

Title	Use of Dodecyl Sulfates in Separation and Analysis of Proteins : Assessment and Development of New Techniques
Author(s)	Kubo, Kanenobu
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/35531
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	久保兼信
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 7449 号
学位授与の日付	昭和 61 年 10 月 3 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	蛋白質の分離・分析におけるドデシル硫酸塩の利用 —評価と新手法の開発—
論文審査委員	(主査) 教授 高木 俊夫 (副査) 教授 濱口 浩三 教授 堀尾 武一

論文内容の要旨

ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) は、今日の生化学の研究に欠かすことのできない分離、分析手法になっている。しかし、SDS - PAGE における SDS そして SDS - 蛋白質複合体の挙動、ましてや対イオンの効果については、殆ど関心が払われていなかった。そこで、SDS の電気泳動挙動に着目して一連の研究を展開してきた。ここでは、SDS の電気泳動挙動を調べるにより明らかになった 0°C 附近でも使用できる SDS 以外のドデシル硫酸塩の効用について述べる。

1. 低温下 (~4°C) でポリアクリルアミドゲル電気泳動への利用

カチオンとしてリチウムイオンのみが存在する条件下、4°C で真の意味での LDS - PAGE を Weber-Osborn 法に準拠して行くと、次に示すような異常挙動に出会う。

1) LDS ミセルの電気泳動の遅延、2) 分子量 3 万付近での分子量 - 相対移動度の半対数プロットの直線関係の消失。これらの異常はそれぞれポリアクリルアミドゲルへの LDS の結合、およびそれによって引き起こされた LDS 濃度の低い (電位勾配がより急な) 領域を蛋白質が電気泳動するために起こる。上記の異常挙動は、ゲルへの LDS 結合サイトを飽和することによって解消できる。それにはゲル調製時そして上部電極槽にそれぞれ 1% そして 0.4% の LDS の添加が必要である。前記の処方を実施した 4°C における、LDS - PAGE は、SDS - PAGE に優るとも劣らない分解能を示した。

2. 蛋白質分子集合体の構造研究への利用

a) コラーゲンへの適用

4°C において、コラーゲンは 2% TrisDS を含む 10mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH7.2) に溶解し、

しかもこの条件においては安定であり、変性は事実上進行しない。ドデシル硫酸イオンの結合によって、コラーゲン分子はTrisD S水溶液中で十分に分散される。その結果、分子間に架橋ができたコラーゲン分子と単量体コラーゲン分子を、分子ふるい効果に基づくゲルクロマトグラフィーによって分離できるようになった。この種のアプローチは、分子内そして分子間の架橋の進行、そしてそれらの化学構造を調べるのに有効である。上記の手法を利用することによって、分子内架橋は成熟に分子間架橋は老化に関連した架橋であることが示唆された。

b) クロロフィル蛋白質への適用

4種類のドデシル硫酸塩（カチオンがそれぞれリチウム（LDS）、トリス（TrisDS）、トリエタノールアミン（TeDS）そしてトリイソプロパノールアミン（TipDS）である）についてそれらの効用を、クロロフィル蛋白質をテスト用の蛋白質分子集合体として用いて、0℃でのPAGEにより調べた。クロロフィル蛋白質の分離の差異は劇的であり、前述の順序でドデシル硫酸塩の解離・変性作用が鈍っていくことが見出された。第一次のPAGEにおけるクロロフィル蛋白質バンドを切り取り、より解離・変性作用の強いもので、さらに温度などの条件制御で、第二次そして第三次のPAGEを行うことにより、蛋白質分子集合体の階層性の検討を深めることができた。TipDS存在下でのPAGEにより、チラコイド膜のクロロフィル蛋白質は5本のバンド（3本の主バンド、2本の副バンド）に分離した。その内の4本についてクロロフィル組成を調べたところ、2本はクロロフィルaをそして、他の2本はクロロフィルaとbをそれぞれ多く含んでいた。2本の主バンドは、TeDSあるいはTrisDS存在下での第二次のPAGEによって、それらはそれぞれ数本のクロロフィル蛋白質バンドに解体した。これらの結果、ドデシル硫酸塩の選択的使用により、蛋白質分子集合体の可溶化状態の制御が可能であることが示唆された。

以上の結果、生化学の分野に定着し確立されたかに見られるSDS存在下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動そしてゲルクロマトグラフィーも、ここで述べたように界面活性剤（カチオン）の側から“修飾”を加えることによって、それらの新規の利用の局面が見出せた。

論文の審査結果の要旨

今日、生物化学の分野においてはSDSと略称される陰イオン界面活性剤の存在下におけるポリアクリルアミドゲル中での電気泳動が蛋白質の分離分析のために極めて広範に活用され、同分野における研究に不可欠な手法となっている。しかし、利用のみが先行して、同法の実施条件下において上記の界面活性剤がどのように挙動し、ひいては同法の効用発現にどのような寄与をしているかについては、詳細な研究は行われていなかった。

久保兼信君は上記の問題に取り組み、まずゲル中でSDSのミセルが分子ふるい効果を受けるためゲルの編目密度に依存して様々の分布様式を示すこと、そしてミセルの挙動が試料に由来する脂質などの介在により著しく影響を受けることがあることを明らかにした。次に、上記の研究の過程において、こ

の電気泳動においてドデシル硫酸イオンの対イオンが分離効果の発現そして試料蛋白質の溶存状態に著しい影響を持つという重要な事実を見出した。久保君はこの知見にもとづいて、カチオンの種類を系統的に換えて効果を比較し、蛋白質のポリペプチド鎖の分離・分析にはリチウム塩が有効であり、他方では数種のアルコールアンモニウム塩は0℃附近において変性能力が抑制されるためにコラーゲンあるいは光合成系のような蛋白質の高次集合体をそのままあるいは段階的に解離させて分離・分析するのに有効であることを見出した。これは定型化したSDS存在下の電気泳動さらにはゲルクロマトグラフィーの周辺に新規かつ有用な変法を開発したものとして高く評価できる。久保君が過去10年余にわたって行ってきた研究の以上の成果は、生物化学の研究を広く支えている手法の基盤の理解に必要な重要な基礎的知見を集積したのみならず、自らが得た知見にもとづいて新規な手法の開発に成功したものである。提出論文は上述の成果をまとめたものであり、理学博士の学位論文として十分価値あるものと認められる。