

UV-Vis 分光光度計によるタンパク質の熱安定性の特性解析

治療用タンパク質研究における Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計とペルチェ式温度制御マルチセルの利点

著者

Carlos Santos Martin
La Trobe Institute for
Molecular Science (LIMS),
La Trobe University,
Melbourne, Victoria 3086,
Australia

Biswaranjan Mohanty
Sydney Analytical Core
Research Facility,
The University of Sydney,
Sydney, New South Wales
2006, Australia

Wesam Alwan and
Mathieu Rault
Agilent Technologies, Inc.



概要

タンパク質の熱安定性は、そのデータがタンパク質の安定性と構造に影響を与える物理的および化学的性質に関する情報を提供するため、バイオ医薬品の重要な特性です。この実験では、ペルチェ式温度制御マルチセルモジュールを搭載した Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計を使用した、タンパク質の熱安定性および融解温度に関する高速でシンプルな特性解析について実証します。

はじめに

創薬は、将来商品化される可能性がある新しい医薬品とその治療効果を実証する必要がある多面的なプロセスです。薬剤ターゲットを適切に同定して特性解析することは、主要な治療用タンパク質化合物の同定に役に立つ、創薬プロセスの重要なステップです。¹治療用タンパク質については、生物化学的特性解析の対象として、分子量、均質性と不均質性、溶解性、熱安定性、アミノ酸配列組成、二次構造、三次元構造、およびタンパク質修飾があります。^{2,3}

熱安定性データは、タンパク質の安定性と構造に影響を与える物理的および化学的性質に関する情報を提供します。溶解温度は、さまざまな手法により温度を徐々に上昇させるとともに、サンプルの性質の変化をモニタリングすることにより測定できます（表 1）。タンパク質の温度を上昇させると、二次および三次構造が変化します。疎水性コアがこれらの構造的変化の作用を受けることにより、タンパク質の凝集体が生成されます。⁴図 1 に示すように、タンパク質の半分がまだ可用形の状態である温度は見かけの融解温度 (T_m) と呼ばれます。この温度は、結合リガンドが存在すると上昇する場合があります。^{5,6}熱安定性の実験は、リガンド結合、薬物安定性、消費期限、最適な保管条件について理解するために有用であり、これらは医薬品の将来の製造および商品化について役に立つ情報です。

UV-Vis 分光光度計によるタンパク質の熱安定性の分析

表 1 に、タンパク質の熱安定性の測定に使用されるさまざまな手法の利点と欠点をまとめて示します。UV-Vis 分光光度計は、分析における多数の課題を克服しています。UV-Vis は、蛍光ラベルを使用せずに吸光度を直接測定しますが、この測定は少量のサンプルにより実行でき、結果は簡単かつ即座に解釈して報告されます。

このアプリケーションノートでは、タンパク質の熱安定性と再現性の特性解析に使用する Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計（図 2）の利点について実証します。Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計は、組み込み型キュベット内温度プローブを使用してペルチェブロックにフィードバックを提供しているため、測定中の溶液の温度を制御できます。機器には 8 つの位置にマルチセルホルダが内蔵されており、水を使用しない空冷式ペルチェ装置を用いて 0 ~ 110 °C の間でサンプルの温度を制御します。実験能力を強化するために、マルチセルの各キュベット位置で同時に測定が実行されるため、他の手法と比較して高速な分析が実現します。

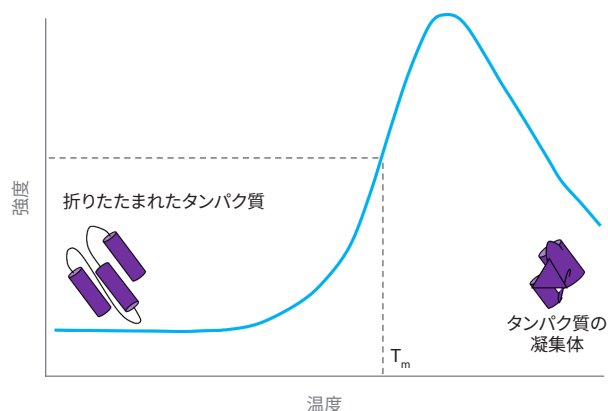


図 1. 温度の上昇に伴うタンパク質強度（または、吸光度）の代表的なレスポンス

表 1. タンパク質の熱安定性の測定に使用する手法

手法	原理	特長	欠点
円偏光二色性分光分析 ^{7,8}	円偏光を使用した際の楕円率の点から吸光度を測定。	<ul style="list-style-type: none"> - 必要なのは少量の物質 - 高感度 - 高分離能 	<ul style="list-style-type: none"> - 分析の長時間化 - 一部の緩衝液では遠紫外で干渉が発生
示差走査熱量測定法 ^{9,10}	参照物質に対する加熱性能の変化を測定。	<ul style="list-style-type: none"> - 必要なのは少量の物質 - 高分離能 	<ul style="list-style-type: none"> - 結果の解釈が困難な場合あり
サーマルシフトアッセイ ^{11,12}	蛍光色素を疎水性分子に結合する際の蛍光の変化を測定。	<ul style="list-style-type: none"> - RT-PCR 装置で複数のサンプルの分析が可能 - 高感度 - 必要なのは少量の物質 	<ul style="list-style-type: none"> - 蛍光プローブが必要 - 蛍光プローブが構造変化を引き起こす場合あり - タンパク質には蛍光プローブを収容するための 1 つのポケットが必要



図 2. Agilent Cary 3500 UV-Vis マルチセル分光光度計は、8 つのキュベット位置において、最大 4 つの温度実験で同時に使用できます。



図 3. この実験で使用した Agilent ウルトラマイクロセル。Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計の非常に小さい集束度の高いビームが、調整の必要がない小型で恒久的にアライメントされた開口部を通過します。

実験方法

サンプル

大腸菌ジスルフィド結合異性化酵素 A (EcDsbA、未変性状態) のサンプルは、La Trobe Institute for Molecular Science (LIMS)、ラトロブ大学、オーストラリアから入手しました。pH 7.0 に調整した 50 mM NaCl、1 mM EDTA、および 100 mM リン酸ナトリウムを含む緩衝液中で、約 0.6 mg/mL の EcDsbA 溶液を調製しました。Agilent ウルトラマイクロセル、容量 50 μ L、光路長 10 mm の石英製キュベットを使用しました (部品番号 5062-2496、図 3)。リン酸緩衝液をリファレンス (ブランク) 溶液として使用しました。

機器とメソッド

Agilent Cary 3500 UV-Vis マルチセルペルチェ式分光光度計の制御には、Agilent Cary UV ワークステーションソフトウェアを使用しました。タンパク質の吸光度と熱安定性を測定するのに使用したメソッドパラメータをそれぞれ、表 2 と 3 に示します。熱安定性の分析に関する実験では、0.1 $^{\circ}$ C/min の昇温速度で 0.1 $^{\circ}$ C ごとにデータを採取しました。各データポイントが記録される前

表 2. 波長範囲スキャンパラメータ

パラメータ	設定値
機器	Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計
波長範囲	200 ~ 400 nm
信号平均化時間	0.1 秒
スペクトルバンド幅	2 nm
サンプル量	80 μ L、蒸発を考慮した量を追加しました

表 3. 熱融解実験パラメータ

パラメータ	設定値
機器	Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計
波長	280 nm
信号平均化時間	2 秒
スペクトルバンド幅	2 nm
データ間隔 (nm)	0.1 $^{\circ}$ C
昇温速度	0.1 $^{\circ}$ C/min
温度制御	ペルチェブロック
温度範囲	25 ~ 90 $^{\circ}$ C
平滑化および導関数フィルタサイズ	25
平滑化および導関数データ間隔	0.1 $^{\circ}$ C
分析の下限温度	30 $^{\circ}$ C
分析の上限温度	90 $^{\circ}$ C
キュベット	ウルトラマイクロセル石英製キュベット
サンプル量	70 μ L

の 2 秒間の信号を平均化しました。0.1 °C/min の昇温速度を使用したのは、昇温速度が高いとサンプルが凝集しやすくなるためです。実験の温度は、Agilent Cary 3500 のペルチェブロックにより制御しました。

結果と考察

EcDsbA タンパク質の最大吸光ピークを測定するために、Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計を表 2 に示すパラメータで使用して、波長をスキャンしました。マルチセルモジュールを搭載した Agilent Cary 3500 では、7 つのサンプルと 1 つのリファレンス溶液を同時に測定できます。この機能により、同一の条件下で同時に測定を実行できるため、結果の信頼性が高くなります。少ないサンプル量（例えば、70 μ L）が必要な場合は、ウルトラマイクロセルを使用して測定を実行できます（図 3）。Agilent Cary 3500 システムには小さい集束度の高いビームが備えられているため、ウルトラマイクロセルを使用する際にあらかじめ調整しなくても、正確な測定が実行できます。図 4 に示すように、EcDsbA の最大吸光ピークは 280 nm でした。

EcDsbA タンパク質の熱安定性に関する分析では、温度の上昇に合わせて 280 nm での吸光度をモニタリングしました。表 3 に示すように、ペルチェブロックの温度を 0.1 °C/min の昇温速度で上昇させて、サンプルの温度を制御しました。温度を上昇させるとともに 1 つのピークが観察されましたが、これは、タンパク質の構造が変化したためにタンパク質の吸光度が変化したことを示しています。熱融解プロット（図 5）は、EcDsbA タンパク質において高温（65 °C より上）でトランジションが発生したことを示しています。

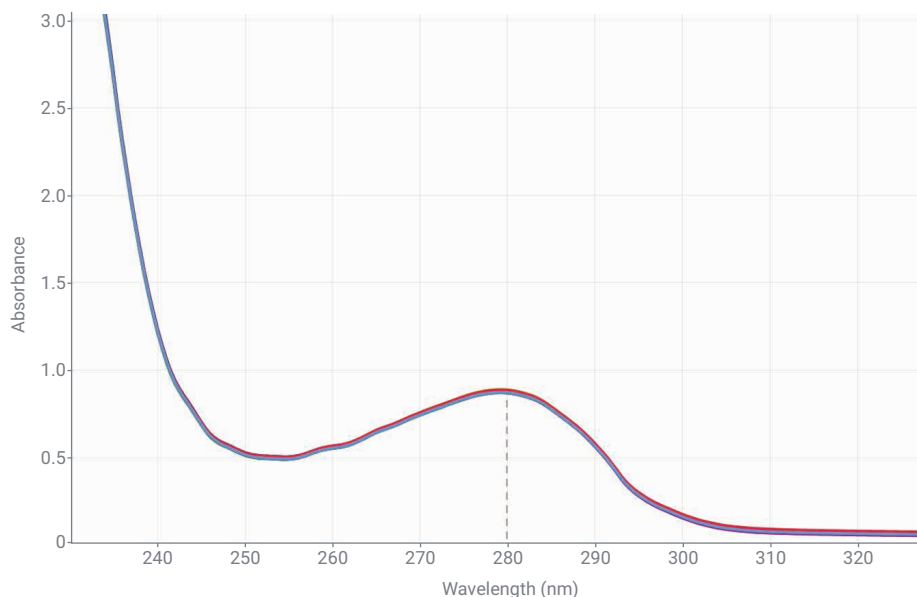


図 4. EcDsbA タンパク質（未変性状態）の 7 つの別のサンプルの波長範囲スキャン。EcDsbA タンパク質のピークは 280 nm です。ウルトラマイクロセルを使用して、7 つのサンプルを同時に測定しました。

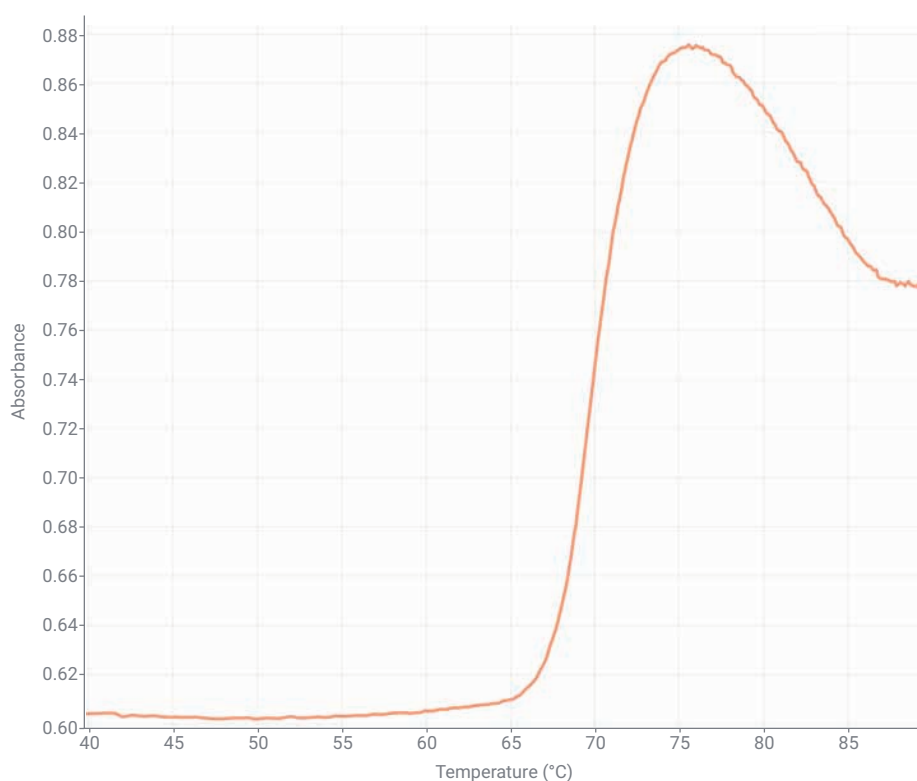


図 5. EcDsbA タンパク質の熱融解プロット。温度が上昇するとともに吸光度が変化しているのは、タンパク質が構造的に変化していることを示しています。

Agilent Cary UV ワークステーションソフトウェアでは、測定した吸光度データの一次導関数を使用して生体サンプルの T_m を算出しています。 T_m を測定するために、平滑化および導関数フィルタの適切なサイズ、および分析の上限温度と下限温度を選択します。表 3 に示す分析パラメータを使用した場合、EcDsbA の T_m は 69.86 °C でした (n = 6、図 6)。

Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計で得られた EcDsbA タンパク質の算出 T_m は、表 4 の 14、15 で示す以前に報告されている円偏光二色性で得られた結果と一致していました。

Agilent Cary 3500 による EcDsbA の T_m の測定精度を、繰り返し測定により評価しました。タンパク質サンプル溶液を 6 つに分割し、それぞれを 70 μ L のウルトラマイクロセルで個別に分析しました。結果の再現性は、EcDsbA の T_m 値の平均と標準偏差を計算することにより評価しました (表 4)。Agilent Cary 3500 UV-Vis システムは、6 回の測定にわたり標準偏差がわずか 0.16 °C という優れた精度を示しました。

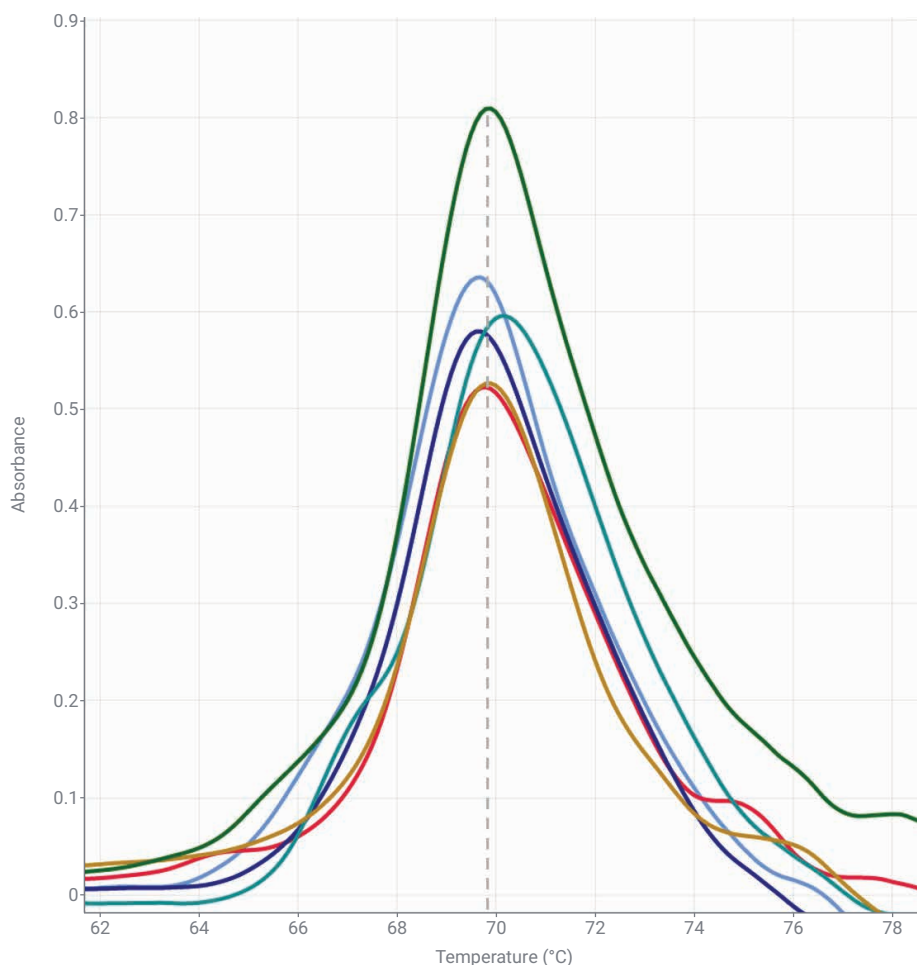


図 6. Agilent Cary UV ワークステーションソフトウェアで得られた、EcDsbA タンパク質の 6 つの別のサンプルの一次導関数のプロット (T_m = 69.86 °C、n = 6)

表 4. Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計で測定した EcDsbA の T_m 値および文献で報告されている値

手法	EcDsbA の T_m (°C)
Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計による繰り返し分析 1	69.70
Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計による繰り返し分析 2	69.80
Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計による繰り返し分析 3	69.70
Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計による繰り返し分析 4	70.20
Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計による繰り返し分析 5	69.90
Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計による繰り返し分析 6	69.90
平均	69.86
標準偏差	0.16
文献値 ¹⁴	68.55
文献値 ¹⁵	69.25

結論

Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計とペルチェ式温度制御マルチセルを使用して、EcDsbA タンパク質の 6 つのサンプルの融解温度 (T_m) を同時に測定しました。結果は非常に再現性が高く、EcDsbA タンパク質の 1 つのサンプルを 6 つに分割した場合、標準偏差 0.16 °C を達成しました。さらに、Agilent Cary UV ワークステーションソフトウェアにより算出した平均 T_m の 69.86 °C は、円偏光二色性分光分析で得られた文献値と一致していました。これらの結果は、タンパク質の熱安定性に関する分析における Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計の高い精度、真度、および速度を実証しています。

Agilent Cary 3500 UV-Vis はメソッドの生産性をさらに最大化するために、結果の精度を損なわずに 7 つのサンプルを同時に測定できます。機器の設計を通してサンプルの最低 3 回の繰り返し分析を同時に測定する機能は、繰り返し分析の測定が必要なラボにとって時間を節約する有用な機能です。

データ解析を簡単にするために、Agilent Cary UV ワークステーションソフトウェアには、平滑化および導関数の計算機能が標準で搭載されています。さらに、このソフトウェアでは、データを安全に取り込み、処理、報告、格納するためのオプションの技術コントロールが使用できます。これらのコントロールは、FDA 21 CFR Part 11、EU Annex 11、GAMP5、さらには ISO/IEC 17025、EPA 40 CFR Part 160 のコンプライアンスガイドラインに従う必要があるラボにとって不可欠です。

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2022
Printed in Japan, August 4, 2022
5994-5086JAJP

参考文献

1. Mohs, R. C.; Greig, N. H. Drug Discovery and Development: Role of Basic Biological Research, *Alzheimers Dement (NY)* **2017**, 11, 3(4), 651–657. doi: 10.1016/j.trci.2017.10.005
2. Schenone, M. et al. Target Identification and Mechanism of Action in Chemical Biology and Drug Discovery, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, 9(4), 232–40. doi: 10.1038/nchembio.1199
3. Gashaw, I. et al. What Makes a Good Drug Target? *Drug Discovery Today* **2012**, 17, Supplement, S24–S30. doi: [10.1016/j.drudis.2011.12.008](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.12.008)
4. Jahn, T. R.; Radford, S. E. Folding Versus Aggregation: Polypeptide Conformations on Competing Pathways, *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, 1, 469(1), 100–17. doi: [10.1016/j.abb.2007.05.015](https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.05.015)
5. Mateus, A.; Määttä, T. A.; Savitski, M. M. Thermal Proteome Profiling: Unbiased Assessment of Protein State Through Heat-Induced Stability Changes, *Proteome Sci.* **2017**, 24, 15, 13. doi: [10.1186/s12953-017-0122-4](https://doi.org/10.1186/s12953-017-0122-4)
6. Ball, K. A. et al. An Isothermal Shift Assay for Proteome Scale Drug-Target Identification, *Commun. Biol.* **2020**, 3, 75. doi: [10.1038/s42003-020-0795-6](https://doi.org/10.1038/s42003-020-0795-6)
7. Greenfield, N. J. Using Circular Dichroism Collected as a Function of Temperature to Determine the Thermodynamics of Protein Unfolding and Binding Interactions, *Nat. Protoc.* **2006**, 1(6), 2527–35. doi: [10.1038/nprot.2006.204](https://doi.org/10.1038/nprot.2006.204)
8. Beychok, S. Circular Dichroism of Biological Macromolecules, *Science* **1966**, 9, 154(3754), 1288–99. doi: [10.1126/science.154.3754.1288](https://doi.org/10.1126/science.154.3754.1288)
9. Abd-Elghany, M.; Thomas, M. K. A Review on Differential Scanning Calorimetry Technique and its Importance in the Field of Energetic Materials, *Physical Sciences Reviews* **2018**, 3, 4. 20170103. doi: [10.1515/psr-2017-0103](https://doi.org/10.1515/psr-2017-0103)
10. Deangelis, N. J.; Papariello, G. J. Differential Scanning Calorimetry. Advantages and Limitations for Absolute Purity Determinations, *J. Pharm. Sci.* **1968**, 57, 1868–1873. doi: [10.1002/jps.2600571109](https://doi.org/10.1002/jps.2600571109)
11. Pantoliano, M. W. et al. High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery, *J. Biomol. Screen.* **2001**, 6(6), 429–40. doi: [10.1177/108705710100600609](https://doi.org/10.1177/108705710100600609)
12. Ericsson, U. B. et al. Thermofluor-Based High-Throughput Stability Optimization of Proteins for Structural Studies, *Anal. Biochem.* **2006**, 15, 357(2), 289–98. doi: [10.1016/j.ab.2006.07.027](https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.07.027)
13. Martin, J.; Bardwell, J.; Kuriyan, J. Crystal Structure of the DsbA Protein Required for Disulphide Bond Formation In Vivo, *Nature* **1993**, 365, 464–468. doi: [10.1038/365464a0](https://doi.org/10.1038/365464a0)
14. Christensen, S. et al. Structural and Biochemical Characterization of Chlamydia trachomatis DsbA Reveals a Cysteine-Rich and Weakly Oxidising Oxidoreductase, *PLoS One* **2016**, 28, 11 (12):e0168485. doi: [10.1371/journal.pone.0168485](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168485)
15. Heras, B. et al. Staphylococcus aureus DsbA Does Not Have a Destabilizing Disulfide, a New Paradigm for Bacterial Oxidative Folding. *J. Biol. Chem.* **2008**, 15, 283(7), 4261–71. doi: [10.1074/jbc.M707838200](https://doi.org/10.1074/jbc.M707838200)