

問題 34 ゲルろ過法によるタンパク質の分子量決定

ゲルろ過法は、簡単でしかも信頼性の高いクロマトグラフィーであり、分子の大きさにより分離する手法である。選択した分子量別の範囲内において、分子はサイズの大きいものから小さいものの順で溶離してくる。この手法では、他の手法で容易に分離できない高分子も含み、どのような種類の生体関連物質でも精製・解析可能である。

3次元ネットワーク構造をもち、ゲル状になる有機高分子(ふつう、ゲルろ過充てん剤 **GFM** とよばれる)は分子ふるいとしてはたらく、大きさや形状によって分子を分離できる。膨潤したゲルをクロマトグラフィーカラムにつめ、適当な緩衝溶液と平衡にする。分離のメカニズムは吸着によるものではなく、使用する溶離液の組成に依存しないので、大変扱いやすい。膨潤したゲル充てん剤粒子中に入り込んでいる液体が固定相となり、ゲル粒子の外側のすき間を流れる溶離液が移動相となる。

カラム中では、いずれの試料分子もゲル粒子間の液相に存在できる。ゲルろ過法において、このゲル粒子の外側にある液相の総容量はボイド容量(空隙容量)と呼ばれ、カラム容積のほぼ 30%にあたる。試料分子の分配は、ゲル粒子中の細孔のうち、その分子が入り込める部分の液体(固定相)と溶離液(移動相)の間でおこる。この分配は拡散を駆動力とし、移動相と固定相との間で試料分子の「動的平衡」を達成するように作用する。移動相中の試料分子は、流れによりカラムの下方へ輸送されるのに対し、ゲル粒子細孔中の分子は停滞しており輸送されない。したがって、試料ゾーン(帯)の移動速度は、移動相に存在する試料分子の割合に依存する。複数の高分子のうち少なくとも一方が、**GFM** 細孔の一部分のみに分配されるとき、高分子の分離が可能である。ゲルろ過法においては試料溶液の濃度効果は見られず、使用できる試料容量はせいぜいかラム容積の 0.5~5%である。移動相と固定相の間の物質移動の不完全さに起因するピークの広がりを避けるため、溶離液の流速は低くする。また、最適の分離条件を得るため、使用されるカラムは長くする。

試薬

ブルーデキストラン (分子量 MW=2 MDa), 4 mg

タンパク質:

卵アルブミン (オボアルブミン) (MW=43 kDa), 1.5 mg

シトクローム C (MW=13 kDa), 0.4 mg

ウシ血清アルブミン (BSA) (MW=67 kDa), 2.2 mg

キモトリプシノーゲン (MW=25 kDa), 1 mg

ヘモグロビン (MW=64.5 kDa), 1.5 mg

0.1 M HCl (R34, R37, S26, S36, S45) 230 ml

KCl 22.35 g

緩衝剤:

トリス(2-アミノ-2-(ヒドロキシメチル)プロパン-1, 3-ジオール) (R36/37/38, S26, S36) 6.05 g

GFM: Toyopearl HW-50 (または HW-55), 細粒, 70 ml

もし上記のタンパク質のうち手に入らないものがあれば、それらの代わりに分子量の近い別のタンパク質で代用しても良い。ただし、プロテアーゼは使用できない。また Toyopearl は、同様な性質をもつゲル充てん剤(GFM)を用いても良い。

器具

70 ml クロマトグラフィーカラム

充てん筒 (カラム上部に取り付け充てん時にスラリー液を貯める。)

スタンド

ペリスタルティックポンプ(チュービングポンプ)

UV 検出器: UV-Cord (記録計に接続したもの)

遠心分離機

分析用てんびんはかり

水流ポンプ

1000 ml メスシリンダー 1本

250 ml メスフラスコ 1本

ブフナーロート(大) ガラスフィルターつき 1個

1000 ml ブンゼンフラスコ(吸引ろ過ビン) 1本

1000 ml 丸底フラスコ 1本

100 μ l マイクロピペット 1本 およびチップ

1000 μ l マイクロピペット 1本 およびチップ

2 ml 注射筒 1本 (20 cm のチューブに接続)

エッペンドルフチューブ 4本

100 ml メスシリンダー 1本

200 ml フラスコ 1 本
100 ml ビーカー 1 個
スチール薬さじ(大) 1 本
マイクロスポーテル 1 本
ガラス棒
ろ紙

注: UV 検出器(UV-cord)は、紫外・可視分光光度計および試験管で代用しても良い。

実験手順

手順 1 緩衝溶液の調製

濃度 0.2 M のトリス(2-アミノ-2-(ヒドロキシメチル)プロパン-1, 3-ジオール)緩衝溶液(以下、トリス溶液)を調製するため、250 ml メスフラスコを用いて 6.05 g のトリスを 250 ml の蒸留水に溶かす。1000 ml メスシリンダーを用いて、0.2 M トリス溶液 125 ml と 0.1 M HCl 230 ml を混合する。さらに蒸留水を加え、800 ml とする。このトリス-HCl 溶液に 22.35 g の KCl を加え、塩が完全に溶解するまで良くかくはんする。水を加え、1000 ml にする。(最終的に KCl の濃度は 0.3 M となる。)

手順 2 クロマトグラフィーカラムの準備

カラムへの樹脂の充てんはクロマトグラフィーにおいてもっとも重要な手順のひとつであり、これにより分離能の良し悪しが大きく左右される。カラムは均一に詰められ、またゲル充てん剤の上端面と下端面は厳密に水平になるべきである。

1. ゲル充てん剤を室温に放置して温度平衡にする。
2. ゲル充てん剤の入ったビンをゆるやかに振り、むらのないスラリー状にする。
3. スラリー状のゲル充てん剤 70 ml をビーカーに移し、緩衝溶液で希釈して 100 ml にする。
4. ガラス棒でかき混ぜ、かたまりのない均一な懸濁液とする。
5. 分離緩衝溶液をカラムに注ぎ、カラムの漏れがないことを確認し、またカラムの内壁を濡らし、充てん剤止め受けの空気を除く。(このとき、水流ポンプを用いてカラムの下端より満たす方が良い。) 止め受けの約 1 cm うえまで緩衝溶液を流し出す。カラムの下端に多孔質ガラスフィルターがついている場合には、カラムの内径にちょうど合った円形ろ紙

をガラスフィルターの上のせ、カラムからゲル充てん剤がもれるのを防ぐと良い。

6. 鉛直にカラムを置き、充てん筒をしっかりとカラムに取り付ける。充てん筒の長さは、カラムの長さの半分以下である。

7. 吸引ろ過ビンに取り付けたブフナーロート上において、水流ポンプを用いてゲル充てん剤を 100~120 ml のトリス緩衝溶液で 3 回洗浄する。Toyoperal が乾かないように注意せよ。各洗浄後、ゲル充てん剤の上面が乾燥しはじめたら水流ポンプをはずす。それから次の緩衝溶液を注ぎ、スチール薬さじ(大)でかき混ぜ均一な懸濁液にしてから吸引する。

8. ゲル充てん剤をロートから 1000 ml 丸底フラスコへ移し、50 ml の緩衝溶液を加え、水流ポンプを連結管を用いてフラスコにつなぐ。吸引脱気を、少なくとも 5 分間続ける。

9. ゲル充てん剤を再び懸濁させ、スラリー状の充てん剤をカラムへいっきに注ぎ込む。カラムの内壁にあてたガラス棒をつたわらせて注ぎ落とすと気泡が入らなくてすむ。(図 1) スラリー状ゲル充てん剤がカラムの内壁を伝わって流れるようにせよ。

10. 充てん筒の上端まで緩衝溶液で注意深く満たし、ゲル充てん剤ができるだけ乱れないようにする。充てん筒をペリスタルティックポンプにつなぎ、さらにポンプを 200 ml フラスコの緩衝溶液だめにつなぐ。ポンプのスイッチを入れ、カラムの流出口を開ける。

11. ゲル充てん剤が定着するまで、カラムに緩衝溶液をポンプを用いて流す。充てん剤容量の 2 倍の緩衝溶液を流したら、充てん筒をはずし、流入ロアダプター(プランジャー)を挿入する。

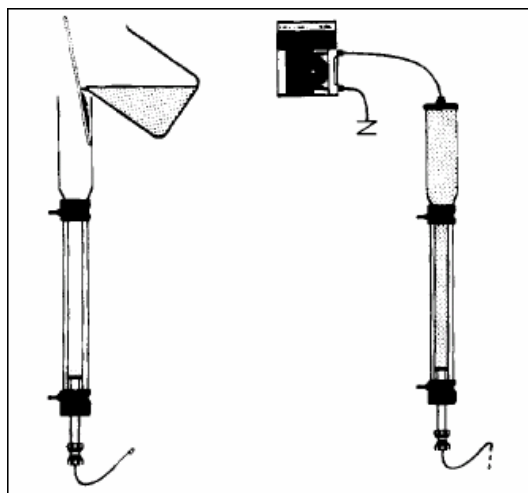


Fig. 1. Packaging the column with GFM.

手順 3 溶液の調製

ブルーデキストランおよびタンパク質をてんびんはかりとマイクロパーテルを用いて量り取る。ブルーデキストランの溶液は、エッペンドルフチューブ中のトリス緩衝溶液 1 ml にブルーデキストランを溶解して調製する。標準となるタンパク質の溶液を 2 種類、エッペ

ンドルフチューブ中に調製する。卵アルブミン、シトクローム C、ブルーデキストラン溶液 0.07 ml、トリス緩衝溶液 0.93 ml を含む溶液を標準タンパク質試料溶液 1 とする。ウシ血清アルブミン、キモトリプシノーゲン、ブルーデキストラン溶液 0.07 ml、トリス緩衝溶液 0.93 ml を含む溶液を標準タンパク質試料溶液 2 とする。ヘモグロビン(分子量未知)の溶液をトリス緩衝溶液 1 ml に溶かして分子量未知のタンパク質溶液とする。2 種の標準タンパク質試料溶液および分子量未知のタンパク質溶液を、5 分間、遠心分離機にかける。

手順 4 試料の添加

1. ゲル充てん剤を乱さないよう、注意して試料溶液を添加する。充てん剤を乱さないように、ろ紙を充てん剤の上端に置いて良い。(しかしその場合には、タンパク質のろ紙への吸収がおこりえるので留意せよ。) 流入口アダプターとペリスタルティックポンプをはずし、カラムの流出口を開ける。緩衝溶液をゲル充てん剤にしみ込ませ(ゲル充てん剤の上面に緩衝溶液がないが、乾いてもいない状態)、流出口を閉じる。口の広いチップのついたピペットもしくは 20 cm 管のつながった 2 ml 注射筒を用いてゆっくりと試料溶液を加えたら、流出口を開け、ゲル充てん剤の中に溶液が流れこむようにする。流出口を閉じ、緩衝溶液(約 1 ml)をゆっくりとかつ注意深く加える(試料溶液を添加したときと同様に)。流出口を開け、緩衝溶液がゲル充てん剤にしみ込むようにする。この操作を繰り返せ。これにより、試料溶液がゲル充てん剤の上端から下により深くしみ込み、逆方向への拡散を防ぐことになる。カラムの流出口を閉じ、注意深くゲル充てん剤の上に約 2 cm の高さで緩衝溶液がたまるようにする。
2. ペリスタルティックポンプをカラムの流入口に、また UV 検出器をカラムの流出口に(管の長さは可能な限り短くする)それぞれつなぎ、溶離をはじめる。

手順 5 カラムクロマトグラフィー

1. カラムの較正を二段階で行う。
 - A. ブルーデキストラン、卵アルブミン、シトクローム C を含む標準タンパク質試料溶液 1 をカラムにかける。おおよそ毎分 1~2 ml の流速で溶離を開始し、溶離液を 100 ml メスシリンダーに集める。溶離過程は、UV 検出器により記録される 280 nm における溶離液の吸収を見て追跡する。メスシリンダーを用いて、ブルーデキストランおよびタンパク質の溶離容量を量る。(溶離液の吸光度が極大となる時の容量を記録せよ。)

(注: 分光光度計と試験管を用いる場合には、次のように手順を変更すると良い。カラム容積の 25% までメスシリンダーに溶離液を集める。ひきつづき、1 ml ずつ、試験管に溶離液を集め続ける。分光光度計を用いて、それぞれの試験管に採取した溶離液の 280 nm におけ

る吸光度を測定し、溶離液の吸光度が極大になるときに対応する全容量を記録する。)

3つのピークが記録されたら、緩衝溶液でカラムを洗浄するため、カラムの容積と同量の緩衝溶液を流す。

B. 標準タンパク質溶液2をカラムにかけ、上で述べたのと同様に実験を進める。

2. 分子量未知のタンパク質溶液をカラムにかける。ピークが記録されたらペリスタルティックポンプを止め、カラムの流出口を閉じ、UV 検出器の電源を切る。

問題

1. クロマトグラフィーで得られたピークを、カラムにかけた物質と対応付けよ。下表を完成せよ。

標準試料番号	ピークの番号(検出された順番に)		
	1	2	3
1			
2			

2. 使用したカラムのボイド容量とは何のことか。説明せよ。

3. クロマトグラフィーカラムの容積を計算せよ。

4. すべてのタンパク質について以下の式で表される有効係数 K_{av} を求めよ。

$$K_{av} = \frac{V_r - V_0}{V_c - V_0}$$

ここで、 V_r は試料分子の溶離容量、 V_0 はボイド容量、 V_c はカラム容積である。

5. 4種の標準タンパク質について得られたデータを用いて、有効係数 K_{av} を分子量の対数値 $\log(MW)$ の関数として、校正曲線を描け。

6. 分子量が未知のタンパク質の分子量を決定せよ。

7. カラムの特徴を示すもうひとつの重要な変数が排除限界点 M_r である。この変数は、ゲルの細孔から排除される(細孔に入り込めない)最も小さい分子の分子量として定義される。較正曲線の直線部分を外挿し、 $\log(MW)$ 軸との切片より、この変数の値を求めよ。

8. このカラムを用いる場合に、低分子量物質について溶離容量を見積もれ。説明も加えよ。