

報 告

グルタチオン S-トランスフェラーゼとグルタチオンとの  
相互作用をモデルとした示差走査蛍光定量法による  
分子間相互作用の解析に関する検討

渡邊政博\*, 豊村隆男, 森秀治  
就実大学薬学部 生体情報学 / 大学院医療薬学研究科 分子標的治療薬学

**Application of differential scanning fluorimetry  
for analyzing molecular interactions  
: a model study on the interaction between  
glutathione S-transferase and glutathione**

Masahiro Watanabe\*, Takao Toyomura, Shuji Mori  
*Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Shujitsu University*  
*Department of Pharmacology, Graduate School of Clinical Pharmacy, Shujitsu University*  
(Received 6 November 2020; accepted 18 January 2021)

---

**Abstract:** To elucidate the physiological and/or pathophysiological roles of biomolecules, the methods for analyzing molecular interactions appear to be useful. So far, we have utilized the classical methods such as pull-down assay or gel shift analysis using native PAGE for studying the action mechanisms of proinflammatory molecules. However, it has been difficult for some biomolecules to perform functional analysis using these methods because of their conformational instabilities. To solve these difficulties, we tried to employ differential scanning fluorimetry (DSF) for analyzing the molecular interactions with the widely-used real-time PCR instrument and the popular software available at a low cost. As the model case, the interaction between glutathione S-transferase and glutathione was analyzed by detecting melting temperature ( $T_m$ ) of the protein and  $T_m$  shift by the protein–ligand interaction. The results clearly indicated the significant molecular interaction, suggesting that DSF has a high potential to analyze the molecular interactions.

Keywords: Differential scanning fluorimetry, Thermal shift assay, Protein–ligand interaction

## 緒言

生体分子の作用メカニズムを解析するためには、分子間の相互作用をとらえる手法が必要不可欠である。これまでに我々は、終末糖化産物やダメージ関連分子パターンの作用メカニズムを解析する過程で、分子間相互作用を明らかにするためにプルダウン法や native PAGE によるゲルシフト法などの手法を活用してきた<sup>1-3)</sup>。これらの手法は、古くから用いられている手法であり、汎用実験機器を用いて低コストで実施でき、その適用範囲は幅広い。一方で、解析対象であるタンパク質分子を担体に固定化する際に分子間相互作用に必要な領域が遮蔽されることや、タンパク質自体が native PAGE に不適合であることなどにより解析困難となる事例が少なからず認められた。そのため我々は、これら以外の手法の導入を模索してきた。

分子間相互作用を解析する手法としては近年、表面プラズモン共鳴法 (Cytiva 社, Biacore システムなど) や水晶振動子マイクロバランス法 (ULVAC 社, AFFINIX システムなど) などが開発されている<sup>4)</sup>。これらの手法では、対象となる分子を非標識で解析することができるため、標識による影響や分子自体の性状を考慮する必要性が低い。さらに、分子間の親和性を定量的に評価することが可能である。しかしながら、これらの手法に必要な装置や消耗品は、いずれも高価であり、誰もが容易に利用できるものとはいえないのが現状であった。

そこで我々は、これまでに述べてきたものとは異なる原理に基づいた手法であり、かつ高価な測定装置の導入を要しない解析手法として示差走査蛍光定量法 (Differential scanning fluorimetry, DSF) による分子間相互作用解析<sup>5)</sup>に着目した。タンパク質は、温度上昇に伴い分子内の高次構造がほどけ (いわゆる、アンフォールディング)、

分子の内側に存在している疎水性部位が露出することが知られている。DSF は、SYPRO orange などの疎水性部位と結合することによって蛍光を発する色素を利用し、色素共存下で温度上昇に伴うタンパク質溶液の蛍光強度の変化を測定することにより、アンフォールディングの進行度を検出する手法である。本手法によって、目的タンパク質特有の融解温度 ( $T_m$ ) を算出することができる。さらに、目的タンパク質に特異的な結合性を示す低分子リガンドが共存することによってタンパク質の熱安定性、即ち  $T_m$  がシフトすることから、タンパク質と低分子リガンドとの相互作用の有無を定性的に評価することや特異的結合リガンドのスクリーニングにも広く応用されている。

DSF は前述の手法と比較して、測定対象となる分子の固定化や特別な標識を施すことなく解析を行うことが可能であることから、他の手法で解析が困難であった分子の解析に適用できる可能性が考えられる。また、バイオや医療関連の研究施設に普及している real-time PCR 装置を用いてデータを取得することが可能であることから、導入コストを低く抑えられることも利点である。一方で、real-time PCR により得られたデータから  $T_m$  を算出するには、一定のデータ処理が必要である。過去の報告では、このデータ処理に数値解析ソフトウェアや、専用のソフトウェア (Thermo Fisher Scientific 社, Protein Thermal Shift Software など) が用いられているものの、これらのソフトウェアが高価であること、特定の real-time PCR 装置に特化していること<sup>6)</sup>、特定のデータ処理しか行えないこと<sup>7, 8)</sup>などの問題があり、本法導入の障壁となり得ると考えられた。

そこで本研究では、DSF において  $T_m$  を算出するためのデータ処理を汎用および無料のソフトウェアにより実現する手法の構築を試みた。具体

的には、相互作用を示すことが広く知られているグルタチオン S-トランスフェラーゼ (glutathione S-transferase, GST) とグルタチオン (GSH) をモデル系として用い、安価な 2 種の汎用ソフトウェア (Excel, R) を駆使して我々が構築したデータ解析手法の有用性について検討を行った。その結果、両者間の高い結合親和性を見出すことができ、本データ解析法により低コストで DSF を導入可能となることが示唆された。

## 方法

### Differential scanning fluorimetry (DSF)

本研究では、モデル実験系として GST と GSH の相互作用の検出の可否について検証した。GST は、N 末端側に 6×ヒスチジン (His) タグを付加したリコンビナント体として ExpiSf Baculovirus Expression System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて昆虫細胞内において発現させた。細胞を回収・破碎後、His タグを利用して TALON Metal Affinity Resin (Takara Bio, Kusatsu, Japan) により精製した。この分子 (40 pmol GST) を 100 nmol GSH および Protein Thermal Shift Dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) と混合し、QuantStudio 3 リアルタイム PCR システムにおいて ROX フィルターを用いた融解曲線解析を行った。解析の設定は、25°C, 2 分; 0.05°C/秒にて温度上昇; 99°C, 2 分とした。解析データより、QuantStudio design & Analysis Software version 1.5.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて温度変化に対応した蛍光強度の値を抽出し、データ解析に供した。

### データ解析

はじめに、移動平均によりデータの平滑化を行った。続いて、以下の 3 つの算出法により T<sub>m</sub> の推定を行った。

1. 数値微分による推定：平滑化したデータを前方差分により温度について数値微分し、微分係数

が最大となる (蛍光強度の変化が最大となる) 温度を当該タンパク質の T<sub>m</sub> とした (T<sub>m1</sub>)。

2. Boltzmann 式による推定：蛍光強度が最大となる温度よりも低温の領域において蛍光強度が最低となる温度から、蛍光強度が最大となる温度の間の平滑化したデータを、非線形最小 2 乗法により Boltzmann 式 (式 1)<sup>7,9)</sup> に回帰し、パラメータのひとつとして T<sub>m</sub> を算出した (T<sub>m2</sub>)。

$$F(T) = F(pre) + \frac{\{F(post) - F(pre)\}}{1 + e^{\frac{(T_m - T)}{C}}}$$

式 1 Boltzmann 式。F(T), 温度 T における蛍光強度; F(pre), 蛍光強度が最大となる温度よりも低温の領域における最低蛍光強度; F(post), F(pre) と同じ領域における最高蛍光強度; C, 当該反応におけるエンタルピー。

3. モデルへの曲線回帰とその導関数による推定：2 と同じ領域のデータを、非線形最小 2 乗法により 4 パラメータロジスティック式に回帰し、パラメータを算出した。算出したパラメータの値を入力した 4 パラメータロジスティック式の導関数が最大値を示す温度を T<sub>m</sub> とした (T<sub>m3</sub>)。

計算は、Microsoft Excel for Microsoft 365 (Microsoft, Redmond, WA, USA) (データの平滑化, 1), R version 3.6.3 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) (2, 3, 統計解析) により行った。

### 結果・考察

本法では、温度変化に対応した蛍光強度の変化から標的タンパク質の T<sub>m</sub> を推定することが必要となる。本研究では、Thermo Fisher Scientific 社から市販されている本法の解析ソフトウェアにおいて採用されている 2 つの手法 (数値微分による推定, Boltzmann 式による推定) と、4 パラメータロジスティックモデルへの曲線回帰とそ

の導関数による推定の3手法を比較検討した。これらの手法のうち数値微分による方法は、複数のドメインを有するタンパク質の解析を行う際に現れる可能性のある複数の蛍光ピークに対応した解析を行うことが可能である。一方で、蛍光測定値のノイズに影響を受けやすいという問題を有している。また、Boltzmann式は、2つの状態間の遷移を説明するモデルであり、測定データの回帰を行うことにより、パラメータのひとつとして $T_m$ を算出することができる。この方法を用いる場合、データのモデル化を行うため、測定値のノイズの影響を受けにくくなる。一方で、モデルと実測値の間に乖離が生じた場合、正確な $T_m$ を推定できない可能性が考えられる。そこで我々は、これらの2手法の中間に位置する手法として曲線回帰とその解析解による推定法を考案した。本法では、モデルとして4パラメータロジスティックモデルを採用し、数値微分による方法にならって、その導関数が最大値となる温度を $T_m$ とした。

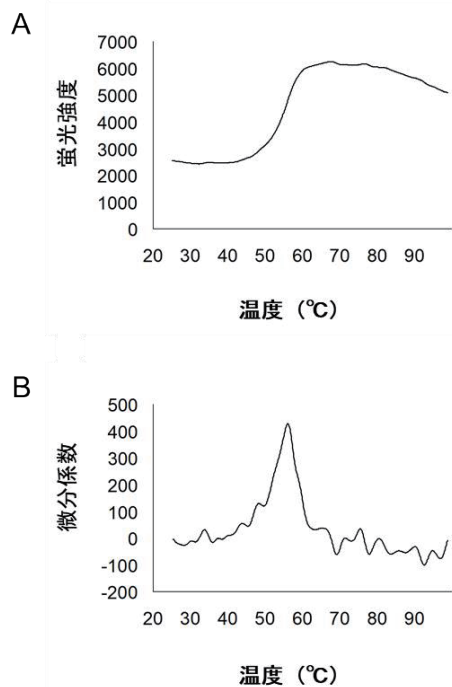


図1 数値微分による $T_m$ の推定。DSF解析により得られた温度-蛍光強度をプロットした(A)。Aを温度について数値微分し、微分係数をプロットした(B)。

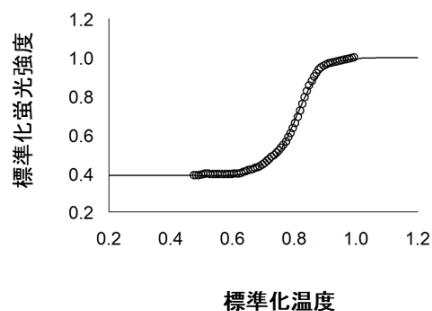


図2 Boltzmann式による $T_m$ の推定。各温度における蛍光強度の実測値(○)(計算範囲における最大値で除算することにより標準化した値, 5ポイント毎)と、曲線回帰により算出したパラメータを入力したBoltzmann式による蛍光強度の計算値(実線)をプロットした。

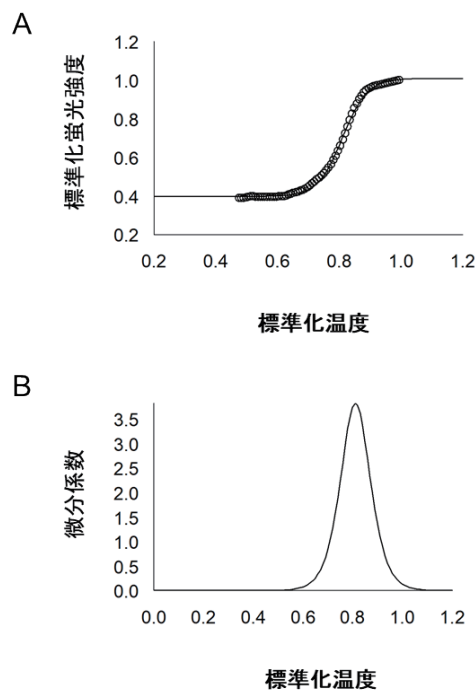


図3 モデルへの曲線回帰とその導関数による推定。各温度における蛍光強度の実測値(○)(図2と同様に処理)と、曲線回帰により算出したパラメータを入力した4パラメータロジスティック式による蛍光強度の計算値(実線)をプロットした(A)。なお、プロットした数値は、計算範囲における最大値で除算することにより標準化した値である。曲線回帰により算出したパラメータを入力したモデル式の導関数をプロットした(B)。

これによりノイズに対する頑健性を有し、かつ2パラメータモデルである Boltzmann 式による方法よりも高精度な推定を行うことができる可能性が考えられた。

なお、これらのデータ処理は汎用の表計算ソフトウェア (Microsoft Excel) と無料の統計処理ソフトウェア (R) を用いて行った。

### DSF 解析による Tm の推定手法の構築

はじめに、これらの手法を用いて GST の DSF 解析と Tm の推定を行った。その結果、図 1A に示した温度-蛍光強度プロットが得られ、その数値解として図 1B を得た。このプロットにおいて微分値が最大となった温度より Tm は 56.1°C と推定された (Tm1)。また、図 1A において蛍光強度の最低値から最大値までのデータについて、Boltzmann 式への回帰を行い、パラメータを算出した。蛍光強度の実測値 (図 2, 丸マーカー) と算出したパラメータを入力した Boltzmann 式による計算値 (図 2, 実線) は、おおむね一致しており残差標準偏差は 0.0121 であった。Tm は 54.6°C と推定された (Tm2)。さらに、同じ領域のデータについて、4パラメータロジスティック式への回帰を行い、パラメータを算出した。蛍光シグナルの実測値 (図 3A, 丸マーカー) と算出したパラメータを入力した 4パラメータロジスティック式による計算値 (図 3A, 実線) は、おおむね一致しており残差標準偏差は 0.0097 であった。続いて、算出したパラメータを入力した 4パラメータロジスティック式の導関数をプロットした (図 3B)。このプロットの最大値をとる温度より Tm は 54.8°C と推定された (Tm3)。以上より、DSF 解析のデータより汎用および無料のソフトウェアを用いて3つの手法により Tm を推定する手法が確立できた。

### DSF 解析によるタンパク質-リガンド間の相互作用の評価

続いて、リガンドとの結合に伴うタンパク質の

Tm の変化を DSF 解析により検討した。GST は、その酵素反応過程において GSH と結合する。そこで、GST 単独のサンプルと、GST と GSH を混合したサンプルにおける Tm を比較した。DSF 解析により、GST の蛍光強度プロットは、GSH の共存により低温側にシフトすることが示された (図 4, 点線)。この解析を n=3 で行い、先に検討した3つの手法により Tm を推定した。その結果、いずれの手法においても GSH の共存により Tm が低下することが示された (データは示さない)。この結果は、GSH との結合により GST の熱安定性が低下したことを示唆している。一般に DSF 解析では、タンパク質はリガンドと複合体を形成することにより安定化され、Tm が上昇すると説明されることが多い。実際に、過去に GST と GSH の相互作用を DSF により解析した報告では、GSH の共存により GST の Tm が上昇することが示唆されている<sup>10)</sup>。現時点においてこの差異が生じた原因について、明確に説明することはできないものの、GST と GSH の比率、DSF に使用した緩衝液や色素、PCR 装置による加熱プログラムの相違<sup>11)</sup>などが影響した可能性が考えられる。この点については、今後さらなる検討を行う必要がある。

また、複合体形成により Tm が低下する分子も報告されており<sup>12)</sup>、新たに解析する分子について実際にどの向きに、どの程度 Tm がシフトするのかを事前に予測することは難しいと考えられ

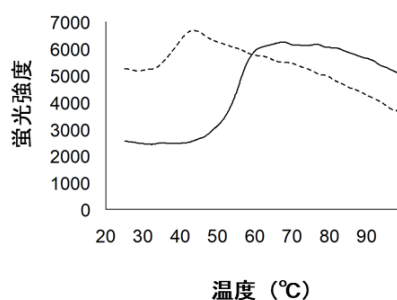


図 4 DSF 解析による各タンパク質の温度-蛍光強度プロット。実線は GST 単独、点線は GSH 共存下の GST を示す。



た。

また、GST を別のタンパク質に置き換えて解析を行ったところ、GST においてみられた Tm のシフトは観察されなかった(データは示さない)。

以上より、さらに検討が必要な点も見出されたものの、本研究において用いた DSF 解析法により Tm の変化を指標としてタンパク質-リガンド間の特異的な相互作用を検出可能であることが示された。

### Tm 推定手法の比較

本研究で測定したデータを用いて3つの Tm 推定手法の比較を行った。

各手法による推定値 (Tm1, Tm2 および Tm3) の平均値を比較したところ、GST および GSH 共存下の GST における Tm1 と Tm2 について、統計学的な有意差が見出された(いずれも  $P < 0.05$ )。そこで、両サンプルの Tm の差の平均値について、同様の検討を行ったところ有意差は見出されなかった(データは示さない)。この結果は、各推定手法により推定される Tm には差が生じるものの、Tm のシフト幅には影響しなかったことを示している。従って、解析対象とする分子によっては、各手法による Tm の推定値に差が生じるものの、この差はリガンド結合による Tm のシフトにおいても維持されるため、結論に差異は生じないことが示唆された。

また、Boltzmann 式による推定と4パラメータロジスティック式を用いた推定について、モデルと実測値との間のずれを反映する残差標準偏差を比較した。その結果、GSH 共存下の GST の測定データにおいて、Boltzmann 式と比較して、4パラメータロジスティック式による手法の残差標準偏差が統計学的に有意な差をもって小さいことが示された ( $P < 0.01$ )。この結果は、当該データにおいてこのモデルが Boltzmann 式によるモデルよりも実際のデータへの適合度が高いことを示している。従って、4パラメータロジスティック式を用いた手法は、モデル化によるノイ

ズへの耐性と、Tm 推定の高精度化を両立できる可能性を有することが示唆された。

続いて、各手法における測定値のノイズへの耐性を比較した。ノイズによる影響を大きく受ける手法では、推定された Tm のばらつきが大きくなると考えられる。そこで、各推定手法による Tm のばらつきを比較したところ、統計学的に有意な差は見出されなかった(データは示さない)。ノイズ耐性が低いとされる数値微分による手法とモデル化による手法の間に違いを見出せなかった理由として、本研究において取り扱ったデータはノイズが少なかった可能性が考えられる。

本研究により、Tm 推定手法については更なる検討が必要であるものの、DSF による分子間相互作用の解析を汎用および無料のソフトウェアを用いて実施する手法を構築することができた。一方で今後、本法の汎用性を確認するために、GST と GSH 以外の既知の相互作用分子をモデル系に用いてさらに検証を進めることが必要であると思われる。

DSF はタンパク質-低分子リガンド間の相互作用解析に広く用いられているものの、タンパク質-タンパク質間の相互作用の解析にも応用可能であることが示唆されている<sup>13)</sup>。また、本法を応用することにより解離定数の算出が可能であることが報告されており<sup>14)</sup>、定性的な分析のみならず相互作用の定量的な分析にも応用できる可能性が考えられる。今後も引き続き本法の改良を継続し、分子間相互作用の解析に応用していきたいと考える。

### 謝辞

本研究は JSPS 科研費 18K06807, 18K14969, ウエスコ学術振興財団およびクリタ水・環境科学振興財団の助成により実施した。

### 引用文献

1) Watanabe M., Toyomura T., Wake H., Liu K.,

- Teshigawara K., Takahashi H., Nishibori M., Mori S.: Advanced Glycation End Products Attenuate the Function of Tumor Necrosis Factor-like Weak Inducer of Apoptosis to Regulate the Inflammatory Response., *Mol Cell Biochem*, 434 (1) 153-162 (2017).
- 2) Watanabe M., Toyomura T., Wake H., Liu K., Teshigawara K., Takahashi H., Nishibori M., Mori S.: The C-terminal region of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis is required for interaction with advanced glycation end products., *Biotechnol Appl Biochem*, 66 (2) 254-260 (2019).
- 3) Watanabe M., Toyomura T., Tomiyama M., Wake H., Liu K., Teshigawara K., Takahashi H., Nishibori M., Mori S.: Advanced glycation end products (AGEs) synergistically potentiated the proinflammatory action of lipopolysaccharide (LPS) and high mobility group box-1 (HMGB1) through their direct interactions., *Mol Biol Rep, in press*
- 4) 今中洋行: 続・生物工学基礎講座 バイオよもやま話 定量的分子間相互作用解析のススメ(前編), *生物工学雑誌*, 96 (5) 266-269 (2018).
- 5) Vivoli M., Novak HR., Littlechild JA., Harmer NJ.: Determination of Protein-ligand Interactions Using Differential Scanning Fluorimetry., *J Vis Exp*, 91 51809 (2014).
- 6) Wang CK., Weeratunga SK., Pacheco CM., Hofmann A.: DMAN: a Java tool for analysis of multi-well differential scanning fluorimetry experiments., *Bioinformatics*, 28 (3) 439-40 (2012).
- 7) Lee PH., Huang XX., The BT., Ng LM.: TSA-CRAFT: A Free Software for Automatic and Robust Thermal Shift Assay Data Analysis., *SLAS Discov*, 24 (5) 606-612 (2019).
- 8) Sun C., Li Y., Yates EA., Fernig DG.: SimpleDSFviewer: A tool to analyze and view differential scanning fluorimetry data for characterizing protein thermal stability and interactions., *Protein Sci*, 29 (1) 19-27 (2020).
- 9) Applied biosystems: Protein Thermal Shift Studies., pp. 88, Publication Part Number 4461808 Rev. A (2011).
- 10) Lea WA., Simeonov A.: Differential scanning fluorometry signatures as indicators of enzyme inhibitor mode of action: case study of glutathione S-transferase., *PLoS One*, 7 (4) e36219 (2012).
- 11) Senisterra G., Chau I., Vedadi M.: Thermal denaturation assays in chemical biology. *Assay Drug Dev Technol*, 10 (2) 128-36 (2012).
- 12) Menchon G., Bombarde O., Trivedi M., Négrel A., Inard C., Giudetti B., Baltas M., Milon A., Modesti M., Czaplicki G., Calsou P.: Structure-Based Virtual Ligand Screening on the XRCC4/DNA Ligase IV Interface., *Sci Rep*, 6 22878 (2016).
- 13) Kopec J., Schneider G.: Comparison of fluorescence and light scattering based methods to assess formation and stability of protein-protein complexes. *J Struct Biol*, 175 (2) 216-23 (2011).
- 14) Bai N., Roder H., Dickson A., Karanicolas J.: Isothermal Analysis of ThermoFluor Data can readily provide Quantitative Binding Affinities. *Sci Rep*, 9, 2650 (2019)