

プロジェクト名：電気泳動用金属蛍光プローブの開発とそのメタロームへの適用

プロジェクト代表者：齋藤 伸吾（理工学研究科・准教授）

1 研究の目的

金属イオンが生命活動に深く関与していることは論を待たないが、近年では、Metalomics（生体金属支援機能科学）が提唱され、金属イオンの動態を調査する方法の開発が望まれている。しかし、「どの微量金属イオンがどのタンパク質にどの程度の量で存在しているか」を計測する手法の開発については試行錯誤が続いている。

一方、我々は、電気泳動法をベースとした金属イオンの分離検出法の開発が Metalomics を発展させる上でキーになりうると考え、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（PAGE）をプラットフォームとする金属-タンパク質複合体（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て研究を進めている。本研究の目的は、金属-有機物複合体（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分析法を開発することである。特に、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（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。具体的には、PAGE に適合した新規金属イオン検出蛍光プローブを開発し、生体試料中金属イオンの一斉検出を可能な分析法を開発することを試みた。

2 新規蛍光プローブを用いる PAGE および CE における金属イオンの分離検出

先行研究では、金属蛍光プローブ FTC-ABDOTA (L1) および FTC-ABDTPA (L2) (Fig. 1) を PAGE に導入し、L1 については Fe, Cu, Ni, Co, Cd を、L2 については Fe を特異的に検出できることが分かっている。しかし、L2 については、Fe イオンのバンドが 2 本観測されてしまうため、そのバンドの同定を行った。Fe イオンと L2 を含む試料溶液に、酸化剤として過酸化水素および還元剤としてアスコルビン酸を添加した。その結果を Figure 1 に示す。Fig. 1 より、酸化還元剤を添加すると、観測されるバンドが一本となることがわかる。酸化剤および還元剤を添加した結果から、上部に検出されるバンドが Fe^{2+} -L2、下部に検出されるバンドが Fe^{3+} -L2 であることが明らかとなった。通常は、より負電荷の大きい錯体 (Fe^{2+} -L2) がより下方に泳動されると予想されるが、今回の結果は予想とは異なる。この泳動挙動に関しては調査中である。

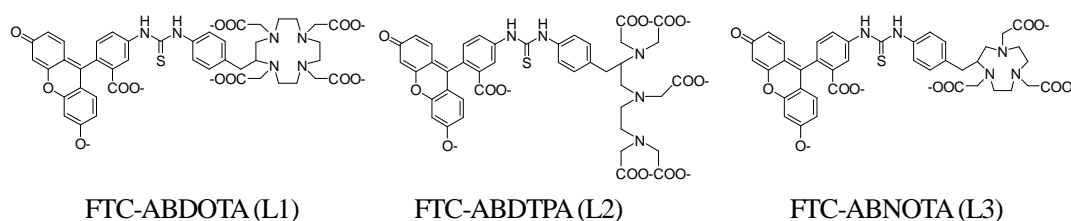


Figure 1. 金属蛍光プローブの化学構造

次に、新規配位子として、L3 を PAGE に導入した。先行研究において、L1（大環状八座配位子）と L2（非環状八座配位子）を PAGE に導入した場合、大環状型の方がより高分離能を示しており、PAGE 分離場が大環状型の錯形成構造の違いを認識していると考え、今回は大環状型六座配位子の L3 を導入した。その結果を Figure 3 に示す。 Cd^{2+} および Hg^{2+} が完全分離されることが分かった。しかし、L1 程の高分離は得られなかった。これは、L3 の錯蛍光構造が L1 ほどの配位形状のバリエーション

がないと考察した。従って、より多座であり、大環状のプロープがPAGE分離場では高分離を与えるものと考えた。

L1, L2 および L3 に関して、トランスイルミネーター（励起源：青色発光ダイオード，検出：CCD カメラ）を用いた場合とレーザー励起蛍光イメージャー（励起源：Ar レーザー，検出：フォトマルチプライヤー）を用いた場合での検出感度の違いを調査した。その結果を Table 1 に示す。レーザー励起蛍光イメージャーを用いた場合，一桁以上感度が向上することが分かった。しかし，安価なトランスイルミネーターを用いた場合でも，nM レベルの高感度検出が可能であることが分かった。このような簡便な手法でも ICP-AES 等の機器分析法よりも高感度な検出が可能であることは特筆すべきことである。

2 タンパク質バンド中金属イオンの検出

タンパク質をPAGEで分離し，電気的溶出法で溶出した後，タンパク結合型金属イオンを蛍光プロープ錯体に誘導体化し，off-lineでのタンパク質-金属イオンマッピングを作成できるかを調査した。検出にはL2を用い，Feイオンの検出を行った。ヒト血清を用いた場合の結果をFigure 4に示す。血清中メジャータンパク質であるトランスフェリン（Tf）中の Fe^{3+} を検出することに成功した。この結果より，今後はマイナータンパク中の金属イオンの検出およびFe以外のタンパク質-金属イオンマッピングを試みる予定である。

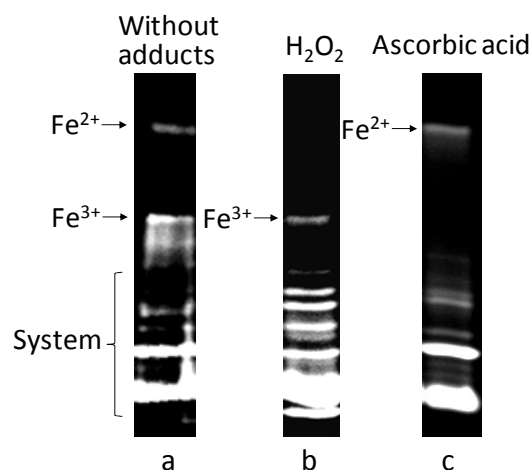


Figure 2. 酸化還元剤添加時の検出されるFeバンドの影響.
a) 酸化還元剤無添加. b) 過酸化水素添加. c) アスコルビン酸添加.

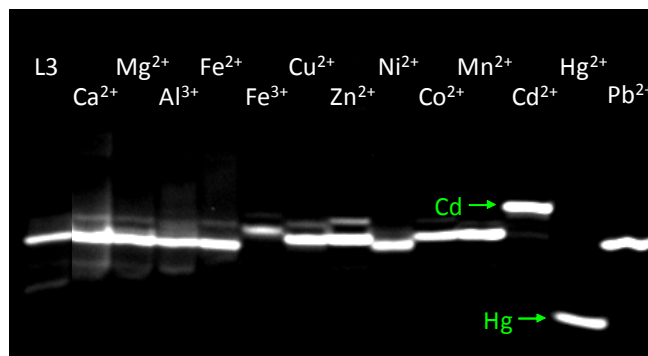


Figure 3. L1 錯体の典型的電気泳動図. ゲル組成：30 %T, 2.7 %C, pH 9.42, [Tris] = 93.8 mM, [gly] = 47.9 mM, pH 9.37. 試料(各 10 μL)：[L3] = 1.0×10^{-6} M, [Metal] = 1.0×10^{-6} M. 泳動時間 3 h.

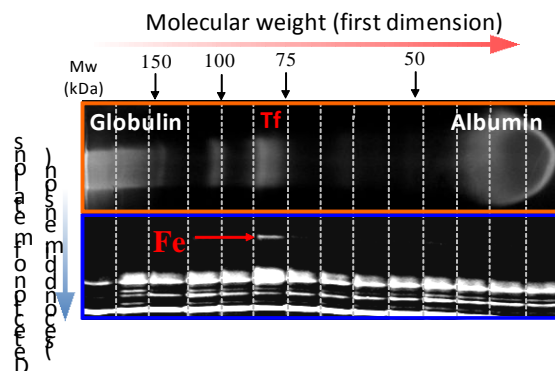


Figure 4. タンパク質-Fe の off-line マッピング.

Table 1 Detection limits of metal ions (M and (ppb)) with CCD camera with transilluminator and laser-excitation imager

	L3 (Transilluminator)	L2 (Transilluminator)	L1 (Transilluminator)	L1 (Laser-excitation)
Fe	—	1.8×10^{-8} (0.9)	3.3×10^{-9} (0.18)	1.9×10^{-10} (0.010)
Cu	—	—	2.6×10^{-9} (0.17)	7.8×10^{-11} (0.0051)
Ni	—	—	3.8×10^{-9} (0.22)	2.1×10^{-10} (0.012)
Co	—	—	3.2×10^{-9} (0.19)	1.2×10^{-10} (0.071)
Cd	5.5×10^{-9} (0.62)	—	7.4×10^{-9} (0.83)	2.2×10^{-10} (0.025)
Hg	2.1×10^{-8} (4.2)	—	—	—