

Title	疎水的-イオンのクロマトグラフィ : ブタ腓臓および微生物の酵素の精製への応用
Author(s)	佐々木, 征治
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/33471
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	佐々木 征 治
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 5 7 3 5 号
学位授与の日付	昭和 57 年 6 月 16 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	疎水的-イオンのクロマトグラフィ：ブタ膵臓および微生物の 酵素の精製への応用
論文審査委員	(主査) 教授 堀尾 武一 (副査) 教授 松原 央 教授 福井 俊郎

論 文 内 容 の 要 旨

1. アンバーライト CG-50は、イオン交換基としてカルボキシル基をもつ弱酸性カチオン交換樹脂であり、その交換基は、pH 4.5以下では解離せず、pH 5.5で約30%が解離する。pH 4において、CG-50は、ブタ膵臓の種々の酵素を酵素の等電点に無関係に吸着する。この吸着は、イオン強度によって全く影響されない。

2. pH 4において、吸着された酵素は、50%プロパノールなどの有機溶媒を含む酢酸緩衝液によって溶出される。

3. CG-50に吸着された酵素は、pHを4から6に勾配的に上昇させると効果的に溶出され、互いに分離される。溶出時に、緩衝液として酢酸緩衝液を用いると、カリクレイン、デオキシリボヌクレアーゼ、カルボキシペプチダーゼB、トリプシン、カルボキシペプチダーゼAの順で溶出されるのに対し、酢酸よりも疎水度の高い3,3-ジメチルグルタル酸緩衝液を用いると、カリクレイン、カルボキシペプチダーゼB、デオキシリボヌクレアーゼ、カルボキシペプチダーゼA、トリプシンの順で溶出される。とくに、後者の溶出法では、トリプシンが他の酵素の分画に全く混入しない。

4. CG-50カラムを用いるクロマトグラフィによって、ただ一回の操作で、ブタ膵臓の抽出液からカリクレイン、カルボキシペプチダーゼB、デオキシリボヌクレアーゼ、カルボキシペプチダーゼA、およびトリプシンは、それぞれ、100倍、16倍、17倍、8倍および32倍に精製される。

5. *Aspergillus niger*の生産するグルコース・オキシダーゼ、*Streptomyces hyalurolyticus*の生産するヒアルロニダーゼ、および*Pseudomonas fluorescens*の生産するコレステロール・オキシダーゼとコレステロール・エステラーゼは、それぞれ、pH 4.5以下において、ブタ膵臓の種々の酵

素と同じように、CG-50によく吸着され、pHを上昇させることにより効果的に溶出できた。

6. CG-50カラムを用いるクロマトグラフィによって、ただ一回の操作で、微生物培養液あるいは微生物菌体抽出液から、グルコースオキシダーゼ、ヒアルロニダーゼ、コレステロール・オキシダーゼ、およびコレステロール・エステラーゼは、それぞれ、収率82%、83%、80%、および90%で、30倍、12倍、45倍、および20倍に精製される。

7. CG-50カラムを用いるクロマトグラフィの吸着・溶出の機構は、次のように考えられる。pH 4.5以下では、CG-50のイオン交換基は、解離していないので(-COOH)、酵素のCG-50への吸着は、酵素とCG-50との間の静電氣的相互作用によるのではなく、CG-50の吸着部位と酵素との間の疎水性相互作用によるものと考えられる。また、CG-50の化学構造に基づき、CG-50の吸着部位には、少くとも一個のカルボキシル基が含まれると考えられる。pHを上昇させることにより、イオン交換基が解離し(-COO⁻)、CG-50の吸着部位の疎水性が減少すると共に、解離したイオン交換基と吸着した酵素との間に静電氣的相互作用が、働くようになると考えられる。この静電氣的相互作用が、疎水性相互作用よりも強くなった場合に、吸着した酵素が、溶出されてくるものと考えられ、このようなクロマトグラフィを疎水的-イオンのクロマトグラフィと呼んでいる。

8. *Geotrichum candidum*の生産するグリセロール・デヒドロゲナーゼは、pH6において、検索した10種類の各種アルキル・セファロース誘導体[CH₃(CH₂)_n-セファロース (n=3, 5, 7), NH₂(CH₂)_n-セファロース (n=4, 6, 8), およびHOOC(CH₂)_n-セファロース (n=1, 3, 5, 10)]の中で、オクチル・セファロース [CH₃(CH₂)₇-セファロース], および10-カルボキシデシル・セファロース [HOOC(CH₂)₁₀-セファロース]に完全に吸着された。

9. 10-カルボキシデシル・セファロースに吸着された酵素は、0.26 M NaClあるいは、10~15%プロパノールで溶出されたが、5%プロパノールでは溶出されなかった。また、1 mM各種ヌクレオチド(NAD⁺, NADH, NADP⁺, NADPH, AMP, ADP, ATP)によっても溶出された。一方、オクチル・セファロースに吸着した酵素は、上記の条件では溶出されなかった。10-カルボキシデシル・セファロースに対するグリセロール・デヒドロゲナーゼの吸着・溶出には、その酵素と10-カルボキシデシル残基との間の疎水性相互作用および静電氣的相互作用の両者が、関与しているものと考えられる。

10. 10-カルボキシデシル・セファロースを用いるカラム・クロマトグラフィによって、ただ一回の操作で、*Geotrichum candidum*の菌体抽出液から、グリセロール・デヒドロゲナーゼは、収率79%で、226倍に精製できる。

論文の審査結果の要旨

蛋白質の分離精製用クロマトグラフィに用いる担体に対する蛋白質の親和力は1) 静電氣的引力, 2) 疎水的相互作用(疎水結合), および 3) 水素結合に大別できる。1) に基くイオン交換クロマトグラフィは最も頻繁に用いられており、極めて高い分離能をもつ。反面、その吸着はpHによって

著しく影響されるので、必ずしも、目的蛋白質の安定な pH で遂行することができず、また、イオン強度によって著しく影響されるので、試料液をあらかじめ脱塩しておく必要がある。2) と 3) に基づく疎水結合クロマトグラフィと水素結合クロマトグラフィは上記の欠点をもたないけれども、分離能が低い。

佐々木君は、担体として、イオン交換基としてカルボキシル基をもつメタアクリル酸系の弱酸性カチオン交換樹脂（アンバーライト CG-50）を用い、蛋白質の吸着と溶離の条件を詳細に検討した。その結果、カルボキシル基が全く解離していない pH 4.5 以下では、ブタ心臓の種々の酵素のほとんどすべてが、イオン強度にほとんど影響されずに、吸着されること、吸着された酵素は 50% プロパノールあるいは pH を 6 へ上げることによって溶出されること、などを見出した。蛋白質は疎水結合によって吸着され、カルボキシル基が解離すると、その解離した基と吸着している蛋白質の間に静電的斥力が働き、蛋白質が溶離すると思われる。このクロマトグラフィを疎水的一イオンのクロマトグラフィと名付けた。

上記のクロマトグラフィを用いて、ブタ膵臓の酵素の精製を行った。抽出液を直ちにクロマトグラフィにかけることによって、カリクレインは 100 倍、カルボキシペプチダーゼ B は 16 倍、デオキシリボヌクレアーゼは 17 倍、などと効率良く分離された。

以上のように、佐々木君の研究業績は、蛋白質の精製、特に大量の試料を扱う場合に秀れた威力を発揮する方法を開発したものである。よって、佐々木君の研究業績は理学博士の学位論文として十分に価値あるものと認められる。