

補助事業番号 2023M-398

補助事業名 2023年度 超高感度ネイティブ質量分析を利用した膜蛋白質に対する創薬スクリーニング技術の開発 補助事業

補助事業者名 横浜市立大学 小沼 剛

1 研究の概要

質量分析(MS: mass spectrometry)は試料をイオンにして質量を求める方法で、微量の試料から迅速にデータを取得できる。一般に、蛋白質の質量分析で感度を上げるには、酸や有機溶媒を加えてイオン化しやすい条件を整える必要がある。しかしながら、このような条件では蛋白質は変性してしまい、機能する状態を保持することができない。機能する姿のまま観測するには、感度をある程度犠牲にしても、中性の水溶液として試料を調製して、ありのままの状態を保って質量分析する(=ネイティブ質量分析)方法が用いられる。ネイティブ質量分析では、細胞内の蛋白質の状態の変化を質量の変化として捉えられるため、蛋白質の機能を理解する上で非常に有用な情報が得られる。本事業では、このネイティブ質量分析の利点を利用し、創薬標的として有望な膜タンパク質GPCRIに対して創薬スクリーニングの技術開発を行う。

2 研究の目的と背景

人の寿命に比例して、がん罹患する患者数も増加しているが、抗がん剤を含め医療技術の発展により、寛解できるがんも増えてきている。ところが新規抗がん剤の開発には、基礎研究から治験および承認まで約20年もの期間が必要とされている。そこで、短い期間で抗がん剤を開発するため、生細胞から抽出した精製していない蛋白質を用いて、微量で効率的に創薬スクリーニングする技術を開発する。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。そこで微量試料で分析可能な質量分析装置に着目した。本申請事業にて質量分析時のイオン化問題や蛋白質の変性問題を解決することで、ネイティブ質量分析によりこれまで誰も成しえていない膜蛋白質複合体を検出し、創薬スクリーニングに応用する基盤技術を構築する。

質量分析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。そこで我々は、リガンドスクリーニングを目的とした大腸菌発現系において生産された蛋白質について、精製を行うことなしに質量分析するシステムを構築した。

次のステップとして、本申請事業では、がんに関わる膜蛋白質、特にGPCRを標的とする質量分析システムの構築を行う。GPCRは大腸菌では発現せず、ヒト細胞もしくは昆虫細胞が用いられる。また、GPCRは構造が不安定であるため、その複合体の検出は非常に難しく、キャピラリー先端系の検討やコーティング金属の検討、試料調整における最適な条件検討から実験を行う必要がある。

3 研究内容

[i] 先端径の異なるガラスキャピラリーの作成

ネイティブ質量分析の測定にはガラスキャピラリーが必須である。このガラスキャピラリーの先端径は、サンプルに応じてMSスペクトルの質に大きな影響を与えることが知られている。そこで先端径の異なるガラスキャピラリーを作成した(図1)。

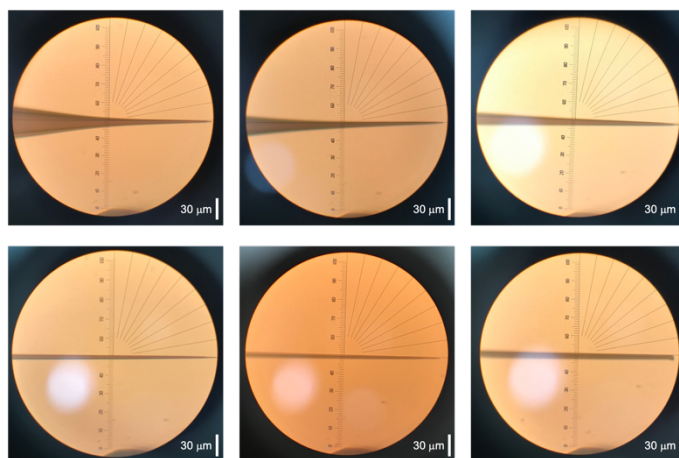


図1.さまざま先端半径および形状のガラスキャピラリー。

[ii] IL-8の大腸菌による大量発現と精製

IL-8遺伝子をpET32に挿入したプラスミドを用いて大腸菌BL21(DE3)の形質転換を行なった。この菌体を20mlのLB培地に植菌し、37°Cで1晩浸透培養を行なった。この前培養液を2LのLB培地に植え継ぎ37°Cで浸透培養を行い、ODが0.6程度に達したところで温度を15°Cに下げ、

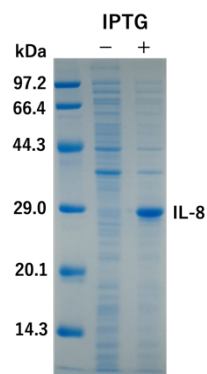


図2. SDS電気泳動ゲル。IPTG添加前(-)と添加後(+)。IPTG添加後のレーンにIL-8のバンドが確認できる。

イソプロピル-β-D(-)-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加してIL-8の発現を誘導した。さらに一晩浸透培養を行った後、遠心して菌体を回収した。ここでSDS電気泳動によりIL-8の発現確認を行なった (図2)。回収した菌体はLysis緩衝液で懸濁し、超音波による菌体破碎を行なった。遠心後、上清をHisTrapカラムにアプライした。イミダゾールを含む緩衝液でIL-8を溶出し、これをゲルろ過カラムで精製した。Hisタグを切断するためにHRV3Cタンパク質分解酵素を加え、4°Cで一晩インキュベートした。この溶液を陽イオン交換カラムにてIL-8を精製した (図3)。最後に、溶媒交換と精製兼ね、ゲルろ過を行なった。非常に純度の高いIL-8を得ることに成功した。

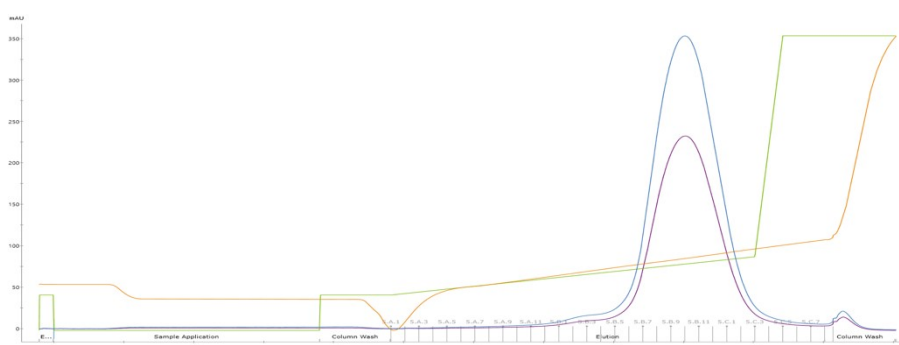


図3. イオン交換カラムによるIL-8の精製。IL-8の溶出は280nm (青)と260nm (紫)の吸光度によって観測された。

[iii] IL-8の質量分析

精製したIL-8の溶液中での構造状態を解析するためネイティブ質量分析を行なった (図4)。その結果、IL-8は溶液中で単量体と二量体の平衡状態で存在していることが分かった。またこのことから精製したIL-8は機能的な構造状態であることが確認できた。

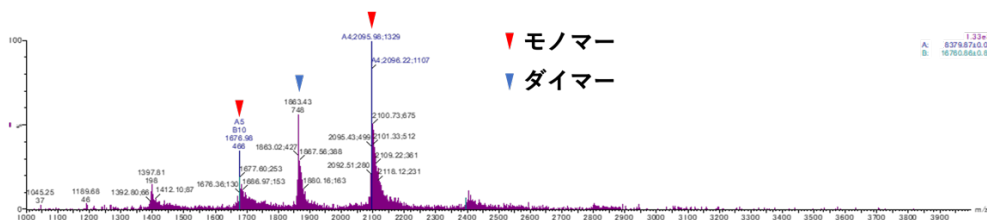


図4. IL-8のネイティブ質量分析結果。IL-8の単量体 (赤三角: 5 価 (左) および 4 価 (右)) と二量体 (青三角: 9 価) 由来のピーク。

[iv] mGs/iの大腸菌による大量発現と精製

mGs/i遺伝子をpET47に挿入したプラスミドを用いて大腸菌BL21 (DE3)の形質転換を行なった。この菌体を20mlのLB培地に植菌し、37°Cで1晩浸透培養を行なった。この前培養液を2LのLB培地に植え継ぎ37°Cで浸透培養を行い、ODが0.6程度に達したところで温度を15°Cに下げ、IPTGを添加してmGs/iの発現を誘導した。さらに一晩浸透培養を行った後、遠心して菌体を回収した。ここでSDS電気泳動によりmGs/iの発現確認を行なった(図5)。回収

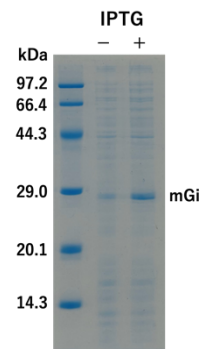


図 5. SDS電気泳動ゲル。IPTG添加前(-)と添加後(+)。IPTG添加後のレーンに mGs/i のバンドが確認できる。

した菌体はLysis緩衝液で懸濁し、超音波による菌体破碎を行なった。遠心後、上清をHisTrapカラムにアプライした。イミダゾールと補酵素であるGDPを含む緩衝液でmGs/iを溶出し、これをゲルろ過カラムで精製した。Hisタグを切断するためにHRV3Cタンパク質分解酵素を加え、4°Cで一晩インキュベートした。この溶液をゲルろ過カラムにアプライしてmGs/iの精製を行なった。非常に純度の高いmGs/iを得ることに成功した。

[v] mGs/iの質量分析

精製したmGs/iの溶液中での構造状態を解析するためネイティブ質量分析を行なった(図6)。その結果、mGs/iは溶液中で遊離状態とGDPが結合した複合状態が存在していることが分かった。またこのことから精製したmGi1は機能的な構造状態であることが確認できた。

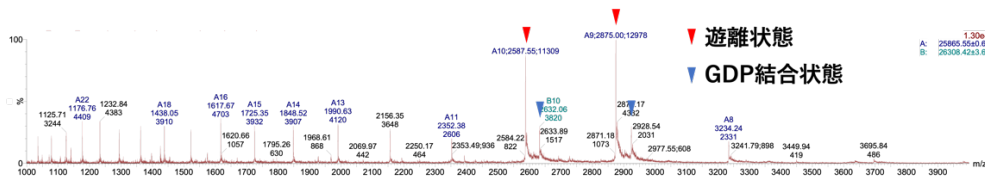


図 6. mGs/iのネイティブ質量分析結果。mGs/iの遊離状態(赤三角:10個(左)および9個(右))とGDP結合状態(青三角:10個(左)および9個(右))由来のピーク。

[vi] 昆虫細胞を利用したCXCR1の発現条件の検討

CXCR1は膜タンパク質である。上記で精製したIL-8やmGs/iは膜タンパク質ではないので大腸菌による大量発現を行ったが、膜タンパク質は通常、大腸菌には発現しない。そこで、CXCR1の大量発現には昆虫細胞発現系を利用することとした。発現条件を最適化するために、「ウイルス作製方法の検討」、「静置培養と振とう培養の比較」、「ウイルス添加量の検討」を行うことで、CXCR1の発現量を向上させることに成功した。ここで事業期間が終了してしまったため、CXCR1の精製および質量分析は今後継続して行う予定である。

4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

厚生労働省の統計では、2024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2024年がん死亡者数は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質量分析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

膜タンパク質を微量で創薬スクリーニングを行える技術を開発することは新規薬剤の開発においてとても重要である。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。

今回標的とした膜タンパク質(CXCR1)は昆虫細胞により発現させている。これまでに我々が開発した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ラ—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

該当なし

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

該当なし

(2)(1)以外で当事業において作成したもの

該当なし

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-mail： konumax@yokohama-cu.ac.jp

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