澱粉を支持体とする Zone Electrophoresis.

東京大学伝染病研究所
生物物理化学研究部

中 村 弘

On a Zone Electrophoresis using Starch as Supporting Medium.

H. Nakamura

H. G. Kunkel 等の報告¹⁾ に基づいて、澱粉を支持体とする Zone Electrophoresis 装置を自作した。

本装置によって、ジフテリア毒素、抗毒素蛋白の電気泳動的精製と純度検索の目的で行った応用実験の結果は先に報告^{*1} したが、今回は本装置についての操作の概略と共に、蛋白質の電気泳動的精製のための基礎実験と 2~3 の結果を述べる。

澱粉は蛋白質との相互作用が少く、また良く水分を保つので Zone Electrophoresis の支持体として適当である。本法の特徴としては、試料の回収率が高いこと、また濾紙に比して多量の試料が扱えること、装置および操作が比較的簡単である事等である。

装置は電源と泳動部分の二つに分けられる。

i) 電源、特に安定化の必要はないが、電流による澱

Fig. 2 泳動装置

a. 電極槽. b. 緩衝液槽. c. 塩橋. d. 泳動用セル. e. 電極

粉中での熱の発生が大きな問題となるので、定電流型電源が良いと思う。著者等が用いているものは、1 KVolt. 50 mA の容量をもつ定電流型電源で、一昼夜の連続使用でも殆ど電流値の変動はない。Fig. 1 にその配線図を示した。

ii) 泳動装置、装置は Fig. 2 に示すごとく、電極槽と緩衝液槽、および泳動用セルから成っており、電極槽、

緩衝液槽は、おのおの 500 cc ずつの緩衝液が入り、塩橋で電氣的に結合してある。電極は、炭素棒、または白金が良い。泳動用セルは、肉厚 3 mm の合成樹脂板で作り、基礎実験には、400×70×15 mm の大きさのものを用了。これで約 6~7 cc の試料の分離が可能である。試料の易動度、成分の数、およびその量等、分離の条件に従って、適当な大きさのセルを選んで使用している。セルはコの字型に曲げた箱で、上部も同じ合成樹脂板の蓋で密閉出来る様になっており、両端は厚目の濾紙で押え、ガーゼを数枚当て、緩衝液中に浸す。全体に高電圧がかかり、定電流型電源を使用するため、緩衝液の漏洩、金属等の接触等、特に注意を要する。

Fig. 1 電源配線図

V₁ 5R4GY, V₂ 807, V₃ 0A2, V₄ 0B2, T₁, T₂, 電源変圧器

*1 曾良, 中村 第 5 回電気泳動研究会東部支部会発表。

泳動実験

O.D.

A) 局方の澱粉を良く水洗^{*2}して用いるが、最後に約 50°C の緩衝液で洗えば、不純物は殆ど除くことが出来る。澱粉 5 gr は約 6 cc の緩衝液と混ぜた場合、電気泳動に用いる最適のペースト状になるので、最後に洗う緩衝液の濃度を適当に選べば、澱粉中の緩衝液の濃度が決る。緩衝液の種類は、ペロナル塩緩衝液が良く、磷酸塩緩衝液では、血清蛋白の場合良い結果が得られなかった。また試料を添加する時に用いる澱粉を、あらかじめ蒸留水で良く洗い、乾燥させておく。

B) 緩衝液を含んだペースト状の澱粉を、セルに充填し、表面に浮出す余分の緩衝液を濾紙で除き、30~60 分放置すれば澱粉は大体均一になる。試料は同じ緩衝液で充分透析しておき、前に用意した乾いた澱粉と混合し、ペースト状にしたものを、澱粉柱の一部を一定の巾 10 m/m に取除いた箇所 (Origin) に充填する。Origin は濾紙の場合と同様に電気浸透による影響^{*3}を考慮して、陰極側から 100 m/m 以上陽極寄りに選ぶ、充填が終わったら、グリースでセルの蓋を密閉し、ゴムベルト、ネジ等で押え、両端部を先に述べたごとくして、緩衝液と連結させる。

Fig. 3 電流による温度上昇

C) 電流の供給; 電流値は、澱粉中での発熱の影響で制限される。ペロナル塩緩衝液 pH 8.6, $\mu=0.1$ を用いた場合、澱粉中での電流値と温度上昇を測定した結果を Fig. 3 に示す。泳動は、0°~4°C の低温で行ったが、澱粉中の温度を 6~7°C 以下に保たせるためには、断面積当り 2 mA/cm² を起えない様に電流値を選ぶ必

*2 水洗は数回行う。多量の水と混合後 30~40 分静置し、沈澱した澱粉は傾瀉して水と分離する。

*3 電気浸透による水の流れが陰極側に向ってあるので、血清蛋白以外はその易動度、および方向を考慮した予備実験が必要である。

*4 血清蛋白の場合であるが、他の試料については、その易動度に応じて時間を選ばねばならぬ。

*5 生理食塩水、および緩衝液等、塩濃度があまり高いと澱粉の分離が困難な場合がある。

Fig. 4 正常馬血清分離図

↓ は Origin を示す

Veronal Buffer pH. 8.6 $\mu=0.1$ 2 mA/cm² 24 時間 4°C

要がある。冷却の方法を改善すれば、かなりの電流を流す事が出来るが、温度の不均一、電気浸透の影響も大となるため、充分考慮せねばならない。以上の条件で行った正常馬血清の分離図を Fig. 4 に示す。

D) 抽出、定量; 泳動時間は約 24~25 時間^{*4}であるが、終了後、澱粉柱を 10 m/m 巾に切断し、適当な

Fig. 5-a

結晶馬血清 Alb. を用いた濃度の増加による至
A. 10% B. 5% C. 2% (24 時間泳動)

抽出液^{*)}で抽出を行う。切取った澱粉と等容量の抽出液を加え、良く攪拌した後、遠心分離し上清をとれば、一回で約 70 % の回収が出来るが、試料の濃度によって適当に抽出をくり返す必要がある。それらの各抽出液について定量を行う。Nessler 法による蛋白 N の測定、および Folin フェノール試薬²⁾による比色定量を行っている。定量図型は、Tiselius 型泳動像と良い一致を示すが、比色定量の場合、蛋白の種類による補正を行わねばならない。また場合によって生物学的活性による定量も必要となる。泳動後、澱粉

Fig. 6-2-a a. ジフテリア抗毒素 globulin [硫安 33~48 % の pseudoglobulin fraction) の分離図

Fig. 5-b

電流を流さない場合の広がり (24 時間)

Fig. 6-1

分離した正常馬血清各成分の Tiselius 泳動像
a. Alb. b. β -glob. c. γ -glob.

Fig. 6-2-b

b. 上図の a. b. 間分割の Tiselius 電気泳動像

柱の表面に濾紙を当て軽く液を吸取り、B. P. B. 等で染色すれば、大体の泳動像が解り、これによって部分的に抽出を行うことも出来る。

E) 試料の濃度; 分離調製の目的では、比較的多量の試料を取扱うが、試料の濃度は、高過ぎると分離が悪く、低いと定量に困難がある。馬血清 Alb. を用いた実験からは、2~8 % の範囲が良いと思われる。Fig. 5 に濃度による像の歪を示した。また電流を通ずる事なく同

Fig. 6-3-a

a. 分離精製後の毒素 3300 Lf/P. N. mg.

Fig. 6-3-b

b. 2500 Lf/P. N. mg の試料
わずかではあるが非対称である。

時間放置した場合の澱粉中での試料の広がりを比較のために示しておく。

Fig. 6-3-c ジフテリア毒素

c. 2200 Lf/P. N. mg の試料の分離図, 点線の部分で分けたものが Fig. 6-3-a である。

Fig. 6-3-d

d. 各 fraction の Lf/P. N. mg の値を示す。

以上が装置に関する操作と、基礎実験の結果であるが、これらを基にして行った正常馬血清の Alb., β -glob., γ -glob. ジフテリア抗毒素 T-glob. (ウマ) の分離, およびジフテリア毒素の分離精製の結果を, Tiselius 電気泳動図と比較して Fig. 6 に示した。なおジフテリア毒素に関しては, 約 1500 Lf/P. N. mg の試料から, 2 回の精製後 3300 Lf/P. N. mg の高単位毒素が得られている。

以上のごとく実験操作も容易で, また優れた精製効果や, 回収率の良い点から考え, 本法は実験的な試料調製

には極めて有力な手段であると考えられる。なお最近酵素の精製, 蛋白の分離等の報告が各誌に多く発表されているから参照されたい。

文 献

- 1) H. G. Kunkel: Methods of Biochemical Analysis 1, 141, (1954).
- 2) Heidelberger, M., and MacPherson, C. F. C., Science, 97, 405; 98, 63. (1943)

Green, H. and Anker, H. S. "On the Synthesis of Antibody Protein." Biochim. Biophys. Acta, 13, 365 (1954)

抗体生成の機構は下記の 3 つのうちのどれかと考えられる。

- 1) γ -Glob. 分子の表面のペプチド鎖の配置が変化して特定の形をとる。
- 2) γ -Glob. の一部が分解し, この分解された部分が再合成されて抗体性を生ずる。
- 3) 抗体は正常 γ -Glob. と全く別個にアミノ酸から合成される。

著者は以下にのべる実験から, 生体内では 3) の機構がおこなわれていると考える。すなわち C^{14} -Glycine を注射した後に免疫をはじめる実験, 免疫しつつある動物に C^{14} -, N^{15} -, D-Amino 酸を注射する実験などによると, 合成された抗体 Glob. は直ちに流血中に現われない。流血中に抗体が現れる時には, 少なくとも抗体 Glob. の $1/3$ は既に合成されているということがみとめられた。抗体合成に関する機構については Gros, P. et al (Bull. Soc. Chim. Biol. 1952, 34, 1070) もまた著者と同じような意見をもっている。

Humphrey, J. H. and McFarlane, A. S. "Rate of Elimination of Homologous Globulins (including antibody) from the Circulation." Biochem. J. 57, 186 (1954)

正常家兎, 免疫家兎に carboxy- C^{14} lysine および phenylalanine を注射して, これらの放射性アミノ酸で label された抗体または非抗体性 γ -Glob. をつくらせる。これらの家兎の血清から分離した抗体または非抗体 γ -Glob. を正常家兎あるいは免疫家兎に注射して, 放射能の消長を検討した。その結果, 抗体 Glob. の lys, phenyl-ala. の carboxy-C は循環血中にある間は交換反応をうけないこと, 免疫家兎に抗体 Glob. または非抗体性 Glob. を注射すると, 血漿中のこれらの Glob. の比放射能は, いずれの場合にも, 1 日に 12.5% ずつ減少することがみられた。正常家兎に抗体性 Glob. を注射した場合の抗体濃度, 非抗体性 Glob. を注射した場合の Glob. の比放射能はいずれも 1 日に 12.5% ずつの減少をしめす。