

等電点分画法によるヒトヘモグロビンの基礎的研究

川崎医科大学・生化学

原野 昭雄

(昭和54年9月27日受理)

Fundamental Study on Human Hemoglobin by Use of
Isoelectric Focusing

Teruo HARANO

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School

Kurashiki 701-01, Japan

(Received on Sept 27, 1979)

ヒトの異常ヘモグロビンや異常鎖 (α または β 鎖) の検索に等電点分画法を応用するために, Ampholine を含む3種類の自作ポリアクリルアミドゲル板 (pH range : 6-9, 5-8と4-9) を調製し, その特性について調べた。

これらゲル板はヘモグロビンの研究にとって有用なものであった。

For the application of isoelectric focusing to the abnormal human hemoglobin and the abnormal chain (α or β chain) detections, three kinds of hand-made polyacrylamide gel plates (pH range : 6-9, 5-8 and 4-8) containing ampholine were prepared and their characteristics were examined.

These gel plates were useful for the study of hemoglobin.

はじめに

等電点分画法 (Isoelectric focusing ; IF 法) は多くの研究者, 特にタンパク質を研究の対象にしている生化学者やこれに関連した部門の研究者にとって重要な研究手段となりつつあり, その重要性は増大している。

I F法はキャリアーアンホライトを含むポリアクリルアミドゲル¹⁻⁴⁾, Sephadex⁵⁾ のような支持体上に pH gradient を生じさせ, 種々の等電点 (pI) をもったタンパク質をそれぞれ相当する pI 点まで電気泳動的に移動させ凝集させる方法である。この方法によれば, 種々タンパク質のpI値を測定すると同時に, 定性・定量分析⁶⁾や分離・精製⁷⁾を行うことが可能である。

ヒトヘモグロビン (Hb) は, 成人の場合その主成分である HbA ($\alpha_2\beta_2$) のほかに, 2~3%の HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$), 1%以下の HbF₁ ($\alpha_2\gamma_2$), 約5%の HbA₁ (α_2 glyco- β_2) や極く微量の HbF₁₁ (α_2 Acetyl- γ_2) が含まれている。これら種々の Hb はそれぞれ異った pI 値をもって

いる。特異な Hb としては Hb を構成するグロビン鎖 (α , β , γ , δ 鎖グロビン) のアミノ酸組成がアミノ酸置換によって異っている異常 Hb (abnormal Hb; abn Hb) が約5,000人に1人の割合で存在するといわれている。これら abn Hb のアミノ酸置換には同一の性質を有するもの間で、あるいは異種性質を有するもの間での置換が考えられるが、前者の場合には荷電的差異はなく Hb の pI 値に変動は観察されないのに反し、後者の場合には pI 値に変動がみられるはずである。

従来, abn Hb の検索には, でんぷんゲル⁸⁻¹⁰⁾, 寒天ゲル^{11,12)}, セルロースアセテート膜¹³⁻¹⁵⁾を用い, abn Hb と正常 Hb (normal Hb; nor Hb) との荷電差を利用した電気泳動法が用いられてきたが, その取り扱い方法は様々であり, abn Hb 間の絶対的比較をすることは困難であった。IF法は abn Hb の検出^{16,17)}, その特性である pI 値の測定 (異常および正常 Hb) を行うための有力な手段となると考えられる。このために3種類の pH range をもった平板ポリアクリルアミドゲルを自作し, その特性を調べるとともに, nor Hb, abn Hb に応用し, 試料状態, その保存法, また, abn Hb についての異常鎖の決定法について検討した。

材料および実験方法

溶血液: 実験に用いた正常人, abn Hb 保因者の溶血液はつぎのようにして調製した。採血された血液を0.9%食塩水で洗い, plasma, buffy coat を除いた血球1容に対し, 蒸留水2容と四塩化炭素0.5容を加え, ミキサーで十分攪拌, 溶血をさせたのち, 3,000rpm, 15分間遠心し, 血球膜成分を沈殿させた上清を溶血液として用いた。

平板ポリアクリルアミドゲルの調製: pH range 3.5~9, 5.0~8.5, 7.0~9.0の3種類の平板ポリアクリルアミドゲルの調製は LKB Produkter AB の Application Note¹⁸⁾を参考にして行った。Acrylamide monomer (30g) と N, N'-methylenebisacrylamide (Bis) (0.8g) を水に溶解して 100ml とした溶液 2.5ml, 20%蔗糖溶液 9.1ml, 蒸留水 2.5ml と Ampholine (LKB Produkter AB) を表1の如く混合し, 脱気後, 氷中で冷却し, 0.004% Riboflavin 溶液, TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine), 10% Am-

表1 各種 pH range のゲル調製・試薬の割合

pH Range	3.5-9.5	5.0-8.5	7.0-9.0
30% Acrylamide-Bis soln.	2.5ml	2.5ml	2.5ml
20% Sucrose soln.	9.1ml	9.1ml	9.1ml
Ampholine			
pH 3.5-10	0.75ml		0.15ml
pH 5-7		0.375ml	
pH 7-9		0.375ml	0.60ml
Distil. H ₂ O	2.5ml	2.5ml	2.5ml
0.004% Riboflavin soln.	50 μ l	50 μ l	50 μ l
TEMED	50 μ l	50 μ l	50 μ l
10% Ammonium persulfate soln.	50 μ l	50 μ l	50 μ l

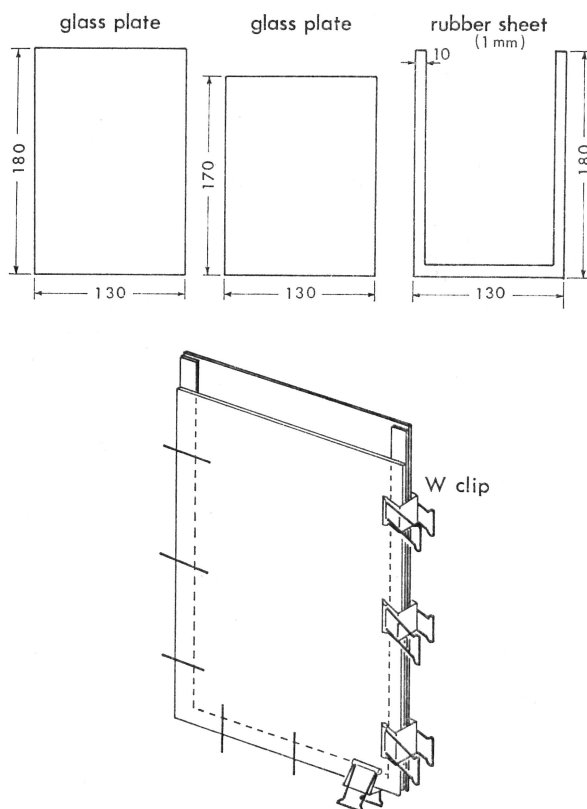
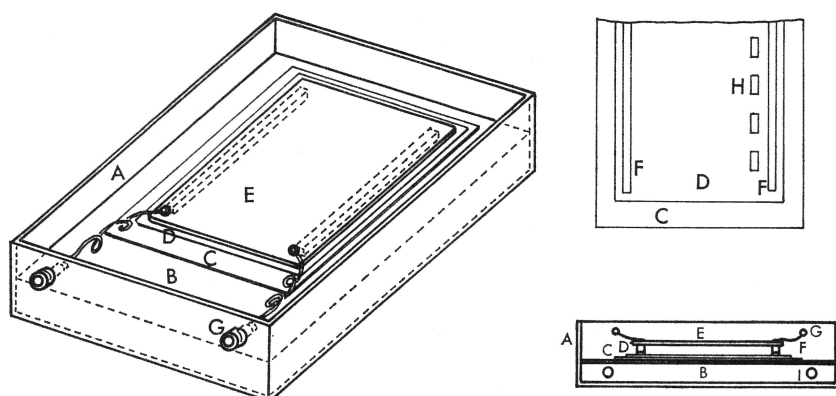


図1 ゲル調製用ガラス板とその組立て図

monium persulfate 溶液を加え, 図1の如く2枚のガラス板 (18cm×13cmと17cm×13cm) にU字型に切った生ゴムシートを狭み, Wクリップで固定したものの間に気泡が入らぬように注意しながら注ぎ込む。少量の水をゲル溶液上に重層し, 蛍光灯照射下に静置しておく。3～4時間もすれば重合は完了する。2枚のガラス板のうち一方を取りはずすと他方のガラス板上に11cm×16cm×1mmの平板ゲルができる。

溶血液の I F : 上記のように調製したゲル板の両端に厚手の口紙 (1mm×6mm×16cm) を置き, 一方に0.02Mリン酸溶液を浸み込ませ (陽極), 他方の口紙には20%エチレンジアミン溶液を浸み込ませた (陰極)。冷却可能なように設計された泳動槽に入れ, 電極板を図2の如く置き, 両極間に一定電圧200Vをかけ I Fを行った。試料の添着は口紙を適当な大きさ (トーヨー口紙 No. 2, 0.5×1cm あるいは 0.5×1.5cm) に切ったものに試料を浸み込ませ, 陰極側から1cm のところに置いた。この実験は終始冷却下 (約8°C) で行い, 通電は5～12時間行った。

ゲルの pH gradient およびヒト Hb の pH (pI) の測定 : I F後, ゲル上の pH gradient や, 分離された Hb(HbA, HbA₂, HbF) の pH(pI) の測定のためにゲルおよび分離された Hb 帯部分をカッターで切り出し, 小試験管に入れ蒸留水 (0.7ml) を加え冷蔵庫中に1夜保



- | | | |
|------------|-------------|-----------|
| A 泳動槽 | D アクリルアミドゲル | G 電源ターミナル |
| B 泳動槽冷却部 | E 電極板 | H 試料添付口紙 |
| C ゲル保持ガラス板 | F 電極口紙 | I 冷却水出入口 |

図2 等電点分画用装置

存し、pH メーターでそれぞれの pH を測定した。

一酸化炭素 Hb (CO Hb) の p-メルクリベンゾエート (PMB) 化 : CO Hb の PMB 化は Rosemeyer と Huehns の方法¹⁹⁾を少し改変して行った。40 μ l の CO Hb を小試験管にとり、リン酸緩衝液 (μ : 0.2, pH 5.9) 35 μ l, ついで 2 M 食塩水 15 μ l を加えよく混和したのち、約 1 g/dl に調製した PCMB (p-chloromercuribenzoic acid) 溶液 20 μ l を加え、ゴム栓をし、一酸化炭素で試験管内を満し、冷蔵庫 (4°C) 中に 4~6 時間放置した。この反応液を上記 Hb の I F と同様にゲル板 (pH range 3~9) に添着し、通電し、PMB- α ヘモグロビンと PMB- β ヘモグロビンにそれぞれ分離を行った。

結果と考察

ゲル板上の pH gradient について : Ampholine を含むゲル板間 (11 cm) に 200 V の一定電圧を通ずると、含有 Ampholine の種類によって異なるが、最初かなりの高電流が流れる。しかし、時間の経過とともに電流値は低下し、2 時間後にはほとんど一定の低電流値を示すようになった (図 3)。5~12 時間後のこの値は 2~3 mA であった。ゲル板上陽極-陰極間を 1 cm 間隔 (長さ 1 cm) に切りとり小試験管に入れ、一定量 (0.7 ml) の蒸留水を加えて、冷室内で含有 Ampholine を十分溶出させたのち pH メーターでそれぞれの pH を測定すると、目的とする pH range に相当する pH gradient がゲル上陽極-陰極間に生じていることがわかった (図 3)。pH range 7~9 の場合では、実際のゲル上の pH gradient は 6~9 であり、pH range 5~8.5 では 5.5~8.0, pH pH range 3.5~9.5 では 4~9 の pH gradient であった。この gradient はかなり安定なものであり、数時間放置してもほとんど変化はみられない。pH gradient の生成の具合は電極液の種類^{20, 21)}や pH を測定するときの

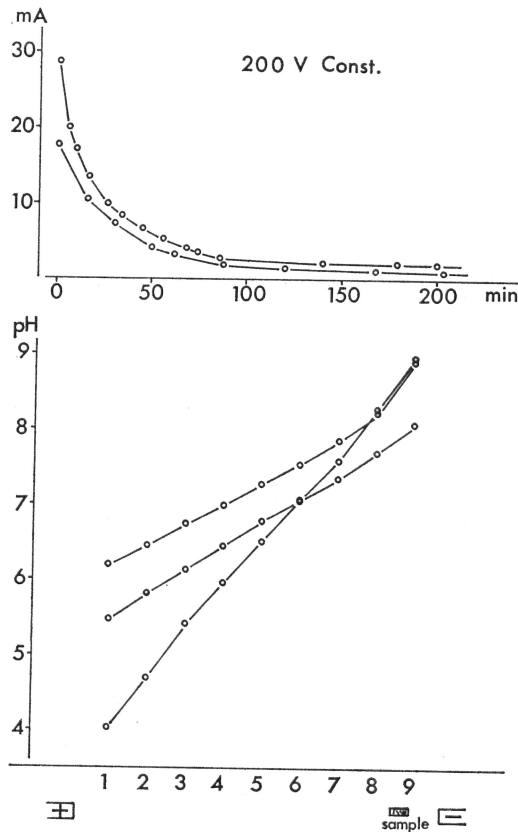


図3 等電点分画時の電流変化とゲル上の pH gradient

温度^{21,22})にも可成り影響される。ここで用いている電極液 (リン酸およびエチレンジアミン溶液) はこれら pH range をもったゲル板に対して適正なものであったといえる。pH range 7~9に調製したゲル板上の pH 7付近の部分について pH-温度の関係を調べると、pHの測定温度上昇にともなって pH は直線的に低下し、 $\Delta\text{pH}/^\circ\text{C} = -0.013$ の値を示した (図4)。同様、このゲル板 (pH range 7~9) 上の全 pH を 25°C と 37°C において測定すると図の如く 37°C で全体的に pH は低目を示し、全範囲において先の $\Delta\text{pH}/^\circ\text{C}$ の値を満足するものであった。この差は I F 後、タンパク質の真の pI 値を求めるときの問題点となり、正確な pI 値を求めるには I F 時と同一の温度でそれを表わすか、またはある一定温度 (例えば 37°C) で測定、あるいはこの温度での値に補正するかの操作が必要である。

Hb の IF と pI 値 : Hb の pI 値は大体 7 付近にある。pH range 7~9 (実際は pH range 6~9 となっている) のゲル板を調製し、Hb の I F を行うと図5のような泳動縞が得られる。陰極側から HbA₂, met HbA, half-met HbA, HbF_I, HbA と HbF_{II} の順序となる。met HbA と half-met HbA の泳動縞は新鮮な血液から得た溶血液ではほとんど観察することはできない。しかし、溶血液の貯蔵期間 (たとえ 4°C の冷室においても) が長くなる

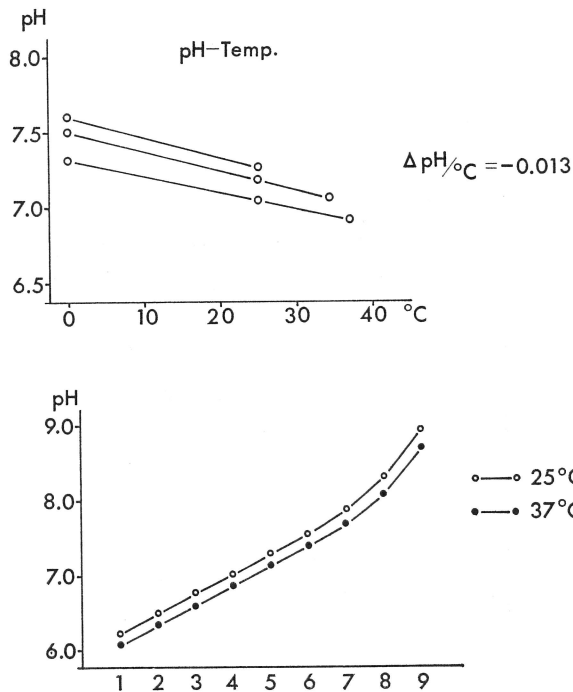


図4 ゲル上の pH と測定温度との関係

と、これらの縞は強く現われるようになるとともに HbA より陽極側に新しく強い縞を生ずるようになる。正常成人血液に含まれる数%の Hb A_{1a-c} も HbA より陽極に泳動縞を生ずると予想されるが、この縞がこれに相当するか否かは疑問であり、貯蔵による Hb の副産物 (aging band) と考えた方が妥当のようである¹⁷⁾。臍帯血液の場合は短期の貯蔵でも met HbA に相当する位置および HbA₂ より陰極側にかっ色を帯びた泳動縞を生ずるが、臍帯血液は変化を受け易い

(血球中に heinz body を生じ易い) ことから met HbF あるいは half-met HbF による縞であろう。また、この場合 HbA と接近した位置に縞が現われ、あたかも HbA が 2 本に分裂したかのように見える。陽極側の縞は HbF_I ($\alpha_2\gamma_2$) の r 鎖グロビンの N 末端アミノ酸がアセチル化を受けた HbF_{II} (α_2 Acety- r_2) によるものである¹⁷⁾。この図 5 中に見られる HbA の酸化体 (met HbA, half-met HbA) は KCN 処理することにより消滅する。すなわち、CN-met HbA は HbA と同一の pI 値をもつものと思われる。各種 Hb: HbA₂, HbF, HbA, met HbA と CN-met HbA の測定された pI 値を表 2 に示す。

表 2 各種ヘモグロビンの pI 値 (37°C)

Hbs	pI
Hb A	6.95
Hb F	7.02
Hb A ₂	7.25
metHb A	7.15
CN-metHb A	6.95

Hb を長期間保存するときは、冷室 (4°C) 中で少量の KCN を加えておけば、腐敗を防ぐとともに貯蔵副産物である met-Hb や half-met Hb の生成²²⁾を押えるために有効である

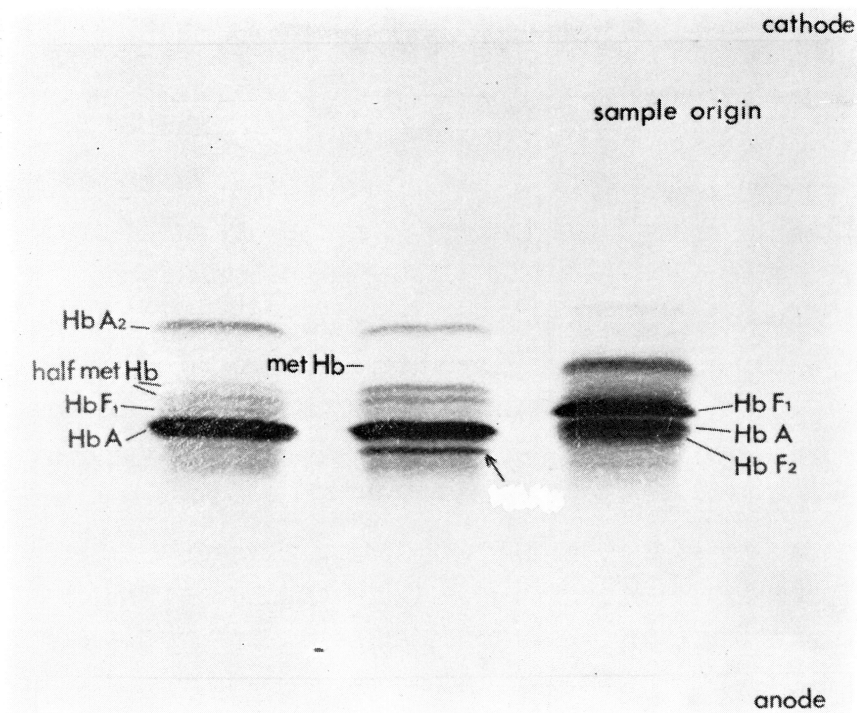


図5 正常人と臍帯血の等電点分画 (pH range 6-9)
 右: 臍帯血, 中: 保存血, 左: 新鮮血
 ↙: aging band

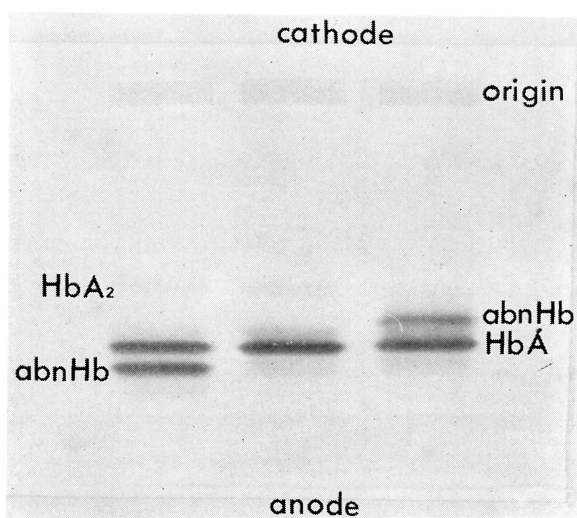


図6 ヘモグロビンの等電点分画 (pH range : 6-9)
 右: slow-moving abn Hb
 中: 正常ヘモグロビン
 左: fast-moving abn Hb

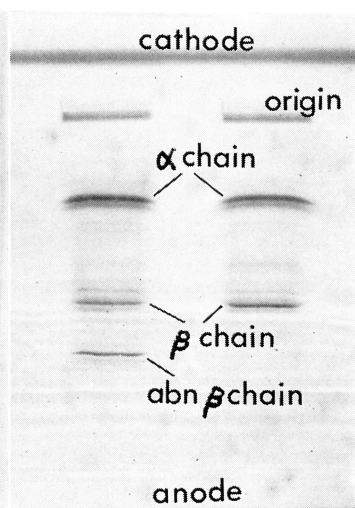


図7 ヘモグロビンの鎖解裂 (pH range : 4-9)

う。

nor Hb に対し, abn Hb を含む血液の I F は図 6 のような泳動パターンを示す。Hb の構成グロビン鎖中のアミノ酸組成・配列がアミノ酸置換によって異った abn Hb では HbA とは異った pI 値を示すようになる^{16,17)}。従来の方法 (例えばセルロースアセテート膜電気泳動法) で fast-moving abn Hb といわれるものは I F 法では HbA より陽極側に, 逆に slow-moving abn Hb では陰極側に新しく縞を生ずる。この abn Hb による新しい縞の位置 (pI 値) はアミノ酸置換の結果生じた荷電差, あるいは置換位置による荷電差の影響の度合によって決まると予想される。abn Hb の pI 値を測定したもので Hb G Taichung (α 74 Asp \rightarrow His)²³⁾ は pI=7.08, Hb Hoshida (β 43 Glu \rightarrow Gln)²⁴⁾ は pI=7.08 であった。前者の abn Hb では酸性アミノ酸 (Asp) が塩基性アミノ酸 (His) に置換された二荷電差を生じているのに, 後者では酸性 (Glu) \rightarrow 中性アミノ酸 (Gln) 置換の一荷電差であるが, これら abn Hb の pI 値 (移動度) は全く同一のものであった。

I F 法によるタンパク質の分離は再現性が非常によく, タンパク質の特性を決める pI 値の測定が可能であるという特長をもつが, pI 値の測定には温度差による影響が大きく, 真の pI 値を求めることは非常に困難である。Hb の研究の場合には正常成人やヘテロ接合体では, 必ず HbA₂, HbA を含んでいる (例外として HbSC Disease, β^0 -thalassemia) ため HbA₂-HbA 間の移動度を基準尺度として他の種々 Hb, abn Hb の移動度を示そうとする動きがあり¹⁷⁾, この表現法が実用的であり望ましいものと思われる。

PMB 化 Hb の IF: 一酸化炭素化された Hb(CO Hb) は弱酸性媒体中で PCMB と反応し, Hb 構成グロビン鎖 (α および β 鎖) にそれぞれ分裂する。この実験では反応時間が約 5 時間と短時間で行っているので HbF($\alpha_2\gamma_2$) の α と γ 鎖部分への解裂はほとんど起こらず, HbF(pI=7.02) の位置に未反応物として残る¹⁹⁾。HbA は PMB 化されると容易に解裂し, pI=7.3 と pI=6.0 付近に強い縞を生ずる²⁵⁾ (図 7)。この 2 本の縞の間に何本かの弱い縞が観察されるが, 先の未反応 HbF, 未反応として残った HbA のほかに HbA₂($\alpha_2\delta_2$) の解裂体がこれらに含まれる。しかし, HbA₂ の含量は少なく, 解裂体 PMB- δ 鎖の同定は行えなかった。fast-moving abn Hb を含む溶血液の PCMB 処理後の I F は図の如く, nor Hb に比べ, 酸性 (陽極) 側に新しい強い縞を生じている。すなわち, この abn Hb は β 鎖に異常をもったものと考えられ, グロビンのセルロースアセテート膜電気泳動法でも同様の結果が得られた。この abn Hb は高濃度 (HbA と同程度) に含有された溶血液を PCMB で処理したもので, 異常鎖を確認することが容易であるが低含量の場合であれば, abn Hb をカラムクロマト法²⁶⁾やセルロースアセテート膜電気泳動法によって単離・精製後, この反応を行い異常鎖決定を行うことが望ましい。

Ampholine を含むポリアクリルアミドゲル板を自作し, それらの特性を調べ, ヒト Hb への応用を試みた。I F 法はタンパク質の分離能, その再現性も非常によく, 特に Hb のような着色タンパク質では分離状態を視覚的に観察しながら実験を進めることが可能である。最近

の I F 法のタンパク質生化学分野への進出はめざましく、この方法による分離・精製のため支持体を Sephadex^{5,27)} に変えたり、試料添着法を工夫²⁸⁾ したり、また、僅少差 pI 値をもったものの分離法の開発²⁹⁾ など日々発展しつつある。ヒト Hb と他の哺乳動物 Hb の間にも pI 差があり³⁰⁾、法医学の面での応用価値もあるものと思われる。

文 献

- 1) R. F. Riley and M. M. Colemann, *J. Lab. Clin. Med.*, **72**, 714 (1968)
- 2) C. W. Wrigley, *J. Chromatogr.*, **36**, 362 (1968)
- 3) J. S. Fawcett, *FEBS Lett.*, **1**, 81 (1968)
- 4) D. H. Leakack and A. C. Rutter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **32**, 447 (1968)
- 5) B. Radola, *Biochem. Biophys. Acta*, **295**, 412 (1973)
- 6) T. Harano, S. Ueda, I. Iuchi and S. Shibata, *Kawasaki Med. J.*, **4**, 139 (1978)
- 7) 原野昭雄, 原野恵子, 上田智, 川崎医誌, **5**, 1 (1979)
- 8) 山岡宏太郎, 太田善郎, 清田正司, 臨床血液, **13**, 800 (1972)
- 9) R. L. Engle, A. Maskey, J. H. Pert and K. R. Woods, *Clin. Chim. Acta*, **6**, 136 (1961)
- 10) J. A. Owen and C. Got, *Clin. Chim. Acta*, **2**, 588 (1957)
- 11) S. Shibata and I. Iuchi, *Proceedings of the VII Ith International Congress of Hematology*, 1239, Tokyo (1960)
- 12) R. T. Weine, *Clin. Chim. Acta*, **4**, 317 (1959)
- 13) D. L. Rosenbaum, *Am. J. Med. Sci.*, **252**, 726 (1960)
- 14) T. Kohn, *J. Clin. Path.*, **22**, 109 (1969)
- 15) A. J. Griogio, *Clin. Chim. Acta*, **27**, 362 (1970)
- 16) T. Harano, I. Iuchi and S. Shibata, *Kawasaki Med. J.*, **4**, 53 (1978)
- 17) P. Basset, Y. Beuzard, M. C. Garel and J. Rosa, *Blood*, **51**, 971 (1978)
- 18) C. Karisson, H. Davies, J. Ohman and U. Andersson, *LKB Application Note*, **75** (1973)
- 19) M. A. Rosemeyer and E. R. Huehns, *J. Mol. Biol.*, **25**, 253 (1967)
- 20) N. Y. Nguyen and A. Chrambach, *Anal. Biochem.*, **82**, 54 (1977)
- 21) W. J. Gelsema and C. L. DeLingny, *J. Chromatogr.*, **130**, 41 (1977)
- 22) J. A. Koepke, J. F. Thoma and R. M. Schmidt, *Clin. Chem.*, **21**, 1953 (1975)
- 23) I. Iuchi, K. Hidaka, S. Ueda and S. Shibata, *Hemoglobin*, **2**, 79 (1978)
- 24) I. Iuchi, S. Ueda, K. Hidaka and S. Shibata, *Hemoglobin*, **2**, 235 (1978)
- 25) T. Harano, S. Ueda and Shibata, *Kawasaki Med. J.*, **4**, 65 (1978)
- 26) T. H. J. Huisman and J. H. P. Jonxis, *The Hemoglobinopathies. Techniques of identification*, *Clin. Biochem. Anal.*, Vol. 6, 124, Marcel Dekker Inc., New York and Basel, 1977
- 27) A. Winter, H. Perlmutter and H. Davies, *LKB Application Note* No. 198
- 28) J. C. Chuat and C. Pilon, *Anal. Biochem.*, **82**, 258 (1977)
- 29) M. L. Caspers, Y. Posey and R. K. Brown, *Anal. Biochem.*, **79**, 166 (1977)
- 30) J. W. Drysdale, P. Righetti and H. F. Bunn, *Biochem. Biophys. Acta*, **229**, 42 (1971)