bind} と TE_{bind} の時間変化を示した（図10）。その結果、chlorpheniramine濃度が高くなるにつれ、 TM_{bind} と TE_{bind} のピークの大きさは大きくなった。

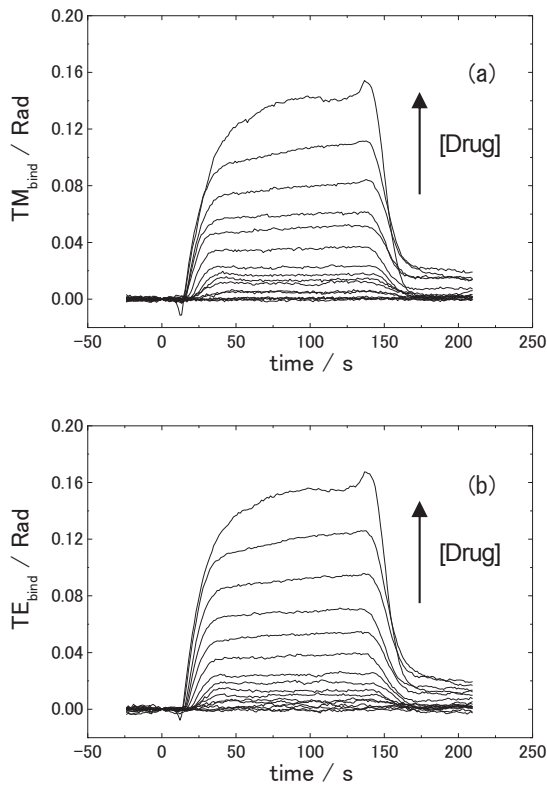


図10 TM_{bind} (a)、 TE_{bind} (b) のクロルフェニラミン濃度依存性 (0.061 ~ 2000 μM)

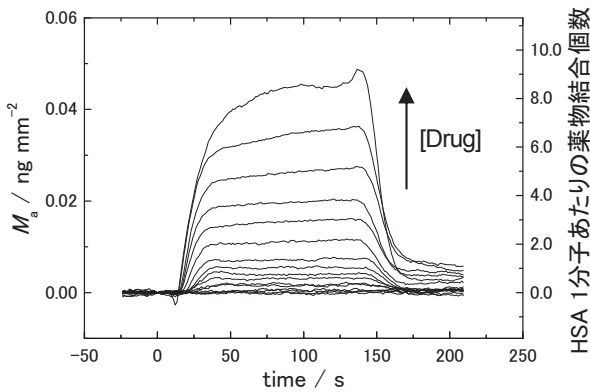


図11 クロルフェニラミン溶液の注入に伴う単位表面積あたりの質量変化(左軸)とHSA 1分子あたりの薬物結合個数の変化(右軸)

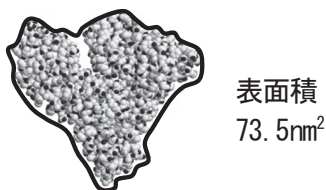


図12 HSA 1分子あたり表面積

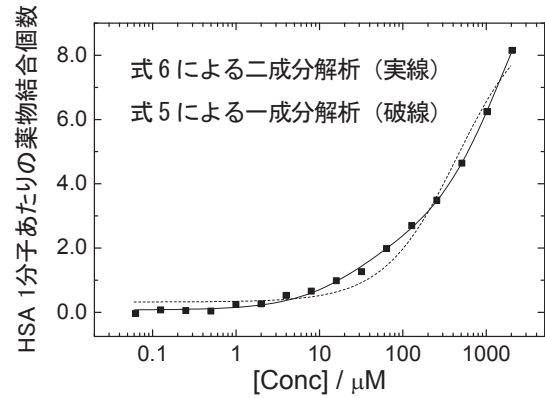


図13 クロルフェニラミン結合個数の濃度依存性

表2 HSA に対する試料薬物の結合定数[†]

試料薬物		K_a / 10^4M^{-1}	N_{max}
chlorpheniramine	強い	3.5	2.2
	弱い	0.058	10.8
(R)-propranolol	強い	9.6	0.8
	弱い	0.020	9.7
(S)-propranolol	強い	13.3	0.9
	弱い	0.020	8.0

[†] 測定条件: 20mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)、24.0°C

TM_{bind} と TE_{bind} のデータを解析することで得られた厚みと密度の積からセンサーチップ単位表面積あたりの質量変化 M_a を計算した (図11左軸)。ここで、HSAの結晶構造 (PDB ID: 1BJ5)²¹⁾ を用いて計算された最も広い投影図 (図12) の面積値 (73.5nm²) を用いて、図11左軸の数値 (ng mm⁻²) を HSA1分子あたりの薬物結合個数に換算した (図11右軸)。その結果、HSA1分子あたりの薬物結合個数変化を得ることができた。

chlorpheniramine濃度に対するHSA1分子あたりの薬物結合個数を図13にプロットした。chlorpheniramineの結合個数は、濃度の増大と共に急激に増大することが示された。式5 (一成分解析)、式6 (二成分解析) を用いてフィッティング解析を行ったところ、式5より式6の方がより良いフィッティングを示したことから、HSAに対するchlorpheniramineの結合は、結合力が異なる2種類の結合を有することが示された (表2)。強い結合についての結合定数は $3.5 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ となり、キャピラリー電気泳動法 ($1.3 \sim 4.1 \times 10^3 \text{M}^{-1}$)²²⁻²⁴⁾ や平衡透析法 ($4.3 \times 10^2 \text{M}^{-1}$)²⁵⁾ から得られた結果よりは大きな結合定数として得られ、UVスペクトル法 ($5.2 \times 10^4 \text{M}^{-1}$)²⁶⁾ とは同程度の値であった。本研究ではセンサーチップ表面に

HSAが固定化させているため、流動する液体中にあるHSAに対する結合を観測したキャピラリー電気泳動法や平衡透析法よりも結合定数が大きく見積もられたと考えられる。

解析から得られたHSA1分子あたりのchlorpheniramineの強い結合についての結合個数は2.2個と得られた。この結果は用いたchlorpheniramineがラセミ混合物で、R体とS体の2種類が共存した影響と考えられる。chlorpheniramineの結合定数に関する文献^{22,25)}でも結合定数がほぼ等しい。2種類の結合定数が観測されていることと一致する。

また、非常に弱い結合定数 $5.8 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ が観測された。これは、先の研究(架橋剤を用いてHSAを固定化した場合)においても観測され、タンパク質とセンサーチップとの間の隙間領域に試料薬物が入り込み、運動・拡散が抑制された薬物が見かけ上結合したように振る舞った結果、非常に弱い結合として観測されたものと考えられる¹⁴⁾。

試料薬物として、高血圧症治療薬(β 遮断薬)であるpropranolol(R体およびS体)を用いた場合も同様に結合力が異なる2種類の結合が観測され、強い結合はR体、S体共に文献値(それぞれ1.2、 $1.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$)²⁷⁾と同程度であった。propranololについてもセンサーチップ表面への吸着である非常に弱い結合を観測した(表2)。

5.3 改良したDPI装置の有効性

以上の結果から、今回改良したDPI装置を用いて、HSAに対するchlorpheniramineやpropranolol(R体およびS体)の薬物結合解析を行うことができることが判明した。その際、恒温ジャケットをDPI装置に装着することにより周囲の温度変化を遮断できたことで感度が高まり、薬物結合個数の濃度依存性のグラフ(図13)のばらつきと結合定数誤差の低減に繋がることや、タンパク質の使用量を下げても測定結果に影響がないことが判明した。

表面修飾がなされていないセンサーチップを用いることで、薬物結合測定後、洗浄剤ヘルマネックスIIの使用によりセンサーチップを再利用できることが示された。先の研究において¹⁴⁾、架橋剤を用いてセンサーチップ表面とHSAとを化学結合させた場合には被覆率が93%となり、HSAの密度が高すぎたため、薬物結合サイトが十分に露出せず、薬物の結合が制限された(薬物の最大結合個数 N_{\max} が0.3となった)。それに対して、表面修飾がなされていないセンサーチップを用いた本研究では、図9のようにHSAは適度な空間をもった上で吸着し(被覆率：約60%)、薬物が十分にHSAにアクセスできる空間が生じ、適切な薬物の最大結合個数を与えたと考えられる。よって、DPI測定において、被覆率の値も測定結果に影響を与えることが示された。

6. まとめ

DPIはセンサーチップ表面のわずかな変化(平均厚み、密度、吸着物質量の変化)を測定できる測定法であるが、感度が高すぎるがゆえに測定環境に影響を受ける。恒温ジャケットを取り付けることで、測定環境の影響を排除できたことから、DPI装置には恒温ジャケットに装着が必須であると考えられる。

これらの研究を通して、DPI装置はタンパク質と低分子の薬物との結合を観測できることが示された。本研究の成果は、連続的に多くの化合物を測定できるハイスループットスクリーニングに優れたDPI装置が医薬品開発に有用な結合分析法として利用できることを示すものである。

参考文献・補足資料

- Owen V (1997) *Biosens. Bioelectron.*, 12, i-ii.
- Cross GH, Reeves A, Brand S, Swann MJ, Peel LL, Freeman NJ, and Lu JR (2004) *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 37, 74-80.
- Daghestani HN, and Day BW (2010) *Sensors*, 10, 9630-46.
- Swann MJ, Peel LL, Carrington S, and Freeman NJ (2004) *Anal. Biochem.*, 329, 190-198.
- Lin S, Lee CK, Wang YM, Huang LS, Lin YH, Lee SY, Sheu BC, and Hsu SM (2006) *Biosens. Bioelectron.*, 22, 323-7.
- Biehle SJ, Carrozzella J, Shukla R, Popplewell J, Swann M, Freeman N, and Clark JF (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, 1689, 244-51.
- Thompsett AR, and Brown DR (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, 1774, 920-7.
- Sonesson AW, Callisen TH, Brismar H, and Elofsson UM (2007) *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 54, 236-40.
- Sonesson AW, Callisen TH, Brismar H, and Elofsson UM (2008) *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 61, 208-15.
- Terry CJ, Popplewell JF, Swann MJ, Freeman NJ, and Fernig DG (2006) *Biosens. Bioelectron.*, 22, 627-32.
- Lee TH, Hall KN, Swann MJ, Popplewell JF, Unabia S, Park Y, Hahm KS, and Aguilar MI (2010) *Biochim. Biophys. Acta*, 1798, 544-57.
- Wang J, Coffey PD, Swann MJ, Yang F, Lu JR, and Yang X (2010) *Anal. Chem.*, 82, 5455-62.
- Zwang TJ, Patel R, Johal MS, and Selassie CR (2012) *Langmuir*, 28, 9616-20.
- 大高泰靖, 涌井博充, 内藤大介, 杉本幹治, 澁川明正 (2019) *千葉科学大学紀要*, 12, 39-46.
- 日本で一般的に利用される個別空調方式(部屋ごとに温度調整ができる空調方式)では、約10分周期で冷媒の圧縮機

が動作するため、冷媒の圧縮率が周期的に変動し、それに
応じて冷却効率も変動する。そのため、空調機から送風さ
れる風の温度が周期的に3~4°C上下する。一方、欧米で
利用されるセントラル空調方式では、熱源から部屋までの
距離が遠く、部屋に送風されるまでに温度が均一化される
ため、室温の変化が生じにくい。

- 16) Hutchinson AM (1995) *Mol. Biotechnol.*, 3, 47-54.
- 17) Tien PK (1971) *Appl. Optics.*, 10, 2395-413.
- 18) Swann M, Freeman N, Carrington S, Roman G, and Barret P (2003) *Lett. Pept. Sci.*, 10, 487-94.
- 19) Hardy J, and Hardy KG (1998) *Science*, 282, 1075-9.
- 20) Price DL, Sisodia SS, and Borchelt DR (1998) *Science*, 282, 1079-83.
- 21) Curry S, Mandelkow H, Brick P, and Franks N (1998) *Nat. Struct. Biol.*, 9, 827-35.
- 22) Martínez-Gómez MA, Villanueva-Camañas RM, Sagrado S, and Medina-Hernández MJ (2007) *Electrophoresis*, 28, 2635-43.
- 23) Martínez-Gómez MA, Carril-Avilés MM, Sagrado S, Villanueva-Camañas RM, and Medina-Hernández MJ (2007) *J. Chromatogr. A*, 1147, 261-9.
- 24) Liu Y, and Zhou W (2006) *Anal. Sci.*, 22, 999-1003.
- 25) Hiep BT, Gimenez F, Khanh VU, Hung NK, Thuillier A, Farinotti R, and Fernandez C (1999) *Chirality*, 11, 501-4.
- 26) Gonzalez-Jimenez J (1994) *Chem. Biol. Interact.*, 91, 65-74.
- 27) Yang G, Zhao Y, Li M, Zhu Z, and Zhuang Q (2008) *Talanta*, 75, 222-6.