

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：74408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840052

研究課題名(和文) 質量分析法を用いたリボソーム複合体のsemi-in vivo溶液構造解析

研究課題名(英文) semi-in vivo analysis on structural dynamics of ribosome complex by mass spectrometry

研究代表者

山本 竜也 (Yamamoto, Tatsuya)

公益財団法人サントリー生命科学財団・統合生体分子機能研究部・研究員

研究者番号：70437573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内の巨大タンパク質複合体について、その構造ダイナミクスを検出・解析することで生体内での機能解析を推し進めていくために、単細胞生物(大腸菌)と高等動物(ヒト培養細胞HEK293)の細胞から直接取り出したリボソームをターゲットに質量分析とH/D交換を用いた動的構造解析法の開発を行った。H/D交換反応を終えたのち粗精製やマトリクス溶液の最適化により、1mg以下の細胞の超音波破碎液からリボソームタンパク質の構造変化を一斉に捉える測定法を確立することに成功した。この方法により遺伝子クローニングや大量発現を介さず、見たい生物個体から直接タンパク質複合体の構造変化を捉えられることが示された。

研究成果の概要(英文)：About macro protein complexes, we developed a new method for directly-extracted ribosomes from unicellular organism (E.coli) and higher animal cells (HEK293: human cultured cell) by mass spectrometry and H/D exchange, to progress the function analysis in the cell through the structural analysis. We succeeded in development of a method, which detects structural changes of many ribosomal proteins from sonicated cell extracts under 1mg cells, by rough purification and optimization of MALDI matrix. This developed method suggested a possibility for the directly detection of structural change from individual target without the gene cloning and over expressions.

研究分野：生物物理学

キーワード：リボソーム 構造機能相関

1. 研究開始当初の背景

巨大タンパク質複合体は、その大きさや多成分系であるという理由から溶液中での構造情報を得ることが難しく、困難を極めている。

中でもリボソームの構造生物学的研究は、1999年から2000年にかけての結晶構造解析により原子レベルの構造が解かれ、その後クライオ電顕を用いた反応中間体の構造が次々と解かれることで反応メカニズムが詳細に理解されてきているが、溶液中での構造変化を捉えることはできていなかった。そこで申請者は質量分析と H/D 交換を応用することで、溶液中で各タンパク質のダイナミクス変化を一斉検出する手法を開発し、ペプチド合成を行うタイムスケールでのダイナミクス変化を検出することに成功していた¹。

2. 研究の目的

高度に精製された複合体を用いて溶液中での動的構造を解析する技術が開発できたが、細胞内での挙動は本当に同じなのだろうか？その問題を解決するため、高感度で多成分を一斉に解析できる質量分析と H/D 交換を未精製のリボソーム複合体に応用することで、巨大複合体の構造変化を検出する手法を確立し、分子生物学的手法だけでなく、これまで困難とされてきた構造解析から巨大複合体の生命現象を解明する道を切り開く。

本申請の具体的な目標は大腸菌を使った単細胞生物とヒト細胞を使った高等動物由来の動的構造変化の測定を高感度に測定する系の確立を通じて、生物種を問わず幅広く複合体の動的構造を捉えることである。また、同時にソフトウェア開発を含めた解析技術の新展開を進める。

3. 研究の方法

(1) 精製リボソームを MALDI-TOF MS で測定すると、Fig.1 (上)のようなスペクトルが得られる。スペクトル上に示されたピークは全てリボソームタンパク質由来のピークで、rRNA は検出されない。また大腸菌の菌体を測定すると Fig.1(下)のようなスペクトルが得られ、リボソームタンパク質由来の物を中心に検出される。

これらに重水を過剰量加えることで H/D 交換を開始し、一定時間後に酢酸と氷冷により pH と温度を下げることで交換をクエンチする。H/D 交換を行うとこれらのピークが高質量側にシフトし、各タンパク質の質量経時変化を調べることで、交換量や交換速度といったダイナミクス由来の情報を得る。*クエンチ時に側鎖は完全に交換される。

H/D 交換速度は以下のモデルで表される。

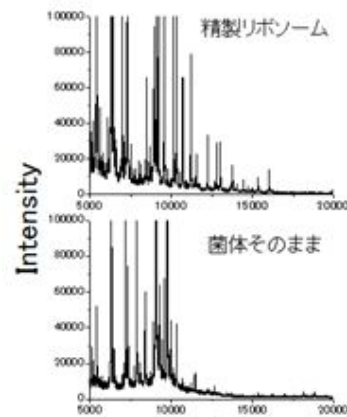
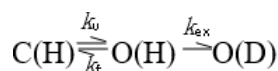


Fig1 精製リボソームと大腸菌菌体の MS スペクトル

C はクローズ、O はオープン構造を表しており、交換速度が分かれば、 k_{ex} は既知であるため、C と O の構造変化による平衡定数が算出され、エネルギーに換算できる。分子表面や激しく揺らいている部分は交換が速いが、分子内部や二次構造部位は交換が遅い。また交換量が多いタンパク質はフレキシブルな領域が多く、交換量が少ないものは硬い領域が多いと言える。この現象を利用して、50 を超えるリボソームタンパク質のダイナミクスが抗生物質によってそれぞれどのように影響を受けるのかを一斉測定する。

(2) 本研究の中で解決すべき課題は主に以下のような点である。

より S/N 比の高いデータを取得する前処理・測定条件の網羅的探索 (特に高分子量側が難しい)

重水を均一に取り込ませるために細胞膜に穴をあける処理条件の探索。

少ない細胞数で情報を得るための分析感度の向上

4. 研究成果

(1) 平成 25 年度は大腸菌を対象に測定法の開発・最適化を行った。上記の 3 つの課題のうち重水を均一に取り込ませる方法を検討した。界面活性剤やメリチンのような細胞膜孔を作るペプチドを検討したが、質量分析時にイオン化の阻害を促し、S/N 比の低下や検出感度の急激な低下を伴うため使用できなかった。最終的には 10W の弱めの超音波を数秒間パルス照射し、細胞膜を破壊することで解決した。現象としては細胞内に重水を取り込んでいているものを見るよりも、細胞内から飛び出しているものを見ていると考えられ、粗面小胞体に結合しているリボソームを扱うには別の方法を検討する必要があるが、将来的にはそれらを区別して扱うことができる可能性を示唆している。

残りの課題である S/N 比と感度であるが、それらは同時に解決を図った。S/N 比と感度が低下する原因は主に Cell デブリと脂質成分によるイオン化の阻害であったため、重水

素交換の反応を実施しながら多段階の遠心処理(最大 20000g)をすることで大幅なシグナルの改善につながった。また、MALDI マトリクス成分の調整、液量調整、premixing 法を適用することで大幅な感度上昇を実現した。その結果 45 種類のタンパク質を同時検出することに成功した。

(2)平成 26 年度は引き続き大腸菌を基に感度の向上に努めた。主にマトリクスの成分調整と超音波によって細胞から放出されたりリボソーム溶液の混合方法、混合比率などを様々な条件で検討した結果、有機溶媒のアセトニトリル 70%が重要であることが分かった。一般の精製タンパク質での測定が 50%程度で良質なデータが取れるのに対し、高い値といえる。理由としては rRNA とタンパク質を積極的に解離させることで感度が高まっていると考えられる。また、実際に重水を使った実験を行った際に、反応の停止で pH を 2.5~3.0 程度に下げ、温度を低温に保つ必要があり、本実験で pH 低下は 2%酢酸で行った、この際いくつかのタンパク質がアグリゲーションを起こしており、一般的な ESI-MS を使った H/D 交換法では測定できないが、我々独自の MALDI-MS を使った方法ではそのまま測定することが可能であることがわかり、大きな発見であった。これらの最適化の結果、1mg 以下の大腸菌細胞からでも十分なシグナル検出感度と S/N 比を得られることが分かった。

(3)平成 27 年度ではヒトの培養細胞 HEK293 を用いたりボソームの動的構造変化測定法の開発を行った。大腸菌の方法をベースに測定系開発を行ったが、同じ方法では検出できなかった。理由としては脂質成分の違い、リボソームがデブリにかなり巻き込まれているなどが考えられた。また細胞に直接レーザー脱離イオン化を行うなど試みたが、改善は見られず、最終的には抽出液を用いることで S/N 比の向上を果たした。より生体内に近いリボソーム構造の情報を得るために、比較的弱い超音波を使った細胞破砕液をそのまま H/D 交換に使ったが、粗精製を行えばより S/N 比の高い情報が取れることも分かった。直接破砕液で 34 のピークがリボソームタンパク質の質量と一致し、ヒト由来のリボソームについて世界で初めて動的な構造変化を一斉検出可能になった。

得られた成果はピークの同定を含めて更なる解析を進め応用データを追加し、論文化予定である。

(4)全体を通じて解析ソフトウェアの開発を行った。ESI-MS を使った H/D 交換解析は自動化が進み、短時間で解析可能となってきているが、我々の開発している MALDI-MS を用いた方法においてはインフラが全く揃っていない。これまではピーク一つ一つを

読み取り数値入力していたが、JAVA 言語によるスペクトルピークピッキングソフトの開発によりこれまで 1 か月程度かかっていた巨大複合体の解析が 1 週間程度にまで短縮され、より対象範囲が広がった。今後は自動解析機能の追加検討している(Fig.2)。

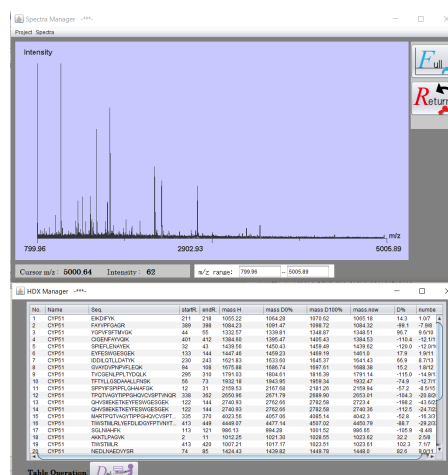


Fig.2 開発した H/D 交換実験解析ソフトの解析画面例

(5)また、本申請と直接関係するテーマではないが、微量質量分析技術の一部が PGRMC1 という膜タンパク質の構造解析に生かされ、”Haem-dependent dimerization of PGRMC1/Sigma-2 receptor facilitates cancer proliferation and chemoresistance “というタイトルで *Nature communications* に採択された²⁾。

今回開発した手法は更なる分析前処理の改良により、粗精製画分を用いた阻害実験・相互作用実験などを通じて、これまで困難とされてきた構造解析から巨大複合体の生命現象を解明する道が開かれた。

<引用文献>

Tatsuya Yamamoto*, Shunsuke Izumi, and Kunihiko Gekko, *FEBS Letters*, 580, 3638-3642 (2006)

Yasuaki Kabe, Takanori Nakane, Ikko Koike, Tatsuya Yamamoto, et al. *Nature Communications*, 11030, (2016)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Tatsuya Yamamoto, Yasuaki Kabe, Makoto Suematsu

“Dynamics analysis of ribosome structure using 1 mg cell revealed by H/D exchange” American Society for Mass Spectrometry, 2014.6.15-19,

Baltimore, USA.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://homepage1.bb-west.ne.jp/pepdesi/index.html>

開発ソフト(一部のみ公開)

<http://homepage1.bb-west.ne.jp/pepdesi/ProteinDesignist.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 竜也 (Yamamoto, Tatsuya)
公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・研究員
研究者番号：70437573

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：