特別講演

ゲル電気泳動法を基盤とした生体試料中微量金属イオンおよび金属タンパク質の分離検出法

埼玉大学大学院理工学研究科教授　齋藤伸吾

要　約

金属タンパク質に特化した新規ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（PAGE）を開発した．この方法は，1）微小体積中の微量金属イオンを検出する「金属 PAGE」，2）汚染金属イオンを抑制し，かつ金属タンパク質から泳動中に金属イオンが解離しない「汚染金属イオンスウィーピング - ブルーネイティブ（MICS-BN）PAGE」および3）ホロ型（金属結合型）タンパク質を単離可能な「ホロ／アポ変換二次元（HAC-2D）MICS-BN-PAGE」の3種の PAGE で構成されている．金属検出 PAGE では電気泳動場で機能する金属イオン検出用の蛍光プローブ分子を開発することにより，サブ ppb レベルの金属イオン検出を可能とした．MICS-BN-PAGE では，平衡論および速度論的に安定なキレート錯体として汚染金属イオンを電気泳動的にスウィープすることで汚染金属イオンのないクリーンな電気泳動場を提供する．HAC-2D MICS-BN-PAGE は，CBB G-250 分子存在下でホロ型とアポ型金属タンパク質の電気移動度が異なることを利用して，ホロ型金属タンパク質だけをスポットとして単離する対角二次元法である．本論文では，これら手法を解説すると共に，実試料への適用例を紹介する．ヒト血清試料の MICS-BN-PAGE／金属検出 PAGE では，既報とは異なる Cu イオンの分布を明らかとし，紅色非硫黄光合成細菌試料の HAC-2D MICS-BN-PAGE／金属検出 PAGE ではペリプラズム空間での Cu イオン結合タンパク質を明らかとした．本法は金属タンパク質の総合的な分析法の一つとして有用であると考える．

KEY WORDS　金属タンパク質，微量金属イオン，蛍光プローブ，PAGE，二次元対角法

はじめに

生体試料中のどの金属イオンがどのタンパク質に結合しているかを同定することは，多くの生命活動を理解するうえで重要である．実に3分の1のタンパク質は金属タンパク質であり生体内の触媒反応，調節反応，構造化などのプロセスに深く関わっている．このような生体内での金属結合状態を扱う学問として Haraguchi[1] や Szpunar[2] らによって“Metallomics”という学問分野が 2004 年に提唱されている．また，日本でも「金属生命科学」が提唱され[3]，生体中金属イオンおよび金属タンパク質の役割に関する研究は近年ますます重要視されている．

これまでの金属タンパク質に対する分析法を簡単に振り返ると，基本的には分離－検出法が用い

られている．複雑な試料からタンパク質同士を空間分離し，そのタンパク質分画中の微量金属イオンを計測することが合理的だからである．分離法としてはサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）かポリアクリルアミドゲル電気泳動法（PAGE）の使用が主流である．逆相系やイオン交換系の液体クロマトグラフィー（LC）ではタンパク質が変性してしまい，分離中に金属結合型（ホロ型）タンパク質から金属イオンが解離してしまう．よって，分子ふるい機能を持つ担体（ゲル）との相互作用がないとされるSECやPAGEが専ら用いられる．検出法としては，その高い感度から誘導結合プラズマ質量分析法（ICP-MS）を用いる例が多い．しかし，筆者はこれらSEC-ICP-MSやPAGE-レーザーアブレーション（LA）-ICP-MS法には重大な課題があると考えている．

まず，両者に共通の問題として，分離場における汚染金属イオンへの対策がないことが挙げられる．溶離液や泳動液中あるいは装置にもppbレベルの様々な汚染金属イオンが存在する[4]．それらは分離中に金属タンパク質と結合したり，金属交換反応によって異なる金属タンパク質を形成したりするため，誤検出や過大評価の原因となる．また，PAGE-LA-ICP-MS法ではゲル表面をレーザーで蒸発させるが，ゲルの不均一性による精度の低下が報告されており[5]，また，試料蒸発量が微量なため，IPC-MSをもってしても高感度化が困難である．以上のような課題を解決した金属タンパク質分析法はこれまで報告例がない．

本論文では，筆者がこれまで開発してきた金属タンパク質に特化した3種類のPAGE手法を紹介する．すなわち，①小体積試料中の超微量金属イオンの測定を可能とした金属検出PAGE，②汚染金属を排除した分離場でタンパク質分離を可能とした汚染金属イオンスウィーピング（MICS）－ブルーネイティブ（BN）-PAGE，および③ホロ型金属タンパク質だけを単離可能とした二次元対角法のホロ／アポ変換二次元（HAC-2D）MICS-BN-PAGEである．

1．金属検出PAGEの開発[4]

微小生体試料溶液（あるいは空間分離した分画試料溶液）中の微量金属イオンを高感度検出可能なPAGEを開発した．この手法では，試料溶液に独自の蛍光プローブ[6, 7]を添加し，試料中金属イオンと蛍光プローブを錯形成させる．PAGEによって，この金属－プローブ錯体と遊離プローブ分子とを分離することで，金属イオンを蛍光検出する．図1にプローブ分子の設計指針と実際に合成したプローブ分子群を示す．発光部位は蛍光量子収率の高いフルオレセインとし，配位部位は種々の金属イオンと解離不活性錯体（解離速度の遅い錯体）を形成する多座ポリアミノカルボン酸骨格とした．プローブ錯体がPAGE分離中に解離してしまうと金属イオンの検出は不可能である．これら両部位をスペーサーで接続した．一般に多くの重金属イオンは蛍光団の発光を重原子効果や常磁性効果で消光してしまうが，両部位がおよそ10Å以上離れると消光を抑制できることが筆者の研究で分かっている[6]．図1に示したプローブは金属イオンと錯形成したときに11Å以上離れることを計算化学的に予測しており，実際に種々の金属イオンと錯生成しても消光を示さない．ただし，遊離プローブ自体も発光するので錯体とプローブの分離が必要である．この分離にPAGEを用いた．例として金属イオン－L3錯体をPAGEで分離した例を図2に示す．詳細は述べないが，～20%の高濃度ゲルで金属間分離が達成されることが判明している（図の例ではFe, Cu, Ni, Co, Cdが検出可能である）．このように大きな錯体分子の中心金属の種類が異なるだけで，種々の金属イオンを高分離できることは分離科学上も興味深い．検出限界は78-220pMであり，この感度はICP-MSより若干劣るものの，ICP-原子発光分光法（AES）より優れている．この方法独自の利点は数μL～100μLの微小試料中のサブppb～数十ppt（絶対感度サブフェムトモル）の金属イオンをクリーンルーム無しで高感度検出可能であり，かつ複数枚のスラブゲルを用いることで100以上の試料を同時に計測可能なことであ

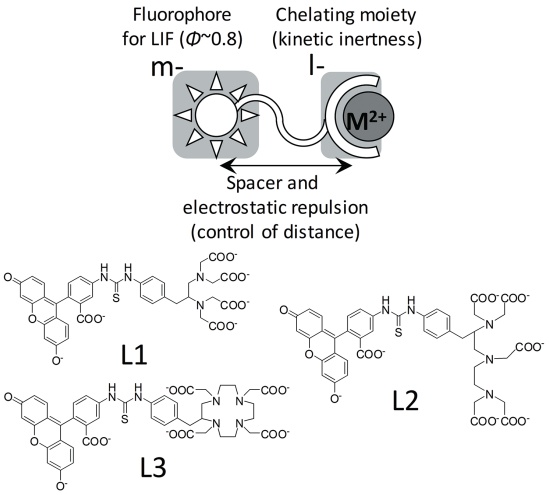


図１　開発したプローブ分子と分子設計指針

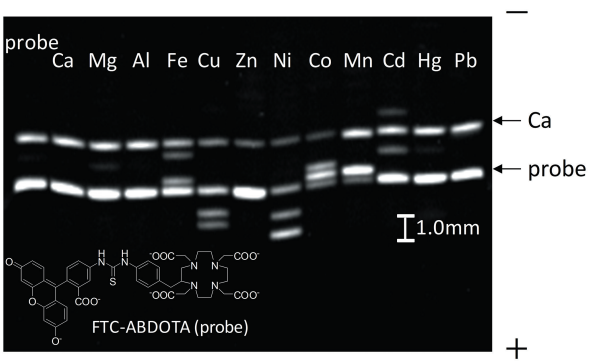


図２　L3を用いる金属検出PAGE

Royal Society of Chemistry Analyst, 2013, 138, 6097
DOI : 10.1039/c3an01107k Fig. 1

る．すなわち，タンパク質を空間分離した分画試料の一斉分析などには適した手法である．

2．汚染金属イオンスウィーピング(MICS)-ブルーネイティブ(BN)-PAGEの開発[4, 8)]

上記の金属検出PAGEを，PAGEで分離したタンパク質分子量分画に適用した．図３に概要を示す．タンパク質の分離には変性剤としてCBB G-250色素分子を添加するブルーネイティブ(BN)-PAGEを用いた（図３a）．BN-PAGEは弱い変性力のため，金属タンパク質から金属イオンが解離しにくいことが報告されている[4, 9)]．金属イオン解離が起きにくいPAGEとしてはBN-PAGE以外にnative SDS-PAGE[10)]やQPNC-PAGE[11)]などが報告されているが，タンパク質の泳動序列が分子量に従うとされるBN-PAGEを採用した．BN-PAGEでタンパク質分離したゲルレーンを30分画にカットしたゲル片から，金属イオンを酸抽出で回収し（図３b），その後，蛍光プローブを添加して二次元目の金属検出PAGEを行った（図３c）．このようにして一次元目BN-PAGEで分離したタンパク質の分子量分画中の金属イオンを金属検出PAGEで測定した．

このBN-PAGE／金属検出PAGEの実証実験として，コントロールヒト血清試料中のCuイオンの測定を行ったところ，Cuイオンは各分画のほぼ全てから検出された．血清試料中の総Cu濃度は0.95ppm（ICP-AES測定）であったが，各分子量分画中のCu濃度の総和である総Cu濃度は6.1ppmであり，回収率642%と明らかに誤った結果となった．この理由はブランク測定（血清試料の代わりに超純水を試料として泳動した）の結果から，汚染Cuイオンが原因ということが分かった（ブランク測定したときの各分画からCuイオンが検出され，その濃度は一分画当たり7.5±1.7ppbであった）．これらの汚染Cuは泳動液(0.1±0.4ppb)，ゲル（5.7±0.5ppb）や装置（電極や樹脂，ガラス板）等から溶出・混入するものであり，LCを含む既存の分離法では避けがたい汚染である．なぜなら，図４aに示すように泳動時に汚染金属イオンは緩衝剤であるグリシン（上槽泳動液）およびTris（下槽泳動液）とそれぞれ安定なアニオン性およびカチオン性錯体を形成しており，電場印加時に常に分離ゲル中に供給され続けるからである（LCでも溶離液の送液により汚染金属イオンが供給され続ける）．この様な汚染金属イオンによって，バックグラウンドとして汚染金属が検出されるだけでなく，分離中に金属非結合型（アポ型）タンパク質と結合し，あたかもホロ型タンパク質として誤検出されてしまう．

そこで，図４b～cに示す新しい汚染金属フリー

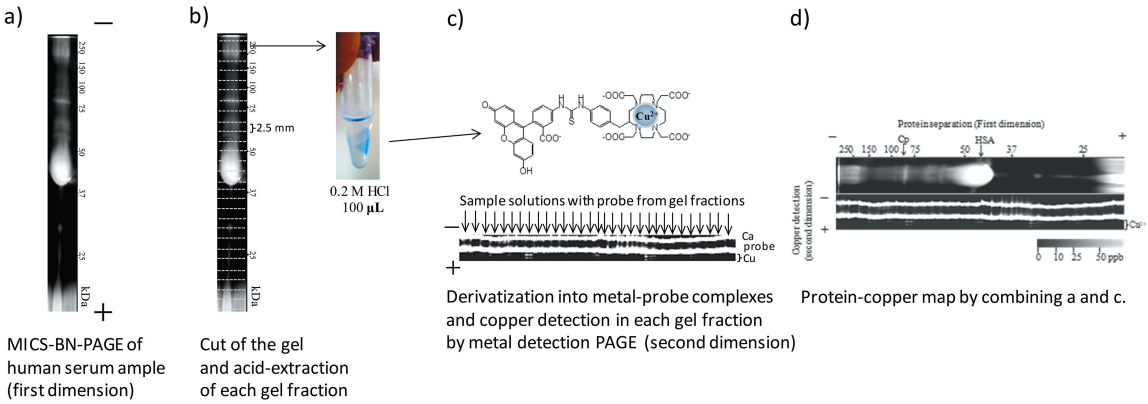


図３　MICS-BN-PAGE／金属検出 PAGE の概要

Royal Society of Chemistry Analyst, 2013, 138, 6097
DOI: 10.1039/c3an01107k Electronic Supplementary Information Fig. S-1

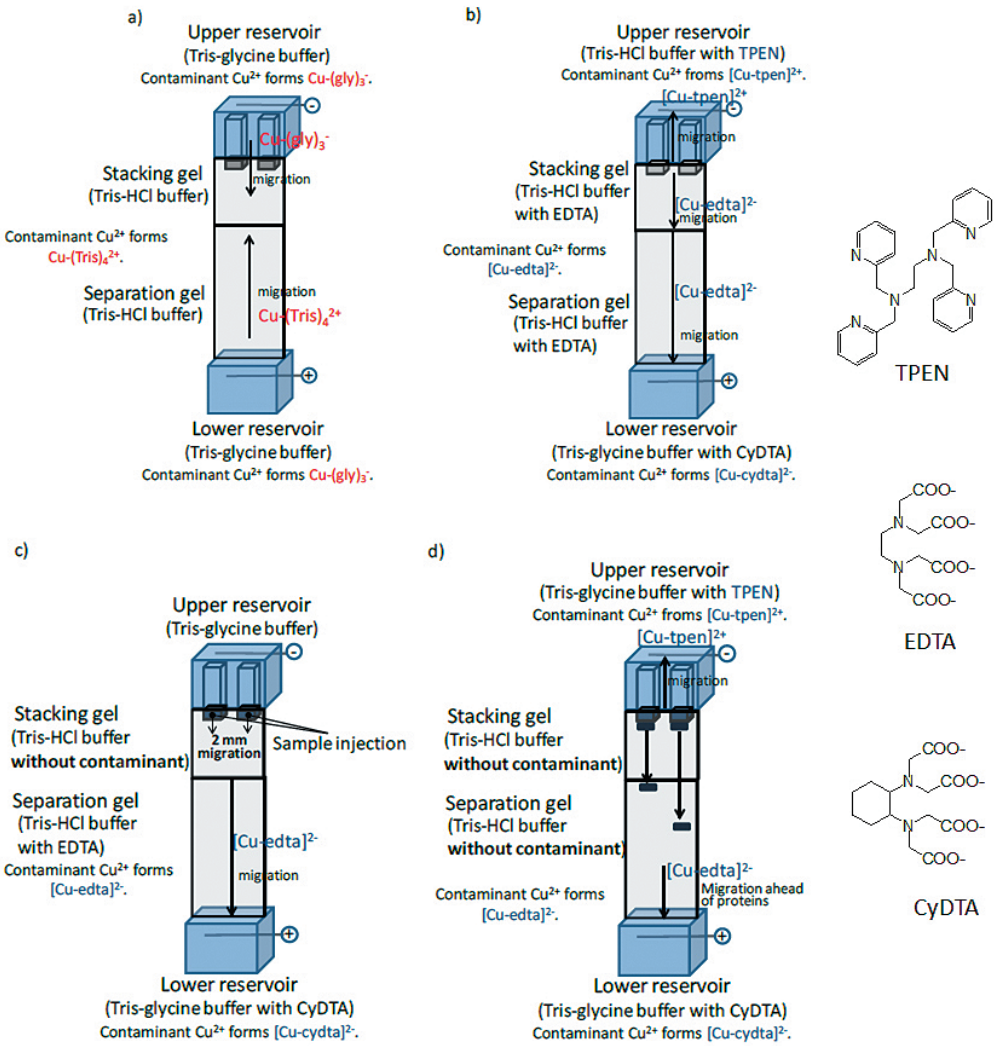


図４　MICS 法の概略

Royal Society of Chemistry Analyst, 2013, 138, 6097
DOI: 10.1039/c3an01107k Electronic Supplementary Information Fig. S-6

なMICS-PAGE法を開発した．MICS法では，上槽および下槽泳動液，分離ゲルにそれぞれ熱力学的にも速度論的にも安定な錯体を形成する配位子TPEN，CyDTAおよびEDTAを添加する（図4b）．ここで電圧を印加しゲルのコンディショニングを行う．この時，汚染金属M^{2+}は上槽では$[M\text{-tpen}]^{2+}$，下槽では$[M\text{-cydta}]^{2-}$，ゲル中では$[M\text{-edta}]^{2-}$錯体を形成しているため，汚染金属はそれぞれの錯体として上下方向に別々に泳動される（ゲル中汚染金属は下槽方向へ，上槽泳動液中汚染金属は上槽方向へそれぞれ泳動し，ゲルから汚染金属イオンは除去され，泳動液からゲル中に供給されることはない）．そのため，汚染金属イオンが全く存在しない濃縮ゲルが電気泳動的に調製できる．その後，試料を添加し（図4c），電圧を印加する（図4d）と低分子の汚染金属錯体$[M\text{-edta}]^{2-}$と遊離EDTAはタンパク質より常に先行して下槽方向へ泳動されるため，試料中タンパク質は汚染金属イオンに全く接触することなく，かつ汚染金属イオンがスウィープされたばかりのクリーンな分離場を泳動する．このようにしてMICS法では汚染金属イオンの影響をほぼ完全に抑制して泳動できる．MICS法での汚染金属イオン濃度は理論上ppq以下であり，汚染金属をこのレベルで抑制したタンパク質分離手法は他に報告がない．ここでMICS-BN-PAGEにおけるブランク試料測定を行ったところ，各分子量分画の汚染Cu濃度は金属検出PAGEの検出限界以下（17ppt以下）であり，汚染を完全に抑制できていることが分かった．そこで再度，コントロール血清を計測したところ，Cuイオンはセルロプラスミン（Cp）分画のみから検出され，総Cu回収率は96%（1.08ppm）と定量的に回収された．つまり，血清中のCuイオンはCp-Cuとしてすべて存在することになる．しかし，これは従来の定説とは大きく異なる．既報の多くではCp-Cuは62～95%，アルブミン結合型Cu（HSA-Cu）は4～19%，その他低分子量タンパク質結合型Cuが3～6%である[12]．MICS法の結果は，泳動中にHSAなどのCu結合ホロ型タンパク質からCuイオンが解離してしまい，定説とは異なる結果となった可能性を否定できない．実際，HSA-Cuは交換活性なCuイオン（Exchangeable Cu；Ex-Cu）として知られており[13]，定量的にHSA-Cuを回収・定量できたという報告は知る限りない．そこで，MICS-BN-PAGEでHSA-Cuを定量的に回収できるかを，HSA標準溶液に対するCuイオンの添加回収実験で検証した．その結果，低温（ゲル0℃，恒温槽-10℃）でのMICS-BN-PAGEであればHSA-Cuを定量的に回収できることが判明した．これは低温でのMICS-BN-PAGEであればHSA-Cuの自己解離反応をある程度抑制可能であり，血清中のCuイオンの精確な分布を明らかにできることを示している．

そこで，成人健常者（N=10）の血清のタンパク質結合型Cuの分布を測定したところ，総Cu濃度回収率は99±3%であり，その分布は，Cp-Cuが99.3±0.3%，HSA-Cuは0.1±0.5%であった．詳細は省略するが，従来の報告と異なる分布が得られた原因を調査した結果，1）従来法では汚染金属イオンを考慮に入れていなかったこと，2）HSA-Cuを精確に回収できていなかったこと，3）血清試料の冷解凍によりCpが変性してしまうことを考慮していなかったことの3点が理由であることが判明した．近年，我々が得た分布に近い血清中Cuイオン分布が報告されている（HSA-Cu：0.64%[14]）．この様にMICS-BN-PAGE／金属検出PAGEで精確なCuイオン分布が初めて得られたものと考えている．

3．ホロ／アポ変換二次元（HAC-2D）MICS-BN-PAGE[15]の開発

続いて，MICS-BN-PAGE／金属検出PAGEを紅色非硫黄性細菌*Rubrivivax gelatinosus*（*Rg*）細胞試料にも適用している[8]．銅イオン過剰環境下で*Rg*を培養すると，過剰のCuイオンは細胞質からペリプラズム空間へと輸送されるが，ペリプラズム空間でのCu存在化学種（どのタンパク質と結合し無毒化しているか）が不明であったためである[16]．MIC-BN-PAGE／金属検出PAGEの結果，*Rg*のペリプラズム空間では，Cuイオン

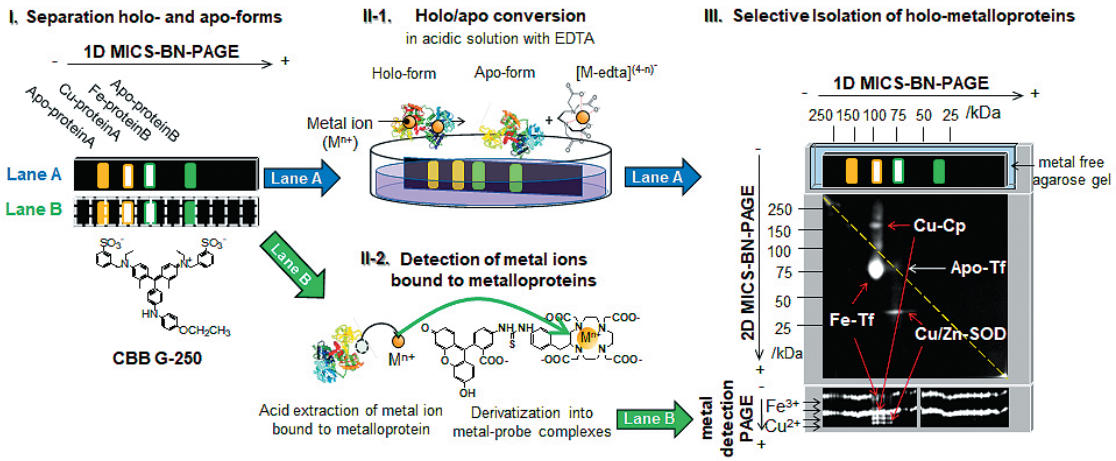


図５　HAC-2D MICS-BN-PAGE の概略

Nature Publishing Group Sci Rep, 9(1), 10566, 2019.
Doi : 10.1038/s41598-019-46955-6 Fig. 2

の耐毒性を調節するタンパク質の一つは，CopI タンパク質であり，Cu イオンと錯形成しているということが強く示唆されている（CopI 分画から Cu イオンが検出された）[8]．しかし，CopI が泳動される分子量分画には，CopI 以外の他のタンパク質も多量に混在しており，CopI が Cu 結合タンパク質であるという決定的な証拠は得られなかった．そこで，ホロ型金属タンパク質を選択的に単離する新規 PAGE 手法（ホロ／アポ変換二次元（HAC-2D）MICS-BN-PAGE）の開発に着手した．HAC-2D MICS-BN-PAGE の概略を図５に示す．HAC-2D PAGE 法では一次元目のタンパク質分離の MICS-BN-PAGE を二つのレーンで行う（図５Ⅰ中のレーンＡとレーンＢ）．レーンＢは通常の MICS-BN-PAGE／金属検出 PAGE に供し，どの分子量分画にどの金属イオンが結合しているかを検出する（図５Ⅱ-２）．レーンＡは，キレート剤（EDTA）の入った酸溶液中で段階的に pH を変化させることで，ホロ型金属タンパク質をアポ型（金属非結合型）へとゲル内で化学種変換する（これをホロ／アポ変換と呼ぶ，図５Ⅱ-１）．この後，もう一度，レーンＡを一次元目と全く同じ MICS-BN-PAGE に供する（二次元目 MICS-BN-PAGE）．そうするとホロ型タンパク質以外は二次元 PAGE 平面の対角線上に並ぶが，ホロ型タンパク質は対角から外れたスポットとして泳動される（図５Ⅲ）．対角外のスポットから金属タンパク質を（質量分析法などで）同定し，金属検出 PAGE からそのスポットに結合していた金属イオンの種類と濃度が同定できる．このようにして，実試料中での金属タンパク質やその結合金属種が分析可能な手法である．

ここで，ホロ型金属タンパク質だけが対角上から外れたスポットとして現れる機序について説明する．MICS-BN-PAGE ではホロ型とアポ型金属タンパク質で泳動位置が異なることを我々は見出している．例えば，鉄輸送タンパク質のトランスフェリン（Tf），銅輸送タンパク質セルロプラスミン（Cp），酸化還元酵素のスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）などがホロ型とアポ型で大きく泳動位置が異なることを確かめている（Tf や SOD はホロ型よりもアポ型の泳動速度が速く，Cp は反対にアポ型よりもホロ型の泳動速度が速い）．この現象は，BN-PAGE で用いる CBB G-250 分子が，ホロ型とアポ型タンパク質を識別して結合していることを示している．実際に Tf に対する結合実験（キャピラリー電気泳動法を使用）とフレキシブルドッキング計算（AutoDock

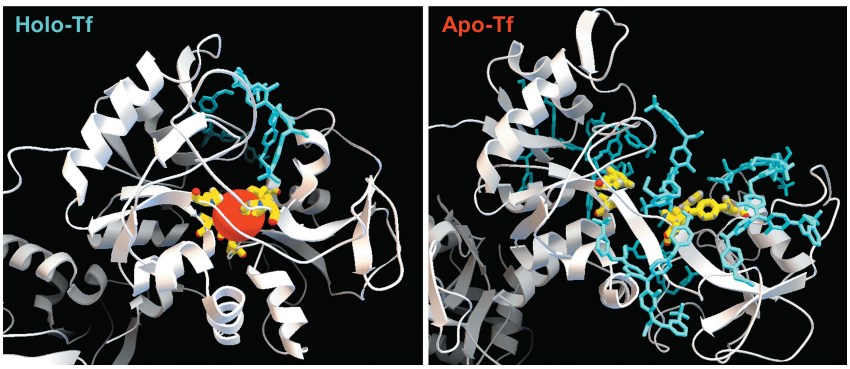


図６　フレキシブルドッキング計算の結果

左）ホロ Tf，右）アポ Tf．図中の赤の原子は Fe^{3+}，黄色は Fe^{3+} に結合するアミノ酸残基，青色は CBB G-250 分子である．

Nature Publishing Group Sci Rep, 9(1), 10566, 2019.
Doi : 10.1038/s41598-019-46955-6 Fig. 5(a)

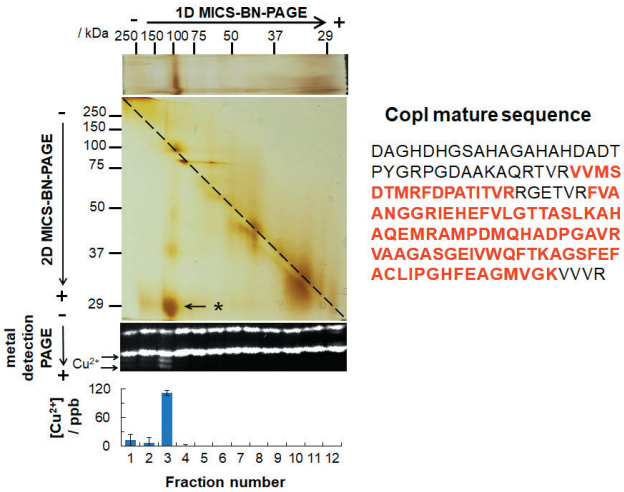


図７　*R. gelatinosus* 試料の HAC-2D MICS-BN-PAGE ／金属検出 PAGE 結果

ａ）二次元 PAGE，ｂ）金属検出 PAGE 泳動図と Cu イオン量，
ｃ）ａ）中のアステリスクのスポットから検出された CopI タンパク質の配列（赤字）．

Nature Publishing Group Sci Rep, 9(1), 10566, 2019.
Doi : 10.1038/s41598-019-46955-6 Fig. 3

Vina プログラムを使用）によって，CBB 色素分子はアポ型の Fe^{3+}が結合する領域をより強く認識し，ホロ型 Tf よりも多くのCBB G-250分子がアポ型 Tf に結合することが分かっている（図６）[15]．先述した HAC-2D PAGE 法では同じ電気泳動を２回行うので，一次元目と二次元目でほとんどのタンパク質（非金属タンパク質やアポ型金属タンパク質）は同じ泳動距離だけ移動するため，対角線上に並ぶのは自明である．一方，一次元目と二次元目で泳動距離が変わるホロ型金属タンパク質だけが対角線上から外れたスポットとして検出されることとなる．

図５Ⅲには実際に Tf，Cp および SOD 標準試料の混合溶液の HAC-2D MICS-BN-PAGE の結果

を示している．ホロ型金属タンパク質は対角から外れたスポットとして検出され，一次元目 MICS-BN-PAGE（レーン B）に対応する金属検出 PAGE で Cu および Fe イオンが検出されていることが分かる．このように，標準タンパク質試料に対してホロ型金属タンパク質を対角外スポットとして検出することに成功したため，続いて *Rg* 試料をこの新規手法に適用した．結果を図 7 a に示す．一次元目 100kDa，二次元目 29kDa 位置にスポットが単離され，このスポットをゲル内消化した後，MALDI-TOF MS 法に供してタンパク質を同定した．その結果，スポットのタンパク質は CopI と同定できた（図 7 c）．また，スポット試料中に他のタンパク質の配列は検出されなかったため，このスポットにはホロ型 CopI が単離されていることが分かった．さらに一次元目 100kDa 位置からは金属検出 PAGE によって多量の Cu イオンが検出された（図 7 b）．以上の結果を総合して考えると，*Rg* ペリプラズム空間中のほとんどの Cu イオンは CopI タンパク質に強く結合されて存在していると結論付けられる．このように実試料においても HAC-2D MICS-BN-PAGE／金属検出 PAGE が金属タンパク質の同定に有力な手法であることが実証できた．

おわりに

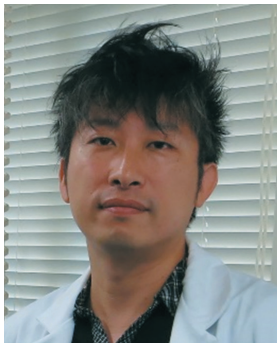
以上，ここで紹介した金属検出 PAGE，MICS-BN-PAGE および HAC-2D MICS-BN-PAGE は，金属タンパク質の分析を指向した独自の PAGE である．著者の知る限り，微量金属イオンを定量可能な PAGE，汚染金属イオンや金属解離の影響を考慮に入れたタンパク質分離用の PAGE，ホロ型金属タンパク質を選択的に単離可能な PAGE の報告はない．実試料への適用も可能であり，金属タンパク質の総合的な分析法としての有用性を示してきた．

ただし，本法は金属タンパク質に対する万能法ではないことにも注意する必要がある．例えば，解離反応速度が非常に速い金属タンパク質には無力であろう．また，HAC-2D PAGE で単離できない金属タンパク質も存在するであろうし，本法でどの程度微量な金属タンパク質を検出できるかも分かっておらず，今後より詳細に調査する必要がある．

上記のような課題点もあるが，本法のような特長を持ち合わせた他の分析法の報告例がないことから，本法が将来的に金属タンパク質の分析を行うときの汎用法の一つとなることを期待している．

謝辞

本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金（若手研究 B　No. 18750057；No. 21750072；No. 23750077；No.25410139；基盤研究 B　No.19H02740）の助成を受けて行われたものであり，一部は株式会社シノテストとの共同研究で行われた．ここに謝意を表する．



◆齋藤伸吾略歴

1996 年	東北大学工学部卒業
1998 年	東北大学大学院工学研究科博士前期課程修了
2001 年	東北大学大学院工学研究科博士後期課程修了
2001 年	北見工業大学工学部化学システム工学科助手・助教
2007 年	埼玉大学大学院理工学研究科准教授
2010 ～ 2011 年	Wake Forest University 在外研究員
2017 年	埼玉大学大学院理工学研究科教授　現在に至る

◆文　献

1）Haraguchi H : Metallomics: the history over the last decade and a future outlook. Met 9 : 1001-1013, 2017

2）Szpunar J : Metallomics : a newfrontier in analytical chemistry, Anal Bioanal Chem 378 : 54-56, 2004

3）https://bio-metal.org/

4）Saito S et al : Separation of metalloproteins using a novel metal ion contaminant sweeping technique and detection of proteinbound copper by a metal ion probe in polyacrylamide gel electrophoresis: distribution of copper in human serum, Analyst 138 : 6097-6105, 2013

5）Raab A, Pioselli B, Munro C et al : Evaluation of gel electrophoresis conditions for the separation of metal-tagged proteins with subsequent laser ablation ICP-MS detection, Electrophoresis 30 : 303-314, 2009

6）Saito S et al : Ultrasensitive CE for heavy metal ions using the variations in the chemical structures formed from new octadentate fluorescent probes and cationic polymers, Analyst 136 : 2697-2705, 2011

7）Saito S et al : Direct fluorometric detection of paramagnetic and heavy metal ions at sub-amol level using an aromatic polyaminocarboxylate by CZE : Combination of pre- and on-capillary complexation technique, Electrophoresis 28 : 2448-2457, 2007

8）Durrand A, Saito S et al : *c*-Type Cytochrome Assembly Is a Key Target of Copper Toxicity within the Bacterial Periplasm, mBio 6 : e01007-15, 2015

9）Jiménez MS et al : Metal-protein binding losses in proteomic studies by PAGE-LA-ICP-MS, Talanta 81 : 241-247, 2010

10）Nowakowski AB, Wobig WJ, Petering DH : Native SDS-PAGE : high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions, Met 6 : 1068-1078, 2014

11）Kastenholz B : New hope for the diagnosis and therapy of alzheimer's disease, Protein Pept Le 14 : 389-393, 2007

12）Rainsford KD, Milanino R, Sorenson JRJ et al : Copper and Zinc in Inflammatory and Degenerative Diseases, Kluwer Academic Publishers, ch. 62 : 24, 1998

13）Inagaki K et al : Speciation of protein-binding zinc and copper in human blood serum by chelating resin pre-treatment and inductively coupled plasma mass spectrometry, Analyst, 125 : 197-203, 2000

14）Ghidoni R, Squitti R, Siotto M et al : Innovative Biomarkers for Alzheimer's Disease : Focus on the Hidden Disease Biomarkers, J Alzheimers Dis, 62（4）: 1507-1518, 2018

15）Ishikawa J, Maeshima A, Mellinger A et al : Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for metalloprotein analysis based on differential chemical structure recognition by CBB dye, Sci Rep, 9(1): 10566, 2019

16）Azzouzi A et al : Coproporphyrin Ⅲ excretion identifies the anaerobic coproporphyrinogen Ⅲ oxidase HemN as a copper target in the Cu^{+}-ATPase mutant copA- of *Rubrivivax gelatinosus* : Mol Microbiol, 88(2): 339-351, 2013

Gel electrophoresis methods orientated towards metalloprotein analysis : isolation of metal-bound proteins and detection of trace protein-bound metal ions

Shingo Saito

Professor, Graduate School of Science and Engineering, Saitama University

Three types of new polyacrylamide gel electrophoresis methods (PAGE) specialized for metalloproteins were developed : 1) "metal detection PAGE" for detection of trace metal ions in small volume sample solutions, 2) "Metal Ion Contaminant Sweeping-Blue Native (MICS-BN) PAGE" for suppression of contaminating metal ions without dissociation of metal ions from metalloproteins during electrophoresis, and 3) "holo/apo conversion two-dimensional (HAC-2D) MICS-BN-PAGE" for selective isolation of holo(metal ion-binding)-metalloproteins. In the metal detection PAGE, the metal ions on sub ppb levels were detected in PAGE by developing the fluorescent probe molecule. MICS-BN-PAGE provides an electrophoretic separation with no contaminated metal ions by electrophoretically sweeping the contaminated metal ions as thermodynamically and kinetically stable chelate complexes. HAC-2D MICS-BN-PAGE is a two dimensional diagonal method to isolate only holo-metalloproteins as spots based on the different electrophoretic mobilities of holo- and apo(non-metal ion-binding)-metalloproteins. In this paper, the principles of these methods and applications to real samples are described. MICS-BN-PAGE/metal detection PAGE was applied to human serum samples, revealed a different (and accurate) distribution of Cu ions from those in many previous reports, and HAC-2D MICS-BN-PAGE/metal detection PAGE was applied to *Rubrivivax gelatinosus* bacterial samples, identified a Cu-binding metalloprotein, CopI, in the periplasmic space for the first time. Thus, it was proven that these PAGE methods are useful for identification and determination of metalloproteins.

Keyword : Metalloproteins, trace metal ions, fluorescent probe, PAGE, two dimensional diagonal method

Address for correspondence
255 Shimo-Okubo, Sakura-ku, Saitama 338-8570, Japan6

Phone : 048-858-3559

E-mail address
shingo@mail.saitama-u.ac.jp