

APPLICATION SHEET

『“KD 計算シート QK” を用いた親和定数の算出』

九州計測器株式会社 ケミカルセンシンググループ

http://www.qk-net.co.jp/RANA_Site/top-r.html

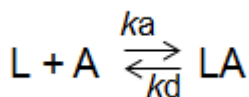
【本社】福岡県福岡市博多区山王一丁目 6-18

TEL:092-441-3200 FAX:092-441-3264

1. はじめに

表面プラズモン共鳴センサから得られたセンサグラムを解析することによりリガンドとアナライトの結合速度 (k_a)、解離速度 (k_d)、親和定数 (KD) を算出することができる。ここでは、弊社の APPLICATION SHEET「 β ラクトグロブリンとその抗体の相互作用」で得たデータからエクセルシート「KD 計算シート QK」を用いて解析を行った例を紹介する。「KD 計算シート QK」では、リガンドとアナライトの 1 対 1 の特異的な結合モデルに基づいた親和定数の計算を行うことができる。なお、計算方法の理論的な基盤については成書¹⁾を参考にした。

2. 相互作用解析の基礎



あるリガンド (L) とアナライト (A) が 1 対 1 の特異的な結合をする場合、速度論的反応式は下式となる。

式 1 (k_a は結合速度、 k_d は解離速度)

この式から、ある時間 t におけるフリーのリガンド濃度 $[L]_t$ とアナライト濃度 $[A]_t$ 、およびその結合体の濃度 $[LA]_t$ の関係は次式のとおりとなる。

$$d[LA]/dt = k_a [L]_t [A]_t - k_d [LA]_t \quad \text{式 2}$$

SPR センサにおいては $[LA]_t$ は共鳴角の変化量 (RU) に置き換え可能である。また、常アナライト溶液が供給されている状況下ではアナライト濃度 $[A]_t$ は常にサンプルとして用意した濃度 (C) とみなすことができる。サンプルインジェクションがバッチ式の場合はアナライトがリガンドに結合するとその分アナライト濃度が減少するが、リガンドは 2 次元的に固定化されておりアナライトに比べるとごく微量なため、アナライト濃度を一定とみなせる場合が多い。リガンド濃度は測定できないが、すべてのリガンドにアナライトが結合した時の RU 値 ($RU_{\max}$) をリガンドの初濃度と仮定することができる。すると、近似的に下式が成立する。

$$dRU/dt = k_a (RU_{\max} - RU) C - k_d RU \quad \text{式 3}$$

これを変形して、

$$dRU/dt = ka RU_{\max} C - (ka C + kd) RU \quad \text{式 4}$$

$ka RU_{\max} C$ と $ka C + kd$ は特定の相互作用測定においては定数となるので、それぞれ a , b とすると

$$dRU/dt = a - b RU \quad \text{式 5}$$

dRU/dt はある時間 t におけるセンサグラムの傾きなので、この傾きとその時の RU 値をプロットすることで直線回帰により a , b を算出することができる。また、

$$b = ka C + kd \quad \text{式 6}$$

と定義したので、アナライト濃度の異なる複数のサンプルについて C と b をプロットするとその傾きが ka 、切片が kd となる。親和定数 KD は kd/ka である。ここで得た ka , kd を下式に代入することで ($RU_{\max}$) も得られる。

$$a = ka RU_{\max} C \quad \text{式 7}$$

3. シートをもちいた親和定数の算出手順

3.1 データの準備

3.1.1 必要なデータについて

親和定数の計算には、原理的に、アナライトの正確なモル濃度が判明している 3 セット以上のセンサグラムデータが必要である。また、Buffer 効果や非特異的吸着の影響の除去のために、リガンドを固定していないリファレンス用の ch を用意し、それぞれのアナライトサンプルについて、リファレンス ch に対するセンサグラムを取得しておく必要がある。計算に際しては、事実上の標準機であるピアコア社製の SPR センサで得られるデータとの互換性を保持するため、データは RU 値としておくことが望ましい。 RU 値は SPR センサで得られる共鳴角の変化を単純に 10000 倍したものである。

3.1.2 Buffer 効果や非特異的吸着の影響の除去

アナライトのリガンド以外のセンサ表面に対する非特異的吸着や、アナライト溶液を調製する際のちょっとした Buffer 濃度の違いによる影響をセンサグラムから除去するために、まず、各サンプルのリガンドを固定化した ch に対するセンサグラムからリファレンス ch に対するセンサグラムを引き算しておく。

3.1.3 データの整形

1 列目に時間を 2 列目以降にサンプル濃度ごとに 3.1.2 で用意した引き算済みの RU 値を並べたデータを用意し、サンプルインジェクト直前の適当な時間における RU 値を基準として 0 点調整しておく。ベースラインの RU 値が 0 付近でないと正しく親和定数の計算をすることはできない。

3.2 親和定数の算出

3.2.1 整形したデータのシートへの入力

「KD 計算シート QK」を開き「Input」シートの C10~I1010 の範囲にデータをコピー＆ペースト（値のみ貼り付け）する。7 行目に各サンプルの濃度を入れ、8 行目でドロップダウンリストから濃度単位を選択する。

グラフを見ながら親和定数計算に用いる各サンプルの結合領域（Association phase）の範囲および解離領域（Dissociation phase）の範囲を 3 行目から 6 行目の範囲に入力する。最初はだいたいの値を入れておいて 3.2.2 以降の手順でプロットを見ながら修正していく。（範囲は時間ではなく B 列の No. を入力する）「β ラクトグロブリンとその抗体の相互作用」で得たデータを入力し、結合領域を No.205 から 400、解離領域を No.450 から 600 とした状態を図 1 に示した。選んだ領域範囲については計算された速度定数などを基に得られた理論値が黒の破線で示されている。

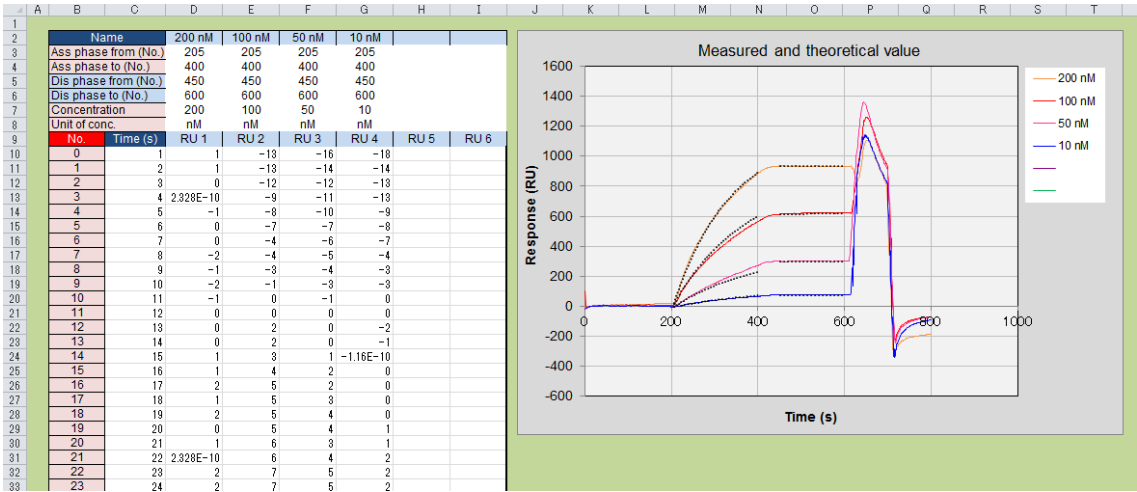


図 1 データ入力例

弊社の APPLICATION SHEET「β ラクトグロブリンとその抗体の相互作用」で得たデータを入力し、結合領域を No.205 から 400、解離領域を No.450 から 600 とした状態。

3.2.2 結合相におけるデータの選択

ここで「Association」シートに移動すると、各サンプルのデータについて、式 5 で示さ

れている RU 値とその時の傾きのプロットおよびその回帰直線（結合領域として指定した範囲）が表示されている（図 2A）。このプロットは山型となっているが、左側の上昇している部分は mass transport limitation（アナライトの拡散が結合に追いつかず、リガンド周辺のアナライト濃度が低い状態）などの影響を受けており、親和定数の計算には不適当なため、取り除く必要がある。そこで結合領域の開始指定を No.205 から 220 に変更した。また図の右の方では傾きが緩やかになっているが、これはバッチ式測定のためにアナライト濃度が実質下がっているものと考えられる。そこで結合領域の終了指定を No.400 から 300 に変更した。変更後のプロットを図 2B に示す。結合領域の範囲指定は計算結果に大きく影響するため、それぞれの測定ごとに総合的に判断する必要がある。

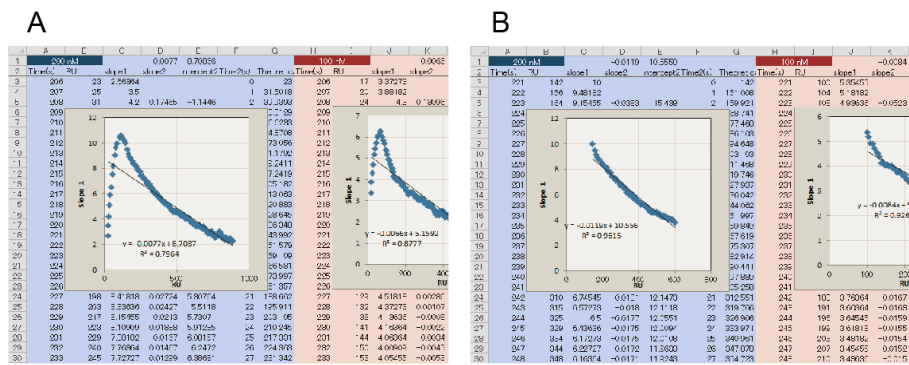


図 2 結合領域の範囲指定とその影響

結合領域を No.205 から 400 とした場合（A）と No.220 から 300 とした場合（B）の RU 値の傾き vs RU 値のプロット。

3.2.3 解離領域におけるデータの選択

解離領域においてはアナライト濃度（C）が 0 であり、式 3 に代入すると下記となる。

$$dRU/dt = -kd RU$$

この式から、解離領域では「RU 値の傾き vs RU 値」のプロットは原点を通る直線となり、その傾きが $-kd$ となることがわかる。理想的にはマイナス座標に均等に分散したプロットとなるが、「Dissociation」シートに示されたプロットに偏りなどが見られる場合は解離領域の範囲を修正する必要がある。本データの場合は RU 値の減少があまり見られず、x 軸周辺で均等に分布したプロットが得られた（図 3）。

kd は結合領域と解離領域から別々に算出されるが、「KD 計算シート QK」では結合領域から得られる kd を最終的な値として「Print」シート表示し、解離領域から得られる kd は、解離領域における理論値を計算するのにのみ用いている。

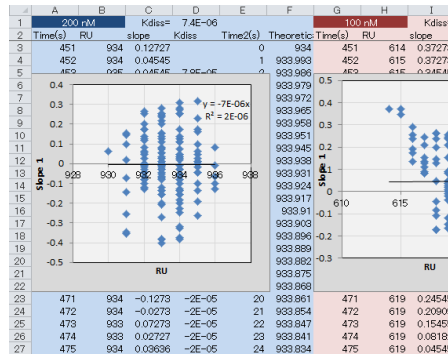


図3 解離領域における範囲指定を No.450 から 600 とした場合の RU 値の傾き vs RU 値のプロット

3.2.4 不適切なサンプルセットの除去

「Selection」シートでは、上記の「結合相におけるデータの選択」で得た傾きとその時のサンプル濃度のプロットおよび直線回帰線を示している（図 4A）。使用していない列を除外するために G 列と H 列では 2 行目の「Adoption (y/n)」で「n」を入力しておく。このプロットは式 6 に相当し、 k_d , k_a とも正の値であることから、理論的には回帰直線は正の切片を持つ右上がりの直線となる。予想される回帰直線から大きく外れたプロットは実験上何らかの不備があったと考えられ、正しい結果を得るためには再実験が必要である。参考値として異常値を除いた結果を見たい場合には同様に 2 行目の「Adoption (y/n)」で「n」を入力することができる。ここでは 10 nM のデータが他データから予想されるプロットとかなり離れており、これを使用しない場合の計算を行ってみた（図 4B）。10 nM のデータを除くことにより相関係数が 0.555 から 0.985 に改善された。

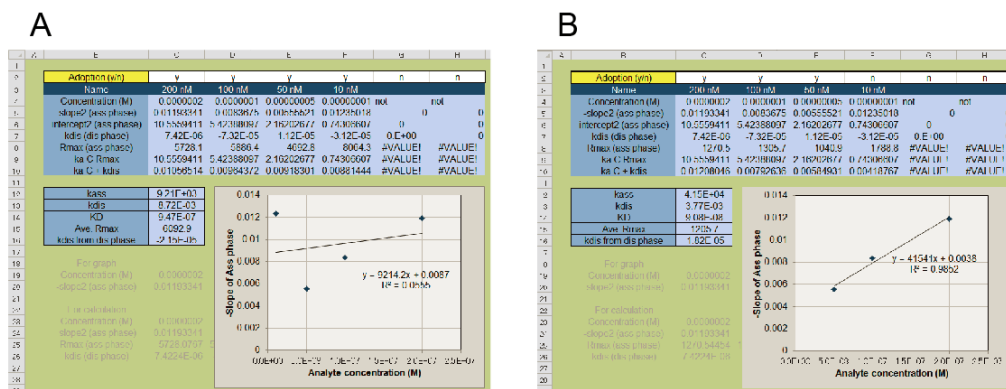


図4 結合領域における傾きとアナライト濃度のプロット

使用していないうしろ 2 列 (G, H) のみを除いた場合 (A) と予想される回帰線から大きく外れる 10 nM のデータ (F 列) を参考までに除いた場合 (B)。

3.2.5 結果の表示・印刷

最終的に必要な KD , k_a , k_d の計算値は「Print」シートに示される。また同じシートに測定値（実線）と理論値（破線）のグラフと測定値と理論値の差のプロットが表示される。また、Date, Ligand, Analyte, Buffer, MEMO の欄に必要事項を入力することができる。グラフ軸スケールなどは「自動」に設定されているので、必要に応じて適当に変更することができる。

4. 参考文献

- 1) タンパク質の分子間相互作用実験法、竹縄忠臣 渡辺俊樹 編、羊土社、1996 年