

ゲル濾過法によるクロレラタンパク質 の分画について

亀井光子*

Studies on Fractionation of Proteins of *Chlorella ellipsoidea* by Gel Filtration

Mitsuko Kamei

I. はじめに

デキストランの架橋重合体であるセファデックスは1959年、スウェーデンの Porath, Flodin¹⁾ によって初めて“ゲル濾過法” (gel filtration) として応用された。以来この“分子篩” (molecular sieving) 効果が分析や調製の一手段として生化学的研究分野で広く利用されて来た。たまたま国内留学の際、京都大学農学部食品工学科栄養化学研究室において、セファデックスによるクロレラ分離タンパク質の分画を試みたので、2, 3の実験例を報告する。

II. 実験

最初に次の(II-I ~ II-III)一般操作^(2~4)を行なった。

II-I. ゲルの選定

市販品セファデックスは G-10~G-200*¹ まで10種以上もあるが、研究目的に適したものを選び出さねばならない。ゲル選定の基準はゲルに試料を添加した場合の固定相と、移動相に対するKd (分配係数) に差のあるものを選ぶのが望ましいとされている。本実験では、試料のタンパク質の分子量が不明であるので、Sephadex G-25 (fine), G-100, G-150の3種を選んで、予備的試験を行なった。

II-II. ゲルの前処理

Sephadex G-25 (fine), G-100, G-150の3種を

各々ビーカーに取り、十分量の蒸留水を加えてガラス棒またはマグネチックスターラーで攪拌し放置後上澄をデカンテーションする。この操作を数回くり返す。膨潤にはG-25 (fine) が数時間、G-100及びG-150は48時間以上を要する。膨潤後実験に使用する緩衝液でbuffer change を行う、G-150はG-25 (fine), G-100に比較して気泡が出来やすく必要に応じてビーカー中のゲルをよくかきまぜ気泡を除去した。

II-III. ゲルの充填

カラムは Pharmacia 社製1.5×30cm, 2.5×45cm, 1.5×90cmの3種を用いた。最初にカラムを垂直に固定する。(その簡単な点検法として錘りのついたひもをたらしめてみるとよい。) 次にカラムの下端を閉じカラムの約 $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{2}{3}$ 程度の緩衝液を入れ、前処理したゲルを稀釈して粘度を低下させスポイド又は注射器で少量ずつ加える。この場合G-100が比較的均一に充填しやすいのに対して、G-25 (fine) は沈着が早く不均一になりやすいからガラス棒で攪拌しつつ充填する。G-150は気泡が出来やすくまた軽いのでゲル表面を水平に保つのに細心の注意を要した。流速は試料を流出する場合と同じ条件に保つのが望ましく図1に示すように、流出管の高さ及び緩衝液の高さを調節することで圧力を適度に保つ。流速が大きすぎると分離能を低下させ、ゲルベッドを圧縮しかえて流速の低下をまねくおそれがある。G-100の場合ポンプで一定の圧力を加えたが流速が低下したので、自然流出の状態の下端のコックの開閉と緩衝液の上下で流速を調節した。ゲルの充填を終了したカラムは、これを安定させるためカラム容積の5~10倍の緩衝液を流出させる。

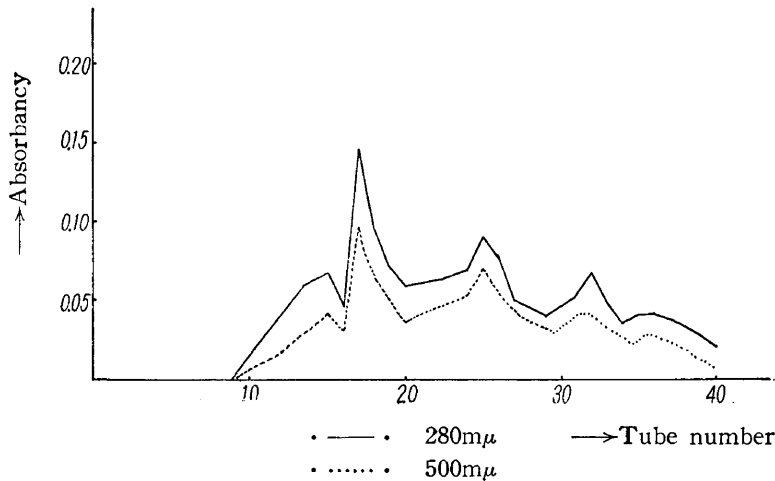
* 本学生物化学研究室

*1. 最近、Sephadex G-200 では分画出来なかった高分子量範囲の物質の分画用として“Sephacrose”が出ている。

Sample : 3.5ml
 Eluant : 0.1 M borate-NaOH-2M urea buffer
 solution, pH 10
 Flow rate : 12ml/hr.
 Tube volume : 5ml

で溶出し図3.に示す結果を得た。この値も前者と同じく測定値が誤差の範囲を出なかったため、Sample量1~5 ml, 流速 8~25ml/hr. の諸条件で同様に溶出を試みたがいずれも不成功であった。この原因は溶媒の性質及び Sample がかなり高粘度のため⁽¹¹⁾ 拡散がおさえられ、移動相と固定相との交換がさまざまに分離効果が低下したものと考えられる。

図3 Sephadex G-100によるクロレラ分離タンパク質の分画



(B) 実験(A)の結果にもとづき、溶媒をかえ、次の様な調製⁽¹²⁾を試みた。

- Freeze-dried Chlorella
 - soaked in 10 volume of mixed solvent (methanol 4 : hexane 3)
 - centrifuged
- Decolorized Cells
 - soaked in 20 volume of 8M urea solution (72hr. 30°C)
 - stirred
 - centrifuged (8000r.p.m. × 30min.)
- Supernatant
 - dialyzed against running tap water (24hr.)
 - added 1N-CH₃COOH to make pH4.0.
 - centrifuged (10,000r.p.m. × 50min.)
- Precipitate
 - dissolved in buffer solution
 - dialyzed against buffer solution
- Sample

得られた試料は次に示す2つの条件で溶出した。

- (1) Sephadex G-150
 - Column size : 1.5 × 150cm
 - Sample : 1ml (11.5mg protein/ml)
 - Eluant : glycine-NaOH-2M urea buffer solution, pH10, μ=0.1
 - Flow rate : 10ml/hr.
 - Tube volume : 5ml
- (2) Sephadex G-25 (fine)⁽¹³⁾
 - Column size : 1.5 × 90cm
 - Sample : 1ml (20mg protein/ml)
 - Eluant : glycine-NaOH-2M urea buffer solution, pH10, μ=0.1
 - Flow rate : 10ml/hr.
 - Tube volume : 5ml

Sephadex G-150 を用いたゲル透過では図4.に示したように、クロレラ分離タンパク質は少なくとも2つの分子量的に異なる成分に分画された。Sephadex G-25 (fine) の場合もG-150と同様に2つに分画された(図5)。

同条件で行なった Blue dextran の実験より、Fraction 1 は相当高分子のタンパク質と推定される。Fraction 2は500mμによるタンパク質定量値が低いのに比較して、260mμにかなり強い吸収が見られたことから核酸関連物質を含む⁽¹⁴⁻¹⁵⁾ものと考えられる。

図4 Sephadex G-150によるクロレラ分離タンパク質の分画

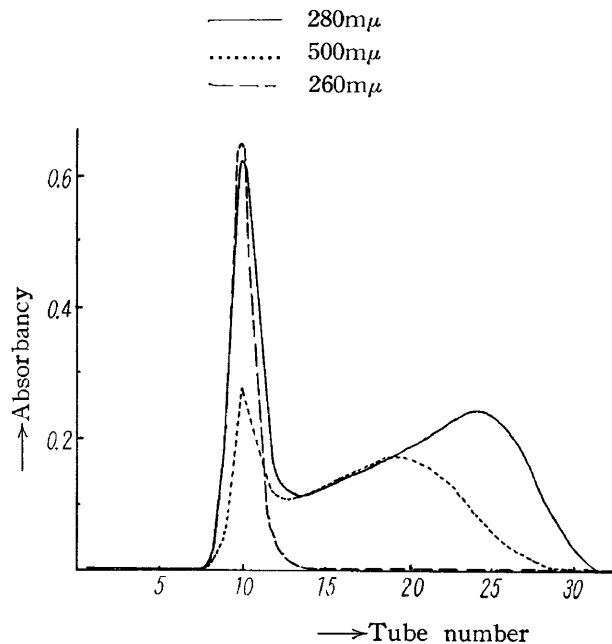
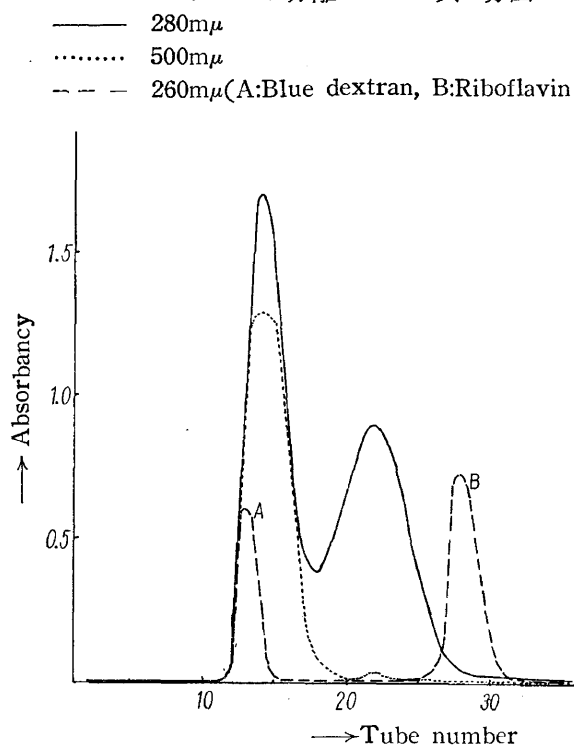


図5 Sephadex G-25 (fine) による
クロレラ分離タンパク質の分画



II-V. ゲルの回収

使用後のゲルは回収し 0.1N-HCl, 0.1N-NaOH 等で洗い、蒸留水で充分洗浄する。湿潤状態に保存する場合はトルエン、フェノールなどを流しておく。乾燥保存する場合は蒸留水で洗浄後ブフナーのロート上で吸引ろ過しながら50%エタノール、90%エタノールで洗い60°Cで加熱乾燥する。

III. おわりに

以上の実験結果より Sephadex を用いたゲル透過法で分離効果をあげるには、次の点を考慮すべきではないかと考える。

- (1) 実験目的に適したゲル及びカラムの選定。
- (2) カラムは垂直に立て、ゲルは均一に充填しゲル内に気泡が発生しないようにする。このためにはゲルの膨潤時とカラムに充填してからの温度差を少なく保つこと及び充填前に脱気し、充填時にガラス棒で攪拌する等の操作が必要である。
- (3) ゲル上面を水平に保ち、Sample はピペットで静かに均一に注入する。Sample 内の気泡は必要に応じて脱気する。
- (4) 流下速度はカラムの内径の大小によって異なるが、やすぎない方がよい。⁽¹¹⁻¹⁶⁾
- (5) Sample 濃度は ⁽¹¹⁻¹⁶⁾ 高くても分離効果を妨げないが、粘度は分離効果に大きな影響を及すので低粘

度の Sample を得るように試料を調製する。

(6) Sample の添加量は一般にゲル容量の $1/10$ 以下が好ましいとされている。しかし分離タンパク質は粘性を有する場合があります、ゲル容量の $1/100$ 以下が妥当で、Sample 添加時にゲルの上面 1 cm 以内の Sample 容量ならば高粘度でない限り分離可能と考える。

(7) 溶媒の pH, μ を考慮し、少量の電解質を含む溶媒で溶出するのがよい。

予備実験の段階で、一般操作法の習得と共に試料の性質を知り、各々の実験目的に最も適した Sample の調製法と溶媒を選定することがゲル透過法による分画の成否を決める要因ではないかと考える。

本研究にあたり、御懇篤な御指導を賜りました京都大学農学部満田久輝教授をはじめ河合、安本両博士ならびに同研究室の方々に深く感謝いたします。また研修費を御援助下さいました私学研修福祉会、京都女子学園育友会ならびに維持会にお礼申し上げます。

文 献

- (1) J. Porath, P. Flodin : *Nature*, **183**, 1657 (1959).
- (2) J. Porath : *Biochim. Biophys. Acta*, **39**, 193 (1960).
- (3) 志村, 吉田 : 化学と生物, **4**, 266, 324 (1966).
- (4) 守屋寛 : ゲル透過法, 広川書店, 1963.
- (5) 田宮博, 渡辺篤 : 藻類実験法, 南江堂, 1965.
- (6) Gornall et. al. : *J. Biol. Chem.*, **177**, 751 (1949).
- (7) G. Pettersson : *Biochem. Biophys. Acta*, **77**, 665 (1963).
- (8) M. Nummi : *Acta Chemica Scand.*, **17**, 527 (1963).
- (9) O. Folin, V. Ciocalteu : *J. Biol. Chem.*, **73**, 627 (1927).
- (10) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- (11) P. Flodin : *J. Chromatog.*, **5**, 103 (1961).
- (12) H. Mitsuda, K. Yasumoto, H. Nakamura : 7th Intern. Congr. Nutrition, Hamburg (1966).
- (13) B. Gelotte : *J. Chromatog.*, **3**, 330 (1960).
- (14) 西土井 : 栄養と食糧, **20**, 190 (1967).
- (15) 岩田, 成川 : 栄養と食糧, **18**, 352 (1966).
- (16) H. Mitsuda, T. Kusano, K. Hasegawa : *Agr. Biol. Chem.*, **27**, 878 (1963).