

## 【 熱測定応用研究のページ 】

等温滴定熱量測定による  
酵素反応阻害剤評価

麻見 安雄

ティー・エイ・インストゥルメント・  
ジャパン株式会社Drug Screening Method using  
Isothermal Titration Calorimetry

Yasuo Asami

TA Instruments Japan Inc.

## 1. はじめに

多くの分野の研究者が分子間相互作用を研究するためにさまざまな方法を用いているが、特に生体高分子の分子間相互作用評価方法として、等温滴定熱量測定 (ITC) はここ 10 年で急速に報告事例が増えており注目されている。プライマリ ITC データは、サンプルセルへ反応物のアリコートを一連の滴定として行い、反応熱を時間経過および反応物量で評価する。各注入ピークの積分により、等温反応の熱力学的情報が正確かつ豊富に得られ、溶液組成の変化の関数としてのエンタルピーの変化をモニタリングできる。これを利用し創薬開発における分子間相互作用の親和性、特異性などが評価されている。<sup>1-3)</sup>

酵素は化学的前駆体 (基質) の分子変換を触媒する生体高分子 (タンパク質又は RNA) である。酵素反応経路または酵素カスケードは生物の生存を維持するために、多数の重要な機能を実行している。酵素機能が乱れたり、または壊された場合、深刻な病気が発生することがある。このように酵素反応速度論を研究し、酵素活性の変化を識別することは、疾患を治療するための新規治療薬を開発するために必要な前提条件である。

一般的な ITC 結合実験では、受容体分子へのリガンドの滴定は、ピークの S 字形分布が得られるが、ITC-酵素反応実験では、酵素溶液へ基質溶液を滴定すると、滴定毎に注入ピークに続いて起こるベースラインシフトが起きる (Fig.1)。各ピークは、希釈熱に相当し、ベースラインの各シフトは、基質の注入からの触媒の定常状態の熱速度の変化 ( $\Delta Q/\Delta T$ ) に対応している。酵素動態を分析するための技術として、ITC を使用することの利点は、1) 基質の標識を必要としない、2) 酵素に非破壊的である、3) 生理学のおよび合成の両方の基質と互換性があり、4) また反応の迅速かつ直接的な尺度ともなる。さらに 5) 一般的な ITC 手法と比較して、酵素反応では使用するターゲットの試料量を大幅に減らすことが可能である。<sup>4-6)</sup>

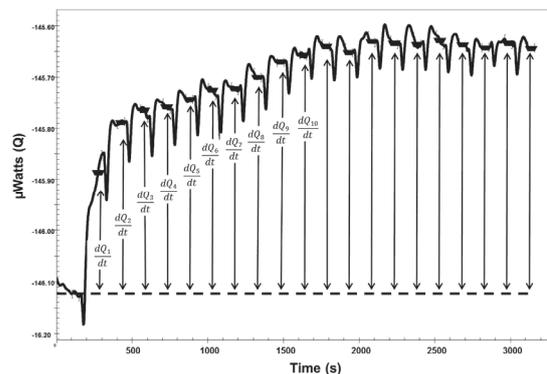


Fig.1 Multiple injection method of enzyme kinetics.

このような長所のある ITC による酵素反応速度実験であるが、実際の操作として、装置の設計上、シリンジがサンプルセルに浸漬した状態にあるため、シグナルが安定化する過程で、滴定シリンジ側サンプルがサンプルセル内に拡散してしまい、そのため一回目の滴定のデータを無視することが一般的であった。特に酵素反応実験では最初の拡散は基質物質の反応で開始してしまうため、これを防ぐため、滴定シリンジ先端に水または緩衝液を数  $\mu\text{L}$  入れ、これをプラグのようにして拡散を防ぎながら測定を行うなどの工夫が必要であった。その為、オートサンプラーなどによる自動化をすることが難しく、阻害剤のスクリーニングなど多検体の評価を HTS 化することが困難であった。

今回、新たに開発された TA Instruments 社製 Affinity ITC では、様々な新技術が取り入れられているが、その中でこのような拡散現象を抑制し、滴定量を高精度で制御できる AccuShot™ インジェクションシステムが取り入れられている (Fig.2)。AccuShot™ ではこれまで一般的であった滴定シリンジの送液のための注射針と攪拌用パドルの一体化構造であったものを、送液用にカニューラを採用し、攪拌機能を分離したこれまでにない画期的なシステムである (特許出願中)。これにより滴定量を  $0.01 \mu\text{L}$  という非常に高精度で送液することが可能である。



Fig.2 Affinity ITC Auto and AccuShot™ injection system.

また酵素反応を解析するためには解析用ソフトも重要であるが、TA Instruments 社製解析用ソフトウェア NanoAnalyze™ はバイオカロリメトリーの解析に必要な機能をさまざまに備えたソフトウェアであり、ユーザーが無償で利用できる。ITC データを取り込み、Michaelis-Menten プロットから非線形回帰による解析および Lineweaver-Burk プロットによる酵素反応速度論解析を行うための機能も付属している。この機能を活用することで阻害剤の阻害機構についての考察も簡便に得ることができるとも特徴である (Fig.3)。

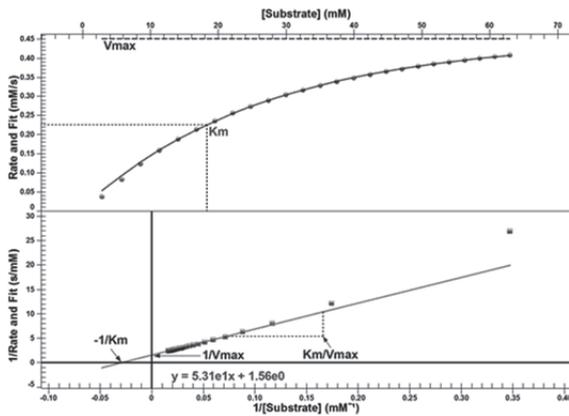


Fig.3 Analyzed of enzyme kinetics by NanoAnalyze™.

## 2. 材料および実験のセットアップ

酵素としてトリプシン、基質はN-ベンゾイル-L-アルギニンエチルエステル (BAEE) および酵素阻害剤としてベンズアミジンは Sigma 社から購入した。緩衝液として 200 mM Tris-HCl, 50 mM CaCl<sub>2</sub> および 1% グリセロール, pH 8.0 で調製した。

酵素反応速度実験は Affinity ITC Auto による多点滴定法 (Multiple Injection Method, MIM) により行った。滴定条件は 3 nM のトリプシン溶液に、0.5 mM の BAEE を 150 秒間隔で 1 μL を 20 回滴定し、この時の攪拌速度は毎分 75 回転 (rpm) とした。酵素阻害効果を評価する際には、ベンズアミジンは最終濃度 1 mM となるように酵素溶液に加えた。リファレンスには水を使用し、Auto Equilibrate 機能 (自動平衡化機能) を用いて、ベースラインの傾きを 0.1 μW h<sup>-1</sup>, 標準偏差 0.01 μW に設定し測定を行った。データはデータ収集ソフトウェア ITCRun™ を用いて収集し、解析用ソフトウェア NanoAnalyze™ を用いて分析した。

## 3. 結果

酵素反応速度の研究のための ITC の応用を説明するためにトリプシンの酵素活性を測定した (Fig.4)。

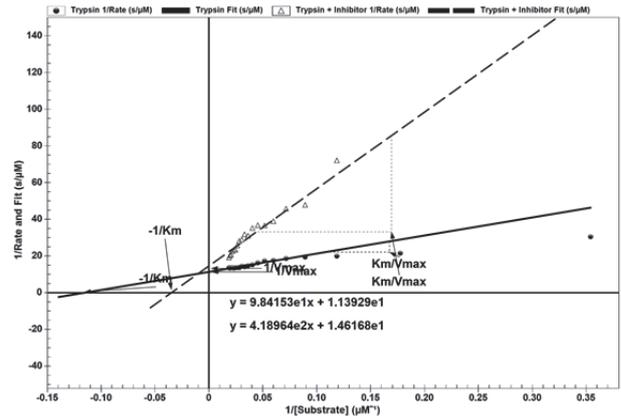


Fig.4 Measurements of Trypsin-BAEE catalytic efficiency.

触媒速度を生じる熱速度に変換して  $K_m$  (ミカエリス定数) は 5.7 μM,  $K_{cat}$  (回転数) は 25.9 s<sup>-1</sup> であると計算され文献値とほぼ同じ再現性を得られた (Table 1)。さらに 1 mM Benzamidine を用いた阻害剤評価では  $K_i$  (阻害定数, あるいは酵素-阻害剤複体のかい離定数) が 22.3 μM となり、文献値<sup>7)</sup> の 18 μM よりも若干大きな値となったが、酵素阻害剤評価を効率よく、簡便に行うことが可能であった。

Variable	Trypsin	Literature value <sup>7)</sup>
$K_{cat} / s^{-1}$	25.9	22
$K_m / \mu M$	5.7	5

Table 1 Kinetics of enzymes assayed calorimetrically versus published values.

以上のことから、Affinity ITC および NanoAnalyze™ による酵素阻害剤評価が、簡便、迅速に阻害剤評価を行う手法として有効であることが示唆された。

## 文 献

- 1) Y. Du *et al.*, *Nat. Med.* **22**, 194–201 (2016).
- 2) S. Zheng *et al.*, *Science*. **352**, 986–990 (2016).
- 3) I. Luque, M. J. Todd, J. Gómez, N. Semo, E. Freire, *Biochemistry*. **37**, 5791–7 (1998).
- 4) N. Karim, S. Kidokoro, *Netsu Sokutei* **33**, 27–35 (2006).
- 5) M. J. Todd, J. Gomez, *Anal. Biochem.* **296**, 179–187 (2001).
- 6) N. Demarse, *TA Instruments – Tech. Note*, 1–16 (2011).
- 7) T. Inagami, *J. Biol. Chem.* **239**, 787–791 (1964).