

タンパク質-金属マッピング電気泳動法の開発

プロジェクト代表者：齋藤 伸吾（理工学研究科・准教授）

1 目的

メタローム（金属-タンパク質複合体）は、生命活動において非常に重要な役割をはたしている一方で、その機能が不明であることも多く、生体試料中に「どのタンパク質にどの金属イオンがどれくらいの量で存在するか」を網羅的に計測できる方法の開発が望まれている。本研究の目的は、上記課題をポリアクリルアミドゲル電気泳動法（PAGE）を用いる簡易な方法で確立することにある。そこで、当課題では、PAGE をプラットフォームとするメタロームの簡易な解析法を開発することを最終目標とし、a) 新規蛍光プローブの分子設計を行い、独自の金属検出用蛍光プローブを合成した。b) また、その蛍光プローブをPAGEに導入し、金属イオンの超高感度分離検出法の開発を行った。実際のPAGEによる分析操作は、タンパク質試料に対し金属蛍光プローブを添加し、金属-蛍光プローブ錯体を形成させ、それをPAGEで濃縮・分離検出するという非常に簡便なものとした。また、感度としては、ゲルスポット中に存在するタンパク質の染色による検出限界値から判断し、フェムトモルレベル以下の超高感度検出を目標とした。

2 蛍光プローブの分子設計

分離分析システムにおけるプローブの分子設計は以下を満たすものが必要である。

①金属イオンの多くはプローブの蛍光を消光する効果を有する。その消光は、常磁性金属イオンに対しては常磁性効果、重金属イオンに対しては重原子効果として知られ、この金属イオンに由来する消光を防ぐ設計が必要である。これまでの研究から、消光を防ぐには錯形成部位と発光部位を 8-10Å 以上離せ消光効果を防げることがわかった。

②分離行程において、プローブ錯体には分解方向（M-P → M + P）への強い推進力が働くため、不安定（解離反応活性）なプローブ錯体は泳動中に金属イオンとプローブに分解してしまう。よって、種々の金属イオンと速度論的に安定なプローブ錯体を形成できる配位部位を選ぶ必要がある。特に、速度論的に活性となりやすい閉殻金属イオン群に対しても、解離不活性な錯体を形成させることが必要である。

以上の分子設計指針に基づき、3種類の金属蛍光プローブ FTC-ABEDTA (L1)、FTC-ABDTPA (L2) および FTC-ABDOTA (L3) を新規合成し (Fig. 3)、これをPAGEに導入することとした。

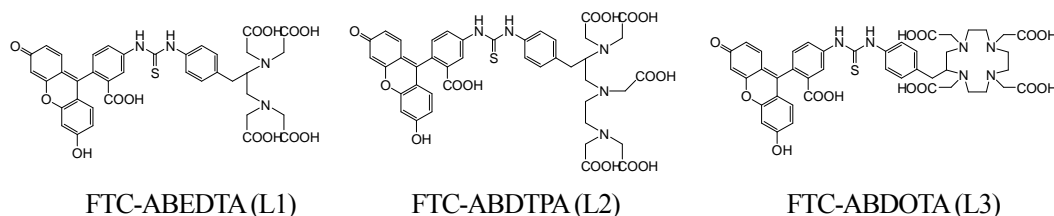


Figure 1. Chemical structures of fluorescent probes for PAGE.

発光部位としては、量子収率が高く、Ar レーザーの発振波長に適したフルオレセイン骨格 ($\phi \sim 0.8$, $\lambda_{ex} = 492 \text{ nm}$) を選択し、配位部位との間にスペーサーを導入した。配位部位としては、一般に安定な金属錯体を形成するとされている EDTA 骨格（非環状 6 座配位子）と、EDTA よりも金属との熱力学的安定性の高い DTPA（非環状 8 座配位子）および DOTA 骨格（大環状 8 座配位子）を選んだ。L1-L3 の

錯形成部位と発光部位は、共に負に帯電するため、電荷反発により両部位間の距離を十分にとるものと考えた。この距離は分子動力学計算によって見積もられ、おおよそ 10~12 Å であることが分かった。発光挙動に関して、L1-L3 錯体は、常磁性および重原子効果を抑制し、どの金属錯体プローブも発光することが分かり、分子設計通りの発光特性を得ることができた。

3 PAGE におけるプローブ錯体の濃縮および分離検出挙動

金属-蛍光プローブ錯体間の相互分離を達成するために、分離場としてのポリアクリルアミドゲル (PAG) の性能を評価する必要がある。タンパク質の PAGE では、濃縮ゲルと分離ゲルの二種類で構成された非連続緩衝溶液系が一般によく使用される。濃縮ゲルにおいては、等速電気泳動的にタンパク質をスタッキング濃縮する方法が用いられている。そこで、蛍光プローブ錯体を汎用のタンパク質分離用の非連続緩衝溶液系 PAGE に導入したが、濃縮、分離とも困難であった。そこで、従来の PAGE とは異なり、終末イオンとなるグリシンを分離ゲルに添加することで濃縮が可能であり、かつ非常に濃いゲル総濃度 (~40%) を用いることで金属間分離も可能であることが分かった。

蛍光プローブの設計の項で述べたように、プローブ錯体は分離ゲル中で錯解離 ($ML \rightarrow M + L$) を起こすと金属イオンを検出できなくなるため、解離不活性な錯形成部位が必要である。L1 (EDTA 骨格) 錯体を PAGE に導入した場合、プローブ錯体がゲル中で解離してしまった。従って、EDTA 骨格を有する L1 はゲル電気泳動用プローブには適さないことが分かった。一方、L2 および L3 に関しては、種々の金属において特有のバンドを観測した (Fig. 2 および 3)。L2 では、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} および Pb^{2+} で

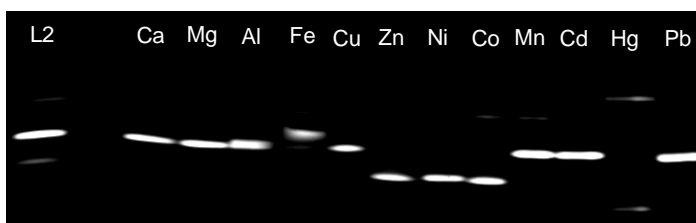


Figure 2. Separation of L2 complexes. Sample, $[M] = 5 \times 10^{-7}$ M, $[L2] = 1 \times 10^{-6}$ M. 20 mA (921~1540 V), 4.5 h.

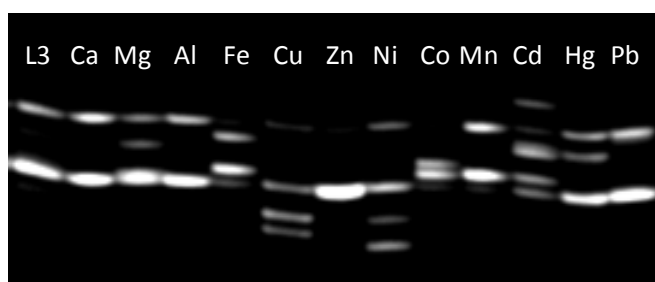


Figure 3. Separation of L3 complexes. $[M] = 5 \times 10^{-7}$ M, $[L3] = 1 \times 10^{-6}$ M. 30 mA (980-1248 V), 4 h.

プローブ錯体のバンドが観測された。特に Fe^{3+} および Hg^{2+} は電気移動度が同じ金属もなく、分離された固有のバンドとして検出された。L3 では、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} および Hg^{2+} に対し、発光バンドを検出し、さらに Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} および Cd^{2+} に関して完全分離が可能であった。これらの事実、L1 のような 6 座非環状型配位子よりも 8 座配位子が PAGE で金属イオンを検出する上で有用であることを示している。さらに、8 座大環状型のプローブ (L3) は 8 座非環状のもの (L2) と比べて分離能が高いことが分かった。その一方で、L3 に関しては、多くの金属錯体に対して 2 本のバンドが観測された。この原因は不明であるが、金属錯体の立体異性体が存在するためと考察している。L2 に関しては Fe^{3+} 、L3 に関しては Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} に対して検出限界を求めた。検出限界はブランクの 3σ とした。その結果、検量線は 10^{-9} - 10^{-7} M の濃度範囲で直線となり、検出限界は 6.6×10^{-10} - 1.6×10^{-9} M と超高感度であった。この検出感度は絶対感度にして 5.2~12.8 fmol であり、ゲルスポット中のタンパク質の一般的な検出限界 (1 ng = 数十 fmol) よりも高感度であり、ゲル中タンパク結合型金属イオンを検出できるポテンシャルを有することが分かった。今後は、より Ar レーザーイメージャーを用いることによる感度の改善、およびタンパク質や血清などの実試料への応用を行っていく予定である。