〔特集：最新のキャピラリー電気泳動とチップ電気泳動〕

マイクロゲル等電点電気泳動法の可能性を考える

真 鍋 敬

SUMMARY

Possibilities of micro gel isoelectric focusing were discussed considering; 1) the advantages of gel electrophoresis, 2) the advantages of gel isoelectric focusing using carrier-ampholytes, and 3) the advantages of micro gel electrophoresis system for the rapid separation of functional proteins under non-denaturing conditions. The importance to develop liquid handling systems in sub-microliter level was stressed for the future separation systems of high-molecular-mass protein complexes, in which the 2-D gel size would be around 1 cm×1 cm and all the separation processes should be automated.

Key words: gel isoelectric focusing, micro gel, carrier ampholytes, two-dimensional gel electrophoresis, protein complex.

1. はじめに

私がゲル電気泳動法とその関連技術の開発をテーマにしてからもう 33 年になります。今回の特集に寄稿させて頂いた機会に、①ゲル電気泳動法をなぜこれだけ長く使い続けているのか、②とくに両性担体溶液を使う等電点電気泳動にこだわっているのはなぜか、そして③なぜいまマイクロゲル等電点電気泳動の可能性を強調したいのか、の三点について整理させていただきます。

2. なぜゲル電気泳動法を使い続けているのか

私が内径 5 mm のガラス管中に作った円筒型のポリアクリルアミドゲルによる電気泳動法を使い始めたのは、1975 年 1 月に東京都立大学(以下すべて当時の名称を使います)理学部化学科の助手に採用されてからです。奥山典生教授に協力を求められたテーマは、ウシ脳のアミン酸化酵素の精製と構造解析でした。自分の博士課程のテーマがヒト血清セルロプラスミンの酸化酵素反応の速度論的解析でしたので、液体クロマトグラフィーによる水可溶性タンパク質の精製には比較的経験があったのですが、やはり組織中の膜タンパク質である脳アミン酸化酵素は難物で、結局結晶化には至りませんでした。1975 年といえば、ちょうど O'Farrell の大腸菌ポリペプチドの 2 次元電気泳動の論文¹⁾

が発表された年で、奥山教授からこの論文を見せられ、2 次元電気泳動を始めてみればと勧められました。タンパク質を一つ一つ精製してゆくテーマに学生時代から合計 7 年間かわり少し飽きていたことと、動物組織にはタンパク質が無数に存在するという実感を得ていたことから、「タンパク質を全部分離する」というテーマに興味を持つことができたのだと思います。

2.1. 装置が安価である

当時の私にとって、ゲル電気泳動法と液体クロマトグラフィーの違いの第一は、液体クロマトグラフィーはすでに HPLC の時代で、高価なポンプやカラム、検出器、フラクションコレクターを必要としたのに対し、ゲル電気泳動法は HPLC ポンプの 1/10 程度の価格で買える直流安定化電源(最大 500 V, 100 mA 程度)と同程度の価格の泳動装置さえあればすぐに始められることでした。装置が安価であるというゲル電気泳動法の特徴は、30 年経過した現在でもあまり変わっていません。キャピラリー電気泳動やマイクロチップ電気泳動の装置は、現在 HPLC 装置に匹敵する価格で販売されています。ゲル電気泳動法には他にも以下に述べる利点があるのに対し、ゲルを用いないこれらの電気泳動法が HPLC と同程度の性能/価格比を発揮できているのか、心配しているところです。

Possibilities of micro gel isoelectric focusing.

Takashi Manabe; 愛媛大学大学院理工学研究科環境機能科学専攻

Correspondence address: Takashi Manabe; Department of Molecular Science, Graduate School of Science and Engineering, Ehime University, 2-5 Bunkyo-cho, Matsuyama 790-8577, Japan.

(受付 2008 年 5 月 30 日, 受理 2008 年 7 月 25 日, 刊行 2008 年 9 月 15 日)

2.2. 分離されたタンパク質を見ることができ、その状態で保存できる

ゲル電気泳動法の、液体クロマトグラフィーと比較したときの利点の第二は、タンパク質を染色後、分離された様子が目に見える状態でゲルを保存できることです。現在ではゲル上のタンパク質は、いつでも取りだして各スポットを切り出し、ペプチドマスフィンガープリント法やMS/MS法で同定できるわけですから、ゲルを保存できることは非常に重要な意味を持つようになりました。ゲルが乾燥しないように10年程度保存するなら、①ゲルを一枚ごとに蒸発の少ないプラスチックバッグ（私達はコスモ・バイオ社ハイブリ・パックを使っています）にタンパク質固定液（7%酢酸など）ごとシーラーを使って封入し、②実験日ごとにゲル入りバッグをまとめてプラスチック袋に入れ、③さらにこれらをシール容器に入れて冷蔵庫に保存する、という注意が必要です。平板ゲル一枚には、CBB染色でも1次元電気泳動なら約100バンド、2次元電気泳動なら数百ないし約1000スポットが見えているので、ゲルサイズが縦8 cm、横10 cm、厚さ1 mmとしても、体積8 cm³という小容器に相当します。私達が常時用いているマイクロ2次元ゲル（脱染色後のサイズは縦40 mm、横40 mm、厚さ1 mm）では、CBB染色で細胞タンパク質約300スポット（銀染色で約800スポット）を検出できますが、これは体積1.6 cm³の小容器に相当します（実際は固定液入りバッグに保存するので体積はこの倍程度）。分離能の高い液体クロマトグラフィーでタンパク質を100分画にできたとして、これらを保存するには100本のサンプル管（サンプル管が1.5 mLのチューブでも、高さ5 cm、縦12 cm、横12 cm程度、体積720 cm³程度のサンプル管立て）が必要で、しかもサンプル管同士は見かけ上区別できませんから、一本ごとに日付や分画番号などを記録する場合があります。これは大変な労力です。また、希薄水溶液状態でタンパク質を保存すると、大気中に浮遊するカビの胞子など細胞性微粒子の混入によって分解を受ける可能性が高くなります。ただし、液体クロマトグラフィーの場合は、LC-MSのように分離しながら連続的にタンパク質の解析ができる便利さがあります。キャピラリー電気泳動やマイクロチップ電気泳動は液体クロマトグラフィーと同様で、CE-MSのように連続的にタンパク質の解析ができますが、分離されたタンパク質を分画保存することは困難です。

2.3. 高分離能で、2次元分離が簡単にできる

「ヒトは何種類のタンパク質をもつか」という33年前の私の疑問は、まだ解決できていません。糖鎖構造の違いやリン酸化の程度の違いなどを無視して、アミノ酸配列が違うことだけでタンパク質を区別するとしても、数千から数万種類の間だろうと考えています。生命体の機能はこれ

らのタンパク質の機能が総合された結果であり、個々のタンパク質の機能とは、そのタンパク質だけがかかわることのできる酵素反応あるいは結合反応という化学反応ですから、生命体の機能を理解するためには数千ないし数万のタンパク質をそれぞれ取りだしてどのような機能を示すのか調べたうえで、複雑な機能を再構成する必要があります。タンパク質はアミノ酸の線状ポリマーであるポリペプチドが基本構造ですから、互いに性質が非常に似通っていて、多数のタンパク質を分離するには①ポリペプチド鎖の長さの違いに基づく分子サイズの違い、②ポリペプチド鎖を構成するアミノ酸の配列の違いに基づく電荷量の違いや等電点の違い、という基本的に二種の方法が使われています。ゲル電気泳動法でいえば、①にはSDSゲル電気泳動または密度勾配ゲル電気泳動法が、②にはゲル等電点電気泳動が対応しています。液体クロマトグラフィーでいえば、①にはゲルパーミエーションクロマトグラフィーまたは逆相クロマトグラフィーが、②にはイオン交換クロマトグラフィーが対応しています。タンパク質の分離能を比較すると、ゲル電気泳動法は二種の方法とも100成分程度を分離できるのに対し、液体クロマトグラフィーではどの方法も20ないし30成分を分離できる程度です。この違いの原因は、液体クロマトグラフィーでは現在のところ固定相として直径3ないし5 μm の粒子形の充填剤が使われており、これが移動相液体の均一な移動を妨げるためであろうと考えています。ゲル電気泳動の支持体ゲルを分子レベルで考えると、その網目はゲル全体にわたって均一で（充填剤のような大きな粒子がないという意味です）、そのすきまはちょうどタンパク質の直径程度（数nmないし数十nm）と考えられ、しかも液体はこの網目に保持されて対流が抑えられていますから、高い分離能が得られます。しかも、ゲル電気泳動では二つの分離原理を組み合わせた2次元分離が簡単に実施できるのに対し²⁾、液体クロマトグラフィーでの2次元分離にはカラムスイッチングなど複雑な装置設計が必要になります³⁾。また、キャピラリー電気泳動は1次元のゲル電気泳動に匹敵する高い分離能が得られますが、試料量が少ないため分離後引き続きタンパク質の構造解析をすることが困難です。構造解析のためには、1次元目にキャピラリー等電点電気泳動を用い、非常に高感度なフーリエトランスフォームイオンサイクロトロン共鳴質量分析法(FTICR MS)と組み合わせる方法が報告されています⁴⁾。

3. なぜゲル等電点電気泳動法なのか

前節では、なぜ私がゲル電気泳動法を使い続けてきたかを紹介しました。ここでは、なぜ私が本稿でとくにゲル等電点電気泳動法を取り上げるのかを説明します。

3.1. 固定化 pH 勾配ゲルと両性電解質混合物添加ゲル

現在のところ、複雑なタンパク質集合体の 2 次元ゲル電気泳動による分離の論文では、ほとんどの場合「変性条件の 2 次元電気泳動」が使われ、その 1 次元目の等電点電気泳動ではポリアクリルアミドゲルに塩基性解離基と酸性解離基を共有結合させた「固定化 pH 勾配ゲル（以下 IPG ゲルと略します）」が使われています。一方、私は 2 次元ゲル電気泳動を始めてから 32 年間両性電解質混合物（市販品名アンフォラインなど）をゲル中に含ませる（以下両性電解質ゲルと略します）タイプの等電点電気泳動を使っています。つまり、2 次元電気泳動の 1 次元目としてのゲル等電点電気泳動法には二種類あって、両性電解質ゲルはあとで述べる欠点のために使う人が非常に少なくなり、IPG ゲルに置き換わっているのが現状です。たとえば *Electrophoresis* 誌の 2007 年 9 号から 2008 年 8 号まで計 24 号には、2 次元ゲル電気泳動に関する論文が 36 報掲載されていますが、86% にあたる 31 報が IPG ゲルを用いたものです。電気泳動に関連した方法に重点をおいた *Electrophoresis* 誌でこの状態ですから、*Proteomics* 誌など、プロテオミクスの応用に重点をおいた雑誌では 2 次元ゲル電気泳動の論文の 95% 以上が IPG ゲルを用いているものと思われます。IPG ゲルを開発し、1982 年に発表した P. G. Righetti は活動的な研究者であると同時に文学的表現に秀でた文章家でもあり、両性電解質ゲルをあらゆる機会をとらえて皮肉たっぷりにこき下ろしています。つまり、現在両性電解質ゲルは雄弁な検察官から有罪判決を求められており⁵⁾、今のままでは国選弁護人さえついていない状態です。そこで、私は微力ながら本稿で被告人の弁護を試みようというわけです。

3.2. 両性電解質ゲルによる等電点電気泳動の問題点

両性電解質ゲルの問題点としてあげられているのは以下の諸点です。

- ① 泳動の時間経過とともにゲル中の両性電解質分子が電極槽側へ移動し、pH 勾配がなだらかになる。
- ② pH 勾配が pH 3.5 から pH 8.5 の範囲に限られ、とくに等電点 8.5 から 10 までのタンパク質は分離できない。
- ③ 両性電解質混合物はアクリル酸とアミンの重合反応によって作られた（この方法は Ampholine の場合）多数の分子種を分画して市販されているもので、一般構造は提案されているが個々の分子の構造が明らかでない。また、これらの分子がタンパク質と結合するなどの問題が予想される。
- ④ ③と関連して、商品によって分子の基本構造が異なり、製造元が違えば分離パターンが部分的に変化することがある。また、同一商品でも、ロットの違いによって分離パターンが異なることもあり得る。

IPG ゲルは、重合させる前のアクリルアミド溶液に、た

例えば円筒ゲルであれば円筒の一番下に加える溶液には酸性の解離基をもつイモビライン分子が含まれ、一番上に加える溶液には塩基性の解離基を持つイモビライン分子が含まれるように、イモビラインの濃度勾配を作ります。イモビライン分子はアクリルアミド分子と同様に分子内にビニル基 ($\text{CH}_2=\text{CHR}$) をもつので、この状態で重合させればアクリルアミドポリマーの鎖に塩基性基と酸性基が共有結合で固定化でき、しかも解離基の濃度勾配ができることになります。このゲルで等電点電気泳動を行えば、上の①から④の問題点はすべて解決できる、というのが Righetti の主張です。

3.3. 反論と私の考える IPG ゲル等電点電気泳動の問題点

一方、3.2 の①から④の主張に対する私の反対意見は以下のとおりです。

①について：両性電解質分子の移動による pH 勾配の変化は、タンパク質の等電点への収束がほぼ達成されたあとで顕著になるので、泳動条件を固定すればタンパク質の分離とその再現性は保証できる。

②について：pH 勾配の範囲が狭いことは問題であるが、両性電解質ゲルでもアミンや塩基性両性電解質を追加することによってこれを克服できる可能性は残されている⁶⁾。

③について：構造が明らかでないために、一部の両性電解質分子がタンパク質と結合して構造解析を妨げるなどの可能性はあるが、実際に私達がヒト血漿タンパク質についてマイクロ 2 次元電気泳動ゲル上の全スポットの質量分析をしたところ (Fig. 1)⁷⁾、これを示唆するような結果は得られなかった。

④について：製造元を一社に決めてしまえば（私達はずっと Ampholine を使っています）、分離パターンの再現性に問題がないことは確認できている。少なくともここ 10 年間の経験では、ロット間で分離パターンの違いはない。

さらに、私が結果として IPG ゲル法を 2 次元ゲル電気泳動に使わなかったのは、この「模範的善人」にも以下のような問題点があるからです。

① 研究者が自分で IPG ゲルを調製するのが非常に困難である。そこで市販 IPG ゲル薄切片を使うことになるが、市販品のサイズは 7 ~ 24 cm の範囲であり、私が 28 年間続けてきたマイクロ 2 次元電気泳動（等電点ゲルの長さ 3.5 cm）には対応していない。

② IPG ゲルは変性条件での等電点電気泳動については泳動条件の最適化が進められているが、タンパク質の機能やタンパク質相互作用を解析するための非変性条件での等電点電気泳動については、ほとんど報告がない。（実はイモビラインが売り出された直後に自分で IPG ゲルを作って非変性条件のマイクロ 2 次元電気泳動に使ってみたのですが、タンパク質が IPG ゲル中に沈殿したままで、2 次元目方向

Fig. 1. A non-denaturing micro 2-DE pattern of human plasma proteins⁷⁾.

A human plasma sample (2 μ L) was subjected to 2-DE in the absence of denaturing agent. A micro IEF gel (i.d. 1.4 mm, length 35 mm, 4.2% T and 5% C polyacrylamide gel) containing 2% Ampholine pH 3.5–10 and 0.5% Ampholine pH 3.5–5 was employed for the IEF step. The 2-DE gel was stained, destained, and all the CBB-stained spots were numbered. The gel size after destaining was 40 mm $\times$ 40 mm $\times$ 1 mm. All the numbered spots (157 spots) were excised and subjected to in-gel digestion and the tryptic peptides were extracted and analyzed by MALDI-TOF MS, followed by peptide mass fingerprinting for the assignment of polypeptides. As for the results of the polypeptide assignment, please refer to the original paper⁷⁾.

に少しずつ流れ出したことを示す多くの濃い縦線が観察されました。可溶性の両性電解質にはタンパク質の等電点沈殿を妨げ安定化する効果があるといわれていますが、IPGゲルではこれが存在しないためと考えています。）

③ タンパク質複合体はみかけの分子量が1000万Daあるいはそれ以上にもなると考えられるが、これらの高分子量複合体の分離には、支持体をアガロースゲルあるいは溶液だけとする必要がある。しかし、IPGゲルはポリアクリルアミドゲルを支持体として使うことを前提にしており、この方向への発展性がない。

これらIPGゲルの問題点は、両性電解質ゲルですでに対応できていますので、私は全体として両性電解質ゲルの方が実的に有利な方法であると判断しています。また、IPGゲルの効用が強調されすぎたために、その欠点がゲル等電点電気泳動法全体の欠点であるように誤解されていることはここで述べておく必要があると思います。Blue-native 2次元ゲル電気泳動など、ディスクゲル電気泳動タイプの電気泳動法を組み合わせる2次元分離の論文が増えてきている⁸⁾のは、上に述べたIPGゲルの欠点②を経験して、

ゲル等電点電気泳動法そのものに失望した研究者によるものと思われます。実際には、両性電解質ゲルで膜タンパク質など水に難溶性のタンパク質を非変性条件で分離する方法については、正面から取り組んだ報告がほとんどありません。予想される困難は、膜タンパク質をNP-40やTriton-100のような非イオン系界面活性剤で可溶化したあとで等電点電気泳動にかけると、タンパク質とともに界面活性剤が濃縮されてミセルとなって沈殿を形成し、タンパク質の移動を妨げることです。私は、臨界ミセル濃度の高い β -オクテチルグルコシドのような非イオン系界面活性剤を使用すれば、分離できるのではないかと考えています。

4. なぜマイクロゲル等電点電気泳動なのか

本稿で私が述べたいことの第三、「マイクロゲル等電点電気泳動の可能性」は、前節3.3のIPGゲルの問題点③に関係しています。「ヒトは何種類のタンパク質を持つのか」という疑問は残ったままですが、非変性条件の2次元ゲル電気泳動を使って、ヒト血漿タンパク質同士の相互作用について情報が得られることがわかってきました⁹⁾。そこで、私の興味は次第に「タンパク質同士がどのように協同して複雑な生体機能を発揮しているのか」という点に移ります。ところが、みかけの分子量が数十万Da以上数千万Daにわたると考えられるこれらタンパク質複合体を、高分離能にかつ簡便に分離する方法はまだ確立されていません。もちろん液体クロマトグラフィーで分離することはできるはずですが、私としてはタンパク質複合体をより簡便に分離できる電気泳動法が開発できるはずだと考えています。また、タンパク質複合体について高い分離能を得るには、タンパク質の場合と同様に電荷の違いとサイズの違いを組み合わせるしかないと思われます。そこで、私達は従来使ってきた非変性条件のポリアクリルアミド-両性電解質ゲル(分離できるのは分子量約百万Da程度まで)をアガロース-両性電解質ゲルに置き換えることで、分子量範囲を一千万Da程度まで広げようとしています。

4.1. ゲルの長さ

タンパク質複合体の分離のための方法を考えるとき、一番の問題になるのは両性電解質ゲルの長さです。非変性条件でタンパク質を分離しようとすると、タンパク質混合物試料に必ず含まれているプロテアーゼによって加水分解がおこる可能性がある¹⁰⁾ので、ゲルを5°C程度に保持した泳動液に浸して冷却しながら、できるだけ短時間のうちに分離する必要があります。私達は長さ14cmの両性電解質ゲルを使って2次元電気泳動をする場合もありますが、その際の等電点電気泳動の時間は終夜すなわち16時間程度にしています。長さ3.5cmの両性電解質ゲルでは泳動時間は約70分ですから、ゲルの長さを1/4にすると、最適な分離

のための泳動時間は1/14になり、泳動時間を劇的に短縮できることがわかります。なお、タンパク質複合体のように見かけの分子量が大きいと、ゲル中の移動速度は小さくなるはずですから、ゲルを短くするだけでなく、ゲル濃度は、取り扱いに不便のない範囲でできるだけ低くする必要がありますでしょう。

4.2. ゲルの断面積

分離できるタンパク質の総量は支持体ゲルの体積、すなわち断面積×長さ按比例するはずですから、断面積はできるだけ大きくしたいのですが、断面積を大きくすると分離能が低下するので限度があります。むしろ、分離能を維持するためには、ゲルの長さを短くしたらそれに応じて断面積も小さくする必要がありますでしょう。ただし、タンパク質およびタンパク質複合体が分離できたら、引き続きこれらの構造解析もしたいので、それを可能にするだけの試料量は欲しいところです。現在私達が使っているマイクロ2次元ゲル電気泳動の両性電解質ゲルは長さ35 mm、直径1.4 mmですから、断面積は1.5 mm²、体積は54 μLです。仮に長さを20 mmにし、直径を1.0 mmにすると、体積は16 μLとなり、試料量は約1/3にする必要があります。長さ10 mm、直径0.7 mmにすると、体積は3.8 μLで、試料量は現在の1/14になります。実は、今使っているマイクロ2次元ゲルからタンパク質スポットを切り出し、トリプシンによるゲル内消化後MALDI-TOF MSにかけると、私達は質量分析ーペプチドマスマスフィンガープリント法が実に高感度なタンパク質構造解析法であることを毎回実感させられます。トリプシンで分解されたペプチド断片の溶液1 μLとマトリックス飽和溶液1 μLを混合したもののうち1 μLをMALDI-MSのターゲットプレートに載せて乾燥させると、マトリックス結晶が直径3 mm程度の白色スポットとして目視できます。レーザーをあててペプチド断片の質量/電荷スペクトルを得るのには、このスポット面積の1/100程度以下の面積しか必要なく、私達はいつも大量のペプチド断片を調製しては捨てていることになります。つまり、かりに試料量が1/14になっても、質量分析計の感度はまだ充分に余裕があるわけです。

4.3. 微量体積取り扱い技術の総合的開発

以上のように、等電点電気泳動のゲルの長さを10 mmにし、アガロースゲルを使えば、おそらく分離に要する時間は5分以下になり、しかもまだタンパク質の構造解析に十分な試料量をかけられることがわかります。では、なぜその方向に踏み出せていないのかといえ、①タンパク質複合体も2次元分離する必要があるが、面積1 cm²のゲル上に100個のスポットが分離できても、これらを区別して切り出す方法がない、②切り出しに限らず引き続くすべての

操作で、各種溶液を0.1 μLあるいはそれ以下のレベルで取り扱う必要があるが、その方法がない、という理由です。①の切り出しについては、いちいち染色スポットをねらって切り出さなくても、ゲル全体をたとえば0.25 mm×0.25 mmの切片にし、(40×40=)1600個の切片を全部質量分析にかける方法で解決できますが、それにしても手操作で0.25 mm角に切るのは難しいでしょう。現在用いているマイクロゲルのサイズは、人間が手操作で処理できる限界に近づいており、さらなるマイクロ化をめざすためには、nLレベルの微量体積取り扱い技術の総合的開発が必要です。この技術が開発できれば、予想されるのは1 cm²程度のマイクロチップ型のゲルで、タンパク質やタンパク質複合体の2次元分離から質量分析による構造解析までを全自動でやってしまう装置です。キャピラリー電気泳動から始まりマイクロチップ電気泳動、さらには溶液システム全体のマイクロ化・ナノ化が進んできましたが、これらはいずれ全体として総合され、化学や生命科学の多くの分離・解析法がマイクロ化・ナノ化への劇的な変化を遂げることになるように思われます。タンパク質とタンパク質複合体の分離・解析システムの開発も、この大きな流れの一部分にしか過ぎないのかもしれない。

5. おわりに

2次元電気泳動のマイクロチップ化は研究者一個人の手には負えないので、大きなプロジェクトチームが必要になるでしょう。卒業研究生や博士前期課程の大学院生と一緒にほそぼそと、しかし楽しみながら続けてきた手作り装置の開発と改良の時代が終わりつつあることを認識するのは少し抵抗もありますが、これはタンパク質集合体成分の一斉分離という狭い目的に限った時の話です。生命活動の諸過程についてはまだまだわかっていないことが無限にあり、その研究の最前線では新しい分離・解析法の開発が必要になるはずで、それを支えるのは現場の研究者や学生の熱意と創意であることはいつまでも変わらないと考えています。

文 献

- 1) O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 1975;250:4007-4021.
- 2) Manabe T, Hayama E, Okuyama T. Microscale multisample two-dimensional electrophoresis of proteins in human serum, cerebrospinal fluid and urine. Clin Chem 1982; 28:824-827.
- 3) Isobe T, Uchida K, Taoka M, Shinkai F, Manabe T, Okuyama T. Automated two-dimensional liquid chromatographic system for mapping proteins in highly complex mixtures. J Chromatogr 1991;588:115-123.
- 4) Manabe T. Analysis of complex protein/polypeptide systems for proteomic studies. J Chromatogr B 2003;787:

- 29–41.
- 5) Righetti PG, Simo C, Sebastiano R, Citterio, A. Carrier ampholytes for IEF, on their fortieth anniversary (1967–2007), brought to trial in court: The verdict. *Electrophoresis* 2007;28:3799–3810.
 - 6) Manabe T, Toyota Y, Miyamoto H. Carrier ampholyte-based separation of basic proteins using micro two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Chromatography* 1997;18:169–174.
 - 7) Manabe T, Jin Y. Assignment of human plasma polypeptides on a nondenaturing 2-D gel using MALDI-MS and PMF and comparisons with the results of intact protein mapping. *Electrophoresis* 2007;28:843–863.
 - 8) Krause F. Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. *Electrophoresis* 2006;27:2759–2781.
 - 9) Manabe T, Jin Y. Analysis of protein/polypeptide interactions in human plasma using nondenaturing micro 2-DE followed by 3-D SDS-PAGE and MS. *Electrophoresis* 2007;28:2065–2079.
 - 10) Manabe T, Jin Y, Yamaguchi N, Sugiyama T, Ikari K. Cleavage of fibrinogen alpha chains during isoelectric focusing of human plasma under non-denaturing conditions analyzed by micro two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Electrop* 2007;51:27–34.