



技術解説

## 等速電気泳動法による 蛋白質の分離精製

菅 健 一\*

### 1. はじめに

電気泳動は帯電した溶質が電場内を移動する現象であり、電気泳動を利用したタンパク質の分離法は古くからおこなわれている。単位電位差勾配下における移動速度として定義される電気泳動度は溶質の大きさ、形状および溶媒の性質によっても変化するが、主に溶質の全荷電量によって決定される。タンパク質を構成するアミノ酸のうちで解離基を有するものが、pHによってそれぞれ異った解離度を有し、これがタンパク質の全荷電量を変化させる。したがって、電気泳動による分離法は主にタンパク質間の全荷電量の差を利用しているといえる。

電気泳動法の一つである等速電気泳動法は次のような特徴を有する。1) 分離に及ぼす分子拡散の影響が通常の電気泳動法と比較して小さい。2) 等電点付近で不安定となるタンパク質に対しても、そのpHを避けて泳動できる。3) 先導液の濃度を上げることによって、濃縮も可能である。4) 適当な両性物質を泳動物質間のスペーサーとして用いることにより、目的物質を高純度で分離できる。

このような特徴から、等速電気泳動法は無機イオン、アミノ酸およびタンパク質などの定性定量分析に応用されている<sup>1-4)</sup>。また最近では、特にわが国において、医薬品および臨床試験への応用も報告されている<sup>5,6)</sup>。

しかし、この電気泳動法は、主に分析用として用いられ、分離精製用としての利用は非常に少ない<sup>1,7)</sup>。これは、目的タンパク質の分離に適した両性物質(スペーサー)の選定の困難さと電気的発熱をいかに除去するかという工学的

な問題に起因している。発酵生産物の高度な精製化が望まれている現在、電気泳動法は高度精製において非常に優れた方法であるので、上記の問題点を克服すべく、検討がなされてきている。

ここでは、等速電気泳動法によるタンパク質分離精製について若干の知見を述べる。

### 2. 等速電気泳動の原理

通常のゾーン電気泳動では、泳動ゾーンを通してpHは緩衝液によってほぼ一定に保たれるので、泳動物質はそれぞれの解離度とモル泳動度に応じて異なった速度で進む。等速電気泳動法は、先導イオンとして最も移動度の大きい陰イオンを、終局イオンとして最も移動度の小さい陰イオンを使用し、各ゾーンで電気的中性を保つためにカウンターイオン(陽イオン)を共通イオンとする。先導イオンと終局イオンの間に、目的タンパク質を含むサンプルを添加する。先導イオンの移動速度はその濃度とカウンターイオン濃度が与えられた時定まり、後続イオンは先導イオンに接して、同速度で進む。一方、各ゾーン内では弱酸イオンおよびカウンターイオンの濃度に応じたpHを示し、また弱酸の解離度はpHによって決定される。泳動速度は解離度によって直接影響されるので、泳動開始後、時間の経過とともに、各弱酸イオンはその位置におけるpHに応じた解離度とモル移動度に従って、前または後のゾーンに移動する。定常状態において、それぞれの陰イオンが単一ゾーンを形成し、先導イオンと等速度で泳動することになる。従って目的タンパク質ゾーンの前後に、適当な両性担体(スペンサー)ゾーンを配置することができれば、高純度で分取が可能となる。試料を先導イオンゾーンと終局イオンゾーンの間に入挿後、どのように定常状態とな

\*菅 健一 (Kenichi SUGA), 大阪大学工学部, 醸酵工学科, 教授. 工学博士, 生物化学工学

るかについて、例を用いて後述する。

### 3. タンパク質の等速電気泳動法による分離

無機イオンの分析に対する等速泳動の定常理論については多くの報告<sup>9)</sup>があり、実験的にも裏づけがなされている。また定常状態にいたる分離過程を解析することによって、試料を分離するのに必要なカラムの長さ、泳動条件などをシミュレートする試みもなされている<sup>4,11,12,13)</sup>。

一方、等速電気泳動法によるタンパク質の分離に関する報告は少ないが、戸田<sup>1)</sup>、島尾<sup>9)</sup>によって、分離に及ぼす先導液、終局液中の構成イオン種、濃度およびpHなどの種々の因子の影響が実験的に検討されている。

等速電気泳動法によるタンパク質の分離を解析するにあたっては、ゾーン内でのタンパク質の泳動速度を決定する必要がある。タンパク質の泳動速度を決定する因子はタンパク質のモル移動度、pHの関数である荷電量、および泳動ゲル内各位置での比電導率などである。タンパク質を形成しているアミノ酸のうち負に荷電する解離基としては、 $\alpha$ -カルボキシル基(カルボキシル基末端)、 $\beta$ -カルボキシル基(アスパラギン酸)、 $\gamma$ -カルボキシル基(グルタミン酸)、チオール酸(システイン)、フェノール性水酸基(チロシン)であり、正に荷電する解離基は $\alpha$ -アミノ基(アミノ末端)、 $\epsilon$ -アミノ基(リジン)、イミダゾール基(ヒスチジン)、グアニジル基(アルギニン)である。また帯電した原子団はほとんどタンパク質の表面に存在しているといわれているので<sup>10)</sup>、近似的に以下の式に従って総荷電量 $\bar{z}_p$ が評価できる<sup>11,12)</sup>。

$$\bar{z}_p = \sum_h N_h \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_h}} - \sum_{h'} M_{h'} \frac{10^{pH - pK_{h'}}}{1 + 10^{pH - pK_{h'}}} \quad (1)$$

ここで、 $N_h$ 、 $M_{h'}$ はそれぞれ注目するタンパク質の塩基性解離基 $h$ 、酸性解離基 $h'$ の個数であり、 $pK_h$ 、 $pK_{h'}$ はそれぞれ塩基性解離基、酸性解離基のpK値であり、タンパク質の滴定曲線から求められる。

一方、タンパク質が球形である場合にはモル移動度 $\omega$ は

$$\omega = \frac{1}{6\pi\eta a} \quad (2)$$

ここで、 $\eta$ は液体の粘度、 $a$ はタンパク質の半径である。

ゲル内でのタンパク質の泳動速度 $v$ は次式で示される。

$$v = \bar{u} E = \omega \bar{z}_p f F E \quad (3)$$

ここで、 $\bar{u}$ は実効電気泳動度、 $F$ はファラデー定数、 $f$ はタンパク質がゲル格子を通過する時の遅延効果を表わす補正係数であり、次式で示される<sup>10)</sup>。

$$f = \exp\{-\pi s(a+r)^2\} \quad (4)$$

ここで $s$ はゲル繊維濃度、 $r$ はゲル繊維半径である。

また $E$ は電圧勾配であり、単位面積あたりの電流 $I$ と比電導率 $k_e$ を用いて、

$$E = I/k_e \quad (5)$$

ここで $k_e$ はゲルの各位置におけるイオンの移動によって変化する値であり、

$$k_e = F^2 \sum_i \omega_i |\bar{z}_i| C_i \quad (6)$$

で表わされる。さらに電氣的に中性であるため、次式が成立する。

$$\sum_i C_i \bar{z}_i = 0 \quad (7)$$

一方、非定常状態において、各位置での先導イオン、終局イオン、タンパク質、スパーサーである両性担体およびカウンターイオンについての物質収支は

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x} (v_i C_i) = -IF\omega_i f_i \frac{\partial}{\partial x} \left( \frac{\bar{z}_i C_i}{k_e} \right) \quad (8)$$

で表わされ、(1)~(8)式を連立させて解くことにより、タンパク質の分離過程がシミュレートできる<sup>12)</sup>。

等速電気泳動法によるタンパク質分離の一例として、血清アルブミン(BSA)、ヘモグロビン(Hb)およびミオグロビン(Mb)を使用し、先導イオンおよび終局イオンとして、それぞれ酒石酸および6-アミノ-n-カプロン酸、カウンターイオンとしてトリスを用い、また、両性担体スパーサーとしてアミノ酸であるシステイン(Cys)およびヒスチジン(His)を用いて、こ

表1 タンパク質の解離アミノ酸側鎖の数と pK 値

Charged side chain		pK	Number of groups		
			BSA	Hb	Mb
Positive charge :					
$\alpha$ -amino	(N-end)	8.0	1	4	1
$\epsilon$ -amino	(Lysine)	9.5	59	48	19
imidazole	(Histidine)	6.5	17	26	11
guanidyl	(Arginine)	12.0	23	14	4
Negative charge :					
$\alpha$ -carboxyl	(C-end)	3.5	1	4	1
$\beta$ -carboxyl	(Aspartate)	3.5	38	38	7
$\gamma$ -carboxyl	(Glutamate)	4.0	59	26	14
sulfhydryl	(Cysteine)	10.0	1	2	0
phenolic	(Tyrosine)	10.0	19	10	3

表2 緩衝液およびアミノ酸の側鎖と pK 値

	Positive charge			Negative charge		
		Number	pK		Number	pK
Cystein	$\alpha$ -amino	1	10.78	$\alpha$ -COOH	1	1.71
	sulfhydryl				1	8.33
Histidine	$\alpha$ -amino	1	9.17	$\alpha$ -COOH	1	1.82
	imidazole	1	6.0			
Tartarate				$\alpha$ -COOH	1	2.96
				$\beta$ -COOH	1	4.24
Tris	$\alpha$ -amino	1	8.0			
6-amino n-capronate	$\epsilon$ -amino	1	10.75	$\alpha$ -COOH	1	4.43

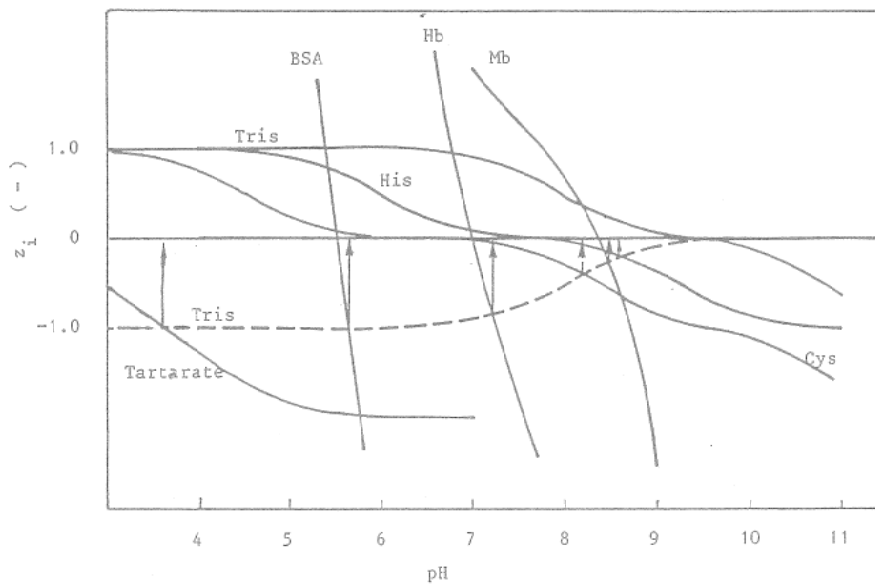


図1 各成分の荷電量におよぼす pH の影響  
矢印は等速泳動時の各ゾーンの pH を示す

これらのタンパク質を分離した場合について述べる。

表1はモデルタンパク質のアミノ酸配列より求めた解離基を有するアミノ酸のpK値とその個数を示す。また表2は緩衝液およびスペーサーとしてのアミノ酸の側鎖のpK値を示す。これらの各物質の側鎖のそれぞれの個数およびpK値を用いて、式(1)から総荷電量 $z$ をpHに対して示したのが図1である。ここでカウンター

イオンであるトリスについては正に荷電するので、 $x$ 軸 ( $z=0$ ) に対して対称に折りまげたものを破線で示した、また、各位物質の電気泳動度 $\bar{u}$ をpHに対してプロットしたものを図2に示す。

一方、タンパク質試料を先導イオンゾーンと終局イオンゾーンの間に変化させてから、どのように分離されていくかを解析するため、式(1)から式(7)を式(8)と連立させ、数値的に計算し

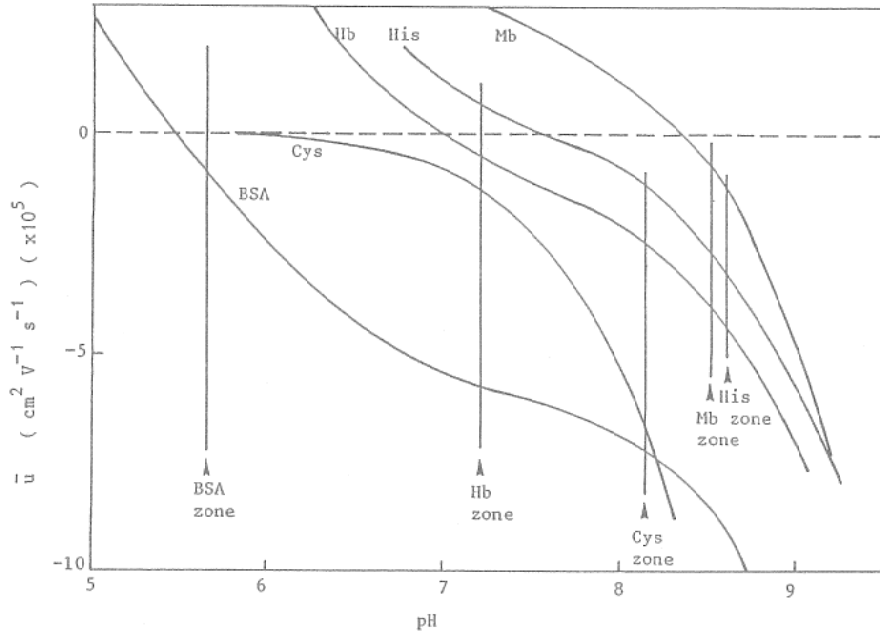


図2 各成分の電気泳動度 $\bar{u}$ におよぼすpHの影響  
矢印は図1から求めた等速泳動時の各ゾーンのpH

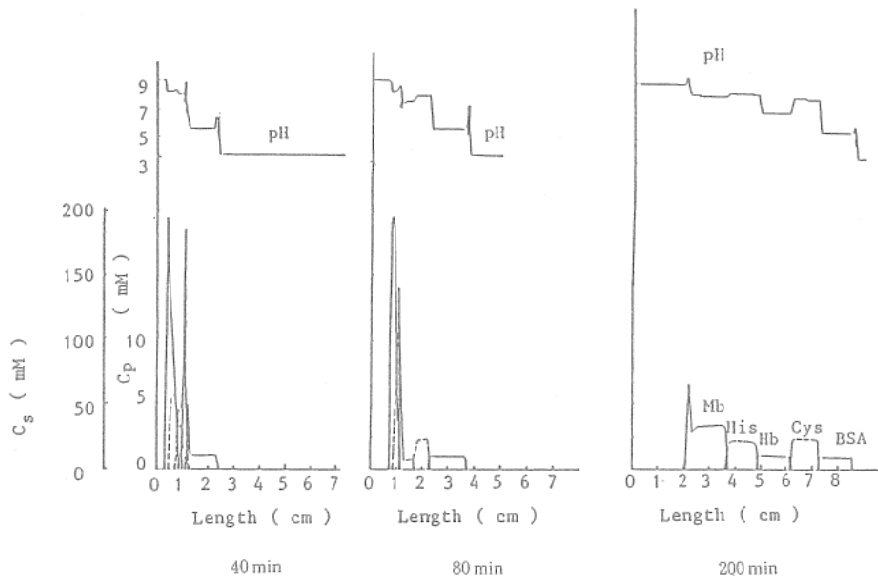


図3 等速泳動によるタンパク質の分離  
pHおよび各成分の経時変化  $C_p$ : タンパク質,  $C_s$ : アミノ酸

た結果を図3に示す。ここでのタンパク質濃度は各5 mg/ml, アミノ酸は各50 mmol, 先導イオン, 終局イオンおよびカウンターイオンは各50 mmol/lとし, 他の条件は表3に示した。

表3 等速泳動条件

Column length	14.0cm
Gel radius	0.25cm
Gel length	12.0cm
Gel concentration	4.0%T
Sample solution volume	0.2ml
Temperature	25°C
Current density	5.0mAcm <sup>-2</sup>

この解析結果から, 過渡状態から等速状態に至るまでの経過は次のようになることがわかる。すなわち, 上記の試料をチャージした時点でのサンプルゾーンのpHは7.7であり, BSA, Cys, HbおよびHisは負に荷電し, それぞれ図2に示す電気泳動度 $\bar{u}$ を持つ。カラムに通電を開始した時点では, 試料ゾーン内の各位置での電位差勾配Eは一定であるので, 上記の各荷電物質は電気泳動度 $\bar{u}$ の順序で陽極に向かって移動する。時間の経過に伴って混合ゾーン中のBSAが最も前に進む。しかし, 先導イオンゾーンのpHは3.6であり, 図1からわかるように, もしBSA分子が先導イオンゾーンに入ったとしても, BSAは正に荷電するので直ちに後のゾーンに戻ることになる。従って, 先導イオンゾーンと混合ゾーンの境界面の混合ゾーン側においてBSA濃度が増加し, その結果, カウンターイオンとの電気的中性を保つため, この領域でのpHは低下する。したがって, このゾーン内のpH範囲では他の成分はBSAと同じ速度で泳動しえないので, 脱落し, 後方のゾーンへと押しやられる。この結果, このゾーンはBSAのみが存在することになり, 先導ゾーンと同速度で進むことになる。新しく形成されたBSAゾーンに接した次の混合ゾーンの中ではCysが最も早い泳動速度を持ち, BSAが単独ゾーンを形成したと同様にして, 次の単独ゾーンを形成することになる。以下, 同様にして, 全ての成分がカウンターイオンと電気的中性を保ちながら単独ゾーンを形成し, 等速泳動することになる。この例では図3より等速泳動に至

るまでに要する時間は約3時間かかることがわかる。ここで注意すべきことは後方に泳動するタンパク質は泳動初期において, 前方への移動が遅れるため, 非常に濃縮されることである。従って, このようなタンパク質の溶解度を考慮しておかなければ, 泳動が乱れる場合がある。

一方, 等速状態での各ゾーンのpHは図1の矢印で示されるように各成分とカウンターイオンとの交点で表わされる。また図2から各成分の電気泳動度は各ゾーンで次のようになることがわかる。

BSA > Cys	BSAゾーン
BSA > Cys > Hb	Cysゾーン
Cys > Hb > His	Hbゾーン
Hb > His > Mb	Hisゾーン
His > Mb	Mbゾーン

以上より, 等速状態での5成分の陽極側からの泳動順序は



となり, BSAとHbの間にCysが, HbとMbとの間にHisが入ることになり, この例では二つのアミノ酸がタンパク質の分離のためのスペーサーとなりうることを示される<sup>13)</sup>。

戸田ら<sup>14)</sup>は等速電気泳動法によるタンパク質の分離について, タンパク質の添加量を変えて, 分離におよぼす影響を検討している。タンパク質の添加量を変えれば, 等速泳動後のタンパク質ゾーン幅は広がるが, スペーサーである両性担体の幅には影響を与えないので, 他のタンパク質との分離状態には影響しないことを示している。これは先導イオン濃度を決めれば, 後続するイオン濃度が定まるというKohlraushの関係式に従っているためである。この事実は, 等速電気泳動法が多量の蛋白質の分離精製に適していることを示している。

#### 4. おわりに

等速電気泳動法をタンパク質の分離精製に用いるためには, 泳動する目的タンパク質の前後に入るスペーサーとしての両性担体を選択する必要がある。このためには目的のタンパク質のみならず, 他の混在する物質の解離曲線および

## 生産と技術

電気泳動曲線が必要であり、またこれらの曲線からスパーサーとなる両性担体の選択または合成が可能となる。これはかなり難しい問題であるが、いったんこれらの物質が定まれば、非常に高度な分離が可能となろう。

等速電気泳動法は、これまで主として分析用として利用されてきたが、これまでに述べたように、その性質上むしろ多量のタンパク質の分離精製に適しているであろう。今後、できるだけ多量の蛋白質の分離に適した装置の開発が期待される。

### 参考文献

- 1) 戸田年総：蛋白質・酵素の基礎実験法，p.360. 南江堂 東京 (1981)
- 2) Everaerts, F. M., Geurts, M., Mikkers, F. E. P., Verheggen, T. P. E. M. : J. Chromatogr., 119, 129 (1976)
- 3) Everaerts, F. M., Kontz, W. J. M. : J. Chromatogr., 65, 287 (1972)
- 4) Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Peek, J. A. F. : J. Chromatogr. 168, 293 (1979)
- 5) 香西重忠, 赤田吉信, 八木孝夫：第4回細管式等速電気泳動分析シンポジウム要旨集, p.18 (1984)
- 6) 児玉裕敬：第4回細管式等速電気泳動分析シンポジウム要旨集, p.22 (1984)
- 7) Lancaster, M. V., Sprouse, R. F. : Anal. Biochem. 77, 158 (1977)
- 8) 例えば, Jovin, T. M. : Biochemistry, 12, 871 (1973)
- 9) 島尾和男：等電点電気泳動と等速電気泳動, p.137, 共立出版, 東京 (1978)
- 10) Shulz, G. E., Schirmer, R. H. : Principles of Protein Structure, Springer-Verlag GmbH (1979)
- 11) 菅 健一, 前田雄明, 合葉修一：日本醸酵工学会大会要旨集, p.176 (1984)
- 12) 菅 健一, 前田雄明, 山田倫子, 合葉修一：第19回 化学工学秋季大会研究発表講演要旨集, p.169 (1985)
- 13) 広川健, 木曾義之：第4回細管式等速電気泳動分析シンポジウム要旨集, p.1 (1984)
- 14) Laurent, T. C., Killander, J. : J. Chromatogr. 14, 317 (1964)
- 15) Nozaki, Y., Tanford, C., : J. Am. Chem. Soc. 89, 742 (1967)
- 16) Roxy, R., Tanford, C. : Biochemistry 10, 3348 (1971)
- 17) Dayhoff, M. O. : "Atlas of Protein Sequence and Structure," National Biochemical Foundation, Washington D. C., vol.5, suppl. 2 p.191 (1976)
- 18) Windholtz, M. : The Merk Index 9th Ed. merk, Rahway, N. J. (1976)