

MALDI-TOF MS を用いたケミカルスクリーニング anthrax (炭疽) lethal factor の阻害剤開発

叶 直樹

質量分析計 (MS) は、様々な生体試料の測定が可能であり、かつ試料の標識化を必要としないという利点を持つため、化学のみならず生物学の分野でも重要な位置を占めている。しかし分析するための試料を調製する際に脱塩や精製操作を必要とするため、ハイスループットスクリーニングに適用するためには試料調製の簡便化が必要とされていた。今回、化学的に修飾を施した自己組織化単分子膜と MALDI-TOF MS (Matrix-associated laser-desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: マトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計) を組み合わせることにより、MS 用の試料調製が簡便で、同時並行処理が可能なスクリーニング系 (SAMDI: Self-assembled monolayers for MALDI) を構築し、この方法を用いて anthrax lethal factor の阻害剤を見出したという報告がなされたので紹介する。

紹介論文

Chemical screening by mass spectrometry to identify inhibitors of anthrax lethal factor

Min, D.-H.; Tang, W.-J.; Mrksich, M. (Dept. of Chem., Inst. for Biophys. Dynamics, Univ. of Chicago, and Ben-May Inst. for Cancer Res., Univ of Chicago)

Nat. Biotechnol., advanced online publication (doi: 10.1038/nbt973) (2004)

要旨

末端に anthrax lethal factor (ALF) の基質となるペプチドを持つ鎖状チオール分子の自己組織化単分子膜を形成させた MALDI-TOF MS 用サンプルプレート上に ALF を添加すると、基質となるペプチドが切断され、断片された鎖状チオール分子が MALDI-TOF MS で観測される。ALF を添加する際に阻害剤が共存すれば基質は切断されないため、切断されていないもとの鎖状チオール分子が観測される。この原理と手法 (SAMDI) を用いて 10,000 低分子化合物ライブラリーから ALF 阻害剤のスクリーニングを行った結果、DS-998 が見出された。SAMDI を用いて DS-998 の ALS 阻害効果に対する定量的解析を行った結果、DS-998 の IC₅₀ 値は 2 μM であった。この値は蛍光基質を用いた溶液中での解析で得られた値 (1.1 μM) と良い一致を示した。DS-998 は UACC-257 細胞に対して、ALF の効果を 20 μM の濃度で完全に抑制し、また、HEK293 細胞に過剰発現させた MEK1 の ALF による切断を 1~10 μM の濃度で抑制した。さらに DS-998 は ALF の持つ殺マクロファージ活性も濃度依存的に抑制した。以上、SAMDI を用いたスクリーニングにより ALF 阻害剤が発見されたことから、この手法の有効性が示された。

参考論文

Using Mass Spectrometry to Characterize Self-Assembled Monolayers Presenting Peptides, Proteins, and Carbohydrate

Su, J.; Mrksich, M. (Dept. of Chem., Inst. for Biophys. Dynamics, Univ. of Chicago)

Angew. Chem. Int. Ed., 41, 4715 (2002)

A peptide-based fluorescence resonance energy transfer assay for Bacillus anthracis lethal factor protease

Cummings, R. T. et al. (Merck Research Lab.)

PNAS, 99, 6603 (2002).