

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16091

研究課題名(和文)細胞内環境下の新規構造解析手法 In-cell Native MSの確立

研究課題名(英文)Development of In-cell Native MS for structural biology

研究代表者

末松 和美(七種和美)(Suematsu Saikusa, Kazumi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・計量標準総合センター・主任研究員

研究者番号：60608769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内環境下におけるタンパク質分子の動的構造の解明を目指し、タンパク質を変性せず複合体のまま測定可能なネイティブ質量分析を用いた新規分析手法の確立を試みた。ネイティブ質量分析における従来の測定溶媒である揮発性の塩溶液から細胞環境に近い条件へ測定溶媒を変更することによって、細胞内環境におけるネイティブ質量分析の測定基盤を構築した。また、よりハイスループットな構造解析手法への発展を目指し、ネイティブ質量分析の自動化システムを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内は様々な分子が存在する複雑環境下であり、その中におけるタンパク質の機能を解明するためには、細胞内環境下またはその環境に近い状態でタンパク質を観測する必要がある。それに対し、本研究は、溶液中の相互作用状態を保ったまま測定可能なネイティブ質量分析を用いることによって、細胞内における微量なタンパク質の構造解析手法の確立を目指した。本手法で確立した技術は様々な培養細胞や抗体を利用した分子標識方法と組み合わせる手法などに応用していくことで創薬・臨床研究への応用へ発展できると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to establish a new analytical method using native mass spectrometry, which enable to measure masses of protein complexes without a collapse in order to reveal the dynamic structure of proteins in an intracellular environment. The measurement basis for native mass spectrometry in the intracellular environment was established by changing the measurement solvent from a volatile salt solution to conditions closer to the intracellular environment. In addition, an automated system for native mass spectrometry was established with the aim of advancing to a more high-throughput structural analysis method.

研究分野：生物物理学

キーワード：質量分析 タンパク質複合体 不揮発性緩衝液

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内で機能している生体高分子は立体構造を持ち、その構造を元に機能を発現している。このため、X線結晶構造解析や核磁気共鳴 (NMR) などの分析手法を用いてタンパク質およびその複合体の構造が原子レベルで解析されてきた。しかしながら、このような試験管内 (in vitro) は実際に働く細胞内環境とは異なっており、生体高分子の構造や機能、性質は異なる可能性がある。このため、生きた細胞内のタンパク質の動態を原子レベルで解析することのできる in-cell NMR が注目を集めている (Serber, Z. et al., JACS, 2001)。この手法では現在までにフレキシブルな構造領域の立体構造の違いや細胞内タンパク質のフォールディングの不安定化が明らかにされている。しかしながら、細胞中にラベルされたタンパク質を挿入または過剰発現させてタンパク質の動態を観察するため、将来的にはより微量で簡便に細胞内の構造解析ができる手法を開発する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では微量かつ簡便に細胞内におけるタンパク質の構造を解析する手法を確立することを目指し、ネイティブ質量分析を用いた細胞環境下におけるタンパク質の構造解析手法の構築を試みる。ネイティブ質量分析では従来、揮発性の塩である酢酸アンモニウム溶液を溶媒に用いることでタンパク質およびタンパク質複合体のイオン化を可能にしてきたが、細胞内環境下のタンパク質の分析に適用するために、分析手法を、様々な緩衝液における条件検討、大腸菌溶解液内タンパク質における解析条件の検討を進めていく。さらに、これまでのネイティブ質量分析は測定試料を手動でチップに導入することによって分析していたため、より汎用性の高い方法へと展開していくことを目指し、オンラインネイティブ質量分析の構築を試みる。

3. 研究の方法

ネイティブ質量分析は微量なエレクトロスプレーイオン化 (nanoESI) を用いて分析を行う。不揮発性緩衝液や大腸菌破砕液存在下での分析を可能にするため、それらのタンパク質溶液に濃い酢酸アンモニウム溶液を添加して行い、それぞれの系に対して最適な酢酸アンモニウムの量を検討する。一方、オンラインネイティブ質量分析はサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) と組み合わせた液体クロマトグラフィー質量分析として構築する。構築したシステムは流量を最適化し、測定可能な分子量範囲の検討、連続測定でのばらつきなど様々な項目で分析の評価を行う。

4. 研究成果

4 - 1. 緩衝液存在下のタンパク質複合体の測定とヌクレオソーム関連複合体への展開

研究代表者はタンパク質の精製用緩衝液である Tris-HCl などの不揮発性緩衝液存在下での測定を可能にするため、酢酸アンモニウムをイオン化促進剤として異なる 2 種類の相互作用を持つ 100 kDa を超える巨大タンパク質複合体について不揮発性緩衝液存在下におけるネイティブ質量分析の測定条件を検討した。使用したタンパク質複合体は multi-subunit で構成されたタンパク質複合体であるアルコール脱水素酵素 (ADH, 140 kDa) と、DNA とタンパク質複合体であるヌクレオソーム (NCP, ヒストン 8 量体+147 bp DNA, 200 kDa) である。測定の結果、3.2 mM Tris-HCl 存在下において、ADH では最終濃度 400 mM の酢酸アンモニウムの添加でタンパク質複合体が観測されたのに対して、NCP では 200 mM の酢酸アンモニウムの添加でイオンが検出された。この違いはそれぞれのタンパク質複合体の相互作用様式から生じており、イオン化の過程における塩橋の再編成の効率によることが示唆された。

このように不揮発性緩衝液存在下での分析手法を確立したため、酢酸アンモニウムでは沈殿し測定が困難であったクロマチンリモデリング因子の一つである Facilitates Chromatin Transcription (FACT) による NCP との相互作用解析に適用した (Mayanagi K., Saikusa K. et al., Sci. Rep., 2019)。その結果、FACT 内の NCP 結合に参与する Mid-AID ドメインのうち、AID ドメインのみでは、112-bp の NCP と AID の複合体が観測されたのに対し、Mid-AID ドメインでは、112-bp の NCP と Mid-AID の複合体、Mid-AID のピークとともに 112-bp のヘキサソームのピークも観測されることを明らかにした (図 1)。この結果をクライオ電子顕微鏡での構造と関連付けることによって、FACT における NCP の再構成過程を解明するに至った。

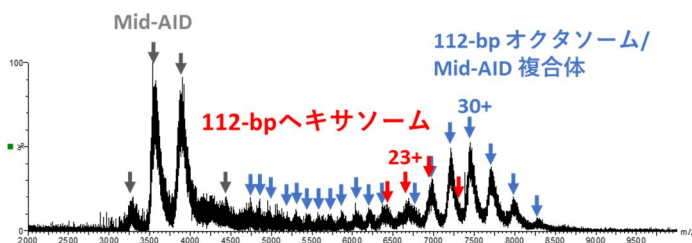


図1 112-bp のヌクレオソームと Mid-AID ドメインのESIマススペクトル

4 - 2 . 大腸菌溶解液下でのタンパク質複合体の測定法の開発

細胞内でのタンパク質-基質の複合体の測定技術を確認するため、大腸菌発現されたジヒドロ葉酸還元酵素 DHFR をモデルとして細胞内環境におけるネイティブ質量分析を試みた（横浜市立大学・明石教授との共同研究）。本研究においても上記の 4-1 と同様にイオン化促進剤として酢酸アンモニウムを添加する方法を用いた。その結果、サンプル調製におけるソニケーション時間が最も重要であり、ソニケーションの時間を 0 とすることで夾雑物として混入する DNA を最小限にすることができ、タンパク質イオンを検出することが可能となった。また、本方法を用いて DHFR を様々な化合物と相互作用させた結果、DHFR と相互作用する特定の基質のみ複合体が観測されることがわかった。

4 - 3 . オンライン SEC ネイティブ質量分析の構築

4-1 や 4-2 に示したようにネイティブ質量分析は細胞環境下に近い条件での測定が可能であることが示された。しかしながら、このような分析は主に手動で行われており、低分子医薬品のスクリーニングなどハイスループットな分析へ展開するためには分析の自動化が重要となる。そこで、ネイティブ質量分析の自動化を目指し、SEC 分析と組み合わせたオンラインネイティブ質量分析システムを構築した。構築したオンラインネイティブ質量分析は、ネイティブ質量分析に適した nanoESI を可能にするため、SEC 分析後にフロープリッターにより流量を減少させるシステムとした。まず、SEC 分析や nanoESI でのイオン化に最適な流量を検討することによって、それぞれの流量は 200 μ L/min、1 μ L/min に決定した。また、構築したシステムにおける測定可能な分子量範囲を調べるため、12 kDa から 300 kDa の分子量を持つ 5 種類のタンパク質の混合液を分析し、いずれのタンパク質も良好な分解能で分析できることを確認した（図 2）。12kDa と 300kDa のタンパク質のシグ

ナル強度は 250:1 であったため、オンライン分析での SEC 分離によって 300kDa のタンパク質が検出されたことがわかった。また、本システムを用いて不揮発性緩衝液に含まれたタンパク質のオンライン溶媒交換を試みた結果、従来の手動でのネイティブ質量分析の結果と同等の構造安定性を保ったまま分析できることを明らかにした。今後は様々なタンパク質複合体へ適用することで本システムの有用性を検証したいと考えている。

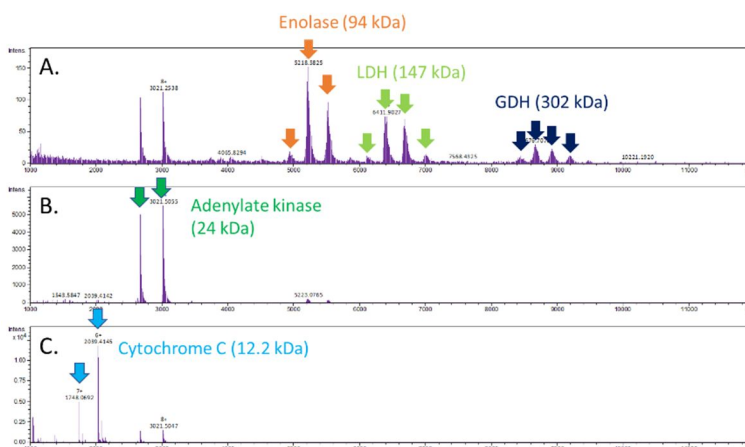


図2 各リテンションタイムにおけるESIマススペクトル
A. 1.7-2.1 min, B. 2.1-2.5 min, C. 2.5-3.0 min

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takano Kotaro, Arai Shunsuke, Sakamoto Seiji, Ushijima Hiroshi, Ikegami Takahisa, Saikusa Kazumi, Konuma Tsuyoshi, Hamachi Itaru, Akashi Satoko	4. 巻 412
2. 論文標題 Screening of protein-ligand interactions under crude conditions by native mass spectrometry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical and Bioanalytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 4037 ~ 4043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00216-020-02649-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saikusa Kazumi, Kato Daiki, Nagadoi Aritaka, Kurumizaka Hitoshi, Akashi Satoko	4. 巻 31
2. 論文標題 Native Mass Spectrometry of Protein and DNA Complexes Prepared in Nonvolatile Buffers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Society for Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 711 ~ 718
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jasms.9b00145	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 七種 和美、絹見 朋也、加藤 愛
2. 発表標題 オンラインSEC ネイティブ質量分析の構築
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	明石 知子 (Akashi Satoko) (10280728)	横浜市立大学・生命医学研究科・教授 (22701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	胡桃坂 仁志 (Kurumizaka Hitoshi) (80300870)	東京大学・定量生命科学研究所・教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関