

プロジェクト名：メタローム解析技術としての多次元 PAGE の開発と応用

プロジェクト代表者：齋藤伸吾（理工学研究科・准教授）

1 研究の背景・目的

メタロミクスは生体内微量元素（金属）が関与する生命現象を科学する新しい学問領域であり、生命機構や疾患原因の解明に重要な役割を果たすと考えられている。メタロミクスを実現するための様々な方法論が提案されているが、その中の有力な手段の一つにポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）で分離したタンパク質バンド中の金属イオンを検出する方法が、幾つかの研究チームから提案されている。この PAGE の「どのタンパク質バンド（スポット）にどの金属がどれだけ存在するか」を知る技術が確立されれば、それはメタロミクスに大きく貢献するものとなる。

申請者は、先行研究において、世界でも初めて PAGE をプラットフォームとした ppt レベルの超微量金属イオンの検出法を確立してきた。これは、独自に設計した蛍光プローブを用いて、PAGE での蛍光検出を実現したものであり、簡易・省エネルギー・汎用性を兼ね備えた新規技術である。本課題では、この新規金属イオン計測技術をタンパク質分離 PAGE に結合し、従来の PAGE に金属検出という新しい次元を加えた多次元 PAGE を確立することを目的とする。また、新規なスタッキング剤や変性剤を適用し、電気泳動分離場での解離反応速度を制御することにより、メタロタンパク質から金属イオンが解離（分解）しない、いわば「ソフトな電気泳動分離技術」の確立を行い、分析システムの全体設計を行う。

2 メタロタンパク質からの金属解離を制御した電気泳動分離

メタロタンパク質から金属イオンが解離する反応には、以下の幾つかの経路が考えられる。1) 自己解離反応（加溶媒解離反応）、2) 酸触媒解離反応、3) 塩基触媒解離反応および 4) 配位子交換反応の 4 つの経路である。一般に金属錯体の解離反応を考えた時、酸触媒解離反応は pH 10 以下の条件で、塩基触媒解離反応は pH 8 以上の条件で顕著になる。また、PAGE によるタンパク質の分離を考えた場合、泳動液の緩衝剤としてトリスやグリシンを用いるが、これらの分子は弱いながらも金属イオンとの錯形成能があるため、これらによる配位子交換反応の経路が存在する可能性がある。つまり、これら 2, 3 および 4 に関しては泳動条件により制御しうるパラメータである。一方、自己解離反応は攻撃分子等がない一次反応の経路であり、この反応速度を制御することは難しいが、PAGE で良く用いられる変性剤はタンパク質の立体構造を変化させるため、この経路に大きく影響を与えることが予想される。本研究ではどの経路が支配的であるか、また泳動条件の調整で解離反応速度を制御しうるかを調査した。

モデルタンパク質としては、Fe 結合タンパク質としてトランスフェリン (Tf) を、Cu 結合性タンパク質としてセルロプラスミン (Cp) およびスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を用いた。ヒト血清中では全 Fe および全 Cu の 95%以上が Tf および Cp と、血漿中では全 Cu の 90%以上が SOD タンパク質と結合しているとされている。泳動条件として、分子量分画を得るためによく用いられる SDS-PAGE、変性剤を添加しない Native-PAGE、変性剤として尿素を用いる Urea-PAGE、弱い変性剤として CBB G250 を用いる Blue-Native(BN)-PAGE を適用した。タンパク質バンド中の金属イオンの定量は、バンドからタンパク質を電氣的溶出し、その後、蛍光プローブを用いる金属検出 PAGE で定

量した。

SDS-PAGE を用いた場合、ホロ Tf から Fe を回収できなかったが、Urea-, Native-, BN-PAGE を用いた場合、70%以上の Fe を回収することができた。これは、SDS のような強力な変性剤の存在下ではメタロタンパク質から金属イオンが解離してしまうことを示している。一方、変性剤がない、または弱い場合は金属イオンを解離せずに泳動する可能性が高いことが分かった。従って、変性剤によって自己解離反応速度が大きく影響されることが分かった。中でも BN-PAGE はある程度の分子量分画を得られるので一次元目のタンパク質分離 PAGE として適している。一方、ホロ Cp やホロ SOD に対しては、BN-PAGE を用いた場合でも Cu の回収率は20%程度であった。そこで、分離ゲル中のトリスやグリシンの濃度を変化させ、配位子交換反応の影響を調査したが、Cu の回収率に変化はなかった。従って、トリスやグリシンによる配位子交換反応はほとんど起きていないことが明らかとなった。さらに、分離ゲルの pH を通常の pH 8.8 から pH 6.8~10.0 に変化させたところ、回収率は pH 9 から上昇し、pH 10.0 では 96~102.3%とほぼ定量的に回収できることが分かった (図1)。つまり、pH 6~9 では酸触媒解離反応の経路が支配的であり、pH 10 では酸触媒および塩基触媒解離反応の経路は存在しないことが分かった。

以上のように、泳動条件によって金属イオンの解離反応を制御できることが分かった。

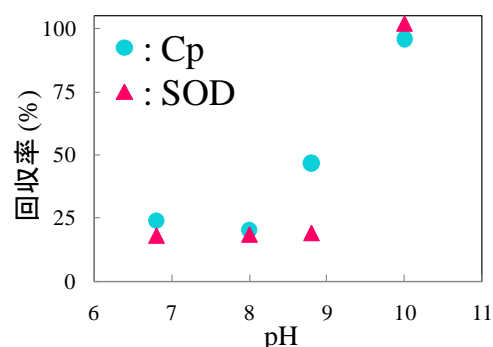


図1. Cu²⁺ 回収率における分離ゲル pH の影響

3 ヒト血清のオフライン2D-マッピング

ヒト標準血清を試料としてオフラインのタンパク質-金属イオン2DマップをFeおよびCuに対して作成した。方法は1次元目に pH 10 とした BN-PAGE を行い、その後、ホールゲルエリユーターを用いて 5 mm 間隔でタンパク質を電気的溶出した。その回収溶液に金属蛍光プローブを添加し、PAGE を用いて金属イオンを検出した。

図2に作成したマップを示す。ほとんどの Fe および Cu に関しては Tf および Cp 分画から検出された。これは、従来の報告と一致しており、本法がマッピングシステムとして機能していることを示している。一方で、Fe に関しては Tf 分画以外からも少量の Fe

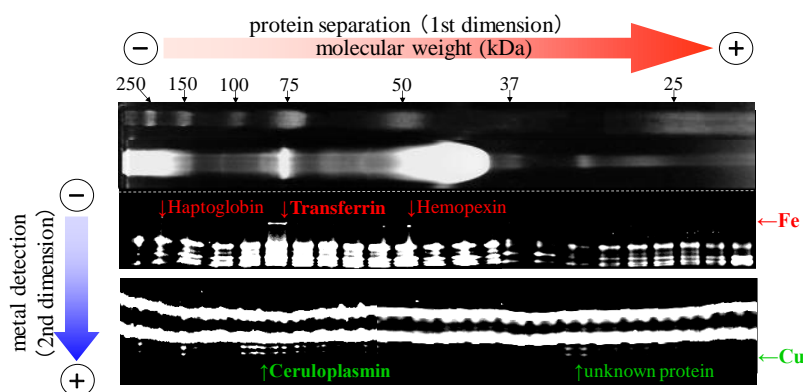


図2 ヒト血清のタンパク質-金属イオン2Dマップ

が検出された。これらは血清中に存在していると言われる Fe 結合性タンパク質であるハプトグロビン、ヘモペキシンであると考えられる。これらは検出した総 Fe 濃度の 5~10%に当たる。この結果は本法が金属イオンの分布を調査する分析法になり得ることを示している。さらに、Cu に関しては低分子量分画に微量の Cu が検出された。このタンパク質は同定には至っていないが、血清中での Cu の分布に関して新たな知見を与えるものである可能性がある。