

等電点および 等速電気泳動法

戸田年総*



電気泳動法は血清や尿、組織抽出液中の電解質を分離分析する有効な手段であり、特にセルロースアセテート電気泳動は、血清蛋白質の簡便な分析法として臨床検査室では欠くことのできない技法となっている。しかしながら近年、検査内容の高度化に伴い、癌遺伝子産生蛋白質(oncogene products)などの微量な異常蛋白質の検出や合成後修飾(post-translational modification)などによってわずかに構造の異なる異性酵素分子の分離分析技術が望まれている。このうち検出の高感度化については、銀染色法(silver staining)および酵素免疫ブロット法(enzyme-linked immunoblotting)が利用され始めている。銀染色法は、非特異的ながら、ポンソーやアミドブラックといった従来の色素染色法に比べて約50倍の感度を有しており、尿や腹水など蛋白質濃度の低い検体の分析に適している。また酵素免疫ブロット法は、ニトロセルロース膜に吸着転写された蛋白質に一次抗体(検出すべき蛋白質に対する特異抗体)を結合させ、さらに二次抗体(パーオキシダーゼなどの酵素で標識された抗免疫グロブリン抗体)を用いて酵素活性として検出する方法であるため、特定の蛋白質を高感度に検出することができる。

一方、分離性能の優れた電気泳動法としては、蛋白質の電気的性質の違いに基づいて分離を行う等電点電気泳動と等速電気泳動、および蛋白質の分子量の違いに基づいて分離を行う SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、さらに両者を組み合わせた二次元電気泳動が利用され始めている。

* 東京都老人総合研究所生化学部

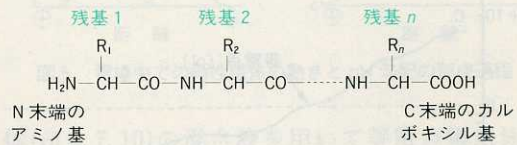


図1 蛋白質の基本骨格

このような現状を踏まえ、ここでは臨床検査法としての応用が比較的進んでいる等電点電気泳動と等速電気泳動を取り上げ、従来のゾーン電気泳動とどこが違うのか、どのような利点と欠点があるのかをできるだけわかりやすく紹介したい。その他の新しい手法については別の機会に譲る。

蛋白質の電荷

蛋白質の基本骨格は、多数のアミノ酸がペプチド結合してできた直鎖状高分子化合物(図1)であり、その配列順序は遺伝子(DNAの塩基配列)によって規定されている。そして蛋白質の電荷は、末端のアミノ酸とカルボキシル基のほか、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アルギニン、ヒスチジンなどの残基(図1のRの部分)の解離による。したがって、異なる遺伝子に由来する蛋白質分子は、それら解離性残基を有するアミノ酸の数と位置(配列)に応じた固有の電荷を帯びている。また、同じ遺伝子に由来する蛋白質においても、シアル酸の結合や、リン酸化などの二次的修飾の有無によって、荷電を異にする。ここで述べる等電点電気泳動と等速電気泳動は、この違いを利用して蛋白質を分離しようとするものである。

ところで、それらの解離基の荷電状態は、溶液

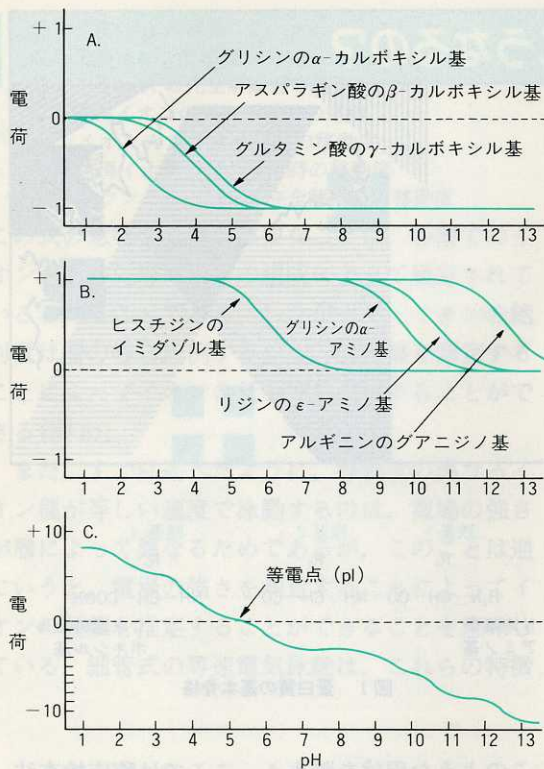


図2 解離性残基の電荷と蛋白質の電荷

の条件(特に pH)によって変化する。アスパラギン酸の β -カルボキシル基 ($pK=3.85$) や、グルタミン酸の γ -カルボキシル基 ($pK=4.25$)、および C 末端の α -カルボキシル基(グリシンの場合、 $pK=2.34$) は、図 2-A のように、その pK より酸性の条件下では水素イオンで中和されており、アルカリ性の条件下でのみ負電荷を帯びる (pK の pH では 50% 解離している)。一方、リジンの ϵ -アミノ基 ($pK=10.53$)、アルギニンのグアニジノ基 ($pK=12.48$)、ヒスチジンのイミダゾル基 ($pK=6.0$)、および N 末端の α -アミノ基(グリシンの場合、 $pK=9.6$) は、それぞれの pK より酸性の条件下でのみ正電荷を帯びる(図 2-B)。その結果、蛋白質全体の電荷の収支は、酸性側でプラス、アルカリ性側でマイナスとなる(図 2-C)。したがって、蛋白質を種々の pH 条件下で電気泳動させると、酸性条件下では陰極側へ、アルカリ性条件下では陽極側へ移動し、その間にちょうどどちらにも動かない pH が存在することになる。この pH が、その蛋白質に固有の等電点 (pI) である。

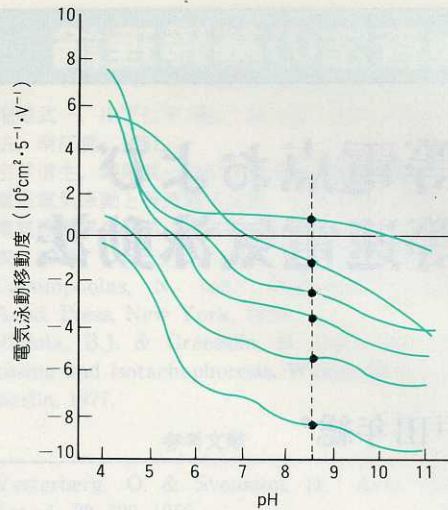


図3 種々の有色蛋白質の pH-移動度曲線

普通のゾーン電気泳動における蛋白質の動き

図 3 に、チトクロームやミオグロビンなどの有色蛋白質について調べた pH と電気泳動移動度の関係を示す。一様な組成の電解質溶液(例えば pH 8.5 のペロナール緩衝液)をセルロースアセテート膜などの支持体に含ませ、その上にこれらの蛋白質を置いて、強さ E (V/cm) の電場をかけると、それぞれの蛋白質は、pH 8.5 における移動度 u (図 3 の pH-移動曲線と破線との交点で与えられる値) に比例する速度 V (cm/秒) = Eu で泳動する。その結果、個々の蛋白質ゾーン間の距離は、しだいに広がっていく(ただし、拡散を抑える力が働かないので、ゾーンの幅も時間とともに広がっていく)。

ゾーン電気泳動の場合、分離の様子は支持体の性質によって異なる。セルロースアセテート膜やアガロースゲルは、蛋白質の移動を妨げる力が極めて弱いために、分子量の違いでは分けられないが、分子ふるい効果のあるポリアクリルアミドゲル上では、電荷が同じであっても分子量が違えば分けることができる。SDS を用いる方法(Shapiro らの方法、Weber と Osborn の方法、Laemmli の方法など)は、低分子の色素に対する相対移動度が分子量の対数値に反比例するように工夫されているので、分子量を推定する方法として利用することができる。

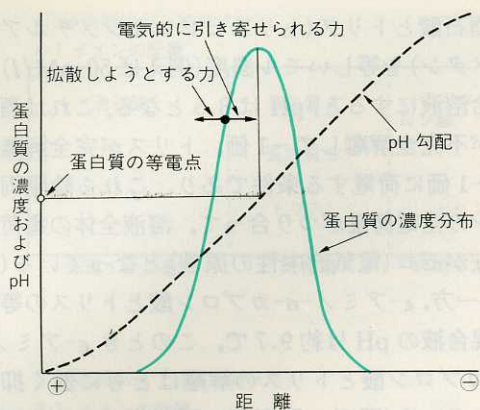


図4 pH 勾配中での蛋白質の濃度分布

等電点電気泳動における 蛋白質の動き

図4の破線のように陽極側で低く陰極側で高い pH 勾配の中で蛋白質を泳動させると、等電点より陽極側では陽イオンとして陰極側に、陰極側では陰イオンとして陽極側に動こうとするので、結局、等電点の位置に集まってくる。そして、集まろうとする力と拡散しようとする力がつり合ったところで平衡状態となる。したがって、等電点の異なる蛋白質を等電点電気泳動法で泳動させると、濃縮を受けながら分離される。また、等電点の値を求めるための分析法としても利用できる。

pH 勾配の作り方には2通りある。通常は、一般的な両性担体(合成両性電解質)混合溶液に電場をかけることによって電氣的に(自動的に)形成される pH 勾配を利用する。その目的に適した両性担体としては、LKB 社の Ampholine や、Pharmacia 社の Pharmalyte、Bio-Rad 社の Bio-Lyte、フジフィルム社の Sepaline などがある。もう一つは、ゲル自身に初めから(共有結合によって)pH 勾配を作っておく方法である。その目的には、LKB 社の Immobiline がある。この方法は、ポリアクリルアミドゲルにしか適用できないという制限はあるものの、狭い範囲の pH 勾配を長時間安定に維持できるので、等電点の接近した蛋白質を分離するのに適している。

両性担体混合液に電場をかけると なぜ pH 勾配ができるのか

話を簡単にするため、代わりに3種類の両性担

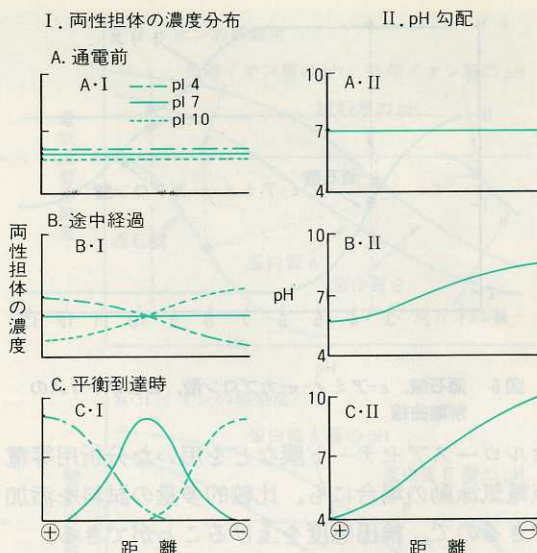


図5 電場中での両性担体の動きと pH 勾配の形成過程

体(pI 4, 7, 10)の混合液を用いて等電点電気泳動を行った場合を考えてみる。これら3成分の均一な混合液(図5-A・I)に電場をかけると pI 4 の成分は陰イオンとして陽極側に、pI 10 の成分は陽イオンとして陰極側に移動を開始する。

ところで、そもそも pI 4 の成分は酸であり、pI 10 の成分はアルカリであるため、陽極付近は酸性に、陰極付近はアルカリ性にそれぞれ傾く(図5-B・II)。その結果、pH が7のときには動けなかった pI 7 の成分も、陽極付近では陽イオンに、陰極付近では陰イオンとなるので中央部分に押し込められて、図5-C・I に示す分布状態となる。そして、このときの pH は図5-C・II の勾配をもつことになる。実際に市販されている両性担体は、非常に多種類の混合物であり、いろいろな範囲で安定した pH 勾配を作ることができる。

等電点電気泳動の長所と欠点

等電点電気泳動の最大の特徴は濃縮作用である。例えば、透析などで十分に脱塩された蛋白質試料をショ糖密度勾配カラム法で等電点電気泳動させる場合、ショ糖と両性担体を試料液に直接溶解させれば、最大 70 ml 程度の試料を 110 ml カラムに添加することができる。これほど多量の試料を一度に処理できる電気泳動法は、ほかに類を見ない。

また、アガロースやポリアクリルアミドゲル、

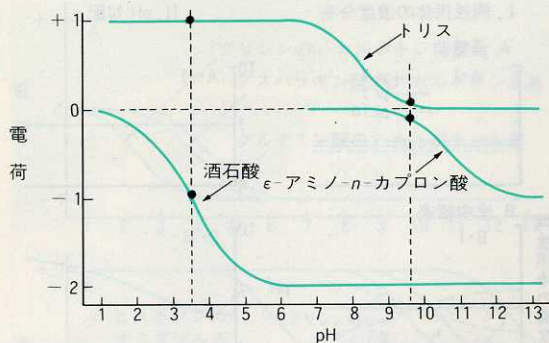


図6 酒石酸, ϵ -アミノ-n-カプロン酸, およびトリスの解離曲線

セルロースアセテート膜などを用いた分析用等電点電気泳動の場合にも, 比較的多量の試料を添加できるので, 検出感度を上げることができる。

分離性能の面でも, 等電点電気泳動は極めて優れている。荷電の違いに基づく蛋白質分離法としては, 他のゾーン電気泳動法との比較はもちろん, 高速液体クロマトグラフィーなどとの比較においても, 最も高い分離が期待できる方法である。

しかしながら, この優れた方法にも欠点がある。たいいていの蛋白質は, 自己の等電点において溶解度が最低となる。したがって, 元来溶解度があまり高くない膜蛋白質や, 会合体を形成しやすい酵素蛋白質の場合, 等電点沈殿を生じることがある。また, 原理上すべての蛋白質が自己の等電点に長時間さらされるので, その間に失活する酵素も多い。いうまでもないが, 偶然に等電点が一致する蛋白質は, 等電点電気泳動では分けられない。

等速電気泳動における蛋白質の動き

等速電気泳動には, ポリアクリルアミドゲルやセルロースアセテート膜などの支持体を用いるゾーン方式と, キャピラリー(毛細管)を用いる無担体方式とがある。前者はもっぱら蛋白質の分離分析に適した方法であるが, 後者は蛋白質だけでなく, ペプチドやアミノ酸, 有機酸, ヌクレオチドなどの低分子イオンの分析にも利用のできる方法である。しかし, ここでは等電点電気泳動との比較のため, 蛋白質の場合に絞って話を(蛋白質以外の例については後で簡単に触れる)。また, 実際の泳動方法にもいろいろあるが, 蛋白質の動きを具体的に理解するために, 我々が設定した方法(参考図書2を参照)を例にとって以下に述べる。

酒石酸とトリス(トリスヒドロキシメチルアミノメタン)を等しいモル濃度(例えば 50 mM/l)で混合溶液にすると, pH は 3.5 となる。これは酒石酸が不完全解離して-1 価, トリスが完全解離して+1 価に荷電する条件であり, これら陰陽両イオンの全電荷量がつり合って, 溶液全体の電荷の収支がゼロ(電気的中性の原理)となっている(図6)。一方, ϵ -アミノ-n-カプロン酸とトリスの等モル混合液の pH は約 9.7 で, このとき ϵ -アミノ-n-カプロン酸とトリスの解離はともに低く抑えられている(図6)。陽極側に酒石酸-トリス緩衝液を, 陰極側に ϵ -アミノ-n-カプロン酸-トリス緩衝液を配置(図7-A・I)し, その間に等電点の異なる2種類の蛋白質の混合溶液を挟んで通電すると, 蛋白質は等電点の低い順序に分離されてそれぞれのゾーンを形成し, 酒石酸と ϵ -アミノ-n-カプロン酸に挟まれた状態のまま, 陽極方向に向かって移動を続ける(図7-B・I)。このとき, それぞれの蛋白質は移動度が異なるにもかかわらず, 等しい(iso)速度(tacho)で泳動する。この場合の酒石酸を先導イオンと呼び, ϵ -アミノ-n-カプロン酸を終局イオンと呼ぶ。

移動度の異なる蛋白質がなぜ等しい速度で泳動するのか

通電開始直後は, 蛋白質Aも蛋白質Bも同じ pH 条件下(図7-A・II)に置かれるので, その条件における個々の移動度の違いによるゾーン電気泳動が起こり, 移動度の大きい順に分離される(図7-B・I)。しかしながら, 蛋白質Aだけがどんどん進み去って蛋白質Bとの間に“すき間”ができることはない。なぜならば, もしA層の後に陰イオン濃度の低い層ができてしまったと仮定すると, そこではトリス濃度も低くなる(電気的中性の原理)ので電気伝導率の低下が起こるからである。その結果, 局部的に電場の強さ(電位の勾配)が大きくなり, そこに引きずり込まれるようにして蛋白質Bが急速に流れ込んでくる。そして“すき間”は埋められて, 両層は再び密着する。

定常状態(等速泳動状態)における蛋白質Aおよび蛋白質Bの移動度 u_A, u_B と, 各層の電場の強さ E_A, E_B との間には

$$u_A \cdot E_A = u_B \cdot E_B = v$$

A. 泳動開始前 (初期状態)

A・I イオンの配置



B. 泳動開始後 (等速泳動状態)

B・I イオンの配置

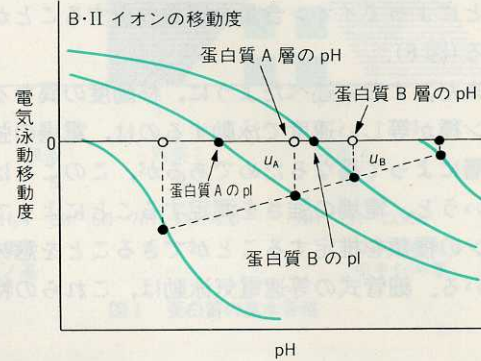
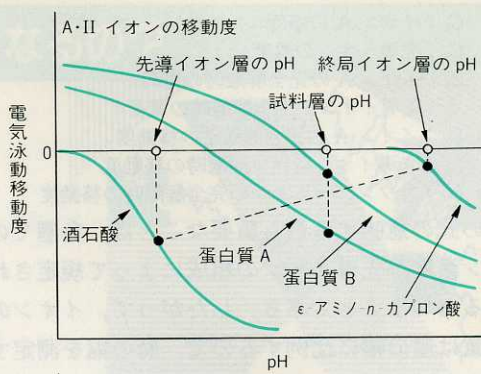


図7 等速電気泳動におけるイオンの配置と移動度

v : 境界面の移動速度
の関係が成立する。

実際の等速電気泳動では、蛋白質 A と蛋白質 B との間隔 (分離) をもっと大きくする必要があるので、両者の中間の移動度をもつ陰イオン (スペーサーイオン) を加えることが多い。等電点電気泳動に用いる両性担体をスペーサーイオンとして利用することができる。

等速電気泳動の長所と欠点

図 7-B・II に見られるように、等速泳動状態に達した蛋白質は、自己の pI より幾分高い pH 条件下に置かれる。そのため、沈殿を生じることが少なく、また等電点電気泳動では失活してしまうような酵素でも安定に分離できることがある。分離に要する時間も、等電点電気泳動より短くてすむうえに、同じゲルサイズならば、等電点電気泳動よりも多量の蛋白質を処理することができる。装置を工夫することによって、通電しながら分画分取することも容易にできる。

一方、特に大きな欠点は見当たらないが、あえていえば、等電点電気泳動よりも若干分離性能が劣るようである (両性担体はスペーサーとしては

あまり適当でない可能性がある。) また、蛋白質の等電点をこの方法で求めるのは適当ではない。

細管式等速電気泳動による
低分子イオンの定性定量分析

なぜそんな式が成り立つのかという詳しい説明は他の成書に譲るが、とにかく等速電気泳動の場合、各層におけるイオン濃度の間には、下記の Kohlrausch の式が成り立っている。

$$C_A = C_L \cdot \frac{Z_L \cdot U_A \cdot (U_L + U_C)}{Z_A \cdot U_L \cdot (U_A + U_C)}$$

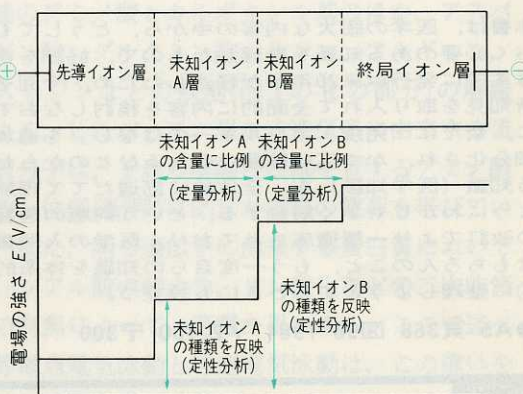


図8 細管式等速電気泳動によって分離された陰イオンの電位差検出法による分析

C_A : イオン A の濃度
 C_L : 先導イオンの濃度
 Z_A : イオン A の完全解離時の電荷
 Z_L : 先導イオンの完全解離時の電荷
 U_A : イオン A の完全解離時の移動度
 U_L : 先導イオンの完全解離時の移動度
 U_C : カウンターイオンの完全解離時の移動度

この式の意味する最も重要なことは、各層でのイオン濃度が先導イオンの組成によって規定されているということである。したがって、イオンの絶対量は層の幅に比例するので、層の幅を測定することによってイオン含量を定量分析することができる(図 8)。

また、すでに述べたように、移動度の異なるイオン種が等しい速度で泳動するのは、電場の強さが層によって異なるためであるが、このことは逆にいうと、電場の強さを測定することによってイオンの種類を推定することができることを意味している。細管式の等速電気泳動は、これらの特徴

が生かせるように工夫された分析的方法である。

参考図書

- 1) 堀尾武一, 山下仁平(編): 蛋白質・酵素の基礎実験法, 南江堂, 1981.
- 2) 宇井信生, 堀尾武一(編): 別冊蛋白質核酸酵素—等電点電気泳動と等速電気泳動, 共立出版, 1978.
- 3) 電気泳動学会(編): 電気泳動実験法, 第 5 版, 文光堂, 1975.
- 4) Catsimpoilas, N. (ed.): Isoelectric focusing, Acad. Press, New York, 1976.
- 5) Radola, B.J. & Graesslin, D. (ed.): Electrofocusing and isotachopheresis, Walter de Gruyter, Berlin, 1977.

参考文献

- 1) Vesterberg, O. & Svensson, H.: Acta Chem. Scand., **20**, 820, 1966.
- 2) Vesterberg, O.: Science Tools, **20**, 22, 1973.
- 3) 松尾雄志: 生物物理化学, **17**, 191, 1973.
- 4) Kohlrausch, F.: Ann. Phys. Leipzig, **62**, 209, 1897.
- 5) Suendsen, P. J. & Rose, C.: Science Tools, **17**, 13, 1970.
- 6) 島尾和男: 生物物理化学, **21**, 49, 1977.

からだの働きと病気 改訂第2版

鈴木秀郎 産業医科大学教授

本書は、医学の膨大な内容の中から、どうしても知っておく必要のある知識を整理したもので、好評を得た前版はすでに発行以来20年余が経過したため、今回その後の新知見を取り入れて全面的に内容を検討しなおすと同時に、新たに「免疫・アレルギーのはなし」を追加した。細分化され、かつ広い範囲にわたるひとのからだに関する知識(医学知識)を、全体的に筋道だてて理解できるようにわかりやすく解説する、という前版の趣旨は今回の改訂でより一層徹底されており、医学の入門書としてはもちろんのこと、もう一度自らの知識を体系的・論理的に整理しようとするときにも役立つ。

●A5 頁368 図96 1984 ¥2,400 千300

●主要内容

①ひとのからだ ②消化器のはなし ③肝臓のはなし ④膵臓のはなし ⑤肺臓のはなし ⑥心臓のはなし ⑦造血臓器のはなし ⑧腎臓のはなし ⑨生殖器のはなし ⑩内分泌臓器のはなし ⑪神経のはなし ⑫運動器のはなし ⑬感覚器のはなし 皮膚 視覚器(眼) 聴覚器 嗅覚器 味覚器 位置覚および運動覚
 ⑭免疫・アレルギーのはなし 免疫のしくみ アレルギーの病気 膠原病のはなし



医学書院

本社 ①①③⑨① 東京・文京・本郷5-24-3 ☎東京(03)811-1101(代) 振替東京7-96693
 洋書部 ①①③ 東京・文京・本郷1-28-36 鳳明ビル ☎東京(03)814-5931~5 振替東京1-53233