

Biotechnology Explorer™

実習用テキスト

サイズ排除クロマトグラフィーキット

カタログ番号

166-0008JEDU

[www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)

**BIO-RAD**

---

## 先生方へ

バイオテクノロジーや分子生物学を学ぶ人達が最初に感じるものの一つは、なにがどんなプロセスを経て起きているのかが目に見えないことです。バイオ・ラッドの Explorer Kit シリーズは、すべて、有色分子または蛍光分子を使用していますので、研究対象となる生物学的過程を明確かつ容易に肉眼で確認することができます。

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) キットは、基本的なゲル濾過クロマトグラフィー法について教育を行うことを目的としてデザインされています。このキットでは、有色分子であるヘモグロビンとビタミン B12 を使用して、SEC の基本原理を説明しています。学生は、クロマトグラフィーカラムを通過するにしたがってこれらの分子が分離されてゆく様子を容易に肉眼で確認することができます。

## 充実した指導ガイド

Biotechnology Explorer キットとそのカリキュラムは、5 年以上の開発期間をかけ、先生の手によって先生のために書かれたもので、高校から大学までの幅広い教育現場で数多く使用されてきました。Biotechnology Explorer は扱いが容易で、教室をバイオテクノロジーの興奮のるつぼに巻き込む素晴らしい方法です。それぞれのキットのプロトコールは段階的に進行し、熟練した先生はもとより経験の浅い先生でも、十分な指導選択ができます。

それぞれのキットのカリキュラムは Biotechnology Explorer 特有のもので、それぞれのキットには独自のカリキュラムが生まれ、それぞれ教員用テキストと学生・生徒用テキストに別れています。教員用テキストは 3 章に分かれ、実習を円滑かつ確実に進行する手助けとなります。まず、バックグラウンド、講義の主題、および参考資料があります。これらを参照するとバイオテクノロジーに熟練した先生はもとより、経験の少ない先生でも、実際の実験に先立って講義および学習の準備をし、計画を立てることができます。この事前準備により実験が円滑かつ確実に進み、学生はそれぞれの実験の基礎にある概念を確実に理解できるでしょう。次に、実験の事前準備を詳細に図解した、わかりやすい進行手順の説明があります。この手順に従えば各実験は間違いなく成功することでしょう。さらに実施計画予定表があり、実験を計画通りに進行する手助けとなるはずです。それぞれの実験は 50 分間で実施でき、ほとんどの時間割りに合うようになっています。

最後に、詳細な教員用解答ガイドがあります。このガイドには、学生・生徒用テキストに示した全設問に対する解答が掲載されています。先生は、学生・生徒用テキストの設問内容の検討、あるいは授業内容のレベルづけとしてこれらの解答を使用することができます。

それぞれのキットは、実験を行う場合でも設問の解答を考える場合でも、学生ができるだけ多く参加できるように作られています。参加することにより、学生は科学的プロセス、および系統的かつ論理的な方法で課題を進めることの価値をより深く理解するようになります。こうした過程を経験することにより、科学的な実験手順や系統的、かつ論理的に物事を進めることの重要性を理解することができます。さらに、このキットの実験を通じて、生徒達が、科学技術を理解する能力をより高めていくことを期待しています。

この Biotechnology Explorer のカリキュラムはとてもユニークで、理科の先生方に非常に驚かれ、また興味を持って頂いています。バイオ・ラッドではこれからもカリキュラムや製品の改良を勧めていきます。皆様のお声はその意味でも大変重要です。ぜひご意見をお聞かせください。

## 目次

教員用テキスト.....	1
バックグラウンド.....	2
実験前の講義.....	2
このキットを使用した授業の目的.....	2
キット使用時に必要な試薬・器具等の一覧.....	3
時間割例.....	3
クロマトグラフィーについて.....	4
実験開始前の準備.....	8
このキットで行う実験のポイント.....	9
クイックガイド.....	10
学生・生徒用テキスト.....	12
◆Lesson 1 クロマトグラフィーについて.....	13
学習 1 クロマトグラフィーについて.....	13
◆Lesson 1 質問 1.....	15
<学習 2 サンプルについて>.....	16
◆Lesson 1 質問 2.....	18
◆Lesson 2 クロマトグラフィー実験.....	19
実験プロトコール.....	20
◆Lesson 3 実験結果の分析.....	23
<質問>.....	23
付録 A 質問の回答例.....	24
◆Lesson 1 クロマトグラフィーについて.....	24
<学習 1 クロマトグラフィーについて>.....	24
<学習 2 サンプルについて>.....	26
◆Lesson 2 質問.....	27
付録 B このキットに出てくる用語の解説.....	28

## 教員用テキスト

バックグラウンド .....	2
実験前の講義 .....	2
このキットを使用した授業の目的 .....	2
キット使用時に必要な試薬・器具等の一覧 .....	3
時間割例 .....	3
クロマトグラフィーについて .....	4
実験開始前の準備 .....	8
このキットで行う実験のポイント .....	9
クイックガイド .....	10

## バックグラウンド

私達の体は、数千種類もの異なるタンパク質からできており、これらのタンパク質は種々の働きをしています。例えば、消化酵素はタンパク質であり、体内を駆け巡ってさまざまな信号を送るホルモンの一部や、人体を疾患から防御する免疫抗体もタンパク質です。これらのタンパク質を組み立てるための情報は DNA にあります。タンパク質を作り上げるための暗号(コード)を含む DNA 部分を、遺伝子と呼びます。それぞれの染色体には数千種類の遺伝子が存在します。それぞれの遺伝子は独自のタンパク質をコードしています。消化酵素を作るための遺伝子は、抗体を作るための遺伝子とは異なっています。

タンパク質は、医薬品として利用されることがよくあります。これらのタンパク質のなかには、天然に存在する材料から大量に精製されるものがありますが、最近では、その多くが、遺伝子工学的手法および組換え DNA 技術により製造されています。材料が何であっても、目的のタンパク質は、細胞中の他のタンパク質との混合物として存在します。バクテリアのような細胞は、約 2000 種類までの異なる種類のタンパク質を大量に産生するものもあります。

生体物質中の固形分の 75%はタンパク質であるため、生物学者は目的のタンパク質を細胞内の他のタンパク質から単離・精製しなければなりません。バイオテクノロジー産業では、特定のタンパク質を精製する方法を決定するのは、非常に骨の折れる作業です。この作業には、タンパク質の大きさ(分子量)、電荷や形状など化学的および物理的性質を利用しています。

## 実験前の講義

以下の講義を、クロマトグラフィーの実験前に行うと良いでしょう：

1. タンパク質の構造についての生物学の教科書の復習
2. DNA の構造および機能ならびにタンパク質合成についての確認
3. 一般的なタンパク質の構造についての図書館およびインターネットでの調査

## このキットを使用した授業の目的

- ・ タンパク質の精製において、異なるタイプのカラムクロマトグラフィーの利用法を比較すること。
- ・ カラムクロマトグラフィーを用いた場合に、天然のタンパク質および組換えタンパク質を含む生体物質がどのようにして分離され精製されるかを説明できるようになること。
- ・ タンパク質の構造および生化学的性質がカラムクロマトグラフィーによる精製とどのように関連しているかについて議論すること。
- ・ 問題\*解決のために科学的手法を応用すること。

**問題**：ヘモグロビン(分子量:65,000 ダルトン)とビタミン B12(分子量:1,350 ダルトン)をゲル濾過クロマトグラフィーにより分離することができるでしょうか？

## キット使用時に必要な試薬・器具等の一覧

このキットの構成物と、キット以外に必要な試薬・器具等の一覧表です。1 キット=8 班×4 人分の実験に必要な数になっています。準備の時の確認リストとしてお使いください。

キット内容物	数量/キット	(√)
タンパク質混合物	1 バイアル	<input type="checkbox"/>
ヘモグロビン		
ビタミン B12		
Poly-Prep® サイズ排除用カラム	8	<input type="checkbox"/>
カラムエンドキャップ	25 個	<input type="checkbox"/>
カラムバッファー	50ml	<input type="checkbox"/>
ピペット(1ml)	10 本	<input type="checkbox"/>
コレクションチューブ	100 本	<input type="checkbox"/>
マニュアルおよびクイックガイド	1	
その他必要な付属品		
12 本用チューブ立て	8	<input type="checkbox"/>
油性ペン	8	<input type="checkbox"/>

## 時間割例

このキットを使用するにあたっては、実験は 50 分授業でできるようにプロトコールが組まれています。実験前の講義や準備、1 回分を含めて、計 3 回の授業のカリキュラム例を示します。先生方の都合や生徒や学生のレベル等に合わせてカリキュラムを組んでください。

**Lesson 1** クロマトグラフィーについての授業

ヘモグロビン、赤血球、ビタミン B12、タンパク質の生化学

質問

**Lesson 2** 実験

**Lesson 3** 結果の分析

分析、質問

## クロマトグラフィーについて

この実験では、サイズ排除クロマトグラフィーの基本的な技術を用いています。今回の実験には、基本的な生物学カリキュラムと応用的な生物学カリキュラムの双方が含まれています。今回の実験で使用する 2 種類の分子はヘモグロビンとビタミン B12 であり、これらはいずれも、私達の体を機能させるために必要不可欠な物質です。そのため、実験内容を、生物学、人の生理学および生化学の基本的な講義と関連させることも可能です。

ここで、このキットを使用するにあたっての操作上、もしくは概念上のポイントを述べておきます。これらのポイントは実験や考察を行っていくために重要になります。

先生方は、生徒達にこれらのポイントを理解させ、可能であれば、生徒達が実験を行う前に、実際の操作を見せてあげてください。

クロマトグラフィーは、例えば、医薬品等に用いられる生体分子を始めとしたいろいろな物質を単離・精製するために広く利用されています。クロマトグラフィーにより、複雑な混合物から個々の成分が分離されます。クロマトグラフィーは、移動相(溶媒および分離対象となる分子)と、紙(ペーパークロマトグラフィーの場合)または樹脂(カラムクロマトグラフィーの場合)と呼ばれるビーズ状の固定相からなっており、移動相はこの固定相の中を通過します。分子は、その化学的性質によって、異なる速度で固定相の中を通過します。

### <一般的なタイプのクロマトグラフィー>

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、ゲル濾過クロマトグラフィーとも呼ばれており、小さな穴のあいた細かいビーズがカラムに充填されます。分子の混合物を液体に溶解し、多孔性ビーズを入れたクロマトグラフィー用カラムに流すと、巨大な分子はビーズのまわりをすり抜けて速やかに通過し、小さな分子はビーズにある小さな穴の中に入り込んでカラムの中をゆっくりと通過します。物質によっては、その大きさのみに基づいて分離され、分離された物質を含む分画を採集することが可能となります。

アフィニティークロマトグラフィー では、精製対象となるタンパク質と結合する生体分子(抗体であることが多い)がすでに結合したビーズを使用します。タンパク質混合物をカラムに加えると、対象となるタンパク質以外のすべての物質はカラムを通過しますが、精製対象となるタンパク質は抗体と結合し、ビーズに保持されます。カラムからタンパク質を溶出させて採集するためには、別のバッファーを用いて、対象となるタンパク質と抗体との間の結合を切り離します。多くの場合この溶出バッファーには高濃度の塩または酸が含まれています。

イオン交換クロマトグラフィー では、カラム中のビーズが電荷(+または-)をもっています。タンパク質混合物をカラムに加えると、対象となるタンパク質以外のすべての物質はカラムを通過します。そのため、対象となるタンパク質と逆の電荷を有するビーズが選ばれるのです。ビーズが正の電荷を有している場合には、負の電荷を持つタンパク質と結合します。この手法は、陰イオン交換法と呼ばれます。ビーズが負の電荷を有している場合には、正の電荷を持つ分子と結合します(陽イオン交換法)。したがって、使用するレジンは、対象となるタンパク質の性質に基づいて選択されます。クロマトグラフィー中、タンパク質は逆の電荷を持つビーズと結合します。対象となるタンパク質からその他の物質を分離した後、高塩濃度バッファーを用いて、希望のタンパク質をカラムから溶出させて採集します。

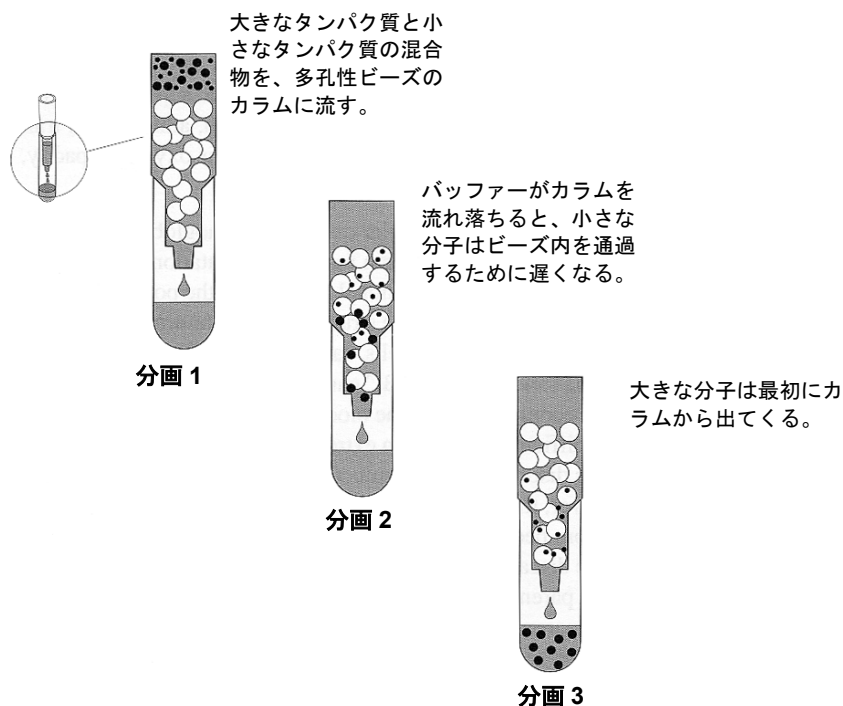
本キットを用いた実験は、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) の基本原理を習得させるようにデザインされています。本キットでは、SEC の原理を明らかにするために、有色分子であるヘモグロビンとビタミン B12 を使用しています。ヘモグロビン(赤褐色)はビタミン B12(桃色)に比べて大きく、そのため、ビタミン B12 よりも速やかにカラムを通過します。学生は、これらの分子がカラムからコレクションチューブへと通過してゆく段階で、これらの分子の分離を容易に目で確かめることができます。

## ＜サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) の原理＞

カラム内に入れられたビーズ集団は、カラムベッドと呼ばれます。ビーズはふるいとして働き、ビーズの穴に小さな分子を一時的に取り込んで濾過する機能をもっています。大きな分子はビーズを迂回する、つまり、ビーズから「排除」されます。本キットには、分子量 60,000 ダルトン未満の分子を効率的に分離(分画)するビーズがあらかじめ充填された 8 本のカラムが含まれています。溶液をカラムに流し込むと、分子量 60,000 ダルトン未満の分子はビーズの中に入り込み、カラム内をゆっくりと通過します。分子が小さいほど、カラム内での移動速度は遅くなります。分子量 60,000 以上の分子はビーズのまわりをすり抜けて、カラムから排除されます。この値は、カラムの排除限界とも呼ばれます。

移動相を作る際に生体分子の溶解に利用される液体は通常、緩衝液(バッファー)と呼ばれます。バッファーに溶解した生体分子混合液を、サンプルと呼びます。サンプルをカラムベッドの上に置くと、バッファー中の生体分子がカラムベッドの上部に入り込み、多孔性ビーズで濾過またはビーズを迂回して通過し、最終的にカラム底部の小さな開口部から流れ出ます。この過程を完了させるために、サンプルがカラムベッドに入り込んだ後に、カラムベッドの上にバッファーを追加します。滴下してくる液体移動相は、時間ごとに順番にコレクションチューブ内に採集します。通常、それぞれのチューブには一定滴数の液体を採集します。カラムを速やかに通過する巨大分子は、最初のほうのチューブ(分画)で採集が完了します。ビーズの穴の中を通過する小さな分子は、終わりのほうの分画で採集されます。

今回の実験で分画を行う 2 種類の分子は、ヘモグロビンとビタミン B12 です。ヘモグロビンは分子量 65,000 ダルトンで、そのため、カラムから排除されます。ヘモグロビンはカラムを速やかに通過し、最初の方のコレクションチューブ、すなわち分画に出現します。ビタミン B12 分子は分子量 1,350 ダルトンと比較的小さいため、ビーズの穴の中を通過し、一時的に穴の中に取り込まれます。その結果、この分子はカラム内をきわめてゆっくりと通過し、終わりのほうの分画に出現します。以下の図に、サイズ排除クロマトグラフィーでの大きな分子と小さな分子の異なる分画様式を示します。





## <サンプルヘモグロビンおよびビタミン B12 について>

### ・ヘモグロビン

ヘモグロビンは赤血球中に存在するであり、体内組織に酸素を運搬する機能を持ちます。今回の実験で使用するヘモグロビンは、ウシヘモグロビンです。ウシヘモグロビンを使用することにより(ヒトのヘモグロビンを使用した場合に比べて)、ヒト血液製剤で認められるような潜在的な健康上の危険を回避することができます。ヘモグロビンは4つのポリペプチド(小さなタンパク質)からなっており、これが4つ合わさって、球状タンパク質を形成しています。ヘモグロビンの名称は、ヘモグロビンの鉄含有成分であるヘム基に由来しており、このヘム基が酸素と物理的に結合します。ヘモグロビンが赤褐色をしているのは、この鉄含有ヘム基のためです。良く似たタンパク質であるミオグロビンは、筋肉内に認められ、筋肉組織に酸素を供給する役割をしています。きわめて活動性が高く大量の酸素を必要とする筋肉は、ミオグロビン含量が高いために褐色をしています。例として、鶏肉のモモの部分の部分が赤褐色をしていることがあげられます。

ヘモグロビンは、身体の酸素運搬細胞である赤血球の主要成分です。赤血球もやはり、ヘモグロビンのヘム基により特徴的な赤色となっています。私達の体内では、様々な成長段階において、若干異なる性質を持つヘモグロビンが産生されています。胎児では、成人のヘモグロビンよりも酸素との親和性が高い(強固に結合する)ヘモグロビンが産生されます。胎児は酸素の供給を母体に依存しているため、母体のヘモグロビンから胎児のヘモグロビンに容易に酸素が供与される必要があります。そのため、産科医は両親に、妊娠中は激しい運動を控えるようにとアドバイスします。激しい運動は組織中の酸素を欠乏させ、そのため、母体組織と胎児ヘモグロビンとの間での酸素のやりとりで競合が生じてしまうからです。

ヘモグロビンは、酸素の他に一酸化炭素とも結合します。実際には、ヘモグロビンは酸素よりも一酸化炭素に対して高い親和性をもっています。一酸化炭素中毒は、ヘモグロビンと結合している酸素が一酸化炭素に置き換えられて、ヘム基の鉄イオンと強く結合してしまうため、組織に酸素が運搬されなくなり、酸素不足になってしまう症状です。

組織への大量の酸素供給を必要とする環境におかれると、身体は環境の変化に適応します。高度が高い場所に行くと空気中の酸素量が減少するため、身体は大量の赤血球を産生することによって対応します。これにより、血流中のヘモグロビン分子数が効率良く増加し、組織への酸素供給量の増加が効率的になります。こうした理由から、運動選手は赤血球の量を増加させるために高地でトレーニングを行い、激しい運動に必要な酸素運搬能を増大させるのです。

鎌状赤血球性貧血は、ヘモグロビンの分子病です。ヘモグロビンをコードしている遺伝子が独特の変化または突然変異をすると、アミノ酸配列に突然変異が生じます。この突然変異によりヘモグロビンの3次元構造が変化すると、ヘモグロビンは「団結」して、棒状構造になります。この棒状の異常なヘモグロビン分子群は、赤血球の形態を歪めて鎌状にします。円形の赤血球とは異なり、この鎌状の赤血球は毛細血管床を自由に通過することができず、毛細血管床をふさいでしまいます。臓器および組織の毛細血管床がふさがれると酸素の供給が困難となり、著しい疲労感を生じたり死に至ることすらあります。鎌状赤血球性貧血は突然変異した遺伝子配列によって生ずる遺伝病であるため、現在のところ治療法はありません。しかし、鎌状赤血球性貧血は、正常なヘモグロビンと正常な赤血球を有する人から頻りに輸血をすることによって軽減させることができます。鎌状赤血球性貧血は、欠陥突然変異ヘモグロビン遺伝子を両親から受け継いでいる患者で生ずる遺伝病です。鎌状赤血球形成傾向を示す人物は、両親の一方から変異の入った遺伝子を受け継いでおり、実際にはこの一方からだけの欠陥の遺伝は、進化による利点を示すものなのです。アフリカでは、鎌状赤血球遺伝子の発現率とマラリア感染率が正の相関関係を示しています。マラリアは蚊が媒介する寄生虫によって引き起こされる致死性の疾患です。この寄生虫は赤血球に感染し、最終的に赤血球を破壊します。この寄生虫は正常な赤血球には感染できますが、鎌状赤血球には感染できません。そのため、鎌状赤血球形成傾向があれば、マラリアに対する抵抗性が獲得でき、環境適応できるのです。残念ながら、遺伝子コピーが二つとも発現した場合には、有害となります。

- ・ ビタミン B12

ビタミン B12 は、ヒトなどの脊椎動物に必要不可欠なビタミンです。ビタミン B12 の機能の一つに、脂肪の分解があります。ビタミン B12 を豊富に含むものとして、卵、乳製品、肉などがあります。ビタミン B12 は、野菜などの植物には含まれていません。そのため、厳密な菜食をしている人々では、ある種のビタミン補給剤を摂取していない限り、ビタミン B12 欠乏症となることが多いのです。

ビタミン B12 の分子はそれだけでは腸管からは吸収されません。ビタミン B12 は腸管でキャリアタンパク質と結合する必要があります。ビタミン B12 がキャリアタンパク質と結合すると、この複合体が腸管を通過して血流中に入り込み、最終的に肝臓に取り込まれます。

ビタミン B12 の必要量はごくわずかであるため(ヒトでの必要量は約 3 $\mu$ g/日)、ビタミン B12 欠乏症が生ずることはごくまれです。しかし、キャリアタンパク質をコードしている遺伝子に突然変異を生じている遺伝病患者もいます。こうした突然変異を生じている患者では、血流中への吸収に必要なキャリアタンパク質が生合成されません。そのため、こうした患者では十分な量のビタミン B12 を摂取しても、必要なキャリアタンパク質がないために欠乏症の症状を示すのです。

## 実験開始前の準備

### <実験直前に準備すべき試薬・器具のチェックリスト>

#### ・各生徒に準備する実験試薬・器具

実験を始める前に、実験を行う生徒や学生達のために、次のリストにあるものをすべて用意します。リストは1班当たりに必要なものです。このキットには最高、8班×4人=32人の生徒が実験できる分量が揃っています。あらかじめ1つの班の実験スペースに置いておくと良いでしょう。また、マイクロチューブには、間違いのないようにマーキングをしっかりとしておくことをお勧めします。

#### ・共有で使用する実験試薬・器具

生徒達が共有して使用する試薬や器具を準備します。これらのものは、先生が使用する実験スペースに置くと良いでしょう。

学生用実験台用	必要数	(√)
コレクションチューブ	12本	<input type="checkbox"/>
サイズ排除クロマトグラフィーカラム	1本	<input type="checkbox"/>
カラムエンドキャップ	1個	<input type="checkbox"/>
ピペット	1本	<input type="checkbox"/>
油性マーカー	1本	<input type="checkbox"/>
チューブ立て	1個	<input type="checkbox"/>
教員用実験台	必要数	(√)
タンパク質混合液	1バイアル	<input type="checkbox"/>
カラムバッファー	1本	<input type="checkbox"/>

### <各ステップの詳細な手順>

ここでは実験に先立って行った方が良いと思われる事前準備について説明します。これらの操作は実験の1~2日前に先生が行うか、あるいは各学生グループが授業時間の中で行うとよいでしょう。

- 目的**
- タンパク質混合物を溶解する
  - 学生用実験台および教員用実験台をセットする
  - 生徒用マニュアルをコピーする

**必要時間** 20分~1時間

#### 手順

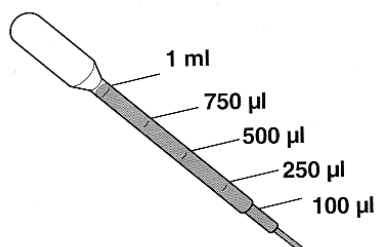
実験開始の約15分前に、キットに含まれているピペットのうちの1本を用いて、0.5mlの蒸留水をタンパク質混合液のバイアルに入れ、緩やかに混和したら15分間おきます。その後、実験開始時まで氷浴上または冷蔵庫内で保管します。

## このキットで行う実験のポイント

ここでは、実験の準備および実施の詳細およびこれらに役立つポイントを記載します。

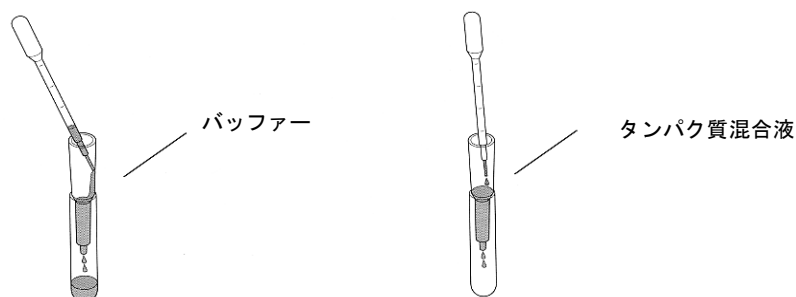
### <ピペットの取り扱い>

実際の実験を始める前に、ピペットの使用方法を完全に習得させてください。ピペットを使用して 100  $\mu\text{l}$ 、250  $\mu\text{l}$  と計り取ることも多くありますので、その量を測り取る練習をしておくとい良いでしょう。



### <クロマトグラフィー>

カラムベッド上部を乱さないようにすることが非常に重要です。カラムベッドにサンプルまたはバッファーをローディングする際には、ピペットをカラム壁にそってカラムベッドの近くまで差し込みます。カラム壁にそって(バッファーの場合)またはカラムベッドの上端(タンパク質混合液の場合)に、ピペットからゆっくりと溶液を出します。



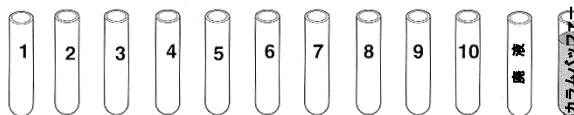
### ・クロマトグラフィー成功のための重要なポイント

1. あらかじめ充填されているカラムから底部のつまみをはずすときには、回さずに折り取り外すこと。
2. カラムはコレクションチューブに軽く置く程度にセットしてください。コレクションチューブにカラムを固く押し込むと、空気が閉じ込められて、サンプルが流れなくなります。
3. カラムはゆっくりと溶液が流れ落ちるようにデザインされています。クロマトグラフィーの全手順には 20～30 分かかるでしょう。カラムの移動はカラムベッドの乱れの大きな原因となるため、コレクションチューブの交換時に必要なとき以外は、カラムを動かさないようにすることが重要です。

## クイックガイド

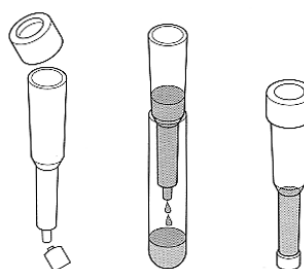
1. 12本のコレクションチューブを準備し、10本には1～10までの番号を順に付けます。

最後の2本には、「廃液」および「カラムバッファー」の表示をつけます。



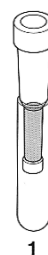
きれいなピペットを用いて、4mlのカラムバッファーを「カラムバッファー」と表示したチューブに移します。

1. サイズ排除用カラムの上部キャップと、末端のつまみを取り外します。全バッファーを廃液用コレクションチューブに流し込みます。



カラムベッドの上部を観察し、すべてのバッファーがカラム内部に入り込んだことを確認します。カラムを直接覗き込むと、カラム基質が「ざらざら」とした外観になっているはずです。カラムの底部にキャップをはめます。

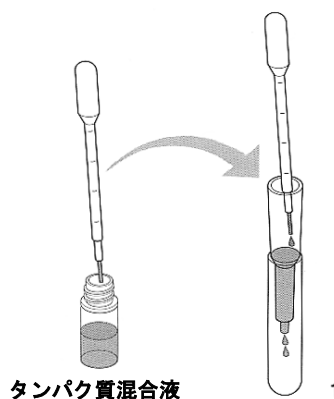
3. カラムを慎重にチューブ1に立てます。これで、カラムにタンパク質サンプルを流し込む準備が整います。



1

4. タンパク質混合液を流し込む準備が整ったら、カラムのキャップをはずします。カラムベッドが乾燥するまでバッファーを流出させないために、準備が整った段階でエンドキャップをはずしてください。

ピペットを用いて、1滴のタンパク質混合液をカラムベッドの上部に加えます。ピペットをカラムベッド上部まで差し込み、カラムベッドが乱れないようにそっと、カラムベッドの真上に1滴を流し入れます。



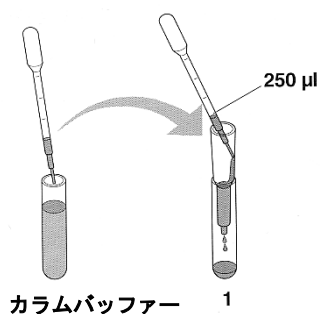
タンパク質混合液

1

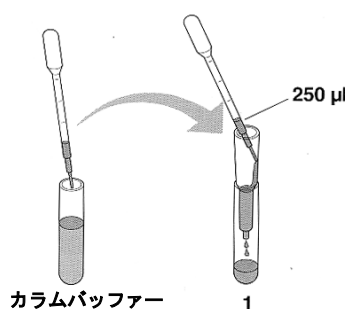
5. タンパク質混合液がカラムベッドに入り込んだらすぐに、カラムの上端に 250 $\mu$ l のカラムバッファーを慎重に加えます。これは、ピペットの先端をカラムに差し込み、先端がカラムの真上に静止するようにして行います。

バッファーがカラム側壁からカラムベッドの上端に流れ落ちるよう、慎重に流し込みます。(注意:カラムベッドを乱すと、サイズ分画をうまく行うことができません。)

チューブ 1 を用いて、流出してきた溶液の採集を開始します。

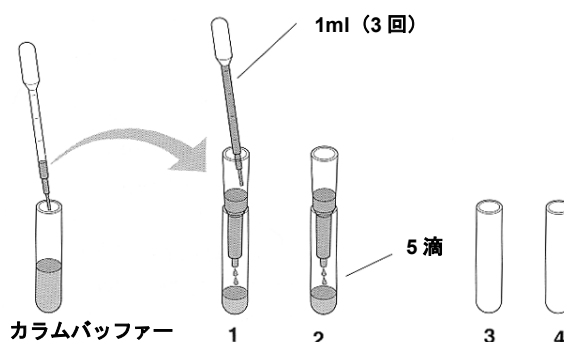


6. さらに 250 $\mu$ l のカラムバッファーをカラム上端に加えます。ピペットをカラム上端の真上に差し込み、カラムの側壁からバッファーが流れ落ちるようにして、前回と同様にバッファーを加えます。チューブ 1 への溶液の採集を続けます。



7. カラムベッドの上端に 3ml のカラムバッファーを加えます。これは、ピペットを用いて 1ml を 3 回加えることにより行います。この時点では、タンパク質混合液はカラムにかなり入り込んでいるため、カラムベッドのわずかな乱れは、分離には影響を及ぼしません。

カラムをチューブ 2 に移し、それぞれのチューブ内に流れ落ちる溶液の滴下数を数え始めます。チューブ 2 には 5 滴を採集します。

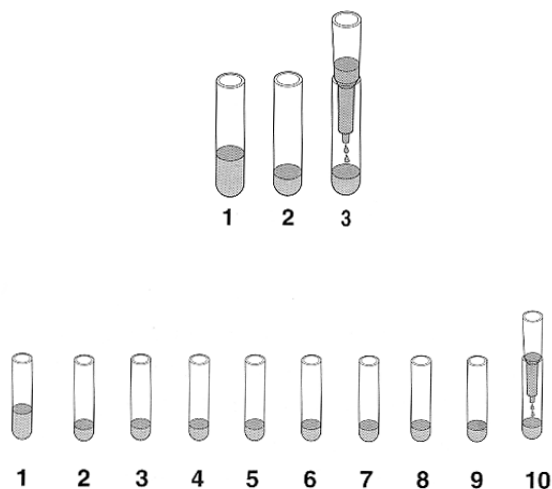


8. チューブ 2 に 5 滴が採集されたら、カラムをチューブ 3 に移します。それぞれのコレクションチューブに 5 滴を採集します。

1 本のチューブに 5 滴が採集されたら、カラムをそのチューブから次のチューブに移します。

9. 各チューブへの 5 滴の採集を継続します。チューブ 10 に到達したら、合計 10 滴を採集します。

カラムにキャップをし、コレクションチューブをラップで覆い、次回の授業まで冷蔵庫内で保管します。それぞれのコレクションチューブ内の溶液の色などを記録に残しておいてください。



## 学生・生徒用テキスト

◆Lesson 1 クロマトグラフィーについて.....	13
学習 1 クロマトグラフィーについて .....	13
◆Lesson 1 質問 1 .....	15
<学習 2 サンプルについて> .....	16
◆Lesson 1 質問 2 .....	18
◆Lesson 2 クロマトグラフィー実験.....	19
実験プロトコール.....	20
◆Lesson 3 実験結果の分析 .....	23
<質問> .....	23

## ◆Lesson 1 クロマトグラフィーについて

### 学習 1 クロマトグラフィーについて

クロマトグラフィーは、例えば、医薬品等に用いられる生体分子を始めとしたいろいろな物質を単離・精製するために広く利用されています。クロマトグラフィーにより、複雑な混合物から個々の成分が分離されます。クロマトグラフィーは、移動相(溶媒および分離対象となる分子)と、紙(ペーパークロマトグラフィーの場合)または樹脂(カラムクロマトグラフィーの場合)と呼ばれるビーズ状の固定相からなっており、移動相はこの固定相の中を通過します。分子は、その化学的性質によって、異なる速度で固定相の中を通過します。

#### <一般的なタイプのクロマトグラフィー>

**ゲル濾過クロマトグラフィー**は、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)とも呼ばれており、小さな穴のあいた細かいビーズがカラムに充填されます。分子の混合物を液体に溶解し、多孔性ビーズを入れたクロマトグラフィー用カラムに流すと、巨大な分子はビーズのまわりをすり抜けて速やかに通過し、小さな分子はビーズにある小さな穴の中に入り込んでカラムの中をゆっくりと通過します。物質によっては、その大きさのみに基づいて分離され、分離された物質を含む分画を採集することが可能となります。

**アフィニティークロマトグラフィー**では、精製対象となるタンパク質と結合する生体分子(抗体であることが多い)をあらかじめ結合したビーズを使用します。タンパク質混合物をカラムに加えると、対象となるタンパク質以外のすべての物質はカラムを通過しますが、精製対象となるタンパク質は抗体等と結合し、ビーズに保持されます。カラムからタンパク質を溶出させて採集するためには、別のバッファーを用いて、対象となるタンパク質と抗体との間の結合を切り離します。多くの場合この溶出バッファーには高濃度の塩または酸が含まれています。

**イオン交換クロマトグラフィー**では、カラム中のビーズが電荷(+または-)をもっています。タンパク質混合物をカラムに加えると、対象となるタンパク質以外のすべての物質はカラムを通過します。そのため、対象となるタンパク質と逆の電荷を有するビーズが選ばれるのです。ビーズが正の電荷を有している場合には、負の電荷を持つタンパク質と結合します。この手法は、陰イオン交換法と呼ばれます。ビーズが負の電荷を有している場合には、正の電荷を持つ分子と結合します(陽イオン交換法)。したがって、使用する樹脂は、対象となるタンパク質の性質に基づいて選択されます。このような原理に基づいて、クロマトグラフィーによりタンパク質は逆の電荷を持つビーズと結合します。対象となるタンパク質からその他の物質を分離した後、高塩濃度バッファーを用いて、希望のタンパク質をカラムから溶出させて採集します。

本キットを用いた実験は、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)の基本原理を習得させるようにデザインされています。本キットでは、SECの原理を明らかにするために、有色分子であるヘモグロビンとビタミン B12 を使用しています。ヘモグロビン(赤褐色)はビタミン B12(桃色)に比べて大きく、そのため、ビタミン B12 よりも速やかにカラムを通過します。学生は、これらの分子がカラムからコレクションチューブへと通過してゆく段階で、これらの分子の分離を容易に目で確かめることができます。

#### <サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)の原理>

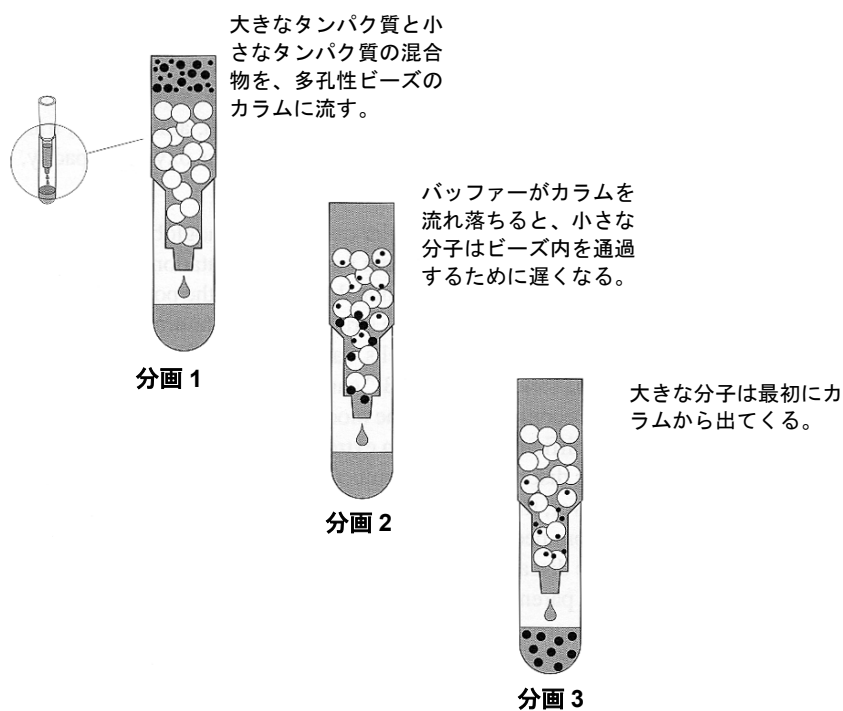
カラム内に入れられたビーズは、カラムベッドと呼ばれます。ビーズは篩として働き、ビーズの穴に小さな分子を一時的に取り込んで濾過する機能をもっています。大きな分子はビーズを迂回する、つまり、ビーズから「排除」されます。本キットには、分子量 60,000 ダルトン未満の分子を効率的に分離(分画)するビーズがあらかじめ充填された 8 本のカラムが含まれています。溶液をカラムに流し込むと、分子量 60,000 ダルトン未満の分子はビーズの中に入り込み、カラム内をゆっくりと通過します。分子が小さいほど、カラム内での移動速度は遅くなります。分子量 60,000 以上の分子はビーズのまわりをすり抜けて、カラムから排除されます。この値は、カラムの排除限界とも呼ばれます。

移動相を作る際に生体分子の溶解に利用される液体は通常、緩衝液(バッファー)と呼ばれます。バッ



ブッファに溶解した生体分子混合液を、サンプルと呼びます。サンプルをカラムベッドの上に置くと、ブッファ中の生体分子がカラムベッドの上部に入り込み、多孔性ビーズで濾過またはビーズを迂回して通過し、最終的にカラム底部の小さな開口部から流れ出ます。この過程を完了させるために、サンプルがカラムベッドに入り込んだ後に、カラムベッドの上にブッファを追加します。滴下してくる液体移動相は、時間ごとに順番にコレクションチューブ内に採集します。通常、それぞれのチューブには一定滴数の液体を採集します。カラムを速やかに通過する巨大分子は、最初のほうのチューブ(分画)で採集が完了します。ビーズの穴の中を通過する小さな分子は、終わりのほうの分画で採集されます。

今回の実験で分画を行う 2 種類の分子は、ヘモグロビンとビタミン B12 です。ヘモグロビンは分子量 65,000 ダルトンで、そのため、カラムから排除されます。ヘモグロビンはカラムを速やかに通過し、最初の方のコレクションチューブ、すなわち分画に出現します。ビタミン B12 分子は分子量 1,350 ダルトンと比較的小さいため、ビーズの穴の中を通過し、一時的に穴の中に取り込まれます。その結果、この分子はカラム内をきわめてゆっくりと通過し、終わりのほうの分画に出現します。以下の図に、サイズ排除クロマトグラフィーでの大きな分子と小さな分子の異なる分画様式を示します。



◆Lesson 1 質問 1

1a. 最も一般的に利用されているカラムクロマトグラフィーの手法を 3 つ挙げてください。

1b. 上記で述べたクロマトグラフィー法はそれぞれどのような分子の性質を利用した手法ですか？簡単に説明してください。

2. 今回の実験ではどのようなタイプのクロマトグラフィー法を利用することになっていますか。

3. 以下の分子の混合物をサイズ排除クロマトグラフィーにより精製する場合、カラム底部の開口部を通過する順番に分子を並べてください。

混合物に含まれているもの: ヘモグロビン、分子量 65,000 ダルトン; ミオグロビン、分子量 17,000 ダルトン; ミオシン、分子量 180,000 ダルトン

最初に出現する分子:

2 番目に出現する分子:

3 番目に出現する分子:

4a. サイズ排除クロマトグラフィーカラムの排除限界が 40,000 ダルトンである場合、ヘモグロビン(分子量 60,000 ダルトン)を分画またはカラムから排除することができますか。

4b. ビタミン B12(分子量 1,350 ダルトン)を分画またはカラムから排除することができますか。

## <学習 2 サンプルについて>

### <ヘモグロビン>

ヘモグロビンは赤血球中に存在するであり、体内組織に酸素を運搬する機能を持ちます。今回の実験で使用するヘモグロビンは、ウシヘモグロビンです。ウシヘモグロビンを使用することにより(ヒトのヘモグロビンを使用した場合に比べて)、ヒト血液製剤で認められるような潜在的な健康上の危険を回避することができます。ヘモグロビンは4つのポリペプチド(小さなタンパク質)からなっており、これが4つ合わさって、球状タンパク質を形成しています。ヘモグロビンの名称は、ヘモグロビンの鉄含有成分であるヘム基に由来しており、このヘム基が酸素と物理的に結合します。ヘモグロビンが赤褐色をしているのは、この鉄含有ヘム基のためです。良く似たタンパク質であるミオグロビンは、筋肉内に認められ、筋肉組織に酸素を供給する役割をしています。きわめて活動性が高く大量の酸素を必要とする筋肉は、ミオグロビン含量が高いために褐色をしています。例として、鶏肉のモモの部分が赤褐色をしていることがあげられます。

ヘモグロビンは、身体の酸素運搬細胞である赤血球の主要成分です。赤血球もやはり、ヘモグロビンのヘム基により特徴的な赤色となっています。私達の体内では、様々な成長段階において、若干異なる性質を持つヘモグロビンが産生されています。胎児では、成人のヘモグロビンよりも酸素との親和性が高い(強固に結合する)ヘモグロビンが産生されます。胎児は酸素の供給を母体に依存しているため、母体のヘモグロビンから胎児のヘモグロビンに容易に酸素が供与される必要があります。そのため、産科医は両親に、妊娠中は激しい運動を控えるようにとアドバイスします。激しい運動は組織中の酸素を欠乏させ、そのため、母体組織と胎児ヘモグロビンとの間での酸素のやりとりで競合が生じてしまうからです。

ヘモグロビンは、酸素の他に一酸化炭素とも結合します。実際には、ヘモグロビンは酸素よりも一酸化炭素に対して高い親和性をもっています。一酸化炭素中毒は、ヘモグロビンと結合している酸素が一酸化炭素に置き換えられて、ヘム基の鉄イオンと強く結合してしまうため、組織に酸素が運搬されなくなり、酸素不足になってしまう症状です。

組織への大量の酸素供給を必要とする環境におかれると、身体は環境の変化に適応します。高度が高い場所に行くと空気中の酸素量が減少するため、身体は大量の赤血球を産生することによって対応します。これにより、血流中のヘモグロビン分子数が効率良く増加し、組織への酸素供給量の増加が効率的になります。こうした理由から、運動選手は赤血球の量を増加させるために高地でトレーニングを行い、激しい運動に必要な酸素運搬能を増大させるのです。

鎌状赤血球性貧血は、ヘモグロビンの分子病です。ヘモグロビンをコードしている遺伝子が独特の変化または突然変異をすると、アミノ酸配列に突然変異が生じます。この突然変異によりヘモグロビンの3次元構造が変化すると、ヘモグロビンは「団結」して、棒状構造になります。この棒状の異常なヘモグロビン分子群は、赤血球の形態を歪めて鎌状となります。円形の赤血球とは異なり、この鎌状の赤血球は毛細血管床を自由に通過することができず、毛細血管床をふさいでしまいます。臓器および組織の毛細血管床がふさがれると酸素の供給が困難となり、著しい疲労感を生じたり死に至ることすらあります。鎌状赤血球性貧血は突然変異した遺伝子配列によって生ずる遺伝病であるため、現在のところ治療法はありません。しかし、鎌状赤血球性貧血は、正常なヘモグロビンと正常な赤血球を有する人から頻りに輸血をすることによって軽減させることができます。鎌状赤血球性貧血は、欠陥突然変異ヘモグロビン遺伝子を両親から受け継いでいる患者で生ずる遺伝病です。鎌状赤血球形成傾向を示す人物は、両親の一方から変異の入った遺伝子を受け継いでおり、実際にはこの一方からだけの欠陥の遺伝は、進化による利点を示すものなのです。アフリカでは、鎌状赤血球遺伝子の発現率とマラリア感染率が正の相関関係を示しています。マラリアは蚊が媒介する寄生虫によって引き起こされる致死性の疾患です。この寄生虫は赤血球に感染し、最終的に赤血球を破壊します。この寄生虫は正常な赤血球には感染できませんが、鎌状赤血球には感染できません。そのため、鎌状赤血球形成傾向があれば、マラリアに対する抵抗性が獲得でき、環境適応できるのです。残念ながら、遺伝子コピーが二つとも発現した場合には、有害となります。

## <ビタミン B12>

ビタミン B12 は、ヒトなどの脊椎動物に必要不可欠なビタミンです。ビタミン B12 の機能の一つに、脂肪の分解があります。ビタミン B12 を豊富に含むものとして、卵、乳製品、肉などがあります。ビタミン B12 は、野菜などの植物には含まれていません。そのため、厳密な菜食をしている人々では、ある種のビタミン補給剤を摂取していない限り、ビタミン B12 欠乏症となることが多いのです。

ビタミン B12 の分子はそれだけでは腸管からは吸収されません。ビタミン B12 は腸管でキャリアタンパク質と結合する必要があります。ビタミン B12 がキャリアタンパク質と結合すると、この複合体が腸管を通過して血流中に入り込み、最終的に肝臓に取り込まれます。

ビタミン B12 の必要量はごくわずかであるため(ヒトでの必要量は約 3 $\mu$ g/日)、ビタミン B12 欠乏症が生ずることはごくまれです。しかし、キャリアタンパク質をコードしている遺伝子に突然変異を生じている遺伝病患者もいます。こうした突然変異を生じている患者では、血流中への吸収に必要なキャリアタンパク質が生合成されません。そのため、こうした患者では十分な量のビタミン B12 を摂取しても、必要なキャリアタンパク質がないために欠乏症の症状を示すのです。

◆Lesson 1 質問2

1. ヘモグロビンおよびミオグロビンが特徴的な色をしているのは、何によるものですか。
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
2. 運動選手が酸素運搬能を増大させることによって持久力を増大させようとする場合に、どのようなことをしますか。
  - 3a. ダチョウやシチメンチョウなどの飛べない鳥では、翼の部分と脚部のどちらのほうに褐色の肉が多く含まれていると予想されますか(褐色の肉にはミオグロビンが多い)。
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  - 3b. カモやタカなどの空を飛ぶ鳥ではどうですか。
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  - 4a. 欠陥遺伝子コピーを正常遺伝子と置き換える遺伝子治療は、鎌状赤血球性貧血患者の治療にどのように役立つと考えますか？
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  - 4b. 同様に、ビタミン B12 担体タンパク質欠乏患者に対して、遺伝子治療をどのように利用することができると思いますか？

## ◆Lesson 2 クロマトグラフィー実験

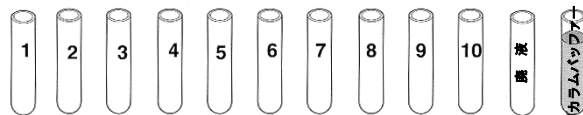
### <使用する試薬・器具の一覧>

実験を始める前に、次のリストにある試薬や器具等がそろっているかどうか確認してください。

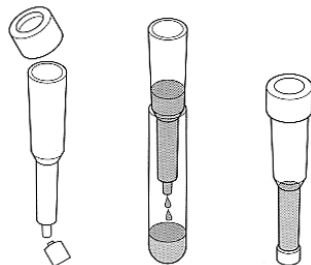
学生用実験台用	必要数	(√)
コレクションチューブ	12 本	<input type="checkbox"/>
サイズ排除クロマトグラフィーカラム	1 本	<input type="checkbox"/>
カラムエンドキャップ	1 個	<input type="checkbox"/>
ピペット	1 本	<input type="checkbox"/>
油性マーカー	1	<input type="checkbox"/>
チューブ立て	1	<input type="checkbox"/>
教員用実験台	必要数	(√)
タンパク質混合液	1 バイアル	<input type="checkbox"/>
カラムバッファー	1 本	<input type="checkbox"/>

## 実験プロトコール

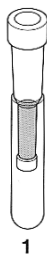
1. 12本のコレクションチューブをチューブ立てに立てます。10本のチューブには、1から10までの番号をつけます。最後の2本には、「廃液」および「カラムバッファー」の表示をつけます。
2. 4mlのカラムバッファーをカラムバッファーと表示したチューブにピペットで採集します。



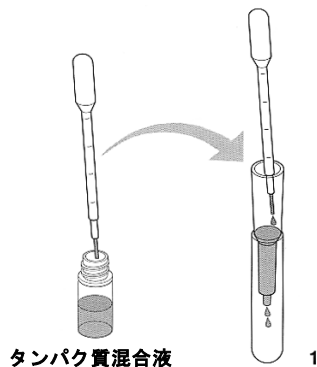
3. Poly-Prep サイズ排除用カラムの上部キャップと、末端のつまみを取り外します。バッファーを「廃液」コレクションチューブに流し込みます。このとき、カラムベッド上部を良く観察すると良いでしょう。バッファーがカラム上部から全てなくなると、上部表面がざらざらした状態に見えます。カラムの底部にカラムエンドキャップをはめます。



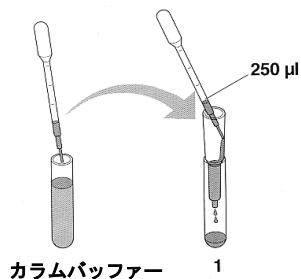
4. カラムをチューブ 1 に立てます。カラムをコレクションチューブに固く押し込むとバッファーが流れにくくなるので、軽く置く程度にしてください。この段階で、カラムにタンパク質サンプルを流し入れる準備が整います。



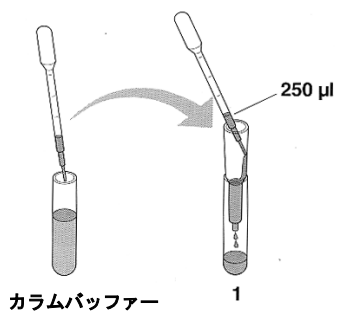
5. カラムからエンドキャップを取り外します。カラムベッドの上端に慎重にタンパク質混合液 1 滴を流し入れます。ピペットをカラムに差し込み、タンパク質サンプルを加えることによるカラムベッドが乱れないようにしながら、カラムベッドの真上に 1 滴をそっと置く様に流し入れます。



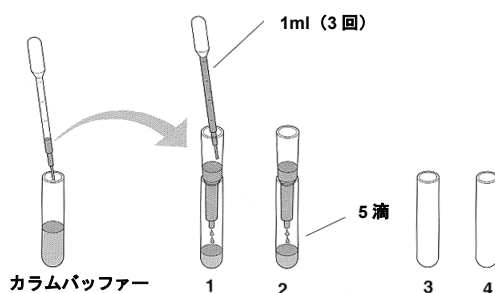
6. タンパク質混合液をカラムベッド内に入り込ませます。この時も、カラムベッド上部を良く観察すると良いでしょう。ついで、250 $\mu$ l のカラムバッファーをカラム上端に慎重に加えます。ピペットの先端をカラムに差し込み、先端がカラムの真上に静止するようにして行います。バッファーがカラム側壁からカラムベッドの上端に流れ落ちるよう、慎重に流し込みます。チューブ 1 を用いて、滴下の採集を開始します。



7. 全バッファーがカラムに流れ込んだ段階で、さらに 250 $\mu$ l のカラムバッファーをカラム上端に加えます。ピペットをカラム上端の真上に差し込み、カラムの側壁からバッファーが流れ落ちるようにして、前回と同様にバッファーを加えます。チューブ 1 への滴下の採集を継続します。

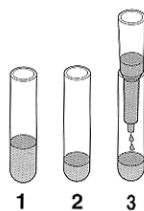


8. すべてのバッファーがカラムに流れ込んだ段階で、3ml のカラムバッファーをカラムの上端に加えます。これは、ピペットを用いて 1ml を 3 回加えることにより行います。この時点では、タンパク質混合液はカラムにかなり入り込んでいるため、カラムベッドのわずかな乱れは、分離には影響を及ぼしません。カラムをチューブ 2 に移し、チューブ内に流れ落ちる滴の滴下数。

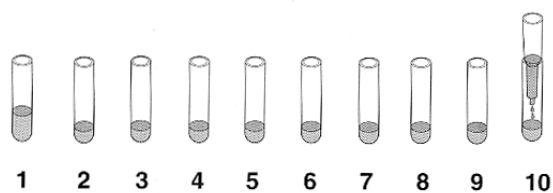




9. チューブ 2 に 5 滴が採集されたら、カラムをチューブ 3 に移します。それぞれのコレクションチューブに 5 滴を採集します。1 本のチューブに 5 滴が採集されたら、カラムをそのチューブから次のチューブに移します。



10. 各チューブへの 5 滴の採集を続けます。チューブ 10 には 10 滴を採集します。滴下の採集が終わったら、カラムにキャップをします。先生の指示にしたがって、サンプルおよびカラムを保管します。



### ◆Lesson 3 実験結果の分析

#### <質問>

1. カラムに流し入れる前のタンパク質混合液の色について考えてみましょう。タンパク質混合液はなぜ赤褐色をしていますか。
2. タンパク質混合液をカラムに流し入れる前に、カラムベッドの上端にバッファーがない状態にする必要があるのはなぜですか。
3. カラムにタンパク質混合液を流し込んだ後に、さらにバッファーを加える(プロトコールのステップ 7 および 8)必要があるのはなぜですか。
4. 採集した 10 本の分画を観察しましょう。  
どのチューブがヘモグロビンおよびビタミン B12 を最大に含んでいますか。最大分画には最も高い濃度のタンパク質/ビタミン濃度が含まれており、最も色調が強くなります。
5. ヘモグロビンとビタミン B12 のどちらの分子が先にカラムから流出しますか。その理由も述べてください。

## 付録 A 質問の回答例

### ◆Lesson 1 クロマトグラフィーについて

#### <学習 1 クロマトグラフィーについて>

1a. 最も一般的に利用されているカラムクロマトグラフィーの手法を 3 つ挙げてください。

アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーが一般的に使用されるクロマトグラフィー手法です。

1b. 上記で述べたクロマトグラフィー法はそれぞれどのような分子の性質を利用した手法ですか？簡単に説明してください。

アフィニティークロマトグラフィーの場合には、抗原を含む固相支持体での抗体の精製が含まれます(抗原抗体相互作用は、この授業内容に関するトピックスとなります)。さらに、基質を含有する固相支持体での酵素の精製も、アフィニティークロマトグラフィーの別の例となります(酵素-基質相互作用も別の講義用トピックスとなります)。

イオン交換クロマトグラフィーの場合には、等電点が著しく異なる 2 種類のタンパク質の分離があります。たとえば、pH7.2 ではリソソームは(+)に荷電していますが、アルブミンは(-)に荷電しています(等電点、タンパク質の電荷に対するアミノ酸の寄与、pH などの背景講義トピックスが含まれます)。

2. 今回の実験ではどのようなタイプのクロマトグラフィー法を利用することになっていますか。

今回の実験では、サイズ排除クロマトグラフィーを利用することになっています。

3. 以下の分子の混合物をサイズ排除クロマトグラフィーにより精製する場合、カラム底部の開口部を通過する順番に分子を並べてください。混合物に含まれているもの:ヘモグロビン、分子量 65,000 ダルトン;ミオグロビン、分子量 17,000 ダルトン;ミオシン、分子量 180,000 ダルトン

最初に出現する分子:ミオシン(分子量 180,000 ダルトン-最大)

2 番目に出現する分子:ヘモグロビン(分子量 65,000 ダルトン-中間)

3 番目に出現する分子:ミオグロビン(分子量 17,000 ダルトン-最小)

4a. サイズ排除クロマトグラフィーカラムの排除限界が 40,000 ダルトンである場合、ヘモグロビン(分子量 60,000 ダルトン)を分画またはカラムから排除することができますか。

ヘモグロビンはカラムから排除されます。ヘモグロビンはビーズの孔よりも大きいため、孔から排除され、カラムを速やかに通過します。

4b. ビタミン B12(分子量 1,350 ダルトン)を分画またはカラムから排除することができますか。

ビタミン B12 はカラムにより分画されます。ビタミン B12 の分子量は排除限界よりもかなり小さく、ビーズの孔を通過して濾過されます。

## <学習 2 サンプルについて>

1. ヘモグロビンおよびミオグロビンが特徴的な色をしているのは、何によるものですか。

これらの特徴的な赤色としているものは、ふたつの分子に含まれるヘム、すなわち、鉄含有基です。鉄剤または、鉄を含む赤土を思い浮かべてみましょう。

2. 運動選手が酸素運搬能を増大させることによって持久力を増大させようとする場合に、どのようなことをしますか。

ヘモグロビンを含有する赤血球は、組織に酸素を供給する役割を担っています。運動選手は赤血球数を増加させることによって酸素運搬能を増大させ、これによって、全身のヘモグロビン分子数を増大させることが可能です。高地でトレーニングを行うと、身体はより多くの赤血球を産生することにより空気中の酸素量の減少に応答し、ヘモグロビン分子数が増加します。さらに、一部の運動選手では血液ドーピングが報告されており、これは、血流中に赤血球を直接輸血するという方法です。これにより、赤血球濃度が上昇し、酸素運搬能が増大します。しかし、血液ドーピングでは赤血球濃度が高くなって血液が濃くなり、卒中や心発作を生ずることがあるため、きわめて危険です。

3a. ダチョウやシチメンチョウなどの飛べない鳥では、翼の部分と脚部のどちらのほうに褐色の肉が多く含まれていると予想されますか(褐色の肉にはミオグロビンが多い)。

脚部の方が褐色の肉が多い。活発な筋肉は、筋肉の活動に酸素を供給するミオグロビンを大量に必要とします。

3b. カモやタカなどの空を飛ぶ鳥ではどうですか。

翼の方が褐色の肉が多い。この場合には、翼の方が活動が活発であり、大量のミオグロビンを必要とします。

4a. 欠陥遺伝子コピーを正常遺伝子と置き換える遺伝子治療は、鎌状赤血球性貧血患者の治療にどのように役立つと考えますか。

遺伝子治療は、遺伝病に罹患した患者の体内に正常な遺伝子を入れる方法です。鎌状赤血球性貧血患者では、ヘモグロビンの遺伝子に欠陥があるため、欠陥遺伝子を正常な遺伝子と置き換えることによって、理論的には、鎌状赤血球性貧血を「治癒」させることが可能です。患者において、正常遺伝子は、通常はウイルスによって運搬される補助的遺伝子として含まれることになり、欠陥遺伝子を物理的に置き換えるものではないことに言及しておかなければなりません。

4b. 同様に、ビタミン B12 担体タンパク質欠乏患者に対して、遺伝子治療をどのように利用することができると思いますか。

同様に、担体タンパク質遺伝子に欠陥のある患者の体内に、担体タンパク質の正常遺伝子のコピーを入れるという遺伝子治療を利用することが可能です。

## ◆Lesson 2 質問

1. カラムに流し入れる前のタンパク質混合液の色について考えてみましょう。タンパク質混合液はなぜ赤褐色をしているのですか。

ヘモグロビンの鉄含有ヘム基が、この混合液の赤褐色の色調に大きく寄与しています。ビタミン B12 は暗桃色です。この両者の混合液は、暗赤褐色の溶液となります。

2. タンパク質混合液をカラムに流し入れる前にカラムベッドの上端にバッファーがない状態にする必要があるのはなぜですか。

分子がサイズ排除クロマトグラフィーカラムを通過するにつれて、わずかな拡散が自然に生じます。そのため、カラムには高濃度の生体分子溶液を流します。タンパク質混合液を流し込む前にカラムベッド上部のバッファーを全部流出させると、精製過程で生ずる拡散の量が全般的に少なくなります。

3. カラムにタンパク質混合液を流し込んだ後に、さらにバッファーを加える(プロトコールのステップ 7 および 8) 必要があるのはなぜですか。

ヘモグロビンとビタミン B12 の混合液を液相に保持するためには、タンパク質混合液を流し込んだ後にカラムにバッファーを追加する必要があります。このバッファーにより液相はカラム内を移動し、クロマトグラフィーによる分離手順が充分に行われることとなります。

4. 採集した 10 本の分画を観察しましょう。

a. どのチューブがヘモグロビンおよびビタミン B12 を「最大に」含んでいますか。最大分画には最も高い濃度のタンパク質/ビタミン濃度が含まれており、最も色調が強くなります。

最大分画は、学生グループごとにわずかに異なると思われます。最大分画は、拡散、サンプルの流し込み時のカラムベッドの拡散などにより影響を受けます。一般的に、ヘモグロビンの最大分画は、チューブ 3、4、5 に認められます。ビタミン B12 の最大分画は、チューブ 7、8、9 に認められるはずでしょう。

5. ヘモグロビンとビタミン B12 のどちらの分子が先にカラムから流出しますか。その理由も述べてください。

ヘモグロビンが最初のカラムから流出し、その後、ビタミン B12 が流出します。ヘモグロビン(分子量 65,000)はビタミン B12(分子量 1,350)に比べてかなり大きいため、そのため、サイズ排除クロマトグラフィーでは最初に溶出すると予想されます。

## 付録 B このキットに出てくる用語の解説

バイオテクノロジー	生存している生物に対して、生物が実際に行っている分子レベルでの生命活動を利用して有益な物質を産出できるように、主に遺伝子レベルでの操作を施すこと。
バッファー	クロマトグラフィーカラムに流し込む生体分子を溶解し、その状態を保つために使用する液体。
クロマトグラフィー	固形マトリックス入りのカラムに混合液を通すことによりタンパク質その他の混合液を分離する過程。マトリックスの性質を調節すると、ある種の分子をその他の分子から選択的に分離することができます。分子の性質には疎水性、分子の大きさ、および電荷などがあります。
カラム	小さな多孔性の球体またはビーズが密に充填されている、プラスチック製の円形シリンダー。
カラムベッド	クロマトグラフィーカラム内に充填されているビーズ集団。
排除限界	多孔性ビーズの孔内に侵入できない分子のサイズ下限。
分画	クロマトグラフィーカラムを通過した物質の含まれているチューブ。それぞれのクロマトグラフィー操作中には、複数のチューブまたは分画が採集される。大きな分子はカラムを速やかに通過するため、早い段階の分画で認められる。ビーズ内を通過する小さな分子は、遅い分画で認められる。
分画する	異なる大きさの分子を分離する能力。サイズ排除クロマトグラフィーでは、小さな分子は多孔性ビーズ内に入り込むことができるが、大きな分子は孔の中を通過できず、ビーズを迂回する。そのため、分子の大きさの差異により、複雑な混合物を分画、すなわち分離することができる。
サンプル	バッファーに溶解し、クロマトグラフィーカラムに流し込まれる、生体分子の混合物。



**バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社**

本社 〒116-0014 東京都品川区東品川 2-2-24

Tel : 03-6361-7000 Fax : 03-5463-8480

大阪 〒532-0025 大阪市淀川区新北野 1-14-11

Tel : 06-6308-6568 Fax : 06-6308-3064

福岡 〒812-0013 福岡市博多区博多駅東 2-5-28

Tel : 092-475-4856 Fax : 092-475-4858

**製品の学術的なお問い合わせ**

**修理・メンテナンスに関するお問い合わせは**

Tel : 03-6404-0331 Fax : 03-6404-0334

Mail : [life\\_ps.jp@bio-rad.com](mailto:life_ps.jp@bio-rad.com)

<http://explorer.bio-rad.co.jp/>

M4125 1303E