

## マイクロコンピューターを用いたセルロースアセテート膜2次元電気泳動に関する一連の研究\*

大橋望彦\*\*・戸田年総\*\*

### はじめに

我々は、老化の機構を解析する手段として各種生化学的手法を導入しているが、その一つとして蛋白質・酵素の分離分析法を高性能化して、より精細な解析に努めてきた。特に蛋白質の解析に注目したのは、細胞老化機構に関し、遺伝形質の発現により生成される各種蛋白質は、合成、熟成、修飾、分解等の過程で、周囲の微少環境の変化を反映し、多くの情報を提供するものと考えたからである。以上の目的に適合する分析法としては、従来より用いられている各種クロマト法、電気泳動等があるが、就中、2次元電気泳動法が相応しい方法と思われた。事実、遺伝形質ならびにその発現調節機構の解明に関して、O'Farrellの方法<sup>1)</sup>は、その分離解像能の優れている点から極めて広範囲の領域で利用されている。しかし残念ながら、この方法は界面活性剤を使用しているために、蛋白質の subunit peptides の分析には適していないながらもその多量体、複合体として存在する蛋白質の性状までを把握するまでには至らない。従って、その優れた利点を参考に、かつ我々の目的に適した方法の開発が是非とも必要であった。現在では既に、2、3の方法<sup>2,3)</sup>が、報告されているが、当初はそれらの発表もなく、独自の開発が先決であった。そこで考案し、検討を進めたのが、ここに紹介するセルロースアセテート膜2次元電気泳動法(2DCAE)である<sup>4-8)</sup>。

### 2DCAEの原理

2DCAEは、1次元目に濃縮電気泳動法(CE:con

centrating electrophoresis)、次いで2次元目に等電点電気泳動法(IEF)の組合せで展開を行い、蛋白質試料の濃縮から分離・染色・定量まで全ての行程をセルロースアセテート膜(CA)上で実施するのが特徴である(Fig.1参照)。以上の1・2次元共に陰極側より陽極側に展開分離が行われる。すなわち、CEでは、電気浸透と等速電気泳動の原理に基づく濃縮段階と、通常用いられるCAゾーン電気泳動の原理による分離段階からなっている。従って、試料中の蛋白質は、CA上で一旦バンド状に濃縮された後、一樣なpH条件下でゾーン電気泳動分離が行われ、2次元目で更に等電点の違いによって展開分離が行われるのが原理である。

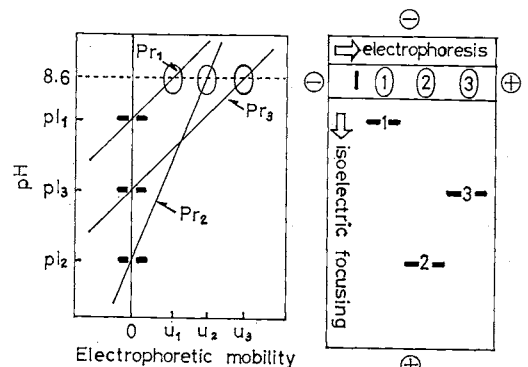


Fig. 1. Separation of proteins by two-dimensional electrophoresis.

\* Studies on the microcomputer-aided analysis of two-dimensional cellulose acetate membrane electrophoretogram.

\*\* Mochihiko Ohashi, Tosifusa Toda, 東京都老人総合研究所生化学部。

Key words : two-dimensional cellulose acetate membrane electrophoresis, concentrating electrophoresis, microcomputer-aided densitometry, image analysis of two-dimensional electrophoretogram, isoelectric focusing.

(2) 生物物理化学

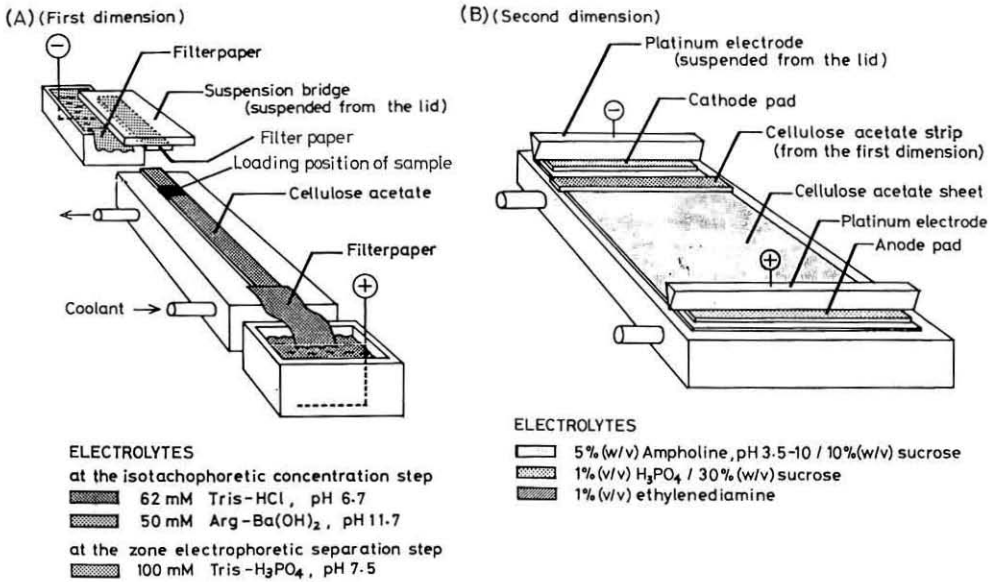


Fig. 2. Procedure of two-dimensional cellulose acetate membrane electrophoresis.

2DCAE の装置

セルロースアセテート膜を用いる電気泳動法は、通常臨床検査に広く利用されている方法であるが、例えばアクリルアミドゲルのディスク電気泳動法等と比べると分離能は劣る。その要因の一つとして、試料の塗付帯の幅の問題がある。そこで我々は、1次元目の CE 装置 (Fig. 2. (A)) に関して、CA (10×60 mm) 上で試料の濃縮バンドが形成される特殊な装置を考案した。この装置の特徴は、最初に通電準備を行い、サスペンション橋を降して陰極槽と CA 膜とを接触させると同時に通電が開始する点にある。この方法により、通電開始時に先導液と終局液との境界が乱れず、等速電気泳動が円滑に行える。この濃縮バンドを形成する性質を利用して、例えば透析尿約 1 ml を予備濃縮なしに直接、CA 上に連続滴下するだけで、尿中蛋白質をシャープなバンドに濃縮することが可能となった。濃縮バンドが形成された後に陰極槽を交換して、通電を続けると、陰極液に含まれる追越しイオン(磷酸イオン)が蛋白帯を追越して陽極側に移動し、CA 上で通常の電気泳動が開始される。この濃縮の効果を示したのが Fig. 3 である。Fig. 3, d) は、血清蛋白の通常の CA 電気泳動像で、5 分画に分離している。しかし、同量蛋白試料を 20 倍に稀釈した場合の泳動像は同図 c) の如く、ブロードな分画像を呈してしまう。そこで同じことを濃縮電気泳動法でみると、b) は

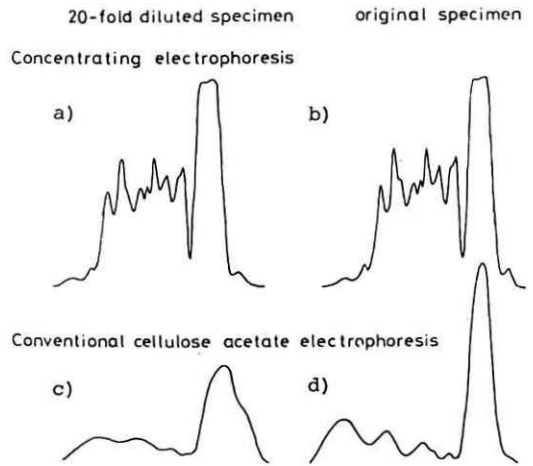


Fig. 3. Effect of concentration electrophoresis on resolving power.

稀釈前の血清試料の分離泳動像で、少くとも 11 峰の分画が認められる。さらに稀釈試料の泳動像を a) に示すが、ここでも少くとも 11 峰の分画が認められ、かつ b) と殆んど同様な展開像が得られる。従って、稀薄な蛋白試料でも再現性良く分離泳動像を得ることが出来、唾液、汗等の試料にも応用することが可能である<sup>9)</sup>。

2次元目の CA (60×110 mm) を用いた IEF 装置 (Fig. 2, (B)) では、空間容積を可及的に少くし、冷却効果、電極の形状 (特にナイフエッジの接触)、安全性

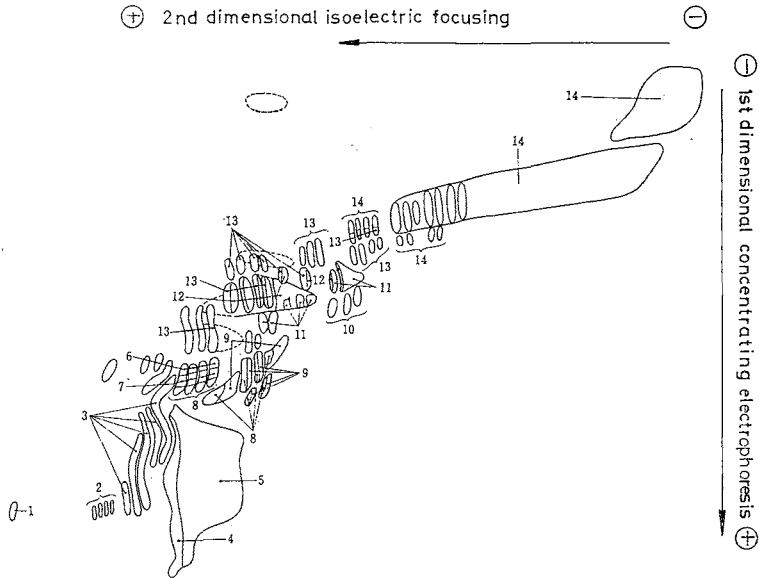


Fig. 4. Two-dimensional electrophoretogram of serum protein.

1:  $\alpha_1$ -acid glycoprotein, 2:  $\alpha_1$ -antichymotrypsin, 3:  $\alpha_1$ -antitrypsin, 4: prealbumin, 5: albumin, 6: haptoglobin, 7: ceruloplasmin, 8:  $\alpha_2$ -HS glycoprotein, 9:  $\alpha_2$ -macroglobulin, 10: hemopexin, 11: C3, 12: transferrin, 13: IgA, 14: IgG.

等の配慮が必要で、改良を重ねて泳動条件の恒常維持が可能となった。この装置を用いた際に得られる結果は、再現性の良い展開像が示された。

### 2DCAE 展開像の解析

1. 展開像の定性. 蛋白質の染色像は、主として Coomassie blue の染色により得ているが、彩色銀染色法<sup>10)</sup>の改良により CA 上でも感度良く染色することも出来る<sup>11)</sup>。再現性のある展開像が示されることから、各種組織抽出液について展開像を比較してみたが、骨格筋と心筋では明らかに異った像が得られ、横紋筋と平滑筋の2層から成る横隔膜では、丁度、骨格筋と心筋を混じた様な展開像が認められた。その他の組織も加え、明確に組織特異的展開像が示されることが知れた<sup>9)</sup>。また癌患者の血清と正常健康人血清の比較においても差のあることが知れ、疾病の診断に有為な方法であることも示した<sup>12)</sup>。この血清蛋白展開像は、70余りのスポットが検出されるが、この内殆どどのスポットについて免疫化学的解析法により各種成分分布を示すことが出来た (Fig. 4)<sup>13)</sup>。その他、本法の特徴の一つである変性剤を操作中に全く加えていないことから、2次元展開後に各種アイソザイムを検出することが可能であり、特に、同一 CA

上で数種のアイソザイム展開像を組合せて示すことが出来る。例えば、6 PGD, G 6 PD, LDH 等アイソザイム分布をそれぞれ調べ、次に、骨格筋、心筋、腎臓等の抽出液について、3種アイソザイムの同時活性染色を行ってみると、それら組織特有なアイソザイム活性分布図が得られる<sup>13,14)</sup>。

2. 展開像の定量. 2次元に展開された蛋白質の染色像は、従来の1次元展開像の様にバンド状ではなく、スポット状に存在するため定量法はそれなりの測定法が必要となる。そこで、従来から臨床検査等で用いられているデンシトメーターの受光部スリットを調整し、光量の限度一杯までに小さく (2×4 mm) して展開像全体をラスタースキヤニングした。測定値を記憶するためには、8ビットのマイクロコンピューターを接続し、後の解析にも役立たせた<sup>14)</sup>。この方法で骨格筋のクマジー染色による展開像を測定した場合、CRTに現われた画像は粗像であったが、組織特異性を示す像が現われ、その定量性もある事が示された。しかし、小さいスポットや、スポットの近接した場合の定量は困難であり、その解析能力にはかなりの限界があった。そこで、顕微測光型走査デンシトメーターにマイクロコンピューターを接続して、画像解析する方法を検討した。この方法での画

(4) 生物物理化学

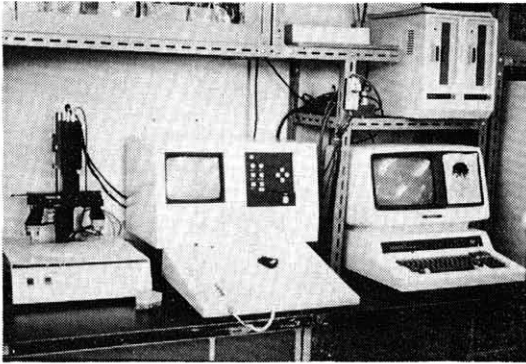


Fig. 5. Microcomputer-aided system for analysis of two-dimensional electrophoretogram.

像は、先の方法に比して大幅に鮮明化し、詳細なスポット測定も可能となり、かつ定量性も十分実用性のある信頼度に達していることが明らかとなった<sup>15,16)</sup>。ただこの方法による測定は、走査に長時間を要し、多検体の処理には適さないという難点があった。マイクロコンピュータの導入は、簡便な実用型のデンストメトリーが行えることを目標としたための方策である限り、データの取り込み方をより簡略化する必要性が生じたのである。丁度その頃、性能の良い CCD-TV カメラが入手出来たので、染色展開像をこのカメラで受像し、A/D 変換、

LOG 変換を行ったデータ値を逐次大記憶容量のメモリーに収納し、ホストマイクロコンピュータの支配により演算処理、画像処理を行う方式を検討した。試作した解析装置は Fig. 5 (写真) に示す様なデスクトップ式の簡便型で、従来の機器と比べて格段と規模が小型化している。実際には、この小型化するために莫大な記憶容量のメモリー内に収納されているデータ値を取り扱う高速処理機能が必要となる。そこで、ソフトプログラムのサブルーチンを機械語で作成し、各種コマンドにより呼び出せる様にした。従って、利用者は対話形式で画像処理が出来、また個有のプログラムをベーシック言語によって簡単に作成することも出来る様にした。その1例を Fig. 6 に提示する。ここに示された例は定量するための情報を殆んど全て包含し、十分解析し得る機能が盛り込まれ、かつ極めて短い文番号で終了していることが特徴となっている。この様に入力に関してはほぼ問題解決がなされたが、ここで新たな問題が生じた。すなわち、従来の様に、ラスタースキャンで測定する場合には、光源むらの様な心配は殆んど必要がなかったが、CCD-TV カメラで入力する場合には、光源むら、画素の性能むら、さらに染色むら等が定量値の信頼度を著しく阻害することが知れた。その対策として、入力データの収納に用いたメモリーを数頁用意し、バックグラウンド補正、

```

10 INPUT "TAKE A BLANK", A$
20 CALL #0, "TAKE"
30 CALL #0, "STORE", "2"
40 CALL #0, "RESTORE", "2"
50 CALL #0, "STORE", "0"
60 INPUT "TAKE A SAMPLE", A$
70 CALL #0, "TAKE"
80 CALL #0, "REFER"
90 INPUT "Is that OK?", A$
   : IF A$="N" THEN GOTO 60
100 CALL #0, "STORE", "0"
110 PRINT "MEASURE A STANDARD SPOT"
120 GOSUB 230
130 LET K1=X1 : LET K2=Y1-(X1*B/8)
140 LET S1=8 : LET S2=5.96
150 PRINT "MEASURE A PROTEIN SPOT"
160 CALL #0, "RESTORE", "0"
170 GOSUB 230
180 LET Y1=Y1-(X1*B/8)
   : LET M1=S1 X1/K1
   : LET M2+S2 Y1/K2
190 PRINT "Size=" ; M1 ; "(mm. mm)"
   : PRINT "IOD=" ; M2 ; "(OD. mm. mm)"
200 INPUT "Next spot? (Y/N)", A$
   : IF A$="Y" THEN GOTO 150
210 INPUT "Another pattern?", A$
220 IF A$="Y" THEN GOTO 60 ELSE END
230 /SUBROUTINE
240 LET X1=150 : LET Y1=120 : D1=0
250 CALL #0, "DOTCURSOR", X1, Y1, D1
260 LET F=0
   : CALL #0, "WINDOW", X1, Y1, F
270 IF F=0 THEN GOTO 280 ELSE GOTO 250
280 LET B=0
   : CALL #2, "EXPAND", X1, Y1, B
290 CALL #2, "SMOOTH", 0
300 CALL #2, "PERSPECTIVE"
310 LET X2=0 : LET Y2=0
   : CALL #0, "DIGITIZER", X2, Y2
320 CALL #2, "PAINT", 1
330 CALL #2, "REDUCE", X1, Y1, "0"
340 CALL #2, "QUANTIFY", X1, Y1, "0"
350 RETURN
360 END

```

Fig. 6. An example of a BASIC program for analysis of two-dimensional electrophoretogram.

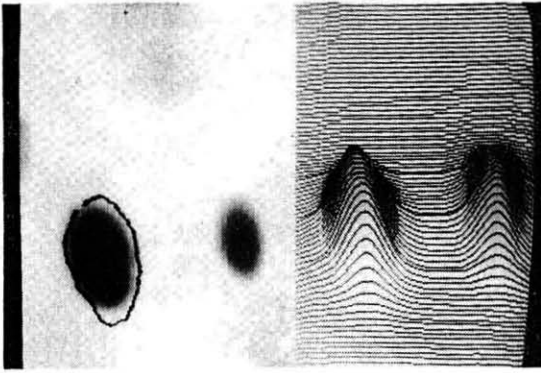


Fig. 7.

ローカルバックグラウンド補正, スタンダード補正等の検討を行い, これらの補正法により信頼度の高い定量値を得ることに成功した(この詳細については別報として本大会において報告している)<sup>17, 18)</sup>. また, 簡便型とするために, 自動的に各スポットの定量が行える様なプログラムは作成せずに, 各スポット毎に, 手動によるデジタイザーを用いて測定領域を決定し, その範囲内にある各素子について濃度を256段階で読みとり, その積分値を求める方式をとっている. その1例をFig. 7に示してあるが, 左半分の画像はその一つのスポットをカーソルにより囲んだ状態が示されており, 右半分の画像は, その周辺における断層濃度変化図形を示している. このカーソルで囲まれた部分が積分されて数値として定量値が示される. この様にして求められた数値の信頼性に関する検定は, あらかじめ作成した標準フィルム(露光時間を段階的に変えて作ったフィルムで, 比色計によりOD値を測定してある小片フィルム)をCA上に載せて各々の測定値を求めて行った. 結果は極めて良好で, 直線性, 測定信頼限度(OD: 0.04~2.3<)も十分実用に足るものであった<sup>19)</sup>. この結果, 従来, 2次元展開像の画像処理に用いられてきた大型コンピューター使用による解析(例えば, Andersonら<sup>20)</sup>, 堀尾ら<sup>21)</sup>, 伊藤ら<sup>22)</sup>)とは異なる実用型の解析装置を作製し得たものと信じている.

### おわりに

以上の如く, ここに紹介したセルロースアセテート膜2次元電気泳動装置と, その画像解析による定量的測定装置は, マイコンコンピューターの発達に伴い改良が重ねられ, ミニコンピューターを凌ぐ程の性能を発揮するまでになった. 今後もこれら装置はポリッシュアップされて行くと思われるが, 既に身近に存在するこれらの装置

を, 当初の目的である老化の機構を解明する手段に適用し始めている. その1例として, ラット肝抽出蛋白質の2DCAE像上に現われる加齢変化について, 詳細な定量的解析を行い, それら結果を基盤に, 老若ラットの去勢, ならびにテストステロンによる復帰能の検討も併せて検討している<sup>23, 24)</sup>. この様に, 新しい技術開発によって始めて得られる新しい知見, 局面が開かれようとしているが, 老化の研究のみならず, その他の応用に関しても, 本法の広範囲な利用, 多岐に渉る適用が十分期待出来るものと信じている.

最後に, 本学会長平井秀松先生, 選考委員の諸先生, 総会長菅野剛史先生はじめ関係諸先生方に深甚の謝意を表します. また, 本研究において, 血清蛋白質の同定, 彩色銀染色法の改良等2DCAE像にとって重要な検討を主導的立場にたつて協力して頂いた都老人研生化学の藤田敬子氏に心から御礼を申し添えます. その他, 装置の試作に当って御協力を頂いた, 株式会社常光, 株式会社エー・ディー・エス, ならびにCA膜に関して種々の御協力を頂きました富士写真フィルム株式会社に感謝の意を添えさせていただきます.

### 文 献

- 1) O'Farrell, P.H.: J. Biol. Chem., **250**: 4007, 1975.
- 2) 真鍋 敬他: 生物物理化学, **22**: 171, 1978.
- 3) 岩瀬三千雄, 井上 勤: 生物物理化学, **26**: 128, 1982.
- 4) 戸田年総, 大橋望彦: 生物物理化学, **22**: 43, 1978.
- 5) 戸田年総他: 生物物理化学, **24**: 42, 1980.
- 6) Toda, T. et al.: Anal. Biochem., **119**: 167, 1982.
- 7) 大橋望彦: 臨床検査, **26**: 335, 1982.
- 8) Toda, T. et al.: Electrophoresis '81, Walter de Gruyter, Berlin, 1981, p. 271.
- 9) 戸田年総他: 臨床化学, **11**: 18, 1982.
- 10) Sammons, D.W. et al.: Electrophoresis, **2**: 135, 1981.
- 11) Fujita, T. et al.: Anal. Biochem. (印刷中).
- 12) 藤田敬子他: 日本癌学会総会記事, 第38回総会, 1979, p. 229.
- 13) 大橋望彦他: 生物物理化学, **26**: 33, 1982.
- 14) 戸田年総他: 生物物理化学, **26**: 127, 1982.
- 15) 戸田年総他: 生物物理化学, **26**: 322, 1982.
- 16) 戸田年総他: 生物物理化学, **27**: 215, 1983.
- 17) 戸田年総他: 生物物理化学, **27**: 279, 1983.
- 18) Toda, T. et al.: Electrophoresis '83, Walter de Gruyter, Berlin, (印刷中).
- 19) Toda, T. et al.: Electrophoresis (印刷中).
- 20) Anderson, N.L. et al.: Clin. Chem., **27**:

(6) 生物物理化学

1807, 1981.

- 21) 新垣尚捷他：生物物理化学，**25**：220, 1981.  
22) 伊藤迪夫他：生物物理化学，**23**：244, 1979.

- 23) Fujita, T. et al. : Electrophoresis '83, Walter de Gruyter, Berlin, (印刷中).  
24) 藤田敬子他：基礎老化研究，**6**：60, 1982.