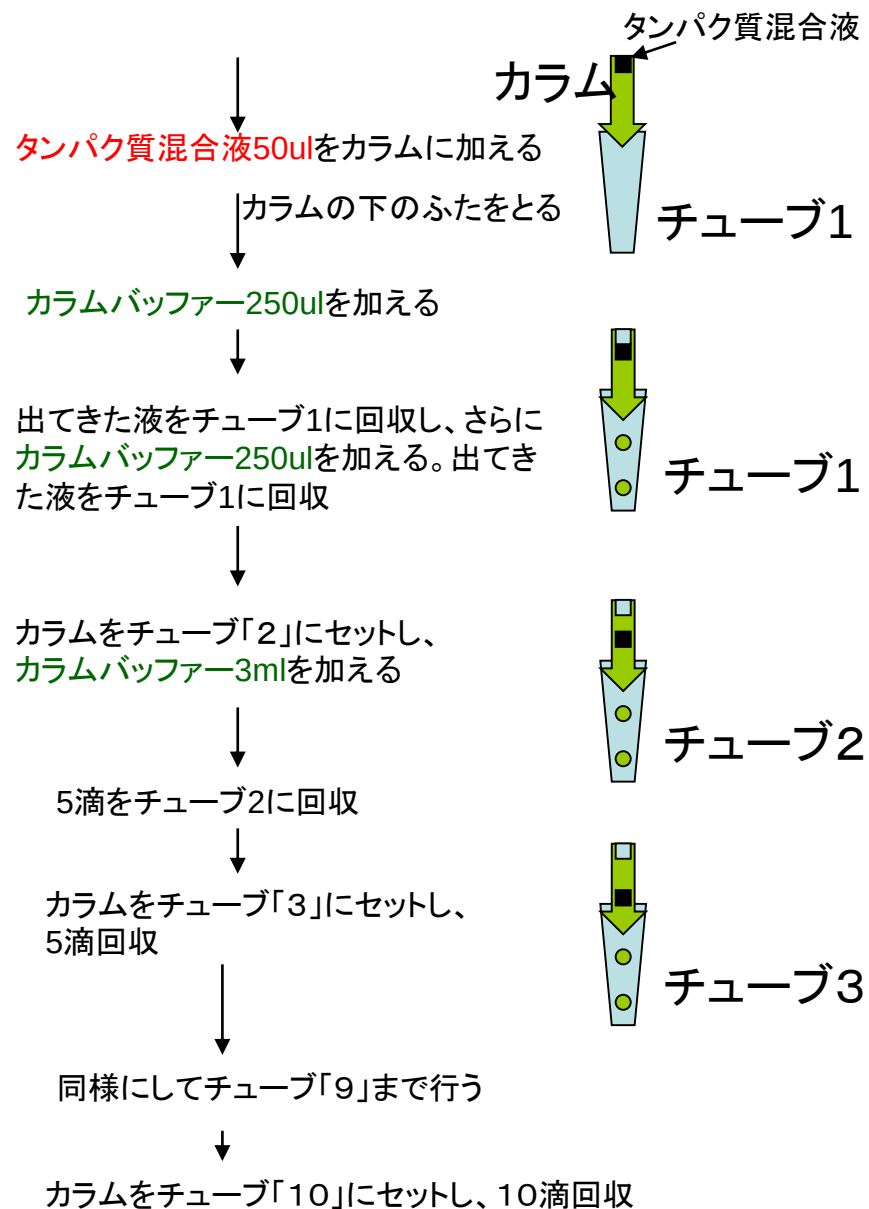
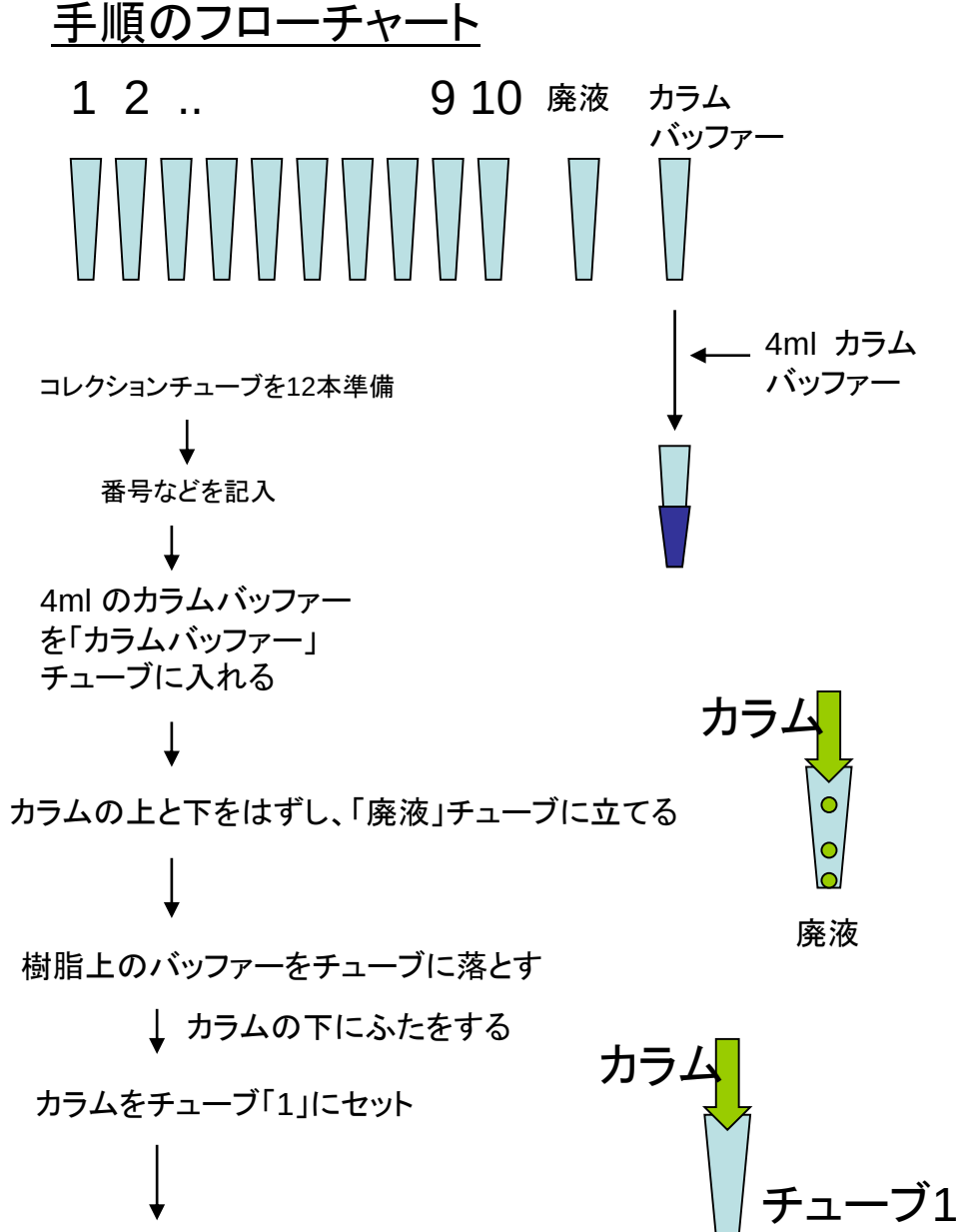
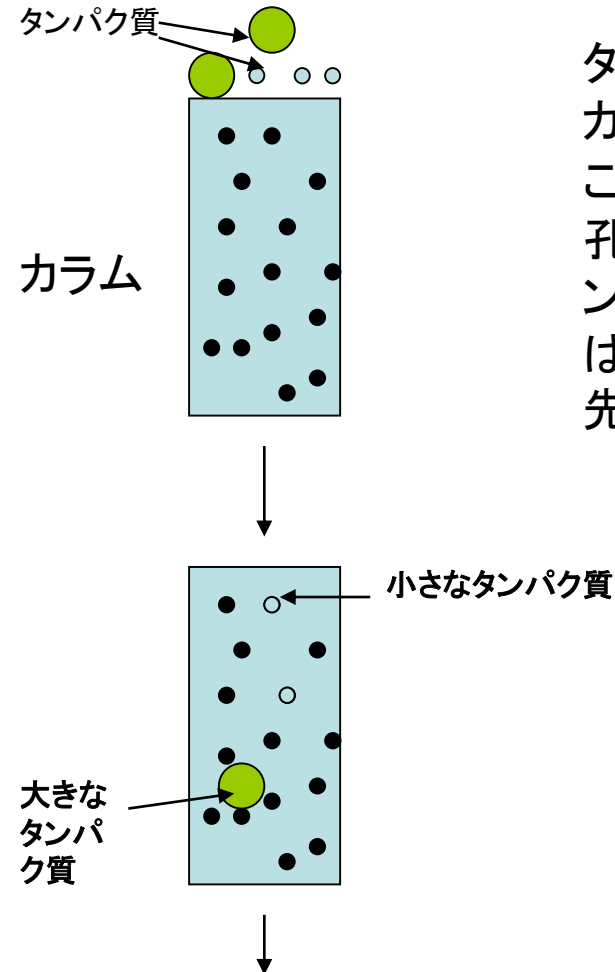


カラムクロマトグラフィーによる生体高分子の分画 佐藤高

手順のフローチャート



サイズ排除カラムクロマトグラフィー(ゲルろ過クロマトグラフィー)



タンパク質を分子量により分ける(分離する)方法。
カラム(筒)の中には多孔質のゲルが充填されている。
これにタンパク質溶液を流すと、分子量の小さなタンパク質は孔に入るが、分子量の大きなタンパク質は入らない。小さいタンパク質を孔から出すためには多くのバッファーを流さなくてはならない。従って、分子量の大きなタンパク質はカラムから先に出て、分子量の小さなタンパク質は後に出る。

用語

バッファー(緩衝液): pHを一定に保つ役割をする。通常は酸と塩基からなる。

タンパク質: アミノ酸の重合体。20種のアミノ酸が多数(100個以上)つながっている。生体を構成したり、代謝活動をするのに必要な生体高分子。
例えば、コラーゲン(皮膚)、ケラチン(爪)などもタンパク質。

タンパク質の精製: 細胞の抽出液などから目的のタンパク質を純粋に取り出す操作のこと。クロマトグラフィーは代表的な手法。いろいろなタンパク質が混じっていると分析への影響が大きいので、あるタンパク質の機能を調べるためには精製が必要になる。

この資料は下記HPからダウンロードできます。

<https://satokichi2012jp.wixsite.com/biochem>

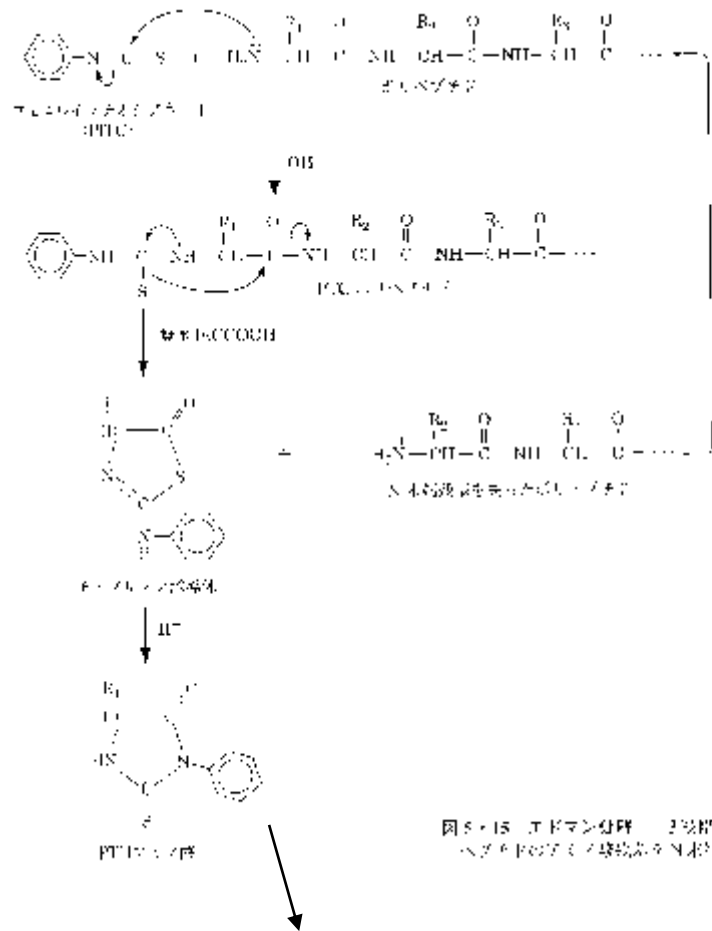
→担当授業→基礎生物学実験N

タンパク質の一次構造

一次構造: アミノ酸配列、アミノ酸がどのような順番でなっているか

一次構造決定法

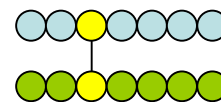
N末端側からエドマン分解により一つずつアミノ酸を遊離させて決定する。現在は自動化されている。



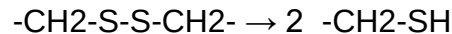
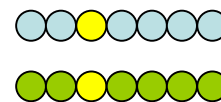
標準試料と比較してアミノ酸を決定する。

一般的な一次構造決定の手順

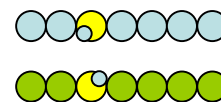
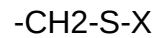
目的のタンパク質を精製する



ジスルフィド結合を還元する。



SH基を保護する



エドマン分解を行う



エドマン分解はサイクルを重ねるとPTHアミノ酸の収量が少なくなる。一般的には30-50アミノ酸で限界。

N C

→ ? →

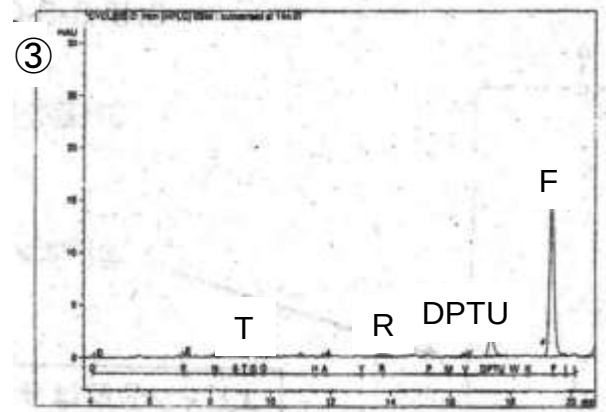
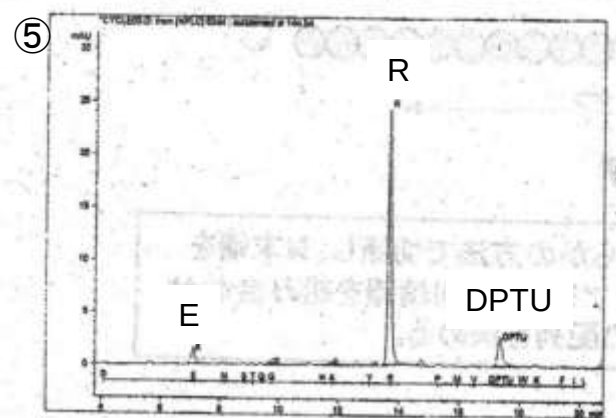
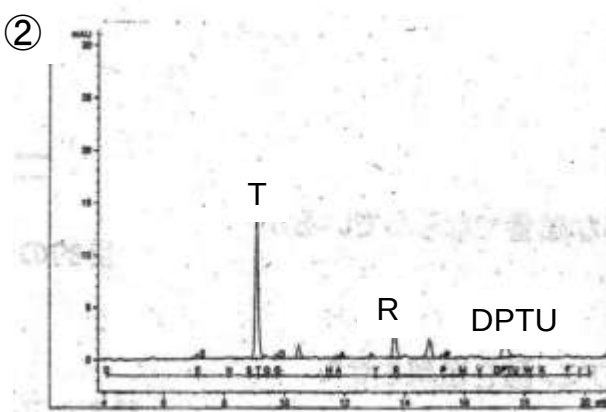
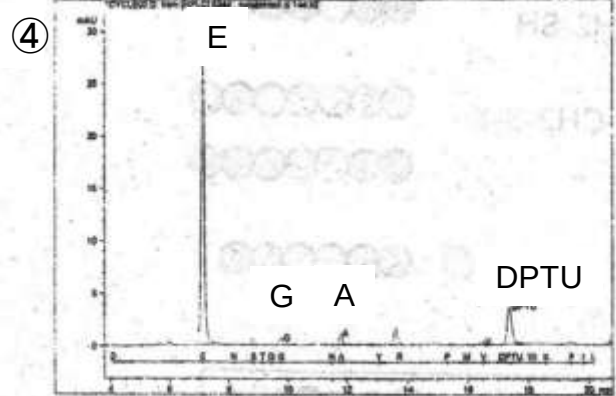
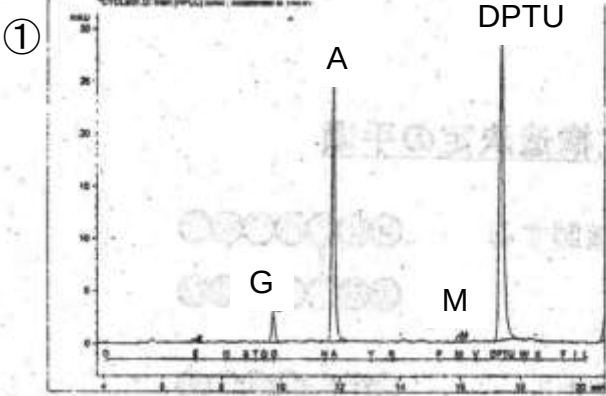


ポリペプチド鎖を何らかの方法で切断し、N末端を生成させればよい。アミノ酸配列情報を組み合わせて、最終的に全体の配列を決める。

N C

N C

N C



＜課題＞ 10点

データは、あるタンパク質のN末端からエドマン分解を行った分析結果である。
①～⑤は、エドマン分解のサイクルに対応する。このタンパク質のアミノ酸配列を推定しなさい。



プロテインシーケンサーは鎖状に並んだアミノ酸をアミノ末端から一つずつ標識してはずし、自動的に高速液体クロマトグラフィーに導入してアミノ酸の種類(例えば、メチオニン(Met)、アラニン(Ala)など)を同定してくれる機器です。