1P089

蛍光相関分光法を用いた抗原抗体反応解析

○坂田 啓司¹、森岡 弘志²、金城 政孝³、田村 守³ (¹ 科学技術振興機構・研究成果活用プラザ北海道・生体分子計測、² 北大院・薬・構造生物、³ 北大・電子研・超分子分光)

抗体は、高い分子認識能と強い結合能を持つ分子である。近年では、単なる抗原検出としての利用にとどまらず、がん治療やリウマチ治療など治療薬としても利用されてきている。それらへの利用に際して最適な抗体を選択するには、抗体の分子認識能や結合能を生体と同じような条件下で解析する必要がある。特に人体に適用される抗体医薬の場合には必須であろう。従って、ELISA や SPR のように一方が固定化された測定系(固相系)ではなく、体内の環境に近い溶液中(均一系)で、かつ夾雑物が混入している場合にも測定可能な測定法が求められる。我々はそのような要求を満たす測定法として蛍光相関分光法(Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS)に注目した。FCS は、共焦点光学系を用いて溶液試料中の微小領域(〜fl)からの、ブラウン運動による分子の自由な出入りに由来した蛍光強度のゆらぎを観測し、分子間相互作用を解析する方法である。FCS 測定では、通常、抗体または抗原のいずれかに蛍光体を標識化する必要があり、解析する際に標識化による影響を考慮しなければならない。本研究では、蛍光標識による影響を考慮する必要のない、それ自体が強い蛍光を発する改変緑色蛍光タンパク質(EGFP)と抗 GFP 抗体との抗原抗体反応を一つのモデル系として使用し、FCS による抗原抗体反応解析を行った。従来の FCS 測定による抗原抗体反応解析は、抗体の 2 価性が統計的に問題とならない濃度範囲で行われていたが、解析できる濃度範囲に限られるという問題があった。今回我々は、抗体の 2 価性を簡単な補正式を用いることで、広範囲な濃度範囲の抗原抗体反応を解析できることを示した。また、同じ抗原抗体反応を BIAcore を用いて解析し、その結果を比較したところ、非常に良い一致を示した。今後、治療を含めた幅広い抗体の利用が考えられるが、その解析法として FCS が期待される。

H. Sakata, H. Morioka, M. Kinjo and M. Tamura : Antigen-Antibody-Reaction Analysis by Fluorescence Correlation Spectroscopy

1P090

蛍光相関分光法を用いた牛プリオン蛋白質の検出

○藤井 文彦¹、坂田 啓司¹、上野 雅由²、柳谷 孝幸³、田村 守⁴、金城 政孝⁴ (¹ J S T・プラザ北海道、² 富士レジオ・帯研、³ 富士レジオ・中研、⁴ 北大・電子研・超分子)

現在、牛海綿状脳症(BSE)は食品の安全性の確保という見地から、社会的な問題となっている。現状では、検査のためのコスト、時間さらに人的労力は多大であり、さらなる検査法の改良が求められる。蛍光相関分光法(FCS)は、蛍光強度のゆらぎを解析し、そのゆらぎに関わる物理量を得る方法である。測定は共焦点光学系を用いて行い、試料中の微小領域(〜10⁻¹⁶l)からの蛍光を検出する。蛍光強度は領域内を出入りする分子数の増減を反映したランダムなゆらぎとして観測され、ゆらぎの振幅と位相は分子の数と分子の大きさを反映した拡散速度に伴い変化する。試料中のこのような分子に関する情報を、FCS では実時間で物理的な分離精製を経ずに分析することが可能であるため、莫大な試料のスクリーニングに適している。そこで我々は、FCS を用いた病原性蛋白質、特にBSEの原因蛋白質である異常型プリオン蛋白質のハイスループットスクリーニングを目指した。FCS 測定による抗原検出は、蛍光標識された抗体の拡散速度と抗原を捕捉した際の標識抗体の拡散速度の差を利用し実現される。この場合、抗原の分子量が標識抗体の分子量に対して4倍以上必要であり、検出可能な抗原の種類は制限される。今回我々は、抗原の分子量に制限を受けない抗原検出法を考案し、牛組換えプリオン蛋白質の検出を試みた。本方法では、抗原を認識する蛍光標識抗体断片(Fab'-C onjugate)に加え、この抗体断片と異なるエピトープを認識する非標識完全型抗体を用いることにより、組換え牛プリオン蛋白質を検出することが可能であることを示した。現時点では、組換え牛プリオン蛋白質を4 nMまで検出可能であり、ELISA、ウェスタンブロット等との比較を行っている。本方法は、FCS を用いた他の病原性蛋白質の検出に対しても応用可能であろう。

F. Fujii, H. Sakata, M. Ueno, T. Yanagiya, M. Tamura, M. Kinjo : Detection of bovine prion protein by fluorescence correlation spectroscopy

1P091

時間分割蛍光法による蛋白質結晶化機構の解明

○西本 悦子¹、新貝 敦²、山下 勝美²、山下 昭二¹ (¹ 九大院・農・植物資源、² NECソフト(株))

蛋白質のX線結晶構造解析には良質の結晶が必要であることから、その結晶化技法に関する研究は多岐にわたるが、結晶化機構に関する系統的研究は比較的少ない。複雑な系からなる結晶化溶液に適応した物理的計測手段が未だ未成熟であることが1つの理由であるが、蛋白質の結晶化への希求から、その機構解明に関して多角的観点からの情報が求められている。今回、蛋白質の分子間相互作用や運動性についての有用な情報をもたらす高速時間分割蛍光法を蛋白質の結晶化機構の研究に応用することを試みた。蛋白質結晶化解析用に構築した時間分割蛍光偏光消光装置は、サブピコ秒レーザーとTCSPC系から構成され(図)、タイミング部分に改良を加え、独自に開発した解析システムを適用することにより時間分解能を改善した。 蛍光異方性 $r(t)$ は蛋白質内蛍光分子の回転相関時間 ϕ_i とその運動自由度 f_i 及び蛋白質全体の回転相関時間 ϕ_e によって次の式によって与えられる。

$$r(t) = r_0 \sum \{f_i \exp(-t/\phi_i) + (1 - f_i) \exp(-t/\phi_e)\}$$

動的散光法により決定された結晶化条件下で、蛋白質の蛍光異方性の減衰を解析し、蛋白質結晶化に及ぼす蛋白質の分子運動の影響を明らかにした。発表ではコンカナバリンAについて得られた結果について報告する。

E. Nishimoto, A. Shinkai, K. Yamashita and S. Yamashita : Fluorescence spectroscopic studies on the mechanism of protein crystallization

1P092

AFM による汎用的生体分子間相互作用力測定法の開発

○関口 博史¹、荒川 秀雄²、猪飼 篤³、大谷 敏郎¹ (¹ 食総研・食品工・計測工学、² 物材機構・ナノマテ研・バイオナノマテリアル、³ 東工大・生命理工・分子生命科学)

近年、AFMを用いた一分子レベルでの生体分子間相互作用力測定によって結合のEnergy Landscapeを見積もるといった試みがなされ始めている。従来のAFM実験では基板側にレセプター分子を、探針側にリガンド分子をそれぞれ固定しておき、両者を相互作用させた後に解離させるのに必要な力をカンチレバー変位から見積もっている。しかし、多くの生体分子が基板上に固定されることで失活する可能性がある上に、探針と相互作用できる方向に配向固定も行わなければならない。実験系の構築に多くの試行錯誤が必要である。様々な相互作用力を網羅的に分析していくためには、上記のような問題の少ない汎用的な実験システムの構築が急務になっている。

そこで我々は以下のような方法によってその解決を試みている。ここでは抗原-抗体間相互作用力を見積もる場合を記述する。まず抗原分子を高分子上へ修飾する。次に修飾された高分子を抗体分子と反応させ、分子内あるいは分子間で架橋する。最後に架橋された高分子の延伸測定をAFMで行う。この測定によって標的分子間の結合は一つずつ引きはがされ延伸カーブ上の複数のピークとして観測される。足場にしていた高分子そのものの延伸カーブとの比較により、標的分子間相互作用力を見積もることができる。まず提案する実験システムが有効かどうかを確かめるために avidin-biotin 間の相互作用力計測を試みた。足場となる高分子にはCM-celluloseを用い、biotin化したCM-celluloseをavidinの存在下、非存在下で延伸測定を行い延伸カーブの比較を行った。その結果、avidin-biotin間の相互作用力として計測された力は約100pNであり、この値は既存の報告と一致する。本発表では結合寿命や負荷速度依存性などについても議論する予定である。本研究の一部はNEDO産業技術研究助成事業の援助のもとに行われた。

H. Sekiguchi, H. Arakawa, A. Ikai and T. Ohtani : Development of a general method for measuring force of interaction between biomolecules by AFM