

補助事業番号 2021M-191

補助事業名 2021年度 超高感度ネイティブ質量分析を利用した

単一細胞創薬スクリーニング技術の開発 補助事業

補助事業者名 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。これまでは数多くの細胞をすりつぶして集めた蛋白質を精製してから分析に用いるのが一般的であったが、本事業により最適化した手法を用いることで蛋白質を精製せずに分析することが可能となった。また、大腸菌から粗抽出された蛋白質に対して特異的な基質(リガンド)を結合した複合体として観測できることが分かった。さらには、細胞をそのままネイティブ質量分析に供し、データを取得することを試みた。機能している蛋白質の質量を細胞ごとに求められれば、様々な状態の細胞を一つずつ比較でき、生命科学研究を進める上で大きく貢献できる。さらには新規抗がん剤など薬剤開発の促進に繋がる。

2 研究の目的と背景

近年、MS装置の開発が急速に進んでいる。この発展により測定試料の高分子量化が進み、蛋白質や核酸などの生体高分子の構造解析にも利用され、様々な疾患や生命現象の機序の解明に貢献している。

本事業の目的は、創薬を目指した超高感度リガンドスクリーニングのためのMSシステムの開発である。がんなどの疾患に関連した蛋白質の機能を阻害するには、その蛋白質に特異的に結合するリガンドを見つけることが必要である。つまり、リガンドが結合した蛋白質複合体の検出が創薬プロセスの最初のステップとなる。MS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にあり、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。

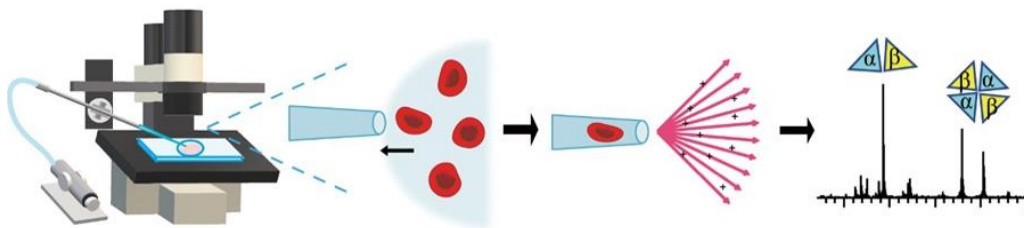
そこで、これらの条件および矛盾点を解決し、リガンドスクリーニングを目的とした新しいESI-MS法を開発する。具体的には、一つ目の条件を解決するため、標的蛋白質の構造が安定である水系溶媒でも試料がイオン化するキャピラリーを開発する。二つ目の条件を解決するため、標的蛋白質を発現させた細胞を丸ごとESI-MS測定できるシステムを構築する。

3 研究内容

一細胞ネイティブ質量分析システムの開発

(<https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2021/20210423akashi.html>)

本事業にて開発した質量分析システムのワークフローを以下に示した。



一細胞ネイティブ質量分析の概略図

(1)新規イオンスプレーキャピラリーの開発

細いガラス管(外径 1mm x 内径 0.5 or 0.78mm x 長さ 10cm)をpuller装置により引き延ばし、ガラスキャピラリーを作製した(図1)。この際、puller装置のパラメータである加熱温度、加熱時間、引き伸ばす力、速さの値を変え、先端径が0.1 μ mから0.5 μ m、および先端部のくびれ等形状の様々なキャピラリーを作製した(図2)。次に、真空蒸着装置を利用し、キャピラリーを金属コーティングした(図3)。



図 1. ガラスキャピラリー

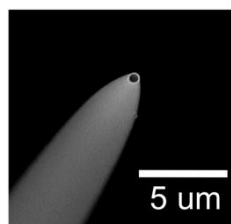


図 2. ガラスキャピラリーの先端



図 3. 金コーティングしたガラスキャピラリー

(2) 質量分析の試料作製

モデル蛋白質としてBRD4を大腸菌にて発現させた。その大腸菌を酢酸アンモニウムに懸濁後、ホモジナイザーペッセルを使用して菌体を破碎した。この際、大腸菌の細胞膜は破碎するが、その中にある核酸は出来るだけ分断しないよう破碎回数を限定した。この菌体抽出物に、BRD4のリガンドであるJQ1を混ぜて測定試料とした。

(3) 質量分析測定及び印加電圧条件の検討

Synapt G2装置（図4左）を用いて、(2)で作成した試料のESI-MS測定を行った。測定を行いながら印加電圧などイオン源（図4右）のパラメータを最適化した。

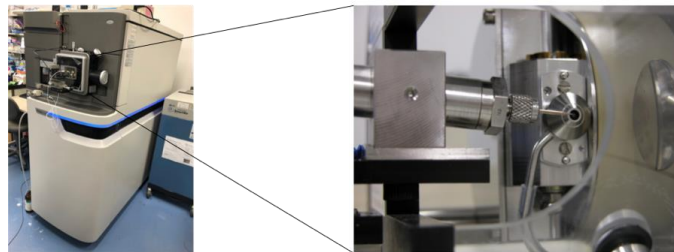


図 4. Synapt G2 装置 (左) およびイオン源の拡大図 (右)

(4) 一細胞ネイティブ質量分析の試み

一般的なネイティブ質量分析の実験方法でデータを得るために必要な試料量を、すりつぶした赤血球を使って求めたところ、理論上、最低でも約200個の赤血球が必要と見積られた。そこで、顕微鏡で観察しながらの赤血球のサンプリング方法や測定のために添加する試薬、条件などを精査した結果、30個、10個、そして最終的には1個の赤血球から再現性良く、ありのままのヘモグロビンをネイティブ質量分析で検出することに成功した。図5に示すように、赤血球1個を極細のガラスキャピラリーに素早く吸い込み、蛋白質を変性させずにイオン化を促進する酢酸アンモニウム水溶液をほんの少し加えてから、ヘモグロビンのイオンをネイティブ質量分析で観測した。

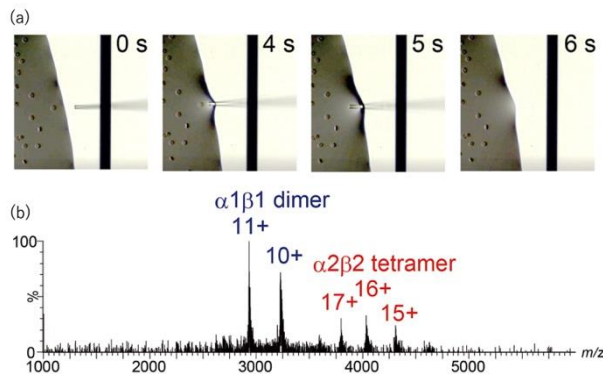


図 5. (a) ガラスキャピラリーで 1 個の赤血球を吸引した時のスナップショット。(b) たった一つの赤血球だけで質量分析した時のヘモグロビンの MS スペクトル。平衡状態にある二量体 ($\alpha 1 \beta 1$) と四量体 ($\alpha 2 \beta 2$) が共に検出された。

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、2020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2019年のがん死亡者数は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い、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MS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。

また、「一細胞」のサンプリングで分析できるということは、細胞一つ一つの様子を比較できることを意味する。その際、「ネイティブ」、すなわち自然の状態での質量分析では、細胞内の蛋白質の様子をより正確に知ることができると期待できる。生命体を構成する細胞一つ一つについて蛋白質の状態を比較できる本技術は、生命現象の基礎的な理解からその応用まで、幅広い分野で役立つと考えられる。

5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

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。

今回標的とした蛋白質(BRD4)は大腸菌により発現させており、現状の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ー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

Sakamoto W., Azegami N., Konuma T., Akashi S. “Single cell native mass spectrometry of human erythrocytes” *Anal. Chem.*, 93 (17), 6583–6588 (2021)

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 - m a i l: konumax@yokohama-cu.ac.jp

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