

羊初乳中に含まれる 繊維芽細胞成長因子(FGF)の分離・精製

中 村 正

生物資源化学科生物資源利用学助手

1. 目 的

近年、羊は、北海道を始め国内でも広く食用となっている。また、乳中（特に初乳中）には、動物の成長に影響を及ぼす刺激因子が多く存在することが知られている。これからの成分についての知見は、食用動物の成長・肥育を行う際に重要なものである。そこで本研究では、道内で多く飼育されている羊に着目し、その初乳中に含まれる成長刺激因子の中で子羊の初期成長時において臓器の形態形成に重要な役割を果たす FGF の分離・精製を行いその化学的特徴を知ることを目的とした。

2. 方 法

試料として、分娩後7日以内の初乳を茶路めん羊牧場より入手した。初乳(4ℓ)を遠心分離(5000 rpm, 30 min)により脱脂し、2倍量の蒸留水で希釈した後、カゼインを等電点沈殿により除去した。ホエータンパク質に35%飽和となるように硫酸アンモニウム(硫安)を添加し、遠心分離(8000 rpm, 30 min)により沈殿を除去した後、85%飽和となるように硫安をさらに添加した。これを遠心分離(8000 rpm, 30 min)して得られた沈殿を蒸留水に溶解し、透析により脱塩した。透析内液を遠心分離して不溶成分を除去し、その上清を0.1 M リン酸緩衝液(pH 6.5)で平衡化したCM-cellulofineを用いてのイオン交換クロマトグラフィーに供した。溶出は、流速1.0 ml/minで0.1 M および0.7 M の NaCl 濃度でのステップワイズ溶出により行った。0.7 M の NaCl 濃度での溶出画分を回収し、10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.0)に対して十分に透析を行った。これを同緩衝液で平衡化したヘパリンアフィニティーカラムに供した。同緩衝液で十分に洗浄、平衡化した後、0~2.0 M の NaCl のリアグラジェントによって結合成分の溶出を行った。タンパク質の検出は280 nmの吸収を測定することにより行った。

結合成分の分析は、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)存在下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により行った。検出はクマシーブリリアントブルー染色により行った。

3. 結 果

ホエータンパク質への35%飽和量の硫酸アンモニウム(硫安)の添加による除タンパク質により、主なホエータンパク質である β -ラクトグロブリンおよび α -ラクトアルブミンが効率よく除去された。さらに、85%飽和量になるように硫安を添加し得られた沈澱物を透析後、SDS-PAGEに供したところ、ラクトフェリンを主なバンドとし、多くのバンドが検出された。

85% 硫酸での沈澱成分をイオン交換クロマトグラフィーに供し、0.7 M NaCl 濃度で溶出した画分を SDS-PAGE により分析した結果、ラクトフェリンのバンドの他に 3 本のバンドが確認された。3 本のバンドの推定分子量はそれぞれ 32, 16, 14 kDa であった。

これを、ヘパリンアフィニティークロマトグラフィーに供し、0~2.0 M までのリニアグラジェントにより溶出させた結果、0~1.0 M の間に溶出する 3 本のピークと 1.2~1.5 M の間に溶出する 1 本のピークに分離された。1.2~1.5 M の NaCl 濃度で溶出した成分を SDS-PAGE により分析したところ、16 kDa のバンドが検出された。

4. 考 察

aFGF および bFGF はヘパリンに強い親和性で結合することが Thornton らにより報告されている。aFGF は、ヘパリンアフィニティークラムから NaCl 濃度 0.9~1.1 M で溶出する分子量 16~19 kDa の成分であり、bFGF はヘパリンアフィニティークラムから NaCl 濃度 1.4~1.8 M で溶出する分子量 16~19 kDa の成分である。今回、SDS-PAGE により 16 kDa のバンドとして検出された成分は、ヘパリンアフィニティークラムから 1.2~1.5 M の NaCl 濃度で溶出した成分であることから、bFGF 様成分である可能性が示唆された。

bFGF であることを同定するには、繊維芽細胞に対して高い成長促進作用を持つことおよび N 末端配列が他の bFGF と高い相同性を持つことの確認が必要である。マウス由来の繊維芽細胞である Balb 3 T 3 clone A 31 を用いて³H-チミジンの取り込みによる細胞増殖活性試験を行った結果、20 ng/ml の濃度で約 2 倍の増殖活性が見られた。N 末端配列分析については現在検討中であるが、以上のことから他の bFGF と高い相同性を持つと考えられ、羊乳中から bFGF が精製された。