

【目的】

本研究では、タンパク質の機能を理解するために必要かつ重要な構造情報を、微量試料で迅速に分析することができる質量分析(MS)を用いて得ることを目的とし、そのための手段として、アフィニティー分離能を有するマイクロチップ電気泳動-質量分析装置を開発するとともに、質量分析の特徴を利用したタンパク質の構造機能研究を行うことを目指す。

【背景】

地域結集型共同研究事業でこれまで展開してきた研究課題“アフィニティー型キャピラリー電気泳動質量分析装置の開発“は、ある特異的相互作用を有するタンパク質や低分子化合物を迅速かつ網羅的に構造解析するためのシステムを作り上げること、そして分離された化合物、特にタンパク質のキャラクタリゼーションのための優れた解析方法を確立することを最終目標としてスタートした。タンパク質の解析に用いられる高性能MSと組み合わせが可能なマイクロチップキャピラリー電気泳動(マイクロチップCE)およびMSとのインターフェース部の構築、ならびにアフィニティー分離を行うためのデバイスの開発については、(株)島津製作所が担当した。マイクロチップCE-質量分析のオンライン分析の条件検討については、横浜市大、(株)島津製作所が担当した。タンパク質のキャラクタリゼーションのための優れた解析法の検討については、横浜市大、味の素(株)、キッセイ薬品工業(株)が分担して研究を行った。以下、その概略について報告する。

【5年間の研究成果】

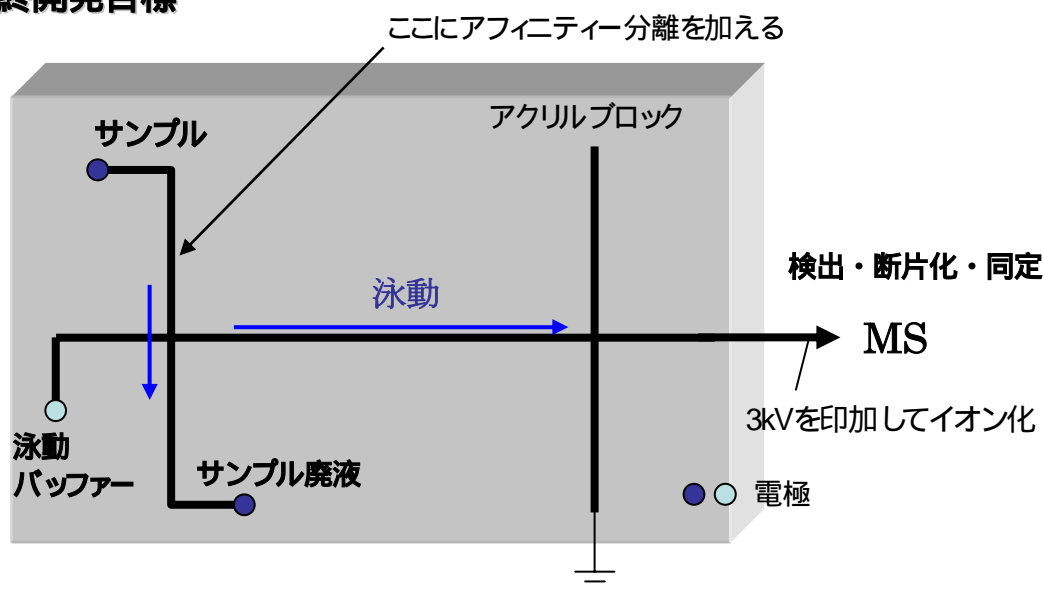
1. マイクロチップ電気泳動/質量分析装置の開発

電気泳動は、液体クロマトグラフィーに比べて高い分離能を有し、短い時間で分析できることからスループットのよい分離手段となりうる方法である。しかしながら、分離を優先させると利用できる溶媒や条件にはいろいろな制約があり、検出手段としては一般に分光学的手法(例えばUV検出)が用いられている。また近年、様々なデバイスをマイクロ化する技術の進歩は著しいが、電気泳動装置をマイクロ化すると分離能が低下するという問題は避けられない。さらに、分光学的手法による検出では、構造情報を得ることは難しい。そこで、構造情報を得ることができる質量分析装置をマイクロチップ電気泳動の検出器として用いることで、マイクロ化に伴い低下する分離能をカバーし、さらにアフィニティー分離の機能も組み合わせた、図1に示すようなコンセプトを有するマイクロチップ電気泳動/質量分析装置(マイクロチップCE/MS)を開発することを目指した。また、従来、電気泳動では分析の対象とすることが難しいとされていたタンパク質を、スループットよく分析できる装置を開発することを目指した。タンパク質をマイクロチップCEで分離する場合、チップ表面での非特異的吸着を抑えることが難しいこと、質量分析

とのカップリングを行うことを前提とすると分離に用いられる条件はかなり限られてしまうことなど、クリアすべき問題が多いことが予想された。そこでアフィニティー分離機能はシステムが構築された後に組み込むこととし、DNA 結合タンパク質のような塩基性の高いタンパク質でも分離・検出できるマイクロチップ CE/MS システムを開発することを第一目標とした。

マイクロチップ CE/MS のためのマイクロチップ部分およびイオン源とのインターフェース部分については（株）島津製作所が開発し、コア研究室に設置の質量分析装置と接続して実験を行った。分析条件の検討は、コア研究室において、まずフューズドシリカチューブを用いる従来のキャピラリー電気泳動/質量分析装置で行った後、マイクロチップ CE/MS で行った。

最終開発目標



アフィニティー電気泳動部位に受容体・抗体・酵素などのタンパク質や核酸、医薬品などの低分子化合物を結合させる。

- 結合させた物質に親和性を持つ物質（タンパク質・アミノ酸・核酸など）を網羅的・短時間に検出・同定できる。
結合の強さに関する情報を合わせて得ることができる。
- 創薬のみならず、食品・化粧品業界など広分野における研究開発の加速が期待できる。

図1 開発を目指したマイクロチップ電気泳動/質量分析装置システム

種々条件検討した結果、チップ流路を塩基性のポリアミン (polyE323) でコーティングしたものをを用いて3種類のタンパク質 (lysozyme (pI 11.0), hTRF2 DNA 結合ドメイン (pI 10.1), myoglobin (pI 7.9)) およびペプチド (Leu-Enkephalin (pI 5.7)) の混合物をマスクロマトグラムで再現性よく分離して観測することができた。またそれぞれの良好なマススペクトルも測定することができ、塩基性タンパク質の分離・検出に成功した (図2)。

マイクロチップには様々な機能を集積化できる特徴がある。本研究においてマイクロチップ CE/MS がタンパク質の分析に利用できることが示されたことは、アフィニティー分離を初めとする種々の機能と組み合わせて、マイクロチップ CE/MS による分析がタンパク質の構造・機能

解析へ展開する足がかりとなるものと考えられる。

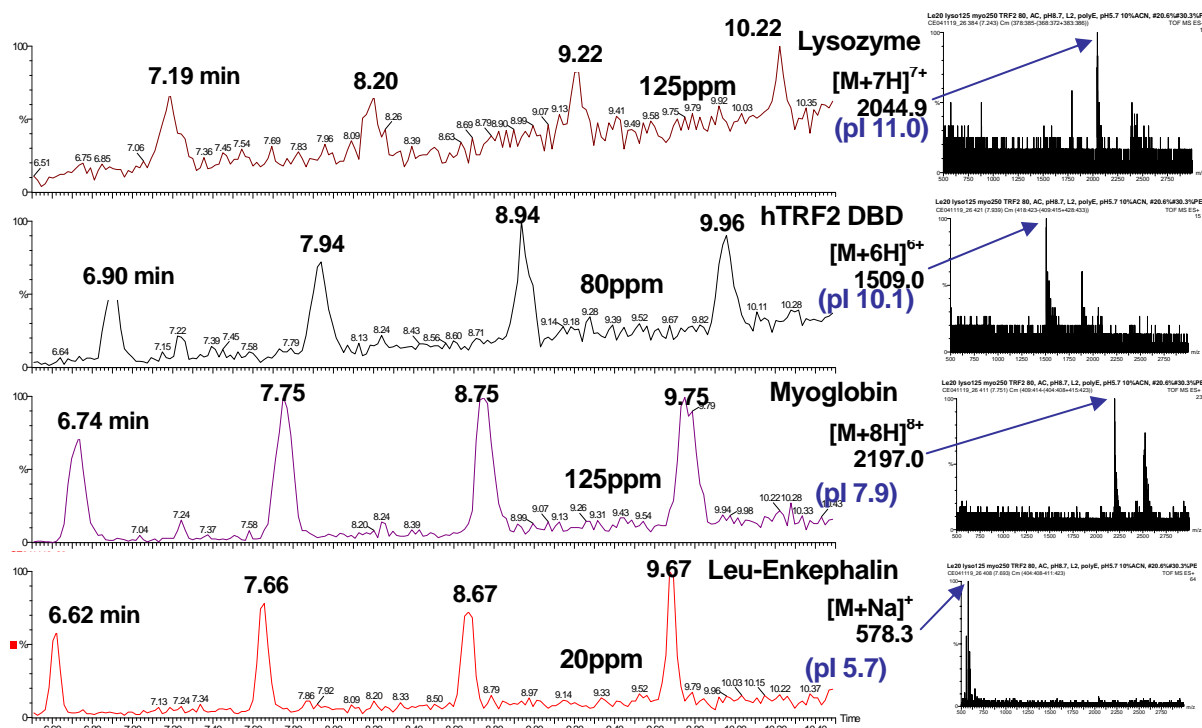


図2 3種類の塩基性タンパク質およびペプチドの分析結果

2. タンパク質の構造解析技術の開発

タンパク質のキャラクタリゼーションにおいて質量分析は欠くことのできないツールとなっている。プロテオーム解析において最も一般的に行われている手法、すなわち微量タンパク質を酵素消化し、得られるペプチド断片の質量および部分配列情報を用いてデータベース検索を行い、タンパク質を同定するという、いわゆる“ボトムアップ”のプロテオーム解析手法においては、質量分析はタンパク質を断片化して得られるペプチドの解析ツールという役割を担っており、現在ではこの方法でルーチン分析を行うこともできる。一方、タンパク質そのものの質量測定を行い正確な分子量を求めた後、質量分析装置内で断片化し、同定に用いる質量情報すべてを獲得するという“トップダウン”の手法では、質量分析はタンパク質およびペプチド両方の解析ツールとしての役割を担っている。“トップダウン”の手法は、感度やスループットの点など、解決すべき問題もまだ多くあり、ルーチンレベルで分析できるような手法に至っているとはいえない。本研究では、翻訳後修飾を含めたタンパク質の解析をするのには有効な方法である“トップダウン”の解析法を、1.で構築するマイクロチップ CE/MS と組み合わせて開発することについて検討した。

また、質量分析を用いて得られるのはタンパク質の一次構造情報だけではない。タンパク質やDNAは生体における様々なイベントで複合体を形成し、その機能を発揮している。このような生体高分子の複合体が、どのようにお互いを認識しているかを明らかにすることは生命科学において大変重要な意味を持つものである。タンパク質の機能と重要に関わる構造情報を質量分析で

獲得することを目的として、本研究では次のような検討を行った。

複合体の解析において、どのような分子がどのようなモル比で結合しているかを明らかにすることは、分子機能を考える上で重要な情報となる。また、分子に金属イオンを抱えて機能を発揮するような生体高分子の場合、1分子あたりに存在する金属イオンの数や種類を明らかにすることも、機能解析において重要な情報となる。エレクトロスプレー質量分析 (ESI-MS) は複合体のままイオン化し、複合体分子について正確に質量測定を行うことができるため、上述のように分子の結合状態を知るよい手段となりうる。また、質量分析の場合、ゲルろ過法などに比べ精度よく分析できるという特徴がある。そこで、タンパク質や DNA からなる生体高分子の複合体の ESI-MS による測定を検討した。

生体高分子の複合体を構成する分子の結合の強さも、その分子認識機構を考える上で重要な情報である。タンパク質や DNA が複合体の構成要素となっている場合、機能解析のため、それぞれの多数の点変異体について結合定数を求めたい場合も多い。結合定数を求めるための既存の方法としては表面プラズモン共鳴やフィルターバインディングアッセイなどがあるが、いずれも迅速に行える方法とはいえない。そこで、ESI-MS を用いて複合体の結合親和性に関して迅速に解析するための方法を開発することを検討した。

タンパク質や DNA などの生体高分子、さらにはそれらと薬物からなる複合体の結合様式や強さに加え、相互作用部位を原子レベルで明らかにできれば、機能に関する様々な考察を確実に行うことができるため、生命現象の深い理解につながる。原子レベルで複合体の構造解析が可能な構造生物学の手法は極めて威力的なものといえる。ところが、複合体の結晶化が難しいため、あるいは分子量が大きく NMR による解析に不向きであるため、構造解析を容易に行うことが出来ない場合がある。このような試料に対して、相互作用部位に関わる情報が、アミノ酸残基レベルでも得られると、それを手がかりにして研究を進展させることができる。そこで、クロスリンク法と質量分析、および重水素交換と質量分析によりタンパク質-タンパク質複合体およびタンパク質-リガンド-薬物複合体の構造について解析し、相互作用部位に関する情報を得ることを検討した。

このような研究を行って得られた成果の中から、2つのトピックスについて以下紹介する。

(1) 複合体分子の質量測定

ESI のようなソフトなイオン化法で複合体の分子量関連イオンを生成し、正確に質量測定を行う場合、試料を揮発性緩衝液に溶解して質量分析装置に導入する必要がある。ところが、試料によっては酢酸アンモニウムのような揮発性緩衝液に溶媒を置換し、長時間接触することにより変性してしまう場合もある。そこで、既報 (Rapid Commun. Mass Spectrom. (2003) 17, 267-271) を参考に、溶媒交換用のゲルろ過カラムをエレクトロスプレーイオン源の直前に接続し、ESIMS へオンラインで溶媒交換・脱塩を行える試料導入システムを構築した。二重鎖 DNA とタンパク質の複合体、テロメアタンパク質とテロメア DNA の複合体、さらに巨大なタンパク質複合体であるヒト基本転写因子 TFIIE の質量測定を行い、その有用性を示すことができた。

ヒト TFIIE は、ゲルろ過での溶出位置から 170kDa と推定されているタンパク質複合体で、 α (50 kDa) と β (35 kDa) の 2 種のサブユニットからなり、 $\alpha\alpha\beta\beta$ のヘテロテトラマーで存在すると考えられている。この TFIIE を大腸菌で共発現させ精製した試料について、オンラインのゲルろ過を介して試料導入し、ESIMS の測定を行った。その結果、 $\alpha\beta$ のヘテロダイマーの質量 (84,210)

を示唆するピークが観測された。分析用超遠心、X線小角散乱の結果からもヘテロダイマーを支持する結果が得られたことから、TFIIIE は溶液中ではヘテロダイマーであることが明らかとなった。(Y. Itoh et al., *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, in press)

(2) 二重鎖 DNA とタンパク質複合体の結合親和性の解析

溶液中での解離定数が既に求められているタンパク質-DNA 複合体(転写因子 c-Myb DNA 結合ドメインと 22 塩基対からなる数種類の二重鎖 DNA) の系において、その結合の強さについてエレクトロスプレーイオン化質量分析法(ESI-MS)を用いて解析する方法を検討した。その結果、溶液中での複合体の解離定数とエレクトロスプレーイオン源部に印加する電圧パラメータの間の相関を明らかにし、校正曲線を作成(図 4)することにより、解離定数未知の DNA-タンパク質複合体の結合の強さについて、ESI-MS を用いて解析する方法を確立した。(特許出願: 2004-27060)

【フェーズⅢについての取り組み】

地域における新技術・新産業の創出に資するために、コア研究室で行っている質量分析を用いた DNA 結合タンパク質の構造研究を継続して推し進めることで、地域 COE としての役割を果たす。また、マイクロチップ CE/MS の低分子化合物の迅速な分析システムへの展開も検討する。