

# SPR innovation

～オプトクエストが示す分子間相互作用解析の新たな扉～

## 標準コンテンツ【応用編1】

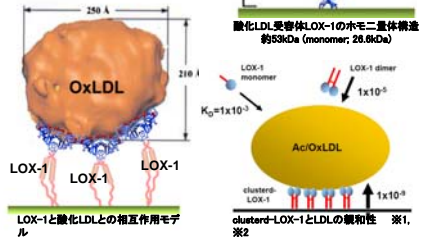
## ～SPR02による酸化LDL受容体LOX-1の酸化LDL認識機構の解明

研究協力: 広島大学 橋 真一 先生  
(大学院 理学研究科)

酸化LDL受容体蛋白質LOX-1(Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1)は、血管内皮細胞上に存在する主要な酸化LDL受容体として発見された。このLOX-1に対する酸化LDLの結合は、動脈硬化発症初期過程のトリガーとなることが、現在までの研究で明らかになった。従って、動脈硬化発症初期過程の阻害を薬学的に考えたとき、LOX-1の酸化LDL認識機構の解明は非常に重要な研究と言える。

～LOX-1は、酸化LDLをどのように認識するのか?～

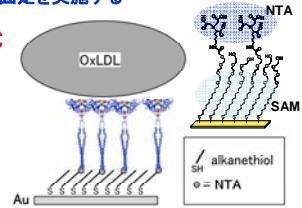
最近、広島大学のTateらは、デキストラン層のStreptavidinを介してLOX-1を固定化し、酸化LDLとの相互作用をSPRセンサで測定した。その結果、LOX-1のクラスター構造の形成が、酸化LDLの特異的な認識を実現するという相互作用モデルが明らかになった※1, ※2。



※1: Ohts, et al. Surface plasmon resonance study on functional significance of clustered organization of lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1). *Biochim. Biophys. Acta* (2010) in press  
※2: 山田 眞幸, 橋 真一, 大木 点 智 一. 酸化LDL受容体蛋白質LOX-1の酸化LDL認識機構の解明. 第19回日本生化学会大会, 2010年12月07日大田市, ポスター発表 (1P-0008)

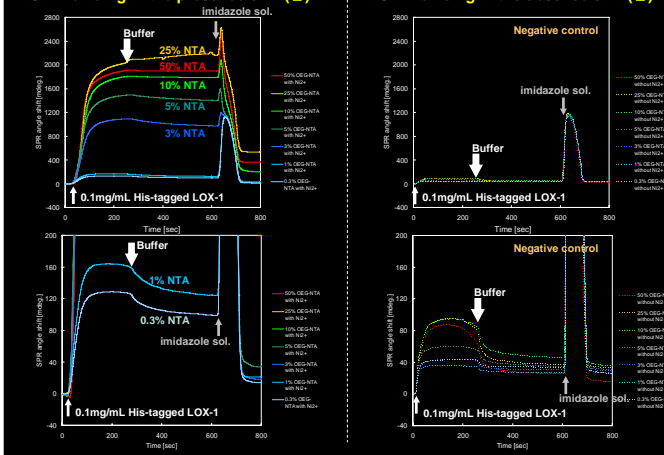
～2次元SAMにより、細胞表面を模倣したリガンド固定を実施する～

本研究では、細胞表面層上でのLOX-1の存在様式をより忠実に反映した系を構築し、クラスター状態にあるLOX-1による基質認識機構の詳細な解析を目指す。そのために、2次元の自己集積性膜 SAM (self-assembled monolayer) 上にLOX-1の細胞外ドメイン全長を再構成する実験を、SPR02により実施した。

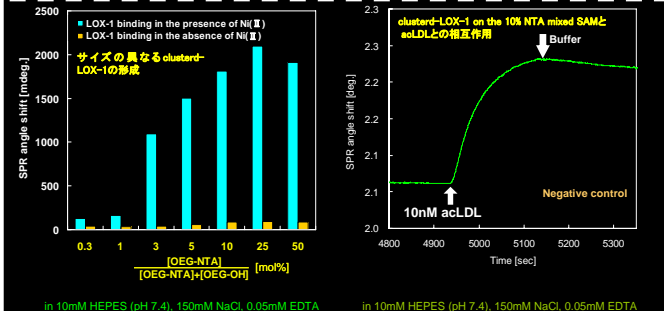


## サイズの異なる cluster-LOX-1の形成検証 ※LOX-1は、広島大学大学院 山田 眞幸 様にご提供いただきました

0.3, 1, 3, 5, 10, 25, 50% NTA mixed SAMを用いたLOX-1 binding by SPR02



in 10mM HEPES (pH 7.4), 150mM NaCl, 0.05mM EDTA



in 10mM HEPES (pH 7.4), 150mM NaCl, 0.05mM EDTA and 0.05%(v/v) Tween-20

## 標準コンテンツ【応用編2】

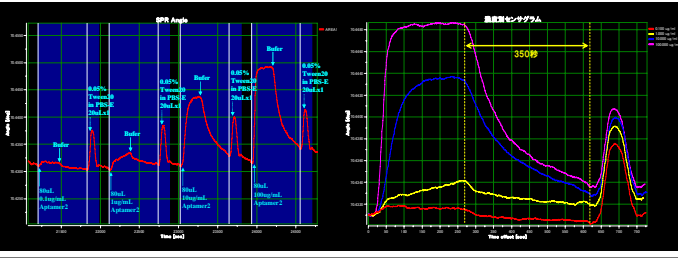
研究協力: 昭和大学 荒川 秀俊 先生  
(大学院 薬学研究科)

## ～SPR02による薬剤候補の探索

血液凝固を促進するトロンビンに対する阻害剤は、薬剤として応用可能であり、TBA (Thrombin-binding aptamer) はその候補である。今回、トロンビンとTBAの相互作用を調べ同時に新規アプタマー候補のスクリーニング系を構築した。



トロンビンとTBAとの相互作用モデル※ (TBAは棒状のDNAアプタマー)  
※Marina Martin-Hidalgo, University of Puerto Rico



## 標準コンテンツ【基本編】

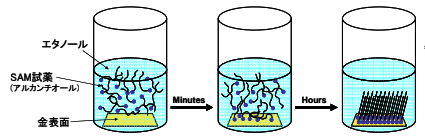
## ～SPR02によるAFP(alpha-fetoprotein)の高感度センシング～

SPRによる測定では、リガンド分子の固定化状態やアライト検出時の実験条件により、結果が大きく変動してくる。信頼性の高いデータを取得するために重要なのは、

1. 非特異的信号(Noise)を出来るだけ低減すること
2. 特異的信号(Signal)を上昇すること
3. 得られたSignalとNoiseを確実に分離すること、

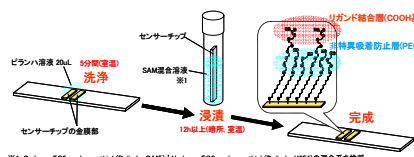
である。上記3に関しては、Reference等を用いた実験系の組み方が重要となるが、1と2については、適切なリガンド固定化法を選択することが最も重要と考えられる。ここでは、比較的容易に1と2の目的を達成できる自己組織化膜 SAM (self-assembled monolayer) を用いた固定化法を腫瘍マーカーAFP (alpha-fetoprotein) の検出に伴って実施した。

～SAMとは、どのようなものか?～



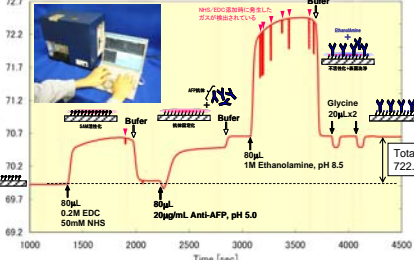
金基板を、チオール等の硫黄化合物を含む溶液に浸漬すると、高密度かつ高配向な2次元の自己集積性膜が形成される。これらはSAMと呼ばれ、異なるSAM試薬を混合すれば、表面状態を空間的に制御することも可能になる。作製プロセスが容

～SPR02のチップ上でSAMを作製してみる～



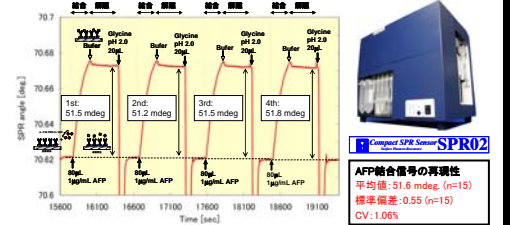
センサチップを洗浄してから、SAMを形成するまでの実質的な作業時間は、わずか20分程度であった(途中の浸漬時間は除く)。

～SPR02を操作して、抗体を固定化してみる～



センサ表面へのAFP抗体の固定化によるSPRの角度変化量は、約722mdegであり、一般的な物理吸着法で得られる500-600mdegよりも多くの抗体を固定化可能であることが分かった。また、反応に使用した抗体のサンプル量は物理吸着法の約10分の1であった。

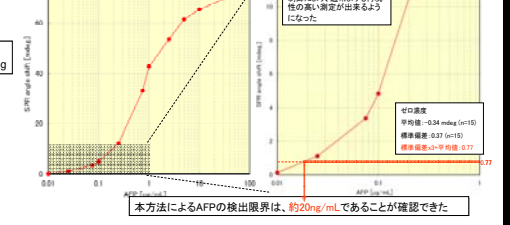
～AFP結合信号の再現性からセンサ性能を評価する～



AFP結合信号の再現性  
平均値: 51.6 mdeg. (n=15)  
標準偏差: 0.55 (n=15)  
CV: 1.06%

AFP添加によるSPRの角度変化量は51-52mdegであり、繰り返し再現性のCVは約1%と、極めて良好であった。酸性条件でAFPが完全に解離することからも、本検出系での非特異的成分(Noise)は非常に少ないと判断できた。

～AFP結合信号の濃度依存性と検出限界を算出する～



本方法によるAFPの検出限界は、約20ng/mLであることが確認できた