

# 平成 26 年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21 世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21 世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	重合性フェノール性化合物修飾化マイクロチップを用いるリン酸化タンパク質のオンライン特異的濃縮法の開発	
研究者所属・氏名	研究代表者：山本佐知雄 共同研究者：	

## 1. 研究目的・内容

近年、ドパミンが pH 8.5 付近の溶液中で自発的に重合することが報告され、重合体であるポリドパミンに様々な化学修飾を行うことが可能となっている。本研究ではポリドパミンのマイクロチップ電気泳動への応用の基礎検討として、ジルコニアとリン酸基との強い相互作用に着目した、リン酸化タンパク質のオンライン抽出法と、それに続く高感度検出法の開発を目的に実験を行った。

## 2. 研究経過及び成果

まず、様々な濃度のドパミン溶液を用い、マイクロチップ流路のコーティング条件の検討を行った。用いるドパミンの濃度は 0.5 mg/mL から 1.0、1.5、2、2.5、3 mg/mL で調製した。各濃度で調製したドパミン/Tris 塩酸緩衝液 (pH 8.5) 溶液をマイクロチップ流路に導入し、溶液が枯渇しないように、適宜、新たなドパミン溶液を加えて、2 時間放置することで各濃度のポリドパミンコーティング流路を作製した。試料に fluorescein-isothiocyanate (FITC) で標識した牛血清アルブミン (BSA) を用い各濃度のコーティング流路でマイクロチップ電気泳動を行うことで作製した流路の評価を行った。その結果、ドパミンの濃度が 1 mg/mL 以下の場合には試料が流路表面に吸着し、幅の広がったピークが検出された。また、2.5 mg/mL の流路では連続分析を行うと再現性の低下が見られた。濃度が高くなるにつれ電圧印加に伴う電流値が高くなったため流路コーティングには 2 mg/mL のドパミン溶液を用いることとした。最適化した条件において FITC 標識化 BSA を測定した結果を Fig. 1 に示す。次に新たに作製した 2 mg/mL のドパミンコーティング流路と FITC 標識化 BSA を用いて泳動時間とピーク面積の再現性を調査した。その結果、試行回数 6 回に対する相対標準偏差が、泳動時間で 2% 以下、ピーク面積で 6% 以下であり、マイクロチップ電気泳動におけるそれぞれの再現性としては比較的良好な結果が得られた。

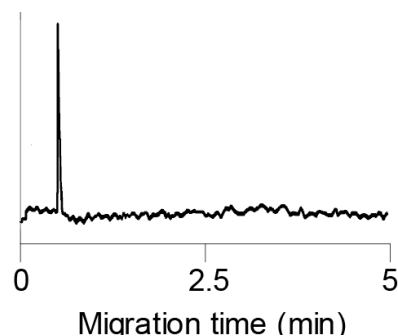


Fig. 1. ドパミンコーティング流路を用いた FITC 標識化 BSA のマイクロチップ電気泳動のэлектроフェログラム

次に 2 mg/mL のドパミンコーティング流路に対し、硫酸ジルコニアを導入しドパミン-ジルコニア流路の作製について検討を行った。まず、導入する硫酸ジルコニアの濃度検討を行った。Fig. 2 にポリドパミン-ジルコニア

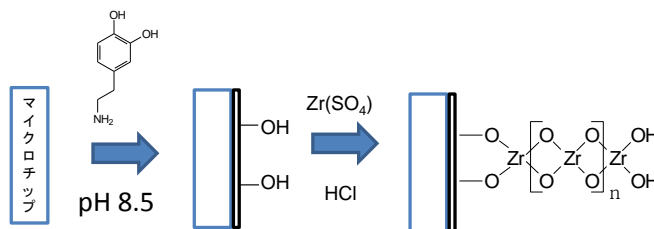


Fig. 2. マイクロチップ流路へのドパミンコーティングとジルコニア修飾流路の作製方法の模式図

流路の作製手順を示す。新たに作製したドパミンコーティング流路に 4 mM 硫酸ジルコニア/0.1 M 塩酸を通液し、12 時間放置することでポリドパミン-ジルコニア流路を作製した。この流路で FITC 標識化 BSA を測定したところ Fig. 1 に比べ泳動時間が遅れる結果となったことから流路中にジルコニアが導入されたと考えられる。

### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

上記研究経過でポリドパミン-ジルコニア流路の作製を確認できたが、ドパミンのみのコーティングに比べジルコニアコーティング流路は再現性に問題がある。そこで反応時間、濃度などを詳細に検討し、ポリドパミン-ジルコニア流路作製の最適化を行う予定である。最適化を行った後は、まず、リン酸化アミノ酸などを用い、本コーティング流路のリン酸基に対する捕捉能などの検討を行う。捕捉能に関して十分に検討を行ったのち、最適化した条件においてモデル化合物としてオバルブミン、HeLa 細胞などのリン酸基を有するタンパク質の測定を行い、最終的にはタンパク質のリン酸化の状態を瞬時に判断することが可能な分析法に発展させる予定である。

### 4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
日本分析化学会第64年会	口頭	2015年9月
第27回バイオメディカル分析科学シンポジウム	口頭	2015年8月
Analytical and Bioanalytical Chemistry	雑誌	2015年7月
第22回クロマトグラフィーシンポジウム	口頭	2015年5月
Analytical and Bioanalytical Chemistry	雑誌	2015年2月
日本分析化学会近畿支部 第8回夏季セミナー	口頭(依頼講演)	2014年8月