

ノ ー ト

高粘度高分子溶液を用いるキャピラリー電気泳動による低分子の分離

藤本 忠蔵^{®*}, 澤田 浩和^{**}

(1994 年 8 月 12 日受付)

(1994 年 9 月 22 日審査終了)

1 緒 言

核酸やタンパク質等の生体高分子の分子ふるい分離に、ゲルを用いるこれまでのキャピラリーゲル電気泳動に代わって、ポリマー溶液を用いるキャピラリー電気泳動が最近多く報告されるようになってきた¹⁾²⁾。これは主に粘性が低く、安定なカラムの調製が容易なためだと考えられる。これまで、ポリエチレングリコール、セルロース誘導体、アガロース、ポリアクリルアミドを含む種々のポリマー溶液が利用されてきたが、ほとんどが生体関連高分子を対象としており、分子量の小さな化合物の分離のための媒体として検討されることはほとんどなかった。本研究では、ポリアクリルアミドやセルロース誘導体の高濃度（従って高粘度）溶液を分離媒体として用いる低分子のキャピラリー電気泳動分離を試み、その分離挙動について検討した。

2 実験方法

2・1 装 置

キャピラリー電気泳動装置としては、高圧電源（松定プレジジョンデバイセズ製 HCZE-30 PN 0.25, 0~±30 kV）、紫外検出器（日本分光製 875-CE 型あるいは Uvidec III 型、いずれも 50 μm×500 μm のスリットを取り付けて使用）、2 個の緩衝液槽並びにインターロック付きアクリル樹脂製ボックスからなる装置を自作して使用した。カラムとしては、内径 100 μm、外径 375 μm のフューズドシリカキャピラリー（GL サイエンス製）を使用した。オンカラム検出のためにフューズドシリカキャピラリーのポリイミド被膜を長さ 1 mm にわたってジュール加熱したニクロム線で焼いてはく離し、検出用ウィンドウ（セル）とした。キャピラリーの全長並び

にキャピラリーの一端から検出用ウィンドウまでの距離は図の説明に示してある。キャピラリーの内面は Hjertén の方法³⁾によって線状ポリアクリルアミドでコーティングした。本研究で検討したポリマー溶液をキャピラリーに満たす前に、浸透流がないことを電流モニター法⁴⁾により確認した。試料は電気泳動法により導入した。

2・2 試 薬

緩衝液並びに試料溶液の調製にはミリ Q 水システムで得られたイオン交換水を使用した。試料は pH 8.5 又は pH 7.2 の緩衝液に溶かし、各成分の濃度を 0.05~0.19 mg/ml とした。メチルセルロース（MC）とヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）（いずれも 25°C で 2% 水溶液の粘度が 4000 cP のもの）は Aldrich 製を用いた。ダンシルアミノ酸は Sigma 製、アクリルアミド、ペルオキシ二硫酸アンモニウム（APS）並びに *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン（TEMED）は電気泳動用試薬（ナカライテスク製）であり、その他の試薬は東京化成工業製試薬特級を用いた。

2・3 ポリマー溶液の調製

線状ポリアクリルアミドの重合はキャピラリー内で行った。0.5 g のアクリルアミド（5% *T* の場合）、7.0 mg の APS 並びに 19 μl の TEMED を 10 ml の脱気した 100 mM トリス-150 mM ホウ酸緩衝液（pH 8.1）に溶解し、前処理したキャピラリー（2・1 節参照）に満たした。重合溶液の充てんは Baba らの装置⁵⁾を用いて行った。ポリアクリルアミド濃度（%*T*）の異なる溶液を調製するときには、%*T*に比例して APS 並びに TEMED の濃度を変えた。その後、キャピラリーの両端を緩衝液に漬けたまま一晩室温で放置して重合を完了させた。

MC 並びに HPMC の溶液は 10 mM リン酸緩衝液

* 浜松医科大学: 431-31 静岡県浜松市半田町 3600

** 豊橋技術科学大学: 441 愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1-1

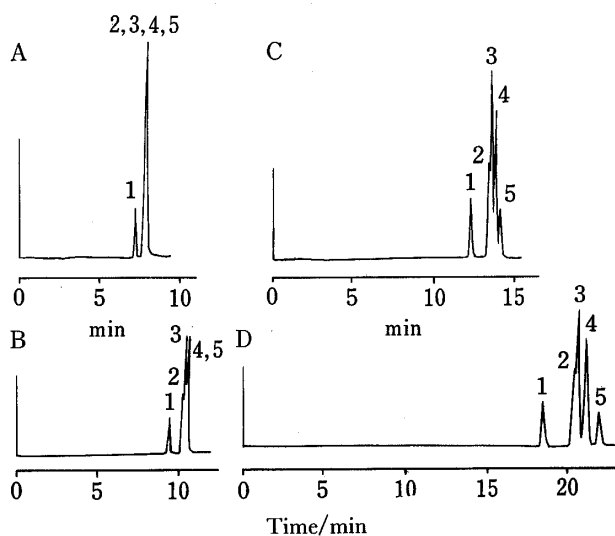


Fig. 1 Electropherograms of a dansyl amino acid mixture on a linear polyacrylamide column.

(A) 0% *T*, (B) 5% *T*, (C) 10% *T*, (D) 15% *T*. Conditions: 100 mM Tris-150 mM boric acid buffer, 40 cm × 100 μm treated fused silica capillary (15 cm to detection), 8 kV applied voltage, electromigration injection at 2 kV for 5 s. Peak identifications: dansyl derivatives of (1) alanine; (2) valine; (3) leucine; (4) isoleucine; and (5) phenylalanine

(pH 7.2)に溶かし、一晚室温で放置した。その後、このポリマー溶液を遠心分離機 (4°C, 3220×*g* で 30 分間) にかけて、上澄み液を採取し、前処理したキャピラリー (2・1 節参照) に満たした。

すべてのカラムは使用に先立ち、紫外検出器につないだレコーダーが安定なベースラインを与えるまで通電した。

3 結 果

0~15% *T* の線状ポリアクリルアミドを充てんしたカラムを用いてダンシルアミノ酸を分離した。得られた代表的な電気泳動図を Fig. 1 に示す。% *T* が大きくなるにつれて各成分間の分離が向上していることが分かる。ポリアクリルアミド濃度が 0~3% では Fig. 1A と同じ電気泳動図を与えた。ポリアクリルアミド濃度が 10% 以上では、移動時間も長くなるものの、ダンシルアミノ酸の側鎖 (R 基) の違いにより分離されており、五つのピークが観察できる。

Fig. 2 は *p*-トルエンスルホン酸、ダンシル酸並びにプロモフェノールブルーの分離を、カラムに線状ポリアクリルアミドを満たしたときと満たさないときについて

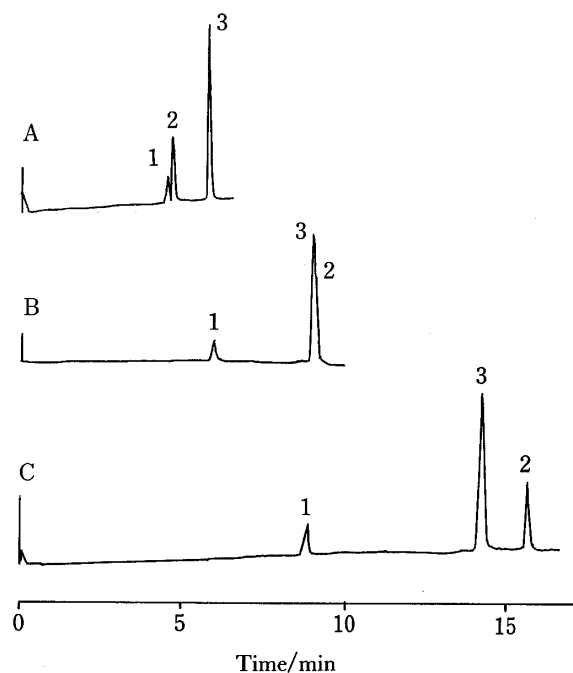


Fig. 2 Electropherograms of a mixture of *p*-toluenesulfonic acid, dansyl acid and Bromophenol Blue on a linear polyacrylamide column

(A) 0% *T*, (B) 10% *T*, (C) 15% *T*. Conditions: 100 mM Tris-150 mM boric acid buffer, 40 cm × 100 μm fused silica capillary (15 cm to detection), 8 kV applied voltage, electromigration injection at 2 kV for 5 s. Peak identifications: (1) *p*-toluenesulfonic acid; (2) Bromophenol Blue; (3) dansyl acid

比較したものである。ポリマー濃度の変化に伴いプロモフェノールブルーの移動時間に顕著な変化が見られた。

更に、ダンシルアミノ酸の分離を MC と HPMC の溶液をキャピラリーに満たしたカラムを用いて行った。ポリマー濃度を 0~20 mg/ml とした (20 mg/ml 以上の濃度で均一な MC の溶液を調製することは困難であった)。

Fig. 3 は 20 mg/ml の MC を満たしたカラムを用いて得られた電気泳動図である。ダンシルフェニルアラニンとダンシルイソロイシンが同じ移動時間を与えているが、他の成分間の分離は向上することが分かる (MC を含まないときの電気泳動図は Fig. 1A に同じ)。20 mg/ml の HPMC を満たしたカラムで得られた電気泳動図は Fig. 3 と同様であった。

4 考 察

同じ電荷/質量比を持つ巨大分子でも分子サイズに基づいてキャピラリー電気泳動分離を行うことが可能であ

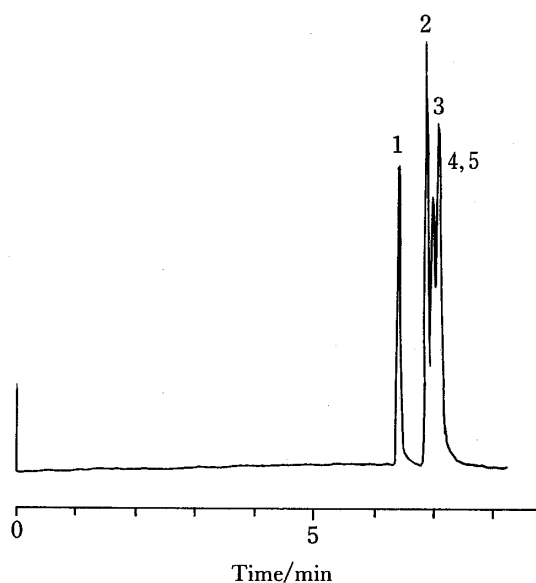


Fig. 3 Electropherogram of a dansyl amino acid mixture on a methyl cellulose column

Conditions: 20 mg/ml polymer solution, 10 mM phosphate buffer, 50 cm×100 μm fused silica capillary (25 cm to detector), 15 kV applied voltage, electromigration injection at 5 kV for 5 s. Peak identifications as in Fig. 1.

り、このために低粘度の希薄なポリマー溶液あるいは硬直なゲルが使用されてきた。本研究では高粘度のポリマー溶液が低分子の分離にも有効なことを実証した。ここで使用したポリアクリルアミド溶液 (7% *T* 以上) 並びにセルロース誘導体溶液 (10 mg/ml 以上) は非常に高い粘性を有し、溶液と呼ぶよりはゼリー状と表現するほうがふさわしいが、Cooper⁶⁾ の著書に従い、架橋していないポリマーであり、線状ポリマー鎖が互いに滑るように動くことが可能なので、本論文では溶液と呼ぶことにする。

使用したポリマー溶液がカラムが対流抑制媒体として働くことは十分考えられるが、本論文で分離した低分子の分離挙動を分子ふるい効果で説明することは難しいと思われる。最近 Cobb ら⁷⁾ によってタンパク質とポリアクリルアミドコーティングの疎水性相互作用の可能性が示唆されている。一方、Hjertén ら⁸⁾ は、ステアロイルデキストランのような両親媒性ポリマーの存在下でキャピラリー電気泳動を行い、タンパク質が電荷ばかりでなく疎水性相互作用によっても分離していることを示唆し、これを“疎水性相互作用電気泳動”と名付けてい

る。本実験の場合には、使用したダンシルアミノ酸の側鎖にはわずかながら疎水性の違いがあり、そのためポリマー鎖との相互作用の強さも異なってくるために分離されているものと思われる。他方、高濃度のポリアクリルアミドの存在下でプロモフェノールブルーの移動時間が大きく変化するの、“芳香族吸着”⁸⁾⁹⁾ のためと思われる。Hjertén ら⁸⁾ は線状ポリアクリルアミドを添加剤として用いて同様な挙動を観察しているが、彼らが用いた 6% *T* 溶液の粘度は添加剤を加えないときの緩衝液の粘度に近い。著者らの結果はより高い濃度のポリアクリルアミド溶液が更に優れた選択性を与えることを示している。その選択性は上で述べたようなクロマトグラフィー的相互作用のために生じているものと考えられるが、定量的な考察をするには更に系統的な実験が必要である。なお、新着の *Anal. Chem.* 誌上にポリエーテルをマトリックスとして用いた低分子の分離¹¹⁾ が報告されているが、本研究とはポリマー並びに相互作用の種類が異なるだけでなく、本研究の場合、相互作用媒体として使用されるポリマーがカラム内を移動しない (従ってカラムから溶出ししない) 点が大きく異なっている。このことは、試料成分の単離・精製並びに分取後の同定に好都合と考えられる。

文 献

- 1) 真鍋 敬: ぶんせき, **1994**, 469.
- 2) 中村 洋, 佐野 明, 太田隆文, 鈴木政雄: ぶんせき, **1994**, 554.
- 3) S. Hjertén: *J. Chromatogr.*, **347**, 191 (1985).
- 4) X. Huang, M. J. Gordon, R. N. Zare: *Anal. Chem.*, **60**, 1837 (1988).
- 5) Y. Baba, T. Matsuura, K. Wakamoto, Y. Morita, Y. Nishitu, M. Tsuhako: *Anal. Chem.*, **64**, 1221 (1992).
- 6) T. G. Cooper: “*The Tools of Biochemistry*”, (1977), (John Wiley & Sons, Inc., New York).
- 7) K. A. Cobb, V. Dolnik, M. Novotny: *Anal. Chem.*, **62**, 2478 (1990).
- 8) S. Hjertén, L. Valtcheva, K. Elenbring, D. Eaker: *J. Liq. Chromatogr.*, **12**, 2471 (1989).
- 9) S. Hjertén, R. Mosbach: *Anal. Biochem.*, **3**, 109 (1962).
- 10) W. Schüzner, S. Fanali, A. Rizzi, E. Kenndler: *J. Chromatogr.*, **639**, 375 (1993).
- 11) Y. Esaka, Y. Yamaguchi, K. Kano, M. Goto, H. Haraguchi, J. Takahashi: *Anal. Chem.*, **66**, 2441 (1994).



Capillary electrophoresis of small molecules in high-viscosity polymer solutions.

Chuzo FUJIMOTO* and Hirokazu SAWADA** (*Hamamatsu University School of Medicine, 3600, Handa-cho, Hamamatsu-shi, Shizuoka 431-31; **School of Materials Science, Toyohashi University of Technology, 1-1, Hibarigaoka, Tempaku-cho, Toyohashi-shi, Aichi 441)

Capillary electrophoretic separations of small molecules were examined using highly viscous polymer solutions. The solutions of linear polyacrylamide of $>7\%$ (T), and methyl cellulose and hydroxypropyl methyl cellulose of >10 mg/ml, are of jelly-like consistency. Used in capillary electrophoresis, they resulted in improved separation of the dansyl derivatives of branched-chain amino acids which differ only by 1~2 methylene units in the side chain. With a linear polyacrylamide column, a remarkable change in elution time with variation in the polymer concentration was observed for a certain aromatic compound. Chromatographic separation mechanisms of some kind are responsible for the observed behavior.

(Received August 12, 1994)

(Accepted September 22, 1994)

Keyword phrases

capillary electrophoresis of small molecules in polymer solutions; liquid chromatographic interaction between polymer chains and solutes; capillary electrochromatography using homogeneously packed stationary phases.
