第 70 回日本電気泳動学会総会シンポジウム：
新規開発の電気泳動技術 2『キャピラリー電気泳動によるバイオ分析の諸相』
論文種目：総説

pH 勾配の *in situ* 検出がもたらしたキャピラリー等電点電気泳動法の進化

志 村 清 仁*

エースバイオアナリシス株式会社

(受付 2020 年 2 月 3 日, 受理 2020 年 3 月 23 日)

SUMMARY

For capillary isoelectric focusing, detection without moving a pH gradient, *i.e.*, *in situ* detection, is a key element to achieve high performance in terms of analysis time and robustness. Two types of *in situ* detection are carried out, *i.e.*, imaging and scanning. Imaging allows overall detection throughout a pH gradient at every moment of focusing. Scanning is also useful to get a focusing profile throughout a pH gradient after a steady state of focusing is achieved. The coupling with affinity techniques with capillary isoelectric focusing could provide a new option for the analysis of a specific protein in a biological sample.

Key words: capillary isoelectric focusing, *in situ* detection, imaging, scanning

1. はじめに

これまで市販されてきた多くのキャピラリー電気泳動装置は、キャピラリーの端近くに位置固定型の一点検出器を備えていた。この固定型一点検出器は、陸上競技の 100 メートル走のようにスタートラインから電気泳動を開始して、ゴールで検出するためのものである。固定型一点検出器は、ゾーン電気泳動では余り問題無く使われてきたが、走者がコースの途中で止まってしまう等電点電気泳動の場合は、そのままでは利用できない。キャピラリー等電点電気泳動 (CIEF) が真価を発揮するには、pH 勾配を動かすことなく、そのままの状態で検出する方法が必要である¹⁾。本稿では、そのような検出法を *in situ* 検出と呼ぶことにし、その現状を概観する。

2. pH 勾配の移動による検出

固定型一点検出器を持つ装置で CIEF を行う場合、等電点に焦点化して動かなくなったタンパク質を、いかにして検出点に移動させるかが問題になる (Fig. 1)。Hjertén と Zhu は 2 つの方法を提案した²⁾。一つは、陽極液にプロト

ン以外の陽イオンを添加する、あるいは陰極液に水酸化物イオン以外の陰イオンを添加することによって、pH 勾配全体の pH をそれぞれ上げる、あるいは下げる。その結果、焦点化したタンパク質に電荷をもたせ、電気泳動によって検出点に移動させる方法である。もう一つは、焦点化のための電場をかけつつ、一端に圧力を加えることでキャピラリー中の pH 勾配をそのまま検出点に移動させる方法である。圧力の代わりに、キャピラリー内壁の電荷に起因する電気浸透流を利用して動かす方もある。

これらの方法にはいくつかの問題がある。共通の問題は、各タンパク質ピークについては 1 回しか検出できない点である。焦点化に要する時間は、タンパク質の性質と pH 勾

Fig. 1 Mobilization of a pH gradient for detection with a static single-point detector

Evolution of capillary isoelectric focusing brought by the use of *in situ* detection of a pH gradient

Kiyohito Shimura

ACE BioAnalysis, Inc.

* Corresponding author: Kiyohito Shimura; ACE BioAnalysis, Inc., 5-6-48-402 Noda, Fukushima, Fukushima 960-8055, Japan

E-mail: shimurak@aceba.jp

第70回日本電気泳動学会総会シンポジウム：新規開発の電気泳動技術2『キャピラリー電気泳動によるバイオ分析の諸相』

配を形成する溶液の組成に依存するので、焦点化が十分であることを確認するには、焦点化時間を変えて少なくとも2回の実験が必要になる。電気泳動による移動では、検出されるタンパク質は電荷をもち、等電点にないことになるので等電点の決定には不向きである。圧力による移動では、ハーゲン・ポワズイユ流による焦点化バンドの広がりが起こる。電気浸透による移動では、内壁の電荷とタンパク質のイオンの相互作用が問題になりうることに加えて、焦点化時間の調節が困難である。

3. pH 勾配の *in situ* 検出

3.1 *in situ* 検出の強み

pH 勾配の移動による検出の問題点を上で述べたが、*in situ* 検出ではそれらの問題から開放される。*in situ* 検出では焦点化の過程において連続的に、あるいは繰り返し検出を行えるので、焦点化時間の最適化を1回の実験で行うことができる。また、pH 勾配を移動させるための時間が不要なので、分析時間を大幅に短縮できる。すなわち、固定点検出器で30～45分かかっていた分析を、5～15分で終わらせることができる。分析時間の短縮は、分析条件の最適化において極めて有利である。

キャピラリー電気泳動ではポリイミドで外壁を被覆したフューズドシリカキャピラリーがよく使われる。*in situ* 検出ではこの外壁のポリイミド層を除去したキャピラリーを用いる。ポリイミドの代わりに外壁を透明な樹脂で被覆したキャピラリーも市販されているが、光学的検出に適した均一な被覆をもつものは筆者の知る限りにおいてまだ現れていない。

3.2 イメージング検出

キャピラリー等電点電気泳動による分離結果をイメージング検出しようとした最初の試みはWuとPawliszynの屈折率変化によるものである³⁾。その後、彼らはUV吸収や蛍光のイメージング検出器も開発した。これらの方法は、シリンドリカルレンズによってシート状にした光をキャピラリーの側面から照射し、キャピラリーを透過した光の減弱またはキャピラリーから発する蛍光をフォトダイオードアレイやCCDカメラなどで検出するものである (Fig. 2)。

Wuらの開発したイメージング検出器から発展したCIEF装置は現在Protein Simple社から市販されている。島津製作所のMultiNAマイクロチップ電気泳動装置でも初期型ではCIEFのイメージング検出が行われていた。

3.3 走査検出

走査方式によるCIEFの*in situ* UV吸収検出はWangとHartwickによって報告されている⁴⁾。そこで彼らは固定点検出器と走査検出器のベースラインノイズの比較を行って

Fig. 2 Imaging detection (Adapted with permission from Wu & Pawliszyn, Anal Chem. 64; 1992:224-227. Copyright 1992 American Chemical Society)

Fig. 3 Scanning head of a scanning fluorescent detector

いる。280 nmにおける光吸収検出について、内径75 μm、外径360 μmのフューズドシリカキャピラリーのポリイミド外壁を取り除き、水を充填した状態で0.30 mm/sの速度での走査検出と静止検出のベースラインノイズを比較した。当然のことながら走査検出の方がノイズは大きいのだが、50 mmの走査においてその差は2倍程度にとどまった。検出感度の低下という問題はあるが、*in situ* 検出で得られる恩恵の大きさはそれに優る。

可視領域のレーザーを光源とする走査型*in situ* 蛍光検出器はShimuraらによって報告された⁵⁾ (Fig. 3)。レーザー光源では蛍光色素標識ペプチドについて極めて高い感度(0.1 pM)と解像度が得られた。これは、レーザー光の光エネルギーと波長純度が高く、容易に小さなスポットに絞ることができるからである。

非標識のタンパク質はトリプトファンの蛍光で検出できるが、これに適した280 nmのレーザーはまだない。しかし、この波長領域のLEDは利用できるようになった。志村らが開発してきたUV LEDを光源とする走査型蛍光検出器を備えたCIEF装置の概略をFig. 4に示す⁶⁾。

Fig. 4 CIEF instrument with a scanning fluorescence detector

この装置は逆 U 字形に配置したキャピラリーの陰極側の直線部に pH 勾配を形成して焦点化を行う。キャピラリーの陽極側には陽極液を充填する。陽極液は pH 勾配に比べるとかなり電気伝導度が高いので、両極間に印加した電圧のほとんどは pH 勾配にかかるようになる。したがって、pH 勾配の陽極端と実際の電極の位置が離れていても、問題にはならない。

キャピラリーの途中まで再現性よく陽極液を充填するために pH 勾配の陽極端の位置に非接触の電気伝導度検出器が設置されている。キャピラリーに試料と両性担体 (carrier ampholyte) の混合液を注入した後、電気伝導度の高い陽極液を注入する。電気伝導度検出器が伝導度の上昇を検出したところで注入を停止し、焦点化を開始する。分離結果の一例を Fig. 5 に示す。本装置の利点は、従来からあるキャピラリー電気泳動装置の基本的な構成を用いつつ、電気伝導度検出器と組み合わせることによって無理なく走査検出を可能にしたことである。本装置は現在日栄工業株式会社とエースバイオアナリシス株式会社が共同して市販機の開発を進めている。

4. アフィニティー技術との結合

タンパク質の分離法としては最も高い分離能力をもつ等電点電気泳動はアフィニティー技術と組み合わせることによって、さらにその有用性が高まる。Protein Simple社は内壁に光反応基を結合したキャピラリー内で等電点分離を

Fig. 5 Separation of the charge variants of Cetuximab using a CIEF instrument equipped with a scanning fluorescence detector

Experimental conditions: sample, Cetuximab 0.25 mg/mL in 2.5% (v/v) Pharmalyte 3-10; capillary, polydimethylacrylamide-coated fused-silica capillary, internal diameter 75 μ m; separation voltage, 10 kV; anode solution, 0.1 M phosphoric acid; cathode solution, 1 M sodium hydroxide; excitation 280 nm, emission 340 nm.

行った後に光照射によってタンパク質を内壁に固定し、ついで特異抗体を用いて蛍光染色や酵素染色を行うことによって極めて高感度な特異的検出を可能にした⁷⁾。光反応によるキャピラリー内壁へのタンパク質の固定は、ウェスタンブロットティングにおける膜への転写に相当する。抗体染色による蛍光や発光の検出はイメージングによって行われる。

一方、Shimuraらは蛍光標識した抗体断片をアフィニティープローブ (AP) として用い、APと目的物との蛍光性複合体をCIEFで分離してそのまま検出するAPCIEF法を開発してきた⁸⁾。pH勾配の形成に必要な両性担体が短波長のUVを強く吸収するために、非標識タンパク質の検出は280 nmの吸収または蛍光に限られ、高感度化が難しい。蛍光色素を標識として用いるAPCIEFでは、UV検出に比べて容易に1000倍以上の高感度化が可能である。また、分離も10分程度で完了するため、タンパク質分析の多くの局面で利用価値が高いと思われる。APCIEFには専用のAPが必要だが、プロテインエンジニアリングの発展に期待できるところは大きい。

Shimuraらはまた、アフィニティークロマトグラフィー (AC) とCIEFを直接結合した、ACCIEFが可能であることを示した⁹⁾。これは、nL ~ μ Lレベルの体積のアフィニティークラムで捕捉した目的物質をそのままCIEFで分離分析する技術で、低濃度試料の濃縮や妨害物質の除去も同時に可能である。この技術もCIEFの実用性を大きく広げることが期待できる。

5. おわりに

in situ 検出法によって CIEF は操作性, 分離能力, 作業時間のいずれについても大幅に改善される. *in situ* 検出が可能になった CIEF は, タンパク質の研究や産業利用の生産性を大幅に高めることになるだろう.

本論文に関して開示すべき利益相反状態は無い.

文 献

- 1) Shimura K. Capillary Isoelectric Focusing. In: Poole CF, ed. Capillary Electromigration Separation Methods. Elsevier; 2018. p. 167–187.
- 2) Hjertén S, Zhu MD. Adaptation of the equipment for high-performance electrophoresis to isoelectric focusing. J Chromatogr. 1985;346:265–270.
- 3) Wu J, Pawliszyn J. Universal detection for capillary isoelectric focusing without mobilization using a concentration gradient imaging system. Anal Chem. 1992;64:224–227.
- 4) Wang T, Hartwick RA. Whole column absorbance detection in capillary isoelectric focusing. Anal Chem. 1992;64:1745–1747.
- 5) Shimura K, Kamiya K, Matsumoto H, Kasai K. Fluorescence-labeled peptide pI markers for capillary isoelectric focusing. Anal Chem. 2002;74:1046–1053.
- 6) 志村清仁, 長井俊彦, 瀬戸善一, 福原修一. アフィニティークロマトグラフィーと等電点電気泳動の直接結合に最適な電気泳動装置. In: 大塚浩二, 編. 第34回 キャピラリー電気泳動シンポジウム 要旨集. 京都市: 日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会; 2014. p. 7–8.
- 7) O'Neill RA, Bhamidipati A, Bi XH, et al. Isoelectric focusing technology quantifies protein signaling in 25 cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103:16153–16158.
- 8) Shimura K, Kasai K. Affinity probe capillary electrophoresis of insulin using a fluorescence-labeled recombinant Fab as an affinity probe. Electrophoresis. 2014;35:840–845.
- 9) Shimura K, Nagai T. Capillary isoelectric focusing after sample enrichment with immunoaffinity chromatography in a single capillary. Sci Rep. 2016;6:39221 (Article number).