

解 説

分子間相互作用解析プログラム“SEDPHAT”による 等温滴定型熱量データ解析

丸野 孝浩, 内山 進

大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻

(受取日: 2019 年 11 月 20 日, 受理日: 2019 年 12 月 19 日)

Analyses of Isothermal Titration Calorimetry Data Using Program SEDPHAT

Takahiro Maruno and Susumu Uchiyama

Graduate School of Engineering, Osaka University

(Received Nov. 20, 2019; Accepted Dec. 19, 2019)

Isothermal titration calorimetry (ITC) directly provides the detailed thermodynamic characterization (Gibbs free energy ΔG , enthalpy change ΔH , entropy change ΔS , and the stoichiometry n) in solution. Since the release of commercially available ITC in the early 1990's, the number of studies that have adopted this method has increased. In particular, ITC instruments with small sample volumes have the adequate sensitivity to measure the heat change upon interaction and have accelerated the application of this method in various fields, including biochemistry, medicinal chemistry, structural biology, and material sciences. In this paper, using program SEDPHAT which has attractive features for non-linear fitting of the binding isotherm, as representative cases of SEDPHAT analysis, we describe the ITC data analyses for $A+B \rightleftharpoons AB$ and $A+B+B \rightleftharpoons ABB$ systems and the global fittings.

Keywords: isothermal titration calorimetry, binding thermodynamics, protein-ligand interaction, protein-protein interaction, global fitting.

1. はじめに

等温滴定型熱量計 (ITC) は, 溶液中における分子間相互作用に伴う熱量変化を検出可能な手法で, 実験的に分子間相互作用の各種熱力学パラメータ (ギブズ自由エネルギー変化量, エンタルピー変化量, エントロピー変化量) を評価できる。また, 実験データについて結合モデルを用いて解析することで, 化学量論と濃度補正係数に関する情報が得られる。装置改良による高感度少容量化により, タンパク質とリガンドの相互作用を始めとして幅広い分野で利用されるようになり, 近年は, ITC を用いた研究成果が数多く発表されている。これまでに発表された学術論文をみると, ITC データの解析は装置メーカーにより提供されるソフトウェアが用いられている場合が多い。一方, 筆者らの研究グループでは, 解析可能な相互作用モデルの豊富さ, さらに, 複数の測定条件から得られたデータに対するグローバル解析が可能な点などから, NIH の Peter Schuck 博士らにより開発されたフリープログラム, SEDPHAT¹⁾を用いて解析を行っている。本稿では ITC から得たデータの SEDPHAT による解析について, 特徴や利点を含めて解説する。

2. 測定条件の設定

測定データから信頼性の高い解析結果を得るために留意すべき事項について説明する。測定は, シリンジに化合物などが溶解した溶液 (シリンジ側溶液) を, 測定セルに入れたタンパク質などを溶解させた溶液 (セル側溶液) に滴下して行うが, シリンジ側溶液とセル側溶液の溶媒組成が異なると希釈熱や反応熱が生じるため, 解析が困難となることがある。そのため, 分子間相互作用に伴う熱量変化以外が生じないように, 透析やサイズクロマトグラフィーなどを用いたサンプル調製を行うことが好ましい。サンプル調製の他に, 測定濃度の設定も信頼性が高い解析結果を得るために重要となる。具体的にはセル側溶液のサンプル濃度に結合親和性と化学量論の値を乗じた値 (c 値とよばれる) が適切な範囲に入るようセル側濃度を設定し, それに応じてシリンジ側溶液の濃度を設定する必要がある。適切な c 値の範囲については文献を参照されたい。²⁻⁶⁾

3. SEDPHAT を用いた解析

解析の各ステップについて順を追って説明する。SEDPHAT は Peter Schuck 博士のウェブサイト (<http://www.analyticalultracentrifugation.com/sedphat/download.htm>) からダウンロード可能である。

3.1 ピーク面積の算出

ITC 測定では一定量のシリンジ側溶液をセル側溶液に滴定することで 1 滴定毎に反応熱が計測され、1 滴定毎の発熱または吸熱ピークを積分し面積を得ることで反応に伴う熱量を求めることができる。1 滴定毎のシリンジ側溶液とセル側溶液の濃度はセルおよび滴定した容量から求められることから、シリンジ側溶液濃度あるいはシリンジ側溶液濃度/セル側溶液濃度比に対する反応に伴う熱量のプロット、すなわち、結合等温プロットを求めることができる。SEDPHAT では、結合等温プロットに対して相互作用モデルから立式されたフィッティング式により非線形フィッティングを行う。ピーク面積の算出は、装置付属のソフトウェアを用いて行うことも可能であるが、簡便かつ短時間にこの処理を行うことができ、解析実施者が異なっても同じ結果が得られるという利点から、筆者らは Schuck 博士らにより開発されたプログラム NITPIC ⁷⁾ (<http://biophysics.swmed.edu/MBR/software.html>) を用いている。Fig.1 に、NITPIC によるベースラインフィッティングとベースラインを差し引いた後にピーク積分を行い作成された結合等温プロットを示した。参考までに下記に実際の操作の流れおよび括弧内には実際の操作を記載する。

- ① NITPIC を起動し、測定データを読み込む (File タブから Read MicroCal/MCS Data あるいは Read TA MXL File を選択)。
- ② ベースラインフィッティングが自動的に行われ、面積プロットが出力される (Execute タブをクリック)。
- ③ SEDPHAT に算出した面積プロットが表示され SEDPHAT のファイル形式の一つである xp ファイルが作成される (File タブから Save Everything & Start SEDPHAT/ITCsy を選択)。

3.2 結合等温プロットの非線形フィッティングの概要

装置付属の解析ソフトウェアである Origin などでは化学量論 n を変数とした解析が行われるが、SEDPHAT では相互作用モデルを選択し、同時に反応に関与しない分子を incompetent fraction (不活性成分割合, incf) として変数として非線形フィッティングを行う。SEDPHAT には Table 1 に示した代表的なものを含め 15 種類のモデルが実装されている。

Table 1 Representative binding model implemented in SEDPHAT.

Model
$A + B \rightleftharpoons AB$
$A + B + B \rightleftharpoons \{AB\} + B \rightleftharpoons ABB$
$A + B + B \rightleftharpoons AB + B \rightleftharpoons BA + B \rightleftharpoons BAB$
$A+B+B \rightleftharpoons AB+B \rightleftharpoons ABB+B \rightleftharpoons ABBB$
$A+B+C \rightleftharpoons AB+C \rightleftharpoons AC+B$
$(A+A)+(B+B) \rightleftharpoons (AA), (BB), AB, (AB)(AB)$

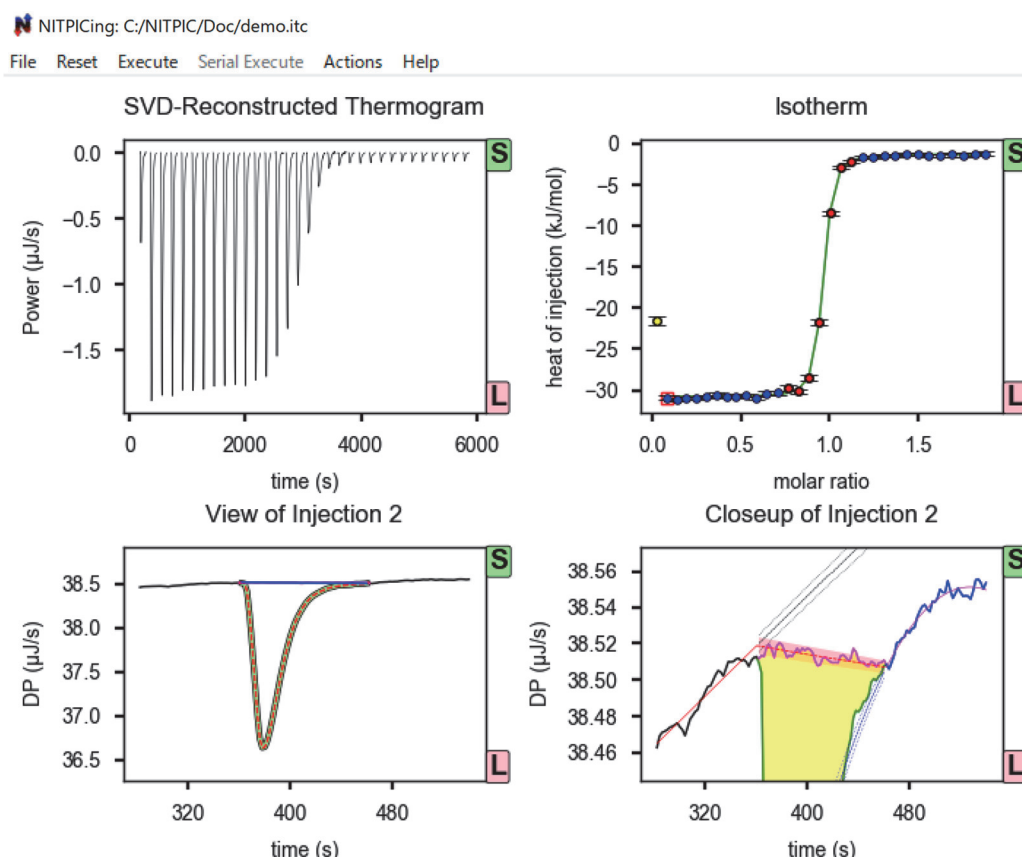
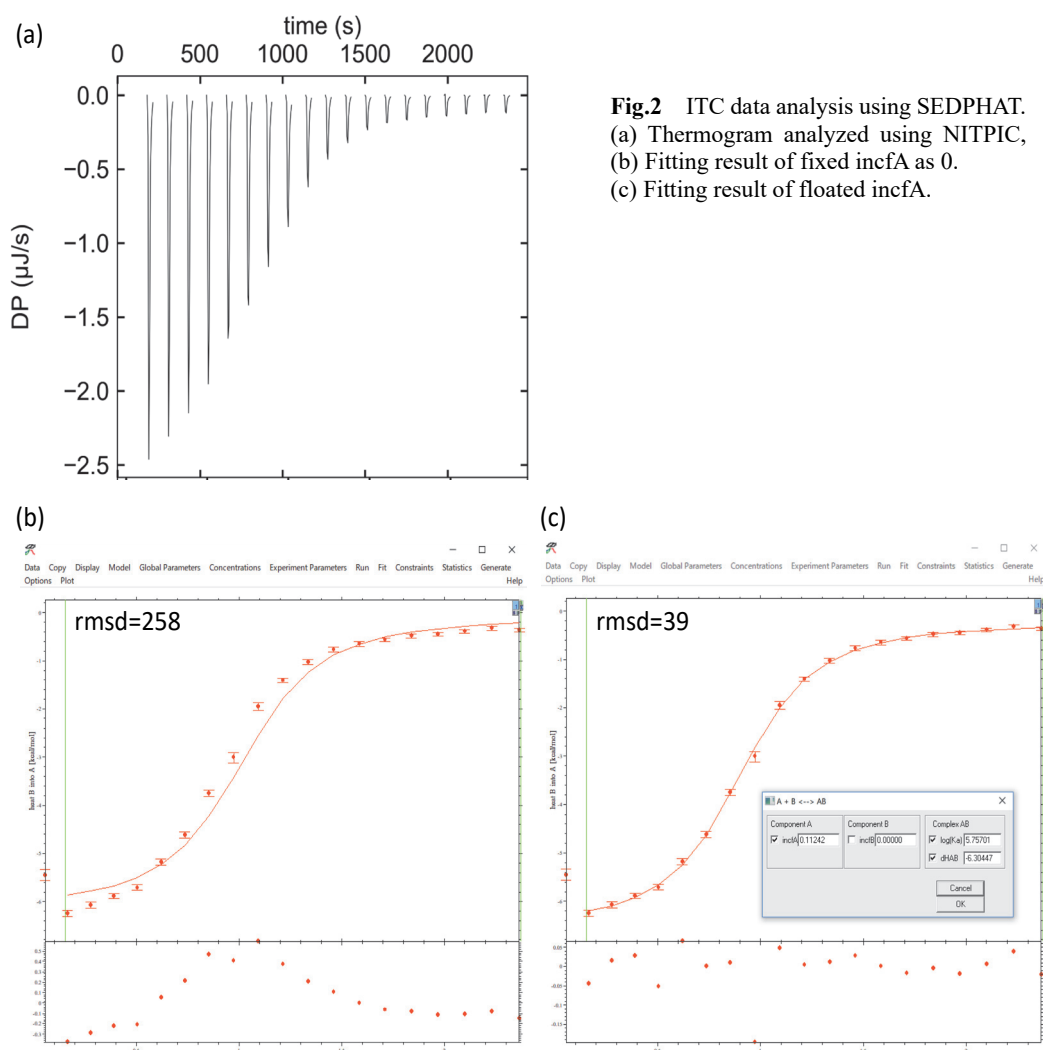


Fig.1 Integration of thermogram using program NITPIC. Demo data (demo.itc) included in the software was used as an example.



下記に実際の操作の流れを記載し、得られる数値の意味について説明する。

① 想定される相互作用モデルを選択する (Model タブから選択)。1:1 結合モデルであれば $A+B \rightleftharpoons AB$ Hetero-Association を選択することとなる。

② グローバル変数を設定する (Global Parameters のタブをクリック)。A と B のモル濃度に対するそれぞれの補正係数と両者の結合親和性 ($\log(K_a)$ 表記) と結合エンタルピー変化量 ($dHAB$ 表記) が表示される。

前者は A と B の相互作用が 1:1 で起こると仮定した場合に、結合等温プロットの変曲点が 1 となるために必要な補正係数をその成分の incf で表示している。つまり、例えば incfA の値が 0.1 となった場合は、A のうち 10 % が反応に関与しないと仮定が必要になることを意味する。このようなズレは、そもそも熱力学パラメータが決まりにくい低い c 値条件での測定結果を用いた場合に良く起こるが、実際にサンプルが変性などにより不活化している場合にも起こり得る。

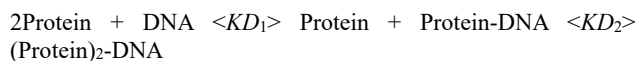
3.3 結合等温プロットの非線形フィッティングの実際～1:1 の場合～

最初の解析例として、タンパク質-低分子化合物の系についての解析例を紹介する。低分子化合物をタンパク質に滴下し、Fig.2(a)に示す結果を得た。相互作用の化学量論については、これまでの先行研究結果により 1:1 結合であることがわかっている。そこでモデルには $A+B \rightleftharpoons AB$ Hetero-

Association を用いた。今回はフィッティングにおける各ステップの意味合いをわかりやすくするためにグローバル変数 (Global Parameters の入力値) を $incfA = 0$, $incfB = 0$, $\log(K_a) = 6$, $dHAB = -10$ とした。実験変数 (Experimental Parameters) には今回の実験のパラメータである、シリンジ側溶液の濃度、セル側溶液の濃度、およびセル容量が要約されており濃度のパラメータをフィッティングパラメータとし、入力されている数値に基づいたフィッティング (Run タブをクリック) を行った後、 $\log(K_a)$ と $dHAB$ をフィッティングパラメータに指定し、フィッティングを実施した (Fit タブをクリック)。ここまでの作業で rmsd が小さな値に収束しフィッティングが良好である場合もあるが、そうはならないことが多い。今回の場合、変曲点付近のズレが大きい (Fig.2(b))。そこで、グローバル変数である incf をフィッティングパラメータに指定した。今回の場合、実際の結合等温プロットはフィッティング曲線よりも低いモル比側に位置していることから、A (セル側) の一部が不活化していることを想定し incfA をフィッティングパラメータに設定した。結果、図に示したように良好なフィッティング結果が得られ、rmsd も十分に小さい値に収束した (Fig.2(c))。得られた incfA は 0.112 であったが、この実験では確実な濃度決定を行っていることから、11.2 % のタンパク質が不活化している可能性が示されたこととなる。なお、先に述べた Experimental Parameters の各成分の濃度をフィッティングパラメータにすることも可能である。

3.4 非線形フィッティングの実際～2 種類の KD を持つ場合～

次に、DNA にタンパク質が相互作用する際に観測された熱量変化から異なる解離定数を持つ 2 段階の相互作用を解析した例を紹介する。⁸⁾ DNA 溶液をタンパク質溶液に滴下し、**Fig.3(a)**に示す結果を得た。得られた結合等温プロットから明らかに段階的に結合が起こっている反応であることが分かる。そこで、下記の反応式のモデルを想定し、SEDPHAT により解析を実施した。



その結果、**Table 2** に示した解析結果が得られ、DNA にタンパク質が 1 分子結合する際は ΔG が $-43.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($KD_1 = 22.3 \text{ nM}$) の発熱反応、エントロピー駆動型の結合であり、一方、2 分子目の結合では ΔG が $-32.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ ($KD_2 = 2.5 \mu\text{M}$) の発熱反応であるがエンタルピー駆動型の結合であることが分かった。滴定の初期においては DNA 1 分子に 2 分子のタンパク質が結合 ($\Delta H_1 + \Delta H_2$ に相当する熱量変化が観測) し、滴定が進み DNA 濃度が増えるにつれ、DNA から 1 分子のタンパク質が解離し他の DNA に結合 ($\Delta H_1 - \Delta H_2$ に相当する熱量変化が観測) する結果、2 段階の ITC サーマグラムが観測されたと考えられる (**Fig.3**)。SEDPHAT はこういった多段階反応の解析にも適したプログラムである。

Table 2 Summary of the thermodynamic parameters.

Binding site	KD / nM	ΔG / kJ mol^{-1}	ΔH / kJ mol^{-1}	$-T\Delta S$ / kJ mol^{-1}
Primary	22.3	-43.5	-5.3	-38.4
Secondary	2500	-32.0	-20.0	-12.0

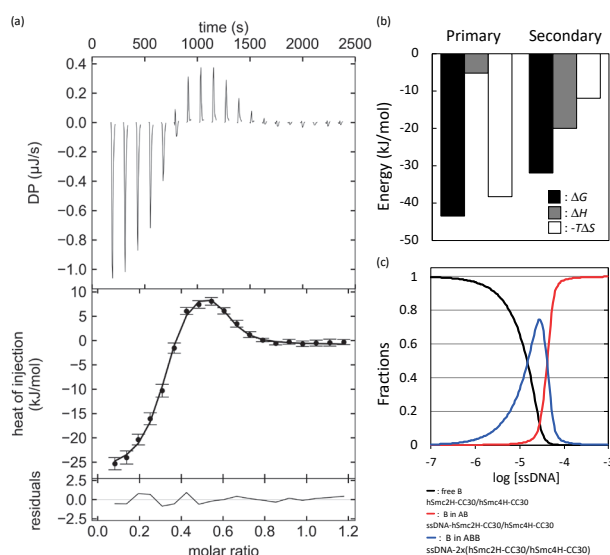


Fig.3 Example of the fitting of the binding isotherm with two different affinities. (a) Thermogram and fitting result. (b) Bar graph of thermodynamic parameters. (c) Population shift of each component. Modified from reference 8.

3.5 解析結果の出力および統計的評価

得られたフィッティング結果はテキスト形式で出力することができるが、プログラム GUSSI⁹⁾を用いることで**Fig.3(a)**のような質の高い図を簡便に作成できる (Plot タブの GUSSI data, fit residuals を選択する)。

プログラム GUSSI は Chad A. Brautigam 博士 (The University of Texas Southwestern, Medical Center) のウェブサイト (<http://biophysics.swmed.edu/MBR/software.html>) からダウンロード可能である。

得られたフィッティングパラメータの誤差は、各フィッティングパラメータの任意の信頼区間について見積もることができる。Statistics タブの Generate 1-dimensional error surface projection でも可能であり、各フィッティングパラメータの誤差範囲の数値情報に加え error surface も出力される。

3.6 グローバル解析

グローバル解析では異なる測定条件で取得した複数の測定データに対して同時にモデルフィッティングを行うことで相互作用パラメータを決定する。特に、対象とする分子がそのリガンドに対して結合親和性の異なる結合サイトを有し、単一の測定濃度条件では全ての結合反応を観測できない場合に、しばしば用いられる。ここでは親和性の異なる 2 つの結合サイトを有する分子に対するリガンドの相互作用を想定したシミュレーションデータを用いて解説する。一つ目の結合サイト $KD_1 = 5 \mu\text{M}$ 、二つ目の結合サイト $KD_2 = 100 \mu\text{M}$ 、結合エンタルピーはそれぞれ -40 kJ mol^{-1} 、 20 kJ mol^{-1} とした。シミュレーションではセル側濃度は各 KD 値に基づき 3 点設定 ($5, 50, 100 \mu\text{M}$) し、シリンジ側濃度は各セル側濃度の 20 倍とした。

SEDPHAT により xp ファイルを読み込む (Data タブの Load Experiment を選択)。この操作を繰り返し行うことで、解析対象となる全ての結合等温プロットデータを同一ウィンドウ内に表示する。次に相互作用モデルを選択し、フィッティングを行うことで、読み込んだ全データに対して最も適合するパラメータを決定するグローバル解析を行うことが可能となる。**Fig.4** にグローバル解析により得られた解析結果を示した。セル側濃度が低い条件 (**Fig.4** 左) では弱い結合に由来する熱量変化が観測されにくく、かつ熱量変化が単調増加を示すことから、この結果から対象とする系に複数の相互作用が存在するとは結論できない。一方、セル側濃度を高くするにつれて、結合が弱い 2 つ目のサイトでの反応熱が観測されることがわかる (**Fig.4** 中央, 右)。これら測定濃度域を変えて取得した複数の結合等温プロットを用いてグローバル解析を行うことにより、単一測定条件では抽出が難しい相互作用の詳細な情報を得ることが可能になる。

3.7 シミュレーションデータ作成方法

実際の滴定実験の前にシミュレーションを行うことで適切な実験条件の設定をより確実なものにすることができる。ここでは、SEDPHAT ver10.58d を用いたシミュレーションデータ作成方法について解説する。

流れはモデルを選択 (Model タブから対象となるモデルを選択) し、セル側濃度、シリンジ側濃度、セル容量、結合等温プロットに付加するノイズの値をそれぞれ入力、さらに測定の滴定回数、1 滴定あたりの滴定量、各種パラメータ (1:1 結合モデルの場合は $\log KA$ と dAB) を入力することでシミュレーションデータが作成される。さらには得られた面積値と滴下するサンプルの物質質量から、実際の測定で観測されるおよそのシグナル強度を見積もることが可能である。シミュレーションでは良好な結合等温プロットが得られたものの実際の測定ではシグナルが小さく解析が困難といった状況を避けるために、観測されるシグナル強度の見積もりもシミュレーションデータ作成と併せて実施することが望ましい。

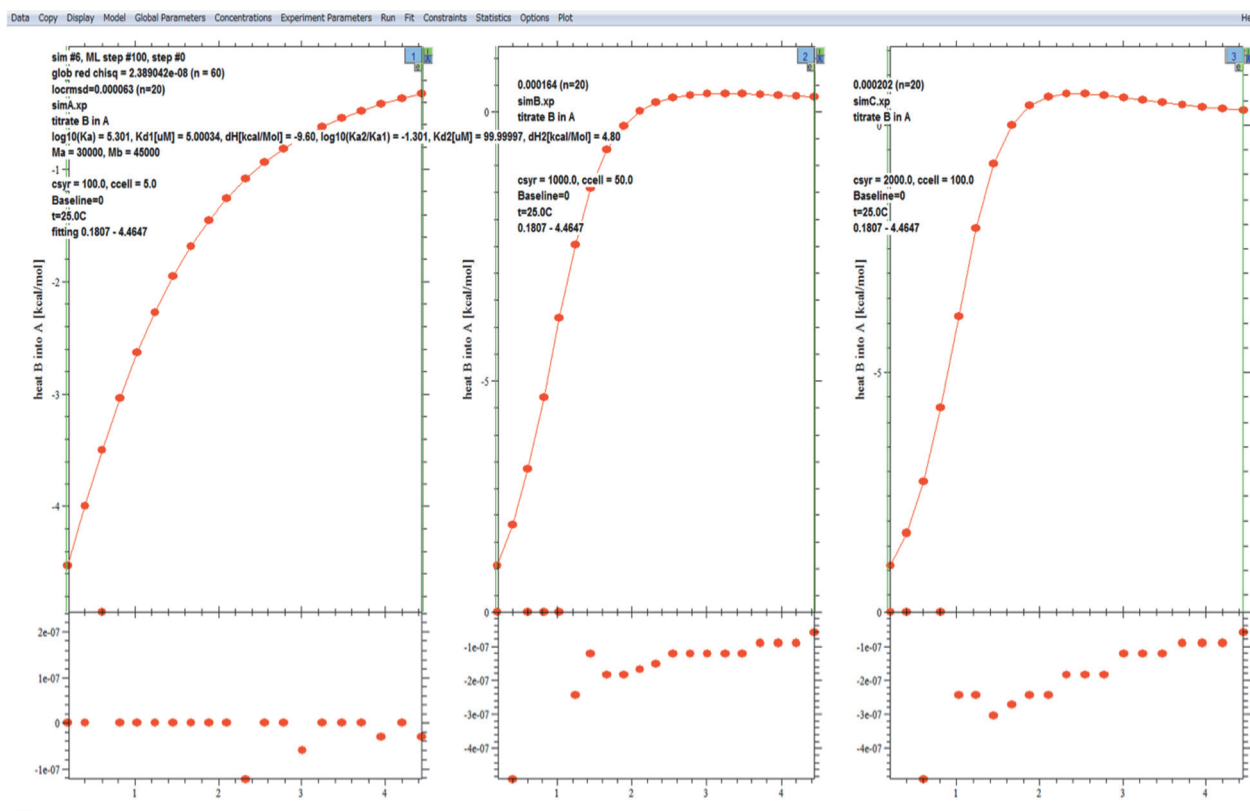


Fig.4 Screen shot of the global analysis for three different experimental data using SEDPHAT. Data were fitted using $A + B + B \rightleftharpoons \{AB\} + B \rightleftharpoons ABB$ model. Upper panel shows the heat change upon the titration of B into A (circle) and the fitting result (solid line). Lower panel shows the fitting residuals. X-axis represents the molar ratio of B/A. (Left) Syringe=100 μ M, Cell=5 μ M. (Center) Syringe=1000 μ M, Cell=50 μ M. (Right) Syringe=2000 μ M, Cell=100 μ M.

4. おわりに

本稿では分子間相互作用解析プログラム SEDPHAT による等温滴定型熱量データ解析について解説した。SEDPHAT には豊富な相互作用モデルに加えて、グローバル解析やシミュレーションデータの作成など ITC 解析を行う上で有用な機能が数多く実装されている。また、NITPIC や GUSSI といった関連ソフトウェアを併用することで、解析から結果の作図までシームレスに行うことができる。本稿が ITC 解析を行う研究者の一助になれば幸いである。

文 献

- 1) J. C. D. Houtman, P. H. Brown, B. Bowden, H. Yamaguchi, E. Appella, and L. E. Samelson, P. Schuck, *Protein Sci.* **16**, 30–42 (2007).
- 2) T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, and L. N. Lin, *Anal. Biochem.* **179**, 131–137 (1989).
- 3) W. B. Turnbull and A. H. Daranas, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 14859–14866 (2003).
- 4) W. B. Peters, F. Verna, and R. K. Brown, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **12**, 772–790 (2009).
- 5) L. D. Hansen, G. W. Fellingham, and D. J. Russell, *Anal. Biochem.* **409**, 220–229 (2011).
- 6) J. Broecker, C. Vargas, and S. Keller, *Anal. Biochem.* **418**, 307–309 (2011).
- 7) S. Keller, C. Vargas, H. Zhao, G. Piszczek, C. A. Brautigam, and P. Schuck, *Anal. Chem.* **84**, 5066–5073 (2012).
- 8) S. Uchiyama, K. Kawahara, Y. Hosokawa, S. Fukakusa, H. Oki, S. Nakamura, Y. Kojima, M. Noda, R. Takino, Y. Miyahara, T. Maruno, Y. Kobayashi, T. Ohkubo, and K. Fukui, *J. Biol. Chem.* **290**, 29461–29477 (2015).

- 9) C. A. Brautigam, *Methods Enzymol.* **562**, 109–133 Academic Press (2015).

丸野 孝浩
Takahiro Maruno
E-mail: tmaruno@bio.eng.osaka-u.ac.jp

内山 進
Susumu Uchiyama
E-mail: suchi@bio.eng.osaka-u.ac.jp