

ヘモグロビン合成に関する研究

II. ヘモグロビンの CM セルロースカラムクロマト

グラフ分析：マイクロカラムクロマト

グラフ分析法の開発

川崎医科大学 生化学

原野昭雄, 小出智子

同 検査診断学

上田 智

同 内科

柴田 進

(昭和54年5月7日受付)

Studies on the Hemoglobin Biosynthesis.

II. Analytical Method of Hemoglobin by CM Cellulose

Column Chromatography: Improvement of

Microcolumn Chromatographic Method.

Teruo Harano and Tomoko Koide

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School.

Satoshi Ueda

Department of Clinical Pathology

Susumu Shibata

Department of Medicine

(Accepted on May 7, 1979)

In vitro で合成されたヘモグロビンの分析に CM セルロース (CM 23 および CM 52) を用いるマイクロカラムクロマトグラフィーを開発, 応用した. 担体による分析値 (β/α 比) の差異は殆んどみられず, また従来から用いられている大カラム法との比較からもマイクロカラム法による分析は有効であることがわかった. CM 23 セルロースマイクロカラムクロマトグラフィーでの所要分析時間は3時間以内と短いものである. 本法の臨床診断 (特にサラセミア症候群) への応用が期待される,

The improvement and the application of microcolumn chromatography on carboxymethyl cellulose, CM 23 and CM 52, for the analysis of the synthesized hemoglobin *in vitro* were described. The differences of the analytical data (β/α ratio) were hardly observed between the different packages (CM 23 and CM 52

cellulose). From the comparison of microcolumn chromatography with large column method which has hitherto been used, this method is considered to be more effective for the analysis of the synthesized hemoglobin. The time required for the analysis on the case of CM cellulose microcolumn chromatography is less than 3 hours.

This method will have a wider application to the clinical diagnosis, especially to the diagnosis of thalassemia syndromes.

はじめに

合成ヘモグロビンの α -鎖、 β -鎖グロビンの分析はCMセルロースによるカラムクロマトグラフィーが主流となっている¹⁾。最近セルロースアセテート膜電気泳動法が合成ヘモグロビンのグロビン分析に応用され、微量のreticulocyte 溶血液を用いる簡易的迅速法が開発された^{2)~4)}。この方法は臨床血液学的診断に有用なものと考えられる。しかし正常ないし非貧血性患者血液中に含まれるreticulocyte 数(%)は低く、このような血液による合成ヘモグロビンの微量分析への応用には困難性がある。先に我々はあらかじめreticulocyte を濃縮しヘモグロビン合成を行ない比放射活性の高い合成reticulocyte 溶血液を調製することができ微量分析を可能とした⁵⁾。今回我々はヘモグロビン合成の改良を行なうと同時に従来から行なわれてきたものより数~10数分の1の試料グロビンを用いるCMセルロースを充填剤としたマイクロカラムクロマトグラフィーの開発を試みた。

実験材料および方法

合成reticulocyte 溶血液は先の報告⁵⁾に従って合成したものをを用いた。CMセルロース、CM 23 および CM 52 は Whatman Co. のものを購入して使用した。カラムとしては市販のガラス管(内径6 mm)を長さ15 cmに切断し、両端にゴム栓をストッパーとしたものを使用した。

リン酸緩衝液： α -鎖および β -鎖(γ -鎖)グロビンの溶出に用いたリン酸緩衝液はつぎのよ

うに調製し、リン酸でpH: 8.6に調節した。

(1) CM 23 カラムクロマトグラフィー用リン酸緩衝液：

Buf. I: 50 mMメルカプトエタノール, 8 M尿素を含む5 mMリン酸二ナトリウム溶液。

Buf. II: 50 mMメルカプトエタノール, 8 M尿素を含む10 mMリン酸二ナトリウム溶液。

Buf. III: 50 mMメルカプトエタノール, 8 M尿素を含む25 mMリン酸二ナトリウム溶液。

(2) CM 52 カラムクロマトグラフィー用リン酸緩衝液：

Buf. I': 50 mMメルカプトエタノール, 8 M尿素を含む8 mMリン酸二ナトリウム溶液。

Buf. II': 50 mMメルカプトエタノール, 8 M尿素を含む30 mMリン酸二ナトリウム溶液。

グロビンの調製：合成reticulocyte 溶血液(約10 g/dl濃度)100 μ lを蒸留水で3倍に希釈し、氷冷、攪拌下に1%塩酸-アセトン(20 ml)中に滴下し脱ヘムを行なった。生成したグロビンを3,000 rpm, 5分間遠心により集め、アセトンで3回洗浄し、水酸化ナトリウムの入った真空デシケーター中で一夜乾燥した。約10 mgのグロビンが回収される。

CMセルロースマイクロカラムクロマトグラフィー：

(1) CM 23マイクロカラムクロマトグラフィーの場合：0.3 gのCMセルロース(CM 23)をBuf. I (~15 ml)に懸濁させ、約10分間室温に静置、上層の微細繊維をデカンテーションにより除き、さらにBuf. Iを加えて平衡化させた。カラム(内径6 mm×長さ15 cm)に高さ9 cmになるよう充填し、Buf. Iを約30分

間流し十分充填する。この際、流速はペリスタルチックポンプを使用し 0.3 ml/min に調節しておく。約 10 mg のグロビンを Buf. I (0.5 ml) で溶解したものをカラム充填剤上に重層し、Buf. I で未吸着部を溶出、tube No. 1~4 にそれぞれ 1.2 ml ずつ集めた。tube No. 5~29 には同種 50 ml 用ビーカー 2 個を用いそれぞれに Buf. II および Buf. III を 30 ml ずつ入れ並列に連結管でつなぎ、ナトリウムイオン濃度 0.01 M から 0.025 M の直線的勾配をもった溶液で γ -鎖および β -鎖グロビンを溶出、回収し、最後に Buf. III のみで α -鎖グロビンを溶出させ tube No. 30~40 に集めた。

(2) CM 52 ミクロカラムクロマトグラフィーの場合：2 g の CM 52 を Buf. I' に懸濁させ (1) の場合と同様にカラムに充填し、充填剤の高さを 9 cm とした。グロビン約 10 mg を Buf. I' (0.5 ml) に溶解し、カラム充填剤に重層した。溶出液は Buf. I' および Buf. II' を 50 ml 用ビーカー 2 個に 30 ml ずつ入れ連結管で並列につなぎナトリウムイオン濃度 0.008 M ~ 0.035 M の直線的勾配をもった溶出液で溶出を行なった。この際、流速をペリスタルチックポンプを用い 0.2 ml/min に調節し、各 tube 中に溶出液 1.2 ml ずつを集めた。tube No. 1~45 には未吸着部、 γ -鎖および β -鎖グロビンを溶出し集めた。 α -鎖グロビンは溶出液を Buf. II' に変え tube No. 46~60 に集められた。

各 tube 中タンパク質分画の吸光度測定：各分画の吸光度測定は Gilford Model 2400-2 を用いセミマイクロセルを使用して 280 nm で Buf. I または Buf. I' を対照にして比色した。

放射活性の測定：アクアゾール 2 の 8 ml が入ったバイアル中に各分画の 1 ml を入れ、さらに水 1 ml を加えて振盪、ゲル化させ約 30 分間室温に放置したのち、液体シンチレーションカウンター (Mark III) で dpm を測定した。各分画 (β -鎖および α -鎖グロビン) の極大付近 3 点を選び吸光度と放射活性値 (dpm) から比活性を求め、その平均値から β/α 比を算出

した。計算式はつぎのようである¹⁾。

$$\beta/\alpha \text{ ratio} = \frac{\beta_{RAD}/\beta_{OD} \times \frac{1}{1.52}}{\alpha_{RAD}/\alpha_{OD}}$$

$$\gamma/\alpha \text{ ratio} = \frac{\gamma_{RAD} \times \frac{18}{17} / \gamma_{OD} \times \frac{1}{2}}{\alpha_{RAD}/\alpha_{OD}}$$

結 果

HbF 含量の高い (HbF: 6%, アルカリ変性法²⁾ で測定) 試料をつかって CM 23 および CM 52 セルロースカラムクロマトグラフィーでの分析例を Fig. 1 に示す。それぞれ未吸着分画、 γ -鎖、 β -鎖および α -鎖グロビン分画の順に溶出される。これら γ -鎖、 β -鎖および α -鎖グロビンの同定はセルロースアセテート膜電気泳動法³⁾ で行なった。CM 23 セルロースカ

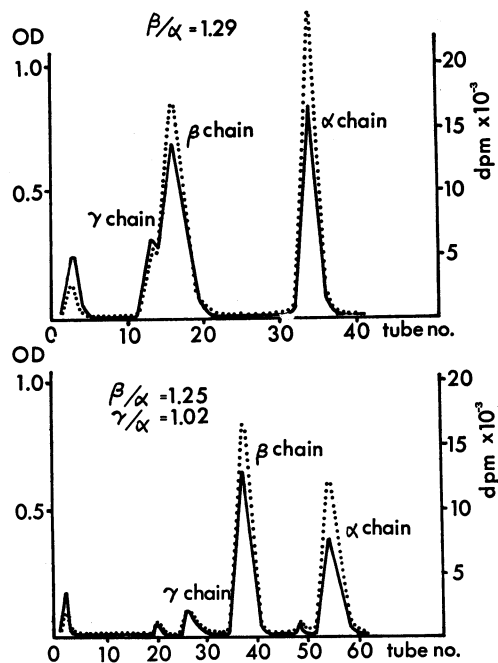


Fig. 1. Separation of globin chains from peripheral blood and estimation of β/α ratio (and γ/α ratio) by chromatography on CM 23 (upper) and CM 52 (lower) carboxymethylcellulose in 8 M urea at pH 6.8. Sample: from patient with aplastic anemia (Hb F content: 7.0%). Solid line: absorbance at 280 nm. Dotted line: radioactivity.

ラムクロマトグラフィーの場合は γ -鎖グロビンのピークが β -鎖グロビンピークの前に肩として現われ pre- β -鎖グロビン (酸化された β -鎖グロビン?) または N末端にグルコースの結合した β -鎖グロビン) との差別が困難である。CM 52 セルロースカラムクロマトグラフィーでは各鎖グロビンがそれぞれ単一ピークとして現われ γ/α 比および β/α 比の測定を正確に成し得るが CM 23 セルロースカラムクロマトグラフィーの場合はこれに比べやや高値を示した (Fig. 1)。これは CM 23 セルロースによる γ -鎖と β -鎖グロビンの分離が不十分なためであるが、HbF 含量の少ない試料であれば殆んど両者間での差異は認められない。また、数倍量のグロビンを使用した CM 23 セルロースカラムクロマトグラフィーでの結果はマイクロカラムクロマトグラフィーの β/α 比との間に大差は認められなかった。この方法による β サラセミア患者の合成ヘモグロビン分析への応用

は Fig. 2 の如くであり β サラセミアの判定が可能であった。

考 察

合成ヘモグロビンのグロビン分析を従来の大カラムのかわりに、大きさ $6\text{ mm}\phi \times 15\text{ cm}$ (充填剤の高さ 9 cm) のマイクロカラムを用いて分析を行なえるようにしたが従来のものと殆んど差異のない結果が得られた。従来のものでは使用する分析試料 (グロビン) 量が数十ミリグラムから百数十ミリグラムと多量のものが用いられたが、本法では十ミリグラム程度の試料があれば十分分析を行なうことができる。しかし、この方法では合成ヘモグロビン中の放射性物質 (^{14}C -(U)-ロイシン, 比放射活性 $250\ \mu\text{Ci}/\text{mmol}$ のものを $7.5\ \mu\text{Ci}$ 使用している) の取り込み具合が分析結果にも大きく影響することはいうまでもない。さらに比放射活性の高い (例えば ^3H) 物質を用いることが望ましい。放射性物質の取り込み具合の悪い試料での分析結果は良好とはいえず合成ヘモグロビンの状態如何により本法による分析の可否は決まる。先の報告⁹⁾ のように正常あるいは非貧血性血液のように reticulocyte 数の低い (1% 以下) 場合には reticulocyte の濃縮された reticulocytes rich red cell による合成ヘモグロビンの溶血液を使用することが望まれる。本法による分析時間は CM 23 セルロースの場合は 2 時間 45 分と短時間で行なえるが、CM 52 セルロースの場合では 6 時間を要する。両者間での分析結果には殆んど差異はなく、迅速分析には CM 23 セルロースクロマトグラフィーで十分である。

今後、本法の臨床診断 (特にサラセミア症候群) への応用が期待される。

本研究は川崎医科大学昭和53年度プロジェクト研究費 (53-104) で行なった。

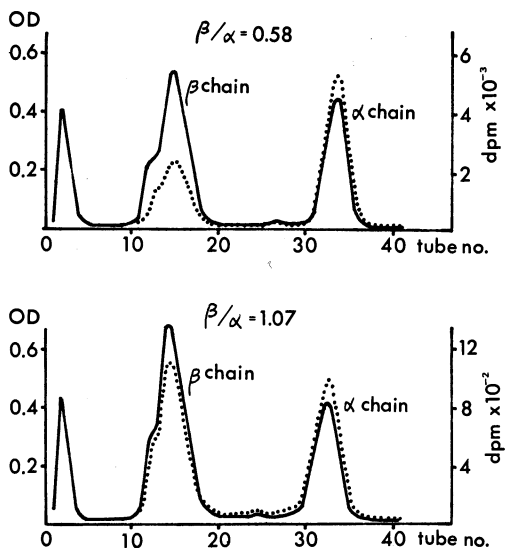


Fig. 2. Separation of globin chains and estimation of β/α ratio from β thalassaemic patient (upper) and normal adult (lower). Solid line: absorbance at 280 nm. Dotted line: radioactivity,

文 献

- 1) Huisman, T. H. J. and Jonxis, J. H. P.: "The hemoglobinopathies" Techniques of identification. Clin. Biochem. Anal. Vol. 6. Marcel Dekker, Inc., New York, 1977, p. 195
- 2) Ueda, S. and Shibata, S.: A simple radioisotope-labeling method for estimation of globin-chain biosynthesis (α/β ratio) in vitro: Use of urea cellulose acetate membrane electrophoresis in combination with liquid scintillator counting. Kawasaki Med. J. 3: 141—143, 1977
- 3) Vettore, L., Matteis, M. C., Bassetto, M. A. and Pepe, G. M.: Biosynthetic ratio of labelled globin chains in human reticulocytes, determined by electrophoresis on cellulose acetate. Hemoglobin. 2: 129—141, 1978
- 4) Salmon, J. E., Nudel, U., Schiliro, G., Natta, C. L. and Bank, A.: Quantitation of human globin chain synthesis by cellulose acetate electrophoresis. Anal. Biochem. 91: 146—157, 1978
- 5) 原野昭雄, 岡田美恵子, 上田 智, 柴田 進: ヘモグロビン合成に関する研究. I. 末梢血液の reticulocytes の濃縮について. 川崎医会誌. 5: 92—96, 1979