蛋白質の electrofocusing (電気泳動的等電点分画) 法

寺 村 貞, Tei TERAMURA

京都大学農学部農林生物学科

武藤 尚志, Shoshi MUTO

名古屋大学農学部農芸化学科

よく知られているように、蛋白質は両性電解質 (amphoteric substance, ampholyte) であり、ある特定の pH では正負両電荷の和、すなわち実効電荷がゼロになり、電場におかれたときいずれの電極へも移動しない。この特定の pH はその蛋白質の等電点 (isoelectric point, pI) と呼ばれ、蛋白質はそれぞれに固有の等電点を持っている。等電点の差を利用して蛋白質を電気運動的に分離あるいは分析しようとする試みは古くからなされているが、最近、Svensson と Vesterberg⁽¹⁾ によって “carrier ampholyte” と称する特殊な両性電解質を用いる方法が確立された。この新しい方法は (electrofocusing あるいは isoelectric focusing) と呼ばれる。Electrofocusing には、溶液中で行なう方法とポリアクリルアミドゲルなどの支持体を用いる方法とがあり、前者は蛋白質標品の分離、精製および分析に用いられ、後者は少量の試料を用いての分離あるいは分析を目的とする場合に適している。本稿では、両者について実験方法を中心に解説を試みる。なお、electrofocusing については、すでに松尾と堀尾⁽²⁾ によるすぐれた解説がある。

I. 支持体を用いない方法

Carrier ampholyte は、種々の pH に等電点を持つ脂肪酸族ポリアミノポリカルボン酸の混合物である。この水溶液の両端に電極をおき電流を通じる (electrolysis する) と、陽極から陰極へかけて pH が徐々に増加してゆく層 (pH 勾配) が形成される。この際、溶液中に蛋白質を共存させておくと、蛋白質は個々の等電点と同じ pH 層のところまで移動して、その部分に濃縮されて局在するようになる。それ故に electrofocusing と呼ばれる。この方法は、一定の pH の緩衝液中における蛋白質の移動度の差を利用した従来の電気泳動法とは異なり、

等電点の差に基づいて分離するので、等電点にわずかな差 (± 0.02 pH) しかない蛋白質どうしても鋭敏に分離できる。しかも、分離された蛋白質の等電点を直接に知ることができる利点を持っている。

1. 実験方法

1) Carrier ampholyte

Carrier ampholyte は、“Ampholine” という商品名で、40% (w/w) 水溶液として LKB-produkter AB から各種の pH 範囲のものが販売されている (表 1)。こ

表 1 “Ampholine” の種類

[pH 範囲]			
3~10,	3~ 6,	5~8,	7~10,
3~ 5,	4~ 6,	5~7,	6~ 8,
7~ 9,	8~10		

いずれも 40%(w/w) 水溶液で、25 ml が 20,000 円

の両性電解質の性質は次のようである。

- 無色の水溶性両性電解質。
- 脂肪酸族ポリアミノポリカルボン酸の種々の誘導体の混合物で、ペプチド結合を持たない。
- 紫外部にはほとんど吸収を持たない。したがって、蛋白質や核酸と混じっても紫外部吸収によってこれらの濃度を測定する場合の妨げにならない。
- 透析性 (分子量 300~500 といわれている) である。したがって、蛋白質試料から透析とかゲル濾過などによって分離できる。

2) 装 置

カラム: Electrofocusing 用として、LKB-produkter AB から特殊なカラムが販売されているが、筆者らは図 1 に示したような手製のカラムを用いて十分に目的を達している。

図1 カラムの概略

電力供給装置： 1,000 V, 10 mA 以上の容量があれば、濾紙電気泳動やディスク電気泳動用に使用する電力供給装置をそのまま流用できる。

冷却水循環装置： 通電中の発熱を防ぐためにカラムを冷却する。4°C 付近で3日間連続使用できればどんな装置でもよい。また、図1のようなカラムを用いる場合は、カラムが細ければ低温室中で行なえば冷却水を循環する必要はない。

pH メーター： 精度のよい pH メーターで、少量を測定できる複合ガラス電極を用いて pH を測定する。

フラクションコレクター： ドロップカウンター式のものも少量ずつ分取するのに適するが、なければ手で行なってもよい。

3) カラムの調製および充填

熱対流による pH 勾配の乱れを防ぎ、かつ通電後、分離された各成分が分画する際に拡散するのを防ぐためにカラム内に蔗糖の濃度勾配をつくる。蔗糖濃度勾配遠心や、カラムクロマトグラフィーに用いる直線的濃度勾配作製装置を用いれば、簡単に濃度勾配をつくることができる。Carrier ampholyte についても濃度勾配をつけるが、これは蔗糖濃度が高い溶液は低い溶液よりも電流が流れにくいので carrier ampholyte についても濃度勾配をつくらせ、カラム内液のコンダクタンスにむらのないようにするためである。コンダクタンスを一定にしないと、熱対流が生じて pH 勾配を乱すことになる。蔗糖濃度勾配は 50~0% の直線的勾配とする。このためには、50% 蔗糖溶液と 0% 溶液を等量ずつ濃度勾配作製装置で混合すればよい。Carrier ampholyte は全使用量

の 3/4 を 50% 蔗糖溶液に、1/4 を 0% 溶液に加えて濃度勾配を作製する。Carrier ampholyte はふつう全溶液量の 0.5~1% を用いる。したがって、カラムの容量が 100 ml であれば、1% にするためには 2.5 ml の 40% carrier ampholyte を用いる。

充填にあたっては、まず、図1のカラム d に 1% リン酸を含む 50% 蔗糖溶液を入れ、コックをカラム c に通じさせてこの溶液を c のくびれの部分まで到達させたところでコックを閉じる。次に、細いチューブを通じて濃度勾配作製装置から、蔗糖および carrier ampholyte の濃度勾配を管壁をつたわらせて c に充填する。濃度勾配の最上部にエチレンジアミン水溶液約 1 ml を静かにのせて電極 a を浸す。最後に、コックを開いて c と d を通じても両側の液面の高さが変化しないように、適当量の 1% リン酸を含む 50% 蔗糖溶液を d に追加する。電極と接する部分にリン酸やエチレンジアミンを用いるのは、carrier ampholyte が直接電極と接触して両電極で酸化および還元されるのを防ぐためである。ここでは、電極 a を陰極、電極 b を陽極とする場合について述べたが、逆にする場合はリン酸とエチレンジアミンを置き換えればよい。

4) 試料の添加

試料はカラムの中央に加える。このためには、カラムの充填の際、糖度計を用いて蔗糖濃度をときどきチェックし、25% のところで充填を中断してここに試料を添加する。試料が脱塩粉末の場合は、少量の 50% 蔗糖溶液と 0% 溶液(いずれも上記の割合で carrier ampholyte を含む)とを 1:1 に混合したもの溶解してそのまま添加すればよい。試料が溶液の場合は、透析するかまたは Sephadex カラムを用いるなどして、上と同じ組成の蔗糖-carrier ampholyte 溶液としてから加える。試料が稀薄溶液の場合は、水に対して透析し、蔗糖溶液を調製する際、水の代りに試料溶液を用いて蔗糖濃度勾配をつくってもよい。

5) 通電 (electrolysis)

電極 a, b に電力供給装置の端子をつなぎ電流を通じる。最初 200~300 V で約 30 分間通電し、徐々に電圧を上げて 900 V にする。通電初期は抵抗が小さく電流が大きい、徐々に抵抗が増加して電流は減少し、約 1 時間後に一定になる。Carrier ampholyte が等電点の順に配列されて pH 勾配が形成されるのには、24~28 時間を要する。これ以上通電を続けても形成される pH 勾配は変化しないが、試料の分離を確実にするために、さらに 15~20 時間続ける。

表 2 ミオグロビン II₁ と II₂ の等電点

実験 番号	ミオグロ ビ 成 分 mg	"Carrier ampholyte" 濃 度(%)	通電時の 温 度 (°C)	等 電 点	
				4°C	25°C
1*	Mb II ₁ 3.5	0.3	4	7.34	6.94
	Mb II ₂			7.28	6.88
2	Mb II ₁ 3.5	0.3	4	7.35	6.94
	Mb II ₂			7.29	6.89
3 a	Mb II ₁ 7.0	1.0	4	7.32	6.95
	Mb II ₂			7.27	6.90
3 b	Mb II ₁ 7.0	1.0	4	7.33	6.98
	Mb II ₂			7.27	6.92
4 a	Mb II ₁ 7.0	1.0	25	7.35	6.98
	Mb II ₂			7.28	6.92
4 b	Mb II ₁ 7.0	1.0	25	7.34	6.97
	Mb II ₂			7.28	6.92

* Mb への CO₂ の結合を防ぐため、アルゴン気流中で分画を行なった。

6) 分 画

通電が終わったら電流を切り、コックをまわしてカラム d のリン酸溶液との連絡を断ってから取りだしロ g から pH 勾配を分画する。得られた分画は、必要に応じて紫外外部吸収、酵素活性などの性質を調べ、pH を測定する。等電点を正確に知りたい場合は少量ずつ分画したほうがよい。

2. 実 験 例

1) ミオグロビン

Vesterberg と Svensson⁽⁴⁾ は、これまで分離が非常に困難で等電点に差を見いだすことのできなかったミオグロビン II₁(Mb II₁) とミオグロビン II₂(Mb II₂) とを、pH 6.5~7.5 carrier ampholyte を用いて分離し、それぞれの等電点を測定した。表 2 に実験条件と結果を示した。図 2 は実験 1 で得られた pH 勾配である。等電点の測定はすべてミオグロビン含量の最大の分画について行なわれている。また、pH 測定の際の精度は ± 0.02 である。表 2 の結果は等電点の測定を一定の温度で行なえば、carrier ampholyte の濃度 (0.3~1.0 %), 通電の温度 (4~25°C) および試料の濃度 (3.5~7.0 mg) は等電点に有意の影響を与えないことを示している。また、分画の際のミオグロビンへの炭酸ガスの結合も問題にならないことを示している。

図 2 表 2 の実験 1 で得られた pH 勾配

2) グルコース 6-リン酸脱水素酵素

筆者の一人 (武藤) は、約 300 倍に精製したサツマイモのグルコース 6-リン酸脱水素酵素を pH 3~6 の carrier ampholyte を用いて通電した。4°C で、最初 300 V, 3 mA, 最終 900 V, 1.6 mA で 48 時間行なった。pH は室温 (20°C) で測定した。図 3 にみられるように、pH 4.22 と 4.50 の 2 つの主ピークのほかに、pH 4.7~5.5 にもいくつもの弱い活性のピークが認められた。ディスク電気泳動およびカイネティクスのデータから本酵素の多分子型が示唆されているので、上の結果も多分子型を反映しているものと考えられる。pH 3~6 の carrier ampholyte は、あらかじめ pH 3~10 のもので通電を行なって、おおよその等電点を調べることによって選択した。

また、本酵素の精製にあたってあらかじめ等電点を知

図 3 サツマイモのグルコース 6-リン酸脱水素酵素の electrofocusing

っておくことは、イオン交換クロマトグラフィーの条件を定めるのに非常に有効である。この目的でサツマイモの粗抽出液を pH 3~10 で通電したが、pH 5 付近に多量の沈殿が生じたため、正確な等電点を知ることができなかった。等電点沈殿は electrofocusing の 1 つの問題点である。試料の量を減らすとか、通電の時間を短縮することによってある程度は防止できる。

3) 尿素存在下での electrofocusing

Catsimpoilas⁽³⁾は、ダイズの貯蔵蛋白質であるグリシニンのサブユニット構造の研究に electrofocusing を応用した。0.2 M β -メルカプトエタノールを含む 6 M 尿素で蛋白質を処理してサブユニットに解離させた後、pH 3~10 の carrier ampholyte を用いて通電した。この際、サブユニットが再会合するのを防ぐために、通常の蔗糖濃度勾配の中にも 0.2 M β -メルカプトエタノールと 6 M 尿素を加えた。この結果、グリシニンは 3 つの酸性サブユニットと 3 つの塩基性サブユニットから構成されていることが明らかにされた (図 4)。

II. 支持体を用いる方法

(Gel electrofocusing)

支持体を用いない electrofocusing の場合の蔗糖濃度勾配の代りに、ポリアクリルアミドのゲルを支持体として用いる方法が、1968 年に Leback と Rutter⁽⁴⁾、Dale と Latner⁽⁵⁾、Awdeh ら⁽⁶⁾、Wrigley⁽⁷⁾、あるいは Fawcett⁽⁸⁾ によって試みられた。これによって、技術的には従来のゲル電気泳動法にきわめて類似したもの

となり、さらに簡便で正確な蛋白質 (酵素) 分離法となってきた。これが gel electrofocusing と呼ばれるもので、これについてはすでに桃谷⁽⁹⁾によって紹介されている。ここには、その後の発展も加えて、その問題点について項目別にまとめてみたい。

1. 実験方法

Gel electrofocusing としてこれまで報告されている方法は、従来のディスク電気泳動法に類似したカラムを用いるもの (この場合、ディスク電気泳動法の場合と同様に分画が鋭い円盤状になって現われるため、disc electrofocusing と呼ぶのが適当と思われる) と、薄層電気泳動法に類似したプレートを用いるもの (thin-layer electrofocusing と呼ばれている) とに大別できる。種類の材料を適宜に分析を進めるには比較的前者が適し、材料を一度に対比して分析するには比較的后者が適している。

一方、原点の位置、つまり試料液または試料ゲルの取扱い方法によって次のように分類される (図 5 A, B 参照, p. 638)。

a) 試料液は (分離) ゲル中に包含あるいは位置づけられるもの (従来用いられたほとんどのものがこれで、non-side origin といえよう)。

b) 試料液または試料ゲルは (分離) ゲルの陰極側に位置づけられるもの (桃谷⁽⁹⁾によって報告されているもので、cathode-side origin といえよう)。

c) 試料液または試料ゲルは (分離) ゲルの陽極側に位置づけられるもの (Wrigley⁽⁷⁾ならびに中井、寺村および常脇⁽¹⁰⁾によって報告されているもので、anode-side origin といえよう。なお、cathode-side origin とあわせて one-side origin と呼ぶこともできよう)。

このうち、b) および c) の方法は、a) のそれに比較して試料中の蛋白質 (酵素) の分離が一方向的に行なわれるため、分離帯の濃縮ならびに分離時間の短縮が得られやすい。さらに、試料液をそのまま用いる場合には、その準備操作はきわめて簡便なものとなる。陽極液として使用される酸類、とくに塩酸は比較的比重が軽く、c) の方法の場合、試料液との混合が起こりにくい。通常、塩基性または中性緩衝液によって試料蛋白質 (酵素) はおもに負に荷電されて使用されるため、とくに carrier ampholyte の pH 3~10 におけるゲ

図 4 グリシニンのサブユニットの分離

斜線をほどこした部分が各サブユニット。

等電点は、I : 4.75, II : 5.15, III : 5.40,

IV : 8.00, V : 8.25, VI : 8.50

A. 原点の位置の違いによる方法

* 図 5 B に示すようなものも含まれる.

** 図を逆または横にしたものも含まれる.

B. Leaback および Rutter⁽⁴⁾, Awdeh ら⁽⁶⁾ ならびに Fawcett⁽⁸⁾ による方法

⊕, ⊖: "carrier ampholyte"(各成分)の荷電の分布(想定)

→: 試料蛋白質(酵素)の分離の方向(想定)

図 5 Gel electrofocusing の諸方法のカラムおよびプレート模式図(側面観)

ルの塩基性末端 (pH 9 以上では、一般に両性電解質の荷電はとくに著しくなる)を原点側におく b)の方法はさける必要がある。酸性側から等電点にむかわせる c)の方法のほうが、一般に試料蛋白質(酵素)の等電点付近におけるふらつきを少なくする。このような条件を満足させるとともに、さらに disc ならびに thin-layer electrofocusing の両法を目的に応じて簡易に併用できるようにした特製装置 (two-system electrofocusing equipment と呼んでいる)を考案している (図 6)。

なお、操作上については、ゲルの長さは、6~20 cm が用いられているが、通常は 5~8 cm が適当と思われる。通電は、直流定電圧で 15~70 V/cm, 14~16 時間、あるいは定電流で 1~2 mA/tube, 3~5 時間行なわれているが、定電圧で 20 V/cm, 15 時間、ないしは 40 V/cm, 3 時間で好適な結果を得ている。なお、pH 勾配は、carrier ampholyte の pH 範囲、そのほかの実施条件に対応して、陽極および陰極液の適正濃度の検定によって調節する必要がある。

図 6 Two-system electrofocusing equipment の本体および付属品

1) ゲル

(分離)ゲル液は、できあがりでアクリルアミド 2.8~8%, BIS* 0.15~0.24% が用いられているが、ディスク電気泳動法の泳動ゲル液にならって、アクリルアミド 7.5%, BIS 0.8% のものを標準ゲル液とするのが適当であろう。なお、必要に応じて(たとえばゲルの分子篩効果が問題となるような場合)種々のゲル濃度のものを調製する。(分離)ゲルについては、最近、ポリアクリルアミドのかわりに Sephadex G-75 (ゲル濃度 8%, carrier ampholyte の濃度 1%) を支持体として用いた thin-layer electrofocusing (ゲルの厚さ 0.75~1.0 mm) が, Radola⁽¹¹⁾ によって報告されている。ポリアクリルアミド以外のゲルについても検討してみる必要があろう。ゲル液の carrier ampholyte の濃度は、できあがりでは 0.7~2% が用いられているが、通常 1% が適当である。しかし、試料によっては 1% ではゲルの pH 勾配を保てない場合があることに注意しなければならない。ゲル液の重合促進剤としては、0.0001~0.0007% のリボフラビン(光化学触媒)、約 0.05~0.09% の TEMED** (触媒) や 0.05~0.07% の過硫酸アンモニウム(酸化剤)

が用いられているが、0.0005% のリボフラビンによる光重合が安全で充分な結果を得ている。なお、試料蛋白質によっては 8 M (2~6 M が用いられているが不充分と思われる) の尿素を加えてその会合を防ぐ必要がある。

試料ゲルを用いる場合、30% アクリルアミド液 (0.8% BIS を含む)、0.004% リボフラビン液、試料液の 2:1:1:4 容量比混合液に、TEMED または DMAPN*** (触媒) を微量加えて好適な結果が得られている。なお、試料ゲルを用いずに試料液に 10% の蔗糖を加える方法(この場合、液上 1 cm の部分に 5% の蔗糖と 1% の carrier ampholyte との混合液を加えて被覆する)や、さらには試料液をそのまま用いることによって、通常、好結果が得られている(電極液を注入する際、試料液層を乱さないように充分注意する必要がある)。

2) 陽極液および陰極液

陽極液としては、1~1.4% のリン酸、0.2% の硫酸あるいは約 1.2% の酢酸 (carrier ampholyte の pH 5~8 の場合) などが用いられている。陰極液としては、約 1% のエチレンジアミン、約 1.8~0.4% のエタノールアミン、あるいは 1% の TEMED などを使用されている。ゲルの carrier ampholyte の濃度 1% に対して、陽極および陰極液の濃度は 0.1~1% が適当のように思われる。なお、pH 勾配の調節が必要な場合、種々の濃

* N, N'-methylenebisacrylamide

** N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine

*** β -dimethylaminopropionitrile

度のもので調整する必要がある。陽極液として塩酸は酸性度が高く、しかも比較的比重が軽いので、試料液の上部に用いるのに好適である。陰極液として TEMED は塩基度が高く、しかも比較的取扱いやすい。なお、TEMED は、カラムの末端のゲルの重合を補足する意味も持っている。

3) 試料緩衝液

試料緩衝液は、材料ならびに目的に応じて検討する必要があるが、とくに使用する carrier ampholyte の pH 範囲外の pK を持つ成分組成のものを選定することが望ましい。Carrier ampholyte の pH 5~8 の場合、Tris-塩酸を用いて好適な結果が得られている。Carrier ampholyte の pH 3~10 の場合、リン酸カリウム緩衝液が好適と思われるが、その 0.01~0.05 M より高濃度ではゲルに影響がみられるようである。

4) ゲルの pH 決定

Gel electrofocusing におけるゲルの pH 決定は、carrier ampholyte によってゲル中に形成される pH 勾配の検定ならびに試料蛋白質(酵素)の等電点測定と合わせて重要であるが、その方法には次のようなものが考えられる。

a) 小型電極によりゲル(5 mm ディスク)の浸水液(1~2 ml で数時間)を間接に測定するもの(従来用いられているもので、indirect measuring といえよう)。

b) 小型特殊電極(ニードル型複合電極など)によりゲルを直接に測定するもの(正確には補正が必要、direct measuring といえよう)。

c) 微量物質(既知の等電点を持つ両性電解質など)によりゲルに直接に標識するもの(direct marking といえよう)。

このうち c) の方法は、a) および b) のそれらに比較して、ゲル中の溶液の pH 測定が直接的に行なわれるため信頼性の高い pH 値が得られやすく、その測定操作もきわめて簡便となる。さらに、c) の方法はゲルに直接に標識するため、試料蛋白質(酵素)の分離帯と適宜共存させて標準設定あるいは比較測定を行なうことが可能である。なお、マーカーとしては、適宜、既知の蛋白質(酵素)などが用いられるが、さらに一般性のあるものの選定改良が必要と思われる。その最も有効な可能性のあるものとして、両性電解質性の色素(Methyl orange や Methyl red)とアミノ酸(アスパラギン酸、グルタミン酸、シスチン、トリプトファン、 β -アラニン、ヒスチジン、リジンなど)との化合物を合成して用いることを考えている。

5) その他

材料ならびに目的に応じて、本法に最も有効な試料の調製法や検出法などが検討される必要があろう。とくに、蛋白質の染色法として 0.05% の Naphthalene black 12 B 200, 1% の Amino black, あるいは 0.01% の Coomassie brilliant blue などが用いられるが、染色前に蛋白質分離後のゲル内の carrier ampholyte を、5~10% のトリクロロ酢酸で完全に洗いだす必要があることが本法の1つの難点となっている。最近、gel electrofocusing 後のゲルの末端部を 0.2% の Bromophenol blue のアルコール-水-酢酸(50:45:5)溶液に約1時間浸漬し、その後アルコール-水-酢酸(30:65:5)液でバックが透明になるまで脱色することにより、クジラの精子ミオグロビンその他で好結果が得られたことが Awdeh⁽¹²⁾ によって報告されている。

その他、試料が酵素の場合は、一般に通電中のジュール熱の発生ならびに等電点で不安定になることによる失活の問題がある。これにはなるべく低温で分離を行ない、分離後なるべく早急に好適 pH 緩衝液あるいは反応液にカラムを移して、失活を最小限にすることが必要である。また、 α -アミラーゼなどのように、特定のイオン(Ca^{2+} など)が不足すると失活するものには、そのイオンを補給(陽極液を通じて行なうと便利である)する必要がある。

2. 実験例

1) Disc electrofocusing

この方法は、従来のディスク電気泳動装置をほとんどそのまま利用し操作については粗孔ゲルを必要としないことや、前述の諸点を除けば、ディスク電気泳動法とはほぼ同様に行なわれている。やや特異な方法としては Fawcett⁽⁸⁾ のそれがあるが、一般的なものと大差ないので省略する。ここには、筆者の一人(寺村)が特製装置(図 6)を用いて行なっている方法をおもに紹介する。

カラム用ガラス管(内径 5 mm×長さ 12 cm あるいは 9 cm, 先端に止め輪をつける)の一端を紙をつけたままのパラフィルムで覆い、カラム用ベース(大型ゴム栓に小孔をあけたもの)の小孔にさし込んでたてる。このカラムに調合直後の(分離)ゲル液——30% アクリルアミド液(0.8% BIS を含む)、0.004% リボフラビン液、8% carrier ampholyte 液、煮沸脱イオン水の 2:1:1:4 容量比混合液——を 8 cm の高さに注入し、その上に脱イオン水を 2 mm の高さに重ねる。これに約 30 分間蛍光灯を照らしてゲルの光重合を行なわせる。重合後、ゲル上の水を充分取り除いたカラムをベースから取りだ

し、パラフィルムを取り去って特製装置の枠部の小孔にセットする。カラムのゲル上に試料液を 1 cm の高さ(約 150 μ l) 入れ、さらに陽極液 (0.5% 塩酸) を 2.5 cm の高さに重ねてこれに白金電極を浸す。次いで、槽部に陰極液 (0.5% TEMED) をカラムの下端が 5 mm 浸るように注入する。4°C のケース内で、直流定電圧 40V/cm で 3~5 時間通電する。通電後、カラムを枠部から取りだし、カラムの下端から壁にそって注射器の針をさし込んでまわしながら水を注入する。ゲルとガラス壁とが離れてから、スポイト用キャップでゲルを静かに押したす。

図 7 に示したものは、サツマイモ塊根の皮層ならびに中心柱の組織について、未処理、切断処理 (切断した試料を 25°C で 2 日間おく)、エチレン処理 (切断した試料を 25°C で 2 日間 10 ppm のエチレン気体中におく)、ならびに罹病処理 (切断した試料を 25°C で 2 日間黒斑病菌を接種罹病させる) によって得られたペルオキシダーゼのアイソザイムである。このペルオキシダーゼの検定は、0.1 M 酢酸緩衝液の 0.1% 塩酸ベンジジン溶液 100 ml に 30% 過酸化水素 0.1 ml を加えた混合液で約 5~20 分間処理し、水洗後、飽和チモール水を入れた保存管中で低温にて保存観察している。

図 7 サツマイモのペルオキシダーゼの gel electrofocusing (carrier ampholyte, pH 3~10)

A: 皮層組織, 未処理 D: 中心柱組織, 切断処理
B: 中心柱組織, 切断処理 E: 〃, エチレン処理
C: 〃, 未処理 F: 〃, 罹病処理

2) Thin-layer electrofocusing

この方法は、従来の薄層電気泳動装置を多少とも改良して使用されているが、操作については、前述の諸点を除けば薄層電気泳動法をほとんどそのまま利用している。なお、特異な方法としては、図 8 にみられるような装置を用いた Awdeh, Williamson および Askonas⁽⁶⁾ のそ

図 8 Awdeh, Williamson および Askonas⁽⁶⁾ の thin-layer electrofocusing の装置

れがある。ゲル (ゲル濃度 5%, carrier ampholyte 濃度 2%, 250×159×1 mm) をかためたプレート面を逆にして炭素電極棒 (両電極間 20 cm, 陰極には 5% エチレンジアミン, 陽極には 5% リン酸でしめらす) の上にのせ、試料液をゲル面にぬりつけて 4°C で直流定電圧 20 V/cm, 16 時間通電している。次に、前項でのべた特製装置 (図 6) を利用して thin-layer electrofocusing を行なう場合について紹介しておく。

厚さ 0.1 cm のプレート用ガラス板 (乾板を利用して 9.0×16.4 cm あるいは 12.0×16.4 cm など) の上にプレート用上枠 (つめの部分) ならびに側枠 (流動パラフィンをぬっておく) をおき、同形のガラス板をのせて両側をセロテープ (幅 2.5 mm) で充分とめてから、さらに下辺から両側にかけて同様にとめる。なお、プレートの上辺の両側にビニルテープの薄片をはって、プレートを装置の枠部にさし込んだとき落ちないようにしておく。このプレートをプレート用ベース (大型ゴム栓に割れ目をつけたもの) の割れ目にさし込んでたてる。上枠の小孔から調合直後の分離ゲル液を、プレート内の上枠のつめの下端まで空隙が満たされるように注入する。これに約 30 分間蛍光灯を照らして、光重合を行なわせる。さらに、隔壁ゲル液——30% アクリルアミド液 (0.8% BIS を含む), 0.004% リボフラビン液, 緩衝液または水, 煮沸脱イオン水の 2:1:1:4 容量比混合液——をプレート内のつめの間に満たし、光重合させて隔壁をつくる。プレートをベースから取りだして下辺のセロテープを取り去り、上枠を注意深く取り除いて装置の枠部の間隙にセットする。プレートの溝孔内に試料液を 1 cm の高さ

に (約 150 μ l) 入れ、さらに陽極液 (0.5% 塩酸) を 2.5 cm の高さに重ねてこれに白金電極を浸す。次いで、槽部に陰極液 (0.5% TEMED) をプレートの下辺が 5mm 浸るように注入する。4°C のケース内で、直流電圧 40 V/cm で 3~5 時間通電する。通電後、プレートを枠部から取りはずし、さらにセロテープを取り除く。さらに、プレートを冷水中に置いてから、スパーテルなどでガラス板を速やかに取り去る。その後の操作は、薄層電気泳動法の場合と同様である。

お わ り に

支持体を用いる用いないに関係なく、electrofocusing には、松尾と堀尾が指摘しているように、carrier ampholyte と蛋白質との複合体、等電点での沈殿、変性あるいは carrier ampholyte の適正濃度などの諸問題が残されている。とくに、carrier ampholyte と蛋白質との複合体形成の可能性は、関係者において最も問題にされる事項である。最近、Vesterberg⁽¹³⁾ は人間の血清アルブミン、 γ -G グロブリンおよび卵白リゾチームについて Sephadex で分離した結果から、carrier ampholyte と蛋白質とが強く結合した複合体の形成を強く否定している。

もちろん、ほかのすべての分離方法においてもそうであるように、人為的変性の可能性に対しては常に充分注意を払う必要があろう。Electrofocusing においても、それに付随する難点の解決をはかるとともに、その本来の特徴を生かしてゆくことが今後の課題と考える。

文 献

- 1) O. Vesterberg and H. Svensson : *Acta Chem. Scand.*, 20, 820 (1966).
- 2) 松尾雄志, 堀尾武一: 蛋白質 核酸 酵素, 12, 737 (1967).
- 3) N. Catsimpoalas : *FEBS Letters*, 4, 259 (1969).
- 4) D. H. Leaback and A. C. Rutter : *Proc. Biochem. Soc. 481 st Meeting*, April, 18 (1968); *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 32, 447 (1968).
- 5) G. Dale and A. L. Latner : *The Lancet*, 1, 847 (1968).
- 6) Z. L. Awdeh, A. R. Williamson and B. A. Askonas : *Nature*, 219, 66 (1968).
- 7) C. W. Wrigley : *J. Chromatog.*, 36, 362 (1968); *Science Tools*, 15(2), 17 (1968).
- 8) J. S. Fawcett : *FEBS Letters*, 1, 81 (1968).
- 9) 桃谷好英: 蛋白質 核酸 酵素, 14, 1024 (1969).
- 10) 中井泰男, 寺村貞, 常協恒一郎: 遺伝学雑誌, 44 (4), 259 (1969).
- 11) B. J. Radola : *Biochem. Biophys. Acta*, 194, 335 (1969).
- 12) Z. L. Awdeh : *Science Tools*, 16 (3), 42 (1969).
- 13) O. Vesterberg : *Science Tools*, 16 (2), 24 (1969).

● 研究のスポット

枯草菌中性プロテアーゼ

—Zn-metalloprotease の 活性中心について—

鶴 大 典

大阪市立大学理学部

ま え が き

枯草菌 *Bac. subtilis* の生産する蛋白分解酵素は、その作用至適 pH から中性プロテアーゼとアルカリ性プロテアーゼとの 2 種に類別されている。そのうち、subtilisin carlsberg や subtilisin BPN' に代表される枯草菌アルカリプロテアーゼの理化学的性質、一次構造⁽¹⁾および立体構造⁽²⁾は最近ほぼ完全に解明され、またその基質特異性ならびに反応機作に関しても、これまでに多くの報告がある。一方、枯草菌中性プロテアーゼは、その研究の歴史がかなり古いにもかかわらず⁽³⁾、アルカリプロテアーゼほど充分な研究は行なわれていない。むしろ今後に多くの問題を残している。たとえば、その活性中心のアミノ酸残基に関しては、現在のところまったく不明である。それは、中性プロテアーゼが比較的不安定であることも 1 つの原因であるが、また、この酵素が Zn を含む金属酵素であることも関係がありそうである。

枯草菌中性プロテアーゼが Ca 塩の添加で安定化され、金属キレーターで容易に失活し、またある条件では Zn^{2+} や Co^{2+} の添加で活性を回復することは、すでに 1958 年ごろに明らかにされていた^(4,5)。われわれはその後、さらに液化型 α -アミラーゼ生産菌の分泌する中性プロテアーゼの精製法を再検討して、Ca 塩で平衡化した CM-cellulose column chromatography を用いることによって、かなり収率よく精製酵素を得ることに成功した。得られた精製標品は 0.18% の Zn を含み、精製過程中的 Zn 含量の増大と比活性の上昇とは常にほぼ比例し、また EDTA 処理による Zn の除去は、可逆的な酵素の失活をもたらすことがわかった。これらの結果から、われわれは枯草菌中性プロテアーゼが Zn を必須成分とする金属酵素であると結論した^(6,7)。

その後、われわれは糖化型 α -アミラーゼ生産菌 *Bac. amylosacchariticus* の中性プロテアーゼもまた 1 分子当たり 1 グラム原子の Zn を含むことを指摘した⁽⁸⁾が、これ