

補助事業番号 2019M-150

補助事業名 2019年度 生細胞抽出物に対する超高感度ネイティブ質量分析技術および装置開発 補助事業

補助事業者名 横浜市立大学大学院 生命医科学研究科 小沼 剛

1 研究の概要

遺伝子組換え蛋白質を用いて、特異的に結合する低分子化合物を探索する場合、標的蛋白質にアフィニティタグをつけて発現できれば比較的容易に精製できるが、アフィニティタグがない蛋白質は精製が困難である。また、生体内により近い環境で相互作用解析ができれば、極めて有用な情報を得ることができる。本事業では、アフィニティタグのない蛋白質を大腸菌で発現させ、クロマトグラフィーによる精製を行わずに、夾雑環境下で特異的なリガンドとの相互作用を解析することを検討した。実験には、モデル蛋白質としてジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)を、特異的に結合する阻害剤としてメトトレキサート(MTX)および葉酸(FA)を用いた。その結果、大腸菌の菌体から蛋白質を回収する際、菌体を3時間以上凍結すること、超音波破碎を用いずペッスルで細胞膜を壊すこと、試料中の標的蛋白質の濃度を5~10 μM とすることが重要であることが分かった。最適化した手法を用いることで、大腸菌から粗抽出されたDHFRに対して、特異的なリガンド結合を質量分析(MS: mass spectrometry)装置で観測できること、そして複数の候補化合物の中から特異的に結合する化合物を見出せることがわかった。

2 研究の目的と背景

近年、MS 装置の開発が急速に進んでいる。この発展により測定試料の高分子量化が進み、蛋白質や核酸などの生体高分子の構造解析にも利用され、様々な疾患や生命現象の機序の解明に貢献している。

本事業の目的は、創薬を目指した超高感度リガンドスクリーニングのためのMSシステムの開発である。がんなどの疾患に関連した蛋白質の機能を阻害するには、その蛋白質に特異的に結合する基質(リガンド)を見つけることが必要である。つまり、リガンドが結合した蛋白質複合体の検出が創薬プロセスの最初のステップとなる。MS 装置は蛋白質を直接観測する分析法の中で検出感度が最も高い。そのため試料がイオン化さえすれば超微量でスクリーニングできる利点がある。

現在、蛋白質をイオン化させる主な方法としてエレクトロスプレーイオン化(ESI: electrospray ionization)法やマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI: matrix assisted laser desorption ionization)法などがある。中でもESI法を利用したMS(ESI-MS)は蛋白質の分子量を最も厳密に決定できる。しかしながら、リガンド結合複合体を検出するには、従来のESI-MS試料に求められる二つの条件が問題である。一つ目の条件は、試料を容易にイオン化させるため、酸や有機溶媒を水系溶媒に添加することである。ところが酸性または有機溶媒中にある蛋白質は変性してしまうため機能を失う。つまりリガンド結合ができない状態になってしまう。二つ目の条件は、精製することで夾雑物を含まない純粋な試料が求められることである。これは、凝集などが理由で精製できない蛋白質は試料になり得ないことを意味し、ESI-MS法の適用範囲をかなり限定している。一方

で、精製された蛋白質は実際に機能している細胞中とは異なる環境下であり、本来のコンフォメーション(真実の姿)を形成していない可能性も残る。

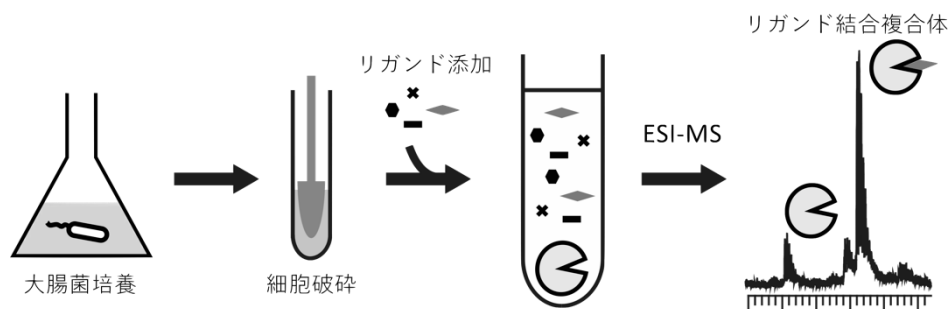
そこで、これらの条件および矛盾点を解決し、リガンドスクリーニングを目的とした新しいESI-MS法を開発する。具体的には、一つ目の条件を解決するため、標的蛋白質の構造が安定である水系溶媒でも試料がイオン化するキャピラリーを開発する。二つ目の条件を解決するため、標的蛋白質を発現させた細胞を丸ごとESI-MS測定できるシステムを構築する。

3 研究内容

生細胞抽出物を試料とした質量分析システムの開発

(http://www-mls.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/news/20200507_akashi.html)

本事業にて開発した質量分析システムのワークフローを以下に示した。



(1)新規イオンスプレーキャピラリーの開発

細いガラス管(外径 1mm x 内径 0.5 or 0.78mm x 長さ 10cm)をpuller装置により引き延ばし、ガラスキャピラリーを作製した(図1)。この際、puller装置のパラメータである加熱温度、加熱時間、引き伸ばす力、速さの値を変え、先端径が0.1umから0.5um、および先端部のくびれ等形状の様々なキャピラリーを作製した(図2)。次に、真空蒸着装置を利用し、キャピラリーを金属コーティングした。(図3)。



図 1. ガラスキャピラリー

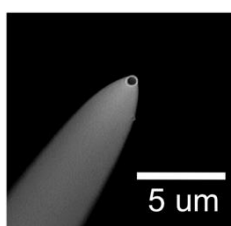


図 2. ガラスキャピラリーの先端



図 3. 金コーティングしたガラスキャピラリー

(2)質量分析の試料作製

モデル蛋白質としてDHFRを大腸菌にて発現させた。その大腸菌を酢酸アンモニウムに懸濁後、ホモジナイザーペッセルを使用して菌体を破碎した。この際、大腸菌の細胞膜は破碎す

るが、その中にある核酸は出来るだけ分断しないよう破碎回数を限定した。この菌体抽出物に、DHFRのリガンドであるメトトレキサートと非リガンドである低分子化合物を混ぜて測定試料とした。

(3) 質量分析測定及び印加電圧条件の検討

Synapt G2装置（図4左）を用いて、(2)で作成した試料のESI-MS測定を行った。測定を行いながら印加電圧などイオン源（図4右）のパラメータを最適化した。

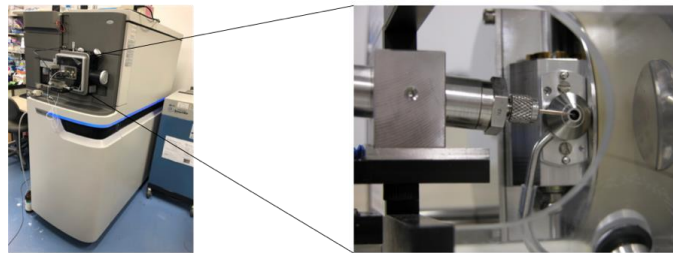


図 4. Synapt G2 装置 (左) およびイオン源の拡大図 (右)

遊離状態及びリガンド結合状態にあるDHFRのマススペクトルを得ることに成功した(図5)

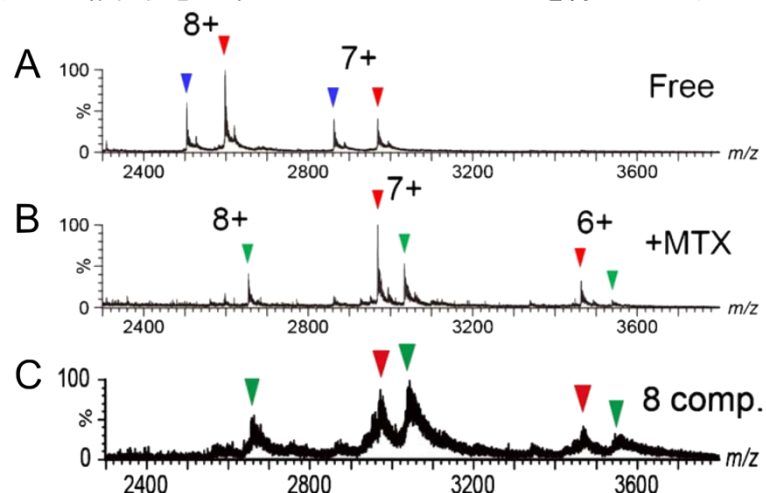


図 5. 夾雑環境下にある DHFR のマススペクトル。リガンド非存在下 (A)、メトトレキサート存在下 (B)、メトトレキサート及び 7 種の低分子化合物存在下 (C) で測定を行った。青矢印はアポ型 DHFR、赤矢印はホロ型 DHFR、緑矢印は DHFR-NADPH-MTX 複合体のピーク位置をそれぞれ示している。

4 本研究が実社会にどう活かされるかー展望

厚生労働省の統計では、2019年のがんによる死亡者数は年間38万人を超えている。現在の日本において、2人に1人はがんに罹患する。さらに男女とも、がんの死亡数は増加し続けており2019年のがん死亡者数は1985年の約2倍である。がん死亡数増加の主な原因は人口の高齢化であり、今後がん患者の増加が見込まれ、その対策は急務である。がん治療の一つである化学療法では、がんの種類やステージに応じた抗がん剤を投与し、がん細胞の死滅や増殖抑制を行

う。しかしながら、抗がん剤の投与により副作用が生じてしまったり、抗がん剤が効果的に機能しない場合もある。それ故、より良い抗がん剤の開発は日本社会ひいては世界社会において必須である。本事業で開発した超高感度MS装置を利用することで、がんの原因分子にも関わらず精製が困難であった蛋白質やそもそも大腸菌や細胞で発現量が非常に少ない蛋白質、特に創薬標的の大部分を占める膜蛋白質に対してリガンドスクリーニングを行い、新規阻害剤の開発を進めることが可能となる。さらに科学コミュニティにおいても、これまで得ることができなかった蛋白質の構造情報により新たな生命現象の解明に繋がる。

5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

生細胞から抽出した精製していない蛋白質を用いて、微量で創薬スクリーニングを行える技術開発はとても重要である。抗がん剤などの分子標的薬はがん原因蛋白質に結合し、機能する。つまり抗がん剤とがん原因蛋白質の複合体の有無を判断することで創薬スクリーニングが可能となる。

今回標的とした蛋白質(DHFR)は大腸菌により発現させており、現状の質量分析システムは大腸菌で発現する蛋白質に特化している。そこで、このシステムをさらに発展させ、昆虫細胞やヒト細胞で発現させた蛋白質に対応させることで、今後様々な蛋白質で質量分析測定できるようになる。その結果、これまで精製が困難であった蛋白質や、発現量が極めて低い蛋白質に対してもリガンドスクリーニングが可能になることが期待できる。さらに今回開発した質量分析システムは、これまで誰も成しえてない一細胞による創薬スクリーニングやテーラーメイド創薬のシステム開発を行うための基盤となる。

6 本研究にかかわる知財・発表論文等

Takano K., Arai S., Sakamoto S., Ushijima H., Ikegami T., Saikusa K., Konuma T., Hamachi I., Akashi S. "Screening of protein-ligand interactions under crude conditions by native mass spectrometry"
Anal. Bioanal. Chem. In-press

7 補助事業に係る成果物

(1)補助事業により作成したもの

該当無し

(2)(1)以外で当事業において作成したもの

該当無し

8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名: 横浜市立大学大学院 生命医科学研究科

(ヨコハマシリツダイガクダイガクイン セイメイイカガクケンキュウカ)

住 所: 〒230-0045

神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-29

担 当 者: 助教・小沼剛 (コヌマツヨシ)

担 当 部 署: 構造エピゲノム科学研究室 (コウゾウエピゲノムカガクケンキュウシツ)

E - m a i l: konumax@yokohama-cu.ac.jp

U R L: <http://www-mls.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/stbiol/konuma/konumaHP.html>