

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14652

研究課題名（和文）質量分析計によるタンパク質の極微量・超高速高次構造解析法の開発

研究課題名（英文）Development of high-throughput and high-sensitivity 3D structure analysis method for proteins by mass spectrometry

研究代表者

金尾 英佑 (Eisuke, Kanao)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：40895166

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：分子鋳型法を利用して水中でターゲットタンパク質を高効率で捕捉することが可能な分子インプリントヒドロゲルを合成した。合成したヒドロゲルに、タンパク質との疎水性相互作用によって蛍光を発現する機能性モノマーを導入し、タンパク質の選択的な蛍光検出システムを構築した。さらに、光活性基であるperfluorophenyl azideを導入することで、タンパク質の選択的捕捉と、その表面との化学結合形成が可能な光刺激反応性ヒドロゲルを開発した。ヒドロゲル内に捕捉されたタンパク質の酵素消化物をLC-MS/MSで解析することで、タンパク質表面の1次構造情報を取得することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で提案した手法は、分子インプリント法を利用することで、LC-MS/MSによる一次構造解析を高次構造解析に応用するものであり、X線結晶解析をはじめとするタンパク質高次構造解析法とは感度と速度の面で一線を画すものである。そのため、生命科学的に重要な機能を担うタンパク質種や複合体をアミノ酸レベルで素早く簡便に予測し、分光学的手法での高次構造分析が必要なターゲットを絞り込むことができる。このように本研究は、既存の分光学的手法が抱える操作の煩雑さ・適用範囲の狭さを補完することが可能であり、ポストゲノム研究の中核を担う構造生物学分野の進展に大いに貢献できる。

研究成果の概要（英文）：We synthesized a hydrogel that effectively captured target proteins in aqueous conditions by using molecular imprinting technique. To enable selective fluorescence detection of the protein, we introduced a functional monomer that exhibits fluorescence upon hydrophobic interaction with the protein. Additionally, by incorporating a photoreactive monomer, perfluorophenyl azide, we developed a photoresponsive molecularly imprinted hydrogel, which enables selective capture of the protein and chemical bonding to its surface. By evaluating the enzyme-digested peptides of the captured protein within the hydrogel using LC-MS/MS, we successfully identified the surface primary structures of the protein.

研究分野：分析化学

キーワード：分子インプリント法 プロテオミクス 構造解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質は、それぞれが独自の三次構造を形成し、離合集散をくりかえしながら、多様な生命現象を支配している。ポストゲノム時代に突入した現代において、タンパク質の三次構造やリガンド認識に関する情報は、生命科学・医療創薬における基盤情報の一つである。

現在、タンパク質の構造解析には、X線結晶構造解析や多次元核磁気共鳴 (NMR) 法、クライオ電子顕微鏡などの分光学的手法が主に用いられており、原子・分子レベルで高次構造を決定することができるようになった (*Nature* 2011, 470, 73; *PNAS* 2007, 104, 9615; *Nat. Methods* 2016, 13, 24)。また、質量分析計 (MS) の高性能化も著しく、LC-MS/MS で得られるペプチドの質量情報から、fmol ( $10^{-15}$  mol) のタンパク質のアミノ酸配列を極短時間で決定することができる (*Nat. Commun.* 2020, 11, 157)。しかしながら、それぞれの手法の欠点も報告されている。例えば、分光学的手法を用いた高次構造解析は、操作の煩雑さや適応できるタンパク質の分子量範囲の狭さから、スループットが著しく低い。加えて、解析のために  $\mu\text{mol}$  スケールのタンパク質を必要としており、極微量サンプルの解析には不向きである。また、LC-MS/MS で得られる情報は、一次構造 (ペプチド鎖のアミノ酸配列) に関する情報のみであり、生命科学的に重要な高次構造に関する情報を直接得ることはできない。

一方我々は、熱・光刺激反応性インターフェイスや分子鋳型法による高分子合成を駆逐することで、高い選択性を持った分子認識材料を多数開発してきており (*Chemistry select*, 2016, 1, 5900; *Chromatography* 2017, 38, 45; *Anal. Chem.* 2019, 91, 2439)、低分子化合物が発現する特異な分子認識機構を解明してきた (*J. Phys. Chem. C* 2018, 122, 15026; *Chem. Sci.* 2020, 11, 409; *Anal. Chem.* 2020, 92, 4065; *Sci. Rep.* 2020, 10, 13850)。これらの背景から、立体障害によってタンパク質内部に入り込むことができない高分子担体上に高反応性の官能基を導入することで、タンパク質表面のみが選択的かつ不可逆的に担体と化学結合を形成し、タンパク質表面の情報をより精確に抽出できると考え、本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、LC-MS/MS を利用した迅速・高感度な高次構造解析法を開発することを目的とした。具体的には、タンパク質表面と選択的に結合する光刺激反応性分子ヒドロゲルを合成し、LC-MS/MS でヒドロゲルに捕捉されたタンパク質の酵素消化物を評価することで、表面の一次配列情報を取得する新規手法の開発に取り組んだ。

## 3. 研究の方法

分子鋳型法を利用して水中でターゲットタンパク質を高効率で捕捉することが可能な分子インプリントヒドロゲル (molecular imprinted hydrogel; MIH) を合成した。分子鋳型法とは、ターゲット分子を鋳型として取り込んだ状態で重合し、鋳型と同形状の分子認識場を持たせた高分子マトリクスを合成する手法である。その後、熱・光活性基である perfluorophenyl azide (PFPA) を MIH に導入し、光照射によってタンパク質表面と選択的に化学結合を形成する光刺激反応性 MIH を開発した。

開発した MIH をターゲットタンパク質溶液に浸漬し、分子鋳型効果によってタンパク質を選択的に捕捉した。その後、光照射によって、MIH 基材とタンパク質表面のアミノ酸残基との間にランダムな化学結合を形成した。反応後、MIH を消化酵素溶液に浸漬してタンパク質を分解し、洗浄することで、MIH に結合していないペプチド鎖の回収を行った。回収したペプチド鎖を LC-MS/MS で解析し、未処理のターゲットタンパク質の MS/MS スペクトルと比較し、検出できなくなったペプチド鎖の情報からタンパク質表面の一次配列を予測した。

## 4. 研究成果

### タンパク質分子インプリントヒドロゲルの合成と ELISA 様蛍光検出システムへの応用

ウシ血清アルブミン (BSA) をモデルタンパク質として、ターゲットを選択的に認識する分子インプリントヒドロゲル合成法の最適化を行った。また合成したゲルに、タンパク質と疎水性相互作用することで蛍光を発現する 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS) を導入し、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 様のタンパク質蛍光検出システムを構築した。ELISA は標識操作によるタンパク質の変性や凝集、抗体などの高コストな生体分子の使用、煩雑なプロトコルなどの問題点があり、これらを解決する手法の開発が求められる。ポリマーの基材として、poly ethylene glycol (PEG) を採用した。タンパク質の分子インプリント法では、水溶性が高い架橋剤や機能性モノマーを使用し、合成した高分子骨格に対するタンパク質の非特異吸着を抑制する必要がある。分子量が大きな PEG は、水溶性であり、排除体積効果が大きいいため、タンパク質の非特異吸着を抑制することが期待できる。

まず、既報研究に従って ANS モノマーを合成した (*Chem. Phys. Phys. Chem.* 2010, 11, 1768)。6.68 mmol の ANS を acetic anhydride (20 mL) と pyridine (10 mL) の混合物に溶解し、加熱還流した (100 °C, 2 h)。生成物を acetone で洗浄し、真空乾燥した。生成物を  $\text{PCl}_5$  と氷浴中で反応させ、ANS chloride を得た。ANS chloride (4.16 mmol), allyl amine (4.2 mmol),  $\text{Et}_3\text{N}$  (4.2 mmol) を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

(100 mL) に溶解し、混合物を周囲条件下で 16 時間攪拌した。Toluene/EtOAc = 85/15 を展開溶媒にしたシリカゲルクロマトグラフィーにより生成物を精製した。acetyl ANS monomer (0.13 mmol) を MeOH/5 M NaOH aq. で加水分解した。最終生成物を、toluene/EtOAc = 85/15 にしたシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。

さらに本研究では、ANS 骨格とタンパク質の相互作用効率を向上させるため、PEG-ANS monomer を合成した。導入した PEG 鎖によって、ポリマー基材とタンパク質の立体障害による相互作用効率の減少が抑制されることが期待される。ANS chloride (0.55 mmol) と diethylene glycol bis(3-aminopropyl) ether (0.55 mmol) を chloroform に溶解し、攪拌した (100 °C, 16 h)。生成物を COSMOSIL (R) 140C18-OPN (Nacalai Tesque) を用いた逆相カラムクロマトグラフィーで精製されました。PEG-ANS (0.17 mmol), acrylic acid (0.17 mmol), EDC (0.17 mmol), DMAP (0.17 mmol) を chloroform に溶解し 16 h 攪拌した。最終生成物を、toluene/EtOAc = 85/15 にしたシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。

これらのモノマーは、BSA の存在化でその濃度に応答して蛍光を発現することが確認された

(図 1)。さらに、BSA を鋳型分子として MIH をレドックス重合した。この際、ANS 以外のタンパク質との相互作用点として、(vinylbenzyl)trimethylammonium chloride (VBTMAC) も導入した。分子選択性の評価のために、鋳型分子を使用せずに重合したヒドロゲル (NIH) も作製し、BSA 溶液浸漬時の各ゲルの蛍光挙動を評価した。その結果、PEG-ANS モノマーを導入した MIH で BSA の吸着による選択的な蛍光応答が確認された (図 2)。一方、ANS モノマーを導入したゲル MIH は蛍光応答が弱く、基材との立体障害によって、ANS とタンパク質の相互作用が阻害されていることが示唆された。また、このような選択性は  $\beta$ -Ig や ConA に対しては確認できず、BSA 選択的な ELISA 様蛍光検出システムの構築に成功したことが示された (*Anal. Method* 2021, 13, 3086)。

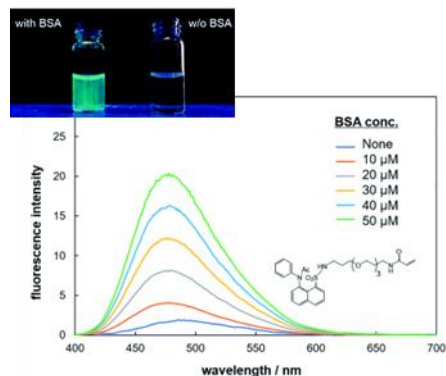


図 1. BSA 濃度に対する PEG-ANS monomer の蛍光強度。

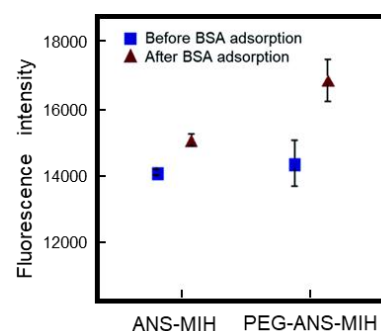


図 2. BSA 溶液浸漬時の MIH の蛍光強度。

### タンパク質表面情報の抽出が可能な光刺激反応性 MIH の合成

PFPA は疎水性であり、タンパク質 MIH 重合に使用する水系溶媒への溶解性が極めて低い。そこで、([2-(2-methacrylamido)ethylthio]ethylcarbonyl)methoxyacetic acid (MDTA) モノマーを導入した PEG 系 MIH を作製した。MDTA は構造内に disulfide 基を有しており、disulfide の切断と sulfhydryl 基を起点とした化学修飾によって、重合後のヒドロゲルに新たな機能を導入することができる (*ACS Appl. Mater. Interfaces* 2014, 6, 20003)。Methacrylic acid (MAA) は、lysozyme 表面の塩基性官能基との相互作用を期待して導入した。種々のタンパク質溶液に対して、NIH との吸着量を比較した結果、合成した hydrogel において lysozyme 選択的な吸着挙動が確認された。

次に、Tris(2-carboxyethyl)phosphine によって disulfide 基を切断し、thiol-ene 反応によって、PFPA をヒドロゲル骨格に導入した。反応の進行は Ellman 試薬を用いて確認した。MIH を methanol で洗浄した後、MIH をリン酸緩衝液に浸漬し、ゲル内の methanol を置換した。作製した MIH は lysozyme 溶液に浸漬し、lysozyme を MIH 内に補足した後、水銀ランプで白色光を照射することで、PFPA と lysozyme の間に化学結合を形成した。その結果、MIH に吸着した lysozyme の 34.7% が高分子骨格と化学結合した。反応後の MIH 内の lysozyme を trypsin 消化し、MIH と結合していないペプチドを回収した後、LC-MS/MS で同定・定量した。Lysozyme 溶液消化物と比較した結果、MIH と反応することによって、lysozyme の三次元構造の外側と同様の配列を持った一部の peptide 鎖のシグナル強度が減少していることが確認された

(図 3)。以上の結果から、本手法が LC-MS/MS でタンパク質表面の構造情報を取得する手法として有効であることが示唆された。

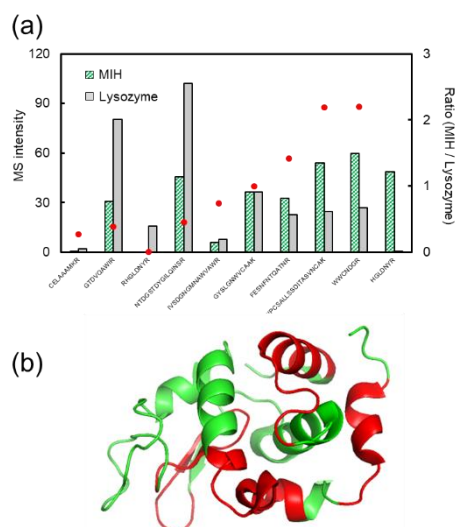


図 3. (a) MIH から溶出した peptide と lysozyme 溶液消化物の MS intensity. (b) Lysozyme の三次構造。赤部は MIH で MS intensity が現象した配列。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 KANA O Eisuke	4. 巻 43
2. 論文標題 Studies on Interactions in Liquid-Phase Separations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CHROMATOGRAPHY	6. 最初と最後の頁 15 ~ 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15583/jpchrom.2021.021	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 Kanao Eisuke, Nakano Katsuya, Kamei Ryoma, Hosomi Takuro, Ishihama Yasushi, Adachi Jun, Kubo Takuya, Otsuka Koji, Yanagida Takeshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Moderate molecular recognitions on ZnO m-plane and their selective capture/release of bio-related phosphoric acids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nanoscale Advances	6. 最初と最後の頁 1649 ~ 1658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1NA00865J	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 Kubo Takuya, Watanabe Naoki, Ikari Seiji, Liu Chenchen, Kanao Eisuke, Naito Toyohiro, Sano Tomoharu, Otsuka Koji	4. 巻 13
2. 論文標題 Fluorescent detection of target proteins via a molecularly imprinted hydrogel	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Methods	6. 最初と最後の頁 3086 ~ 3091
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0AY02341H	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 Kanao Eisuke, Wada Shuntaro, Nishida Hiroshi, Kubo Takuya, Tanigawa Tetsuya, Imami Koshi, Shimoda Asako, Umezaki Kaori, Sasaki Yoshihiro, Akiyoshi Kazunari, Adachi Jun, Otsuka Koji, Ishihama Yasushi	4. 巻 94
2. 論文標題 Classification of Extracellular Vesicles Based on Surface Glycan Structures by Spongy-like Separation Media	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 18025 ~ 18033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.2c04391	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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 二瓶太一, 金尾英佑, 久保拓也, 大塚浩二
2. 発表標題 分子インプリントヒドロゲルを用いた凝集誘起発光検出法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二瓶太一, 金尾英佑, 久保拓也, 大塚浩二
2. 発表標題 光刺激反応性分子インプリントヒドロゲルを用いたタンパク質高次構造解析法の開発
3. 学会等名 日本材料学会第8回材料WEEK
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 二瓶太一, 金尾英佑, 久保拓也, 大塚浩二
2. 発表標題 光刺激反応性分子インプリントヒドロゲルを用いたタンパク質高次構造解析法の基礎検討
3. 学会等名 第42回キャピラリー電気泳動シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金尾英佑, 大崎勇人, 高谷 光, 久保拓也, 大塚浩二, 足立 淳, 石濱 泰
2. 発表標題 ハロゲン結合を基軸とする分子インプリントポリマーの開発
3. 学会等名 第29回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加甲貴吉, 金尾英佑, 久保拓也, 大塚浩二
2. 発表標題 凝集誘起発光機能を有するインプリントヒドロゲルによるタンパク質の選択的蛍光検出
3. 学会等名 第16回近畿支部若手夏季セミナー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eisuke Kanao, Shunsuke Tanaka, Takuya Kubo, Koji Otuska, Kazunari Akiyoshi, Jun Adachi, Yasushi Ishihama
2. 発表標題 Development of a spongy-like polymer monolith for separation of extracellular vesicles and enzyme reaction
3. 学会等名 HUPO 2022 World Congress (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金尾 英佑
2. 発表標題 材料化学で拓く分離・分析の限界突破
3. 学会等名 TI-FRIS/FRIS Retreat 2022 (招待講演)
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------