

ミオシン重鎖分離のための電気泳動条件

和田正信*・土路恭子**・新畑茂充*・菊地邦雄*

* 広島大学総合科学部健康科学グループ・

** 広島大学大学院生物圏科学研究科

Electrophoretic Condition for Separation of Myosin Heavy-chain Isoforms

Masanobu WADA*, Kyoko TORO**, Shigemitsu NIHATA* and Kunio KIKUCHI*

* Department of Health Science, Hiroshima University and

** Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University

Abstract : An electrophoretic separation of a previously undetected myosin heavy-chain (HC) isoform in rodent skeletal muscles, designated as HCIID, could be achieved for the first time by the use of polyacrylamide (PAA) gradient gel of Bär & Pette ((1988) FEBS Lett. 235, 153-155). However, when used as a conventional method in our laboratory, their gel system seems not to result in reproducible electrophoretograms. This study was undertaken to examine electrophoretic conditions necessary to identify myosin heavy-chain (HC) isoforms, HCI, HCIIA, HCIIB and HCIID, with special reference to HCIIA and HCIID. In an attempt to explore the effect of the pH in the separating gel on electrophoretogram the gels adjusted to pH 8.6 were shown to provide the best and most reproducible results. In the case that PAA gradient gels were adopted on the basis of the original method of Bär & Pette, HCIIA and HCIID isoforms were best distinguished by the gels with 4-11%. As characterized by its effect on the mobility of HC isoforms, concentrations of glycerol as well as of PPA were found to be a critical factor. In a series of experiments where PAA gradient gels were used, any gels other than those with 25-30% glycerol gradient did not have a capacity to separate definitely fast type HC isoforms. Other combinations between concentrations of PAA and glycerol were also examined including homogeneous concentrations. In contrast to the report by Bär & Pette, PAA gradient gels were not essential in distinguishing HCIIA from HCIID. Enhanced electrophoretic mobilities existing between HC isoforms were displayed on homogeneous PAA gels rather than on gradient gels.

緒 言

これまで交差神経支配、電気刺激、発育・老化、トレーニング、あるいは後肢宙づりなどに伴う筋線維タンパクの変化について広範にわたる研究 [8, 12, 13, 15, 22] がなされてきたのは、ミオシン分子に幾つかのアイソフォームがあり、それらの組み合わせが筋線維の収縮速度に大きく影響するため [7]、このタンパクの組織化学的・生化学的变化から生理学的にも意義深い示唆を得られることに起因していると思われる。

筋線維は myofibrillar actomyosin ATPase の pH に対する感受性にに基づき type I、type IIA、type IIB の 3 種類にタイプ分けされる。この分類は筋線維に含まれるミオシン重鎖 (Heavy chain; HC) のアイソフォームの種類に依存していることが確認されており [19]、各筋線維に含まれる HC はそれぞれ、HCI、HCIIA、HCIIB と呼ばれている。成熟した哺乳類の速筋線維に発現している fast type HC は、この HCIIA と HCIIB の 2 種類のみであると長く考えられてきたが、近年、免疫組織化学的あるいは電気泳動的に第 3 のアイソフォームが確認され、Pette らの研究グループ [2, 23] はその HC を HCIID と、これに対して Schiaffino らの研究グループ [18] は HCIIX と命名した。

1970 年に Laemmli [11] によって開発された不連続系ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (Sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) は、比較的容易にタンパクを分離できる極めて有用な方法である。この方法は HC を各アイソフォームに分離する手段としても利用されてきたが、Pette らの研究グループ以外で fast type HC (HCIIA、HCIIB、HCIID/X) を 3 種類に分離できる研究者はごく限られている。特に HCIIA と HCIID/X との SDS-PAGE における移動度の差異は極めて小さく、両者を明瞭に分離するのは容易ではない。我々の研究グループにおいても分離には一応成功したが、泳動パターンの再現性は必ずしも高いとは言いがたい。この原因として、HC が分子量約 200K ダルトンと比較的大きなタンパクであること、またそれに対して各アイソフォームの分子量の差異が相対的に小さいことに起因して泳動時間を長くしなければならないため、ごく限られた泳動条件でのみしか HC の分離が可能にならないことが考えられる。しかしながら、その限られた条件が何であるのかについて検討した報告はこれまでなされていない。そこで本研究では、Laemmli [11] のものを改良した Bär & Pette [2] および Sugiura & Murakami [20] の SDS-PAGE に基づき、HC を明瞭に分離するための電気泳動条件について詳細に検討した。

研究 方 法

1. 試料の抽出

Wistar 系雄ラット (12 週齢) の足底筋および横隔膜を実験の対象とした。ガラスホモジナイザーを用いて、これらの筋を 40 倍の抽出液 (5M 尿素、2M チオ尿素、10mM ピロリン酸ナトリウム、0.1% (V/V) メルカプトエタノール) 中で均質化した。得られた抽出液をサンプルバッファー (62.5mM トリス塩酸: pH6.8、2% (W/V) SDS、10% (V/V) グリセロール、5% (V/V) メルカプトエタノール、0.02% (W/V) ブロモフェノールブルー) で 50 倍に希釈し、電気泳動を行うまでフリーザー内 (-20℃) で保存した。

2. 電気泳動条件

本実験では、分離ゲルにおける pH、アクリルアミドの濃度、グリセロールの濃度、およびラン

ニングバッファの組成の影響について検討した。検討項目以外のゲルの組成は、375mM トリス、0.1% (W/V) SDS、0.1% (V/V) TEMED、0.05% (W/V) 過硫酸アンモニウムであった。分離ゲルの溶液をガラスプレートに注入後、できる限りフラットなゲル面を得るために、少量のエタノールを溶液の上に添加した。濃縮ゲルの組成は、3.5% (W/V) アクリルアミド、0.1% (W/V) SDS、0.1% (V/V) TEMED、0.1% (W/V) 過硫酸アンモニウム、125mM トリス塩酸：pH6.8であった。アクリルアミドとビスアクリルアミドの比は分離ゲル、濃縮ゲルともに100：1であった。ランニングバッファの組成は、それ自身の影響を検討した時以外は、0.025M トリス、192mM グリシン、0.1% (W/V) SDSを用いた。サンプルバッファで希釈した抽出液2～10 μ lを注入し、6℃の条件下において150Vの定電圧で13～15時間泳動を行った。なお、チャンバーはマリソル社製KS-8020型を使用、分離ゲルの大きさは、横8 cm×高さ6 cm×厚さ1 mmであった。

3. 染色およびミオシン重鎖の分類

泳動後、ゲルにはOakleyら [14] の方法に若干の改良を加えて銀染色を施した。改良点は、最初のステップとして50% (V/V) メタノール溶液中で30分間ゲルを固定したこと、および第2のステップにおける溶液に1% (V/V) ゲルタルアルデヒドを用いたことである。分離されたHCはTerminら [23] の方法に従い、移動度の大きい順にHCI、HCIIB、HCIIDおよびHCIIAに分類した(図1)。

結果と考察

1965年にSummersら [21] によって最初に使用されたSDS-PAGEは、SDSがタンパクポリペプチド鎖とミセル結合することで、タンパクが元来持つ電荷がほぼ相殺され、分子量に依存してアクリルアミド中をタンパクが挙動する特性を利用して、それらを分離・同定する分析方法である。この方法は少量の試料で分析が可能なこと、必要な装置が手軽であること、あるいは解析能が高いことなどの利点があり、生化学の分野を中心に広く利用されてきたが、HCを幾つかのアイソフォームに分離できるようになったのは比較的最近のことである。1979年にRushbrook & Stracher [16] が、まずslow type HCとfast type HC とに分離したのに引き続いて1986年にDaniel-Betteら [4] が、1987年にStaron & Pette [19] がfast type HCをHCIIAとHCIIBとに分離した。Petteらの研究グループ [2] は、さらに電気泳動法を改良し、翌年にはアクリルアミドに5～8%のグラディエントを持つゲルを用いHCIIAとHCIIBに加え新たなアイソフォームであるHCIIDを検出した。しかしながら、Bär & Pette [2] の方法では彼らが示すように明瞭に分離できないか、できたとしても再現性が低いとの指摘があり [20]、本研究では種々の泳動条件がSDS-PAGEにおけるHCの泳動パターンに及ぼす影響について詳細に検討した。

Laemmli [11] は分離ゲルのバッファとしてpH8.8のトリス塩酸を使用し、以後不連続系SDS-PAGEにおいてはこれが広く用いられてきた。しかしながら、ピロリン酸電気泳動の例ではあるが筋中のisomyosinを検出する場合、Hohら [10] の原法(pH8.8)とは異なるpHのバッファを用いた例もあり [3]、SDS-PAGEによってHCを分離しようとする際にも、必ずしも8.8が至適pHではない可能性がある。図1にpHが泳動パターンに及ぼす影響を示した。pH8.6付近において最も再現性が高くタイトなバンドが得られたのに対し、8.8～9.0ではややバンドが広がる傾向がみられ、HCIIAとHCIIDとを明確に分離することができなかった。サイズの大きなタンパクを分離する場合、分子量10～50Kダルトン程度のものを分離する場合とは異なるpHを用いた方がよいことが認

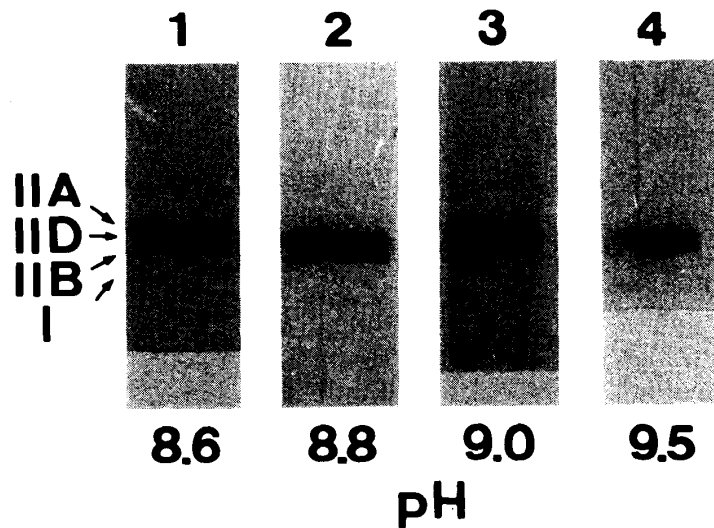


Fig. 1. Influence of pH in a separating gel on electrophoretic separation of myosin heavy chain isoforms. The pH in the solutions of the separation gels was adjusted to 8.6 (Lane 1), 8.8 (Lane 2), 9.0 (Lane 3) or 9.5 (Lane 4) at 6 °C before the addition of the detergent and distilled water. All separating gels were made with a gradient concentration of polyacrylamide (5-10%) and glycerol (25-35%). Abbreviations: IIA, IIB, IID, fast myosin heavy chain isoforms; I, slow myosin heavy chain

められた。また、低分子のタンパクの分離を目的とする SDS-PAGE では、溶液の pH が多少変化しても泳動パターンは大きな影響を受けることはなく、HC のような高分子タンパクを分離する場合において、特に pH が重要な意味を持つであろうことが推察される。したがって、室温で電気泳動を行い HC を分離しようとする、それまで比較的よい泳動結果が得られていたものが、突然うまくいかなることがしばしばあるのは、本研究の結果から気温の変動により緩衝液として用いるトリス塩酸の pH が作成時のものとは変化することに原因の一つがあると考えられる。

使用するアクリルアミドの濃度は泳動パターンに大きな影響を及ぼすことは、周知の事実である。HC を分離しようとする初期の試みでは [4, 19]、5 ~ 7.5% の均一の濃度を用いていたが、この方法では fast type HC は IIA と HCIIB にかろうじて分離できるに留まった。その後、グラディエントゲルが導入され HCIID の検出が可能になったが、用いられているグラディエントの濃度は報告者により異なっており [1, 2, 9, 19, 23]、至適な濃度は不明である。そこで、7.5% を中心に種々のグラディエントのゲルを作成し、解析能を比較検討した。図 2 にアクリルアミドの濃度の影響を示した。グラディエントを大きくするにしたがい各アイソフォーム間の移動度の差異は小さくなったが、よりシャープなバンドが得られ 4 - 11% で最もよい結果が得られた。

SDS-PAGE の分離ゲル中にグリセロールを混入させる試みは早くから行われてきた [4]。Sugiura & Murakami [20] は、グリセロールに 30 - 40% のグラディエントを持つゲルを使用したところ極めてシャープな泳動パターンが得られたことを報告しており、本研究ではグラディエントを 10% に固定して、種々の濃度での泳動パターンについて検討した (図 3)。グリセロールの濃度が 10 - 20% まででは、fast と slow にのみ分離し、一方 20 - 30% では HCI および HCIIB は明瞭に分離されたが、HCIIA と HCIID は一つのバンドとして同定された。25 - 35% で最もよい結果が得られ、4 つのアイソフォームを検出することができたが、それ以上の濃度では fast HC 間の移動度の差異が小さくなり、HCIIA と HCIID は再び一つのバンドとして検出された。グリセロールのグ

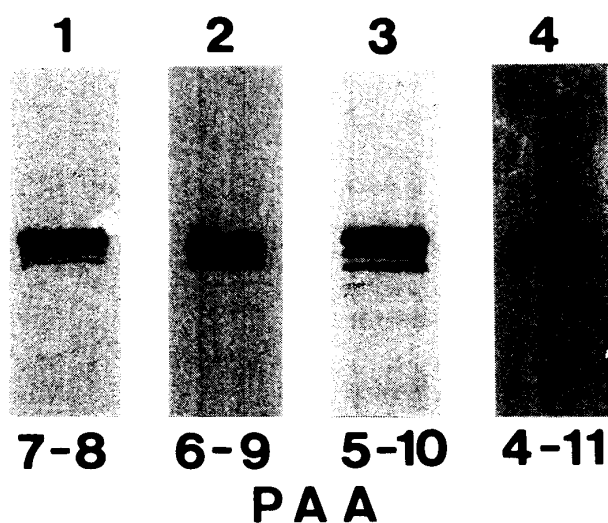


Fig. 2. Influence of polyacrylamide concentration on electrophoretic separation of myosin heavy chain isoforms. The separating gel was made with a gradient concentration of polyacrylamide of 7-8% (Lane 1), 6-9% (Lane 2), 5-10% (Lane 3) or 4-11% (Lane 4). A glycerol concentration of all gels was from 25% to 35%. Abbreviation: PAA, polyacrylamide

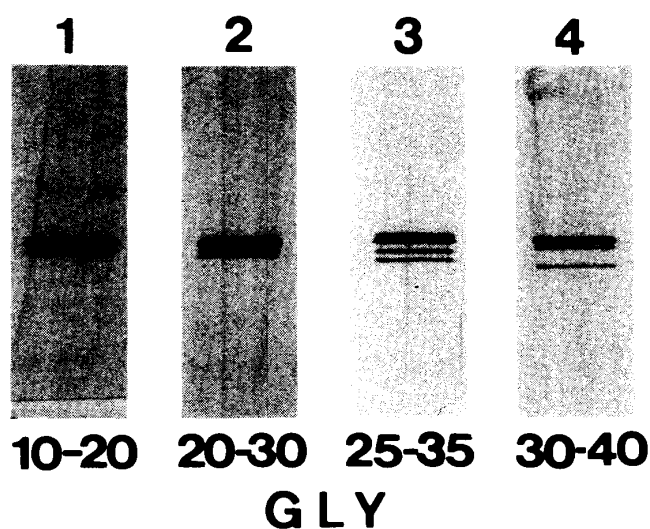


Fig. 3. Influence of glycerol concentration on electrophoretic separation of myosin heavy chain isoforms. The separating gel was made with a gradient concentration of glycerol of 10-20% (Lane 1), 20-30% (Lane 2), 25-35% (Lane 3) or 30-40% (Lane 4). A polyacrylamide concentration of all gels was from 4% to 11%. Abbreviation: GLY, glycerol

ラジエントを用いると、ゲル溶液に比較的大きな密度差ができ、ポリメライズする際に発生する熱に起因して起こるゲル溶液の対流をある程度抑制できる。したがって、より正確なアクリルアミドのグラディエントを持ったゲルを作成するためには、グリセロールのグラディエントを用いることが有効であることが示唆されているが [20]、本研究の結果から、それだけではなくグリセロール

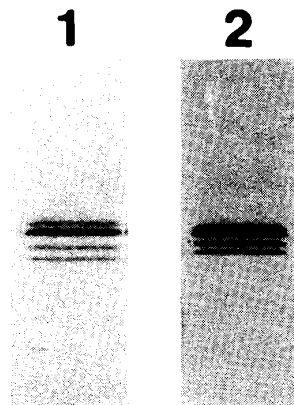


Fig. 4. Comparison of electrophoretic separation of myosin heavy chain isoforms between the polyacrylamide homogeneous (Lane 1) and gradient (Lane 2) gels. The gel of lane 1 consisted of 7.5% polyacrylamide and 30% glycerol. The gel of lane 2 was composed of 4-11% polyacrylamide and 25-35% glycerol.

の濃度そのものが各HCの移動度に影響することが明らかになった。しかしながら、グリセロールがどのような化学的機序によってゲル上のタンパクの挙動に影響を及ぼすのかについては不明のままである。

すでに述べたようにHClIDはアクリルアミドのグラディエントを持つゲルの導入により初めて検出が可能になった [2]。また、HClIDを明瞭に分離できたことを示すその後の報告では全てアクリルアミドグラディエントゲルを用いていることなどから [1, 9, 20, 23]、アクリルアミドグラディエントゲルはHClID検出に必須であると考えるのが妥当なように思われた。しかしながら、本研究においてさらに幾つかのアクリルアミドとグリセロールの濃度の組み合わせについて検討したところ、条件によっては、むしろグラディエントゲルよりも均一ゲルにおいて各アイソフォーム間の移動度の差異が大きくなり、より高い解析能が認められることが示された。具体的には、アクリルアミド-7.5%、グリセロール-30%で最良の結果が得られることが観察された (図4)。Bär & Pette [2] は、彼らがHClIDの検出に成功したのはアクリルアミドグラディエントゲルを採用したことが大きな要因であることを示唆しているが、彼らの報告にはグリセロールの濃度については明記されていない。本研究の結果から、アクリルアミドのグラディエントよりも、適切な濃度のグリセロールを用いたことに成功の原因があると推察される。Bär & Pette [2] の方法に従いHCを分離しようとしたが、fast type HCを明瞭に分離することができなかったことを示すSawchakら [17] の報告は、この推察を裏付けるものである。

不連続系SDS-PAGEにおいては、ランニングバッファーとして原法の0.025M トリス、0.192M グリシン、0.1% SDSが広く用いられているが [11]、陰極側に0.1M トリス、0.15M グリシン、0.1% SDS、陽極側に0.05M トリス、0.075M グリシン、0.05% SDSや [6]、あるいは0.05M トリス、0.15M グリシン、0.1% SDS [5] などを使用した方がよりシャープなバンドが得られたことが報告されている。本研究ではこれらのバッファーの影響についても検討したが、泳動パターンにはほとんど変化はみられなかった (未発表資料)。

本研究の結果から、SDS-PAGEによりHCを分離しようとする場合、アクリルアミドの濃度だけではなく、グリセロールの濃度も各アイソフォームの移動度に大きな影響を及ぼすこと、およびアクリルアミドグラディエントは必ずしも必要ではないことが明らかになった。ラット骨格筋HCの分離には、アクリルアミド7.5%、グリセロール30%の成分からなるゲルが最適であることが認められた。これらの結果は分子量が比較的大きなタンパクをSDS-PAGEにより分離する試みに対する一助になるものと思われる。

総 括

ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) における泳動条件が、ミオシン重鎖 (HC) のゲル上の挙動に及ぼす影響を検討する目的で、ラット骨格筋を対象に条件の異なる種々の条件下で電気泳動を行い、以下の結果を得た。

1. 分離ゲルのpHが8.6付近の時に、HCは最も明確に分離された。pH8.8以上ではHClIAとHClIDとを明瞭に分離することはできなかった。
2. アクリルアミドの濃度勾配を大きくすると、各アイソフォームの移動度の差異は小さくなったがタイトなバンドが検出され、グリセロールの濃度が25-35%の場合、4-11%で最もよい結果が得られた。
3. アクリルアミドの濃度勾配を持ったゲルを用いた場合、グリセロールの濃度は25-35%の時、最も高い解析能が認められた。また、グリセロールの濃度それ自身がHCの移動度に影響を及ぼし、25-35%より高すぎても低すぎてもfast type HCは明瞭に分離されなかった。
4. アクリルアミドのグラディエントはHCの検出に対して必須な条件ではなく、アクリルアミド7.5%、グリセロール30%でHClIAとHClIDとを分離することが可能であった。この均一ゲルにおけるHClIAとHClIDの移動度の差異は、グラディエントゲルにおけるものより大きい傾向にあった。
5. ランニングバッファの組成は泳動パターンにほとんど影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、HCの電気泳動パターンの再現性が低分子タンパクのものとは比べて低い傾向にあるのは、気温の変動などによりランニングゲル溶液のpHが変化することに起因すると思われる。また、先行研究においてfast type HCを明瞭に分離することができなかった原因として、アクリルアミドの濃度より用いたグリセロールの濃度に主として問題があったものと推察される。

文 献

1. Aigner, S., Gohlsch, B., Hämäläinen, N., Staron, R. S., Uber, A., Wehrle, U. & Pette, D. (1993) *Eur. J. Biochem.* 211, 367-372.
2. Bär, A. & Pette, D. (1988) *FEBS Lett.* 235, 153-155.
3. d'Albis, A., Pantaloni, C. & Bechet, J. J. (1979) *Eur. J. Biochem.* 99, 261-272.
4. Danieli-Betto, D., Zerbato, E. & Betto, R. (1986) *Biochem. Biophys. Commun.* 138, 981-987.
5. Doucet, J. P., Murphy, B. J. & Tuana, B. S. (1990) *Analyt. Biochem.* 190, 209-211.
6. Doucet, J. P. & Trifaro, J. M. (1988) *Analyt. Biochem.* 168, 265-271.
7. Greaser, M. L., Moss, R. L. & Reiser, P. J. (1988) *J. Physiol.* 406, 85-98.
8. Green, H. J., Klug, G. A., Reichmann, H., Seedorf, U., Wiehrer, W. & Pette, D. (1984)

Pflügers Arch. 400, 432-438.

9. Härmäläinen, N. & Pette, D. (1993) *J. Histochem. Cytochem.* 41, 733-743.
10. Hoh, J. F. Y., McGrath, P. A. & White, R. I. (1976) *Biochem. J.* 157, 87-95.
11. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
12. Larsson, L. & Salviati, G. (1989) *J. Physiol.* 419, 253-264.
13. Matsuda, R., Bandman, E. & Sterohman, R. C. (1983) *Dev. Biol.* 95, 484-491.
14. Oakley, B. R., Kirsch, D. R. & Morris, N. R. (1980) *Analyt. Biochem.* 105, 361-363.
15. Pette, D., Müller, W., Leisner, E. & Vrbova, G. (1976) *Pflügers Arch.* 364, 103-112.
16. Rushbrook, J. I. & Stracher, A. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4331-4334.
17. Sawchak, J. A., Leung, B. & Shafiq, A. (1992) *Muscle & Nerve* 15, 1349-1353.
18. Schiaffino, S., Gorza, L., Sartore, S., Saggin, L., Ausoni, S., Vianello, M., Gundersen, K. & Lømo, T. (1989) *J. Musc. Res. Cell Motility* 10, 197-205.
19. Staron, R. S. & Pette, D. (1987) *Biochem. J.* 243, 695-699.
20. Sugiura, T. & Murakami, N. (1990) *Biomed. Res.* 11, 87-91.
21. Summers, D. F., Maizel, J. V. Jr. & Darnell, J. E. Jr. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54, 505-513.
22. Templeton, G. H., Sweeney, H. L., Timson, B. F., Padalino, M. & Dudenhoefter, G. A. (1988) *J. Appl. Physiol.* 65, 1191-1195.
23. Termin, A., Staron, R. S. & Pette, D. (1989) *Histochemistry* 92, 453-457.