

等温滴定熱量計(ITC), 生体高分子用示差走査熱量計(DSC)のご紹介

タンパク質分析におけるマイクロカロリメトリ

■ 等温滴定熱量測定 (ITC)

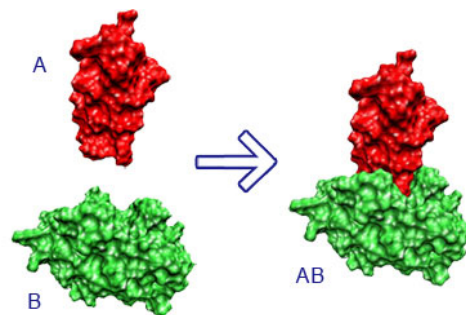
- リガンド-標的間の相互作用や結合
- 熱力学的結合プロファイル

■ 示差走査熱量測定 (DSC)

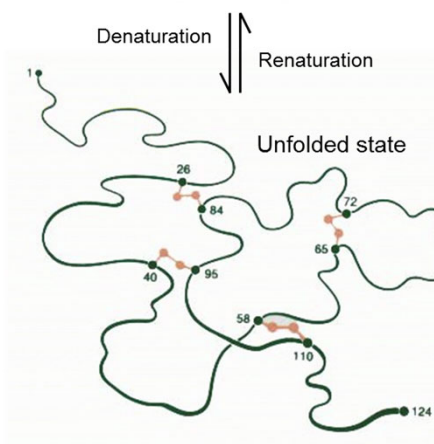
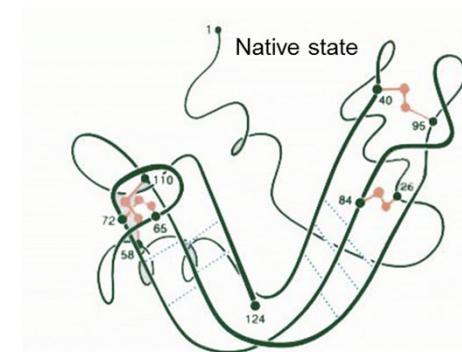
- 熱的安定性
- ドメイン構造



- 結合が生じるか
- 結合の強さ
- 結合比
- 結合様式



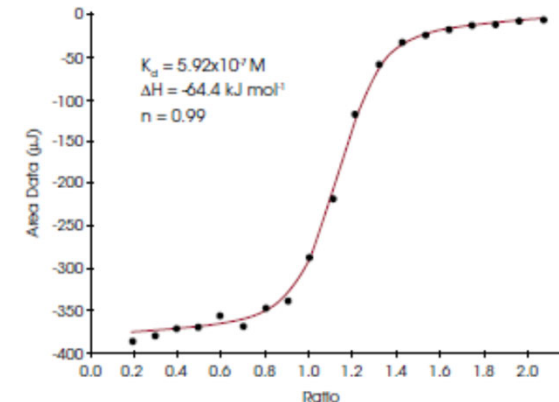
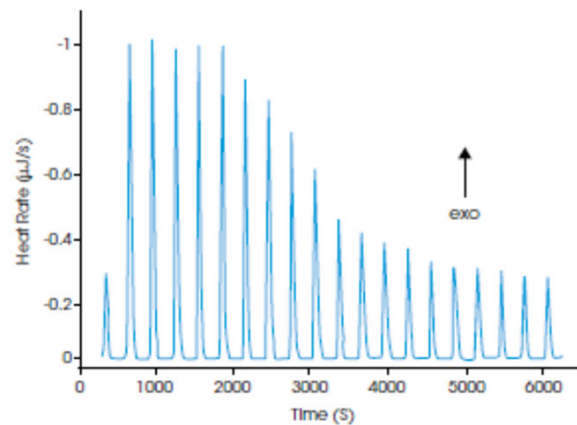
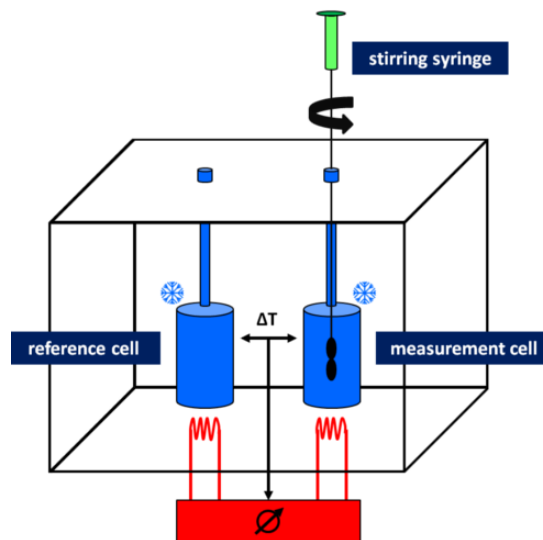
- どの温度まで安定か
- 条件(pH等)による影響
- ドメインはいくつか



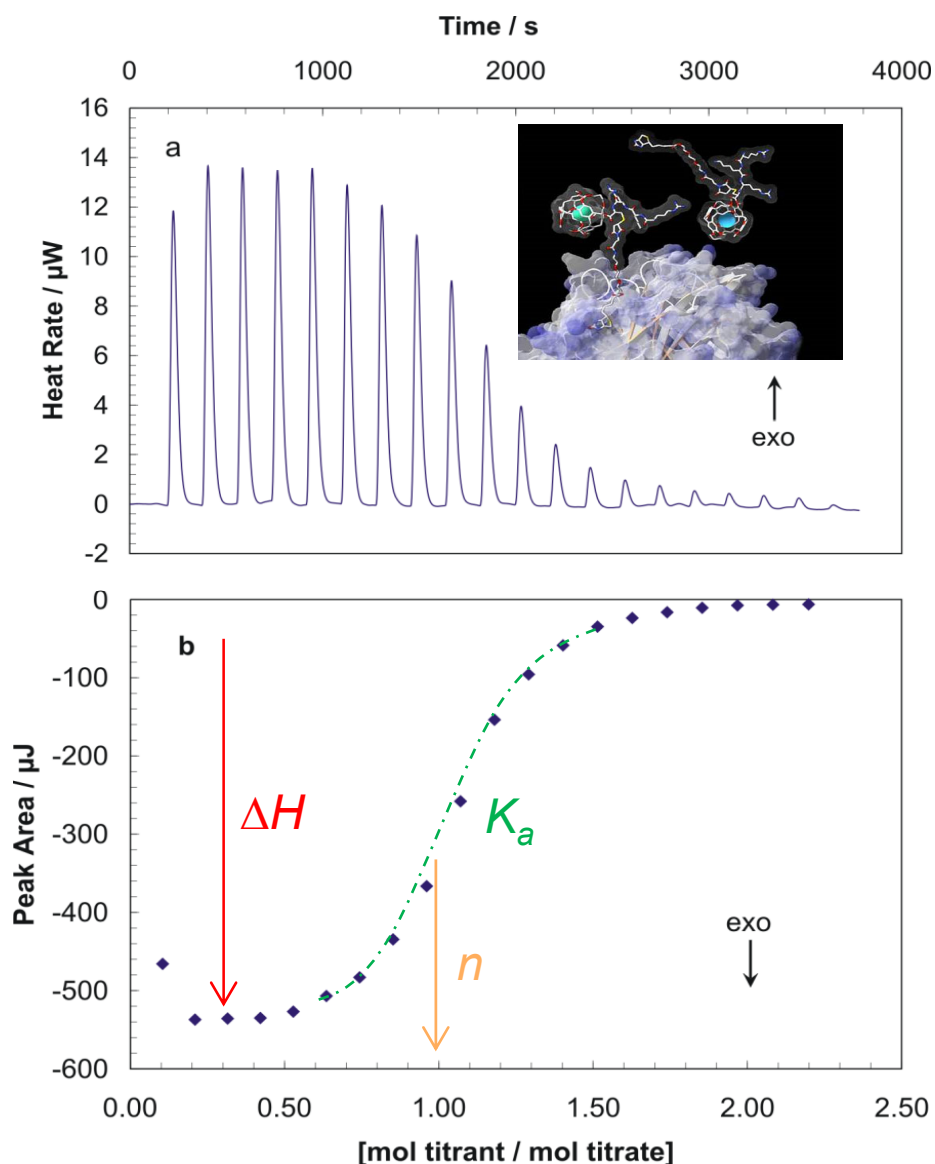
ITC (Isothermal Titration Calorimeter)

滴定した際に生じる分子間相互作用に伴う熱量を測定

- 既知の濃度の液体サンプルをシリンジおよびセルに充填
- リファレンスには水を充填
- 結合サイトが飽和するように滴定量，滴定回数をプログラム
- 生じた熱量変化を算出し，想定モデルを用いた解析を実施することで，結合解離定数 K_d やエンタルピー ΔH ，化学量論比 n などが得られる



ITC測定から得られる情報



- セル内のサンプルにリガンドを指定量ずつ滴下
- セル内のサンプルとリガンドが反応することで反応熱が生じる



- 滴下量が増えてゆくとセル内のサンプルが飽和し、熱の生成が小さくなる

$$\Delta q = \Delta[PL]\Delta H^\circ V_{\text{cell}}$$

- カーブフィッティングにより

- エンタルピー, ΔH
- 結合定数, $K_a (=1/K_d)$
- 化学量論比(結合比), n

が得られる

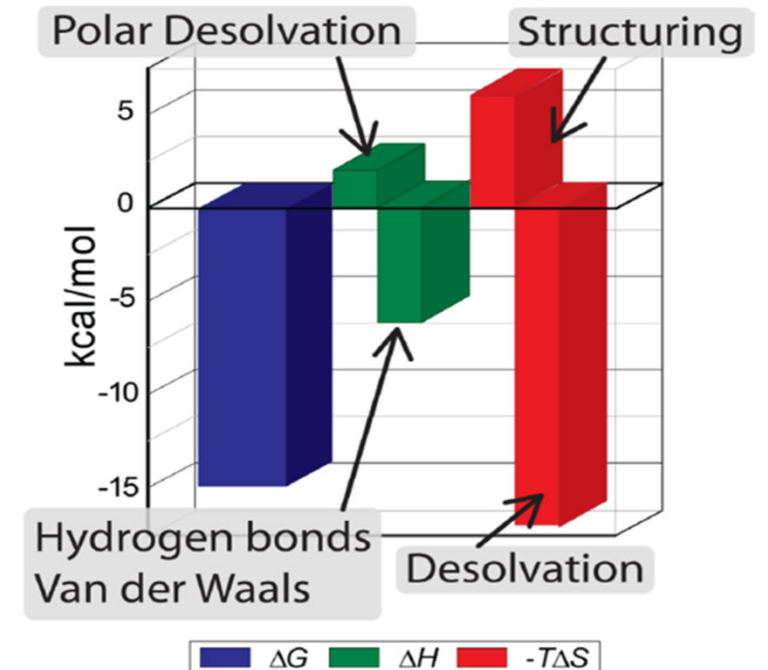
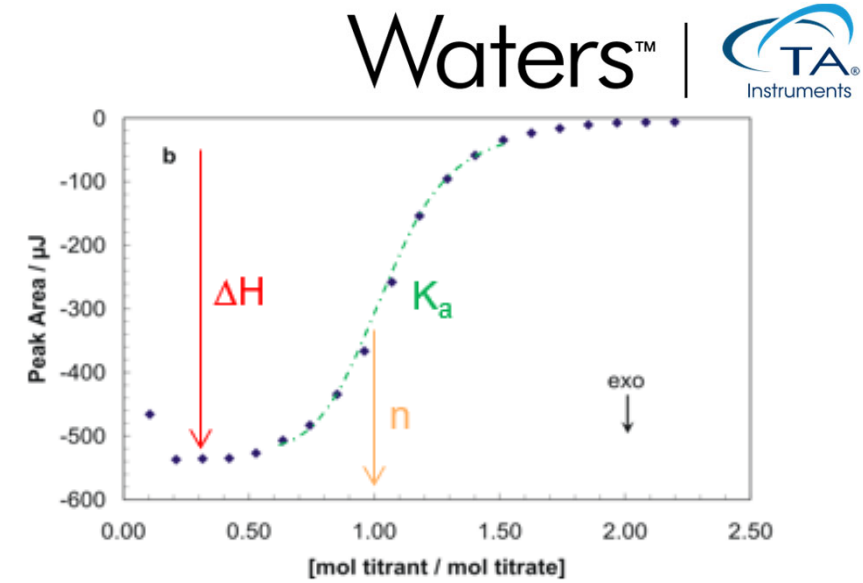
熱力学的パラメータ

- ITCの測定結果から得られた ΔH , K_a の値より, 以下の式からギブズエネルギー変化 ΔG , およびエントロピー変化 ΔS を計算することが出来る

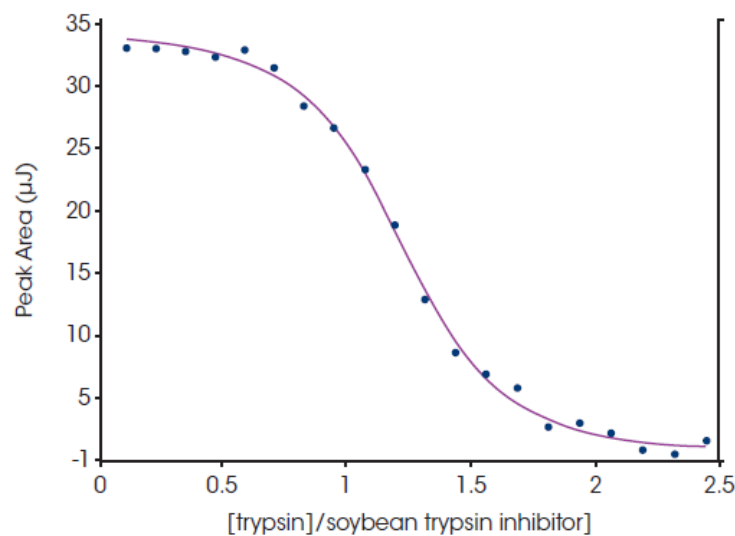
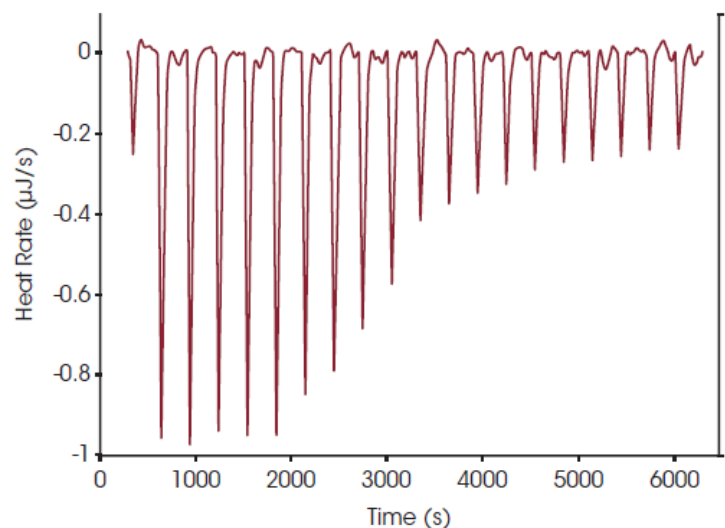
$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln(K_a)$$

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

- 結合によるギブズエネルギー変化に対するエンタルピー, エントロピーそれぞれの寄与は結合様式の考察にしばしば使用される
 - エンタルピー
 - 水素結合, ファンデルワールス力, 静電結合等
 - エントロピー
 - 疎水性相互作用, 水和状態の変化, コンフォメーション自由度の変化等



タンパク質-タンパク質の相互作用

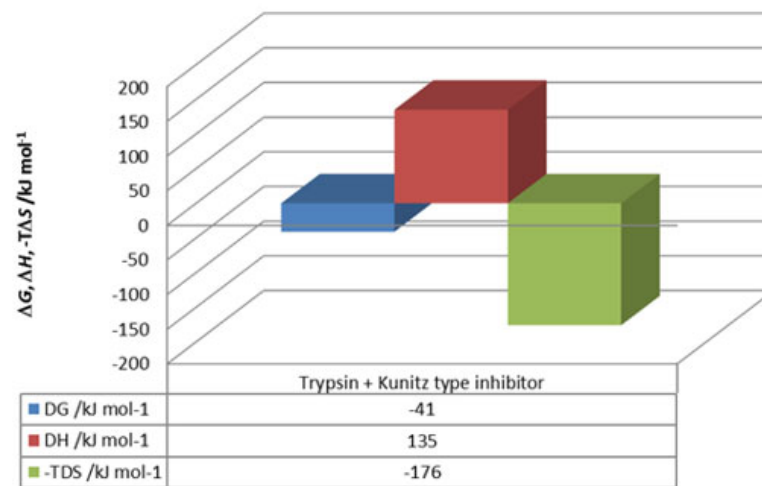


- セル: soybean trypsin inhibitor (2.1 μM)
- シリンジ: porcine pancreatic trypsin (440 μM)
 - $K_a = 1.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, $\Delta H = 135 \text{ kJ mol}^{-1}$, $n = 1.15$

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln(K_a)$$

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

- $\Delta H = 135 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta G = -41 \text{ kJ mol}^{-1}$, $T\Delta S = 176 \text{ kJ mol}^{-1}$



- 吸熱のエンタルピー変化
- エントロピーの増大によって相互作用が主に生じている
- 疎水性の相互作用や脱溶媒和、それにとまなうコンフォメーション変化が支配的

Affinity ITC & Affinity ITC Auto

Isothermal Titration Calorimeter, 等温滴定熱量計

ITC測定において重要な2つの主要箇所(セルおよび滴定アセンブリ)に優れた技術を採用し、高精度で信頼性の高い測定が可能なITC装置です



特徴

- **AccuShot™** 効率よく攪拌される最適な位置に正確な量の滴定サンプルを送液
- **FlexSpin™** 低速攪拌, 効率的な混合, 最高感度を実現する攪拌技術
- 容量選択可能なセル
- 正確な等温制御が可能な固体熱電素子による加熱/冷却。ベースラインドリフトが小さく, 高分解能
- シリンジ洗浄の完全自動化
- 96ウェルオートサンプラー(フィールドアップグレード可能)

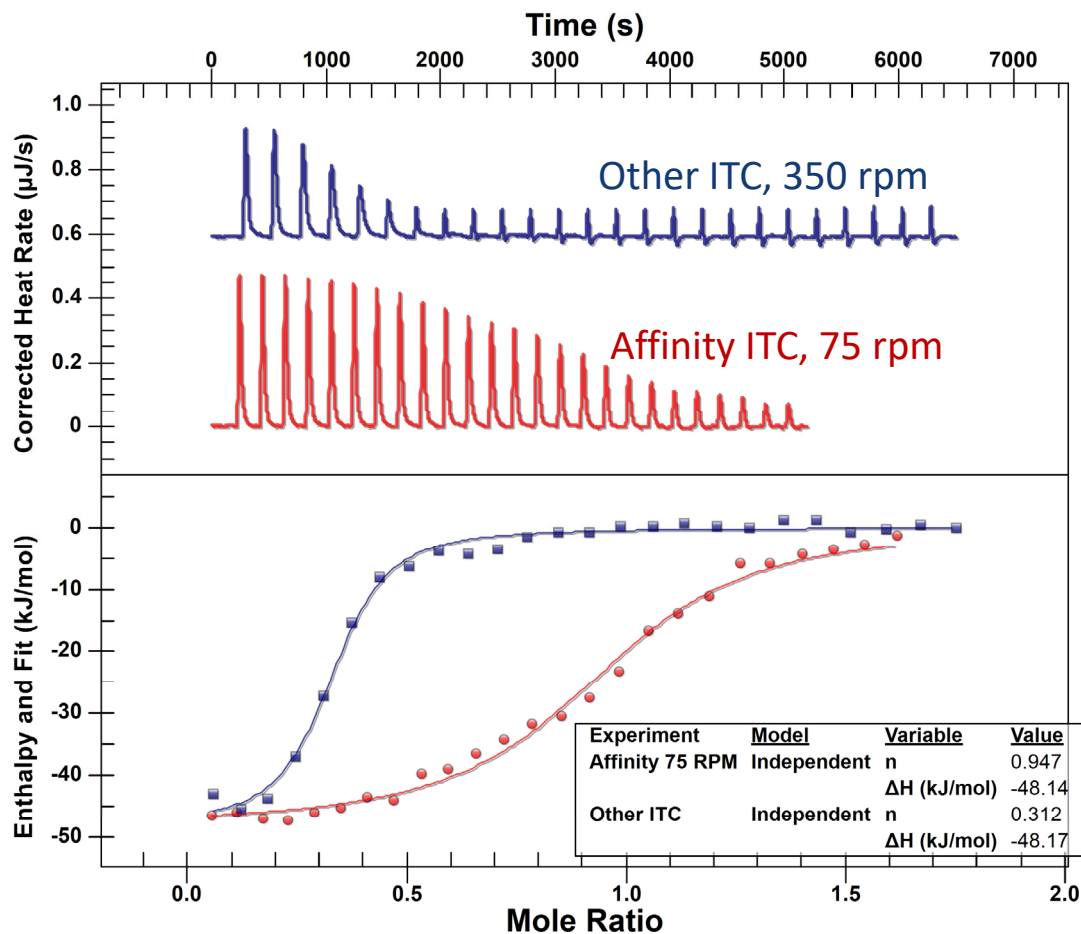
- サンプルとリファレンスの2つの固定式セル
- 円筒形構造で効率のよい攪拌が可能。デッドゾーンや気泡の発生を抑制
- 1.0 mL(標準容量, SV)と190 μ L(低容量, LV)の2つの容量を選択可
 - LV: サンプル量が少ない場合
 - SV: 熱量が小さい場合, 結合性が強い場合
- 高純度(99.999%)の24金(Au0)を使用
 - 熱伝導率が高く, 高感度に熱量を検出
 - 強酸, 強塩基に耐性があり, 洗浄液として使用可能
 - ハステロイ製も選択可能



- 滴定機構から分離された革新的なパドル形状
 - 送液された滴定サンプルの効率良い攪拌が可能
 - ベースラインへの戻りが早く、高いピーク分解能
- 低速(75 rpm, 推奨値)での攪拌が可能
 - 壊れやすい構造を保護しつつ、高感度に測定可能
- 円筒形構造のセルとの組み合わせによりデッドゾーンを排除
- 柔軟な支持体を使用し、アライメントのずれなどによる損傷の可能性を排除



攪拌速度による違い



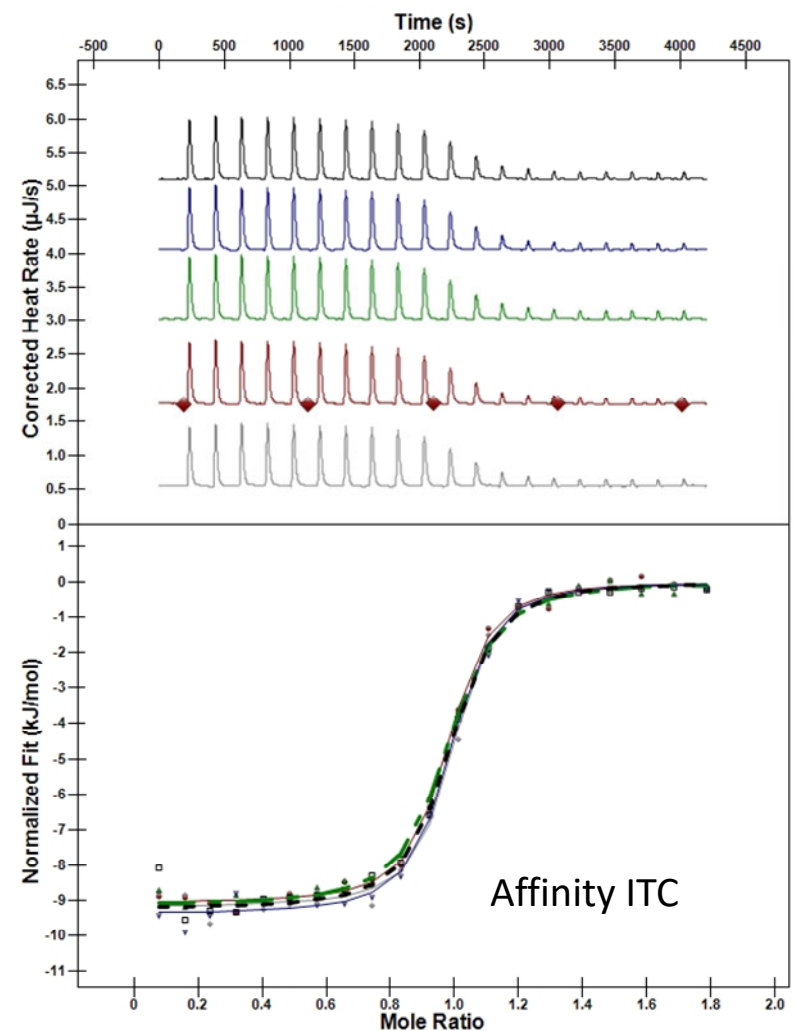
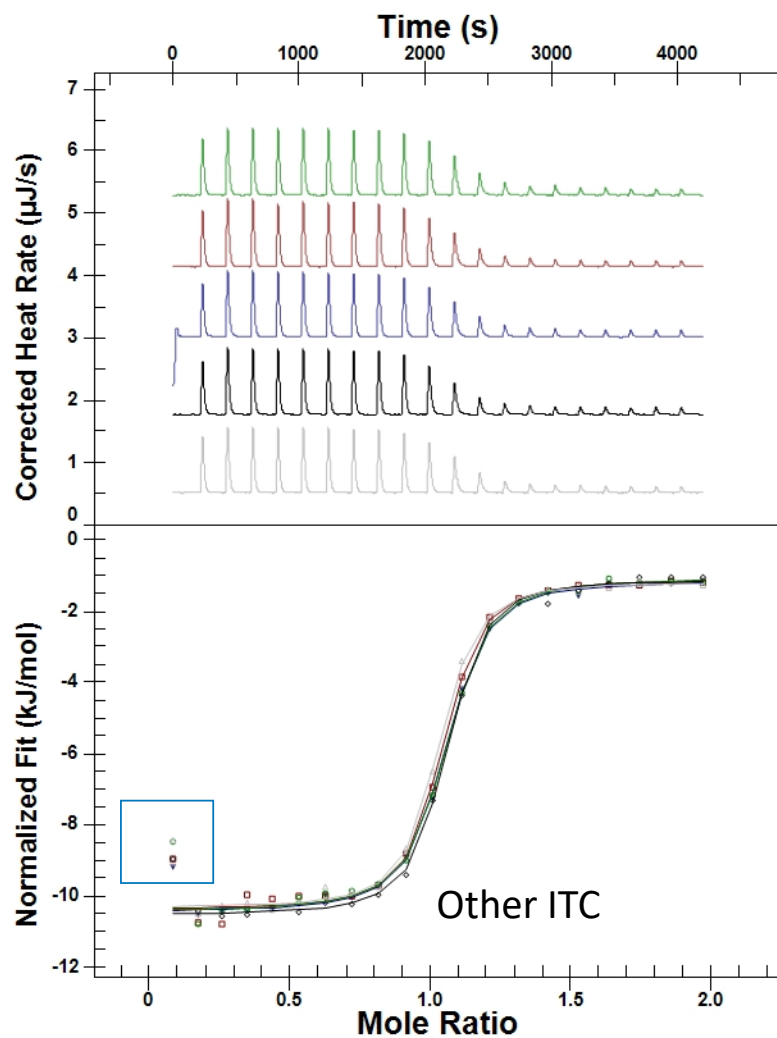
セル：タンパク質, シリンジ：ペプチド

- 攪拌速度の違いで異なるn値
 - 小さいn値は高速の攪拌によってタンパク質が一部破壊されてしまったことを示唆

- 攪拌機構から分離された滴定システム
- 効率的な混合に最適な位置に滴定サンプルを送液
- 250 μL のシリンジを備え、様々な測定に対応
 - 一回の充填で連続して複数回の測定や、バックグラウンド測定が可能
- 高精度ステップモータにより0.01 μL ~の正確な送液が可能
- 滴定カニューラの完全自動クリーニング
- 非常に細いカニューラを採用し、最初の滴定における拡散を最小化



最初の滴下データポイントの正確性

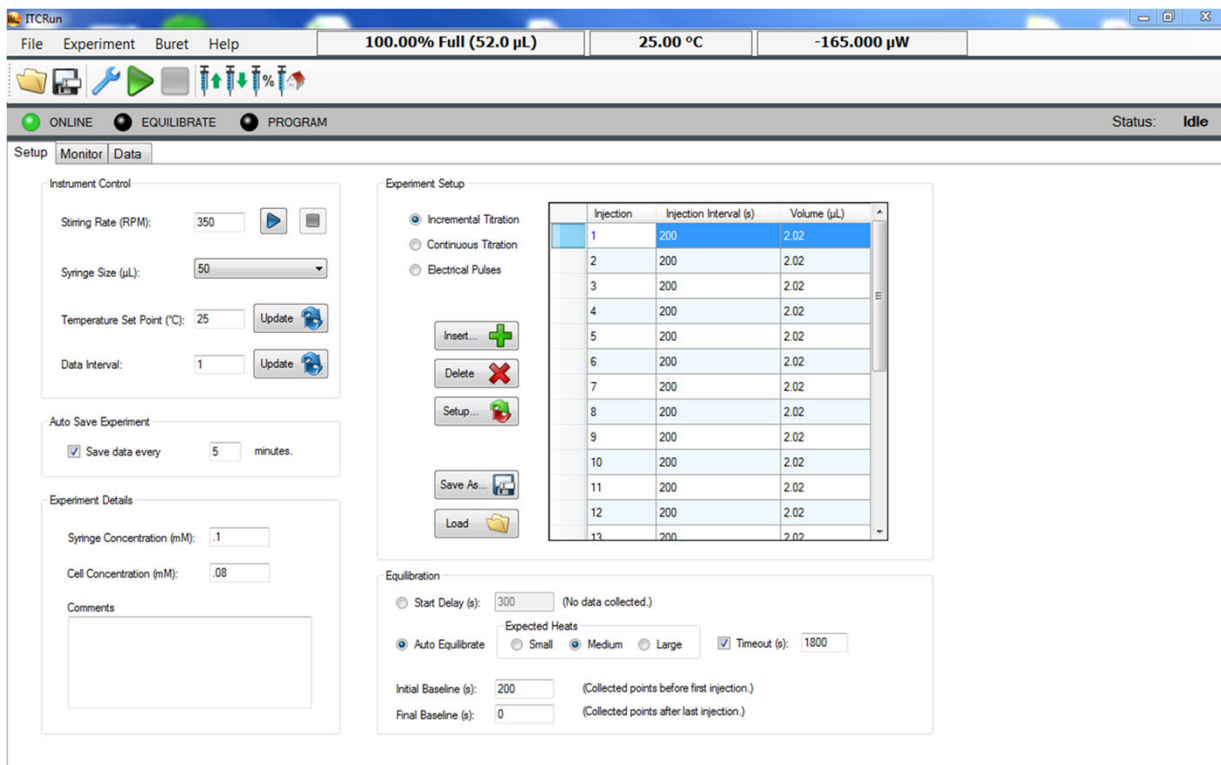


オートサンプラー

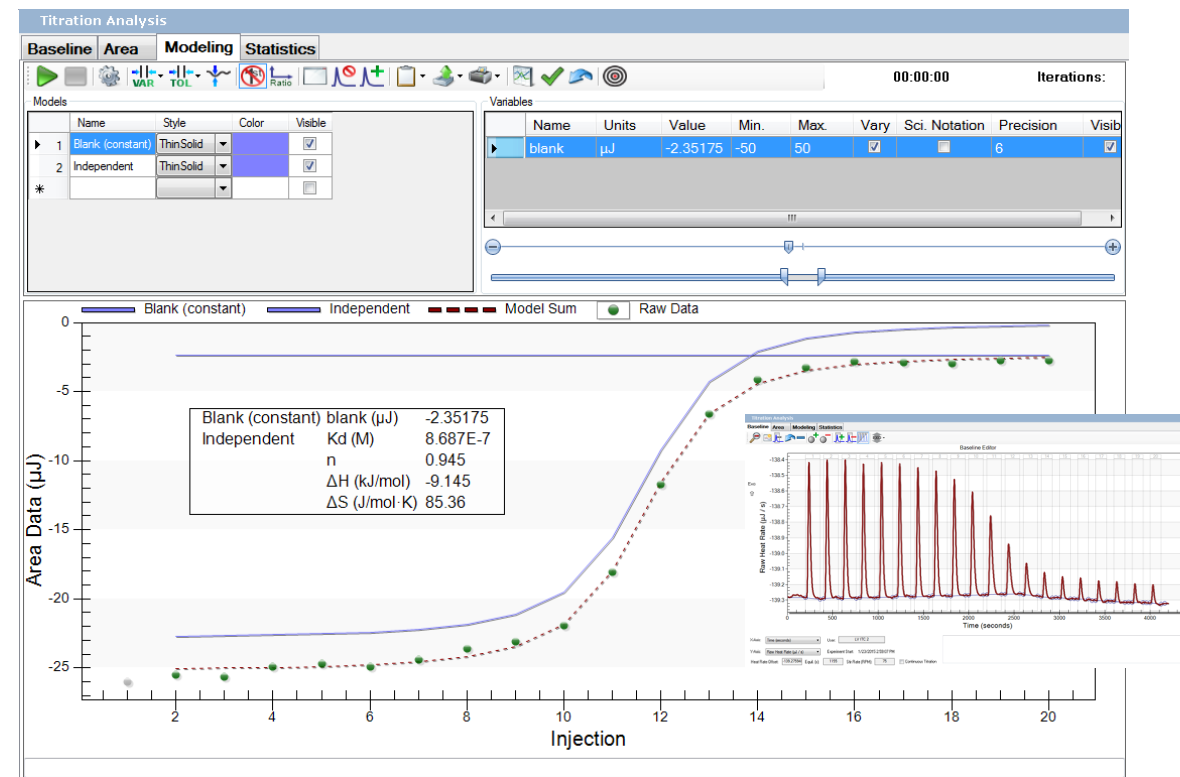
- 業界実績の高いHPLCグレードオートサンプラー
- 高スループット
- サンプルは2つの96ウェルプレートにセット
- サンプルトレイの温度制御が可能(4 °C~室温)
 - 温度に敏感なサンプルに
- 複数の洗浄用溶媒ポートを備え洗浄ルーチンをプログラム可
 - サンプルのコンタミを防止



ソフトウェア ITC Run & NanoAnalyze



- 柔軟な滴定条件設定
- 平衡時ベースライン安定条件の設定
- 滴定ハードウェア(シリンジ動作)のリアルタイムモニター
- リアルタイムデータ表示

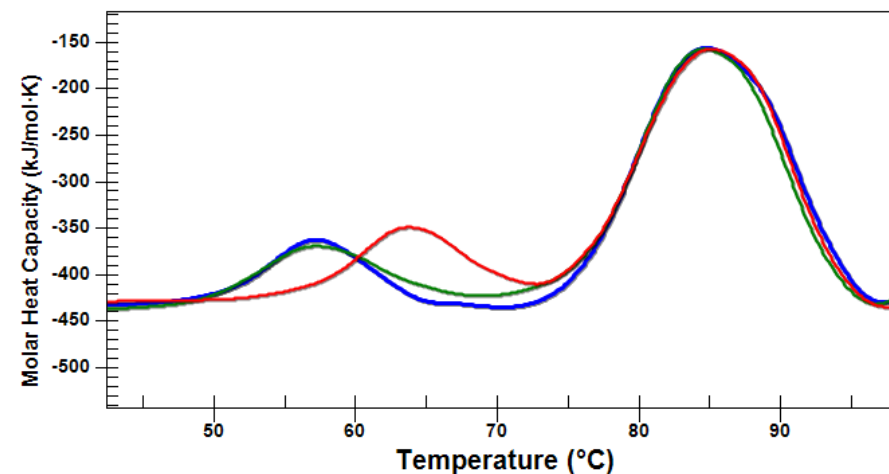
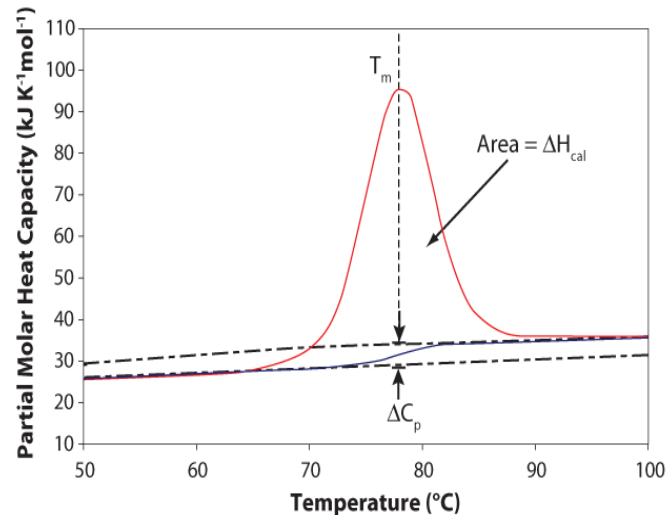


- ベースライン/積分範囲の設定
- ブランク減算
- 各種モデル式に対応したデータモデリング
- 測定条件の最適化
 - パラメータを入力することで結果カーブの予測や、実験条件の最適化を行うことが可能

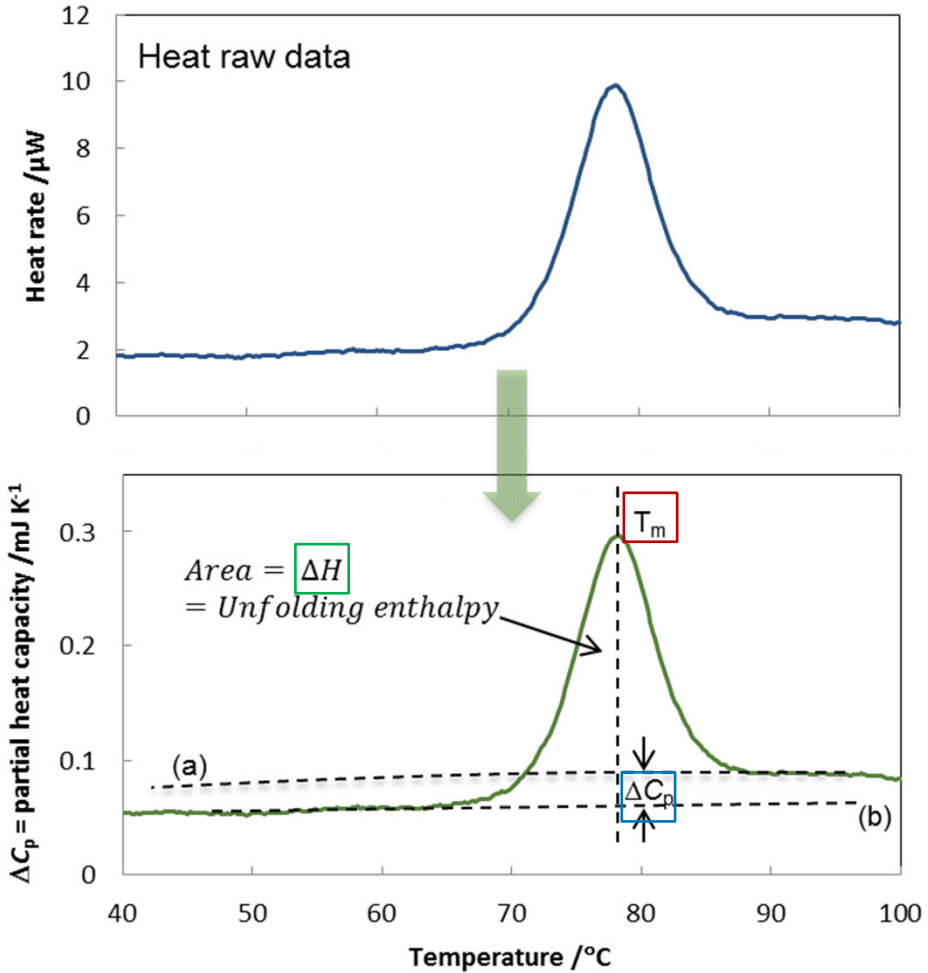
Nano DSC (Differential Scanning Calorimeter)

温度を変化させた際に生じる構造変化に伴う熱量を測定

- 既知の濃度の液体サンプルをセルに充填
- リファレンス試料(バッファー等)をリファレンスセルに充填
- 温度範囲および走査速度をプログラム
- 得られるピークは分子のunfoldingを直接測定したもの。変性温度やエンタルピー変化を得ることができる。サーモグラムを比較することで熱的安定性を比較することができる



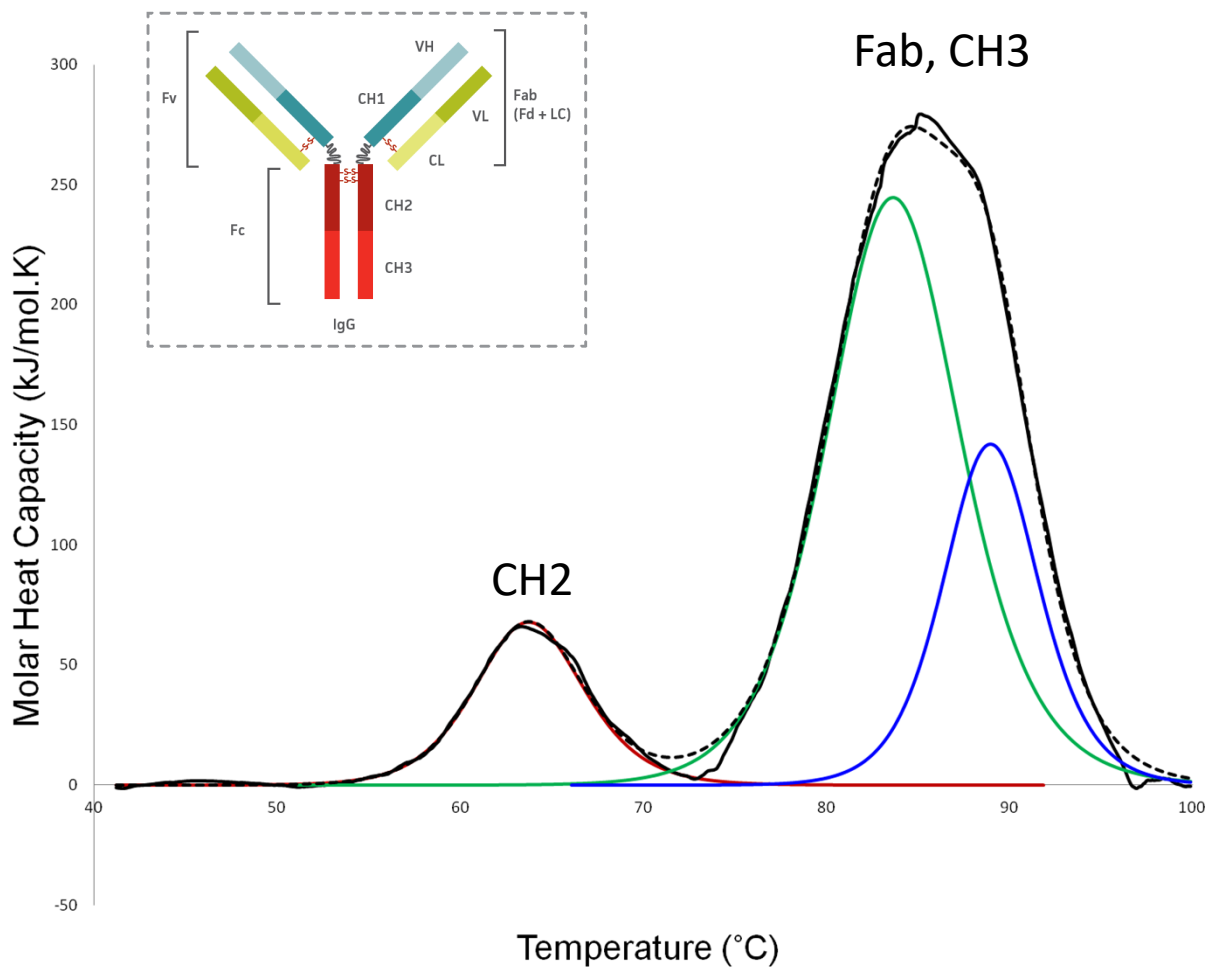
DSC測定から得られる情報



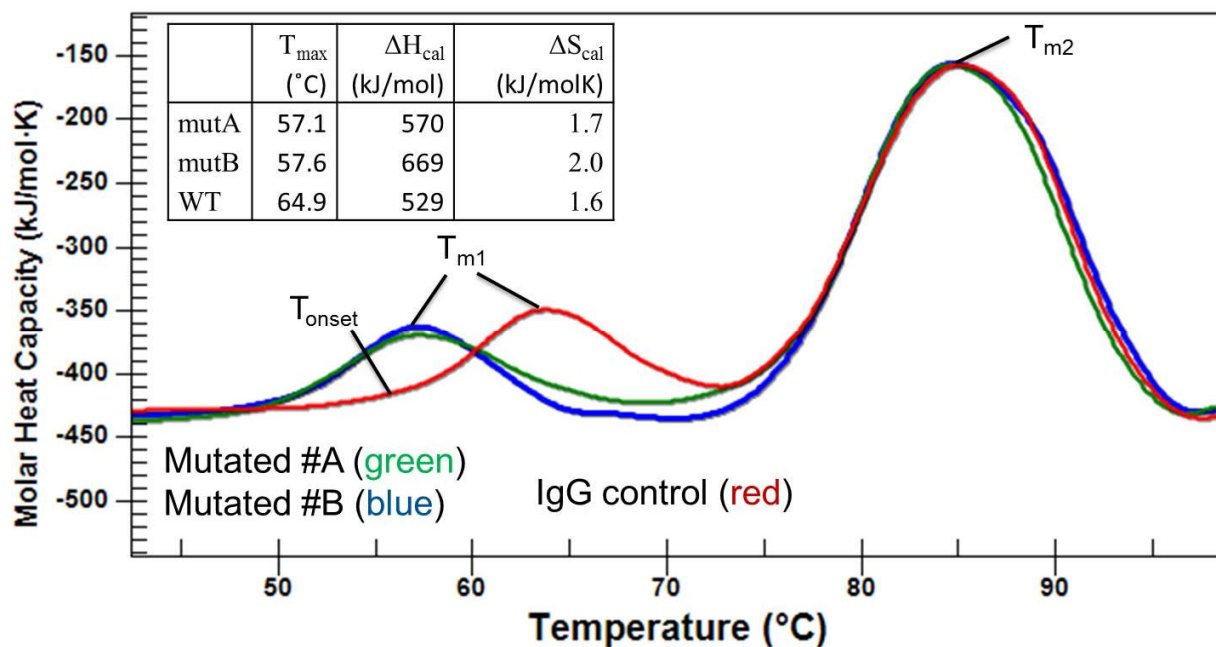
A DSC trace of 42 μg Lysozyme (conc. 0.14 mg/ml) in glycine buffer at pH 4. The horizontal dotted lines represent the heat capacity functions of the unfolded state (a) and native state (b).

- 変化の midpoint がタンパク質の変性温度, T_m
- ピーク面積が転移のエンタルピー変化, ΔH
 - 'カロリメトリックエンタルピー'と呼ばれることもある(\leftrightarrow ファントホッフエンタルピー)
- 転移前後で外挿した線が (b) native state および (a) unfolded state の熱容量曲線
- T_m における熱容量曲線の差が転移によって生じた熱容量変化, ΔC_p
 - 内部の疎水部が水に露出したことによって生じる水和効果による変化

サーモグラムのデコンボリューション (例: IgG抗体)



- カーブフィッティングによりDSCサーモグラムの複数のピークに分離(デコンボリューション)
- IgG抗体の例
 - 3つのピーク
 - それぞれのピークは各ドメインのunfoldingに対応



- コントロールおよび2つの変異バッチのIgG抗体
- 変異体では低温側のピークが低温にシフト
- 変異により不安定化している
- 他のドメインは変化をうけていない

Nano DSC & Nano DSC Auto

Differential Scanning Calorimeter, 示差走査熱量計

高感度で再現性・安定性に優れた生体高分子用DSC装置です

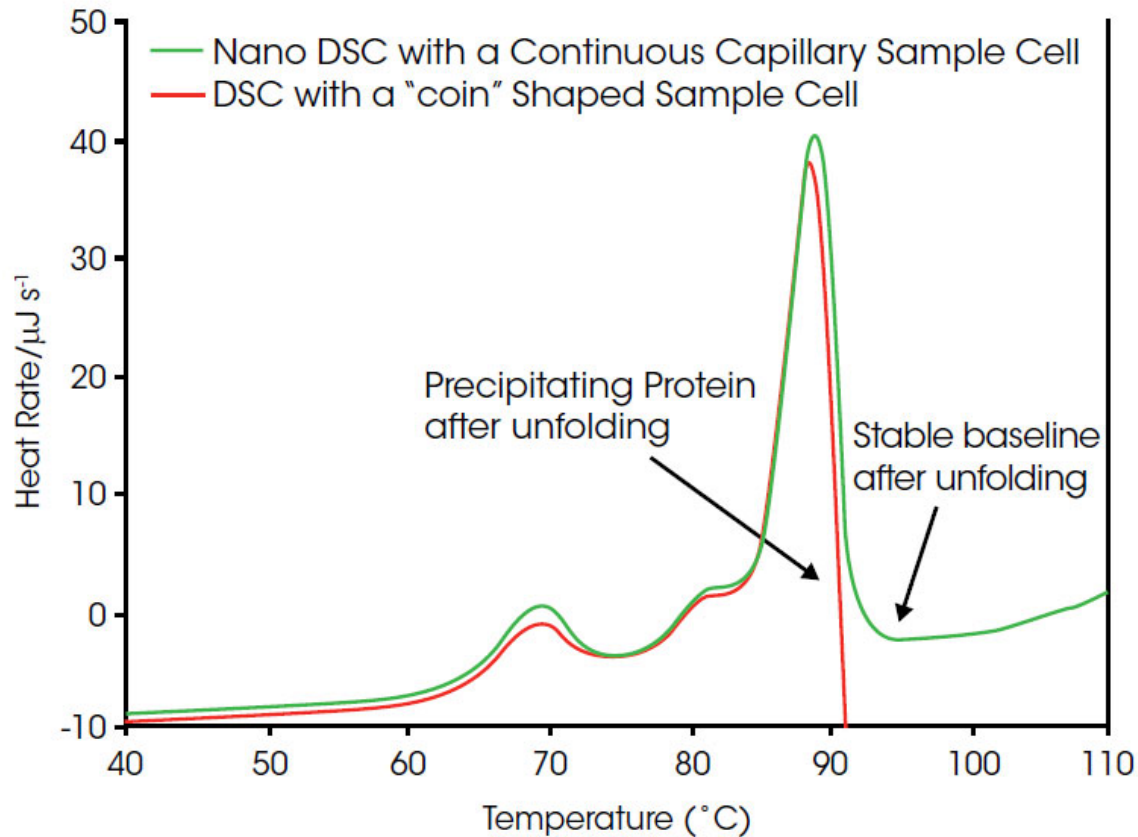
特徴

- キャピラリープラチナセル
 - 凝集や沈殿を生じやすいサンプル分析に適した固定型キャピラリーセルデザイン
 - プラチナ製。不活性で、強酸、強塩基やタンパク質洗浄酵素にも対応
 - 実効セル容量300 μL 。試料の使用量を最小限化
- 固体熱電素子温度コントロール
 - 正確で再現性のよい温度制御。高感度な加熱/冷却スキャンおよび優れたベースライン再現性を実現
- 内蔵型の高精度加圧システム(6 atmまで、プログラム可能)
- 96ウェルオートサンプラー



Nano DSCセル

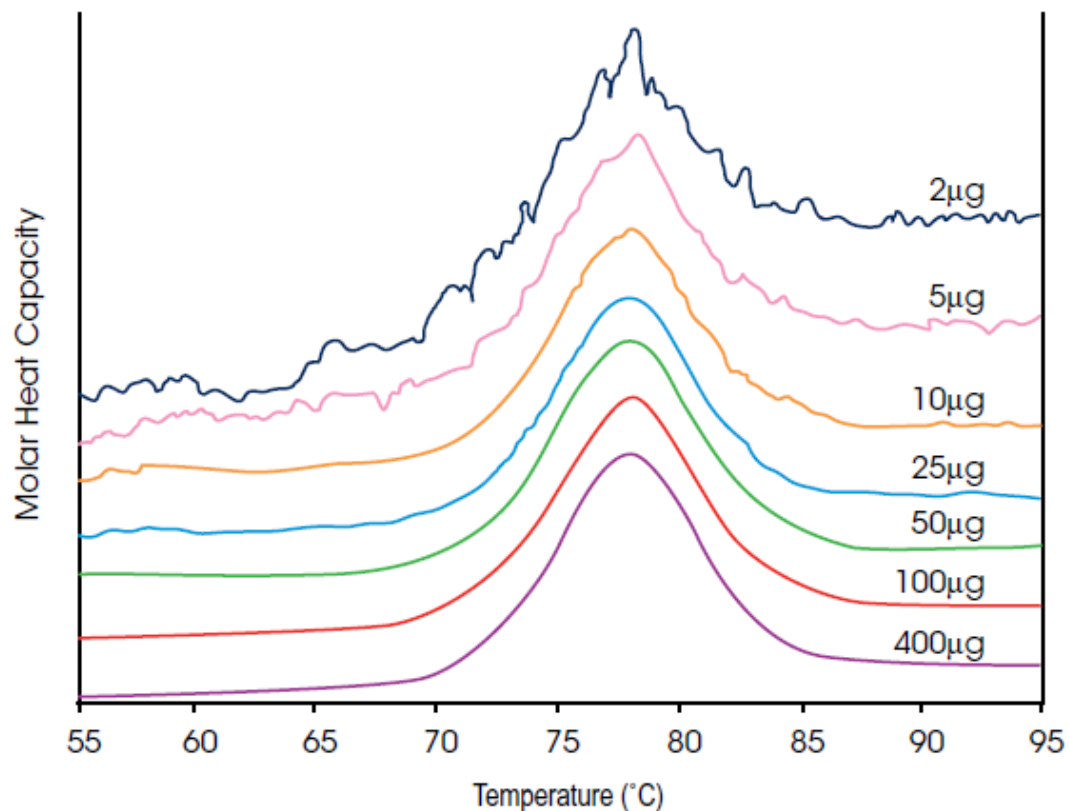
キャピラリーセルの利点



0.5 mg/mL 精製ヒトIgG₁モノクローナル抗体

- 凝集/沈殿しやすいサンプルでも安定したベースラインを得ることが可能
- 正確な T_m 値, エンタルピーを求めることができる

どのくらいのタンパク質が必要か

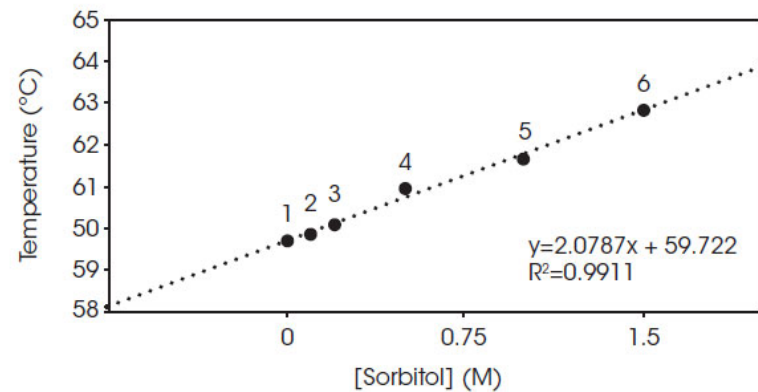
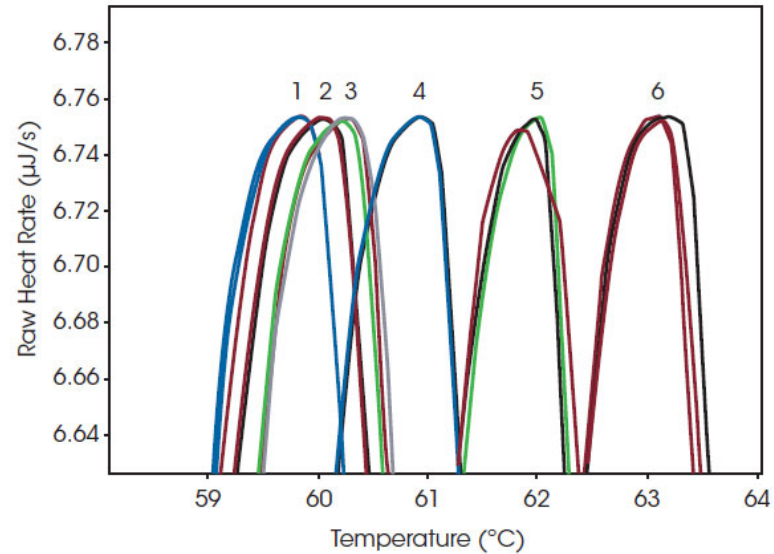


- 各種濃度で調製したlysozyme (pH 4.0, glycine buffer)
- キャピラリーセル内にlysozymeが2 μgの場合でも十分に検出できる感度
- 熱力学的パラメータも正確に得られる

Lysozyme in cell (μg)	Calorimetric		Van't Hoff	
	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (kJ K ⁻¹ mol ⁻¹)	T_m (°C)	ΔH (kJ mol ⁻¹)
400	512	1.46	78.0	515
100	512	1.46	78.0	509
50	517	1.47	77.9	513
25	513	1.46	77.8	513
10	515	1.47	78.0	515
5	490	1.40	78.0	510
2	503	1.43	77.8	499

Nano DSCの再現性

過溶化剤(Sorbitol)の添加による影響



- Sorbitol濃度を変えて調製したlysozyme (1 mg/mL, glycine buffer, pH3.2)
- Sorbitol濃度: 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 1.5 M
- Sorbitol濃度による T_m 値の変化は非常に小さい(約3 $^{\circ}\text{C}$)
- わずかな変化でもSorbitol濃度と T_m 値の線形性を明らかにできる

- ITCやDSCを使用して，分子間の相互作用に関する熱力学的情報や，タンパク質の安定性について評価ができます
- Affinity ITC, Nano ITC, Nano DSCは高感度で，使いやすく，信頼性の高いデータを得ることができるマイクロカロリメータです

