

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2013～2015
課題番号：25410139
研究課題名(和文) 金属タンパク質の分布測定を指向した多次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法の開発

研究課題名(英文) Multidimension polyacrylamide gel electrophoresis oriented toward the identification of metalloproteins

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
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：「生体中微量金属イオンがどのタンパク質にどれだけ結合しているのかを計測する」ことは重要であるが非常に困難である。そこでこれを実現するために新規なポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)を開発した。一つは汚染金属イオンをタンパク質の分離場から高度に除去可能な汚染金属イオンスイーピングPAGEであり、もう一つはゲル分画中の超微量金属イオンを検出可能な金属検出PAGEである。さらに金属タンパク質だけを試料から単離可能なホロ/アポ変換二次元MICS-PAGEの開発にも成功した。これらの新規PAGEによって生体試料中の新規金属タンパク質を発見することにも成功した。

研究成果の概要(英文)：Although investigation of metalloproteins is of importance to realize the relationship between metal ion and biological behavior, identification of metalloproteins is difficult. Here, we have developed three types of new polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) specific to metalloproteins and protein-bound metal ions in biological samples: metal ion contaminant sweeping (MICS)-Blue Native (BN)-PAGE; metal ion detection PAGE; and holo-apo conversion two dimensional MICS-PAGE. In MICS-BN-PAGE, all metal contaminants were excluded from the gel, the separation buffer and the instruments, resulting in protein separation under metal-free conditions. In metal detection PAGE, metal ions (Fe, Cu and others) were separated and fluorescently detected with high sensitivity (to the ppt level) by the addition of probes. In holo-apo conversion 2D MICS-BN-PAGE, metalloproteins were exclusively isolated off of the diagonal line.

研究分野：分析化学

キーワード：メタロミクス 金属タンパク質 電気泳動 スペシエーション

1. 研究開始当初の背景

近年、生体中の金属結合型タンパク質(金属タンパク質)の生体内分布を知ることが多くの病態や生命活動を理解する上での鍵であることが明らかとなってきた。しかし、タンパク質結合型金属の正確な分布を網羅的に調査できる方法は確立されていない。

一方、研究代表者はこれまでに、ブルーネイティブ-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(BN-PAGE, 変性力は弱い分子量に基づく分離が可能なPAGE)によるタンパク質分離(一次元目)と独自に開発した蛍光プローブを用いる ppt レベルの金属イオン検出用PAGE(二次元目)を組み合わせて、一次元目のタンパク質分画中の微量金属を定量するPAGEを基盤とした簡易なタンパク質-金属イオン二次元マッピング技術の開発に成功している。これにより、ヒト血清中の主な鉄と銅イオン結合タンパク質の分布を得ることに成功したが、以下の問題が残っていた。A. 弱く結合しているタンパク質結合型金属は泳動中にタンパク質から解離するため検出できないこと、また、B. BN-PAGEでは、目的とする金属タンパク質と分子量が同程度のタンパク質との単離・同定が困難なこと、C. 装置および試薬由来の微量な汚染金属イオンの存在により、正しい金属分布情報が得られないことである。これらの問題は、他の研究者らによって開発された種々の金属タンパク質の分離検出法(例えばHPLC-ICP-MSやPAGE-レーザーアブレーション質量分析法等)でも同様に論じられ、最終的にはこれらの分離検出法では上記問題の解決は非常に困難であると報告されていた(Balkhi et al., *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 6904 など)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「生体中微量金属イオンがどのタンパク質にどれだけ結合しているか」を計測するためのゲル電気泳動法を基盤とした簡易で高感度なスペンション技術を確立することである。特に、これまで検出不可能であった置換活性なタンパク質結合型金属イオンの検出をするために、1. 金属タンパク質からの金属解離(分解)を抑制した「ソフトな分離場」の確立に挑戦した。また、2. 複雑な生体試料から金属タンパク質だけを選択的に単離する新規二次元電気泳動法の開発を行った。さらに、上記1および2を統合し、3. 金属タンパク質に特化した電気泳動システムを構築することで、血清・微生物中の金属イオンの動態把握を試みた。

3. 研究の方法

(1) 金属タンパク質に特化したPAGEの開発
タンパク質結合型金属イオンが分離過程で解離(分解)しない「ソフトな分離場」の構築のため、ゲル中の高度な汚染金属除去に

種々の分離モードを適用することを試みた。タンパク質を弱く変性する手法としてUrea-PAGE, Native-SDS-PAGE, BN-PAGEを選択した。これらは金属タンパク質から金属が解離しない程度に弱く変性するとの報告がある手法である。しかし、金属タンパク質から定量的に金属イオンが検出されているかどうかといった詳細な検討はされていない。これらのPAGEに研究代表者が開発した汚染金属イオンスウィーピング法(MICS法)を組み込み評価した。MICS-PAGE法は上層および下層泳動液にそれぞれ正と負の異なる電荷を有する錯体を形成するキレート剤を添加するPAGEであり、泳動液や装置由来の汚染金属イオンをタンパク質試料に先行して泳動・除去させる手法である。これにより、汚染金属イオンが除去されたばかりの泳動場で試料を分離可能である。つまり、汚染金属イオンと一切接触することなくタンパク質の分離が可能である。これによって、タンパク質結合型金属イオンを金属検出PAGEを用いて測定する際、汚染金属イオンのタンパク質への誤取り込みによる正誤差や汚染金属イオンによって起こる金属置換反応に基づく負誤差を抑制し、正確な金属イオンの分布を測定可能である。

(2) ホロ/アポ変換2D-MICS-PAGEによる金属タンパク質の選択的分離法の開発

一次元目MICS-PAGE(BN-PAGEあるいはUrea-PAGE)と二次元目MICS-PAGEの間で金属をタンパク質から解離させ、ホロ型であったタンパク質を対角線上から外れたスポットとして金属タンパク質を単離させる方法を開発した。すなわち、一次元目ゲルを、キレート試薬を含む酸性溶液に浸漬することで、ゲル中ホロタンパク質をからアポ型に変換し、その後、二次元目のMICS-PAGEに供する。これにより、試料中のアポタンパク質は一次元目と二次元目とで全く同じ電気泳動をすることになるため、二次元図の対角線上に泳動する。一方、金属タンパク質は、一次元目はホロ、二次元目はアポタンパク質として泳動される。MICS-BN-PAGEやMICS-Urea-PAGEではホロとアポタンパク質で泳動挙動が異なるため、金属タンパク質は二次元図の対角線上から外れたスポットとして検出されるはずである。

(3) 金属検出PAGEとの統合による多次元化
上記、および研究代表者の開発したゲル中の微量金属イオン濃度を定量できる金属検出PAGEとを結合してPAGEを多次元化し、さらに実試料(血清および紅色非硫黄性細菌 *Rubrivivax gelatinosus*)に適用した。

4. 研究成果

(1) MICS-BN-PAGE, MICS-Urea-PAGEおよびMICS-Native-SDS-PAGEのそれぞれがモデルタンパク質である鉄結合型タンパク質であるトランスフェリン(Tf)に対して有効であることが分かった。すなわち、ホロTfは鉄

イオンを解離することなく泳動された。さらにホ口型とアポ型 Tf で異なる位置に泳動されることも分かった。

(2) Tf をモデル金属タンパク質として、そのホ口型 (Tf-Fe) とアポ型を、ホ口/アポ変換 2D-MICS-BN-PAGE およびホ口/アポ変換 2D-MICS-Urea-PAGE に適用した。ホ口/アポ変換 2D-MICS-Urea-PAGE の一例を図 1 に示す。ホ口/アポ変換をしない場合 (図 1 左) には Tf の 4 つの化学種 (アポ Tf, C ロープに鉄イオンを結合した Tf_C -Fe, N ロープに鉄イオンを結合した Tf_N -Fe および C と N ロープに二個の鉄イオンを結合した Tf -Fe₂) は対角線上に並んで泳動されるが、ホ口/アポ変換をした場合、ホ口型の Tf は対角線から外れ、それぞれ水平方向に並んだスポットとして泳動された (図 1 右)。このように金属タンパク質のホ口型を対角線から外して泳動することが出来た。また、MICS-BN-PAGE を用いたときにはモデル金属タンパク質として Tf 以外にも銅イオン結合型のセルロプラスミン (Cp) および亜鉛イオン結合型のスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を用いてホ口/アポ変換二次元法を行い、これらのホ口型とアポ型を対角線から外れたスポットとして分離検出できることがわかった。

一方、BN-PAGE と Urea-PAGE を用いたときで二次元泳動の分離挙動が異なることが分かった。例えば BN-PAGE では Tf のホ口型とアポ型の二つのスポットだけが検出されたが、上述したように Urea-PAGE では 4 つのスポットが観測された。これはこれら二つの手法での分離を支配するパラメーターが異なるためと考察した。すなわち、BN-PAGE では、色素 CBB-G250 の添加によってタンパク質に負電荷を付与して変性させるが、Urea-PAGE では無電荷の尿素でタンパク質を弱く変性させる。従って、BN-PAGE では CBB-G-250-タンパク質複合体の電荷および形状に依存して分離するのに対し、Urea-PAGE では尿素による変性に基づき分子形状の違いだけにに基づき分離する。よって、それぞれの金属タンパク質の特性によっても分離性能が変化すると考察した。

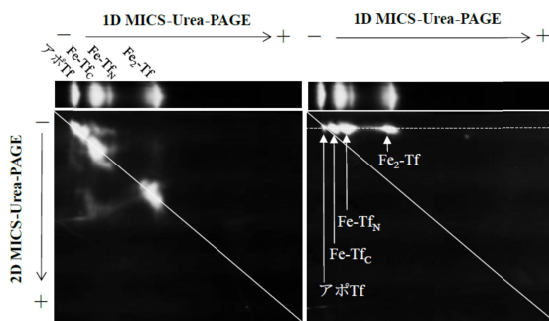


図 1 ホ口型およびアポ型トランスフェリン混合試料のホ口/アポ変換二次元 MICS-Urea-PAGE の典型的泳動図。右) ホ口/アポ変換なし。左) ホ口/アポ変換あり。

(3) ヒト血清試料および *R. gelatinosus* のペリプラズム空間試料をホ口/アポ変換 2D-MICS-BN-PAGE/金属検出 PAGE に適用した。その結果、ヒト血清試料では、Tf およびセルロプラスミン (Cp) が対角線から外れたスポットとして検出され、一次元目の MICS-BN-PAGE の Tf および Cp 分画から、それぞれ鉄イオンと銅イオンが検出された。このように実試料に対しても金属タンパク質を単離し、そのタンパク質に結合していた金属を同定できることを示した。また、対角線からは外れなかったものの、銅イオンと弱く結合するとされるアルブミン (Alb) から微量の銅イオンが検出された。よって、非常に弱く結合している金属イオンも本法で検出できることがわかった。

また、銅イオンを添加して培養した *R. gelatinosus* ペリプラズム空間試料に関しては、CopI タンパク質を対角線から外れたスポットとして検出した。*R. gelatinosus* は銅イオン過剰条件化で CopI タンパク質が発現することが分かっていたが、銅イオンと結合しているという直接的証拠はなかった。ホ口/アポ変換 MICS-BN-PAGE の結果に加え、この試料の一次元目の MICS-BN-PAGE の CopI 分画からは総銅イオンの 70% 以上が金属検出 PAGE によって検出されたことから (図 2), CopI タンパク質が銅イオン結合性タンパク質であり、*R. gelatinosus* のペリプラズム空間の銅イオン調節に強く関わっていることを世界で初めて発見した。

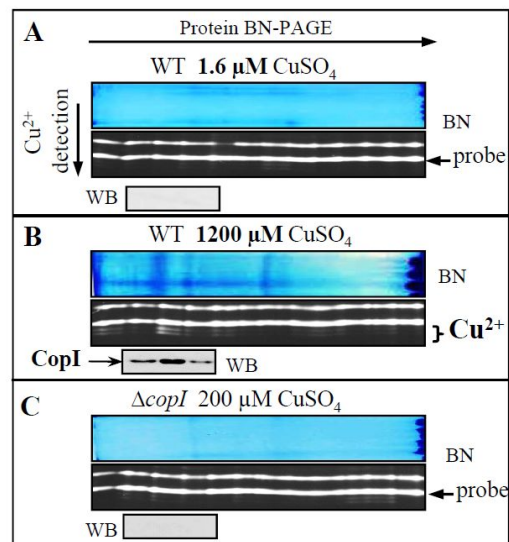


図 2 *R. gelatinosus* のペリプラズム空間試料の MICS-BN-PAGE/金属検出 PAGE. A. 1.6 μM 銅イオン存在下で培養した野生株. B. 1.2 mM 銅イオン存在下で培養した野生株. C. 1.6 μM 銅イオン存在下で培養した $\Delta copI$ 株.

以上のように金属タンパク質に特化した PAGE として、ホ口/アポ変換-2D-MICS-PAGE/金属検出 PAGE システムの開発に成功した。今後は、様々な試料に対して本手法を用いる

ことでこれまで知られていなかった金属タンパク質の発見に繋がると考える。また、金属を解離させることなく、かつホロ型とアポ型で泳動距離が大きく変化するような変性剤の開発を行い、本手法の高性能化を図る予定である。

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7件)

S. Saito, K. Hirose, M. Tsuchida, K. Wakui, K. Yoshimoto, Y. Nishiyama, M. Shibukawa, "Rapid Acquisition of High-Affinity DNA Aptamer Motifs Recognizing Microbial Cell Surfaces Using Polymer-Enhanced Capillary Transient Isotachopheresis," *Chem. Comm.*, **52**, 461-464 (2016). 査読有り.

A. Durand, A. Azzouzi, M. Bourbon, A. Steunou, S. Liotenberg, A. Maeshima, C. Astier, M. Argentini, S. Saito, S. Ouchane, "c-type Cytochrome Assembly is a Key Target of Copper Toxicity within the Bacterial Periplasm," *mBio*, **6**, e1007-15 (2015). 査読有り.

D. Goto, K. Ouchi, M. Shibukawa, S. Saito, "Affinity Capillary Electrophoresis for Selective Control of Electrophoretic Mobility of Sialic Acid Using Lanthanide-Hexadentate Macrocyclic Polyazacarboxylate Complexes," *Anal. Sci.*, **31**, 1143-1149 (2015). 査読有り.

K. Ouchi, C. L. Colyer, M. Sebaiy, J. Zhou, T. Maeda, H. Nakazumi, M. Shibukawa, S. Saito, "Molecular Design of Boronic Acid-Functionalized Squarylium Cyanine Dyes for Multiple Discriminant Analysis of Sialic Acid in Biological Samples: Selectivity Toward Monosaccharides Controlled by Different Alkyl Side Chain Lengths," *Anal. Chem.*, **87**, 1933-1940 (2015). 査読有り.

齋藤伸吾, "電気泳動法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分布測定法", *化学工業*, **66**, 21-27 (2015). 査読無し.

齋藤伸吾, "タンパク質結合型金属イオンのポリアクリルアミドゲル電気泳動によるマッピング", *電気泳動(Electrophoresis Letters)*, **58**, 24-26 (2014). 査読無し.

T. Haraga, S. Saito, Y. Sato, S. Asai, Y. Hanzawa, H. Hoshino, M. Shibukawa, K. Ishimori, K. Takahashi, "Application of Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection for Determination of Trace Neodymium in Spent Nuclear Fuel Using Complexation with an Emissive Macrocyclic Polyaminocarboxylate Probe," *Anal. Sci.*, **30**, 773-776 (2014). 査読有り.

[学会発表](計11件)

齋藤伸吾, 「発見を目指す電気泳動

分離分析」日本化学会北海道支部北見地区化学講演会(北見工業大学)2016年1月26日

S. Saito, "Polyacrylamide gel electrophoresis oriented toward the identification of metalloproteins," PACIFICHEM2015 (The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies) (Honolulu, USA) 2015年12月16日

植木晃宏, 齋藤伸吾, 前島明典, 渋川雅美, 「汚染金属イオンスウィーピングPAGE/銅イオン検出PAGEを用いる種々の銅結合性タンパク質の分析」第66回日本電気泳動学会総会, 東京工科大学(東京都, 八王子市)2015年9月5日

齋藤伸吾, 「電気泳動分離場で機能する蛍光プローブ」分離機能とセンシング機能の化学」セミナー2015, 東北大学片平キャンパス(宮城県, 仙台市)2015年3月7日

齋藤伸吾, 「タンパク質結合型金属イオンのポリアクリルアミドゲル電気泳動によるマッピング」第65回日本電気泳動学会総会「最新の電気泳動技術30の話題」, 横浜情報文化センター(神奈川県, 横浜市)2014年10月24日

S. Saito, "Selection of DNA Aptamer for Bacterial Cell using Polymer-enhanced Capillary Transient Isotachopheresis," 1st Asian Symposium on Analytical Sciences, 広島大学東広島キャンパス(広島県, 広島市)2014年9月17日

齋藤伸吾, 川島光喜, 渋川雅美, 「汚染金属イオンスウィーピングPAGE/金属検出PAGEによるヒト血清中銅イオン分布の解明」キャピラリー電気泳動シンポジウム(SCE2013), 日本女子大学(東京都, 文京区)2013年11月14日

前島明典, 齋藤伸吾, 川島光喜, 佐藤誠, 渋川雅美「汚染金属イオンスウィーピング法を用いる金属タンパク質のゲル電気泳動分離: 血清中アルブミン結合型銅イオンの定量」金属の関与する生体関連シンポジウム, The 23rd Symposium on Role of Metals in Biological Reactions, Biology and Medicine (SRM2013), 武蔵野大学(東京都, 江東区)2013年6月21日

H. Tsujimura, T. Haraga, K. Takahashi, M. Shibukawa, S. Saito, "Multiple Stacking Preparative Capillary Electrophoresis Using Transient Isotachopheresis," 39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2013) (Amsterdam, Netherland) 2013年6月17日

S. Saito, M. Kawashima, M. Sato, M. Shibukawa, "Protein-Copper Ion Mapping of Human Serum Using a Novel Metal Ion Contaminant Sweeping Technique and Fluorescent Metal Probe in

Polyaminocarboxylate Gel Electrophoresis,"
39th International Symposium on High
Performance Liquid Phase Separations and
Related Techniques (HPLC2013) (Amsterdam,
Netherlands), 2013年6月17日

前島明典, 齋藤伸吾, 渋川雅美「ホ
ロ/アポ変換2次元ポリアクリルアミドゲル
電気泳動法による金属タンパク質の分離」
第73回分析化学討論会, 北海道大学函館キ
ャンパス(北海道・函館市)2013年5月18
日

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: アプタマーの選抜方法
発明者: 齋藤伸吾, 廣瀬和生, 土田真帆, 渋
川雅美, 佐藤誠
権利者: 株式会社シノテスト, 埼玉大学
種類: 特許
番号: 特願 2015-51714
出願年月日: 2015年3月16日
国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.apc.saitama-u.ac.jp/bunseki/index.ht
ml](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: 60343018