

【熱測定応用研究のページ】

ITC を用いたカイネティクス解析

廣瀬 雅子

スペクトリス (株)

マルバーン・パナリティカル事業部

Kinetics Analysis using ITC
Measurements

Masako Hirose

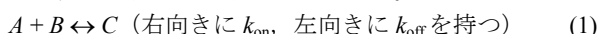
Malvern Panalytical division
of Spectris Co., Ltd

1. はじめに

ITC (等温滴定型カロリメトリー) は、滴定によって生じる相互作用の熱量変化を計測し結合定数を算出する分子間相互作用解析法である。反応の End point を観察することから、一般的にはカイネティクス解析には適していないと考えられている。しかしながら、ITC 測定で得られる熱量情報は $\mu\text{J s}^{-1}$ で表わされ、熱産生の速度を示していることがわかる。また、ITC 測定の生データを注意深く観察すると、サンプルによってレスポンスがベースラインに戻る時間が異なっていることに気付く。本稿では、ITC データから、どのようにカイネティクスの情報を取得するかについて取り上げる。なお、これらの情報は弊社アプリケーションノート「Implementation of kinITC into AFFINImeter」¹⁾ を要約したものである。kinITC 法は 2012 年に Burnouf らによって報告されており、詳細についてはこちらを参照いただきたい。²⁾

2. カイネティクスパラメータの算出方法

サンプル A とサンプル B が複合体 C を形成する場合、その反応は以下のように表わされる。



この反応は以下のカイネティクス式で表わされる。

$$d[C]/dt = k_{\text{on}} [A][B] - k_{\text{off}} [C] \quad (2)$$

ここで $[A]_0$ を ITC のセルに充填したサンプルの初期濃度とすると、測定に伴い希釈されるそれぞれの濃度は $A = [A]/[A]_0$, $B = [B]/[A]_0$, $C = [C]/[A]_0$ で表わされ、以下の式が導き出される。

$$dC/dt = k_{\text{on}} [A]_0 AB - k_{\text{off}} C \quad (3)$$

このとき任意の時間 t における、ITC のセル内で起こる熱量シグナル P_s との関係は以下の式で表わされる。

$$P_s(t) = V_{\text{cell}} \Delta H [A]_0 dC/dt \quad (4)$$

ここで V_{cell} はセル体積であり、 dC/dt が(3)から求められていれば $P_s(t)$ を評価できる。しかしながら、実際には装置固有のレスポンスタイム (τ_{ITC}) を考慮する必要があり、 $P_s(t)$ は実際に測定した $P_m(t)$ ではないことに注意しなければならず、(5) 式のように表わすことができる。³⁾ (Dumas, 2015)

$$P_s(t) = P_m(t) + \tau_{\text{ITC}} dP_m/dt \quad (5)$$

τ_{ITC} は $P_m(t) = P_{\text{max}} \exp(-t/\tau_{\text{ITC}})$ から実験的に求めることが可能で (1-3 % v/v MeOH を 1 μl 滴下)、弊社の MicroCal iTC200 では、およそ 3.5 s であることが分かっている。

ITC のデータを見ると、それぞれの滴定間においてもベースラインに戻るまでの時間が異なることに気付く。

(Fig.1) 特に $[A] = [B]$ 近傍、またはそれに近い滴定時 (1 : 1 結合の場合。Fig.1 破線で示したレスポンス) では平衡化にかかる時間が最も遅くなっており、カイネティクスシグナルが得られていることが分かる。

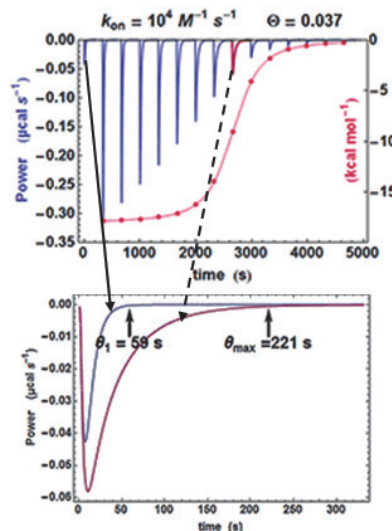


Fig.1 Evolution of the time of return to baseline (equilibration time) The injection curves (upper-panel) were calculated with the values $[A]_0 = 11 \mu\text{M}$, $[B]_0 = 120 \mu\text{M}$, $k_{\text{on}} = 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($K_d = 0.1 \mu\text{M}$), $\tau_{\text{ITC}} = 3.5 \text{ s}$ and $\tau_{\text{mix}} = 0.8 \text{ s}$.

また、各滴定でベースラインに戻るまでの時間 (τ) は Burnouf らにより (6) 式が求められている²⁾。

$$\tau = \frac{1/c}{k_{\text{off}} \left[(1/c + s + 1)^2 - 4s \right]^{1/2}} \quad (6)$$

ここで $c = [A]_0/K_d$ は Wieseeman パラメータで、 $s = [B]_{\text{tot}}/[A]_{\text{tot}}$ は化学量論比で既知であり、 τ が得られれば k_{off} が求まる。なお、実際のデータでは、ベースラインに戻るまでの時間にはシステムのもつレスポンスタイムと滴定にかかる時間 (t_{INJECT}) を考慮した、 $4.5(\tau + \tau_{\text{ITC}}) + (t_{\text{INJECT}})$ が望ましいことが見出されている。

Fig.1 のシミュレーションデータを元に、Fig.2 では各滴定時の化学量論比を横軸に、各レスポンスがベースラインに戻るまでにかかった時間 (θ_k) を縦軸に、点のみでプロットした。また、(6)式を用いて求めた各滴定における τ は、 $4.5(\tau + \tau_{\text{ITC}}) + (t_{\text{INJECT}})$ で算出したものを点付き曲線で示した。この曲線を Equilibration-Time Curve (ETC) と呼ぶ。これらを見ると、シミュレーションデータから得られた平衡化にかかる時間と、 k_{off} のパラメータを含んだ理論式(6)から求めたそれが近似していることが示されている。このことから、測定で得られた平衡化にかかる時間を求めることで ETC から k_{off} が求められることが示された。 K_d は通常の ITC 解析から求められているので、 $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ から k_{on} が算出

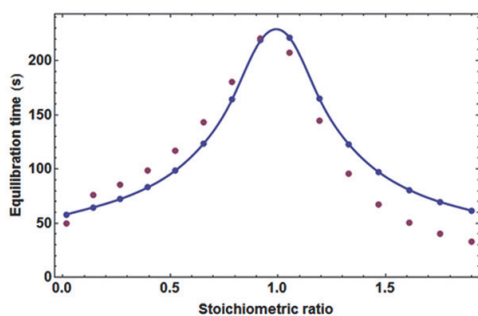


Fig.2 Equilibration-time curve. The equilibration times θ_k (dots) were determined from the theoretical injection curves as explained in the legend of Fig.1. Dots with line correspond to $4.5(\tau + \tau_{ITC}) + t_{INJECT}$, where τ is given by equation (6) with the parameters used for the calculation of the theoretical data in Fig.1.

される。なお、これらの計算は、AFFINImeter 社から提供されている kinITC モデルを搭載した解析ソフトウェア (KinITC) を用いるとほぼ自動で取得することが可能である。

3. 実際のデータでの KinITC の応用

SPR (表面プラズモン共鳴) と kinITC 法を比較するため、炭酸脱水素酵素とその阻害剤の 4-CBS で測定を行った。SPR による測定結果は文献 3 を参考とした。ITC 測定は MicroCal iTC200 を使用した。測定温度は 6.1, 9.1, 12.1, 15.1, および 25 °C でそれぞれ 5 回測定を行った。攪拌速度は 1,000 rpm, Feedback Mode は High を用いた。4-CBS は Sigma から入手し、酵素調製は文献 3 を参照した。4-CBS は 315 μM , 酵素は 26 μM (25 °C のみ 19 μM) にそれぞれ調整した。1 滴定目のみ 0.3 μl で滴下し、以降は 1.9 μl (25 °C のみ 1.4 μl) で実施した。滴定速度は 0.5 $\mu\text{l s}^{-1}$ で, Filter Period (データ取得平均化の時間) は 2 s に設定した。測定結果を Fig.3 に示す。

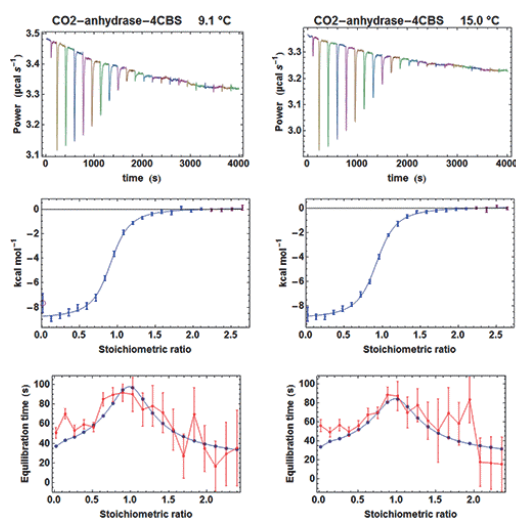


Fig.3 Subset of results obtained with AFFINImeter. Top: illustration of the raw injection curves. Middle: resulting titration curves obtained by AFFINImeter. Bottom: experimental and theoretical ETCs. (Only show data at 9.1 °C and 15.0 °C).

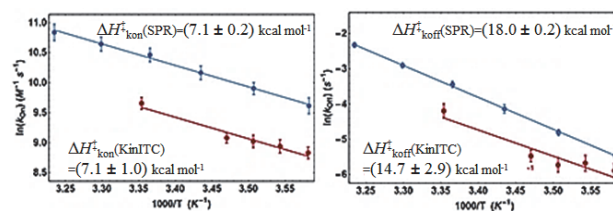


Fig.4 Arrhenius plots for k_{on} (left) and k_{off} (right) obtained from KinITC and SPR.

測定結果より ETC を用いてすべての温度における k_{on} , k_{off} をそれぞれ求めた。これらの値と文献 3) で得られている SPR の値でアレニウスプロットを作成した (Fig.4)。

プロットを見ると、ITC 測定による k_{on} および k_{off} も SPR と同様に温度依存性が示された。また、実験誤差範囲内で傾きがほぼ同等であり、このことは $k_{on}^{SPR}/k_{on}^{kinITC}$ および $k_{off}^{SPR}/k_{off}^{kinITC}$ の比率がほとんど変化しないことを示している。それぞれの活性化エネルギー $\Delta H^\ddagger$ は以下のアレニウスプロットの式(7)より、プロットから得られる傾きに気体定数 R をかけることで求まることがわかる。

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\ddagger}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln A \quad (7)$$

このことから、活性化エネルギー $\Delta H_{on}^\ddagger$ および $\Delta H_{off}^\ddagger$ も実験誤差内ではほぼ同一であることが示された。

4. おわりに

ITC によるカイネティクス解析, kinITC 法は、固定化、ラベル化不要で、特別なサンプル調整を必要としない「溶液中」の手法という利点がある。また、通常の ITC 測定のデータをそのまま用いて KinITC ソフトウェアで解析を行うことができる。カイネティクス、相互作用の観点では ITC ならびに SPR は共に有用な情報を与える。重要なのは双方ともモデルフィッティングによる解析であり、得られるパラメータの妥当性については総合的に判断することが重要であると考えられる。

文 献

- 1) P. Dumas, E. Ennifar, G. Bec, A. Pineiro, J. Sabn, E. Munoz, and J. Rial, Malvern Application Note, Implementation of kinITC into AFFINImeter (2015).
- 2) D. Burnouf, E. Ennifar, S. Guedich, B. Puffer, G. Hoffmann, G. Bec, F. Disdier, M. Baltzinger, and P. Dumas, *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 559-565 (2012).
- 3) I. Navratilova, G. A. Papalia, R. L. Rich, D. Bedinger, S. Brophy, B. Condon, T. Deng, A. W. Emerick, H. W. Guan, T. Hayden, T. Heutmekers, B. Hoorelbeke, M. C. McCroskey, M. M. Murphy, T. Nakagawa, F. Parmeggiani, X. Qin, S. Rebe, N. Tomasevic, T. Tsang, M. B. Waddell, F. F. Zhang, S. Leavitt, and D. G. Myszk, *Anal. Biochem.* **364**, 67-77 (2007).