

黒毛和種ウシの血清タンパク質における SDS-PAGE法及びIEF法の基礎的研究

七條喜一郎*・鈴木 實*・竹内 崇*・福西克弘**・
寺坂陽一郎***・山内俊平****

Primary Studies of SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis and Isoelectric Focusing on the Serum Protein in Japanese Black Cattle

Kiitiro SITIZYO*, Minoru SUZUKI*, Takashi TAKEUCHI*, Katsuhiko FUKUNISHI**,
Youichiro TERASAKA*** and Syunpei YAMAUCHI****

The electrophoretic conditions on the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing were investigated in cattle serum protein. The results obtained are listed as follows. 1) The time required and suitable temperature for sodium dodecyl sulfate (SDS) treatment of serum were 100°C at 3 minutes on the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. 2) Serum proteins were separated into 7 bands by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (fraction I ~ fraction VII). The fraction V by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis agrees with the albumin by cellulose acetate membrane electrophoresis, and fraction I and α -globulin agree precisely. γ -globulin was separated into 2 bands, namely fraction II and fraction III by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. 3) The optimum application volume of samples was 4 μ l/cm on the isoelectric focusing. 4) Serum proteins were separated into 30~40 bands by isoelectric focusing. Albumin by cellulose acetate electrophoresis was fractionated in the region of pI 4.2~pI 4.9 on the isoelectric focusing pattern.

-
- * 鳥取大学農学部獣医学科家畜生理学講座
 - * *Department of Veterinary Physiology, Faculty of Agriculture, Tottori University*
 - ** 鐘紡(株)
 - ** *Kanebo Co. Ltd.*
 - *** 鳥取県家畜病性鑑定所
 - *** *Veterinary Diagnostic Laboratory, Tottori Prefecture*
 - **** 愛知県岡崎保健所
 - **** *Okazaki Health Center, Aichi Prefecture*

緒 論

血漿タンパク質は組織タンパク質との間に動的平衡が保たれており、組織における病変は血漿タンパク質の変動として反映される。したがって、血漿タンパク質を分画してその変動を検索することにより、疾患における病態生理学的背景を理解することができる。

一般の臨床診断を目的とした血清タンパク質の分画測定には、操作が簡便なCellulose acetate膜電気泳動法(CA膜法)が用いられているが^{10,11,13-21)}、このCA膜法では血清をAlbumin (Alb), α -globulin (α -glob), β -glob, γ -globの5分画にしか分離できず、その診断的価値には限界がある。

そこで分離能の優れたSDS-polyacrylamide gel 電気泳動法(SDS-PAGE法)及びPolyacrylamide gel等電点電気泳動法(IEF法)をCA膜法と組み合わせて血清タンパク質の分析を行うことにより、診断的価値が高まるものと考えられる。しかし、SDS-PAGE法及びIEF法で動物の血清タンパク質を分析した報告は少なく^{9,12)}、臨床診断を目的とした基礎的研究もほとんどなされていない⁷⁾。

本実験ではSDS-PAGE法及びIEF法を家畜の臨床診断に応用するための基礎研究の一環として、ウシ血清における両泳動法の操作条件を検討した。またSDS-PAGE法及びIEF法による各分画帯とCA膜法における分画成分との関係についても検討した。

実験材料及び方法

実験には本学附属農場にて出生した黒毛和種子ウシ5頭及びその母牛を供試した。採血は真空採血管を用いて外頸静脈より行い、採取した血液は室温に2時間静置後、2,000rpmで10分間遠心して血清を分離し、実験に供するまで-20℃に凍結保存した。

血清総タンパク質量(TP量)の測定はアタゴ製タンパク屈折計で行い、CA膜法は、Separax膜(富士写真フィルム社)を用いて、膜の陽極側より2.5cmの位置に血清約2 μ lを線状に塗布した。泳動はVeronal緩衝液(pH8.6, イオン強度0.06)を用いて、膜幅1cm当たり0.8mAの定電流で40分間通電した。染色はPonceau-3Rで1分間行い、1%酢酸で1分間ずつ5回液を換えて脱色した。分画比の測定はDensitometer(常光産業, PAN型)で行った。

SDS-PAGE法はWEBER²³⁾の泳動条件に従い、以下の試薬を用いて、水平Slab gel法で行った^{1,5)}。

試薬① $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.84 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

25.76 g, Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)
1.00 g / 500ml (pH7.0に調整)

試薬② Acrylamide 11.1 g, n, n, n-Methylenebisacrylamide 0.3 g / 100ml

試薬③ Ammonium Persulfate 100mg/15ml

試薬④ n, n, n, n-Tetramethylethylenediamine 0.05ml

試薬⑤ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.44 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
2.56 g, SDS 1.00 g, Bromophenol Blue (BPB)
0.003 g, Urea 36.00 g / 100ml,
(pH7.0に調整)

試薬⑥ Methanol : Acetic acid : H_2O = 40 : 7 : 53

試薬⑦ Coomassie Brilliant Blue-R (1.25 g / 試薬⑥ 500ml)

試薬⑧ Methanol : Acetic acid : H_2O = 50 : 75 : 825

泳動gelは試薬① 15mlに試薬② 13.5ml, 試薬③ 1.5ml, 試薬④ 0.05mlを順次加えて混和して作成した。泳動試料は血清に試薬⑤を加えてタンパク質濃度が5mg/mlになるように調整し、100℃で3分間加熱処理した後、直ちに冷却し、その4 μ lをgel板上に塗布した。泳動緩衝液には試薬①の3倍希釈液を用い、gel幅1cm当たり1.5mAの定電流で、BPBが原点から約4.5cm移動するまで通電した。染色は試薬⑥で20分間固定した後、試薬⑦で15分間行った。脱色は試薬⑧で12時間行った。

分画比の測定はCA膜法と同じDensitometerで行った。なお、分子量の指標にはSIGMA社製のMW-70キットを用いた。

IEF法は間根山ら⁵⁾の方法に従い、以下の試薬を混合して、厚さ0.7mmの薄層gelを作成した。

(a) Acrylamide溶液 (29.1 g / 100ml) 4 ml

(b) n, n-Methylenebisacrylamide溶液 (0.9 g / 100ml)
4 ml

(c) Saccharose (25.0 g / 100ml) 10ml

(d) Ampholine (LKB社製, pH3.5-10.0) 1.5ml

(e) Riboflavin溶液 (4 mg/100ml) 0.5ml

泳動はアタゴ製のCA膜用等電点電気泳動装置で行い、陽極側電極液には1M H_3PO_4 を、陰極電極液には1M NaOHをそれぞれ用いた。血清試料はタンパク質濃度が30mg/mlになるようにPBS (0.01M, pH7.4)で希釈し、その約3 μ lをgelの陽極側から2cmの位置に塗布した。

泳動は4~8℃の冷水を循環させながら、電圧を200V, 400V, 600V, 800Vと30分間隔で順次高圧側へ変えて行った。固定及び染色は田中と鈴野²²⁾の方法に従って、20% Trichloroacetic Acidで1時間固定後、Methanol : Acetic Acid : H_2O の混合溶液(3 : 1 : 6)で30分ご

とに2回液を交換して洗浄した後、Coomasie Brilliant Blue-R/Methanol溶液 (0.16 g/100ml) で染色した。脱色はAcetic Acid : Methanol : H₂Oの混合溶液 (3 : 1 : 6) で3時間行った。泳動終了後の支持体gelのpH勾配はgelを通電方向に5 mm間隔で切り取り、pHメーターで測定した。

Agarose gel電気泳動法による各分画成分の抽出は1% Agarose gelを用いて泳動し、泳動終了後のgelの両端1 cmを切り取り、Ponceau-3Rで染色して、Alb, α -glob, β -glob, γ -globの各分画位置を確認し、この染色像を基準にして、残りのgelの各分画部分を切り取り加圧濾過した濾液をLyphogel (アトー社) で約3~5倍に濃縮した。

実験成績

1. SDS-PAGE法及びIEF法の泳動条件

1) SDS-PAGE法におけるgel濃度及び試料の処理方法

SDS-PAGE法はタンパク質試料にMercaptoethanol及びSDSを加えて処理し、その表面荷電を一定にして分画する方法である。この場合、Oligomerタンパク質がSub-unitに分かれて分画されるが、その分離には使用するgelの分子篩密度とSDS処理における加温温度並びに処理時間が影響するものと思われる。そこで、最初に2種類のgel濃度 (Acrylamide 5%と10%) について検討したところ、10% gelで良好な分画像が得られた。

Fig. 1はSDS処理の温度と時間を変えて泳動した分画像を示したものである。100℃で3分間処理したものと50℃で2時間処理したものでは明らかな差がみられず、分画I~VIIのbandが明瞭に分離された。しかし、37℃で3時間及び20℃で約12時間処理したものでは前二者に比べて分画Vが太いbandを示し、分画IIIがわずかに細いbandとなった。また、加温せずに泳動したものでは、分画Vが更に太く、分画IIIが欠如していた。

したがって、以下の実験には短時間で良好な分画が得られる100℃、3分間のSDS処理を行った。

2) IEF法における試料の塗布方法

薄層gelを用いるIEF法において、微量の試料を正確に塗布するには熟練を要し、しばしば分画像の歪みを生ずる原因となる。そこで本実験では、gelを切り取り、そこに試料を注入する方法、濾紙に試料を浸み込ませてgel上に置く方法及びgelに直接ピペットで塗布する方法について検討した。

その結果、gelを切り取り試料を注入したものは、

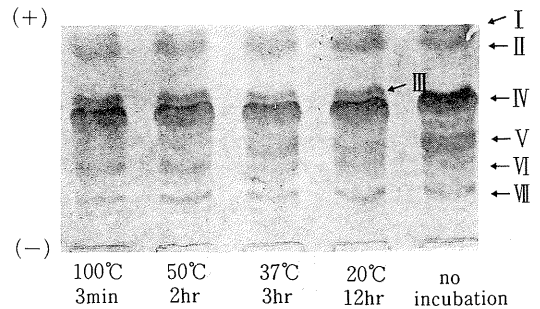


Fig. 1 Influence of incubation time and temperature by treatment with SDS on the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

溝の陽極側でgelとの干渉が起こり、分画像に大きな乱れを生じることが多かった。また、試料を含ませた濾紙を塗布位置に置いて泳動したものでは、低pH域の分離が悪くなる傾向がみられた。これに対して、血清を直接塗布する方法ではほぼ良好な分画像が得られた。

次に塗布量について検討したところ、血清を希釈せずにそのまま4 μ lを塗布した場合、塗布位置からgelの中央にかけてtailingが認められ、塗布量を4 μ l以下にすると泳動むらが生じ易かった。そこで、血清を30mg/mlに希釈して4 μ l塗布するか、あるいは20mg/mlに希釈して6 μ lを塗布すると明瞭な分画像が得られた。

したがって、以下の実験では試料のタンパク質濃度を30mg/mlに調整してgelに直接塗布する方法で行った。

2. IEF法及びSDS-PAGE法の分画帯とCA膜法による分画成分との関係

IEF法及びSDS-PAGE法で血清タンパク質を分画すると、多数のbandに分離されるが、これらの各bandがCA膜におけるAlb, α -glob, β -glob, γ -globとどのような関係にあるかを知る目的で、Agarose gel電気泳動法で抽出したAlb及びGlobの各成分をIEF法、SDS-PAGE法及びCA膜法で泳動した。

Agarose gel電気泳動法で抽出したAlb, α_1 -glob, α_2 -glob, β -glob, γ -globはCA膜法における血清の各分画位置に対応して分離され、Agarose gel電気泳動法とCA膜法による分画は一致していた (Fig. 2)。

IEF法でウシ血清を分画するとpI 3.0~8.1の領域に約40本のbandが確認された (Fig. 3)。このうち、pH 4~4.5付近に分画される濃い数本のbandはAlbに一致していた。また、 α_1 -glob及び α_2 -glob成分はIEF法のpI 3.3及び3.9付近にそれぞれ4~5本のbandを示し、 β -glob

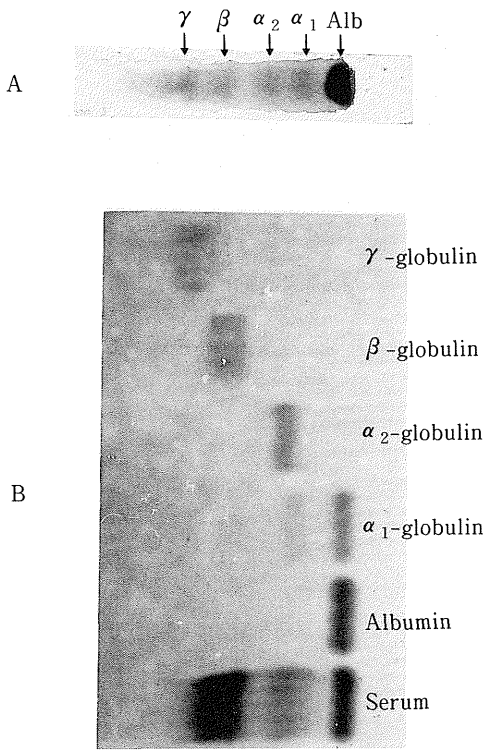


Fig. 2 Electrophoretic patterns
 A : Agarose gel electrophoretic pattern of bovine serum
 B : Cellulose acetate membrane electrophoretic pattern of bovine serum protein fraction by agarose gel electrophoresis

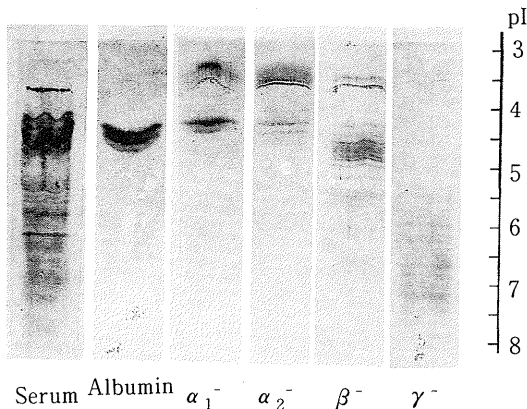


Fig. 3 Isoelectric focusing patterns of bovine serum protein fraction by agarose gel electrophoresis.

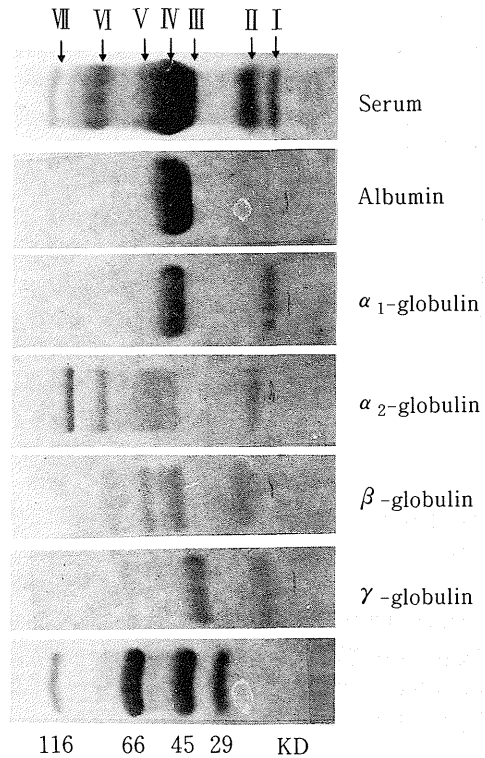


Fig. 4 SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of bovine serum protein fraction by agarose gel electrophoresis.

成分はpI 4.2~6.4の領域に約10本のbandとして分画され、 γ -glob成分はpI 5.5~7.7域に約12本のbandとして分画された。

SDS-PAGE法でウシ血清を分画すると、分子量が30,000~130,000の範囲に7本の明瞭なbandがみられ、これを便宜的に分画I~分画VIIとした (Fig.4)。このうち、分画IはCA膜法で分画される α_1 -globに相当し、分画II及び分画IIIは γ -globに、分画IVは主にAlbに、分画Vは β -globに、分画VI及び分画VIIは α_1 -globにそれぞれ一致する結果が得られた。

考 察

1. SDS-PAGE法及びIEF法の泳動条件

1) SDS-PAGE法の泳動条件

SDS-PAGE法はタンパク質をMercaptoethanolのような変性剤と加熱することによって、Oligomerタンパク質をSubunitに分解し、gelの分子篩効果を利用して分画す

る方法である。したがってSDSの分画像に影響を及ぼす要因には泳動に用いる支持体の分子篩密度 (gel濃度) と変性剤及びSDSによる処理方法が関係する^{3,6)}。

血清に含まれているタンパク質は分子量が40,000~300,000程度のものが多く、通常の分析には5~10%のgelが用いられている⁶⁾。

本実験において5% gelと10% gelについて検討したところ、ウシ血清においては10% gelが5% gelよりも明瞭な分画像を示すことが明らかになった。

変性剤及びSDSによる試料の処理方法は報告者によって異なっており、SHAPIROら⁸⁾は37℃で3時間反応させると、IgGがL鎖とH鎖に分離すると報告した。また、LAEMMLI⁹⁾は、100℃で1.5分間加熱する方法を報告している。本実験において、ウシ血清におけるSDS処理の反応温度と時間との関係を検討したところ、血清にSDSを加えて直ちに泳動した場合には分画Vが太いbandを示し、分画IIIが認められなかった。しかし、20℃で12時間、50℃で2時間、100℃で3分間反応させた場合、いずれの方法においても、分画Vが細いbandになり、分画IIIが明瞭に分離した。なお、この分画IIIはその分子量から推察するとSHAPIROら⁸⁾が報告したIgGのH鎖に相当するものと考えられた。

2) IEF法の泳動条件

著者ら⁹⁾は先にCA膜を用いたIEF法の泳動条件について検索し、明瞭な分画像を得るためには試料の塗布量及び塗布方法を一定にする必要があることを報告した。Polyacrylamide gelを用いるIEF法の試料の塗布方法は、試料溝に注入する方法^{3,5)}、濾紙に試料を吸着させて載せる方法 (濾紙法)²²⁾などがある。このうち、試料溝に注入する方法では試料溝の深さをgelの厚さの1/3以下にする必要がある³⁾と報告されているが、本実験ではgelの厚さを0.7mmと薄くしたため、このような溝を作成することが困難であった。そこで、塗布位置のgelを切り取って試料を注入したところ、分画像に乱れを生じることが多かった。また、濾紙法では低pH域の分画に乱れを生じた。これに対してCA膜を用いるIEF法¹¹⁾と同様に、直接試料をgelに塗布する方法では、ほぼ満足できる分画像が得られた。したがって、本実験のように薄層gelを用いる場合には、gel板上に直接塗布する方法がよいと思われる。また、その場合の試料濃度は30mg/mlとし、4 μ lの塗布が適していた。

2. SDS-PAGE及びIEF分画像とCA膜像の関係

CA膜法は、タンパク質分子の表面荷電と、支持体の電気浸透現象及び支持体への試料の吸着現象の総合的な

結果によってタンパク質を分離する方法である。これに対して、SDS-PAGE法は支持体の分子篩効果を利用して分画する方法であり、また、IEF法は個々のタンパク質の等電点によって分画する方法である。このように原理的に異なる三つの泳動方法を動物の臨床診断に応用する場合、それぞれの泳動方法における各分画成分が互いどのような関係にあるかを知っておく必要がある。

ヒトの血清については、SDS-PAGE法の各bandとCA膜法の分画成分との関係については二次元電気泳動法で検討されているが²⁾、ウシ血清については明らかにされていない。

本実験において、ウシ血清のAlb、 α -glob、 β -glob、 γ -glob成分をそれぞれの泳動法で検討した結果、AlbはSDS-PAGE法の分画IVの主成分であることが明らかになった。また、 α_1 -globはSDS-PAGE法の分画Iに属する低分子タンパク質であった。 α_2 -glob及び β -globは分画VI及び分画VII位置に分離することが明らかになった。また、 γ -globはSDS-PAGE法で分画IIと分画IIIの2つの成分に分離し、それぞれの分子量から推察すると、分画IIはIgGのL鎖、分画IIIはIgGのH鎖であろうと考えられ、このことはSHAPIROら⁸⁾が報告した成績に一致するものであった。

IEF法でヒト及び動物の血清を分画すると約30~40本のbandに分画されるが²⁾、各成分の同定及びその定量的意義については明らかにされていない点が多い。本実験において、ウシ血清のAlb、 α_1 -glob、 α_2 -glob、 β -glob及び γ -globをIEF法で泳動したところ、IEF法のpI 3.5付近に濃く染まる2~3本のbandはAlbであることが確認された。また、このAlbの高pI側 (pI 4.5~5.5) に分画される約10本のbandは β -globに属する成分であり、pI 6.0~8.0領域にみられる10~15本のbandは γ -globに属する成分であった。

以上のように、本実験において、従来一般に用いられているCA膜法とSDS-PAGE法及びIEF法による分画像との関係が明らかになった。したがって、今後このSDS-PAGE法及びIEF法をCA膜法と組み合わせて分析することにより、動物の血清タンパク質異常をより詳細に分析出来るものと考えられる。しかし、SDS-PAGE法及びIEF法で分画される各bandの生理的・生化学的性質については明確にされていない点が多く、このことについては、今後、種々な疾病との関係において検討を加えたいと考えている。

総括及び結論

SDS-PAGE法及びIEF法をウシの臨床診断に応用するための基礎的検討を行った。

実験に先立ち、SDS-PAGE法の試料処理方法及びIEF法における試料の塗布方法について検討した。SDS-PAGE法にはAcrylamideの10%gelが適しており、試料のSDS処理は100℃で3分間が最もよいことが明らかになった。また、IEF法における試料塗布方法は直接gel板上に塗布する方法が最も優れていた。

CA膜法で分画されるAlb及びGlobの各分画成分とSDS-PAGE法並びにIEF法の各分画成分との関連性について検討したところ、AlbはSDS-PAGE法の分画IVに、 α_1 -globは分画Iに、 α_2 -globは分画I, V, VI, VIIに、 β -globは分画VとVIに、 γ -globは分画II及びIII位置に分離されることが明らかになった。

IEF法の各分画とCA膜法による分画成分との関係において、AlbはIEF法のpI 4.2~4.9域に幅広く泳動され、 α -globはpI 3.3~4.9に、 β -globはpI 4.3~6.4に、 γ -globはpI 5.5~7.7の領域にそれぞれ分画された。

謝 辞

本研究を行うに当たり、試料採取にご理解、ご協力下さいました津野幸人前附属農場長並びに附属農場の方々に感謝いたします。

文 献

- 1) Abe, T. and Komatsu, M. : The α -fetoprotein level in the sera of bovine fetuses and calves. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **38** 339-345 (1979)
- 2) 浅川順一・高橋規郎 : O' Farrellの2次元電気泳動法. 電気泳動学会編, 新版電気泳動実験法, 文光堂, 東京, (1989) pp.299-314
- 3) 福田守道・新津洋司郎 : SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法. 蛋白核酸酵素, **17** 304-311 (1977)
- 4) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** 680-685 (1970)
- 5) 間根山幸子・宝木 聡・尾本恵市 : 薄層ポリアクリルアミドゲル等電点分画による赤血球PGM₁の亜型. 生物物理化学, **22** 233 (1979)
- 6) 松尾雄志・西 望・和田文雄 : SDS-disc電気泳動法. 電気泳動学会編, 新版電気泳動実験法, 文光堂, 東京, (1989) pp.288-298
- 7) Schultze, A. E. and Jensen, R. K. : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of canine urinary proteins for the analysis and differentiation of tubular and glomerular diseases. *Vet. Clin. Pathol.*, **18** 93-97 (1989)
- 8) Shapiro, A. L., Vinuela, E. and Maizel, J. L. : Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28** 815-826 (1967)
- 9) Sitizyo, K., Jinnai, S., Matsuda, M., Takeuchi, T. and Suzuki, M. : Electrophoretic technique using cellulose acetate membrane isoelectric focusing. *J. Fac. Agric., Tottori Univ.*, **27** 31-36 (1991)
- 10) 七條喜一郎・竹内 崇・鈴木 實 : ニワトリの産卵期における血清タンパク質, リボタンパク質及び糖タンパク質に関する研究. 鳥大農研報, **42** 161-168 (1989)
- 11) 七條喜一郎・竹内 崇・鈴木 實 : セルロースアセテート膜電気泳動法における産卵鶏血清の波形帯に関する研究. 生物物理化学, **34** 43-46 (1990)
- 12) 七條喜一郎・竹内 崇・鈴木 實・斎藤俊之 : ニワトリの血清タンパク質およびリボタンパク質の等電点電気泳動法による分析. 生物物理化学, **35** 453-458 (1991)
- 13) Sitizyo, K., Takeuchi, T., Suzuki, M. and Saito, T. : Studies on protein and lipid components of serum and residual yolk in chick embryos. *J. Fac. Agric., Tottori Univ.*, **28** 67-74 (1992)
- 14) 鈴木 實・豊澤敬一郎・七條喜一郎 : 家畜血清タンパクのCellulose Acetate電気泳動法における血清凍結保存の影響. 鳥大農研報, **27** 49-67 (1975)
- 15) 鈴木 實・豊澤敬一郎・七條喜一郎 : 家畜の血清無機物質ならびに血清タンパクに関する研究. I. ウシ及びブタの血清無機物質ならびに血清タンパク分画値について. 鳥大農研報, **28** 33-43 (1976)
- 16) 鈴木 實・豊澤敬一郎・七條喜一郎 : 家畜の血清無機物質ならびに血清タンパクに関する研究. II. イヌ, ウサギ, ニワトリの血清無機物質ならびに血清タンパク分画について. 鳥大農研報, **28** 44-54 (1976)
- 17) 鈴木 實・豊澤敬一郎・七條喜一郎・榊原隆夫・上田昭夫 : ブタの成長過程における血球動態及び血清タンパクに関する研究. 鳥大農研報, **30** 51-59 (1978)
- 18) 鈴木 實・豊澤敬一郎・七條喜一郎・吉田好正 : ニワトリの成長過程における血球動態及び血清タンパ

- クに関する研究. II. 血清タンパクの変動について. 鳥大農研報, **30** 66-72 (1978)
- 19) 鈴木 實・豊澤敬一郎・七條喜一郎・林 茂・河本修治・原田俊機:ウシの成長過程における血清タンパク, リポタンパク及び糖タンパクに関する研究. 鳥大農研報, **31** 125-133 (1978)
- 20) 鈴木 實・豊澤敬一郎・七條喜一郎:イヌの成長過程における血清タンパクの変動. 鳥大農研報, **32** 16-22 (1980)
- 21) 鈴木 實・七條喜一郎・竹内 崇・斎藤俊之:Cellulose Acetate膜電気泳動法におけるイヌの体液タンパク質に関する研究. 鳥大農研報, **43** 217-222 (1990)
- 22) 田中経彦・鈴野亮輔: PAG等電点電気泳動法. 電気泳動学会編, 新版電気泳動実験法, 文光堂, 東京, (1989) pp.420-430
- 23) Weber, K. and Osborn, M.: The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244** 4406-4412 (1968)