

異常血色素に関する研究 VI:

シリカゲル薄層ガラスプレートを用いた フィンガープリント法について

川崎医科大学、生化学教室

日高和夫, 井内岩夫

島崎俊一, 青葉宏子

(昭和55年9月13日受理)

Studies on the abnormal hemoglobin VI:
An improved method of fingerprinting with
use of silica gel thin layer glass plate

**Kazuo HIDAKA, Iwao IUCHI, Shunichi SHIMASAKI
and Hiroko AOBA**

*Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School
Kurashiki 701-01, Japan
(Received on Sept. 13, 1980)*

要 約

異常血色素のトリプシン消化ペプチドの異常ペプチドの確認と分離精製法としてシリカゲル薄層ガラスプレート (20×20cm, Merck Silica gel 60) を用いたフィンガープリント法について吟味を行ない、すぐれた方法を確立した。即ち、シリカゲル薄層プレートの一隅にトリプシン消化物 0.5mg を塗布し、20°C, 450V で2時間電気泳動 (pH 3.5) し、次いで直角方向にn-ブタノール:ピリジン:酢酸:水=30:30:6:12 混液を用いたクロマト (6時間、室温) をおこなって分離のよい再現性のあるフィンガープリントが得られた。従来の濾紙フィンガープリントと比較して、濾紙法では分離不可能であった中性分画のペプチド類 ($\alpha T_p-1, 4, 9, 11$ および $\beta T_p-1, 13$) がきれいに分離され、また発色の不鮮明な陽性分画 ($\beta T_p-3, 5, 50x$) 等を本法は明瞭なスポットとして検出し得た。最近検出したこの様な部位に異常を有する Hb Matsue-Oki, Hb Ube-2 および Hb J Bangkok 等の異常ペプチドの分取が本法により極めて容易になし得た。

従って本法は少ない試料量で簡単な装置により容易に実施出来、いずれのペプチドも分離精製が

できるので推奨に値する。

Abstract

In order to identify and separate the abnormal peptides of the tryptic digest of abnormal hemoglobin, a new modified method was established after careful examination of the fingerprint with use of commercial silica gel glass plate (20 x 20 cm, Merck silica gel 60).

An amount of 0.5 mg of the dissolved tryptic peptide of α and β chains was applied on a silica gel plate and subjected to electrophoresis in one way with pyridine-acetate buffer (pyridine: acetic acid: water = 2: 20: 978, pH 3.5) for 2 hrs at 20 °C with a potential gradient of 450 Volt, Ascending chromatography in the recutangular direction of electrophoresis was then carried out with a mixture of n-butanol - pyridine acetic acid - water (30: 30: 6: 12, in volume) for 6 hrs at room temperature.

The fingerprint map thus obtained gave beautiful pattern demonstrating ideal separation of the individual spots and high reproducibility.

This fingerprint was superior in occasion to the traditional paper fingerprint developed by Ingram and Baglioni because the traditional method gave unclear separation of the neutral peptides, α Tp-1, 4, 9, 11 and β Tp-1, 13 and faint coloration of the acid peptides, β Tp-3, 5 and 5ox.

All these defects were overcome by our new method. The abnormal α Tp-9 of Hb Matsue-Oki (α 75 Asp \rightarrow Asn) and Hb Ube-2 (α 68 Asn \rightarrow Asp) and the abnormal β Tp-5 of Hb J Bangkok (β 56 Gly \rightarrow Asp), those of which were detected recently in our laboratory and showed an unseparable abnormal peptide by the traditional fingerprinting, were clearly separated by our improved method and contributed much to the further analyses.

はじめに

異常血色素の研究ではまず異常血色素の一次構造異常の決定が不可欠である。しかしながらこの一次構造解析はその種類により多くの段階を経て最終的にアミノ酸配列異常が決定される。場合によっては極めて少ない試料量で短期間に一次構造を決定し、さらに機能異常までも明らかにすることが要請される。こうした事情に対応するため今回はフィンガープリント法において従来の沓紙 (Whatman 3 MM) 法¹⁾ のかわりにシリカゲル薄層ガラスプレート法の吟味を行ない、前者に比べ、確実にきれいな再現性のよいフィンガープリントを得る方法を確立出来た。ここにその方法と成績を報告することにした。

材 料

A) 溶血液は常法に従って作製し、グロビンは Anson-Mirsky 法²⁾ に準じて調製した。グロビンからの α 鎖および β 鎖の分離は 8M 尿素-CM・セルロースカラムクロマト法³⁾ により行なった。

次いで得られた α および β ポリペプチド鎖をトリプシン消化⁴⁾ し、トリプシン可溶性分画

を凍結乾燥し、本法の材料とした。

B) I. フィンガープリント用試薬

1) 一次元高圧電気泳動用緩衝液：ピリジン，酢酸，および水をそれぞれ 2ml：20mlおよび 978ml の割合に混合し，pH 3.5 の緩衝液をつくる。

2) 二次元クロマトグラフ用展開液：n-ブタノール：ピリジン：酢酸：水=30：30：6：12の容積割合で混合する。

ピリジンおよび n-ブタノールはニンヒドリン陽性物質を除去するため，ニンヒドリンを添加して還流し蒸留したものを使用する。酢酸は過マンガン酸カリウムを添加して還流し，次いで蒸留を行なって精製し使用する。

II. ペプチド検出用試薬

1) ニンヒドリン試薬：市販アミノ酸分析用(半井)ニンヒドリンをアセトンに 0.3%の濃度に溶解したものを使用する。

2) フルオレスカミン試薬⁵⁾：1), 10mg/dl フルオレスカミン-アセトン溶液。2), 10 ml/dl トリエチルアミン-アセトン溶液。

フルオレスカミンは市販品(日本ロシュ)をそのまま使用し，トリエチルアミンおよびアセトンは蒸留して精製し使用する。

試薬 1), 2) の順にシリカゲル薄層プレートに噴霧し，UVランプ(350nm)下で蛍光の有無を調べてペプチドを確認する。

III. シリカゲル薄層プレート：市販品 Merck, Silica gel 60 ガラスプレート，(20×20 cm)をそのまま使用する。

方 法

私共が確立したシリカゲル薄層プレートによるフィンガープリント法は以下の如くである。一次元高圧電気泳動および二次元上昇クロマトについて別々にのべる。

1) 高圧電気泳動： α 鎖ないし β 鎖のトリプシン消化ペプチド 5 μ l (0.5 mg) を図 1 のシリカゲル薄層プレートの原点 S にマイクロピペット (10 μ l 用) と温風機を用いてスポットの直径が 2 mm 以上にならない様に少量ずつ塗布し乾燥させる。塗布後泳動用緩衝液をプレート全面に均一に過剰液がしたたりおちない程度に噴霧し，泳動槽の冷却板(水道水を流す，約 20°C)に乗せ，サランラップでおおった沓紙(Whatman 3 MM, 21×7.5 cm)をウィックとし，プレートの両端から陰陽両電極槽に浸す。一定電圧 450 V で 2 時間通電を行なう。通電終了後，ドラフト内で風を送って乾燥する。

2) 上昇クロマトグラフィー：泳動終了の薄層プレートを泳動方向と直角方向にクロマト用展開液を用い展開槽で 6 時間室温(約 25°C)展開する(展開液先端は 5~6 時間で最上端に

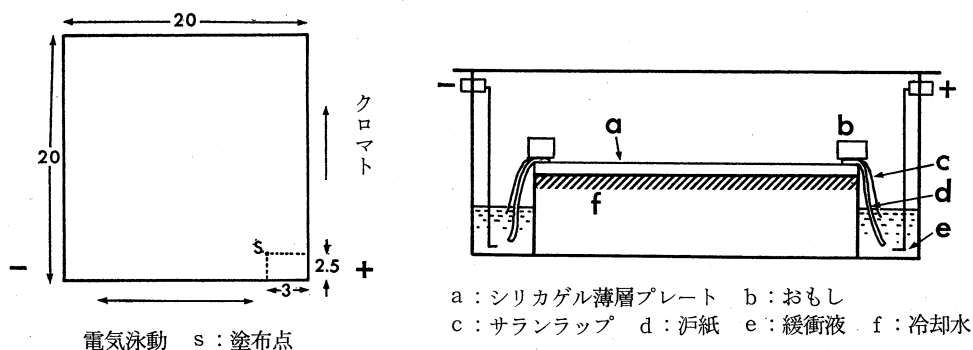


図1 シリカゲル薄層ガラスプレートと電気泳動装置

達する)。展開終了後充分乾燥を行ないニンヒドリンまたはフルオレスカミン発色液を噴霧し、フィンガープリントパターンを得る。

3) 薄層プレートからのペプチドの分取: 薄層プレート上の発色したペプチドスポットに鉛筆で印を付け、掻き取り、ペプチドごとに小試験管 (1.5×10cm) に移し入れる。自動アミノ酸分析機 (VANAKO LC-7型) を用いてアミノ酸分析を行なう場合薄層プレートの3~4枚分のペプチド量が必要である。掻き取ったシリカゲル粉末量は4枚分で0.2ml以下である。次いで過剰の未反応ニンヒドリン除去のため、試料を含む各小試験管にアセトン1mlずつを加え、攪拌後3000rpm, 5分間遠沈しアセトンを除く。各々に40%酢酸1mlを加え充分攪拌してペプチドを抽出し30分後, 3000rpm, 5分間遠沈し, 酢酸層を別々の試験管に移し取る。この抽出操作をさらに2回繰り返し抽出液を同じ試験管に集め減圧乾固する。

4) アミノ酸分析: 酢酸乾固物に6N-塩酸1mlを加え N_2 下, 110°C, 20時間水解し, アミノ酸分析用試料とする。

結 果

正常な α および β 鎖のトリプシン消化ペプチドのフィンガープリントパターンを図2a, 2bに示した。いずれのペプチドも小さなスポットとなり互いに良く分離し, 再現性もすぐれていて同定に支障はなかった。このパターンは試料塗布量0.5mgの場合であるが, 最適塗布量はトリプシン消化ペプチドの0.5~0.7mg量がよく, これより多くするとスポットの重なりやテーリングが少しみられた。

図3のa, b, cには従来法では異常鎖分取が困難であったHb Matsue-Oki (α 75Asp \rightarrow Asn)⁶⁾, Hp Ube-2 (α 68Asn \rightarrow Asp)⁷⁾ および Hb J Bangkok (β 56Gly \rightarrow Asp)³⁾のそれぞれの異常鎖のトリプシン消化ペプチドのフィンガープリントを示した。Hb Matsue-Oki および Hb Ube-2の異常な α Tp-9と α Tp-9oxはそれぞれ正常な α Tp-9と α Tp-9oxの位置の上方と下方に移動して単離されていた。またHb J Bangkokでは異常な β Tp-5と β T-5oxが正常な β Tp-5と β Tp-5oxの位置より下方に移動して分別しており, 他のペプチドスポットの位置関係とこのHbのクロマト的性質からこれらの異常ペプチドの確認は容易であ

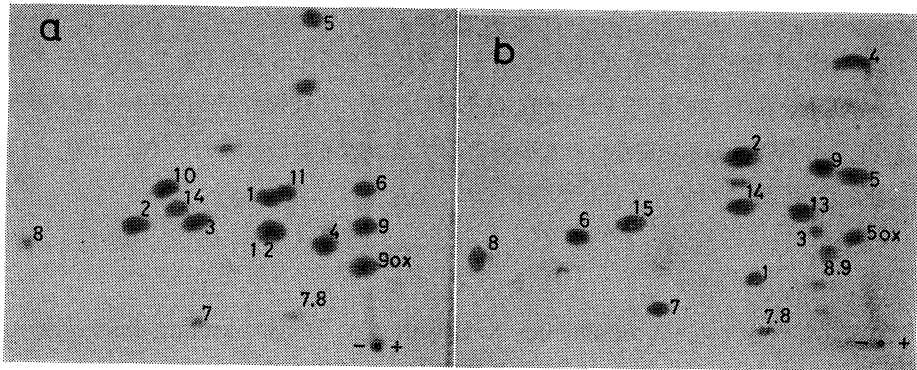


図2 正常な α および β 鎖のトリプシン消化ペプチドのフィンガープリント a: α 鎖, b: β 鎖

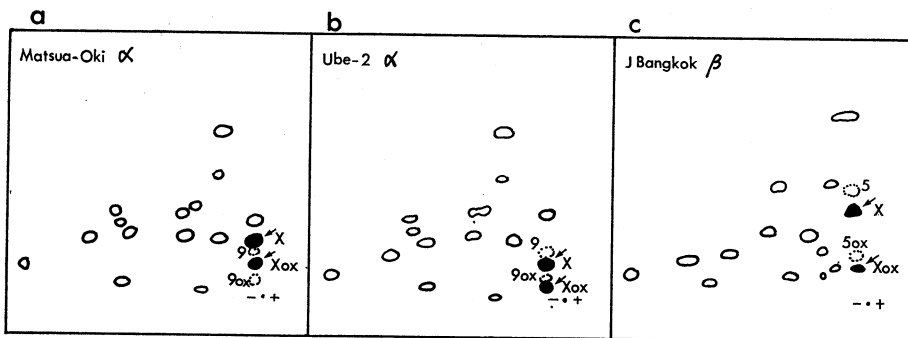


図3 異常色素の異常ペプチド鎖のトリプシン消化物のフィンガープリント, Hb Matsue-Oki および Hb Ube-2 において9と9ox スポットが消失し、かわりに異常スポットXとXoxが現われている。また Hb J Bangkok では正常な5と5ox スポットが消失し、かわりに異常スポットXとXoxが現われている。

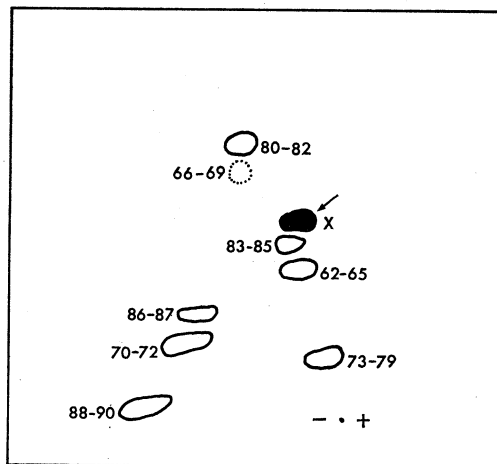


図4 Hb Ube-2 異常 α Tp-9 のサーモライシン消化ペプチドのフィンガープリント 正常なスポット(66-69)が消失し、かわりに異常スポットXが現われている

った。

図4には Hb Ube-2 の異常 α Tp-9 のサーモライシン消化ペプチドのフィンガープリントパターンを示した。異常ペプチド (66-69) は正常なペプチドに相当する位置から右下方向に現われた。Baglioni による沝紙法ではこの異常ペプチドは2個のペプチド (62-65) と (83-85) と重なり合い単一ペプチドとして分離できなかった。

考 察

これまでに報告されている Schleicher & Schüll 製や⁸⁾⁹⁾ Brinkmann Instruments製¹⁰⁾ のシリカゲル薄層プレート (20×20cm または 20×40cm) を用いたフィンガープリント法では pH 6.4 の緩衝液を用いた電気泳動が行なわれているが、私共の用いた Merck 製のシリカゲル薄層プレートでは pH 4 以上の緩衝液では泳動中プレートに多くの亀裂を生じ使用出来なかった。しかし、pH 3.5 の緩衝液では図2の様に常にスポットの小さな分離の良いフィンガープリントが得られた。しかもこの緩衝液では pH 6.4 の緩衝液の様なピリジン臭もなく使いやすい利点があった。クロマト用展開液としては Ingram⁴⁾ や Baglioni¹¹⁾ の沝紙によるフィンガープリント展開液はペプチドの上昇および分離がよくなかったので、種々の吟味を行ない、結局 Brenner ら¹²⁾ の展開液 (n-ブタノール：ピリジン：酢酸：水=30：23：3：24) を採用し、さらに組成比率を n-ブタノール：ピリジン：酢酸：水=30：30：6：12 に変更した。その結果、ペプチドの上昇も、ペプチド相互の分離も改善された。私共の pH 3.5 の緩衝液を使用するとペプチドの酸性アミノ酸 (Asp, Glu) の荷電はほとんど消失してしまうからペプチドの動きは沝紙の場合とかなり異なっていた。即ち、pH 6.4 の緩衝液での沝紙フィンガープリントでは中性分画のペプチドである α Tp-1, 4, 9, 11 および β Tp-1, 13 は原点付近で重なりも大きく、単一ペプチドとして現われない。しかしシリカゲル薄層プレートの場合、これらのペプチドは異なった移動度を示し、しかもクロマトが分離に大きく貢献し単一の分離ペプチドとなった。

沝紙フィンガープリント法では Hb Matsue-Oki や Hb Ube-2 の異常 α Tp-9 はそれぞれ Asp→Asn と Asn→Asp と荷電が異なったアミノ酸の置換であるにも拘らず巨大分子量ペプチドであるせいか正常な α Tp-9 の位置からほとんど動かず、他のスポットと重なりがあり分離されず解析が事実上出来なかったが、シリカゲル薄層プレートで図3a, 3bの様にクロマト的に単一ペプチドとして明瞭に分離し容易に解析がなし得た。また β Tp-5 の異常は沝紙法では Hb J Bangkok の如く原点右上方に横帯状に広がり確認しにくい、シリカゲル法では図3cの様に小さな濃縮されたスポットとなり容易に異常を確認し得た。また Hb Ube-2 の α Tp-9 のサーモライシン消化ペプチドの沝紙フィンガープリントでは異常ペプチドは2個のペプチド (62-65, 83-85) と重なり分離不可能であったが、シリカゲル法では図4の様にこれらのペプチドから分離する事が出来た。

フィンガープリントからのペプチドをそのままアミノ酸分析機にかける場合、沝紙法で

は4~6mgの試料量が必要であるが、シリカゲル法では1.5~2mg(即ち、シリカゲル薄層プレート3~4枚)で充分であった。しかもクロマト展開時間が滷紙法の3日間に比べ6時間で完了するので時間的にも短縮された。

このように、従来の滷紙法に比べ本法は試料量の微量化と操作時間の短縮が出来、しかも滷紙法ではペプチドの重なりのため解析が困難であった異常ペプチドの解析が本法で容易となった。その逆の場合となった例はまだない。このような理由から本法は滷紙法に代わる推奨しうる方法と思う。

References

- 1) 日高和夫, 井内岩夫, 吉田克子: 異常血色素の α 鎖および β 鎖のトリプシン消化法, ならびにフィンガープリント法による異常ペプチドの分離と同定について: 川崎医学会誌, 一般教養篇 2: 37-47, 1976.
- 2) Anson, M. L. and Mirsky, A. E.: Protein coagulation and its reversal. The preparation of insoluble globin, soluble globin. *J. Gen. Physiol.*, 13: 469-476, 1930.
- 3) Clegg, J. B., Naughton, M. A. and Weatherall, D. J.: Abnormal human hemoglobin separation and characterization of the α and β chains by chromatography and the determination of two new variants, Hb Chesapeake and Hb J Bangkok. *J. Mol. Biol.*, 19: 91-108, 1966.
- 4) Ingram, V. M.: Abnormal human hemoglobin. 1 The comparison of normal human and sickle-cell hemoglobins by "Fingerprint". *Biochim. Biophys. Acta*, 28: 529-545, 1958.
- 5) Klein, B., Sheehan, J. E. and Grunberg, E.: Use of fluorescamine ("Fluram") to detect amphetamine in urine by thin-layer chromatography. *Clin. Chem.* 20/2: 272-274, 1974.
- 6) Ohba, Y., Miyaji, T., Matsuoka, M., Takeda, I., Fukuda, Y., Shibata, S. and Ohkura, K.: Hemoglobin Matsue-Oki; alpha 75 (EF4) Aspartic acid-Asparagine. *Hemoglobin* 1: 383-388, 1977.
- 7) Miyaji, T., Iuchi, I., Yamamoto, K., Ohba, Y. and Shibata, S.: Amino acid substitution of hemoglobin Ube-2 ($\alpha_2\beta_2$ Asp β_2): An example of successful application of partial hydrolysis of peptide with 5% acetic acid. *Clin. Chim. Acta*, 16: 374-382, 1967.
- 8) Garel, M. C., Hassan, W., Coquelet, M. T., Goossens, M. and Rosa, J.: Hemoglobin J Cairo: β 65 (E9) Lys \rightarrow Gln, a new hemoglobin variant discovered in Egyptian family. *Biochim. Biophys. Acta*, 420: 97-104, 1976.
- 9) Efremov, G. D., Wilson, J. B. and Huisman, T. H. J.: The chemical heterogeneity of human hemoglobin F. Direct evidence for the existence of three types of γ chain; the γ^I , γ^T , and γ^T chains. *Biochim. Biophys. Acta*, 579: 421-431, 1979.
- 10) Jensen, M., Oski, F. A., Nathan, D. G. and Bunn, H. F.: Hemoglobin Syracuse ($\alpha_2\beta_2^{143(H21)His\rightarrow Pro}$), a new high-affinity variant detected by special electrophoretic methods. Observation the auto-oxidation of normal and variant hemoglobin. *J. Clin. Invest.*, 55: 469-477, 1975.
- 11) Baglioni, C.: An improved method for the fingerprinting of human hemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta*, 48: 392-396, 1961.

- 12) Brenner, M., Niederwieser, A. and Pataki, G.: Thin-layer chromatography. A laboratory handbook, edited by Stahl, E. p. 751-750, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1969.