〔シンポジウム：キャピラリー電気泳動の最近の成果と展望〕

キャピラリー電気泳動による蛋白質分析の展望と課題

真 鍋 敬

1. はじめに

キャピラリー電気泳動は無機イオン、有機低分子、医薬品成分、ペプチドなど、多くの化学種の分離・分析法としてすでに大きな領域を形成しつつある。これらの化学種は、従来の電気泳動法では分析が困難であるために、もっぱら HPLC によって分離・分析が行われてきたものが多い。すなわち、これらの分析対象については、キャピラリー電気泳動は HPLC に取って代わる簡便かつ高分離能な分析法として注目され、発展してきた。しかし、蛋白質および DNA 断片のような生体高分子については、ゲル電気泳動による分析が過去 30 年にわたって行われ、さまざまな成果が得られている。また、血清/血漿蛋白質の分析に関しては、セルロースアセテート膜（以下セア膜と略す）電気泳動法の改良から全自動装置が広く用いられる段階に至っている。したがって、蛋白質分析や DNA 断片分析の領域では、キャピラリー電気泳動の現状と今後を考えるためには、他の電気泳動法の性能や利点と比較してどのような位置にあるかを評価しなければならない。

本稿では、蛋白質分析の領域において、キャピラリー電気泳動が従来法と比較してどのような位置にあるのかを概観するとともに、今後の発展の可能性について考えたい。

2. 泳動液のみを支持体とするキャピラリーゾーン電気泳動とセア膜電気泳動

本稿では、「ゾーン電気泳動」という語を、「単一の緩衝液を電極槽液および泳動液として用いる電気泳動」という意味で用いる。泳動液溶液のみを支持体とし、ゲル等を用いないキャピラリーゾーン電気泳動の

性能については、同じくゾーン電気泳動の系であるセア膜電気泳動が比較の対象となる。血清蛋白質を分離した経験と文献によれば、以下のように比較の結果を整理できる。

①分離能はどちらも血清蛋白質を 6 分画に分離できる程度である。ただし、泳動条件の設定によりキャピラリー電気泳動ではさらに数個の蛋白質ピークや肩を検出できる場合がある¹⁾。

②キャピラリー電気泳動で上記の分離能を再現的に得るためには、キャピラリーの内壁に蛋白質が吸着することによる影響を抑える必要がある。すなわち、泳動の前にはキャピラリー中に 1 M 水酸化ナトリウム溶液を通す方法¹⁾や、緩衝液に界面活性剤²⁾や両性電解質を加えて動的に表面電荷を抑える方法が用いられる。注意すべきことは、キャピラリーゾーン電気泳動では電気浸透流を試料の分離に利用する点である。例えば血清試料はセア膜電気泳動の場合と逆に、キャピラリーの陽極側端から注入され、陰極側にある紫外吸収などの検出器で検出される。

③吸着との関連で、キャピラリーに注入する血清試料は、原液のままでなく 20 倍程度以上希釈して用いる必要がある。内壁と蛋白質との吸着平衡は、蛋白質濃度が高くなると吸着のほうに片寄ることになるため、例えば血清の原液をキャピラリーに注入してゾーン電気泳動しても、一本の大きいピークが長くテーリングしたように検出されるだけで、ピークの分離は得られない。

④血清蛋白質の泳動開始から検出までに要する時間は、キャピラリー電気泳動では 10 分以内で、2 分程度で検出している報告もある³⁾。実験室用のセア膜電気泳動装置では、泳動開始から染色、デンストメトリー

Protein analysis by capillary electrophoresis: Present and future.

Takashi Manabe; 愛媛大学理学部化学科

Correspondence address: Takashi Manabe, Department of Chemistry, Faculty of Science, Ehime University, 2-5 Bunkyo-cho, Matsuyama 790, Japan.

第 46 回日本電気泳動学会総会・シンポジウム

まで2時間以上要するうえ、手操作の段階が多い。ただし同時に20検体程度を泳動できる利点がある。しかし、1検体あたりで評価しても、全自動キャピラリー電気泳動装置を用いたゾーン電気泳動のほうが、手操作のセア膜電気泳動より操作性は高いと考えられる。セア膜電気泳動の全自動装置とキャピラリー電気泳動装置との比較では、明らかにセア膜装置のほうが単位時間当たりの処理検体数が大きいので、キャピラリーを並列に数十本並べて同時に泳動、検出する全自動装置が登場するまで、優位は変わらないはずである。

3. ゲルまたはポリマー溶液を支持体とする キャピラリーゾーン電気泳動とゲル電気泳動

溶液だけを支持体とするゾーン電気泳動では、蛋白質の分離能を高くするには原理的に限界がある。しかし、ゲルに泳動液を含ませたものや泳動液中に水溶性ポリマーを加えたものをキャピラリーゾーン電気泳動の支持体として用い、SDS複合体として蛋白質に大きな負荷をもたせれば、蛋白質をもとのサイズの違いにより分離できるはずである。実際、塩基配列決定用DNA断片のサイズ分離については、キャピラリーゲル(ポリマー)電気泳動によって、大型平板ゲルを用いたゲル電気泳動に匹敵する、極めて高い分離能が得られている⁴⁾。蛋白質のサイズ分離について、以下にキャピラリーゲル(ポリマー)SDS電気泳動の現状と、従来のポリアクリルアミドゲルSDS電気泳動とを比較する。

①分離能については、不連続緩衝液系やポリアクリルアミド密度勾配ゲルを利用できる円筒/平板ゲルSDS電気泳動のほうが、現在のところ優れている。平板ゲルSDS電気泳動では、分子量約10万から1万程度の蛋白質を、10cmのゲル長に100以上のバンドとして分離することが可能である(バンド幅0.5mm以下)。キャピラリーゲル(ポリマー)SDS電気泳動では、上記分子量範囲の蛋白質ピーク約20本が互いに分離できる程度である^{5,6)}(Fig. 1)。キャピラリーゲル(ポリマー)SDS電気泳動でも、不連続緩衝液系や密度勾配ゲルを用いて分離能を向上させることは原理的に可能ではあるが、そのことによってキャピラリー電気泳動の大きき特徴である高い操作性を失わせることになるので、実際には行われていない。

②キャピラリーゲル(ポリマー)SDS電気泳動では、SDS-蛋白質複合体を泳動途中で紫外吸収によって検出し、検出時間やピーク面積などの情報を自動的に得ることができる。また、ゲル充填キャピラリーであれ

Fig. 1. Capillary SDS electrophoresis of six proteins.

Capillary SDS electrophoresis was done in a 75 μ m i. d., 40 cm long (effective length 20 cm) fused-silica capillary coated with linear polyacrylamide. Linear polyacrylamide (4% T, 0% C, containing 0.05 M Tris-0.38 M glycine and 0.1% SDS) was filled in the capillary and run at 200 V/cm. Sample injection was done at 200 V/cm for 5 sec using a solution containing six purified proteins (0.5 mg/ml each) and 0.5% SDS. Protein peaks has been identified to be; 1, cytochrome ; 2, carbonic anhydrase; 3, ovalbumin; 4, albumin; 5, apo-transferrin; and 6, phosphorylase b.

ば紫外吸収検出器に固定したままで、20回程度以上繰り返し電気泳動することも可能であるし⁷⁾、ポリマー溶液を用いて分離する場合であれば、キャピラリーを交換することなく、数百回泳動を繰り返すことも可能ではある。平板型ゲルSDS電気泳動の場合は、ゲルを泳動ごとに取り外し、染色し、デンストメトリーするまでは分析結果の定量的な取り扱いができない。平板ゲルの場合は同時に10~20試料を泳動できることを考慮しても、キャピラリー電気泳動のほうが操作性において優れていると思われる。

上記①、②を合わせて考えると、キャピラリーSDS電気泳動は、特にポリマー充填の系で、従来のSDSゲル電気泳動に置き代わる可能性をもつだけでなく、サイズ分離したSDS蛋白質複合体を自動的に分取する方法として、さらに発展することも期待できそうである。

4. キャピラリー等電点電気泳動と ゲル等電点電気泳動

キャピラリーを用いると等速電気泳動の状態を安定

Fig. 2. Capillary isoelectric focusing of human plasma proteins.

Capillary isoelectric focusing was done in a 75 μ m i. d., 27 cm long fused-silica capillary coated with linear polyacrylamide at 250 V/cm. Human plasma (final 280-fold diluted) was mixed with a Ampholine solution (final concentration 1%) and injected in the capillary before electrophoresis. The step of focusing was run for 10 min, then the anodic solution was replaced with 0.01 M CH_3COOH to mobilize and detect the proteins.

に保つことが容易であるために、1970年代からキャピラリー等速電気泳動の装置が市販され、有機酸、金属イオンなどの分離に用いられてきた。しかし蛋白質の分離については、等速電気泳動の原理だけでは蛋白質どうしを互いに独立したゾーンとして区別して検出することが難しく、両性電解質混合物と蛋白質試料を混合したものを等速電気泳動の緩衝液系で分離する方法が用いられ、筆者らもこの方法を用いた全自動キャピラリー電気泳動装置による血清蛋白質の分析について報告した⁸⁾。キャピラリー中での等電点電気泳動がこのころ広まらなかったのは、蛋白質が等電点に収束すると、位置を固定した検出器では検出ができないと考えられたからであろう。Hjerténらは、等電点電気泳動で形成されたpH勾配を、電極槽液のイオン組成を変えることで変化させ、蛋白質を検出器側に移動させる方法を報告した⁹⁾。その後さらにいくつかの方法が、収束後の蛋白質を移動させるために工夫され、キャピラリー等電点電気泳動方法の利用が広がっている^{10,11)}。一方、ゲル等電点電気泳動は、固定化pH勾配ゲルを用いるなど、pH勾配範囲の拡大や再現性の向上の工夫が進められ、アイソザイム検出の目的や2次元ゲル電気泳動の1次元目分離法として用いられている。以下

に、キャピラリー等電点電気泳動の現状をゲル等電点電気泳動と比較する。

①キャピラリー等電点電気泳動では、筆者らの研究室で市販両性電解質混合物 (Ampholine) を用いて、等電点8程度から等電点4程度の範囲の血清蛋白質について、70以上の紫外吸収ピークまたは肩が検出できる程度の分離能を達成できた (Fig. 2)。すなわち、単純に計算すると、2つの蛋白質の等電点の値が0.1違えば、互いに区別して検出できることになる。これは、長さ10 cm程度の円筒ゲルで、Ampholineを用いて血清蛋白質を分離した場合の分離能と同程度である。ただし、キャピラリー等電点電気泳動の場合は、蛋白質をいったん収束させてから移動させる。したがって、蛋白質が実際に等電点の順に移動しているのかどうかについては、さらに厳密な検討が必要である。

②操作性の面では、キャピラリー等電点電気泳動は、1)ゲルを作製する必要がない、2)ゲルを取り出し、染色、デンストメトリーをする必要がない、などの利点がありゲル等電点電気泳動より大いに有利である。ただし、キャピラリー等電点電気泳動では、蛋白質の吸着を抑えるためにキャピラリーゾーン電気泳動の場合よりもさらに徹底した内壁処理が必要であり、現在実

験室レベルで一般に行われている処理法はちょうどポリアクリルアミドゲル作製と同程度の時間と労力を要する¹²⁾。しかし、一度処理したキャピラリーは、血清蛋白質分析には20回程度以上繰り返し使用できるので、一回の分析あたりの労力は少ないことになる。また、処理済みのキャピラリーが各社から市販され始めているので、これを用いることもできる。

Fig. 2 に示したように、キャピラリー等電点電気泳動では1時間程度で血清蛋白質の検出と記録までが終了しているが、アガロースやポリアクリルアミドなどの円筒ゲルを用いる従来法では、蛋白質を等電点に収束させる過程だけでも数時間を要する。ただし、ゲル等電点電気泳動では泳動後ゲルを切片とし、電解質を水に溶出させて直接pHを測定することができるが、キャピラリー中のpH勾配を直接測定する方法は、まだ開発されていない。

上記①②を合わせて考えると、キャピラリー等電点電気泳動は、特に高い分離能を要求される蛋白質分析の場面（純度検定等）において、今後利用が広がる可能性が高いと思われる。

5. キャピラリー電気泳動を用いた結合分析法

キャピラリー電気泳動は分離分析法であり、分離後の蛋白質の構造情報を得るためにMSと結合する結合分析法（CE-MS）が研究の焦点となっている。高感度であることや、得られる情報の質が高いことから、現在のところ質量分析法は最も有効な構造解析法と考えられるからである。キャピラリー電気泳動で分離した後に、アミノ酸配列情報を得るためにシークエンサーにかけることも行われており、これも一種の結合分析法と考えることができる。また、分離分析法どうしの結合として、HPLCとキャピラリー電気泳動の結合（HPLC-CE）などの報告がある。キャピラリー電気泳動そのものも、現在用いられているだけでも5種（ゾーン電気泳動、MEKC、等電点電気泳動、等速電気泳動、サイズ分離電気泳動）以上の分離原理に基づくものであり、異なる分離原理でのキャピラリー電気泳動どうしの結合（CE-CE）も、今後発展してゆくことが期待される。これらの一部は従来の2次元ゲル電気泳動による蛋白質分離と蛋白質情報収集システムに対応するものであるが、分離能や情報量の面では2次元ゲル電気泳動のほうが現時点では優れている。しかし、キャピラリー電気泳動を用いる結合分析法は、全体として多様な新しい蛋白質分析の領域を拡大しつつある。

6. キャピラリー電気泳動による蛋白質分析の今後

以上のように、すでに現時点においても、キャピラリー電気泳動は蛋白質分析に従来広く用いられてきた電気泳動法と十分に競合しうだけでなく、ある面ではより優れた性能を示している。注目すべきことは、従来のセア膜電気泳動、ゲルSDS電気泳動、ゲル等電点電気泳動が、それぞれ別々の装置でしか実施できなかったのに対し、キャピラリー電気泳動の場合は、1つの装置でこれら原理の異なる電気泳動のいずれもが実施できるという点である。しかもその装置では、試料注入位置から検出器までの距離がわかっているので、蛋白質の移動速度を容易に計算でき、このデータを研究室間で比較することも容易となるはずである。

キャピラリー電気泳動（CE）による蛋白質分離の原理としては、前節までに述べた以外にも、蛋白質と他の分子とのアフィニティを用いる分離や、界面活性剤ミセルとの相互作用を用いる分離が試みられ、成果を上げつつある。電気泳動研究者の立場からみれば、これらの領域はアフィニティ電気泳動あるいは親和電気泳動として、すでに長期間取り組まれてきたものと深い関係がある領域である。キャピラリー電気泳動装置を用いることによって、従来のテーマに限っても分離能の向上や解析の精度の向上が期待できるはずである。

キャピラリー電気泳動は、さまざまな化学種の分離能の向上と分離の再現性を追求する中で発展してきた。従来の電気泳動法との根本的な違いは、対象とする試料が蛋白質やDNA断片に限らず、すべての化学種にまで広がりつつあるという点にある。すなわち、キャピラリー電気泳動は、化学種の微量分離・分析と構造解析という科学の大きな領域において、多くの研究者に共通の言語を提供しつつある。このことは、蛋白質分析の領域においても、新しい視点による研究の方向が生まれ、発展してゆくことを約束するものであると考えている。

文 献

- 1) Lee X-J, Heo GS. Free solution capillary electrophoresis of proteins using untreated fused-silica capillaries. J Chromatogr 1991; 559: 317-24.
- 2) Towns JK, Regnier, FE. Capillary electrophoretic separations of proteins using nonionic surfactant coatings. Anal Chem 1991; 63: 1126-32.

- 3) Chen F-TA. Rapid protein analysis by capillary electrophoresis. *J Chromatogr* 1991 ; 559 : 445-53.
- 4) Manabe T, Chen N, Terabe S, Yohda M, Endo I. Effects of linear polyacrylamide concentrations and applied voltages on the separation of oligonucleotides and DNA sequencing fragments by capillary electrophoresis. *Anal Chem* 1994 ; 66 : 4243-52.
- 5) Ganzler K, Greve KS, Cohen AS, Karger BL, Guttman A, Cooke NC. High-performance capillary electrophoresis of SDS-protein complexes using UV-transparent polymer networks. *Anal Chem* 1992 ; 64 : 2665-71.
- 6) Guttman A, Nolan JA, Cooke NC. Capillary sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis of proteins. *J Chromatogr* 1993 ; 632 : 171-5.
- 7) Manabe T. Sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis of proteins employing short capillaries. *Electrophoresis* 1995 ; 16 : 1468-73.
- 8) Manabe T, Yamamoto H, Okuyama T. Fully automated capillary isotachopheresis of proteins. *Electrophoresis* 1989 ; 10 : 172-7.
- 9) Hjertén S, Liao JL, Yao K. Theoretical and experimental study of high-performance electrophoretic mobilization of isoelectrically focused protein zones. *J Chromatogr* 1987 ; 387 : 127-38.
- 10) Mazzeo JR, Krull IS. Capillary isoelectric focusing of proteins in uncoated fused-silica capillaries using polymeric additives. *Anal Chem* 1991 ; 63 : 2852-7.
- 11) Yao XW, Regnier FE. Polymer- and surfactant-coated capillaries for isoelectric focusing. *J Chromatogr* 1993 ; 632 : 185-93.
- 12) Hjertén S. High-performance electrophoresis. Elimination of electroendosmosis and solute adsorption. *J Chromatogr* 1985 ; 347 : 191-8.