

# 異常ヘモグロビンの分離・精製への 等電点分画法の応用

川崎医科大学 生化学

原野 昭雄, 原野 恵子

同 検査診断学

上 田 智

(昭和54年3月6日受付)

## Application of Isoelectric Focusing for the Separation and Purification of Abnormal Hemoglobin.

Teruo Harano and Keiko Harano

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School

Satoshi Ueda

Department of Clinical Pathology.

(Accepted on Mar. 6, 1979)

アンホラインを含むポリアクリルアミドゲル (pH range 6~9) での等電点分画法は異常ヘモグロビンの分離・精製のためのセルロースアセテート膜電気泳動法や DEAE セルロースカラムクロマト法と比較して有効であることがわかった。特にこの方法は低含量異常ヘモグロビンや fast moving 異常ヘモグロビンの溶血液を一度に多量に、短時間内で分離・精製するのに有効である。

Isoelectric focusing on polyacrylamide gel plate (pH range 6-9) containing ampholine was described to be useful for the separation and purification of abnormal hemoglobin. This technique was superior to the methods of cellulose acetate membrane electrophoresis and DEAE cellulose column chromatography for the objectives. Especially, it was effective for the separation of the lower percentages of abnormal and fast moving hemoglobin and for enabling the process in a short period of time.

### はじめに

異常ヘモグロビンの一次構造決定には異常成分である異常ヘモグロビンの分離・精製は必要欠くべからざるものである。従来から行なわれ

ている異常ヘモグロビンの分離・精製法には DEAE セルロースカラムクロマト法<sup>1)</sup> やセルロースアセテート膜電気泳動法<sup>2), 3)</sup> がある。最近実用化されてきた等電点分画法はキャリアーアンホライトを用い安定な pH 勾配を作り、タ

ンパク質を電気泳動すると等電点に相当する pH 点まで移動して止まる。この原理にもとづいて幾種かのタンパク質の混合物を効率よく分離でき、微量成分の分析にも有効なものである<sup>4)~6)</sup>。我々は等電点分画法を異常ヘモグロビンの分離・精製に応用し、効率よく、短時間で分離することができたので報告する。

### 材料および実験方法

試料血液：昭和53年9月、倉敷中央病院入院中の患者（男・4歳）の溶血液を電気泳動した Hemoglobin Screening の結果、異常ヘモグロビンの保因者であることが発見され、この異常ヘモグロビンにたいし Hb Kojima と命名した。等電点分画法の結果から pI: 6.7 (fast moving) であり、異常ヘモグロビン含量 22.5% が算出された。等電点分画ゲル板上 HbA<sub>2</sub> の縞が2本に分離すること、異常ヘモグロビン含量から  $\alpha$  鎖異常であることが予想され、またセルロースアセテート膜電気泳動 (8M Urea-Tris-EDTA-Borate 緩衝液) の結果から  $\alpha$  鎖異常が判明した。イソプロパノールテストは陰性で安定な異常ヘモグロビンを考えられた。その他、HbA<sub>2</sub>=2.4% (セルロースアセテート膜電気泳動・溶出法<sup>7)</sup>)、Hb F=0.3% (アルカリ変性法<sup>8)</sup>) であった。

溶血液の調製：抗凝固剤の入った血液を 0.9% 食塩水で洗い、血球を 3,000 rpm, 5 分間遠心して集めた。この操作を3回くり返し行なった。血球量の2倍量の蒸留水、1/2 量の四塩化炭素を加え振盪後、3,000 rpm, 15 分間遠心して溶血液を調製した。

異常ヘモグロビンの分離・精製：

(1) セルロースアセテート電気泳動法：Tris-EDTA-Borate 緩衝液を塩酸で pH 8.16 に調節し電気泳動用緩衝液とした。先に得た溶血液を3倍に希釈してセルロースアセテート膜 (7×20 cm; ザートリウス製) 上に 50  $\mu$ l を塗布した。冷室 (8°C) 中、150V 定電圧下に2時間泳動した。分離帯を切り取り水で抽出した。

(2) DEAE セルロース (DE 52) カラムクロ

マト法：DE 52 (ワットマン製) を 0.01 M 食塩を含む 0.2 M グリシン-0.01% シアン化カリウム溶液 (pH 約 7.8, Buf. I) に懸濁させ、塩酸で pH 7.8 に調節後、さらに Buf. I で洗浄をくり返し行なった。カラム (6 mm  $\phi$  × 15 cm) の高さ 9cm まで充填した。溶血液 0.1 ml を Buf. I で透析・平衡化させ、カラム上に重層した。各ヘモグロビンの溶出には Buf. I (300ml) と Buf. II (300 ml) (0.04 M 食塩を含む 0.2 M グリシン-0.01% シアン化カリウム溶液; pH 約 7.8) を直列に連結し、直線的ナトリウムイオン勾配をつけることにより行なった。

(3) 等電点分画法：等電点分画法に用いたポリアクリルアミドゲルは Hemoglobin Screening に用いるものと同様なものを調製し行なった<sup>9)</sup>。即ち、アクリルアミド-ビス溶液 {30g のアクリルアミドモノマー (半井化学) と 0.8g のビス (N, N-メチレンビスアクリルアミド; 半井化学) を水に溶解し 100 ml としたもの} (3.0 ml), 蒸留水 (3.0 ml), 20.8% ショ糖溶液 (11.0 ml), アンホライン (pH 7~9; LKB Co., Ltd.) (0.6 ml) とアンホライン (pH 3.5~10) (0.15 ml) を混和、脱気、氷中で冷却後、0.004% リポフラビン溶液 (0.1 ml), TEMED (0.05 ml) および 10% 過硫酸アンモニウム溶液 (0.05 ml) を加え、1 mm 間隔に2枚のガラス板 (13 cm × 17 cm と 13 cm × 18 cm) を重ね合わせた間に注ぎ込み、少量の水を重層し、紫外線照射下に重合させた (約3時間を要する)。1枚のガラス板を取り除き、他方のガラス板上に 11 cm × 16 cm × 1 mm のポリアクリルアミドゲル板を調製した。ゲル板の中央部に厚手の口紙をリボン状 (1 mm × 6 mm × 16 cm) に切ったものを置き、0.02 M リン酸溶液を浸み込ませ陽電極とし、ゲル板の両端には同様の大きさの口紙を置き 20% エチレンジアミン溶液を浸み込ませ陰電極とした。冷却 (約 8°C) 下、200 V 定電圧で約 20 分間予備通電を行なったのち、0.5 cm × 15 cm の口紙 (トーヨー口紙 No. 2) を陰極側からそれぞれ 1 cm のところに置き、溶血液 200  $\mu$ l を浸み込ませた。(ゲル板1枚当り溶血液 400  $\mu$ l を塗布すること

ができる)。200 V 定電圧下に1時間、さらに300 V に電圧を上げ1時間通電を行なうと各ヘモグロビン (Hb A<sub>2</sub>, Hb F, Hb A, 異常 Hb, Hb A<sub>1c</sub>) の分離帯を観察できた。各分離帯を切り取り水中に溶出させ各ヘモグロビン (特に異常 Hb) を集めた。

結 果

ここに用いられた溶血液は fast moving 異常ヘモグロビンを含むものであり、含量22.5%と少ないものであった。通常行なわれるセルロースアセテート膜電気泳動での溶血液濃度 (10 g/dl), 泳動条件 (Tris-EDTA-Borate 緩衝液 pH 8.6) では分離が悪く、溶血液濃度を約3倍に希釈し、緩衝液 pH 8.16 に低下させ、また分離に十分な時間通電することによって異常ヘモグロビンの分離が可能であった (Fig. 1)。

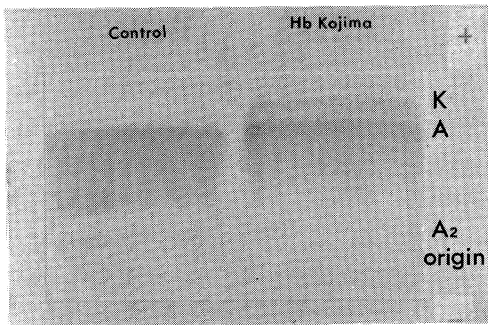


Fig. 1. Cellulose acetate membrane electrophoresis (pH 8.16) of the oxy-Hb hemolysate.  
K: Hb Kojima, A: Hb A, A<sub>2</sub>: Hb A<sub>2</sub>.  
Right: Hemolysate from the patient with Hb Kojima.  
Left: Normal control.

DE 52 カラムクロマト法での正常溶血液の各ヘモグロビンの分離では、最初 Hb A<sub>2</sub> が溶出され、ついで Hb A, Hb F が溶出され、Hb A と Hb F は殆んど重なってくる。最後に Hb A<sub>1c</sub> 分画が溶出 (Fig. 2 A) されるが、Hb Kojima 分画は等電点的には Hb A<sub>1c</sub> に近い為溶出の際には重なった分画として溶出させる可能性がある。Hb Kojima を含む溶血液が同様のカラムに应用されたとき (Fig. 2 B) の溶出パターン

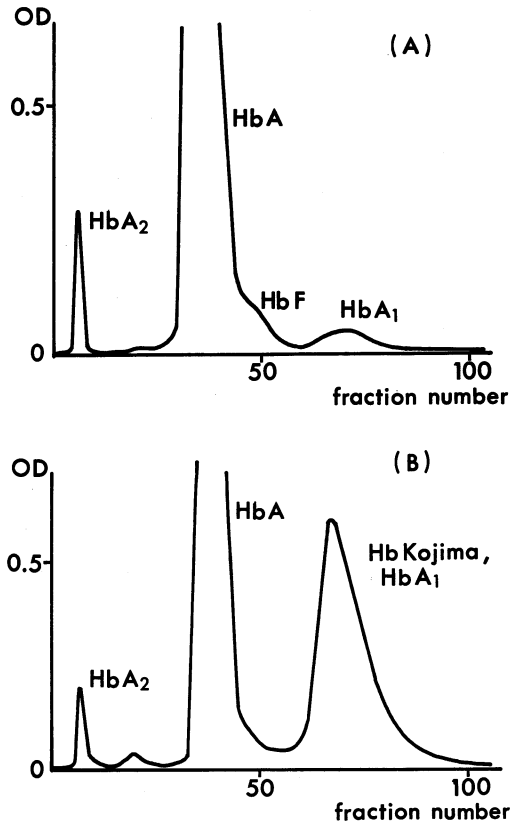
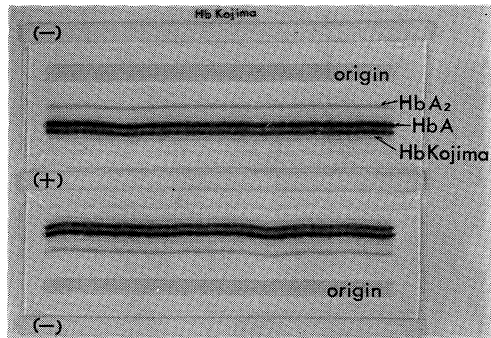


Fig. 2. Separation of hemoglobins of hemolysates from the sample with higher Hb F content (A) and from the patient with Hb Kojima (B) by use of DEAE cellulose (DE 52) column chromatography. Three ml was fractionated into the respective tubes. Optical density of each fraction was measured at 415 nm, using water as a reference.

では Hb A<sub>1c</sub> と Hb Kojima の分画が同一ピークとして現われ、このクロマトグラムからは異常ヘモグロビン (Hb Kojima) の含量は約30%と算出された。クロマトグラム中の各ヘモグロビンの同定は溶出液を濃縮後、等電点分画法により行なった。

等電点分画法による分離パターンは Fig. 3 に示すように、各ヘモグロビン (Hb A<sub>2</sub>, Hb A, Hb Kojima) の分離帯を明瞭に現わした。これら各分離帯をカッターで切り取り、水または適当な緩衝液 (例えばリン酸緩衝液) 中に溶出すれば高濃度の単一ヘモグロビン溶液の調製が可

能であった (Fig. 3)



**Fig. 3.** Separation of abnormal hemoglobin (Hb Kojima) when 200  $\mu$ l of hemolysate was applied on one side filter paper (0.5  $\times$  15 cm) at original site and moved by isoelectric focusing.  
(+): anode, (-): cathode.

### 考 察

異常ヘモグロビン Hb Kojima は等電点分画法で pI 値の測定から 6.7 という値を示し、セルロースアセテート膜電気泳動の泳動パターンから fast moving な異常ヘモグロビンと呼ばれるものである。Hb Kojima は電気泳動法による異常鎖検索の結果から  $\alpha$  鎖異常であることが判明したため、異常ヘモグロビン含量は 25% 以下になることが考えられる。 $\alpha$  鎖異常、イソプロパノールテスト陰性ということから安定な異常ヘモグロビンで含量 22.5% は妥当なところである。

通常のセルロースアセテート膜電気泳動法でのこのヘモグロビンの分離は良くなく、この方法により有効に分離するには溶血液の濃度を低下させること、緩衝液の pH、泳動条件の選択が主要な要因となる。

DE 52 によるカラムクロマト法による場合、Hb A の溶出後、Hb A<sub>1c</sub> 分画と Hb Kojima 分画が重なったピークを示し、溶出に使用する緩衝液のナトリウムイオン濃度勾配、カラムの大きさ、即ち、充填剤と試料量との量的割合等の工夫が必要となる。また、カラム充填剤による試料の吸着による試料回収率の低下も考えられる。

しかしながら、等電点分画法では Hb A<sub>1c</sub> の pI 値は Hb A (pI: 6.96) と Hb Kojima のそれとの中間値を示し、両者の中間に細い分離帯を示す。Hb Kojima と Hb A<sub>1c</sub> との分離は可能なものである。しかし、Hb A<sub>1</sub> 分画には Hb A<sub>1c</sub> の他に Hb A<sub>1b</sub>, Hb A<sub>1a</sub> がありこれらの pI 値は Hb A<sub>1c</sub> のそれより低い値を示すが、これらの含量は極めて少なく (1% 以下)、夾雑物としての含量は無視し得るものである。この実験では両電極間距離 5 cm と非常に狭いゲル板間での異常ヘモグロビンの単離を試みたもので Hb A<sub>1c</sub> と Hb Kojima の分離は十分とはいえないかも知れないが、塗布可能な溶血液量は 1 枚のゲル板 (11 cm  $\times$  16 cm) 上に 400  $\mu$ l であり、しかも短時間 (2 時間) 内で効率よく分離・精製が可能であるという利点がある。

### 文 献

- 1) Abraham, E. C., Reese, A., Stallings, M. and Huisman, T. H. J.: Separation of human hemoglobins by DEAE-cellulose chromatography using glycine-KCN-NaCl developers. Hemoglobin 1: 27-44, 1976
- 2) Jonxis, J. H. P. and Huisman, T. H. J.: A laboratory manual on abnormal hemoglobin. Oxford and Edinburgh, Blackwell. 1968
- 3) Ueda, S., Shibata, S., Miyaji, T. and Ohba, Y.: The third instance of Hb M Saskatoon disease discovered in Japan. Kawasaki med. J. 2: 185-197, 1976
- 4) Koepke, J. A., Thoma, J. F. and Schmidt, R. M.: Identification of human hemoglobins by use of isoelectric focusing in gel. Clin. Chem. 21: 1953-1955, 1975
- 5) Basset, P., Benzard, Y., Garel, M. C. and Rosa, J.: Isoelectric focusing of human hemoglobin: Its application to screening, to the characterization of 70 variants, and to the study of modi-

- fied fractions of normal hemoglobins. *Blood* 51 : 971—982, 1978.
- 6) Harano, T., Iuchi, I. and Shibata, S.: A simple isoelectric focusing procedure for screening human hemoglobin components on polyacrylamide gel. *Kawasaki med. J.* 4 : 53—56, 1978
  - 7) Ueda, S., Shibata, S., Miyaji, T. and Ohba, Y.: Routine Hb A<sub>2</sub> estimation by cellulose acetate membrane electrophoresis. *Kawasaki med. J.* 1 : 113—120, 1975
  - 8) Betke, K., Marti, H. R. and Schlicht, I.: Estimation of small percentages of faetal hemoglobin. *Nature* 184 : 1876—1878, 1959