

## 第5章 分離操作

### 第1節 遠心分離

遠心分離操作は、物質の密度の違いを利用して、遠心力により分離を行う操作であり、液体中に浮遊する沈殿の分離や水とクロロホルムのように相互に混じり合わない液体を分離する際などに利用される。実際の遠心分離操作は、遠心機を使って行われる。

#### 1.1 遠心機

遠心機には回転数や大きさ、冷却装置の有無などによって、超遠心機、高速冷却遠心機、微量冷却遠心機、卓上遠心機などなどがあり、それぞれの大まかな特徴は以下の通りである。

**卓上遠心機**： 容量 50 mL までのチューブを回す卓上で使えるサイズの遠心機である。サイズが小さいことから、回転数は 5,000 rpm 程度までと低く冷却装置を備えていないものが多いが、最近では 15,000 rpm 程度までの回転が可能で、冷却装置を備えているものもある。

**微量遠心機**： 容量 2 mL までのマイクロチューブを回すための遠心機である。回転数の上限は 15,000 rpm 程度であり、冷却装置を備えているものが多い。

**高速遠心機**： 主に容量 50 mL のチューブから 500 mL 程度のボトルを回すための遠心機であり、冷却装置は備えられている。

**超遠心機**： 回転数の上限が数万 rpm から 150,000 rpm 程度の超遠心機には、分離用のものと分析用のものがある。非常に高速で、また長時間（数日に及ぶこともある）ローターを回すことが多いので、冷却装置や真空ポンプなども備えられており、他の遠心機と比較して装置が大きなものが多いが、最近では卓上に設置可能な小型のものもある。

#### 1.2 ローター

遠心機の回転軸に取り付けて回転させる部分のことをローターという。ローターは遠心管を支える部分であり、ローターを取り替えることによって、同じ遠心機を用いて様々な種類の遠心管を回転させることが出来る。ローターには、大きくわけて、アングルローターとスイングローターの2種類がある。超遠心機で使うアングルローターには遠心管を垂直に保持する物もあるが、一般の遠心機用のアングルローターでは、遠心管は斜めに保持される。スイングローターは遠心管を保持する部分が可動構造になっており、重力と遠心力の合力が常に遠心管の長軸方向にかかるようになっている。



アングルローター



スイングローター

### 1.3 遠心力

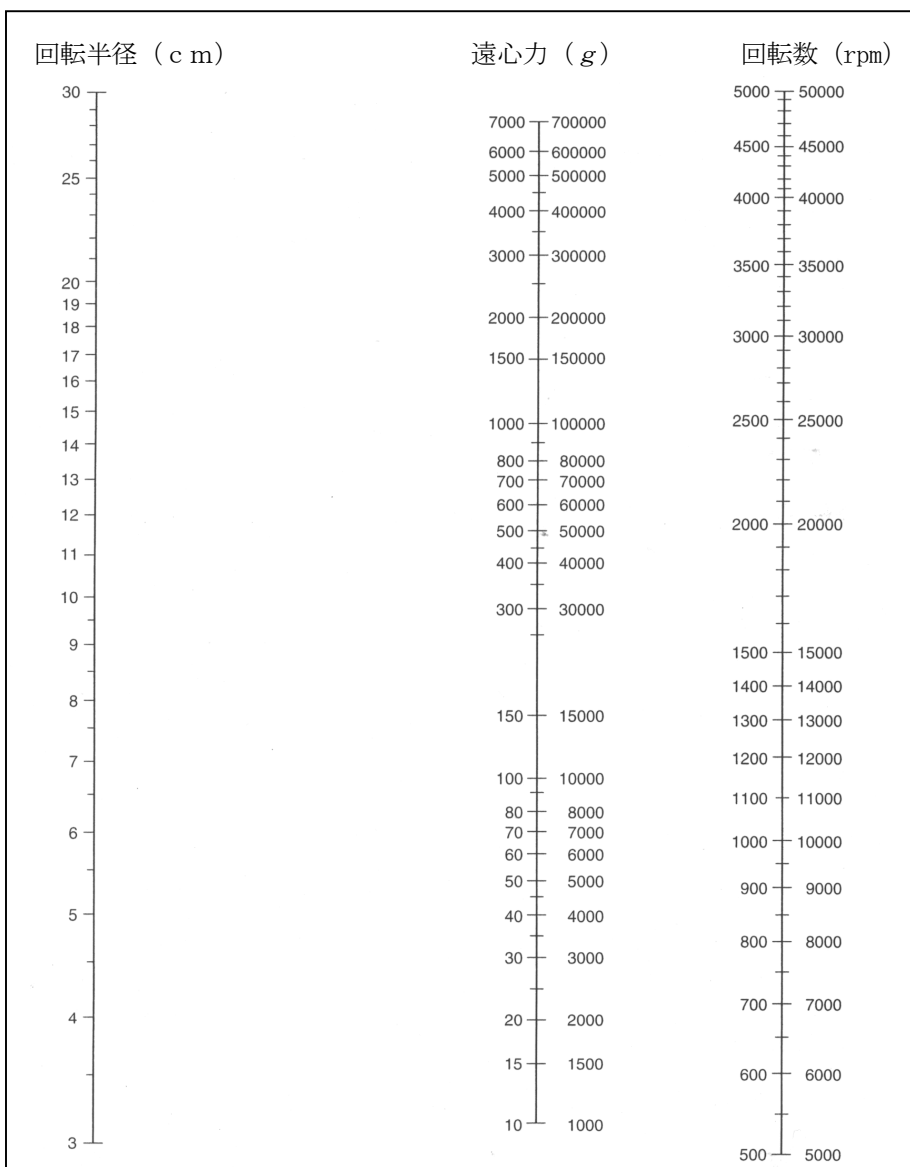
遠心力の大きさ ( $g$ ) は以下の計算式で求められる。

$$\text{遠心力 (g)} = 1.12 \times r n^2 \times 10^{-5}$$

$n$ : 回転速度 (回転数 rpm; revolutions per minute)

$r$ : 回転半径 (単位 cm)

しかしながら、実際にこの式に数値をあてはめて、必要とする遠心力を算出するのは煩雑であるので、普通はノモグラフを用いて遠心力を求める。ノモグラフ上に用いるローターの回転半径をプロットし、必要な遠心力と直線で結ぶことで、設定すべき回転数が求められる。あるいは、ノモグラフ上で用いるローターの半径と設定しようとする回転数を直線で結ぶことで得られる遠心力が求められる。



ノモグラフ

## 1.4 遠心機を使う際の注意事項

遠心分離中は、ローターが高速で回転しており、非常に大きな遠心力がかかっているため、些細な使用方法の誤りが重大な事故につながる可能性があるため、遠心機の取扱説明書に従って、細心の注意を払い使用する必要がある。特に、以下の点については、どのような遠心機を使用する際にも共通の注意事項である。

### 【ローターの取り扱い】

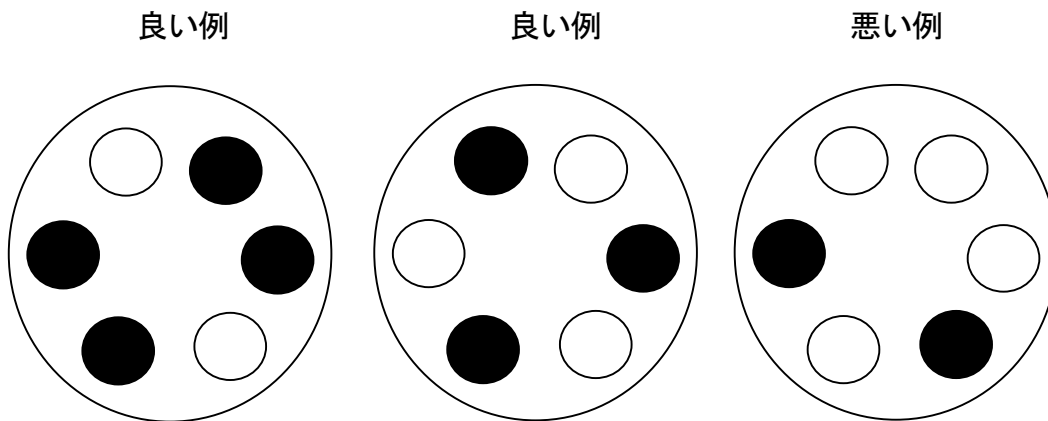
ローターの回転軸への固定は、差し込むだけのものから、ねじで固定しなければならないものなど様々である。遠心分離中にローターがはずれると大きな事故につながるため、回転軸への固定は決められた方法でしっかりと行わなければならない。また、使用後は、本体から取り外して水洗いしておく。

### 【回転数】

ローターによって、使用できる上限の回転数があるため、これを超える回転数でローターを回してはならない。また、遠心管にも利用可能な上限の回転数（遠心力）があり、ローターの上限の回転数を超えていなくても、遠心管の許容限度以上の遠心力がかかると遠心管が破損することがあるので注意を要する。遠心管の破損により、内容物が飛び散るとバランスが崩れて大きな事故につながる可能性があるため十分に注意を要する。

### 【バランス】

高速で回転する回転軸にかかる荷重は均等でなければならず、少しでもバランスが崩れると遠心力が加わったときに遠心管が破損したり、遠心機自体が壊れる可能性がある。遠心管は回転軸に対して対称になるように差し込み、また回転軸に対して、バランスがとれているように重さをあわせておく。また、バケットを差し込むタイプのローターでは、同じ種類のバケットが全ての場所にかけている状態にし、バケットのない場所を作らないようにする必要がある。なお、最近の遠心機はオートバランス機能を持ち、試料の入った遠心管のバランスがずれていても、問題なく回転できるようになっているものもある。



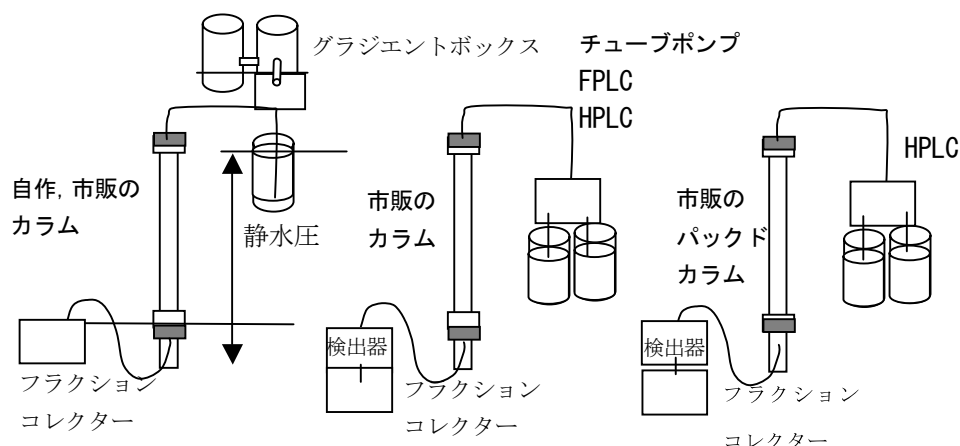
アングルローターへの遠心管の差し込み位置（黒く塗りつぶした部分）

## 第2節 クロマトグラフィー

### 2.1 タンパク質の精製におけるカラムクロマトグラフィー

タンパク質の精製に用いられるクロマトグラフィーはほとんどの場合、ガラス、プラスチック、金属などのカラムを用い、移動相に水溶液を用いる液体カラムクロマトグラフィーによって行なわれ、用いる担体（樹脂）の種類によりイオン交換、疎水性（ハイドロホービック）、アフィニティー、ゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、金属キレートクロマトグラフィー等に分類される。用いるカラムの大きさ、長さは様々であり、タンパク量と分離法によって選択する。また、装置としては送液に重力を用いるオープンカラム法および送液ポンプを備えた液体クロマトグラフィー装置（LC）を用いて行なうが、その選択は用いる担体によって決定する。用いる担体ゲルの耐圧性により、低圧（柔らかいゲル、静水圧を利用）、中圧（硬質ゲル、FPLC, HPLC、ペリスタポンプを利用）、高圧（硬質ゲル、高耐圧性、HPLC を利用）に分けることができる（下図）。

低圧装置（静水圧）    中圧装置（ $\sim 10\text{kg/cm}^2$ ）    高圧装置（ $\sim 150\text{kg/cm}^2$ ）



一般的にタンパク質に対して吸着量の大きい担体には柔らかいものが多く、耐圧性に乏しいので低圧および中圧領域での使用が多い。最近ではタンパク質精製専用液体クロマトグラフィー装置も用いられ、サンプルおよび溶媒の切換え、溶出液のタンパク量（280nmにおける紫外吸収）、電気伝導度、pHなどが測定でき、溶出液の分画がフラクションコレクターで行なえるようになっている。フラクションコレクターでの分画で気を付けることは分画量がピーク体積に比べ多くなりすぎないことである。分離された成分がフラクション中で混じらないよう分画量を設定する。また、これらの装置で使用することを前提にしたパックドカラムも数多く市販されている。カラムクロマトグラフィーに供するサンプルは遠心、フィルターろ過などにより沈澱物や濁りを取り除いておく。一般にタンパク質の精製では目的タンパク質の生物活性を指標にして、その比活性を上げることを目的とし、そのため目的タンパク質が安定な条件で精製法を検討する。しかし、精製の目的によっては変性条件での精製を行なうこともあり、この場合は逆相クロマトグラフィー等の使用も可能である。以下に各種クロマトグラフィーの基本的な扱い方を記す。

#### 【イオン交換クロマトグラフィー】

タンパク質の精製に一般的に用いられる各種クロマトグラフィーの中で、イオン交換法が最も分離能がよくかつ大量のタンパク質を処理できる。タンパク質は水溶液中では等電点よ

りも低い pH では正の、高い pH では負の表面電荷を持っている。そこでイオン交換体がタンパク質とは逆の電荷を有していれば、両者は静電的相互作用により結合する。もちろん両者はそれぞれの対イオンによって取り囲まれているため、タンパク質の吸着は対イオンの交換と溶液の pH 変化を伴う。また、吸着量は溶液のイオン強度に影響され、高塩濃度中では吸着は極端に弱くなる。従ってイオン交換クロマトグラフィーはふつう 10~100mM 程度のバッファー中で行い、あらかじめ担体およびタンパク質を開始バッファーで緩衝化しておくことが必要である。イオン交換体はその官能基の電荷のタイプにより陽イオン交換体と陰イオン交換体に分けられる。陽イオン交換体の官能基の代表的なものには CM(Carboxymethyl,  $-O-CH_2-COOH$ ), SP(Sulfopropyl,  $-O-C_3H_6-SO_3H$ ) など、陰イオン交換体の代表的なものには DEAE(Diethylaminoethyl,  $-O-C_2H_4-N-(C_2H_5)_2$ ), QAE(Quaternized aminoethyl or Diethyl-(2-hydroxypropyl)-aminoethyl,  $-O-C_2H_4-N-(C_2H_5)_2(CH_2-CH(OH)-CH_2)$ ) などがある。また、担体の基材としてはセルロース、セファデックス、架橋アガロース、ポリアクリドアミドおよび各種合成ポリマーが用いられている。一般的には、陽イオン交換体を用いる場合には pH4~5 付近の、陰イオン交換体の場合は pH7~8.5 付近のバッファーが用いられることが多い。いずれにせよ、目的タンパク質の等電点と安定な pH 範囲および添加するタンパク量を把握しておくことでイオン交換体の選択、使用するバッファーの pH および使用するカラムの大きさを決定することができる。初めての実験では目的タンパク質が吸着せずに素通り画分に溶出されることがあるので、カラムからの溶出液は確認するまですべて残しておくことよい。サンプルを添加する前に開始バッファー、カラムから溶出される開始バッファーおよびサンプルについて pH と伝導度を測定し、サンプルの pH の再調整および水による希釈によりサンプルの伝導度を開始バッファーより少しだけ下げる。溶出法としては開始バッファーに食塩などの塩を徐々に添加していくか、溶出液の pH を徐々に変化させるグラジエント溶出法が一般的である。PH のグラジエントでは陽イオン交換体を用いる場合には pH を上げることによって、陰イオン交換体の場合は pH を下げることによって目的タンパク質は溶出される。

### 【ゲルろ過】

ゲルろ過 (Gel filtration) は分子ふるいクロマトグラフィー、分子排除クロマトグラフィーとも呼ばれ、分子の大きさに基づいた分離法であり、クロマトグラフィー担体に低分子量成分は取り込むが、高分子量成分は排除する性質 (分子ふるい作用) をもつゲル粒子を用いる。歴史的にはデンプン、架橋デキストラン (セファデックス)、寒天ゲルなどの多糖が担体として用いられたが、現在ではより改良された種々のゲル粒子が用いられている。また、それぞれのゲル粒子の中で分画する分子量範囲に合わせたポアサイズを持つ多種類のゲルが市販されている。一般に多糖をベースとする柔らかいゲル粒子は用いる圧力範囲が狭く、より高い圧力下ではゲルが変形し、流速が極端に低下するのでポンプを用いずに静水圧下で扱うことが多い。静水圧は溶媒瓶の液面からカラムの出口までの高さで表され、流速を一定にするために静水圧を一定にする工夫がされた溶媒瓶 (マリOTT瓶) を用いることもある。逆に硬いゲルでは静水圧では圧力が足らずポンプを用いることが多い。従って、使用するゲル粒子の種類によって使用する装置を選ぶ必要がある。液クロ装置に接続することを前提としたパッドカラムも数多く市販されている。

表1 セファデックス担体の種類と性質\*

ゲルの種類	膨潤度 (ml/g dry gel)	分画分子量範囲 (Da)	粒子径分布 (mm)	pH 安定性
Sephadex G-10	2~3	~ 700	55~165	2 ~ 13
Sephadex G-25	4~6	1000 ~ 5000	38~235	2 ~ 13
Sephadex G-50	9~11	1500 ~ 10000	38~235	2 ~ 10
Sephadex G-75	12~15	3000 ~ 80000	59~285	2 ~ 10
Sephadex G-100	15~20	4000 ~150000	100~310	2 ~ 10

\*ゲルの粒子径はメディアムサイズのものを表示した。コース, メディアム, ファイン等の種類があり, 粒子径が小さいゲル程分離がよい。

表1によく用いられているセファデックス担体の種類と性質を示す。ゲルろ過を用いる分離の目的には二つあり, 一つは分子量によるグループ分けであり, 例えばタンパク質と低分子量の塩とを分離する場合であり, 少量のサンプルの脱塩, バッファー交換等に用いられる。もう一つはタンパク質の分子量に基づく細分画であり, タンパク質の精製, 分子量の推定等に用いられる。ゲルろ過の分離能は一般的に, ゲルベッドの体積と長さ, サンプル量および流速によって支配される。原理的にはサンプルの体積に比べて十分なゲルベット体積を持ち, 長いカラムで流速は遅い方が分離がよい。グループ分けの場合はゲルベッドの25%程度までサンプルを添加してよいが, 細分画の場合はゲルベッドの3%程度が適当である。カラムの選択と作製, サンプルの添加法, 流速の設定, ゲルの洗浄等については各ゲルの説明書を参照されたい。カラムクロマトグラフィーの段理論から分子量の異なる物質の見かけ分配係数 ( $K_{av}$ ) と溶出位置との関係は  $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$  と表すことができる。ここで  $V_0$  はボイド容積と呼ばれ, ある限界以上の大きさを持つ分子がすべて溶出される位置で, これはゲル粒子間のすきまの容積に相当する。 $V_e$  は目的物質の溶出される容積であり,  $V_t$  はカラムの全容積を示す。理想的な場合には  $K_{av}$  は物質の分子量に比例する。そこで, 数種類の標準タンパク質を用いて検量曲線を描き目的物質の分子量を推定する。 $V_0$  および  $V_t$  の測定のためには分子量の大きなブルーデキストランおよび分子量が小さい DNP-アラニンなどの着色試薬を用いる。吸着を抑えるために, 溶媒には適当な pH の緩衝液に 0.2M 程度の食塩を添加することが多い。ゲルろ過による分子量の推定は溶液中での実際の分子量を与え, SDS-ポリアクリルアミド電気泳動から推定されるサブユニットの分子量と合わせてオリゴマー形成タンパク質のサブユニット数の推定に用いられる。

#### 【疎水性クロマトグラフィー】

一般に高塩濃度下ではタンパク質の表面疎水性は増大し, さらに塩濃度を上げると塩析する。そこで, 塩析するまでの高塩濃度下でイオン交換担体やゲルろ過担体のカラムにタンパク質を流すと, タンパク質によってはこれらの担体にタンパク質が吸着されることが認められる。このようにして吸着されたタンパク質は溶媒の塩濃度を下げることによって溶出される。この現象を利用するのが疎水性クロマトグラフィーであり, より多くのタンパク質を吸着することのできる置換基としてブチル, フェニル, オクチル基を導入した架橋アガロースや合成ポリマーの担体が疎水性クロマトグラフィーの専用担体として市販されている。使用法は 20~35%飽和硫酸を含むバッファー溶液で目的のタンパク質が塩析されない条件で同じ溶媒で緩衝化したカラムに吸着させる。もし目的タンパク質がカラムに吸着されなければ, より高濃度の硫酸溶液を用いるか, より疎水性の高い担体を試す。目的タンパク質が吸着されたカラムは吸着時に用いた溶媒で洗浄した後, 硫酸濃度をグラジエントにより下げながら目的タンパク質を溶出する。もし, カラムから溶出されない場合は 20~30%のエチレングリコール溶液を試す。疎水性クロマトグラフィーによる精製は硫酸分画法に比べて

遙かに分離能に優れ、他の方法で分離されない場合でもうまく分離できる可能性がある。

### 【アフィニティークロマトグラフィー】

目的タンパク質がなんらかの生物活性を持ち、特定の基質や他のタンパク質等のリガンドと相互作用することが予想される場合、それらのアフィニティー（親和力）を利用したカラムクロマトグラフィーが可能である。そのためにリガンドとなる物質を担体に固定化する必要がある。固定化の方法としてはリガンド分子に存在するアミノ基、カルボキシル基、チオール基、水酸基などの官能基との化学反応を利用する（表2）。このための固定化用に活性化された各種の担体が市販されている。例えばリガンドのアミノ基との反応を利用する場合、シアン化臭素活性化担体がよく用いられ、タンパク質や核酸などの第一級アミンと反応する。固定化による立体障害を排し、より効率的なリガンド分子との相互作用を行うために担体から数原子分の鎖（スペーサー）を介して固定化のための官能基を配置する場合が多い。

表2 市販されている主なリガンド固定化用担体

結合部位	市販担体名	メーカー名	スペーサー原子	カップリング条件
-NH <sub>2</sub>	CNBr-活性化 Sepharose4B	Amersham	0	pH8-10, 4°C-室温, 15分-2時間
	ECH-Sepharose4B	Amersham	9	pH4.5-6, 4°C-室温, 1.5-24時間
	活性化 CH-Sepharose4B	Amersham	6	pH5-10, 4°C-室温, 1-4時間
	NHS-活性化 Sepharose4FF	Amersham	9	pH6.5-9, 4°C-室温, 15分-2時間
-SH	Thiopropyl Sepharose6B	Amersham	7	pH4-8, 4°C-室温, 3-16時間
	活性化 Thiol Sepharose4B	Amersham	4	pH4-8, 4°C-室温, 3-16時間
-COOH	EAH Sepharose4B	Amersham	10	pH4.5-6, 4°C-室温, 1.5-24時間
-NH <sub>2</sub> , -SH, -OH	Epoxy-活性 Sepharose6B	Amersham	12	pH9-13, 20-40°C, 16時間-数日

また、目的タンパク質が共通のリガンドに対して親和性を有する一群のタンパク質に属する場合や精製のためのタグを有する場合は市販の群特異的アフィニティークロマトグラフィーが利用できる。例えば、抗体や糖タンパク質、ATPやNADを補酵素とするタンパク質の精製に用いられる（表3）。

表3 市販されている主な群特異的アフィニティークロマトグラフィーの例

固定化リガンド	目的タンパク質
Con A (Concanavalin A)	糖タンパク質, 膜タンパク質
ブルー (Cibacron Blue)	NAD <sup>+</sup> およびNADP <sup>+</sup> 依存酵素
レッド (Procion Red)	NADP <sup>+</sup> 依存酵素
ヘパリン (Heparin)	フィブロネクチン
プロテイン A (Protein A)	抗体 (IgG)
ストレプトアビジン (Streptavidin)	ビオチン化タンパク質
各種レクチン (Lectins)	糖タンパク質
アンヒドロトリプシン (anhydrotrypsin)	トリプシン消化中のC末端ペプチド

### 【吸着クロマトグラフィー】

タンパク質が個体表面に吸着される現象を利用するクロマトグラフィーで、吸着体として無機塩類の担体、特にリン酸カルシウムの結晶がよく用いられてきた。リン酸カルシウムの一種であるヒドロキシアパタイト (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>) はCa<sup>2+</sup>とPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>が規則的に並び、一つの担体が両方のイオン交換体として働くことから吸着と溶出の過程が複雑であり、目的タンパ

ク質の表面の電荷の偏りに依存することから、他のクロマトグラフィーでは分離できないタンパク質を分離できる場合がある。担体を自作することもできるが、流速性能が問題となることが多く、これらの性能を改善した市販ゲルや FPLC および HPLC 用のパックドカラムが市販されている。一般的な使用法としては 10mM 程度のリン酸バッファー (pH 6 以上) でカラムを平衡化した後、同一バッファーでバッファー交換したサンプルを添加し、カラムを洗浄した後、リン酸バッファーの濃度を 200~500mM にステップワイズあるいはリニアグラジエントによって上げて目的タンパク質を溶出する。

### 【金属キレートクロマトグラフィー】

金属キレートクロマトグラフィーは固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー、金属キレートアフィニティークロマトグラフィーとも呼ばれ、担体上で  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  などの金属イオンを配位したキレート形成を行い、この金属イオンとタンパク質表面に存在する His, Cys, Trp 残基とのアフィニティを利用して目的タンパク質を結合させる。担体との結合力は金属イオンの種類、バッファーの種類、濃度、pH およびタンパク質に依存する。溶出にはイミダゾールなどの競合試薬、キレート剤、低 pH のバッファー等が利用される。 $\text{Ni}^{2+}$ を用いる金属キレートクロマトグラフィーは目的タンパク質の N 末端に His 残基を数残基導入した His タグタンパク質の精製によく用いられている。

## 2.2 ゲルろ過による高分子と低分子の分離

### 【目的】

ゲルろ過でタンパク質の精製や分子量の推定を行う場合、目的タンパク質の分子量が分画分子量範囲にあるゲルを選択する (2.1 表 1)。また、分子量分画範囲の小さなゲルろ過担体を用いると高分子量の分子と低分子量の分子を簡単に分離することができる。この性質を利用してタンパク質溶液の脱塩およびバッファー交換を短時間で行うことができる。ここではタンパク質としてチトクローム C (赤色) を、分画範囲よりも高分子量の分子としてブルーデキストラン (青色) を、低分子物質として DNP-アラニン (黄色) を用い、その混合液からそれぞれの成分の分離をセファデックス G-50 のカラムを用いて行う。

### 【試薬】

ブルーデキストラン、DNP-アラニン、チトクローム C の混合水溶液。膨潤したセファデックス G-50 のゲル 5ml

### 【器具】

バイオラッドポリプレップカラム (カラム容量 2ml)

### 【操作】

バイオラッドポリプレップカラムにカラムコックを取り付け試験管上に固定する。カラムに膨潤したセファデックス G-50 のゲルスラリー (ゲルの体積と同量の水で懸濁したもの) を 5ml 注ぎ、2ml の高さ以上のゲルを取り除き 5ml の水で洗浄した後、ゲルベッドぎりぎりのところでコックを閉じる。次に、サンプル溶液を 0.2ml 静かに添加し、コックを開きサンプルがゲルの中に入ったところで再びコックを閉じ、0.2ml の水を加えてコックを開く、この洗浄操作を 2 回繰り返した後、水を 5ml 加え溶出する。溶出中に各成分がカラムで分離される様子を観察する。各成分を別々のエッペンチューブに分け、再使用のために保存する。よい分離を得るためにサンプルの添加時にゲルベッドを乱さないよう注意する。



## 2.3 順相および逆相クロマトグラフィー

順相および逆相クロマトグラフィーは原理的に言えば、前項で述べられた各種液体クロマトグラフィーの中で、吸着クロマトグラフィー（場合によっては、分配クロマトグラフィー\*）に分類される。しかし、カラムに詰められる担体の表面の極性と、溶離液に用いられる溶媒の極性の違いによって、物質の分離が行われるというユニークな特徴を持っているため、別項を設けて、その原理について述べることにする。

順相クロマトグラフィーに用いられる担体（カラムに詰める粒子ということで充填剤と呼ぶ）の代表的な例は、シリカゲルである（図1-A）。シリカゲル粒子の表面にはSi-OH（シラール）基が存在し、非常に極性（親水性）の高い状態となっている。これに対し、逆相クロマトグラフィーに用いられる担体は、同じくシリカゲルであるが、その表面に炭化水素のような疎水性のグループが化学結合を介して導入されており、非常に極性の低い状態となっている。図1-Bの例では、オクタデシル基（C18）が導入されている。



図1. 順相および逆相クロマトグラフィーに使用する充填剤の例。

(A) 順相用. シリカゲル担体, 表面無修飾.

(B) 逆相用. シリカゲル担体, 表面をオクタデシル(C<sub>18</sub>)基で修飾.

順相, 逆相クロマトグラフィーの原理を図2を用いて説明する。図1で示したシリカゲル粒子の担体をカラムに詰める。図2では説明のために担体は1個しか書かれていないが、実際はもちろん多数の粒子が、身動きできないくらい密に充填される。カラムの一方の端から、溶離液に用いる溶媒が流し込まれ、もう一方の端から溶媒が流れ出して行く。図2-Aの場合には、シリカゲル担体の表面は極性の高い状態となっている一方で、溶離液にはヘキサンなど極性の低い有機溶媒が使われる。このように、粒子担体の表面の極性（固定相とも呼ばれる）が、溶離液（移動相とも呼ばれる）の極性より高い場合を、「順相」クロマトグラフィーと呼ぶ。これに対し、図2-Bのように、担体の表面は疎水性に富んでいるのに対し、溶離液として水溶液など極性の高い溶媒を用いる場合がある。この場合は逆に粒子担体の表面の極性は溶媒よりも低いので、「逆相」クロマトグラフィーと呼ぶ。

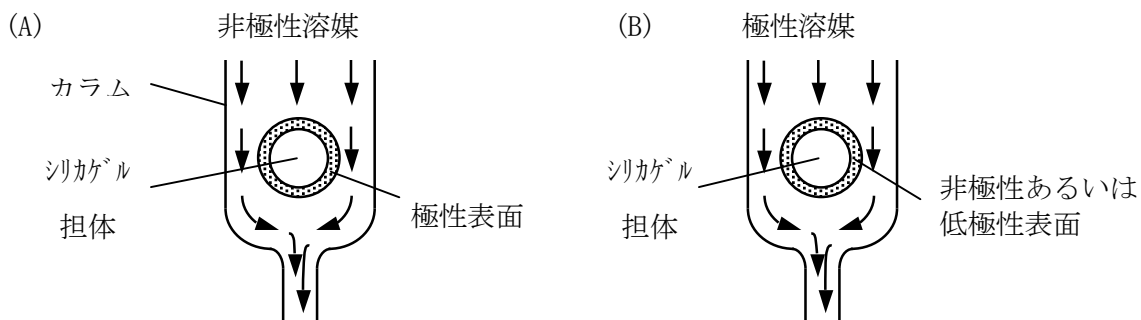


図2. (A)順相クロマトグラフィー と (B)逆相クロマトグラフィー の原理.

どちらのクロマトグラフィーの場合も、物質はその極性に応じて分離される。しかし、溶出してくる順序は両方のクロマトグラフィーで全く異なる。図 3-A に示したように順相クロマトグラフィーの場合には、同時にカラムに導入された物質は、極性の低い順番にカラムから溶出される。これは、極性の低い物質は、極性の高い担体表面にほとんど引き付けられることなく、溶離液に乗って素通りのような状態でカラムから流し出されるのに対し、極性の高いものは担体表面に親和性を持ち、その溶出が妨げられるためである。逆に、逆相クロマトグラフィーの場合（図 3-B）には、極性の高いものは担体表面に引き付けられることなく早く溶出し、極性の低いものは担体表面と相互作用することによって溶出が遅れる。

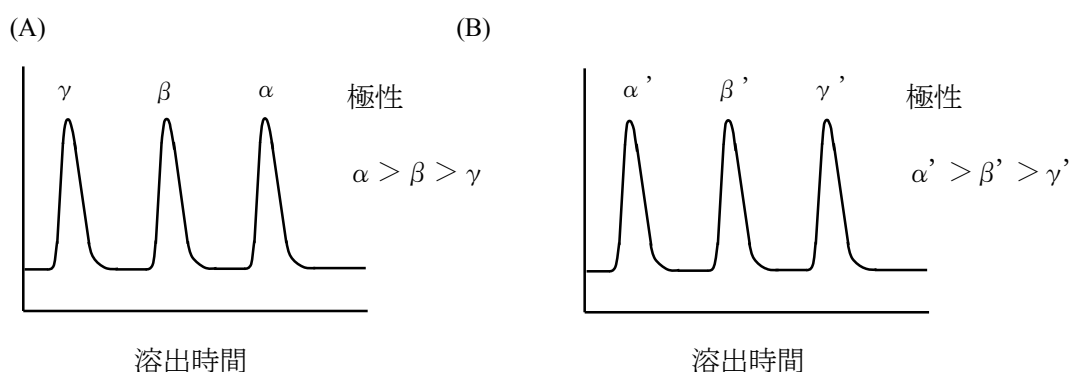


図 3. 極性の異なる物質のクロマトグラフィーによる分離。縦軸は検出器の応答。(A) 順相クロマトグラフィー, (B) 逆相クロマトグラフィー。

一般的に言うと、順相と逆相クロマトグラフィーでは、対象とするサンプルに違いがある。順相クロマトグラフィーの場合には、溶離液にヘキサン、エーテルなどの有機溶媒を用いることが多く、そのような溶媒に解ける脂溶性物質の分離が中心となる。例えば、トリアシルグリセロールやコレステロールなど脂質成分の分離が試みられるが、この場合には、非極性のトリアシルグリセロールの方が早く溶出される。逆相クロマトグラフィーは各種の極性溶媒に溶ける物質の分離操作に用いられるが、もっとも汎用されているのはペプチドの分離であろう。この場合、極性アミノ酸、例えばリジンを含むペプチドは早く溶出されるのに対し、ロイシンなどの脂肪族アミノ酸や芳香族アミノ酸を高い割合で含むペプチドは担体に強く吸着される。C18 基を結合した担体などを用いた場合には、このようなペプチドは強く吸着され過ぎるため水溶液では溶出されず、しばしばアセトニトリルなどの有機溶媒を、しだいに濃度を上げて加えて行き、溶出をさせる。一般的には、有機溶媒の濃度を直線的に増加させるグラジエント（勾配）溶出が多用される。

順相、逆相クロマトグラフィーとも、その原理は古くから知られていたものの、汎用されるようになったのは、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）の技術が実用化された後である。直径数  $\mu\text{m}$  から数十  $\mu\text{m}$  の大きさで、数十から数百  $\text{\AA}$  の細孔を表面に多く持つシリカゲル担体は、表面積が非常に大きく、また HPLC 特有の条件、すなわち高流速、高圧力にも耐えられるため、効率よく分離操作を行うことができる。例えば上述のペプチド分離の例で言えば、グラジエント溶出を利用した逆相 HPLC を行うことにより、アミノ酸 1 個の置換したペプチドを明確に分離することも可能である。さらに、現在では、図 1 で示したものの他に、順相、逆相とも様々な官能基でシリカゲル表面を修飾した担体が開発されており、多様なニーズに応えられるよう

になっている。以上のような事情から、順相、逆相 HPLC は様々な分野で不可欠のツールとなっている。例えば、「日本食品標準成分表」に掲載されている食品中のビタミンの定量については、その多くが HPLC 法によって行われている。

\*分配クロマトグラフィー：水と軽油は混ぜ合せても直ぐに2層に分離する。クエン酸は水に溶けるが、一部は軽油にも溶ける。このように互いに混じりあわない液体に、ある物質が同時に溶け込むことを分配と呼ぶ。分配の原理を利用したクロマトグラフィーが分配クロマトグラフィーである。方法としては、例えば担体粒子の表面を水で濡らす、すなわち水の薄い層でコーティングする（これが可能なためには、担体粒子の表面が水に馴染み易いこと、すなわち十分に極性が高いことが必要である）。このような担体の詰まったカラムに、軽油に溶かしてクエン酸を流すと、その一部は担体表面の水の層に分配されて溶出が遅れる。分配係数の違うものは当然その溶出挙動も変わる。このように、物質の分配係数の違いに応じて物質の分離を行うクロマトグラフィーを、分配クロマトグラフィーと呼ぶ。

## 第3節 電気泳動

### 3.1 電気泳動とは

電気泳動とは、「ある荷電粒子を電場内に置くと、粒子がその荷電に応じて移動を始める」という現象をさす。具体的に言うと、電解質溶液に電極2本を差し込み、直流電圧をかけると、正のイオンは陰極へ、負のイオンは陽極へと移動を始める現象である。タンパク質や核酸も、水溶液中では荷電を持つことが多いので、通常のイオン同様、電極に引かれて移動を始める。その移動度に応じて、タンパク質や核酸を分離しようとする方法を電気泳動法と呼んでいる。

一般に、 $q$  という電荷を持った粒子を、 $H$  という電位勾配を持った電場に置くと、その粒子は $qH$  という駆動力で、 $q$  の持つ電荷とは反対符号の電極の方へ引かれる。そのような分子の移動速度は駆動力  $qH$  と抵抗力  $F$  のバランスによって決まる。 $F$  は粒子が他の分子と衝突することによって生じる。通常の電気泳動では、この衝突する分子とは水および支持体（後述）ということになる。

電気泳動は元々、最初に述べたような方法、すなわち電解質溶液に直接電極を差し込んで、タンパク質を電極に引き寄せるような方法で行われた。その代表的な方法が、Tiselius 式（移動界面）電気泳動法であるが、現在ではほとんど使用されることはない。しかし、その現代版とも言うべき、キャピラリー電気泳動法（直径 1mm 以下の細管に電解質溶液を詰め、その中で荷電粒子の分離を行おうとする方法）は、鋭敏な分析法としてよく利用されている。

このような方法と異なり、ゲルのような支持体の中で荷電粒子を泳動させる方法が、現在では非常によく使われている。この場合には、泳動粒子は支持体のマトリックスと衝突をすることによって、抵抗力が生まれる。いわば、このような“ふるい”効果が加わることにより、粒子は効率よく分離されることになる。また、溶液中の電気泳動では、溶液の対流による泳動相の乱れが生じ易いが、支持体を導入することにより、そのような問題点も解決される。以下では、支持体を用いた電気泳動について主に述べることとする。

### 3.2 支持体

古くから様々な支持体が試みられてきた。ろ紙、酢酸セルロース膜、薄層プレート、デンプンなども使われてきたが、現在ではほとんど使用例を見ない。支持体として頻用されているのは、アガロースとポリアクリルアミドのゲルであろう。このうち、ポリアクリルアミドは網目の小さいゲルを形成できるため、タンパク質や核酸を、その大きさや荷電に応じて精密に分離したい場合には適している。しかし、数 Kb といった大きな核酸などは、その網目に入り込めないため、分析することはできない。このような場合には、網目サイズの大きいアガロースゲルを用いる。なお、3回生の「資源生物科学実験」においては、アガロースゲルを用いた DNA の電気泳動、ポリアクリルアミドゲルを用いたタンパク質の電気泳動、両方について経験してもらう予定である。

### 3.3 ポリアクリルアミドゲル電気泳動

主としてタンパク質を分析することを目的として、様々なポリアクリルアミドゲル電気泳動法が開発されてきた。以下に、その主なものについて述べる。なお、ポリアクリルアミドゲル

は、モノマーのアクリルアミド溶液に架橋剤，重合開始剤，触媒を加えて重合反応を起こさせることによって調製する。

### 【変性剤を用いない泳動法（ディスク電気泳動）】

タンパク質を変性しない条件で電気泳動分析するために様々な緩衝液系が報告されてきたが，もっともよく用いられているのは，Davis の系でディスク電気泳動と呼ばれている。電気泳動装置の模式図を図 1 に示す。通常，ポリアクリルアミドゲルは 2 枚のガラス板に挟まれた形で作製される。ゲルは上部の濃縮用ゲル，下部の分離ゲルからなる。ゲル中にはトリス-塩酸緩衝液が含まれている。濃縮ゲルの pH は 6.7，分離ゲルの pH は 8.9 である。濃縮ゲルの上には“溝”が作られているが，これはサンプルを注入するためである。ゲルはガラス板に挟まれたまま，泳動装置に取り付けられ，上部の泳動槽，下部の泳動槽にはトリス-グリシン緩衝液 (pH8.3) が注ぎ込まれる。上部の泳動槽には陰極が，下部の泳動槽には陽極がつながれる。

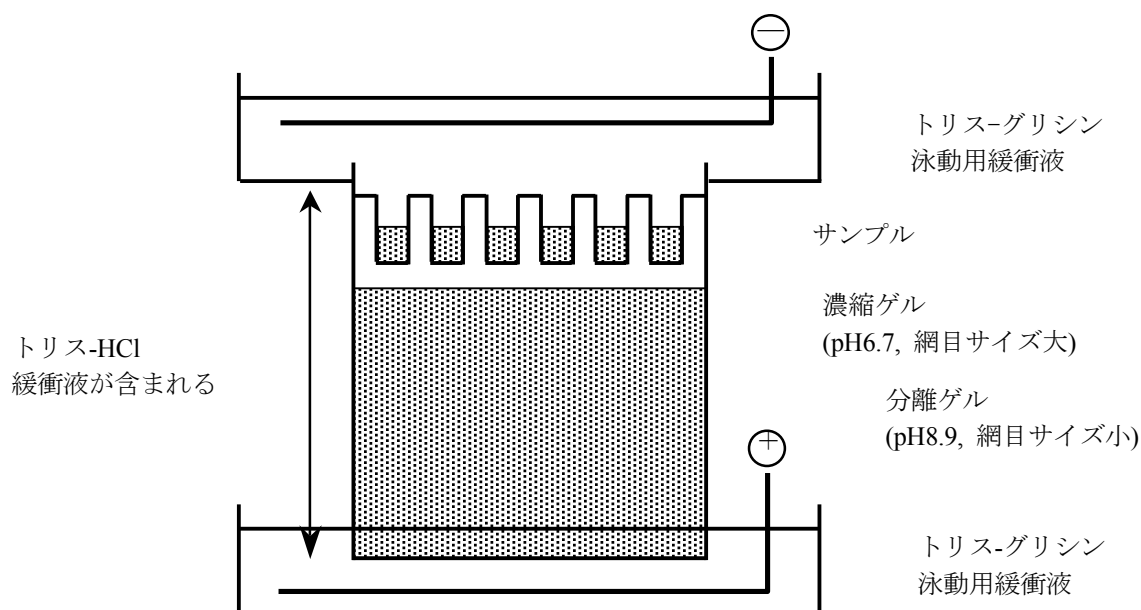


図 1. ポリアクリルアミドゲル電気泳動装置の模式図。

サンプルを濃縮用ゲルの溝に入れて，泳動を開始する。濃縮ゲルで起こる現象を模式的に示したのが図 2-A である。濃縮ゲルに含まれている塩素イオン ( $\text{Cl}^-$ ) は大きな荷電を持つので，非常に速く陽極側に移動する。それに対し，泳動槽の緩衝液中に存在するグリシンは，濃縮ゲルの pH6.7 という環境下では，大きな荷電は保持しておらず (分子内のカルボキシル基とアミノ基の電荷がほとんどつり合っているため)，ゆっくりと陽極に引き寄せられる。タンパク質の場合は，塩基性タンパク質を除いて，この pH 条件ではほとんどが負電荷を帯

びているため、やはり陽極側に移動する。濃縮ゲルの網目のサイズは非常に大きいので、ほとんどのタンパク質は、あまり抵抗を受けることなく動くが、その速度は $\text{Cl}^-$ とグリシンの中間である。というのは、タンパク質の荷電は $\text{Cl}^-$ よりも小さく、グリシンよりも大きいためである。例えて言うと、マラソンランナーのタンパク質達は、先導バイクである $\text{Cl}^-$ に先導され、最後尾を棄権者収容の車に当たるグリシンがついて行くというイメージになる。タンパク質は両イオンの間に挟まれ“濃縮”されていく。 $\text{Cl}^-$ が速く移動するため、濃縮ゲル中には陽電荷のプラスイオンが残り、それを中和するためタンパク質の濃度が高くならなければならないことも、濃縮が進む原因である。“濃縮ゲル”においては、このような機構で濃縮が達成される。

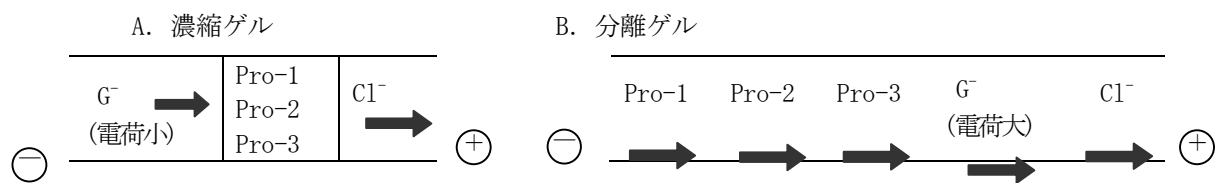


図2. ゲル内におけるタンパク質(Pro-1, -2, -3)とグリシン(G).

次にタンパク質、その他のイオンは、分離ゲルに入ってゆく(図2-B)。分離ゲルのpHは8.9なので、グリシンは十分負電荷を持ち、移動速度は速くなる。また、分離ゲルの網目は小さいので、タンパク質には大きな抵抗力がかかるようになる。従って、グリシンはタンパク質を追いこして進む。それぞれのタンパク質は、その荷電と大きさに従って、それぞれのゾーンを形成して移動して行き、分離される(いわゆるゾーン電気泳動)。以上のように、ゲル中の緩衝液の組成を不連続にすることによって、一段階目でサンプルを濃縮した後、二段階目でそれぞれの物質を分離するような方法を、不連続(discontinuous)電気泳動法と呼ぶ。ディスク電気泳動というのは *discontinuous* の略号である。なお、今回の例では分離ゲルの密度は一定である。しかし、タンパク質をその大きさに応じて、さらに精密に分離したい場合には、“ふるい”効果を高めるため、ゲルの密度を段階的に上から下の方向へ向かって増やしてゆく方法が用いられる。このような方法を「密度勾配ゲル電気泳動」と呼ぶ。

### 【ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)】

上記の変性剤を用いない電気泳動の系に、変性剤を加えてしばしば泳動が行われる。例えば、尿素が加えられるが、これは溶けにくいタンパク質を可溶化するためである。また、RNAや一本鎖DNAの場合、立体構造の形成や塩基の電荷が泳動に影響を与えることから、ホルムアルデヒドを変性剤として加える。しかし、何と云っても一般的なものは、タンパク質の分析に汎用されている、SDSを加えた系であろう。SDSを使う理由としては、膜タンパク質などを可溶化する、目的タンパク質をサブユニットへ解離させる、分子量を測定する、あるいは分子量に応じて効率よく分離する等がある。SDSがタンパク質に結合すると棒状粒子の形をとる。そして、多数のドデシル硫酸基の結合により、どのタンパク質も全体とし

て多数の負電荷を持つようになり、分子量だけに依存して（すなわち、形状や電荷の違いに拠らず）、移動度が決定するのである。SDS-PAGE の詳細については、3 回生の資源生物科学実験書を参照されたい。

### 【等電点電気泳動】

タンパク質はアミノ酸がペプチド結合により重合して形成されたものであり、その中には正電荷、負電荷を与える様々なアミノ酸残基が含まれる。ある pH において、タンパク質の正電荷、負電荷がちょうど釣り合っ（打ち消し合っ）、タンパク質全体の電荷が 0 になる状態が生まれる。この pH を“等電点”と呼ぶ。等電点にあるタンパク質は、電荷が 0 なので、陽極、陰極に引かれることなく静止する。このような現象を利用してタンパク質を分離しようとする方法を、等電点電気泳動と言う（ここではタンパク質の例だけを述べたが、もちろん他の物質にも適用可能である）。

これまでの電気泳動法では、緩衝液を用い、pH を一定にして泳動を行った。しかし、等電点電気泳動法では、緩衝液を用いず、代わりに陽極側に酸 ( $H^+$  を供給する、例えばリン酸)、陰極側に塩基 ( $OH^-$  供給、例えば NaOH 水溶液) を用いる。このような状態で、ポリアクリルアミドゲルを泳動槽にセットし、通電すると、陰極槽の  $OH^-$  は陽極側へ、陽極槽の  $H^+$  は陰極側へ移動しようとし、ゲル内に移動する。結果として、ゲルの中でも陰極に近い側では  $OH^-$  の濃度が高く、陽極に近い側では  $H^+$  の濃度が高いという状態、すなわち pH 勾配が形成される。この pH 勾配を利用して、先程述べた原理に従ってタンパク質は分離される。しかし、通電によって得られる pH 勾配は不安定なので、実際の等電点電気泳動では、pH 勾配安定化のため、両性担体と呼ばれる、様々な等電点を持つ両性電解質混合物をゲルに加える。あるいは、ポリアクリルアミドゲル自体に解離基を固定して pH 勾配を安定化させる方法もある。しかし、それらの詳細については、ここでは述べない。

等電点電気泳動では、タンパク質の電気的性質だけに基ついで分離を行いたいので、分子量の影響を受けないよう、ポリアクリルアミドゲルの密度は取扱いやすい範囲でできるだけ小さくする。これも、ゲルの分子ふるい効果を期待する他のゲル電気泳動法と異なる点である。

### 【二次元電気泳動法】

これまで述べてきたポリアクリルアミドゲル電気泳動を組み合わせることによって、さらに高度な分離が得られる。二次元電気泳動法とは、ある方法で一次元目のポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、一次元目とは異なる方法を用いて、一次元目とは垂直の方向に二次元目の泳動を行うことにより、成分を分離しようとする方法である。タンパク質の分離に関しては、一次元目に等電点電気泳動、二次元目に SDS-PAGE を組み合わせることが最も多い。

等電点電気泳動法と SDS-PAGE を組み合わせた二次元電気泳動の概念を図 3 に示す。一次元目（水平方向）では、タンパク質はその等電点に従って分類される。しかし、等電点が同じタンパク質でも、分子量の異なる場合には、同じバンドの中に複数のタンパク質が重なって表れていることになる。そこで、二次元目では分子量に応じた分離を試みるため、

一次元目のゲルを SDS-PAGE 用のゲルの上部に設置し、二次元目（垂直方向）の泳動を行う。その結果、例えば一次元目では一つのタンパク質と思われた A や B という成分が、実は分子量の異なる A-1, A-2 及び B-1, B-2, B-3 という複数のタンパク質が重なって表れていたことがわかる。このように、荷電と分子量という二つの独立した性質の違いを組み合わせることにより、タンパク質の分離能は飛躍的に増大する。

最近のゲノム解析の急速な進展により、“タンパク質とそれらをコードするゲノム DNA の対応を明らかにするとともに、ゲノム情報を利用して全全ての遺伝子の翻訳産物について機能を解明する研究”，いわゆる「プロテオーム研究」が推進されている。プロテオーム解析において、細胞や組織、臓器における遺伝子翻訳産物の発現や消長を観察するのに、二次元電気泳動法は欠かすことのできないツールである。二次元電気泳動で得られた分離パターンを解析したり、検出されたスポットの位置や濃度を正確につかんだり、二次元電気泳動パターンをデータベース化するため、様々なソフトウェアが市販されている。

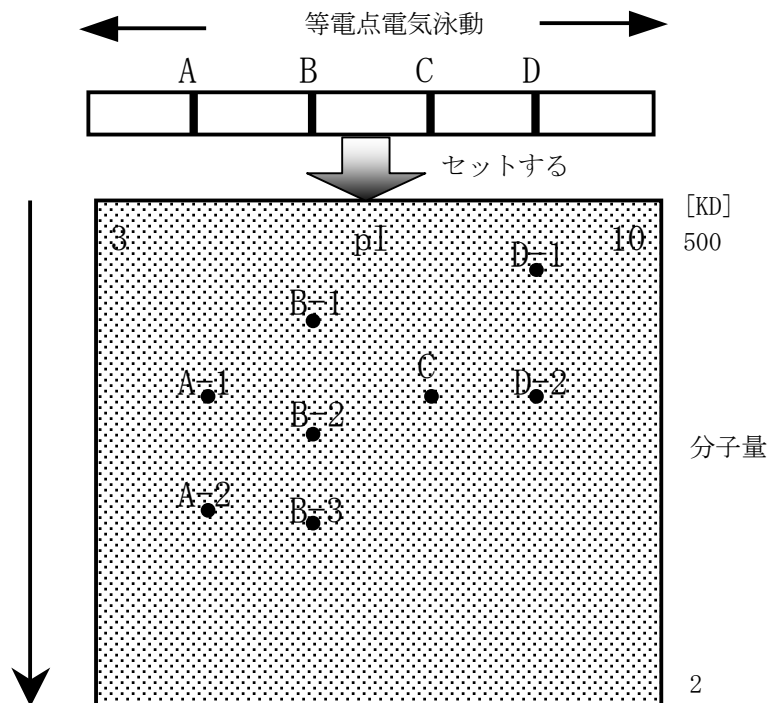


図3. 二次元電気泳動の概念図。  
1次元目：等電点電気泳動，2次元目：SDS-PAGE

### 3.4 染色法

最後に電気泳動後のバンドあるいはスポット検出のための染色法について述べる。

最も一般的なものは、対象とする成分毎に開発された染色試薬を用いる方法である。タンパク質の場合には、クマシーブリリアントブルーやアミドブラック 10B などの色素があり、核酸の場合には、エチジウムブロマイド結合後に UV 照射で検出する方法が汎用される。これらについては、3回生の資源生物科学実験で経験してもらう。その他、銀染色法もタンパク質、核酸の染色に使用されるが、特に高感度なタンパク質染色法として重宝されている。その他、放射性同位体 (RI) 標識をした成分の場合には、オートラジオグラフィを用いるが、この方法に



は RI を扱う施設と汚染に対する厳重な注意が必要である。また、最近では高感度の蛍光色素をタンパク質に吸着させたり、ゲル中のバンド以外の領域（バックグラウンド）を染色する“ネガティブ染色法”も開発されている。その他、酵素タンパク質の場合には、未変性状態のまま（すなわち SDS など変性剤を用いない条件下で）電気泳動し、基質を含む溶液に浸し、生成物を可視吸収あるいは蛍光で検出する方法がある。これを“活性染色法”と呼ぶ。

以上のようなゲル中での染色法に加え、タンパク質や核酸を膜に転写（ブロッティング）し、膜上で検出する方法もある。核酸の場合には、転写後、目的の塩基配列に相補的な配列を持った DNA や RNA 断片（プローブと呼ぶ）を結合（ハイブリダイズ）させるが、そのプローブを様々な方法で標識しておくことによって検出が可能となる。タンパク質の場合には、目的とするタンパク質を認識する抗体（1次抗体）を膜上でタンパク質に結合させ、その1次抗体に対して酵素標識した2次抗体を結合させる。最終的に酵素反応によって目的とするスポットを検出するという“免疫染色法”がよく行われる。3年生の資源生物科学実験では、核酸、タンパク質のブロッティング、膜上での検出反応実験を行ってもらう。