3. イオン交換体による蛋白質の精製*

高河原 勇**・藤井克美**・奥貫一男***

イオン交換体を用いて、両性電解質を精製する方法は、少なくとも現在は、対象物質が可溶性状態でなければならないという制限があるが、その応用範囲が極めて広い。また、比較的温和な環境で精製操作を行なうことができ、しかも、温度、溶媒のpH、塩の種類、塩濃度、保護物質の共存などの環境条件をコントロールしやすい。したがって、多種類の物質の混合物を互に分離しうる条件を比較的簡単に決めることができる。このような特長があるため、蛋白質についても約20年前から使用されはじめ、¹⁾ 現在では蛋白質の分離、精製、分析に広く利用されている。²⁻⁴⁾

現実の問題として、イオン交換体によって、酵素などの可成り不安定な生物活性物質を精製することを試みると、種々の障害に出合うのが常である。ここでは、酵母菌体から多数種の酵素を一連の操作でマズプロダクションするフローシステムを開発する途上で得た経験とデータの中から、イオン交換セルロースのカラムクロマトグラフィーによる酵素の分離、精製の具体例についてのべる。

I. 理論的背景

カラムクロマトグラフィーの様相を支配するパラメーターのうち特に実用的だと思われるもの、およびそれらのパラメーター間の関係について簡単にのべる。ある種の物質をある種のイオン交換体を用いて精製を行なうとき、そのクロマトグラフィーを支配するパラメーターの間に成立する関係を Fig. 1. に示す。K_dの定義から式①が導かれる。ここでV_bは、カラム内のイオン交換体層の容積(高さLと断面積Sとの積)で bed volume と呼ばれる。Iはイオン交換体層中の移動可能な水の容積である。例えば、普通のイオン交換セルロースの場合では、V_bの20%から30%がセルロースとその水和水で、この部分は固定相と呼ばれる。したがって、Iは残りの70%から80%に相当し、この部分は移動相と呼ばれる。K_dは、移動相中の目標物質の濃度に対する固定相中の目標物質の濃度の比と定義される。通常、固定相の量をその質量で表わすけれども、実用上、固定相の量の代りに交換体の bed volume を用いた場合のK_dを特にK_{d'}で示す。K_dは物質が交換体に吸着する強さを表わし、吸着係数と呼ばれる。V_eはカラムの一端に吸着された物質がクロマトグラフィーされて他端まで移動する間に、カラム内を流れる展開溶液の容積で、elution volume と呼ばれる。式①から、V_eはV_bに比例し、K_{d'}が大きいたまは物質の溶出は遅れる。

目標物質と不純物質がクロマトグラフィーによって分

Fig. 1. Relation among several parameters governing the chromatographic behavior of components.³⁾

K_d = Adsorption coefficient.

K_{d'} = K_d expressed by the apparent volume of the fixed phase.

P = Number of theoretical plates.

h = Height of each theoretical plate.

$\bar{v}$ = Linear velocity.

λ = Coefficient related to degree of packing of particles.

d_p = Particle diameter.

C = Concentration of solute in moving phase.

D_f = Diffusion coefficient of solute in moving phase.

* Preparation and purification of proteins by ion-exchangers.

** Isamu Takagahara, Katsumi Fujii, オリエンタル酵母工業株式会社大阪工場酵素開発センター.

*** Kazuo Okunuki, 大阪大学名誉教授.

離される様子をとり扱うために, Fig. 1. の中央のグラフのように, まず, 不純物質 (斜線ピーク) が溶出した後に, 目標物質 (無斜線ピーク) が溶出する場合を考える. 式①から式②が導びかれる. 式②で ΔV_e は, 2 種の物質の V_e の差で, 不純物質が溶出してから目標物質が溶出するまでの流出液の容量である. K_d' は目標物質の K_d' , 一方 K_d' は不純物質の K_d' である. 式②から溶出ピークの間隔 ΔV_e は V_b に比例し, 2 種の物質の K_d' の差に比例する.

次に, ピークの鋭さをとり扱うために, 流出するピークの高さの 1/2 の高さにおけるピークの幅を $W_{1/2}$ とするとき, プレート説^{5,6)} から式③が導びかれる. カラムをある厚みのあるプレートの重層したものとみなす. ある 1 つのプレート内で, 固定相と移動相とが完全に平衡に達した後に, 移動層が次のプレートへ移動し, 次の固定相と平衡になる. プレート説では, この繰返しによってクロマトグラフィーが進行すると想定して理論的な解析を行なう. P はカラム内に想定したプレートの段数で, 理論段数とよばれる. P は式③から実験的に求められる. h は上記の仮想プレートの厚みであり, 交換体の粒子径, 充填状態, 流速, 溶質の拡散定数, 濃度などで左右されるが, 特に, 流速の増加に対して直線的に大きくなる. ピークの幅 $W_{1/2}$ は V_b と K_d' に比例し, またカラムが細長く, 流速が低いほど $W_{1/2}$ は小さくなる (式③).

ところで, 目標物質と不純物質の間の ΔV_e が大きいほど, また, 目標物質のピークの幅 $W_{1/2}$ が小さいほど, 両者の分離の程度は良くなる. 従って, 分離の良さは $\Delta V_e/W_{1/2}$ によって表わされる. $\Delta V_e/W_{1/2}$ は, 式②と式③とから式④のように表わされる. 結局, 目標物質と不純物質の分離を良くするためには, i) V_b を大きく, ii) K_d' の差を大きく, iii) 流速を小さく, iv) カラムを細長くすれば良いことになる.

II. 酵素精製のための予備実験

酵素の精製を効果的に行なうためには, 酵素の安定性に影響する要素, 分離に影響する要素, などを本格的な精製にとりかかる以前に, できるだけ多く集めておく方が得策のようである. 私達の研究室で行なっているものの中から, 特に基本的と思われる予備実験を後述する.

1. 等電点分画法によるテスト (Test by isoelectric fractionation)

抽出液などの粗酵素サンプルを, 等電点分画することによって, 目的酵素の等電点 (isoelectric point) (pI と略す) と不純物質の pI などを知らることができる. これ

らのデータに基づいて, 目的酵素のクロマトグラフィーに使用するイオン交換体の種類と, その場合の pH などの条件の見当をつけることができる. 等電点分画法に関しては, 松尾雄志氏が記述されるので省略する.^{7,8)} 一般に, pI が中性より酸性であるほど DEAE-セルロースに吸着しやすく, pI が中性よりアルカリ性であるほど CM-セルロースに吸着しやすい. 酵母の抽出液を等電点分画した結果を Fig. 2. に示す. グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, EC 1.1.1.49) (G-6-P DH と略す) の pI は約 4.5 である. 従って, この G-6-P DH は, 塩濃度が適当であれば, pH 6~8 で DEAE-セルロースに吸着されるだろうと推察される. また, このサンプルには pI が 4.5~6.0 の不純蛋白が多量に含まれていることが A_{280nm} のカーブから推察される. DEAE-セルロースを用いたカラムクロマトグラフィーにおいて, 上記の不純蛋白質は G-6-P DH より先にカラムから溶離してくるであろう. ただ, 松尾雄志氏^{7,8)} が指摘しているように, 等電点分画によって求められる pI は塩の存在しない状態のものであり, 塩が存在するときの pI は塩が存在しないときの pI と可成り異なることに留意する必要がある.

Fig. 2. Isoelectric fractionation of extract from yeast.

0.5% Ampholine pH 3-10 was used.

2. オーバーフローテスト (Overflow test)

酵母の抽出液をまず, DEAE-セルロースカラムに流す (Fig. 3.: 上部). その通過液を, 続いて, CM-セルロースカラムに流す (Fig. 3.: 下部). 上記の 2 本のカラムのセルロース柱をそれぞれカラムから取り出し, 適当な長さ毎に輪切にし, 各輪切部分から酵素を溶出し, 酵素活性を測定する (Fig. 3.: 各カーブ). ここに見られるように, 試料溶液に含まれている物質が, DEAE-

Fig. 3. Distribution of enzymes in columns of ion exchangers.

Yeast extract was applied to a DEAE-cellulose column (4×48 cm).

The resulting bypassed solution was then applied to a CM-cellulose column (3×36 cm). These experiments were carried out in the conditions equilibrated with 10mM Tris-HCl buffer at pH 8.0. The cellulose ion-exchangers were individually taken out of the columns, and divided in approximately 10 cm³. Adsorbed substances in each section were eluted with 1 M ammonium sulfate solution by batchwise manner, and the activities of ATPase, glutathione reductase (G R), hexosephosphate isomerase (HP I) and enolase (ENL) were determined of each of the eluates.

セルロースカラムの上の端から、 K_d' の高い順に吸着帯をつくり (ATPase>G R>HP I), そして、 K_d' の低い酵素ほど吸着帯はブロードである。ENL は、DEAE-セルロースに対する K_d' は吸着されるには低すぎるけれども、CM-セルロースに対しては、高い K_d' をもち、シャープな吸着帯をつくる。上述の4種の酵素の1種を目的酵素とみなし、他の3種を不純物質とみなすと、一般に目的酵素試料のクロマトグラフィーは、まずは、このような状態から出発すると考えてよいのではなからうか。もし、カラムに流すサンプルの量をさらに増加させていくと、目的酵素の吸着帯がカラムの下端にとどき、目的酵素がカラムから溶出しはじめる時点が必ずある。その時点では、目的酵素の吸着帯の中心は、すでにカラム

Fig. 4. Overflow test with DEAE-cellulose column.

DEAE-cellulose column (1.1×13 cm) equilibrated with 10 mM K-phosphate buffer (pH 7.5) was loaded by yeast extract and enzyme activities (isocitrate dehydrogenase (iC DH), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PG DH), hexosephosphate isomerase (HP I), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-P DH), hexokinase (HK), and glutathione reductase (G R)), total protein concentration and nucleic acid concentration were determined.

の中央より下に降りてきているはずである。目的酵素と不純物質が良好に分離されるようなクロマトグラフィーを行なうためには、試料をカラムに流し終った時点における目的酵素の吸着帯の位置からカラム底部までの距離に、十分の余裕があることが必要である。試料の量と、目的酵素の分画に適当なイオン交換体の量の関係を知って、クロマトグラフィーの出発点の状態を適当に調節するために、私達の研究室では、下記のオーバーフローテスト (overflow test) を行なう。オーバーフローテストの1例を Fig. 4. に示す。これは、酵母の抽出液を DEAE-セルロースカラムに過剰に添加し、そのカラムからの溶出液を分画し、各分画について酵素活性を分析したものである。

オーバーフローテストに基づいて、イオン交換体の使用量とサンプルの添加量との関係を知り、イオン交換体の最少必要量を知ることができる。また、目的酵素の前後に流出する物質の状況から分離の良否を、ある程度判断することもできる。例えば、HP I がカラムから溶出し始める時点におけるカラム内の状態を考えてみることにする。 K_d' が HP I より大きく、したがって、HP I よりも DEAE-セルロースに吸着しやすい物質、すなわち、G-6-P DH, HK, G R, などの吸着帯がカラム内に飽和していて、HP I の吸着帯がオーバーフローしはじめたと思われる。目的酵素がオーバーフローしはじめるまでに流した試料の量から V_b を差引いた量を、仮に、その酵素についての飽和量と呼ぶことにすると、

Fig. 5. Batchwise test with DEAE-cellulose.

3 g wet weight of DEAE-cellulose were suspended in 30 ml of 10 mM K-phosphate buffer (pH 6.0). 20 ml of yeast extract were added and equilibrated by continuous mixing at ice-cold for 30 min.

After pH determination, 0.5 ml aliquot of supernatant was taken and enzyme activities (HP I, 6-PG DH and G-6-P DH), total protein concentration and nucleic acid concentration were determined.

pH was raised to 6.5 by the addition of 2 N KOH, and the similar determinations were made after 30 minutes' equilibration.

By the same way, enzyme activities at adsorption equilibrium were determined up to pH 8.0.

The coefficient K_d' was calculated by the following equation.

$$K_d' = \frac{aA_0 - (a+b)A_L}{A_L V}$$

where,

V = Volume of ion exchanger added (volume per unit wet weight had been determined separately.).

a = Volume of enzyme solution added.

b = Volume of buffer solution added.

A_0 = Enzyme activity per unit volume of the enzyme solution.

A_L = Enzyme activity per unit volume of supernatant.

酵素を多量に精製する目的において、良好なクロマトグラフィーを行なうためには、加えるサンプルの量を飽和量の1/10程度、多い場合でも1/3以下にする必要がある。例えば、HP Iでは、飽和量が V_b の約2倍であるので、クロマトグラフィーにかかる抽出液の量を、多くしたい場合でも、 V_b の約7割以下に、量より質を求めるときには V_b の2割程度にする。

3. バッチワイズテスト (Batchwise test)

Fig. 5. は、一定量の DEAE-セルロースのサスペンション (pH 6) に一定量の酵母の抽出液 (pH 6) を加えて、すなわち、バッチワイズ法で、種々の酵素と DEAE-セルロース間の吸着平衡を測定したものである。まず、pH 6 において吸着平衡に達した後にサスペンションの1部を除去し、除去したサスペンションを遠心して生じた上清の酵素活性を測定する。つぎに、残りのサスペンションへ KOH を添加して pH を段階的に上げていき、各段階の pH で、上記と同様の方法で上清を分離し、酵素活性を測定した。pH が次第にアルカリ性となり、蛋白質のマイナス電荷が増加するにつれて、DEAE-セルロースに対する酵素の吸着率が増大し、その結果として液相中の酵素濃度が低下していく。この例では、iC DH, HP I, 6-PG DH, などの DEAE-セルロースに比較的吸着され難い第1グループと、G R, G-6-P DH, などの DEAE-セルロースに比較的強く吸着性を示す第2グループがみられる。HK は pH 6 では第1グループに属し、pH 8 では第2グループに属するように変化する。したがって、pH 6 でクロマトグラフィーすると HK は K_d' 値の近似した第1グループ (Fig. 4. から K_d' は約0.2 と計算される) から分離され難いけれども、 K_d' の差の大きい第2グループ (K_d' , 約2) からは分離されやすい。pH 8 でクロマトグラフィーすると、逆に第1グループ (K_d' , 約6) から分離されやすいけれども、第2グループ (K_d' , 約50) からは分離され難い。従って、HK から両方のグループの酵素を除くためには pH 6 附近と pH 8 附近で2度クロマトグラフィーを行なうか、あるいは pH 7 附近で精密なクロマトグラフィー (試料の量を飽和量の約1/10程度にするなどの条件で) をすると良いのではなかろうかということが推察される。

このように、バッチワイズテストによって、目的酵素および他の物質の K_d' の pH による変化を知った上で、クロマトグラフィーを行なう際の pH の選択をする。一般に2種の物質のそれぞれの pI の平均値に近いほど、それらの分離は良くなる。つぎに、pH の場合と同様な方法で、塩濃度を変化させ、吸着および溶出を行なうの

Fig. 6. Elution test with DEAE-cellulose column.

A yeast extract in 10 mM K-phosphate buffer at pH 7.5 (starting solution, 75 ml) was applied to a DEAE-cellulose column (2.2×13 cm) equilibrated with the same buffer. The column was eluted successively with 150 ml of the K-phosphate buffer (pH 7.5) solutions of stepwisely increasing concentrations. The resulting eluate was divided in 50-ml fraction, and the fractions thus obtained were individually measured of enzyme activities (iC DH, G-6-P DH, and G R), total protein concentration and nucleic acid concentration.

に適当な K_d' が得られる条件を検討する。イオン交換セルロースに吸着した酵素を溶出する場合の K_d' は 0.3 から 3 程度が適当であると思われる。このような K_d' 範囲では、 V_e は V_b の 1~3.7 倍程度となり、酵素の希釈を最小限にすることができる。

4. エリュージョンテスト (Elution test)

Fig. 6. はある一定量の酵母の抽出液を DEAE-セルロースカラムに流した後、展開液である K-リン酸緩衝液 (pH 7.5) の塩濃度をステップワイズに上げてカラム溶出液を分画し、分析したものである。図の最下辺の垂直線部分は、カラムに新しい緩衝液 (たとえば 10 mM) を添加した時点を示し、その垂直線に接続して右上方にのびた斜線の先端は、その緩衝液 (たとえば 10 mM) がカラム内を流れた後、カラムから流出しはじめた時点を示す。緩衝液の塩濃度が上がるごとに、溶出する蛋白質濃度が、多少にかかわらず増加するのが見られる。酵母の G-6-P DH は DEAE-セルロースでは 1 つのピークでクロマトグラフィーされることがわかっているけれども Fig. 6. では 2 つのピークを形成して溶出される。これはイオン交換体の量に比べて、試料の量が多すぎたために、カラムの上の方にあった K_d' の高い物質の吸着帯が塩濃度が上がるにつれてひろがり、その結果として、G-6-P DH の 1 部がオーバーフローして、第 1 番目のピークが形成されたと考えられる。第 2 番目のピークの溶出の様相をみると、塩濃度を 75 mM にすると G-6-P

Fig. 7. Elution test for G-6-P dehydrogenase on DEAE-cellulose column.

A yeast extract in 25 mM K-phosphate buffer at pH 7.5 (25 ml) was applied to a DEAE-cellulose column (2.9×6.5 cm) equilibrated with the same buffer of 100 mM, and eluted with 200 ml of the buffer of 100 mM. The eluate was divided in 5-ml fraction.

The figure shows the G-6-P dehydrogenase activity, the absorbancy at 280 nm and electric conductivity of each of the eluates. Electric conductivity was measured by a conductivity meter manufactured by MS Co., Ltd., Osaka.

DH の K_d' は 1.0 に可成り近づくことが推察される。このように、エリュージョンテストによって、クロマトグラフィーを行なうために適当な K_d' を得る条件を求めることができる。例えば、Fig. 6. の実験例のように、ある塩濃度ごとに V_b の 3 倍量の緩衝液を流した場合は、一応、 K_d' が 3 以下になるような塩濃度が知られる。また、このような実験から精製の可能性について、大体見当をつけることができる。Fig. 7. は、エリュージョンテストのもう 1 つの例である。ステップワイズに緩衝液の塩濃度を上げて G-6-P DH をカラムから溶出し、その分画を可成り厳密に分析したものである。蛋白質のピーク (A_{280nm}) と G-6-P DH のピークは、僅かながら互にずれていて、従って、分離可能のようであることと、および、分離のための塩濃度は 50 mM と 100 mM の間であり、しかもその濃度として 65 mM~75 mM が適当

Fig. 8. Purification of G-6-P dehydrogenase by DEAE-cellulose column chromatography.

A yeast extract in 25 mM K-phosphate buffer at pH 7.5 (15 ml) was applied to a DEAE-cellulose column equilibrated with the same buffer. The column was washed with 100 ml of the same buffer of 50 mM.

The figure shows the elution patterns of electric conductivity, enzyme activity and absorbancy at 280 nm obtained by eluting the column successively with 200 ml of the buffer of 65 mM (the left half) and with 200 ml of the buffer of 75 mM (the right half).

だろうと考えられる。Fig. 8. は上記の予想に基づいて実験したものである。65 mMの緩衝液で大部分の蛋白質が大きなピークを形成して、カラムから溶出され、緩衝液の塩濃度を 75 mM に上げると G-6-P DH がカラムから溶出される。

上記の4種の予備実験のうちのいくつかを必要に応じて行なうことによって、最適条件でイオン交換クロマト

グラフィーを組み立てることができよう。

III. 精製度と回収率

物質を精製する場合の目標は、当然のことながら、より高度の精製をより高い回収率で行なうことである。イオン交換クロマトグラフィーにおける物質の分離の程度に影響する要素および回収率に影響する要素の中から、主なものを Fig. 9. に示す。イオン交換クロマトグラフィーに限らず、一般に、異なる条件での精製を2種あるいは2種以上に組み合わせると、分離の程度が著しく改善される。例えば、ある条件の第1ステップで不純物質群Aを分離し、条件を変えた第2ステップで不純物質群Bを分離するとき、より効果的であることが多い。酵素が溶液中で安定であるための条件は、一般的には、0°C 附近の温度、中性附近の pH、高い蛋白質濃度、保護物質の共存、失活作用物質の不在、などであろう。酵素溶液へ人工的に添加できる保護物質として、dithiothreitol, 2-mercaptoethanol, thioglycolate (以上は、酵素の SH 基の保護作用があると考えられている)、EDTA (重金属のキレート剤)、目的酵素の基質、glycerol, glycine, albumin, gelatin, dimethyl sulfoxide, などが、しばしば用いられている。acetone などが有効な酵素安定化剤である例もある。粗酵素溶液中では安定な酵素であるのに反して、精製を進めるにつれて、著しく不安定となり、急激に回収率が低下する場合がある。このような場合の原因としては、主に次の4つの場合が考えられよう。

1) 精製が進むにつれて保護作用を示す不純物質が除去される場合。2) イオン交換体に吸着されるとき、酵素が変性し、失活する場合、あるいは、失活はしないけれども、イオン交換体に非可逆的に吸着され、溶出され

Higher purity

Separation factors

Ion exchanger: kind, particle size, ionic form, bed condition	<p>pH</p> <p>Ion species</p> <p>Ionic concentration</p>
Column: length, diameter	
Kd value: "enzyme" relative to "impurities"	
Flow rate	

Higher yield

Recovery factors

Denaturation-inactivation	<p>Temperature</p> <p>pH of solvent</p> <p>Protein concentration</p> <p>Coexistence of protecting materials</p> <p>Coexistence of inactivating materials</p>
Irreversible adsorption	
Dilution	

Fig. 9. Various factors for improvements of purification.

ない場合. 3) 蛋白質濃度が過度に低下することによって, 酵素が失活する場合. 4) 目標としている酵素反応が2つ以上の酵素反応からなっている場合, 予期しない補酵素を必要とする場合など, 酵素活性の分析に問題がある場合.

1) の保護作用をしめす不純物質を除去したために目的酵素の失活がおこったと考えられるときには, 適当な安定化物質を添加することによって失活を防止できる場合がある. 例えば, 酵母アルコール脱水素酵素 (alcohol dehydrogenase, EC 1.1.1.1) は, 脱塩したり, イオン交換クロマトグラフィーにかけたりすると, 数時間の中に殆んど完全に失活することを何度か経験した. この場合には 1 mM の thioglycolate を添加しておくことによって防止された.

2) のイオン交換体との強い相互作用による変性や非可逆的吸着を防ぐためには, 酵素がイオン交換体に, あまり強く吸着されすぎると条件を避けるようにすると効果がある. すなわち, K_d' が適度にまで低下するように, 吸着させる際の塩濃度を上げたり, また, pH を変える. 例えば, 酵母 G-6-P DH を DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーするとき, Fig. 8. に見られるように, 75 mM K-リン酸緩衝液 (pH 7.5) で十分に溶離されるはずにもかかわらず, 緩衝液濃度を 200 mM にしても, 回収率が低すぎることを, 当初のころ, 経験した. 吸着の際の緩衝液濃度を 20 mM から 50 mM に上げることで問題は解決された. また, 別の例では, 酵母 HK を DEAE-セルロースを用いて精製した場合にも, 上述の例と同様なことがおこったけれども, この場合はクロマトグラフィーを行なうときの pH を 7.5 から 7.0 に下げることによって解決された.

3) の蛋白質濃度が低下しすぎることによる問題は, クロマトグラフィーをする際に適当な K_d' の条件を選ぶことによって防ぐことができよう.

4) の場合については, 目的酵素の種類によって多岐にわたるので, ここでは触れない.

IV. そ の 他

その他の問題の1つにスケールアップがある. 例えばカラムサイズを 10 ml 単位から 1 単位へ大きくするとき予想外の困難に出会うことがある. これには種々の異なる原因があるのであろうけれども, 私達のスケールアップに関する経験から, 一般に最も有効だった解決法は, スケールを上げるときは, 目的酵素をイオン交換体に吸着させる際, および溶離する際の K_d' を小さいスケールの場合よりも低くすると良いということである. これに

(A) DEAE-cellulose

(B) P-cellulose

Fig. 10. Effects of concentration and pH of elution buffer on pH of the eluate in column chromatography with cellulose ion exchangers.

(A) DEAE-cellulose column (15 l) equilibrated with K-phosphate buffer at pH 7.5 was successively eluted with 15 l of the same buffer of 200 mM and the same buffer of 20 mM.

(B) P-cellulose column (15 l) equilibrated with 10 mM K-phosphate buffer at pH 6.0. The column was eluted with 50 mM K-phosphate buffer at pH 7.0.

The pH and electric conductivity of the eluate were determined continuously by a flow-type electrode cell.

よって、目的酵素の溶出ピークは鋭くなり、さらに、溶出に要する時間も短縮されるという利点も出る。V_bが十分大きい場合は、V_bの小さい場合よりK_{d'}を下げて、 ΔV_e を十分とることができ (Fig. 1. の式②)、一般にスケールアップと共にPが増加するので、むしろ、 $\Delta V_e/W_{1/2}$ は良くなる傾向がある (Fig. 1. の式④)。

可成り重要な問題であるので附記すると、イオン交換クロマトグラフィーにおいて溶出に用いる緩衝液の塩濃度を変化させるとき、pHの変化を伴う。例として、イオン交換セルロースカラムクロマトグラフィーにおいて緩衝液の塩濃度を段階的に変えたときのpHの変化をFig. 10. に示す。Fig. 10. では、100 mM K-リン酸緩衝液 (pH 7.5) でDEAE-セルロースカラムを平衡化したのち、200 mMのK-リン酸緩衝液 (pH 7.5) を流すとき、溶出液のpHが0.1~0.2上り、また、続いて20 mM K-リン酸緩衝液 (pH 7.5) を流すとき、溶出液のpHが0.4も下る。また、Fig. 10. では、10 mM, pH 6.0 のK-リン酸緩衝液でP-セルロースカラムを平衡化した後に、50 mM pH 7.0 のK-リン酸緩衝液を流すとき、後者の緩衝液がカラムから流出する時点で、まず、流出液の電気伝導度は少し上る (塩濃度の上昇をしめす) けれども、流出液のpHは7.0に近づくどころか、逆に0.3程度も下る。その後、同じ緩衝液を流し続けると、かなり後の方で、ようやく、流出液のpHは7.0になり、電気伝導度も、その緩衝液のものになる。イオン交換体の緩衝能が高いほど、この傾向が著しい。一般に、塩濃度を上げる場合には、陰イオン交換体ではpHが上がり、逆に陽イオン交換体ではpHは下がる。塩濃度を下げる場合には、一般にその逆である。一方、緩衝液のpHを変えた場合には、カラムの上の方からゆっくりとpHの変換が起こり、カラム全体が、その緩衝液のpHになるまでには、かなりの量の緩衝液を流さなければならない。イオン交換体カラムクロマトグラフィーにおいて、pH勾配による溶出をする場合には特に注意を要する。

V. イオン交換体による特殊なカラムクロマトグラフィー

酵素がイオン交換体に対して、イオン交換的な吸着ではなくて、“生物学的な”吸着をされると考えられる場合がある。酵母抽出液を、1度DEAE-セルロースに吸着させた後、強い条件で溶離したものを粗酵素試料として用いて、P-セルロースによるエリュージョンテストをpH 7.0で行なったのがFig. 11. である。P-セルロースはセルロースのグルコース残基の6位にリン酸が導入さ

Fig. 11. Elution test for acidic enzymes with P-cellulose column.

A yeast extract in 10 mM K-phosphate buffer at pH 7.0 (starting solution 20 ml) was applied to a P-cellulose column (2.2×5.3 cm). The column was eluted successively with 150 ml of the K-phosphate buffer (pH 7.0) at higher concentrations. 50-ml eluate fractions were collected and measured of enzyme activities (G-6-P DH, 6-PG DH and G R), total protein concentration and electric conductivity.

れたものであり、CM-セルロースと同様に弱酸性陽イオン交換体に属するものである。Fig. 11. で扱われている酵素の等電点は、G-6-P DHが4.5、G Rが4.9、6-PG DHが4.9である。従って、この実験条件のpH 7.0では、いずれの酵素もがマイナス電荷になっているはずである。一方、P-セルロースは陽イオン交換体であり、マイナスイオンは吸着しないのが普通であり、事実、用いた粗酵素試料中のほとんどの蛋白質がP-セルロースカラムに吸着されることなく通過している。以上のことから、それに反して、P-セルロースに吸着している上記の酵素は、静電気力に反して吸着していると考えられよう。その他、P.Kも同様な吸着を示す。P-セルロースに吸着された上述の酵素は、各々の基質溶液によってP-セルロースカラムから溶離される (Fig. 12)。図の上辺の垂直線は、カラムに異なる添加物を含む緩衝液を流し始めた時点で、その垂直線に連続して右下方にのびた斜線の先端が、その緩衝液がカラム底部から流出しはじめた時点を示す。酵母抽出液をDEAE-セルロースカラムに吸着させた後、強い条件で溶離した半精製酵素溶液を、まず、P-セルロースカラムに流し、つぎに、緩衝液でそのP-セルロースカラムを洗う。その洗浄によって、半精製酵素溶液に含まれていたほとんどの蛋白質と共に、HKがカラムから流出するけれども、G-6-P DH, P.K, 6-PG DHはカラムに吸着されたままであ

Fig. 12. Elution of enzyme adsorbed on P-cellulose by substrate solution.

A yeast extract in 10 mM malonate buffer at pH 6 (starting solution, 5 ml) was applied to a P-cellulose column (1.1 × 10.6 cm) equilibrated with the same buffer. The column was washed by 10 ml of the same buffer. The washed column was eluted successively by the following malonate buffer solution and 5-ml fractions were collected.

- 1) 10 ml of the buffer containing 10^{-4} M G-6-P,
- 2) 10 ml of the buffer,
- 3) 10 ml of the buffer containing 5×10^{-4} M 6-PG,
- 4) 10 ml of the buffer,
- 5) 10 ml of the buffer containing 2×10^{-4} M NADP⁺,
- 6) 10 ml of the buffer,
- 7) 10 ml of the buffer containing 1×10^{-4} M ATP,
- 8) 10 ml of the buffer.

Enzyme activities (HK, 6-PG DH, G-6-P DH, and P K) of each fraction were determined.

Fig. 13. An example in successive isolation of several yeast enzymes for mass production at Oriental Yeast Co., Ltd., Osaka.

る。その吸着カラムに、G-6-Pを含む緩衝液を流しても、いずれの酵素も溶出されない。けれども、6-PGを含む緩衝液を流すと、6-PG DHが溶出された。同様に、NADP⁺によってG-6-P DHが溶出され、ATPによってP Kが溶出された。6-PG、NADP⁺、ATPはそれぞれ6-PG DH、G R、P Kの基質であり、それらの酵素反応はいずれも無機リン酸によって拮抗的に阻害される。これらの事実に基づいて、上記の3種の酵素は、上記のそれぞれの基質のリン酸基に対する親和力と同様のメカニズムで、P-セルロースのリン酸基に対する親和力によってP-セルロースに吸着すると考えられる、

最後に、イオン交換体が、蛋白質の一般的分画手段として、どの程度有効かについて1例を示すことにする。

Fig. 13. は、オリエンタル酵母工業株式会社大阪工場、工場レベルでの酵素の生産にイオン交換体を用いた過程の模式である。酵母抽出液を連続してDEAE-セルロースカラム、CM-セルロースカラム、P-セルロースカラム、DEAE-セルロースカラムに通過させる。上記の4本のカラムに吸着した酵素は、それぞれ別々に溶出される。このように、抽出液中の酵素は、まずグループとして、互いに分離されて後に、更に、図のように別々のイオン交換体カラムに分配され、それぞれのイオン交換体カラムクロマトグラフィーによって、さらに細かく分離される。例えば、第1番目のDEAE-セルロースカラムから溶出されたグループは、さらにP-セルロースカラムとDEAE-セルロースカラムに吸着され、それぞれから別々に溶離される。グループ分けのされ方は、酵母の種類、培養条件、抽出条件などに基づく抽出液の種類によって異なり、また、どの酵素をより多量に、あるいは互に効率よく分離して生産しようとするのかなどの目的によって、ある程度異なるけれども、上記の精製操作方法においてはかなり自由にコントロールできるものである。私達の工場では、現在、イオン交換体カラムクロマトグラフィーを種々に組合わせて、1度に、1つの流れ作業過程ごとに、十種余の酵素の精製を行なっているけれども、この数は、むしろ、目的酵素の選定によるものであり、必要とあれば、更に増加させることができる。

文 献

- 1) C. A. Zittlo: *Advances in Enzymol.* **14**, 319. (1953).
- 2) 垣花秀武: 成田耕造編「最新イオン交換」(1960) 広川書店.
- 3) 波多野博行編: 「新しい液体クロマトグラフィー」化学の領域 増刊88号 南江堂 (1969).

(172) 生物物理化学

- 4) 成田耕造：村上孝夫編「クロマトグラフィーの
実際」広川書店 (1964)。
- 5) A. J. P. Martin, R. L. M. Synge ; Biochem. J.
35, 1358 (1941).
- 6) W. Mayer, E. R. Tompkins : J. Am. Chem.
Soc. **69**, 2866 (1947).
- 7) 松尾雄志, 堀尾武一：蛋白質核酸酵素 **12**,
No. 9, 737 (1967).
- 8) 松尾雄志, 堀内義夫, 中村敏一：「新しい液体
クロマトグラフィー」化学の領域 増刊 88 号
164 (1969).