〔原 著〕

未処理フューズドシリカキャピラリー電気泳動による タンパク質の分離

栗岡 晋*・都丸慶子*・佐藤泰世**・黒須泰行**

SUMMARY

Separation of 11 model proteins of various *pI* and *MW* values, and proteins in human serum, were performed by capillary electrophoresis using untreated fused silica capillary with 100 mM sodium borate (pH 10.0) for electrolyte and 100 mM phosphoric acid (pH 2.5) for washing the capillary between the run. Proteins in human serum were also separated into five fractions (albumin, α_1 , α_2 , β and γ -globulin) by the same conditions as above within 8 min. The model proteins showed the migration time based on their *pI* values and the reproducibility of both the migration times and peak areas was good except for a few basic proteins.

Key words: capillary electrophoresis, untreated fused silica, human serum.

はじめに

キャピラリー電気泳動 (CE) 法は、ここ数年注目を浴びてきた分析法であり¹⁻³⁾、今後、分析のマイクロ化につれて、ますます期待される分析法の一つである。その特長は、試料量が数 nl または数 pg である微量分析、30 分以内の短時間分析、高速液体クロマトグラフィの操作に似た簡便な操作に要約される。この特長を生かした応用例が、既に数多く発表されている⁴⁻⁸⁾。その中では、低分子物質に対する分析データが、比較的多いように思われる。我々もビタミン B₆ 群の分離条件の検討を行い、その有用性を確認した⁹⁾。CE 法によって、タンパク質を分離する際、未処理フューズドシリカキャピラリー内表面のシラノール基にタンパク質の吸着が生じ、分離能、再現性に好ましくない影響を与えることは、広く知られている事実である。このような影響を避けるために、キャピラリー内表面の洗浄法の工夫¹⁰⁾、コーティング¹¹⁾、さらに、キャピラリー内へのゲル充填¹²⁾などが試

みられている。しかし、我々は、未処理フューズドシリカキャピラリーという素材そのものを、シンプルに反復使用することが、CE 法をよりいっそう簡便化するために必要であると考えている。今回、未処理フューズドシリカキャピラリーを用いる CE 法によって、様々な等電点、分子量を持つモデルタンパク質およびヒト血清タンパク質の分離分析を試み、それらの移動時間、ピーク面積の再現性を指標として、電解液、添加剤、キャピラリー洗浄液、キャピラリーの初期化、試料注入法について検討を加えたので、それらの結果について報告する。

材料および方法

1. モデルタンパク質

分子量、等電点を考慮して、Table 1 に示した 11 種のタンパク質を選択した。血清アルブミンとリゾチームはナカライテスクから購入した。他は、シグマ社から購入した。

Protein analysis by untreated fused silica capillary electrophoresis.

* Susumu Kurioka, Keiko Tomaru; 東京慈恵会医科大学医科学研究所生化学研究部

** Yasuyo Sato, Yasuyuki Kurosu; 日本分光株式会社技術研究所

Correspondence address: Susumu Kurioka, Division of Biochemistry, Institute of Medical Science, The Jikei University School of Medicine, 3-25-8 Nishi-shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105, Japan.

(受付 1992年11月16日, 受理 1992年12月21日)

Table 1. List of model proteins.

Proteins	pI ^a	MW ^b	Source
Trypsin inhibitor	4.5	20K _d	Soybean
Ovalbumin	4.6	45	Chicken
Serum albumin	4.8	66	Bovine
Insulin	5.4	6	Bovine
Transferrin	5.5	75	Human
Hemoglobin	6.9	65	Bovine
Myoglobin	8.1	17	Horse
Trypsinogen	9.3	24	Bovine
Ribonuclease A	9.5	14	Bovine
Cytochrome <i>c</i>	10.1	12	Horse
Lysozyme	11.2	14	Chicken

^a Isoelectric point. ^b Molecular weight.

2. ヒト血清

天然に存在するタンパク質混合法としてヒト血清を選んだ。ヒト血清は、75 mM 塩化ナトリウムを含む 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) により、5% 血清濃度に希釈して用いた。

3. その他の試薬

試薬は全て特級、又はそれに準ずるものを使用した。セルバライトは、pH 範囲 3~10、アンフォラインは、pH 範囲 4~6、及び 9~11 を購入した。

4. キャピラリー電気泳動の条件

- 1) キャピラリー: 未処理フューズドシリカキャピラリー (50 μ m I.D. $\times$ 50 cm). 有効長は 30 cm.
- 2) 装置: キャピラリー電気泳動システム CE-800 (日本分光製) を使用¹³⁾.
- 3) 電解液: 100 mM ホウ酸ナトリウム, 30 mM リン酸ナトリウム, または 100 mM ホウ酸リチウム緩衝液を所定の pH に調整して使用.
- 4) 試料注入: サイホン法 (落差 5 cm, 10 秒) または電気的移動法 (2 kV, 10 秒)
- 5) 泳動: 12~15 kV (定電圧), 通常 10 分以内.
- 6) 検出: フローセル方式によるオンライン検出 (波長 200 nm).
- 7) キャピラリー初期化: 毎回 5 分間洗浄液を送液, 次に 5 分間電解液を送液.

結 果

1. 電解液の pH

等電点がほぼ等しく、分子量が異なるインスリン (MW 6K_d, pI 5.4) とトランスフェリン (MW 75K_d, pI 5.5) を選び、泳動に適した電解液の pH を検討した。電解液は、pH を 2.0, 6.0, 7.0 および 10.0 に調

整した 30 mM リン酸溶液を使用した。その結果を Fig. 1 に示した。インスリン、トランスフェリンとも、pH 10.0 の電解液を使用した時の方が、pH 2.0 の電解液より、移動時間が短く、シャープなピークとして同定できた。pH 6.0 および 7.0 では、インスリンのピークがブロードになり、トランスフェリンは検出できなかった。

2. 電解液の塩

pH 10.0 の 100 mM ホウ酸ナトリウム, 100 mM ホウ酸リチウム緩衝液, または 30 mM リン酸ナトリウム緩衝液を電解液として、10 種類のモデルタンパク質の分離状況を検討した (Fig. 2)。なお、泳動時の電流値が、10 μ A になるように各緩衝液の濃度を調整した。10 種類のタンパク質の分離は、ホウ酸ナトリウム緩衝液を使用した時、より再現的に各タンパク質の移動時間に適当な差が見られ、相互の分離は良好であった。リン酸ナトリウム緩衝液を使用した時は、ピークの形状がややシャープでなかった点と、チトクロム *c* が、30 分以内に検出できなかった点でホウ酸ナトリウム緩衝液より劣っていた。ホウ酸リチウム緩衝液を使用した時は、各タンパク質の移動時間の差が小さく、従って相互の分離が悪く、実用的でないことがわかった。Fig. 3 は、100 mM ホウ酸ナトリウム (pH 10.0) 緩衝液を電解液として泳動した、モデルタンパク質 10 種類の移動時間と等電点および分子量との関係を図示したものである。

3. 添加剤

1, 2 の結果から、電解液を 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 10.0) と決め、さらにこの電解液に添加剤 (終濃度各 0.01%) を加えることによってモデルタンパク質の移動時間および分離に与える影響を調べた。

Table 2 に、モデルタンパク質の移動時間に与える添加剤の影響をまとめて示した。TSAC (trimethyl stearyl ammonium chloride), ポリエチレンジミンの添加によって、使用したモデルタンパク質の全てが、所定時間内に検出できなくなった。CHAPS ((3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), 塩化コリン, セルバライト (pH 3~10), およびアンフォライン (pH 4~9) は、添加剤を加えない時の移動時間と殆ど変わらなかった。アンモニア, リジンの添加は、移動時間を減少させ、一方、アンフォライン (pH 4~9; pH 11~12) の添加は、移動時間を明らかに増加させた。ピーク形状と移動時間の再現性から判断すると、CHAPS, 塩化コリン, セルバライト (pH 3~10) を除き、今回用いた他の添加剤は、むしろタンパク質の分離を低下させる傾向が見られた。

Fig. 1. Electropherogram of insulin and transferrin.

Sample: 1 mg/ml, Injection: siphonic method (height: 5 cm, time: 10 s, Electrolyte: 30 mM sodium phosphate. Applied voltage: 15 kV. Detection: 200 nm.

Fig. 2. Migration times of model proteins in three types of electrolyte.

Electrolyte: 100 mM Li-Borate; 30 mM Na-Phosphate; 100 mM Na-Borate, pH: 10.0. Other conditions were as in Fig. 1.

Table 2. Effect of additives on migration time.

Additives	Proteins ^a					
	1	2	3	4	5	6
No additive	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Ammonia	0.84	0.79	0.85	0.85	0.95	0.84
Lysine	0.87	0.82	0.88	0.86	1.00	0.85
CHAPS ^b	1.03	0.97	1.09	1.07	1.13	1.01
Polyethyleneimine	—	—	—	—	—	—
TSAC ^c	—	—	—	—	—	—
Choline chloride	0.95	0.95	0.99	1.02	1.17	0.96
Servalyl (pH 3-10)	0.97	0.93	1.07	1.05	1.21	1.00
Ampholine (pH 4-6)	0.95	0.95	1.03	1.02	1.00	0.98
Ampholine (pH 9-11)	1.34	1.22	1.46	1.36	1.19	1.25

^a 1: Serum albumin, 2: Myoglobin, 3: Trypsin inhibitor, 4: Transferrin,

5: Lysozyme, 6: Trypsinogen.

^b 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylamino]propanesulfonic acid.

^c Trimethyl stearyl ammonium chloride.

— Indicates no detection.

Fig. 3. Migration times vs. pI and MW of model proteins.

A: Trypsin inhibitor, B: Ovalbumin, C: Serum albumin, D: Transferrin, E: Hemoglobin, F: Myoglobin, G: Trypsinogen, H: Ribonuclease A, I: Cytochrome c, J: Lysozyme.

4. 洗浄液

0.1 M 水酸化ナトリウム, 0.1 M 塩酸, 0.01~0.1 M リン酸緩衝液 (pH 2.5) をキャピラリー洗浄液として検討した。キャピラリー初期化後, 6種類のモデルタンパク質の移動時間, ピーク面積の再現性を比較する方法により, 洗浄液の評価をおこなった (Table 3)。僅かであるが, リン酸緩衝液が, 0.1 M 水酸化ナトリウムより移動時間, ピーク面積において良い再現性を示した。また, リン酸緩衝液は, 調べた濃度の中では, 0.1 M が最も良い再現性を示した。ただ, リゾチームの移動時間の

再現性は, リン酸緩衝液の濃度によって変化する傾向があった。0.1 M 塩酸は, ピーク面積の再現性から, 十分な洗浄効果がないと判断した。

5. 試料注入法

サイホン法または電気的移動法によって試料注入をおこない, モデルタンパク質またはヒト血清タンパク質各分画の移動時間, ピーク面積の再現性について調べた。Table 4 は, ヒト血清タンパク質各分画 (アルブミン, α_1 , α_2 , β , γ -グロブリン) の移動時間および分画面積の再現性を, 注入法別に調べ, % CV で示した結果である。電気的移動法の方が, わずかに再現性の良いことを示している。データの表示はしていないが, モデルタンパク質についても同様の傾向が得られた。それぞれの試料注入法によって得られたヒト血清タンパク質各分画のピーク面積比 (%) を Table 5 に示した。電気的移動法による注入では, 移動時間の長いアルブミン分画の比が見かけ上減少, 逆に移動時間の短い γ -グロブリン分画の比が, 見かけ上増加している。Fig. 4 は, 健康人ならびに M-proteinemia の血清タンパク質のエレクトロフェログラムであり, 試料注入法による違いが, よく理解できる。

考 察

未処理フューズドキャピラリーを使用して CE によるタンパク質の分離分析を検討した結果, 電解液として 100 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 10.0), 洗浄液として 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 2.5) を用い, 泳動ごとに洗浄液と電解液を一定量ずつ送液して, キャピラリー初

Table 3. Effect of washing solutions on reproducibility of migration time and peak area.

Migration time (% CV)						
Washing solutions	Proteins					
	1	2	3	4	5	6
0.01 M phosphate buffer	0.60	3.78	3.74	0.53	8.80	1.15
0.1 M phosphate buffer	0.68	1.40	0.87	1.14	3.03	0.60
0.2 M phosphate buffer	0.92	0.12	2.39	0.17	10.49	1.81
0.1 M NaOH	5.51	1.33	1.11	0.50	2.01	0.95
0.1 M HCl	2.27	1.28	3.06	1.29	2.50	0.49

(n=8-10)

Peak area (% CV)						
Washing solutions	Proteins					
	1	2	3	4	5	6
0.01 M phosphate buffer	9.95	12.26	13.75	8.63	9.69	9.36
0.1 M phosphate buffer	8.19	6.97	6.50	6.37	8.22	8.89
0.2 M phosphate buffer	12.02	10.33	11.15	11.22	13.41	15.79
0.1 M NaOH	12.76	21.32	13.96	7.88	10.39	13.93
0.1 M HCl	16.77	14.59	16.21	14.05	16.08	17.12

(n=7-10)

1: Serum albumin, 2: Myoglobin, 3: Trypsin inhibitor, 4: Transferrin,
5: Lysozyme, 6: Trypsinogen.

Table 4. Effects of injection methods on reproducibility of migration time and peak area of serum* protein fractions.

Migration time (% CV)					
Methods	Fractions				
	Albumin	α_1	α_2	β	γ
Siphonic	2.34	2.29	2.19	2.05	2.02
Electrophoretic	1.07	1.29	1.31	1.22	1.40

(n=12-16)

Peak area (% CV)					
Methods	Fractions				
	Albumin	α_1	α_2	β	γ
Siphonic	1.99	15.66	8.93	7.77	5.19
Electrophoretic	1.50	17.44	3.87	3.89	3.63

(n=12-16)

* Normal human serum.

期化を行うことが、再現性ある分離分析に有効であることがわかった。

pH 10.0 でのタンパク質の移動時間を決める基本的な要素は、電気浸透流とタンパク質の実効電荷であると考えられる。Fig. 3 に示すように、ホウ酸ナトリウム電解液中で観察された各モデルタンパク質の移動時間は、

Table 5. Percent ratio of serum protein fractions and their apparent changes by injection methods.

Methods	Fractions				
	Albumin	α_1	α_2	β	γ
Siphonic	65.8	4.4	7.9	8.9	12.9
Electrophoretic	56.7	3.5	9.7	10.9	19.2

(n=16)

チトクロム *c* を除いて、ほぼ等電点と相関していた。また、等電点がほぼ同じであるタンパク質（血清アルブミン、オボアルブミン、トリプシンインヒビター）の挙動は、分子量の違いによって移動時間の予測を行える可能性を示唆していた¹⁴⁾。ミオグロビン、ヘモグロビン、トランスフェリンは、等電点に差があるが、それぞれの移動時間はほぼ同じであった。チトクロム *c* の長い移動時間は、解離したシラノール基とチトクロム *c* との静電的相互作用によるものと考えられる。同じことは、リン酸ナトリウム (pH 10.0) を電解液として使用した時に見られ、この時、リゾチームの移動時間も大幅に増加した (Fig. 2)。今回、設定した泳動条件では、塩基性タンパク質の分離に問題点があり、また、タンパク質の移動時間が、等電点以外に、分子量や金属 (Fe) の含有

(a) Siphonic method

(b) Electrophoretic method

Fig. 4. Electropherograms of human serum using different injection methods.

(a) siphonic method (height: 5 cm, time: 10 s).
 (b) electrophoretic method (2 kV, 10 s). Electrolyte: 100 mM Na-borate (pH 10.0). Other conditions were as in Fig. 1. 1: γ -Globulin, 2: β -Globulin, 3: α_2 -Globulin, 4: α_1 -Globulin, 5: Albumin.

によって影響されていることが示唆された。電解質の塩を検討した中で、リチウム塩は、ナトリウム塩よりタンパク質の溶解力が大きいことから、リチウムイオンを含む電解液に、より良好な分離を期待したが、Fig. 2 に示したような結果はむしろ逆であった。タンパク質とシラノール基の相互作用を抑える手段として、pH 10.0 の電解液を選択してきたが、塩基性タンパク質の大きな移動時間は (Fig. 2, 3), 依然としてこの相互作用があることを示している。そこで、この相互作用に拮抗できる物質を電解液に加えることによって、分離改善の可能性を検討した。しかし、今回試みた範囲内では、分離能、再現性を改善できるような添加剤を見いだせなかった。

未処理フューズドキャピラリーを反復使用するために、再現性の高いキャピラリー初期化が必須であり、泳動後のキャピラリー洗浄が重要である。従来、洗浄法と

して水酸化ナトリウム水溶液が多用されているけれども、Zhu ら¹⁰⁾はヘモグロビンを使用し、分光学的方法によって、リン酸水溶液による洗浄の有用性を報告している。最近、Lee ら¹⁵⁾は、1 M NaOH が洗浄液として優れていることを報告している。我々は、モデルタンパク質、ならびにヒト血清タンパク質を使用して、移動時間、ピーク面積の再現性から、洗浄液の効果を検定した結果、0.1 M リン酸水溶液 (pH 2.5) が、他の洗浄液と比較して有用であることを確認した。

CE 法の試料注入法にはサイホン法、電気的移動法、加圧・吸引法がある。サイホン法は注入が簡便であるが、注入量の再現性に若干問題点があるとされている。電気的移動法は注入量の再現性はあるが、多成分を含む試料の場合、原理的に各成分を均等に注入することができない。加圧・吸引法は簡便であるが、繊細な制御が困難である。今回、サイホン法と電気的移動法を検討した。血清中のタンパク質をアルブミン、 α_1 、 α_2 、 β 、 γ -グロブリン各分画の面積比 (%) として算出した場合、各成分を均等に注入できない電気的移動法の特長が、よく反映されていた (Table 5, Fig. 4)。血清タンパク質の各分画の比を問題とする時、電気的移動法によって得られた比を補正することは原理的には可能と思われる。ただし、一般的に、試料中に移動度の差が大きい二つの物質が存在した場合、通常の注入条件 (数 kV, 数秒) の範囲では移動度の小さい物質の注入が著しく不利になったり、また同じ成分比であっても、全体の濃度や希釈液の塩濃度の影響を受けてしまうため、補正が極めて困難である。一方、サイホン法は、エレクトロフェログラムから、直接、比が読み取れる簡便性があるように思われる。

未処理フューズドシリカキャピラリーを用いた CE 法は、今後、改善すべき点はあるけれども、微量、高分離、迅速性、簡便性から、タンパク質の分離分析の有用な手法であることを確認することができた。

文 献

- 1) Karger BL, Cohen AS, Guttman A. High-performance capillary electrophoresis in the biological sciences. *J Chromatogr* 1989; 492: 585-614.
- 2) Mikkers FEP, Everaerts FM, Verheggen Th PEM. High-performance zone electrophoresis. *J Chromatogr* 1979; 169: 11-20.
- 3) Jorgenson JW, Lukacs KD. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Anal Chem* 1981; 53: 1298-302.
- 4) Chen FTA, Liu CM, Hsieh YZ, Sternberg

- JC. Capillary electrophoresis—a new clinical tool. *Clin Chem* 1991; 37: 14–9.
- 5) Nielsen RG, Sittampalam GS, Rickard EC. Capillary zone electrophoresis of insulin and growth hormone. *Anal Biochem* 1989; 177: 20–6.
 - 6) Hogan BL, Yeung ES. Indirect fluorometric detection of tryptic digests separated by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr Sci* 1990; 28: 15–8.
 - 7) Cheng YF, Dovichi NJ. Subattomole amino acid analysis by capillary zone electrophoresis and laser-induced fluorescence. *Science* 1988; 242: 562–4.
 - 8) Takeuchi T, Yeung ES. High-performance liquid chromatographic separation of inorganic anions on a silica gel column modified with a quaternary ammonium salt. *J Chromatogr* 1986; 370: 83–92.
 - 9) 黒須泰行, 佐藤泰世, 宇田川慶子, 栗岡 晋. キャピラリー電気泳動によるビタミン B₆ 群の分析に関する基礎的研究. *ビタミン* 1992; 66: 91–100.
 - 10) Zhu M, Rodrigues R, Hansen D, Wehr T. Capillary electrophoresis of proteins under alkaline conditions. *J Chromatogr* 1990; 516: 123–31.
 - 11) Towns JK, Regnier FE. Polyethyleneimine-bonded phases in the separation of proteins by capillary electrophoresis. *J Chromatogr* 1990; 516: 69–78.
 - 12) Cohen AS, Karger BL. High-performance sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and proteins. *J Chromatogr* 1987; 397: 409–17.
 - 13) Kurosu Y, Hibi K, Sasaki T, Saito M. Influence of temperature control in capillary electrophoresis. *J High Resolut Chromatogr* 1991; 14: 200–8.
 - 14) Kurosu Y, Sato Y, Senda M. Investigation of migration behaviors of peptides and proteins by capillary zone electrophoresis. *Anal Sci* 1991; 7: 273–6.
 - 15) Lee KG, Heo GS. Free solution capillary electrophoresis of proteins using untreated fused-silica capillaries. *J Chromatogr* 1991; 559: 317–24.

要 旨

未処理フューズドシリカキャピラリーを用いたキャピラリー電気泳動法によって、11 種のモデルタンパク質 (MW 6~75kDa: pI 4.5~11.2) 及びヒト血清タンパク質の分離分析を試みた。電解液、添加剤、キャピラリー洗浄法、試料注入法について、タンパク質の移動時間、ピーク面積の再現性を指標として検討した。電解液として 100 mM ホウ酸ナトリウム (pH 10.0), 洗浄液として 0.1 M リン酸水溶液 (pH 2.5), 泳動ごとに洗浄液と電解液を交互に 5 分間送液してキャピラリーの初期化を行い、再現性の良い分離分析が達成できた。使用したモデルタンパク質は、チトクロム c を除き、等電点と関連する移動時間を示した。ヒト血清タンパク質は、8 分以内で分離分析が可能であった。さらに改善すべき点はあるが、未処理フューズドシリカキャピラリーを用いた電気泳動法は、微量、高分離、迅速、簡便なタンパク質分析手法として有用であることを確認した。