

第2節 生体材料からのタンパク質抽出, 塩析, 精製, 結晶化

2.1 ダイズ種子貯蔵タンパク質と β -アミラーゼの精製

【目的】 ダイズ種子はタンパク含量が高く, 重要な食品素材の一つである. ここでは, ダイズ種子より, 貯蔵タンパク質である 11S グロブリンと β -アミラーゼの部分精製を試みる.

【試薬】 ダイズ種子, 10mM の 2-メルカプトエタノールを含む 30mM トリス塩酸緩衝液 pH8.0, 1N の HCl, 0.4M の NaCl を含む 35mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.6, 50mM トリス塩酸緩衝液 pH8.0, 0.2M の NaCl を含む 50mM トリス塩酸緩衝液 pH8.0.

【器具】 pH メーター, スターラー, 三角フラスコ(200mL)1 個, ビーカー(100mL)2 個, 濾紙, 葉さじ, 乳鉢, 乳棒, 攪拌子, パスツールピペットとそのゴム, 1.5mL チューブ 15 個, 遠心機, Qセファロースカラム(1mL)1 個, カラム用コネクター, プラスチック製シリンジ (5.0mL) 1 個, チューブたて, パラフィルム.

【安全上の注意】 実験の 6) で 1N の HCl により pH を下げるが, パスツールピペットを使う場合, 一度に大量に加えないようにする.

【実験】

(Qセファロースカラムの平衡化)

- 1) まず, 3mL の 0.2M の NaCl を含む 50mM トリス塩酸緩衝液 pH8.0 を 5.0mL シリンジを用いて, Qセファロースカラムに添加し, カラムを洗浄する. このときの流速は 2-3 秒に 1 滴くらいにする.
- 2) 次に, 10mL の 50mM トリス塩酸緩衝液 pH8.0 を Qセファロースカラムに添加し, カラムを平衡化する. 平衡化したカラムは, ダイズタンパク質の分画及び精製の 13) に使用する.

(ダイズタンパク質の分画及び精製)

1 日目

- 1) 数時間蒸留水に浸したダイズ種子 6 粒をていねいに乳鉢ですりつぶした後, 葉さじで 100mL のビーカーに移す. 種子の皮はビーカーに入れない.
- 2) 10mM の 2-メルカプトエタノールを含んだ 30mM トリス塩酸緩衝液 pH8.0 を 75mL を使い, 乳鉢を洗いながらビーカーに加え, 攪拌子 (スターラーバー) を 100mL のビーカーに入れた後, スターラーで 5 分間攪拌する (室温).
- 3) スターラーで攪拌した液を 5 分間室温で静置する. 200mL の三角フラスコとロートおよび濾紙を用意して, 沈殿を入れないように静置した液をろ過する. 全てをろ過すると時間がかかるので, ある程度回収できたところで次のステップに進む.
- 4) 得られた濾液を 100mL のビーカーに移し, これを粗抽出液とする.
- 5) 1mL の粗抽出液をピペットマンで 1.5mL のプラスチックチューブにとり SDS-PAGE と β -アミラーゼの活性測定用に分取しておく (4 度で保存). (1 本のみ作成. サンプル名は粗抽出液, 班名とともにチューブに記載すること.)
- 6) 攪拌子を粗抽出液を含む 100mL のビーカーに入れ, スターラーで攪拌しながらパスツールピペットを使って 1N の HCl により pH を 6.3-6.5 に合わせる (室温).

注意) 抽出液の pH が極端に酸性になるとダイズ貯蔵タンパク質や β -アミラーゼが変性する. 目

的の pH に近づいてきたら、HC1 を入れ過ぎないように注意すること。目的の pH に近づいたら、1N HC1 を希釈して用いるのも良い方法である。

7) パラフィルムで密閉して4度で保存し11S グロブリンを冷沈させる（一晚以上）。

2日目

- 8) 1.5mL のプラスチックチューブを2本用意する。
- 9) 4度で保存してあった粗抽出液を攪拌したのち、1mL ずつ1.5mL のプラスチックチューブにピペットマンを使って入れる。遠心直前まで、できるだけ温度を上げないように氷上で冷やしておく。4℃で、最高回転数で3分間遠心する。
- 10) ピペットマンを使って上澄み液を100mL のビーカーに回収する。この時、できるだけ抽出液を温めないようにする。沈殿には11S グロブリンが含まれ、上澄み液にはβ-アミラーゼや7S グロブリンが含まれる。
- 11) 沈殿を、0.4M のNaCl を含む35mM リン酸ナトリウム(pH7.6)緩衝液0.3mL(1本当たり)で溶かす(2本とも行う)。泡だてないようにゆっくりとピペッティング(ピペットマンで液を出し入れすること)で丁寧に溶かす。これを11S グロブリン画分とする(2本分を1本のチューブにまとめる。サンプル名は11S、班名とともにチューブの蓋に記載する)。後日、SDS-PAGE に供するので、4℃で保存しておく。
- 12) 一方、β-アミラーゼや7S グロブリンが含まれる10)で得られた2mLの上澄み液(100mLのビーカーに回収済み)に、50mM トリス塩酸緩衝液pH8.0を4mL加える。
- 13) 5.0mL のプラスチック製のシリンジを使って、平衡化済みのQセファロースカラム(陰イオン交換カラム)に100mLのビーカーで希釈した液約6mLを全てアプライする。このときの溶出液は廃棄してよい。シリンジに泡が入らないように注意。
- 14) 1.5mL のチューブを4本用意して、1から4の番号をつける(班名も記載する)。
- 15) 5.0mL のプラスチック製のシリンジを使って、2.0mL の50mM トリス塩酸緩衝液pH8.0で、カラムを洗浄する。カラムより溶出される液は廃棄してよい。
- 16) 5.0mL のプラスチック製のシリンジを使って、4.0mL の0.2M のNaCl を含む50mM トリス塩酸緩衝液pH8.0で、β-アミラーゼを含む画分をカラムより溶出させる。カラムより溶出される液は、1.0mL ずつ1.5mL のチューブに回収する。チューブ番号(1,2,3,4)。後日、β-アミラーゼの活性測定、タンパク定量とSDS-PAEG に用いる。チューブ1-4は、班名を記載し、4℃で保存する。

2.2 リゾチームの単結晶の調製

【目的】 タンパク質の結晶化はタンパク質の精製法として古くから用いられており、近年はX線結晶構造解析によるタンパク質の立体構造解析のための重要な研究手段となっている。ここではリゾチームを用いて結晶化の原理および方法を学ぶ。

【試薬】 市販卵白リゾチーム粉末、0.5M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.5)、食塩(NaCl)、50%w/v PEG4000 溶液

【器具】 結晶化用3連の血液凝集板(ガラス製)、セロテープ(大)、拡大鏡(実体顕微鏡)、ピペットマン 200 μ l あるいは20 μ l

【実験】

- 1) 市販卵白リゾチーム 50mg を 1 ml の pH4.5, 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液溶液に溶解し, タンパク質溶液とする.
- 2) 上記濃縮タンパク溶液を沈殿化剤として NaCl を用い, バッチ法あるいは蒸気拡散法 (シッティングドロップ法およびハンギングドロップ法) により結晶化し, 結晶の外形を拡大鏡で観察する.
沈殿化剤 1. 0.05M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) と 1.0 M NaCl
沈殿化剤 2. 0.05M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) と 1.5 M NaCl
沈殿化剤 3. 0.05M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5), 1.0 M NaCl と 40% w/v PEG4000
各沈殿化剤 $10\ \mu\text{l}$ とタンパク質溶液 $10\ \mu\text{l}$ を 3連の血液凝集板のくぼみに取り混合して, すばやくセロテープで被い結晶化を観察する (図). 通常 1 時間程度で結晶が現れその後成長し, 0.3mm 角程度の結晶が得られる. 得られた結晶は数日間安定である.

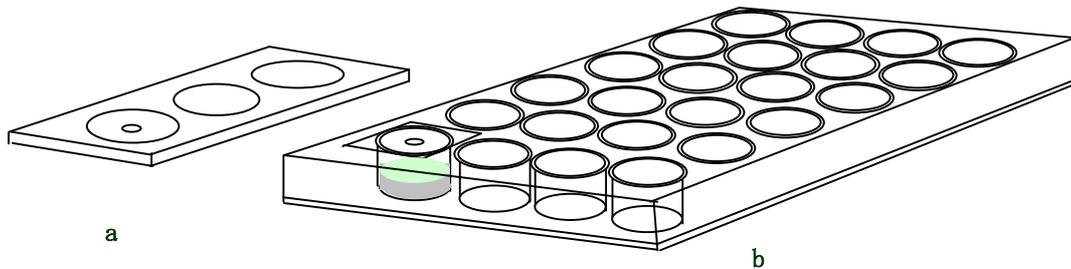


図 1 結晶化容器

a はバッチ法に用いる 3 連の血液凝集板でセロテープで密封する. b は市販の 24 穴ハンギングドロップ蒸気拡散用プレートでウェルに 1 ml の母液を入れ, 母液とタンパク溶液を等量混ぜたドロップ $10\ \mu\text{l}$ をカバーガラスにのせてひっくり返し, シリコングリースでウェル上に固定密封する.