to 50 ml with water. The absorbance is measured at 608 nm against reagent blank.

(Received May 9, 1983)

Keyword phrases

spectrophotometry of iron(II) with 2,2'-dipyridylketone aminoethylimine; 2,2'-dipyridylketone aminoethylimine-iron(II) complex.

ジエチルアミノエチル-セファデックスを用いた尿素存在下におけるたん白質のイオン交換クロマトグラフィー

門屋 利彦[®], 奥山 典生*

(1983 年 6 月 4 日受理)

イオン交換樹脂としてジエチルアミノエチル (DEAE)-セファデックス A-50 を用いてたん白質のイオン交換クロマトグラフィーにおける尿素の影響, 特にたん白質の高次構造にあまり変化を及ぼさない程度の尿素の存在による影響についての検討を行った. ウシ血清アルブミンを試料として検討を行った結果, 尿素の存在によってたん白質と DEAE-セファデックスとの相互作用は低下し, 尿素濃度 0 から 4 M の間では, 尿素 1 M 当たり塩化ナトリウム 0.02 M に相当した. 又ヒト血清を試料として 2 M 尿素存在下でのイオン交換クロマトグラフィーを行った結果, 大きな影響はみられず, 未変性の血清と同様のイオン交換クロマトグラフィー像を与えることが分かった. 更に 2 M 尿素によって抽出されるグリパ繊維性酸性たん白質などの脳の繊維性たん白質について, 2 M 尿素存在下におけるイオン交換クロマトグラフィーを適用した.

1 はじめに

Palés^らがイオン交換クロマトグラフィーを初めてたん白質に適用してチトクローム c を精製して以来, イオン交換クロマトグラフィーはたん白質の分離・精製において最も重要かつ有効な方法として用いられてきた. 近年では構造たん白質などの不溶性たん白質を尿素を用いて抽出した後, 尿素存在下におけるイオン交換クロマトグラフィーを用いて分離・精製することが試みられている^{2)~5)}. しかし, たん白質のイオン交換クロマトグラフィーにおける尿素の存在による影響についての基礎的な検討は, ほとんど行われていない. そこでイオン交換樹脂としてジエチルアミノエチル (DEAE)-セファデックス A-50 を用い, 免疫グロブリン G と血清アルブミンについて尿素の存在による影響について検討した. 更に血清のたん白質と 2 M 尿素によって初めて抽出される

脳内に存在するグリパ繊維性酸性たん白質 (GFA) などの繊維性たん白質について 2 M 尿素存在下での DEAE-セファデックス A-50 クロマトグラフィーを適用した.

2 実 験

2.1 試 薬

リン酸第一カリウム, リン酸第二カリウム, 尿素, 塩化ナトリウム, エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 (EDTA) は和光純薬製特級を用いた. 電気泳動には, 市販特級あるいは電気泳動用特製試薬を使用した. ウシ血清アルブミン (BSA) は ICN Pharmaceuticals 社製, ヒト免疫グロブリン G (IgG) はミドリ十字社製のものを用いた.

2.2 血清たん白質試料の調製

ヒト血清は正常人血液を 3000×g で遠心分離した上清に等容の 2 M 尿素を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.1, 0.1 mM EDTA を含む) を加え, 更に 25000×g で遠心して得られた上清を用いた.

* 東京都立大学理学部化学科: 東京都世田谷区深沢2-1-1

2.3 脳の繊維性たん白質試料の調製

と殺場で得た新鮮なウシ脳の脳間膜と凝固血を取り除き, 生理食塩水で洗浄した後, 脳重量の4倍容の0.1 M リン酸カリウム緩衝液(pH 7.1, 1 mM EDTA を含む)で磨砕した。ホモジネートを10000×gで30分間遠心し, 上清と沈殿に分離した。得られた沈殿より, 2 M 尿素を含む10 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.1, 1 mM EDTA を含む)を用いてたん白質を抽出した。

2.4 イオン交換カラム

Pharmacia 社の DEAE-セファデックス A-50 {粒子直径 (40~120) μm } を充てんした内径 7.5 mm, 高さ 60 mm のカラム (クロマトグラフィー用ミニカラム, 生化学工業社製セパコールミニ) を用いた。

2.5 DEAE-セファデックス A-50 カラムクロマトグラフィー

開始緩衝液で平衡化した上記カラムにたん白質試料を添加し, ゼン動ポンプを用いて線速度 3.4 cm/h の定流量で開始緩衝液を流した。開始緩衝液でカラムを十分に洗浄した後, 連通管式 (2 槽) 直線濃度こう配作成装置を用いた塩化ナトリウムの直線濃度こう配法によって溶離を行った。流出液はフラクションコレクターにて各 1.5 ml 分取し, 分取した流出液中のたん白質定量は日立 220A 形ダブルビーム分光光度計を用いて波長 280 nm の吸光度を測定する方法によった。

3 結果と考察

3.1 たん白質の溶出に対する尿素濃度の影響

10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.1, 0.1 mM EDTA を含む) で平衡化した DEAE-セファデックス A-50 カラムに同緩衝液を用いて溶解した BSA を添加した後, 尿素濃度を 1 M から 6 M まで 1 M ごとに段階的に上昇させた。最後に 2 M 尿素, 0.5 M 塩化ナトリウムを含む同緩衝液を流した。結果を Fig. 1 に示す。尿素濃度増加の各段階においてたん白質の回収率は (2~7) % であり, 尿素的イオン交換クロマトグラフィーにおけるたん白質の溶出に対する効果は非常に小さいと考えられる。

3.2 DEAE-セファデックス A-50 カラムクロマトグラフィーにおけるたん白質の溶離位置に対する尿素濃度の影響

A 尿素を含まない, B 2 M 尿素を含む, C 6 M 尿素を含む, 3 種類の 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH

Fig. 1 Effect of urea concentration on the elution of protein on diethylaminoethyl (DEAE)-Sephadex A-50 column chromatography

Sample: Bovine serum albumin, Buffer: 10 mM potassium phosphate

7.1, 0.1 mM EDTA を含む) で平衡化した DEAE-セファデックス A-50 カラムと 塩化ナトリウム濃度 こう配法を用いて検討を行った。

塩化ナトリウム濃度を 0 から 0.5 M まで上昇させたことによりカラム長は 6.0 cm から 3.5 cm に短縮する。しかし, 尿素濃度の変化ではこのような現象は認められなかった。

上記の各々の緩衝液に溶解したヒト IgG をカラムに添加した結果を Fig. 2, I-A, I-B, I-C に示す。IgG は尿素を含む系では, ほとんど素通りの位置に溶離されているが, 尿素を含まない系では尿素を含む系よりもその溶離位置はわずかに遅れている。一方, 各々の緩衝液に溶解した BSA をカラムに添加し同緩衝液でカラムを洗浄した後, 塩化ナトリウム濃度を 0 から 0.5 M まで直線濃度こう配法によって上昇させた結果を Fig. 2, II-A, II-B, II-C に示す。BSA は尿素濃度の増加に従って, より低い塩化ナトリウム濃度で溶離された。各クロマトグラフィーにおける緩衝液中の尿素濃度と BSA の溶離位置の塩化ナトリウム濃度との関係を Fig. 3 に示した。破線は尿素濃度 0 での BSA の溶離位置の塩化ナトリウム濃度を示し, 矢印は尿素濃度の増加に伴うそ

Fig. 2 Effect of urea concentration on the elution volume of proteins on DEAE-Sephadex A-50 column chromatography

Sample—I: IgG, II: Bovine serum albumin; Urea concentration (M): A 0, B 2, C 6

Fig. 3 The relation between sodium chloride concentration at elution volume of bovine serum albumin and urea concentration added to eluant on DEAE-Sephadex A-50 column chromatography

---- Assumed concentration of sodium chloride at elution volume without urea; Size of arrows show the decrease of sodium chloride concentration at elution volume corresponding with various urea concentration.

の塩化ナトリウム濃度の減少を示している。BSAの溶離位置の塩化ナトリウム濃度は、尿素濃度0から4Mの間では尿素1Mの増加に対して約0.02M減少していることが分かる。これらは尿素の存在によってたん白質とDEAE-セファデックスとの相互作用が低下することによるものと考えられる。尿素の存在によってたん白質がより低い塩濃度で溶離されることは、6M尿素中でたん白質の等電点が上昇するという報告⁶⁾と一致する。

更に尿素濃度と溶離ピーク幅との関係をFig. 4に示した。ピーク幅は尿素濃度0から(2~3)Mまではほとんど変化なく、4M付近から広がり始めた。またたん白質回収率は、尿素を含まない系では88%、2M尿素を含む系では80%に対して6M尿素を含む系では50%と大きく低下した。これらは、尿素濃度(2~3)M付近まではたん白質はコンホーメーション変化をあまり受けていないが、4M付近からランダムコイル型に変移してゆくことによる影響があると考えられる。

Fig. 4 The relation between urea concentration and the width of the elution peak of bovine serum albumin on DEAE-Sephadex A-50 column chromatography

3.3 血清のたん白質への適用

上述の結果より、2M尿素の存在下でもたん白質はコンホーメーション変化を受けないことが予測されるのでヒト血清のたん白質を用いて2M尿素存在下で尿素非存在下での一般的なイオン交換クロマトグラフィーと同様の結果が得られるかどうかの検討を行った。

2M尿素を含む10mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.1, 0.1mM EDTAを含む)で平衡化したイオン交換

カラムに同緩衝液で2倍希釈したヒト血清 1 ml (35 mg proteins) を添加した。同緩衝液でカラムを洗浄した後、塩化ナトリウム濃度を0から0.5 M まで直線濃度こう配法によって上昇させた。結果のクロマトグラムを Fig. 5 に示す。このクロマトグラフィーにおけるたん白質の回収率は90%であった。又ヒト血清とピーク a (チューブ番号4), ピーク b (同 40), ピーク c (同 50), ピーク d (同 60), ピーク e (同 70) の二次元電気泳動像の主なスポットを図にしたものを Fig. 6 に示す。二次元電気泳動法⁷⁾はマイクロゲルを用いて一次元目に2 M 尿素を含むアクリルアミドゲル等電点電気泳動を行った後、二次元目に(4~17)%アクリルアミドグラジエントゲル電気泳動を行った。二次元電気泳動像では、ほとんどのたん白質スポットについて2 M 尿素による大きな影響はみられなかった。リボタンパクのスポットに変化がみられ

たが、これは血清試料を尿素存在下で遠心したために脂質部分が外れたことによると考えられる。又血清中のアミノ酸化酵素⁸⁾は2 M 尿素中で、活性を保持している。

クロマトグラフィーの各ピークの主なたん白質は、以下のようであった。

ピーク a : IgG

b : トランスフェリン, ヘモペキシン, リボタンパク, アルブミン

c : アルブミン, Gc グロブリン, IgA, α_2 マクログロブリン, IgM

d : ハプトグロビン, α_2 HS 糖タンパク, α_1 酸性糖タンパク, アルブミン

e : プレアルブミン, セルロプラスミン, ハプトグロビン, アルブミン

このクロマトグラフィーにおけるたん白質の溶離順は, Cohn らの方法⁹⁾ による血しょうのエタノール分画 IV の DEAE-セファデックス A-50 クロマトグラフィーを行った Rimón らの報告¹⁰⁾ とよく一致していた。以上の結果より血清のたん白質は2 M 尿素存在下においては大きなコンホメーション変化を受けず、未変性の血清と同様のイオン交換クロマトグラフィー像を与えることが分かった。

3.4 脳の繊維性たん白質への適用

尿素存在下でのイオン交換クロマトグラフィーの適用の重要な例である GFA の場合について記述する。このたん白質は2 M 尿素によって初めて抽出される。そこで2 M 尿素を用いてウシ脳より抽出した GFA, ニューロフィラメントたん白質 (NFP) などの繊維性たん白質に2 M 尿素存在化でのイオン交換クロマトグラフィーを適用した。

2 M 尿素, 0.05 M 塩化ナトリウムを含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.1, 1 mM EDTA を含む) で平衡化したイオン交換カラムにウシ脳の繊維性たん白質試料 7 ml (32 mg proteins) を添加した。同緩衝液でカラムをよく洗浄した後、塩化ナトリウム濃度を0.05 M から0.5 M まで直線濃度こう配法によって上昇させた。結果のクロマトグラムを Fig. 7 に示す。SDS 電気泳動による分析の結果、この条件で GFA 及び NFP はカラムに吸着し、GFA は塩化ナトリウム濃度 0.2 M 付近から溶離され、NFP はそれよりもやや遅れて溶離されることが分かった。又このクロマトグラフィーにおいてたん白質は、ほぼ 100% 回収された。以上のように2 M 尿素による繊維性たん白質の抽出に続く2 M 尿素存在下でのイオン交換クロマトグラフィーは、これら

Fig. 5 Chromatogram of human serum proteins in the presence of 2 M urea

Fig. 6 Diagrammatic representation of two-dimensional electrophoresis of human serum proteins and of the column fractions

s: Human serum proteins, a: Tube No. 4 (peak a),
b: Tube No. 40 (peak b), c: Tube No. 50 (peak c),
d: Tube No. 60 (peak d), e: Tube No. 70 (peak e)

Fig. 7 Chromatogram of bovine brain cytoskeletal proteins fraction extracted with 2 M urea

のたん白質の分離・精製に非常に有効であると考えられる。

4 結 論

たん白質の塩化ナトリウム直線濃度こう配 DEAE-セファデックス A-50 クロマトグラフィーにおいて尿素の存在濃度に応じてそのたん白質の溶離位置での塩化ナトリウム濃度は減少した。その減少量は、尿素濃度 0 から 4 M の間では尿素 1 M 当たり塩化ナトリウム 0.02 M に相当し尿素濃度 4 M 付近から 6 M になるとその減少は直線性を失い、ピーク幅も広がり、たん白質の回収率も減少した。これらの現象はたん白質と DEAE-セファデックスとの相互作用に対する影響及びたん白質の高次構造に対する影響、DEAE-セファデックスの高分子構造に対する影響などのいろいろな面からの考察が可能である。例えば尿素濃度 4 M 付近から 6 M では、たん白質の水素結合、疎水性結合が影響を受け、ランダムコイル型に変移することによる影響が大きく現れることによるものと考えられる。この場合にはカラムの短縮はほとんど観察されない。一方、ここに用いられた 0.5 M 塩化ナトリウムによるカラムの短縮はセファデックスの結合水構造に対する塩化ナトリウムの影響と考えられる。この場合には、たん白質の高次構造に対する影響はほとんどない。ただし、更に高濃度の塩化ナトリウムでは塩析などの影響が現れてくる。

以上のような極端な場合は別として尿素濃度 0 から 4 M の場合には、カラムの短縮、たん白質の変性のような現象はほとんどないので、むしろ分離は DEAE-セファデックスとたん白質との相互作用に対する影響と考えられる。このような影響は、主として疎水性相互作用に対するものが第 1 に考えられる。このような結果は S-100

たん白質 a, b の分離¹¹⁾ の場合のようにアルコールなどの有機溶媒添加の DEAE-セファデックスクロマトグラフィーにみられる影響と同様のものであると考えられる。

以上のことより尿素濃度の変化によってたん白質を溶離する方法やたん白質に大きなコンホメーション変化を与えない 2 M 尿素存在下でのイオン交換クロマトグラフィーは、2 M 尿素によって抽出される繊維性たん白質の分離・精製に非常に有効な手段となると考えられる。

文 献

- 1) S. Paléus, J. B. Neilands : *Acta Chem. Scand.*, **4**, 1024 (1950).
- 2) N. Geisler, K. Weber : *Eur. J. Biochem.*, **111**, 424 (1980).
- 3) E. J. Miller, R. K. Phodes : "Method in Enzymology", Edited by L. W. Cunningham, D. W. Frederikson, **82**, 33 (1982), (Academic Press, New York).
- 4) J. D. Potter : "Method in Enzymology", Edited by S. P. Colowick, N. O. Kaplan, **85**, 241 (1982), (Academic Press, New York).
- 5) R. Liem : *J. Neurochem.*, **38**, 142 (1982).
- 6) R. V. Josephson, S. K. Maheswaran, C. V. Morr, R. Jenness, R. K. Lindorfer : *Anal. Biochem.*, **40**, 476 (1971).
- 7) T. Manabe, E. Hayama, T. Okuyama : *Clin. Chem.*, **28**, 824 (1982).
- 8) S. Suzuki, T. Sakurai, A. Nakahara, O. Oda, T. Manabe, T. Okuyama : *J. Biochem.*, **90**, 905 (1981).
- 9) E. J. Cohn, L. E. Strong, W. L. Hughes, D. J. Mulford, J. N. Ashworth, M. Melin, H. L. Tayler : *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 459 (1946).
- 10) A. Rimón, Y. Shamash : *Biochim. Biophys. Acta*, **121**, 26 (1966).
- 11) T. Isobe, N. Ishioka, T. Okuyama : *Eur. J. Biochem.*, **115**, 469 (1981).

☆

Ion-exchange chromatography of proteins using diethylaminoethyl-Sephadex in the presence of urea. Toshihiko KADOYA and Tsuneo OKUYAMA (Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University, 2-1-1, Fukasawa, Setagaya-ku, Tokyo)

For the purification of cytoskeletal proteins such as glial fibrillary acidic protein (GFA) or neurofilament proteins (NFP), the chromatography of proteins in the presence of urea should be one of the most important step, since those proteins were extracted with 2 M urea from brain tissue. Ion exchange chromatography was performed using a 6.0×0.75 cm I.D. column packed with DEAE-Sephadex A-50 equilibrated in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.1) with or without urea, and linear sodium chloride gradient for elution of proteins. Human IgG, bovine serum albumin (BSA), and human serum proteins were used as

protein samples. In the presence of urea, interaction between ion exchange resin and BSA was reduced. One M urea was equivalent to 0.02 M sodium chloride ion strength. In the case of the presence of 6 M urea, urea had effects on elution patterns of proteins. However, 2 M urea scarcely produced an effect on ion exchange chromatography of human serum proteins. Then, bovine brain 2 M urea extract, which was rich in GEA and NFP was applied to DEAE-Sephadex A-50 column chromatography in the presence of 2 M urea. This system was very useful for the puri-

fication of these proteins.

(Received June 4, 1983)

Keyword phrases

ion exchange chromatography of proteins in the presence of urea; elution of human serum proteins on DEAE-Sephadex A-50 column chromatography; purification of glial fibrillary acidic protein and neurofilament proteins.

マラカイトグリーン-過ヨウ素酸カリウム触媒酸化反応の 誘導期測定による極微量マンガン(II)の吸光度定量

深 沢 力[®], 川久保 進, 望 月 学^{*}

(1983 年 5 月 30 日受理)

高濃度のマラカイトグリーン (MG) 溶液を用い, 水に対し吸光度約 1.8 を示す吸収板を対照液の代わりに用いて, 約 0.2 以下の吸光度変化を測定すると, 過ヨウ素酸による MG の酸化反応はマンガン(II) の存在量に逆比例する誘導期を示し, 誘導期後, 反応は擬零次反応で近似できた. 従って, 一次反応として速度定数を求める既報のように, 吸光度の経時変化を対数プロットする必要もなく, 記録紙上の吸光度の経時変化から, 直接, 簡便に誘導期が求められた. 吸光度変化の測定時間は既報の半分以下の 25 分以内で済み, 更に簡便に (5~200)ng のマンガン(II) が定量できた. 又, 共存イオンの影響も既報より少なく, 特に, 鉄(III) はマンガン(II) の 10^4 倍量まで共存しても差し支えなかった.

1 結 言

マラカイトグリーン (MG)-過ヨウ素酸酸化反応におけるマンガンの触媒作用を利用し, 吸光度法により反応速度定数を求めて, 5 ng 程度までのマンガン(II) を定量する方法を報告した¹⁾. しかし, この方法では反応速度が MG 濃度に比例する擬一次反応として表せる条件下で反応速度定数を求めて定量するため, 吸光度の経時変化を約 50 分にわたり測定したうえ, 各吸光度値を対数プロットする必要がある, 時間もかかり操作も面倒であった. その後種々検討した結果, 高濃度の MG 溶液を用い, 0.2 以下の吸光度変化を精度よく測定するとマンガン(II) の存在量に逆比例する誘導期が現れ, 反応は零次反応で近似できた. 誘導期の測定も吸光度変化を

記録した記録紙上で簡単に測定でき, 短時間にマンガン(II) の定量ができた. 本法は, 反応速度定数を用いる既報¹⁾の方法に比べて, 簡単, 迅速であるうえ, 共存イオンの影響も一層少なく, 同程度までのマンガン(II) を定量できた.

2 実 験

2.1 試薬及び装置

マンガン(II) 標準溶液 (500 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$): 金属マンガン (99.99%) 125 mg を硝酸に溶解し, 9 mol dm^{-3} 硫酸 1.4 cm^3 を加えて加熱, 酸化窒素を追い出し希釈し 250 cm^3 としマンガン(II) 標準溶液とした. これを使用の都度水で希釈し, 0.05 μg マンガン(II) cm^{-3} として用いた.

MG 溶液: 和光純薬工業製マラカイトグリーン (シュウ酸塩) 102 mg を水に溶解し 100 cm^3 とし原液とした (2.20×10^{-3} mol dm^{-3}). これを更に水で希釈し,

* 山梨大学工学部応用化学科: 山梨県甲府市武田4-3-11