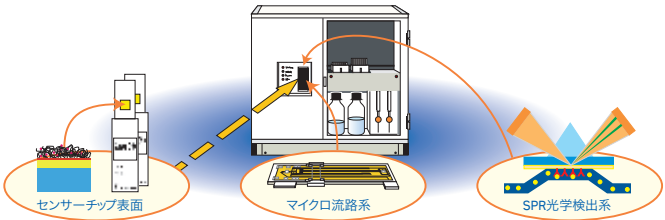


Biacoreによる生体分子の相互作用解析

Biacoreとは？

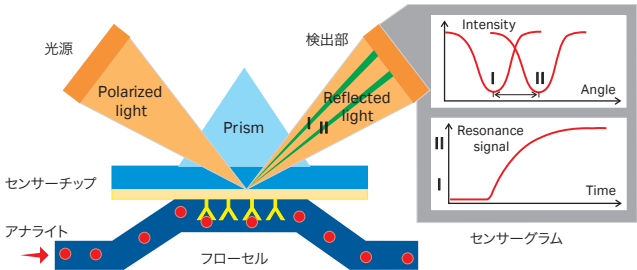
Biacore システムは標識を使わずにリアルタイムに生体分子の相互作用をモニタリングするシステムです。リアルタイムに得られる結合データは生体反応を制御するタンパク質とほかの生体分子とのダイナミックな相互作用を理解するのに無くてはならない情報です。Biacore システムはタンパク質とほかの生体分子との包括的な評価に必要な高品質、情報豊かなデータを提供します。



Biacore の 3 つの要素技術
Biacore では SPR 光学検出系、マイクロ流路系、センサーチップの 3 つの要素技術を統合して、分子の相互作用を測定します。

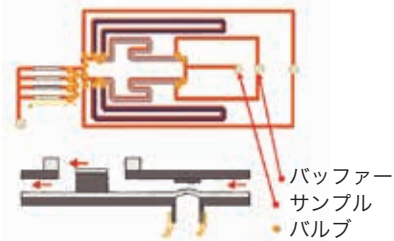
■ SPR 光学検出系

Biacore の検出系には、表面プラズモンが金属／液体界面で励起した場合に起こる、いわゆる表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance = SPR）の光学現象を採用しています。2 分子間の結合と解離にともなってセンサーチップ表面で生じる微量な質量変化を SPR シグナルとして検出します。右の図で金薄膜とガラスの界面で光が全反射するように照射すると、反射光の一部に反射光強度が低下した部分が観察されます（SPR シグナル発生）。この光の暗い部分の現れる角度は、センサーチップ表面の溶媒の屈折率に依存します。センサーチップ表面に固定化したリガンドにアナライトを添加し、2 分子間で結合反応が起きると質量が増加します。この質量変化（＝溶媒の屈折率変化）に比例して、光の暗い部分がⅠからⅡにシフトします。逆に、解離により質量が減少すれば、ⅡからⅠにその分だけ戻ります。Biacore システムでは、ⅠからⅡにシフトする量、すなわちセンサーチップ表



- ③ デッドボリュームの非常に少ないエアバルブを用いることにより、マイクロリットルレベルでの送液コントロールが可能です。

バッファー→アナライト→バッファーの切り替えは自動的に制御され、エアによるノイズが生じたり、アナライトの濃度が希釈されたりということは一切起こらないように設計されています。



■ センサーチップ

生体分子間相互作用の反応の場となるのが、このセンサーチップです。ガラスに金の薄膜を蒸着し、薄膜上にはリンカー層を介してデキストランを結合させています。相互作用を測定する分子のうちどちらか一方の分子をデキストラン上に固定化します。固定化反応のためにさまざまな構造をデキストラン上に導入しています。

デキストランを使うことのメリットは、

- ① 生体内に近い親水性の環境を作れることです。
- ② 添加サンプルの非特異的吸着を著しく減らすことができます。
- ③ 直鎖のデキストランを使用しているので、固定化したリガンドの自由度を高めることができ、スパーサー的な働きを持たせられます。



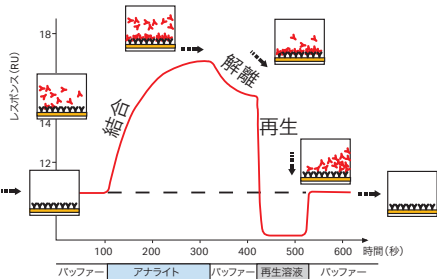
■ センサーグラムを見てみよう！

Biacore システムでは、一定流速でランニングバッファーをセンサーチップ表面に供給してデータを取得します。ここにアナライトを一定時間添加して、センサーチップ上に固定化したリガンドとアナライトの結合過程を観察します。アナライトの添加が終わるとバルブが自動的に切り替わり、もとのランニングバッファーがフローセルに供給されます。このとき、フローセル内のフリーのアナライトの濃度が瞬間的にゼロになり、アナライトがリガンドから解離する様子を見ることができます。解離過程を観察した後は、結合したアナライトを強制的に外す操作（＝再生）を行います。リガンドを失活させずに、なおかつ完全にアナライトを取り除くように再生条件を最適化すると、同じセンサーチップを用いて繰り返し測定することができます。Biacore の測定は、結合反応が平衡になるまで待つ必要がなく、1 回の測定に要する時間は 10 分間程度です。

センサーグラムを見ると、「アナライトがリガンド分子を認識するかどうか」、「アナライトとリガンドの複合体が安定に保持されるかどうか」がすぐにわかります。たとえば、いくつかの異なる配列の DNA をセンサーチップ上に固定化し、核内レセプターを添加したとき、どれか 1 つの DNA との結合レスポンスが得られれば、そのレセプターはその DNA の配列を特異的に認識したということがわかります。また抗原を固定化し、異なる抗体を添加したとき、各々の解離のカーブを比較すれば、解離しにくく安定的に結合している抗体も簡単に選別することができます。

さらにセンサーグラムの解析から、さまざまなパラメーターを算出することができます。

- ① 結合量からアナライトがリガンドと結合するかを知ることができます（結合特異性の確認）。
- ② センサーグラムのカーブから結合速度定数（ k_s ）と解離速度定数（ k_d ）を算出することができます（カインेटクス）。さらに、解離速度定数と結合速度定数の比からアフィニティー（解離定数、 K_D ）を求めます。



- ③ 対象分子の濃度を定量することができます。結合量はアナライト濃度に依存しますので、濃度既知の標準物質を用いて検量線を作成すれば、特異性を利用してクルードなサンプルでも対象分子の正確な定量が可能です。
- ④ 温度を変えてカインेटクスを求めることにより、相互作用の熱力学的パラメーターを算出することも可能です。

Biacore の最大の特徴は、2 分子の相互作用が平衡状態に達したときのアフィニティーだけでなく、平衡に至るまでの結合・解離反応の速さを知ることができることにあります。反応速度の違いはタンパク質の機能の差異を反映していることが次第に明らかになってきました。医薬品のスクリーニング、最適化にもカインेटクス情報が活用されています。

このようにセンサーグラムからいろいろな情報を得ることができます。