

# 新しいアフィニティー-質量分析計を用いた創薬ターゲット化合物探索の新手法の開発 Development of new method of drug target compound screening by new affinity Mass spectrometry

○福田哲也<sup>1</sup>、長門石暁<sup>2</sup>、Kai-Tang、John Ervin<sup>3</sup>、中山登<sup>1</sup>、板東泰彦<sup>1</sup>、西村俊秀<sup>1,4,5</sup>、津本浩平<sup>2</sup>

1. 株式会社バイオシス・テクノロジーズ, 2. 東京大学大学院工学系研究科・東京大学創薬機構, 3. Silicon Kinetics, Inc., 4. 東京医科大学第一外科学, 5. Lund University, Bio Medical Center



## 研究の目的

創薬の研究は常にターゲットプロテインの探索と創薬候補品の化合物を目的に定性・定量分析をすることが求められている。しかし創薬の分野は低分子医薬から高分子の抗体医薬、Protein-protein Interactionを阻害するような中分子分野、抗体などの生体高分子と低分子をコンジュゲイトしたターゲティングドラッグの分野などと多種多様になり、出てくる医薬候補品も多彩になってきている。そこでハイスループットで高感度に化合物の分子量や構造を確認できる質量分析の手法は今まで以上に重要性を増してきている。そこで、我々研究グループは創薬ターゲットプロテインやバイオマーカー探索やScreeningのスピードUPを目的にNanopore Optical Interferometry (nPOI)<sup>1,2</sup>という原理を用いた分子間相互作用解析と質量分析装置(LC/MS)を接続した研究を行った。nPOIはSurface Plasmon Resonance (SPR)と同様にKon, Koffのヒストグラムの現象を見ることができ、SPRよりも結合容量が高い(100倍以上)ためBinding化合物を直接LC/MSで検出し、分子量と構造を確認することが可能である<sup>3</sup>。そして混合物の中から直接ターゲットタンパク質と相互作用している化合物やタンパク質、ペプチドなどを同定、定量することが出来るため弱い相互作用やアフィニティーランキングの検証、HTS(ハイスループットスクリーニング)が可能となる。今回私たちの研究グループはフローセルにリガンドとしてCarbonic Anhydrase IIを固定し、Furosemideを低分子モデル化合物<sup>4</sup>)として、アフィニティー解析を行い、溶出してきたFurosemideをESI LC/MSに導入して検証を行った。

## System component

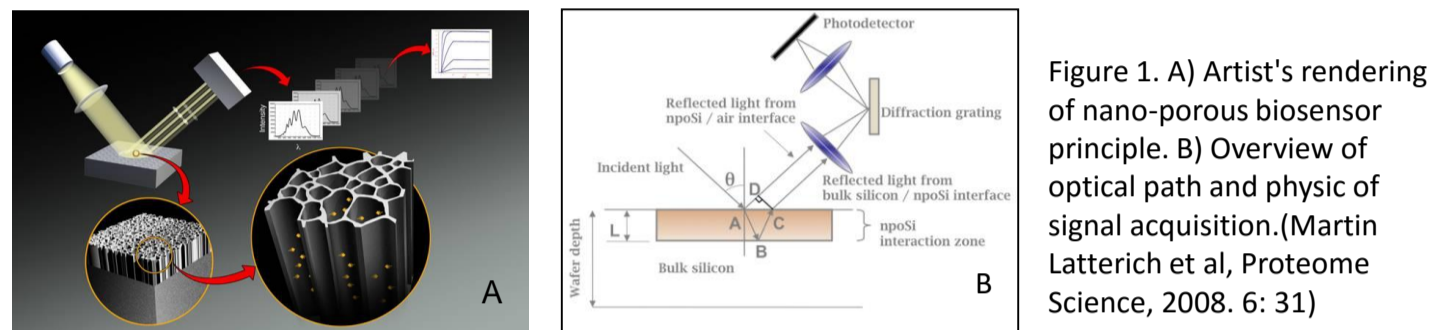


Figure 1. A) Artist's rendering of nano-porous biosensor principle. B) Overview of optical path and physics of signal acquisition. (Martin Latterich et al, Proteome Science, 2008. 6: 31)

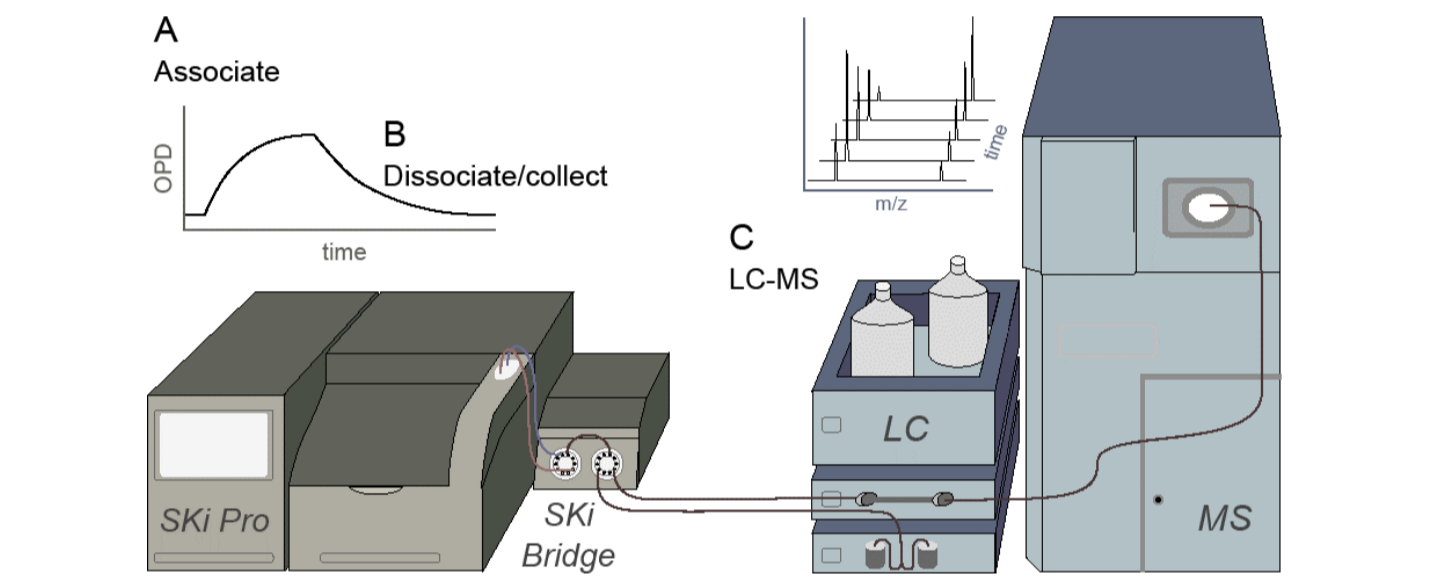
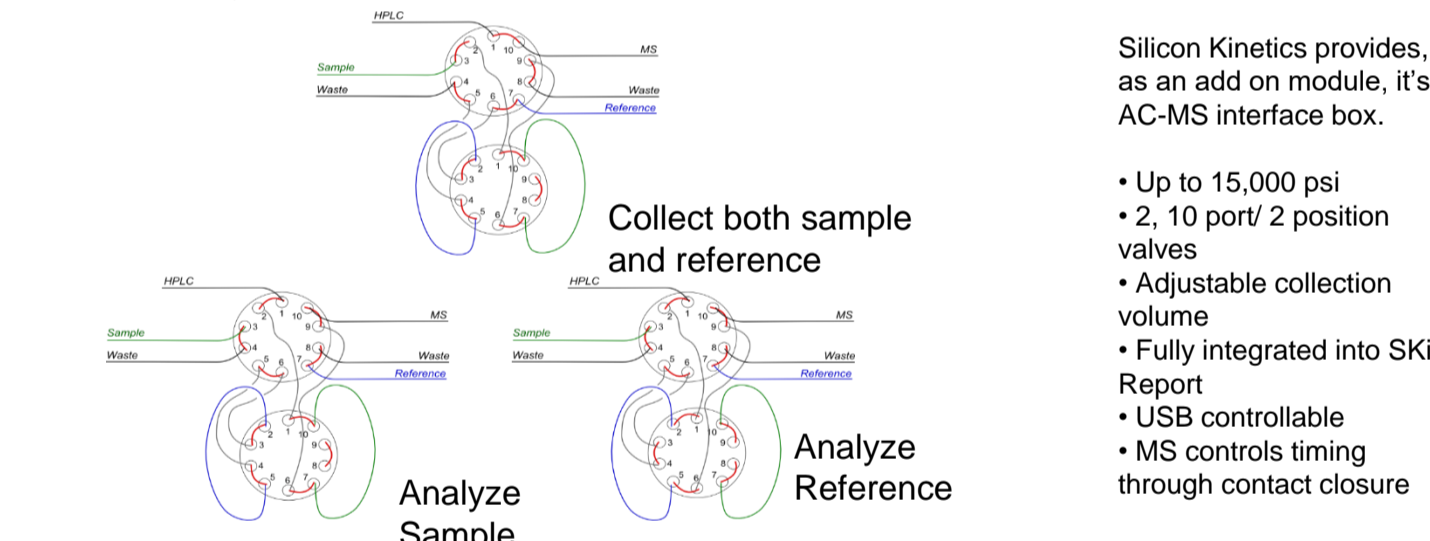
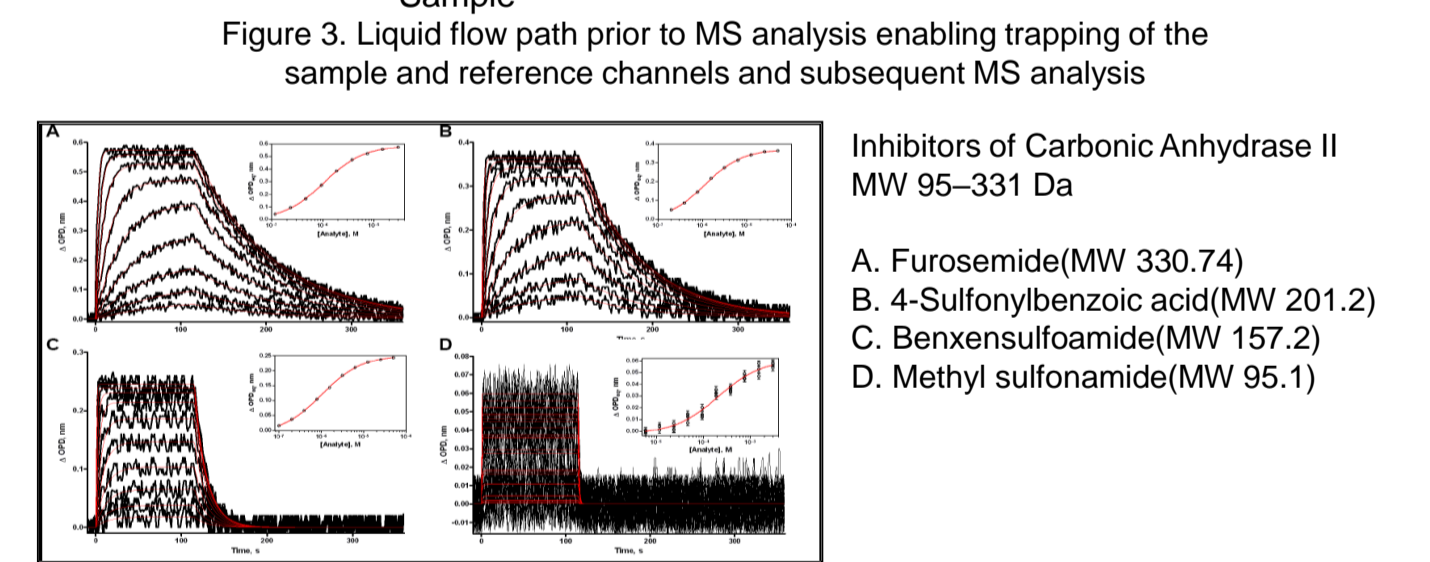


Figure 2. The component of Affinity Capture- Mass Spectrometry



Silicon Kinetics provides, as an add on module, it's AC-MS interface box.

- Up to 15,000 psi
- 2, 10 port/ 2 position valves
- Adjustable collection volume
- Fully integrated into SKI Report
- USB controllable
- MS controls timing through contact closure



Inhibitors of Carbonic Anhydrase II MW 95–331 Da

A. Furosemide (MW 330.74)  
B. 4-Sulfonylbenzoic acid (MW 201.2)  
C. Benzensulfoamide (MW 157.2)  
D. Methyl sulfonamide (MW 95.1)

Figure 4. Kinetic analysis of Enzyme-small molecule

## Experimental flow

### AC-MS (Affinity Capture-Mass Spectrometry) によるタンパク質-固定化と低分子の結合-解離評価試験

タンパク質-タンパク質相互作用、タンパク質-低分子化合物相互作用ともにカイネティクス解析によるセンサーグラムによって検証評価したアプリケーションデータをFig.3に示した。分子量95から331までの低分子がnPOIによって検出できている。次の検証としてSki-proとLC/MSを接続して解離してきた低分子の検出評価について試験を実施した。CAIIをリガンドとして固定化を行い、低分子化合物のアナライズとしてFurosemideを適用したLC-MS試験を行った。

- 実験と方法
- NHS活性化: リガンドの固定化方法はアミンカップリング法を用いた。NHS活性化として25mM NHSと100mM EDCを1:1で混合し、6ul/minの流速で7分間送液しNHS活性化を行った。
- リガンドの固定化: 固定化するリガンドは400 ug/mlの濃度に調製したCAIIを使用した。センサーチップに送液したリガンド溶液の量は40 ul (4ul/minの流速で10分間)である。
- クエンチ(ブロッキング): クエンチングには1Mエタノールアミン溶液(pH 8.5)を用いた。1Mエタノールアミン溶液を10ul/minの流速で1分間送液した。
- 結合・解離: 結合ならびに解離の試験評価はフロセמיד(Furosemide)を用いて行った。適用したFurosemideの濃度は5uMである。Running bufferとしてPBS/0.1%DMSOを使用した。サンプルのアプライ容量は30ulである。
- LC/MSとの接続: LC/MSとの接続は、Ski-Bridgeを介して行った(Fig.1, Fig.2)。Ski-Bridgeには2基の10方バルブが搭載してあり、Sample-loopとReference-loopからそれぞれ順番にLC/MSのバルブスイッチングによってLoading pumpによって送られる。LC/MSのバルブには逆相のトラップカラムが接続してあり、サンプルは一旦キャプチャーされて、脱塩を行い、次にGradient-PumpによってLC/MSに送られる仕組みとなっている(Fig. 2)。

## Results and discussion

### Immobilization and Kinetics analysis of CAII/Furosemide

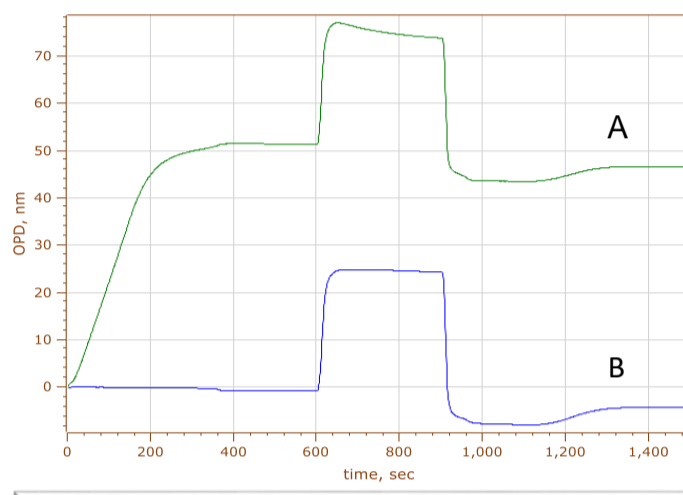


Figure 5 Immobilization of CAII with EDC/sNHS on COOH Tip. Here using approximately 400 µg/mL getting 50 nm on surface. A: Sample, B: Reference

Table 1. LC/MS conditions of Affinity capture-Mass Spectrometry

Name	k <sub>off</sub> 1/s	k <sub>on</sub> 1/uM*s	K <sub>d</sub> uM
Furosemide	0.5241864	0.4523889	1.158708

### AC-MS -LC/MS SRM mode & Full MS Scan-

LC/MSの測定モードはSRMとMS/MSで実施した。フロセמידはネガティブモードでの測定が感度を得やすい。フロセמידの分子量330に対し、質量電荷比(以下m/z)は329となる。インフュージョンによる検証の結果、Collision Energy 35によってm/z 285のフラグメントピークが得られることを確認した。そこでSRMの設定をPrecursor ion/Product ionの設定をm/z 329/285とした。

MS/MSでのデータ取得はFull MS Scanによって試験を行った。MS rangeはm/z 300-500とした。フロセמידがFull MS Scanによって検出されるとMS/MSのトリガーがかかりMS/MSスペクトルを取得するように設定した。

LC/MS components		Mass Spectrometry conditions	
nano-ESI LC/MS/MS	ZAPLOUS System, (AMR Inc.)	Ion Source	Dream spray(AMR Inc.)
HPLC	Paradigm MS4 (Microm BioResources, Inc.)	Mode	SRM, Full MS Scan
Autosampler	HTS-PAL(CTC Analytics)	Polarity	Negative
Loading Pump	Agilent 1100(Agilent technologies)	IS	1.6 keV
Mass Spectrometry	Thermo LTQ(ThermoFisher Scientific)		

LC conditions	
Mobile A	0.1% HCOOH/2% Acetonitrile
Mobile B	0.1% HCOOH/90% Acetonitrile
Gradient	B%: 5(0min)-95(10min)-95(12min)-5(12.5min)-5(15min)
Flow rate	5ul/min
Flow rate (loading pump)	10ul/min

Table 2. LC/MS conditions of Affinity capture-Mass Spectrometry

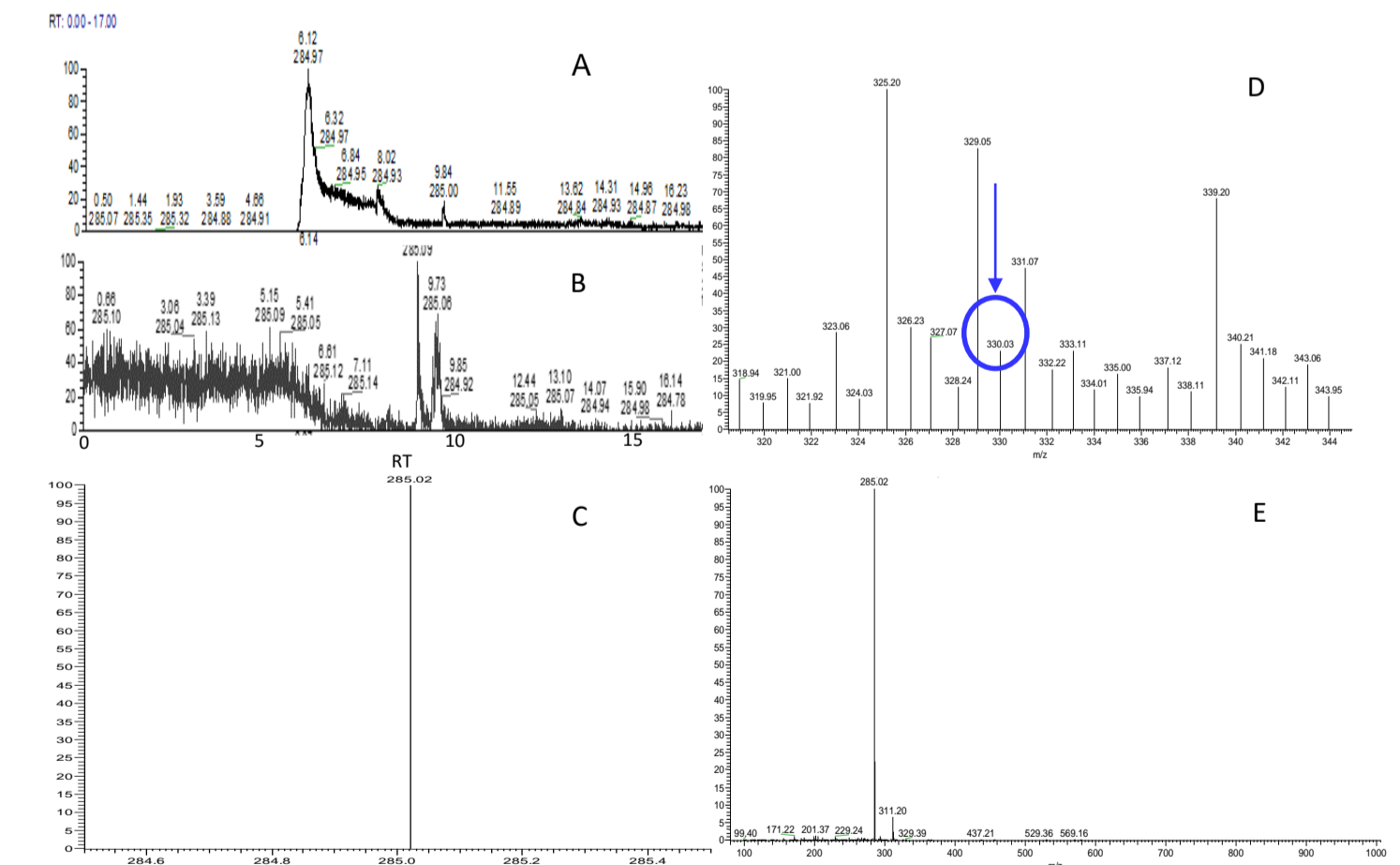


Figure 6. MS spectrum of Furosemide by AC-MS analysis.

A. SRM chromatogram of 0.5uM Furosemide. B. SRM chromatogram of 0 uM Furosemide. C. SRM profile of Furosemide(m/z); Precursor MS/Product MS : 329/285) D. Full MS spectrum profile, E. MS/MS spectrum of Furosemide

AC-MSによる解析、測定の結果、高感度でSRMによるFurosemideの検出を確認した(Fig.6A, B, C)。固定化したCAIIに5uMのフロセמידを適用して、解析・測定を行ったところ、フロセמידのMS/MSフラグメントピークの検出に成功した(Fig.6D,E)。今後はMSの高感度化開発を推進しさらなる低分子化合物のLC/MSによる検出と癌疾患関連タンパク質のターゲット化合物のAC-MSによる検出を目指す。

医薬品は短期間でメディカルニーズにあった開発が求められており短期間で分子レベルでの解析が必要となっている。そこで、このnPOI/LC/MSのシステムは創薬開発において重要な戦略になりうると思われる。

- 参考文献
- 1) Martin Latterich and Jacques Corbeil, Label-free detection of biomolecular interactions in real time with a nano-porous silicon-based detection method. Proteome Science, 2008. 6: 31
  - 2) Rebecca L. Richa and David G. Myszka, Grading the commercial optical biosensor literature—Class of 2008: ‘The Mighty Binders’. J. Mol. Recognit. 2010; 23: 1–64
  - 3) Iain Campuzano, Kiaus Michelsen & Paul Schinier, On-line Nanopore Optical Interferometry Mass Spectrometry for Screening and Quantifying Small Molecule-Protein Interactions. ASMS 2013 Minneapolis, Minneapolis, MN, USA.
  - 4) Giuseppe A. Papalia , Stephanie Leavitt, et al. Comparative analysis of 10 small molecules binding to carbonicanhydrase II by diVerent investigators using Biacore technology. Analytical Biochemistry 359 (2006) 94–105