

〔シンポジウム：電気泳動法の最近の進歩〕

セ・ア膜による2次元電気泳動法

大橋望彦*・戸田年総*・藤田敬子*・吉田光孝**

セ・ア膜2次元電気泳動法について

O'Farrell の2次元電気泳動法を始めとして、近來、種々の多次元展開による分離・分析法が開発されてきている。何故、多次元展開に目が向けられるのか、その理由は簡単で、1次元の展開像に比較して明らかに分離能が優れているからであり、諸解析をより詳細に行える利点があるからである。

この利点を生かして、かつ簡便な操作法で、より迅速な分離・分析が行えるようになることは、各方面での応用を容易にし、また、同じ分野での多くの知見が集積しやすくなる。

すでに、われわれは以上のことをより具体的にするため、セルローズ・アセテート膜(セ・ア膜)を用いた2次元電気泳動法を確立した¹⁻³⁾。われわれの開発した2次元電気泳動法においては、1次元目の泳動では、セ・ア膜上の濃縮操作を除けば、原理的に通常のセ・ア膜電気泳動法とほとんど変りがない。また、2次元目の展開では、1次元目の分離と原理的には近い等電点電気泳動法を応用している。この1・2次元の泳動法の組合せは、他の2次元展開の方法とはかなり異なっている。たとえば、ポリアクリルアミド・ゲルの2次元展開は、普通には1次元目に等電点電気泳動法を行い、2次元目では、まったく分離の原理が異なる分子篩効果で分けるゲル電気泳動法を行っている⁴⁻⁷⁾。確かにこの方法は非常に優れた分離分解能を示し、従来の1次元のみ行っていた方法ではとうてい達成できなかった詳細なポリペプチド・マップが作成されている。このように優れた方法がすでに知られていながら、別の方法の開発をした理由はいくつかある。その主な理由は、① 支持体であるセ・ア膜が

常時入手可能な市販品であること、② その使用条件が一定で、再現性が得られやすいことである。さらに、③ SDS ゲル電気泳動のように、展開時に蛋白質の変性剤を使用しない方法を採用する。④ 短時間の操作で、結果がわかる。⑤ 試料が少なく解析できる。⑥ リブリカ染色法が採用できる。⑦ 染色された展開像を乾燥後保存することが容易である。等々が挙げられる。

そこで、ここに挙げた③の理由について少し詳しく吟味してみる。

蛋白質の分離展開像について

1. pI マーカーの2次元展開

従来のセ・ア膜を用いた1次元展開の電気泳動法では、分離された蛋白質が native の状態で、多量体のままの電気的性質が易動度に反映している。この性質を残したままで2次元の分離展開像が得られることは、蛋白質の生体内の存在様式を少しでも反映している分析法として意味がある。すなわち、遺伝形質発現により産生した蛋白質は、その後種々の修飾を受け、heterogeneous な分子形態を作っていることが解析可能となる。

その具体的なモデルとして、Myoglobin や Cytochrome C 等の保存試料を2次元展開したところ、1次元展開では不明である複雑な分解生成物の分布がみられた。

2. ヒト血清蛋白質の2次元泳動像

本法による2次元の展開像は、従来の1次元法による泳動像との位置関係がそのまま対応しうるので、解読しやすい。とくに1次元のいわゆる5分画に分けられるヒト血清蛋白質の展開像では、従来の5分画がさらに細部に分画されていることが明瞭となる。

Two-dimensional electrophoresis of native proteins on cellulose acetate membranes.

* Mochihiko Ohashi, Tosifusa Toda and Toshiko Fujita; 東京都老人総合研究所生化学部

** Mitsutaka Yoshida; 東邦大学理学部生理化学

Correspondence address: Mochihiko Ohashi, Department of Biochemistry, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan.

(178) 生物物理化学

(1) 方法

ヒト血清を2次元セ・ア膜電気泳動法により展開した後、クマシー・ブルーにより蛋白質の染色を行う。本報告の中で用いたセ・ア膜ならびにセパラインは、富士写真フィルム株式会社より提供された。

(2) 結果

ヒト血清の5分画泳動像はそのまま2次元展開像でも5分画の位置として表現することができる。これらスポットは、免疫化学的手法等によりすでに大部分同定されているが⁹⁾、しかし、蛋白質としては微量にしか存在しない酵素類等は、特別なスポットとして認識されずに、ここに見られているスポットと重複して存在している場合が多い(後述のアイソザイムの展開像参照)。

3. O'Farrell とセ・ア膜2次元展開像の比較

高分子の状態で泳動されるため、SDSゲル電気泳動に比して、分離解像力が衰える(参照:肝抽出蛋白質の2次元展開像の比較^{9,10)})。このことは致し方ないことで、nativeの状態は、いろいろな修飾された分子形態が連続した状態にあることを考慮すれば、当然のこととなる。

アイソザイムの展開について

1. 酵素活性を残したままで膜の固定ならびに洗浄を行う試み

この2次元電気泳動法にも、ある程度の制約がある。すなわち、2次元目に等電点電気泳動法を採用しているので、泳動展開後のセ・ア膜上には、明らかにpH勾配が作られている。この勾配が発色反応時に不均一な条件を与える可能性のあることは否定できない。

そこで、マウス腎の酵素抽出液を試料とし、2次元展開した後で、各種飽和度の異なる硫酸アムモニア溶液で膜上の蛋白質を固定し、可及的にセパラインを除去する洗浄の検討を行った。

(1) 方法

まずは1次元の等電点電気泳動法によりマウス腎の抽出液を展開して、以下のごとく処理された。

- A. 20% 飽和硫酸, 5 min
- B. 30% 飽和硫酸, 5 min
- C. 40% 飽和硫酸, 5 min

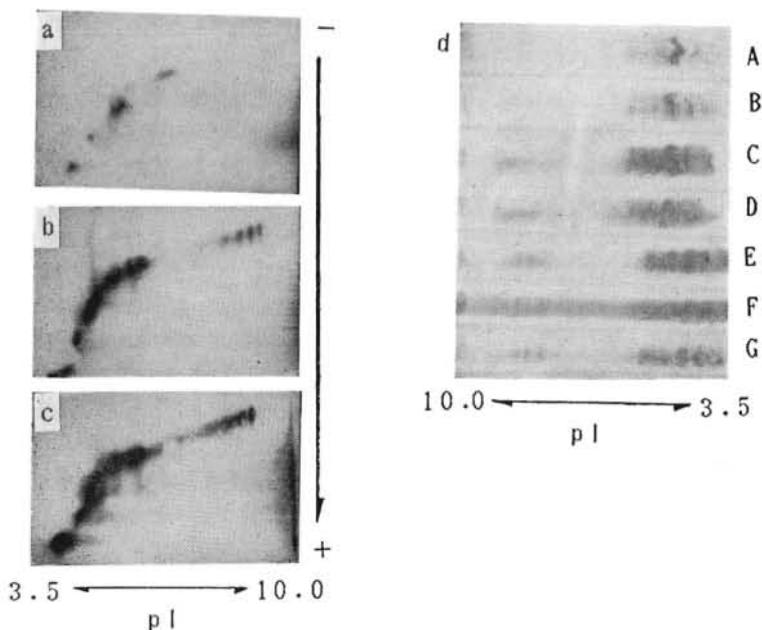


Fig. 1. Effects of concentrations (% saturation) of ammonium sulfate (AS) on fixation and rinsing of LDH isozymes are showing after the developments by two-dimensional cellulose acetate electrophoresis (a, b and c) and by isoelectric focusing on CA membrane (d). LDH isozyme from kidney of mouse was used.

a : 20% satur. AS. (stained by PMS method), b : 30% satur. AS. (stained by PMS method), c : 40% satur. AS. (stained by PMS method), d : 20-80% satur. AS. (stained by Diaphorase method; Lanes from A to G are fixed with 20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80% saturation of AS, respectively.)

- D. 50% 飽和硫酸, 5 min
- E. 60% 飽和硫酸, 5 min
- F. 70% 飽和硫酸, 5 min
- G. 80% 飽和硫酸, 5 min

上記の固定・洗浄処理を行った膜（1次元・2次元展開済みの）について、それぞれ LDH isozyme の酵素染色（PMS 法と Diaphorase 法を用いた）を行って比較検討した。

PMS 法：2.6 mg NAD, 0.075 mg PMS, 0.51 mg NBT, and 57.6 mg Li-lactate in 3.0 ml of 0.3 M Tris-HCl, pH 9.5.

Diaphorase 法¹³⁾：2.6 mg NAD, 0.51 mg NBT, 57.6 mg Li-lactate, 22 units of Diaphorase in 0.3 M Tris-HCl, pH 9.5.

(Diaphoraseは、東洋醸造株式会社から提供された.)

(2) 結果

これまでに、メタノール・酢酸、スルフォサルチル酸、5%酢酸等の緩和な固定処理による酵素活性の残存を調べてきたが、いずれの処理も酵素を完全に不活性化してしまう結果に終わった。そこで、今回検討した硫酸アムモニアの固定・洗浄処理は、1次元展開後Diaphorase

法により染色した場合には、40%以上飽和硫酸で5min処理が良好な結果を示した(Fig. 1-d)。なお、2次元展開像の結果(PMS法)は30%飽和硫酸で5min処理でも良好な結果が示された(Fig. 1-a,b,c)。この硫酸処理条件は酵素の種類によってそれぞれ最適飽和度があるので、あらかじめその点を配慮する必要がある。また、硫酸の飽和度が高いと反応に影響する場合があるので、固定可能な最低濃度条件を採用するのが好ましい。

2. 同時多酵素染色法

1次元の泳動像と異なり、2次元に展開していると、いくつかの類似反応で発色させることのできる酵素であれば、多種類のアイソザイムの分離像を一枚のセ・ア膜上において示すことが可能である。

その一例として、マウス腎抽出液をセ・ア膜上で2次元に展開した後、いくつかの脱水素酵素を組合せて、同時に発色させた2次元展開像を示す。

(1) 方法

a. ICD+G6PD

b. MAD+SorbdH

0.3 M Tris-HCl, pH 8.5, 0.1 mM NAD, 0.1 mM NADP に、2 mg/ml Isocitrate, 0.4 mg/ml G6P (aグ

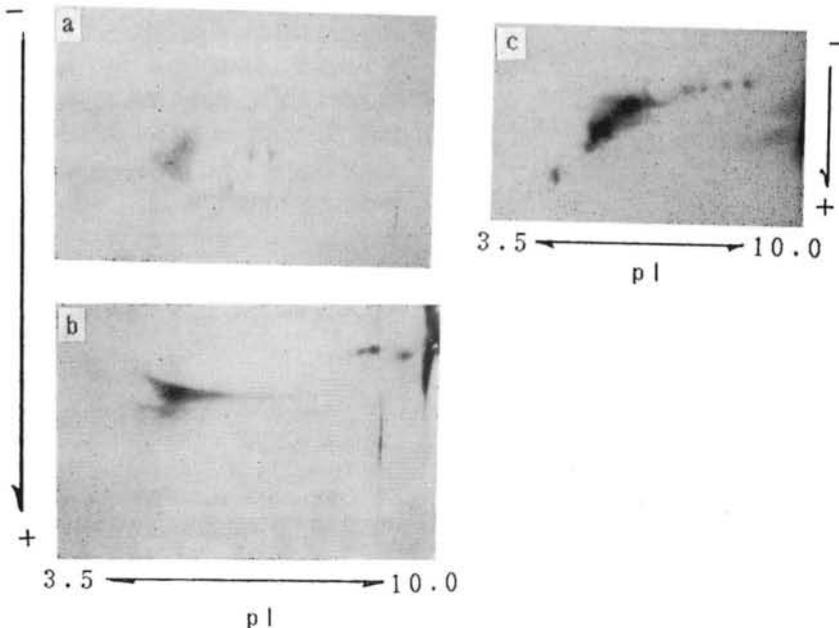


Fig. 2. Demonstrations of multiple isozyme staining and high sensitive staining methods on CA membrane.

a : Isocitrate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase isozymes from kidney of mouse. b : Malate dehydrogenase and sorbitol dehydrogenase isozymes from kidney of mouse. c : human serum LDH isozymes. 5 μl of serum was applied and stained by diaphorase method.

(180) 生物物理化学

グループ), 14 mg/ml Malate, 2.5 mg/ml Sorbitol (bグループ) の基質をそれぞれ添加, 全量を 3.0 ml とした. この反応液 2.5 ml を 6.8×11.5 cm のろ紙にしみ込ませ, その上に展開後のセ・ア膜を載せ, squeeze してろ紙と密着させた. そして, 37°C, 20min 反応, 染色した.

(2) 結果

ここで採用したそれぞれのアイソザイムは, 相互に重なり合うことなしに分布していることが明瞭であるが (Fig. 2-a, b), 染色されていない他の蛋白質とは明らかに重なっている. また, PMS 法より Diaphorase 法は感度が高く, ヒト血清の LDH isozyme の 2 次元展開像が本法で容易に得られた (Fig. 2-c). これは, 今後の臨床应用到に適した方法といえる.

3. リプリカ法による多重酵素染色

反応系が異なるために, 上記 2. のように同時に多種

類の発色が行えない場合でも, 前記⑥のリプリカ染色法を採用し, 数枚の重複展開したセ・ア膜をそれぞれ発色させることが可能であり, 多種酵素の位置的判断も決めやすい.

(1) 方法

2次元目の泳動の際に, セ・ア膜を3枚重ね合わせて展開する. その3枚の膜をそれぞれ, 異なった反応系で染色を行い, 2次元展開像として相互に比較する.

- a. 酵素 1 (SorbD) の反応による染色
- b. 酵素 2 (MAD) の反応による染色
- c. 酵素 3. (LDH) の反応による染色

(2) 結果

リプリカ法の採用により, 反応系の異なるアイソザイム像を容易に比較検討することができた (Fig. 3-a, b, c).

結 語

以上セ・ア膜 2次元電気泳動法についての概略を説明した. 基本的には方法としてはほぼ確立したといえ, 種々の応用が可能であることを示したが, その臨床応用等の経験が浅く, これからいろいろと検討しなければならないことが多く残されている. ここでは省略したが, この他に, セ・ア膜上で, 高感度の蛋白質染色法である銀染色法の適用は, 従来困難とされていたが, 検討の結果十分感度よく染色される方法・条件を見いだすことができた¹²⁾. また, 免疫化学的手法を組合せることもすでに検討していて, スポットの同定に十分役立つことがわかっている⁹⁾. これらの手法も加えて, 多くの方に利用されることを期待している.

2次元電気泳動法の実施に協力してくださった林依子, 新保靖志両氏に感謝します.

文 献

- 1) 大橋望彦, 戸田年総: 生物物理化学, 28: 1, 1984.
- 2) 大橋望彦, 他: 生物物理化学, 26: 191, 1982.
- 3) Toda, T. et al.: Anal. Biochem., 119: 167, 1982.
- 4) O'Farrell, P. H.: J. Biol. Chem., 250: 4007, 1975.
- 5) 真鍋 敬, 奥山典生: 生物物理化学, 26: 199, 1982.
- 6) 井上 勤, 他: 生物物理化学, 26: 183, 1982.
- 7) Hirabayashi, T.: Anal. Biochem., 117: 443, 1981.
- 8) 大橋望彦: 臨床検査, 26: 335, 1982.
- 9) Wirth P. J. and Vesterberg, O.: Electrophoresis, 9: 47, 1988.
- 10) Fujita, T. et al.: Anal. Biochem., 159: 8, 1986.
- 11) 黒田五夫, 他: 生物物理化学, 29: 403, 1985.
- 12) Fujita, T. et al.: Anal. Biochem., 139: 463, 1984.

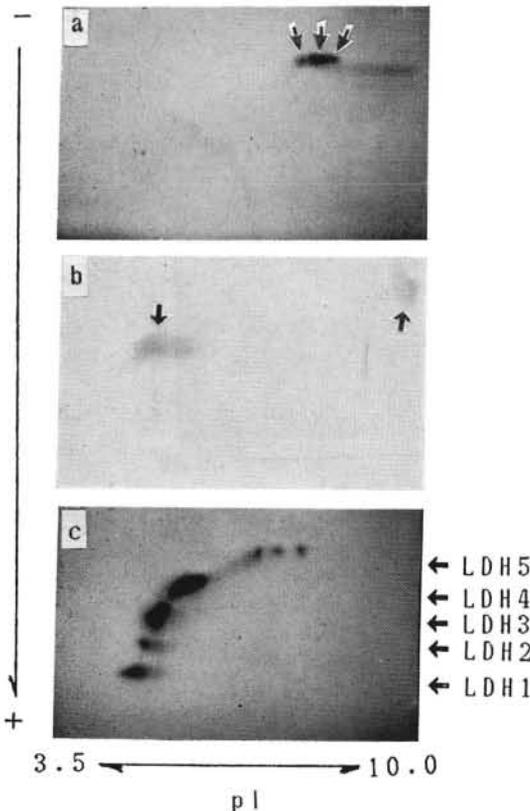


Fig. 3. Replicative staining method for independent color reaction of enzyme.

a: SorbDH isozymes on upper layer of piled CA membranes. b: MAD isozymes on middle layer of piled CA membranes. c: LDH isozymes on lower layer of piled CA membranes.