

非固定化かつ非化学修飾状態における分子間相互作用の速度解析法

1 概要

キャピラリー電気泳動 (CE) 法とモーメント解析理論を組み合わせ、化学的に非修飾 (蛍光標識化を行わない) かつ、遊離 (リガンドの固定化を行わない) 状態の分子間における相互作用の平衡情報 (会合平衡定数) および速度情報 (会合速度定数と解離速度定数) を解析的に測定できる解析法を開発した。原理的には、溶質とリガンドとの会合体をキャピラリー内で停止させ、この条件下で測定されるCE溶出ピークの形状的特徴をモーメント理論により解析する。この解析法 (クロマトグラフィックキャピラリー電気泳動 (CCE) 法) を分子間相互作用の新たな実験的速度解析法として提案し、それを具体的実験系に適用してその有用性を実証した。

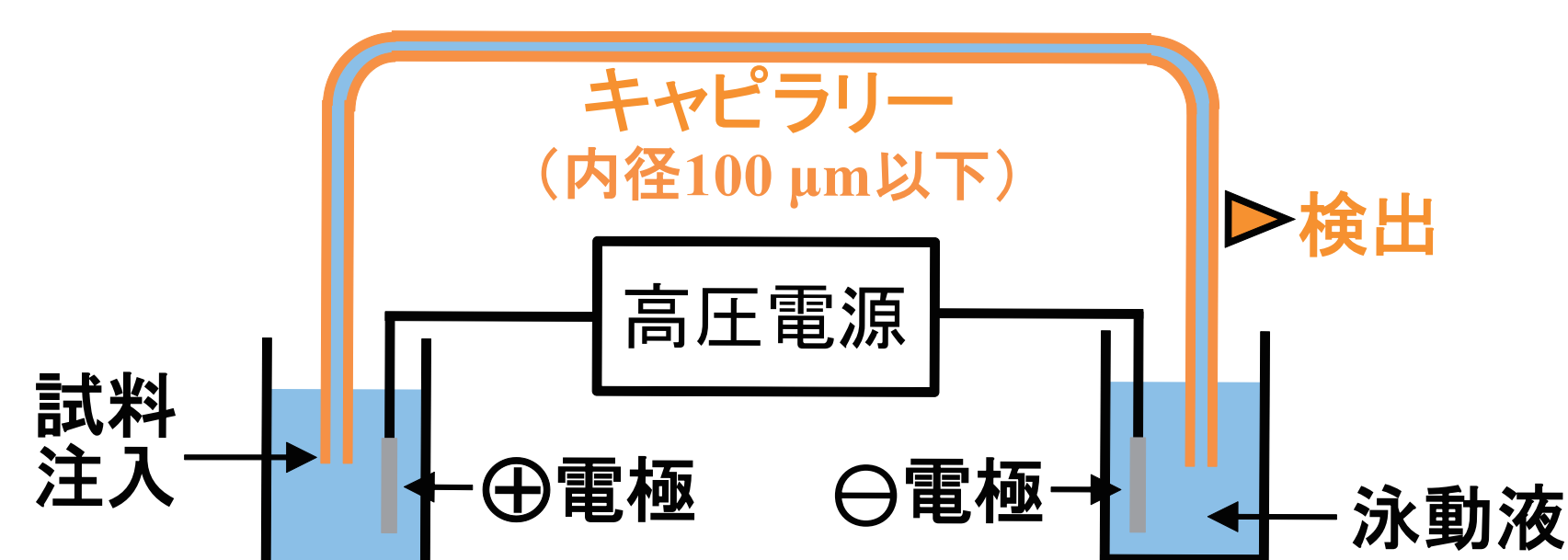
2 緒言

生体機能の発現や生体情報の伝達には、生体分子間の特異的・選択的な反応や相互作用が深く関与している。これらの機能や性能は、分子間相互作用の平衡特性 (親和性や選択性等) および速度特性 (反応速度や物質移動速度等) によって左右される。このため、様々な分子間相互作用の解析法が開発され、その一部は平衡情報だけではなく速度情報 (反応速度定数等) をも解析することができる速度解析法として利用されている。しかし、これら既往の解析法では、分子の固定化や化学修飾 (蛍光標識化等) が必要であり、相互作用の解析結果に対する分子の固定化や化学修飾の影響が懸念される。

3 分子間相互作用—速度解析法

測定法	
表面プラズモン共鳴法	リガンド固定化 (化学修飾不要)
水晶振動子マイクロバランス	
Biolayer Interferometry	
二面偏波式干渉計	
反射干渉分光法	
クロマトグラフィー	(リガンド遊離型) 蛍光標識化
蛍光相互相関分光法	
Microscale Thermophoresis	
キャピラリー電気泳動*	リガンド遊離型 化学修飾不要

* 特許情報 名称: 電気泳動による物質の相互作用の分析方法
出願日: 2015年1月26日
出願番号: 特願2015-012255

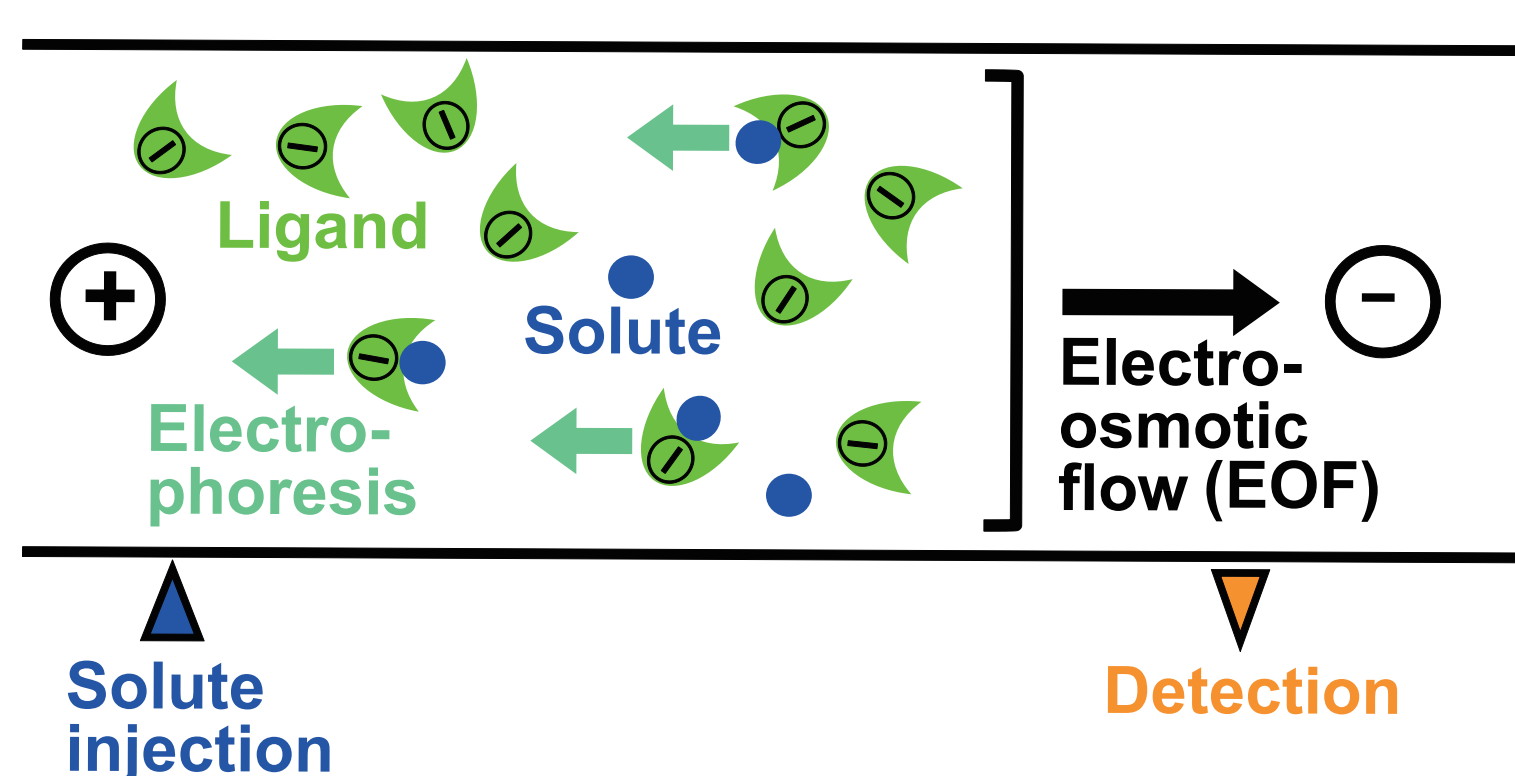


キャピラリー電気泳動装置の概略図

そこで本研究では、キャピラリー電気泳動 (CE) 法とモーメント解析理論を組み合わせ、非固定化 (遊離) かつ非化学修飾 (非蛍光標識化) 状態の分子間における相互作用の平衡情報だけではなく、速度情報をも得ることができる解析法 (クロマトグラフィックキャピラリー電気泳動、CCE) を開発した。

4 CCE法の原理

負電荷を有するリガンド分子あるいは分離媒体 (修飾シクロデキストリンや陰イオン性界面活性剤ミセル等) と電気的中性の溶質分子との相互作用解析について考察する。キャピラリーの試料注入側に陽極、検出器側に陰極を設置し、キャピラリー内に電位勾配を形成する。

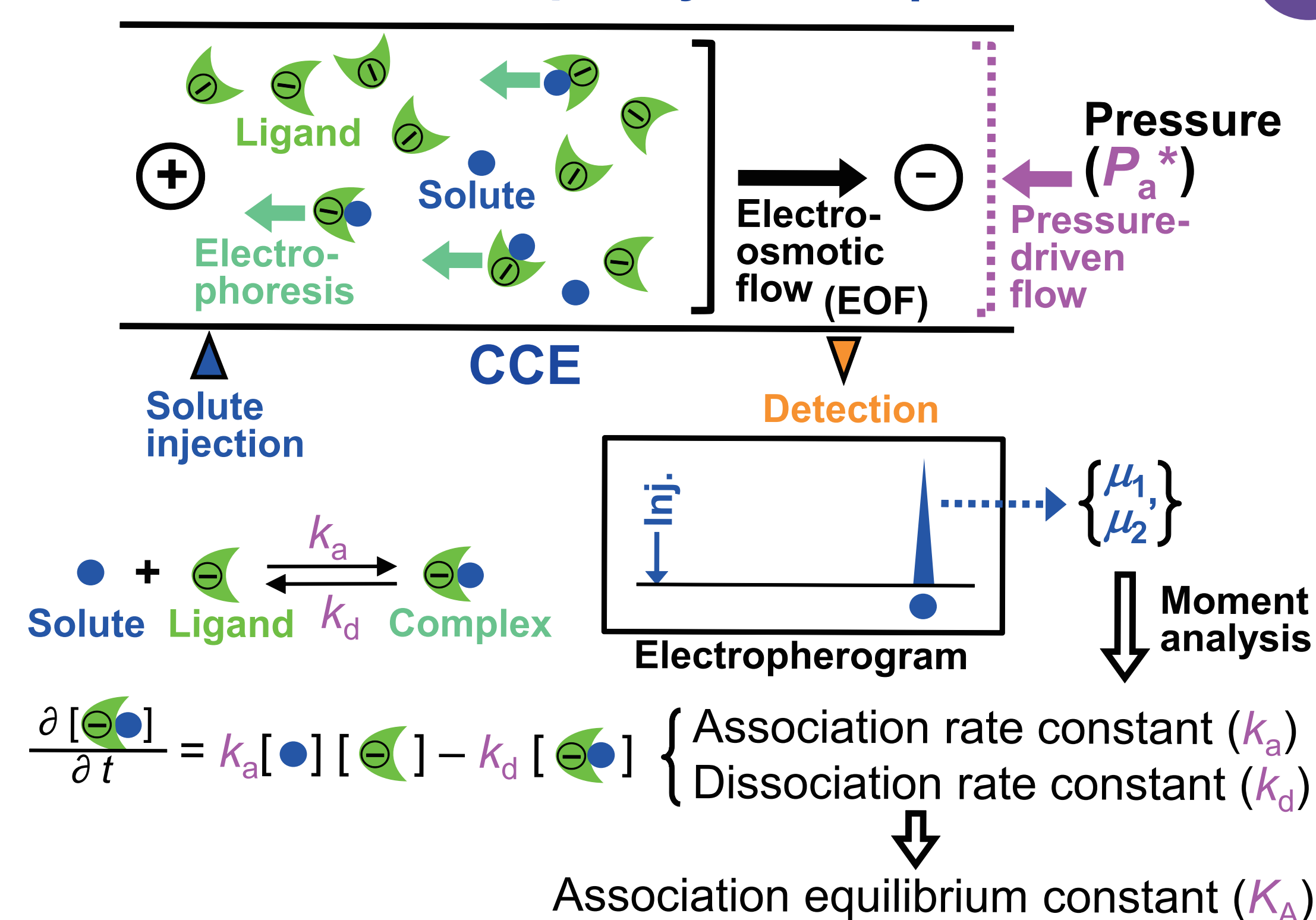


キャピラリー内反応系の概略図

このとき、電気的中性の溶質分子は電気泳動しないが、溶質分子とリガンドとの会合体はリガンドが負電荷を有するため陽極に向かって泳動する (←)。一方、泳動液全体は電気浸透流 (Electroosmotic flow, EOF) によって陰極に向かって移動し (→)、その速度は電気泳動速度よりも速い。このため、溶質分子と会合体は共に陰極方向に移動するが、溶質分子は電気泳動しない分だけ会合体よりも速く陰極方向に移動する。

通常のCE法では、溶質分子と会合体の双方が上記のように、移動速度は異なるものの陰極方向に同時に移動する条件で分離を行う。そして、検出器に到達した溶質分子を順次検出し、混合試料の分離と目的成分の定性・定量分析を行う。

5 Chromatographic Capillary Electrophoresis



これに対して、クロマトグラフィックキャピラリー電気泳動 (CCE) 法では、CE分離系に適切な大きさと向き第三の流れ (例えば、電気浸透流に対向する圧力差流) をさらに追加する。この場合には、会合体はキャピラリー内で停止し、溶質分子だけが陰極方向に移動する状況となる。この時のキャピラリー内における溶質分子の物質移動挙動はクロマトグラフィーの場合と同様である。

従って、クロマトグラフィーの場合と同様に、溶質分子の溶出ピーク形状をモーメント理論を適用して解析することにより、非固定化かつ非化学修飾状態における分子間相互作用の速度情報 (会合速度定数 k_a と解離速度定数 k_d) および平衡情報 (会合平衡定数 $K_A = k_a/k_d$) を解析的に求めることができる。