Sephadex 薄層クロマトによる血清蛋白の分析*

右 田 俊 介**

Summary

Basic conditions for the quantitation of serum protein fractions by thin layer gel filtration were investigated. The pattern of serum transferred on filter paper was recorded by an automatic recording densitometer and revealed 3 components (M, G, and A components) of serum protein corresponding to 19S, 7S and 4S by ultracentrifugation. Quantitative changes of the 3 components were characteristic in myeloma, macroglobulinemia, nephrosis and polyclonal hypergammaglobulinemia. The advantages of the thin layer gel filtration were not only its speed and its adaptability to very small amount of sample, but also its better separation than ultracentrifugation in certain molecular weight range.

Sephadex は reverse molecular sieve として Porath らによって開発され、カラムクロマトとして各方面に利用されている。これを薄層クロマトとして血清蛋白の分離に用いたのは、Morris¹⁾, Johanson²⁾ らによって 1964 年に発表されたのが最初であった。我国には守屋³⁾ によって紹介されたが、著者はこの方法を簡単に行うことが出来るように、また定量的に表現出来るように改良を試みた。その結果血清蛋白は 4S, 7S, 19S, の 3 成分に相当する 3 つの band に分離し、デンストメトリーによりその変動を追求することが可能であることが判明した。

方 法

1. 準備, Sephadex G-100, G-200, G-100 superfine, G-200 superfine (夫々 G-100 sf, G-200 sf と略), Biogel 60, DEAE-Sephadex を検討した。gel の溶媒としては 0.15M 食塩水, 磷酸緩衝食塩水 pH 7.0 (PBS), 1 M プロピオン酸 (PA), 20% 2 クロロエタノール水溶液 (2CE), 2 M 尿素水溶液を検討し、いずれも使用可能であった。

溶媒には防腐剤として 3% に n-ブタノールを混じた。gel は使用に先立って 24 時間以上十分溶媒に膨潤させ、上清の部分を捨ててゲルだけを残した。その際の gel の濃度は G-100 sf では 5.5%, では G-200sf 4% である。薄層を作るのに図 1 のような数板のガラス板、クロマトを行うスプラチックケース 26×17×8 cm, 緩衝液槽としてバターケースなどを用意した。

2. 薄層ゲルの作り方, 粒子の大きい 120~140 メッシュの, G-100, G-200, Biogel 60, DEAE-sephadex などの

場合と、400 メッシュ以上の G-100sf, G200sf の場合で作りがことになる。sf の場合は図 1 のように厚さ 3 mm の

図 1 Procedure for Thin Layer Chromatography of Sephadex Gel

5×20cm のガラス片を周囲におき、その中においたガラス板の上に 25ml のゲル (5.5% G-100 sf 又は 4% G-200 sf) を置き、ガラス板より 1 mm 高い周囲の堤防の上

* Serum protein analysis by thin layer gel filtration, 第16回電気泳動学会総会におけるシンポジウム「薄層クロマトグラフィー」における講演

** Shunsuke Migita, 京都大学ウイルス研究所, Institute for Virus Research, Kyoto University

(110) 生物物理化学

をガラス棒をローラーとして押すと、gel は広げられて 1 mm の厚さの薄層板を作ることが出来た。次に粒子の大きな通常の gel 薄層を作るには、5 mm の厚さの 5 × 20 cm のガラス片 4 枚を 3 mm の厚さのガラス片の代りに堤防として用いた。一旦膨潤させ、上清をのぞいたゲル 17 乃至 20 ml を 3 倍に稀釈して中央のガラス板の上に徐徐に注ぐ、gel 粒子はガラス板上に沈み、上清はガラス板とガラス片の隙間より洩れて、5 分位待っているとガラス板上に薄層が形成される。粒子も多少洩れるが隙間を小さくすれば防止出来る。gel の厚さは 0.5 乃至 1 mm となる。水平な湿室に保存して、一ヶ月位は使用出来る。

3. 試料の添加、図 2 のごとく 1.5 cm 間隔で 6 試料を

図 2

spot でおく場合と、3 試料を 1.5 cm のバンドとして、沔紙 1.5 × 0.08 cm にしみこませて、原点に置く場合があった。定性分析のためには spot で十分であったが、定量のためにはバンドで置くことが必要であった。

尙試料添加の前には 1 時間以上、後にのべる展開の時と同じ条件で予備流下させて、緩衝液を十分平衡に達せしめ、試料の添加に際しては柔い gel 薄層を傷つけないように注意した。試料と共に流下させる marker としては Blue Dextran (Pharmacia)、ヘモグロビン、BPB (Brom phenol blue) 加血清 (アルブミン) など着色物質を用いると、展開中その進行を確かめることが出来た。またそれ以外に分子量のことになる蛋白質の混合物、例えば卵白リゾチーム、Bence Jones 蛋白、血清アルブミンなどの精

製蛋白混合物を一緒に展開すると、染色後に図 3. 4 より未知試料の分子量測定に用いることが出来た。

図 3 Lysozyme (1.6×10^4) (括弧内は分子量)
Bence Jones prot. (4×10^4)
Albumin (7×10^4)
 γ G immunoglobulin, norm. (16×10^4)
 γ A immunogl., myeloma, Kira. (32×10^4)
 γ M immunogl., pathologic, Na. (90×10^4)
(G-200sf, PBS による)

4. 展開：図 1 のごとく、プラスチックのケースの中にバターケースを置き、これに斜めに薄層板を立て掛ける上端及び下端は沔紙で連絡して緩衝液を流した。蓋としてはガラス板でおおい、重しをおいて気密とした。プラスチックケースの底にもガラス板を置き、このガラス板を傾斜させて薄層ゲルの傾斜を加減し、流速を変えることが出来た。展開の途中で傾斜を変えて流速を変更しても、悪影響があるようには思われなかった。

通常角度は 20° で、Blue Dextran の spot が 10 cm 移動するまで展開を行った。時間は大体 3 乃至 4 時間で十分であった。G-200 と G-200 sf では後者の方が流速が遅く、分離はきれいであった。10 cm 以上の展開を行うと diffusion により spot が大きくなるために、必ずしも分離像がよくなるわけではなかった。

5. 展開後の操作：Blue dextran が 10 cm 移動した際に展開をやめ、薄層ゲルを取り出して、その上に 10 × 20 cm の東洋沔紙 No 2 を静かにあてて、気泡がゲルの間に入らないように注意して密着させ、これを直ちに $180^\circ \sim 200^\circ \text{C}$ のガス乾熱滅菌器中で 4 ~ 5 分間で乾燥させた。これより低い温度で乾かすと乾燥の際にボタンが移動して乱れることが判明した。

染色液の処方

a). アミドブラック 10B	30g
氷 酢 酸	100ml
メタノール	450ml
水	450ml
b). ポ ン ソ ー 3 R	4 g
トリクロール酢酸	30g
水	1000ml

図 4

a) 又は b) に20分間染色し、次いで5%酢酸中水で洗条脱色した。この時ガラス板に附着していた汚紙ははなれるので、以後は汚紙の方だけを取扱った。汚紙には乾燥した Sephadex 粒子が附着してザラザラしているが、指にておとして平滑にしておくことが、後に行うデンストメトリー上必要であった。

6 デンストメトリー：汚紙電気泳動用（自記式複光路）デンストメーターを用いてアミドブラック染色の場合570mμで測定した。

結 果

展開距離と分子量の関係：最初に分子量既知の試料を用いて、この方法によって展開される距離と分子量の関係をしらべた。図3及び図4に見られる如く、移動距離は試料の分子量の対数値と直線関係にあることがわかったが、直線部分を示す分子量の範囲は Sephadex の種類により異なり、Blue dextran が10cm 移動する際の他の試料の移動距離は Sephadex の粒子の大きさ、溶媒などにより異なることが明らかとなった。血清蛋白を分析する立場からは、19S の IgM, 7S の IgG, 4S のアルブミンなどを区別するためには G-200sf が適しているが、この方法では、9S の IgA, 分子量約32万は分子量約90万の IgM と区別が出来ない欠点がある。またアルブミン以下の分子量のものは G-100sf の方が G-200sf がより分離がよい。しかし、G-100sf では 7S の IgG 以上の成分はすべて同じ移動距離を示し、区別出来なかった。sf に比べて粒子のやや大きい通常の G-200 は IgA と IgM の分離には却って適しているが、tailing があって一般的には分離には明確さを欠いた。即ち一つの方法ですべての領域にすぐれた方法はなかったが、G-200sf と PBS の組合せが最も一般的な方法であると思われた。

正常人血清蛋白：G-200sf と PBS を用いて展開し 2μl の試料を1.5×0.08cm の汚紙にしみこませて薄層上に添加すると、4~5 時間で目標として用いる Blue Dextran が10cm 程度移動し、血清は3つのバンドに分離した。図5これは血清中に存在する 4S (A成分), 7S (G成分), 19S (M成分), の3成分に相当すると考えられた。デンストメトリーによる3例の平均値は A, G, M, が 56.8, 33.8, 9.5% であった。展開に時間をかけて各ピークの間隔がもっと大きくなるようにすると、各ピークの拡散もやや

図 5 Thin layer chromatogram of normal & pathologic sera by Sephadex G-200 gel filtration with PBS

Samples: 1, normal 2, chronic hepatitis 3, pulmonary tbc. 4, hypogamma & inf. 5, pulmonary inf. 6, periarteritis nodosa.

大きくなって分離はかえってわるくなった。

次に各種疾患時の血清蛋白像をこの方法で検討した。その結果従来超遠心分析によって知られていたパターンが、この方法によっても容易にうることが出来ることが明らかになった。

骨髓腫：3例の γ G-骨髓腫の血清ではいずれもG成分が著しく増加し、M成分はかえって減少し、或いは消失していた。4例の γ A-骨髓腫では、G成分の増大したG骨髓腫のものが1例、他の3例はG成分とM成分が共に増加した特異的なパターンを示し、しかもGとMの分離はわるく、GとM成分の間に連続的に分布する成分の存在がうかがわれた。3例のLicht chain 骨髓腫では、2例ではGとM成分の減少のみ認められ、1例少量の電気泳動的に均一な γ A免疫グロブリンをもつ例で γ A骨髓腫に特有のパターンが稀釈された形で見られた。G-100sfを用いてこれらの血清中にBence Jones 蛋白を証明しようとしたが2 μ lの血清を試料する通常の方法では、証明出来なかった。

マクログロブリン血症：2例のマクログロブリン血症ではM成分の著しい増加が見られ、G成分は減少していた。本症の診断にこの方法は有効であった。

ネフローゼ症候群でA成分の減少、M成分の増加によりA, G, M成分がほぼ等しい特異的なパターンを示した。この際増加したM成分はズダンブラック染色によりリポ蛋白であることが判明した。

慢性感染症：関節ロイマ、慢性肺感染症、Systemic Lupus Erythematoses などの際はG成分が増加するが、M成分の増加を伴って成分Gが増加する場合と、伴わないでG成分だけ増加する場合があることが明らかとなったが、どのような際にその区別が生ずるのか明らかでな

かった。

肝疾患：肝硬変症についても慢性感染症の際と同様の関係があった。

臍帯血：正常人血清よりA成分の割合が多く、GとM成分は共に減少していた。

以上各種疾患時の血清のパターンは超遠心分析によるパターンと類似の像を示し、この方法が超遠心分析に代りうるものであるかどうか更に追求する必要性を暗示した。超遠心法による定量値とは完全に一致しなくても、その簡易性によって著しくすぐれていることは論をまたないところであって、丁度Tiseliusの電気泳動法が沔紙電気泳動に代ったと同じ関係が、超遠心法と薄層クロマトによるゲル沔過法の間にも成立つかもしいない。

結 論

Sephadex ゲルによる薄層クロマト法を改良して、デンストメーターによる定量が可能な方法を考案した。その方法について稍詳細にのべ、その基本的諸条件を検討した。これを用いて疾患時血清蛋白分画の変動を追求した結果についても簡単にのべた。この方法は単にカラムクロマトを行う諸条件を決める際の予備的な取扱いとして用いうるだけでなく、その定量値をもって超遠心分析法に代りうる方法として用いうる可能性が、十分存在することを認めた。

文 献

- 1) Morris C. J. O.: chromatography, 16, 167 (1964)
- 2) Johanson, B.J. and Rymo L.: Acta chemi, Scand., 18, 217 (1964)
- 3) 守屋 寛: 蛋白質核酸酵素 10, 882 (1965)