

445 交差反応を利用する分泌生産イネ α -アミラーゼの
免疫アフィニティクロマトグラフィー精製
(京大・工・化工) ○加藤滋雄 寺嶋正明 須澤通雅 佐田栄三

【目的】酵母によって分泌生産されるイネ α -アミラーゼを、抗大麦 α -アミラーゼ抗体との交差反応を利用して、培養上清から1段の免疫アフィニティクロマトグラフィーによって高純度に精製することを検討した。

【方法および結果】硫酸沈殿ならびにゲルクロマトグラフィーによって粗精製した大麦 α -アミラーゼをウサギに免疫して得た抗血清から抗大麦 α -アミラーゼ抗体を精製した。これを CNBr-activated Sepharose 4B に固定化して、免疫吸着体を調製した。イネ α -アミラーゼ発現ベクター pEno/RAmy 1A を導入した *Saccharomyces cerevisiae* LL 20 を、2 L の YEPD 培地で 24 時間 30 °C で培養した。イネ α -アミラーゼを含む培養上清を限外濾過膜で濃縮した後、50 mM Tris-HCl + 5 mM CaCl₂ 緩衝液 (pH 7.6) で平衡化した免疫吸着体充填カラムに 2 ml/min の流量で負荷した。同じ緩衝液で洗浄後、2.5 M NaSCN 又は pH 3.8 の酢酸緩衝液でイネ α -アミラーゼを溶離した。活性は還元糖量、タンパク濃度は CBB 法、純度は SDS-PAGE によって求めた。

培養上清からの1段の免疫アフィニティクロマトグラフィーによって SDS-PAGE で単一バンドとなる純度に精製できた。また、2.5 M NaSCN による溶離の場合回収率は約 60 % であった。交差反応を利用する方法は、十分な純度、量の精製目的抗原が得られない場合にも免疫アフィニティクロマトグラフィーが行え、また抗原中の不純物と、組換え体によって産生された粗原料中の不純物は異なるため、抗原純度が高くなくても、高純度の精製が可能である。

Purification of secreted rice α -amylase by affinity chromatography with a cross-reactive antibody

○ Shigeo Katoh, Masaaki Terashima, Michimasa Suzawa and Eizo Sada
(Chemical Engineering Dept., Kyoto University)

446 リン酸チタニウム系多孔質結晶化ガラスのタンパク質分離用クロマト充填剤としての応用
(名工大、材料工) ○今井一成、弓岡良也、細野秀雄、阿部良弘
(名工試、セラ応) 鈴木高広、鳥山素弘

【目的】無機材料は機械的強度や化学的耐久性が高く、加熱滅菌も容易であることから生体触媒や生体関連物質の固定化、吸着分離材料として優れた資質をもつ。我々は、リン酸化合物材料の高い生体親和性に着目し、これまでに生体関連材料として優れた吸着機能特性をもつ材料の創出を試みてきた。その結果、原子骨格構造的に優れたイオン交換機能をもつと思われるリン酸を主成分とした多孔質結晶化ガラスを合成することに成功した。そこで、今回はこの材料のタンパク質吸着特性を調べ、分離精製用クロマト充填剤としての機能性を検討した。

【方法と結果】Li₂O-CaO-TiO₂-P₂O₅系ガラスを結晶化処理後、酸処理しLiTi₂(PO₄)₃を骨格に持つ多孔質結晶化ガラス(LTP)、およびリン酸チタニウムTi(HPO₄)₂·nH₂Oを含む組織を骨格に持つ多孔質結晶化ガラス(TP)を作製した。比較としてハイドロキシアパタイト(HAP)を用いた。これらを微粉碎し牛血清アルブミン溶液に投入し、タンパク質吸着特性を比較した。一方、カラムによるタンパク質の分離精製特性は、 α -キモトリプシノーゲンA、 β -ラクトグロブリン、チトクロムC、リボヌクレアーゼAの混合溶液を用いて、各材料の充填カラムに吸着した混合タンパク質の分離条件を検討することにより行った。溶離液中のタンパク質の同定は、SDS-PAGEにより行った。その結果、TPはHAPよりも比表面積が高く、担体重量あたりのアルブミン吸着量もHAPと同等の結果を示したが、LTPの吸着量はこれらの約半分にとどまった。TPとHAPに吸着したアルブミンの溶離条件を調べたところ、NaCl水溶液ではいずれも溶離できず、1N-NaOHや6N-尿素、1N-リン酸緩衝液(pH 7)で溶離され、両担体は同様な吸着機構であることが推定された。しかし、TPはNaイオンの作用により構造の骨格が変質していることがわかった。種々のカチオンの影響を調べたところ、リン酸アンモニウム溶液を溶離液として用いることが適当であった。混合タンパク質を吸着した各試料から溶離液に濃度勾配をつけて段階的溶出を試みたところ、いずれも良好な分離パターンが得られた。SDS-PAGEの結果、イオン強度に依存した溶出順はTPとHAPでは異なっていることが判明した。

Application of porous glass-ceramics to column chromatography of proteins.

○ K. Imai, Y. Yumioka, H. Hosono, Y. Abe (Dept. Mater. Sci. Eng., Nagoya Inst. Tech.),
T. Suzuki, M. Toriyama (Govern. Ind. Res. Inst., Nagoya)