

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：21601
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26410158
研究課題名(和文) 免疫抽出とキャピラリー等電点電気泳動のオンライン結合による翻訳後修飾パターン分析

研究課題名(英文) Pattern analysis of post-translational modification using on-line coupling of immunoadsorption and capillary isoelectric focusing.

研究代表者
志村 清仁 (Shimura, Kiyohito)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30130008
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：免疫吸着カラムとキャピラリー等電点電気泳動用キャピラリーを一体化した分離分析デバイスを開発し、免疫吸着した試料をデバイス内に溶離し、そのまま直接キャピラリー等電点電気泳動で分離分析する方法を開発した。本法は翻訳後修飾によって生じたタンパク質電荷バリエーションを分離定量することができるため、微量のタンパク質の翻訳後修飾パターンを効率よく解析することができる。

研究成果の概要(英文)：A separation and analysis device that integrates an immunoadsorption column and a capillary for isoelectric focusing was developed. By using this device, an analysis method was developed to elute the sample trapped in the immunoadsorption column into the device and analyze the eluted sample by capillary isoelectric focusing. This method can efficiently separate and determine the charge variants of a protein produced by post-translational modifications.

研究分野：バイオ分析化学

キーワード：electrophoresis isoelectric focusing immunoadsorption PTM modform analysis capillary

1. 研究開始当初の背景

翻訳後修飾は遺伝子産物の働きを調整することによって、遺伝的な決定の枠を越えて生命活動の多様性と適応性を高めている。逆に、翻訳後修飾のあり方は、細胞や個体の状態を鋭敏に反映するものであり、極めて有益な情報を含むと考えられる。最も研究が進んでいるリン酸化を例にとると、多くのリン酸化タンパク質は複数のリン酸化部位をもつため、それぞれの部位におけるリン酸化の有無によって多くのリン酸化体が存在する。リン酸化部位が2箇所であれば4種のリン酸化体が、3箇所であれば9種のリン酸化体が存在する(図1)。したがって、翻訳後修飾を把握するには、各翻訳後修飾体の存在比パターンを知ることが重要である。このような存在比パターンを、ここでは翻訳後修飾パターンと呼ぶことにする。

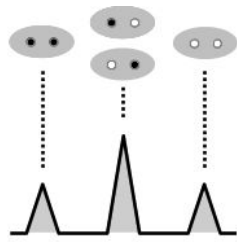


図1 翻訳後修飾パターンの例 2箇所のリン酸化部位をもつタンパク質に可能な4種のリン酸化体が等モルずつ存在する場合の等電点分離パターン

2次元ゲル電気泳動と質量分析の組合せによって、翻訳後修飾の解析と特徴付けが済むと、特定のタンパク質の翻訳後修飾パターンは、2次元ゲル電気泳動で分離したタンパク質の免疫染色(ウェスタンブロット)によって得ることができる。ここで得られるパターンは主に等電点の差に基づくものであるが、それを得るのに丸1日から2日を要する。一方、固定化抗体カラムアフィニティークロマトグラフィーとキャピラリー等電点電気泳動(CIEF)を組み合わせると、同様なパターンをより短時間に得られる可能性がある。しかし、抗体カラムで抽出した試料を一旦取り出すと、試料のロスが起こり、全体としての感度と精度が大幅に低下してしまう。

このロスと精度の低下を無くするには、免疫抽出とCIEFをオンライン結合することが望ましい。以前、私はこのためにマイクロ流体チップを開発したが(Shimura, K. et al. J. Sep. Sci. 2007, 3, 1477)、多数のマイクロバルブとマイクロポンプを操作する必要から、運転には専用の自動化装置の開発を要した。

最も単純なオンライン結合としては、抗体カラムとCIEF用キャピラリーを直結し、カラムから溶離されたタンパク質を、そのままCIEF分離することが考えられる。CIEFには、タンパク質の吸着と電気浸透を抑制するために、水溶性かつ電気的に中性のポリマーで内壁を被覆したキャピラリーが必要である。一方、抗体カラムには固定化抗体由来する解離基が存在するので、

酸性では正電荷、塩基性では負電荷を帯びる。このため、全体に電圧を印加すると、抗体カラム部分で発生する電気浸透流によって、試料タンパク質とpH勾配がCIEF用キャピラリーから移動してしまうという問題が生じる(図2)。

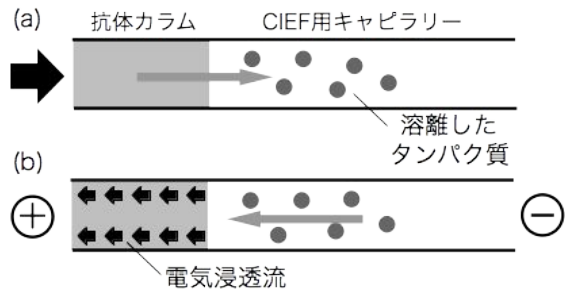


図2 抗体カラムで発生する電気浸透流の問題 (a) 抗体カラムに捕捉したタンパク質をCIEF用キャピラリーに溶離する。(b) 電圧を印加すると酸性化した抗体カラムで発生する電気浸透流が、試料タンパク質とpH勾配をCIEF用キャピラリーから陽極方向に移動させてしまい、等電点分離ができなくなる。

2. 研究の目的

ごく最近になって、本研究者はアフィニティークラムとCIEF用キャピラリーを直結したデバイスにおいては、以下のような方法を用いれば、オンライン結合が可能であることを発見した。すなわち、アフィニティークラムを陽極側に置く場合、まず全体をpH勾配形成のための両性担体液で満たした後に、酸性の電極液をちょうどアフィニティークラムだけが浸るように陽極側から注入する。これによって、吸着したタンパク質はアフィニティークラムとCIEF用キャピラリーの境界付近に溶離される。この状態で電圧を印加して焦点化を開始する。すると、アフィニティークラム内で陽極側への電気浸透流が発生するが、これに釣り合うような圧力を陽極端に加えれば、CIEF用キャピラリー内は電気浸透の影響を受けず、等電点電気泳動によるタンパク質の分離を問題なく行うことができる(図3)。これはアフィニティークラムとして金属キレートを内壁に固定化した中空キャピラリーを用いて実証したが、この原理は抗体カラムについても全く同様に適用できるはずである。

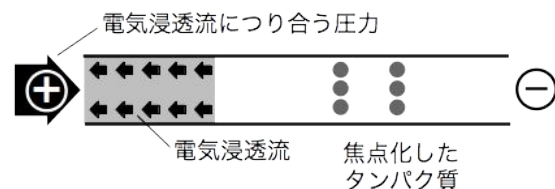


図3 圧力による電気浸透流の影響解消 アフィニティークラム部分で発生する電気浸透流に釣り合う圧力を陽極端に加えることにより、CIEF用キャピラリー内の液の流れを抑制し、等電点分離が可能になる。

本研究ではタンパク質の免疫抽出と、キャピラリー等電点分離のオンライン結合を上記の原理を用いて実現する。次に蛍光標識した細胞抽出液、血清などを試料として、リン酸化、糖鎖付加などの翻訳後修飾パターン分析に応用し、この方法の有効性を実証したい。

本研究は最近私が発見したアフィニティー抽出と CIEF のオンライン結合を可能にする原理を利用して、近年注目を集めている翻訳後修飾パターンの高感度かつ高精度、また迅速で自動的な分析方法を確立しようとするものである。抗体カラムと等電点電気泳動のオンライン結合は初めての試みであり、本研究では、きわめて単純な構造をもつ分離デバイスによってこれが実現可能であることを実証する。本法は市販の自動式キャピラリー電気泳動装置を用いて実施することができるため、本研究の成果は即座に広く分析技術者が利用可能である。また本法は現在の医学生物学研究に欠かせないウェスタンブロッティング法によって得られるものと同様な情報を簡単・迅速・高精度に得ることができるため、医学生物学分野の基盤技術としての価値は極めて高い。さらに、特定のタンパク質の翻訳後修飾パターンは疾病の新たなマーカーとして期待されており、これを利用するための基盤ツールとしても大きな貢献が期待できる。

3. 研究の方法

操作性に優れた中空キャピラリー抗体カラムを中心に、結合容量、作成の容易さなどを指標として抗体固定化法を最適化する。抗体カラムと CIEF 用キャピラリーの結合方法として、1本のキャピラリー内を塗り分ける方法と、それぞれ別に作成したものを連結する方法を実施し、その利点と欠点を明らかにする。高感度なレーザー誘導蛍光検出を可能にするため、アフィニティープローブキャピラリー電気泳動法(APCE)を用いて、血清糖タンパク質の糖鎖結合パターン分析を行う。

抗体固定化中空キャピラリーカラムの調製

フューズドシリカキャピラリー内壁に抗体を固定化するための方法をいくつか試行して、結合容量、作成の容易さ、有効性などの観点から最適の方法を決定する。抗体の固定化法としては抗体のアミノ基、過ヨウ素酸酸化による糖鎖のアルデヒド基を利用する方法を行う。また、ストレプトアビジンをあらかじめ内壁に固定化しておき、ビオチン化抗体を結合させる方法も実施する。これらは、すでによく確立された方法であり、これらの中から最適な方法を選択する。

カラム結合法の最適化

一本のキャピラリーの内壁に抗体結合部分と中性ポリマー結合部分の2種の内壁構造を作り分ける区分塗り分け法と、それぞれ別のキャピラリーに作成した後に接合する連結法を実施し、その利点と欠点を明らかにする。調製が容易なのは連結法であるが、連結面のデッドボリューム、連結部からの液漏れ、連結部外壁の平滑性の消失などの不具合も予想される。

最適化した方法の生体試料への応用

エリスロポイエチン (EPO) は糖鎖末端のシアル酸含量の違いにより複雑な翻訳後修飾パターンを示すことが知られている。血中や尿中の EPO について、本法を適用し、EPO の翻訳後修飾パターンを解析する。

4. 研究成果

抗体固定化中空キャピラリーカラムの調製

1本の熔融シリカキャピラリーの内壁を塗り分けることにより、入口側の内壁に抗体を、出口側の内壁に水溶性ポリマーを結合することにより、一体型キャピラリーを作製した。抗体の固定化は、シリカ表面にアミノシランの結合、ジスクシニミジルカルボネートによる活性化、ストレプトアビジンの結合、ビオチン化抗体の結合の順に反応を行うことにより達成した。水溶性ポリマーの結合は、シリカ表面へのメタクリルシランの結合、ジメチルアクリルアミドの共重合により、ポリジメチルアクリルアミドの結合を達成した。抗体として、抗ヒスチジンタグモノクローン抗体を結合したところ、キャピラリーの長さ 20 cm あたり、約 120 fmol のヒスチジンタグ付き Fab 抗体断片が結合した。

一体型キャピラリーに結合した Fab は、キャピラリーに等電点電気泳動用の両性担体液を満たした後に、抗体結合部分のみに陽極液を満たし、抗体側を陽極側にして等電点電気泳動を行ったところ、再現性よく、また高感度に Fab を分離検出することができた。

カラム結合法の最適化

1本のキャピラリーの内壁を塗り分けるのは、繊細な操作を要し、効率がよくない。そこで、内壁に抗体と水溶性ポリマーを別々に結合しておいた2本のキャピラリーの結合を試みた。これには、シリカキャピラリーの外径より少し小さな内径をもつテフロンチューブに2種のキャピラリーを差し込んで端面を接触させることが方法として適していることが分かった。これにより、一体化キャピラリーを容易に作成できるようになった。

内壁に抗体を結合した中空キャピラリーは結合反応に時間がかかるため、低い流速で試料を添加する必要がある。そのため、より高速で試料を添加できる方法を検討したと

ころ、免疫磁気ビーズを用いる方法が有望であることが分かった。目的タンパク質を抗体結合磁気ビーズにあらかじめ結合させておき、この磁気ビーズ懸濁液をキャピラリーに注入し、キャピラリーの脇に磁石を配置してキャピラリー内に磁気ビーズを捕捉する方法である。この方法は抗体固定化磁気ビーズを毎回更新できるため、多数回使用に伴う抗体の結合容量の低下もないという利点もある。

最適化した方法の EPO 分析への応用
一体化キャピラリーを EPO の電荷バリエーション分析に応用した。EPO に結合する組換え Fab を蛍光標識して EPO に対するアフィニティプローブ (AP) を調製した。この AP にはヘキサヒスチジンタグがついており、抗ヘキサヒスチジン抗体結合磁気ビーズと EPO 試料の 3 者を混合すると、EPO は AP を介して磁気ビーズに結合する。EPO を結合した磁気ビーズを内壁に水溶性ポリマーを結合したキャピラリーに注入し、磁石でキャピラリー内に捕捉した。キャピラリー内に両性担体を満たした後、磁気ビーズ部分に陽極液を満し、等電点電気泳動を行ったところ、EPO を AP との複合体として検出することができた。また、EPO の各電荷バリエーションを別々のピークとして分離検出することができた。

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. Affinity probe capillary electrophoresis of insulin using a fluorescence-labeled recombinant Fab as an affinity probe. Shimura, K., Kasai, K., *Electrophoresis* 査読有り, **35**, 840-845, 2014.
2. アフィニティプローブキャピラリー電気泳動による翻訳後修飾パターン分析. 志村清仁, 電気泳動(生物物理化学), 査読有り, 58, 74-76, 2014.
3. Direct coupling of immobilized metal ion affinity chromatography and capillary isoelectric focusing in a single capillary. Shimura K., Nagai T., *J. Electroph.* 査読有り, **59**, 7-17, 2015.
4. Capillary isoelectric focusing after sample enrichment with immunoaffinity chromatography in a single capillary. Shimura K., Nagai T., *Sci. Rep.* 査読有り, **6**, 39221, 2016.

[学会発表](計 3 件)

1. 翻訳後修飾パターン解析に向けたアフィニティプローブ CE (APCE) の開発(招待講演). 志村清仁, 分離機

能とセンシング機能の化学セミナー(日本分析化学会東北支部会主催), 東北大学(仙台), 2014 年 3 月 8 日.
2. 一体型キャピラリーデバイスを用いたエリスロポエチンの等電点パターン分析(招待講演). 志村清仁(1 番目), 長井俊彦(2 番目), 瀬戸善一(3 番目), 福原修一(4 番目)他 3 名, 第 67 回日本電気泳動学会総会、釧路市観光国際交流センター、2016 年 8 月 26 日.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 2 件)

名称: 分離分析用キャピラリーデバイス, 分離分析用マイクロ流体チップ, タンパク質又はペプチド分析方法, 電気泳動装置, 及び分離分析用マイクロ流体チップ電気泳動装置
発明者: 志村清仁, 長井俊彦, 福原修一, 瀬戸善一
権利者: 公立大学法人福島県立医科大学, 日栄工業株式会社
種類: 日本国特許
番号: 特願 2015-547698
出願年月日: 平成 28 年 5 月 24 日
国内外の別: 国内

名称: CAPILLARY DEVICE FOR SEPARATION AND ANALYSIS, MICROFLUIDIC CHIP FOR SEPARATION AND ANALYSIS, ANALYSIS METHOD FOR PROTEINS OR PEPTIDES, ELECTROPHORESIS INSTRUMENT, AND MICROFLUIDIC CHIP ELECTROPHORESIS INSTRUMENT FOR SEPARATION AND ANALYSIS
発明者: Shimura K., et al
権利者: Shimura K., Nichiei Industry
種類: U. S. Patent
番号: Application No.: 15/025,809
出願年月日: 03/29/2016
国内外の別: 国外

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志村 清仁 (SHIMURA, Kiyohito)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 30130008

(2) 研究分担者

長井 俊彦 (NAGAI, Toshihiko)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90180447