〔原 著〕

Trimethylammoniumpropanesulfonate (Z1-methyl) 添加によるヒト血清蛋白質の キャピラリー電気泳動分離法の検討

三浦利彦*・矢吹重光*・船渡忠男**・坪 茂典***
町田祥子†・川村 武**・佐々木毅**

SUMMARY

Recent data have demonstrated that a capillary electrophoresis (CE) using untreated fused silica capillary has some advantages for separation of proteins or other substances. It is, however, necessary to minimize nonspecific adsorption of proteins to the wall, which cause decreased reproducibility. In order to overcome this problem, we extended a CE method by adding trimethylammoniumpropanesulfonate (Z1-methyl) as a zwitterion to running buffer, where the pH was raised above the isoelectric points of sample proteins. We also checked the optical condition for the separation of human serum proteins. The results showed that the use of 50 mM sodium borate (pH 10.0) including 1.0 M Z1-methyl gave a reproducible and more evident separation pattern at the analysis of human serum proteins. These results indicate that CE with Z1-methyl was useful method on a clinical laboratory.

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

はじめに

蛋白質をキャピラリー電気泳動 (CE) で分析する場合、未処理溶融シリカキャピラリー内壁のシラノール基が負に帯電する¹⁾ ことによって、陰極方向へ生じる電気浸透流^{2,3)} は栓流となり高速液体クロマトグラフィーにおけるポンプの役割を担う。一方、負に帯電したシラノール基は正電荷をもつ蛋白質を静電的に吸着するために、

蛋白質の分析において、ピークのテーリングや繰返し分析でピークが再現しないなどの原因となることが報告されている⁴⁾。

今回、泳動緩衝液の pH を蛋白質の等電点 (pI) より高くすることにより、蛋白質の電荷を全体として負とし、クーロン斥力で吸着を抑制させ、さらに zwitterion を添加することにより蛋白質の吸着を抑えた方法によって、ヒト血清蛋白質混合試料とヒト血清の分離分析の検

Capillary electrophoretic separation of human serum proteins by the addition of trimethylammoniumpropanesulfonate (Z1-methyl) to the buffer.

* Toshihiko Miura, Shigemitsu Yabuki; 東北大学医学部附属病院検査部

** Tadao Funato, Takeshi Kawamura, Takeshi Sasaki; 同, 臨床検査診断学講座

*** Shigenori Tsubo; 杏和総合医学研究所

† Sachiko Machida; 日本ミリポアリミテッド

Correspondence address: Toshihiko Miura, Department of Clinical Laboratory, Tohoku University Hospital, 1-1, Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980, Japan.

略語: CE, capillary electrophoresis; Z1-methyl, trimethylammoniumpropanesulfonate; CA, cellulose acetate membrane electrophoresis; pI, isoelectric point; Alb, albumin; IgG, immunoglobulin G; α_1 AT, α_1 -antitrypsin; α_2 HS, α_2 HS-glycoprotein; N, neutral peak

(受付 1994年3月2日, 受理 1994年6月15日)

討を行ったので報告する。

材料および実験方法

1. 精製ヒト血清蛋白質

市販精製ヒト albumin (Alb, Organon Teknika), ヒト immunoglobulin G (IgG, ICN), ヒト α_1 -antitrypsin (α_1 AT, Chemicon International), ヒト α_2 HS-glycoprotein (α_2 HS, Athens Research and Technology) を使用した。これらの蛋白質を免疫電気泳動で分析したところ、抗ヒト全血清 (Dako) との反応において単一の沈降線だけを形成した。また、等電点電気泳動 (Phast-System, Pharmacia) でおおのの等電点を分析した。Alb は pI 4.75~5.45, α_1 AT は pI 4.4, 4.5, 4.55, 4.6, 4.65, α_2 HS は pI 4.3~4.65, IgG は pI 6.55~9.3 であることを確認した。

2. ヒト血清蛋白質混合試料の作製

Alb, α_1 AT, α_2 HS および IgG の終濃度がおおの 0.29 mg/ml, 0.20 mg/ml, 0.20 mg/ml, 0.24 mg/ml になるように混合して作製した。CE で分離分析したときに出現したピークの同定は、精製ヒト血清蛋白質の泳動時間と一致を示すことにより行った。

3. ヒト血清試料の作製

ヒト血清をミリ-Q 水 (Millipore) で 100 倍に希釈して用いた。

4. その他の試薬

四ホウ酸ナトリウム, リン酸二水素ナトリウム, リン酸二ナトリウム, 水酸化リチウム (和光純薬: 特級) を使用し、脱気したミリ-Q 水で溶解した後、フィルター (0.45 μ m) に通した。

5. キャピラリー電気泳動の条件

1) キャピラリー: 未処理溶融シリカキャピラリー (75 μ m I.D. $\times$ 60 cm) を用いた。

2) 装置: Quanta 4000 システム (Waters) を使用し、得られたピークのデータ解析は M 741 Data Module で行った。

3) 泳動緩衝液: 25, 50, 100 mM ホウ酸ナトリウム液と 50 mM リン酸ナトリウム液を所定の pH になるように調整して使用した。

4) 添加剤: zwitterion である trimethylammonium-propanesulfonate (Z1-methyl, Millipore) を 0.5, 1.0 M の濃度になるように緩衝液に添加した。

5) 試料注入: 重力法 (落差 10 cm) で 10 秒間注入した。

6) 泳動: 100 μ A を越えない範囲で定電圧 (10~20

kV) をかけて泳動した。

7) 検出: フローセル方式によるオンラインで検出 (波長 214 nm) した。

8) キャピラリーの初期化: 分析ごとに 100 mM 水酸化リチウム, 次にイオン交換水, 最後に緩衝液を送液した。

6. セルロースアセート膜電気泳動 (CA) の条件

1) 膜: セラフォア (6 $\times$ 16 cm, ザルトリウス) を用いた。

2) 装置: 全自動電気泳動装置 FED-II (コスモ) を用いた。

3) 緩衝液: 70 mM バルビタール緩衝液 (pH 8.6) を用いた。

4) 泳動: ヒト血清を 0.3 μ l/0.5 cm 塗布し, 定電流 (0.6 mA/cm) をかけて 19 分間泳動した。

5) 染色液: 0.8% ポンソー 3R (コスモ)-6% トリクロロ酢酸で 20 秒間染色した。

6) 検出: デンシトメトリー (500 nm) で検出した。

結 果

1. Z1-methyl 無添加緩衝液の pH

ヒト血清蛋白質混合試料を用いて、泳動に適した緩衝液の pH を検討した。泳動緩衝液は pH 2.5, 4.0 および 7.0 に調整した 50 mM リン酸ナトリウム液と pH 10.0 に調整した 50 mM ホウ酸ナトリウム液を使用した。その結果, Fig. 1 に示したように, pH 2.5 と pH 4.0 では分離同定することができなかった。また, pH 7.0 では一部分離が可能であった。一方, pH 10.0 では分離同定することができたが、ピーク形状はブロードであることから、満足できるものではなかった。

2. Z1-methyl 添加緩衝液の pH

上記緩衝液に終濃度が 1.0 M になるように Z1-methyl を添加して, 1. と同様に泳動に適した緩衝液の pH を検討した。Fig. 2 に示したように, 各 pH においてみられたピークは無添加に比べて大きな形状になった。pH 2.5, と 4.0 では分離が不十分であり, ピークを同定することはできなかった。pH 7.0 では一部分離が可能であった。一方, pH 10.0 ではおおの精製ヒト血清蛋白質は鋭いピークとして分離同定された。

3. Z1-methyl の濃度

ヒト血清蛋白質混合試料を用いて、泳動に適した Z1-methyl の濃度を検討した。泳動緩衝液は Z1-methyl を終濃度が 0.5 M, 1.0 M になるように添加した 50 mM ホウ酸ナトリウム液 (pH 10.0) を用い, 5 回繰り返し測定

Fig. 1. Effect of pH in buffer without additive on separation of purified human serum proteins.

Conditions: running buffer, 50 mM phosphate buffer (pH 2.5, 4.0 and 7.0) and 50 mM sodium borate buffer (pH 10.0); capillary length, 60 cm; capillary diameter, 75 μ m; detection, 214 nm; injection, siphonic method (height: 10 cm, time: 10 s). Abbreviation: Alb, albumin; α_1 AT, α_1 -antitrypsin; α_2 HS, α_2 HS-glycoprotein; IgG, immunoglobulin G; N, neutral peak.

Fig. 2. Effect of pH in buffer with additives on separation of purified human serum proteins.

Conditions: additive, 1.0M Z1-methyl; others are the same as in Fig. 1.

Table 1. Effect of Z1-methyl concentration in running buffer on reproducibility of migration time and peak area.

Buffer	Parameter	Alb	α_1 AT	α_2 AT	IgG
Migration time					
A	Mean	22.18	20.24	17.68	14.64
	SD	0.13	0.17	0.15	0.10
	CV (%)	0.59	0.84	0.85	0.68
B	Mean	16.46	15.33	13.75	11.73
	SD	0.05	0.05*	0.04*	0.04
	CV (%)	0.30	0.33	0.29	0.34
C	Mean	8.93	8.52	8.07	6.77
	SD	0.01**	0.01**	0.01**	0.01**
	CV (%)	0.11	0.12	0.12	0.15
Peak area					
A	Mean	127019	89043	55289	76294
	SD	7596	10694	7309	8774
	CV (%)	5.98	12.01	13.22	11.50
B	Mean	61982	39877	33593	32497
	SD	2820	3729	2993	2925
	CV (%)	4.55	9.35	8.91	9.00
C	Mean	38734	20883	16621	22929
	SD	1189**	1040**	667**	803**
	CV (%)	3.07	4.98	4.01	3.50

$n=5$ each.

The composition of the buffers is as follow: 50mm sodium borate buffer (pH 10.0), (A) containing no additive; (B) containing 0.5m Z1-methyl; (C) containing 1.0m Z1-methyl. Other conditions are the same as in Fig. 1. Test for equal variance, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ compare with no additive. SD: standard deviation, CV: coefficient of variation.

Fig. 3. Effect of salt concentration in buffer on separation of purified human serum proteins.

Conditions: running buffer, 25, 50 and 100mm sodium borate buffer (pH 10.0); additive, 1.0m Z1-methyl; others are the same as in Fig. 1.

Fig. 4. Comparison of human serum protein profile by CA and CE. Each serum sample is obtained from patient with a gammaglobulinemia (case 1), chronic inflammation (case 2) or IgG type M-proteinemia (case 3) and double albuminemia (case 3).

Conditions: running buffer, 50 mm sodium borate buffer (pH 10.0); additive, 1.0 M Z1-methyl; others are the same as in Fig. 1.

による各成分の泳動時間、ピーク面積の再現性 (CV%) を Table 1 に示した。無添加に比べて 1.0 M Z1-methyl の添加により、有意 ($p < 0.01$) に泳動時間とピーク面積の再現性の向上が認められた。

4. 緩衝液の塩濃度

ヒト血清蛋白質混合試料を用いて、泳動に適した緩衝液の塩濃度を検討した。泳動緩衝液は 1.0 M Z1-methyl 含有の 25 mM, 50 mM, 100 mM に調整したホウ酸ナトリウム液 (pH 10.0) を使用した。その結果, Fig. 3 に示したように, 25 mM では IgG のピークは 2 峰性を示し, 100 mM では 25 mM や 50 mM に比べてピークはブロードで, 泳動時間も長くなった。一方, 50 mM では各精製ヒト血清蛋白質は鋭いピークとして 10 分以内に分離同定された。

5. 患者血清蛋白質のエレクトロフェログラム

患者の血清蛋白質分析を CE ならびに CA で行い, それぞれの泳動パターンを Fig. 4 に示した。血清 1 は低 γ -グロブリン (γ 低下) の血清である。 γ 分画 (矢印) の低下が CE-1 および CA-1 において観察された。血清 2 は慢性炎症型 (α_1 , α_2 および γ 上昇) の血清である。 α_1 分画 (矢印 1), α_2 分画 (矢印 2) および γ 分画 (矢印 3) の上昇がいずれの泳動パターンにおいても観察された。血清 3 はダブルアルブミンをもち, IgG-K 型 M-蛋白の血清である。CE-3 において, 明瞭に泳動時間の異なるダブルアルブミンによる二つのピーク (矢印 1, 2) と γ 分画に鋭いピーク (矢印 3) が観察された。

考 察

蛋白質およびキャピラリー内壁のシラノール基の解離は pH により影響を受けるので, 泳動緩衝液の pH は最も重要な分析条件である。そこで, pH の最適条件を検討したところ, Fig. 1 に示したように pH 4.0 では, 蛋白質がキャピラリー内壁に強く吸着することが示唆された。使用した精製ヒト蛋白質の pI は Fig. 1 に示したように pI 4.3~9.3 であり, pH 4.0 では正に荷電するので, シラノール基の解離によって負に帯電したキャピラリー内壁に静電的に吸着したものと考えられる。また, pH 4.0 ではシラノール基の解離が抑制され, 電気浸透流が非常に小さくなったこと^{2,3)}も吸着の一因になっていると考えられる。pH 2.5 では蛋白質の正荷電量が pH 4.5 に比べて大きくなるので, さらに吸着することが予想されたが, 逆の結果になった。これは pH 2.5 ではシラノール基の解離が抑制される²⁾ので, キャピラリー内壁の負荷電量は減少し, したがって正に荷電した蛋白質の静電気力による結合が減少したことによるものと考えられる。pH 7.0 では一部分離されたが, 依然として分離不十分であり内壁に蛋白質が吸着していることが示唆された。一方, pH 10.0 では分離された面積の大きいピークが見られたことから, 蛋白質の吸着はかなり抑制されていると思われる。蛋白質と内壁の両方が pH 10.0 では負に強く帯電しているので, 静電反発により吸着が抑制されていると考えられる。これまで内壁と蛋

白質の吸着を抑える方法としては、pH を蛋白質の pI 以上に高くして、蛋白質と内壁の両方を負に帯電させ静電反発を利用する方法⁵⁻⁸⁾、逆に pH を低くしてシラノール基の解離を抑えて吸着を防ぐ方法⁹⁾ が報告されている。今回のわれわれの結果は前者の方法が有効であることを示している。

これまでの結果から蛋白質とシラノール基の静電的相互作用を抑制させる手段として、pH 10.0 の緩衝液が推奨される。Lee ら⁷⁾はこの条件でヒト血清試料の分離分析を行い、泳動時間の再現性が2%以内であることを報告している。栗岡ら⁹⁾も同様な結果を得ているが、塩基性蛋白質の泳動時間が長いことから、依然として相互作用が存在することを推察している。これを回避する手段としてシラノール基に線状のポリマーを共有結合させることにより蛋白質をシリカ表面に近づきにくくする方法^{4,10,11)}、あるいはシラノール基に疎水基を共有結合させた後、これに非イオン系界面活性剤ミセルを吸着させておくことで、蛋白質の吸着を抑える方法⁹⁾が報告されている。しかし、キャピラリーを前処理する工程が複雑で時間を要する欠点がある。一方、緩衝液に陽イオン^{12,13)}や陽イオン界面活性剤^{14,15)}を加えてシラノール基の負電荷を中和する方法、あるいは zwitterion を加えて蛋白質の吸着を抑制する方法^{5,16)}はキャピラリーの前処理を必要としない点で簡便な方法である。そこで、zwitterion である Z1-methyl を泳動緩衝液に加えることによって、分離改善の可能性を検討した。Fig. 2 に示したように、検討したすべての pH で蛋白質の吸着は抑制され添加による効果が認められた。とくに、pH 10.0 では4種類の精製ヒト血清蛋白質は IgG, α_2 HS, α_1 AT, Alb の順に泳動され、鋭いピークとして短時間で分離された。さらに、ピークの泳動時間と面積の再現性について検討した結果、Table 1 に示すように 1.0 M の添加により良好な再現性が得られ、キャピラリーを洗浄して初期化後、繰り返し分析する場合においてきわめて有効であることが確認された。実際に 1.5 M 添加まで検討を行ったが、1.0 M に比べて再現性に有意差は認めなかった。以上のことから、蛋白質の pI より高い pH で 1.0 M Z1-methyl を併用することにより、ヒト血清蛋白質の CE による明瞭な分離分析が可能になった。

泳動緩衝液の塩濃度が 25 mM の場合、Fig. 3 に示したように IgG が2峰性のピークになって分離された。同じ現象はヒト血清試料における γ 分画においても確認された。これは蛋白質の立体構造の安定に寄与していると考えられている水素結合、疎水結合、静電的相互作

用などの種々の非共有結合¹⁷⁾が IgG では他のヒト血清蛋白質よりも塩濃度によって影響を受けやすいことに起因しているものと考えられる。100 mM では通電量が大きくなるので印加電圧を下げなければならないために、他の塩濃度に比べて泳動時間の延長がみられた。したがって、50 mM が最適な塩濃度条件であることが確認された。

これらの条件で患者血清を分析し、CA の泳動パターンと比較したところ、ダブルアルブミンが CE において明瞭な2本のピークとして分離されたことから、CE は優れた分離能を有することが示唆された。

以上の結果から、1.0 M Z1-methyl 含有の 50 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 10.0) の使用により、CE によるヒト血清蛋白質およびヒト血清の分離分析が可能になった。

本論文の要旨は第 44 回電気泳動学会総会にて報告した。

文 献

- 1) Bolt GH. Determination of the charge density of silica sols. *J Phys Chem* 1957; 61: 1166-9.
- 2) McCormick RM. Capillary zone electrophoretic separation of peptides and proteins using low pH buffers in modified silica capillaries. *Anal Chem* 1988; 60: 2322-8.
- 3) Towns JK, Regnier FE. Capillary electrophoretic separations of proteins using nonionic surfactant coatings. *Anal Chem* 1991; 63: 1126-32.
- 4) Jorgenson JW, Lukacs KD. Capillary zone electrophoresis. *Science* 1983; 222: 266-72.
- 5) Lauer HH, McManigill D. Capillary zone electrophoresis of proteins in untreated fused silica tubing. *Anal Chem* 1986; 58: 166-70.
- 6) Zhu M, Rodriguez R, Hansen D, Wehr T. Capillary electrophoresis of proteins under alkaline conditions. *J Chromatogr* 1990; 516: 123-31.
- 7) Lee KJ, Heo GS. Free solution capillary electrophoresis of proteins using untreated fused-silica capillaries. *J Chromatogr* 1991; 559: 317-24.
- 8) Chen FTA, Liu CM, Hsieh YZ, Sternberg JC. Capillary electrophoresis—A new clinical tool. *Clin Chem* 1991; 37: 14-9.
- 9) 栗岡 晋, 都丸慶子, 佐藤泰世, 黒須泰行. 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. *生物物理化学* 1993; 37: 175-81.

- 10) Hjertén S. High-performance electrophoresis. Elimination of electroendosmosis and solute adsorption. J Chromatogr 1985; 347: 191-8.
- 11) Kilár F, Hjertén S. Fast and high resolution analysis of human serum transferrin by high performance isoelectric focusing in capillaries. Electrophoresis 1989; 10: 23-9.
- 12) Green JS, Jorgenson JW. Minimizing adsorption of proteins on fused silica in capillary zone electrophoresis by the addition of alkali-metal salts to the buffers. J Chromatogr 1989; 478: 63-70.
- 13) Wiktorowicz JE, Colburn JC. Separation of cationic proteins via charge reversal in capillary electrophoresis. Electrophoresis 1990; 11: 769-73.
- 14) Emmer A, Jansson M, Roeraade J. Short communication. Improved capillary zone electrophoretic separation of basic proteins, using a fluorosurfactant buffer additive. J Chromatogr 1991; 547: 544-50.
- 15) Muijselaar WGHM, Bruijn CHMM, Everaerts FM. Capillary zone electrophoresis of proteins with a dynamic surfactant coating. Influence of a voltage gradient on the separation efficiency. J Chromatogr 1992; 605: 115-23.
- 16) Guzman NA, Moschera J, Iqbal K, Malick AW. Effect of buffer constituents on the determination of therapeutic proteins by capillary electrophoresis. J Chromatogr 1992; 608: 197-204.
- 17) Tanford C. Protein denaturation. Adv Protein Chem 1968; 23: 121-282.

要 旨

最近、未処理溶融シリカキャピラリーを用いたキャピラリー電気泳動法は蛋白質あるいはその他の物質の分離において、いくつかの利点を有することが報告されている。しかし、蛋白質の分析においては、蛋白質のキャピラリー内壁に対する非特異的吸着等の克服される問題が少なくない。これを解決するために、緩衝液の pH を試料（蛋白質）の pI より高く設定し、さらに zwitterion である trimethylammoniumpropanesulfonate (Z1-methyl) を緩衝液に添加した際の分析条件について検討した。その結果、泳動緩衝液として、1.0M Z1-methyl 含有の 50 mM ホウ酸緩衝液 (pH 10.0) を使用することにより、ヒト血清蛋白質の再現性のある分離分析が可能になった。さらに、患者血清分析において優れた分離能が示唆された。

これにより、Z1-methyl を用いた CE は臨床検査において有用な方法であることが示唆される。