

**立教大学学術推進特別重点資金（立教 S F R）**  
**大学院生研究**  
**2008年度研究成果報告書**

<b>研究科名</b>	立教大学大学院博士課程前記課程	理学研究科	化学専攻
<b>指導教員</b>	所属・職名	氏名	
	理学部・准教授	田 淵 眞 理 印	
<b>自然・人文の別</b>	自然 ・ 人文	<b>個人・共同の別</b>	個人 ・ 共同 1 名
<b>研究課題名</b>	バイオナノ構造体を用いたリポタンパク質分離機構の構造相関解析		
<b>研究代表者</b>	在籍研究科・専攻・学年	氏名	
	理学研究科 化学専攻 2年	加藤 武 伺 印	
<b>研究組織</b>	在籍研究科・専攻・学年	氏名	
	理学研究科・化学専攻・1年	佐川奈緒美	
<b>研究期間</b>	2008	年度	
<b>研究経費</b>	50	千円	

**研究の概要** (200~300字で記入、図・グラフ等は使用しないこと。)

近年メタボリックシンドロームが大きく取り上げられている中で、リポタンパク質はその医学的診断において重要な基準となるタンパク質であり、予防や新たな疾病との相関を解析するために効率的かつ高精度な分離分析技術が求められている。代表的な分離手法の一つとしては電気泳動法が広く用いられているが、効率性や精度の点で問題点がある。そこで代表者らは、今日生体試料分析の分野で注目を集めてきているマイクロチップ電気泳動法と三次元網目構造を有するバイオナノ構造体であるバクテリアセルロース(BC)とを組み合わせた新しい分離手法を開発してきた。しかし、その分離メカニズムの解明には至っていない。よって、本研究ではリポタンパク質分離機構の分離メカニズムの解明をタンパク質のサイズと電荷の側面から検討した。

**キーワード** (研究内容をよく表しているものを3項目以内で記入。)

[ リポタンパク質 ] [ マイクロチップ電気泳動法 ] [ バイオナノ構造体 ]

**研究成果の概要** (図・グラフ等は使用しないこと。)

本系の分離ファクターとしては BC による篩い分け効果とタンパク質の持つ表面電荷効果の双方が考えられる。そこで本研究ではこれら分離ファクターの検証として、一般に標準タンパク質として使用されている、Bovine serum albumin (BSA)、apoferritin、thyroglobulin (Tg)、Insulin を対象として用い、分離系の検討を行った。さらに通常タンパク質を分離する手法である変性処理を施した系での分離を行うことで、系の分離ファクターの検証を行った。

BSA、apoferritin、Tg、Insulin の泳動中の慣性半径は文献値に依るとそれぞれ 7.9、12.2、17 nm であり (Insulin のサイズに関しては文献値が見受けられなかった)、これまでのリポタンパク質の電気泳動の結果から分離時間はサイズの小さな順に早くなると予想できる。これまでリポタンパク質の分離においては変性処理を行っていないため、まず同様の未変性の系で行った。この系では濃度の検討として、従来のリポタンパク質の分離濃度である 0.1-1 $\mu$ g/mL での分離を試みたが、ピーク本数や検出時間のばらつきが見られた。そこで流路内の蛍光顕微鏡観察を行ったところ、タンパク質の凝集体が観察できた。このことから、原因はタンパク質の凝集効果により粒子の分散が阻害されることによると考えられる。そこで、およそ 1 ng/mL 程度に希釈したところ、再現性の向上がみられ、ピーク本数のばらつきが減少した。これは凝集効果の緩和に起因すると考えられ、本系において未変性の標準タンパク質を約 0.1-1ng/mL で比較的安定に分離でき、リポタンパク質と同様にサイズの順に分離できることがわかった。各タンパク質のピーク検出時間は、およそ 80、93、115、98 s 附近であった (BSA、apoferritin、Tg、Insulin の順)。

ここで未変性のサイズに関しては atomic force microscopy (AFM) による粒子サイズの決定を行った。粒子サイズの評価は付属の解析ソフトを用い、取得画像の輝度分布により得られた最高頻度の値を粒子サイズとして採用した。これはタンパク質粒子を球体と仮定し、z 軸方向の高さを粒子直径としたことによる。その結果、標準タンパク質の粒子サイズをそれぞれ 7.9 $\pm$ 1.6 (BSA)、12.2 $\pm$ 2.6 (apoferritin)、17.3 $\pm$ 5.4 (Tg)、5.7 $\pm$ 2.4 nm (insulin) と決定した。リポタンパク質である、High density lipoprotein (HDL)、Low density lipoprotein (LDL)、Very low density lipoprotein (VLDL) に関しても同様にサイズを決定し、20.1 $\pm$ 5.4、26.2 $\pm$ 4.0、35.3 $\pm$ 6.3 nm を得た。

以上の結果、粒子サイズとピーク保持時間との相関について直線関係が得られ、標準タンパク質、リポタンパク質それぞれについて、サイズの順に分離されるという結果が得られた。これにより、本実験系ではリポタンパク質以外の標準的なタンパク質を変性処理することなくサイズ分離を達成することが可能であると示された。しかし、本実験からは分離ファクターの検証に至っていない。そこで、さらにタンパク質表面電荷の観点から検討を行った。

タンパク質表面電荷の指標としては等電点 (isoelectric point (IP)) が挙げられる。ここで本実験における標準タンパク質の一般的な IP 値を挙げると、IP=4.7-4.9 (BSA)、4.0-5.0 (apoferritin)、4.85 (Tg)、5.3-5.7 (Insulin) であり (泳動バッファー pH=6.98)、先に実験を行った電気泳動の移動時間に関して相関をプロットしたところ、移動時間に対してプロットのばらつきが大きく、相関を示さなかった。このことから、表面電荷の違いが分離ファクターとしては大きく寄与していないのではないかと推察された。

またさらに、確実な分離ファクターを決定するために、標準タンパク質に変性処理を施すことで、未変性の系と比較し電荷の寄与が無い場合、すなわち分子篩い分け効果だけでの分離を行いサイズ分離が可能であるか否かを検討した。従来の変性処理を施した系での分離は、一般に SDS ポリアクリルアミド電気泳動法 (SDS-PAGE) と呼ばれており、タンパク質分離に際して広く用いられている。ここではまず、タンパク質はその立体構造を構成するために、ジスルフィド結合 (S-S 結合) を有しており、一般に S-S 結合を  $\beta$ -メルカプトエタノールにより切断し構造を変性させる処理を行う。

**研究成果の概要 つづき**

このように、タンパク質の立体構造を切断した後、さらに Sodium dodecyl sulfate (SDS) をタンパク質表面へ吸着させることで、タンパク質の種類に依らず表面電荷をほぼ負電荷に均一化することができ、分子サイズのみが分離へ寄与ようになる。

そこで、変性処理を行った先の 4 種類のタンパク質に関して、未変性と同様に電気泳動を行い、それぞれ 100、105、108、97 s 付近 (BSA、apoferritin、Tg、Insulin の順) でのピークを検出した。また、分子サイズについても AFM による画像の解析から  $7.9 \pm 2.5$ 、 $12.2 \pm 5.7$ 、 $17.3 \pm 6.4$ 、 $5.7 \pm 3.0$  nm と決定した。これらのデータを元に、移動時間と分子サイズの相関を見たところ、未変性と同様にほぼ直線的な相関となった。これにより、タンパク質表面電荷の効果が無い状態において確実にサイズ分離が達成されることがわかり、サイズ篩い分け効果が分離ファクターの 1 つとして検証できた。

ここで、先に求めた未変性の標準タンパク質、リポタンパク質それぞれの系での移動時間と分子サイズ相関を比べると、いずれも個々の場合では直線的な関係をとっていたが、それぞれの直線は傾きの異なる関係となっていた。

このことは、分子サイズ以外のファクターが寄与していることを示唆しており、先に述べた表面電荷の効果の寄与が少ないと仮定する場合に、分子の形状が寄与していると考えられる。実際の形状は、AFM により取得した画像によるとリポタンパク質がほぼ球形をしているのに対して、標準タンパク質は楕円体の形状をしていた。これは一般的な知見と一致する。そこで、先に球体として z 軸方向を直径として決定した分子サイズを、x、y、z 軸方向それぞれで求め、さらに全体を楕円体として円近似を行い再度比較したところ、各直線は同一方向へと近づいた。これにより分離ファクターとして、分子の形状も寄与していることが考えられ、この点については更なる検討が必要であると考えている。