

直接測定によるタンパク質の 結合機能診断と創薬支援

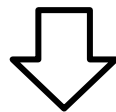
滋賀医科大学 医学部
生化学・分子生物学講座
准教授 石田 哲夫

研究背景

血漿タンパク質による診断

- (1) 病気で増減するタンパク質を定量
- (2) 生活習慣/慢性疾患による
タンパク質の機能異常を定量

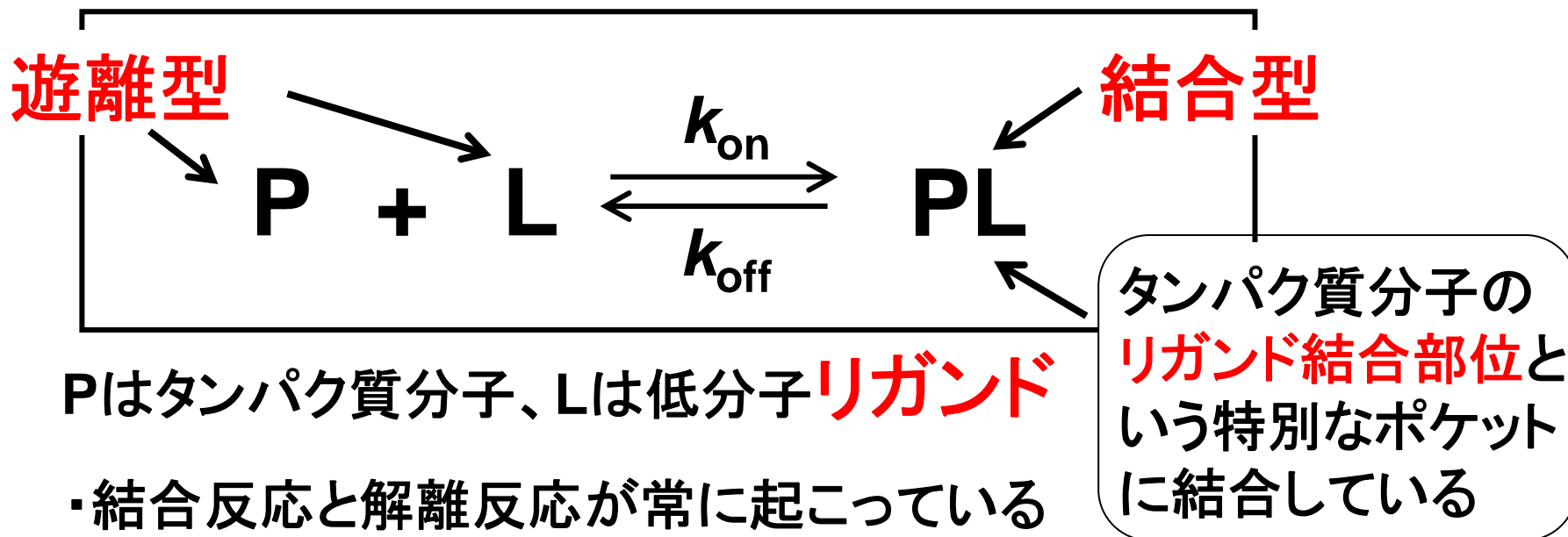
(2)のタイプの測定は未開拓



結合機能の測定法を開発する

タンパク質と低分子の結合反応

(1:1の反応例)



Pはタンパク質分子、Lは低分子リガンド

- ・結合反応と解離反応が常に起こっている
- ・両方の反応速度が等しくなると平衡状態

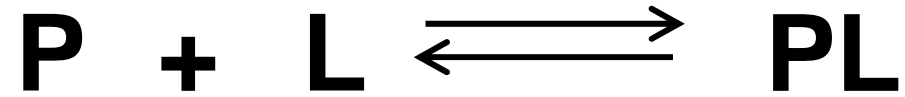
結合反応速度 = 解離反応速度

$$k_{\text{on}} [P][L] = k_{\text{off}} [PL]$$

$$K_d = [P][L] / [PL] = k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$$

平衡定数 K_d は解離定数といい、濃度の単位を持つ

結合平衡の測定



タンパク質の総濃度 $[P]_t = [P] + [PL]$

リガンドの総濃度 $[L]_t = [L] + [PL]$

・総濃度は既知

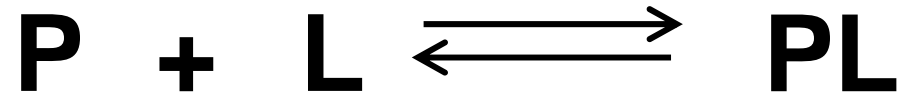
1. 結合型リガンド濃度 $[PL]$ を測定
2. 遊離型リガンド濃度 $[L]$ を測定

1か2のどちらかを測定



反応液中のすべての成分の濃度が分かる

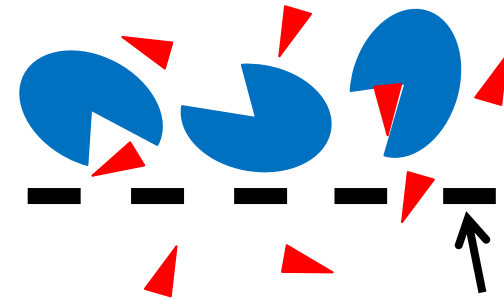
遊離型リガンド濃度の測定



遊離型リガンドだけを反応液から取り出す

従来の方法

1. 平衡透析
2. 限外ろ過



本研究の方法

フロンタルゲルろ過

(Frontal Gel Chromatography、FGC)

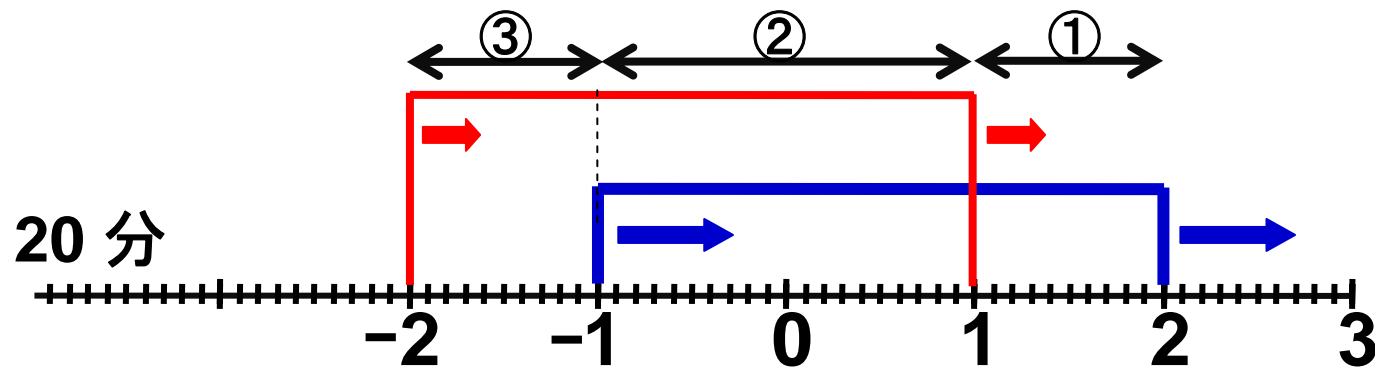
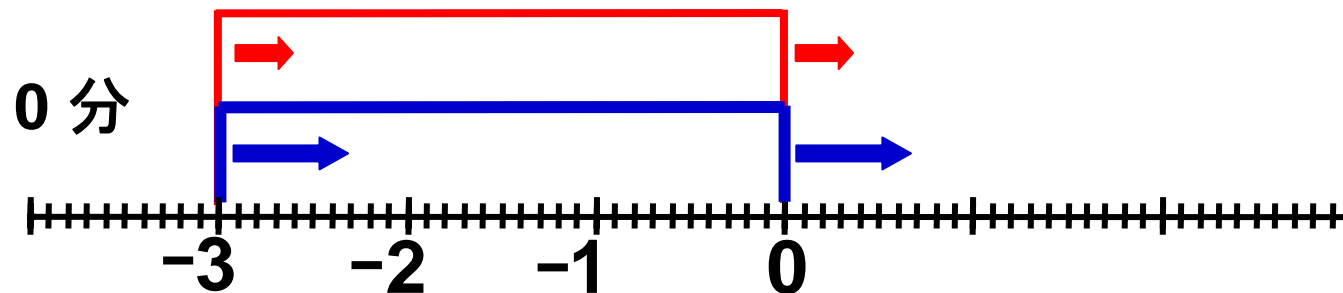
ゲルろ過カラムを用いる

フロンタル解析

カラムの中をタンパク質 がリガンドより速く進む

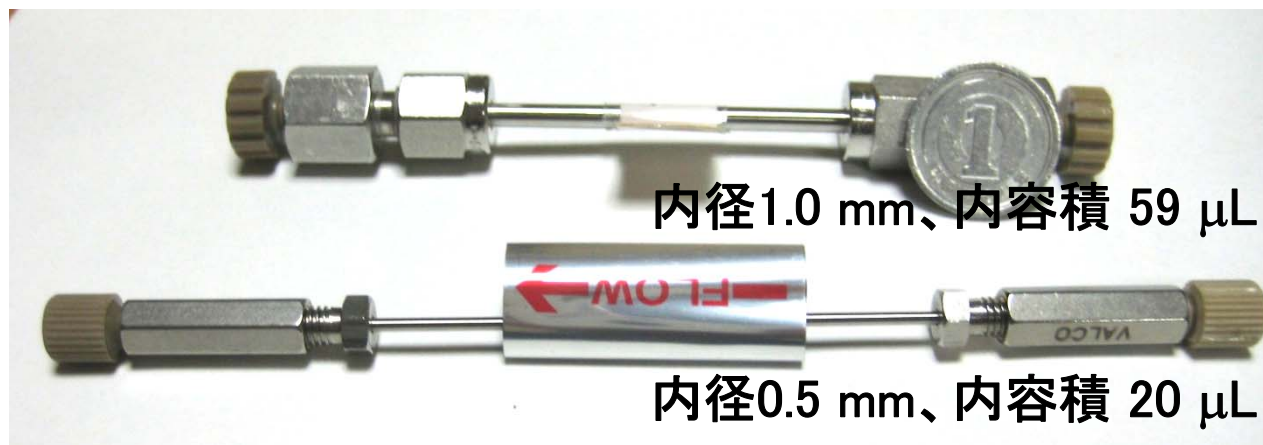


タンパク質 は1分間に0.1メモリ、リガンド は1分間に0.05メモリ進む

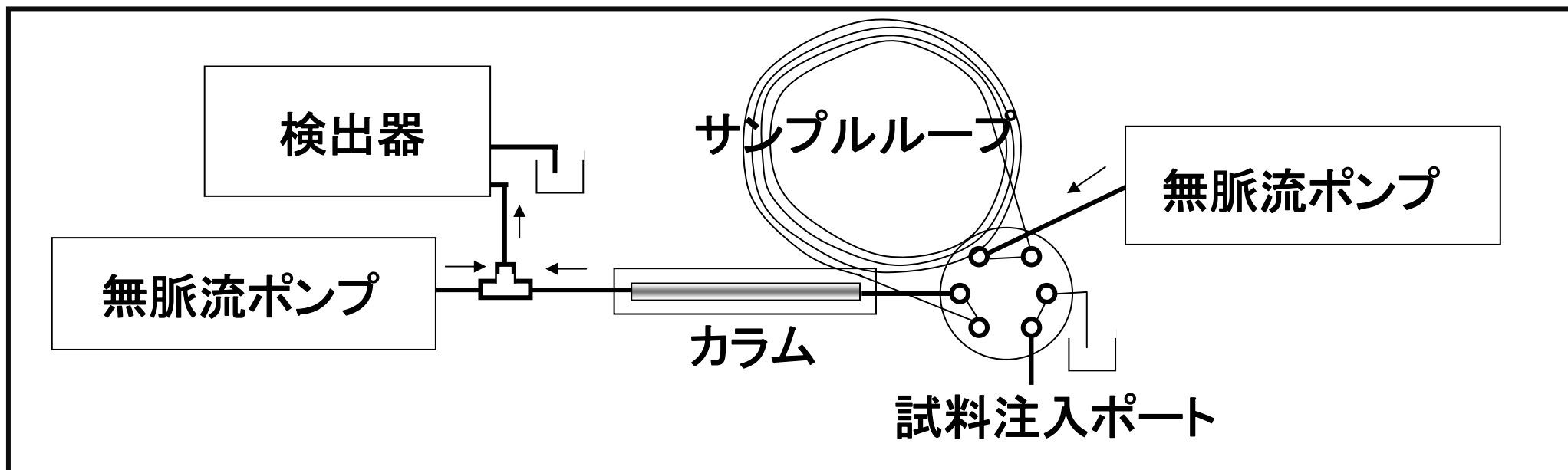


①ではタンパク質が、③ではリガンドが純粋に取り出されている

マイクロフロントルゲルクロマトグラフィー

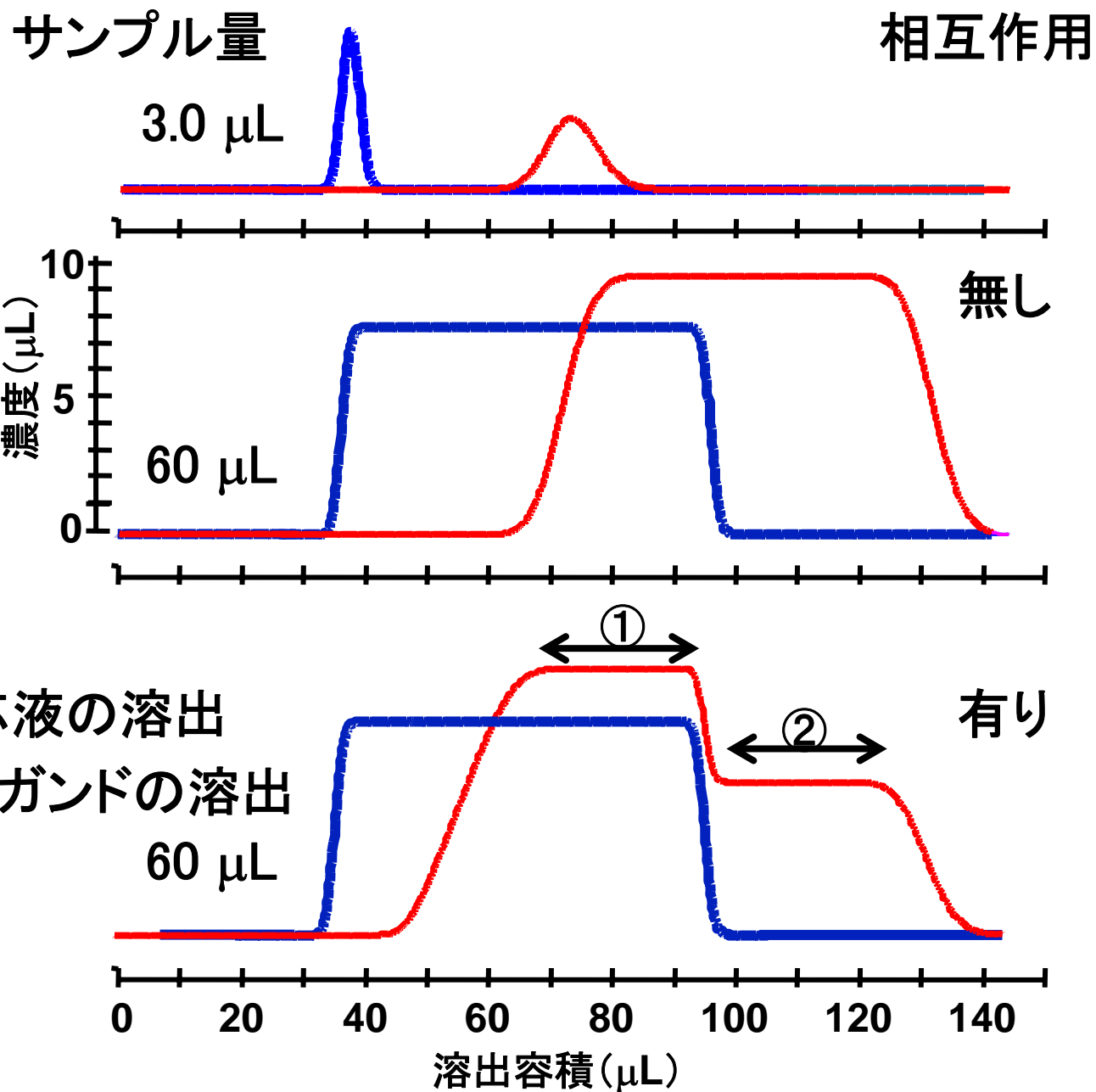


マイクロゲルろ過カラムを用いるフロントル解析

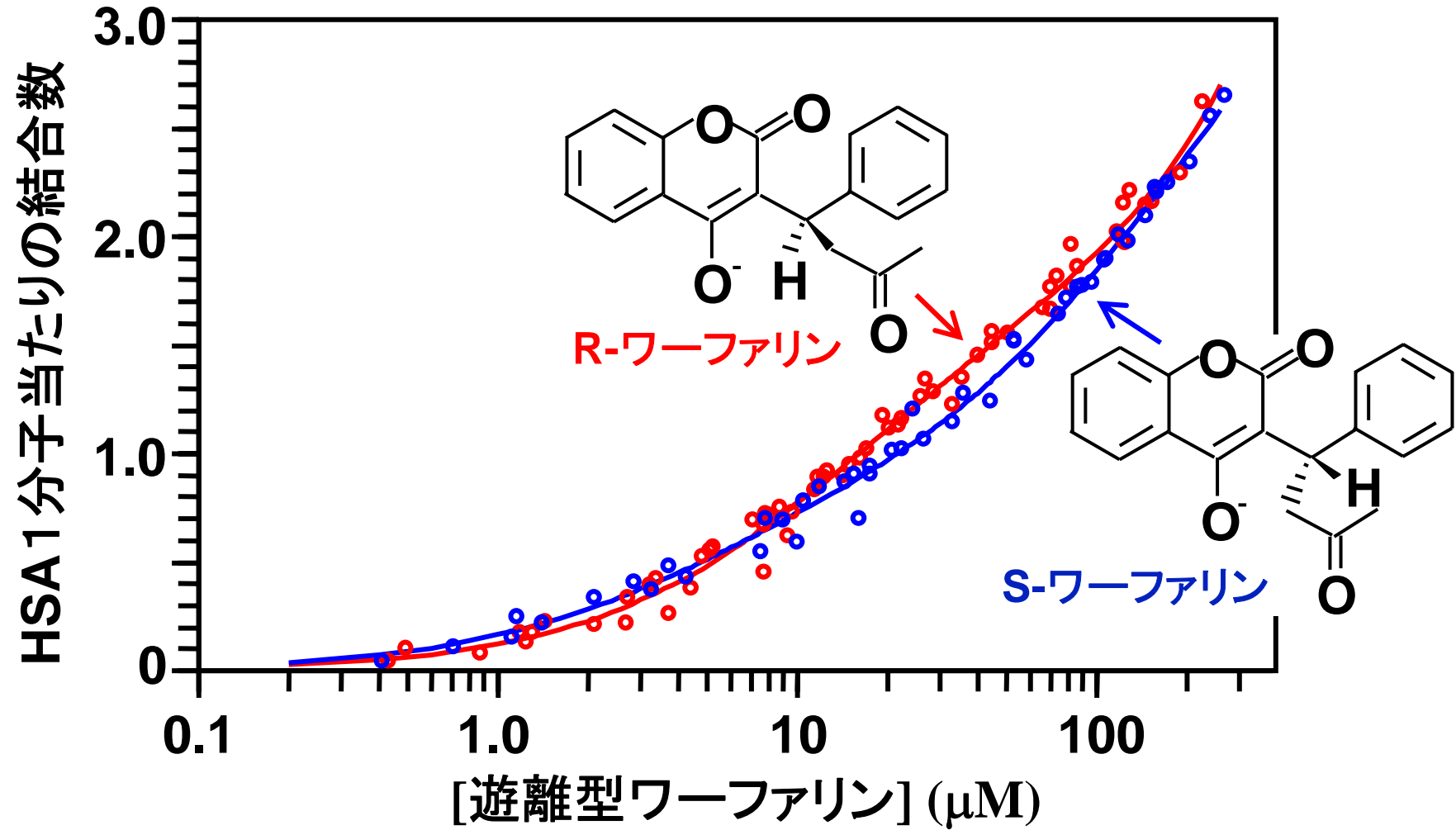


分析装置の構成

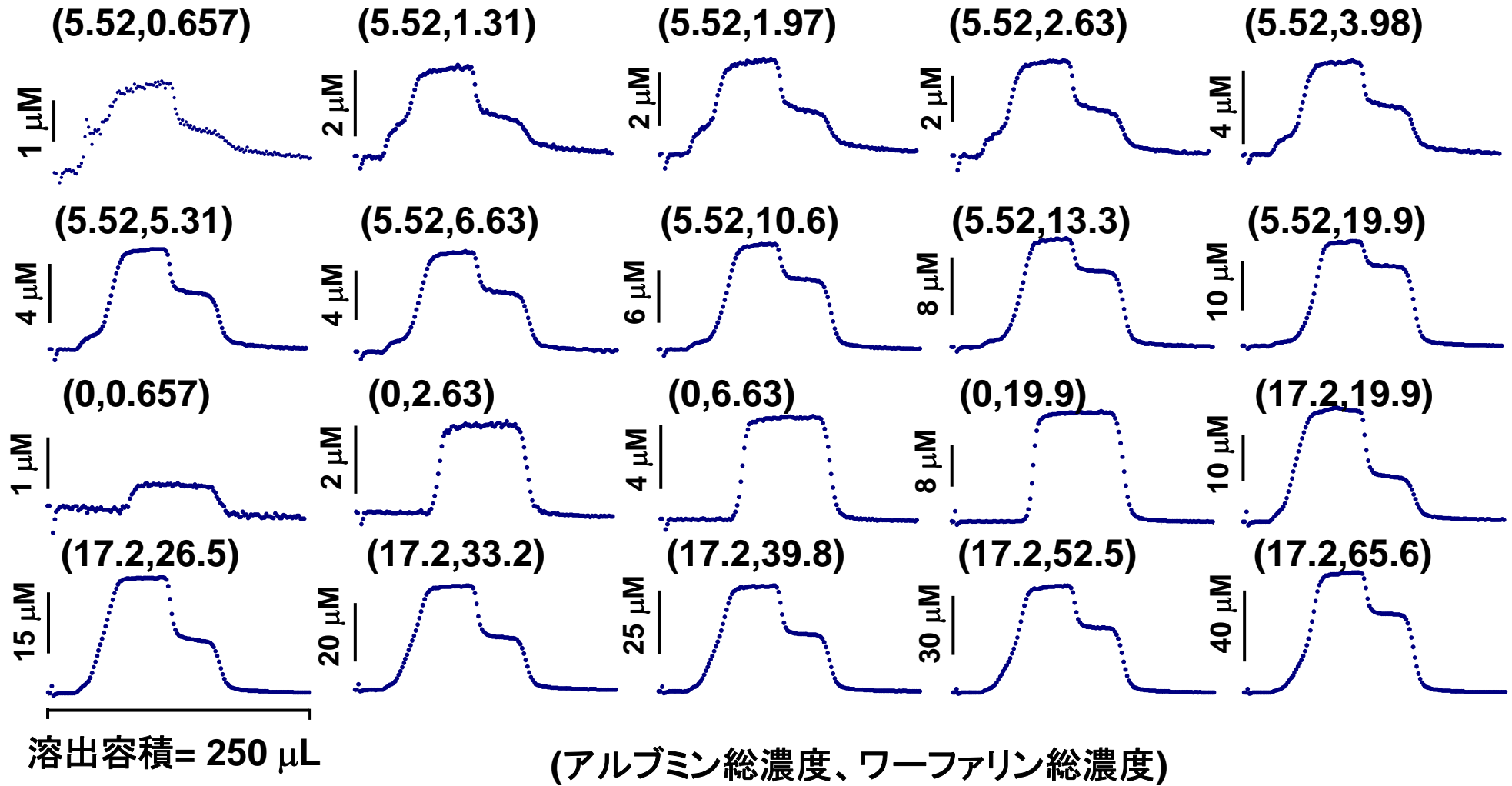
理論クロマトグラム



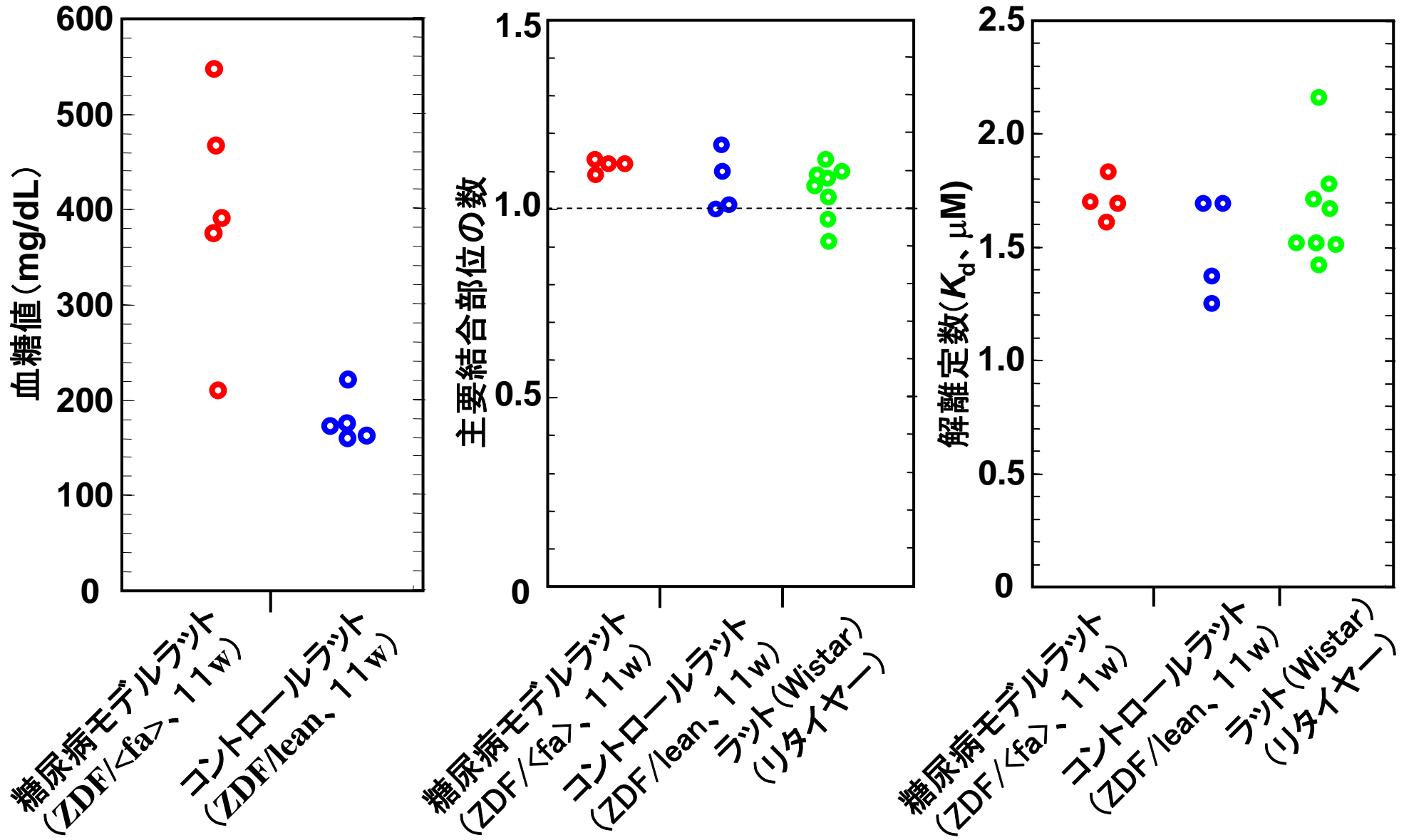
ヒト血清アルブミンと抗凝固剤の結合曲線



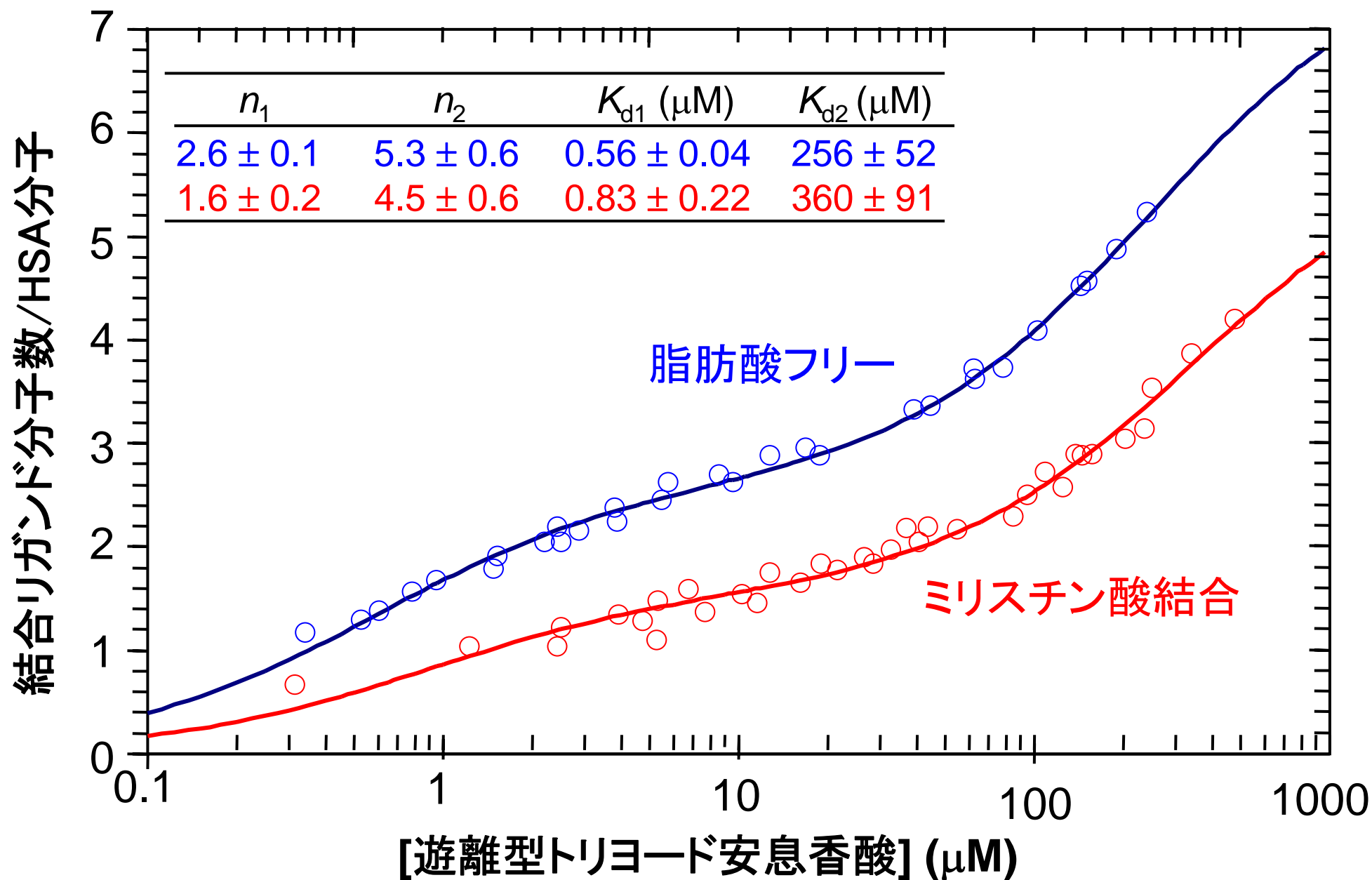
血清アルブミンと抗凝固剤のクロマトグラム



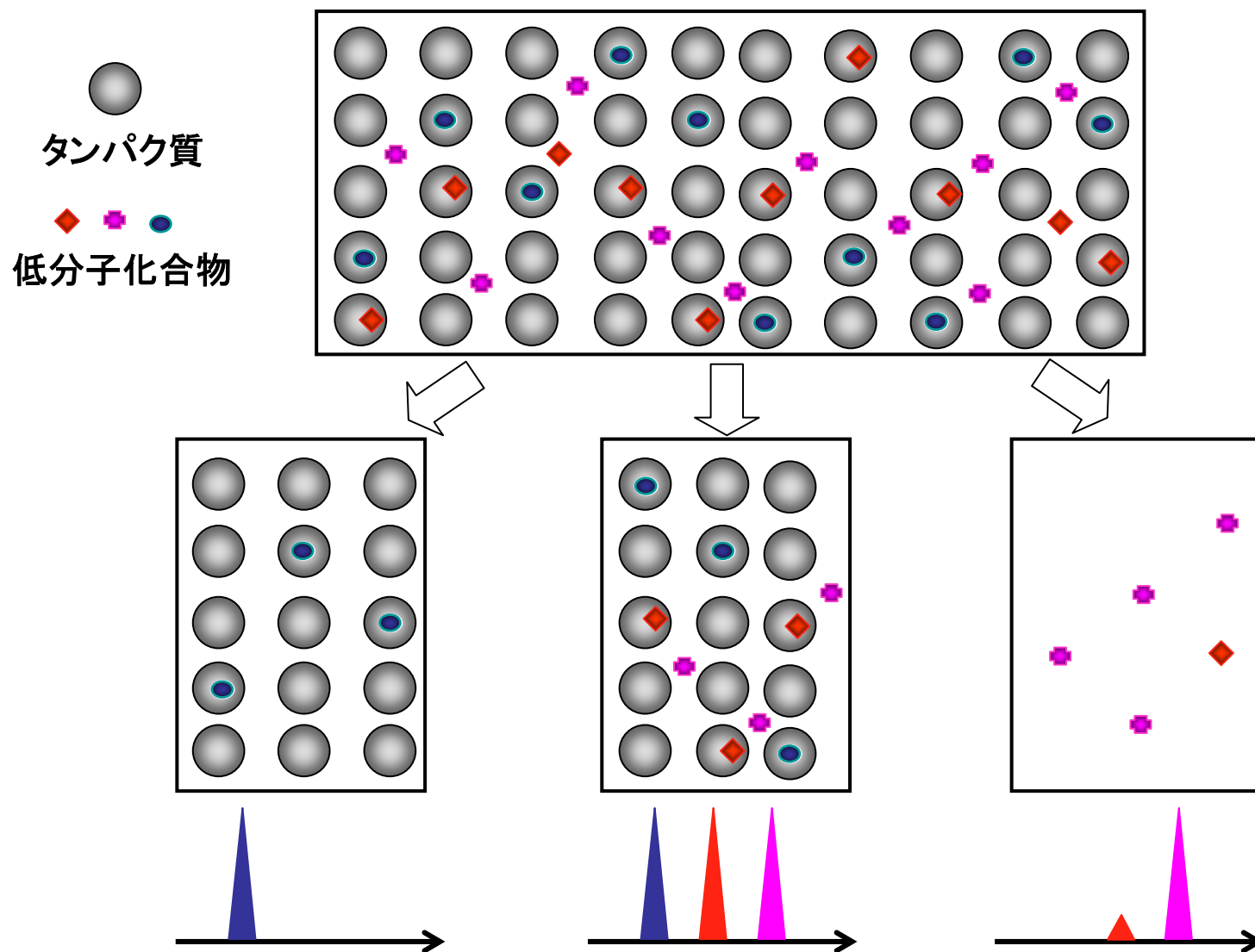
ラット個体別血清アルブミン機能測定



脂肪酸とヒト血清アルブミン結合機能



血清低分子バイオマーカー探索の多次元化



従来技術とその問題点

タンパク質と低分子の結合測定のゴールドスタンダードは平衡透析法とされているが、透析膜内外間の平衡に時間がかかる、微量試料での測定が技術的に困難等の問題があり、装置の改良が続けられているが、広く利用されるまでには至っていない。

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の問題点であった、微量化と自動化および測定精度の飛躍的改善に成功した。
- 従来は試料量と時間の点でほとんど実用性がなかったが、100マイクロリットル以下まで微量化できたため、多くの系で測定することが可能となった。
- 本技術の適用により、微量の血清でも測定ができるため、臨床検査への応用が期待される。

想定される用途

- 本技術の高精度結合データ測定の特徴を生かして結合データベースの構築に適用する。基準結合データは理論計算による薬剤開発などにメリットがある。
- 上記以外に、ハイスループット定量スクリーニング生かした用途も期待される。
- また、微量試料での全自動分析が可能なことから、バイオマーカー探索の分野に展開することも可能と思われる。

想定される業界

- 利用者・対象

創薬に係る研究所

臨床検査の開発に関わる研究所

基礎科学研究機関

- 市場規模

分子間相互作用測定装置は多種類が相当の台数市場に出ており、このうちのかなりの用途には本研究の技術の方が適していると思われる

実用化に向けた課題

- 現在、24時間自動測定が可能なところまで開発済み。しかし、データ解析などソフト面に未解決部分がある。
- 今後、疾患モデルラットの微量採血試料で実験データを取得し、ヒトへの臨床検査に適用していく場合の条件設定を行っていく。
- 実用化に向けて、微量化を10マイクロリットルレベルまで進める技術を確立する必要がある。

企業への期待

- タンパク質-タンパク質相互作用測定は、細孔を改良したゲルろ過用充填剤を製造する技術により克服できると考えている。
- カラム充填剤やマイクロ流路デバイス製造技術を持つ企業との共同研究を希望。
- また、分子間相互作用を使う測定装置を開発中の企業、臨床検査分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

お問い合わせ先

滋賀医科大学大学

産学官連携コーディネーター 岡崎 誠

TEL 077-548-2847

FAX 077-548-2086

e-mail mokazaki@belle.shiga-med.ac.jp