

〔短 報〕

カルバミル化ヒト β グロビンをを用いた変性系等電点電気泳動用マーカー

白鳥三恵子*・宇田川章子*・板倉宏治*・戸田年総**

はじめに

等電点電気泳動法 (IEF) は、タンパク質の等電点に基づいて分離を行うもので、高い分離能と濃縮能を有している。また、O'Farrell の開発した二次元電気泳動法¹⁾ は、IEF と SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) を組み合わせたもので、非常に高い分離能をもつため種々の分析に用いられている。しかし、IEF は、種々の条件により泳動パターンが左右されるため、その内部標準として pI マーカーを同時に泳動することは大変有用である。これまでも数種類のマーカーが報告されているが、スポット数が多く分子量が比較的大きいため、二次元電気泳動を行った場合、目的とした蛋白質との区別が難しい等の不都合があった。

今回、私達は、ヒト由来のグロビン β 鎖をカルバミル化したところ、分子量約 14,000 付近に 13 個のメインスポットをもつ pI マーカーを作製することができ、また、これらの各スポットの pI 値を、ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動 (PAG-IEF) とショ糖密度勾配等電点電気泳動 (SDG-IEF) による方法の 2 種類で比較したので報告する。

材料および方法

カルバミル化ヒト β グロビンは、Willard らの方

法²⁾ に従い作製した。

二次元電気泳動は、O'Farrell の方法¹⁾ に従い、IEF は変性系等電点電気泳動用ポリアクリルアミドゲル (5% アクリルアミド, 2% Ampholite (MILLIPORE 社) pH 3~10, 8.5 M 尿素, 2% ノニデット P-40) をキャピラリーチューブ内 (ϕ 1.13 × 90 mm) に作製したもの、また、SDS-PAGE はマルチゲル 2 D-10/20 (第一化学薬品) を用い Laemmli 法³⁾ に準じて泳動した。染色は、2 D-銀染色試薬・II「第一」(第一化学薬品) を用いた。

PAG-IEF は、変性系等電点電気泳動用ポリアクリルアミドゲルを、水平型電気泳動装置 (Pharmacia 社 2117 MULTIPHOUR II) を用いて 15°C, 200 V で 30 分間通電後 700 V に昇圧し 60 分間通電した。泳動後、ゲルを蛋白染色用と pH 測定用に 2 分割し、染色用は固定後ペーヅブルー-83 染色液 (第一化学薬品) で染色した。pH 測定用は、ただちに 5 mm 間隔に切り未脱気の高純水 0.5 ml を加えてそのまま 2 時間室温放置後に 15°C で pH 測定 (HORIBA 社 F-16) した。各スポットの pI 値は、この移動距離と pH 勾配から算出した。

SDG-IEF は、松尾らの方法⁴⁾ に準じ、濃溶液として 50% ショ糖, 6 M 尿素, 0.5% 2-ME, 2% ノニデット P-40 52.75 ml に 40% Ampholine (Pharmacia 社) pH 5~7 2.25 ml を加えたもの、淡溶液として 8 M 尿素, 0.5% 2-ME, 2% ノニデット P-40 50.75 ml にサン

Carbamylated human β -globin as pI marker for isoelectric focusing in denaturing condition.

* Mieko Shiratori, Akiko Udagawa, Koji Itakura ; 第一化学薬品株式会社つくば工場技術開発センター

** Tosifusa Toda ; 東京都老人総合研究所

Correspondence address : Mieko Shiratori, Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd., Tsukuba Factory Technical Development Center, 3-3-1, Koyodai, Ryugasaki 301, Japan.

Abbreviations : IEF, isoelectric focusing ; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis ; PAG-IEF, polyacrylamide gel-isoelectric focusing ; SDG-IEF, sucrose density gradient-isoelectric focusing ; 2-ME, 2-mercaptoethanol

(受付 1995 年 5 月 15 日, 受理 1995 年 6 月 30 日, 刊行 1995 年 8 月 15 日)

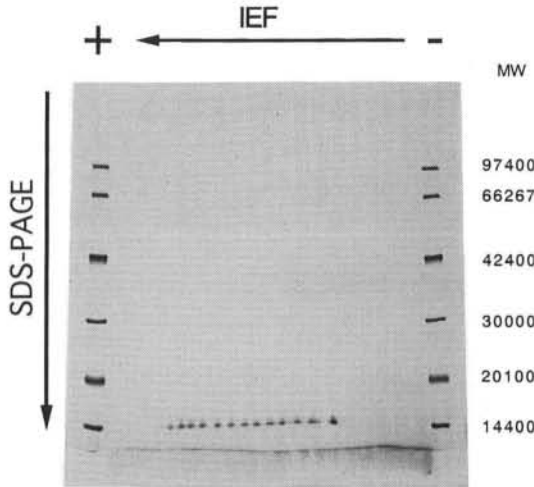


Fig. 1. Two-dimensional electrophoretic pattern of carbamylated human β -globin for the internal pI marker.

Carbamylated human β -globin was applied to the first dimensional PAG-IEF (pH 3-10) in a denaturing capillary gel, and followed by the second dimensional SDS-PAGE on a 10-20%T gradient slab gel.

プル 3.50 ml および 40% Ampholine pH 3.5~10 0.75 ml を混合したものを用い、変性系のショ糖密度勾配を作製した。15°C, 500 V で 3 時間通電後、800 V に昇圧して約 36 時間通電した。泳動後 500 μ l/tube に分画し、15°C で pH 測定した。各分画中に含まれる蛋白質を再度 PAG-IEF で分離し、595 nm でデンストメトリー (Helena 社 Auto Scanner QUICK QUANT III 使用) を行うことにより、各 pI 成分のピーク位置を求めた。

結果

1. カルバミル化ヒト β グロビン

カルバミル化後のヒト β グロビンを O'Farrell の方法¹⁾により二次元電気泳動した結果、分子量約 14,000 付近に 13 個のメインスポットが確認された (Fig. 1)。

2. 各スポットの pI 測定

(1) PAG-IEF による測定

PAG-IEF ゲルの 2 時間抽出液の pH 測定値 (Fig. 2 A) と CBB 染色したバンドの移動距離から求めた 13 スポットの pI 値は、pH 5.1~7.1 であった (Table 1)。

また、抽出液をさらに 4 時間 (泳動後 6 時間) 室温に放置後 pH を再測定すると、0.05~0.25 低値を示し

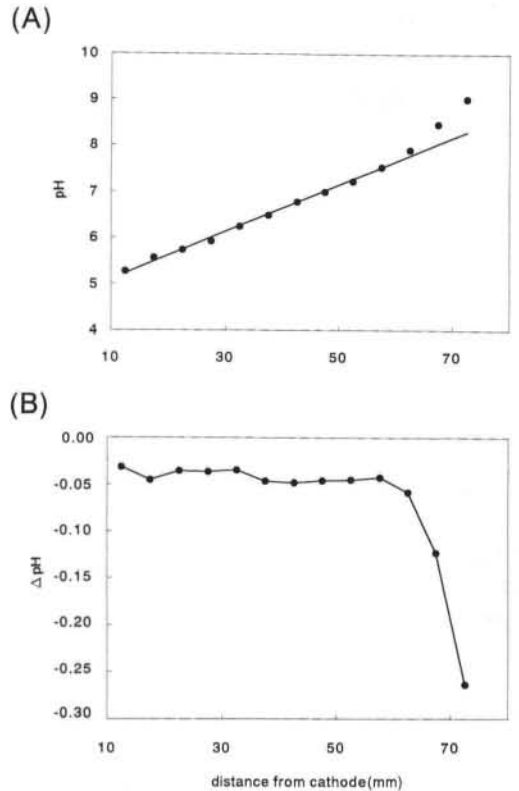


Fig. 2. Determination of pH gradient on PAG-IEF.

(A) pH values determined after 2 h extraction. (B) pH drift during the long them extraction (Δ pH=pH (6 h)-pH (2 h)).

た。とくにアルカリ側では大きな低下を示した (Fig. 2 B)。

(2) SDG-IEF による測定

SDG-IEF (Fig. 3) から求めた 13 スポットの pI 値は、pH 5.5~7.9 と PAG-IEF より 0.3~0.8 高値を示した (Table 1)。

考察

私達は、ヒト由来のグロビン β 鎖を経時的にカルバミル化し pI マーカーを作製した。このマーカーは、分子量約 14,000 付近に 13 個のメインスポットの現れるものであり、スポット数が比較的少ないこと、分子量が小さいことなどから、とくに二次元電気泳動用の等電点マーカーとして大変有用である。

2 種類の方法を用いて測定した各スポットの pI 値 (Table 1) は、PAG-IEF で求めた値が 0.3~0.8 程度

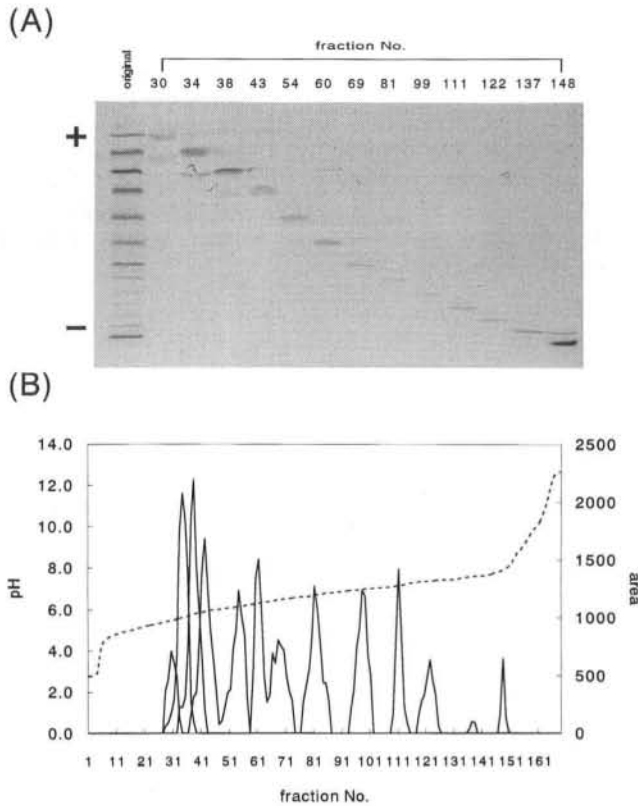


Fig. 3. Determination of pI values of carbamylated human β -globin by SDG-IEF.

(A) PAG-IEF patterns of proteins in fractions of SDG-IEF. (B) Densitometric profiles (—) and pH gradient (---).

Table 1. pI values of carbamylated human β -globins.

Spot	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
SDG-IEF	5.5	5.6	5.8	5.9	6.1	6.3	6.5	6.7	7.0	7.2	7.4	7.6	7.9
PAG-IEF	5.1	5.2	5.3	5.4	5.7	6.0	6.2	6.4	6.5	6.7	6.8	7.0	7.1

SDG-IEF=sucrose density gradient isoelectric focusing

PAG-IEF=polyacrylamide gel isoelectric focusing

酸性側にシフトしていた。この PAG-IEF による pI 値測定法は、抽出のために精製水で希釈することや、抽出のための放置時間中に CO_2 の溶け込みによると思われる pH 低下 (Fig. 2 B) などの影響を受けるものと思われた。また、PAG-IEF や SDG-IEF で測定される pI 値は、電気泳動中に蛋白がどのようなコンフォメーションをとっているかにより左右されるものであり、温度、イオン強度、変性剤など種々の条件により変化する。今回求めた pI 値も当然これらの影響を受けてい

るものと思われ、このため、どちらの値がより真の値に近いかは一概にはいえない。しかし、両性担体抽出時の CO_2 や精製水による希釈の影響が少ない分だけ SDG-IEF のほうがより真の値に近いと思われる。

今回各スポットの pI 値の測定を行ったことで、二次元電気泳動用の内部標準としてだけではなく、煩雑な操作を行わなくても未知サンプルのおおまかな pI 値を推定することができるようになった。ただし前述のように、求められた値は種々の条件に左右されるも

のであり、その表示および使い方には十分な注意が必要である。

文 献

- 1) O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975 ; 250 : 4007-21.
- 2) Willard KE, Giometti CS, Anderson NL, O'Connor TE, Anderson NG. Analytical techniques for cell fractions XXVI. A two-dimensional electrophoretic analysis of basic protein using phosphatidyl choline/urea solubilization. *Anal Biochem* 1979 ; 100 : 289-98.
- 3) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 1970 ; 227 : 680-5.
- 4) 松尾雄志, 堀尾武一. 蛋白質の電気泳動的等電点分画法. *蛋白質 核酸 酸素* 1967 ; 12 : 737-48.