

# タンパク質局所濃度の絶対定量を可能とする 可塑性タンパク質固定化基材の開発

## Development of Plasticized Protein Immobilization Substrates for Absolute Quantification of Local Protein Concentration

同志社大学生命医科学部医情報学科 助教 中村 祐士

Department of Biomedical Information, Faculty of Life and Medical Sciences,  
Doshisha University, Yushi Nakamura

### 要旨

本研究では、タンパク質局所濃度の絶対定量を可能とするための可塑性タンパク質固定化基材の合成について検討した。様々な検討の結果、基材のベースとなるアガロース分子中のヒドロキシ基をメタンスルホニルクロリドを用いてメシル化し、タンパク質固定化ユニットとなる 2-(2-ピリジニルジチオ)エチルアミンと反応させることで、目標を上回る担持量において固定化基材の合成に成功した。また、合成した基材から調製したゲルは、均質性および透明度が修飾前のアガロース同様に高く、タンパク質局所濃度の絶対定量への利用可能性が示された。

### 1. はじめに

一般的な組織中のタンパク質の解析方法として、生化学的手法と組織学的手法が挙げられる。前者は、摘出した組織をホモジナイズ（均一化）した後に、対象のタンパク質を解析する。この利点の一つとして、既知の精製タンパクを用いた検量線を用いることで絶対定量が可能な点が挙げられる。ただしこの手法では、採取した組織全体の平均濃度は求められるが、任意の組織・細胞領域における局所濃度を求めることは不可能である。一方、後者では組織構造を保持したままの標本作製し、染色を行う。そのため、タンパク質の局在やその相対的な濃度差は解析できるものの、局所的な絶対濃度を求めることはできない。したがって現状では、例えば脳神経細胞におけるあるタンパク質について、細胞体、樹状突起、軸索、シナプスといった局所における正確な存在濃度を調べることは困難である。一方で、生体を構成する因子の生理機能およびその病態形成機構の解明には、本来その因子の組織細胞中の局所濃度の決定が必要不可欠である。

これに対し、我々は免疫組織染色法に検量線となるブロックを導入することにより、組織局所について任意のタンパク質の絶対定量を可能とする解析手法を提案した (Fig. 1)。すなわち、あらかじめ任意の濃度の抗原タンパク質を固定化し、対象組織とともに切片化できる検量線ブロックを開発する。これを解析対象となる組織とともにパラフィン包埋切片を作成する。これを免疫染色し、蛍光顕微鏡下等で撮像、染色の輝度を数値化する。ブロックの輝度をもとに検量線を作成し、組織中の輝度をもとに 1 ピクセルの精度でタンパク質の局所絶対濃度を求めるものである。

本研究を達成する上で最も重要な要素の一つとして、高濃度のタンパク質を固定化でき、且つ可塑性を有するブロック基材が必要不可欠である (Scheme 1)。しかしながら、市販しているタンパク質固定化ユニットを有する修飾アガロースビーズでは、クロスリンクにより可塑性が失われているため、均質な染色像は全く得られず、検量線ブロックとしては利用できないことが分かっている。これを解決するには、合成化学的アプローチに基づいた、

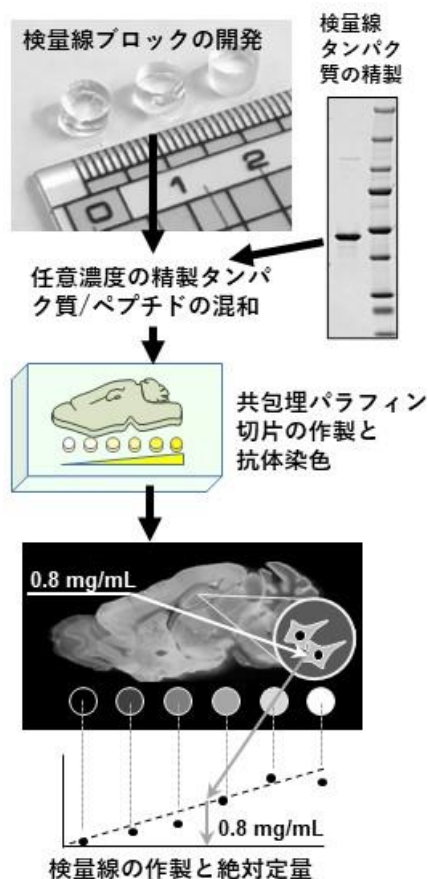


Fig. 1 タンパク質局所濃度絶対定量の概要.

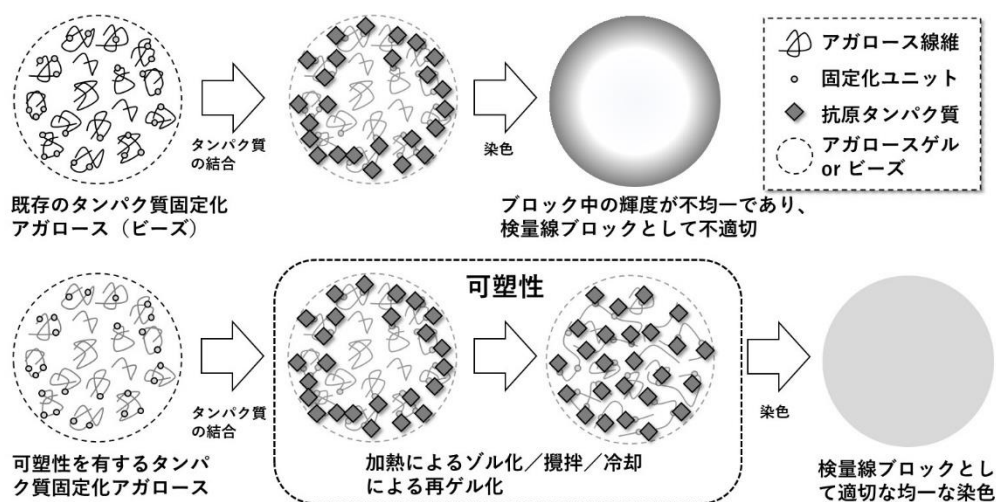
可塑性を有したタンパク質を固定化できるブロック基材の開発が必要となる。

このような背景のもと、本研究では、主にタンパク質局所濃度の絶対定量の達成に必須

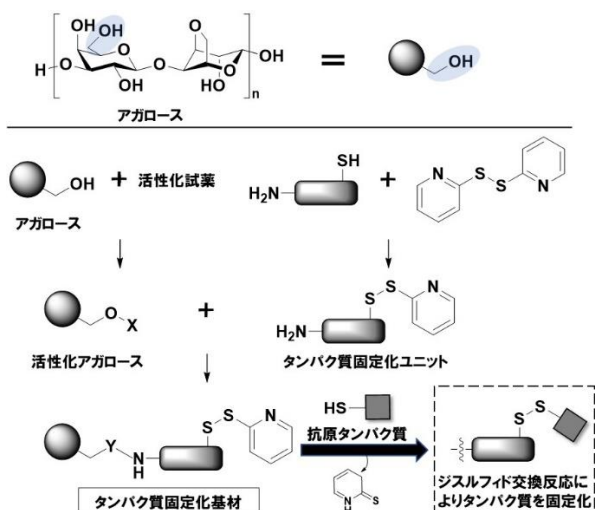
な可塑性を有するタンパク質固定化基材の開発について検討したので、その詳細について報告する。

## 2. 実験方法

本研究では、融解温度とゲル化温度の差が大きい粉末アガロース (Agar BA-10, High Quality) をブロック基材のベースとし、クロスリンクを抑制しながらタンパク質を固定化するためのユニットを導入することが可能な合成手法の開発について検討した。その合成戦略を Scheme 2 に示す。アガロース分子中の1級ヒドロキシ基をターゲットとして各種試薬を用いて活性化、続いて固定化ユニット中のアミノ基と活性部位が反応させることでタンパク質固定化基材を合成する。タンパク質固定化ユニットに2-ピリジルジチオ骨格を導入することで、タンパク質中に含まれるシステイン残基由来のメルカプト基とジスルフィド交換反応を介して共有結合的にタンパク質を固定化できる<sup>1)</sup>。アガロースに対する固定化ユニットの導入量の指標として、0.01 g 当たりの修飾アガロースと2-メルカプトエタノールを反応させた際に放出される、2-メルカプトピリジンの UV-vis 分析における検出値 (ABS) を用いた。同様の操作を市販のタンパク質固定化用アガロースビーズ (Activated Thiol Sepharose™ 4B) に対し行った際の2-メ



Scheme 1 検量線ブロックに求められる可塑性を有するタンパク質固定化基材の概要.



Scheme 2 固定化基材合成戦略.

ルカプトピリジンの検出量 (ABS: 0.170) を担持量の目標値として設定した。

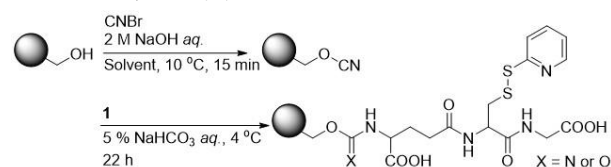
### 3. 実験結果と考察

#### 3.1. シアネートエステルを介した合成手法の開発

アガロースに対して化学的に何かを担持させる方法として、臭化シアンによる活性化、すなわち、アガロース中のヒドロキシ基 (特に1級ヒドロキシ基) と臭化シアンを反応させシアネートエステルを形成し、これと担持させたいユニットの求核部位とを反応させる方法が古くから知られており、現在でもよく利用されている<sup>2)</sup>。そこで、本研究においても、まず臭化シアンをを用いた方法を利用して目的とする固定化基材を合成し、その担持量や基材の特性について調査した (Table 1)。

タンパク質固定化ユニットには、市販のタンパク質固定化用アガロースビーズを参考に、市販のグルタチオンと 2,2'-ジピリジルジスルフィドから一段階で調製された **1** を用いた<sup>3)</sup>。初期検討では、固定化ユニットの担持量を示す 2-メルカプトピリジンの検出量の値が、目標値の 5 倍以上となった (Entry 1)。活性化試薬である臭化シアンの添加量を減らしていくと、同様に担持量も減少した (Entries 2, 3)。得られた修飾アガロースを用いて、基材として利用するためのゲルを作成したところ、クロ

Table 1 反応条件スクリーニング<sup>a</sup>



Entry	CNBr (mmol)	Solvent	Loading (ABS) <sup>b</sup>
1	0.47	H <sub>2</sub> O	0.886
2	0.12	H <sub>2</sub> O	0.576
3	0.06	H <sub>2</sub> O	0.184
4	0.06	DMF	N.d.
5	0.06	DMSO	N.d.
6 <sup>c</sup>	0.06	H <sub>2</sub> O	0.140

<sup>a</sup>1st reaction conditions: Agarose (0.5 g) in H<sub>2</sub>O (10 mL) at 10 °C for 15 min, and adjusted to pH 11 with 2 M NaOH aq. 2nd reaction conditions: Activated agarose (dry weight: 0.2 g), **1** (0.14 mmol) in 5% NaHCO<sub>3</sub> aq. (0.5 mL) at 4 °C for 22 h. <sup>b</sup>Determined by UV-vis (340 nm). <sup>c</sup>4% agarose gel (dry amount: 0.5 g) was used.

スリンク体、すなわち、可塑性を失ったアガロース (加熱溶解させる際に溶解せず、ゲルにもならない) が多量に含まれ濁りのある不均一なゲルとなっており、基材として利用できないことが分かった (Fig. 2, b)。アガロースの修飾の際によく用いられる DMSO や DMF<sup>4)</sup> といった溶媒中での活性化について検討したが、そもそも固定化ユニットの導入自体確認できなかった (Entries 4, 5)。予めゲル状態にしたアガロースに対しての修飾は、Entries 1-3 と同様の結果となった (Entry 6)。上述のクロスリンク体と考えられる不溶物を含む修飾アガロースに対して、加熱溶解時に遠心分離を行い、その上澄みを回収するという操作から不溶物の除去についても検討した。この操作で不溶物の除去には成功したものの、上澄みの修飾アガロースにおける担持量は目標値を大幅に下回り基材としての利用は困難であった。

以上の結果から、臭化シアンを活性化試薬として利用したシアネートエステルを介する方法は、その高い反応性からクロスリンクを容易に引き起こしてしまい、目的とする基材の合成への利用は困難であると考えられた。

### 3.2. *O*-スルホニル化を介した合成手法の開発

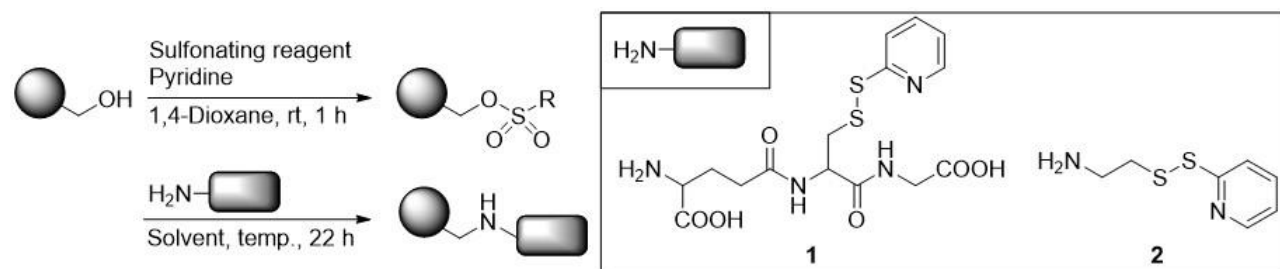
*p*-トルエンスルホニルクロリドやメタンスルホニルクロリドなどのスルホニル化試薬は、アルコール分子中のヒドロキシ基を容易にスルホニル化しスルホン酸エステルを与える。スルホナートアニオンが良い脱離基として機能することから、スルホン酸エステルは求核置換反応や脱離反応に対して高い活性を示すことが知られている。このスルホン酸エステルは一般的にアミンとは容易に反応する一方で、アルコールではその求核性の低さから強塩基の添加無くしてほとんど反応は進行しない。この反応性の差は、目的とするクロスリンクを制御した固定化基材の合成を行う上で好ましいものと考え、スルホニル化を介した合成手法について検討を行った<sup>5)</sup>。その結果を Table 2 に示す。

初期検討として、*p*-トルエンスルホニルクロリドをスルホニル化試薬として用いた検討では、臭化シアンを用いた方法と比較すると担持量は大きく低下することが分かった (Entry

1)。反応温度の効果について検討したところ、室温下での反応が最も良い結果を示した (Entries 1-3)。また、活性化試薬の量をさらに上げてほとんど結果は変わらなかった (Entry 4)。本手法で合成した基材は、ゲルにした場合若干白濁するものの、臭化シアンを用いた検討の際に問題となった、加熱溶解時の不溶物は確認されなかった。すなわち、もとのアガロースの物性を損なうことなく修飾できる可能性があることが分かった。

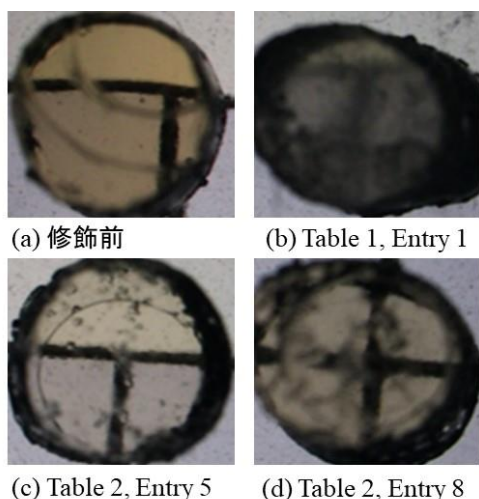
続いて、トシル基よりも立体的に小さいメシル基の導入が可能で、メタンスルホニルクロリドをスルホニル化試薬として用いて検討した。検討の結果、*p*-トルエンスルホニルクロリドを用いた場合と比較して、担持量は同程度であった (Entry 5)。一方で、Entries 1-4 で合成した基材で確認されたゲルの白濁が、メタンスルホニルクロリドを用いて合成した場合はほとんど見られず、メシル化を介する合成手法はより基材に適した生成物を与えることが分かった (Fig. 2, c)。

**Table 2** *O*-スルホニル化を介した固定化基材の合成における条件検討



Entry	Sulfonating reagent (mmol)	Immobilizing unit (mmol)	Solvent	Temp (°C)	Loading (ABS)
1	TsCl (0.36)	<b>1</b> (0.30)	5% NaHCO <sub>3</sub> aq.	rt	0.063
2	TsCl (0.36)	<b>1</b> (0.30)	5% NaHCO <sub>3</sub> aq.	4	0.036
3	TsCl (0.36)	<b>1</b> (0.30)	5% NaHCO <sub>3</sub> aq.	60	0.044
4	TsCl (0.72)	<b>1</b> (0.30)	5% NaHCO <sub>3</sub> aq.	rt	0.050
5	MsCl (0.36)	<b>1</b> (0.30)	5% NaHCO <sub>3</sub> aq.	rt	0.066
6	MsCl (0.36)	<b>2</b> (0.30)	1,4-Dioxane	rt	0.078
7	MsCl (0.72)	<b>2</b> (0.30)	1,4-Dioxane	rt	0.082
8	MsCl (0.72)	<b>2</b> (0.30)	1,4-Dioxane	55	0.187

<sup>a</sup>1st reaction conditions: Agarose (0.5 g), pyridine (71 μL) in 1,4-dioxane (1 mL) at rt for 1 h. 2nd reaction conditions: Sulfonated agarose (dry weight: 0.1 g) in solvent (0.5 mL) for 22 h. <sup>b</sup>Determined by UV-vis (340 nm).



**Fig. 2** 各アガロースのゲル状態での撮像画像

より担持量を向上させるために、固定化ユニット **1** よりもシンプルかつ分子的に小さい **2** をデザイン・合成し、これのメシル化アガロースへの導入について検討した。固定化ユニット **2** は **1** と比べて脂溶性に優れ、一般的な有機溶媒に可溶なため、メシル化同様に 1,4-dioxane 中で反応させたところ、固定化ユニットの担持量の向上が見られた (Entries 6, 7)。さらに、反応温度を室温から 55 °C に変更して検討することで、担持量の目標値を上回る基材の合成に成功した (Entry 8)。また、ゲル化の際には不溶な固体などは見られず、基材に適した均一かつ透明なゲルが得られることを見出した (Fig. 2, d)。

#### 4. まとめ

本研究では、タンパク質局所濃度の絶対定量を可能とするためのタンパク質固定化基材の合成について検討した。臭化シアンによる活性化を介する手法では、タンパク質固定化ユニットの担持量は目標値を大幅に上回った。しかしながら、シアネートエステルの優れた反応性のためにクロスリンクの制御が困難であった。一方で、*O*-スルホニル化、特にメシル化を介した手法では、担持量が目標値を上回っただけでなく、クロスリンクも十分に抑制され、基材に適した均質かつ透明なゲルが得られることを見出した。今回得られた固定化

基材を用いて、今後は、実際にタンパク質の固定化への利用、それに基づいた検量線ブロックの作成等について検討を進めていく予定である。

#### 謝辞

本研究は、同志社大学生命医科学部医生命システム学科の宮坂 知宏 教授との共同研究です。

また、本研究をご支援下さいました公益財団法人京都技術科学センターに深謝申し上げます。

#### 参考文献

- 1) (a) D. Siegel, *Analyst*, **2012**, *137*, 5457-5482. (b) D. T. Mclachlin, B. T. Chait, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6826-6836.
- 2) (a) J. Kohn, M. Wilchek, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1984**, *9*, 285-304. (b) G. Kumel, H. Daus, H. Mauch, *J. Chromatogr. A*, **1979**, *172*, 221-226. (c) S. C. March, I. Parikh, P. Cuatrecasas, *Anal. Biochem.* **1974**, *60*, 149-152.
- 3) R. S. Navath, Y. E. Kurtoglu, B. Wang, S. Kannan, R. Romero, R. M. Kannan, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2446-2455.
- 4) Q.-Q. Meng, J.-X. Wang, G.-H. Ma, Z.-G. Su, *Process Biochem.* **2009**, *44*, 562-571.
- 5) K. Nilsson, K. Mosbach, *Eur. J. Biochem.* **1980**, *112*, 397-402.