

〈一般研究課題〉 安心できる生活環境をサポートするための食品中
異常タンパク質分離手法に関する研究
助成研究者 名古屋工業大学 北川 慎也



安心できる生活環境をサポートするための 食品中異常タンパク質分離手法に関する研究

北川 慎也
(名古屋工業大学)

Studies for the separation of aberrant proteins in foods to support reliable life

Shinya Kitagawa
(Nagoya Institute of Technology)

Basic studies for the separation of aberrant proteins in foods to support reliable life were performed. In the separation of proteins by the capillary electrochromatography with fluorescent detection, the derivatization of proteins by the reaction with thiol functional group was suitable compared with that with amino or carboxy functional group to produce the effective electrophoretic migration. The combination of chromatographic and electrophoretic separation was suitable to enhance the separation of proteins and peptides. To develop a new packing material for the protein separation, the property of gold nano particles (GNPs), which prepared by reduction of HAuCl_4 with trisodium citrate, fixed on the surface of silica gels was investigated. It was found that the surface of GNPs was covered with citric acid and was useful for cation exchange and hydrophilic interaction chromatography.

1. はじめに

我々の生活環境には様々な食品があふれている。安心できる生活を送るためにはこれらの食品の安全性が確実に保障されている必要があるが、現在流通している食品には、食品添加物、残留農薬など人体に有害となりうる物質が含まれているものも存在する。昨今話題となっている牛海綿状脳症(BSE)は、食品中の異常型プリオンタンパク質によるものとするプリオン原因説が有力視されている。安心できる生活環境を得るには、食品に含まれる異常型プリオンタンパク質を初めとしたタ

ンパク質の分析を通して、食品の安全性を高める必要がある。

肉・魚や野菜、及びこれらを原料としている食品には数千種類のタンパク質が含まれている。疾病と異常タンパク質の関係が判明している際には、ターゲットとなるタンパク質を種々の方法で検出すればよいが、疾病と異常タンパク質の関連性を調べる際には、タンパク質の分離手法が欠かすことができない。食品中の数千種類のタンパク質の中から、疾病の原因となりうるタンパク質を特定することは極めて重要であり、そのため、タンパク質の高性能な分離手法の開発が強く望まれている。

現在、最もよく使用されているタンパク質の分離手法は二次元ゲル電気泳動である。また、近年二次元高速液体クロマトグラフィーもタンパク質の分離手法として用いられている。タンパク質そのものではなく、タンパク質を分解して得られたペプチドを、クロマトグラフィーなどの方法を用いて分析し、タンパク質情報を得ることも行われている。いずれの方法においても、膨大な種類のタンパク質・ペプチドを分離するためには、一種類の分離機構ではなく、複数の分離機構が必要となる。本研究では、電気泳動とクロマトグラフィーという異なった機構による分離が同時に行われるキャピラリー電気クロマトグラフィー(CEC)をタンパク質分離に利用することを検討した。また、新たなタンパク質分析用の液体クロマトグラフィー充填剤として、金ナノ粒子固定充填剤のタンパク質分離への適用について基礎的検討を行った。

2. CECによる標準タンパク質分離の検討

微量な試料成分の分離・検出を行う際には、検出システムの高感度化が必要である。蛍光検出は、簡便に検出の高感度化を図ることが可能である手法であり、タンパク質の発現状態の差異を調べるディファレンシャル解析を簡便に行う際には、重要な手法となるであろう。そこで蛍光検出器を用いたCECでの、タンパク質分離について検討を行った。

2.1 電気クロマトグラフィーの溶出挙動

CECにおける電荷を帯びた試料の溶出時間 t_R は次式のように示される。

$$t_R = \frac{L}{v_{\text{pres}} + (\mu_{\text{osm}} + \mu_{\text{eph}})E} (k+1) \quad (1)$$

L , v_{pres} , μ_{osm} , μ_{eph} , E , k はそれぞれカラム長、圧力差流による流速、電気浸透流移動度、電気泳動移動度、電位勾配、保持比である。我々は見かけの電気泳動速度を v_{ae} と電気泳動移動度 μ_{ae} を式(2)のように定義した。電場 E 中では、電気泳動速度 v_{ae} は試料の電気泳動移動度 μ_{ae} と比例する。

$$v_{\text{ae}} = (\mu_{\text{osm}} + \mu_{\text{eph}})E = \mu_{\text{ae}}E \quad (2)$$

移動相組成のグラジエントを用いるとき、移動相組成 M は時間とカラム軸方向の位置の両方の関数 $M(t, x)$ となる。 $M(t, x)$ は理想的には次式で与えられる。

$$M(t, x) = M\left(t - \frac{x}{v_{\text{pres}}}, 0\right) \equiv M_{x0}\left(t - \frac{x}{v_{\text{pres}}}\right) \quad (3)$$

M_{x_0} はカラムの入口における移動相組成であり、時間 t にのみ依存する。試料成分の保持比と電気泳動移動度はともに移動相の組成(性質)に依存するので、それらは移動相組成 M の関数となる。従って、 k と μ_{ac} は、時間とカラム軸方向の位置の関数である。移動相の導電率が移動相組成に依存するとき、電位勾配 E は x と t の両者の関数 $E(t, x)$ となる。さらに、我々の CEC システムはスプリットシステムを用いているので、移動相のグラジエントを用いるとき圧力差流の速度は変化する^[1]。よって、移動相組成と印加電圧の両方が変化する場合、固定相への保持と移動相中の電気泳動の両者の影響を考慮した試料成分のカラム軸方向の泳動速度 $v(t, x)$ は、次式で与えられる。

$$v(t, x) = \frac{v_{pres}(t) + \mu(t, x)E(t, x)}{k(t, x) + 1} \quad (4)$$

式(4)はCECでは、試料成分の溶出挙動が様々な要因、及びそれらの組み合わせに依存していることを示している。

2.2 実験

Figure 1 に今回の実験で使用したキャピラリー電気クロマトグラフィーの装置の概略図を示す。この装置は2台のポンプ(LC-10AD, Shimadzu, Kyoto)、移動相グラジエント用のコントローラー(SCL-10A, Shimadzu)、ミキサー(P/N228-35830-91, Shimadzu)、研究室で調整した2つのスプリッタ、2つのレジスタンスチューブ(フューズドシリカキャピラリー, 内径 0.05 mm, 500 mm, GL Science, Tokyo)、蛍光検出器(FP2020 puls, Jasco, Tokyo)、インジェクター(model 7520, Rheodyne, CA)、高圧電源装置(HVA 4321, NF, Yokohama)、ODS充填剤(dp.5 μ m, Develosil ODS-5, Nomura Chemical, Aichi)を充填した自作のキャピラリーカラム(内径 0.15 mm)からなる。スプリッタAとBはそれぞれ、(A)移動相の変化が分離カラムに到達するまでの時間の遅れの低減、(B)試料注入量の削減(スプリットインジェクション法)のために用いた。高圧電源装置はD/A変換器(PCI-3176, Interface, Hiroshima)でコントロールされ、蛍光シグナルは10HzのA/D変換器を用いてPCに取り込んだ。安全な操作のため分離カラムの入口側を接地し、高電圧は分離カラムの出口側に印加した。

移動相として水(緩衝溶液もしくは酸添加)とアセトニトリルの混合溶液を用い、その混合比を変化させるグラジエント溶離を行った。

2.3 結果と考察

タンパク質の中には、オワンクラゲがもつ緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescent Protein, GFP)のように強い蛍光を持つものもあるが、通常のタンパク質は蛍光物質ではない。従って、タンパク質の蛍光検出を行う際には、蛍光性を有する官能基をタンパク質に導入(誘導体化)する必要がある。まず、タンパク質やペプチド、アミノ酸の蛍光誘導体化試薬としてよく用いられる、4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン(NBD-Cl)を用い、6種類のタンパク質(リゾチーム、トリプシンインヒビター、カルボニックアンヒドラーゼ、オブアルブミン、ウシ血清アルブミン、フォスフォリターゼb)の誘導体化を行った。NBD-Clはアミノ基と結合する。従って、NBD-Clで

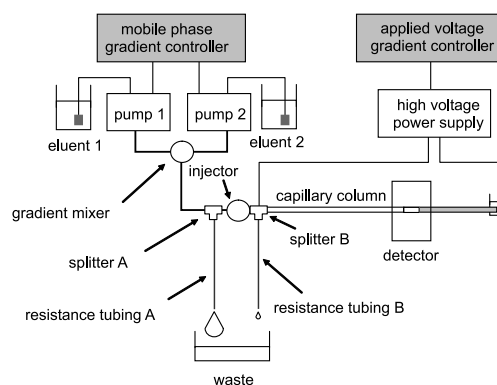


図1 装置の概略図

誘導体化されたタンパク質は、主としてカルボキシ基の解離により負電荷を有することになる。一般的にODSカラムを用いたタンパク質の逆相分離においては、酸性の移動相が利用される。しかしながら、酸性条件下ではカルボキシ基の解離が抑制され、試料は十分な電気泳動移動度を得ることが困難である。実際に、酸性条件下（0.01% トリフルオロ酢酸を含む水/アセトニトリル混合移動相）では、正負どちらの電圧を印加しても、電気泳動効果を観測することができなかった。カルボキシ基の解離が起こる中性条件下（酢酸緩衝溶液 [pH 6.0]）で分離を行ったところ、電場下におけるタンパク質試料の電気泳動を確認することができたが、分離性能が著しく低下することがわかった。すなわち、NBD-ClはCECのための誘導体化試薬としては、適切ではないことが確認された。

蛍光誘導体化試薬としては、アミノ基と反応する試薬の他に、タンパク質に必ず含まれるカルボキシ基と反応するタイプの試薬も存在する。しかしながら、カルボキシ基と誘導体化試薬を反応させると、タンパク質試料に負電荷を持たせることが困難になる。電気泳動挙動を通してCEC分離をコントロールする場合、正負両方の電荷を与えることが可能である状態が、自由度が高く望ましい。そこで、アミノ基・カルボキシ基ではなく、タンパク質内のシステインに由来するチオール基に結合する、4-フルオロスルファモイルベンゾフラザン(ABD-F)による誘導体化を行った。

ABD-Fで誘導体化を行ったウシ血清アルブミンを用いて、CEC分離における電圧印加の効果を検討した。CECにおける試料の溶出時間と、電圧印加の関係は式(1)を変形すると、式(5)で与えられる。グラジエント分離を行っているため、 μ_{osm} , μ_{eph} , k を定数とみなすことはできないが、原則として溶出時間の逆数($1/t_R$)と印加電圧が比例することになる。

$$\frac{1}{t_R} = \frac{\mu_{osm} + \mu_{eph}}{L(k+1)} E + \frac{v_{pres}}{L(k+1)} \quad (5)$$

Figure 2にABD-F誘導体化ウシ血清アルブミン (BSA)、および、参照として低分子蛍光試薬である硫酸キニーネ (quinine) の、それぞれの溶出時間の逆数と、印加電圧の関係を示した。出口側に正の電圧を印加した際には、BSA、quinineともにほぼ直線的に $1/t_R$ が減少している（溶出時間が遅くなっている）。これに対して、負の電圧を印加した際には、quinineの $1/t_R$ は上昇している（溶出時間が早くなっている）が、BSAに関してはほぼ一定である。これは、BSAでは負の電圧を印加した際には、電気泳動効果が得られていないことを示している。グラジエント分離においては、カラム出口に近い部位の方が、試料の保持が大きくなる。従って、カラム出口へ向かって試料の電気泳動を行うと、保持の増大より試料ゾーンの移動速度が低下する。そのため、出口方向へと電気泳動を行う負電圧印加時には、溶出時間の短縮（ $1/t_R$ の増大）が抑制されていると考えられる。この現象が、BSAでより顕著に観測されるのは、逆相系カラムに対するタンパク質の保持挙動が、沈殿一再溶解モ

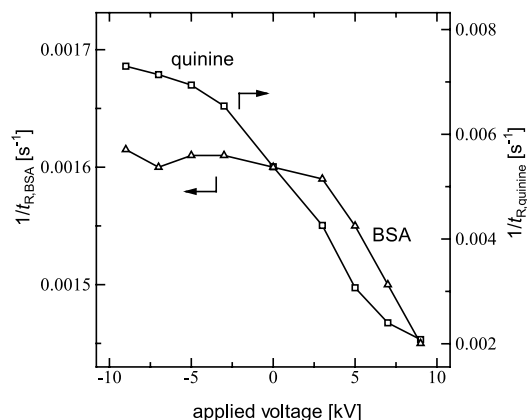


図2 印加電圧による溶出時間の変化

デルと呼ばれる、特定の有機溶媒濃度以上で固定相から初めて脱離する挙動を示すためであると思われる。すなわち、タンパク質は低有機溶媒濃度領域（カラム出口方向）に電気泳動により運ばれ、そこで固定相へ強固に吸着され、試料の泳動自体が行われなくなったと考えられる。

Figure 3にABD-Fで誘導体化を行った α -キモトリプシン及びその分解物のCECでの分離を示した。 α -キモトリプシンは分子量約25 kDaのタンパク質である。分解物の分子量を、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法（MALDI-TOF-MS）で調べたところ1.5～13 kDaであることがわかった。Figure 3に示されているように、 α -キモトリプシン及びその分解物の分離においては、印加電圧に正負に依存して、溶出時間の増大、減少が起きている。これは、分解物の多くはペプチド（分子量10 kDa以下）であるため、沈殿-再溶解モデルが適応されないためであると思われる。しかしながら、分子量10 kDa以上の分解物や分子量約25 kDaの α -キモトリプシン自体も印加電圧の正負に対応して、溶出時間が変動している。これは、Figure 2で示したBSAとは異なった挙動である。このことから、CECによるタンパク質分離においては、電気泳動効果が得られやすい種類のタンパク質と、得られにくい種類のタンパク質があることが明らかとなった。これは非常に興味深い現象であり、タンパク質構造となんらかの関係があることが予想される。タンパク質の種類・構造と電気泳動効果の関連については更なる検討が必要である。

また、電圧印加により溶出時間が変化しているだけではなく、Figure 3の0 kVと-7 kVを比較すると、-7 kVの印加を行った方が明らかにピークの数が増えている。これは、クロマトグラフィーだけでは分離することができなかった成分（保持が同一）に対して、電気泳動分離を加えることで、分離性能の向上を得ることが可能であることを示している。-7 kVの電圧印加では電気泳動効果による分離の改善が見られるが、+7 kVの電圧を印加すると逆に分離が阻害されてしまうことも明らかである。適切な電圧を印加し複合型の分離を行うことで、タンパク質分離においても液体クロマトグラフィーよりも高い分離性能を得られることを明らかにすることができた。

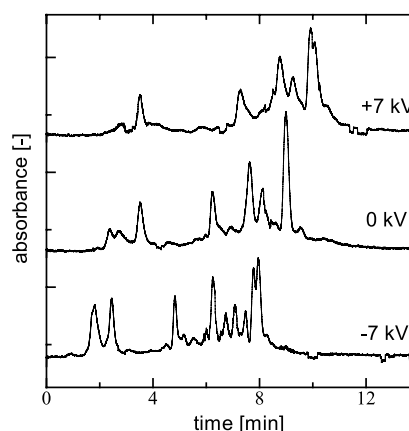


図3 CECによる α -キモトリプシン及びその分解物の分離

3. 金ナノ粒子固定充填剤のタンパク質分離への適用に関する基礎検討

金ナノ粒子(GNPs)は、金原子が数個から数千個程度集まって形成した、粒径が数nm～数十nmの粒子であり、その光学的、電子的特性が、分子や結晶にはない特徴的な性質を示すことから、様々な分野で利用されている物質である。我々は、金ナノ粒子の大きさがタンパク質とほぼ同じ大きさであることに着目し、金ナノ粒子の大きさとシリカゲル表面への導入密度をコントロールすることで、タンパク質とシリカゲル表面（もしくはシリカゲル表面に修飾された化学種）の接触を物理的にコントロールし、特異的なタンパク質認識能を有する充填剤の開発を目指している。表面に固定された金ナノ粒子の性質が、分離に大きな影響を与えるため、本研究では、未修飾金ナノ粒子の表面状態およびその分離場としての特性について基礎検討を行った。

3.1 実験

金ナノ粒子は、クエン酸三ナトリウムによる塩化白金酸の還元により調製した。3 mM 塩化白金酸水溶液 80 ml (A液)と、還元剤溶液である 8 mMクエン酸三ナトリウム水溶液 20 ml (B液)を調製した。A液、B液を共に 80℃まで加熱した後、A溶液にBの還元剤溶液をすばやく攪拌しながら加えた。次にこの溶液を加熱沸騰させ、15分間沸騰を保った。塩化白金酸の還元が進行するにつれ、ゆっくりと溶液の色が薄い黄色から赤色へと変化することを確認し、その後、室温まで放冷した。この方法で粒径約 20 nmのGNPsの調製を行った^[2]。

シリカゲル表面にGNPsを固定するために、GNPsと結合を行うチオール基を含んだシラン化剤を用いて、シリカゲルを修飾した。クロマトグラフィー用シリカゲル粒子 (dp.5 μ m, Develosil)をトルエンで洗浄した後、20%(v/v)の3-(メルカプトプロピル)-トリメトキシシラン (MPTMS)溶液に加え、15時間、60℃に保ちながら攪拌し、MPTMS修飾を行った。反応終了後、粒子表面上に残存している未反応のMPTMSを取り除くために、トルエン、エタノールの順に洗浄を行い、その後粒子を乾燥させた。

乾燥させたMPTMS修飾シリカゲルをGNPs溶液と混合して反応させ、シリカゲル表面にGNPsを固定した。調製した充填剤は、溶融シリカキャピラリー (i.d. 0.15 mm, GL Science, Tokyo, Japan)ヘスラリー充填し分離カラムを作成し、Figure 1に示した装置と類似のキャピラリー液体クロマトグラフで評価を行った。

3.2 結果と考察

クエン酸による還元で調整したGNPsの表面は、GNPs周りをクエン酸イオンが取り囲み、GNPs同士はクエン酸イオンの負電荷による静電反発によって分散安定性を保っている。充填剤表面のGNP周りにクエン酸イオンが存在するならば、正電荷を持つ試料との静電的相互作用が起こればと考えられる。試料として、塩化ベンジルトリメチルアンモニウム(BTMA)を用い、10 mMリン酸緩衝溶液(pH 6.2)で分離を行ったところ、BTMAは保持された。すなわち、調整した充填剤とBTMAの間に相互作用があることが確認された。相互作用が静電的相互作用であること確認するために、移動相中にNaClを添加し、その塩濃度が分離に与える影響を調べた。移動相中の塩濃度に対する塩化ベンジルトリメチルアンモニウムの保持比の関係をFigure 4に示した。移動相中の塩濃度を上げていくにつれ、塩化ベンジルトリメチルアンモニウムの保持が小さくなっていることから、分離モードがイオン交換であり、保持が静電的相互作用に由来していることが確認できた。

次に、このイオン交換能がクエン酸由来のものであるかどうかを確認するために、移動相中のpHを変化させて動揺の実験を行った。移動相のpHを下げていくにつれ、塩化ベンジルトリメチルアンモニウムの保持が小さくなった。移動相のpHを下げることにより、充填剤表面のGNPs表面のクエン酸の解離が抑えられるため、試料との静電的相互作用が小さくなったものだと考えられる。充填剤の調整過程および分離条件中には、クエン酸以外にカルボキシ基を有する物質は存在しないため、充填剤表面のGNPs表面にはクエン酸が存在していると考えられる。

これまでの陽イオン性化合物の分離結果から、充填剤表面のGNPs周りにはクエン酸が存在し、それを陽イオン交換性の官能基として利用できることが確認された。この表面状態を、他の分離モードである親水性相互作用クロマトグラフィーとしての利用を試みた。親水性相互作用クロマ

トグラフィーは、近年注目を浴びている分離モードであり、有機溶媒を多く含む有機溶媒/水の移動相と極性固定相を用い、試料は極性官能基との親水性相互作用によって保持される^[3]。

クエン酸の解離を抑えるため0.1% トリフルオロ酢酸を加えたアセトニトリルを移動相として用い、塩基性アミノ酸であるヒスチジンの分離を行ったところ、ヒスチジンには保持が見られた。この保持は、GNPs表面のクエン酸のカルボキシ基とヒスチジンの窒素との水素結合に由来すると考えられる。移動相中に水を加えていくに連れ（アセトニトリル濃度を100%から95%、90%と下げていく）につれヒスチジンの保持が小さくなった。固定相と試料との水素結合が水によって阻害され、保持が小さくなったためであると考えられる。この結果から、金ナノ粒子表面が親水性相互作用の分離場としても用いることが可能であることが確認できた。

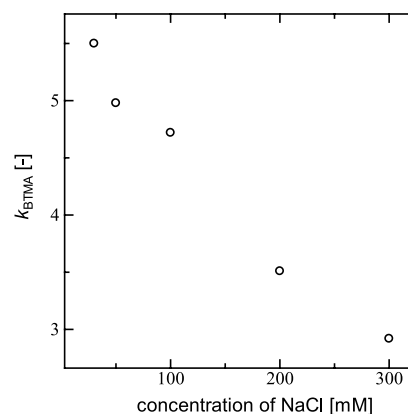


図4 塩濃度と保持の関係

4. まとめ

タンパク質分離の高性能化のため、キャピラリー電気クロマトグラフィーの利用、および金ナノ粒子を固定した新規充填剤の開発について検討を行った。CECにおいてタンパク質の蛍光検出を行う際には、電気泳動を阻害しないために、アミノ基やカルボキシ基ではなくチオール基と反応する誘導体化試薬が有効であった。タンパク質の種類により電気泳動効果に大きな差があることが明らかになり、これはタンパク質構造と関連があると思われ、今後更なる検討を行うことで新たな知見が得られる可能性がある。また、タンパク質・ペプチド分離においても、クロマトグラフィー分離と電気泳動分離の融合が有効であることが確認された。クエン酸還元で調整した金ナノ粒子は、イオン交換と親水性相互作用の二つの分離性能を有していることがわかった。充填剤表面にこれらの保持モードとは異なった分離場を導入し、金ナノ粒子との相互作用および立体障害を利用した、新規タンパク質分析用充填材開発のために必要な知見を得ることができた。

参考文献

- [1] Nakashima, R.; Kitagawa, S.; Yoshida, T.; Tsuda, T., *J. Chromatogr. A*, 2004, 1044, 305-309.
- [2] Tsutsui, G., *J. Appl. Phys.*, 2001, 40, 346-349.
- [3] Lindner, H.; Sarg, B.; Meraner, C.; Helliger, W., *J. Chromatogr. A*, 1996, 743, 137-144.