

令和元年5月24日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07329

研究課題名（和文）目的生物由来微量タンパク質の直接動的構造解析

研究課題名（英文）Structural dynamics analysis of extract protein from target organisms

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・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） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：生体内のタンパク質構造の動きは生命現象理解に重要であるが、これまでの構造研究では大腸菌のような別の生き物に大量に作らせて解析しているため、他のタンパク質との相互作用やその動きについて本来の活動状況を反映しきれていなかった。そこで、生命現象をタンパク質構造から説明するために、質量分析と水素/重水素交換法を応用し、分析器具や解析ソフトウェアの開発から基盤構築することで、目的生物から得られる微量タンパク質を直接観察する方法の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により目的とする生物のタンパク質を直接観察することが可能となり、これまであまり注目されていなかった翻訳後修飾による構造変化や複数タンパク質の構造変化を同時に捉えられるようになる。学術的にはキーとなるタンパク質を中心として周辺タンパク質や化合物との新しいやり取りが観測される可能性があり、また同じ生物内でも病理部位特有のタンパク質構造変化や特有な相互作用を捉えることが可能となってくる新しい技術である。

研究成果の概要（英文）：Protein dynamics in an organism are important in elucidation of biological phenotype. However, intrinsic protein-protein interactions and the dynamics have never been detected, because recent structural researches have mainly used over-expressed proteins from model organisms. We made a new method using extract proteins from target organisms to elucidate biological phenotype from protein structure by the application of Hydrogen/Deuterium exchange and mass spectrometry, through developments of measurement tools and dedicated analytical software.

研究分野：生物物理

キーワード：質量分析 動的タンパク質構造 微量分析 重水素交換

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) タンパク質構造はその機能と密接な関係にあるが、活性を含む定量的なデータを十分に説明できていない。主な理由は、現在の構造解析が本来とは異なる生物を使った大量発現系を用いていることや溶液構造解析可能な対象が少ないこと、複数タンパク質の一斉解析が困難であることなどである。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では本来あるべき生物の中から微量なタンパク質を捉え、細胞内マトリクス溶液を含んだ状態で重水素交換 (H/D 交換) を行い、質量分析によりその質量変動を解析することにより、目的生物由来微量タンパク質の直接動的構造解析を確立する。確立した方法はシグナル伝達タンパク質群の相互作用にて検証し、分子生物学と構造生物学を直接つなぐ新しい学問領域の創造につなげる。

### 3. 研究の方法

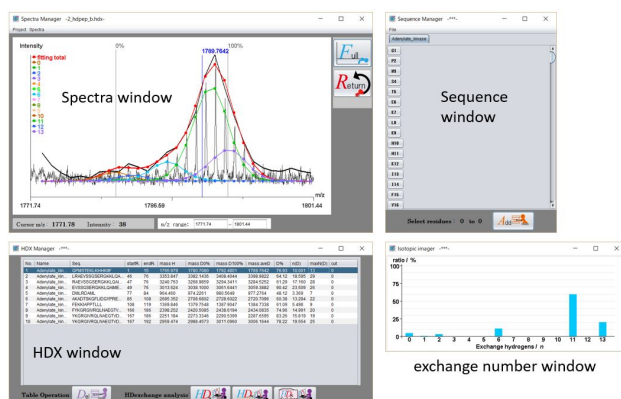
(1) 動物培養細胞からの内部液ごと回収し、タグや抗体で目的タンパク質と結合タンパクを精製する。これらに重水を過剰量加えることで H/D 交換を開始し、一定時間後に酢酸と氷冷により pH と温度を下げることで交換をクエンチする。得られたタンパク質を Pepsin により消化することで部位特異的情報を得ることもできる。H/D 交換を行うとこれらの質量が増えていく。各タンパク質の質量経時変化を MALDI-TOF MS を用いて調べることで、交換量や交換速度といったダイナミクス由来の情報を得る。

(2) H/D 交換の実験データの高精度な解析には時間がかかるが専用ソフトウェアがないため開発を行う。

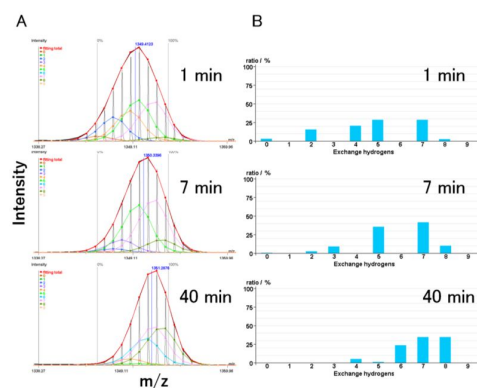
(3) 質量分析の前処理法はデータの精度に直結するが抽出サンプルに対する方法が確立されていないためその確立を行う。

### 4. 研究成果

(1) H/D 交換の高精度解析に向けたソフトウェアの開発を行った。これまでの方法論では捨ててしまっている精密質量データを解析段階で十分に生かすことと、解析速度の向上を目指して Java 言語による GUI 形式の専用ソフトウェア開発を行った(ソフトウェア名: scipas DX [Single-Charged Ion Peaks Analyzing System for Deuterium eXchange])。これまでは、質量分析の結果が複雑な同位体の混合スペクトルとして得られるため解析が難しく、H/D 交換質量分析は一般的な手法として広まっていなかったが、wet 研究者である自らが解析ソフトを作成することで、高精度かつ高速な解析を実現することに成功した。本ソフトを実際のスペクトルに応用した結果、これまで生かせていなかったリフレクトロン型分析計による高分解能スペクトルのデータが十分に活用できるようになり、交換水素の個数とその存在比を精度よく観察できることがわかった。さらに解析の自動化を極限まで追求した結果、複数データを単一フォルダに入れておくだけで一斉解析できるようになり、構造解析で問題となる解析時間(NMR などでは数種間かかる)がほぼゼロで行えるようになっただけでなく、複数サンプルのスクリーニングなどへの応用も可能になった。また、同位体分布の形状から平均データだけでなく溶液中で異なるタンパク構造変化をしている集団を分離することに成功し、それぞれ重水素交換速度と溶媒露出割合を算出するアルゴリズムの開発に成功した。今後、多くの研究者に使っていただく予定である。



解析ソフトウェア Scipas DX の外観



実際の解析結果。

(2) H/D 交換前処理法の確立を行った。交換反応条件の試薬、pH、温度、手順、質量分析パラメータについて網羅的に探索し、安定して結果が得られる方法の確立を行った。その結果サンプルごとの最適条件ではなく、どんなサンプルでもそれなりのデータが得られる条件の探索に成功し、様々なサンプルの高速解析につながる条件が得られた。また上記にソフトウェア開発により解析精度が格段に高まったことで実験精度のぶれが目立つようになったため、H/D 交

換実験特有の誤差である Back exchange を極限まで減らす為、専用の前処理装置の作成を行った。



H/D 交換前処理装置の外観

(3) 質量分析と H/D 交換反応を利用して、大量発現系を用いずに目的とする生体試料から直接微量タンパク質を取り出し、その構造変化をみるという課題に挑んだ。具体的には Adenylate kinase(AK1)、や MAPR ファミリータンパク質といった細胞増殖を担うタンパク質群を中心に、測定データの収集を行った。HEK293 などの培養細胞を 10cm dish に full growth まで増殖させた細胞塊から、AK1、Neudesin、PGRMC1 の抗体と磁気ビーズを用いて濃縮精製を行い H/D 交換反応を測定できる条件を検討した。AK1 については 10cm dish 1 枚から検出できることが示されたが、PGRMC1 などは検出自体が不安定であることが分かった。現状では比較的多く存在する代謝タンパク質などでは検出可能であるが、微量タンパク質の検出はより高効率な前処理条件を検討する必要がある。これらの結果から動物・植物組織から直接取ってきても同様の結果が得られる可能性が高い。新たに持ち上がった課題や可能性として、構造内の部位特異的情報を取得するためのサンプル不均一性(翻訳後修飾、タンパク質間相互作用、基質結合状態など)をどう分析するのかという点も見えてきた。それらに対しては基質添加や相互作用タンパク質の添加などにより際しい情報が得られる可能性が広がった。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

山本、佐竹. 細胞・組織特異的な天然タンパク質複合体の構造変化検出法確立  
第 39 回 日本分子生物学会年会 11.29-12.2 2016 (横浜) ポスター賞

山本, 佐竹. MALDI MS によるタンパク質 H/D 交換解析の高度化と実践.  
第 40 回日本分子生物学会年会 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会) 12.6-9, 2017 (神戸)

第 66 回質量分析学会総合討論会/日本プロテオーム学会 2018 年合同大会 5.15-18, 2018 (大阪)

山本, 佐竹 MALDI MS によるタンパク質 H/D 交換解析の高度化

International BMS Symposium 2018 in Kyoto 10.26-27, 2018 (Kyoto)

Yamamoto, Satake Advancement and application of H/D exchange analysis of protein by MALDI MS

第 41 回 日本分子生物学会 11.28-30, 2018 (横浜)

山本, 佐竹 MALDI MS による多条件下タンパク質の H/D 交換解析高度化

〔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:

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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

(1) 研究成果と関連ソフトウェア

<https://protein.p-desi.net/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：山本 竜也

ローマ字氏名：Yamamoto Tatsuya

所属研究機関名：公益財団法人サントリー生命科学財団

部局名：生物有機科学研究所

職名：研究員

研究者番号（8桁）：70437573

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。