

機関番号：12401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21750072

研究課題名 (和文) 金属イオン-タンパク質マッピング電気泳動法の開発

研究課題名 (英文) Electrophoresis for metal ion-protein mapping

研究代表者

齋藤 伸吾 (SAITO SHINGO)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：60343018

研究成果の概要 (和文) : 配位部位が大環状および非環状型の 8 座蛍光プローブを新規合成し、キャピラリー電気泳動-レーザー励起蛍光検出法 (CE-LIF) およびポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE) に適用し、種々の遷移金属イオンに対し数十 pM の検出限界を得ることに成功した。CE-LIF においてはカチオン性ポリマーを添加することで高分離を達成した。この分離原理が新しいものであることが判明し、イオン会合複合体分離モードと命名した。また、金属検出 PAGE によって、分離したトランスフェリンおよびセルロプラスミン分画中の鉄および銅イオンを検出することに成功した。

研究成果の概要 (英文) : Novel fluorescent probes for detecting metal ions working in capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence detection (CE-LIF) and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) have been developed. The detection limits for several transition metal ions of tens pM were successfully obtained. In CE-LIF, the addition of cationic polymer provided high resolution among metal-probe complexes with new separation principle. The new separation mode was named as "Ion association complex separation mode." In PAGE, Fe and Cu ions which existed in the gel fractions of transferrin and ceruloplasmin were successfully determined.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：分離分析

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、生体中のメタローム (金属含有生体物質) は多くの病態や生命活動を理解する上でのフロンティアであることが明らかとなっており、メタロームの系統的、網羅的学術領域としてのメタロミクスが注目されている。しかしなが

ら、メタロームの分析法は ICP-MS (ICP質量分析法) などに代表される機器分析による解析が中心であり、タンパク質結合型金属イオンを測定できる簡易で汎用的なハイスループット分析法が望まれている。

一方、キャピラリー電気泳動法 (CE) お

よびポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE) は既にタンパク質, DNA や糖鎖等の簡易な解析法として実用化されており, 高感度な蛍光法が導入され, ハイスループット化も可能な生体試料への適合性が高い解析法であるといえる。しかし, 生体中の重要な構成要素の一つである金属イオンの解析法としては実用化されていない。これは, 重金属イオンの多くは消光効果を有するため高感度な蛍光法を適用できなかったこと, さらに, 分離システムに適合した蛍光プローブの分子設計が全くされてこなかったことが原因である。

(2) 研究代表者は, これまでキャピラリー電気泳動法 (CE) における新規な金属蛍光プローブ群を設計・開発し, 重金属イオンをサブアト ( $10^{-19}$ ) モルレベル (濃度感度  $10^{-10}$ - $10^{-11}$  M) という超高感度で蛍光検出することに成功している。この研究により, 通常は消光してしまう常磁性金属や重金属の一斉蛍光検出が初めて可能となった。本研究課題では PAGE および CE に適合した金属イオン検出蛍光プローブを新たに開発し, 生体試料中 (特に二次元電気泳動後のタンパク質スポット中) の金属イオンを一斉分析が可能な解析法を開発することを着想した。この方法が開発されれば, タンパク質, DNA, 糖鎖に続き, 従来の電気泳動マッピング技術に金属分布というもう一つの異なる次元 (軸) を与えることができる。さらにタンパク質スポット中の金属組成を計測することにより, 近年注目を浴びているメタロームの網羅的解析 (メタロミクス) へと展開でき, 簡便な装置で, これまで困難であった生体中金属に関する動態の全体論的な把握が可能となる。また, 病態との関連を見出すための強力なツールとなると共に, 疾患の診断およびモニタリングへの応用が期待でき, 学術的にも社会的にも発展性があると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は, メタロームを簡易に解析する技術として, 電気泳動法をプラットフォームとするタンパク質バンド中や血清中に存在する種々の超微量金属イオンの超高感度一斉解析法を開発することである。特に, PAGE で分離された「どのタンパク質バンドにどのような金属がどの程度の量で存在しているか」を網羅的に測定できる簡便かつ超高感度な電気泳動システムを, 金属蛍光プローブ分子の設計を含め, グランドデザインする。

そのために, 以下の項目について研究を進めた。すなわち,

- A. CE および PAGE に特化した蛍光プローブの分子デザイン
  - B. 金属間相互分離システムの構築
  - C. タンパク結合型金属の誘導体化 (ゲルスポット中も含む)
- の3点である。

## 3. 研究の方法

研究の方法は上述 A~C に対し, 以下の様に行った。

### A. 電気泳動法用の新規金属蛍光プローブの開発

新規蛍光プローブを設計・合成した。その際の要件は, a) 高感度な発光団を有すること, b) 常磁性金属の常磁性消光効果を防ぐ分子設計をすること, c) タンパク質から金属を置換する必要があるため, 大きな安定度, 錯形成速度を有すること, d) 分離する際に錯体がプローブと金属とに分解しないように解離不活性錯体を形成すること, の4点である。

### B. 蛍光プローブ錯体の電気泳動分離検出

電気泳動法での金属間相互分離システムの構築を行った。用いた電気泳動システムは, CE-LIF および PAGE である。プローブをこれらの分離手法に適用する際, 独自に開発した分離様式 (イオン会合複合体分離, ゲル細孔内での分離) を用いた。さらにそれら新規分離様式の分離機序を明らかにすることとした。

### C. ゲルスポット中および生体試料中タンパク質結合型金属イオンの蛍光誘導体化

ゲル電気泳動で分画したゲルスポット中および血清試料などの生体試料中の金属イオンを測定する方法の開発を試みた。金属イオンとの親和性が高く, 試料中のタンパク結合型金属を置換させうるプローブ群およびその条件を探索した。

## 4. 研究成果

### (1) 新規蛍光プローブの開発

数種類の電気泳動法に適する金属蛍光プローブを新規合成した (図1)。これらプローブは金属配位部位, スペーサーおよび発光団で構成されており, 配位部位と発光団の距離を離すことで金属イオンの消光効果 (重原子効果, 常磁性消光) を抑制することができる。今回, 合成したプローブは発光団としてフルオレセインを有し, 配位骨格として8座大環状型 (FTC-ABDOTA, L1), 8座非環状型 (FTC-ABDTPA, L2) および6座非環状型骨格 (FTC-ABNOTA, L3) を有するものとした。

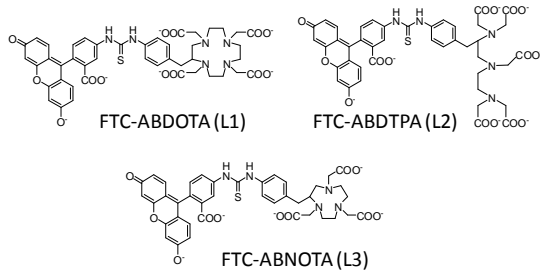


図1 新規蛍光プローブ

(2) 新規蛍光プローブの CE-LIF への適用

CE-LIF を用いて, L1 および L2 プローブ錯体の分離検出を試みたところ, 通常のキャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) では金属間相互分離が不可能であった。しかし, ポリブレンなどの多価カチオンを添加することによって金属間高度分離が可能であることが分かった (図2)。金属イオンの検出限界は  $2\sim 7 \times 10^{-11} \text{ M}$  と超高感度検出が可能であった。溶液中の金属イオンの汚染を考えなければ, 検出限界は  $10^{-12} \text{ M}$  レベルにも達する。この方法はヒト血清試料や河川水への適用が可能であり, 実用法としても優れていることが分かった。

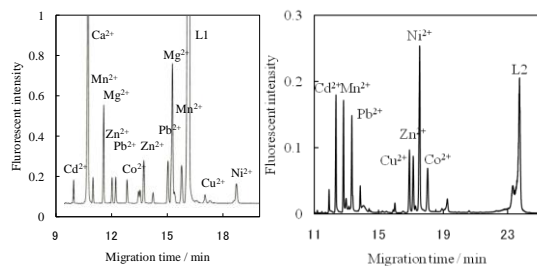


図2. ポリブレン添加時の L1 および L2 プローブ錯体の典型的泳動図。

プローブ錯体の移動度のポリブレン濃度依存性を解析し, この分離原理を調査したところ, 多価カチオン-金属プローブ錯体との間で形成するイオン会合複合体の形状あるいは大きさが中心金属によって大きく異なり, 高分離を達成するという, 従来とは異なる新規分離原理であることを明らかとし, これを「イオン会合複合体分離モード」と命名した。また, 実際にポリブレン-L1 プローブ錯体イオン会合複合体の円二色性スペクトル測定によって, 中心金属によって分子形状が異なることを証明した。

(3) 新規蛍光プローブの PAGE への適用

L1~L3 を PAGE に導入し, ゲル電気泳動場において金属プローブ錯体を効率的に分離することに成功した (図3)。また, 非連続

系のゲルを用い, スタッキング剤としてグリシンを選択することでプローブ錯体のオンライン濃縮にも成功している。これにより, 最大 40 倍の濃縮に成功した。また, 狭いバンドに濃縮することで金属間の高分離も達成できる。検出できる金属イオンの種類は蛍光プローブの配位部位の骨格によって大きく異なる。L1 では,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ , L2 では  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  および L3 では  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  の分離検出が可能であった。プローブの配位部位の剛性や配位座数の違いで検出選択性を制御できることが分かった。金属イオンの検出感度は, レーザー励起蛍光イメージャーを用いた場合, 一桁 ppt レベル ( $10^{-11} \text{ M}$ ) にも達し, 微量金属イオンの定量に適していることを確認した。また, L2 を実試料としてヒト血清に適用し, 血清中鉄イオンの検出にも成功している。

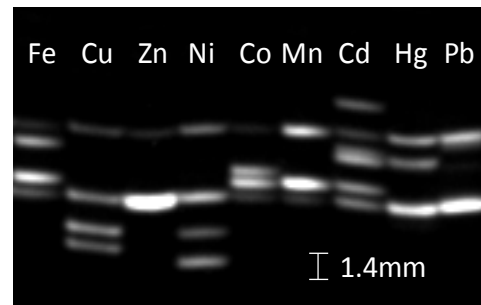


図3. プローブ L1 の PAGE における典型的電気泳動図。

(4) メタロタンパク質中の金属の検出

PAGE をプラットフォームとし, 一次元目でタンパク質を分離し, 二次元目で, タンパク質に結合している金属イオンの蛍光分離検出をする金属イオン-タンパク質マッピング電気泳動法の開発を進めた。前項において, 二次元目の金属イオン検出系を確立したため, 本年度は一次元目において, 金属イオンがタンパク質から解離しない分離条件を探索した。モデルタンパク質として, 血清中主要銅結合性タンパク質であるセルロプラスミンおよび鉄結合性タンパク質であるトランスフェリンを用いた。結果として, 通常よりも高い pH に設定し, 精製したモノマーによって作成したスラブゲルを用いたブルーネイティブ PAGE および尿素 PAGE を適用することによって, 金属イオンの解離反応を大幅に抑制できることが分かった。一次元目のゲルからタンパク質を電気的溶出し, 蛍光プローブを用いる金属検出 PAGE を行ったところ, トランスフェリン結合型鉄イオン, セルロプラスミン結合型銅イオンを検出することに成功した。

今後は, 一次元目と二次元目の効率的な接続を行い, 二次元電気泳動マッピングシステ

ムの確立を行う予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Shingo Saito, Yuta Nakano, Atsushi Hikichi, Ryouji Suzuki, Keitaro Yoshimoto, Mizuo Maeda, Masakazu Aoyama, Masami Shibukawa, "Ultrasensitive CE for heavy metal ions using the variations in the chemical structures formed from new octadentate fluorescent probes and cationic polymers", *Analyst*, 査読有, 2011, in press.
- ② 齋藤伸吾, "PAGE 分離後のタンパク質結合型金属イオンの検出", *ぶんせき*, 査読無, 第 12 号, 2010, 678.
- ③ 齋藤伸吾, キャピラリー電気泳動法を用いる金属イオンの超高感度検出法の全体設計, *MaLS FORUM*, 査読無, Vol.7, 2010, pp.8-13.
- ④ Shingo Saito, Atsushi Hikichi, Takao Kamura, Kazuyuki Hattori, Masakazu Aoyama, Masami Shibukawa, "Recognition of Monosaccharides with Energy-transfer Luminescence Using Residual Coordination Sites of Lanthanide(III)-4-aminobenzyl-EDTA Complex in Aqueous Solution, *Chemistry Letters*, 査読有, Vol.38, 2009, pp.412-413.

[学会発表] (計 17 件)

- ① 原賀智子, 中野裕太, 渋川雅美, 齋藤伸吾, 亀尾裕, 高橋邦明, 「キャピラリー電気泳動-レーザー励起蛍光検出法によるアクチノイド元素の高感度分析法 — 様々な配位構造を有する蛍光プローブの基礎的検討 —」日本化学会第 91 春季年会, 2011 年 3 月 26 日 (神奈川県横浜キャンパス)
- ② 佐藤義行, 中野裕太, 齋藤伸吾, 原賀智子, 浅井志保, 亀尾裕, 高橋邦明, 渋川雅美, 「放射性廃液中の希土類イオン分析を目的とした新規蛍光プローブおよび動的三元錯体平衡を利用する高感度 CE-LIF」日本化学会第 91 春季年会, 2011 年 3 月 26 日 (神奈川県横浜キャンパス)
- ③ Stephanie E. Rockett, Shingo Saito, Keita Iehara Takeshi Maeda, Hiroyuki Nakazumi, Christa L. Colyer, "Characterization of Novel Squarylium Dyes with Multiple Carboxylic Acid Residues as Noncovalent Protein Probes", *PittCon2011*, 2011 年 3 月 15 日 (Atlanta, GA, USA)

- ④ 齋藤伸吾, 「ゲル電気泳動法をプラットフォームとするメタローム解析技術の開発」2010 旭硝子財団 助成研究発表会, 2010 年 7 月 27 日 (市ヶ谷)
- ⑤ 大島大樹, 齋藤伸吾, 佐藤誠, 渋川雅美, 「PAGE を基盤とした蛍光ラベル化配位子を用いるタンパク質-鉄イオン二次元マッピング法の開発」(ポスター賞受賞)日本分析化学会関東支部若手交流会, 2010 年 7 月 3 日 (国民宿舎サンレイク草木)
- ⑥ 大内和希, 齋藤伸吾, 渋川雅美, 「残余配位座でシアル酸を特異的に分子認識する発光性ランタノイド-六座大環状ポリアザカルボン酸錯体」(ポスター賞受賞)日本分析化学会関東支部若手交流会, 2010 年 7 月 3 日 (国民宿舎サンレイク草木)
- ⑦ 中野裕太, 齋藤伸吾, 渋川雅美, 「キャピラリー電気泳動におけるポリカチオンによる金属蛍光プローブ錯体の配位構造認識」日本分析化学会関東支部若手交流会, 2010 年 7 月 3 日 (国民宿舎サンレイク草木)
- ⑧ 大内和希, 齋藤伸吾, 渋川雅美, 「発光性ランタノイド-六座大環状ポリアミノカルボン酸錯体の残余配位座を利用する単糖分子認識」第 71 回分析化学討論会, 2010 年 5 月 16 日 (島根大学松江キャンパス)
- ⑨ 大島大樹, 齋藤伸吾, 佐藤誠, 渋川雅美, 「PAGE を基盤とした蛍光ラベル化配位子を用いるタンパク質結合型金属イオンの分離検出技術の開発」第 71 回分析化学討論会, 2010 年 5 月 15 日 (島根大学松江キャンパス)
- ⑩ 加藤健太, 齋藤伸吾, 渋川雅美, 永澤明, 「水溶液中における閉殻金属(II)-含ピリジン六座配位子錯体の加溶媒解離反応速度論: 活性化体積の測定と反応速度制御因子の考察」日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月 27 日 (近畿大学本部キャンパス)
- ⑪ Shingo Saito, Hiroki Oshima, Takahiro Nomura, Keitaro Yoshimoto, Makoto Sato, Mizuo Maeda, Masami Shibukawa, "Polyacrylamide gel electrophoresis of trace metal ions bounded to proteins in gel fraction using novel fluorescent probes: Fluorescent detection of trace Fe(III) in transferrin", *PittCon 2010* (Orland, Florida, USA) 2010 年 3 月 15 日.
- ⑫ 齋藤伸吾, 「超微量重金属イオンの CE 蛍光検出のための試薬および分離システム設計」(招待公演) 第 26 回イオンクロマトグラフィー討論会, 2009 年 12 月 4 日

- ⑬ 中野裕太, 齋藤伸吾, 渋川雅美, 「八座発蛍光性配位子を用いる金属イオンのCE-LIF 分離検出 -カチオン性ポリマーとのイオン会合による配位構造認識-」日本分析化学会第 58 年会, 2009 年 9 月 24 日 (北海道大学)
- ⑭ 野村高弘, 大島大樹, 佐藤誠, 齋藤伸吾, 渋川雅美, 「PAGE をプラットフォームとするタンパク質結合型金属イオンの検出法の開発: トランスフェリン結合型 Fe(III)の検出」東京コンファレンス 2009, 2009 年 9 月 4 日 (幕張メッセ国際会議場)
- ⑮ 齋藤伸吾, 「分離分析システムにおけるランタノイドイオンの高感度検出試薬の開発」(招待講演), 「核燃料サイクルの物質利用」研究専門委員会 第 15 回委員会, 2009 年 7 月 22 日 (大宮 ソニックスティ)
- ⑯ 榎本七基, 齋藤伸吾, 嶋田康紀, 佐藤誠, 渋川雅美, 「配位構造の異なる金属プロープ錯体の PAGE における分離検出特性の調査」分離技術会 年会 2009, 2009 年 6 月 12 日 (明治大生田キャンパス)
- ⑰ 中野裕太, 齋藤伸吾, 渋川雅美, 「剛性の高い八座非環状蛍光配位子を用いる金属イオンのキャピラリー電気泳動分離」(学生ポスター賞受賞) 分離技術会 年会 2009, 2009 年 6 月 12 日 (明治大生田キャンパス)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称: 流れ分離分析法による金属測定に使用する試薬及び測定方法

発明者: 齋藤伸吾, 穴田哲也, 星座

権利者: 株式会社シノテスト, 齋藤伸吾, 星座

種類: 特許

番号: 特許第 4571379 号

取得年月日: 22 年 8 月 20 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.apc.saitama-u.ac.jp/bunseki/Index1.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤 伸吾 (SAITO SHINGO)

埼玉大学・理工学研究科・准教授  
研究者番号: 60343018

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし