〔原 著〕

両性担体をスペーサーとする蛋白質の等速電気泳動の コンピュータシミュレーション

島 尾 和 男

SUMMARY

Computer simulation of isotachopheresis of proteins using carrier ampholytes such as Ampholine or Sepaline as the spacers was performed on the basis of the author's theory of steady state electrophoresis. As carrier ampholytes behave as if they were weak acids in anionic isotachopheresis, the simulations were performed on systems composed of five weak acids with similar pK values in the absence or in the presence of up to two protein components. The results could explain those of agarose gel isotachopheresis experiments of proteins using carrier ampholytes as the spacers.

Key words: protein isotachopheresis, carrier ampholyte, computer simulation.

はじめに

蛋白質の等速電気泳動分析は両性担体をスペーサーとして細管内で行われることが多いが¹⁾, ゲルスラブを用いる実験法も開発された²⁾. これらの実験では易動度がほんの少しずつ異なる多くの両性担体成分の等速電気泳動により生じる pH 勾配の中を微量の蛋白質成分が等速電気泳動していると考えられる. このとき, 両性担体成分や蛋白質成分の分布状態, 媒質の pH や電位勾配がどのようになっているかについてのコンピュータシミュレーションはまだ行われていない. この報告では電気泳動の定常状態についての私の理論^{3,4)} を利用して, 易動度の違いの少ない弱酸の等速電気泳動とこの系での蛋白質成分の等速電気泳動についてコンピュータシミュレーションを行った結果を報告する.

基礎方程式

基礎方程式はすでに発表した理論^{3,4)} を 5 個の両性担体成分と 2 個の蛋白質成分を含む系に適用したものである. 両性担体の性質についてメーカーから詳しいことが

公表されていないので, 取扱いを簡単にするため, 両性担体成分は 1 価の弱酸としてよいものとした. このことは, 両性担体成分の等電点をかさむ 2 個の pK がおよそ 2 以上異なると考えていることに相当する. 蛋白質のいろいろな価数のイオンの分布状態についてはすでに発表した正規分布モデル³⁾ を適用する. また, カウンター成分は 1 価の弱塩基とする.

詳細はすでに発表した⁴⁾ ので省略するが諸成分の濃度勾配を表す式は次のようになる.

$$\frac{dC_{Ai}}{dX} = \frac{C_{Ai}}{D_{Ai}} \left(\frac{I \alpha_{Ai} - U_{Ai}^-}{\kappa} - v \right), \quad i=1-5 \quad (1)$$

$$\frac{dC_{Pi}}{dX} = \frac{C_{Pi}}{D_{Pi}} \left(\frac{I \sum_j \alpha_{Pij} U_{Pij}}{\kappa} - v \right), \quad i=1, 2 \quad (2)$$

$$\frac{dC_R}{dX} = \frac{C_R}{D_R} \left(\frac{I \alpha_R + U_R^+}{\kappa} - v \right) + \frac{M_R}{D_R} \quad (3)$$

これらの式の

C : モル濃度, mole/l

U : イオン易動度, cm^2/Vs

D : 拡散係数, cm^2/s

Computer simulation of isotachopheresis of protein using carrier ampholyte as spacers.

Kazuo Shimao; 東京医科歯科大学教養部物理学科

Correspondence address: Kazuo Shimao, Laboratory of Physics, Department of General Education, Tokyo Medical and Dental University, Kohnodai, Ichikawa 272, Japan.

(受付 1988 年 6 月 10 日, 受理 1988 年 8 月 26 日)

(304) 生物物理化学

κ : 電気伝導度, S/cm
 I : 陽極方向への電流密度, A/cm²
 X : 陽極方向への距離, cm
 α : 下添字のイオン種の割合
 v : 等速電気泳動の速度, cm/s
 M : 積分定数

下添字

A_i : i 番目の弱酸
 A_i^- : i 番目の弱酸の -1 価のイオン
 P_i : i 番目の蛋白質
 P_{ij} : i 番目の蛋白質の j 価のイオン
 R : カウンター成分
 R^+ : カウンター成分の 1 価のイオン

を表す.

(1), (2) および (3) 式を用いて数値積分により弱酸, 蛋白質およびカウンター成分の弱塩基の分布状態を求めるには伝導度 κ を諸成分の濃度の関数として表すことが必要である. 既報^{3,4)} のように, 下式が成立する.

$$\kappa = \frac{AF - CD}{BF + CE - C/96.5} \quad (4)$$

(4) 式の $A-F$ は諸成分の濃度の関数で, 下記の通りである.

$$\begin{aligned} A &= -\sum_i \frac{C_{A_i} U_{A_i} - \alpha_{A_i}^{-2}}{D_{A_i}} + \sum_i \frac{C_{P_i} U_{P_{i1}} (\sum_j j \alpha_{P_{ij}})^2}{D_{P_i}} \\ &\quad + \frac{C_R U_{R^+} + \alpha_{R^+}^2}{D_R} \\ B &= \left(\frac{v}{I} \right) \left(-\sum_i \frac{C_{A_i} \alpha_{A_i}^-}{D_{A_i}} + \sum_i \frac{C_{P_i} \sum_j j \alpha_{P_{ij}}}{D_{P_i}} + \frac{C_R \alpha_{R^+}}{D_R} \right) \\ &\quad - \frac{\alpha_{R^+} M_R}{D_R I} \\ C &= 1 + \frac{[\text{OH}^-]}{[\text{H}^+]} - \sum_i C_{A_i} \frac{d\alpha_{A_i}^-}{d[\text{H}^+]} + \sum_i C_{P_i} \sum_j \frac{d\alpha_{P_{ij}}}{d[\text{H}^+]} \\ &\quad + C_R \frac{d\alpha_{R^+}}{d[\text{H}^+]} \\ D &= -\sum_i C_{A_i} U_{A_i} - \alpha_{A_i} (1 - \alpha_{A_i}^-) \\ &\quad + \sum_i C_{P_i} U_{P_{i1}} \{ \sum_j j^2 \alpha_{P_{ij}} - (\sum_j j \alpha_{P_{ij}})^2 \} \\ &\quad + C_R U_{R^+} + \alpha_{R^+} (1 - \alpha_{R^+}) \\ E &= \left(\frac{v}{I} \right) \{ -\sum_i \alpha_{A_i}^- C_{A_i} + \sum_i C_{P_i} \sum_j j \alpha_{P_{ij}} \\ &\quad + \alpha_{R^+} + C_R + [\text{H}^+] - [\text{OH}^-] \} \\ &\quad + \frac{1}{I} (M_{\text{H}^+} - M_{\text{OH}^-} + M_R) \end{aligned}$$

Table 1. Properties of electrophoretic components.

Component	pK	Ionic mobility, cm ² /Vs			
Counter base	8.1	2.0×10 ⁻⁴			
Spacer weak acids	#	-1.5×10 ⁻⁴			
#: See Tables 2 to 5.					
Protein	I	I'	II	II'	
Acidic pK	(Number of residues)				
3.5	1	1	4	4	
4.0	53	53	48	48	
4.4	80	79	69	68	
8.0	4	4	32	32	
10.5	16	16	60	60	
Total N(-)	154	153	213	212	
Basic pK					
6.5	15	15	26	26	
8.0	1	1	4	4	
10.5	58	58	89	89	
12.5	24	24	45	45	
Total N(+)	98	98	164	164	
Mobility, U_{P_i} 10 ⁻⁶ cm ² /Vs	2.5	2.5	2.0	2.0	

Table 2. pK, mobility and initial concentrations for Fig. 2.

Component	pK	Mobility 10 ⁻⁴ cm ² /Vs	C(0) Fig. 2-A M	C(0) Fig. 2-B M
Weak acid				
1	6.48	-1.5	1.000 × 10 ⁻³¹	1.581 × 10 ⁻¹⁶
2	6.58	-1.5	1.000 × 10 ⁻²⁰	6.295 × 10 ⁻¹²
3	6.68	-1.5	5.000 × 10 ⁻¹¹	5.000 × 10 ⁻⁸
4	6.78	-1.5	5.000 × 10 ⁻⁵	6.000 × 10 ⁻⁵
5	6.88	-1.5	4.950 × 10 ⁻³	4.950 × 10 ⁻³
Counter base				
8.10	2.0		5.000 × 10 ⁻³	5.000 × 10 ⁻³

Table 3. pK, mobility and initial concentrations for Fig. 3.

Component	pK	Mobility 10 ⁻⁴ cm ² /Vs	C(0) Fig. 3-A M	C(0) Fig. 3-B M
Weak acid				
1	9.10	-1.5	1.000 × 10 ⁻⁴⁶	1.000 × 10 ⁻²²
2	9.20	-1.5	1.000 × 10 ⁻²⁶	1.000 × 10 ⁻¹⁴
3	9.30	-1.5	1.000 × 10 ⁻¹²	1.000 × 10 ⁻⁸
4	9.40	-1.5	5.000 × 10 ⁻⁵	5.000 × 10 ⁻⁵
5	9.50	-1.5	4.950 × 10 ⁻³	4.950 × 10 ⁻³
Counter base				
8.10	2.0		5.000 × 10 ⁻³	5.000 × 10 ⁻³

Fig. 1. Relation between pK of spacer weak acid, pH of equimolar zone of spacer and base and mobility of the spacer and the model proteins I, I', II and II'.

Fig. 2. Concentrations of spacers and counter base, potential gradient and pH of equimolar system composed of the spacers for the model proteins I and I'.

Fig. 3. Concentrations of spacers and counter base, potential gradient and pH of equimolar system composed of the spacers for the model proteins II and II'.

$$F = \sum_i D_{A_i} C_{A_i} \frac{d\alpha_{A_i}^-}{d[H^+]} - \sum_i C_{F_i} D_{F_i} \sum_j j \frac{d\alpha_{F_{ij}}}{d[H^+]} - C_R D_R \frac{d\alpha_{R^+}}{d[H^+]}$$

なお、 i 価のイオンの易動度 u と拡散係数 D およびファラデー定数 F の間には、 $D = uRT/iF$ の関係が成り立ち、蛋白質イオンについては、易動度は価数に比例するものとして取り扱う。

等速電気泳動系の選択と数値積分の条件

すでに報告^{5,6)} したように、等速電気泳動では、先行液に 1 価の酸と塩基の等モル混合液を用いると、これに続く 1 価の酸のゾーンはすべてその酸とカウンター塩基のほぼ等モル混合液となるので、結果の見通しが容易となり、好都合である。この系を等モル系と呼ぶことにして、この報告では等モル系についてシミュレーションを行う。両性担体のイオン易動度はすべて Cl^- イオンの約

1/5 の $-1.5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ とする。アガロースゲルスラブを支持体とし、両性担体をスペーサーとする蛋白質の等速電気泳動実験法²⁾ では 0.01–0.03 M の塩酸と弱塩基の等モル系を先行液として用いる。このとき後続する両性担体相は 0.006–0.018 M の弱酸と弱塩基の等モル液となる。シミュレーションでは先行液は 0.005 M の等モル液とし、カウンター成分は pK が 8.1 のトリス様の弱塩基とした。

蛋白質成分としては代表的な血清蛋白質であるヒト血清アルブミンと γ -グロブリン様のモデル蛋白質を用い (I および II) 分解能を知るために pK 4.4 の酸性基が 1 個少ないモデル蛋白質 (I' および II') も取り扱う。Table 1 に諸成分の性質を掲げた。

等速電気泳動する両性担体ゾーンの pH は弱酸の pK と弱塩基の pK=8.1 の平均値となる。Fig. 1 はいろいろな pK (下方横軸) をもつスペーサーとしての弱酸と弱塩基の等モル液の pH (上方横軸) での弱酸および

Fig. 4. Concentrations of the components, voltage and pH of the system containing proteins I and I'.

モデル蛋白質の易動度を示す。スパーサーと蛋白質の易動度曲線の交点に近い pK をもつスパーサーがそれぞれの蛋白質の等速電気泳動分析に適している。

シミュレーションに用いたスパーサーの pK (Table 2, Table 3) はこのようにして決定したものである。

電流密度はアガロースゲルを用いる実験法に合わせて断面積 1 cm^2 につき 5 mA とし、数値積分の $4X$ は系により異なるが、 0.00002 ないし 0.0005 cm を試行錯誤法により採用した。

結果および考察

1. 両性担体

Fig. 2 および Fig. 3 に、それぞれ、蛋白質 I, I' および II, II' に用いる両性担体だけの系でのシミュレーションにより成分の濃度、電位勾配および pH を求めた結果を示す。数値積分は $X=0$ から開始する。成分濃度の初期値は Table 2 および Table 3 に掲げた。

それぞれの図の左側 A は両性担体量 (図中の integral amount) が多い場合で、各両性担体成分のゾーンが明

Fig. 5. Concentrations of the components, voltage and pH of the system containing proteins II and II'.

らかに分離するが、量が少なくなると、右側 B のように隣り合う成分が重なり合い、電位勾配でも pH 勾配でも成分間の境界が不明瞭になる。両性担体がきわめて多数の両性電解質の混合物であることから、これをスパーサーとする蛋白質の等速電気泳動法では、ゲルを用いるときも細管を用いるときも、右側の状態を利用していると思われる。このことは、細管を用いるとき、電位勾配の記録から両性担体成分の分析ができないことから知られる。

2. 蛋白質

Fig. 4 および Fig. 5 は、それぞれ、Fig. 2 および Fig. 3 の右側 B の系に蛋白質 I, I' および II, II' が加わった場合の成分濃度、電位および pH をシミュレーションにより求めた結果である。これらの図は、Fig. 2 および Fig. 3 の B の一部分を拡大したものであり、数値積分の初期値を Table 4 および Table 5 に示してある。また Fig. 5 では比較のため、蛋白質がない場合 (Fig. 2-B の部分拡大図) を $\times$ で二重にプロットした。

蛋白質の存在のために pH は強い影響を受けるが、電位はほとんど不変であり両性担体成分の濃度は少し変化する。このことはゲルスラブを用いて、蛋白質の同時多検体の並行分析²⁾ が可能なことの理論的根拠を与える

Table 4. Initial concentrations for Fig. 4.

Component	Initial concentration, M
Weak acid 1	1.17318×10^{-9}
Weak acid 2	1.97680×10^{-6}
Weak acid 3	3.37918×10^{-4}
Weak acid 4	3.32571×10^{-3}
Weak acid 5	1.33505×10^{-3}
Counter base	4.99895×10^{-3}
Protein I	2.00000×10^{-50}
Protein I'	4.00000×10^{-11}

Table 5. Initial concentrations for Fig. 5.

Component	Initial concentration, M
Weak acid 1	1.00432×10^{-9}
Weak acid 2	8.89677×10^{-6}
Weak acid 3	1.56960×10^{-3}
Weak acid 4	3.12152×10^{-3}
Weak acid 5	2.95649×10^{-4}
Counter base	4.98877×10^{-3}
Protein II	9.00000×10^{-37}
Protein II'	1.11123×10^{-9}

ものである。また、等電点電気泳動法の場合に比べて蛋白質の存在が pH に与える影響が大きいのは、等速電気泳動では蛋白質が等電点にないので、電荷が大きいため当然の結果である。

蛋白質ゾーンの拡がりには、Fig. 4 のアルブミンモデルでは約 0.4 mm、 γ -グロブリンモデルでは約 0.08 mm 程度である。かつ、いずれの場合も $pK=4.4$ の酸性基が 1 個だけ少ない蛋白質が二つのゾーンとしてほぼ完全に分離していることは、この実験法が両性担体の成分が適当なときには等電点電気泳動法⁷⁾ に匹敵する分解能をもちうることを示唆する。

実際の実験では、後続するゾーンほど温度が高いことやスラブゲルを用いるときにはゲルの厚さも後続するゾーンほど薄くなることなどを考慮すると、ここにえられたシミュレーションの結果はゲルスラブを用いた実験結果 Fig. 6 (詳細は未公表) を説明していると言うことができる。とともに、Charlionet, R. et al. の isotachophoretic focusing⁸⁾ に、より詳しい理論的基盤を与えるものである。

おわりに

電気泳動の定常状態に関する理論を両性担体を用いる蛋白質の等速電気泳動分析法に応用してこの方法の分解能を示すとともに、シミュレーションの結果がゲルスラブを用いる実験の結果を説明することを示した。これに

Fig. 6. Agarose gel isotachopheretic pattern of serum and serum protein fractions.

7×100 mm Toyo No.2 filter paper moistened by 150 μ l Sepaline (20 g/dl) was placed on cathodic end of a gel slab (1×100×100 mm) containing 1.04 g/dl Agarose IEF, 6.4 g/dl sorbitol and 0.03 M equimolar mixture of Tris-HCl. The slab was connected to the anodic and cathodic vessel filled with 0.5M equimolar mixture of Tris-HCl and Tris- ϵ -amin-n-caproic acid, respectively. 1 μ l each of samples were electrophoresed from the origin indicated by the arrow for 95 min under constant current of 6 mA (voltage 29→287V). Protein was stained by Coomassie brilliant blue R250.

1, 2: Fraction II. 3, 4: Transferrin. 5, 6: Control serum II (Wako). 7, 8: α 1 Antitrypsin. 9: Control serum I (Wako). 10: Fraction V. Serum protein fractions were SIGMA products.

より筆者の電気泳動の定常状態についての理論が広い範囲の適用性をもつことが示された。

文 献

- 1) Delmotte, P.: Electrophoresis '78, Catsimopoulos N. (ed.), Elsevier North Holland Inc., New York, 1978, pp.115-134.
- 2) 島尾和男: 生物物理化学, 32: 77, 1988.
- 3) Shimao, K.: Electrophoresis, 7: 297, 1986.
- 4) 島尾和男: 生物物理化学, 31: 241, 1987.
- 5) 島尾和男: Med. Technol., 7: 1215, 1979.
- 6) Shimao, K.: Electrophoresis, 7: 121, 1986.
- 7) Shimao, K.: Electrophoresis, 8: 14, 1987.
- 8) Charlionet, R. et al.: Electrophoresis, 7: 558, 1986.