



Title	生体高分子精製法の二三の進歩
Author(s)	塩川, 洋之
Citation	結核の研究, 31, 1-13
Issue Date	1971
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/26809
Type	bulletin (article)
File Information	31_P1-13.pdf



[Instructions for use](#)

生体高分子精製法の二三の進歩

塩 川 洋 之

(北海道大学結核研究所生化学部)

生体高分子の分離精製は従来ともすれば試行錯誤的あるいは経験主義的になり勝ちであったが、最近生体高分子の物理的・化学的性質についての知識が蓄積されるにつれて、生体から高分子を分離する方法についての理論も系統化されつつあり、精製操作はかなり精緻に且つ容易

になってきた。現在においても実際に生体高分子を精製する場合には或る程度の経験を必要とすることは勿論であるが、その分離法の特徴および適用範囲をよく考えて行えば分離効果をより高いものにする。表1に現在よく用いられている方法を、分離されるべき物質の性質の如

表 1 溶質の性質に基づく分離法の分類

分 離 法	大 き さ	電 荷	分 子 間 引 力	
			水素結合	非極性結合
沈 澱 法 電解質 (塩析) 有機溶媒 等 電 点 脱塩又は希釈 酸による沈澱 塩基による沈澱		+++	+++	+++
		+	++	+++
		+++	++	
		+++	++	+++
		+++	++	
		+++	++	
吸 着 法 酸性白土 アルミナゲル イオン交換樹脂 イオン交換セルロース イオン交換ゲル affinity chromatography		+	+++	+++
			+++	+++
		+++	+	
		+++	+	
		+++	+	
			+++	+++
分 子 篩 透 析 限外濾過 ゲルクロマトグラフィー	+++	+		
	+++	+		
	+++	++		
沈 降 遠 心 法 密度勾配遠心法	+++	+		
	+++	+		
電 気 泳 動 溶 液 支持体 (濾紙, セルロースアセテート等) ゲル (アクリルアミド, 澱粉等) Disc 電気泳動法	+	+++	+	
	+	+++	+	
	+	+++	++	
	+++	+++	++	
分 配 カウンターカレント クロマトグラフィー (濾紙, シリカゲル等) 水性二層分配法			+++	+++
			+++	+++
	+++	+++	+++	+++

註) +++, ++, +, : 分離法に影響する性質の寄与の程度をしめす。

何なる点を利用しているかという見地から分類してみた。実際に分離精製を行う場合には、通常数段階の操作が組み合わされるものであって、一般には同じ原理に基

づいている方法を繰り返して用いるよりは、原理的に異なった方法を組み合わせる方がよりよい効果を与える場合が多いが、しかしそれはその時々において判断しな

ければならず、例えば精製操作の終段階によく用いられる再結晶の繰りかえしが如何に効果的であるかをみても判るであろう。生体高分子の分離精製についてはすでにすぐれた著書¹⁻³⁾あるいは綜説^{4, 5, 6)}が刊行されているが、この綜説においては比較的最近開発された水性二層分配法、水和ゲル膜による限外濾過法および Affinity Chromatography についての進歩を概観してみたい。

I 水性二層分配法

たがいに混合しない2種の溶媒への分配係数が異なることを利用して混合物を分離する方法は古くから用いられ、生体分子を扱う場合には分配クロマトグラフィーおよび向流分配法として発達したが、2層を形成するため

に用いられてきた溶媒系は主として水-有機溶媒系であったために、有機溶媒に対しては変性しやすいタンパク質、核酸のような生体高分子の分離においては用いられた範囲は限られたうらみがあった。近年 Albertsson により開発された水性二層分配法 (Polymer two phase Partition) においては、ある濃度以上においてはたがいに混合しない2種のポリマー水溶液を2相系として用いているために、通常の生体高分子は変性されることはなくその適用範囲は非常に拡大され、多くの生体高分子は勿論細胞およびその破片粒子の分離にまで用いられるようになってきた。^{7, 8, 9, 10)}

種々の組成の2種のポリマー水溶液を混合した場合の状態図を図に示したが、図中の曲線 (binodal) より上の

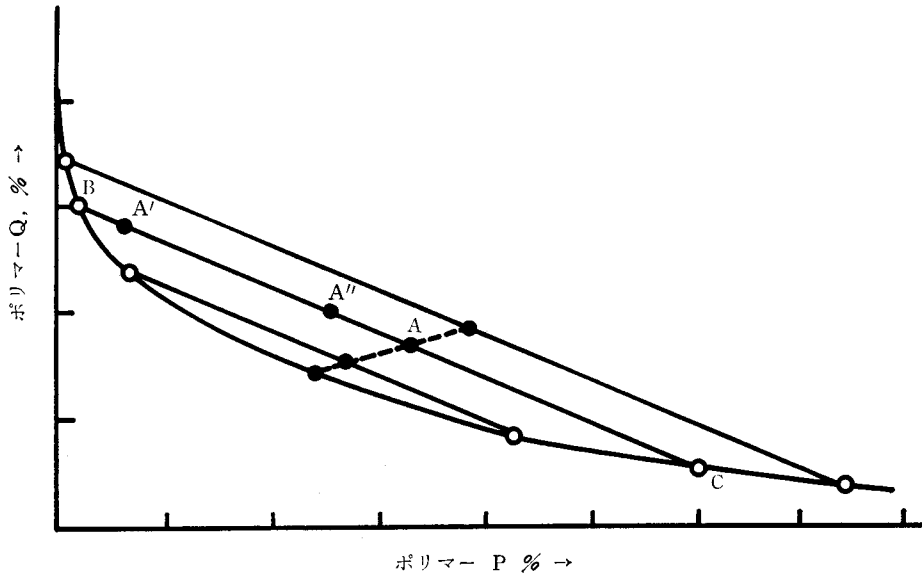


図1 2種類のポリマー水溶液から作られる分配系の状態図

点で表示される総組成を有する系では2相系を形成し、下の領域の点で表わされる総組成を有する系は均一な溶液となる。曲線上の2点たとえばBCを結んだ直線 (tie line) 上にある各点, A, A', A'' 等はいずれも上層と下層の組成がBおよびCで表わされるような2相を形成するがその体積比は異なり, A点ではAB:AC 又A'点ではA'B:A'C となる。此のことを利用して何れか一方の層にかたよって分配されるような物質を濃縮することができる。

高分子がポリマー2相系へ分配する状態はいろいろの因子によって影響されるが、それらはほとんど経験的にしかわからない。即ち二相を形成するポリマー水溶液の

物理的および化学的性質、相のイオン組成、分配される物質の性質等非常に多くの条件が分配を支配するけれども、多くの実験によって或程度の一般化はできるようになった。次にその主なものを挙げてみよう。

1. 粒子の大きさ

粒子の大きさは分配に非常に大きな影響を与える。タンパク質或いは核酸のような高分子が二相に分配する行動は古く Brønsted¹¹⁾ により次の式であらわされた。

$$\ln K = \ln \frac{C_2}{C_1} = \frac{\lambda \cdot M}{RT}$$

式中 K は高分子の分配係数, C_1 および C_2 は各相における高分子の濃度, R は気体常数, T は絶対温度, M

は分子量(或いは粒子量), λ は分子量以外の因子たとえば高分子の化学組成とか構造或いは系の性質に依存する因子である。球状粒子においては M は粒子表面積でおきかえることもできる。上式から判るように K は M に依存するからもしも M が非常に大きくて 100 万以上ならば λ が非常に小さくても K 値 (C_1/C_2) に非常に大きな変化を与えることが予想される。たとえば dextran-poly-ethylene glycol (PEG) 系では低分子の塩, アミノ酸, ヌクレオチド等は 2 相系全体に均等に分布するが, 高分子のタンパク質は通常 0.1 から 10 程度の分配係数を有しており, 更に大きな高分子である DNA 或いは細胞粒子などは全く一相のみに偏在する。どちらの層に

存在するかはその高分子の性質に依存する。

2. 立体構造

分配される高分子が同一の分子であってもその立体構造が異なれば分配も又異なる。たとえば未変性の DNA は変性した DNA と全く異った分配を示し, 同じ現象はタンパク質の変性の場合にもみられる。これは恐らく立体構造の変化によって分子内に埋もれていた基が表面に露出した結果によるものと思われる。

3. イオン組成と電荷

イオンの存在は多くの分配系に大きな影響を与える。その典型的な例を図 2¹²⁾ に示す。図に見られるようにイオンの濃度によって分配係数は左右されているが此の性

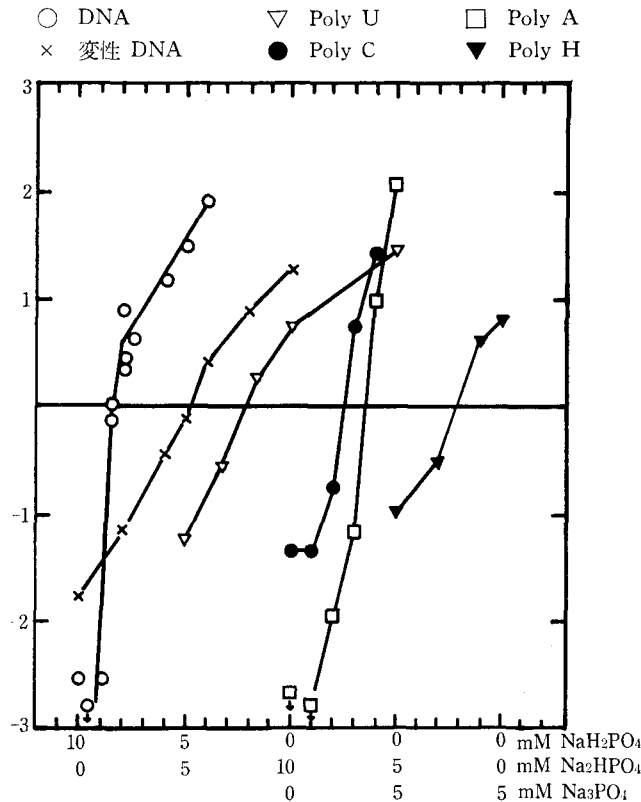


図 2 核酸の分配 (dextran-PEG 系) におよぼすイオンの効果

質を利用すれば後に実例で述べるように有効な分離操作を行うことができる。

4. 他 の 因 子

分配系に用いられるポリマーのタイプおよび分子量が分配に影響をおよぼすことは勿論であるがポリマーの化学的性質もまた大きな効果を示す。ポリマー分子がその表面上に有する疎水基或いは親水基の挙動は現在のところ

あまりよく知られていない。

表 2 に現在まで用いられたポリマーを挙げたが, これらの組合せによって多くの分配系を作ることができる。実際によく用いられている系は dextran-polyethylene glycol (PEG) 系および dextran sulfate-polyethylene glycol 系である。

分配された粒子と相の間に働く力として想像されるも

表 2 水性二層分配法に用いられるポリマー¹⁰⁾

非解離性ポリマー	解離性ポリマー
dextran	Na dextran Sulfate
Polyethylene glycol	Na carboxymethyl dextran
Polypropylene glycol	Na carboxymethylcellulose
Polyvinyl alcohol	DEAE-dextran · HCl
Polyvinylpyrrolidone	
Methylcellulose	

のは水素結合および疎水結合であろうが、溶液系が多価電解質系の場合はイオン結合の寄与も考えられる。しかしいずれにせよその力は弱いもので、高分子が上層或いは下層に分配した際の遊離エネルギーの差は約3 Kcal/mol 程度で C_1/C_2 の値は約100のオーダーに相当する。したがって1分子或いは1粒子あたり1個の水素結合の変化すらその分子或いは粒子を1相へ偏在させることができる。

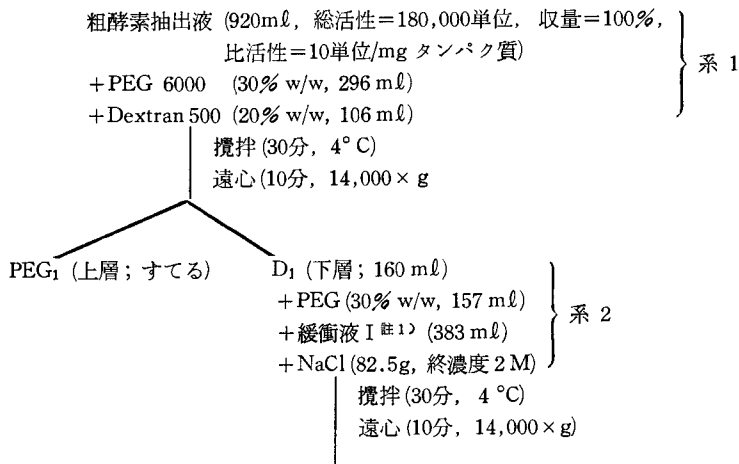
実際に此の方法を用いて分離を行った例はかなり多いが、分配係数がかなり大きい場合即ち分離を目的とする物質が1相に偏在するときは分液漏斗を用いる程度のバッチ法で目的を達することができる。しかしより複雑な分離においては向流分配法のような連続的な再抽出を繰り返す方法が必要であろう。次に代表的な生体高分子或いは粒子に就いて、分離法の実例を挙げるが詳しい実験条件等については原報を参照されたい。

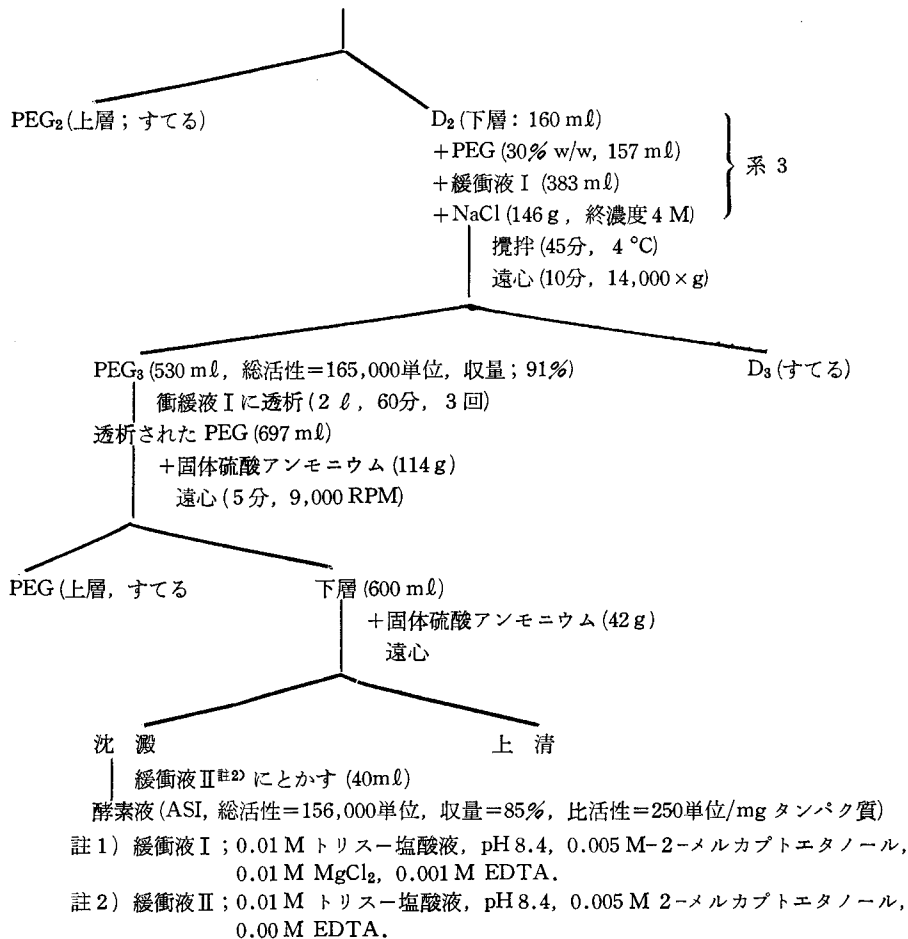
1. タンパク質および核酸

タンパク質と核酸は一般に分配係数に差があるので、此の方法をタンパク質精製のための除核酸或いは核酸精製のため除蛋白に用いることができる。Okazaki およ

び Kornberg¹³⁾ は *Bacillus Subtilis* の細胞抽出液から DNA ポリメラーゼを精製する際に、最初プロタミン処理で除核酸を行ない引きついで DEAE クロマトグラフィーを行なったが、プロタミン処理による収量は変動が大きく且つ DEAE セルロースクロマトにおいては吸着容量が低い上に本来一つのピークで現われて来るべき酵素が2本のピークとなって溶出された。従って彼らはプロタミン法の代りに水性二層分配法を行なった。即ち1150 ml の抽出液に20% dextran 500 溶液および30% PEG 溶液を終濃度がそれぞれ16%および6.4%になるように加え、更に NaCl を加えて終濃度を4 Mにした。2時間、0°C に放置後遠心分離によって両相を分離すれば、酵素と PEG は透明な上層(1480 ml) に存在し、核酸は dextran と共に白濁した下層(280 ml) に存在した。酵素活性の収量は約80%で比活性の上昇は約2倍であった。一般にタンパク質の精製過程の初期段階において、核酸・多糖類を除去すればその後の精製は行ないやすくなるもので、此の方法はそのような意味で核酸除去の一つの有力な方法となりうるであろう。同様な操作は λ phage により誘導された exonuclease¹⁴⁾、phage Q β RNA ポリメラーゼ¹⁵⁾ の精製にも用いられている。此のバッチ法を数回連続して行なうことは容易であり勿論それだけ効果的であるが、一例として Babinet¹⁶⁾ による RNA-ポリメラーゼの精製例を表3に示す。此の酵素は多くの研究者¹⁷⁻²³⁾ によって微生物から分離されていたが、Fuchs の方法以外は皆初期の段階において核酸除去のためにストレプトマイシン又はプロタミン処理を行っており、此の段階の収量が好くなかった。表にみられ

表 3 RNA ポリメラーゼの水性二層分配法による精製





るように分配法の処理で得られた分画 (ASI) は収量 85%、比活性の増加は 25 倍で単に核酸の除去のみならず蛋白質相互間の分離も行なわれていることがわかる。RNA と DNA はそれぞれ異なった分配係数を有しているので (dextran-PEG 系)、系のイオン組成をわずかに変えるだけで、たがいに他相への移動を簡単に行なうことができ、Ruclin と Albertsson²⁴⁾ は此の法により E. Coli からの DNA と RNA の分離を行なった。

2. ビールス

dextran sulfate-PEG 系でポリオビールスの種の違いによって分配パターンの異なることが報告され²⁵⁾ 分配係数と遺伝子のマーカーとの相関関係が論ぜられている。免疫化学的に興味のあることは抗原抗体結合物の分離で、Philipssonら^{26,27)} は ³²P でラベルしたポリオビールスがヒト γ G の抗体で不活性される際にえられる産物を向流分配法でしらべた。結合しなかったビールスはビールス抗体結合物と図 3 にみられるようにはっきり

と分離された。

3. 細胞粒子

細菌細胞、芽胞、細胞フラグメント等は簡単なバッチ法で分配分画が可能であるが、粒子相互の分離には向流分配法が用いられている。図 4²⁸⁾ に微生物の混合物を dlextren-PEG 系で向流分配法を用いて分離した例をあげた。血液中に存在する種々の細胞を分配法により相互分離した多数の例が Walter²⁹⁻³⁹⁾ によって報告されている。彼らは一連の研究から血液中の細胞の分配挙動を次のようにまとめた。(1)分配法により赤血球を種々の年齢に分け得る。(2)動物種が異なれば血球細胞は異なった分配挙動を示す。(3)細胞の表面の電荷と分配の間には大まかな相互関係が成立する。(4)細胞膜を酵素により修飾すれば分配に変化を生ずる。(5)網状赤血球は分配により 2 つの分布をしめす。(6)白血球は赤血球と分離することができ、更に白血球相互の分離も可能である。

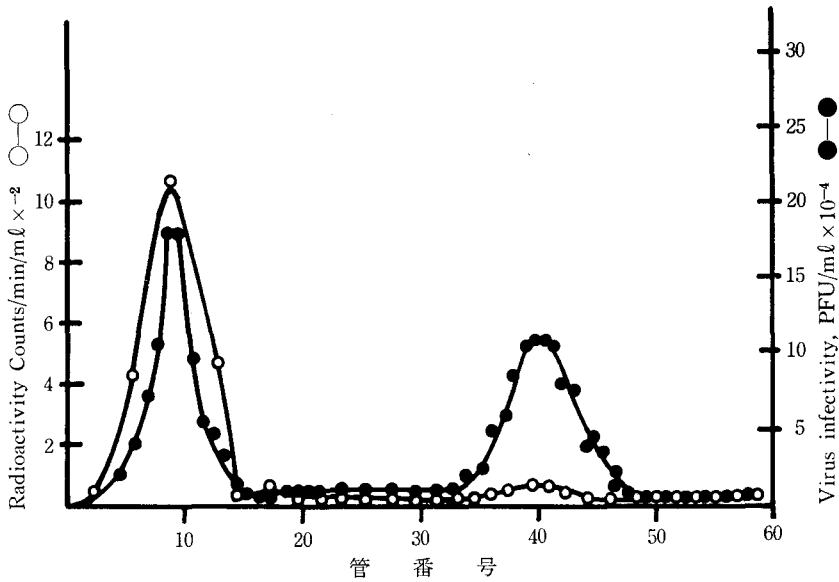


図3 向流分配法によるポリオウイルスとビールス抗体結合物の分離
左；ビールス抗体結合物 右；結合しなかったビールス

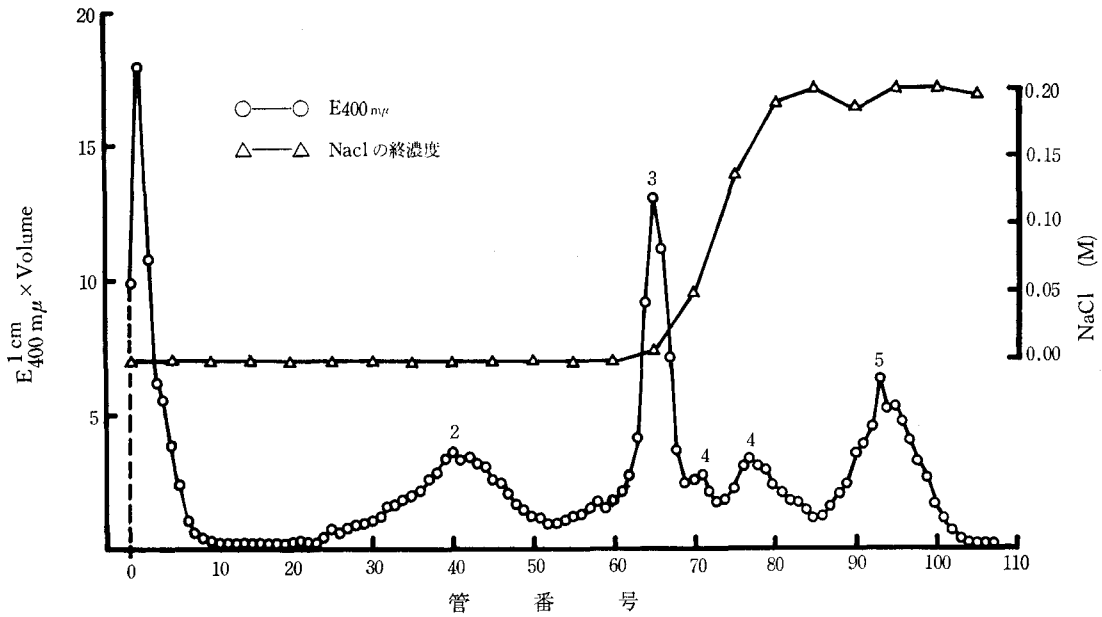


図4 向流分配法によるバクテリアの分画 (dextran-PEG 系)

1. *Saccharomyces Carlsbergensis*
2. *Escherichia Coli*, K12 W 1117
3. *Escherichia Coli*, K12 58
- 4 および 4'. *Chlorella Pyrenoidosa*
5. *Escherichia Coli*, ML 3081

以上述べた諸例からもわかるように、ポリマー溶液の水性二層分配法は比較簡単な方法で温和な条件下に生体高分子を分離することができる点に特徴がある。現在まで報告されているポリマー溶液の組み合わせは数少ないが此の点は将来の研究によって拡大され、此の分配法によ

る多彩な分離が期待される。

II 水和ゲル膜による限外濾過法

従来水溶液中に存在する小分子と高分子を分離するにはいわゆる半透膜を用いる透析或いは限外濾過法が用いら

れてきた。半透膜としてはコロジオン膜およびセロファン膜が使われてきたが、溶質相互の分離は膜の孔の大きさに依存しているために、濾過速度を増すために減圧或いは加圧を行なうと、孔よりも大きな分子が孔をふさいで目づまりを起し、目的に反して濾過速度は急速に低下するという現象がしばしばみられた。最近になって高分子技術の発展によりゲル状濾過膜が開発され上のような欠点がいちぢるしく改善された。即ちこの膜は水に浸した場合ゲル状となって多量の水を含んでいるので濾過に際しては、小分子の溶質は此の中を拡散しながら透過し、

一方高分子の溶質は拡散速度が非常に遅くなって実際には通過しないと同じような結果がえられるものと思われる。この膜は米国において市販され (Diaflo 膜, Amicon 社) その紹介⁴⁰⁻⁴³⁾ もあるが、最近になって国産品 (ダイヤフィルター, 日本真空 KK) も市販されるようになった。実際にこの膜を限外濾過等に使う場合に問題となるのは高分子物質のゲル中における拡散速度即ち膜がどの程度高分子を保持するかということであるが、これはいわゆる膜の保持率として種々の膜について測定されている。表4にその例を示した。⁵⁵⁾

表4 種々のゲル膜によるタンパク質の保持率

化 合 物	分 子 量	保 持 率 (%)				
		XM-100 (100,000)	XM-50 (60,000)	XM-4 a (35,000)	UM-1 (10,000)	UM-2 (500)
Apo-ferritin	480,000	100	100	—	—	—
γ -globulin	160,000	100	100	—	—	—
Aldolase	142,000	0	85	100	100	100
Albumin	67,000	0	68	100	100	100
Haemoglobin	64,500	0	62	70	100	100
Ovalbumin	45,000	0	77	98	100	100
Chymotrypsinogen A	25,000	0	0	0	90	100
α - Chymotrypsin	24,000	0	0	0	95	100
Trypsin	20,000	0	0	0	95	100
Myoglobin	17,800	0	0	0	88	100
Cytochrome C	12,300	0	0	0	85	100
Cyanocobalamin	1,355	0	0	0	0	0
Phenylalanine	165	0	0	0	0	0

()の中の数字はその膜によって保持される物質の大略の分子量の下限を示す。

生体高分子においては加圧法が限外濾過に用いられ、液量に応じた装置が市販されている。此の方法は Blatt⁴³⁾によりタンパク質の希薄溶液の濃縮に応用されて以来従来のセロファン膜による限外濾過法よりも非常に短時間で操作を行なうことが認められた。また濃縮中の高分子の損失量も少なく、Pollak⁴⁴⁾が希釈したヒト血清および異常尿について行なった実験によれば、タンパク質の回収率はそれぞれ94.5%および94.8%であった。このように濃縮効果がすぐれているのみならず望ましくない低分子の除去も同時に可能なので、尿、血清のような体液および生体抽出液等の電気泳動或いはクロマトグラフィー等の前処理法として好適でありその方面の報告は多い⁴⁵⁻⁵⁴⁾。Blatt⁵⁵⁾は種々のサイズ(分子篩のサイズの膜 (i) XM-50: 5000 (ii) UM-1: 10,000 (iii) UM-2: 500)をそれぞれ備えた濾過装置を直列につなぎ、試料としてアルブミン、チトクロームC、シアノコバルミン、フェ

ニルアラニンの混合物を (i) の装置へ入れて限外濾過を行ない分離を行なった。その分離例を図5に挙げるが、同一試料を用いて Sephadex-100による分離像とくらべて殆んど同程度の分離をしめしており、濾過法は操作が簡単である上に一度に多量の試料を処理しうることを考えれば、高分子のグループ分離に好適な方法であると考えられる。Ziplivan⁵⁶⁾も3個の濾過装置 (i) 60,000 (ii) 10,000 (iii) 1000)を直列につなぎ、(i) 内でポリアクリルアミドゲルにカップルさせて不溶化した α -キモトリプシンをカゼインに作用させて、酵素分解を行ないそれによって生ずるフラグメントの限外濾過を行なった。各装置に保持された分画と濾液とを Sephadex-100による分析、免疫拡散法および免疫泳動法によって、カゼインの酵素分解フラグメントの抗原性の消失の程度を知ることができた。Blatt⁵⁷⁾はメチルオレンジとヒト血清アルブミンを濾過装置内で結合させ濾液中の色素を

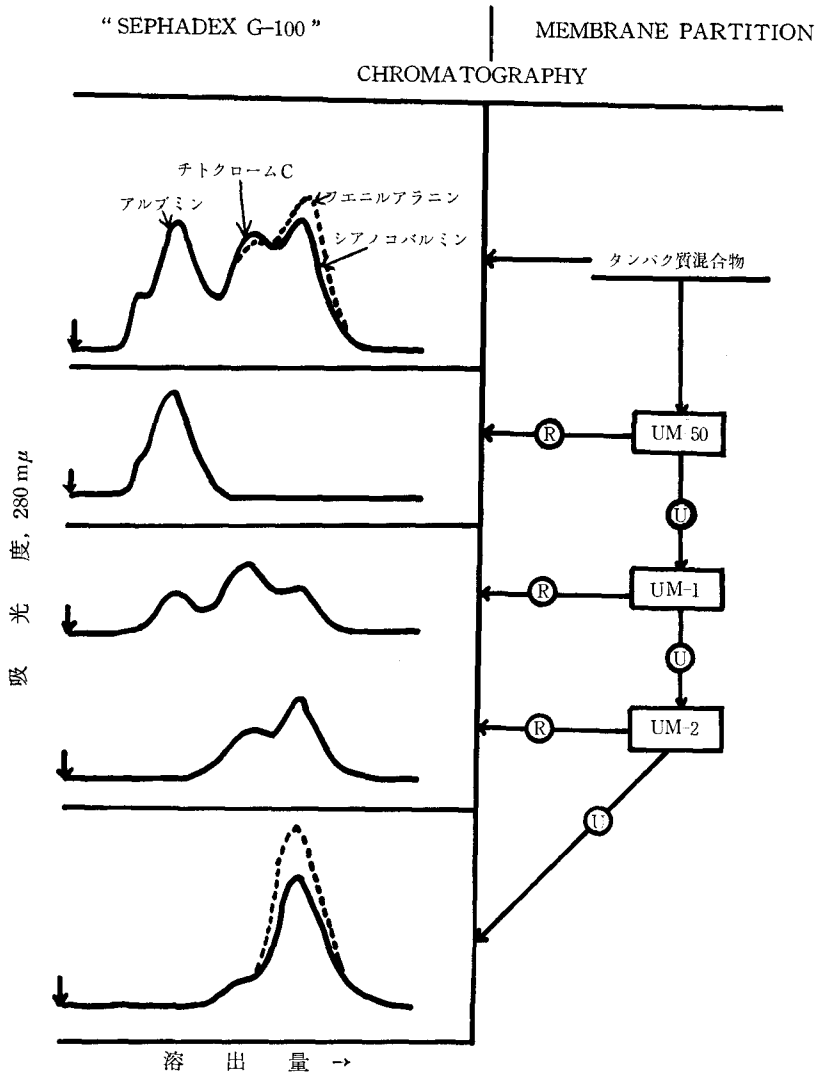


図5 ゲル膜限外濾過と“Sephadex G-100”による分離の比較図

R: ゲル膜によって保持される物質

U: 限外濾過液

測定することにより両者の結合をしらべた。此の方法によって得られた結果は現在のところ従来の平衡透析でえられたものと必ずしもよい一致をみていないが、水和ゲル膜による限外濾過法の応用の一つとして興味のもたれる方向であらう。

III Affinity Chromatography

生体高分子のうち特異的に結合する二分子たとえば酵素と基質又は阻害剤、或いは抗原と抗体のようなものうち一方(A, たとえば或る酵素の阻害剤)を不溶化してカラムに詰めて、他方(B: たとえば酵素)の溶液を

そのカラムに流せばBは特異的にカラムに捕促されるが結合にあずからない他の共存成分はカラムを素通りしてしまう。捕促された分子を適当な条件下で溶出して集めれば精製を簡単に行なうことができる。此のような目的のために不溶化を行なう手段として最も多く用いられているのは通常は可溶性であるAを、不溶性で且つBに対しては不活性である担体に物理的に吸着又は被覆させたりあるいは化学的に共有結合させる方法である。従来は担体としてガラス、合成樹脂粒子、セルロースのようなものが多く用いられてきたが、最近ではデキストラン、ポリアクリルアミドのような架橋構造をもち且つゲル化す

るようなものが多く用いられるようになってきた。Cuatrecasas⁵⁸⁾は酵素の精製のために Sepharose 4 B に酵素の低分子阻害剤を結合させたものをカラムに詰めて酵素液を流し、分離に好結果を得た。彼らは此の方法を Affinity chromatography と呼んでいるが、此の方法は適当な条件をえらべば従来数段階で行なった精製操作を一段階で行なうことができる可能性を持っており、将来その発展が期待されるものである。以下彼らの行な

った *Staphylococcus aureus* の Nuclease の例を説明する。この Nuclease は Tymidine-3', 5'-di-p-nitrophenyl phosphate を基質とした場合 5' 位から p-nitrophenyl phosphate を遊離し、3' 位からも p-nitrophenol を遊離する。彼らは強い阻害剤である 3'-(4-aminophenyl phosphoryl)-deoxytymidine-5'-phosphate を Sepharose 4 B に結合させたものをカラムに詰めて affinity chromatography を行なった。図6にその結果を示すが

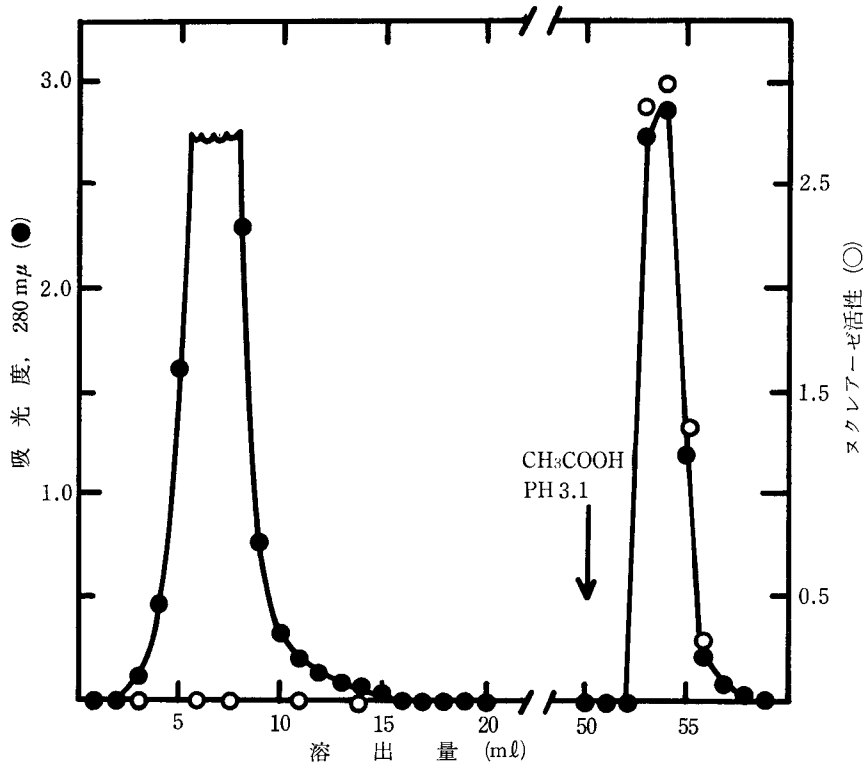


図6 Affinity Column によるヌクレアーゼの精製

nuclease のコファクターである 0.01 M CaCl_2 を含む 0.05 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) で不活性タンパク質を溶出した後に、0.1 M 酢酸で溶出を行なうと Nuclease が 100% の収量で回収された。更に α -キモトリプシン、カルボキシペプチダーゼA、アビジン等も此の方法で容易に精製されている。

抗原あるいは抗体の一方をその結合力を保持したまま不溶化したものは、いわゆる immunoabsorbent として用いられ抗体あるいは抗原の分離に古くから用いられており⁵⁹⁾ その特異的相互作用による分離効果は非常に高かった。従来主としてセルロースおよびその誘導体が不溶性担体として用いられてきたが、Cuatrecasas⁶⁰⁾ は Sepharose にブターインシュリンの B 鎖を結合させたものをカラムに詰め、インシュリン抗体を分離した。抗体活性を有する部分は数本のピークに分かれ、いわゆる抗

体の “heterogeneity” を示した。又 Goetzl⁶¹⁾ にも DNP 化合物を特異的に結合する能力のあるマウスのミエローマ蛋白 (IgA) の部分的精製物を DNP-Sepharose 或いは PNP-Sepharose カラムに吸着させ DNP-glycine でミエローマ蛋白を溶出して精製を行なった。今まで述べたセルロース或いはデキストランのような天然高分子は多糖類でその化学的安定性或いは反応性はそれを構成している糖の部分に依存しており、特にセルロースの場合にはその構造が複雑なため導入される活性基の分布が均一でないという欠点があった。Inman⁶²⁾ は此の点を考慮して化学的に安定であり且つ架橋度を容易に制御しうるポリアクリルアミドの球状粒子を担体とし用いる方法を開発した。ポリアクリルアミド粒子は炭化水素の骨格を有してカルボアミド基を側鎖に持ち pH 1~10 の間で加水分解されない。しかしそのアミド N は容易に他の窒

素化合物と次のように置換する。

ここに出来たポリアクリルアミドのアミノエチルおよ

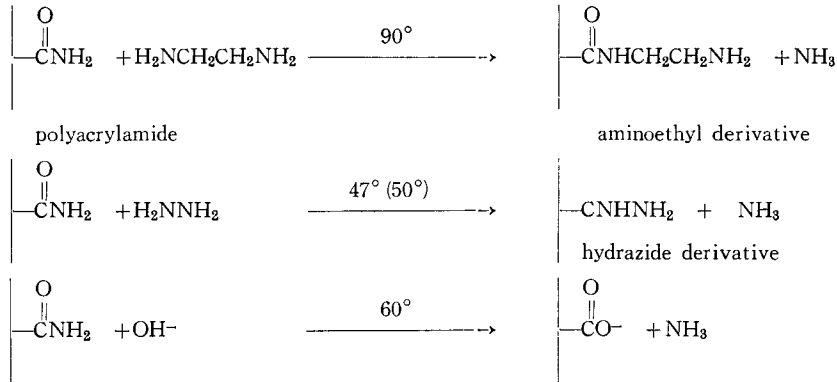


図7 ポリアクリルアミドの誘導體生成反応 (1)

びヒドラゼト誘導體を母体として、活性物質と第2の置換反応を行なわせて affinity chromatography に適当

な不溶化物をつくることことができる。図8にその一例を示した。

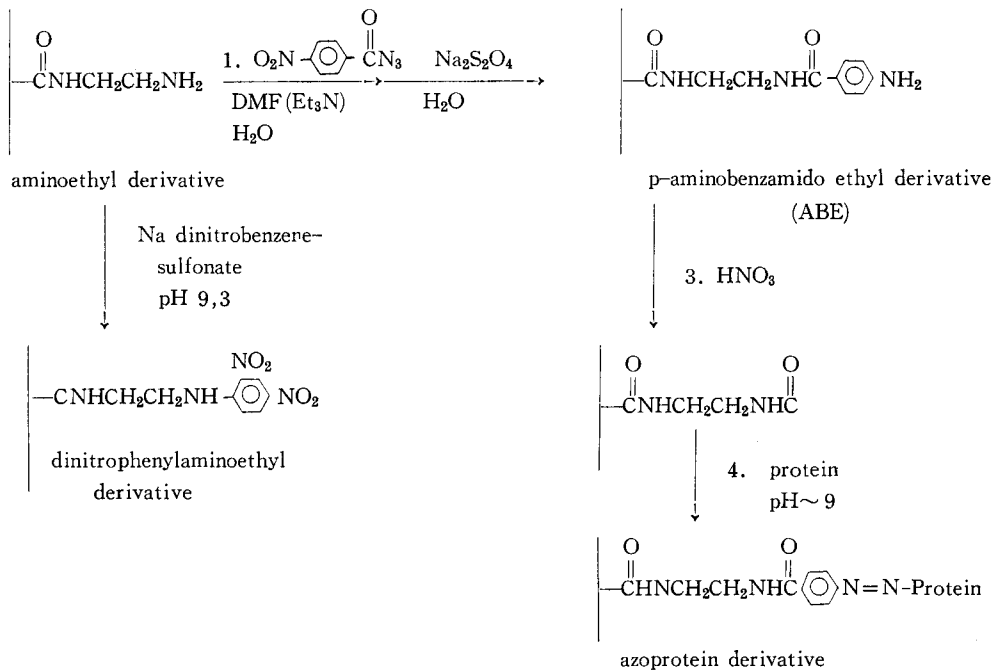


図8 ポリアクリルアミドの誘導體生成反応 (2)

このようにして作られたイオン交換体, Immuno-adsorbent はすぐれた性質をしめし, Bio-gel P-300 にウシ血清アルブミンをジアゾニウム塩を経て結合させた Immuno-adsorbent のカラム (300 mg のアルブミンが 1 g のアクリルアミドに結合しているもの) は, 非特異的に部分精製された抗アルブミン-ウサギ免疫グロブリン画分から 25~70 mg の ^{131}I -抗体を結合し, 1% NaCl を

含むホウ酸緩衝液 (pH 7.8) で洗滌後 0.05 M グリシン-HCl 緩衝液 (pH 2.4) で溶出すれば 76~93% の好収量で回収された。

生物を免疫した際に見られる抗体産生細胞を他の細胞から分離する試みは従来かなり困難であったが, 最近抗原あるいはハプテンを不溶化させたものを詰めたカラムを用いる affinity chromatography により可能になっ

た。Wigzell ら^{63,64}) は抗原を被覆したガラス又は合成樹脂の粒子をカラムに詰めて、抗体産生細胞を含む細胞混合物を流し、抗体産生細胞は特異的にカラムに保持されるのに対して他の細胞はほとんどカラムを素通りすることを利用して両者の分離を行なった。しかし彼らの実験においては、抗体産生細胞以外の他の細胞もガラス粒子に保持されていることが認められた。Truffa-Bachi および Wofsy⁶⁵) は此の点を考慮して、前述の Inman および Dintzis⁶²) の方法により p-アミノフェニル β -ラクトシド-ヘモシアニン 複合抗原のハプテンである p-アミノフェニル β -ラクトシド基を Bio-Gel P-6 (16-25 メッシュ, 直径 600 μm 以上のもの) に結合させて上記複合抗原 (lac 抗原と略称) によって免疫されたマウスの脾臓細胞より抗体産生細胞の分離を行なった。此の affinity カラムはあらかじめ lac 抗原で免疫したマウスの抗血清から純化された抗体でテストしたところ、カラムゲル 1 ml 当り 2.2~0.3 mg の lac 抗体と結合する能力があった。表 5 にみられるように免疫マウス脾臓細胞

表 5 lac affinity カラム上における
抗-lac PF 細胞の除去

カラムにつけた総細胞数	濾過前の PPM*	濾過液中の PPM*	細胞の回収率 (%)	PPM*の回収率 (%)
6.0×10^7	200	43	100	22
1.2×10^6	750	210	100	28
1.2×10^6	750	230	100	30
1.6×10^7	760	127	100	16
1.6×10^7	760	132	100	17
4.0×10^7	1200	77	97	9
4.0×10^7	1200	102	97	12
4.0×10^7	1200	77	100	9
4.0×10^7	1200	230	100	29
1.5×10^8	300	30	95	10
2.0×10^6	700	119	96	17
平均回収率; 99 ± 2				18 ± 7

* PPM=細胞 100 万個当りのブラック形成細胞数

胞約 10^8 - 10^8 個をカラムに流したところ、総細胞のうち $99 \pm 2\%$ は素通りしたが抗体産生細胞 (この数は Jerne のブラック法で測定したので抗 lac PF 細胞と略称する) は $18 \pm 8\%$ のみしか通過しなかった。此のカラムによる細胞の保持は特異的で表 6 に見られるようにカラムの官能基を変えれば抗 lac PF 細胞は保持されず又 p-ニトロフェニル β -ラクトシド (PNP-lac) の存在によっても抗 lac PF 細胞は保持されない。ブラック形成の阻害

表 6 lac affinity カラムの特異性

PF 細胞の特異性	PNP-lac の濃度	カラムにつけた総細胞数	濾過前の PPM	濾過液中の PPM
抗-lac	0	4.0×10^7	1200	102
抗-lac	$1 \times 10^{-5} \text{M}$	3.7×10^7	1240	1270
抗-ヒッジ赤血球細胞	0	5.2×10^6	430	430
抗-アゾフェニル- β -グルコシド	0	7.2×10^7	30	30

剤である PNP-lac を用いてカラムから抗 lac PF 細胞を溶出する試みは、PNP-lac の濃度が 5×10^4 ~ 10^6 の範囲に存在する場合は PF 細胞の検出が困難であるので、以下のようにバッチ法によって行なった。 2×10^7 個の細胞懸濁液を 0.2 ml の lac-ゲルおよび対照として 0.2 ml の lac 化しない Bio-Gel P-60 (300 μm) にそれぞれ加え、混合後上清を傾斜して除いた後に PNP-lac を加えて $1 \times 10^{-5} \text{M}$ の濃度として溶出し、上清中の抗 lac PF 細胞数を測定 (此の場合 PNP-lac の濃度は $2.5 \times 10^{-7} \text{M}$ に下げる) した。種々の時間で濃い PNP-lac と共存させた抗 lac PF 細胞の回収数を図 9 に示す。

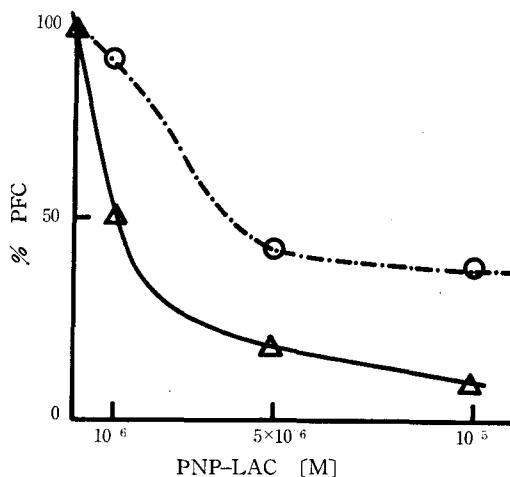


図 9 PNP-lac ハプテンによる抗-lac PF 細胞に対する阻害
— 細胞濾過前の PF 細胞に対する阻害
--- lac affinity Column の細胞濾過後溶出液中の PF 細胞に対する阻害

図にみられるように約 70% の抗 lac PF 細胞が lac-粒子に結合するが PNP-lac 添加後 45 分間のうちに大部分の抗 lac PF 細胞が溶出されている。このようにポリア

クリルアミドを担体して官能基を導入した支持体を用いた affinity カラムを用いて、抗体産生細胞の分離が非常に特異的に行なわれた点は Wigzell らのガラス粒子カラムにくらべて進歩しているが、溶出の点に問題があり、此の点は抗体産生細胞の安定性の問題と共に将来の解決を待つところであろう。

Ⅳ む す び

最近発達しつつある生体高分子の分離精製法のうち、比較的手軽に用いることができると思われる水性二層分配法、水和ゲル膜による限外濾過法および affinity chromatography の応用例をいくつか紹介した。前二者は非特異的分離法で且つ比較的大量の試料を扱うことができ操作も簡単であるので、精製の初期段階においてグループ分離をするような場合に好適であろう。後者は特異的分離法で扱う試料の量も前者にくらべると少なく、吸着剤の製法がやや煩雑である。しかしその特異性をうまく用いるならば、非特異的方法では分離の非常に困難なあるいは数段階を要する過程も一挙に解決してくれる可能性を有している。これらの方法を今まで知られている種々の方法と組み合わせて、生体高分子の容易な且つ収量のよい方法を期待するものである。

文 献

- 1) 萩原文二：酵素研究法 (赤堀四郎編) 1, 101 (1955) 朝倉書店
- 2) Morris, C. J. O. R., and Morris, P.: Separation Methods in Biochemistry, Sir Isaac Pitman & Sons Ltd., London, 1963.
- 3) 日本化学会編：実験化学講座, 23-25 (生物化学 (I)-(III)) の各巻
- 4) Colowick, Sidney P. and Kaplan, Nathan O. (Editors): Methods in Enzymology, Academic Press, New York の各巻
- 5) Anfinsen, C. B. and Edsall, John T. (Editors): Advances in Protein Chemistry, Academic Press, New York の各巻
- 6) Gøritsen, T. (Editors): Progress in Separation and Purification, Wiley-Interscience, New York, (2巻)
- 7) Albertsson, P.-Å.: Partition of Cell Particles and Macromolecules. Almqvist & Wilsell, Stockholm; Wiley, New York, 1960.
- 8) Albertsson, P.-Å.: Methods Biochem., Anal., 10, 229 (1962).
- 9) Albertsson, P.-Å.: Advan. Protein Chem., 24, 309 (1970).
- 10) 加藤好雄：化学と生物, 8, 304 (1970).
- 11) Brønsted, J. N.: Z. Physik. Chem., A Suppl. (Bodenstein-Fest Band), 257 (1931).
- 12) Albertsson, P.-Å.: Biochim. Biophys. Acta, 103, 1 (1965).
- 13) Okazaki, T. and Kornberg, A.: J. Biol. Chem., 239, 259 (1964).
- 14) Little, J. W., Lehman, I. R., and Kaiser, A., D.: J. Biol. Chem. 242, 672 (1967).
- 15) Eoyang, L., and August, J. T.: Methods Enzymol. 12B, 530 (1968).
- 16) Babinet, C.: Biochim. Biophys. Res. Commun., 12, 639 (1967).
- 17) Furth, J. J., Hurwitz, J., and Anders, M.: J. Biol. Chem. 237, 2611 (1962).
- 18) Chamberlin, M., and Berg, P.: Proc. Nat. Acad. Sci., 48, 81 (1962).
- 19) Nakamoto, T., Fox, C. F., and Weiss, S. B.: J. Biol. Chem., 239, 167 (1964).
- 20) Ochoa, S., Burma, D. P., Kroger, H., and Weill, D.: Proc. Nat. Acad. Sci., 47, 670 (1961).
- 21) Richardson, J. P.: Proc. Nat. Acad. Sci., 55, 1616 (1966).
- 22) Stevens, A., and Henry, J.: J. Biol. Chem., 239, 196 (1964).
- 23) Fuchs, E., Zillig, W., Hofschneider, P. H., and Preuss, A.: J. Mol. Biol., 10, 546 (1964).
- 24) Rudin, L., and Albertsson, P.-Å.: Biochim. Biophys. Acta, 134, 37 (1967).
- 25) Bengtsson, S., and Philipsson, L.: Virology, 20, 176 (1963).
- 26) Philipsson, L.: Virology, 28, 35 (1966).
- 27) Philipsson, L., Killander, J., and Albertsson, P.-Å.: Virology, 28, 22 (1966).
- 28) Albertsson, P.-Å., and Baird, G. D.: Exptl. Cell Res., 28, 296 (1962).
- 29) Walter, H., Selby, F. W., and Brake, J. M.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 15, 497 (1964).
- 30) Walter, H., Winge, R. and Selby, F. W.: Biochim. Biophys. Acta. 109, 293 (1965).
- 31) Walter, H., Selby, F. W., and Garza, R.: Biochim. Biophys. Acta, 136, 148 (1967).
- 32) Walter, H., Garza, R., and Selby, F. W.: Exptl. Cell Res. 49, 679 (1968).
- 33) Walter, H., Garza, R., and Coyle, R. P.: Biochim. Biophys. Acta, 156, 409 (1968).
- 34) Walter, H., and Selby, F. W.: Biochim. Biophys. Acta, 112, 146 (1966).
- 35) Walter, H., and Selby, F. W.: Biochim. Biophys.

- Acta, **148**, 517 (1967).
- 36) Walter, H., and Albertsson, P.-Å. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **25**, 670 (1966).
- 37) Walter, H., and Coyle, R. P. : *Biochim. Biophys. Acta*, **165**, 540 (1968).
- 38) Walter, H., Krob, E. J., Garza, R., and Ascher, G. S. : *Exptl. Cell Res.*, **55**, 57 (1969).
- 39) Walter, J., Krob, E. J., and Ascher, G. S. : *Exptl. Cell Res.*, **55**, 279 (1969).
- 40) Michaels, A. S. : *Ind. Eng. Chem.*, **57**, 32 (1965).
- 41) 萩原文二・橋本光一 : *最新医学*, **24**, 2362 (1969).
- 42) 橋本光一・岸田比出子 : *科学と工業*, **44**, 347 (1970).
- 43) Blatt, W. F., Feinberg, M. P., Hofenberg, H. P., and Saravis, C. A. : *Science*, **150**, 224 (1965).
- 44) Pollak, V. E., Gaizutis, M., and Rezaian, J. : *J. Lab. Clin. Med.* **71**, 338 (1968).
- 45) Gabay, S., and Valcourt, A. J. : *Biochim. Biophys. Acta*, **159**, 440 (1968).
- 46) Griffin, H. L., and Victor Wu, Y. : *Biochemistry*, **7**, 3063 (1968).
- 47) Bahl, O. P., and Agrawal, L. M. L. : *J. Biol. Chem.*, **244**, 551 (1969).
- 48) Eriksson, K. E., and Zedowski, W. R. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **129**, 683 (1969).
- 49) Jacoli, G. G. : *Biochim. Biophys. Acta*, **165**, 299 (1968).
- 50) Wimmer, E., Maxwell, I. H., and Tener, G. M. : *Biochemistry*, **7**, 2623 (1968).
- 51) van Oss, C. J., Lord, J. E., and Scheinman, A. : *Nature*, **215**, 639 (1967).
- 52) Rechler, M. M. : *J. Biol. Chem.* **244**, 551 (1969).
- 53) Blatt, W. F., Hudson, B. G. : *Anal. Biochem.*, **26**, 329 (1968).
- 54) Eisenberg, E., Zobel, C. R., and Moos, C. : *Biochemistry*, **7**, 3186 (1968).
- 55) Blatt, W. F., Hudson, B. G., Robins, S. M., and Zipilivan, E. M. : *Nature*, **216**, 511 (1967).
- 56) Zipilivan, E. M., Hudson, B. G., and Blatt, W. F. : *Anal. Biochem.*, **30**, 91 (1969).
- 57) Blatt, W. F., Robinson, S. M., and Bixler, H. J. : *Anal. Biochem.* **26**, 151 (1968).
- 58) Cuatrecasas, P., Wilcheck, M. and Anfinsen, C.B. : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **61**, 636 (1968).
- 59) Campbell, Dan. H., and Weliky, N. : *Methods in Immunology and Immunochemistry*, (Williams, C. A., and Chas, M. W., Editors), **1**, 365 (1967), Academic Press, New York.
- 60) Cuatrecasas, P. : *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **35**, 531 (1969).
- 61) Goetzel, E. J., and Metzger, H. : *Biochemistry*, **9**, 1267 (1970).
- 62) Inman, J. K., and Dintzis, H. M. : *Biochemistry*, **8**, 4074 (1969).
- 63) Wigzell, H., and Anderson, B. : *J. Exp. Med.* **129**, 23 (1969).
- 64) Wigzell, H., and Mäkelä, O. : *J. Exp. Med.* **132**, 110 (1970).
- 65) Truffa-Bachi, P., and Wofsy, L. : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **66**, 685 (1970).