

[P-4]

蛋白質結合金属の SRXRF 及び PIXE を利用した準定量的測定法

斎藤 彰¹⁾、荒木朋洋²⁾、中野忠一郎³⁾、松崎浩之³⁾、隅谷和嗣⁴⁾、岡島敏浩⁴⁾

1) 九州沖縄農業研究センター、2) 九州東海大学農学部、3) 東京大学大学院工学系研究科、
4) 九州シンクロトロン光研究センター

従来、生体から単離され生理活性のある酵素蛋白質と結合することが明らかになった金属は、生体に必須な金属として重視された。また蛋白質に結合する金属が進化の過程で他の金属に置換したことや、*in vitro* 実験において異なる金属との置換によりその生理活性が変化することも明らかになった。以上のことから蛋白質結合金属解析は重要課題となったが、現在生体金属解析からその結合蛋白質を解析する有効な手法がない。そこで我々は既知の鉄結合蛋白質をモデルとして、九州シンクロトロン光研究センター SRXRF の蛍光 X 線分析法及び東京大学 MALT タンデム加速器 PIXE システムの粒子励起 X 線分析を利用した蛋白質結合金属の定量的測定を試みた。今後金属ストレス障害に関与する蛋白質をプロテオーム解析（2次元電気泳動・質量分析・アミノ酸配列解析）に利用する予定である。

手法：Fe (242ppm) を含むフェリチン蛋白質 (MW. 440Kd, 1 分子に最大約 4500 個の Fe を含む) 及び Fe (0.5ppm) を含むトランスフェリン蛋白質 (MW. 80Kd, 1 分子に最大 2 個の Fe を含む) を標準蛋白質結合金属とした。Fe 含有蛋白質溶液に蛋白質染色剤 CBB と展着剤を添加し $2\mu\text{l}$ 、直径 2mm でスポットし、BL15 (12keV 放射光 X 線, 85mA, $V=15-33 \times 10^4$ V, 2mm x 0.15mm spot, 入射角 45 度、検出角 135 度、Ge (Li) 検出器、大気) で、あるいは PIXE (3.0MeV プロトン, 40-50nA, 8mm 直径 spot, 入射角 90 度、検出角 135 度、pure-Si 検出器、超真空 10^{-7} torr) で 900 秒照射し、Fe 特性 X 線 (6.4keV) 量を測定し、其々総光量数 (I_0)、総陽子数で標準化した。

結果：PVDF 膜上には均一なスポットを作成できた。しかし膜上、内部の鉄に対する計測効率は不明であるが、光 X 線あるいは陽子はフィルターを通過いると考えられる。そこで膜上 (内部) の全ての鉄が測定できたと仮定すると、フェリチンをスポットしたとき、SRXRF での検出限界は最大でビーム面積当たり 200pg, トランスフェリンの場合 80pg であり、前者では 2ng/beam area, 後者では 400pg/beam area まで準定量的に鉄が測定できると考えられた。一方 PIXE では、フェリチン内 Fe の検出限界は最大で 2ng であった。また PIXE では SRXRF に比べフィルターが変色し蛋白質変性が推定され、実際 N 端のアミノ酸分析できず、非破壊分析とならなかった。しかし、ビームサイズ 8mm 直径の PIXE では 2次元電気泳動スポットプロファイル (100mm x 100mm) を高感度金属マッピングできると考えられた。一方、SRXRF では金属分析した蛋白質スポットがプロテオーム解析できることがメリットと期待、今後光 X 線照射後の蛋白質に対する非破壊性を検証する予定。

蛋白質結合金属の **SRXRF**及び**PIXE**を利用した 準定量的測定法

斎藤 彰1)、荒木朋洋2)、中野忠一郎3)、松崎浩之3)
隅谷和嗣4)、岡島敏浩4)

1)九州沖縄農業研究センター、2)九州東海大学農学部
3)東京大学大学院工学系研究科、4)九州シンクロトロン研究センター

緒言

従来、生体から単離され生理活性のある酵素蛋白質と結合することが明らかになった金属は生体に必須な金属として重視され研究されてきた。また蛋白質に結合する金属はその生理活性に重要な因子であり、進化の過程で他の金属に置換したことや、*in vitro*実験において異なる金属との置換によりその生理活性が変化することも明らかになってきた。

以上から、蛋白質結合金属の解析は重要な課題である。しかし、現在生体金属解析からその結合蛋白質を解析する有効な手法がない。そこで我々は既知の鉄結合蛋白質をモデルとして、九州シンクロトロン光研究センター**SRXRF**の蛍光X線分析法及び東京大学MALTタンデム加速器**PIXE**の粒子励起X線分析を利用した蛋白質結合金属の定量的測定を試みた。今後各種金属ストレス障害に関与する金属結合蛋白質の解析(プロテオーム解析)に利用する。

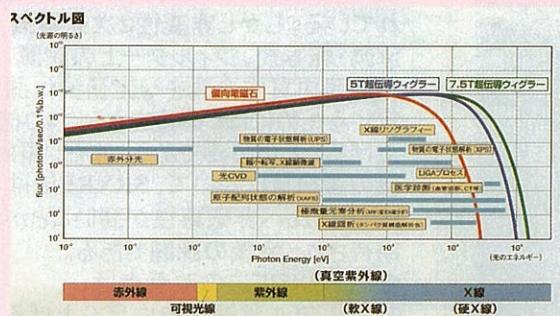
表1. 主な金属結合蛋白質

	含有金屬 元素(質量)	分子量 (Kd)	金屬元素數 /1分子	金屬重量pg /蛋白質重量10ng ^{a)}
Ferritin	Fe(55.8)	473	4500(max)	5300
Nitrogenase	Fe(55.8)	200-220	24	63.7
Alcohol dehydrogenase	Zn(65.4)	150	4	17.4
Transferrin	Fe(55.8)	66-68	2	16.7
Urease	Ni(58.7)	480	10	12.2
Catalase	Fe(55.8)	225	4	9.9
Gluthathion -peroxidase	Se(78.9)	76-92	1	9.4
Nitrogenase	Mo(95.8)	200-220	2	9.1
Alpha-amylase	Ca(40)	40-50	1	8.9
Acid phosphatase	Mn(54.9)	110	1	5.0
Plastocyanine	Cu(63.5)	134	1	4.7
AI結合蛋白質?	Al(27)	270?	1?	10pg

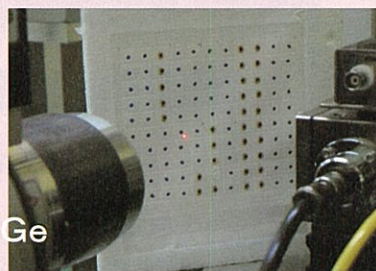
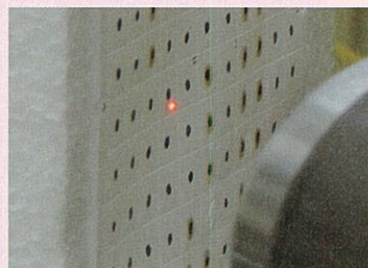
a) (結合金屬原子量/蛋白質分子量) $\times 10 \text{ ng}$

CBB染色で検出できる蛋白質スポットの検出限界=10ng

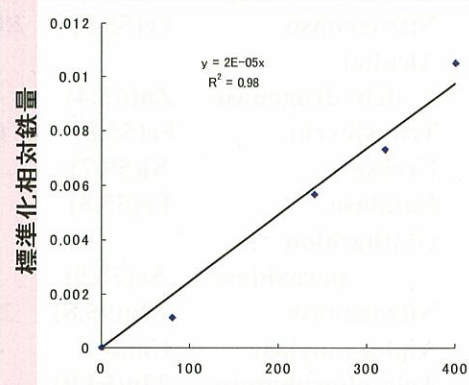
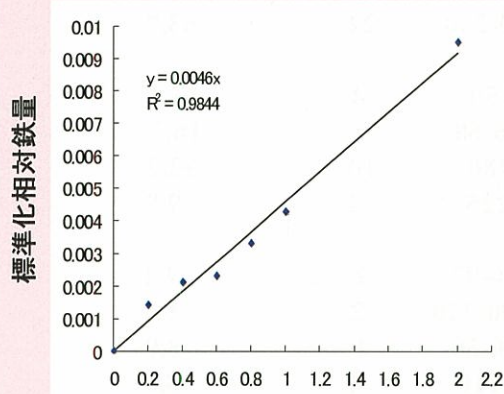
九州シンクロトロン光研究施設BL15システム



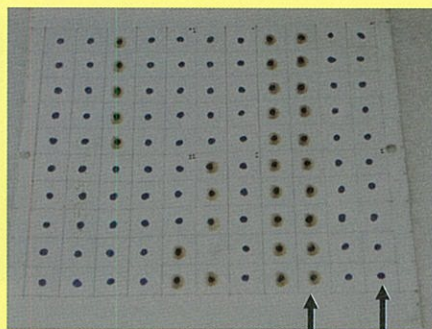
Photon energy; 12keV,
Beam current; 85mA,
V=15-33 x 10E+4,
照射面積; 2mm x 0.15mm spot
入射角; 45度、検出角; 135度
Ge(Li) 検出器、



SRXRF法による鉄結合蛋白質内鉄の準定量的測定



照射後サンプルの非破壊性



PIXE陽子粒子照射

SRXRF放射光照射

蛋白質に対する陽子、放射光照射の影響？
陽子照射 → N端アミノ酸残基分析できず
放射光照射 → 照射後の変色はないが????

結果・考察

SRXRF法はPIXE法に比べ測定感度が約10倍高いと考えられ、また大気条件のSRXRF法はその操作性で優れている。しかし非変性2次元電気泳動・転写後、フィルター上の金属結合蛋白質内金属を準定量的に測定するためには、感度をさらに10倍上げることが必要である。また、照射後の蛋白質について、SRXRF法はPIXEに比べ非破壊性が高いことが期待され、今後の課題である。

今後SRXRF法の改善点は

1. サンプル移動の自由度を上げる
2. 照射面の拡大
3. 原子量の小さい元素用の検出にシリコン検出器の導入
4. 不活性ガス封入チャンバーの導入 など

以上から、金属蛋白質の金属分析と蛋白質分析を同じサンプルでできる新しい手法としてのSRXRF法が期待できる。