The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	蛋白質の固相への吸着をコントロールするための諸要因の研究と酵素のカラムクロマトグラフィへの応用
Author(s)	髙河原, 勇
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34826
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【20】

氏名・（本籍）	髙河原（たかがわら） 勇（いさむ）
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 6602 号
学位授与の日付	昭和59年9月25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	**蛋白質の固相への吸着をコントロールするための諸要因の研究と酵素のカラムクロマトグラフィへの応用**
論文審査委員	（主査）教授 堀尾 武一 （副査）教授 中川 八郎　教授 松原 央

論文内容の要旨

1. 一般のイオン交換クロマトグラフィの原理に反して，Candida utilis およびパン酵母(Saccharomyces cerevisiae)のglucose−6−phoshate dehydrogenase, 6−phosphogluconate dehydrogenase, glutathione reductase および pyruvate kinase は，それらが負の総電荷をもつ条件下で，陽イオン交換体であるP−セルロースに吸着された。この吸着は，それぞれの酵素の基質中のリン酸基に対する親和性と類似の相互作用によると考えられ，吸着したglucose−6−phosphate dehydrogenaseは$NADP^+$ またはNADPHによって溶離され，同様に，glutathione reductaseはNADPHにより，6−phosphogluconate dehydrogenaseは6−phosphogluconateにより，また，pyruvate kinaseはATPまたはADPによって溶離された。この種のクロマトグラフィはいわゆるaffinity−elution chromatographyと原理的に異り，affinity−adsorption−elution chromatographyとも呼ぶべきものである。
2. 上記の知見に基づき，基質のもつリン酸基に親和性のある複数の酵素を大量に，連続的に精製する方法を開発した。一例として，glucose−6−phosphate dehydrogenaseをパン酵母から大量に精製し，結晶化した。
3. 硫安またはギ酸ナトリウムのような塩が高濃度で存在する（ただし，蛋白質はほとんど析出されない）条件下で，酵母抽出液中の，調べた限りの水溶性酵素は全てセルロースおよび，DEAE−セルロース，CM−セルロース，P−セルロースのいずれのカラムにも吸着された。吸着された酵素は塩濃度を減少させる事によってクロマトグラフィ的に溶離された。
4. セルロースに吸着された特定の酵素を溶離させるのに必要な塩濃度は，DEAE−セルロース，CM−セルロースおよびP−セルロースにおいて必要とされる塩濃度のいずれにくらべても低い。すなわち，

イオン交換基は陽イオン的と陰イオン的とにかかわらず，高濃度の塩の存在下における酵素のセルロースへの吸着を弱める。

5. 吸着された酵素は，高濃度の塩濃度を変化させる事なく，ureaまたは，たとえば，sucrose のような水酸基をもつ種々の試薬によって溶離された。

6. 酵素のセルロースに対する吸着力は主に水素結合力に基づくと推察された。この水素結合クロマトグラフィを用いて高濃度の塩の存在下における酵素の精製を行った。

7. これまでに不明な点の多い疎水的相互作用のみによる吸着の性質を調べる目的で，疎水性基と親水性をもつけれども解離基をもたないNonidet P40を用いて，phenyl−Sepharoseおよび他の疎水性基をもつ吸着体への吸着量を種々の条件下で測定する事によって，疎水的吸着におよぼす，添加試薬の種類と濃度，pHおよび温度の効果を調べた。添加試薬の疎水的吸着への効果は次の5種類に大別された。(1)添加濃度全域で吸着を強める効果のあるもの（硫安のようにlyotropicな効果があるとされるもの）。(2)低濃度域では弱め，高濃度域では逆に強めるもの（NaSCNのように，Chaotropicな効果をもつとされるイオンを含むもの），(3)低濃度域では強めるが，高濃度域では逆に弱めるもの（$MgC\ell_2$ のように電荷密度の高いイオンを含むもの）。(4)添加濃度全域で弱めるもの（ethanolなどの有機溶媒，ureaのような有機化合物）。(5)疎水的吸着にほとんど効果を与えないもの（sucrose, glycerol のような糖類）。

8. 疎水性基に水酸基または解離基の導入された構造をもつ吸着体へのNonidet P 40の疎水的吸着の性質を調べた。また，卵白lysozymeおよび牛血清albuminの，種々の疎水性吸着体への吸着の性質を調べ，その機作を考察した。

9. ステロイド骨格に種々の数の水酸基のついた構造のリガンドをもつために，疎水性の少しずつ異る一連の疎水性吸着体を合成し，上記の知識を応用して数種の酵素の精製法を開発した。

論文の審査結果の要旨

この20年間，生体高分子の分離分析技術は著しく進歩した。中でも，蛋白質の分離精製においては，種々の吸着体が開発され，その吸着体への蛋白質の吸着溶離に基くクロマトグラフィは重要な役割をしめている。けれども，上記の吸着体への蛋白質の吸着に影響する要因の系統的な研究は必ずしも充分に行われているとは云えない。

髙河原君は，まず，非イオン性表面活性剤の非イオン性リガントをもつ固相への吸着を，特にNonidet P 40とフェニルセファローズを用いて，詳細に研究した。上記の吸着への影響の相違から，種々の低分子量の試薬は4種に大別できることを見出した。更に温度とpHの影響にいても検討した。これらの結果に基き，下記の蛋白質のクロマトグラフィを改良および開発した。

リン酸化合物を基質とする酵素のアフィニティクロマトグラフィの吸着体としてP−セルローズなどが極めて有用である。例えば、グルコース・6・リン酸デヒドロゲナーゼは，自身の総電荷が負の条件

下でも，負電荷のＰ—基に吸着され，基質の一つNADPによって溶離される。

大部分の酵素は単なるセルロースへ，硫安，クエン酸などの存在下で，吸着され，塩濃度の低下，あるいは，ショ糖，グリセロールなどの添加によって溶離される。この吸着には水素結合が関与している可能性がある。

コラニル酸および種々の誘導体を結合させたセファロースに対するコレステロールオキシダーゼ，ステロイドデヒドロゲナーゼなどの吸着溶離条件を検討し，これらの酵素の分離精製を行った。

髙河原君の研究業績は，単に記載されている種々の酵素だけでなく，他の酵素の，しかも他の精製法にも極めて有用であり，理学博士の学位論文として充分に価値あるものと認める。