

高性能 UV/Vis 分光光度計を用いた 生体分子の特性解析

Agilent Cary 3500 UV-Vis によるオリゴヌクレオチドおよび
タンパク質研究の加速



著者

Wesam Alwan
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

分子生物学の研究は、生物の細胞内の生化学的プロセスや分子のプロセスを理解する上で重要な役割を果たします。これらのプロセスには、脂質・炭水化物・タンパク質・核酸の相互作用が含まれます。生体分子の特性解析は、生物の発生・成長や疾患のメカニズムを理解し、治療法の開発を加速する上で重要です。オリゴヌクレオチドやタンパク質など、研究者の興味を引き、治療薬として使用される生体分子の例がいくつかあります。

オリゴヌクレオチドは、DNA または RNA の鎖と塩基ペアを形成するように設計された短い DNA です。オリゴヌクレオチド配列の正確かつ再現性のある合成の進歩により、オリゴヌクレオチドへの注目が高まっています。¹オリゴヌクレオチドは、創薬、研究、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）やマイクロアレイベースのアッセイなどの診断検査キットで広く使用されてきました。オリゴヌクレオチドは、迅速な開発が可能で、標的となるウイルスの遺伝子配列に対して特異的であるため、ウイルスに対するワクチン開発にも使用されています。

タンパク質は、この 25 年で治療薬としてより頻繁に使用されるようになった生体分子のもう 1 つの例です。²最初のタンパク質治療薬は、糖尿病の治療のために開発されたインスリンでした。タンパク質治療薬は、免疫応答に影響を与えるモノクローナル抗体、または細胞プロセスで触媒やメッセンジャーとして作用する酵素の場合があります。

生体分子の機能を理解するために、さまざまな分析と特性解析手法が用いられます。UV-Vis 分光光度計は生体分子の特性解析研究に適した確立された技術ですが、Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計 (図 1) には生体分子研究を加速する多くの機能と利点があります。



図 1. 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。

UV-Vis 分光光度計による生体分子の特性解析

UV-Vis 分光光度計は、タンパク質と核酸の特性解析評価を行うための重要なツールです。この技術により、生体分子の量 (濃度など) と質、安定性 (熱融解や緩衝液の適合性など)、生化学的活性に関する情報が得られます。この技術概要では、この技術の 6 つの活用法について概説します。

安定性試験

UV-Vis 分光光度計は、タンパク質とヌクレオチドの安定性の研究に利用できます。吸光度の変化が、時間経過、温度変化、塩濃度などのバッファ条件の違い、化学変性剤 (尿素など) の有無などに応じてモニタリングできます。UV-Vis から、生体分子の分解、凝集、または構造変化に関する貴重な情報が得られます。

タンパク質の凝集

タンパク質は 280 nm 付近の光を吸収しますが (芳香性アミノ酸のトリプトファン、チロシン、フェニルアラニンの存在による)、350 nm の光は吸収しないため、UV-Vis 分光光度計を用いて約 350 nm の散乱光を測定することでタンパク質の凝集を調べることができます。タンパク質の機能は構造と密接に関連しているため、タンパク質の凝集に関する解析はタンパク質治療法の研究に有用です。UV-Vis 分光光度計は、この研究分野で極めて重要なデータを提供するシンプルで高速な分析ソリューションです。

比較研究

UV-Vis 分光光度計は高速な技術であるため、比較研究に役立ちます。吸収スペクトルが得られることに加えて、スペクトルの二次微分を用いて、より高い解像度で特徴の解析ができます。二次微分法は複雑なタンパク質スペクトルの分解が可能であるため、タンパク質構造内の芳香族側鎖 (トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン) の局所微小環境における変化を高感度で測定できます。それぞれのスペクトルを比較することで、バッファ、pH、極性、またはさまざまな賦形剤の存在の変化によって生じるタンパク質の構造変化を検出可能です。

熱溶融 (T_m)

熱安定性もタンパク質と核酸の両方にとって非常に重要な評価指標です。核酸の場合、温度が上昇すると二本鎖ヌクレオチドが一本鎖に変性しますが、この変性が起こる温度は主にヌクレオチドの組成と配列に依存します。制御された条件下で UV-Vis 分光分析を用いて、温度を徐々に変化させながら吸光度を測定できます。温度を上昇させながら、単一波長または全範囲の波長スキャンをモニタリングする実験が可能です。熱溶融データは、オリゴヌクレオチドの同一性確認、品質管理目的、タンパク質と核酸の相互作用の解析、および熱安定性オリゴヌクレオチドのスクリーニングに使用できます。

定量および品質管理

UV-Vis はヌクレオチドやタンパク質の定量に広く使用されています。ヌクレオチドは 260 nm の光を吸収するため、他の波長での吸収をモニタリングすることで汚染物質の存在を示すことができます。例えば、260/280 および 260/230 比を使用して、単離された核酸の純度を決定したり、フェノールまたはその他の有機またはタンパク質の汚染物質を同定したりすることが可能です。タンパク質の定量には、ブラッドフォードアッセイなどの UV 活性色素を使用することにより、純粋なタンパク質と混合物の両方に UV-Vis 分光光度計を使用できます。タンパク質/ヌクレオチド中の不純物の検出は、ダウンストリームプロセスの正常動作を保証する品質管理環境における重要なステップです。UV-Vis 分光分析は迅速かつ簡便な非破壊分析技法であり、タンパク質とヌクレオチドの両方にとって理想的な定量方法です。

酵素活性

UV-Vis 分光光度計は酵素反応の解析に有用です。UV-Vis で、反応の進行に伴う吸光度の経時的変化を測定します。例えば、基質または補因子が光を吸収する場合、基質が反応で消費されるにつれて吸光度が減少するのを経時的にモニタリングできます。逆に、反応生成物が光を吸収する場合は、反応が進むにつれて吸収レベルは時間の経過とともに増加します。

吸光度データを使用して、反応速度定数や触媒効率を決定し、反応阻害剤の特性解析を行うことが可能です。波長スキャンを繰り返し実行し、吸光度の変化をモニタリングすることによって、酵素活性を解析することができます。これらの研究を行うためのより簡単な方法は、単一波長での吸光度の変化の測定です。

生体分子の特性解析における Cary 3500 UV-Vis の利点

Cary 3500 UV-Vis は、製薬およびバイオ医薬品研究における液体分析アプリケーションに独自の測定機能を提供するダブルビーム分光光度計です。この機器には、アプリケーションに合わせたさまざまな UV-Vis サンプル測定モジュールを取り付けることができます。

Cary 3500 マルチセルおよびコンパクト UV-Vis モジュールは、キュベットベースのアプリケーション向けの測定ソリューションを提供するので、分子生物学研究に適しています。これらのモジュールは、低容量サンプルの分析に適した小容量キュベットを含め、それぞれ最大 8 個と 2 個のキュベットを収容できます。

8 ポジションのマルチセルを取り付けた場合、ユーザーは 8 つのチャネルすべての同時測定機能を利用できます。この機器にはマルチセルホルダが内蔵されており、冷却水を使用しない空冷式ペルチェ装置を用いて 0 ~ 110 °C の間の 4 つの異なる温度ゾーンでサンプルの温度を制御します。一体型のキュベット内温度プローブが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、高速の昇温速度の適用機能など、測定中の溶液の温度制御が実現されます。コンパクトシステムは、周囲温度での実験および温度制御された実験を実施することもできます。

あるいは、マルチセルを備えた Cary 3500 UV-Vis は、結果の精度を損なうことなく、7 つのサンプルとリファレンスを同時に測定可能です。機器の設計によりサンプルの最低 3 回の繰り返し分析を同時に測定する機能を有しており、繰り返し分析測定が必要なラボにとって貴重な時間の節約につながります。

3500 は、Agilent Cary UV ワークステーションソフトウェアを使用して完全に制御されます。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。

生体分子の特性解析における Cary 3500 の利点について、その概要を図 2 に示します。

より短い時間でより多くの成果

- 8チャンネル同時測定
- すべてのチャンネルで同時に全波長範囲の
スキャンを実行



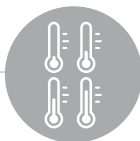
ランプ交換の頻度とコストの削減

- 10年間の交換保証付き長寿命
キセノンフラッシュランプ
- 毎日のウォーミングアップの負担を
軽減
- ユニークなキセノンフラッシュランプ
UV-Vis 範囲をカバーする高品質
データのソース



4つの異なる温度における サンプルの同時測定

- 速度論的分析実験など、温度に
関連するすべての UV-Vis 実験に
最適なソリューション



オリゴヌクレオチドの高速熱融解

- 0.5~40 °C/min で昇温可能
- あらゆる昇温速度における精度、再現性、
信頼性の向上



少量の測定

- 超微量キュベットを使用した少量測定
(50 µL)
- 高度に集束されたビーム、位置合わせ
は不要
- 高い再現性



生体分子分析のためのより深い知見

- タンパク質とオリゴヌクレオチドの
正確な定量
- 恒温制御と昇温制御の両方を対象と
した最先端技術



強かつ柔軟な解析ソフトウェア

- 50以上の組み込み計算とカスタマイズ
可能な計算
- 計算はメソッド内に保存でき、サンプル
収集後に自動適用可能
- オプションの OpenLab ソフトウェアで
データを安全に取得して保存するための
技術的制御を提供



持続可能性目標の達成

- このシステムは、製品ライフサイクル全体に
わたる環境への影響について独立した
監査と検証を経て、My Green Lab の ACT
ラベル (Accountability = 説明責任、
Consistency = 整合性、Transparency =
透明性) を取得



図 2. 生体分子の特性解析における Cary 3500 UV-Vis 分光光度計の特長と利点

生体分子の特性解析における Cary 3500 UV-Vis アプリケーションの例

Cary 3500 UV-Vis システムは、以下をはじめとする生体分子特性解析のさまざまな側面で使用されてきました。

- 成熟 tRNA の熱変性³
- 光活性化可能な環状ケージドオリゴヌクレオチドの熱溶融特性解析⁴
- 組み換え EcSTH の酵素活性アッセイのモニタリング⁵
- DNA の定量⁶
- 動的光散乱を使用したタンパク質-AuNP 複合体の流体力学的直径の測定⁷
- UBQLN2 タンパク質の液液相分離の濁度分析研究⁸

結論

Agilent Cary 3500 UV-Vis 分光光度計は、熱安定性、定量、カイネティクスの研究など、生体分子の特性解析アプリケーションに広く使用されています。さまざまな研究グループがこのシステムを使用して、オリゴヌクレオチドとタンパク質の理解を深めています。

マルチセルを備えた Cary 3500 UV-Vis は、8 チャネルを同時にモニタリングすることで結果を得るまでにかかる時間を短縮できるため、生体分子アプリケーションに特に有用です。ペルチェ技術により、比類のない実験再現性が保証され、温度制御された 4 つの実験を同時に実施できます。

Agilent Cary UV ワークステーション機器コントロールソフトウェアには、自動化され、世界的な薬局方の要件に準拠した一連の稼働時適格性評価試験が含まれています。

Cary 3500 UV-Vis 独自の設計と性能機能は、ユーザーがアプリケーションの実験計画を最適化するのに役立ち、公開されている一連の研究からも、信頼性のある最終結果が得られることがわかります。

www.agilent.com/chem/cary3500uv-vis

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。

DE44443809

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2024

Printed in Japan, February 5, 2024

5994-7043JAJP

参考文献

1. Lundin, K. E.; Gissberg, O.; Smith, C. L. Oligonucleotide Therapies: The Past and the Present. *Hum. Gene Ther.* **2015**, *26*(8), 475–85.
2. Leader, B.; Baca, Q.; Golan, D. Protein Therapeutics: A Summary and Pharmacological Classification. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 21–39.
3. Lai, L. B.; Lai, S. M.; Szymanski, E. S.; Kapur, M.; Choi, E. K.; Al-Hashimi, H. M.; Ackerman, S. L.; Gopalan, V. Structural Basis for Impaired 5' Processing of a Mutant tRNA Associated with Defects in Neuronal Homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2022** Mar 8, *119*(10), e2119529119.
4. Yang, L.; von Trentini, D.; Kim, H.; Sul, J. Y.; Eberwine, J. H.; Dmochowski, I. J. Photoactivatable Circular Caged Oligonucleotides for Transcriptome In Vivo Analysis (TIVA). *ChemPhotoChem.* **2021** Oct., *5*(10), 940–946.
5. Pan, X.; Heacock, M. L.; Abdulaziz, E. N.; Violante, S.; Zuckerman, A. L.; Shrestha, N.; Yao, C.; Goodman, R. P.; Cross, J. R.; Cracan, V. A Genetically Encoded Tool to Increase Cellular NADH/NAD⁺ Ratio in Living Cells. *Nat. Chem. Biol.* **2023** Oct 26.
6. Kline, M. C.; Duewer, D. L. Evaluating Digital PCR for the Quantification of Human Nuclear DNA: Determining Target Strandedness. *Anal. Bioanal. Chem.* **2020** Jul., *412*(19), 4749–4760.
7. Riley, M. B.; Strandquist, E.; Weitzel, C. S.; Driskell, J. D. Structure and Activity of Native and Thiolated A-Chymotrypsin Adsorbed onto Gold Nanoparticles. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2022**, *220*, 112867.
8. Raymond-Smiedy, P.; Bucknor, B.; Yang, Y.; Zheng, T.; Castañeda, C. A. A Spectrophotometric Turbidity Assay to Study Liquid-Liquid Phase Separation of UBQLN2 In Vitro. *Methods Mol. Biol.* **2023**, *2551*, 515–541.

詳細

- Cary 3500 マルチセル UV-Vis 分光光度計
- Cary 3500 コンパクト UV-Vis 分光光度計
- Cary UV ワークステーションソフトウェア
- GMP 施設のデータインテグリティ実現のために - Agilent Cary 3500 UV-Vis 向け Cary UV ワークステーションソフトウェア
- UV-Vis 分光分析と分光光度計の基礎サイト