〔原 著〕

高速液体クロマトグラフィーによる アポ蛋白の単離と分析

松浦尚志・古賀俊逸・宮田康司*

SUMMARY

Using the molecular sieve high performance liquid chromatography (HPLC), we analyzed human serum apolipoproteins and attempted to isolate them. The apolipoproteins obtained from human serum very low-density lipoproteins (VLDL), high-density lipoproteins (HDL) and lipoprotein depleted serum were chromatographed on TSK G3000SW column. HPLC was performed in 6M urea (pH3.15) or 0.1M Tris-buffered 4M guanidine hydrochloride (pH7.0). As a result, better separation of apoproteins were achieved using 4M guanidine hydrochloride as an elution buffer. By this technique, apo VLDL could be separated into three peaks of apo B, apo E and apo C, apo HDL into apo E, apo A-I, apo A-II and apo C, and the apoproteins of $d > 1.21\text{g/ml}$ fraction into albumin, apo A-IV and apo A-I. Pure materials of apo E, apo A-I and apo A-IV could be obtained by a single column operation.

Key words: apolipoprotein, HPLC.

はじめに

アポ蛋白の分離、精製、分析などにはゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法 (SDS-PAGE)、等電点電気泳動法 (IEF) などが広く用いられてきたが^{1,2,3)}、最近、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) のシステムを用いたゲル濾過法が、短時間に再現性よく可溶性蛋白質を分離できることから、アポ蛋白の分離、分析にも応用されるようになってきた⁴⁾。今回われわれは HPLC によるゲル濾過法で、ヒト血清アポ蛋白の分離と分析法を検討し、本法がアポ蛋白の分析と単離に極めて有用であることを認めたので、その成績につき報告する。

材料および方法

1) リポ蛋白, およびアポ蛋白分離

a) Apo VLDL

リポ蛋白の分離は超遠心法により行った⁵⁾。ヒト空腹時血清に EDTA (pH7.0) および NaN_3 をそれぞれ 0.05% および 0.04% になるように加え、さらに $d = 1.006\text{g/ml}$ の比重液を 1/10 量重層し、日立 RP65-T ローター (日立工機) を用いて 35,000rpm, 16時間, 15℃ で超遠心を行い、浮上した VLDL を回収した。VLDL の脱脂は Warnick らの方法⁶⁾ に従って行った。すなわち、得られた VLDL (約 1ml) を 10ml の冷アセトン: エタノール混液 (1: 1) に加えて攪拌し、-20℃ で 4

Isolation and analysis of apolipoproteins by high performance liquid chromatography.

*Takashi Matsuura, Shunichi Koga and Yasuji Miyata; 九州大学医学部第3内科

Correspondence address; Takashi Matsuura, Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka-shi 812, Japan.

(受付 1987年3月26日, 受理 1987年11月1日)

(8) 生物物理化学

時間静置後、 -10°C で3,000rpm、10分間遠心して沈澱したアポ蛋白を回収した。この沈澱をさらに冷エーテルに懸濁し2時間静置後、遠心で沈澱を回収し、さらに再度同様の操作を1回行い、残留したエーテルを N_2 ガスでとばして apo VLDL を得た。得られた apo VLDL は -20°C で保存した。

b) Apo HDL

VLDL 除去後の血清下層分画に乾燥させた NaCl を 9.8g/dl の割合で加え、その溶媒密度を $d=1.063\text{g/ml}$ に調整した⁵⁾。この試料血清に $d=1.063\text{g/ml}$ の比重液を1/10量重層し、日立 RP65-T ローターを用いて 35,000rpm、16時間、 15°C で超遠心を行い、浮上した LDL を除いた。この下層分画に乾燥させた NaBr を 19g/dl の割合で加え、溶媒密度を $d=1.21\text{g/ml}$ に調整し、日立 RP65-T ローターを用いて 40,000rpm、24時間、 15°C で超遠心を行い、HDL 分画($d, 1.063\sim 1.21\text{g/ml}$)を得た。

HDL 分画の脱脂操作は Scanu らの方法⁷⁾に従って行った。すなわち、得られた HDL は 0.05% EDTA ($\text{pH}7.0$) を含む生理食塩水に対して透析し、過剰の塩を除去した後、冷エタノール：エーテル混液(3:2) 50ml にその 1ml を滴下混和し、 -10°C で6時間転倒攪拌して脱脂した。終了後、 -10°C 、3,000rpm、10分間遠心して沈澱を回収し、冷エーテルで2回洗浄後、さらにエーテル 50ml で遠心管を満たし、 -10°C で16時間転倒攪拌して、脱脂を終了した。その後、エーテルで1回洗浄し、残留したエーテルは N_2 ガスでとばして apo HDL を得た。得られた apo HDL は -20°C で保存した。

c) $d>1.21\text{g/ml}$ 分画のアポ蛋白

$d>1.21\text{g/ml}$ の分画には主として脂質と結合していないアポ蛋白が含まれているが、このアポ蛋白を Weinberg らの方法⁸⁾に従い回収した。すなわち、静注用脂肪乳剤 Intrafat® (大五栄養化学) を日立 RP65-T ローターを用いて 13,000rpm、35分、 4°C で遠心し、上層のクリーム層を回収し、これを 0.05% EDTA を含む 0.05M リン酸緩衝液 ($\text{pH}7.4$) に懸濁し元の容積に戻し、triglyceride-rich particle (TRP) を得た。

a) および b) の操作でリポ蛋白を除いた $d>1.21\text{g/ml}$ 分画を 0.05M リン酸緩衝液 ($\text{pH}7.4$) で透析し、NaCl を 4M になるように加え pH を 7.4 に再調整した後、上記 TRP を血清 5 容に対して 2 容の割合で加えて、 37°C で1時間ふ置し、TRP にアポ蛋白を吸着さ

せた。これを日立 RP65-T ローターを用いて 39,000rpm、35分、 4°C で超遠心を行い浮上した脂質層を回収して、2倍量の 0.05M リン酸緩衝液 ($\text{pH}7.4$) で希釈し、同様の超遠心操作で2回洗浄した。脱脂、保存は HDL に準じて行った。

2) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

カラムには TSK G3000SW ($7.5\text{ID}\times 600\text{mm}$, 東洋曹達) を用い、TSK ガードカラム SW ($7.5\text{ID}\times 75\text{mm}$, 東洋曹達) をその前に装着した。送液装置は島津 LC-4A を用いた。蛋白の溶出パターンは紫外吸光度計 SPD-2AS (島津製作所) にて 280nm で測定し、クロマトパック C-R1B (島津製作所) にて記録分析を行った。

溶出液は、ギ酸にて $\text{pH}3.15$ に調整した 6M 尿素⁹⁾、および 4M 塩酸グアニジン、0.01M dithiothreitol を含む 0.1M Tris 緩衝液 ($\text{pH}7.0$)^{10,11)} を用いた。HPLC の運転は室温で行い、送液速度は 0.5ml/min で 0.5ml 毎に分画を採取した。

試料は 6M 尿素 ($\text{pH}3.15$) または 6M 塩酸グアニジンと 0.01M dithiothreitol を含む 0.1M Tris 緩衝液 ($\text{pH}7.0$) で溶解し、200 μl の sample loop に総蛋白量で 0.5~1mg を添加した。

HPLC による各蛋白の分子量測定はそれぞれのアポ蛋白の溶出時間より分配係数を求め、Porath の公式¹²⁾に従い標準蛋白の $K_d^{1/3}$ と $M^{0.555}$ (M =分子量) より求めた標準直線を用いて計測した。蛋白質の分子量マーカーとしては 6 種の蛋白を含む電気泳動用の Low Molecular Weight Calibration Kit (Pharmacia, Sweden) を用いた。

3) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は Laemmli の方法¹³⁾に従って行った。すなわち、緩衝液に 0.05M Tris-HCl (0.38M glycine と 0.1% SDS を含む, $\text{pH}8.3$) を用い、分離ゲル濃度は 10% および 12.5% を用いた。試料は 0.01M Tris 緩衝液 ($\text{pH}8.6$) で透析し、SDS、2-mercaptoethanol をそれぞれ 1% および 5% になるように加え、さらにマーカーとして 0.05% bromophenol blue を 10 μl 加えて泳動に供した。染色は 0.25% coomassie brilliant blue G250 溶液 (水 10 容, メタノール 9 容, 酢酸 1 容) にて行った。分子量マーカーは Low Molecular Weight Calibration Kit を用いた。

4) Urea-PAGE

Davis の変法^{5,14)}に従い、8M 尿素を含む 7.5% のポ

リアクリルアミドゲルを用いて行った。緩衝液には 0.05M Tris 緩衝液 (0.38M glycine を含む, pH8.3) を用い、1% amido-black 10B (7% 酢酸溶液) にて染色した。この泳動では SDS-PAGE では分析困難な apo A-II と apo C 群の分離状態を検討した。

5) 分離した蛋白の同定

分離したアポ蛋白の免疫化学的同定は Ouchterlony 法¹⁵⁾により行った。抗体はわれわれの研究室で作成した抗ヒト apo A-I 抗体、抗ヒト apo A-II 抗体、抗ヒト apo A-IV 抗体および DAKO (Denmark) の抗ヒトアルブミン抗体を用いた。アガロースは 0.02M ペロナール緩衝液 (pH8.4) に 1% になるよう溶解して使用した。

結 果

1) Apo HDL の分離

Apo HDL の HPLC 分析は 6M 尿素および 4M 塩酸グアニジンの 2 種類の溶出液を用いて行った。6M 尿素を溶出液とした場合、7 本のピークが認められた (Fig. 1)。各分画を SDS-PAGE, Urea-PAGE にて分析した結果、retention time (以下 RT) 24.7 分 (peak 4)、29.6 分 (peak 5) の分画に含まれる蛋白はそれぞれ apo A-I、apo A-II に一致する部位に泳動された。RT31.1 分 (peak 6)、35.3 分 (peak 7) の分画に含まれる蛋白は apo C 群に一致する部位に泳動された

(Fig. 1 の写真参照)。さらに、Ouchterlony 法により検討した結果、RT24.7 分および 29.6 分の分画はそれぞれ apo A-I、A-II と同定できた。

得られた apo A-I 分画 (peak 4) を SDS-PAGE で分析すると、apo A-I の他に 2~3 の蛋白の混入が認められた。そこで apo A-I 分画を限外濾過により濃縮し、再度 HPLC カラムを通して精製したところ、SDS-PAGE にても単一のバンドとして観察される純粋な apo A-I の標品を得ることができた (結果省略)。

溶出液に、0.01M dithiothreitol を含む 4M 塩酸グアニジンをういた場合の分析結果は Fig. 2 に示した。主要ピークの溶出時間は、6M 尿素を溶出液にしたときに比べて遅延した。各分画を SDS-PAGE にて分析した結果、RT28.2 分 (peak 3)、30.5 分 (peak 4)、37.2 分 (peak 5)、39.4 分 (peak 6) のピークはそれぞれ apo E、apo A-I、apo C および apo A-II monomer と考えられた。Ouchterlony 法により検討したところ、RT30.5 分のピークは apo A-I、RT39.4 分のピークは A-II と同定できた。また、apo E に相当するピークは、apo VLDL より得られた apo E (後述) と溶出時間が一致した。

4M 塩酸グアニジンを溶出液とした場合、apo E が apo A-I から分離でき、さらに 1 回のカラム操作で SDS-PAGE で単一のバンドとなる apo A-I 分画を得ることができ、6M 尿素に比べ分離能が向上した。な

Fig.1. Elution profile of apo HDL. The eluting buffer was 6M urea solution (pH 3.15).

The elution profile was monitored at 280 nm with a flow rate of 0.5ml/min. Peaks 4 and 5 are the peaks of apo A-I and A-II, respectively as shown in SDS-PAGE in 12.5% gels, illustrated in the insert. Peaks 6 and 7 are those of apo C.

Fig.2. Elution profile of apo HDL. The eluting buffer was 4M guanidine HCl solution in 0.1M Tris, 0.01M dithiothreitol (pH 7.0).

The elution profile was monitored at 280 nm with a flow rate of 0.5 ml/min. Peak 4 is the peak of apo A-I as shown in SDS-PAGE, illustrated in the insert.

(10) 生物物理化学

お、カラム操作時間は6M尿素を用いた場合が約50分、4M塩酸グアニジンを用いた場合が約60分であった。

2) Apo VLDL

4M塩酸グアニジンを溶出液としてapo VLDLをHPLCで分析した結果、RT21.4分 (peak 1)、28.2分 (peak 2)、39.6分 (peak 3) の3本のピークが認められ、Vercaemst らの結果¹¹⁾と一致した (Fig. 3)。各分画に含まれるアポ蛋白の分子量をSDS-PAGEにより測定したところ、RT21.4分のピークはゲルの上端にとどまり、RT28.2分および39.6分のピークはそれぞ

Fig.3. Elution profile of apo VLDL. The eluting buffer was 4M guanidine HCl solution in 0.1M Tris, 0.01M dithiothreitol (pH 7.0).

The elution profile was monitored at 280 nm with a flow rate of 0.5 ml/min.

Fig.4. Elution pattern of delipidated TRP following incubation with lipoprotein depleted serum.

The eluting buffer was 6M urea solution (pH 3.15). The elution profile was monitored at 280 nm with a flow rate of 0.5 ml/min.

Apoprotein bands are identified along the right.

れ34,000, 11,000となり apo Eおよび apo Cの分子量と一致した。RT21.4分のピークは Vercaemst らの報告¹¹⁾や電気泳動上の易動度より apo Bと推定される。

3) d>1.21g/ml 分画

TRPに吸着された蛋白を、6M尿素を溶出液としHPLCにて分離したところ、RT21.4分 (peak 1)、22.8分 (peak 2)、24.7分 (peak 3) の3本のピークが認め

Fig.5. Elution pattern of delipidated TRP following incubation with lipoprotein depleted serum.

The eluting buffer was 4M guanidine HCl in 0.1M Tris, 0.01M dithiothreitol (pH 7.0). The elution profile was monitored at 280 nm with a flow rate of 0.5 ml/min. Apoprotein bands are identified along the right.

Fig.6. Plots of the distribution coefficient (K_d) the $1/3$ power as a function of molecular weight (M) to the 0.555 power. The eluting buffers were 6M urea (a) and 4M guanidine HCl (b).

1 : phosphorylase b (MW 94,000) 2 : albumin (MW 67,000) 3 : ovalbumin (MW 43,000) 4 : carbonic anhydrase (MW 30,000) 5 : trypsin inhibitor (MW 20,100) 6 : α -lactalbumin (MW 14,400).

られた (Fig. 4). SDS-PAGE でも, TRP に吸着回収された蛋白として, 分子量67,000, 50,000, 29,000に相当する3本のバンドが認められ, それぞれアルブミン, apo A-IV, apo A-I と推定されたが, HPLC による溶出ではアルブミンと apo A-IV はともに RT22.8 分のピークに含まれていた. この分画を再度 HPLC カラムを通してアルブミンと apo A-IV は分離できなかった.

4M 塩酸グアニジンを溶出液として用いた場合 RT21.4分 (peak 1), 24.6分 (peak 2), 26.5分 (peak 3), 30.5分 (peak 4) の4本のピークが観察された (Fig. 5). 各分画を SDS-PAGE で分析すると, RT21.4分の分画は分離ゲルの上端にとどまり, 2 番目のピーク以下はそれぞれアルブミン, apo A-IV, apo A-I に相当する部位に泳動された. さらに, それぞれのピークは Ouchterlony 法でも, アルブミン, apo A-IV, apo A-I と確認できた.

4) 標準蛋白を用いた溶出液の比較検討

電気泳動用の分子量マーカーを 6M 尿素を含む溶出液で溶解し HPLC にて分析した. 6 種の蛋白の分離は不十分で, この溶出時間より分配係数 K_d を求め, Porath の公式に従って $K_d^{1/3}$ と $M^{0.555}$ の関係をみたところ, 直線性に乏しかった (Fig. 6a).

一方, 溶出液に 4M 塩酸グアニジンを用いた場合, 6M 尿素に比し各蛋白の分離は良好で, 分配係数と分子量の関係をみたところ, 分子量14,400から94,000にわたって直線性が保たれていた (Fig. 6b).

6M 尿素を溶出液とした場合の標準直線より分子量を推定したところ, apo A-I が47,700, A-II が24,100, C 群が20,000, 11,100となり各々の一次構造から求められた分子量とは異なっていた. しかし, 4M 塩酸グアニジンを溶出液とすると apo E, apo A-I, apo C, apo A-II monomer の分子量はそれぞれ38,000, 29,000, 11,000, 7,400となり既知分子量とはほぼ一致した.

考 察

HPLC によるゲル濾過は, 従来のカラムクロマト法によるゲル濾過に比べ短時間に再現性よくアポ蛋白を分離することが可能であり, アポ蛋白の分離同定に有用であった. 4M 塩酸グアニジンと 0.01M dithiothreitol を含む 0.1M Tris 緩衝液 (pH7.0) を溶出液として用いた場合, 6M 尿素を溶出液にした場合に比べ分

離能が向上し, アポ蛋白の有効な分離を行うことができた. 特に, apo HDL からの apo A-I の単離, apo VLDL からの apo E の単離が1回のカラム操作で可能であり有用であった.

われわれはさらに $d > 1.21\text{g/ml}$ 分画のアポ蛋白を TRP に吸着させて回収し, そのアポ蛋白分離についても, HPLC を用いて検討した. その結果3種類の蛋白を分離し得たが, Weinberg らが指摘した proline-rich protein は同定できなかった. この分画でも 6M 尿素を用いて溶出した場合, アルブミンと apo A-IV の分離ができなかった. しかし, 4M 塩酸グアニジンを溶出液として用いると, アルブミンと apo A-IV の分離は可能であり, このことから 4M 塩酸グアニジンの方が 6M 尿素よりも分離能は優れていることが示された. さらに, 分子量測定用標準蛋白による分離能の検討や分子量測定においても, 4M 塩酸グアニジンの方が優れていた.

ま と め

- 1) TSK G3000SW カラムを用いる HPLC により, apo VLDL, apo HDL および $d > 1.21\text{g/ml}$ 分画中のアポ蛋白の分析と単離が可能であった.
- 2) 溶出液として 6M 尿素を用いた場合と 4M 塩酸グアニジンを用いた場合を比較してみると, 尿素に比べて塩酸グアニジンの方が分離が良く, 分子量測定を含めアポ蛋白の分析に適していると考えられた.

本論文の要旨の一部は第36回電気泳動学会総会 (於新潟市) において発表した. また, 本研究の一部は厚生省特定疾患原発性高脂血症調査研究班 (班長: 垂井清一郎) の研究費により行った.

文 献

- 1) Mills, G. L. et al.: A Guide Book to Lipoprotein Technique, Elsevier, Amsterdam, 1984, p.384.
- 2) Koga, S. et al.: Biochim. Biophys. Acta, **236**: 416, 1971.
- 3) 古賀俊逸, 宮田康司: 生物物理化学, **29**: 43, 1985.
- 4) Edelstein, C. and Scanu, A. M.: Methods in Enzymology, Vol.128, Academic Press, Inc., Orlando, 1986, p.339.
- 5) 古賀俊逸: リポタンパク, 中外医学社, 東京, 1980, p.28.

(12) 生物物理化学

- 6) Warnick, G. R. et al. : Clin. Chem., **27** : 279, 1979.
- 7) Scanu, A. M. and Edelstein, C. : Anal. Biochem., **44** : 576, 1971.
- 8) Weinberg, R. B. and Scanu, A. M. : J. Lipid Res., **24** : 52, 1983.
- 9) Polacek, D. et al. : Lipids, **16** : 927, 1981.
- 10) Pfaffinger, D. et al. : J. Lipid Res., **24** : 796, 1983.
- 11) Vercaemst, R. et al. : J. Lipid. Res., **25** : 876, 1984.
- 12) Porath, J. : Pure Appl. Chem., **6** : 233, 1963.
- 13) Laemmli, U. K. : Nature, **227** : 680, 1970.
- 14) Davis, B. J. : Ann. N.Y. Acad. Sci., **121** : 404, 1964.
- 15) Ouchterlony, O. : Immunological Method. Blackwell, Oxford, 1964.