

生体成分の微小重力下での電気泳動による分離条件の確認

代表研究者：黒田 正男 (大阪大学医学部)
協同研究者：田中 達哉 (大阪大学医学部)
 魚住 光郎 (大阪府立公衆衛生研究所)
 和田 博 (大阪大学名誉教授)
 田川 邦夫 (大阪大学名誉教授)

要 旨

宇宙環境すなわち微小重力環境を利用して、新たに開発された無担体電気泳動装置により、いくつかのタンパク質の分離を試み、その分離能力の違いを地上と比較するための実験を行なった。

軌道実験は電気泳動装置の吸光度検出器の異常により一部の実験は中止されたがその他は予定のスケジュールで行われ無事終了した。

実験に使用したサンプルはタンパク質の混合溶液（2種類と3種類の混合溶液）を使用した。吸光度データが地上に送信されなかったため、宇宙での予備実験を省略して、本実験を2回行ない、泳動された試料の分画を分取し、冷蔵庫に保管して回収した。

帰還後、分取試料は我々の実験室に搬送され、各種解析を行ない、地上と微小重力下との分離能の比較を行なった。この結果、決定的に分離能が良くなったかどうかの判断は難しいが地上実験の結果とは明らかに様子が違うことが推定できた。これは地上では熱対流や拡散による乱れ等が消滅とまでは言えないが影響が少なくなっていることが想像できるものである。

本実験から微小重力における電気泳動の分離能力が地上に比して決定的に優れているとは言い切れない。さらに宇宙実験を重ねるとともに、装置の改良等を行ない、泳動槽内の緩衝液ならびに試料の流動や熱の分布状態、あるいは電気浸透などに関する解析が必要である。

序 論

従来から酵素、ホルモンを始めとして各種生体成分の分離分析および精製の方法は、数多く開発されてきた。電気泳動法もそのひとつで種々な装置が考案され、利用されている。しかし、電気泳動による方法では大量の物質を高純度でしかも収量よく分取し、精製する装置およびその方法は確立されていない。

そこで我々は宇宙環境、すなわち微小重力下におけるいくつかの条件を利用し、

地上では分離困難な各種生体成分の分離手法を開発するため、各種泳動条件を地上と微小重力下とで比較検討するものである。

電気泳動装置としてはフリーフロー電気泳動と呼ばれる無担体連続電気泳動装置(free-flow electrophoresis)を使用する。この無担体連続電気泳動装置はいくつかの種類があり市販もされているがいずれの場合も電場をかけるため、発生するジュール熱に起因する試料溶液の対流により分離帯が乱れ、分離能に限界がある。そのため分離槽の冷却を厳密に行なう必要がある。さらに熱対流による影響を少なくするため分離槽の厚みが制限され、処理能力が劣るなど問題点が非常に多く、応用面で制限があった。

しかし、無重力状態では濃度差による試料の浮遊や沈降、あるいはジュール熱による対流が無視出来ることを利用し、地上では分離困難な各種生体成分の分離を試みるものである。

この種の実験は米国をはじめ、諸外国で古くから行われている。(表1参照) 1975年のアポロソユーズ計画においてはフリーフロー装置による電気泳動を実施し、組織から得た細胞、リンパ球などの分離を試みた。その結果から、地上で得られた結果と比較して分離が向上したと結論された。この実験は吸光度の測定を行なったのみで、分画を分取しなかった。

年	飛行計画		分離対象物
1971	Apollo-14		染料・ヘモグロビン・DNA
1972	Apollo-16		
1973	Apollo-17		粒径の異なるポリスチレンラテックス
1975	Apollo-Soyuz	ASTP-MA-011	赤血球、リンパ球、腎臓細胞
//		ASTP-MA-014	//
1981	Space-Shuttle	STS-3	赤血球、腎臓細胞
1982		STS-4	ラテックス球製造
//		STS-5	人の肝臓と腎臓細胞の処理
1983		STS-8	犬脾臓細胞から β 細胞の分離
//	Space-Lab	SL-3	インターフェロン、 α トリプシン、表皮成長因子、抗血友病因子等

表1 諸外国で過去に実施された宇宙電気泳動実験

スペースシャトル (Space-Shuttle 1983) STS-8では腎臓組織、脳下垂体から得た細胞を分離した。回収した細胞分画を培養し、前者においてはウロキナーゼの生産能、後者においては成長ホルモンの生産能について解析を行ったとの報告である。腎臓細胞の泳動結果は、地上で行った実験に比べ広範囲にわたっていたが、ウロキナーゼ生産能はそのうち僅かの分画にとどまっていることが判明した。脳下垂体の泳動結果もほぼ同様の結果が得られていた。しかし、特に腎臓細胞の泳動結果は、細胞の打上げ、保存の条件によって細胞が変性した結果、地

上での泳動結果に比較して分布が広がった可能性があることも指摘された。

従って微小重力が電気泳動の分離能の向上に直接関与したか否かについては明確な結果が得られているとは言えない。微小重力条件が、電気泳動の分離能に有利であることを実証するためには、分離する対象試料の電氣的、あるいは化学的な性質が明確であり、標準試料として、扱いえるようなものを選択し、かつまた泳動槽内の緩衝液の流動状態、電気浸透なども解析できるような実験系を選択して実験を実施することが極めて重要であると考えられる。

しかし、宇宙実験の機会が頻繁に与えられることはないので、このような要求を満足するだけの予備実験を繰り返すことは極めて困難である。

最近ではスペースラブ (Space-Lab 1983) S L - 3 ではインターフェロン、表皮成長因子、その他の分離についても実験が行われたとの報告もある。このように過去にいくつもの実験が行われているが何れの場合も結果の詳細および装置とその実験条件などの詳細が報告されていない。

そこで我々は新たにフリーフロー電気泳動装置を開発し、各種タンパク質の混合溶液を分離し、その条件を検討し、地上では分離困難な各種生体成分の分離手法の開発を行い、将来医薬品の精製 (純化) とその製造に応用できる可能性を検証するために実施するもので科学的な意義が非常に高いものである。

実験試料及び方法

実験試料

今回の実験目的は各種タンパク質による分離条件の検討である。このことから我々は調整が容易で、安定性および保存性に優れ、しかも数種類の混合試料を使用するため pH の違いによる易動度が違うものであること。また分光分析による吸光度測定が容易でリアルタイムで分離能の検討が行える試料であること。このような条件を考慮し、最終的には下記の試料を用いて今回の軌道実験を実施することとなった。なお、これらは全て市販のものを使用した。

1) Cytochrome C

馬心臓 / 心筋 (From Horse Heart) pH 10.1 (中性で + 荷電)

2) Conalbumin

鶏卵白アルブミン (From Chicken White) pH 6.4 (中性で - 荷電)

3) BSA (Bovine Serum Albumin)

牛血清アルブミン (From Bovine Serum) pH 4.8 (中性で - 荷電)

緩衝液

電気泳動に使用される緩衝液は古くから種々のものが試みられ、開発されてきた。我々も地上予備実験ではさまざまな緩衝液 (例えばトリスバッファー、トリ

スーグリシンバッファー、その他数種類)をテストし、比較検討を行なった。

フリーフロー電気泳動では電場をかけるため発生するジュール熱により、泳動槽内の温度が急激に上昇する。この温度上昇は分離能力に様々な影響を与えるため、緩衝液の選択とpHの調整が非常に重要である。

このことから我々も槽内の温度上昇と易動度の関係を様々な角度から検討した。その結果、トリエタノール酢酸バッファー (pH7.5近辺) が最善であるとの結論からこれを用いることに決定した。

電気泳動装置

装置は新しく宇宙開発事業団が開発したフリーフロー電気泳動装置を利用した。泳動槽は100mm(length)×60mm(width)×4mm(thickness)で、分画すなわち分取数は60本である。

この装置の大きな特徴は泳動槽の槽厚を4mm(thickness)としたことにある。これは試料および溶媒を出来る限り多く流し、将来の大量処理を考慮したものである。なお、一般に地球上で利用されている市販のフリーフロー装置は槽厚が0.5～0.9mmであるのでこれに比べ、5倍近くの処理量が期待できるものである。

緩衝液容器の容量は1000mlで、試料及び緩衝液は泳動槽上部から注入し、分離した試料は泳動槽下部に取り付けたシリンジポンプに吸引され、泳動終了後、分取バッグに回収される。

泳動パターンの計測は泳動槽下部に設けられた測光窓にキセノンランプによる紫外線(280nm)をオプティカルファイバーで照射し、反対側に取り付けた光電変換素子により検出し、吸光度を測定する。

このデータは地上にリアルタイムで送信され、地上表示装置で監視できる。地上では研究者がこのデータから分離の状況を監視し、泳動条件の変更や分取範囲を決定し、軌道上の搭乗科学者へ指示し、実験を進行させる。

試料注入速度、緩衝液速度、負荷電圧と電流、槽壁の温度、および泳動試料の吸光度などの経時変化は全て記録され、飛行後の解析に利用される。

実験条件

我々の研究テーマは様々な条件下での分離状態の確認であることから次の様な各パラメータの変化による宇宙実験を提案した。

- 1) 試料濃度の違いによる分離能の比較検討。
- 2) 試料・溶媒の流速の変化による分離能の比較検討。
- 3) 泳動電圧の変化による分離能の比較検討。

以上のような各パラメータの違う数回の実験を行い、データを取集する予定で計画を立てた。しかし実験装置の都合上、例えば溶媒タンクの容量、試料容器の容量と本数、分取試料の保存用冷蔵庫の容量、あるいは泳動装置で利用できる電力容量、などの多くの制限を受けたため最終飛行実験計画は表2の様に決定した。

実験回数／条件	予備泳動 1	予備泳動 2	本泳動 実験 1	予備泳動 3	本泳動 実験 2
試料	Cytochrome C			Cytochrome C	
	BSA			BSA	
／濃度	50mg/ml(each)			Conalbumin 30mg/ml(each)	
溶媒（緩衝液）	Triethanolamine/Acetate 10mM (pH7.5)				
溶媒流速（cm/min）	6	3	6	3	3
試料流速（cm/min）	5	2	5	2	2
泳動電圧（V）	0	200	200	400	200
吸光度スケール（0-1）	1	1/4	1/4	1/4	1/4
溶媒送液時間（min）	5	10	7	10	14
分取数	-	-	15	-	25

表 2 実験計画書の軌道実験

実験結果

我々が最終的に提案した泳動実験は（表 2）の条件による計 5 回の実験予定であった。しかし、装置の検出器が不調（原因不明）のため吸光度データが地上に送信されなかった。従って予備泳動はすべて中止し、実験回数が（表 3）のように縮小して行なわれた。

実験回数／条件			本泳動 実験 1		本泳動 実験 2
試料	Cytochrome C BSA			Cytochrome C BSA Conalbumin	
／濃度	50mg/ml(each)			30mg/ml(each)	
溶媒（緩衝液）	Triethanolamine/Acetate 10mM (pH7.5)				
溶媒流速（cm/min）			6		3
試料流速（cm/min）			5		2
泳動電圧（V）			200		200
吸光度スケール（0-1）			1/4		1/4
溶媒送液時間（min）			7		14
分取数			15		25

表 3 実施された軌道実験と条件

本来、実験手順書では地上にリアルタイムで送信されてくる吸光度データを観測し、予備泳動1では泳動電圧を加えずサンプルの流れの状態、並びにサンプル注入位置と分取容器の位置の確認。

予備泳動2では電場を与え、分離能の確認を行なった上で本実験1を行なう計画であった。

さらに、予備泳動3では泳動電圧を装置の限界近くまで上げて、最大分離能の確認を行ない、本実験2を実施する予定であった。しかし、吸光データを地上で確認することができず予備泳動を全て中止し、本実験のみを行なった。

また、本実験1においては分取容器(No.33)を搭乗科学者が付け忘れたとの報告である(これについてはクルーと地上との交信で確認されている)。これは分離ピークと思われる重要な位置のため大変残念である。なお、この分取容器の位置すなわちNo.33に分取するはずのサンプルは前後のフラクション、すなわちNo.32とNo.34の容器に分散されているものと考えられる。

回収されたサンプルは帰還後、我々の研究室に届けられ、各種分析を行なった。サンプルの解析手段は様々な方法が考えられるが一般的でかつ確実な方法として、SDS-ポリアクリルアミドゲル(SDS-polyacrylamide gelelectrophoresis)電気泳動法を用いたタンパク質の分離・検出法がある。我々もこの方法で解析作業をして分離能の検証を行った。

その結果を図1、図2に示す。この各図は同一条件での地上実験と宇宙実験との比較である。

図1は本実験1の結果で、2種類の混合タンパク質(Cytochrome C - BSA)を分離したものである。上段の二つは同じ条件で飛行前に実施した地上実験のものである。宇宙実験での分離能向上については特に顕著な結果が見られないが裾の広がりを見た場合、明らかに少なくなっている。これは微小重力下では拡散等が減少しているためと考えられる。なお、Fraction No.33は前述の通り欠落している。

図2は本実験1にさらに1種類のタンパクを加えた3種類の混合タンパク質(Cytochrome C - BSA - Conalbumin)を分離したものである。これも分離についての結果の判断は難しいところであるが、地上実験では泳動槽の槽厚の影響で、裾が非常に広がり、ある程度は分離しつつあるが分離ピークは判別できない。しかし、宇宙実験では分離ピークについては地上と同じように判別できないが実験1よりもさらに裾の広がりには少なくなっている。なお、この3種類タンパクの混合での飛行前の地上実験は一例のみである。

ただ、何れの場合も分離能を確認するところまでにはっていない。これについて考えられることはもう少し、泳動条件すなわちサンプル流速あるいは溶媒の流速を遅くしたり、泳動電圧を少し変えて様子を見れば分離が更に良くなるものと想像できる。

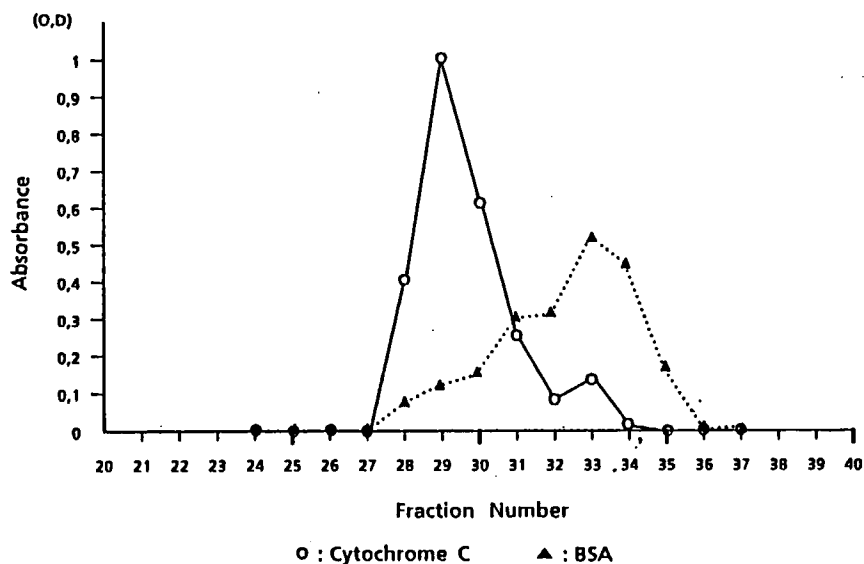
考 察

宇宙環境での無担体連続電気泳動装置(free-flow electrophoresis)による実験は終了した。この実験からだけでは宇宙環境における電気泳動の分離能が地上と比較して決定的に優れているかどうかの判断は非常に難しい。

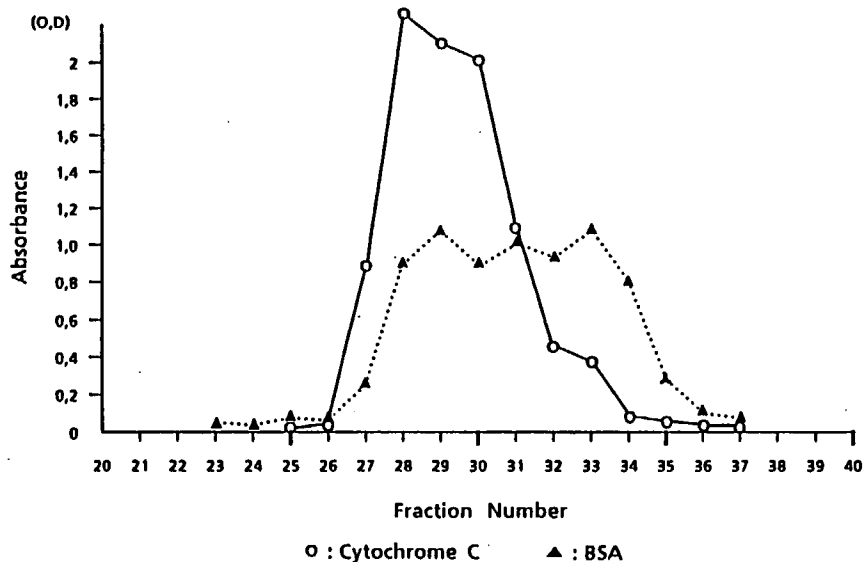
これは今回の第一次材料実験において電気泳動実験に使用できる時間が短いことから実験回数が制限されたこと。また、多くの制約ため様々な条件でのデータが得られなかったこと。さらに、使用したフリーフロー電気泳動装置の開発が非常に遅れ、我々が地上実験で十分評価する機会がなかったことによるものである。

しかし、理論上では多くの利点があり、さらに装置の改良と宇宙実験を重ねることにより好結果が期待できるものと思われる。

地上実験(1)



地上実験(2)



宇宙実験

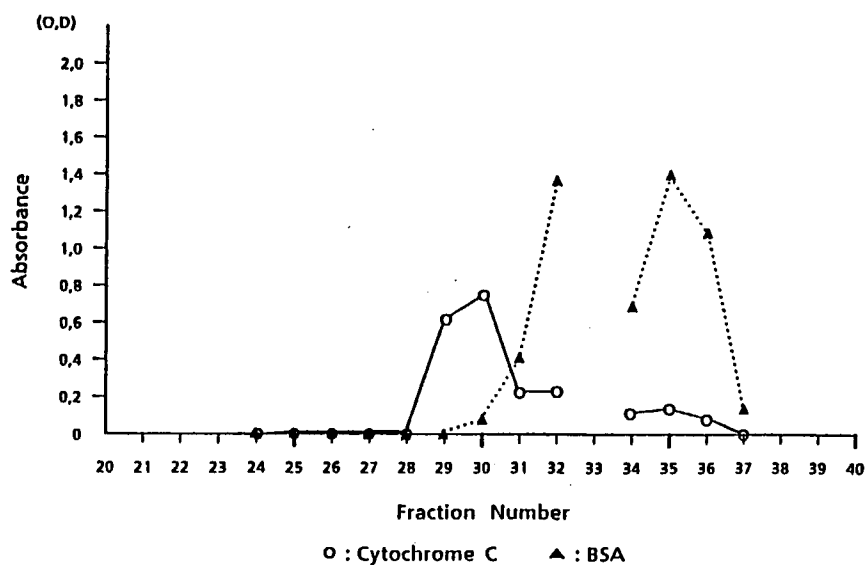
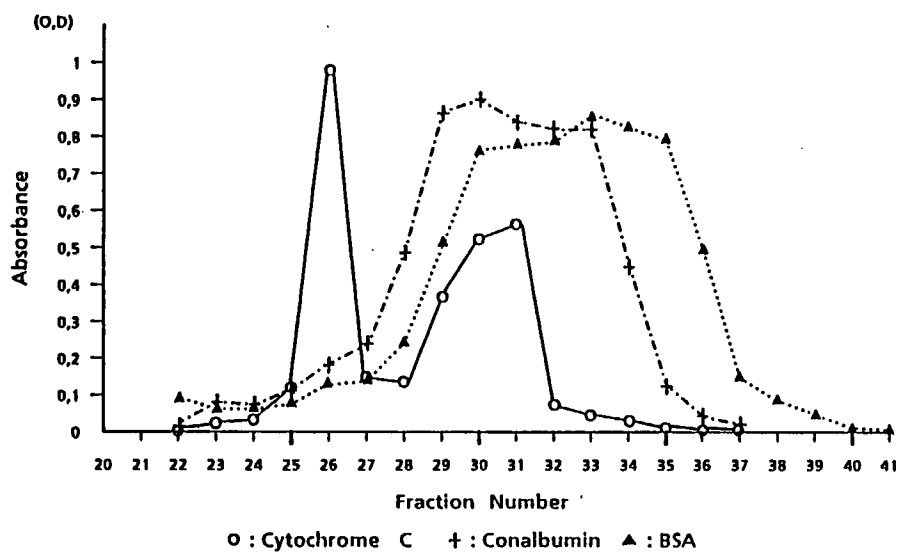


図1 2種類混合タンパクの分離結果

地上実験



宇宙実験

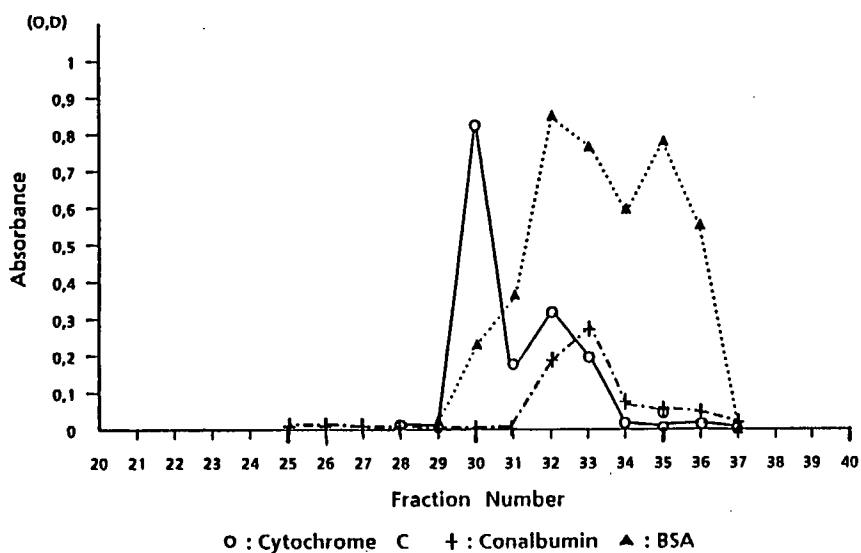


図2 3種類混合タンパクの分離結果