

表面プラズモン共鳴(SPR)を用いたタンパク結合能測定法

医薬事業本部 バイオ技術センター 岡嶋 孝太郎 / 黒田 幸弘*

1 はじめに

薬物が生体へ投与されて血中へ移行すると、多くの場合、血漿タンパクと可逆的に結合して存在する。血漿タンパクと結合している薬物は血管壁を透過することができず、非結合薬物のみが組織へ移行して薬効を示す。このことから、血中の薬物総濃度ではなく非結合型薬物濃度の方が薬理効果との相関性が高いと考えられるため、薬物投与による生体のレスポンスを正しく見積もるためには非結合型濃度で議論することが重要である。タンパク結合能は化合物によって異なり、薬物動態を評価する上で重要な因子の1つとして認識されている。

さて、医薬品開発では一般的に開発ステージが進むほど開発費用が必要となり、開発後期における医薬品候補化合物のドロップアウトは製薬企業にとって非常に大きな痛手となる。従って、上市される望みの薄い候補薬物をできるだけ初期の段階で排除しておくことが重要となる。そのため創薬初期の段階でタンパク結合能など薬物動態に関わる特性を評価することが重要であるが、評価対象化合物の数が膨大であることから、迅速かつ効率よくスクリーニングできる評価法が必要となる。タンパク結合能のハイスループットスクリーニング法としては、マイクロウェルプレートを用いた限外ろ過法¹⁾や平衡透析法²⁾、液体クロマトグラフ法³⁾、表面プラズモン共鳴(surface plasmon resonance, SPR)法⁴⁾が知られており、一度に多くの化合物数を簡便に測定できるようになってきた。

今回、我々はSPR装置の中で高感度であり広く利用されているピアコアT100を用いて、タンパク結合能を高速でスクリーニングする技術を確立した。

2 SPR法の利点

SPR法を用いてタンパク結合能評価を行う場合の利点としては、次の3つが挙げられる。単離されたタンパクに対する結合を評価するため、血漿などを用いる場合と異なり、抽出作業など煩雑な前処理を必要としない、SPRではセンサーチップ表面に評価化合物が結合して重くなるほど高いレスポンスが得られる。そのため、タンパク結合率が高いほど検出感度が向上する、分析所要時間はタンパクの結合率に依存せず、極めて短時間である。

3 測定手順

一般的に酸性の薬物は血漿中での存在割合が最も高いヒト血清アルブミン(HSA)に、塩基性の薬物は、 γ -酸性糖タンパク(AGP)に結合することが知られている。従って、固定化するタンパクは目的の化合物の物性情報等から結合することが予測されるものを用いる。予測が困難な場合には結合する可能性のあるタンパクを固定化し、それぞれに対する結合能を評価してもよい。本法は処理速度に優れるのみならず、以下に述べるように1回の試料注入で複数のタンパクに対する結合能の同時評価が可能であるため測定時間はかわらない。

タンパクのセンサーチップへの固定化

測定試料の添加

解析

スキーム1 SPRを用いた測定の流れ

SPR測定の流れをスキーム1に示す。まず評価するタンパクをセンサーチップに化学的に固定化する。次に測定試料を添加してレスポンス値を取得し、最後に解析を行う。以下、それぞれのステップについて詳述する。

【血漿タンパクのセンサーチップへの固定化】

ピアコアT100用のセンサーチップは4つのフローセルで構成されており、それぞれのフローセルに異なるタンパクを固定化して測定することが可能である。また、2つあるいは4つのフローセルに同時に試料を添加して測定することも可能である。タンパク結合能評価ではCM5とよばれる金薄膜の表面がカルボキシメチルデキストランで覆われたセンサーチップを用い、評価したい血漿タンパクを固定化する。

HSAの場合にはアミンカップリング法、AGPの場合には表面チオールカップリング法を標準的に採用し、センサーチップに化学結合させる。

アミンカップリング法とはセンサーチップ上のカルボキシル基をN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)と1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)でスクシンイミジルエステルに変換して活性化しておき、そこへタンパクを添加することで、タンパク中のアミノ基と共有結合させ

る固定化法である。未反応のスクシンイミジルエステルはエタノールアミンを添加することで不活性化させる。

表面チオールカップリング法とはセンサーチップ上にスパーサーを経てチオール基を導入しておき、そこに活性化したタンパクを添加して共有結合させる方法である。具体的には次の手順で行う。まず、タンパク中のカルボキシル基をEDC存在下で2-(2-ピリジニルジチオ)エチルアミンと反応させ、活性なS-S結合を持つ誘導体へと変換しておく。次にアミンカップリングと同じ方法で活性化しておいたセンサーチップにシスタミンを添加、次いで還元することでセンサーチップ末端をチオール基へと誘導する。ここに先ほど誘導化したタンパクを添加し、ジスルフィド交換を行うことで共有結合させ固定化が完了する。

なお、評価に用いるタンパクを固定化したセルをリガンドセル、未処理のセルをリファレンスセルと称する。それぞれのタンパクの固定化量は6000 RU ~ 15000 RU程度(1000 RU = 1 ng/mm²)を目安にしている。

【測定】

測定試料は薬物を少量の有機溶媒(DMSOなど)に溶解し、ランニング緩衝液(リン酸等張緩衝液等)で希釈して調製する(有機溶媒濃度:約3~10%)。

測定試料を隣り合うリガンドセルとリファレンスセルの両方に連続的に(30秒~60秒間程度)添加し、リガンドセルで得られたレスポンスからリファレンスセルで得られたレスポンスを減算して得られる差レスポンスを測定する。薬物を溶解した有機溶媒の種類により、ランニング緩衝液に含まれる有機溶媒濃度のわずかな誤差のために差レスポンス値が大きな影響を受け

ることがある。その場合には差レスポンスを補正するための検量線を同時に作成する。具体的には複数段階濃度の有機溶媒を含有するランニング緩衝液(溶媒補正回帰式導出用試料)を測定試料と同条件で測定する。この測定で得られた差レスポンスに対し、同じくこの測定で得られたリファレンスセルのレスポンスをプロットし、適当な関数を回帰させて溶媒補正用回帰式を算出する。

【解析】

有機溶媒濃度誤差の影響がない場合には、上記測定で得られた差レスポンスそのものが薬物の結合量を反映する。

当該誤差の影響がある場合には次の手順でこれを補正する。まず実試料の測定におけるリファレンスセルのレスポンスを溶媒補正用回帰式に代入して溶媒補正ファクターを算出する。次にその溶媒補正ファクターを差レスポンスから減算することで溶媒補正したレスポンスを算出する。得られたレスポンスは、センサーチップへ結合した薬物の質量を反映している。SPR法では結合する化合物の分子量が大きいほどレスポンス値は高く現れる。通常は濃

度換算するためにさらにこの値を分子量で除した値(RU/MW値)に基づいてタンパク結合能を比較する。

タンパク結合率を推算する場合は、タンパク結合率が既知の化合物(ワルファリン、ジアゼパムなど)のRU/MW値をX軸に、タンパク結合率をY軸にプロットして回帰式を算出しておく。これに測定試料のRU/MW値を内挿することでタンパク結合率の算出が可能となる。

4 各種薬物の血漿タンパク結合率測定例

【HSAに対するタンパク結合率予測】

HSAに対するタンパク結合率予測を行うための回帰曲線を算出した例を以下に記述する。

センサーチップに約6600 RUのHSAを固定化した。7濃度のDMSO(4.0~5.6%)含有リン酸等張緩衝液を測定し、溶媒補正用回帰式を算出した。次にタンパク結合率が既知である7化合物(ワルファリン、ジアゼパム、フェノバルビタール、フェニトイン、ジギトキシン、イブプロフェン、シメチジン)を終濃度約80 μMとなるように約5%DMSO含有リン酸等張緩衝液に溶解して調製した試料を測定した

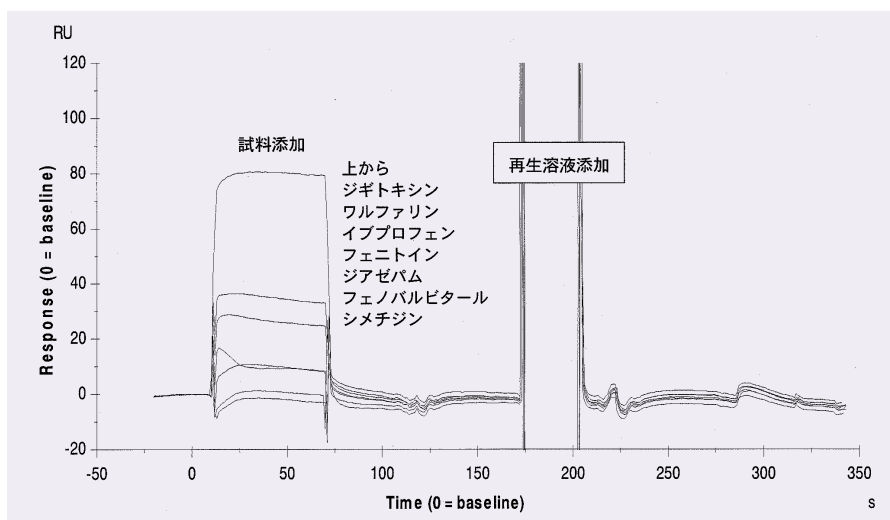


図1 各試料添加時のセンサーグラム

(図1). 溶媒補正したレスポンスを分子量で除したRU/MW値と血漿中タンパク結合率の文献値との相関を図2に示した. 結合率約30%~99.9%において良好な相関関係が認められたが, さらに精密に評価したい場合にはより狭い範囲に区分けされた検量線を作成することで対応可能である.

未知試料の場合はこの回帰式にRU/MW値を代入することで, タンパク結合率を推算することが可能である. 本測定法では1日あたり40化合物の評価が可能であるため, 例えば当社で行っているウェルプレートを用いた限外ろ過-LC/MS法の処理速度(13化合物/日)や平衡透析-LC/MS法の処理速度(6化合物/日)と比べると3~6倍のスループットがある. この点において本法は創薬初期段階にお

けるタンパク結合率測定に適した方法であると考えられる. また, 本法はAGPやヒト以外の動物種の血漿タンパクにも適用可能である. 血漿タンパク結合能は動物種間で大きく異なることは珍しくなく, 本法を用いればその影響を迅速に見積もることができる. 一例として, ラット血清アルブミンとヒト血清アルブミンに対する結合能の相関を図3に示した. 動物種差のないことが知られているいくつかの既知化合物の相関から基準線を作成しておく. もし, 候補化合物のプロットが基準線から大きく外れた場合には, タンパク結合性の種差が大きく, アニマルスケールアップ時の安全性評価等に注意を要することになる.

5 おわりに

創薬初期段階では非常に膨大な数の評価対象化合物をスクリーニングすることが要求されるため, ある程度の精度をもって迅速にタンパク結合能を評価する必要がある. 従来のタンパク結合能評価法では煩雑な作業を必要とするため, SPR法と同等のスピードで測定することは困難である

ことから, 本法はスクリーニングに最適であるといえる. 現在のところ本法の利用例は多くないが, 有用性が認識されつつあり, 今後は従来法から本法へ切り替えられるものと予想される. 当社では今までタンパク結合能評価に限外ろ過法や超遠心法, 平衡透析法, 液体クロマトグラフ法を採用しており, スクリーニングあるいは開発後期における信頼性基準対応でのデータ取得を行ってきた. 今後, 創薬初期段階におけるスクリーニング法として, 今回紹介したSPR法を加えてお客様にご提案させていただくことで, 創薬支援の内容をさらに拡充でき, より高い顧客満足を得られると思われる.

文献

- 1) Blodgett, J.; Lynch, J.; Millipore Application Note - AN1733EN00, 2003.
- 2) Kariv, I.; Cao, H.; Oldenburg, K.R. *J. Pharm. Sci.* 2001, 90(5), 580-587.
- 3) Valko, K.; Nunhuck, S.; Bevan, C.; Abraham, M.H.; Reynolds, D. P. *J. Pharm. Sci.* 2003, 92(11), 2236-2248.
- 4) Frostell-Karlsson, A.; Remaeus, A.; Roos, H.; Anderson, K.; Brog, P.; Hämläinen, M.; Karlsson, R. *J. Med. Chem.* 2000, 43, 1986-1992.

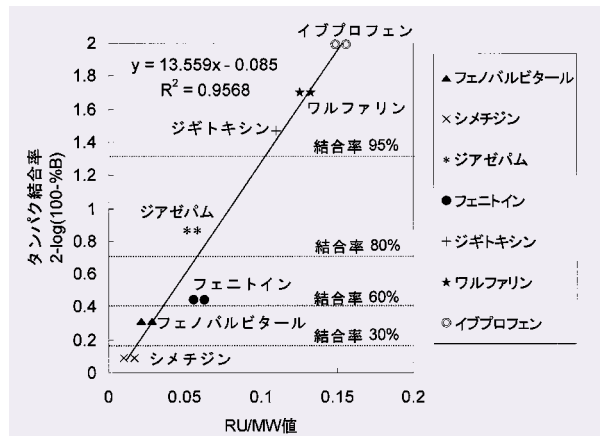


図2 HSAに対するタンパク結合率予測

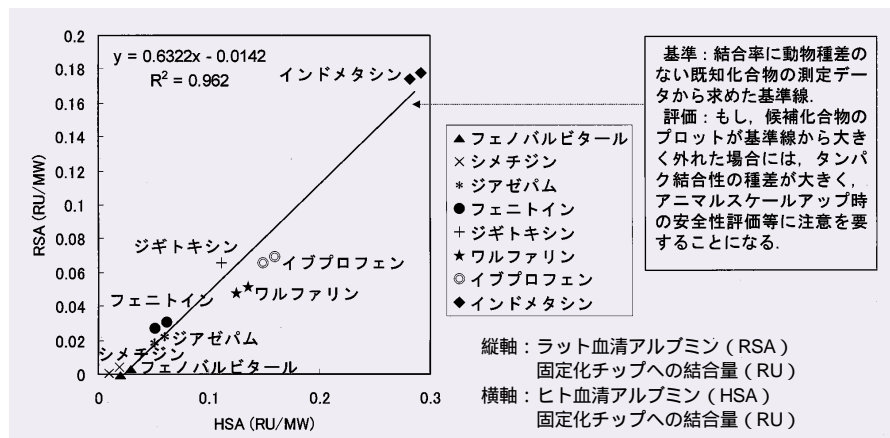


図3 アルブミンの薬物結合性の動物種差



岡嶋 孝太郎
(おかじま こうたろう)
医薬事業本部
バイオ技術センター



黒田 幸弘*
(くろだ ゆきひろ)
現 武庫川女子大学薬学部