

限外濾過による血清蛋白質の分子量分画

小 山 憲 治
大 野 省 太 郎
福 田 三 寿
木 原 啓 一

Molecular Fractionation of Human Serum Protein by Ultrafiltration

Kenji KOYAMA
Shotaro OHNO
Mitsutoshi FUKUDA
Keiichi KIHARA

Human serum protein has been separated by ultrafiltration into three major fractions; macroglobulin, albumin, and γ -globulin. First, macroglobulin fraction was removed from a serum protein solution by using TS-1000 membrane. Then, albumin fraction was separated from γ -globulin fraction through TS-300 membrane. The optimum conditions for the membrane separation of albumin and γ -globulin were discussed.

1. はじめに

限外濾過法によるヒト血清蛋白質の分子量分画の可能性を検討した。限外濾過法は、高分子物質の脱塩、濃縮に、工業的規模で使用されている技術であるが、その分離性の粗さ、および分離技術の未発達のために、高分子間の分離には使用されていない。しかしながら、従来の高分子分画法であるゲル濾過法、イオン交換法、塩析法、有機溶剤沈澱法と比較し、その大量処理性および分離条件の穏和性から、分離性能の改良により、これらの分画法と肩を並べる可能性がある。また、これまでそれ程重要視されなかった、分離条件の改良により、満足できる結果を得る可能性もある。本研究は比較的シャープな分離性能を持つTS-シリーズの膜を用い、代表的な混合蛋白系であるヒト血清を試料として、その成分蛋白の分画を試みた結果である。

2. 実 験

[1] 試 料

健康人より採取した血清を用いた。添加物は一切含有していない。分離条件の検討にはウシ血清アルブミンお

よびウシ血清 γ -グロブリンを用いた。両者を2:1の割合で混合し、緩衝液で希釈して総蛋白質濃度1%の溶液とした。

[2] 限外濾過装置および限外濾過膜

限外濾過装置はTSK-UFシステム、SC-60を用いた。これは流路長約27cm、流路厚み約0.7mmに設計された薄層流路型セルとチュービングポンプとを組み合わせたもので、9cm角の正方形の膜を装着する。有効膜面積は約60cm²である。限外濾過膜は、第1段階のマクログロブリン分画の除去にTS-1000(公称分画分子量10⁶)、第2段階のアルブミンと γ -グロブリンの分離にはTS-300(同3×10⁵)を用いた。他に脱塩、濃縮用にTS-50(同5×10⁴)を用いた。装置、膜、共に東洋曹達製である。

[3] 分離操作

回分法によった。この実験では原液200mlより出発し、膜透過液が100mlになった時点で原液側に100mlの緩衝液を供給、この操作を繰り返した。膜の見かけの阻止率Rは次式より求めた。

$$C_R/C_0 = 0.5^{n(1-R)} \quad (1)$$

ここでC₀、C_Rは各々原液中の対象蛋白質濃度、およ

び回分操作 n 回後の供給液中の対象蛋白質濃度, n は回分回数, R は見かけの阻止率である。

[4] 濃度検定

溶液中の蛋白質濃度は液体クロマトグラムのピーク高さによって決定した。

測定条件

装置	HLC802UR (東洋曹達)
カラム	TSK GEL G3000SW 2ft×1 (同)
溶離液	1/15M リン酸緩衝液
流速	1.0 ml/min
ループ容積	200 μ l
検出器	UV 280 nm

3. 結果および考察

ヒト血清の液体クロマトグラムを Fig. 1 に示す。ピークは大別してマクログロブリン類 (分子量 2×10^5 以上), γ -グロブリン (1.6×10^5), アルブミン (6.7×10^4) の3群より構成される, と見ることができる。もちろん, これらのピーク中にはマイナーな成分も含まれているが, このようなわずかな分子量の違いは, 現状の限外濾過による分離の範囲外にあるので, 上で分類した3つの蛋白質群の膜による篩分けを試みた。

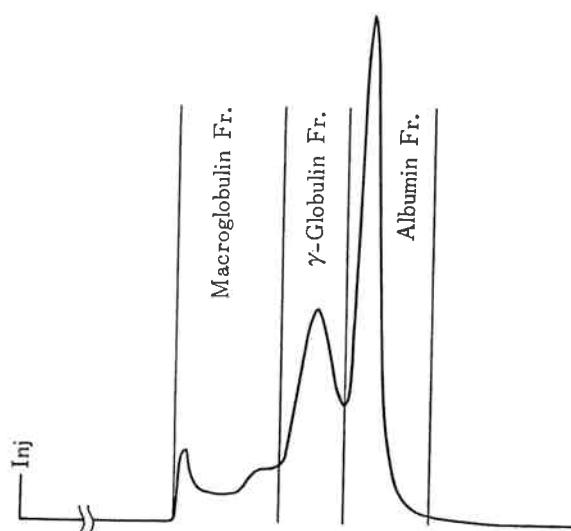


Fig. 1 Chromatogram of human serum

[1] マクログロブリン類とアルブミンと γ -グロブリンとの混合物との分離

純水で3倍希釈したヒト血清をTS-1000によって分画した。膜透過流量は約 $17 \text{ l/m}^2 \cdot \text{hr}$ であった。循環流量を増し, 膜透過流量を $20 \text{ l/m}^2 \cdot \text{hr}$ 以上にすると操作中に透過流量の著しい低下とアルブミンおよび γ -グロ

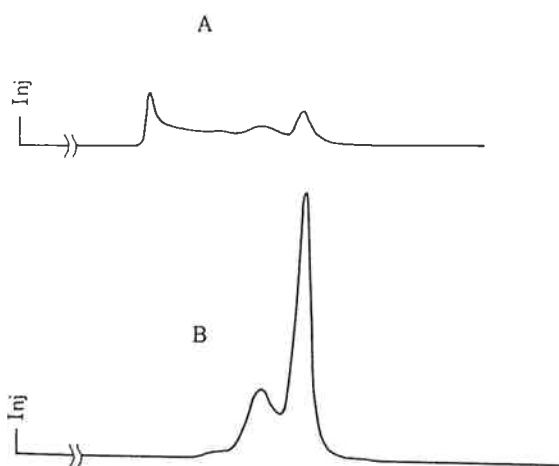


Fig. 2 Chromatogram of human serum fractionated by TS-1000 membrane.

A : Macroglobulin fraction-retentate

B : Mixture of albumin and γ -globulin-filtrate

ブリンに対する阻止率が85%以上となり分離効率が低下した。Fig. 2 に最終的に得られた膜阻止液と膜透過液のクロマトグラムを示す。膜透過液はTS-50膜により濃縮したものである。80%以上のアルブミンと γ -グロブリンが膜透過しており, マクログロブリン分画と分離されていることがわかる。しかしながら得られたアルブミンと γ -グロブリンの混合液は, その組成において原液 (血清希釈液) とほぼ同様であり, アルブミンと γ -グロブリンの阻止率にあまり差が無いことを示している。分子量差から考えてアルブミンの阻止率の方が低く

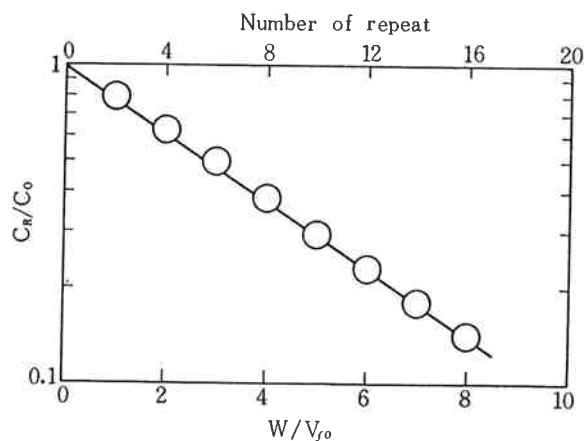


Fig. 3 Relationship of the concentrations of albumin and γ -globulin to the number of repeat

C_0 : Initial concentration of albumin or γ -globulin in the feed solution

C_R : Concentration of albumin or γ -globulin in feed solution at n th batch,

n : Number of repeat

V_{f0} : Initial volume of the feed solution

W : Volume of filtrate

なるのが当然であり、この結果は、アルブミンと γ -グロブリンとの膜分離が本実験の条件では困難であることを示唆している。

Fig. 3 に回分回数と膜に保持されているアルブミンと γ -グロブリンの量との関係を示す。回分操作が進むに従って保持されたアルブミンと γ -グロブリンの量は直線的に減少しており、この操作中において膜の分離性能に変化が無いことを示している。

以上の結果はセルロース系の膜を用いた Van Oss¹⁾らの結果と同一であり、ヒト血清よりアルブミンと γ -グロブリンの混合物を膜分離によって得るのは比較的容易である。

(2) アルブミンと γ -グロブリンとの分離

膜によるアルブミンと γ -グロブリンとの分画は Van Oss¹⁾ ら、および Blatt²⁾ によって試みられている。Van Oss らはセルロース系の膜を用いて、血清から膜分画したアルブミンと γ -グロブリン混合物の分離を試みたが両蛋白質共に膜を透過しなかった。更に彼等は低濃度の両蛋白質混合系では分離が比較的良好であることを見出した。また Blatt^{2,3)} は XM-100 膜を用いてアルブミンの阻止率に対する γ -グロブリンの存在量の影響について検討し、 γ -グロブリンの存在がアルブミンの阻止率を急激に増加させることを認めた。これらの結果は、使用した膜材質の違いはあるが、実用的な濃度範囲でのアルブミンと γ -グロブリンの分離は困難であることを示している。これらの研究に使用された膜はアルブミン単独溶液の場合には低い阻止率を示すものであるが、 γ -グロブリンが共存することによって高い阻止率を示すようになる。事実、今回の実験に使用した TS-300 膜もアルブミン単独溶液では阻止率 40% 前後、 γ -グロブリン単独溶液で阻止率 95% 以上を示すが、両蛋白質の混合物では共に 95% 以上となり、分離は望めなかった。この理由として我々は γ -グロブリンの濃度分離を考えた。一般に限外河過法において、膜面に生ずる濃度分極層を減少せしめるために、膜面の剪断速度を高める、という機械的操作を推奨するか、蛋白質のような電解質が溶質の場合、その電気的性質を考慮することによって分離効率を著しく向上させることが可能な場合がある。特に本研究の場合、中性付近の等電点を持つ γ -グロブリンは、分子間の静電的反撥が弱く、濃度分極層およびゲル層を形成し易く、分離を阻害し易い状態にあるものと思われる。よって、溶液の雰囲気を変化させてことにより、分離の可能性が生まれると判断した。

(1) pH の影響

膜分離に供するウシ血清アルブミンおよびウシ血清 γ -グロブリンの 2 : 1 の混合溶液 (総蛋白濃度 1%) の

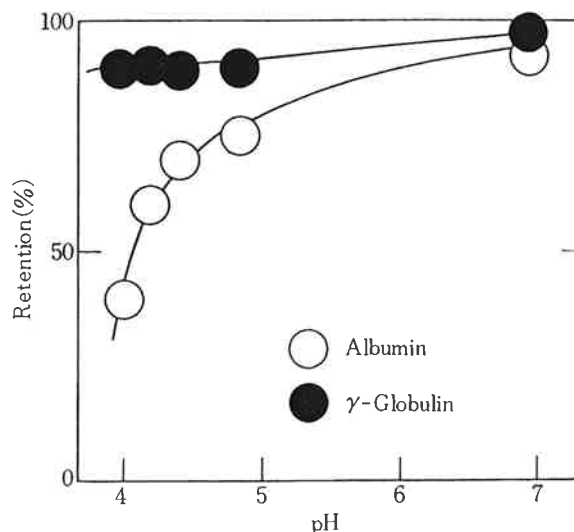


Fig. 4 pH dependences of the retention of albumin and γ -globulin on TS-300 membrane. Sample solution contains 0.67% albumin and 0.33% γ -globulin.

pH を変化させて、各々の膜透過挙動を見た。使用した膜は TS-300 である。pH 3.8 以下ではアルブミンがコンフォメーション変化を起こす (N-F 転移) ため、pH の下限は 4.0 とした。溶媒には 1/15M 酢酸緩衝液を用いた。Fig. 4 に両蛋白質の阻止率と pH との関係を示す。 γ -グロブリンの阻止率は pH の変化にそれ程敏感では無いが、アルブミンのそれは pH の低下と共に著しく減少している。これよりアルブミンと γ -グロブリンとの膜分離は pH 4.0 付近で可能であることがわかる。

(2) 塩濃度の影響

pH の影響と共に塩濃度の影響も無視できない。pH 4.1 において塩濃度を変化させ、その効果を見た。加えた塩は NaCl である。結果を Fig. 5 に示す。明らかに低塩濃度において分離は良好である。

以上の結果は次のように説明できる。pH 変化は両性電解質である蛋白質の静電的性質を変え、塩濃度の変化は静電的拡がりを変える。pH 4.1 においてアルブミン、 γ -グロブリン共に正電荷を持ち (アルブミンの等電点は pH 4.7)、また低塩濃度では広い静電雰囲気を持って互に強く反撥している。これにより濃度分極層は比較的低濃度、低粘度となり、この層におけるアルブミンの拡散速度は大きくなる。更に合成高分子を基材としている TS-300 膜は負電荷を持つと考えて良く、反対の電荷を持つアルブミンは膜近傍に接近し易い (中性付近ではアルブミンは負電荷を持ち、膜とは反撥し合う)。このような状態がアルブミンの選択透過を促進するものと思われる。

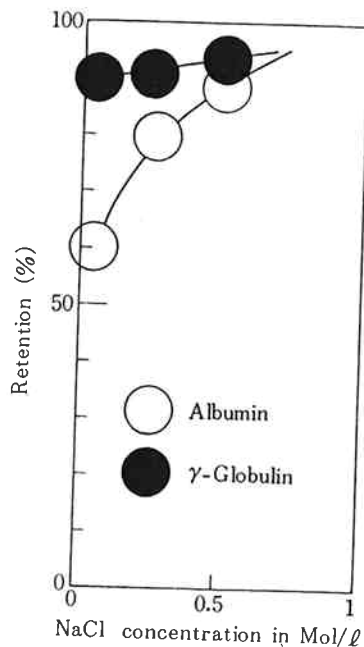


Fig. 5 Salt concentration dependences of the retention of albumin and γ -globulin by TS-300 membrane, at pH 4.1. The solute concentration and contents as Fig. 4

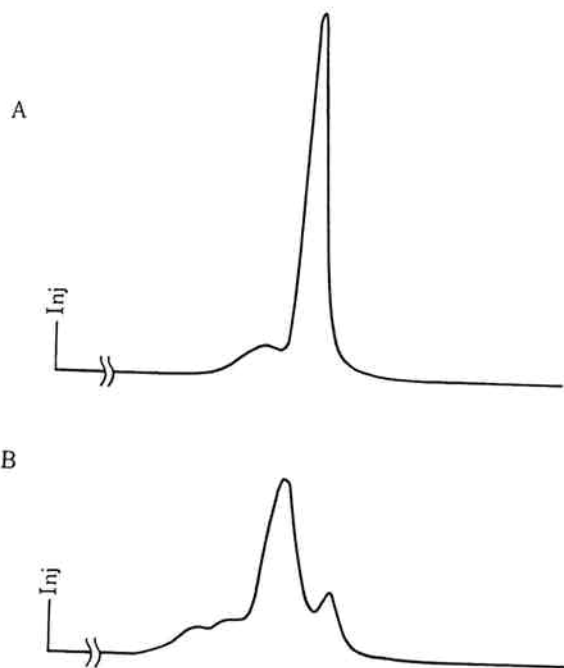


Fig. 6 Chromatograms of the fractionated human serum by TS-300 membrane.
A : Albumin fraction-filtrate.
B : γ -Globulin fraction-retentate

(3) アルブミンと γ -グロブリンとの膜分離

以上の結果を用いてヒト血清より膜分離によって得たアルブミンと γ -グロブリンとの混合液の膜分離を行った。溶液はTS-50膜(分画分子量 5×10^4)を用いて塩

濃度を1/5に脱塩すると共に、pH 4.1の酢酸緩衝液に置換したものを用いた。操作中、膜透過量は約 $15 \text{ l/m}^2 \cdot \text{hr}$ であった。Fig. 6にTS-300膜を透過したアルブミン分画(TS-50により濃縮)と膜阻止液である γ -グロブリン分画のクロマトグラムを示す。得られたアルブミン分画はほぼ単一のピークであるが、 γ -グロブリン分画中にはアルブミンのピークが残存している。しかしながら、両分画中には通常のエタノール分画によって得られたものに存在する凝集体は見られず、限外濾過法が比較的穏やかな分離法であることを示している。またFig. 7に見られるように、この分離操作中、膜の分画性能の変化は無かった。

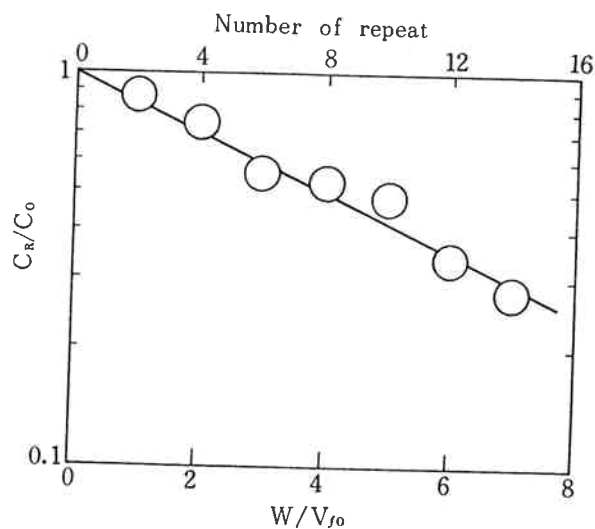


Fig. 7 Relationship of the concentration of albumin in feed solution to the number of repeat. TS-300 membrane was used.

4. おわりに

限外濾過により血清蛋白質を大ざっぱに3つの画分に分子量分画することができた。このような結果は、血清溶液を中性領域で扱っても得られない。限外濾過は高分子をその分子サイズによって篩分ける技術であるが、特に溶質が電解質の場合には、溶質および膜の電氣的性質が分離に大きな影響を与えがちである。この点を考慮して、膜分離条件を設定すれば、従来、限外濾過では困難とされてきた分離も可能となる場合がある。ゲル濾過やイオン交換による分離の場合に払われるような分離条件に対する注意を限外濾過による分離の場合にも払うべきであろう。

文 献

- 1) C. J. Van Oss, P. M. Bronson; *Membrane Scien-*

- ce and Technology*, ed. J. E. Flinn, Plenum Press, New York (1970).
- 2) W. F. Blatt; *Nature*, 216, 511 (1967).
- 3) W. F. Blatt, A. Dravid, A. S. Michaelis, L. Nelson; *Membrane Science and Technology*, ed. J. E. Flinn, Plenum Press, New York (1970).