

〔シンポジウム II〕 2次元電気泳動

1. セルロースアセテート膜による2次元電気泳動*

大橋望彦・戸田年総・藤田敬子**

最近2次元電気泳動法も実用面で広く利用されるようになり、多くの研究に重要な知見を与えている。また検出感度も銀染色法の出現により飛躍的に上昇した。とくに本年春頃より、色彩銀染色法が報告され、検出される蛋白質の質的差の判別も容易となり、今後の利用範囲がより拡大されることは十分予想される。しかし一方では、これら有用な方法も、臨床検査などに滲透するまでには至らず研究的手法に止まっているのが現状である。

普及をさまたげている要因としては、

1) 分離法が蛋白質のサブユニットを単位としているため、従来の方で分離した蛋白質との対応が付き難い。

2) 蛋白質が解離して、生物活性を失っているものが多い。

3) あまりにも多くのスポットが検出されるため、その情報処理能力に限界がある。

4) 2次元電気泳動に共通した、定量法に問題がある。

5) 方法の修得に時間がかかる。

6) ゲルの調製をするのは熟練を要する。

7) 保存し難い。

8) 多検体処理は容易でない。

等々が考えられる。これらのことを配慮して、従来試みられていなかった、セルロースアセテート膜(セ・ア膜)を利用した2次元電気泳動法を開発し、各種試料について検討してきた。ここにそれら結果についての概要を紹介する。

方法・材料

方法としては、第1次元目には「濃縮電気泳動」が行われる。すなわち、この「濃縮電気泳動」は添加試料が一旦濃縮される段階と、引き続き、一定pH条件下で異なる移動度をもつ蛋白質が相互に分離するいわゆる通常の電気泳動の段階により構成されている。第2次元目に

APPARATUS FOR TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS

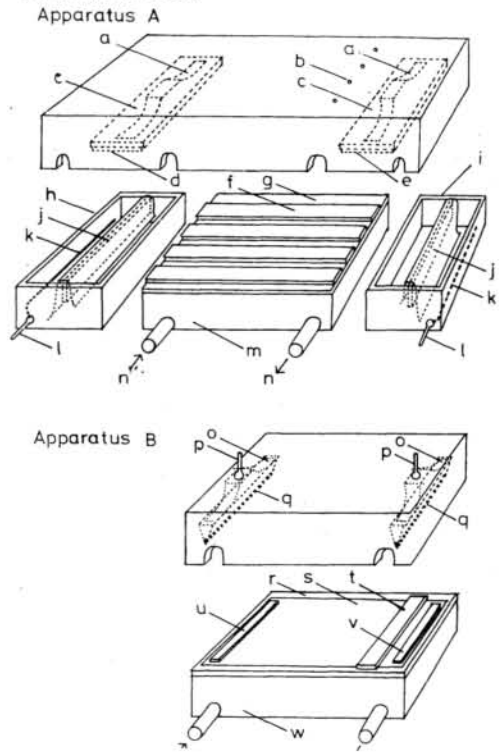


図1A セ・ア膜濃縮電気泳動装置。(1次元用)

図1B セ・ア膜等電点電気泳動装置。(2次元用)

a: 懸垂橋保持パネ. b: 試料添加用穴. c: 懸垂橋. d: 懸垂濾紙(陰極側). e: 懸垂濾紙(陽極側). f: セ・ア膜(Titan III). g: ガラス板. h: 陰極槽. i: 陽極槽. j: 電極濾紙橋. k: 電極(白金線). l: 電極ターミナル. m: 冷却槽. n: 冷却水(出入口). o: 電極保持パネ. p: 電極ターミナル. q: ナイフ・エッジ電極(白金). r: ガラス板. s: セ・ア膜(Separax EF). t: 1次元泳動済みセ・ア膜. u: 陽極ガラス・ファイバー片. v: 陰極ガラス・ファイバー片. w: 冷却槽.

* Two-dimensional electrophoresis on cellulose acetate membrane.

** Mochihiko Ohashi, Tosifusa Toda, Toshiko Fujita, 東京都老人研究所生化学.

表 1 2次元電気泳動条件.

TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS	
1st dimension	
Membrane :	Titan III Zipzone (1×7.6 cm)
Buffer :	Leading, 62 mM Tris-HCl, pH 6.7
	Terminating, 50 mM Arginine- Ba(OH) ₂ , pH 11.7
	Passing, 100 mM Tris-H ₂ PO ₄ , pH 7.5
Run :	Concentration, 200 V, 30 min
	Separation, 0.4 mA/strip, 50 min
2nd dimension	
Membrane :	Separax EF (6×11 cm)
Buffer :	Anodal, 1% H ₃ PO ₄ , 30% sucrose
	Cathodal, 1% ethylenediamine
	Carrier, 5% Ampholine, 3.5-10, 10% sucrose
Run :	1 mA/sheet (const.) → 800 V/11 cm (const.)
	3 hrs.

は「等電点電気泳動」が行われる。両次元とも支持体としてセルロースアセテート膜を採用しているのが本法の特徴である。

1. 濃縮電気泳動：濃縮を行うためには特殊な装置を考案し(図1A), 実用化している。この原理には等速電気泳動の溶媒系(表1)と支持体(1×7.6 cm)の性質に応じた電気浸透とを組み合わせて、添加試料を集束、シャープなバンドを形成させる手法が講じてある。したがって、電気浸透の異なるセ・ア膜では集束位置が異なることを利用して、試料に最適なセ・ア膜の選択を行っている。通常は、Titan III が採用されている。試料添加バンド形成が終了後、溶媒系を変えて(表1, passing ion を含む溶媒)通電を継続する。この際、試料中の蛋白質は用いた溶媒系のpHに応じて、荷電の異なる蛋白質相互間で分離泳動する。ここまでが1次元泳動である。

2. 等電点電気泳動：2次元目に行う等電点電気泳動には、支持体としてセ・ア膜を用いるが、この場合は電気浸透がほとんどないセパラックス EF (6×11 cm) を採用している。1次元目で分離を行ったセ・ア膜ストリップを2次元目の膜の陰極側に密着し、pH 勾配に応じて等電点の異なる蛋白質を相互に分離する。この分離法には新しく考案した装置(図1B)を用い、その泳動条件は表1に示した。通常はpH 3.5~10.0の範囲の等電点を検索している。装置の構造には冷却効率、結露、乾燥防止、電極の形状、安全性、操作性に主眼をおいて設計を行った。また、操作中に、いわゆる蛋白質の変性を生じさせる試薬などは用いず、2次元展開後に生物活性

を維持している蛋白質(酵素など)が検出可能である。この2次元目の泳動では、セ・ア膜を数枚重ねて泳動することもでき、レプリカの作製も容易であるのが一つの特徴である。

3. 材料：これまでに検討した材料は、ヒトやネズミの血清、尿、汗、唾液、臓器組織抽出液などであり、正常と悪性腫瘍(肺癌、食道癌、肝癌、骨髄性白血病など)の比較も併せて行っている。

4. 蛋白質の同定・検出法：2次元展開を終了したセ・ア膜を表2に示すように、スルホサリチル酸固定後、クマジー染色により蛋白質の染色を行う。染色スポットの同定はヒト血清について免疫固定法ならびに免疫向流電気泳動法により検索した。高感度検出法として、Adams らの原法をセ・ア膜に適合する条件に改変して「色彩銀染色法」をほどこした。その染色法の概要は表3に示す。酵素染色法の例としてLDH, G 6 PD, 6 GPD, ICD などに関するアイソザイムを検出した。各対応基質、補酵素、ホルマザン形成試薬を含む寒天板に2次元展開終了セ・ア膜を密着させて、暗所37°Cに30~60分孵置呈色させた。

表 2 蛋白質の検出法(クマジー青染色)。

DETECTION OF PROTEINS	
Fixation :	20% Sulfosalicylic acid
Stain :	3.2% Sulfosalicylic acid, 5% TCA, 0.06% Coomassie Brilliant Blue G 250, 50% EtOH
Destain :	10% AcOH, 20% EtOH
Dry :	5% AcOH, 7.5% glycerol, 7.5% Sol-Yama- to (synth. paste)

表 3 色彩銀染色変法(セ・ア膜用)。

STAINING PROCEDURE		
Steps	Solutions	Duration of agitation
Fix	20% Sulfosalicylic acid	15' or more
↓	↓	↓
Wash	10% EtOH 0.5% AcOH	15' 3× or more
↓	↓	↓
Equilibrate membrane	AgNO ₃ 0.3~0.4 g in 100 ml	15' or more
↓	↓	↓
Reduce silver	NaBH ₄ 8.75 mg HCHO 0.15 ml in 100 ml of 0.6 N NaOH	1'
↓	↓	↓
Enhance color	Na ₂ CO ₃ 7.5 g in 11	10' 3×

5. 蛋白質の定量的解析法：デンストメーター（常光製 PAN-FV 型）を改造し、マイクロコンピューター（CPU：Z-80）と接続，入力データの管理・出力処理プログラムを独自に作製して2次元像の再現ならびに各スポットの図形映像処理，さらに各域値設定に基づく面積比や容積比を算出した。

結果・考察

1. 濃縮電気泳動法の特徴（従来の電気泳動法との比較）

セ・ア膜を用いる電気泳動法で蛋白質の分離を行う場合に，分離能の良し悪しは最初の塗布状態で決まることが多い。注意深く一条に均一な塗布が要求され，特に稀薄蛋白質溶液で何回も同じ個所に塗布しなければならない時はなおさら熟練を必要とする。しかし本法では膜上でシャープなバンドを形成させる濃縮操作があるため，特別な注意を要さず再現性良く分離能の高い泳動像が得られる。したがって，蛋白濃度の低い試料，例えば尿・汗・唾液などの分離泳動像を簡単に得ることが出来る。また，多少の塩類等が試料中に存在していても，脱塩効果があるため妨害することがない。さらに，蛋白のような高分子でなくても，条件の選択さえ良ければ，両性電解質であるならば，ほとんどが濃縮される可能性があり，ペプチド類の分離にも用いられる。

2. 濃縮電気泳動法を用いての稀薄蛋白質試料の分離像（唾液・汗・尿）。

蛋白質濃度の低い試料をセ・ア膜上で分離すると，分離像が悪くなるが，濃縮操作で一旦シャープなバンドを

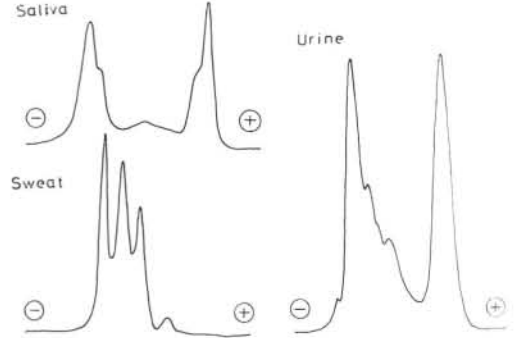


図3 濃縮電気泳動法による稀薄蛋白質試料の分離像。

形成すると分離像が良くなると同時に再現性も良いことを図2に示す。

血清蛋白を常法にしたがい分離すると，通常の5分画が明瞭に識別出来る。しかし，この試料を20倍に稀釈し，同じ蛋白量を塗布して分離像をみると，分離能が悪く，5分画も不明瞭となる。しかし，濃縮電気泳動法では，血清蛋白の分離像は少なくとも11峰に分離し，また20倍稀釈液においても同じ泳動像が得られている。この方法を，唾液・汗・尿などの試料に適用した時の泳動像を図3に示す。これらの泳動像は特別な前処理を行わずに得たもので，通常の方法では泳動像を認めることが出来なかった。

3. 血清蛋白の2次元電気泳動分離像（クマジー青染色法）。

正常ヒト血清蛋白を本法にしたがい2次元に分離し，クマジー青染色により泳動像を得た。従来ではセ・ア膜上で5分画，さらに等電点電気泳動法では20分画程度が分離されたが，本法での泳動像では図4に示されるよう

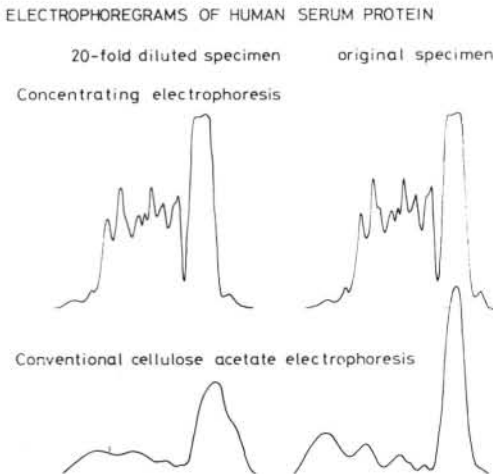


図2 濃縮電気泳動法（上図）と従来の電気泳動法（下図）の泳動像比較。

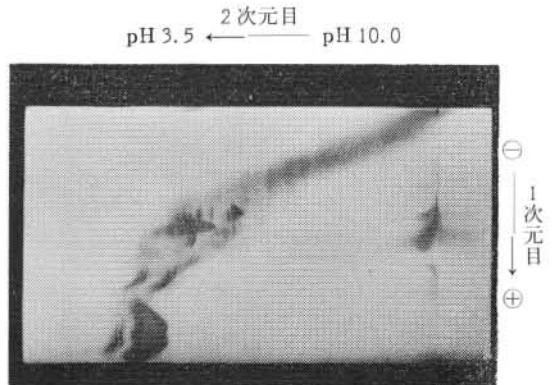


図4 正常ヒト血清蛋白の2次元展開像（クマジー染色）。

(194) 生物物理化学

に、少なくとも70個のスポットが検出される。この図でみても判るように、1次元目で分離し得なかった分画が2次元目で分離しているもの、また2次元目のみでは分離し得なかった分画も1次元目で分画してあるために明瞭となったものが多数認められる。

4. 2次元電気泳動法により分離されたヒト血清蛋白各スポットの免疫固定法に基づく同定。

蛋白染色像として得た2次元像は、従来の分画上の位置、既知蛋白の pI 値などから各スポットがどのような蛋白であるかはおおよその推定はつく。しかし、その各スポット範囲が明確には判断出来ない。そこで、ヒト血清蛋白中、主として多量成分を中心に入手し得る各構成蛋白の抗体を用い、免疫固定法による沈降スポットの検出を試みた。図5はその一部の例で、IgG、C3蛋白の分布位置が示されている。この方法ではその特定蛋白がどの範囲に分布しているかは判断されるが、拡散による各スポット境界の不明瞭な点では、先に推定した裏書きになる程度に止まる。

5. 各スポットの免疫向流電気泳動法による同定

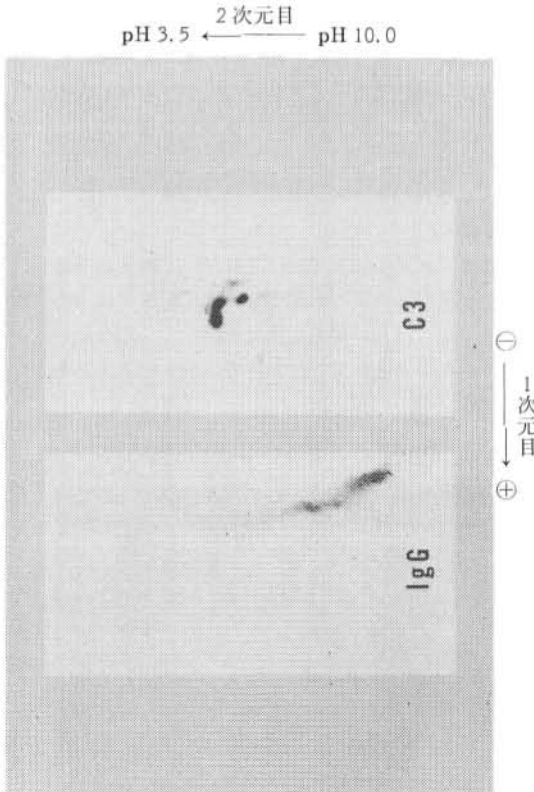


図5 免疫固定法による C3、IgG 蛋白の分布位置 (クマジー青染色)。

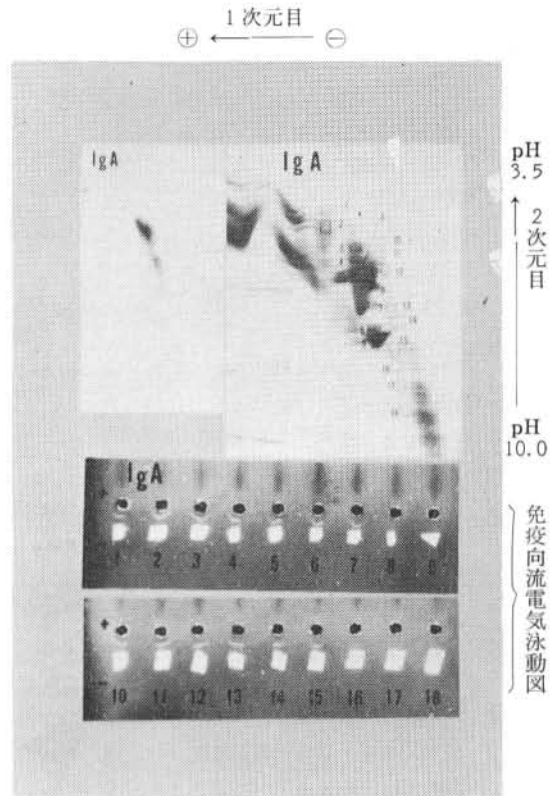


図6 各スポットの免疫向流電気泳動法による位置決定。

左上図：IgA の免疫固定法による位置決定。

右上図：IgA 用に切り出した各小片の位置表示。

下2図：抗 IgA を用いた免疫向流電気泳動像、ホール(黒円部、抗体注入位置)、小片(白色多角形、上図番号に対応)、中間の白線(沈降帯)

先に判定した各分画の定性に関し、より詳細な位置決めは、より微量定性法の適用が必要である。そこで、この2次元電気泳動法の特徴の一つである2次元目に3枚のセ・ア膜を重ねて展開し、その中1枚をクマジー染色しスポットの分離状態を確認し、他の1枚を先の免疫固定法に用い後で分布の確認に用い、さらに他の1枚をクマジー染色スポットに重ねて小片に切り抜いた。図6ではIgAの同定例を示すが、このような多くの切り抜き小片を取り出し、次いでその小片について図のごとく免疫向流電気泳動法を行った。ここでは抗体として抗 IgA を用いているが、明瞭な沈降帯を形成する小片が IgA の分布位置を示している。以上の操作を各種抗体を用いて精査し、ヒト血清蛋白の主要スポットの同定を行った結果をまとめたのが図7である。勿論これ以外の蛋白が血

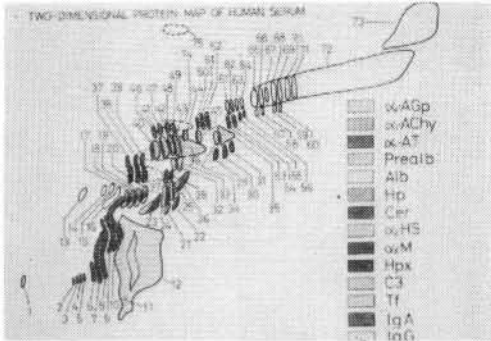


図7 正常ヒト血清蛋白の2次元展開スポット位置模式図。

清中には存在し、それら蛋白が重複している可能性は否定出来ない。また入手し得なかった抗体もあるので未同定構成蛋白が明らかに染色スポット中にも存在している。

6. アイソザイムの分離

各種酵素にアイソザイムの存在していることは良く知られている。これらアイソザイムの同定は、従来の1次元の方法では同時に何種類もの酵素に関して検出することは困難であり、かろうじてスラブ泳動を行い切断してから酵素反応を個々に行って推定する方法が行われている。本法によれば、2次元電気泳動法で蛋白変性剤を使用していない特徴もあり、展開後に酵素活性の測定が可能である。そこで、2次元目で2枚重ねの展開を行い、1枚目は蛋白染色し分離状態を確認し、他の1枚について、酵素活性の染色法による検出を行った。ここでは各種脱水素酵素について調べた例を挙げるが、LDH, G6PD, 6PGD, MDH, ICD, GDH などの酵素を同時に検出することが出来た。これは、各単独酵素反応で、アイソザイムの分布状態を知った上で、全ての基質、補酵素を含む検出試薬（フォルマザン呈色反応基剤）を混合溶液として呈色させる。これらの各アイソザイムは互に重なり合うことなく分布しており、各種臓器特異性などこれまでに得られている知見が良く反映していた。ただし、2次元目の泳動に pH 勾配をつけてあるので、反応液に用いる緩衝液は濃度を高める必要があるのと、至適 pH の異なる酵素の組み合わせは不相当である。また種属特異性が各種酵素で知られており、生物種属によってはアイソザイム相互の重複する可能性も否定出来ない。応用に関しては今後も個々の実験条件の設定をさらに行ってから本実験を執行する必要がある。

7. 担癌患者（膵臓癌）における血清蛋白の異常例
 本法を利用して各種癌患者血清蛋白を検索している

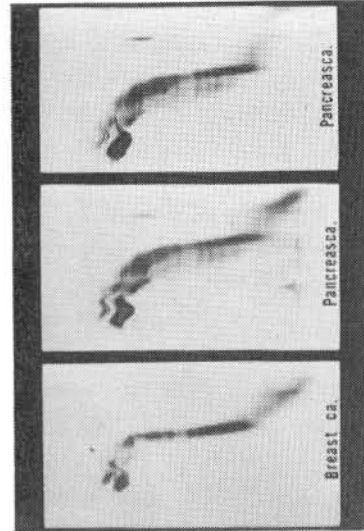


図8 癌患者血清蛋白像の実例。

上：膵臓癌患者にみられた異常な展開像。
 中：上図と同じ（採血時期が2週間異なる）、
 下：乳癌患者。

が、その中で、極めて異常な展開像を示す症例が認められた。図8に示すように、この患者血清は IgG の成分が重複像として現われている。これは、その成因に関して全く不明であるが、従来の1次元の方法では絶対発見し得ない特異例といえる。すなわち、従来法として、1次元目のみでは恐らく β₂ 分画の高値異常例として扱われ、2次元目のみでは γ 分画の高値異常例として扱われたであろう。このような例はまれであるが、同一患者血清を時期をずらして採血した後検査しても同一展開像を示すことから、単なる技術的異常でないことは明らかである。また他の癌患者血清で一般的に α₁-X, α₁-AT, IgA 領域等の濃染色像が認められる例が多いが、現在なお検索中であるので結論は保留する。

8. 組織抽出蛋白像からみた特異性と応用例（肺、食道の比較）。

組織の構成細胞による蛋白染色2次元像の特異性はこれまでの検索で極めて明瞭に存在する。そして、各種腫瘍組織に関して、正常組織の混入がほとんど無視出来ることを病理組織検査で調べた上で2次元像を検討すると、その腫瘍の発生母組織の2次元展開像に酷似していることが知られる。これは、複雑な構成細胞種からなる組織に関しては必ずしも適用し得ないかも知れないが、特に人癌組織（primary tumor）に関しては一般的に云える。そこで、われわれが遭遇した症例を紹介する。肺組織の2次元像と食道組織のそれとは明らかに区別される

が、臨床的に食道癌と診断された患者が死後剖検で肺癌であることが判明し、病理組織診断で、肺原発腫瘍（角化を伴う分化型扁平上皮癌、浸潤性増殖を示す。癌細胞は多型性に富み、癌巣は充実性）の食道への浸潤性（前記肺癌と連続性。癌巣は腺腔を形成するようにみえるが、原形は扁平上皮癌。核分裂像は肺より多い。角化傾向に乏しい。癌巣を被覆する食道粘膜上皮はビラン性）の所見が示された。そこで、この組織を正常部位、腫瘍部位に分けてそれぞれ泳動して比較した。結果的には、食道に存在していた腫瘍抽出蛋白は食道の展開像を示し、原発腫瘍と考えられていた肺腫瘍抽出蛋白は肺の展開像を示していた。このことは、もし肺腫瘍の食道へ浸潤したものであるならば、当然食道部位の腫瘍も肺の展開像を示すことが期待出来ることに明らかな矛盾があった。従来腫瘍と宿主の関係で、宿主の性質が腫瘍に近づくことは屢々報告されているが、腫瘍が宿主組織の性質に近づくことはあまり知られていない。したがって、われわれ独自の解釈をするならば、肺原発腫瘍の浸潤であるというよりは、食道にも原発癌巣が存在し、両者ともに扁平上皮癌であったのではないかというものである。このような複合腫瘍は診断として極めて難しいと思われる。この症例については後に、病理の方にも理解いただいたが、完全な自信を持つ根拠は乏しい。より多くの同様な知見の蓄積が必要であろう。

9. 尿中蛋白の2次元泳動像。

健康人の尿を本法により濃縮泳動後2次元展開した蛋白染色像を見ると明らかにかかなり高分子の蛋白が存在し、量的には少ないとしても、血清の蛋白泳動像に類似した分画の存在していることに驚かされる。さらに、腎障害を伴わない肝癌患者尿の分析では、ほとんど血清の2次元展開像と類似していた（図9）。これが何を意味しているかは今後の課題であるが、尿検査として利用され得る有力な手掛りとなる。

10. 銀染色法の適用試行。

近来、ゲル電気泳動法において著しく感度の高い蛋白質の検出法として銀染色法が利用されている。通常この方法はクマジー染色法と比して100倍程度の感度を有するといわれる。さらにまた、この改良法として色彩銀染色法と称する方法が開発され、第1回国際電気泳動学会（於チャールストン市）に初登場した。この方法を用いると、蛋白の性質にしたがって、銀染色が赤、緑、橙、黄、褐色などと極彩色に呈色する。したがって、多数のスポットが検出されるO'Farrellの展開像などではマーカー蛋白が色彩で区別出来れば、各スポットの位置関係が容易に判断し得ること、さらに、従来のように黒点で

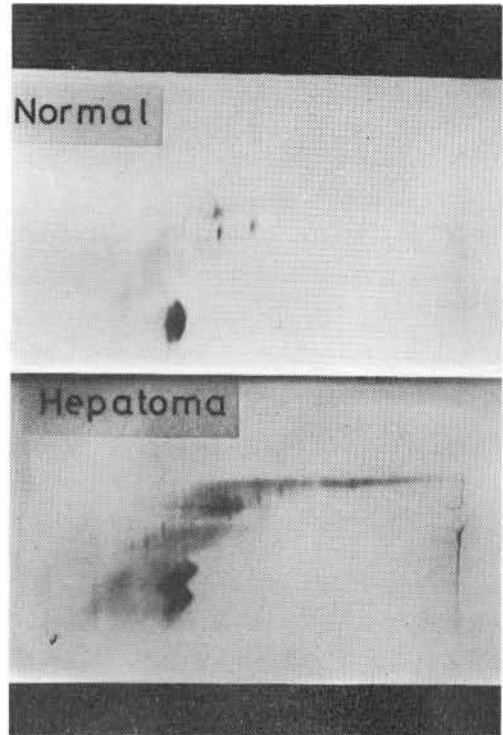


図9 尿中蛋白の2次元展開像。
上：健康人尿。
下：肝癌患者尿。

INFLUENCE OF PROTEIN CONCENTRATION ON STAINING INTENSITY

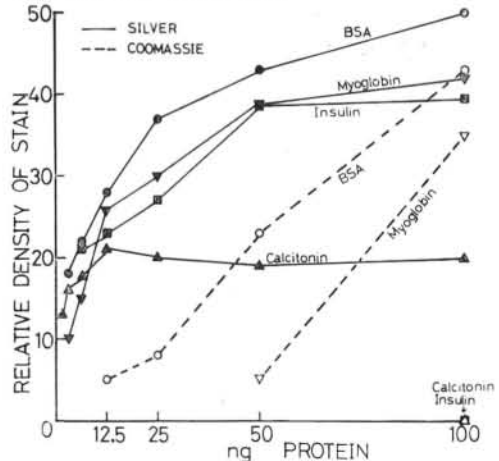


図10 銀染色法とクマジー青染色法との染色感度の比較。

みえていたスポットの中で重なり合っていた別種蛋白のスポットがダブルスポットである、ということ認識で

きる利点が見出されている。そこでわれわれも、この方法をセ・ア膜に応用することを検討した。しかし、ゲルの場合と異なり、発表された条件では、不成功に終わった。その後、条件を改変して検討を進めているが、今までに、透過光による観察で明らかに茶褐色のバックグラウンド中に、赤色、橙褐色等の呈色スポットが認められる条件を見出した(表3)。また、銀染色の条件ではクマジー染色の20~30倍の感度を示し、インスリンやカルチトニンなどの例では極めて大きな感度の差があることを認めている(図10)。

11. 2次元泳動像の定量性に関する検討.

1次元泳動と異なり、2次元泳動の最大の難点とされ

るのが定量性の問題である。現在の段階では、世界各国でこの点についての常法というものを決めているところはない。最近の報告では、大型のコンピューターを利用して解析を試みている例があるが、それも研究段階である。われわれも基礎的検討とともに、簡便な解析法の開発を念頭にマイクロコンピューターの導入による画像解析を試みている。XY方向にステップで試料を送り、数値化データの集積、画像分画、面積比、容積比を求めるプログラムを作製、実用化の見通しを得ている。ただし、現在の状態ではまだ感度や精度の上で問題点もあり、今後検討を続けなければならない。