

## 異常血色素に関する研究ⅩⅢ： 異常血色素一次構造解析への二次元電気泳動法の導入

川崎医科大学 生化学(2)教室

山崎壽子・井内岩夫

(平成7年10月2日受理)

Studies on the Abnormal Hemoglobin XIII:  
Application of Two-Dimensional Electrophoresis of Peptides  
for the Study of Abnormal Hemoglobin

Toshiko YAMASAKI and Iwao IUCHI

*Department of Biochemistry*

*Kawasaki Medical School*

*Kurashiki, 701-01, Japan*

*(Received on October 2, 1995)*

### 概 要

Lysylendopeptidase 消化後の $\alpha$ グロビン鎖を二次元電気泳動法にて泳動し、約30のスポットを検出した。これまで分子量数千以上の蛋白質分析のための手法と思われていた本法が分子量数百のペプチドにも応用できることが明らかとなった。これにより、異常血色素の一次構造解析に HPLC 法と併用することにより、より微量試料での分析が可能になるものと思われる。

### Abstract

A method of two-dimensional electrophoresis for peptides below 40 amino acid residues is described. We applied Lysylendopeptidase digest of hemoglobin  $\alpha$  chain and successfully scattered the spots in more than 30 two-dimensionally. This technique might be suitable for one procedure in a series of sequential analysis step of peptides together with HPLC method.

### はじめに

蛋白質の二次元電気泳動はこれまでに多くの研究者によって<sup>1)~7)</sup>、一次元電気泳動法(PAGE, SDS-PAGE<sup>8),9)</sup>など、ゲル濾過、イオン交換クロマト、高速液体クロマト(HPLC)とともに有用な方法として高く評価されている。しかし小蛋白質すなわちペプチド分析への二次元電気泳動法の適用例は少なく、現在では HPLC 法が専らその検出感度、収率の面からペプチドの分析方法として汎用されている。当研究室においても異常血色素の一次構造解析に HPLC 法は不

可欠であった<sup>13)</sup>が、他方でさらに微量試料を用いたしかもより簡便なペプチド分析方法はないかと模索してきた。そしてそれにより従来の HPLC 法では分離が困難であった  $\alpha$  Tp 7 と Tp 7・8 の分析および未だ具体的な例はないが異常血色素分析において HPLC 法では分離が困難なペプチドの分析を可能にする本法を概ね確立した。本紙では二次元電気泳動の改良法と、これによる  $\alpha$  グロビン鎖の酵素消化ペプチドの分離成績を報告する。

### 材料と方法

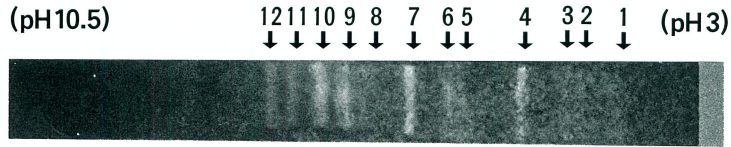
試料は  $\alpha$  グロビン鎖の Lysylendopeptidase 消化物 ( $\alpha^{LE}$ ) を用いた<sup>14)</sup>。この酵素はトリプシンと異なり鎖内の Lys の C 末端のみを解裂させる。Immobiline Dry Strip (pH 3 ~ 10.5, 3.3 mm × 110 mm, 0.5 mm 厚) は Pharmacia 社のものを使用。ウェスタンブロッティング用の PVDF 膜は日本ポール社のフルオロトランスを使用。方法は以下の如くである。

- (1) 一次元目電気泳動: Immobiline Dry Strip を 8 M 尿素, 0.5% Triton X-100 を含む 2 mM 酢酸で膨潤させる (6 時間)。  $\alpha$  グロビンの酵素消化物約 1 mg を含む試料溶液を、膨潤後の Immobiline Dry Strip に塗布する (数十ナノモル)。電極液は蒸留水を使用 (正負極共に) し、シリコンオイルを冷媒として、1400 V, 16 時間, 4 °C で電気泳動する。
- (2) 二次元目電気泳動: 用意したポリアクリルアミドゲル (12%, 12 × 14 cm, 1 mm 厚) を両極共に 5% 酢酸を用いて 1.5 時間 (200 V 定電圧) 通電し、ついで正極として 0.055 M 2-メルカプトエタノールを含む 5% 酢酸, 負極として 5% 酢酸溶液を用いた第 2 段の予備通電を 1.5 時間 (150 V 定電圧) 行なう。一次元目のゲルストリップをこのスラブゲルの上端に密着させ、隙間をアガロースゲルで埋め、両極共に 5% 酢酸溶液を用い約 1.5 時間通電する (20 mA 定電流)。
- (3) PVDF 膜への転写: セミドライ型転写装置を用い、0.7% 酢酸溶液を転写溶媒とし、144 mA, 1 時間通電し、スラブゲルから膜へペプチドを転写させる。
- (4) ペプチドの検出: 0.01% フルオレスカミン/アセトン溶液, 次いでトリエチルアミン: アセトン (=1:10) 溶液を PVDF 膜に直接噴霧し, UV 光による蛍光スポットを観察する。

### 結 果

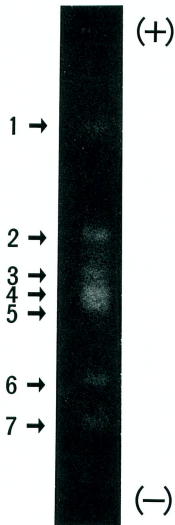
Immobiline Dry Strip を用いて  $\alpha^{LE}$  の等電点電気泳動を行なった (Fig. 1)。  $\alpha^{LE}$  は 12 本のペプチドから構成されておりここでは 12 本のバンドに分かれている。しかしバンドの各 5 残基目までのアミノ酸配列を調べたところ、バンド 4 は VGAHA, バンド 7 は VGAHA, バンド 9 は VAPAL, バンド 10 は LLSHX, バンド 12 は TYFPH が主要なペプチドとして同定されたが、バンド 10, 9, 4 は明らかに他のペプチドを含んでいた。このうちバンド 4 とバンド 7 の 5 残基までは共通の配列が見られたことより 1 本のペプチド由来の断片が複数の位置に泳動されている可能性が示唆された。また  $\alpha^{LE}$  を尿素を含む 12% の PAGE で泳動すると 7 本のバンドに分離した (Fig. 2)。この両電気泳動を組み合わせると絶対量として約 0.5 mg (31 nmol) の  $\alpha$  鎖の二

次元電気泳動を行なったのが、Fig. 3である。これにより理論上12本のペプチド混合物であるべきものが約30のスポットとして観察された。



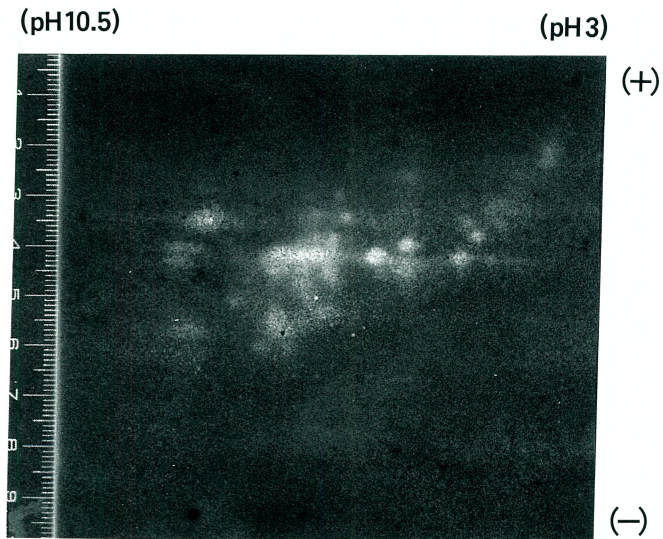
**Fig. 1.** Isoelectric focussing of Hemoglobin(Hb)  $\alpha$  chain digest with Lysylendopeptidase.

The numbers from right to left refer to the separated peptide bands.



( $\leftarrow$ ) **Fig. 2.** Electrophoregram of Hb  $\alpha$  chain digest( $\alpha^{LE}$ ). The numbers from top to bottom refer to the peptide bands on a PVDF membrane blotted from 12% palyacrylamide gel.

( $\downarrow$ ) **Fig. 3.** Mapping of  $\alpha^{LE}$  digest. The peptides from top to bottom are ordered by molecular weight with large to small and the peptides from right to left are distributed by acidic to basic.





## 考 察

二次元電気泳動法による $\alpha$ グロビン鎖の Lysylendopeptidase 消化物の分離を試みた。これにより約30のスポットが得られたが、ペプチド数の理論値は12本であることより、酵素消化が不十分だったか、余計な切断が起こっているという可能性が考えられる。また蛍光発色では検出感度が高いため混在している紫外外部吸収では検出されないほどの微量のペプチドも検出されるためではないとも考えられる。さらに、ペプチド以外の夾雑物をも検出している可能性もある。同じ試料を HPLC で分離すると理論どおりの数(12本)のピークとして検出された。PVDF 膜上でのフルオレスカミンによる検出感度は数ピコモルであった。今回の二次元電気泳動で最初に塗布する試料の量は数十ナノモルなので、一連の作業中の収率を考慮してもかなり大量の試料を塗布したことになる。この点からも上記の理由(検出感度の高さ)により理論数以上のスポットが検出される事は十分予想される。また、分析に使用した試料の量は HPLC 法とほぼ同じ(約0.5~1 mg)であるが、二次元電気泳動法ではさらに試料量を少なくしても充分検出可能である。また $\alpha$ 鎖の Lysylendopeptidase による消化では多量の尿素を使用するが、ペプチドの検出波長214nmでは尿素による吸収がピーク検出を妨害する。しかしフルオレスカミンによる蛍光発色であれば尿素による影響がないことも HPLC 法と比較した場合の利点のひとつとしてあげられる。また $\alpha$ 鎖 Tp7 と Tp7・8 および $\beta$ 鎖 Tp6, Tp7, Tp7・8 はそれぞれ1~4個のアミノ酸よりなるペプチドで従来の HPLC 法では溶出ピークが早い位置に近接したひと固まりのピークとして溶出される。すなわちアミノ酸置換が起こっても検出されにくい。事実、この領域のアミノ酸置換のほとんどは HPLC 法が一般的手法となる以前にフィンガープリント法によって検出、報告されており<sup>15),16)</sup>、その後 Huisman らの報告<sup>17)</sup>を除いてはほとんど検出されていない。これは特にこの領域のアミノ酸置換が HPLC 法では分析しにくいためと考えられる。

また我々は、二次元電気泳動法の別法としてあらかじめペプチドN末端に DABITC (4-N, N-dimethylaminoazobenzene-4'-isothiocyanate) というアゾ色素を結合させておき、同様の方法での泳動も試みた。これは泳動中も紫色に発色したペプチドの泳動位置を確認することができ、しかも感度が蛍光発色よりも優れているという利点があるためである。さらにその構造がエドマン試薬に似ていることからそのままペプチドの自動配列決定ができるとも考えられた。しかし実際にはエドマン法を用いた自動配列決定法において1残基目が同定されないという事が恐れられたので、今回は蛍光発色法を採用したわけである。二次元展開フィンガープリント法などは、ペプチドN末端に作用するニンヒドリン発色後にペプチドを抽出し、その配列を決定する方法であるが、そこでは試料の量が多量で、ニンヒドリンと未反応のペプチドが存在するために可能なのであり、今回のように極微量の試料を扱う場合には適さなかった。

今回これまでに検出されたすべてのスポットの同定は行っていないが、現時点で、酵素消化ペプチドを二次元電気泳動に応用するという目的は達せられた。今後、各スポットの同定を行い異常血色素の分析に応用したい。そして本法が HPLC 法とともに、それぞれの欠点を相補

う方法として利用されることにより、蛋白質一次構造解析の微量法の難点は解決されると思われる。

本研究は、川崎医科大学プロジェクト研究費（6-103）により行なわれた。

### 参 考 文 献

- 1) Patrick H O'Farrell: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins: J. Biol. Chem. 250 4007-4021, 1975
- 2) Görg A: Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients: current state. Biochemical Society Transactions 21(1): 130-132, 1993
- 3) Yamaoka T, Yamashita K and Itakura M: Determination of the number and relative molecular mass of subunits in an oligomeric protein by two-dimensional electrophoresis. J Chromatography 630: 345-351, 1993
- 4) Görg A et al: Approach to stationary two-dimensional pattern: Influence of focusing time and Immobiline / carrier ampholytes concentrations. Electrophoresis 9: 37-46, 1988
- 5) Görg A et al: Horizontal two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients using PhastSystem. Electrophoresis 9: 57-59. 1988
- 6) Görg A et al: The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis 9: 531-546, 1988
- 7) Görg A et al: Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients of leaf proteins from barley(*Hordeum vulgare*): Method, reproducibility and genetic aspects. Electrophoresis 9: 681-692. 1988
- 8) Cleveland MW et al: Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 252 1102-1106, 1977
- 9) Scott D Patterson et al: High-yield recovery of electro-blotted proteins and cleavage fragments from a cationic polyvinylidene fluoride-based membrane. Anal. Biochem. 202 193-203, 1992
- 10) John P Larmann Jr et al: Two-demensional separation of peptides and proteins by comprehensive liquid chromatography-capillary electrophoresis. Electrophoresis 14: 439-447, 1993
- 11) Mary F Lopez et al: High resolution 2-D peptide mapping with subsequent analysis of peptides by microsequencing or lectin binding directly from PVDF membrane blots. Applied and Theoretical Electrophoresis 4: 95-102, 1994
- 12) Sheng HS et al: Electroimmunoblotting of small peptides separated on urea-dodecyl sulfate (SUDS) gels. Journal of Immunological Methods 107: 13-22, 1988
- 13) 日高和夫, 井内岩夫, 島崎俊一: 異常血色素に関する研究IX: 異常血色素のトリプシン消化物の高速液体クロマト法による分離と同定について。川崎医学会誌一般教 10: 49-54, 1984
- 14) 山崎壽子, 井内岩夫: 異常血色素に関する研究XI: Lysylendopeptidase を用いた異常血色素の一次構造解析法について。川崎医学会誌一般教 19: 17-20, 1993
- 15) Spivak VA et al: A new hemoglobin variant: Hb Dagestan  $\alpha 60$ (E9) Lys→Glu. Hemoglobin 5(2): 133-138, 1981
- 16) Nakatsuji S et al: Hemoglobin Tottori ( $\alpha 59$  [E8] Glycine→Valine): A new unstable hemoglobin. Hemoglobin 5(5): 427-439, 1981
- 17) Huisman THJ et al: Hb J-Antakya or  $\alpha_2\beta_2 65$ (E9)Lys→Met in a Turkish family and Hb

Complutense or  $\alpha_2\beta_2$ 127(H5)Gln→Glu in a Spanish family: correction of a previously published identification. *Biochim. Biophys. Acta* 871 : 229-231, 1986