

キャピラリー電気泳動法によるたんぱく質の分析

村瀬 佑一*, 平元 秀和*, 甲田 正人*

Analysis of Protein by Capillary Electrophoresis

Yuichi MURASE*, Hidekazu HIRAMOTO*, Masahito KOTA*

*Osaka Customs Laboratory 4-11-28, Nankohigashi, Suminoe-ku, Osaka 559-0031 Japan

In Japan Customs laboratories, SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) is generally carried out for qualitative analysis of proteins. In this study, we analyzed proteins by Capillary Electrophoresis (CE) with UV detection and by SDS-PAGE, and compared their measured data. As a result, it was found that, in addition to the identification of proteins, CE could detect individual differences within the same kinds of proteins and is effective for analysis of protein mixtures.

1. 緒 言

たんぱく質は、牛乳、卵、あるいは大豆などから抽出又は分離して得られるが、関税率表上の所属は、その原料や分離された成分により異なる。例えば、ミルク由来のたんぱく質であるカゼインは、第3501.10号に分類されるが、同じミルク由来のたんぱく質であるミルクアルブミンは、第3502.20号に分類され、関税率も異なることから、たんぱく質の成分や混合の有無を調べることは重要である。たんぱく質の同定を行う方法として、税関では、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（以下「SDS-PAGE」という。）を用いている。

SDS-PAGEは、たんぱく質をゲルの分子ふるい効果によって、分子量に基づいた大きさごとに分離後、たんぱく質を染色し、可視化した泳動像を比較することでたんぱく質の同定を行う分析方法であり、広くたんぱく質の分析に用いられる方法である。¹⁾しかし、SDS-PAGEでは、泳動と染色及び脱色を分けて行う必要があるなど、操作が煩雑である。

SDS-PAGEと同様の原理を用いた分析方法に、キャピラリー電気泳動法（以下「CE」という。）がある。CEによるたんぱく質の分析も、キャピラリー内を電気的に泳動させたたんぱく質を、分子ふるい効果を用いて分離を行うものである。²⁾CEによるたんぱく質の検出は、キャピラリーの検出部にて紫外外部吸収により行うため、泳動像の確認に染色を行う必要がない。さらに、SDS-PAGEと比較して、分離能の向上³⁾や、泳動時間と吸光度の二つの情報を数値化したエレクトロフェログラムとして得られることから、より詳細な分析が期待できる有用な分析方法である。また、CEでは、キャピラリー内にゲルではなく、高分子ポリマー溶液を泳動液として充填した場合でもたんぱく質を分離可能であることが報告されている⁴⁾。キャピラリーの泳動液の充填や洗浄の自動化

は容易であるため、CEは、連続分析や全工程の自動化が可能であり、装置の操作性の面で、SDS-PAGEと比較して非常に有利である。

そこで、本研究においては、CEによるたんぱく質の分析についてSDS-PAGEと比較して検討を行った。

2. 実 験

2.1 試薬

2.1.1 標準たんぱく質

ミルクアルブミン ((1)MP Biomedicals, (2)東京化成工業)
 β-ラクトグロブリン (シグマ-アルドリッヂ)
 カゼイン (キシダ化学)
 卵アルブミン ((1)和光純薬工業, (2)東京化成工業)
 大豆たんぱく質(1) (和光純薬工業)

2.1.2 市販品

ホエイプロテイン
 脱脂粉乳
 大豆たんぱく質(2)

2.1.3 輸入品

脱脂粉乳
 大豆たんぱく質分離物
 ミルクアルブミン(3)

2.1.4 その他試薬

2-メルカプトエタノール (キシダ化学)
 ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) (ナカライトスク)
 塩酸 (塩化水素 35%) (キシダ化学)
 トリスヒドロトキシメチルアミノメタン (和光純薬工業)
 グリセリン (キシダ化学)

酢酸 (キシダ化学)
 メタノール (キシダ化学)
 SDS-MW Analysis Kit (ベックマン・コールター)
 PhastGel Homogenous20 (GE ヘルスケア)
 PhastGel Buffer Strips (GE ヘルスケア)
 PhastGel Blue R (GE ヘルスケア)

2.2 分析装置及び測定条件

2.2.1 キャビラリー電気泳動法

装置 : Agilent7100 (Agilent)

条件 :

キャビラリー : 75 μ mI.D., T.L.33 cm, E.L.24 cm (Agilent)
 キャビラリー温度 : 25°C
 試料導入方法 : 電気の導入法 (-5 kV, 12 sec)
 印加電圧 : -15 kV
 測定波長 : 215 nm
 泳動用バッファー : SDS-MW Analysis Kit 付属泳動用バッファー
 サンプル調製用バッファー : SDS-MW Analysis Kit 付属サンプル調製用バッファー

2.2.2 SDS ポリアクリルアミド電気泳動法

装置 : PhastSystem (GE ヘルスケア)

条件 :

泳動用ゲル : PhastGel Homogenous20
 バッファーストリップ : PhastGel Buffer Strips
 ゲル温度 : 15 °C
 印加電圧 : -250 V
 泳動時間 : 30 分
 サンプル調製用バッファー : 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH6.8, SDS 1%, メルカプトエタノール 1%, グリセリン 20%) 上記試薬を用いて調製したもの
 染色液 : メタノール:酢酸:水 = 3:1:6, PhastGel Blue R
 洗浄液 : メタノール:酢酸:水 = 3:1:6
 保護液 : グリセリン:酢酸:水 = 5:10:85

2.3 実験方法

2.3.1 各種標準たんぱく質の分析

2.3.1(1) SDS-PAGE によるたんぱく質の分析

たんぱく質の濃度が約 6 mg/mL になるように標準たんぱく質 (ミルクアルブミン(1), カゼイン, 卵アルブミン(1)及び大豆たんぱく質(1)) をバイアルに採取し, サンプル調製用バッファー 1 mL 加えた. その後, 沸騰水浴中で 5 分間加熱後, 流水で 5 分間冷却した. 試料を SDS-PAGE で測定し, 電気泳動図を解析した.

2.3.1(2) CE によるたんぱく質の分析

たんぱく質の濃度が約 4 mg/mL になるように標準たんぱく質 (ミルクアルブミン(1), カゼイン, 卵アルブミン(1)及び大豆たんぱく質(1)) をバイアルに採取し, サンプル調製用バッファー 475 μ L 及び 2-メルカプトエタノール 25 μ L 加えた. その後, 沸騰水浴

中で 5 分間加熱後, 流水で 5 分間冷却した. 試料を CE で測定し, エレクトロフェログラムを解析した.

2.3.2 CE によるたんぱく質の同定

2.3.1(1)及び 2.3.1(2)と同様に標準たんぱく質, 市販品, 輸入品について SDS-PAGE 及び CE で測定し, バンドパターンとピークパターンを 2.3.1 (2)の結果と比較することでたんぱく質の同定が可能か検討した.

2.3.3 ミルクたんぱく質の混合物の分析

ミルクアルブミン(1)とカゼインを様々な比率で混合した試料を用意し, 2.3.1(1)及び 2.3.1(2)と同様の方法で調製した後, 各々を SDS-PAGE と CE で測定し, 混合の有無又は混合比の測定が可能か検討を行った.

3. 結果及び考察

3.1 標準たんぱく質の分析

標準たんぱく質 (ミルクアルブミン(1), カゼイン, 卵アルブミン(1)及び大豆たんぱく質(1)) の SDS-PAGE による分析結果と CE による分析結果を Fig.1 及び Fig.2 に示す.

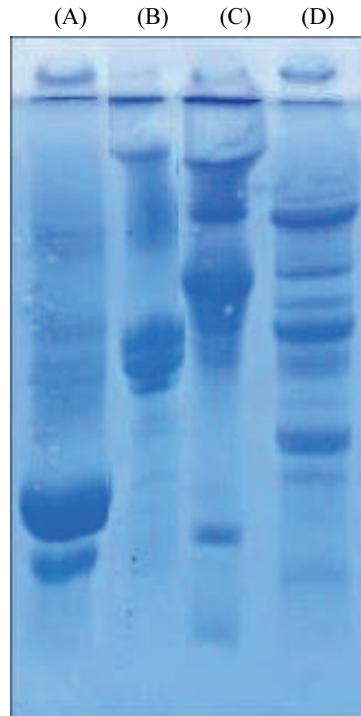


Fig. 1 SDS-PAGE electropherograms of Standard Reagents
 (A) Milk Albumin (1), (B) Casein, (C) Egg Albumin (1), (D) Soy Protein (1)

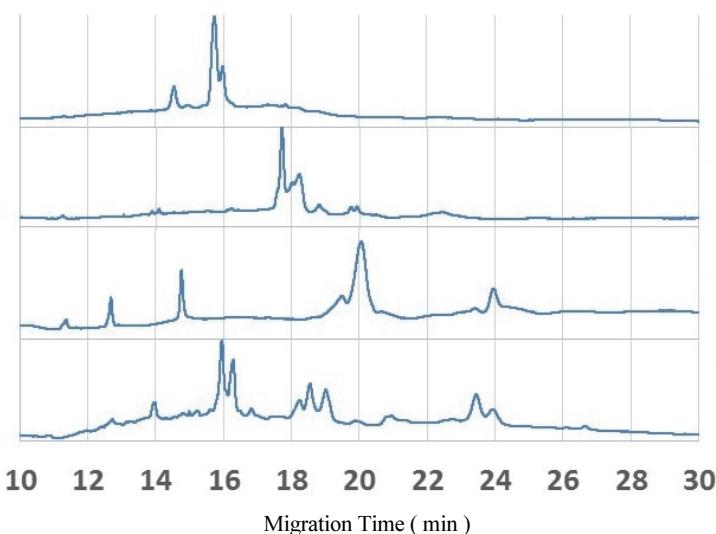


Fig. 2 CE electropherograms of Standard Reagents
(A) Milk Albumin (1), (B) Casein, (C) Egg Albumin (1), (D) Soy protein (1)

SDS-PAGE の電気泳動図では、各種たんぱく質ごとに固有のバンドパターンを持っており、分析試料を同じ条件で分析し、これらのバンドパターンと比較することで、たんぱく質の同定を行っている。

CE のエレクトロフェログラムでは、近接した複数のピークをピーク群としてグループ化すると、ピーク又はピーク群を検出するのは、ミルクアルブミンでは14分付近及び16分付近の2箇所、カゼインでは18分付近に1箇所、卵アルブミンは13分付近、15分付近、20分付近、24分付近に4箇所、大豆たんぱく質分離物では14分付近、16分付近、19分付近、23分付近に4箇所となっており、たんぱく質の種類により異なるピークパターンを示すエレクトロフェログラムを得た。このピークパターンを SDS-PAGE によるバンドパターンと比較したところ、それぞれのピーク及びバンドは明確な対応関係にはないものの、その分離パターンには類似性が認められた。

3.2 CE によるたんぱく質の同定

各試料の SDS-PAGE による分析結果及び CE による分析結果を Fig.3 及び Fig.4 に示す。

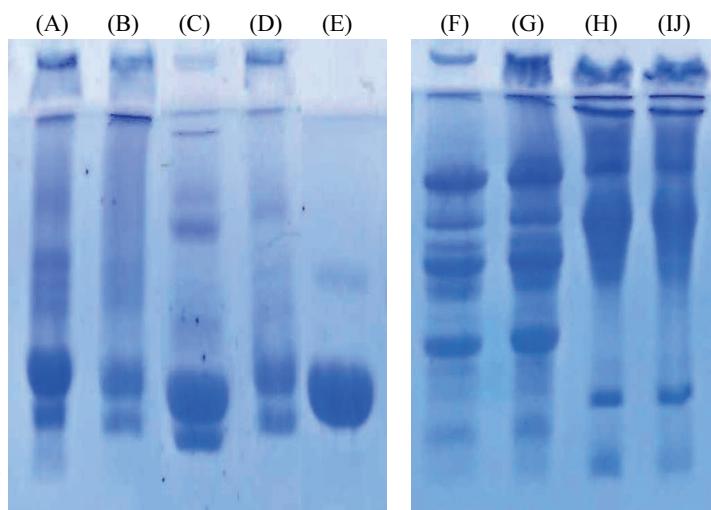


Fig. 3 SDS-PAGE electropherograms of Standard Reagents, Commercial Products and Imported goods
(A) Milk Albumin (1), (B) Milk Albumin (1), (C) Milk Albumin (3), (D) Whey Protein, (E) β -Lactoglobulin, (F) Soy Protein (1), (G) Soy Protein Isolate, (H) Egg Albumin (1), (I) Egg Albumin (2)

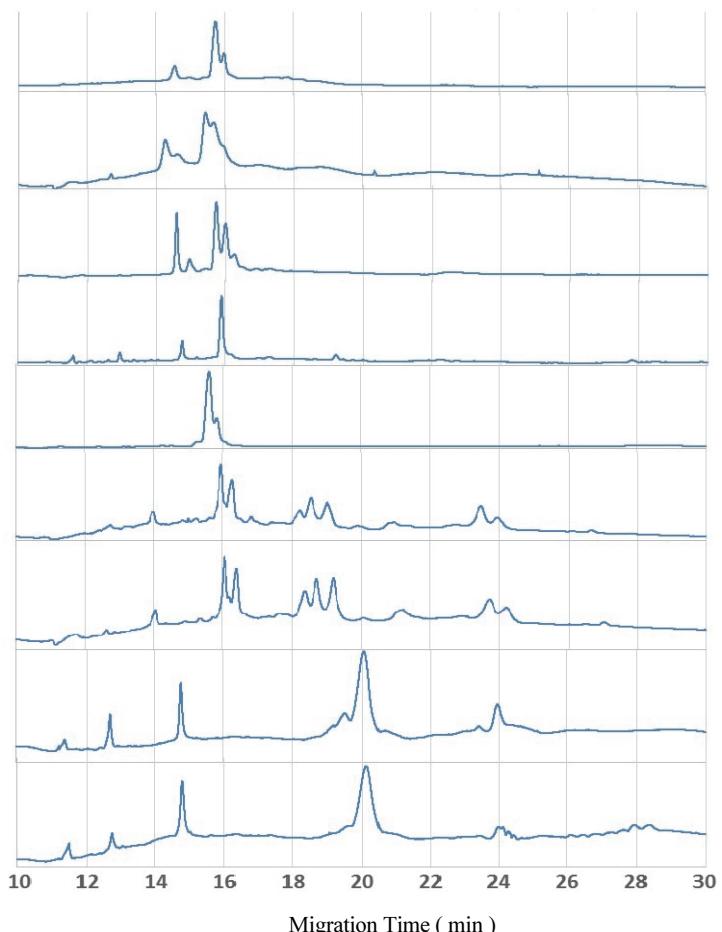


Fig. 4 CE electropherograms of Standard Reagents, Commercial Products and Imported goods
(A) Milk Albumin (1), (B) Milk Albumin (2), (C) Milk Albumin (3), (D) Whey Protein, (E) β -Lactoglobulin, (F) Soy Protein (1), (G) Soy Protein Isolate, (H) Egg Albumin (1), (I) Egg Albumin (2)

SDS-PAGE 及び CE のいずれにおいても、同種のたんぱく質では、類似のバンドパターン及びピークパターンを得た。このことから、CE は、SDS-PAGE と同様に、同条件で分析した標準品とエレクトロフェログラムのピークパターンを比較することで、たんぱく質の同定は可能であると考えられる。

また、Fig.5 に示すとおり、ミルクアルブミン(1)～(3)のエレクトロフェログラムは、14.5 分付近及び 15.5 分付近にピーク群を検出するが、各ピーク群のピークパターンを比較すると、試料ごとに異なっており、ミクロなレベルでは同種のたんぱく質において個体間の差異が認められた。一方、Fig.3 の電気泳動像(A)～(C)が示すとおり、SDS-PAGE 分析では、ミルクアルブミン(1)～(3)について、上記の CE のピーク群に対応するバンド間に明確な差異は認められなかった。

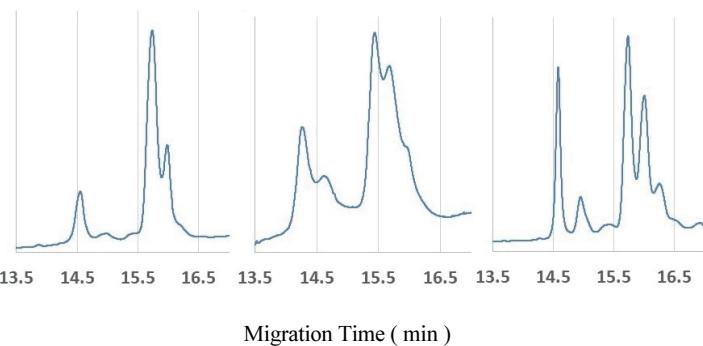


Fig. 5 CE electropherograms of Milk Albumin (Expanded Fig. 4-(A), (B) and (C))
(A) Milk Albumin (1), (B) Milk Albumin (2), (C) Milk Albumin (3)

SDS-PAGE ではバンドの移動度とその濃淡を情報として得ることができるが、CE では泳動時間と吸光度の情報を数値化したエレクトロフェログラムとして得ることができる。また、CE は、キャビラリーを用いることで泳動距離が長くなり、分離能が向上している。そのため、同種のたんぱく質においても、その成分比の違いが各ピーク群間におけるピークパターンの違いとなって表されたと考えられる。このような試料間の個体差は卵アルブミンにおいても見られた (Fig.6) が、大豆たんぱく質については、3 種類の異なる販売形態のものについて、ピークパターンの大きな違いは認められなかった (Fig.7)。

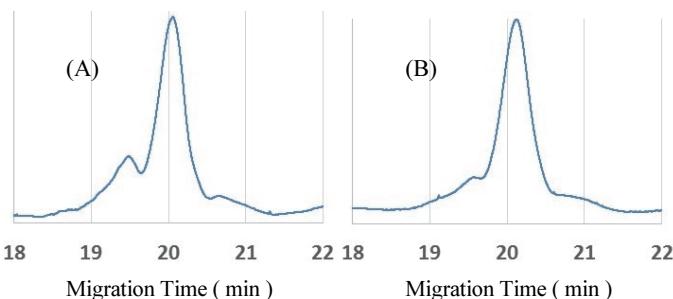


Fig. 6 CE electropherograms of Egg Albumins (Expanded Fig. 4-(H) and (I))
(A) Egg Albumin (1), (B) Egg Albumin (2)

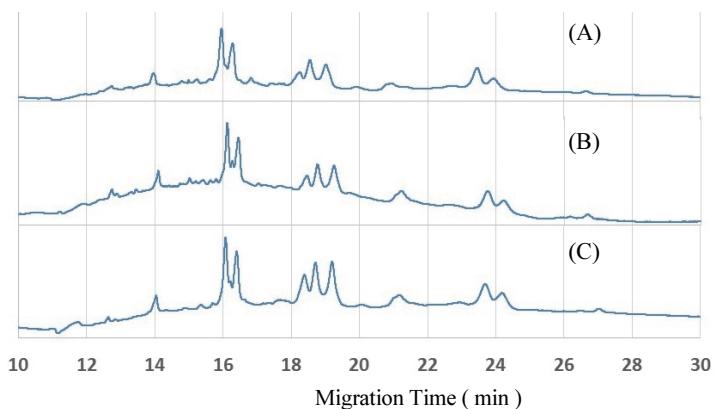


Fig. 7 CE electropherograms of Soy Protein products
(A) Soy Protein (1), (B) Soy Protein Isolate, (C) Soy Protein (2)

3.3 ミルクたんぱく質の混合物の分析

ミルクアルブミン(1)とカゼインを種々の割合で混合したものについて、SDS-PAGE 及び CE で分離した結果を Fig.8 及び Fig.9 に示す。

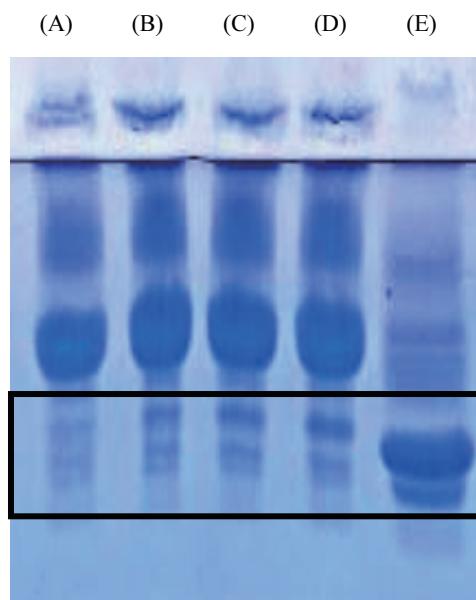


Fig. 8 SDS-PAGE electropherograms of Milk protein mixtures
(A) Casein 100%, (B) Milk Albumin (1) 2% + Casein 98%, (C) Milk Albumin (1) 4% + Casein 96%, (D) Milk Albumin (1) 6% + Casein 94%, (E) Milk Albumin (1) 100%

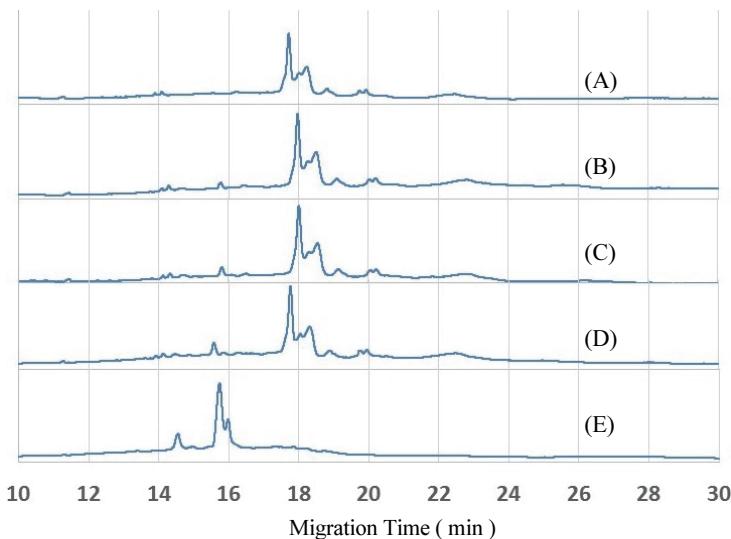


Fig. 9 CE electropherograms of milk protein mixtures
(A) Casein 100%, (B) Milk Albumin (1) 2% + Casein 98%, (C) Milk Albumin (1) 4% + Casein 96%, (D) Milk Albumin (1) 6% + Casein 94%, (E) Milk Albumin (1) 100%

カゼインにミルクアルブミン(1)を加えると、Fig.8 の枠内部分にミルクアルブミン(1)の混合割合の応じた濃さのバンドが現れた。Fig.8 の電気泳動像(E)が示すとおり、ミルクアルブミン(1)はこの位置に濃いバンドを持っていることから、ミルクアルブミン(1)の添加により、それに由来するバンドが現れたものと考えられる。しかし、カゼイン単体においても、同位置において僅かにバンドが確認されるため、ミルクアルブミン(1)の比率がごく少量の場合には、SDS-PAGE によりミルクアルブミン(1)の混合の有無を、判断することは難しいと考えられる。CEにおいても、Fig.9 の 16 分付近のピークに同様の傾向が観測された。

上記のミルクたんぱく質混合物のエレクトロフェログラム (Fig.9) を詳細に解析するために、13 分から 20 分付近を拡大したものを Fig.10 に示す。カゼイン単体 (Fig.10 の(A)) では、P1 及び P4 に 2 つのピーク群を確認できた。カゼインにミルクアルブミン(1)を加えた Fig.10 の(B)～(D)では、新たに P2 及び P3 に 2 つのピーク群が現れ、これらのピーク群は、ミルクアルブミン(1)の割合が増えるにつれて強度が強くなっている。ミルクアルブミン(1)単体 (Fig.10 の(E)) では、P2 及び P3 にのみ、ピーク群が確認された。このことから、P1 及び P4 に現れるピーク群は、カゼイン由来であり、P2 及び P3 に現れるピーク群は、ミルクアルブミン(1)由来であると考えられる。



Fig. 10 CE electropherograms of milk protein mixtures (Expanded Fig. 9; migration time, approx. from 13 min. to 20 min.)
(A) Casein 100%, (B) Milk Albumin (1) 2% + Casein 98%, (C) Milk Albumin (1) 4% + Casein 96%, (D) Milk Albumin (1) 6% + Casein 94%, (E) Milk Albumin (1) 100%

以上より、カゼイン中のミルクアルブミンの混合の有無については、SDS-PAGE での判別が難しい場合においても、CE により判別できる可能性があると考えられる。同様に、他のたんぱく質についても、SDS-PAGE に比して高い分離能を有する CE は、検出したピークの詳細な検討が可能であり、たんぱく質の混合物の分析に有効であると考えられる。

4. 要 約

本研究では、CE によりたんぱく質の同定が可能か検討した。CE では SDS-PAGE と同様にたんぱく質の同定が可能であり、たんぱく質の種類によっては、同種のたんぱく質における個体間の差異も検出が可能であった。

ミルクたんぱく質の混合物の分析において、各成分に由来するピークを詳細に検討することで混合の有無を判別することが可能であり、様々なたんぱく質の混合物の分析においても CE は有効であると考えられる。

(謝 辞)

本研究に当たって、試料を提供していただいた神戸税関業務部分析部門に厚く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 松本 清：“食品分析学 機器分析から応用まで”，P.71 (2006), (培風館).
- 2) Zaifang Zhu, Joann J. Lu, Shaorong Liu : *Anal Chim Acta*, 21, 709(2012)
- 3) 本田 進, 寺部 茂：“キャビラリー電気泳動 基礎と実際” , P.45 (1995), (講談社).
- 4) David N. Heiger : “キャビラリー電気泳動 入門”, P.63 (1992), (横河アナリティカルシステムズ株式会社) .