

バイオ計測学特論06

2021年度 第4Q

佐藤しのぶ

本日のトピック

- ITCについて

熱分析と熱量測定

熱分析とは？

熱分析は温度を変化させたことによっておこる物理的変化を測定する手法

例：示差走査熱量測定 (Differential scanning calorimetry、DSC)
示差熱分析 (DTA), 熱重量測定(TGA)

熱量測定(カロリメトリー)

熱量測定は温度と時間の観点から、熱生成の比率、熱および熱容量などを直接決定する測定手段

例：DSC, 等温熱量測定(TAM), 等温滴定熱測定(ITC)

結合に関与する相互作用とは？

- 親水基グループによる非共有結合による相互作用
- 特異性：形状、相補的な極性、水素結合、静電的相互作用等に由来
- 結合は、エンタルピック成分、およびエントロピック成分双方の影響で起こる
- エンタルピック成分：水素結合、ファンデルワールス力、静電的相互作用等。
- エントロピック成分：構造変化や疎水性相互作用による脱水和が影響
- 2分子の結合がある場合：溶媒の影響よりも、2分子間の親和性のほうが優勢

DNAと小分子の相互作用

$$\Delta G = -RT \ln Ka = \Delta H - T\Delta S$$

化合物	結合モード	ΔG (kcal mol ⁻¹)	ΔH (kcal mol ⁻¹)	$-T\Delta S$ (kcal mol ⁻¹)
Berenil	Groove binder	-8.0	+0.6	-8.6
DB75	Groove binder	-9.0	-2.2	-6.8
Propamidine	Groove binder	-7.0	-1.1	-5.9
Distamycin	Groove binder	-10.5	-5.8	-4.7
Netropsin	Groove binder	-8.7	-5.8	-2.9
Doxorubicin	Intercalator	-8.9	-7.4	-1.5
Propidium	Intercalator	-7.5	-6.8	-0.7
Chartreusin	Intercalator	-7.4	-7.1	+0.3
Daunorubicin	Intercalator	-7.9	-9.0	+1.1
Ethidium	Intercalator	-6.7	-9.0	+2.3

Groove binderは、
エントロピーの寄
与が大きい

Intercalatorは
エンタルピーの寄
与が大きい

インターカレーションと グルーブバインディング

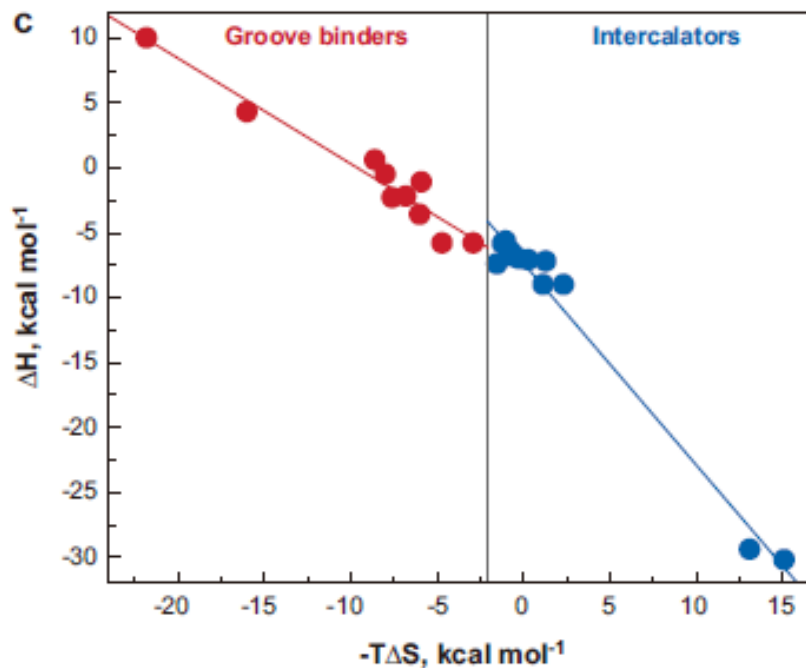
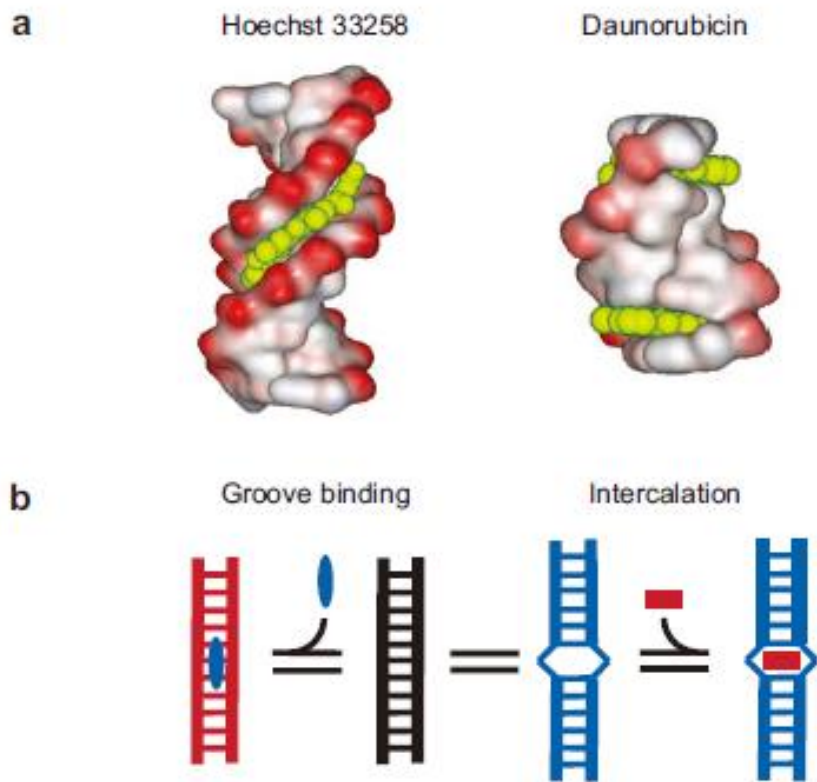


Figure 3

Thermodynamic signatures for the DNA binding mode of small molecules. (a) The structures the DNA complexes of the groove binder Hoechst 33258 (*left*) and daunorubicin (*right*). (b) A schematic of the binding mechanism. (c) The enthalpic and entropic contributions to DNA binding for groove binders and intercalators.

DNAと小分子の相互作用

$$\Delta G = -RT \ln Ka = \Delta H - T\Delta S$$

化合物	結合モード	ΔG (kcal mol ⁻¹)	ΔH (kcal mol ⁻¹)	$-T\Delta S$ (kcal mol ⁻¹)
Berenil	Groove binder	-8.0	+0.6	-8.6
DB75	Groove binder	-9.0	-2.2	-6.8
Propamidine	Groove binder	-7.0	-1.1	-5.9
Distamycin	Groove binder	-10.5	-5.8	-4.7
Netropsin	Groove binder	-8.7	-5.8	-2.9
Doxorubicin	Intercalator	-8.9	-7.4	-1.5
Propidium	Intercalator	-7.5	-6.8	-0.7
Chartreusin	Intercalator	-7.4	-7.1	+0.3
Daunorubicin	Intercalator	-7.9	-9.0	+1.1
Ethidium	Intercalator	-6.7	-9.0	+2.3

Groove binderは、
エントロピーの寄
与が大きい

Intercalatorは
エンタルピーの寄
与が大きい

DNAの水和状態



DNAはリン酸骨格の周りが水和されている

Groove binderは、リン酸骨格と相互作用するため、DNAの周りの多くの水を脱水和する必要がある
→エントロピックな変化となる

Intercalatorは、塩基対間に平行挿入し、塩基と π - π スタッキングによる相互作用(疎水性相互作用)
→エンタルピックな変化となる

SUMMARY POINTS

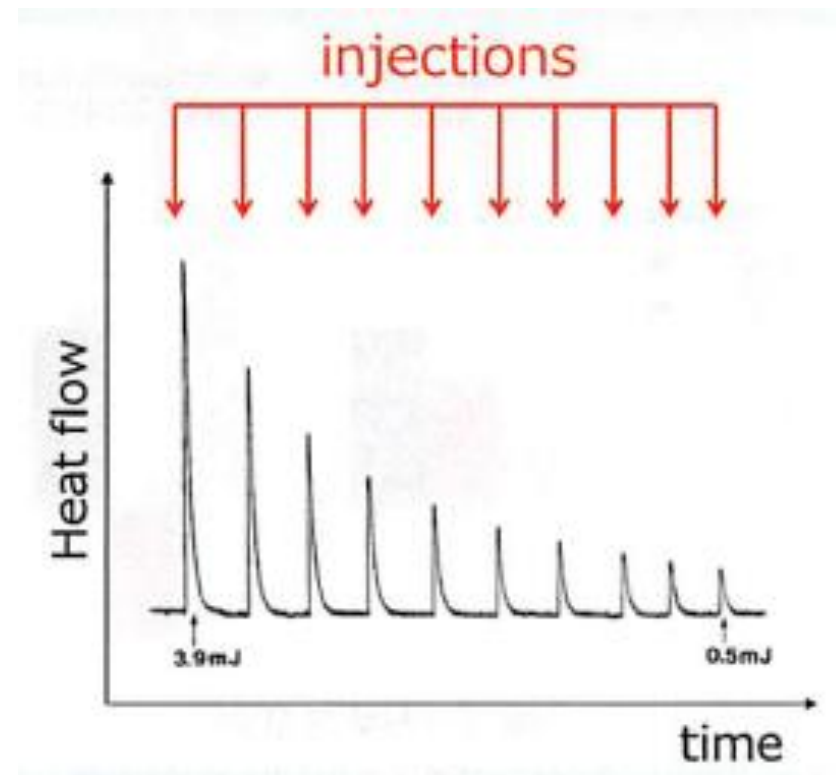
1. Thermodynamic data are an essential complement to structural data in drug development and for the optimization of lead compounds.
2. A complete thermodynamic profile for a binding interaction includes the binding free energy (ΔG), enthalpy (ΔH), entropy (ΔS), and heat capacity change (ΔC_p).
3. The thermodynamic profile indicates the predominant forces that drive the binding interaction.
4. Isostructural complexes need not be isoenergetic.
5. Favorable enthalpy contributions arise from favorable hydrogen bonding and van der Waals interactions, and favorable entropic contributions arise primarily from hydrophobic interactions and desolvation.
6. Thermal denaturation methods provide valuable tools for rapid screening of the binding compound libraries and for quantitative measurement of ultratight binding interactions.
7. High specificity does not demand high affinity.

等温滴定カロリメトリー(ITC)とは？

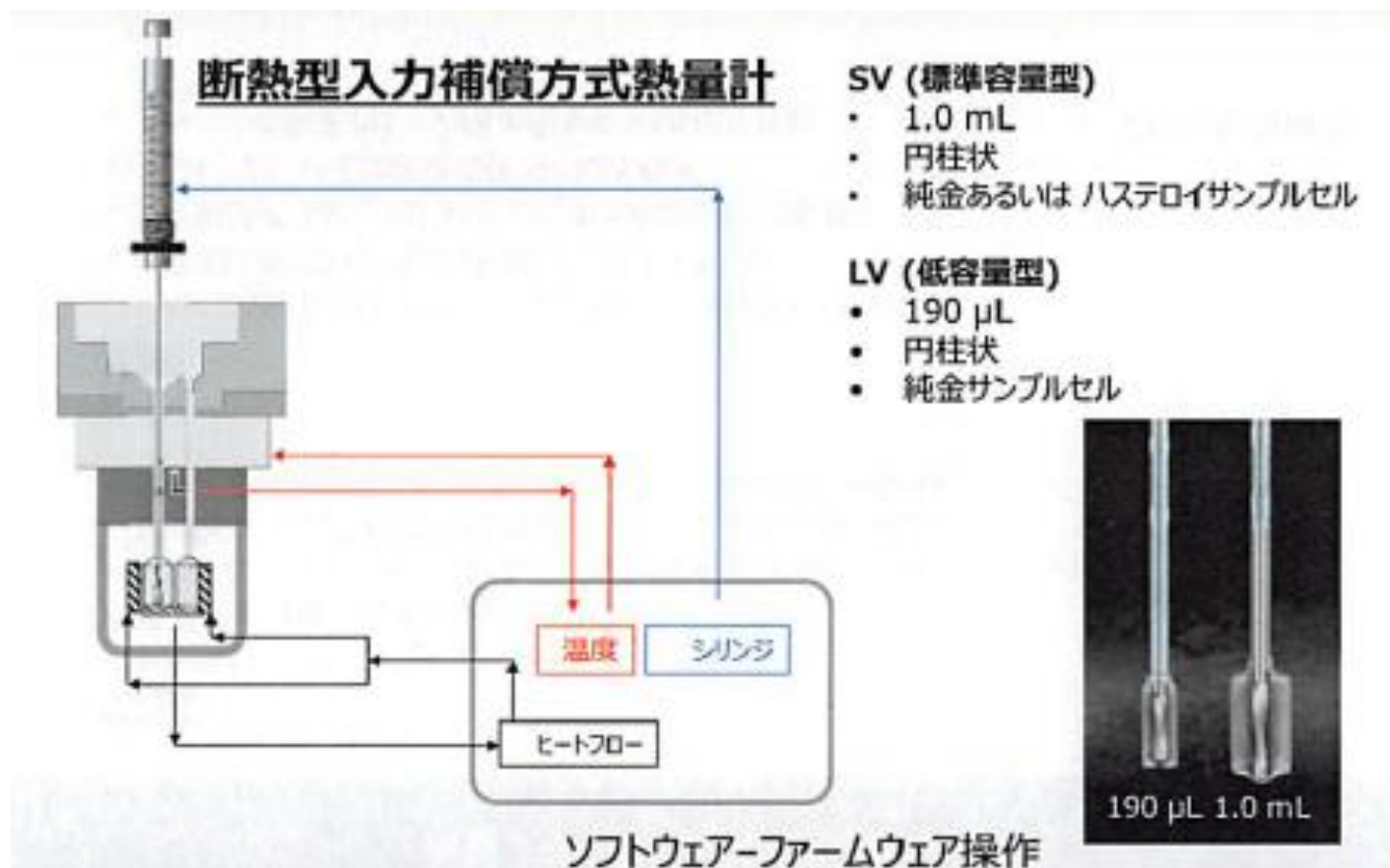
滴定カロリメトリーとは、一方の基質を制御された添加によって加え、その時に起こるHeat flow変化を測定する手法。液-液滴定は最も一般的ですが、固-液測定や気-固測定も滴定法の一つと考えることができる。

<特徴>

- 汎用的
- 化学修飾等が不要
- 固定化も可能だが不要
- 平衡化状態をモニタリング



ITC概略図



ITCで得られるデータ

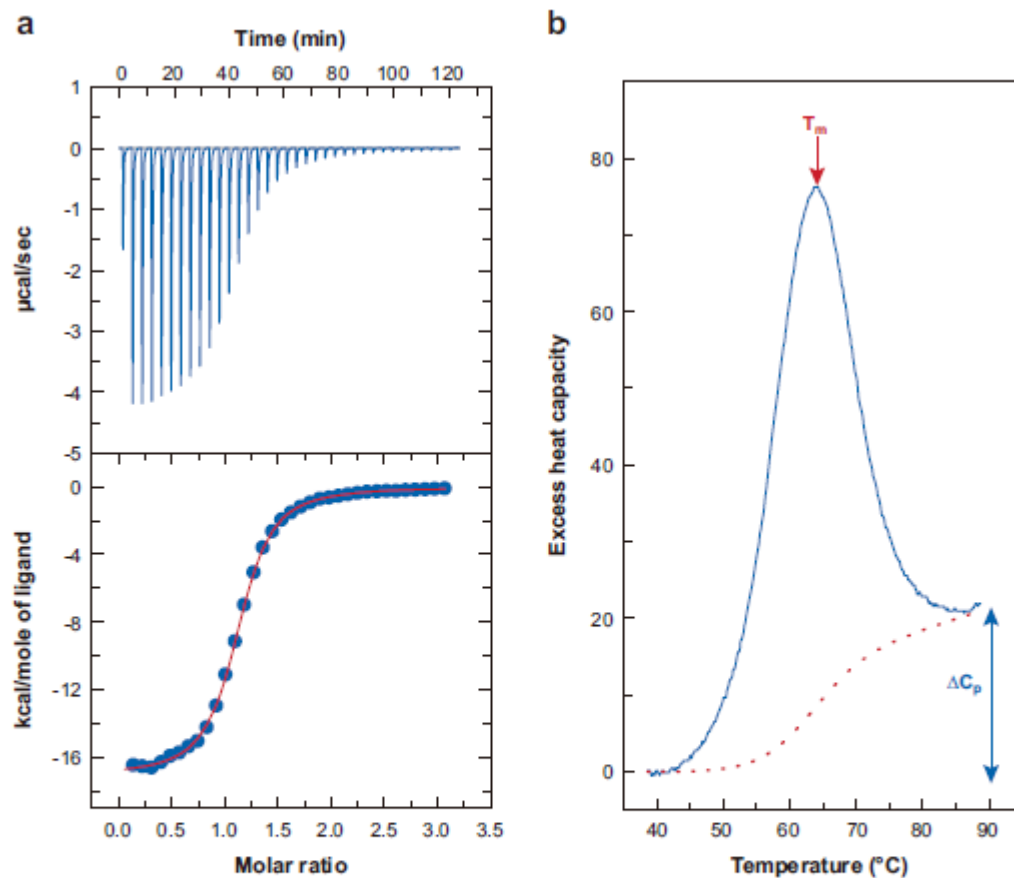
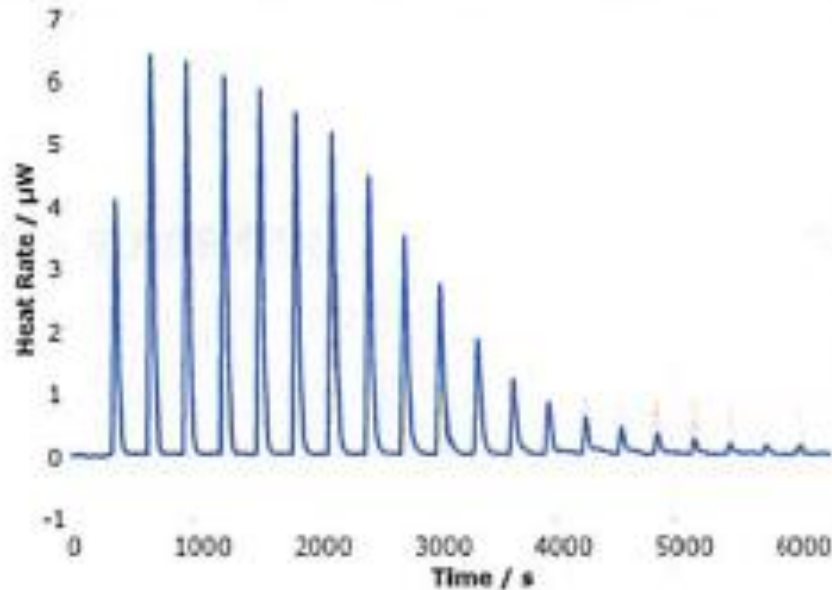


Figure 1

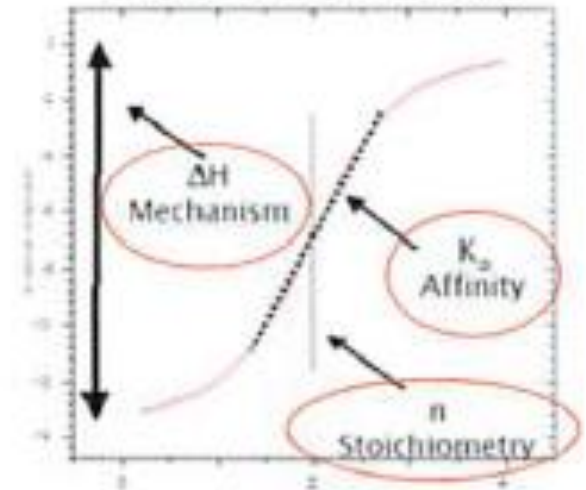
Representative ITC (a) or DSC (b) data. The ITC data are for the binding of 2'-CMP to RNaseA. The top panel shows the primary titration data, and the lower panel shows the binding isotherm constructed from the primary data. The DSC transition shown is for the thermal denaturation of the protein ubiquitin. The diagram indicates the melting transition temperature T_m and the heat capacity change ΔC_p .

ITCでわかること

例) RNase Aと2'-CMP (青) あるいは5'-CMP (赤) との相互作用



Typical ITC Data



二種類の溶液を混ぜ合わせた時に生じる熱流量変化を測定し、そこから熱量値を算出

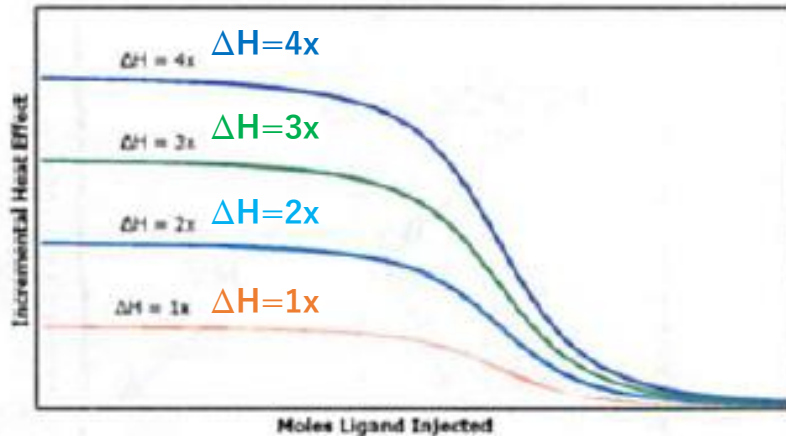


スキャッチャード・プロットを作成後、Fitting modelによる最小二乗法を用いて平衡定数など算出

装置や濃度の最適条件



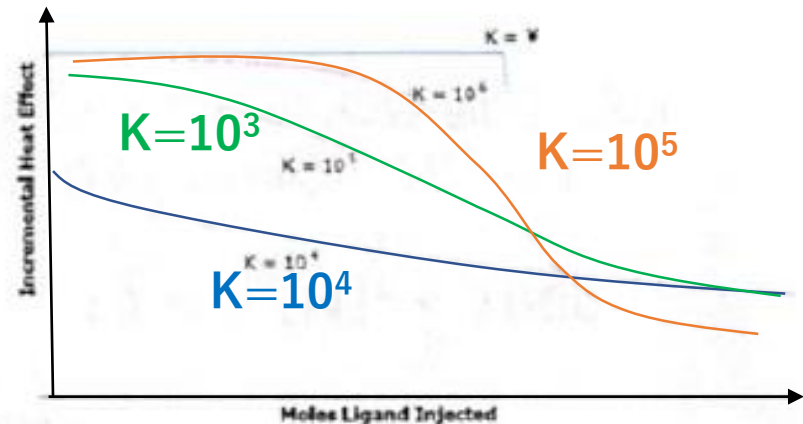
Constant Equilibrium Constant
with Varying Enthalpy



リガンド添加量

$$K = \frac{[AB]}{[A][B]}$$

Constant Enthalpy with
Varying Equilibrium Constant

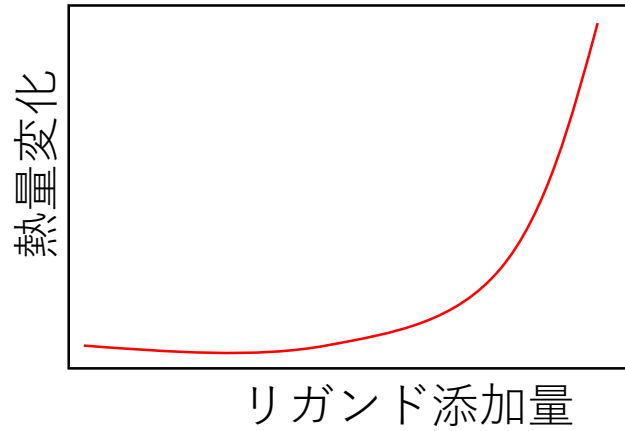


リガンド添加量

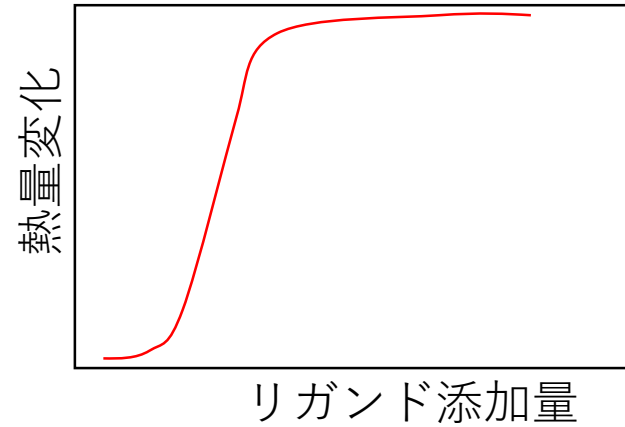
- 一度の実験から、ストイキオメトリー(n)、エンタルピー(ΔH)、結合定数(K_a)の情報が得られます。
- エンタルピーはITCより直接測定できます。
- K_aを得るための指標は、10 < K_a[M]_T < 1000 : [M]_T, セル中のトータル初期サンプル濃度
- [M]_Tは10-100 μM, K_aは10³ to 10⁹ M⁻¹に設定
- 解離定数 : K_D = 1/K_a

データの特徴

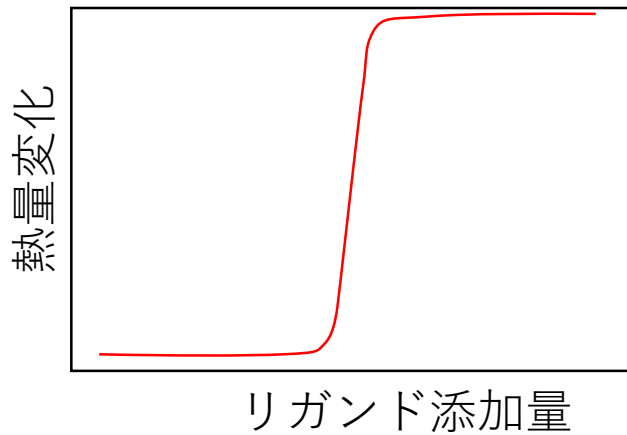
n が高すぎる場合



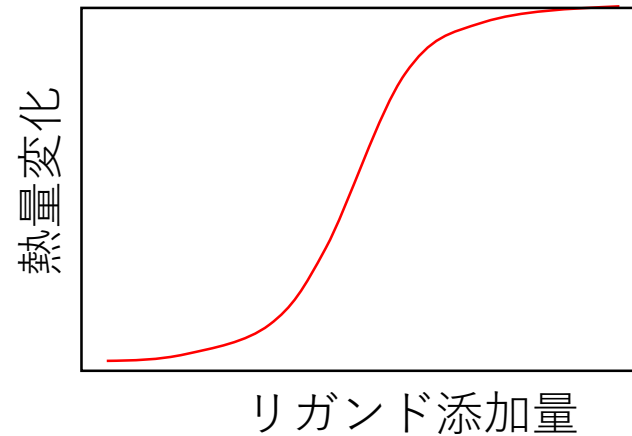
$[L]$ が高すぎる場合



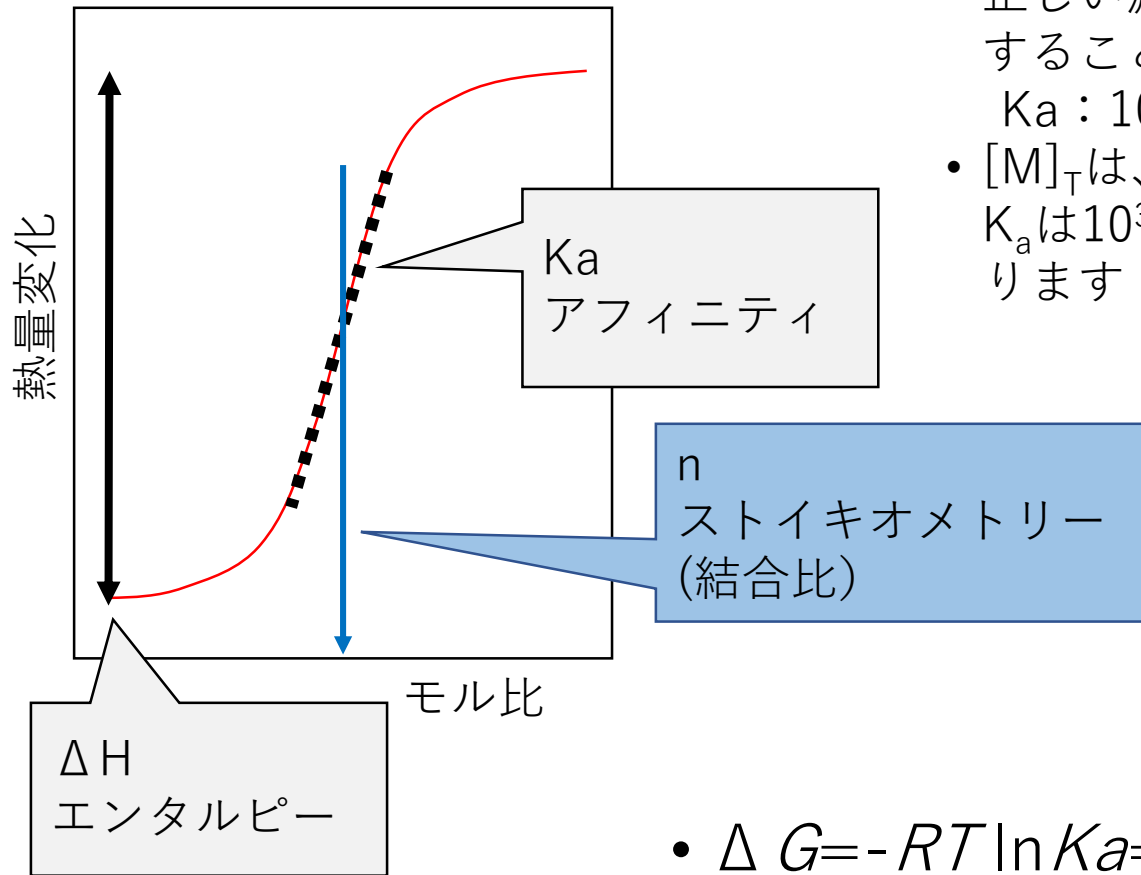
K_a が高すぎる場合



最適



結合定数の決定方法



- 正しい濃度を使用してKaを予想することが重要です。
 $K_a : 10 < K_a[M]_T < 1000$
- $[M]_T$ は、たいてい10-100 μM , K_a は 10^3 - 10^9 M^{-1} のオーダーとなります

- $\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S$ より、
 ΔG 、 $-T\Delta S$ も算出できます。

結合定数の決定方法

滴定のデータから結合定数Kを以下のように求めることができます。化学量論的に1:1の反応に対して、 $M+X=MX$ の結合平衡は次式で記述されます。

$$K = \frac{[MX]}{[X][M]} \quad (f16)$$

$$X_{tot} = [X] + [MX] \quad (f17)$$

$$M_{tot} = [MX] + [M] = [MX] + \frac{[MX]}{K[X]} \quad (f18)$$

ここでKは結合定数です。

MX濃度の変化は、熱変化として次式と関連付けられます。

$$dQ = d[MX]\Delta H^{\circ}V_0 \quad (f19)$$

ここで ΔH° は結合のモルエンタルピー、 V_0 はセル容積、Qは吸収または発生した熱量です。(f16)、(f17)、(f18)、(f19)式より次式が導かれます。

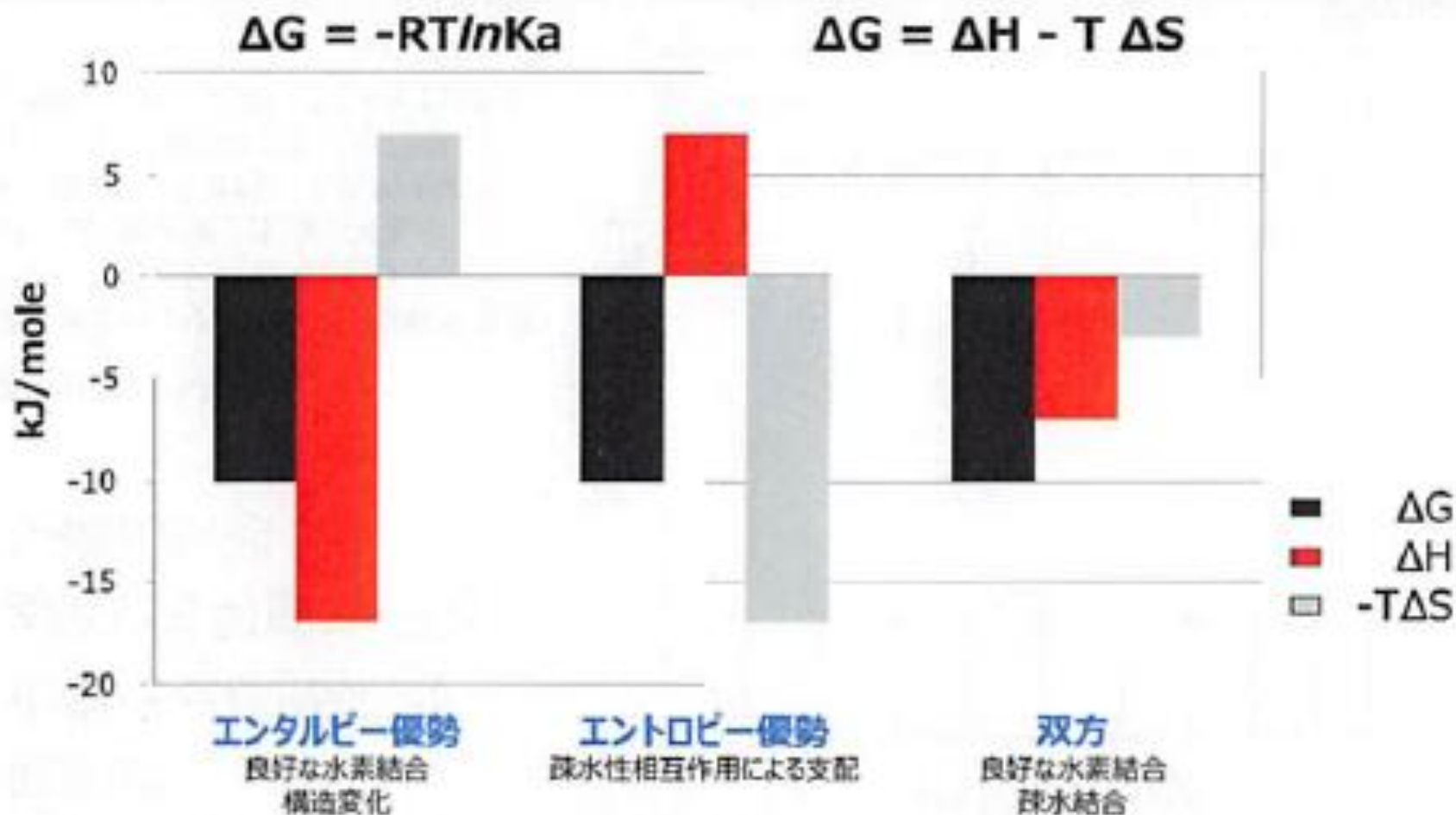
$$\frac{1}{V_0(dQ/dX_{tot})} = \Delta H^{\circ} \left(\frac{1}{2} + \frac{1 - (1+r)/2 - X_r/2}{(X_r^2 - 2X_r(1-r) + (1+r)^2)^{1/2}} \right) \quad (f20)$$

ここで、 $r = 1/(K M_{tot})$ 、 $X_r = X_{tot}/M_{tot}$ です。

滴定型熱量測定装置で測定される実験的パラメータは示差熱 dQ/dX_{tot} (実際には $\Delta Q/X_{tot}$)です。 ΔH° は滴定曲線下の総面積から得られます。上記のようにして、測定値として ΔH° とKが求められるので、(f21)式よりギブスエネルギー ΔG° とエントロピー ΔS° が算出されることとなります。

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ} = RT \ln K \quad (f21)$$

熱力学的プロファイル



どのような分子間相互作用が働いているかわかる！

サンプル調整の注意点

- すべての反応には熱の発生を伴います。目的の反応の熱のみを測定する必要があります。
- サンプルの希釈は熱を発生させます
- 緩衝液の希釈熱を最小にするために
 - 1) サンプルを透析
 - 2) リガンドの希釈は、サンプルと同じ組成の緩衝液を選ぶ
 - 3) 緩衝液にリガンドを滴下するblank測定を行い、実測データを補正する
- 還元剤や有機溶媒の使用を避ける
- 最適な温度やバッファーを選択する
- 温度： ΔH は温度や測定系に依存し、 ΔC_p で変化する。結合測定できる最適な温度を探す必要がある
- 異なるバッファーは異なるイオン化エネルギーを持っています。これは結合エネルギーに影響します。

サンプル調整条件

一般的な調整条件として、下記の条件でサンプルを用意します。

- セル側に入れる試薬のサンプル濃度：数10から数100 μ M程度に調整したもの
- シリンジ側のサンプル濃度：セル側サンプルの10倍程度に調整したもの（結合比による）
- 用意するサンプル容量

	Nano ITC SV	Nano ITC LV
セル側	1.5mL*程度	400 μ L*程度
シリンジ側	0.3mL*程度 x 2回分	80 μ L*程度 x 2回分

*Dead volumeを含みます

- 希釈熱測定用レファレンス：溶媒を使用 数mL程度
- 良く用いられる溶媒：酢酸バッファー、リン酸バッファー、カコシル酸バッファーなど
- 添加物などを入れる際は、注意

•*ITCによる測定はCファクター値に依存します。下記の等式で $10 < C < 1000$ 程度になるように標的サンプル濃度を調整してください。

$$C = K_a \times [M]$$

Ka: 結合定数、[M]: 標的濃度

*通常、一サンプル当たり、二測定行います(実際のサンプル測定x1、Blank希釈熱測定x1)。一測定にかかる時間は通常、約0.5時間から2時間(機種による)です

ITCを使ったアプリケーション

- 分子間の結合反応：結合定数, 結合個数、熱力学パラメータの算出
- 結合の周囲への影響
- 蛋白質の力価測定
- 蛋白質-蛋白質間相互作用
- 高分子-低分子相互作用
- 結合様式の決定
- 臨海ミセル濃度の決定
- 酵素キネティクスの測定

測定例：RNase Aに結合するリガンド 2'-CMPとの相互作用解析

測定方法

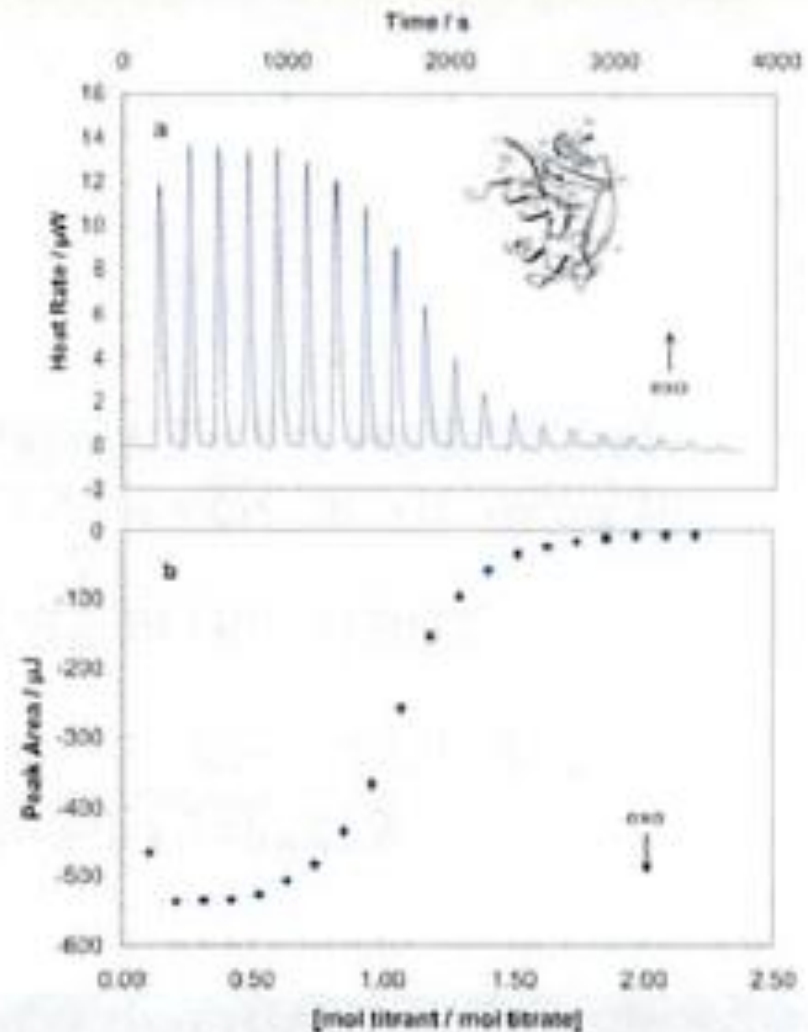
- 2'-CMP (20回 x 5 μ L, 1.6mM) を RNase A (950 μ L, 80 μ M)に滴定
- 25 $^{\circ}$ C

測定結果

- $n = 1$
- $K_D = 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$
- 結合エンタルピー: -65 KJ/mol

結合曲線の形状は K_D の精度を規定します。

典型的な K_D は $10^3 - 10^{12} \text{ M}^{-1}$



測定例：RNase Aに結合するリガンド 2'-CMPとの相互作用解析

Red: 5'-CMP (Low affinity) をRNase Aに滴下:

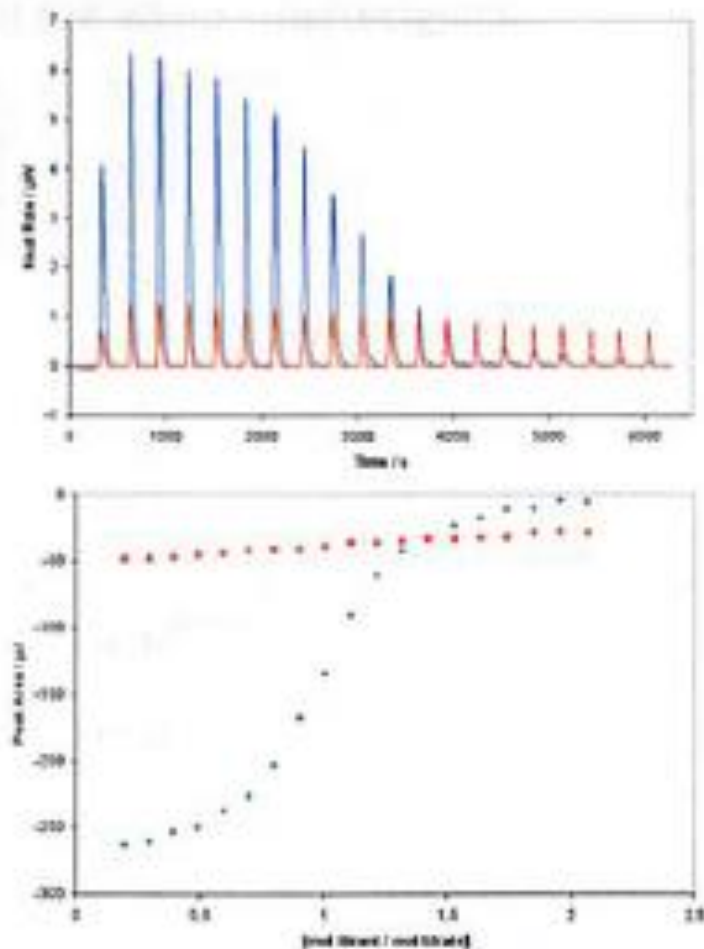
小さなカーブ、フィッティング精度が悪い

Blue: 2'-CMP をRNase Aに滴下:

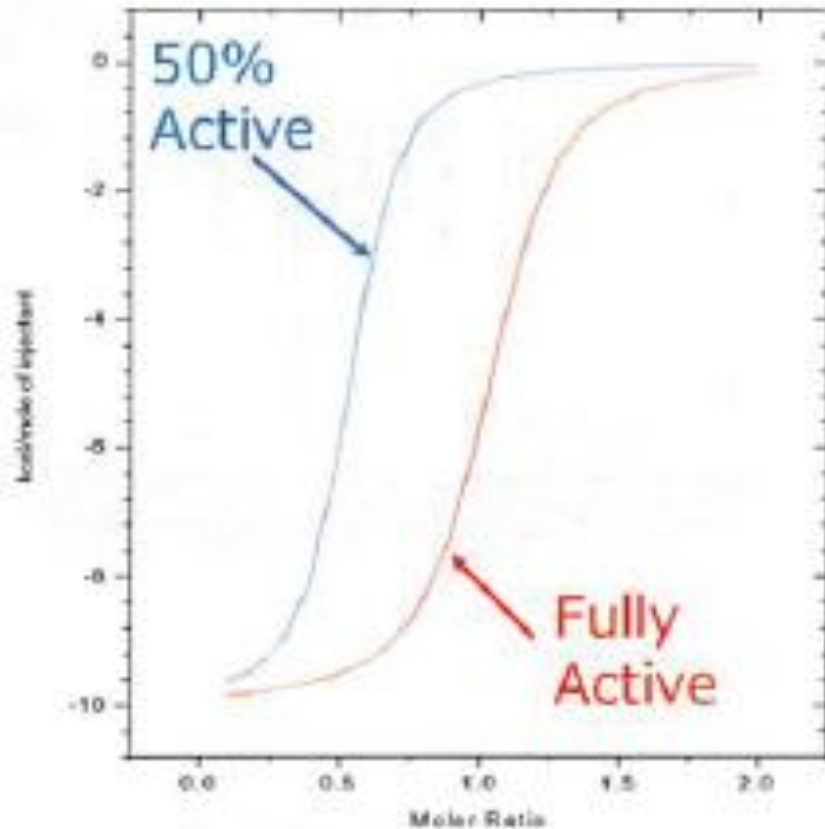
- 5'-CMPであらかじめ~ 50%のサイトを結合
(0.32 mM 5'-CMPで950 μ L 70 mM RNase をあらかじめ結合)
- 1.3 mM 2'-CMP、20x 5 μ L 滴定で5'-CMP を置換

2'-CMP : $K_d = 10^6 \text{ M}^{-1}$
したがって
5'-CMP $K_d = 3.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$
enthalpy = -47 KJ/mol
n = 1.

同様に非常に強いKaでも適用可能



測定例:蛋白質の品質管理



有効成分濃度の測定

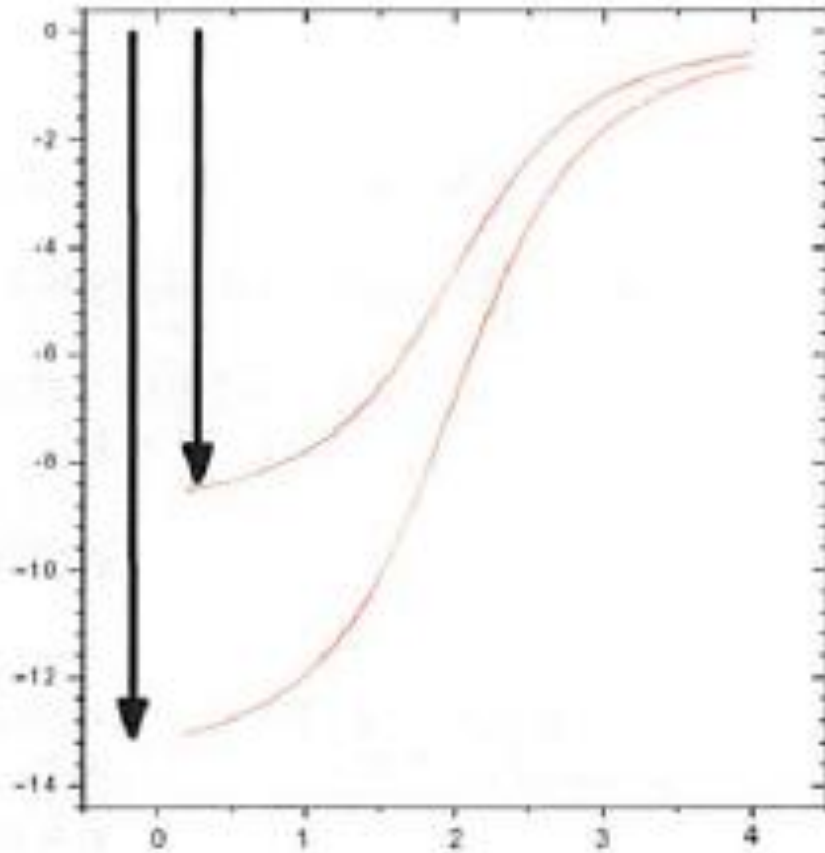
例) 採取した抗体の比較

ストイキオメトリー (n)
結合比率の減少



- 結合比率の減少が結合に関与する分子数の違いを示唆

測定例：結合機構の測定



結合の様式評価

例) モノクローナル抗体比較

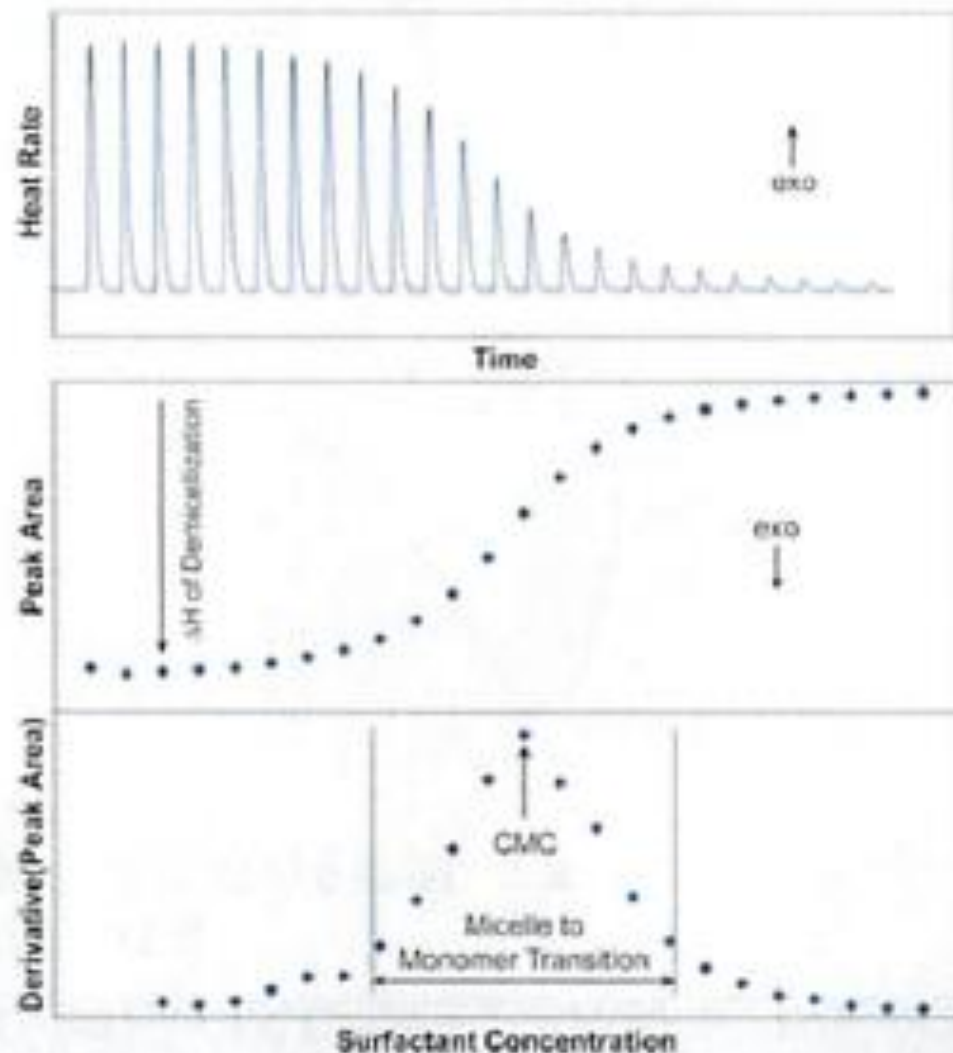
結合定数 (K_a) ほぼ同じ



エンタルピー変化量(ΔH)が結合の特異性やエネルギーの違いを示唆

測定例：臨界ミセル濃度の算出

- 臨界ミセル濃度 (CMC)はミセルを形成する際の界面活性剤の凝集濃度です
- バッファー中に高濃度の界面活性剤懸濁液(ミセルを形成する程度の)を滴下していきます
- 測定開始初期ではミセルがかい離し、CMCを境に界面活性剤が凝集するようになります。このときの中点の濃度がCMCとなります

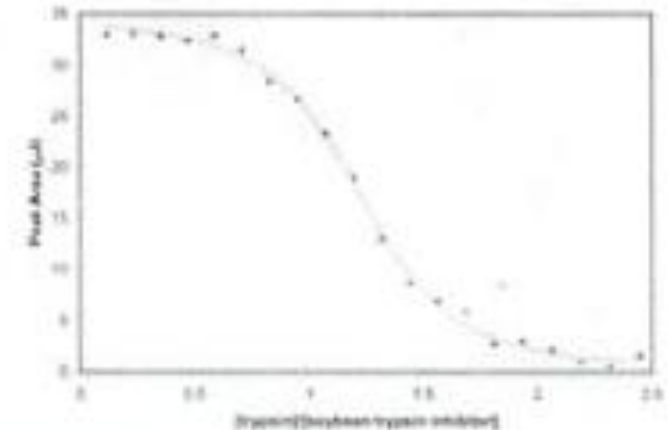
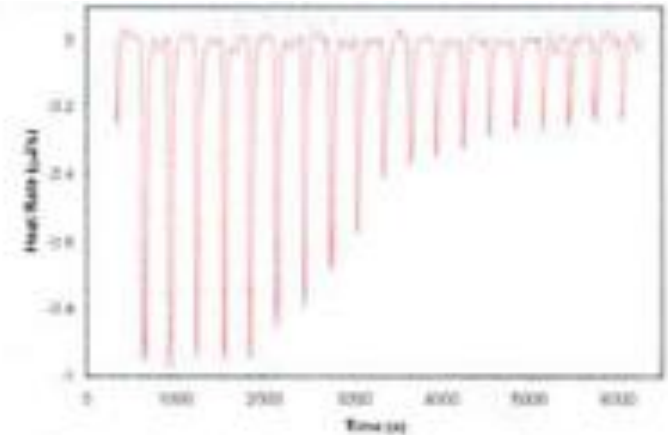
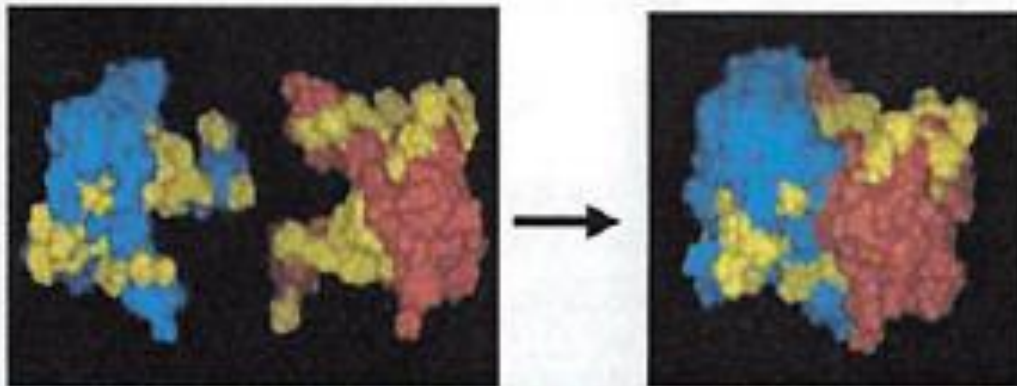


測定例：蛋白質蛋白質相互作用

- ITCはヘテロダイマー形成やかい離、ホモダイマーかい離などのキャラクターゼーションがわかります

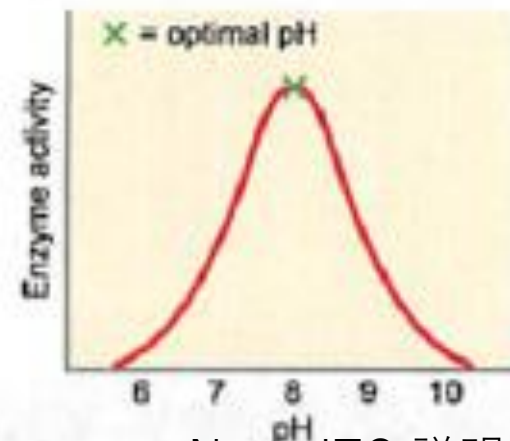
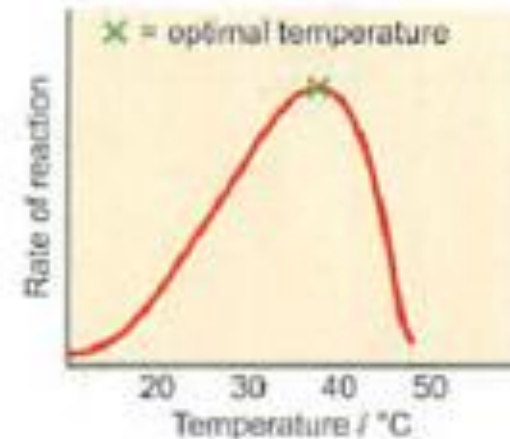
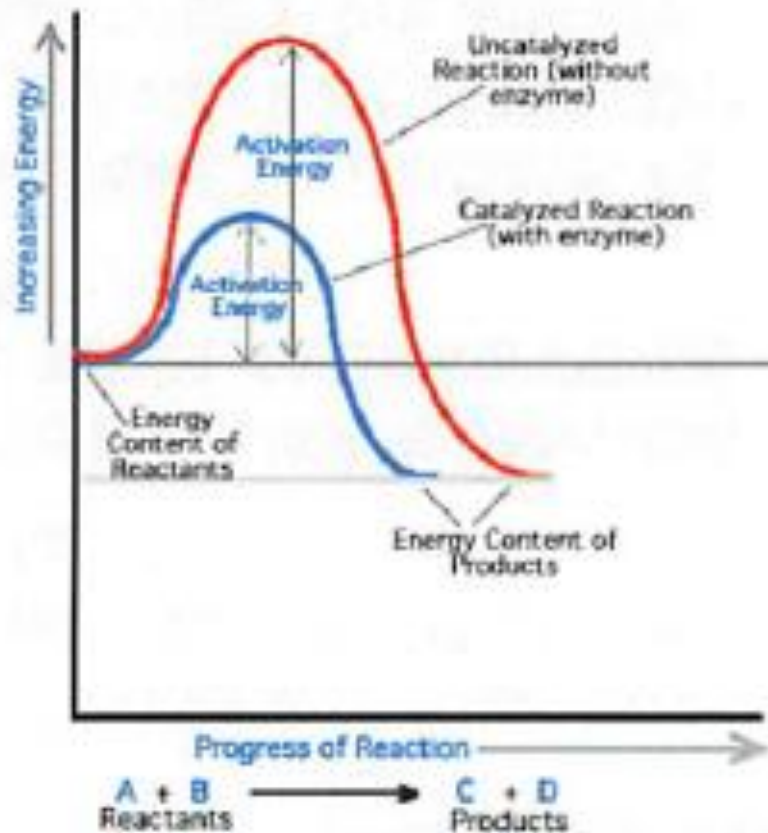
大豆トリプシンインヒビターに(2.1 mM, 1.0 mL), pH 4.5トリプシンを滴定(440 mM, 100 mL, 20 x 5 mL aliquots)

- **Red**: heat produced from each injection
- **Blue**: integration of heats over time (mJ) vs. mole ratio)
- $K_d = 1.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, enthalpy = 135 kJ mol^{-1} , stoichiometry = 1.15



測定例: 酵素キネティクス

- 酵素反応を含む反応は発熱、吸熱を伴います
- ITCは酵素反応速度論や酵素阻害の研究に威力を発揮します



測定例: 酵素キネティクス

Single injection method: 様々な用途に利用でき簡単です。反応速度に関係なく利用できます

Inject $[S] > K_M, [E]$

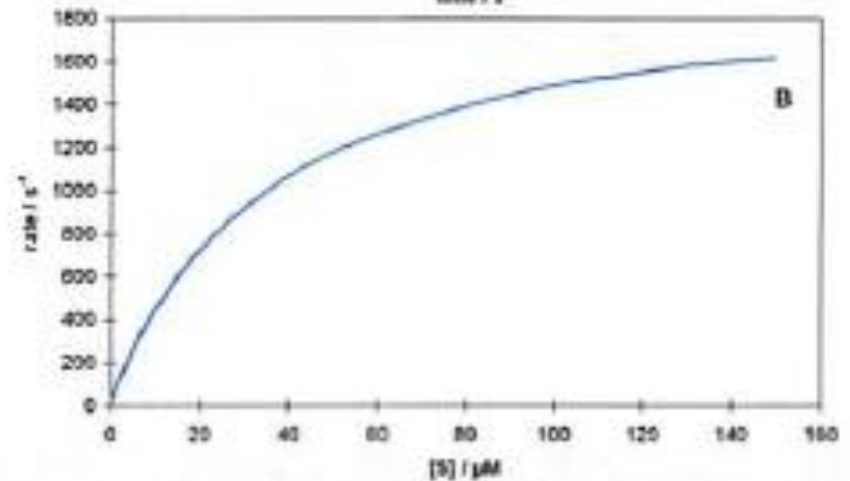
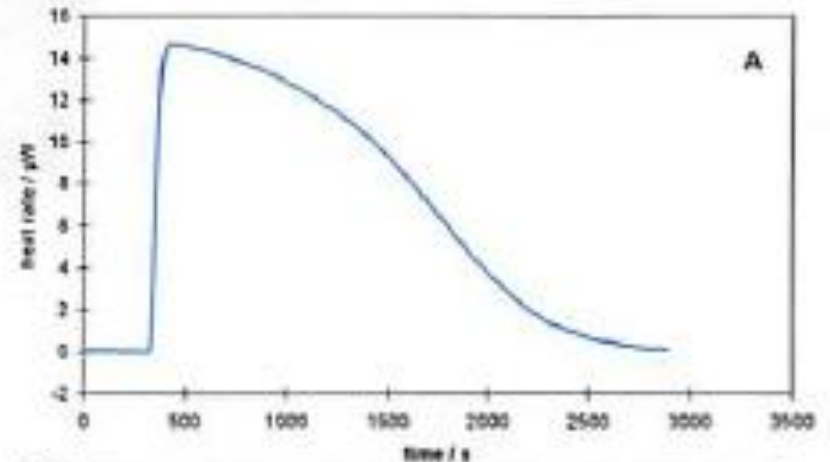
Penicillin: 15 μL , 10.2 μM injection
Penicillinase: 950 μL 7.7×10^{-11} M

A: 生データ (instrument response)
B: 加水分解速度 (normalized for $[E]$)

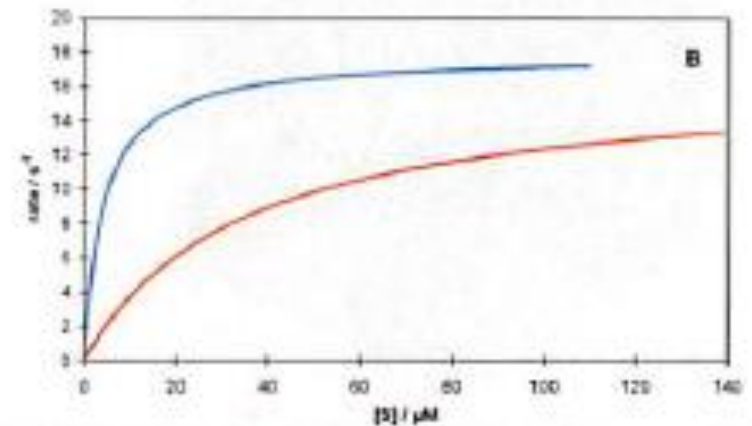
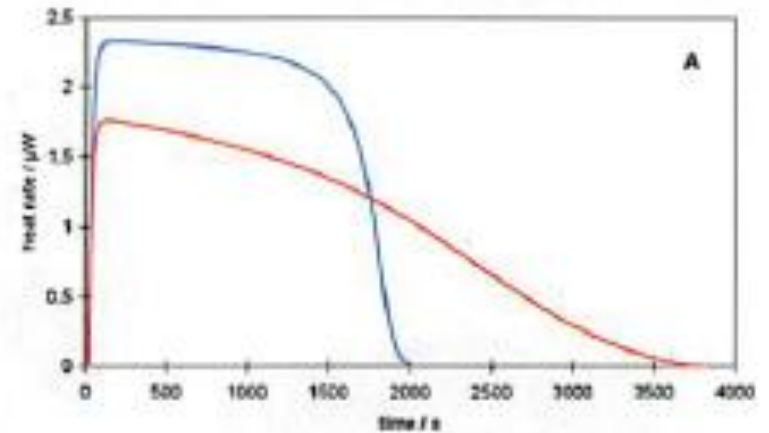
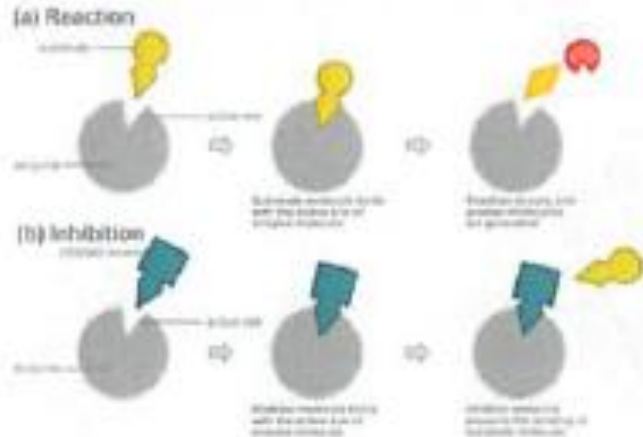
Replot B as Lineweaver-Burk plot
($1/\text{velocity}$ vs. $1/[S]$); V_{max} = y-intercept,
 K_M = x-intercept, $k_{\text{cat}} = V_{\text{max}}/[E_{\text{total}}]$

$K_M = 30.7 \mu\text{M}$
 $V_{\text{max}} = 1.4 \times 10^{-10} \text{ mol s}^{-1}$
 $k_{\text{cat}} = 1950 \text{ s}^{-1}$

新たな方法を考える必要はありません



測定例: 酵素キネティクス



Blue: 10 μL $5.1 \times 10^{-7} \text{ M}$ trypsin (Titrant)
950 μL $1.44 \times 10^{-4} \text{ M}$ BAEE (Titrant)

Red: plus $1.36 \times 10^{-4} \text{ M}$ benzamidine

(-) inhibitor: $K_M = 4.17 \mu\text{M}$; $V_{\text{max}} = 0.091 \mu\text{Mol/s}$,
 $k_{\text{cat}} = 17.8 \text{ s}^{-1}$

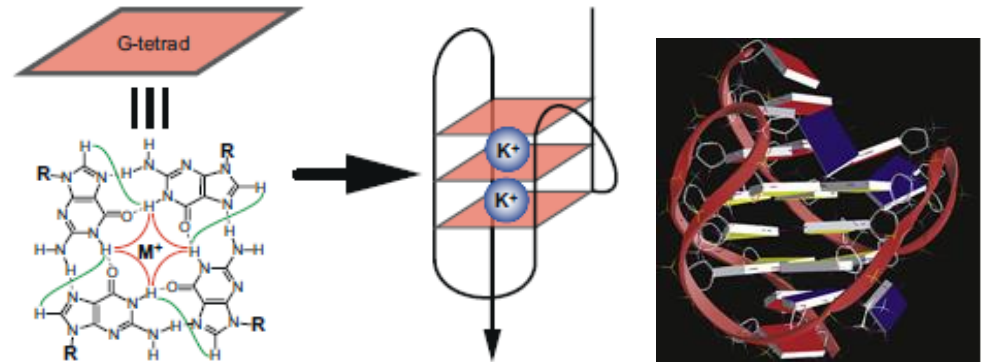
(+) inhibitor: $K_M = 35.1 \mu\text{M}$; $V_{\text{max}} = 5.9 \times 10^{-4} \mu\text{Mol/s}$,
 $k_{\text{cat}} = 0.11 \text{ s}^{-1}$, $K_i = 18.4 \mu\text{M}$

テロメアとテロメラーゼ

テロメア

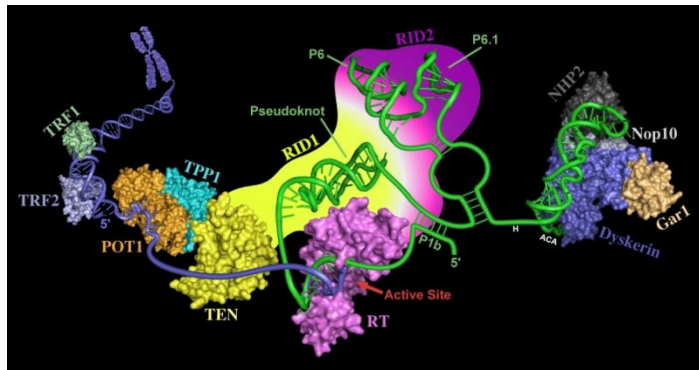
染色体の末端で見られる特徴的な繰り返し配列。ヒトの染色体では、**TTAGGG**の繰り返し配列

K⁺存在下あるいは**Na⁺**存在下で右図のような**四本鎖DNA構造**を形成する。



テロメラーゼ

TTAGGG繰り返し配列を伸長する酵素



テロメア配列の鋳型となるRNAと逆転写酵素 (hTERT), その他の制御サブユニットからなる複合蛋白質.

癌細胞において高い活性が見られている.

テロメラーゼ活性を調べることによって癌診断が可能.

迅速かつ簡便な検出方法が望まれている.

テロメラーゼ活性測定方法

既存のテロメラーゼ活性検出法 (Telomerase Repeat Amplification Protocol: TRAP)

1 h (伸長反応)

2.5 h (増幅反応)

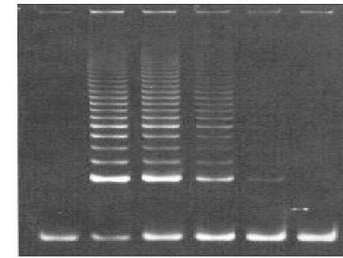
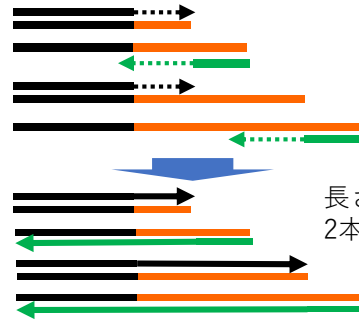
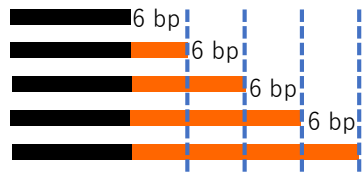
1.5 h (検出)

Step 1: テロメラーゼによる
テロメアDNA繰り返し配列の
付加

Step 2: PCRによる増幅

Step 3: ゲル電気泳動

TSプライマー テロメアDNA
5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT ag (ggtag)_n-3'



6 bp毎に異なる
長さのラダーに
よって活性確認

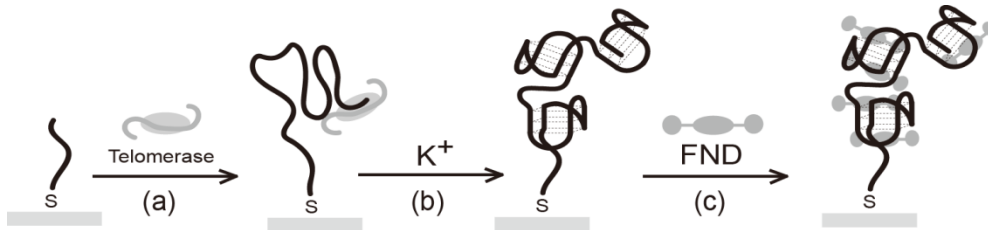
時間がかかり
煩雑な操作が必要
PCRが必須

電気化学的テロメラーゼ活性検出法 (ECTA)

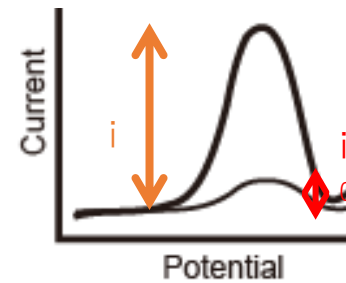
30 min (伸長反応)

1min (検出)

電気化学測定結果



TS プライマー固定化電極



電流増加率の算出

Δi : 電流増加率

i : 伸長反応後電流値

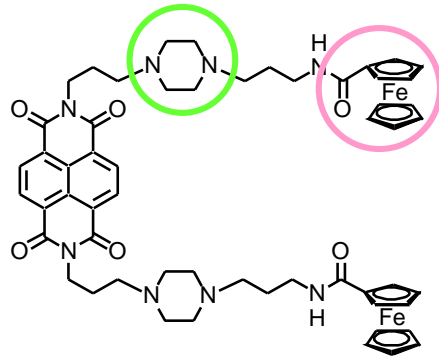
i_0 : 伸長反応前電流値

$$\Delta i(\%) = (i - i_0) / i_0 \times 100$$

迅速かつ簡便
PCR不要
定量的データによる
評価可能

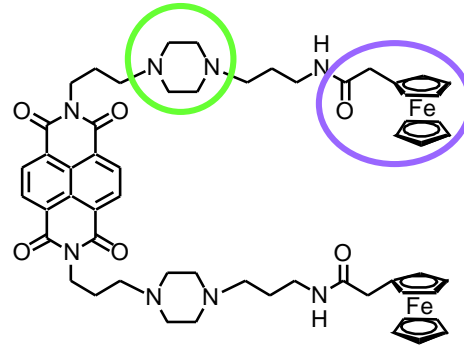
Analytical Chemistry, **77**, 7304-7309 (2005).
分析化学, **61**, 243-250 (2012).

ECTA指示薬としてのフェロセン化ナフタレンジイミド



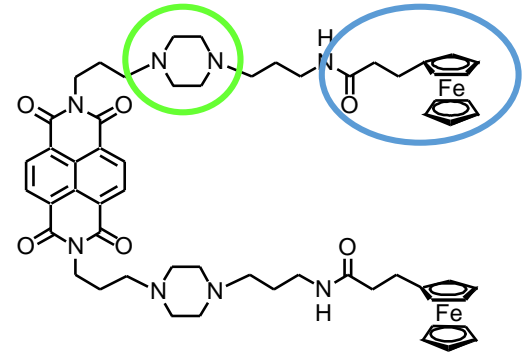
1

Piperazine-caFc



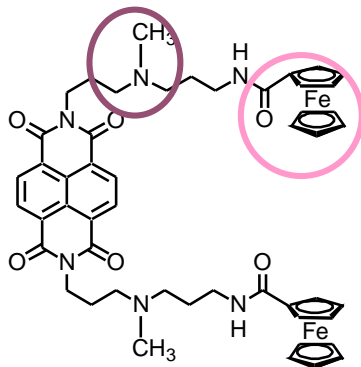
2

Piperazine-acFc



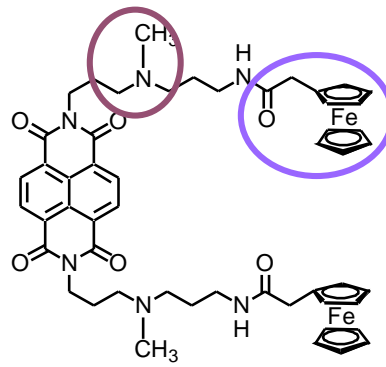
3

Piperazine-proFc



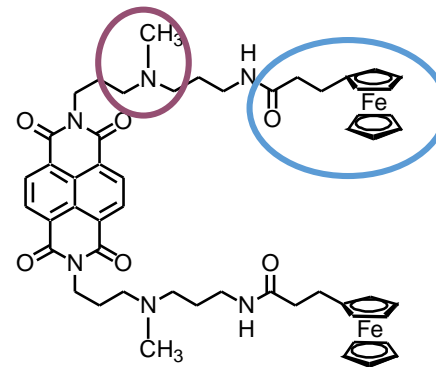
4

N-Methyl-caFc



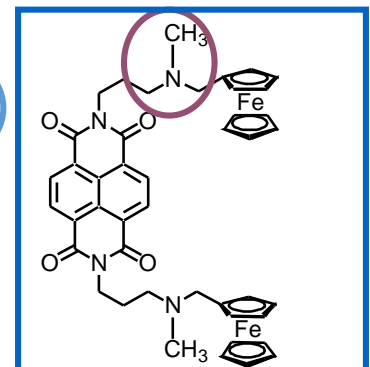
5

N-Methyl-acFc



6

N-Methyl-proFc



7

N-Methyl-Fc

Different linker chain

Different redox potential

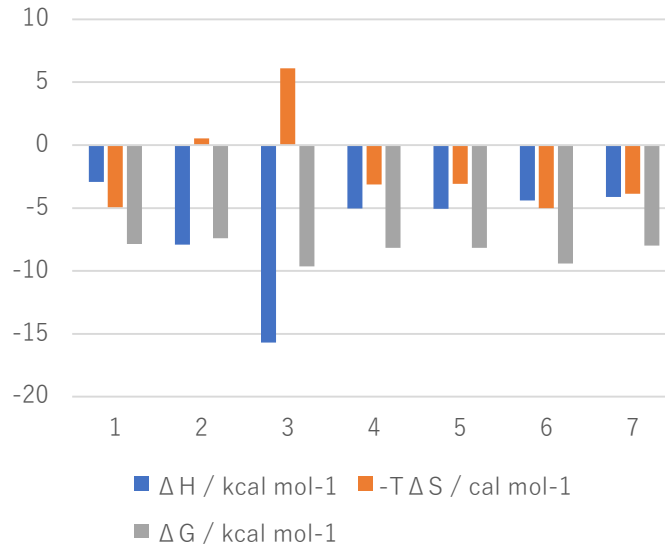
KCl, NaCl存在下における熱力学的パラメータ

		1	2	3*	4	5	6	7
NaCl¹⁾	$10^{-5}K/M^{-1}$	4.55	2.17	86.9	7.59	7.59	61.2	5.71
	n	3	2	3	2	2	2	2
	$\Delta H / \text{kcal mol}^{-1}$	-2.92	-7.92	-15.7	-5.04	-5.07	-4.40	-4.11
	$-T\Delta S / \text{cal mol}^{-1}$	-4.93	0.52	6.11	-3.12	-3.09	-5.02	-3.88
	$\Delta G / \text{kcal mol}^{-1}$	-7.85	-7.40	-9.63	-8.16	-8.16	-9.42	-7.99
KCl²⁾	$10^{-5}K/M^{-1}$	9.75	6.16	57.3	7.52	8.34	27.9	9.99
	N	3	2	2	2	2	2	2
	$\Delta H / \text{kcal mol}^{-1}$	-3.74	-7.60	-9.40	-3.57	-6.91	-5.11	-3.72
	$-T\Delta S / \text{cal mol}^{-1}$	-4.57	-0.43	0.03	-4.58	-1.30	-3.83	-4.60
	$\Delta G / \text{kcal mol}^{-1}$	-8.31	-8.03	-9.37	-8.15	-8.21	-8.94	-8.32

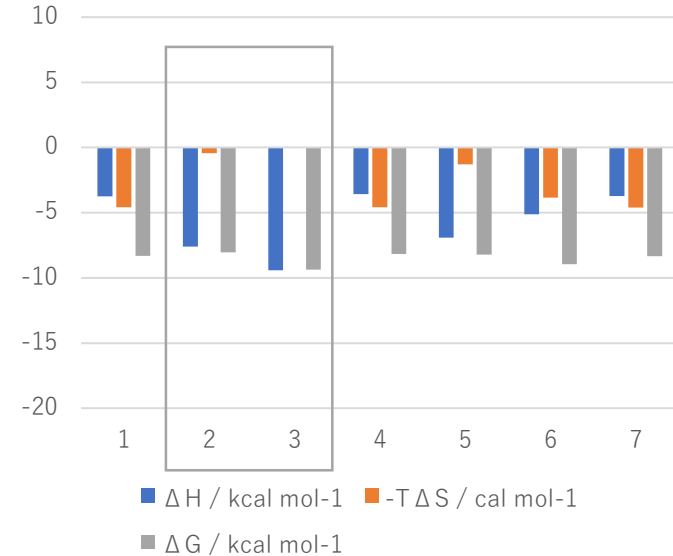
- 1) 0.10 M AcONa-AcOH(pH 5.5), 0.10 M NaCl, 30 ° C
 2) 0.10 M AcOK-AcOH(pH 5.5), 0.10 M KCl, 30 ° C
 * Reverse titration was carried out to avoid to aggregation.

KCl, NaCl存在下における熱力学的パラメータ

NaCl



KCl



FND2, 3においては大きなエンタルピーへの寄与とわずかなエントロピーの寄与が見られた。



複合体形成後に、効果的な π - π スタッキング相互作用をしていることを示唆。

Strategy of designed tetraplex DNA specific binder

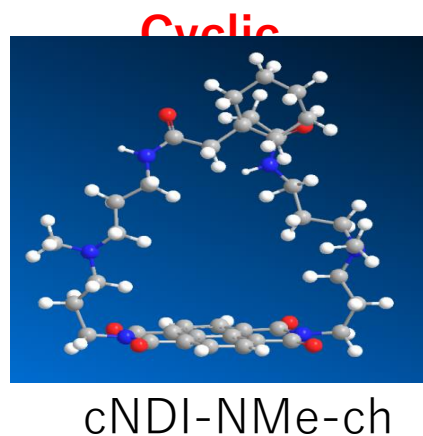
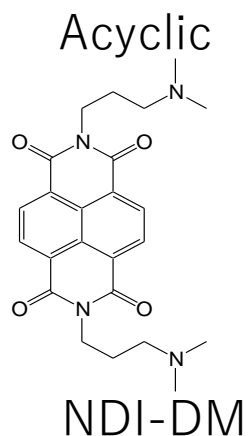
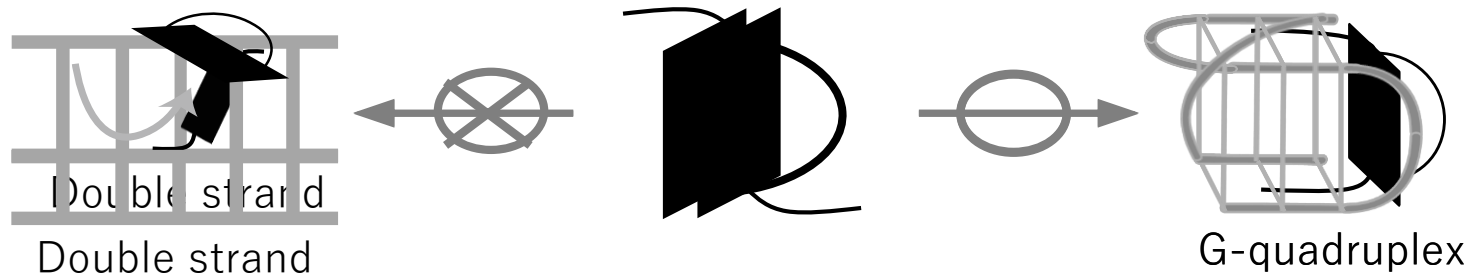


Table 1. Comparison of binding affinity between cyclic and acyclic naphthalene diimide.

DNAs	$10^{-6} K/M^{-1}$	
	NDI-DM ³⁾	cNDI-NMe-ch ³⁾
A-core	1.6	8.6
ds-oligo	0.60	0.033

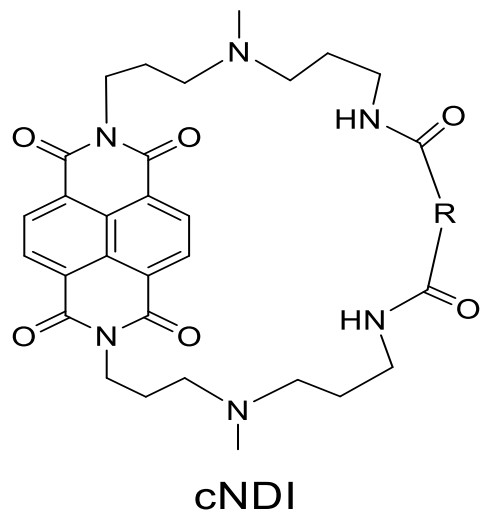
TA-core...G-quadruplex DNA, ds-oligo...Double strand DNA

High preference for tetraplex DNA (Ca. 260-times)

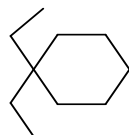
Need to improve an affinity for tetraplex DNA

3) Y. Esaki *et al.*, *Chem. Commun.*, 50 5967-5969 (2014).

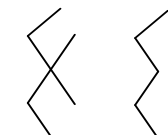
Design of new cyclic naphthalene diimide (cNDI)



R:

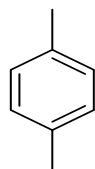


ch

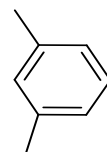


C3-DM

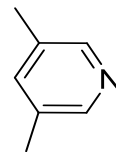
C3



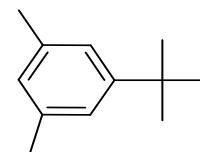
p-Ben



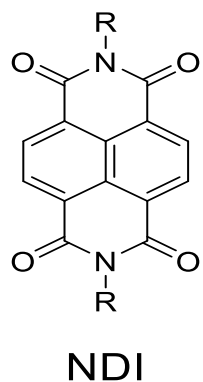
m-Ben



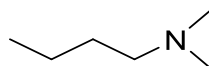
m-Pry



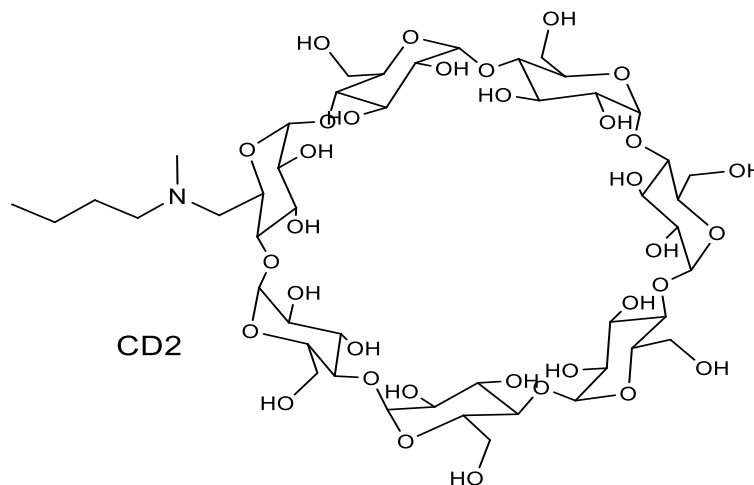
m-Ben-tBu



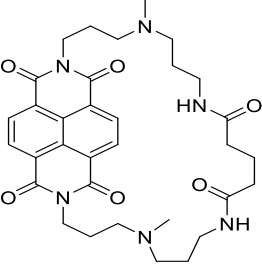
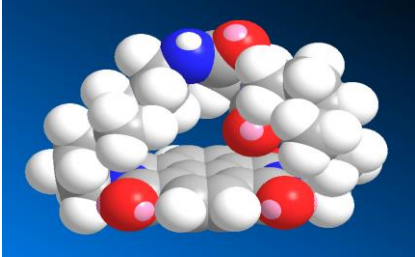
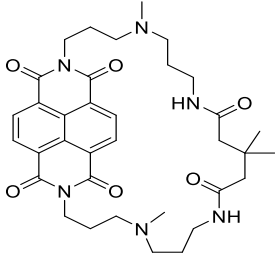
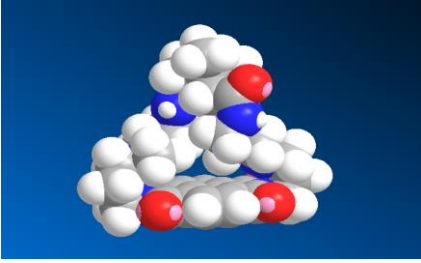
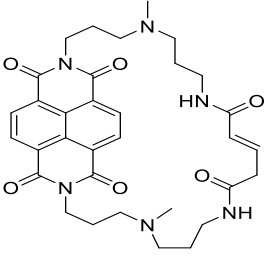
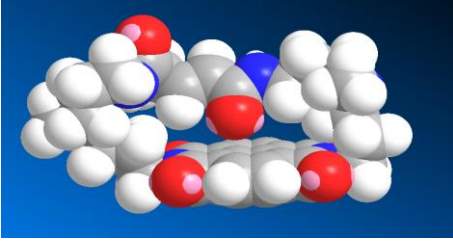
R:



DM

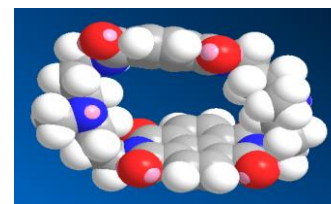
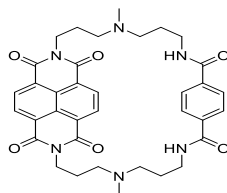


Design of new cyclic naphthalene diimide (cNDI)

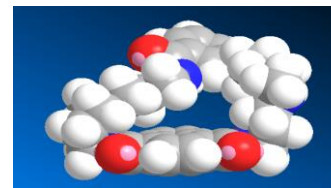
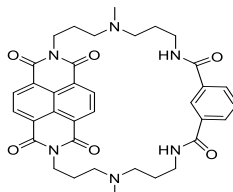
cNDI-Nme-C3	 <p>Chemical structure of cNDI-Nme-C3, showing a central naphthalene core with two imide rings, and two side chains. Each side chain consists of a dimethylamino group connected to a propyl chain, which is further linked to a carbonyl group and a secondary amide group.</p>	 <p>Space-filling model of cNDI-Nme-C3, showing the overall molecular structure with carbon atoms in white, oxygen in red, and nitrogen in blue.</p>
cNDI-Nme-C3DM	 <p>Chemical structure of cNDI-Nme-C3DM, showing a central naphthalene core with two imide rings, and two side chains. Each side chain consists of a dimethylamino group connected to a propyl chain, which is further linked to a carbonyl group and a secondary amide group, with a dimethyl group attached to the propyl chain.</p>	 <p>Space-filling model of cNDI-Nme-C3DM, showing the overall molecular structure with carbon atoms in white, oxygen in red, and nitrogen in blue.</p>
cNDI-Nme-mPry	 <p>Chemical structure of cNDI-Nme-mPry, showing a central naphthalene core with two imide rings, and two side chains. Each side chain consists of a dimethylamino group connected to a propyl chain, which is further linked to a carbonyl group and a secondary amide group, with a methyl group attached to the propyl chain.</p>	 <p>Space-filling model of cNDI-Nme-mPry, showing the overall molecular structure with carbon atoms in white, oxygen in red, and nitrogen in blue.</p>

Design of new cyclic naphthalene diimide (cNDI)

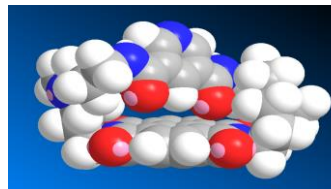
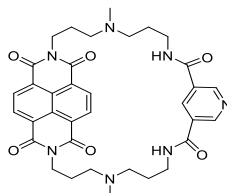
cNDI-Nme-pBen⁴⁾



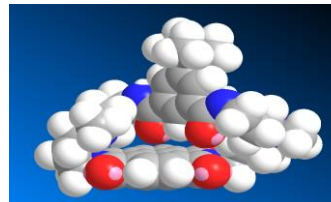
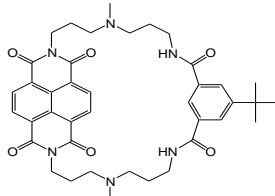
cNDI-Nme-mBen



cNDI-Nme-mPry



cNDI-Nme-mBentBu



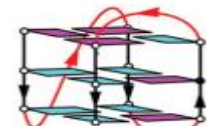
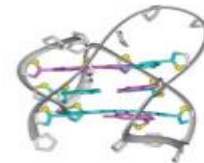
4) M. M. Islam *et al.*, *Molecules*, 20, 10963-10979 (2015).

Interaction of c NDI with varied DNAs

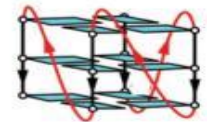
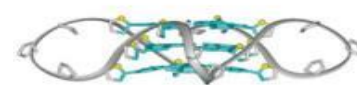
- Structural stabilizing evaluation based on melting temperature (T_m)
- Binding affinity evaluation using absorption titration
- Binding affinity evaluation using isothermal titration calorimetry (ITC)

DNA	DNA sequence
TA-core	5'-TAG GGT TAG GGT TAG GGT TAG GG-3'
<i>c-myc</i>	5'-TGA GGG TGG GGA GGG TGG GGA A-3'
ds-oligo	5'-GGG AGG TTT CGC-3' 5'-GCG AAA CCT CCC-3'

TA-core



c-myc



TA-core; G-quadruplex of telomeric region. ds-oligo; Double strand DNA.
c-myc; G-quadruplex of promoter region in cancer gene.

Binding ability evaluation using absorption titration

Table 2. Binding affinity (K) and binding number (n) of NDIs with several DNAs^a

		NDI-DM	NDI-CD2	cNDI-ch	cNDI-C3	cNDI-C3DM	cNDI-pBen	cNDI-mBen	cNDI-mPry	cNDI-mBen-tBu
TA-core	10^{-6} K/M ⁻¹	1.6	0.043 ^a	8.6*	2.8	1.3	11	13	8.9	4.9
	n	2	n.d.	2*	2	2	2	2	2	2
c-myc	10^{-6} K/M ⁻¹	1.5	0.89		2.2	2.5	3.7	1.6	5	2
	n	2	1		2	2	2	3	2	2
c-myc/TA-core		0.9	21		0.8	1.9	0.3	0.1	0.6	0.4
ds-oligo	10^{-6} K/M ⁻¹	0.60	0.096 ^a	0.033 ^a	0.015 ^a	0.017 ^a	1.1	0.55	0.39	0.024 ^a
	n	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2	2	3	n.d.

*Result for A-core

Condition: 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 mM KCl, 25°C. Scatchard analysis, ^aBenesi-Hildebrand analysis.

いずれの化合物も、2本鎖DNAよりも4本鎖DNAに対して、高い結合能を有した。

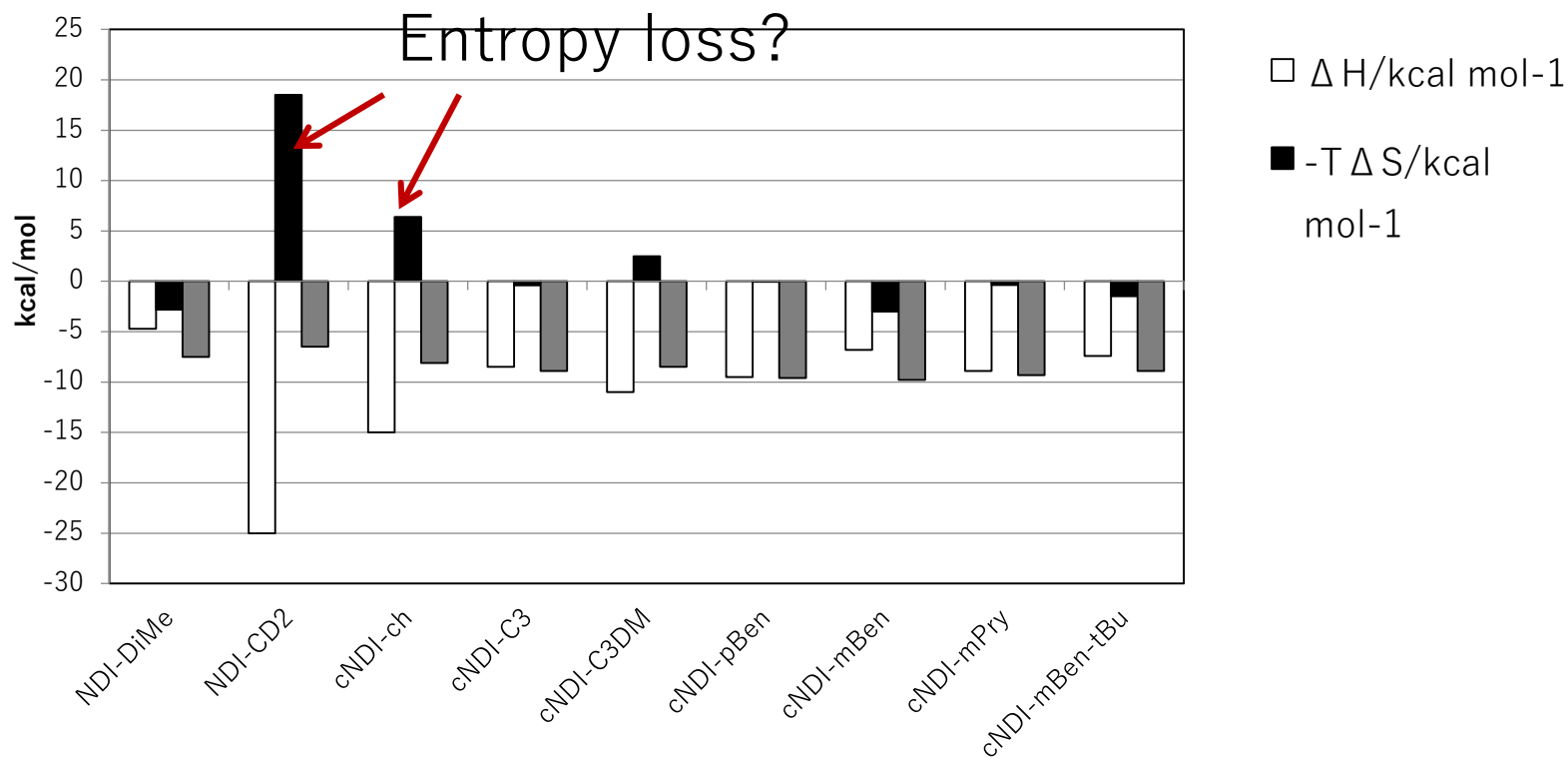
TA-coreに選択的に結合：cNDI-pBen, mBen

TA-core, c-myc同等に結合：NDI-DM, cNDI-C3, C3DM, mPry, mBen-tBu

c-myc選択的に結合：NDI-CD2

3) Y. Esaki *et al.*, *Chem. Common.*, 50 5967-5969 (2014). 4) M. M. Islam *et al.*, *Molecules*, 20, 10963-10979 (2015).

Thermodynamic parameters from ITC measurement



Enthalpy driven binding to TA-core

ITCとSPRの比較

	ITC	SPR
固定化	No	Yes
結果	Thermodynamics	Kinetics
分子量の制限	No	≈ 200 daltons
得られるデータ	Thermodynamic $K_a, \Delta H, \Delta S, n$	$K_{on}, k_{off} = K_d$ under ideal conditions
多点結合	Yes	No
ランニング・コスト	None	Chips and reagents
サンプル	In-Solution	No solids, opaque sols
必要量	2-3 nanomoles	Generally less
測定時間	30-60 min	2-10 min

Major SPR Competitor: GE HealthCare -BiaCore

T100

12/25 宿題について

出欠および評価のため、
Moodleの課題を提出して下さい。

課題提出締め切り： 1/8