

## 1-2-1 研究成果

<p>中テーマ名：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  サブテーマ名：タンパク質の構造解析における質量分析関連技術の開発</p>	
<p>中テーマリーダー（所属、役職、氏名）</p> <p>横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 教授 西村善文  横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 準教授 明石知子</p> <p>研究従事者（所属、役職、氏名）</p> <p>横浜市立大学大学院国際総合科学研究科 準教授 明石知子  味の素（株） ライフサイエンス研究所 主任研究員 山田尚之  キッセイ薬品工業（株） 創薬研究部 主任研究員 岡崎浩輔  （財）木原記念横浜生命科学振興財団 奥田昌彦  岡村英保  野村 充</p>	
<p>研究の概要、新規性及び目標</p> <p>①研究の概要</p> <p>(1) マイクロチップキャピラリー電気泳動（<math>\mu</math>チップCE）の分離の迅速性および多機能を複合化できる可能性と、質量分析（MS）の構造情報を微量で得られるという特性を組み合わせた<math>\mu</math>チップCE/MSを用い、高感度・ハイスループットでタンパク質を検出・同定するシステムを確立する。確立したシステムを用いて、DNA 結合能を有するタンパク質や低分子化合物の構造解析において応用研究を展開する。</p> <p>(2) 様々な機能性タンパク質の構造や相互作用について MS により解析する技術を確立するとともに、DNA 結合タンパク質や創薬のターゲットタンパク質に適用し、方法の有用性について評価する。</p> <p>②研究の独自性・新規性</p> <p>(1) LC/MS/MS によるタンパク質の検出・同定のためのシステムに比べ、迅速性に優れ微量分析が可能な CE/MS のシステムを<math>\mu</math>チップ化することで、分析における特長を最大限引き出すことができる。<math>\mu</math>チップCE/MSを利用するもので、タンパク質を丸ごと解析できる市販システムは存在しないことから、これによる機能性タンパク質や低分子化合物の構造解析は斬新なものである。</p> <p>(2) 様々な機能性タンパク質の機能を反映するような構造情報を、MS を利用して獲得する研究例は世界的に見ても多いとは言えず、研究の独自性は高いものである。</p> <p>③研究の目標（フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に）</p> <p>(1) <math>\mu</math>チップ CE/MS</p> <p>フェーズⅠではCE/MS によるタンパク質の分離・検出に関する基礎的検討、FTICR-MS を用いたタンパク質断片化の基礎検討やタンパク質同定のインフォマティクス環境の整備を行う。</p> <p>フェーズⅡでは<math>\mu</math>チップ CE/MS によるタンパク質の分離・検出に関する基礎的検討、汎用質量分析装置へのタンパク質断片化技術の移植、<math>\mu</math>チップ CE/MS によるトップダウンプロテオミクスシステムの完成や<math>\mu</math>チップ CE/MS による低分子化合物の分析を行う。</p> <p>(2) 質量分析関連技術の開発</p> <p>フェーズⅠでは解析対象のタンパク質の絞込み、試料調製やMSによるタンパク質の構造および相互作用に関する解析法を確立する。</p> <p>フェーズⅡでは創薬ターゲットタンパク質のリガンドおよび薬物結合部位の同定と確立した解析方法による機能性タンパク質の構造機能解析を行う。</p>	

## 研究の進め方及び進捗状況

### (1) $\mu$ チップ CE/MS

フェーズ I では CE/MS を用いて CE 部分内壁のコーティング剤および方法、分離条件などタンパク質の分析における実験条件の最適化を行い、 $\mu$ チップ CE/MS へ発展させるための基礎的な検討を行った。独自開発したエミッターを用いて、FTMSで効率の良いタンパク質断片化技術を開発した。得られたデータからタンパク質同定を行うためのバイオフィオマティクス環境を整備した。

フェーズ II では  $\mu$ チップ CE/MS を用いて、チップ流路のコーティング剤および方法、分離条件などを最適化し、等電点が 10 を越えるような塩基性タンパク質でも分離・検出することに成功した。さらに、 $\mu$ チップ CE/MS により分離・検出されたタンパク質の断片化に成功し、トップダウンプロテオミクスに利用できるシステムの一連の技術開発を終了した。また、アミノ酸誘導体等の低分子化合物の迅速な測定法を開発した。

### (2) 質量分析関連技術の開発

フェーズ I では ESI-MS を用いて、タンパク質-二重鎖 DNA およびタンパク質-タンパク質複合体の安定な分子量関連イオンを観測することに成功した。創薬ターゲットとなるタンパク質が薬物と相互作用する部位を、主鎖アミド水素の重水素交換と MS を用いて解析することを目指し、モデルタンパク質を用いて実験手法を確立するとともに、ターゲットタンパク質の調製を行った。

フェーズ II ではオンラインのゲルろ過を ESI-MS の試料導入部分に用いることで迅速な脱塩を行い、塩濃度に対して敏感なタンパク質-タンパク質複合体およびタンパク質-DNA 複合体などの質量測定が可能なシステムを構築し、有用性を示した。タンパク質-一点変異 DNA 複合体の結合の強さについて、ESI-MS を用いて解析できることを明らかにした。パーキンソン病に関連するタンパク質であるヒトカテコール-O-メチルトランスフェラーゼ (HCOMT) のアロステリックリガンドおよび薬物結合部位を明らかにした。

## 主な成果

具体的な成果内容：

$\mu$ チップ CE/MS を用いて、トップダウンプロテオミクスの手法により塩基性の高い DNA 結合タンパク質のオンラインでの分離・検出・断片化に成功した。独自開発のエミッターによるタンパク質の断片化に成功した (エミッターは上市)。 $\mu$ チップ CE/MS によるアミノ酸誘導体等の低分子化合物の迅速な測定法を開発した。タンパク質-DNA 複合体の結合の強さを ESI-MS で解析する方法を確立した。基本転写因子 TFIIE の質量測定に成功した。HCOMT のリガンドおよび薬物結合部位を明らかにした。

特許件数：4      論文数：9      口頭発表件数：21

## 研究成果に関する評価

### 1 国内外における水準との対比

$\mu$ チップ CE/MS を用いて、塩基性の高いタンパク質をオンラインで分析し配列情報まで獲得した研究例はなく、独自性が高く新規なものである。

### 2 実用化に向けた波及効果

独自開発のエミッターは現在市販されており、質量分析を用いたプロテオミクス研究に広く活用されている。X線結晶構造解析で明らかにされていないタンパク質複合体も、本研究で用いた研究手法を適用することで重要な構造情報を得られることを示すことができた。

$\mu$ チップ CE/MS によるアミノ酸等の低分子化合物の迅速な測定法開発について味の素 (株)、横浜市大、島津製作所 (株) の三者共同で特許出願した。

## 残された課題と対応方針について

$\mu$ チップ CE/MS を用いたトップダウンプロテオミクスの手法による塩基性タンパク質の分離・断片化検出について論文執筆、学会発表を行う。

$\mu$ チップ CE/MS を用いたタンパク質の解析システムは、既存の LC/MS や CE/MS のシステムに比べると操作性において優位であるとは言いがたく、市場性を考えると現時点での事業化は難しい。

$\mu$ チップ上には様々な機能を統合できることから種々の方面への展開が可能である。今すぐの実用化、事業化は難しいものの、実用化に近づけるためには、確立した要素技術に基づく基盤研究を継続して進めることが必要であると考えられる。

	JST負担分（千円）							地域負担分（千円）							合 計
	H 12	H 13	H 14	H 15	H 16	H 17	小計	H 12	H 13	H 14	H 15	H 16	H 17	小計	
人件費	414	5,317	4,714	9,022	8,791	5,216	33,474	4,944	7,230	6,500	4,120	4,120	3,015	29,929	63,403
設備費	39,288	27,150	20,639	19,829	20,438	14,905	142,249	118,666	0	0	0	0	0	118,666	260,915
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	1,762	6,544	12,042	4,426	3,734	4,026	32,534	0	14,355	9,427	5,763	6,851	5,330	41,726	74,260
旅費	26	32	219	123	53	19	472	0	0	0	0	0	0	0	472
その他	0	18	47	22	26	4	117	0	0	0	0	0	0	0	117
小 計	41,490	39,061	37,661	33,422	33,042	24,170	208,846	123,610	21,585	15,927	9,883	10,971	8,345	190,321	399,167
代表的な設備名と仕様 [既存（事業開始前）の設備含む] JST負担による設備：キャピラリー電気泳動システム 地域負担による設備：															

※複数の研究課題に共通した経費については按分する