

報 文

生体高分子のポストカラム誘導体化高速液体クロマトグラフィー
における蛍光偏光解消法の有用性

阿部 一智*, 石田 淳一*, 中村 優*, 山口 政俊®*

(1995 年 3 月 20 日受付)

(1995 年 4 月 17 日審査終了)

生体高分子のポストカラム誘導体化高速液体クロマトグラフィー (HPLC) における検出手段としての蛍光偏光解消法の有用性について、基礎的研究を行った。本研究を遂行するために、ラット肝臓ホモジネート中の脂肪酸結合タンパク質 (FABP) のポストカラム HPLC 分析法を利用した。ホモジネート中のタンパク質をゲル浸透カラム (TSKgel G2000 SW_{XL}) クロマトグラフィーにより分離し、カラムからの溶出液にポストカラム試薬 (脂肪酸残基を有する種々の蛍光プローブ) を導入し、生じた蛍光を通常蛍光法及び蛍光偏光解消法で検出した。蛍光偏光解消法は、通常の蛍光検出器に偏光子及び検光子を装着して行った。その結果、蛍光偏光解消法により、遊離型プローブに基づく蛍光は、タンパク質結合型プローブに基づく蛍光に比べ著しく消光した。更に、タンパク質の分子量が大きいほど消光の度合いが小さく、従って相対的に蛍光が大きくなった。これらの結果は、蛍光偏光解消検出法が通常の蛍光検出法に比べ、生体高分子のポストカラム HPLC において有効になりうることを示している。

1 緒 言

生体高分子の高感度分析法として、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)・蛍光検出法が広く利用されている。更に近年、蛍光寿命などの蛍光特性を取り入れ、更なる感度及び選択性の向上を目的とする研究が行われている。蛍光特性の中で蛍光偏光解消を分析化学に利用する研究は、通常の手法による蛍光測定では古くからなされている。これは、遊離の蛍光プローブと巨大分子に取り込まれたプローブの回転緩和時間の違いに基づき、それらのプローブからの蛍光偏光の解消度が大きく異なってくることを利用する方法である。本法は、細胞膜あるいは細胞内の流動性に関する研究¹⁾や、抗原又は抗体の定量²⁾、あるいはタンパク質分解酵素の測定³⁾⁴⁾などに応用され、最近では、レーザーを光源とする免疫測定法⁵⁾にも利用されている。

本研究は、生体高分子の HPLC 分析に蛍光偏光解消法を利用し、感度及び選択性の向上を図ることを目的とするものである。本研究を遂行するために、先に報告したラット肝臓中の脂肪酸結合タンパク質 (fatty acid binding proteins, FABP) のポストカラム蛍光検出法を

利用した⁶⁾。この方法は、ラット肝臓ホモジネートをゲル浸透クロマトグラフィーに付し、カラムからの溶出液に蛍光プローブ (dansyl-ウンデカン酸) 液を合流させ、蛍光をモニターするものである。これは蛍光プローブが FABP などのタンパク質と選択的に結合し、蛍光の増強及び波長シフトすることに基づいている。この場合、クロマトグラムにおけるベースラインは、常時流れているプローブからの蛍光 (ベースライン蛍光) に依存し、ピークはタンパク質と結合したプローブからの増強した蛍光 (ピーク蛍光) に依存している。従って、更に感度を向上するためにはベースライン蛍光を選択的に減少させることが重要である。

このような、生体高分子のポストカラム HPLC 分析において、蛍光偏光解消法を適用した場合、そのベースライン蛍光を決定する遊離型プローブからの蛍光のみを選択的に消光させ、一方、生体高分子に結合したプローブからの蛍光は残光することが期待でき、生体高分子の選択的かつ高感度な検出が可能となるはずである。

検討には、蛍光プローブとして 11-[(5-dimethylamino)naphthalene-1-sulfonyl]amino]undecanoic acid (dansyl-ウンデカン酸), 12-(*n*-methyl)-*n*-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]octadecanoic acid (NBD-ステアリン酸), 1-pyreneundecanoic acid (pyrene-ウンデカン酸),

* 福岡大学薬学部薬品分析学教室: 814-80 福岡県福岡市城南区七隈 8-19-1

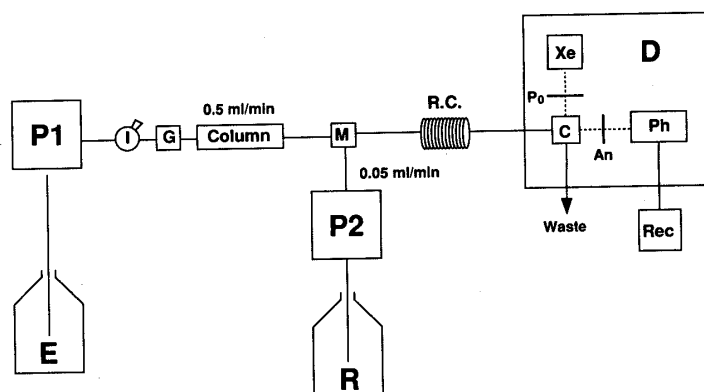


Fig. 1 Schematic flow diagram of post-column HPLC system with fluorescence depolarization detection

P1 & P2: HPLC pumps; I: injection valve (20 μ l); D: fluorescence detector (Hitachi 650-60) (Xe, xenon lamp; C, cell; Ph, photomultiplier; Po, polarizer; An, analyzer); G: guard column (TSKgel SW_{XL}); Column: TSKgel G2000 SW_{XL} (300 $\times$ 7.8 mm i.d.); M: mixing tee; R.C.: reaction coil (PTFE tube, 5 m $\times$ 0.5 mm i.d.); Rec: recorder; E: mobile phase [50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)]; R: Fluorescent probe solution (2 μ M); Flow rates: E, 0.5 ml/min; R: 0.05 ml/min. Conventional fluorescence was measured on a fluorescence detector without polarizer and analyzer. Fluorescence was measured at the excitation and emission maxima described in Table 1 depending on the fluorescent probe used.

11-[*N*-(diethylamino-3-coumarinoryl) amino] undecanoic acid (coumarin-ウンデカン酸), 11-(9-anthroyloxy)undecanoic acid (anthracene-ウンデカン酸) を用いた。

2 実 験

2.1 試 薬

4 種の蛍光プローブ [dansyl-ウンデカン酸, NBD-ステアリン酸, pyrene-ウンデカン酸, coumarin-ウンデカン酸, anthracene-ウンデカン酸] はフナコシ薬品製を入手した。その他の試薬は和光純薬製特級品をそのまま用いた。

蛍光プローブ溶液は, dansyl-ウンデカン酸, NBD-ステアリン酸, coumarin-ウンデカン酸, anthracene-ウンデカン酸についてはメタノールを, pyrene-ウンデカン酸についてはアセトンを用いてそれぞれの 1 mM 溶液を調製し, 更にリン酸塩緩衝液 (50 mM, pH 7.0) で 2.0 μ M に希釈し調製した。

2.2 装 置

遊離型及びタンパク質結合型プローブの蛍光スペクトル測定には日立製 650-60 型分光蛍光光度計及び角型石英セル (1 $\times$ 1 cm) を使用した。スリット幅は, 励起側及び発光側ともに 10 nm に設定した。

高速液体クロマトグラフは, Rheodyne 7125 (20 μ l ループ) サンプルインジェクターを装備した東ソー CCPM を使用した。蛍光プローブ溶液の送液用ポンプとして, 東ソー CCPE-II を使用した。蛍光検出器は, 18 μ l のフローセルを装着した日立 650-60 型蛍光分光光度計を使用した。

本研究に用いた, 単一溶離・ポストカラム HPLC 蛍光検出システムの流路図を Fig. 1 に示す。カラムにゲル浸透型の TSKgel G2000 SW_{XL} (300 $\times$ 7.8 mm i.d.) (東ソー製) を, 移動相に 50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) を用いた。移動相の流量は 0.5 ml/min に設定した。本システムに注入されたサンプル (20 μ l) は, カラムで分離された後, 蛍光プローブ溶液 (流量: 0.05 ml/min) と混合され Table 1 に示す励起及び発光波長で蛍光検出された。

HPLC・蛍光偏光解消検出は, 次の方法で行った。蛍光分光光度計 (D in Fig. 1) の励起光側及び測光側に, それぞれ偏光子 (Po) 及び検光子 (An) (偏光付属装置 650-0156) を装着し蛍光を検知した。偏光子からの直線偏光と平行の角度の蛍光成分のみを検光子により検知する場合を λ_{II} で表し, 同じく垂直の角度の蛍光成分のみを検光子により検知する場合を λ_I で表す。HPLC・通常蛍光検出は, 偏光子及び検光子を装着せずに行った。

Table 1 Fluorescence excitation and emission maxima (nm) of free and protein-bound probes

Probes	λ_{ex}	λ_{em}
Dansyl-undecanoic acid	345 (335)	497 557) [†]
Pyrene-undecanoic acid	345 (334)	379 379)
Anthracene-undecanoic acid	365 (363)	449 456)
NBD-stearic acid	469 (469)	529 553)
Coumarine-undecanoic acid	432 (425)	446 477)

[†] The fluorescence excitation and emission maxima of the free probes are described in parentheses.

2・3 ラット肝臓ホモジネート溶液

アルビノ種ウイスター系雄性ラットのけい部を切断し、直ちに肝臓を摘出する。それを氷冷した 5 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.4) 中でホモジネート (1:2.5, w/v) する。ホモジネート溶液を 10000 g で 30 分間遠心分離し、浮遊脂肪を取り除いた上澄みを HPLC 用サンプルとする。得られたサンプルは 500 μ l ずつに分けて -40°C で冷凍保存する。使用時に自然解凍し、0.45 μ m のセルロースアセテートフィルターを通した後、HPLC に注入した。

2・4 FABP の精製

FABP の精製は Wilkinson and Wilton の方法⁷⁾に準じて行った。上記によって得られたラット肝臓ホモジネート液 10000 g 上澄みを、105000 g で 90 分間遠心分離する。この上澄みを 70% 飽和硫酸アンモニウムで塩析し、更にその上澄みを 10 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.4) で透析する。その溶液を限外濾過 (Amicon YC 05) により濃縮し、10 mM リン酸塩緩衝液 (pH 7.4) で平衡化した Sephadex G-100 カラム (90×2.6 cm i.d.) に付す。脂肪酸残基を持つ蛍光プローブに結合活性のある FABP 分画を集め、30 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) で透析する。その溶液を限外濾過 (Amicon YC 05) により濃縮し、30 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) で平衡化したジエチルアミノエチル (DEAE) セルロースカラム (15×2 cm i.d.) に付し、塩化ナトリウムの 0 M から 150 mM のこう配溶離法により FABP を

溶出する。FABP 溶出液を再び限外濾過 (Amicon YC 05) により濃縮し、精製 FABP 溶液とする。

最終精製物の均一性は、15% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)/ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動での単一バンドの出現、及び HPLC による単一ピークの出現によって確認した。

3 結果と考察

3・1 遊離型及びタンパク質結合型蛍光プローブの蛍光スペクトル

脂肪酸残基を持つ蛍光プローブは、FABP と同様にアルブミンにも吸着し、その蛍光スペクトルが大きく変化する。遊離型及びタンパク質結合型蛍光プローブの蛍光スペクトルを、各プローブをリン酸塩緩衝液 (50 mM, pH 7.0) あるいは飽和アルブミンの同緩衝液に溶かして測定した (Table 1)。pyrene-ウンデカン酸以外のすべての蛍光プローブにおいて、アルブミン存在下で、蛍光スペクトルの青色シフトが観測された。HPLC の蛍光検出はタンパク質結合型蛍光プローブにおける励起及び発光波長で測定した。

3・2 HPLC・通常蛍光検出法によるクロマトグラム

ラット肝臓ホモジネート中のタンパク質をポストカラム HPLC・通常蛍光検出法により測定した。5 種類の蛍光プローブを用いて、通常蛍光検出法により得られたクロマトグラムを Fig. 2 (I~V) の C に示す。クロマトグラム中の波線は、蛍光検出器の測光側のシャッターを閉じ、記録紙を掃引させることにより得られた。波線からベースラインまでの高さ (I_c) は遊離型プローブからの蛍光に、又各ピーク高さ (P_c) は結合型プローブからの蛍光に基づいている (ピーク位置でのプローブは、その一部がタンパク質に結合している。従って、ピーク位置でのベースライン高さは、 I_c よりわずかに低いと考えられる。しかし、結合したプローブの割合は全プローブに比べ極めて小さく、減じたプローブの P_c への影響は無視できる)。いずれのプローブを用いた場合も、主に 3 本のピークが検出された。ピーク 1 の高分子化合物は、標準タンパク質を用いるタンパク質分子量測定法⁸⁾により、分子量 50~70 万の高分子であることが推定された。ピーク 2 は、BSA 標品との co-chromatography により、アルブミン (MW: ca. 66500) であることが確認された。ピーク 3 は、精製 FABP との co-chromatography により、FABP (MW: ca. 14000) であることが確認された。Fig. 2(III) に見られるピーク 4 は、蛍光プローブに pyrene-ウンデカン酸を用いた場合のみ

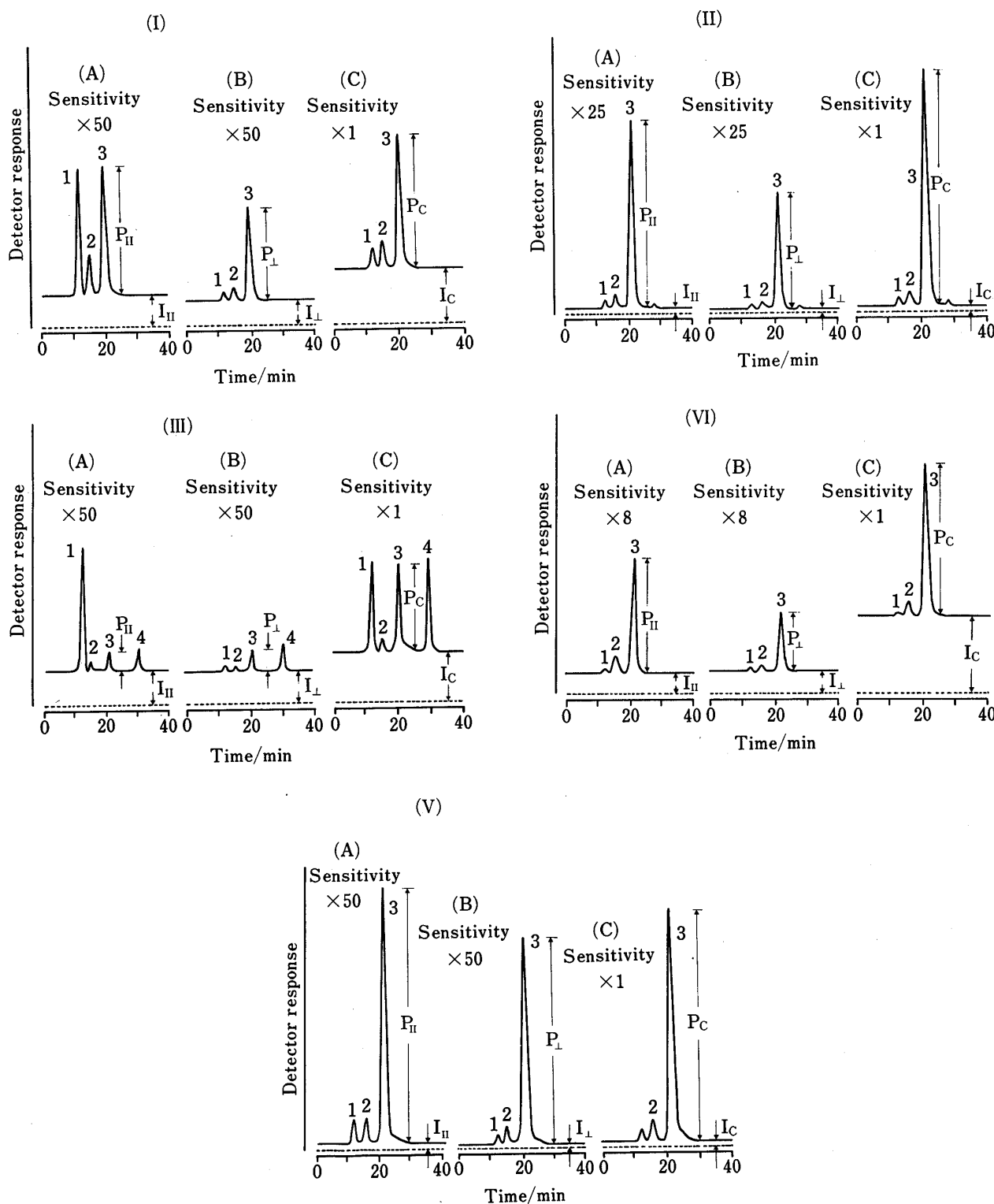


Fig. 2 Chromatograms obtained with rat liver homogenates (10000 g) by conventional and depolarization fluorometric HPLC using various probes

(A): λ_{II} ; (B): λ_{I} ; (C): conventional. Probes: (I), dansyl-undecanoic acid; (II), NBD-stearic acid; (III), pyrene-undecanoic acid; (IV), coumarin-undecanoic acid; (V), anthracene-undecanoic acid. The explanation of dashed line as well as P_C , P_{II} , P_I , I_C , I_{II} and I_I is described in the text.

Table 2 Effect of fluorescence depolarization (λ_{II} and λ_I) on the fluorescence intensity of peak height (P_C , P_{II} and P_I) and baseline (I_C , I_{II} and I_I).

Fluorescent probes and proteins	Dansyl-undecanoic acid		NBD-stearic acid		Pyrene-undecanoic acid		Coumarine-undecanoic acid		Anthracene-undecanoic acid	
	λ_{II}	λ_I	λ_{II}	λ_I	λ_{II}	λ_I	λ_{II}	λ_I	λ_{II}	λ_I
Unknown ^{a)}	11.67 ^{b)}	0.80 ^{b)}	5.14	1.65	2.73	0.10	19.84	2.73	5.28	1.33
Albumin	2.15 ^{b)}	0.90 ^{b)}	4.28	1.88	1.29	0.34	11.42	4.39	3.66	1.42
FABP	1.61 ^{b)}	1.17 ^{b)}	3.16	1.98	0.83	0.53	11.30	4.90	2.38	1.80
Fluorescent probe	1.52 ^{c)}	1.48 ^{c)}	2.86	2.39	0.56	0.57	3.49	3.68	1.67	1.90

a) Unknown macro-molecular compounds. b) P_{II} (or P_I)/ $P_C \times 100$ (%), c) I_{II} (or I_I)/ $I_C \times 100$ (%)

に観察されるものであるが、何に由来するのかは不明である。

3・3 HPLC・蛍光偏光解消検出法によるクロマトグラム

ラット肝臓ホモジネート溶液 (10000 g) を HPLC・蛍光偏光解消法により λ_{II} 及び λ_I で測定したとき、Fig. 2 (I~V) のそれぞれ A 及び B のクロマトグラムが得られた。検討したすべての蛍光プローブにおいて、 λ_{II} 及び λ_I におけるベースライン蛍光 (それぞれ、 I_{II} 及び I_I) は、通常蛍光検出で得られるそれ (I_C) の 0.5~3.7% に減少した (Fig. 2, Table 2)。一方、タンパク質の種類により異なるが、一般に、 λ_{II} における各ピーク高さ (P_{II}) は、通常蛍光検出で得られるピーク高さ (P_C) の 3~20% 程度に減少しただけであった。すなわち、結合型プローブの蛍光が比較的多く残光し、遊離型プローブの蛍光がほとんど消光した。又、分子量の大きいタンパク質ほど λ_{II} でのピーク高さが相対的に高くなった。逆に、 λ_I における各ピーク高さ (P_I) は、通常蛍光検出での各ピーク高さ (P_C) に比べて、0.1~4.9% に著しく減少し、タンパク質の分子量が大きいほど消光した。これらの事実は分子の大きさ (分子量) に基づく回転緩和時間の違いが、偏光解消の度合いに影響を与えたためと考えられる。

以上のように、 λ_{II} における蛍光偏光解消法により、生体高分子であるタンパク質に結合した蛍光プローブからの蛍光が多く残光し、結合していない蛍光プローブからのそれがほとんど消光した。従って、クロマトグラム上のベースライン蛍光が、ピーク蛍光に比し選択的に小さくなった。これは、検出器の光電子増倍管の感度を増倍することにより、ピークの高さを選択的に増幅することが可能になることを意味する。又、測定対象である高

分子の分子量が多いもの、すなわち、分子の回転緩和時間が長いものほど、蛍光偏光解消法の効果が大きく現れた。以上の結果は、HPLC・蛍光偏光解消検出法が生体高分子の高感度測定に有効であることを示している。

しかし、通常の蛍光検出器の光源であるキセノンランプは出力が小さく、又、偏光子、検光子の使用により、光源からの光量は更に小さくなる。従って、この蛍光を検出するために、光電子増倍管の感度を高める必要があり、このためベースラインのノイズが大きくなり、 S/N (ピーク高さ/ノイズ幅) 比が小さくなった。すなわち、通常の蛍光検出器を用いる限りは蛍光偏光解消法の有用性は十分に発揮されない。最近、HPLC 用レーザー蛍光検出器の光源として、アルゴンレーザーやヘリウム/カドミウムレーザーの開発が進み、市販されている。レーザー光源の特長である強出力性、集光性及び偏光性は、従来の光源の欠点を補う可能性を持っていると考えられる。すなわち、光源からの光量が大きくなるため、光電子増倍管の感度を下げて測定することが可能になる。従って、ベースラインのノイズ幅が小さく、 S/N が大きくなり測定感度の向上が期待される。今後、これらのレーザー光源を用いる蛍光偏光解消検出器の開発が大いに望まれる。又、偏光度に影響するもう一つの因子として蛍光寿命がある。特に遊離及び高分子に結合したときの蛍光プローブの蛍光寿命に差がある場合、蛍光偏光解消検出に与える影響は回転緩和時間との関係で複雑となる。従って、これらのナノ秒単位での定量的解析が必要となる。それぞれの蛍光プローブの蛍光寿命及びタンパク質と結合した蛍光プローブの寿命については、その測定に特殊な装置が必要なため、今回は測定できなかった。寿命との関係が検討できると、特定の高分子化合物に対する適切な蛍光プローブの選択が可能になると考えられる。又生体中には DNA と蛍光性インターカレーターの関係など、HPLC・蛍光偏光解消検出法が適用可

能な高分子が多く存在する。これら生体高分子の分析への本法の適用が期待される。

文 献

- 1) M. Sinitzky, M. Inbar: *J. Mol. Biol.*, **85**, 603 (1974).
- 2) W. B. Dandliker: "Immunochemistry of Proteins", Vol. 1, Edited by M. Z. Attassi, (1977), (Plenum press, New York).
- 3) H. Maeda: *Anal. Biochem.*, **92**, 222 (1979).
- 4) K. Kinoshita, H. Maeda, H. Hinuma: *Anal. Biochem.*, **104**, 15 (1980).
- 5) 小林吉晴, 佐伯奈美, 西口嘉乃, 渡邊富久子, 宮井潔: *臨床化学*, **19**, 322 (1990).
- 6) M. Yamaguchi, K. Wada, J. Ishida, M. Nakamura: *Analyst* (London), **117**, 1859 (1992).
- 7) T. C. I. Wilkinson, D. C. Wilton: *Biochem. J.*, **238**, 419 (1986).
- 8) G. D. Swergold, C. S. Rubin: *Anal. Biochem.*, **131**, 295 (1983).



The usefulness of fluorescence depolarization detection for postcolumn high-performance liquid chromatography of biopolymer. Kazutomo ABE, Junichi ISHIDA, Masaru NAKAMURA and Masatoshi YAMAGUCHI (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University, 8-19-1, Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka 814-80)

The usefulness of fluorescence depolarization detection for postcolumn high-performance liquid chromatography (HPLC) of biopolymer was investigated using the postcolumn HPLC method for the determination of fatty acid binding proteins (FABP) in rat liver homogenates. Proteins including FABP in rat liver homogenates were separated by gel-permeation column (TSKgel G2000 SW_{XL}) chromatography. The eluate from the column was mixed with a solution of a fluorescent probe having a fatty acid residue, and monitored by conventional and depolarized fluorescence detection. The latter was performed on a fluorescence detector equipped with a polarizer (excitation unit) and an analyzer (emission unit). The fluorescence of the free probe was remarkably decreased compared with that of the protein-bound probe which fluoresced more intensely with increasing molecular weight of the binding proteins. This indicates that fluorescence depolarization detection is useful for the selective and sensitive post-column HPLC of biopolymer.

(Received March 20, 1995)

(Accepted April 17, 1995)

Keyword phrases

fluorescence depolarization; postcolumn-HPLC; biopolymer; detection.