

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月7日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23750077

研究課題名（和文） 金属イオン検出を新たな次元とする多次元PAGEによるメタロタンパク質分析法の開発

研究課題名（英文） Multi-dimension polyacrylamide gel electrophoresis for detection of metal ions bound to metalloproteins

研究代表者

齋藤 伸吾 (SAITO SHINGO)

埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：60343018

研究成果の概要（和文）：

生体試料中の金属イオンの分布情報を得るため、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（PAGE）を基盤とするタンパク結合型金属イオンの高感度検出技術を開発した。金属イオンをPAGEで検出するための蛍光プローブを開発し、種々の金属イオンに対して分離検出可能なプローブを見出した。この金属検出PAGEを二次元目とし、ブルーネイティブPAGEを一次元目として用い二次元化を試みた。その結果、種々のタンパク質結合型銅および鉄イオンの検出に成功した。

研究成果の概要（英文）：

A polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)-based method has been developed, consisting of two gel electrophoresis, to obtain distribution of protein-bound metal ions in biological samples. The former is blue-native (BN) PAGE to separate proteins without dissociation during migration. The other is a PAGE for the separation and detection of protein-bound metal ions in small volume samples with high sensitivity in the ppt range using fluorescence metal probe. The probes have a chelating moiety (multidentate polyaminocarboxylate), a fluorophore (fluorescein) and a spacer (aminobenzyl group) to form emissive and kinetic inert complexes with metal ions. Some metal ions,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+/3+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  and  $Hg^{2+}$ , were successfully detected by this new PAGE. After separation of the proteins by BN-PAGE, the metal ions in the gel fractions were eluted, followed by derivatization of copper ions into the metal probe complexes to be separated and determined by fluorescence detection in the second PAGE. In this PAGE-based method, the copper ions bound to ceruloplasmin and superoxidedismutase, and iron ions bound to transferrin and hemopexin were quantitatively determined.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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-有機物質複合体）が多く有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

らかとなってきた。このメタロームの系統的、網羅的学術領域として原口によって提唱されたメタロミクスが注目を集めている (*J. Anal. At. Spectrom.*, 19, 5 (2004))。メタロームの

網羅的解析技術として、PAGE によるタンパク質分離後のゲル中金属イオンの検出が提案されている(例えば *Nature*, 445, 91 (2007))。検出法としては、レーザーアブレーション-誘導結合プラズマ質量分析法 (LA-ICP-MS) の適用が主流である (*Anal. Chem.*, 77, 5851 (2005)等)。しかし、致命的な問題点として、a) PAGE-LA-ICP-MS は、低感度(サブ ppm レベル)であるため、低濃度で存在するメタロタンパク質の検出が不可能であり、さらに誤検出の可能性(金属汚染やゲルの歪みによる)が高く、正確な測定が困難との報告がある (*Electrophoresis*, 30, 303 (2009))。加えて、b) タンパク質の分離時に、メタロタンパク質から金属が解離してしまうことも報告されている (*J. Anal. At. Spectrom.*, 22, 917, (2007))。これらのことから、PAGE によるメタロームのスペシエーションは、“technically challenging”と評される (*Nature*, 460, 823 (2009))。その一方で、これを実現した時の大きな波及効果が期待されている。

(2) 研究代表者は、上記の低感度、誤検出および金属解離といった問題点を克服した「タンパク質結合型金属を正確に測定できる簡易で汎用的なハイスループット分析法」を開発することを着想した。主たるアイデアは、a) ゲル電気泳動場で機能する金属蛍光プローブ群を創製し、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)を与えることである。蛍光検出法であれば、高感度かつ誤検出しないシステムの構築が可能である。研究代表者は、既に PAGE で機能する幾つかの金属蛍光プローブを見出しており研究の端緒を拓いている。a) に加えて、b) メタロタンパク質分離の際の金属イオンの解離反応(分解)を抑制した電気泳動場の構築を行うこととした。解離反応には多くの制御因子があるため、解離反応を自在に操作することは容易ではないが、研究代表者は、ある特殊な条件下で幾つかのメタロタンパク質が金属を保持したまま泳動できることを発見している。このように、従来の金属検出技術を凌駕する手法(a)と解離反応を抑制した分離システム(b)を組み合わせることで、金属検出という新しい次元を加えた多次元 PAGE(例えば、「タンパク質の分子量-等電点-金属検出」)を構築できると考えた。

(3) このような多次元情報を獲得することにより、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。本研究の様に積極的にメタロタンパク質の解離反応を制御する試みは、これまでほとんど行われておらず、独自性が高い研究といえる。

## 2. 研究の目的

(1) 生体内微量元素(金属)が関与する生命現象を理解するためには、「どのタンパク質にどの微量元素イオン種がどれだけ存在するか」を知る高感度スペシエーション技術の開発が必須である。本研究の目的は、新規方法論として、従来のタンパク質のポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)に、超高感度金属分離検出という新しい次元を加えた多次元 PAGE を開発することである。これを達成するために、蛍光プローブを用いる金属検出 PAGE の開発を行い、タンパク質の PAGE と結合して多次元化に挑戦する。また、メタロタンパク質からの金属解離(分解)を抑制した「ソフトな分離」の確立を行い、タンパク質-金属マッピング法の全体設計を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 蛍光プローブ錯体およびメタロタンパク質の速度論的安定性、発光特性、電気泳動場での分離特性などを全体論的に考慮した分析システムのグランドデザインを行いブレイクスルーを狙い、以下の3つの研究項目を行った。

### ① 金属蛍光プローブ群の創製と PAGE における高感度分離検出

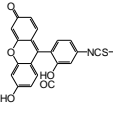
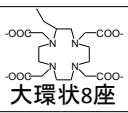
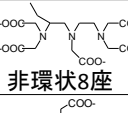
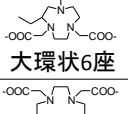
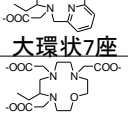
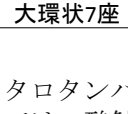
新規蛍光プローブを設計・合成し、PAGE に導入した。これにより、遷移金属および重金属群の超高感度一斉分離検出( $10^{-10}$ ~ $10^{-11}$  M, 絶対感度アトモレベル)を目指した。

上記を達成するために、新規蛍光プローブを開発した。プローブ群は高量子収率を有する発光団(フルオレセイン)、スパーサー(アミノベンジルイソチオカルバミル基)および解離不活性錯体を形成する配位部位(多座ポリアミノカルボン酸)で構成される。発光部位と錯形成部位の距離を 11 Å 以上とすることで、常磁性および重金属群を蛍光検出できること、および検出および分離選択性は配位部位の化学構造に依存することが先行研究から分かっている。そこで配位構造の異なる(6~8座、大環状型または非環状型)のプローブ群(表1)を調査した。

### ② メタロタンパク質のソフトな電気泳動分離

メタロタンパク質中の金属イオンが分離過程で解離(分解)しない「ソフトな分離」

表1. PAGE用新規金属蛍光プローブ

光アンテナ部位	スペーサー	錯形成部位	分離検出金属イオン
		 大環状8座	Fe <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup>
		 非環状8座	Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Hg <sup>2+</sup>
		 大環状6座	Cd <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup>
		 大環状7座	Fe <sup>3+</sup> , Hg <sup>2+</sup>
		 大環状7座	Mg <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup>

法の開発を試みた。

泳動中に起こるメタロタンパク質の金属解離反応の経路としては、酸触媒、配位子置換、金属置換および加溶媒解離反応があるが、それぞれ pH、スタッキング剤、汚染金属、変性剤が制御因子となる。従って、これらを制御することを考えた。Cu 検出にはプローブ 1 を用い、Fe 検出を行う際にはプローブ 2 を用いた。上記② (メタロタンパク質の分離) および① (金属検出) を結合して PAGE を多次元化した。その際、一次元目のゲルを切り出し、その分子量分画から金属を溶出し、その後、蛍光プローブを加えて、二次元目の金属検出 PAGE を行った。

### ③ ゲル内 (In-gel) 誘導体化法の開発

上記の多次元化の方法に加えて、メタロタンパク質を一時的に補足するトラップゲルを用い、In-gel で金属イオンを蛍光プローブ錯体に化学種変換して、多次元化する方法を開発した。

操作方法は、a) タンパク質のソフトな分離をチューブゲルで行う。b) チューブゲルを二次元目のスラブゲルへと導入するが、スラブゲル上端にタンパク質を補足するための高濃度トラップゲル (30-60%T) を重層する。泳動によってタンパク質をトラップゲルに補足した後、c) ゲル上端から蛍光プローブを電気泳動的に導入する。金属イオンはタンパク質から解離し、プローブ錯体へと化学種変換され、d) 濃縮ゲルで濃縮され、分離ゲルでスポットとして検出した。金属は Cu<sup>2+</sup>を検出することとし、プローブ 1 を用いて定量を行った。

## 4. 研究成果

(1) 「金属蛍光プローブ群の創製と PAGE における高感度分離検出」に関しては、表 1 に

示したプローブ 1~5 に関して検出性能を調査した。特に、プローブ 4 および 5 はこれまでに全く調査していなかった分子構造である。典型的な L5 の電気泳動図を図 1 に示す。検出選択性は表 1 に示した通り、種々のプローブで異なる金属イオンの検出が可能であった。これらのプローブを用いれば、生体試料中の Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+/3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> および Hg<sup>2+</sup> の検出が可能であることを示している。すなわち、一次元目 PAGE で分離したタンパク質の分子量分画から、これらの金属を定量できる可能なことを示している。この方法の利点は、溶出によって数十 μL に希釈された分子量分画 (数 μL) を濃縮ゲルによって再濃縮しつつ高感度分析が可能なことである。検出限界は 4~20 μL の試料中のサブ ppb~数十 ppt であり、少試料量中の超高感度分析が可能であることを示した。

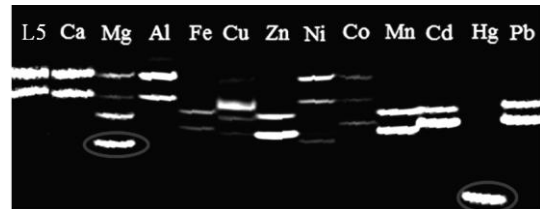


図 1. L5 錯体の典型的な電気泳動図。試料: [プローブ 5] = 1 × 10<sup>-5</sup> M, [金属イオン] = 1 × 10<sup>-5</sup> M。

(2) メタロタンパク質のソフトな電気泳動分離に関しては、モデルタンパク質として、銅結合タンパク質のセルロプラスミン (Cp)、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を、鉄結合タンパク質のトランスフェリン (Tf)、ヘモペキシン (Hx)、ヘモグロビン (Hb) を用いた。ソフトな電気泳動場として、ブルーネイティブ (BN) PAGE を用いた場合に、最もタンパク質からの金属解離を抑制できることが分かった。また、BN-PAGE の条件を従来とは変更し、濃縮ゲル pH を 7.5 とすることで、ある程度、酸触媒解離反応を抑制することができた。さらに、生理 pH と近い値にすることで、泳動時に化学種が変化していないことが予想できる。

一次元目を BN-PAGE で行い、その後、切り出したゲル (分子量分画) から少量の酸で金属を溶出し、その後、金属検出 PAGE を行うことでタンパク質結合型 Cu および Fe を検出することに成功した (図 2)。さらに、実試料としてヒト血清を用いたところ、鉄結合性タンパク質の Tf 分画から Fe<sup>3+</sup> の、銅結合性タンパク質の Cp 分画から Cu<sup>2+</sup> のそれぞれの検出に成功した (図 3)。

このように本法が、タンパク質結合型金属イオンのマッピングに有用であることが示された。

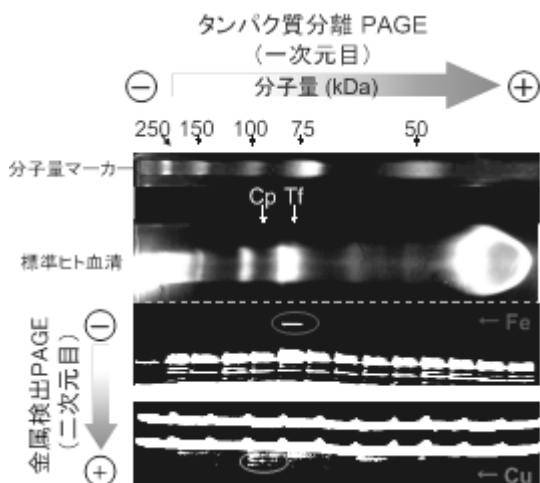


図 2. 金属結合型タンパク質混合試料の BN-PAGE/金属検出 PAGE の典型的泳動図.

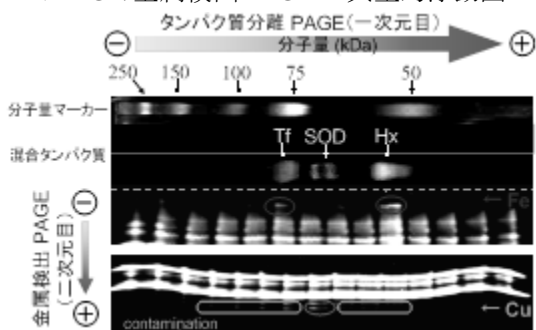


図 3. ヒト血清の BN-PAGE/金属検出 PAGE の典型的泳動図

(3) ゲル内 (In-gel) 誘導体化法の開発を行った。モデルタンパク質としては SOD を用いた。その結果、低濃度の SOD ( $5 \times 10^{-7}$  M) から  $\text{Cu}^{2+}$  を検出することに成功した (図 4)。本実験による SOD 結合型 Cu の回収率および感度を評価したところ、ゲル内誘導体化法を利用したタンパク質-Cu 二次元マッピングシステムによる SOD 結合型 Cu の回収率は 52% となり、定量的な検出には至らなかった。しかしながら、5.2 pmol と一桁ピコモルレベルの Cu を 5.0 pmol の SOD 中から検出することに成功した。この様に、現在のところ、定量性には欠けるものの金属検出を新たな次元とする二次元マッピング化に成功した。さらに、感度が十分に高いことから、この方法がタンパク質-金属イオンマッピングを行う上で、有用であることが示された。

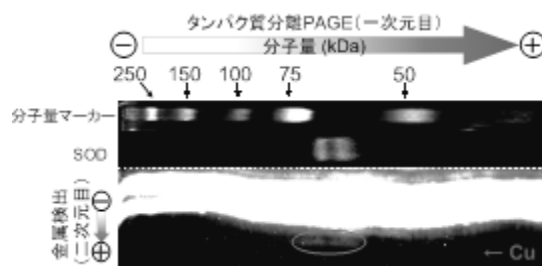


図 4. ゲル内誘導体化法を利用した SOD-Cu 二次元マップ。試料  $5 \times 10^{-7}$  M SOD (10  $\mu$ l).

## 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) Kazuki Ouchi, Shingo Saito, Masami Shibukawa, "A New Molecular Motif for Recognizing Sialic Acid Using Emissive Lanthanide-Macrocyclic Polyazacarboxylate Complexes: Acid-Dissociation of A Coordinated Water Molecule Controls Selectivity," *Inorganic Chemistry*, 査読有, 2013, accepted with minor revision.

(2) Shingo Saito, Yoshiyuki Sato, Tomoko Haraga, Yuta Nakano, Shiho Asai, Yutaka Kameo, Kuniaki Takahashi, Masami Shibukawa, "Highly sensitive detection of neodymium ion in small amount of spent nuclear fuel samples using novel fluorescent macrocyclic hexadentate polyaminocarboxylate probe in capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence detection", *Journal of Chromatography A*, 査読有, 1232, 2012, 152-157.

(3) 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, 136(13), 2011, 2697-2705.

(4) 齋藤伸吾, "新規蛍光プローブの開発と速度論的特性を用いる高性能金属イオン分離分析システムの構築", *分析化学*, 査読有, 60(10), 2011, 773-784.

[学会発表] (計 1 1 件)

①辻村大翔, 齋藤伸吾, 渋川雅美, 「キャピラリー等速電気泳動法を利用した新規濃縮-分離-分取システムの開発」日本分析化学会第 61 年会 (金沢大学) 2012 年 9 月 18 日

②佐藤義行, 齋藤伸吾, 原賀智子, 伊東祐有希, 亀尾裕, 高橋邦明, 渋川雅美, 「ウラニルイオンに選択的なキャピラリー電気泳動-レーザー励起検出法用新規蛍光プローブの開発」日本分析化学会第61年会(金沢大学) 2012年9月18日

③川島光善, 齋藤伸吾, 佐藤誠, 渋川雅美, 「汚染金属フリーな新規ゲル電気泳動法の開発と血清中タンパク質-銅イオン二次元マップ」日本分析化学会第61年会(金沢大学) 2012年9月18日

④Kazuki Ouchi, Shigo Saito, Masami Shibukawa, "Lanthanide-macrocylic polyazacarboxylate complexes for luminescence recognition of sialic acid: the mechanism of the specific binding," RSC Tokyo International Conference 2012 -Micro/Nano Technologies for Analysis of Human Health and Diagnostics- (Makuhari Messe, Chiba, Japan) 2012年9月6日

⑤齋藤伸吾, 川島光喜, 佐藤誠, 渋川雅美, 「タンパク質-金属イオン二次元ゲル電気泳動法の開発: 分離場の汚染金属抑制とヒト血漿中銅イオンの分布」第23回日本微量元素学会学術集会(シェーンバッハ・サボ一, 砂防会館) 2012年7月5日

⑥ Kazuki Ouchi, Shingo Saito, Masami Shibukawa, "Emissive Lanthanide-Macrocylic Polyazacarboxylate Complexes Specifically Recognizing Sialic Acid by Acid Dissociation Reaction of a Coordinated Water Molecule," PittCon2012, Orlando, USA (Orange County Center, USA) 2012年3月18日

⑦浅藤憲, 齋藤伸吾, 渋川雅美, 「ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による金属錯体分離における結合水の影響」日本分析化学会第60年会(名古屋大学東山キャンパス) 2011年9月14-16日

⑧Shingo Saito, Tomoko Haraga, Yuta Nakano, Yoshiyuki Sato, Yutaka Kameo, Kuniaki Takahashi, Masami Shibukawa "Highly Emissive Metal Probes Suitable for Ultratrace Detection of Lanthanide and Actinide Ions by Capillary Electrophoresis-Laser-Induced Fluorescence," 36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2011)(Budapest Congress & World Trade Centre, Budapest, Hungary) 2011年6月19-23日

⑨ Kazuki Ohuchi, Shingo Saito, Masami

Shibukawa, "Specific Molecular Recognition of Sialic Acid by Reactions with Residual Coordination Sites of Lanthanide-Macrocylic Polyazacarboxylate Complexes in Aqueous Solution," IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (Kyoto International Conference Center, JAPAN) 2011年5月25日

⑩Hiroki Ohshima, Shingo Saito, Mitsuyoshi Kawashima, Makoto Sato, Masami Shibukawa, "Two-Dimensional Protein-Metal PAGE for Sensitive Detection of Metal-Bound Proteins" IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (Kyoto International Conference Center, JAPAN) 2011年5月23日

[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: 試料中の金属の測定方法

発明者: 齋藤伸吾, 佐藤誠

権利者: 株式会社シノテスト

種類: 特許

番号: 特許第5145511号

取得年月日: 24年12月7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/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤 伸吾 (SAITO SHINGO)

埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号: 23750077