

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008年

課題番号：19560760

研究課題名（和文） 細胞内情報経路を標的としたハイスループット型  
リン酸化タンパク質分離材料の創製研究課題名（英文） Immobilized zirconium ion affinity chromatography  
for specific enrichment of phosphoproteins研究代表者 上江洲 一也（UEZU KAZUYA）  
北九州市立大学・国際環境工学部・教授  
研究者番号：40253497

## 研究成果の概要：

本研究では、リン酸基と相互作用の強い Zr(IV)イオンに着目し、W/O/W 型界面鋳型重合法を用いて、樹脂孔表面に Zr(IV)を固定させた新規金属固定化アフィニティークロマトグラフィー（Zr-Phos IMAC）を調製した。マトリックス支援レーザー脱離イオン化法（MALDI-TOF/MS）を用いたモデルタンパク質の分離評価では、従来の IMAC よりも非リン酸化ペプチドの検出を軽減させ、リン酸化ペプチドの検出感度を向上させることに成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：化学工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・分離精製工学

キーワード：リン酸化タンパク質、W/O/W 型界面鋳型重合法

金属固定化アフィニティークロマトグラフィー、リン酸化ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝性疾患、免疫系の異常、癌等の正確かつ簡便な診断法を確立するには、特定の代謝や情報伝達経路をターゲットに特徴的な関連タンパク質を網羅的に解析することが必要である。また、情報伝達系や免疫系の診断では、指標タンパク質の動的な解析も欠かせない。そこで、細胞内情報伝達系および免疫系タンパク質のプロテオーム解析をハイスループット化するために、高収量、高精度、高速度を実現する新規の分離・精製技術が求められている(Johnson, L. N et al., *J. Chem. Rev.*, 101, 2209.(2001))。一般に、生体内のタンパク質の 1/3 はリン酸

化部位を持ち、プロテインキナーゼとプロテインホスファターゼ等の酵素によってリン酸化が可逆的に制御されている。これは、生細胞の発生・分化、代謝、細胞性免疫機構、発癌、プログラム細胞死および遺伝子発現の制御等の細胞機能の調節において必須の機構である。プロテオーム解析におけるタンパク質の同定法は、タンパク質を抽出後、電気泳動により分離し、ゲルから切り出した個々のスポットをプロテアーゼ処理後、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析（MALDI-MS）等の質量分析計で分子量を決定し、データベース上で同定するというものである。したがって、リン酸化タンパク質を

中心としたプロテオーム解析を行う場合は、試料調製の段階でのリン酸化ペプチドの選択的な分離が、非常に重要なプロセスとなる。

全細胞タンパク質の中からリン酸化タンパク質およびペプチドを単離・濃縮する精製法として、抗リン酸化タンパク質抗体による免疫沈降法、金属 ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ) 固定化アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) (Raska, C. S et al., *Anal. Chem.*, 74, 3429, (2002)) および金属酸化膜の粒子を用いた方法が開発されている。免疫沈降法は、リン酸化モチーフに対する抗体を用いて特定のリン酸化タンパク質を少量回収するのに適しているが、リン酸化タンパク質の網羅的かつ高収量での濃縮には不向きであり用途が制限される。一方、IMAC および金属酸化膜の粒子を用いた精製法は、網羅性に優れているものの、特異性は期待できない。また、繰り返し使用することが困難である。

したがって、新たな機能性プロテオーム解析に道を拓く、特異性と網羅性を制御可能なリン酸化タンパク質の分離・回収技術は未だに開発されていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、上述した背景に鑑み、リン酸化タンパク質を対象に IMAC 法の利点と免疫法の利点を併せ持った細胞内情報経路を標的としたハイスループット型リン酸化タンパク質分離材料を創製することである。

本研究では、ジルコニウム-リン酸基複合体 (Zr-Phos 複合体) がリン酸基をもつ高分子に高いアフィニティーを示すことに着目し、Zr-Phos 複合体をリン酸化タンパク質認識部位として、樹脂上でリン酸化タンパク質を網羅的に分離・濃縮することが可能ではないかと考えた。界面鋳型重合法を用いることで、標的リン酸化タンパク質・リン酸化ペプチドに対して、高度な分離性能をもったハイスループット型界面タンパク質インプリント分離材料を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 樹脂の調製

ゲストイオンとして Zr (IV) イオン、機能性ホストとしてリン酸オレイルを用いた W/O/W 型界面鋳型重合法により、樹脂表面に Zr を固定した樹脂を調製した。巨大孔を形成するために、重合時にポリスチレン (PS) を添加した。得られた球状樹脂をアセトンで 24 h、303 K で洗浄し、メタノール、続いて水に浸漬して PS を除去した。その後、樹脂を水中で 70  $\mu\text{m}$  のふるいにかけて分級した。

### (2) 樹脂の物性評価

調製した樹脂の比表面積及び細孔容積は、それぞれ窒素ガス吸着法及び非水銀ポロシ

メーターを用いて測定した。また、平衡吸着容量を求めるために、フッ素イオン溶液 (pH 3.0, 25 mg/L) 50 mL に樹脂 (0.2 g~1.0 g) を投入し、30°C、24 h で吸着させて、残存したフッ素イオン濃度を測定した。フッ素イオン濃度の測定は、イオン交換クロマトグラフ装置で行った。

### (3) モデルタンパク質の消化

モデルタンパク質として、BSA、 $\beta$ -casein、及び OVA を用いた。各タンパク質の消化は、トリプシンを用いて行った。

### (4) MALDI-TOF/MS によるリン酸化ペプチドの分離

BSA (20 pmol/ $\mu\text{L}$ )、 $\beta$ -casein (20 pmol/ $\mu\text{L}$ )、及び OVA (20 pmol/ $\mu\text{L}$ ) を混合比率 (mol) 10 : 1 : 1 に調整した試料 5  $\mu\text{L}$  (+0.1% TFA 溶液 95  $\mu\text{L}$ ) を Zr-Phos IMAC 20 mg 充填したチップに通液した。その後、リン酸化ペプチドを溶出するために、1% 高リン酸及び 13%  $\text{NH}_3\text{OH}$  をそれぞれ 100  $\mu\text{L}$  通液した。通液後の溶液 1.0  $\mu\text{L}$  を MALDI-TOF-MS 用プレートに滴下し、測定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 新規界面鋳型樹脂の調製

本研究では、孔表面への Zr イオンおよびリン酸オレイルの複合体の高密度集積化を検討した。Zr とリン酸基をもつ分子との複合体に着目し、ゲストイオンとして Zr(IV) イオン、機能性ホストとしてリン酸基をもつリン酸オレイルを用いた W/O/W 型界面鋳型重合法により、樹脂表面に Zr を固定化した樹脂を調製した。水内相中に添加する Zr (IV) イオンの添加量を変化させていくと、リン酸オレイルの仕込み量を 5 倍 (0.75 mmol/g) にすることができた。この樹脂は、従来の界面鋳型樹脂がもつ飽和吸着容量 0.05 mmol/g (フッ素イオン) に対して、0.30 mmol/g まで増加させることに成功した。これは、Zr イオンが、リン酸オレイルと強い相互作用をもち、その錯体が油水界面に大量に存在できたためだと推測される。

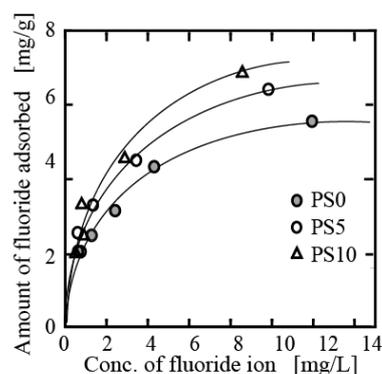


Fig.1 フッ素イオンに対する吸着等温線 (PS0,5,10 : ポリスチレン添加量 0,5,10 g/L)

(2) ポリスチレン添加による孔形状および表面改質効果

有機高分子を空孔の鑄型として添加・除去したポリスチレン (PS) の分子量および添加量を変化させることで、孔径及び表面構造を制御した構造制御ポリマーを調製した。分子量 (20 万) が同じ PS の添加量の違いによる構造制御は、窒素吸着法及び非水銀ポロシメーターを用いて比表面積、細孔容積、および細孔分布を測定した結果、エマルションのポアサイズは約 500 nm 程度であることがわかり、PS の添加量の変化により約 50 nm 程度の孔径制御に成功した。(比表面積をほぼ一定のまま細孔容積が 25% 増加したことがわかった。) また、PS 添加量 (10 g/L) を一定に、異なる分子量 (2.5 万、9 万、及び 20 万) において PS を添加したところ、比表面積を増加させることに成功した。

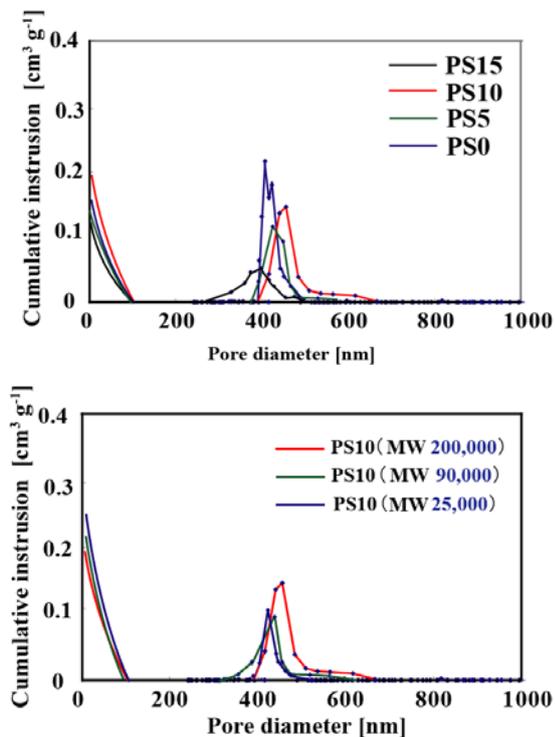


Fig.2 ポリスチレン添加による各樹脂の孔径分布 (窒素吸着法および非水銀ポロシメーター)

(3) Zr-IMAC によるリン酸化ペプチドの分離・精製

リン酸基と相互作用の強い Zr(IV) イオンに着目し、W/O/W 型界面鑄型重合法を用いて、樹脂孔表面に Zr(IV) を固定させた新規 IMAC 用樹 (Zr-Phos IMAC) の調製を行い、リン酸化タンパク質分離性能評価を行った。具体的には、リン酸化タンパク質を、特異的に認識するように、樹脂内の表面構造および孔径を制御した樹脂を充填したカラムにおいて、試

料添加条件、カラムの洗浄条件、リン酸化タンパク質の溶離条件等の最適化を検討した。試料添加条件として、BSA (20 pmol/μL)、β-casein (20 pmol/μL)、及び OVA (20 pmol/μL) を混合比率 (mol) 10:1:1 に調整した試 5 μL (+0.1% TFA 溶液 95 μL) を Zr-Phos IMAC 20 mg 充填したチップに通液した。その後、リン酸化タンパク質溶離条件の検討では、1% 高リン酸及び 13% NH<sub>3</sub> 溶液をそれぞれ 100 μL 通液した結果、NH<sub>3</sub> 溶液の方が精製に適していることが質量分析計の結果より分かった。比較実験として用いた鉄を固定化した従来型の IMAC より、分離性能が高いことが確認された。

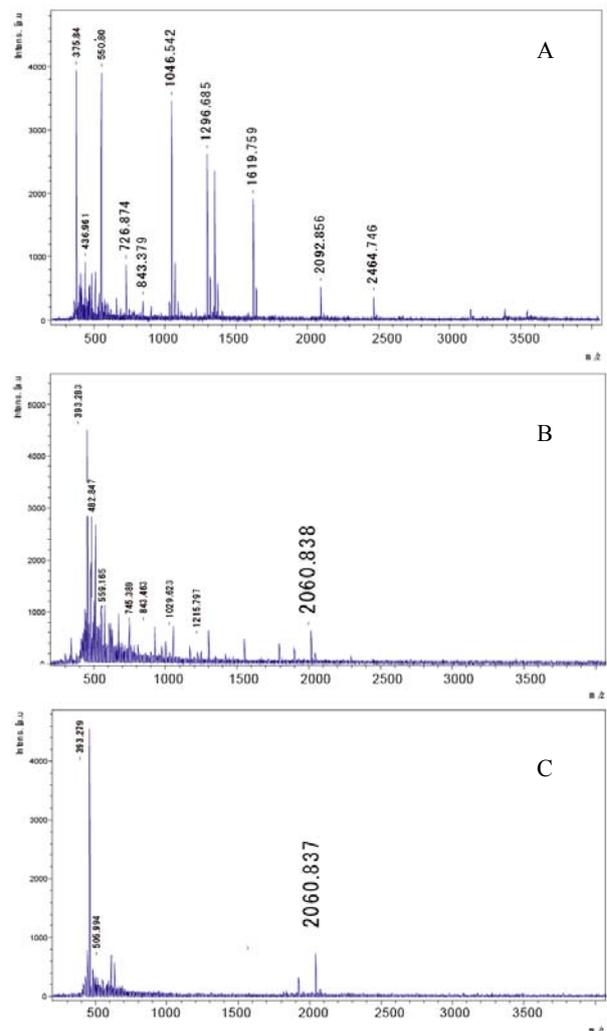


Fig.3 混合ペプチド (BSA, β-casein, OVA) の MALDI スペクトル A: 濃縮前、B: 市販 Fe-IMAC 濃縮後、C: Zr-IMAC 濃縮後

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計19件)

1) H. Mizuki, H. Kawakita, S. Samatya, K. Uezu, Preparation of Zr(IV)-immobilized resin prepared by surface template polymerization to remove fluoride ion  
Submitted to *Separation science and technology*

2) S. Samatya, H. Mizuki, H. Kawakita, K. Uezu, The effect of polystyrene addition in Zr(IV)-immobilized resin prepared by surface template polymerization to remove fluoride ion  
Submitted to *Reactive and Functional Polymers*

3) H. Kawakita\*, H. Masunaga, K. Nomura, K. Uezu, I. Akiba, S. Tsuneda Adsorption of bovine serum albumin to a polymer brush prepared by atom-transfer radical polymerization in a porous inorganic membrane  
*Journal of Porous Materials*, **14** (4), 387-391 (2007)

4) M. Goto, T. Okubo, H. Kawakita, K. Uezu, S. Tsuneda, K. Saito, M. Goto, M. Tamada and T. Sugo, Design of polymer brushes for immobilizing enzymes onto hollow fiber micropores in organic media reaction  
*Biochem. Eng. J.*, **37**, 159-165 (2007)

5) T. Okobira, K. Miyoshi, K. Uezu\*, K. Sakurai, and S. Shinkai, Molecular Dynamics Studies of Side Chain Effect on the  $\beta$ -1,3-D-Glucan Triple Helix in Aqueous Solution  
*Biomacromolecules*, **9**, 783-788 (2008)

6) Y. Miyazaki, H. Matsuo, T. Fujimori, H. Takemura, S. Matsuoka, T. Okobira, K. Uezu, and K. Yoshimura, Interaction of boric acid with salicyl derivatives as an anchor group of boron-selective adsorbents  
*Polyhedron*, **27**, 2785-2790 (2008)

7) 上江洲一也  
シリーズ解説「イオン交換と計算化学」第5回  
金属錯体の構造解析と安定性評価  
イオン交換学会誌, 18巻1号, 14-20 (2007)

8) 上江洲一也, 大河平紀司  
シリーズ解説「イオン交換と計算化学」第6

回(最終回)  
多糖と核酸との複合体の構造解析  
イオン交換学会誌, 18巻2号, 75-82 (2007)

9) K. Uezu and K. Yoshizuka  
Computational Chemistry in Solvent Extraction  
*Solvent Extraction Research and Development, Japan*, **14**, 1-15 (2007)

10) 上江洲一也  
受賞論文(平成18年度日本イオン交換学会進歩賞)  
分子認識部位の設計とイオン交換機構を解析  
イオン交換学会誌, 18巻3号, 100-109 (2007)

11) 上江洲一也  
思考のツールとしての計算化学(連載第1回)  
WAKO Infomatic World, June No.1, 2-4 (2007)

12) 上江洲一也  
新しい $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-グルカン内水素結合の発見(連載第2回)  
WAKO Infomatic World, August No.3, 5-6 (2007)

13) 上江洲一也  
Al(III)とIn(III)の分離のための $\alpha$ -ジケトン誘導体の分子設計(連載第3回)  
WAKO Infomatic World, September No.4, 6-7 (2007)

14) 上江洲一也  
カリックスアレーン誘導体によるアルカリ金属イオンの抽出挙動(連載第4回)  
WAKO Infomatic World, October No.5, 5-7 (2007)

15) 上江洲一也  
分子集合体のシミュレーション(連載第5回)  
WAKO Infomatic World, November No.6, 6-7 (2007)

16) 上江洲一也  
水中における $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-グルカンの構造解析(連載第6回)  
WAKO Infomatic World, December No.7, 5-7 (2007)

17) 上江洲一也  
 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-グルカンと核酸とが形づくる三重螺旋構造(連載第7回)  
WAKO Infomatic World, January No.8, 6-7

(2008)

1 8) 上江洲一也

水中における $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-グルカン/核酸複合体の構造解析 (連載第8回)

WAKO Infomatic World, February No.9, 6-7 (2008)

1 9) 上江洲一也

ポリオールへのアンチモン吸着機構 (連載第9回、最終回)

WAKO Infomatic World, March No.10, 5-7 (2008)

[学会発表] (計7件)

1) H. Mizuki, T. Kawano, K. Uezu.

Specific capture of phosphoprotein by immobilized Zirconium ion affinity chromatography, 4th International Symposium on Plant Neurobiology, Fukuoka, Japan. (6, 2008)

2) H. Mizuki, T. Kawano, K. Uezu.

Immobilized Zr(IV) affinity chromatography prepared by surface template polymerization for specific capturing phosphorylated proteins, The Fifth International Workshop on Molecular Imprinting, Kobe, Japan. (8, 2008)

3) 水城秀信, 河野智謙, 上江洲一也

界面鋳型重合法を用いたIMAC用樹脂によるリン酸化タンパク質の分離・精製

化学工学会東北大会, 仙台 (2008年10月)

4) H. Mizuki, T. Kawano, K. Uezu.

Immobilized zirconium ion affinity chromatography for specific enrichment of phosphoproteins, The first Japan-Korea joint symposium on bio-microsensing technology, Kitakyushu, Japan. (11, 2008)

5) H. Mizuki, T. Kawano, K. Uezu.

Immobilized zirconium ion affinity chromatography for specific enrichment of phosphoproteins, The 3rd Japan-Taiwan Joint International Symposium on Environmental Science and Technology: Environmental Chemistry, Bioscience and Managements, Kitakyushu, Japan. (12, 2008)

6) H. Mizuki, T. Kawano, K. Uezu.

High-speed Removal of Fluorine Ion by Perfusion / Surface-Molecular-Imprinted Resin, The 21<sup>th</sup> Symposium on CHEMICAL ENGINEERING, Saga, Japan. (12, 2008)

7) H. Mizuki, T. Kawano, K. Uezu.

Specific capture of phosphoprotein by surface-templated resin, 2nd Kyushu-Cranfield Joint Colloquium on Plant Cell Biology & Engineering, Kitakyushu, Japan. (3, 2009)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上江洲 一也

北九州市立大学・国際環境工学部・教授

研究者番号: 40253497

(2) 研究分担者

河野智謙

北九州市立大学・国際環境工学部・准教授

研究者番号: 20335699