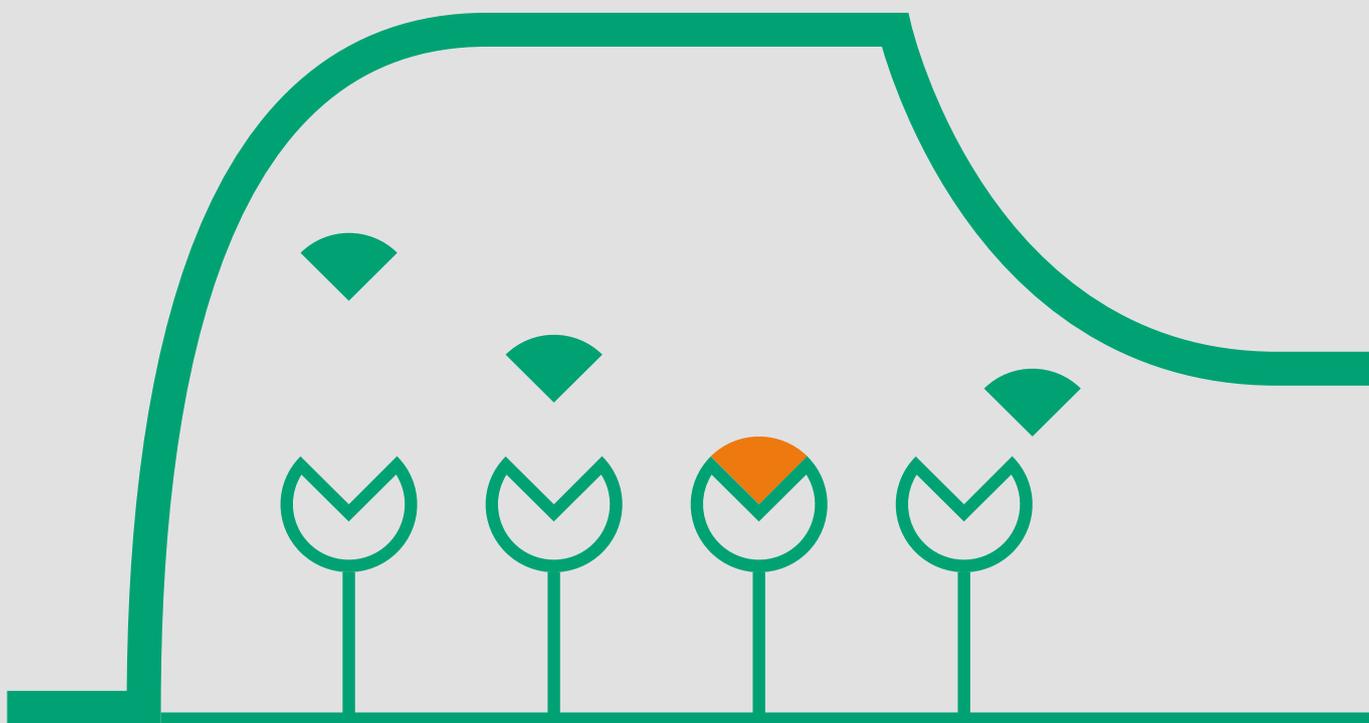


Biacore™ 相互作用測定ナビ

2023年度版

2023年10月発行



Contents

Biacore™の歴史	2
K _D 学のススめ	3
Biacore™概要とその原理	9
Biacore™の各機種一覧・比較	10
Biacore™消耗品一覧	13
アプリケーション例	14
Biacore™サポート情報	19

Biacore™の歴史

表面プラズモン共鳴 (SPR) : Target-based drug discoveryにおける30年の足跡

SPRは1990年初頭に抗体医薬品Humira®のキャラクタリゼーションに初めて成功しました。

今日SPRは抗体抗原結合のリアルタイム検出とTarget-based drug discoveryにおけるkinetics測定のスタンドードになりました。

1990-1999 研究、高分子、少サンプルでのSPRの時代

- ・ 1990：アボット社が初めてBiacore™SPRシステムを購入
- ・ バイオ医薬品製薬企業がSPRテクノロジーを抗体抗原のaffinity、kineticsやエピトープマッピングの測定に採用
- ・ ファージディスプレイによる完全ヒト抗体ライブラリーの整備
- ・ 1997：FDAがSPRを使って開発された移植時の拒絶反応予防の最初のヒトモノクローナル抗体を承認
 - 抗IL-2受容体
- ・ 標的に対して結合する未知分子がSPRとマスペクトロメトリーを接続することで同定される可能性



1990 Biacore™誕生
世界で初めてSPRを応用
して作られた分析機器



1998 Biacore™ 3000

2000-2010 創薬で“Core”テクノロジーになった時代

- ・ 2003：乾癬治療薬のAlefacept、初めてBiacore™システムを用いた出荷試験
- ・ 2008：新規承認薬の約50%がTarget-based drug discoveryによるものに
- ・ SPRの高感度化とスループットの向上は大規模フラグメントライブラリーのスクリーニングを可能とした。またGPCRのようなチャレンジングな標的に対する結合解析が可能に



2007 Biacore™ X100



2010 Biacore™ T200

2011-2020 規制当局の承認事例の増加 バイオシミラー分析のキーテクノロジーに

- ・ FBDDで開発された最初の医薬品の発売
- ・ 上位100標的分子のうち~25%がGPCRに
- ・ 2018：販売額上位10品目のうち8品目がバイオ医薬品に
- ・ SPRテクノロジーが日米欧の薬局方に掲載



2016 Biacore™ 8K
2018 Biacore™ 8K+

2023



Biacore™ 1K



Biacore™ 1K+



Biacore™ 1S+

K_D学のススめ

東京大学医科学研究所 長門石 曉 先生

東京大学大学院工学系研究科 東京大学医科学研究所 津本 浩平 先生

はじめに

Biacore™が初めて研究の場で利用されるようになってから今年（2023年）で33年になります。初期においては主に抗体のK_Dやそれに加えてk_a、k_dを求める装置として利用されていましたが、まだまだそれをどのように利用するのが手探りであったようです。その後の進展はより詳細な分子レベルの理解の必要性の高まりや測定分子の広がりも相まって、生命現象の理解や治療薬の開発においてK_D (k_a、k_d) が必須であり、ルーチンの測定項目となることが多くなってきました。このような状況のなか“何故K_Dを求めるのだろうか?”、“何故アフィニティー情報だけでなく、カイネティクス情報が必要だろうか?”という根源的な問いに対して、Biacore™を黎明期からご利用されK_Dを見続けられてきた東京大学大学院 津本浩平先生と長門石曉先生からお話いただく貴重な機会をいただきました。

本稿は、両先生の長年にわたる生命分子間の相互作用解析、治療薬に関するご研究によって積み重ねてこられた知見・ご経験を基に長門石 曉 先生にご講演いただいた 第45回日本分子生物学会年会（2022）バイテクショートセミナー『K_D学のススめ』を基に記事にしました。

『K_D学のススめ』で、お話しすること

本ガイドブックを手にした皆様は、K_Dという値について、論文などで見たことがある、または、授業などで習ったことがあるかと思います。本章ではK_Dというものは知っているけれど、EC₅₀やIC₅₀などと何が違うのだろうかということを、噛み砕いた内容にしてお届けします。

それぞれの値を算出する数式や、本質的な考え方といったことではなく、普段、皆様にとって分子生物学の世界で馴染みのある、いわゆる活性を測る濃度（EC₅₀やIC₅₀など）とK_Dというものが、どのように違うのかということをお伝えできればと考えております。

K_D値とは何か、なぜ必要なのかについての本概説をご覧ください。また、以下の点を意識してください。

- 新規なりガンドやタンパク質等を発見した際、その分子の

活性を正確に評価することの重要性は、全ての研究者が認識されていると思います。また狙った活性が得られた際に、想定している標的分子に作用していることもProof of Concept (PoC) をとる上で無視できません。

- この活性の強さは濃度で表しますが、代表的な“活性濃度”としてIC₅₀値やEC₅₀値があります。さて、これらの値は、本当に標的分子に作用していることを意味しているのでしょうか？しっかりと“K_D値”も評価していますか？

医薬品の活性 (EC₅₀値)

具体的な例でお話ししたほうが分かりやすいかと思っておりますので、今回はCOVID-19の低分子阻害剤を例に説明します。

【バクスロビド/パキロビッド (Pfizer社)】

こちらはSARS-CoV-2のメインプロテアーゼ阻害剤としてPfizer社が開発した低分子医薬品です。実際の医薬品はカクテルになっていて他の薬剤も混合されていますが、その中でもいわゆるSARS-CoV-2特異的な分子として開発された阻害剤を例に、論文のデータを使いながらご紹介いたします。

まず、ここでお話しするのはEC₅₀です。メインプロテアーゼ阻害剤ですので、抗ウイルス活性が（IC₅₀ではなく）EC₅₀として評価されます。

Daniel W Kneller et al., *Nat. Commun.* 13, 2268 (2022) のTable 2を見ていただくと、いくつかの化合物が記載されています。これらは候補薬剤であり、Table一番下のPF-07321332が今回の化合物になります。そこにはEC₅₀で0.88 μMと書かれています。この論文では、SARS-CoV-2感染細胞（Vero細胞）の生存率を指標にしたアッセイで、この薬剤がEC₅₀として最も濃度が低く、活性が強いことを示しています（表1）。

表1 Daniel W Kneller et al., *Nat. Commun.* 13, 2268 (2022)

Compound	EC ₅₀ μM
BBH-1	16.1
BBH-2	15.4
NBH-2	13.9
PF-07321332	0.88

表2 Rana Abdelnabi et al., *Nat. Commun.* 13, 719 (2022)

Cell Type	Bavpat	B.1.1.7	B.1.351	B.1.1.28.1	B.1.617.2	Toxicity
Vero E6	90±10 nM	270±40 nM	140±40 nM	280±20 nM	210±30 nM	>50,000
A549 (ACE2TMPRSS2)	100±70 nM	110±60 nM	70±20 nM	120±40 nM	260±50 nM	>50,000

Rana Abdelnabi et al., **Nat. Commun.** 13, 719 (2022) の Table 1でも、抗ウイルス活性としてEC₅₀が示されています。こちらでは細胞による違いを比較しています。それぞれのモデル細胞に対して、どのウイルスが感染して、それがどれくらい阻害されたかということを示すデータをEC₅₀で表したデータです(表2)。これらのようにEC₅₀は、薬剤の開発において最も使われる値ではないかと思えます。ここではEC₅₀を下記のように説明したいと思います。

50%効果濃度 EC₅₀=細胞(複雑系)にて目的の薬効を50%示す濃度域

ECはEffect Concentrationの略ですので、名前の通り、50%効果濃度ということです。

医薬品の活性 (EC₅₀値 vs K_i値)

このメインプロテアーゼ阻害剤は酵素の阻害剤ですので、EC₅₀以外にもK_iという値が出てきます。阻害定数ですね。先ほど紹介した論文とは別に、Dafydd R. Owen et al., **Science** 374 (6575), 1586-1593 (2021) では、このメインプロテアーゼ阻害剤に関するEC₅₀とK_iがそれぞれ求められています。別の論文ですのでEC₅₀値は少し異なりますが、Fig.1では阻害剤(PF-07321332)のEC₅₀値が数十nMから数百nMという値で示されています。また、*in vitro*でのFRETを用いたsubstrate cleavage assayでPF-07321332における酵素の阻害活性も測っていて、しっかりと阻害定数K_iを求めています。ご覧の通りに3.11 nM、n=6で振幅はありますが、数nMという値になっています(表3)。

表3 Dafydd R. Owen et al., **Science** 374 (6575), 1586-1593 (2021)

Compound	SARS-CoV2 M ^{pro} K _i (nM)	VeroE6-enACE2 CPE EC ₅₀ (nM)
PF-07321332	3.11 (1.47-6.59, n=6)	74.5 (66.5-83.4, n=20)

このことから、まずEC₅₀値とK_i値というものは一致しないことが分かります。そして、阻害定数については標的分子に対し酵素阻害を示すものですので、「定数」という言葉が出てきます。

阻害定数 K_i=標的分子に対し酵素阻害を示す濃度単位の定数

つまり、どちらもメインプロテアーゼを阻害する活性濃度を見ているのですが、先ほどのEC₅₀はあくまでもフェノタイプとしての効果を見ている。一方でK_iというものは、*in vitro*で阻害活性がどれくらいの濃度レンジであったかということを示す、似て非なるものとお考えください。

医薬品におけるK_D値

引き続き、パクスロビド/パキロビッド(Pfizer社)に関する例です。では、今回のテーマであるK_D値とは一体何なのか。また別の論文Daniel W. Kneller et al., **Nat. Commun.** 13, 2268

(2022) からご紹介します。この低分子阻害剤は、標的がメインプロテアーゼです。このメインプロテアーゼは既にMproという通称名で構造も解かれており、論文の中では阻害剤との複合体も示されています。

この論文では、あまり馴染みのない測定手法かもしれませんが、Biacore™ではなく、ITCと呼ばれるタンパク質と低分子阻害剤が相互作用した際の熱を測定する装置でK_D値を出しています。四角の中に書かれていますように、K_D値は7 nM、そのほかに熱学的なパラメータが書いてありますが、今回ポイントとなるのは、このK_D値が7 nMであるということです(図1)。

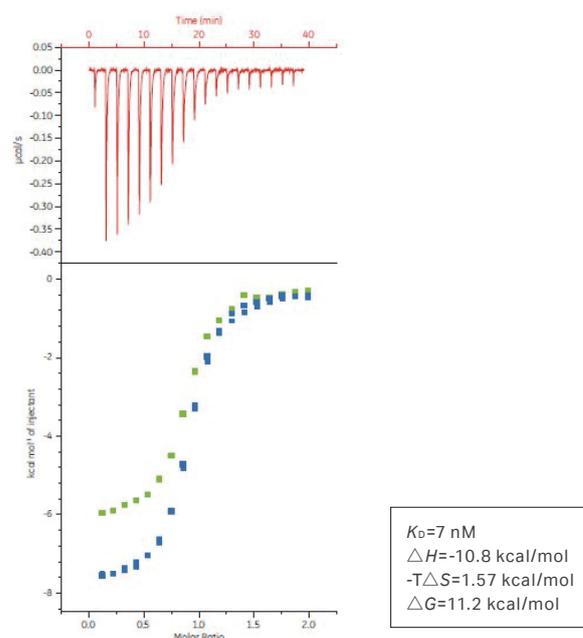


図1 ITCによる測定データ(イメージ)

このITCによる測定結果は、勿論、タンパク質と化合物を混ぜ合わせた時の反応を見ている。その組み合わせというのは1種類ずつのタンパク質と化合物のみ、つまり、この化合物は標的タンパク質に結合したという情報しか得ていません。つまり、このK_D値が7 nMという値は、まさにこの低分子阻害剤がその標的タンパク質に結合する時の濃度領域なのです。

解離定数 K_D=標的分子に対して示す結合に関する解離定数

大文字のKとDによるK_Dは解離定数というもので、ここではじめて標的分子に対する結合を示す値が出てきました。

活性濃度を表す単位

先程のEC₅₀やK_iというものは、標的をきちんと定めて解析していますので、薬剤が効いている理由は、標的に結合しているからであろうと考えられます。しかし、実際に見ている情報が、ダイレクトなものではないということがポイントです。

先ほどITCでお見せしたように、解離定数(K_D)というものは、

そこにはもう標的とその相手である化合物しか存在しない系で相互作用解析をしていますので、そこから得られてくるものは、その1対1結合の値です。それを K_D 値として表すことができるということになります。

解離定数 (K_D) が、そのほかの活性濃度と何が違うかという点で、標的分子に対して直接的な結合活性を表している値という点です。逆に言えば、ほかの値は標的に対して結合活性を示している値とは、少し違います。

阻害定数 (K_i) はそれらしく見えるかもしれませんが。確かに系によっては、阻害定数そのまま標的分子に対する結合の活性に近い数値を示すこともあります。しかし、阻害活性を見る場合は、基質などの混ざりものを含めた中で数値結果を見ているため、ダイレクトな情報ではありません。結構、 K_i という値も K_D 値とはかけ離れてしまうこともあり、直接的な情報を見えていない可能性は高いです。

ということで、ここまで K_D 値というものは、皆様がよく触れる活性値であるナントカ50というものとは違うものであるとお考えください。

なぜ K_D 値を求めなのか

分子生物学的なアプローチで阻害剤などの薬剤を創ろうとした時、その研究を進める中で、 K_D 値というものがどこで必要になってくるかということを実験にしてみました (図2)。

例えば、ご自身で開発した薬剤を細胞でアッセイしてみたところ活性がありました。この薬剤は細胞のフェノタイプとしての効果は見られましたが、では、細胞のどこに作用しているのだろうかと考えた時、大きく2つに分かれます。

1つ目は、薬効を見ている薬剤の活性に選択性、特異性があれば、 K_D 解析が必要ないとは言いませんが、実際のところ K_D 解析というものはあまり出てきません。ただし、この活性が、本当に自分が目的としている標的に特異的に結合しているかどうかを知りたい、標的分子を知りたいという時であれば、 K_D 解析が必要であるとお考えください。

2つ目のアプローチとして、はじめに*in vitro*の測定を行いました。すると、活性が見られるようです。それを細胞でアッセイしたところフェノタイプとしての効果もありました。そうすると、この新しい薬剤がやはり標的と特異的に結合しているかどうか

かが気になると思います。その時、目的の選択性、特異性が表現型として確認できれば、それでOKという考えもあるかもしれませんが、それでも、やはり標的分子に作用しているか知りたいということであれば、 K_D 値が必要になります。

開発したい薬剤が標的分子に作用していることを知りたい場合、 K_D 値が必要になる。

つまり、どんな経路をたどろうとも、皆様が評価している新しい薬剤がどこに行っているか、その標的分子を知りたいと思った瞬間に、 K_D 値を算出するというのがイコールとして、絶対に使わなくてはいけなくなるとお考えください。

K_D 値を算出する手段

続いて、 K_D 値をどう測るのかという内容に移ります。様々なテキストに記載されている通り、Langmuir plotやScatchard Plotとその式から K_D 値を算出します (図3)。

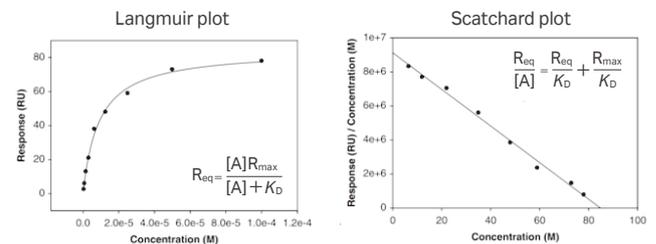


図3

下記、分子Aと分子Bが、標的タンパク質と薬剤だと考えてください。日本語で書くとなんだか小難しくなりますが、こちらが K_D 値の大きな説明です。

分子Aと分子Bの間で、濃度依存性をもって結合が観察され、高濃度において飽和に達する領域が存在し、かつ50%複合体が形成する中点が存在する。

一方で、 EC_{50} のような活性濃度は、薬効(目的の活性)を示す際の濃度領域ではありますが、その標的分子に対して特異的に結合しているかどうか、相互作用の反応中点があるのか、濃度依存的平衡定数の逆数であるかどうかなどは、実は全く考慮されていません。

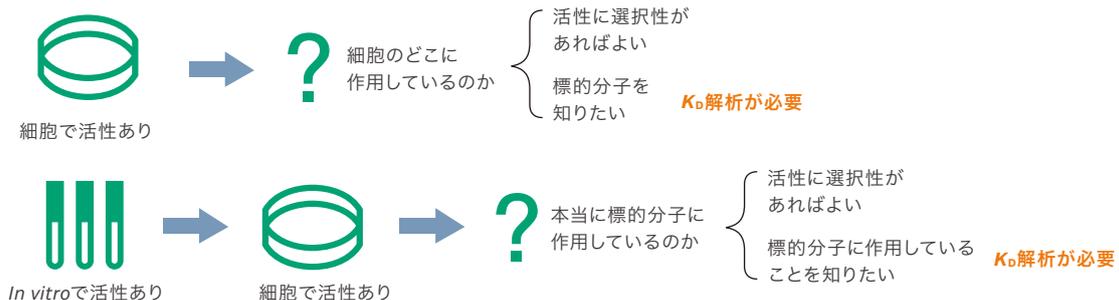


図2

K_D値とは解離定数であり、標的分子に対して結合する際の平衡定数の逆数

薬剤の開発段階では、こういったK_Dのような値を評価して、最終的に医薬品になっているものが多いかと思えます。シンプルにEC₅₀だけを見ても、ここには標的分子に作用して、その濃度領域と言っているかどうかという情報は全く存在していないと思っていただいても結構です。

K_D値 ≠ 活性濃度

念押しですが、K_D値と活性濃度 (EC₅₀やIC₅₀など) というものはイコールではないとお考えください。

生化学的 / 分子生物学的手法で

K_D値は算出できるのか

実際にK_D値はどのように解析するか、少し教科書的なところをお話ししたいと思います。皆様は、特にタンパク質の相互作用を測定する際、下記のようなものを教科書などで見た、もしくは実施したことがあるかと思えます (図4)。

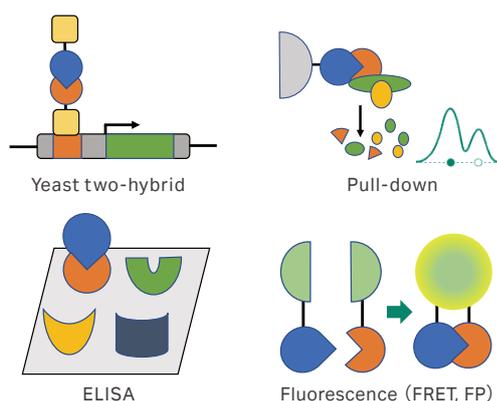


図4

分子間相互作用は、Yeast two-hybrid、Pull-down、ELISA、蛍光のFRETやFP (蛍光偏向) といった方法で測定されています。多くの場合、タンパク質科学の研究者から見ると、ここから出てくる値をK_D値と呼ぶのは良くないかなと思うことが多いです。

この中で、FRETおよびFPに関しては、見かけ上のK_Dとして参考にしても良い場面もあるかと思えますが、こういった手法でK_Dとして算出する場合の注意事項を挙げてみます。

(見かけ上の) K_D値として参考にしてもよい場合

1. アッセイ系における分子間相互作用の結合量論比 (1:1など) が分かっていること
2. 反応中点濃度から1/10~10倍の濃度領域においてシグナルが濃度依存的に変化していること
3. 高濃度域で反応が飽和に達していること

1つ目、アッセイ系の分子間相互作用において、いわゆる結合量論比がちゃんと分かっていることが大事です。何対何結合

ということがご自身の中で想定されていて、その中でアッセイ系であることが大事です。

2つ目、反応中点濃度が10分の1から10倍の濃度領域において、しっかりと濃度依存性があるということを見ているかどうか。低い濃度だけ、高い濃度だけではダメです。そこに変化量があったとしても、濃度依存性があったとしても、しっかりと低い濃度から高い濃度まで広いレンジで測定しないとK_D値というものは正確に算出されません。

そのため、3つ目の高濃度の域で反応が飽和に達しているということも大切になってきます。

ということで、FRETやFPといった系ではK_Dとして議論できる場合もたくさんありますし、皆様も論文で見られたことはあるかと思えます。

ただし、このような、いわゆるインダイレクトな情報で算出されたK_Dに関しましては、それが真の値であるかどうか、しっかりと検証が必要であるとお考えください。

蛋白質 - 低分子間の物理化学的な相互作用解析

できる限り正確なK_D値を測定するためには、先ほども紹介したITCのように、いわゆる物理化学的な相互作用、分子のダイレクトな情報を拾い取ってくれるシステムが必要であるとお考えください。最近ではSPR、ITC、MSTといったシステムがK_D解析のパワフルなツールとして知られています。

SPR Surface Plasmon Resonance

(表面プラズモン共鳴)

ITC Isothermal Titration Calorimeter

(等温滴定カロリーメーター)

MST Microscale Thermophoresis

(マイクロスケール熱泳動)

代表的な結合情報として、以下が挙げられます。

解離定数K_D (会合定数K_A=1/K_D)

→ **SPR、ITC、MST**

熱安定性 ΔT_m

→ **DSF (TSA)、DSC**

また、結合親和性 (解離定数) と深く関与するそれ以外の物理化学的なパラメータとして以下が挙げられます。

解離定数K_D

= k_{off} (解離速度定数) / k_{on} (会合速度定数) → **SPR**

= exp (ΔG (結合自由エネルギー) / RT)

ΔG (結合自由エネルギー)

= ΔH (結合エンタルピー) - TΔS (結合エントロピー) → **ITC**

K_D値はどこで活用することになるのか

このK_D値は、どのようなタイミングで必要性が出てくるのかというところを、少しご紹介したいと思います。こちらは簡易的

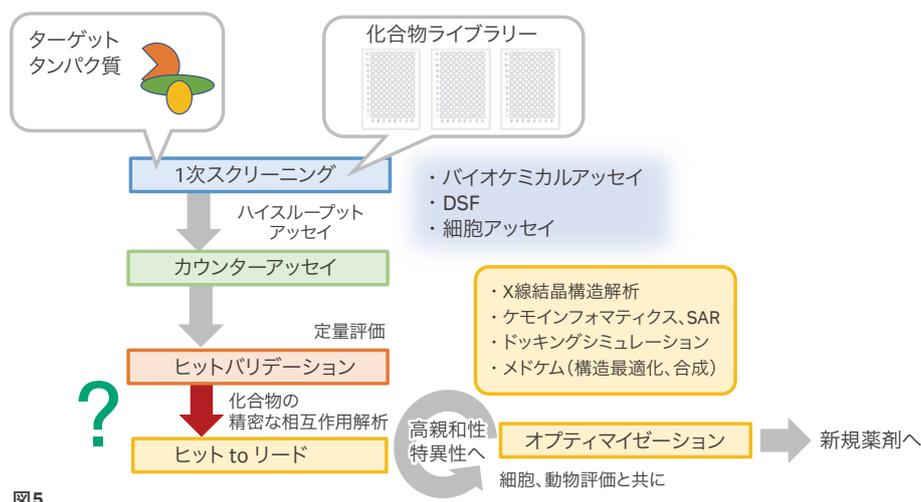


図5

な薬剤設計、薬剤スクリーニングのワークフローです(図5)。こちらでは標的タンパク質が決まっている、いわゆる分子標的創薬のフローを描いています。ターゲットタンパク質があり、その阻害剤を探求・開発したいという場合、このように1次スクリーニング、カウンターアッセイ、ヒットバリデーションといったワークフローに沿って進んでいくと思います。その標的に対して間違いなく作用して活性を示しているということでセレクションを掛け、どんどん化合物の候補を減らしていきます。この時、自ずと以下のようなクエスチョンが出てきます。

- 標的蛋白質に結合しているのか?
- 結合親和性はどれくらいあるのか?
- 特異性はあるのか?
- 構造情報から活性を上げられないか?
- 構造活性相関はあるのか?

自分の見つけてきた化合物薬剤の候補は、本当に標的タンパク質に結合しているのか。一次スクリーニングを行う場合、バイオケミカルなアッセイ系、もしくは細胞のアッセイ系で、かつハイスループット型になりますので、あまりシンプルな系とは言えないことが多いと思います。そのため、確かにフェノタイプとして活性は見えているけれども、化合物が目的としている分子に特異的な結合を示しているかどうかは分かりません。これにはそれぞれの分子を使って、何らかの手法で見ていく必要があります。

そうすると、活性はあったけれども、実際にどれくらいの結合親和性なのだろうというのも気になるでしょう。先ほど申し上げましたように、特異性があるのかどうかという点も気になります。また、実際にどんどん活性を上げていきたいのであれば、構造情報を得たいと思われるでしょう。

その後、その構造情報を使って構造活性相関 (structure-activity relationship: SAR) を見て、さらにヒットtoリードや最適化をしていきたいという流れになると思います。つまり、新しい薬剤がきちんと標的に効いているかどうかというのを考えれば考えるほど、このクエスチョンは自然に出てきます。研究者によってはこのクエスチョンの登場する場所が変

わってくるかもしれませんが、ワークフローの赤い矢印のところで発生することが多いです。

ある程度絞られてきて、いい化合物だと思った時、さあ、これは本当に標的に行っていますかというクエスチョンが強く現れます。

標的分子があり、その薬剤開発をしたい場合、 K_D 値の算出は避けて通れない。

このように考えていただいてもよいと思います。

K_D 値評価を活用した研究例

ここから私たちの研究論文を少し紹介いたします (Shinya Tashiro et al., *ACS Chem. Biol.* (2018) 13, 2783-2793.)。Supporting information Figure 2にある化合物No.1が、標的に対して取れてきた、分子量のとても小さなヒット化合物です。Sensorgram (SPR) と記載されているものが実際に結合活性を見たセンサーグラムで、Scatchard plotが、前述の K_D 値算出に使うプロットです。Scatchard plotからフィッティングカーブが得られ、 K_D で2 μ Mという値が得られました(図6)。

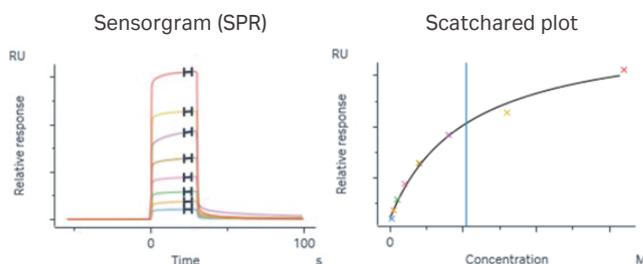


図6 化合物No.1のデータ(イメージ)

これで我々のヒット化合物が標的タンパク質と K_D 値=2 μ Mで結合しているという情報を得たこととなります。 K_D 値が得られましたので、X線構造解析なども行って、そこから化合物の官能基を色々変えていきます。すると、No.15という化合物が得られました。この化合物は親和性が高く、平衡値による

Scattered plotを用いなくてもSensorgramの形状から直接Kinetics解析が行えるようになり、最終的に K_D 値で64 nMという数十倍強い薬剤の設計に成功しています (図7)。

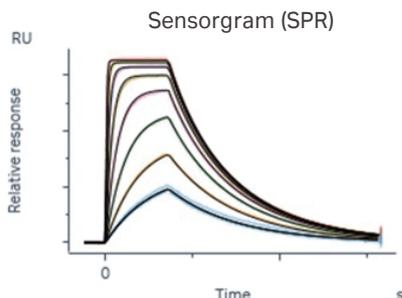


図7 化合物No.15のデータ(イメージ)

このようにあるヒット化合物をセレクションして、そこから強くしていきたいと思った時には、SPRなどでダイレクトな情報を得て、そこから K_D 値をしっかりと解析して、その値がどう変わっていったかを見ていくことが必須になってきます。

酵素阻害剤の速度論パラメータの例

ここでは、なぜSPRによるKinetics解析をするのかについて紹介したいと思います。幾つかの論文で面白いデータが確認できます。

ヒトD-アミノ酸オキシダーゼ阻害剤の速度論パラメータ：

Sara Núñez et al., *Drug Discov. Today*. 17 (1-2), 10-22 (2012).

HIV-1プロテアーゼ阻害剤の速度論パラメータ：

Inge Dierynck et al., *J. Virol.* 81 (24), 13845-13851 (2007).

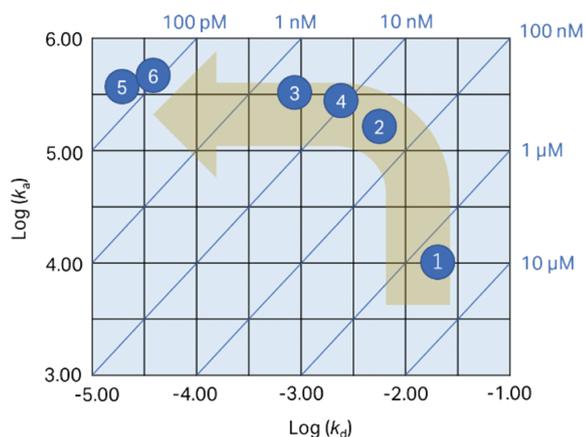


図8 Sara Núñez et al., *Drug Discov. Today*. 17 (1-2), 10-22 (2012).

ヒット化合物 (①) から最適化された化合物たちを比較していきますと、このようにはじめは k_a が良くなり (②③④)、その後 k_d が良くなっていく (⑤⑥) というような傾向が見られます。このように、薬剤開発においては、SPRを使って速度的なパラメータを出していくことで、自分の作った薬剤の特異

性、親和性がどんどん上がっていく過程を見ていくことができます (図8)。そのため、SPRはパワフルなツールとして最近注目されている技術の一つになっているのです。

そのほか、以下の論文をご紹介します。

Robert A. Copeland, *Nat. Rev. Drug Discov.* 15(2) 87-95 (2016).
速度論的パラメータが薬効と密接に関連する

Wei Sun Leong et al., *Nature Communications*, 10, 867 (2019).
ITCとDSF解析により特異性のあるヒット化合物の同定に成功

Biacore™ 概要とその原理

Biacore™とは

生体分子の相互作用を研究するため、世界で初めてSPRを応用して作られた分析機器として1990年に初号機が販売されました。生体分子等の相互作用をノンラベル・リアルタイムに検出可能で、多くの場合、1検体あたり数μg程度以下の試料使用量で測定可能です。

Biacore™システムでは、図1のようにセンサーチップ上に固定化した分子（リガンド）上に添加分子（アナライト）を一定時間添加します。その結果得られるセンサーグラムから、結合レスポンス高や K_D （結合の強さ）だけでなく k_a 、 k_d （結合解離の速さ）も求められることは大きな特長です。

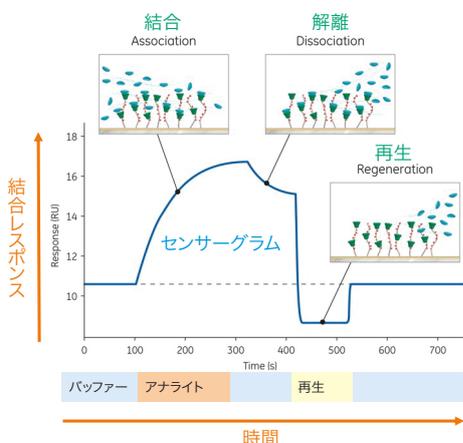


図1 センサーグラムと送液

Biacore™の装置構成と原理

Biacore™はSPR検出器、流路系、センサーチップおよび制御解析PC（ソフトウェア）で構成されます。

Biacore™の検出系は、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。センサーチップのリガンド固定化面の裏側（図2では上部左側）から一定の角度範囲の偏光を照射し、全反射した反射光強度の極小点の角度変化からセンサーチップ表面近傍の屈折率（密度）変化を検出しています。この密度変化を時間に対してプロットすること

でセンサーグラムが得られます。センサーチップ・キット類が多種市販されていることは（P.13）、様々な測定系を簡便に構築するのに重要です。流路系は微量な溶液を正確な濃度で瞬時に測定部に添加するのに重要な役割を果たします。また、センサーチップは平板ですが、機種別の流路形状の違いによりフローセル数は決定されます。使用するバイアルやマイクロプレートには専用のキャップ・シールがあり、測定中の揮発やニードルに付着する溶液の混入を防ぎ、正確な測定に寄与します。ソフトウェアは、様々なデータを処理し、解析するために多様な機能を備えており、簡便に広範な用途での測定解析を可能にします。

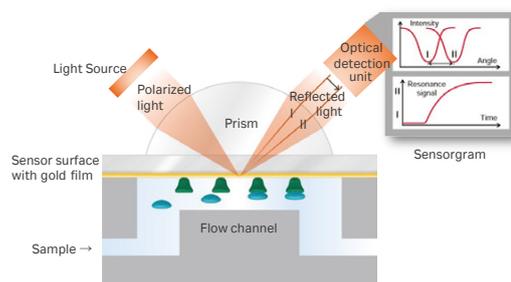


図2 Biacore™の構成（SPR検出器・センサーチップ・流路系）

Biacore™の進化

これらのBiacore™の構成要素は発売後33年でそれぞれ大きな進化を遂げています。センサーチップは16種類（2023年現在）市販されていて幅広い測定に対応します。機種別の流路系の設計の進化は、スループットの向上に大きく寄与してきました。ソフトウェアは様々な機能が加わるとともに、異なる機種においても同一のソフトが簡便に利用でき、またネットワークサーバーでのデータマネージメントにも対応可能になってきました。検出器の感度も大きく向上しました。Biacore™の感度はどの程度低ノイズかで評価され、その結果小さなレスポンスを検出できるかが決定します。この感度の向上はフラグメント化合物のような非常に低分子量の分子の結合検出はもちろん、高い活性率で固定化することが難しい高難度標的分子の相互作用解析に大きな進展をもたらしました（図3）。

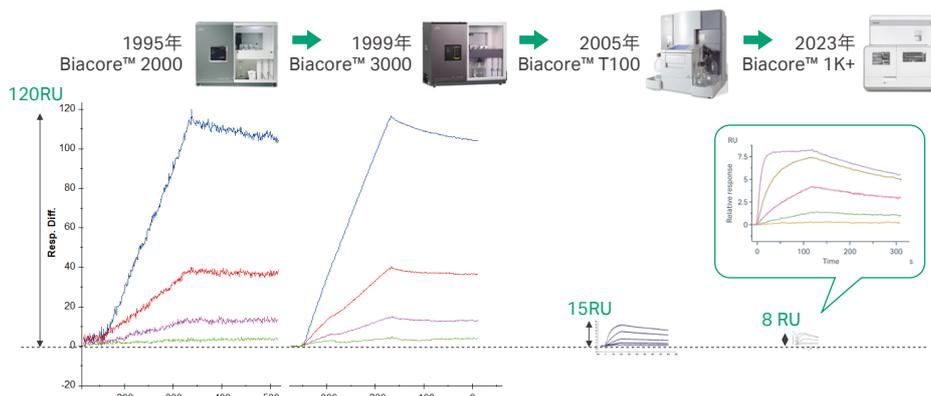


図3 Biacore™の感度の進化

相互作用解析の4つの“したい”をかなえる高感度・6フローセル・ソフトウェア

Biacore™ 1 series

難しい標的を測定したい

センサーチップ代を抑えたい

装置の前にいる時間を減らしたい

データ管理を安全・便利にしたい



アップグレード可能



Biacore™ 1K System

- Biacore™ T200相当感度
- ペアフローセル
- サンプルプレート1枚

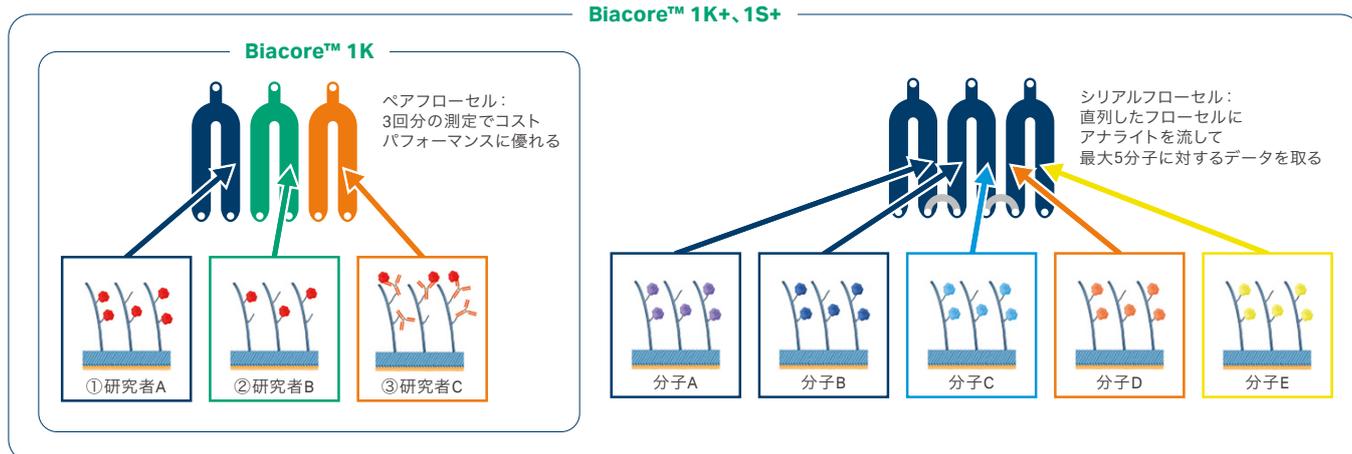
Biacore™ 1K+ System

- Biacore™ T200相当感度
- ペア+シリアルフローセル
- サンプルプレート2枚

Biacore™ 1S+ System

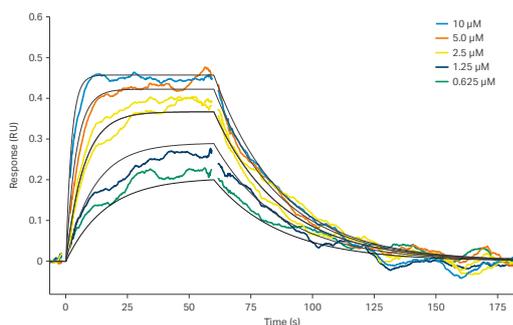
- Biacore™ シリーズ最高感度
- ペア+シリアルフローセル
- サンプルプレート2枚

6フローセルがもたらすアッセイの柔軟性と低ランニングコスト



低いノイズレベルでできること

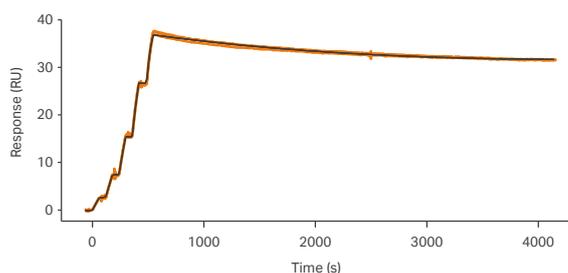
Biacore™ 1 seriesでは有機分子において検出可能な分子サイズの下限はありません。シリーズ最高感度のBiacore™ 1S+では、最高濃度で0.5 RU未満のレスポンスしか得られない場合でも、濃度依存的なレスポンスの差を切り分けられます。これにより、活性を維持したままの可溶化およびセンサーチップへの固定化が難しい分子との相互作用を可能とします。



炭酸脱水酵素IIに結合するCBSA (201.20 Da) の相互作用

安定したシグナルでできること

密閉されたマイクロ流路系での測定を行うことで、低ノイズ、高いシグナル安定性を実現し、 10^{-6} s^{-1} までの非常に遅い解離速度においても信頼性の高いデータが得られます。下図はBiacore™ 1K+を用いてSingle-cycle kineticsにより評価しています。1時間で5 RU程度しか解離しない非常に安定した分子複合体では小さな変化量を測定するため十分なシグナル安定性が求められます。



モノクローナル抗TNFα抗体に結合するTNFα (17.3 kDa) の相互作用

8本のニードルにより高品質測定データを短時間で

Biacore™ 8 series

スクリーニング：

最大で2300サンプルを1日で

キャラクタライズ：

64相互作用を4時間で処理



Biacore™ 8K System

- 8本ニードル
- 96/384ウェルプレート4枚設置可能

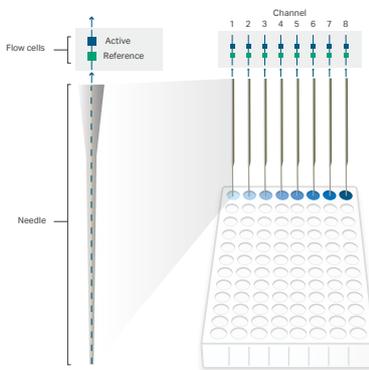


Biacore™ 8K+ System

- 8本ニードル
- 96/384ウェルプレート12枚設置可能

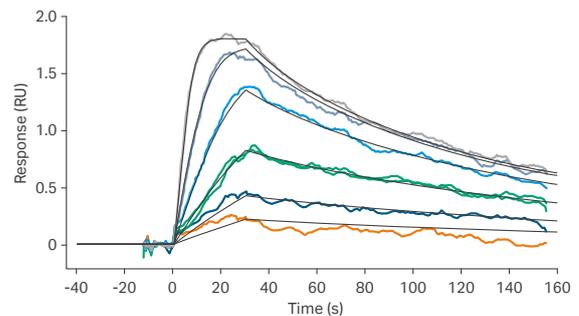
8本ニードルでできること

高いスループットでスクリーニング～キャラクタライズまで測定できることは勿論、1度のインジェクションで8濃度の測定ができるParallel kinetics、より広範囲な濃度系列で条件検討から本測定までを1度を実施する2D kineticsに対応しています。



高品質なデータはそのまま

Biacore™ 8 seriesも有機分子において検出可能な分子サイズの下限はありません。下図では2.0 RU未満で濃度依存的なレスポンスの差を切り分け、信頼性のある解析を実施しています。



トロンピンに結合するメラガトラン (429.5 Da) の相互作用

Biacore™ 共通のソフトウェアで、使い始めたその日から測定からレポートまで

Biacore™ Insight Software

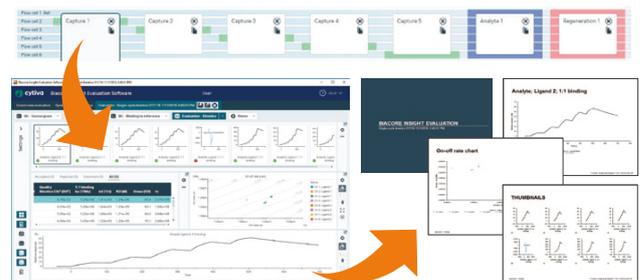
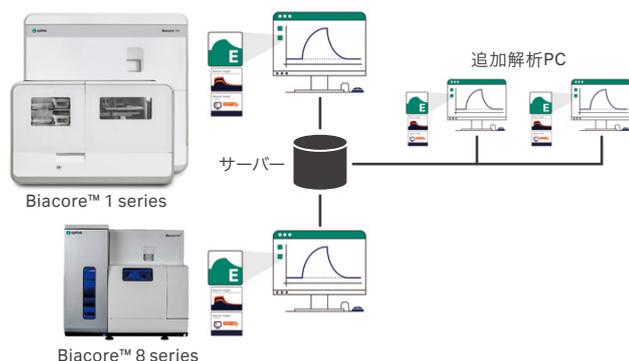
Biacore™ 共通のソフトウェアで、安全・便利なデータ管理と拡張性の高さを実現

多彩なオプションをもつ共通ソフトウェアをSQLサーバー上に構築。異なる種類のBiacore™も共通のソフトウェアでコントロール、データ管理していただけます。

使い始めたその日から、アッセイセットアップからレポートまで

測定内容に応じて準備された測定・解析メソッド

➔ インジェクションの順番をマウス操作で配置できます。

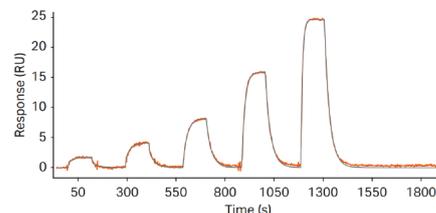


マウスによる選択だけで、Microsoft® Excel®, PDF、Microsoft® PowerPoint®のレポート作成

小スケールの相互作用解析に

Biacore™ X100 Plus Package

- はじめてカインेटクス解析を行う方
- 少数サンプルをじっくり評価したい方
- 濃度測定、低分子にも対応 (Plus Packageのみ)
- 最大15サンプルの全自動操作が可能



Single-cycle kineticによる炭酸脱水酵素に結合するフロセמיד (330.74 Da) の相互作用

Biacore™仕様一覧

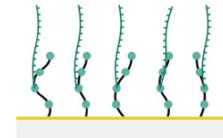
	Biacore™ X100 Plus Package	Biacore™ 1K	Biacore™ 1K+	Biacore™ 1S+	Biacore™ 8K	Biacore™ 8K+
価格 (2023年時点)	13,079,730円	34,570,730円	48,850,730円	57,418,730円	73,889,730円	83,862,730円
ニードル数	1	1	1	1	8	8
フローセル数 (送液設定)	2 (ペア)	6 (ペア)	6 (ペア+シリアル)	6 (ペア+シリアル)	16 (ペア)	16 (ペア)
サンプル数	15 バイアル	96/384プレートx1 + reagent rack x1	96/384プレートx2 + reagent rack x2	96/384プレートx2 + reagent rack x2	96/384プレートx4	96/384プレートx12
ベースラインノイズ (RMS)	< 0.1 RU	< 0.03 RU	< 0.03 RU	< 0.01 RU	< 0.02 RU	< 0.02 RU
検出分子サイズ	100 Da まで	有機分子において 下限なし	有機分子において 下限なし	有機分子において 下限なし	有機分子において 下限なし	有機分子において 下限なし
ブランク差し引き後ドリフト	< +/-0.03 RU/min	< +/-0.003 RU/min	< +/-0.003 RU/min	< +/-0.003 RU/min	< +/-0.03 RU/min	< +/-0.03 RU/min
サンプル揮発防止	専用バイアルキャップ	専用バイアルキャップ、専用プレートシール/セプタ	専用バイアルキャップ、専用プレートシール/セプタ	専用バイアルキャップ、専用プレートシール/セプタ	専用プレートシール/セプタ	専用プレートシール/セプタ
ソフトウェア	Biacore™ X100 専用ソフトウェア	Biacore™ Insight Software	Biacore™ Insight Software	Biacore™ Insight Software	Biacore™ Insight Software	Biacore™ Insight Software
使用可能センサーチップ (P.13 詳細)	15 種類	16 種類	16 種類	16 種類	16 種類	16 種類
21CFR Part11対応 GxPサポート	なし	あり (オプション)	あり (オプション)	あり (オプション)	あり (オプション)	あり (オプション)
アクティビティ・キュー ・各操作の予約 ・複数ランの予約	なし	あり	あり	あり	あり	あり
バッファーセレクター	なし	なし	4	4	4	4
全自動測定	24 h	60 h	72 h	72 h	60 h	72 h
データ取得間隔	1 Hz	1 or 10 Hz	1 or 10 Hz	1, 10 or 40 Hz	1 or 10 Hz	1 or 10 Hz
測定温度	4 - 40°C 室温から10°C以下まで	25 - 37°C	25 - 37°C	4 - 40°C 室温から20°C以下まで	4 - 40°C 室温から20°C以下まで	4 - 40°C 室温から20°C以下まで
サンプルラック温度	室温	4 - 37°C 室温から18°C以下まで	4 - 37°C 室温から18°C以下まで	4 - 40°C 室温から18°C以下まで	4 - 40°C 室温から18°C以下まで	4 - 40°C 室温から18°C以下まで
添加ボリューム	2 - 100 µL	1 - 400 µL	1 - 400 µL	1 - 400 µL	1 - 200 µL	1 - 200 µL
添加ツール	—	Dual、ABA、Poly	Dual、ABA、Poly	Dual、ABA、Poly	Dual、ABA	Dual、ABA
kinetics解析手法	Multi-cycle kinetics Single-cycle kinetics	Multi-cycle kinetics Single-cycle kinetics	Multi-cycle kinetics Single-cycle kinetics	Multi-cycle kinetics Single-cycle kinetics	Multi-cycle kinetics Single-cycle kinetics Parallel kinetics 2D-kinetics	Multi-cycle kinetics Single-cycle kinetics Parallel kinetics 2D-kinetics
kinetics解析範囲	$k_a = 10^3 \sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (タンパク質) $k_d = 10^{-5} \sim 0.1 \text{ s}^{-1}$	$k_a = \sim 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (タンパク質) $k_a = \sim 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (低分子) $k_d = 10^{-6} \sim 1 \text{ s}^{-1}$	$k_a = \sim 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (タンパク質) $k_a = \sim 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (低分子) $k_d = 10^{-6} \sim 1 \text{ s}^{-1}$	$k_a = \sim 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (タンパク質) $k_a = \sim 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (低分子) $k_d = 10^{-6} \sim 6 \text{ s}^{-1}$	$k_a = \sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (タンパク質) $k_a = \sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (低分子) $k_d = 10^{-6} \sim 0.5 \text{ s}^{-1}$	$k_a = \sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (タンパク質) $k_a = \sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (低分子) $k_d = 10^{-6} \sim 0.5 \text{ s}^{-1}$
測定時間 Binding Level Screen (384-Well plate)	—	15 h	15 h	15 h	4 h	4 h

ノウハウや経験がなくても簡単に実験がはじめられる汎用性の高いキット

Biotin CAPture Kit

(アプリケーション例: P.15)

- 構成品:
 - ① 1本鎖オリゴDNAセンサーチップ
 - ② 相補鎖DNA-ストレプトアビジンコンジュゲート溶液
 - ③ 再生溶液
- アッセイ系構築でハードルとなる固定化・再生条件の検討不要
- Biotin化された広範な分子に適用可能 (核酸除可)
- リガンドキャプチャー後のベースラインが安定
- 繰り返し使用可能な専用センサーチップで失敗を恐れず測定にチャレンジ可能



① Sensor Chip CAP

各種センサーチップ、キット

16種類のセンサーチップ10種類以上のキット (2023年現在) で、様々なサンプルの測定をサポートします。



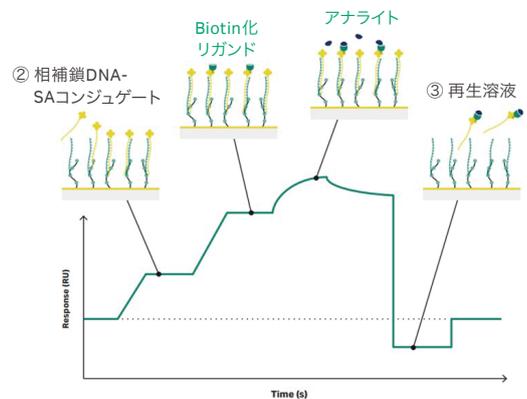
Series S Sensor Chip CM5

- Biacore™ 1 series用
- Biacore™ 8 series用



Sensor Chip CM5

- Biacore™ X100用



センサーチップ*	製品番号 Series S(1 series, 8 series用)				製品番号 X100用			固定化関連キット	製品番号 1キット
	10枚	3枚	1枚	10枚	3枚	1枚			
汎用	Sensor Chip CM7	29147020	28953828		29147017	28957332	Amine Coupling Kit	BR100050	
	Sensor Chip CM5	29149603	BR100530	29104988	29149604	BR100012	Amine Coupling Kit, type2	BR100633	
	Sensor Chip CM4		BR100534	29104989		BR100539	Thiol Coupling Kit	BR100557	
	Sensor Chip CM3		BR100536			BR100541	PDEA Thiol Coupling Reagent	BR100058	
	Sensor Chip C1		BR100535	29104944		BR100540			
	Sensor Chip PEG			29239810			29245706		
Biotin-tag	Sensor Chip NA		29699622	29407997			Biotin CAPture Kit	28920233	
	Sensor Chip SA	29699621	BR100531	29104992		BR100032	Biotin CAPture Kit, Series S	28920234	
His-tag			BR100532	28994951		BR100034	Biotin CAPture Reagent	29423383	
	Sensor Chip NTA				BR100034	BR100407	NTA Reagent Kit	28995043	
GST-tag							His Capture Kit	28995056	
							His Capture Kit, type 2	29234602	
							GST Capture Kit	BR100223	
	Sensor Chip Prisma		29650264	29650263			Human Fab Capture Kit	28958325	
	Sensor Chip Protein A		29127556	29127555		29127558	29127557	Human Fab Capture Kit, type 2	29234601
抗体用	Sensor Chip Protein G			29179315		29179316	Human Antibody Capture Kit	BR100839	
	Sensor Chip Protein L			29205138		29205137	Human Antibody Capture Kit, type 2	29234600	
							Mouse Antibody Capture Kit	BR100838	
							Mouse Antibody Capture Kit, type 2	29215281	
脂質用	Sensor Chip L1			29104993		BR100543			
	Sensor Chip HPA			29104994		BR100030			
カスタム用	Sensor Chip Au					BR100542			
	SIA Kit Au		BR100405			BR100405			

* Series S Sensor Chip の製品名には“Series S”が追加されます。例) Series S Sensor Chip CM5

- 汎用センサーチップは、各種Coupling kitを用いたリガンド直接固定化のほか、Biotin CAPture Kitを除く各種Capture kitと併用します。
- Biotin CAPture Kitには専用のセンサーチップ (Sensor Chip CAP) が付属します。
- Biotin CAPture Reagent (29423383) は、Biotin CAPture Kit付属の相補鎖DNA-SAコンジュゲートのみの単品です。
- NTA Reagent Kit (28995043) は、Sensor Chip NTAと併用するキレート反応用NiCl₂溶液と脱キレート用EDTA溶液のセットです。
- 各種Kit, Type2は、Biacore™ 8 seriesで用います。

抗体のアプリケーション例

Assessing long-term glucose regulation by measurement of glycated hemoglobin using Biacore™ 8K

Roche Diagnostics社がBiacore™ 8Kを用いて糖化したヘモグロビン (HbA1c) を認識する抗体の結合を測定した事例です。血糖値が上昇し続けると、グルコース分子は赤血球中のヘモグロビンに不可逆的に結合します。高血糖が長く続くほど、ヘモグロビンに対するグルコースの結合量は増えるため、HbA1cを測定することで、長期的な血中グルコース調節を評価することができます。

はじめにHbA1cを標的とした6種類のウサギmAb (mAb A~F) の相互作用を評価しました。Series S Sensor Chip CM5には、ヒツジ抗ウサギFc抗体をおよそ12,000 RU固定化しました。測定方法として、200 nM ウサギmAbを10 μL/min.で60秒コンタクト。その後、0、3、10、30、90、270 nMアナライト A01 (HbA1c peptide) を80 μL/min.で180秒コンタクト、解離時間は300秒としました。再生条件は、20 μL/min.で、HBS-ET bufferを15秒、10 mM Gly-HCl pH2.0を20秒、続いて10 mM Gly-HCl pH2.25を60秒x2回としました (図1)。

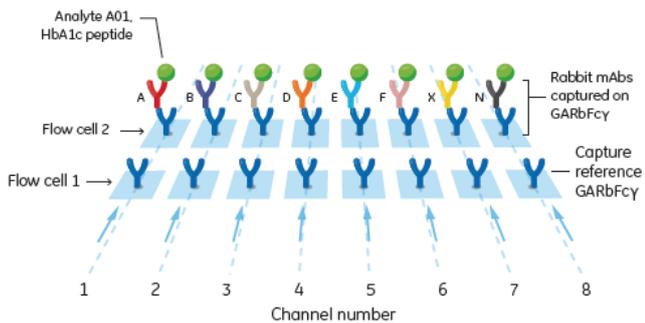


図1 アッセイセットアップ1

キャプチャー法による6種類のウサギmAb (mAb A~F) とHbA1c peptideの相互作用測定。mAb XとNはネガコン。

1:1 bindingでMulti cycle Kinetics解析を行った結果を図2に示します。ウサギmAb A~Fに対してKineticsプロファイルが示され、mAb A (Ch1) の親和性が最も高いと確認できました。

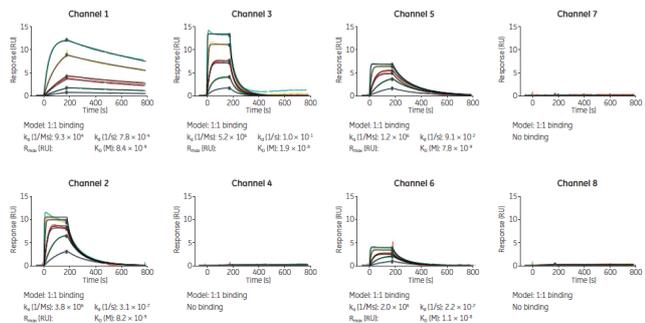


図2 Multi cycle Kineticsによる解析結果

続いて、分子量1100から1500の7種類のヒトHbA1cペプチド誘導体を評価するため、抗体には最も親和性の高かった

mAb Aを選択しました。

各種ヒトHbA1cペプチド誘導体は、アミノ酸組成、配列の長さ、糖化修飾などが異なります。A01は糖化HbA1cペプチドのポジコン、A02とA05は非糖化HbA1cペプチドのネガコン、A07はHbA1A2で交差反応性のないネガコン、A03、A04、A06はHbA1cペプチド誘導体に化学修飾や配列を延長した、こちらもポジコンです。

アナライトの濃度系列として、A01、A03、A04、A05、A06は前述と同様ですが、A02とA07のみ、不要な交差反応をよりよく検出するため、0、10、30、90、270、810 nMと添加濃度を上げています。

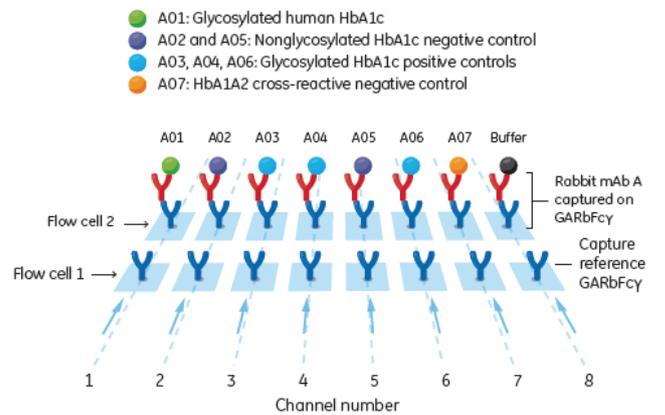


図3 アッセイセットアップ2

キャプチャー法によるウサギmAbと各種HbA1c peptide誘導体の相互作用測定。Ch8はバッファのみ。

1:1 bindingでMulti-cycle kinetics解析を行った結果を図4に示します。mAb Aはすべての糖化HbA1c誘導体と濃度依存的な結合を示しましたが、非グリコシル化誘導体およびHbA1A2誘導体とは結合を示しませんでした。

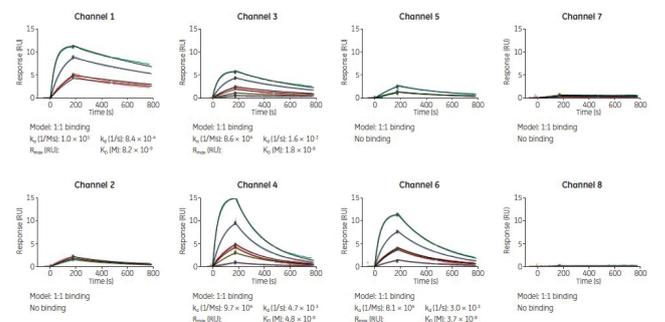


図4 Multi cycle Kineticsによる解析結果

R_{max} =5~15 RUのレベルで高感度に速度論的のプロファイルが示されました。

Biacore™ 8Kを用いることで、ペプチドといった小さな分子でも幅広い親和性の違いを示すKineticsプロファイル測定を並行して行えることが示されました。

低分子のアプリケーション例

Binding kinetics by Surface Plasmon Resonance: Insight into Structure-kinetics/thermodynamics relationships

フィリップス大学マールブルク校との共同研究による、メタロプロテアーゼの一種であるサーモリシン (Thermolysin, TLN) に結合する阻害剤のKinetics解析事例です。

化合物スクリーニングに続く、リードの最適化における目標は、*in vivo*での特性を改善することです。阻害剤の場合、 K_i 値で示される阻害効果のほか、薬物の滞留時間 (drug residence time, $1/k_{off}$) が、もう1つの重要な要素とされます。これは薬物-標的複合体の安定性に関係し、薬効の向上だけでなく、投与量を抑えることによるオフターゲットを低減し、安全性、忍容性の向上につながります。

TLNの結合ポケットは S_1 、 S_1' 、 S_2' から構成されます。今回、 S_2' サイトに関与する P_2' を可変させた化合物を評価しました (図1)。

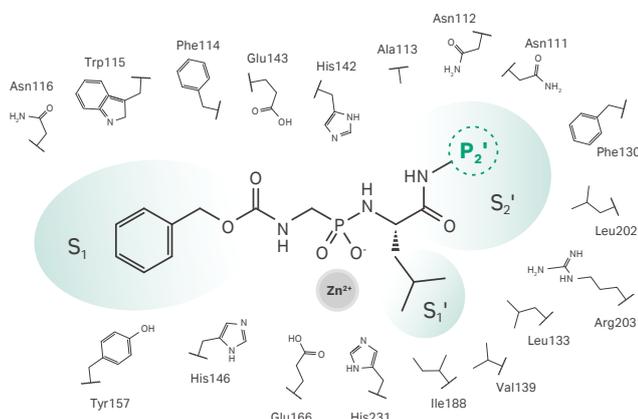


図1 サーモリシン阻害剤候補化合物 (平均分子量 454 Da)

リガンド-アナライトの複合体安定性の高いサンプルによる Kinetics測定を行う場合、Biotin CAPture Kitが有用です。Biotin-Streptavidinの強固な結合によりリガンドタンパク質を安定して固定化でき、かつ、キット付属の再生溶液で簡便に再生が行えるため、アッセイ開発に時間をかけることなく測定を進めることができます (図2)。

今回、Biacore™ T200を用いて4つのシリーズに分類される20種類のTLN阻害剤を分析しました。センサーグラムは、シリーズ内、

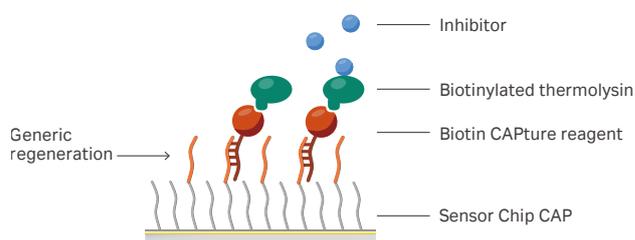


図2 Biotin CAPture Kitを用いたアッセイセットアップ

シリーズ間において結合特性に明らかな違いを示しました (図3)。 k_{on}/k_{off} mapを用いることで、各化合物のKinetics結果が明確に比較できます。Y軸を K_a 、X軸を k_d とすると斜線上のデータは K_D 値として同等であることが示されます。同シリーズの化合物は同等の K_D 値であり、C5を除くSeries Cにおいて化合物-標的複合体の高い安定性が確認されました (図4)。

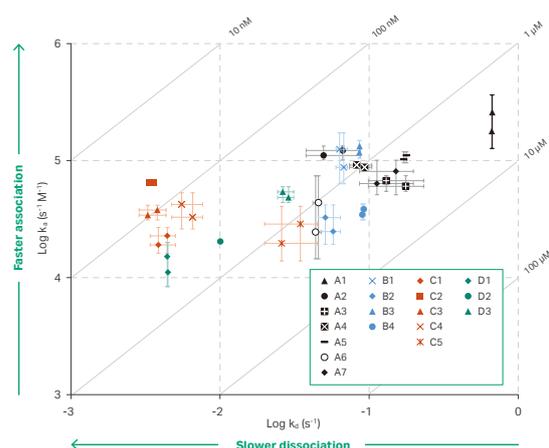


図4 Kinetics解析結果の k_{on}/k_{off} map

(紺色) Series A、(水色) Series B、(橙色) Series C、(緑色) Series D。 k_{on}/k_{off} mapを用いることで、化合物の構造とKineticsの関係が分かりやすく示すことができます。

Reference

- A. Biela, N. N. Nasief, M. Betz, A. Heine, D. Hangauer, G. Klebe, **Angew. Chem. Int. Ed.** 2013, 52, 1822–1828; **Angew. Chem.** 2013, 125, 1868–1876.
Krimmer SG, Betz M, Heine A, Klebe G. **ChemMedChem.** 2014 May;9(5):877

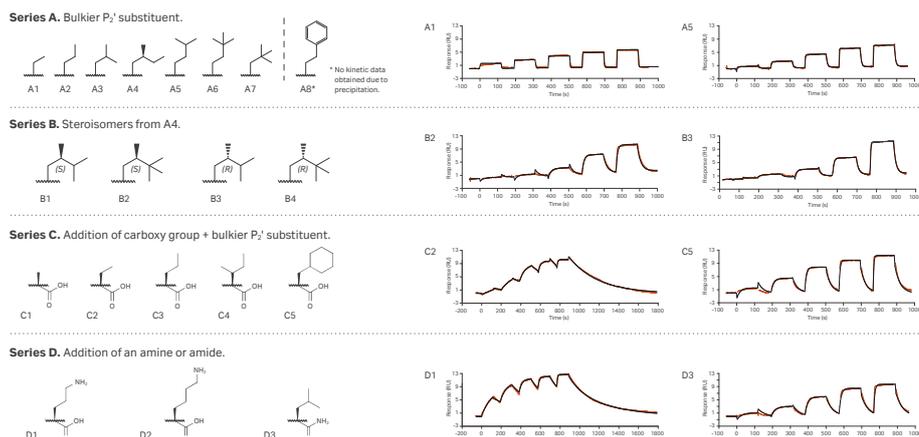


図3 Single cycle Kineticsによる解析結果

Series A. バルキーな P_2' 置換基。Series B. A4の立体異性体。Series C. カルボキシル基+バルキーな P_2' 置換基。Series D. アミンまたはアミド。

核酸のアプリケーション例

Unraveling the mechanisms of RNA-binding protein functions using SPR-based kinetic analysis

RNAが転写されると、スプライシング、輸送、安定性の調整、翻訳といった過程で様々なタンパク質が関与します。今回、神経細胞特異的に見られるRNA結合タンパク質であるHuDおよびスプライオソームであるU1Aについて、RNAとの相互作用を評価しました。

核酸 - タンパク質の相互作用測定では、核酸の固定化を第一選択とします。センサーチップ表面はカルボキシメチル基により負に電荷しているため、核酸をアナライトとして流すと反発作用によって正確な相互作用測定ができないためです。多くの場合、立体障害を防ぐためスペーサーを挟んで末端がBiotin修飾された核酸をSensor Chip SAに固定化します。さらに、Biotin化1本鎖オリゴヌクレオチドをSensor Chip SAに固定化し、相補鎖を導入した核酸を設計しキャプチャー法を採用することで、同一フローセル上で複数の核酸を評価することが可能となります(図1)。

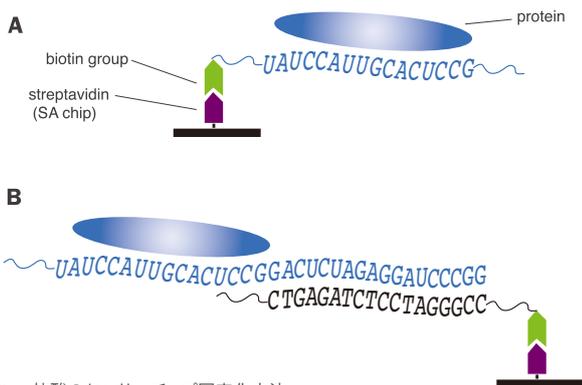


図1 核酸のセンサーチップ固定化方法
A 5'末端をBiotin化した核酸をSensor Chip SAに直接固定化します。
B はじめにBiotin化1本鎖オリゴヌクレオチドをSensor Chip SAに固定化、3'末端に相補鎖を導入した核酸を測定時にキャプチャーします。

HuDは神経細胞特異的に転写後の遺伝子制御に関与し、RNAのAUリッチな配列に結合します。Huファミリーに保存された3つのRNA認識モチーフ(RRM)のうち2つが結合に必要とされていましたが、実際にはすべて重要であると示されました(図2)。

Mutations of HuD	K_D	k_a	k_d
wt	wt	wt	wt
1, 2, 3 (all present)	wt	wt	wt
1, 2 (3 absent)	↓ 2000 x	↓ 20 x	↑ 100 x
1, 3 (2 absent)	↓ 13.5 x	↑ 2.5 x	↑ 35 x
2, 3 (1 absent)	↓ 3.5 x	↑ 4 x	↑ 14 x

図2 HuD/RNA結合のRRM削除が結合Kineticsに及ぼす影響

U1AはU1 small nuclear ribonucleoprotein RNA (U1hplI)に結合するスプライオソームで、2つのRRM型ドメインを持ちます。野生型U1AとU1hplIはpM単位の親和性で結合することが示されました。また、RNA結合ポケットのリジン残基をアラニンに置換することで親和性が低下することが確認され、リ

ジンが重要な役割を果たすことが示されました(表1)。

表1 U1Aのリジンからアラニンへの置換がU1hplIの結合Kineticsに及ぼす影響

Protein	K_D	k_a	k_d
wt U1A	32 pM	1.1×10^7	3.6×10^{-4}
Lys20,22Ala	↓ 39 x	↓ 9.8 x	↑ 3.9 x
Lys50Ala	↓ 16 x	↓ 10 x	↑ 1.5 x

U1Aの正に荷電したリジンがU1hplIとの相互作用に重要と考えられます。ランニングバッファーの塩濃度を150 mM NaClから500 mM NaClに上げたところ親和性の低下が確認され、リジン残基の静電的相互作用が関与すると考えられました。

表2 野生型および変異型U1Aにおける塩濃度が結合Kineticsに及ぼす影響
 ランニングバッファーの塩濃度を150 mM NaClから500 mM NaClに上げました。

Protein	K_D	k_a	k_d
wt U1A	↓ 132 x	↓ 59 x	↑ 2.2 x
Lys20,22Ala	↓ 108 x	↓ 14 x	↑ 7.6 x
Lys50Ala	↓ 136 x	↓ 19 x	↑ 7.3 x

結晶構造解析によりU1AのPhe56残基がRNAループとスタックすることが確認されました。U1AのPhe56Ala変異体を作成したところ、親和性が6600倍低下し、この劇的な変化は特に k_d に由来するものであることが分かりました。

表3 U1A/U1hplI複合体のRNA結合部位における変異が結合Kineticsに及ぼす影響

Mutation	K_D	k_a	k_d
Phe56Ala	↓ 6600 x	↓ 4.7 x	↑ 1400 x
U1hplI G4C	↓ 8700 x	↓ 3.5 x	↑ 2500 x

以上の結果から、U1Aとその標的RNAとの相互作用は2段階のメカニズムで起こることが示されました。はじめのステップはRRM型ドメインのリジン残基による静電的相互作用がはたされ、続いて、フェニルアラニン残基の水素結合と芳香族スタッキングによって安定した複合体を形成する「ルアー&ロック」モデルが提唱されました。

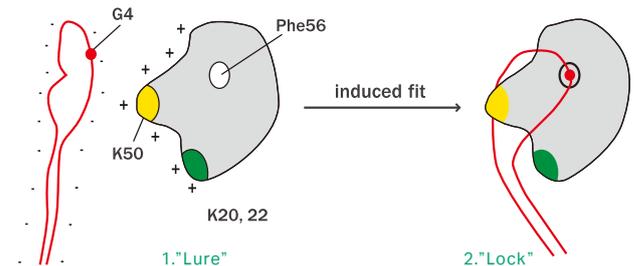


図3 U1AとU1hplI RNAの結合に関する2段階の「ルアー&ロック」モデル

複合体評価のアプリケーション例

Investigating complex molecular interactions using novel SPR analysis approaches

オランダがんセンターとの共同研究による、DNAミスマッチ修復システムの複雑な相互作用測定を行った事例です。Biacore™ 1 seriesで新たに搭載された様々なインジェクション方法を活用して、複雑な結合様式を評価しました。Biacore™では、通常サンプルをインジェクションするとその後ランニングバッファーに切り替わります。複数のサンプルを連続的にインジェクションしたい場合、図1の手法が選択できます。

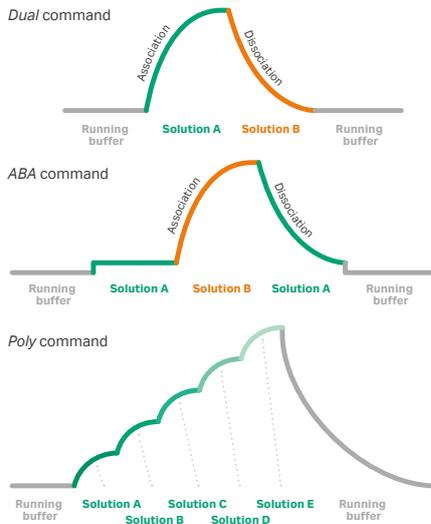


図1 Biacore™ 1 seriesにおける各種インジェクション方法
 溶液A、B、…とバッファーを挟むことなく連続でインジェクションできます。使用例は以下の通り。
Dual pH依存性など解離条件を比較する場合。主に解離速度の評価。
ABA バッファー条件検討、アロステリックな反応など。フィッティング解析が可能。
Poly 4種類以上の分子による複合体形成の評価。

図2に示すDNAミスマッチの修復プロセスに関与する各分子の結合順序や容量依存性について評価を行いました。

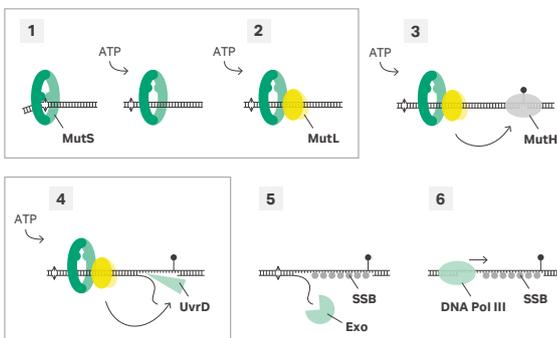


図2 DNAミスマッチにおける修復工程
1 MutSの結合とATP依存的なクランプ形成、**2** MutSによるMutLのリクルート、**3** MutHによるニクの導入、**4** MutLが helicase UvrDをリクルートして二本鎖を開裂、**5** exonucleaseによるミスマッチの分解、**6** DNA pol IIIによるギャップの修復。

はじめに、Biotin修飾DNAリガンドをSensor Chip SAに固定化し、MutSとの相互作用とATPの影響を評価しました。Dual commandにより、解離相にATP濃度系列を設定したところ

濃度依存的に解離が速くなることが確認されました(図3)。

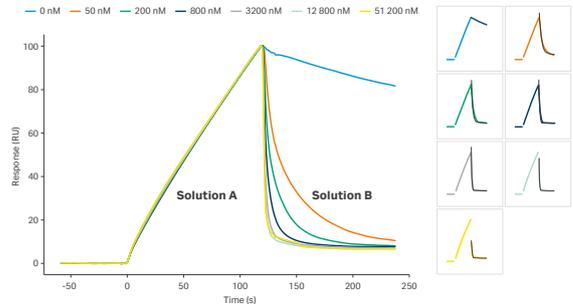


図3 Dual Commandを用いた、解離速度におけるATPの影響評価
Solution A MutS、**Solution B** ATP。

次に、MutS存在下でのMutLの結合を評価しました。ABA commandにより、1 mM ATPを含むランニングバッファーを用いてもMutSの解離の影響なくMutLの相互作用が評価できました(図4)。

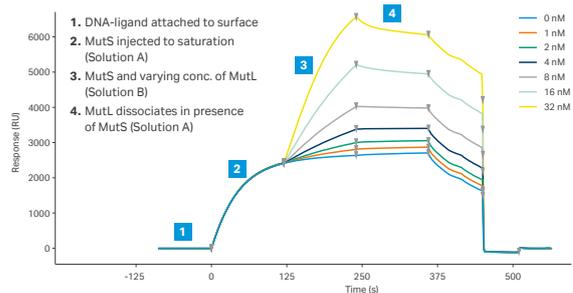


図4 ABA Commandを用いた、MutS存在下でのMutL相互作用測定
1 DNAが固定化されたベースライン、**2** MutSを飽和するまで添加 (Solution A)、**3** MutS存在下での各濃度のMutL (Solution B)、**4** MutS存在下でのMutL解離相 (Solution A)。

最後に、DNAミスマッチ修復に関与するMutS、MutL、UvrDの複合体形成を、Poly commandにより評価しました(図5)。

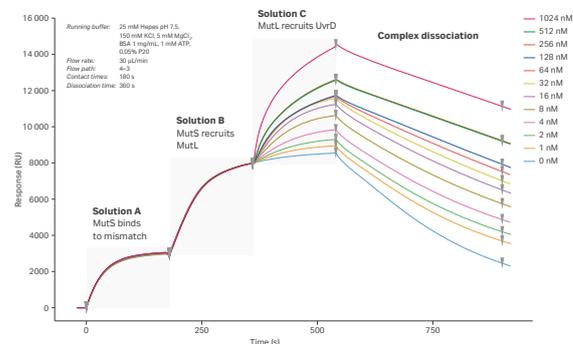


図5 Poly Commandを用いた、ミスマッチDNA、MutS、MutL、UvrDの複合体形成試験
 Sensor Chip SAにミスマッチを含むDNAを固定化、1 mM ATPを含むランニングバッファーで測定。**Solution A** MutS、**Solution B** MutS + MutL、**Solution C** MutS + MutL + 各濃度のUvrD

Dual、ABA、Poly Commandを用いた新しい解析アプローチで、より高度な分析ニーズに応えることができます。

そのほかのアプリケーション

Affinity/Kinetics解析を実施する以外にもBiacore™は様々な用途で活躍します。ダイジェストでお届けします。

Binding level screen

標的ベースの創薬スクリーニングを実施する場合、標的タンパク質に対して、数百～数千という化合物ライブラリ、また、ハイブリドーマ培養上清などの結合レスポンスを評価します。図1のようなフラグメント化合物の場合、結合レスポンスのプロットだけでなくセンサーグラム形状の分類を行い、閾値以上のレスポンスが得られ、かつ典型的な結合を示すものをヒットとして選抜します。また、分子量により補正する、定期的にポジコンを測定することでタンパク質活性の減衰を補正するなど、各種補正機能を用いることでより公平に多サンプルが評価できます。

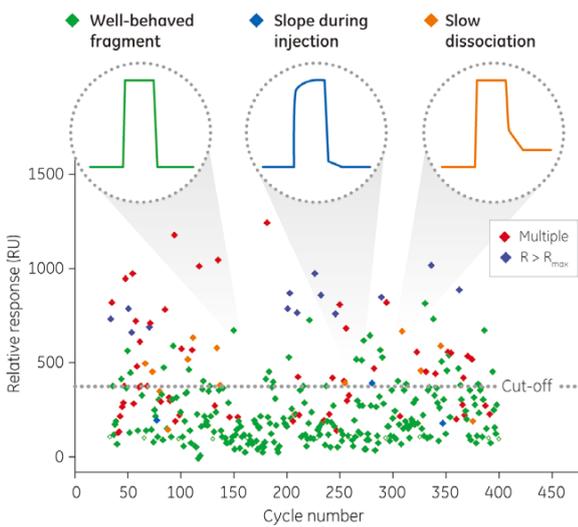


図1 化合物フラグメントのBinding level screen

Epitope Binning

モノクローナル抗体の評価において認識するエピトープの多様性を迅速に評価します。Epitope Binningの代表的な3つのフォーマットが用意されており(図2)、大規模なマトリクスデータにおいてデータをビジュアル化し、効率よく評価を行うことができます(図3)。

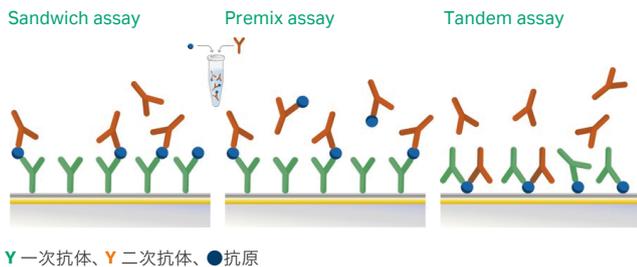
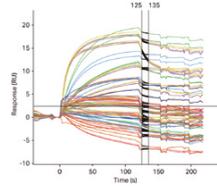
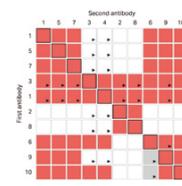


図2 Biacore™で実施できる3種類のアッセイフォーマット

Sensorgram overlay



heat map



binning wheel



図3 大規模なEpitope Binningマトリクスデータの可視化

(結合活性) 濃度定量

Bradford法による吸光度を指標にした濃度定量は総タンパク質の定量ですが、Biacore™を用いて標的タンパク質に対して標品およびサンプルを流して濃度定量を行うことで、結合活性濃度定量を行うことが可能となります(図4)。Kinetics/Affinity解析を行う前にも、本法でアナライツタンパク質を定量することで、よりデータの信頼性が向上します。

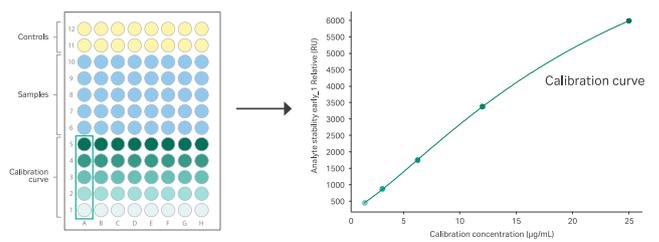


図4 結合活性濃度定量

EC₅₀/PLA解析

医薬品の同等性評価などでは、EC₅₀、Parallel line analysis (PLA) 解析が実施されます。EC₅₀解析では、Y軸を結合レスポンス、X軸をアナライツ濃度(対数)としたプロットにFour parameter fittingを行い、50%効果濃度を評価します。PLA解析では同様のプロットの直線的な部分に関してLinear fittingを行い、slopeを評価します。

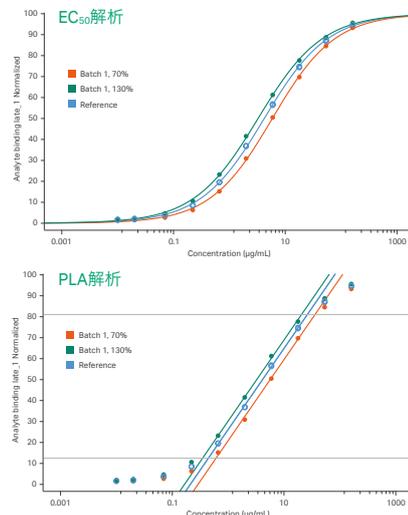


図5 EC₅₀/PLA解析

Biacore™ サポート情報

Biacore™を安心してとことん使いこなしていただくため、様々なサポートを用意しています。

Biacore™ コンシェルジュ

Biacore™をとことん使いこなすための新鮮な情報を、メールで毎月お届けいたします。ぜひ登録ください。

イベント・製品アップデート情報はもちろん、ここだけでしか見られないBiacore™で結果を出すために役立つ本質的な理解を助けるTipsやこんな使い方もあるんだ! というアプリケーション紹介など盛りだくさんです。



Biacore™ コンシェルジュで登録と一部公開記事はこちら。



Biacore™ ポータル

Biacore™に関する各種公開情報へアクセスするためのポータルサイトです。製品情報、製品マニュアル（日本語）、FAQ、ソフトウェアダウンロード、そのほか様々な情報へアクセスできます。

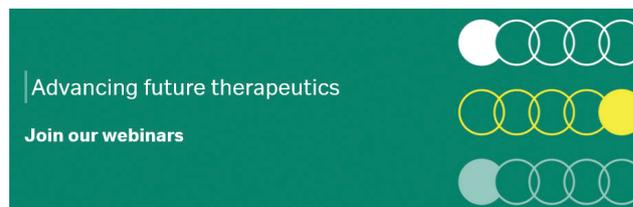


Biacore™ ポータルへのアクセスはこちら。



Cytiva Webinar

Cytivaの様々な製品や技術に関して、主に国内スタッフが不定期でウェビナーを開催しています。開催済みのウェビナーはオンデマンドでご覧いただけます。現在Biacore™に関して17コンテンツが公開されています。



私たちの世界が変化しても、画像診断、細胞およびタンパク質発現研究のソリューションパートナーとして専門知識を共有し、ワクチン、生物製剤、細胞治療の大規模製造のための実現技術を提供することに専念し続けます。
ぜひ以下のCytiva Webinarにご参加ください。
お申し込みは下記 Register あるいは Watch on-demandからお申し込みください。

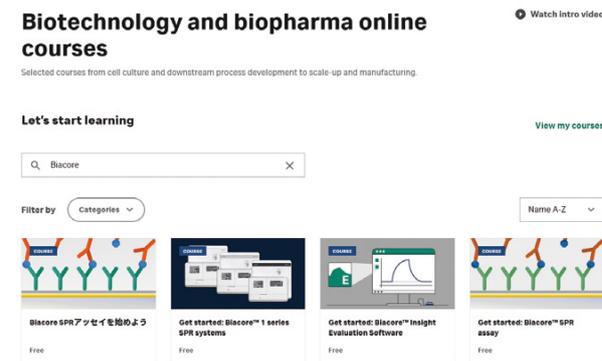


Cytiva Webinarへのアクセスはこちら。



Biotechnology and biopharma online courses

Cytivaの様々な製品や技術に関してオンラインで学習できるコースです。CategoriesでSurface plasmon resonanceを選択すると、現在Biacore™に関して7コースがあります。



オンラインコースへのアクセスはこちら。



バイオダイレクトライン

Biacore™を活用いただく上の、個別のご相談に関してはお気軽に弊社までお問合せください。専門のスタッフが皆様の研究活動をバックアップしています。お問合せ先は裏表紙をご確認ください。

総合お問合せ窓口

TEL : 03-5331-9336

(営業日の 9:00 ~ 12:00、13:00 ~ 17:30)

機器アフターサービス (音声案内にしたがい①を選択)

製品技術情報に関して (音声案内にしたがい②を選択)

e-mail : Tech-JP@cytiva.com (常時受付)

納期/在庫お問合せ (音声案内にしたがい③を選択)

注) お問合せに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。
注) アナログ回線等で番号選択ができない場合はそのままお待ちください。オペレーターにつながります。

www.cytivalifesciences.co.jp

論文に掲載いただく際の名称・所在地
Cytiva
Tokyo, Japan

Cytiva and the Drop logo are trademarks of Life Sciences IP Holdings Corp. or an affiliate doing business as Cytiva.
Biacore is a trademark of Global Life Sciences Solutions USA LLC or an affiliate doing business as Cytiva.
Humira® is a registered trademark of AbbVie, Inc.

©2023 Cytiva.

掲載されている内容および価格は2023年10月現在のものです。価格は希望小売価格(消費税は含まれておりません)であり、単なる参考価格のため、弊社販売代理店が自主的に設定する販売価格を何ら拘束するものではありません。掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問合せに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。

Cytiva(サイティバ)

グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社
〒169-0073

東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルヂング

お問合せ：バイオダイレクトライン

TEL : 03-5331-9336

e-mail : Tech-JP@cytiva.com



www.cytivalifesciences.co.jp

71-4037-01

23.10.10 (EP)