

Bence Jones 蛋白質의 精製 및 N-末端檢出

金 俊 平

大田大學 化學科

(1970. 1. 31, 수리)

Purification and N-Terminal Study of Bence Jones Proteins.

Jun Pyong Kim

Taejon presbyterian College

(Recieved Jan. 31, 1970)

Summary

Human Bence Jones Protein could be purified by DEAE-Sephadex A-50 column ($2 \times 37\text{cm}$) with 0.02M phosphate Buffer (pH 8.0) and gradient increasing with NaCl concentration as in Fig. 2-4.

Sample As (K-type Bence Jones Protein) had two component, F-I was major component and its dried weight was 350mg. of starting material of 500mg.

Other Sample Im and Ik (λ -type Bence Jones Protein) was purified by DEAE-Sephadex A-50 with 0.02M phosphate Buffer (pH 8.0) too. F-I (major component) of Im and F-I of Ik were 242mg and 146 mg. its dried weight respectively. K-type of Bence Jones Protein's (As, Ko, Ta.) N-terminal amino acid residue was determined by method of DNP. K-type of Bence Jones Protein's amino acid residue were either glutamic acid or aspartic acid.

Sample Ta was confirmed as glutamic acid its N-Terminal. As and Ko were aspartic acid.

Each yellowish spot (DNP-amino acids) were extracted with 4mL. of pH 8.0 5% NaHCO_3 solution and calculated its recovery by O.D. ($360\text{m}\mu$) using the $\epsilon = 18.1 \times 10^3$ -DNP Asp.

$\epsilon = 17.4 \times 10^3$ DNP Glu. considering 50% lose during the acid (6N-HCl) hydrolysis.

Recovery of ko and As were 54.3% and 65% of its starting materials (DNP-Protein).

Sample Ta's recovery was 85% of its DNP-protein.

λ -type of Bence Jones Protein was not investigated its N-terminal amino acid residue by DNP-method, probably it was blocked its N-terminal residue with glutamic acid.

緒 論

Bence Jones 蛋白質이란 것은 骨髓腫(myeloma) 환자의 尿에서 排泄되는 蛋白質의 一種으로서 환자 가 하루에 수 g.에서 수십g. 排泄한다. 이 병에 걸리게 되면 일년내에 죽게 되는 일이 많다. 이蛋白質은 일찍이 영국의 의사 Watson 과 McIntire 에 의해 發見되었으며 법의 학자인 H. Bence Jones 교수에 의해 化學적으로 연구⁽¹⁾되었다. 그후 이蛋白質은 그 特異性으로서 이 蛋白質溶液을 pH5 부근에서 $50^{\circ} \sim 55^{\circ}\text{C}$ 로 加熱하면 混濁하나 100°C 까

지 내려주면 다시 투명하게 되는 아주 재미있는蛋白質로 알려져 있었으나 그 本體에 對해서는 1962년까지 全然 알 수 없었다. 이 Bence Jones 蛋白質이 다시 인기를 얻게된 것은 1962년 Edelman 과 Gally⁽²⁾가 骨髓腫 γ -Globulin 를 還元하여 두種類의 peptide 인 Heary chain 과 Light chain 을 얻어 그 중 分子量이 작은 짧은 것 即 Light chain 이 Bence Jones 蛋白質과 같다는 것으로 부터였다. 이 Bence Jones 蛋白質은 抗原性에 의해 두 type 로 나눌 수 있다. 即 K-type 과 λ -type 로 나눌 수 있으며 抗 K-type 와 未知의 Bence Jones 蛋白質이 免疫電氣

泳動法에 의해反應하면 K-type가 되며抗 λ -type와反應하면 λ -type로判定하게 된다. 大體로 이蛋白質의分子量은 22,000~24,000程度이며正常免疫 Globulin 分子量 150,000에 비해比較的 다루기 쉬운 크기이며 몇 種類의 Bence Jones 蛋白質에對해 末端的 化學構造가 Putman에 의해 1954년부터始作되었으며^(3,4) 이들全 一次構造決定은 1963년부터 Titani⁽⁵⁻⁸⁾ 및 Hirschman Craig⁽⁹⁾ 등에 의해 시작되어 K-type의 Bence Jones 蛋白質이決定되었고 또한 Titani^(10,11)에 의해 λ -type의 全一次構造가 결정되었으며 Milstein⁽¹²⁾에 의해 Half-cystine 주변의 peptide 構造決定이 이루어졌다. 이러한蛋白質은 사람以外에 생쥐(mouse)의 尿中에서 排泄된 것이 발견되었으며 (k-type) 이를 Cray⁽¹³⁾ 등이 構造研究를 하고 있다. 現在까지의 研究結果에 의하면 이들蛋白質은 214前後의 amino 酸으로 되어 있으며 N-末端부터 半程度가 극히變化가 심한 variable part로 되어 있으며 그후 C-末端部分은 유전인자에 의해 1개의 amino 酸의變化만 除外하고 完全히 同一의 amino 酸으로 되어 있는 constant part가 있다. 필자는 이들 Bence Jones 蛋白質이 사람에 따라서 差異가 있는 N-末端 주변의蛋白質에서의 amino 酸의 配列을 연구코저 먼저 이들蛋白質의 crude 상태의 것으로부터 purify하여 N-末端의 amino 酸을 決定하고자 이 실험을 계획한 것이다.

實驗方法

1) K-type의 Bence Jones 蛋白質의 精製⁽¹⁴⁾

粗(crude) Bence Jones 蛋白質은 普通 骨髓腫환자의 尿를 60% 포화황산암모늄(ammonium sulfate)로 沈澱시켜 얻고있다. 沈澱物은 脫이온水에 녹히여 4°C에서 2日동안 脫이온水로 갈아주면서 투석(dialysis)한 후 lyophilize(冷凍乾燥)하여 -20°C室에 저장한다. 粗 Bence Jones 蛋白質의 試料(As=환자 Asahi의 약자) 500mg를 pH 8.0의 완충액(0.02M phosphate Buffer)에 녹히여 미리 이 완충액으로 平衡化시킨 DEAE sephadex A-50 column(2×37cm)에 apply 하고 위에서 처음 Buffer인 0.02M phosphate Buffer(pH 8.0)가 약 700ml. column를 通過하였을 때 gradient(0.02M phosphate Buffer(pH 8.0), 0.5 M NaCl 용액)를 통하였으며 이 column를 통해 나오는 流出液은 automatic fraction collector에 一定하게 받아 이것을 280m μ 의 O.D.(optical density)로 蛋白質部分을 검색하였다.

2) λ 型 Bence Jones 蛋白質의 精製

Bence Jones 蛋白質(Im) 500mg를 pH 8.0의 0.02M phosphate Buffer의 少量에 녹히여 이를 이미 平衡化시킨 DEAE-Sephadex A-50 Column(1.8×50cm)에 apply 하고 Ist Buffer(0.02M phosphate)가 100ml. 가량 流出된후 gradient(0.02M phosphate Buffer pH 8.0에 0.5 M NaCl 용액 加한 것)를 유입시켜 精製하였으며 試料 Ik 500mg.도 위와 같은 DEAE-Sephadex A-50(2×35cm) column으로 같은 Buffer를 써서 精製하였다.

3) Bence Jones 蛋白質의 아미노酸 分析

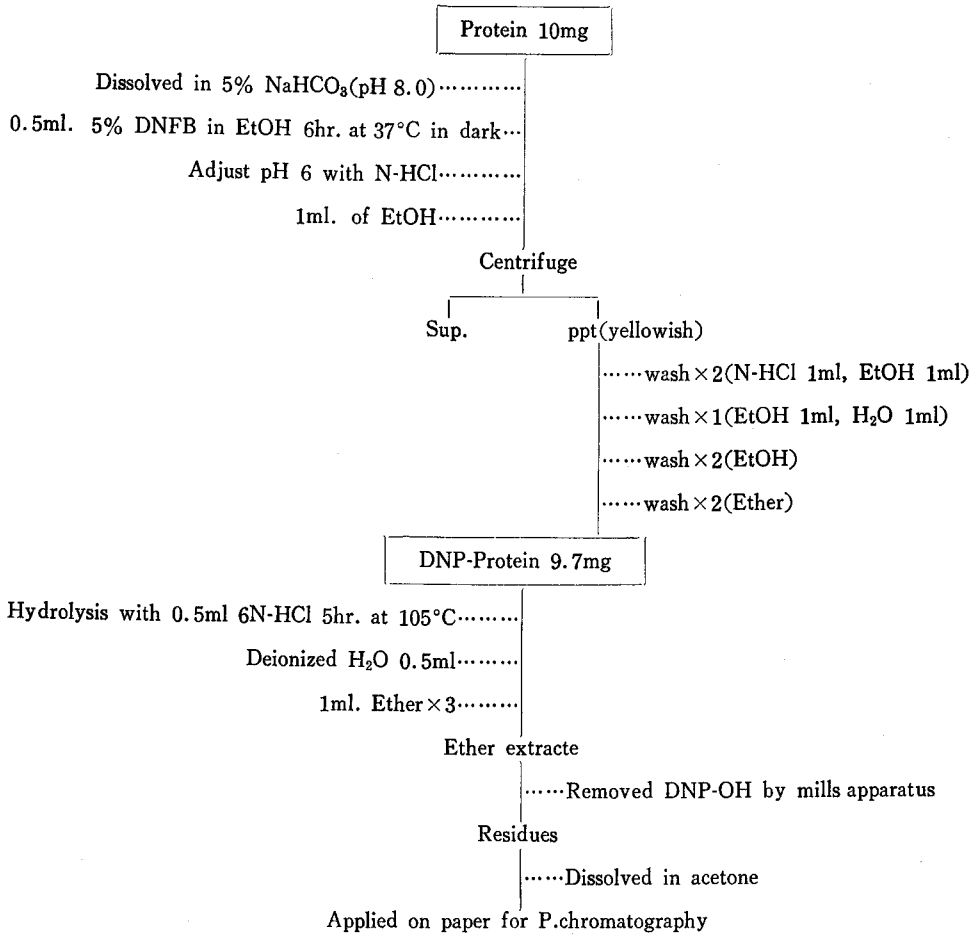
K-型的 Bence Jones 蛋白質의 一種인 試料 As와 λ -型的의 一種인 Im의 全體 아미노酸의 組成을 알기 위해 酸 加水分解하기 前에 精製한 것의 純度を 알기 위해 polyacrylamide의 Disc electrophoresis로 調査해 均一한帶(Band)가 나타난 것을 확인하고 試料를 작은 眞空試驗管에 넣어 6N-HCl를 少量 加하여 105°C oven 속에서 20時間 加水分解하여 自動아미노酸 分析機에 의해 각 아미노酸의 mole 比를 計算하였다.

4) K-型 Bence Jones 蛋白質의 N-末端檢出

가) DNP法에 의한 N-末端의 檢出⁽¹⁶⁾

精製된 蛋白質 As와 이미 精製한 試料 Ko, Ta, 를 大阪大學蛋白質研究所 千谷先生으로부터 入手하여 각 10mg를 0.5ml의 5% sodium bicarbonate (pH8.0) 용액에 溶解시켜 이를 遠心分離用試驗管에 넣고 여기에다 5% DNFB가 들어있는 Ethanol 용액⁽¹⁷⁾ 0.5ml를 加해 이를 37°C의 어두운 房에서 6時間 DNP 化 시킨다. DNP 化후 N-HCl 용액을 이 液이 pH 6 程度의 酸性이 되도록 滴下시킨다. 다음 1ml의 Ethanol를 DNP-Protein이 沈澱되도록 加해 混合物를 遠心分離하여 黃色의 DNP 蛋白質의 沈澱을 얻는다. 沈澱物은 1~2回 N-HCl과 Ethanol의 混合液(1:1Vol)과 Ethanol로 각각 씻고 다시 ether로 씻은 다음 이를 乾燥器속에서 乾燥시킨다. 이와 같이 하여 얻은 DNP 蛋白質은 약 9.7mg.이었으며 DNP 蛋白質은 空氣를 뺀 試驗管속에서 6N-HCl 0.5ml. 가량 加해 105°C⁽¹⁸⁾의 oven속에서 5시간 加水分解한다. 酸加水分解시킨 것은 脫이온水 0.5ml를 加해 2倍로 희석하고 이에다 ether를 加해 抽出한다음 ether 층⁽¹⁹⁾만 모아서 ether만 증발시킨다. 이 ether 抽出物중 Dinitrophenol은 mill의 裝置를 통해 80°C의 Water bath속에서 減壓하면서 승화시켜 除外하고 殘渣는 다시 少量의 acetone에 녹히여 미리 pH 6.0의 Phthalic acid 용액에 적서 건조시킨 Toyo 여지 No.51(10×40cm)에 apply 하여 展開한다. 이 DNP法の 實驗

Fig. 1 Procedure of DNP method



順序는 다음 Fig 1 에 표시하였다. 展開液은 tert. amyl. alcohol-phthalic acid⁽²⁰⁾ 용액이며 66時間 展開하였다.

5) λ型 Bence Jones 蛋白質의 N-末端檢出

試料 Ik 및 Im 의 蛋白質 各 10mg 를 取해 K-型 蛋白質의 N-末端檢出 實驗方法인 DNP 法을 써서 檢出하였다.

結果 및 考察

1) K-型 Bence Jones 蛋白質의 精製

Crude Bence Jones 蛋白質 500mg (As)를 DEAE-Sephadex A-50 (2×37cm) column에 apply 하여 0.02M Phosphate Buffer 를 써서 精製한 結果는 Fig. 2 와 같고 主成分인 F-1 部分을 모아 4°C 에서 2日間 脫이온水로 투석한 후 冷凍乾燥해 350mg 를 얻었고 F-II 의 것은 94mg였다.

2) λ-型 Bence Jones 蛋白質의 精製

試料 Im 500mg 를 DEAE-Sephadex A-50 column (1,8×50 cm)를 통해 나온 Fig. 3 의 F-1 의 部分을 모아 2日間 脫이온水로 4°C 에서 투석하고 lyophilize 하여 242mg 를 얻었다.

試料 Ik도 같은 實驗方法으로 精製하였으며 그 結果는 Fig. 4 에서 보는 바와 같이 主成分인 F-1 이 gradient 를 시작하기 前에 나왔으며 이를 투석해 보았더니 그 무게가 146 mg 이었다. 이 結果는 아마도 염유가 약간 試料속에 남아있는 관계 때문인 것으로 생각된다.

3) Bence Jones 蛋白質의 Amino 酸組成分析

K-型의 Bence Jones 蛋白質의 一種인 試料 As와 λ型의 一種인 試料 Im 를 6N-HCl 로 20時間 105°C 속에서 加水分解하여 얻는 이들 Amino 酸組成은 다음 Table I 과 같다.

Half-cystine 및 tryptophane 의 値는 수정 값이며 이들 Bence Jones 蛋白質의 分子量을 23500 으로

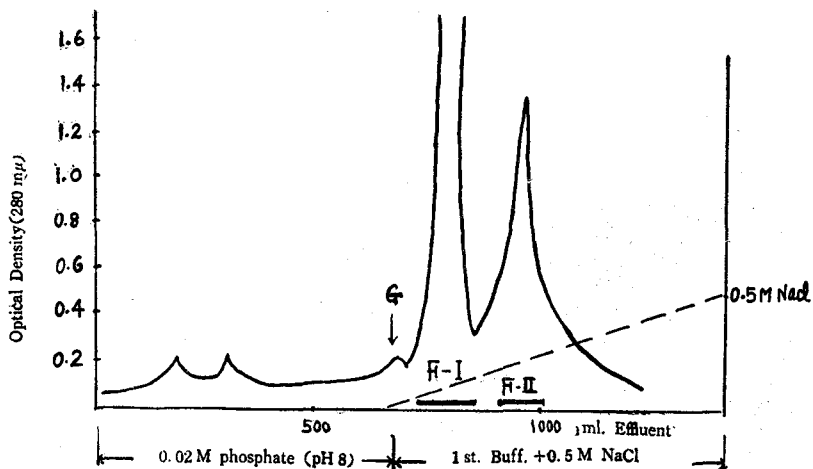


Fig. 2. Chromatography was Performed on DEAE-Sephadex A-50 column (2×37cm) Sample=As

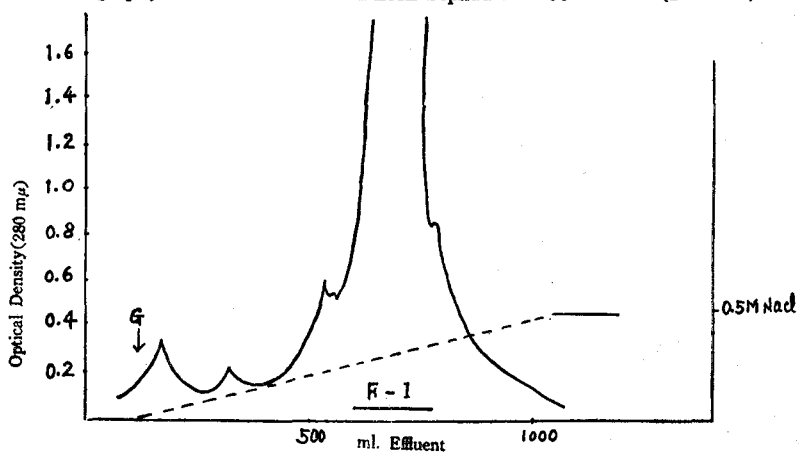


Fig. 3. Sample Im was applied on DEAE-Sephadex A-50 Column (1.8×50cm)
Buffer: 0.02M Phosphate (pH8.0) Gradient: 1st Buffer added 0.5M NaCl.

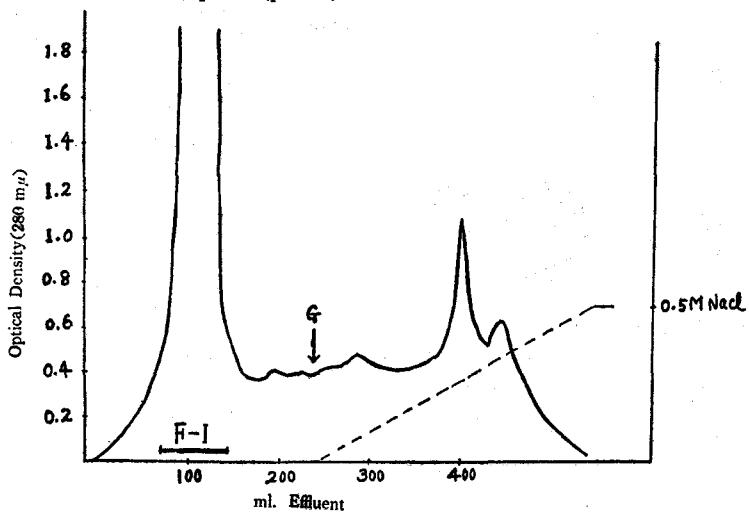


Fig. 4. Ik was applied on DEAE-Sephadex A-50 Column (2×35cm)

Table 1. Amino Acid Composition of B.J. Proteins.

As (K-Type)			Im (λ Type)		
Amino Acid	μ mole	Molar Ratio	Amino Acid	μ mole	Molar Ratio
Asp	0.436	15	Asp	0.613	16
Thr	0.546	19	Thr	0.797	20
Ser	0.857	29	Ser	1.205	31
Glu	0.653	22	Glu	0.823	21
Pro	0.463	15	Pro	0.714	18
Gly	0.399	13	Gly	0.614	16
Ala	0.489	16	Ala	0.665	17
1/2 Cys	0.075	5 ⁽¹⁵⁾	1/2 Cys	0.072	5
Val	0.468	16	Val	0.622	16
Met	0.031	1	Met	0.047	1
Ileu	0.206	7	Ileu	0.169	4
Leu	0.334	11	Leu	0.624	16
Tyr	0.275	9	Tyr	0.334	9
Phe	0.186	6	Phe	0.179	5
Trp		2 ⁽⁴⁾	Trp		2
Lys	0.343	11	Lys	0.426	11
His	0.123	4	His	0.160	4
Arg	0.144	5	Arg	0.181	5
Total		206			217

간주하여 試料중 2% 水分을 포함한 것으로 보고 計算한 것이다. 이 結果에서 보는바와 같이 K-type 의 As 는 206 의 Amino 酸基이며 λ -type 의 Im 는 217 의 Amino 酸基로 나타나 있으나 大體로 보아 文獻值⁽²²⁾와 가까운 結果임을 알 수 있다.

4) K-型 Bence Jones 蛋白質의 N-末端檢出

DNP 法으로 檢出한 試料 As, Ta, Ko 는 Fig. 5 에서 보는것 처럼 Ta 는 N-末端의 Amino 酸이 glutamic acid 이며 Ko, As 는 aspartic acid 임이 確 認되었다.

각 黃色의 spot 는 5% NaHCO₃ 용액 (pH 8.0) 4ml 에 抽出하여 Recovery⁽²¹⁾를 O.D.(360m μ) $\epsilon=18.1 \times 10^3$ DNP-ASP $\epsilon=17.4 \times 10^3$ DNP-Glu.에 依 據 算出하였으며, 이때 酸分解中의 損失量을 50% 로 간주하였다. DNP 蛋白質에 對해 As 의 收量은 65%, Ko 의 收量은 54.3%이고 Ta 의 收量은 85% 였다

5) λ 型 Bence Jones 蛋白質의 N-末端檢出

試料 λ 型인 Ik 와 Im 10mg 를 K-型의 Bence Jones 蛋白質의 N-末端檢出法과 같은 法으로 檢出해 보 았으나 兩者(Ik, Im)다. N-末端 amino 酸이 檢出 되지 아니하였다. 이는 人間의 λ 型 Bence Jones 蛋 白質의 N-末端이 DNP法으로 檢出되지 아니한 環

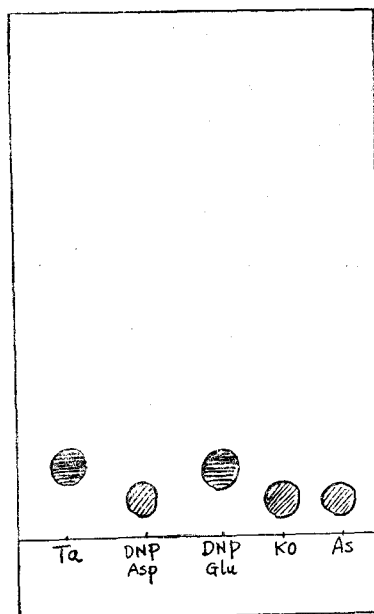


Fig 5. The Result of Paper Chromatography K-Type of B.J. Proteins (Ta,Ko and As) 66hrs. developed in Tertiary Amyl-phthalic Acid in dark room.

狀化된 Glutamic acid 即 Pyrrolid 2-one-5 Carboxylic acid (PCA)로⁽²²⁻²⁴⁾ 되어 있는지도 모른다.

要 約

Bence Jones 蛋白質(As, Ik, Im)를 DEAE-Sephadex A-50 Column 으로 0.02M phosphate Buffer(pH8.) 와 0.5M NaCl 를 gradient 로 使用해 精製하였다. 試料 As(K-型)의 精製結果 主成分인 F-1는 粗蛋白質 500mg 로부터 350mg 얻었으며 다른 試料 Im 와 Ik(λ -型)에서도 각각 主成分을 242 mg(Im)와 146mg(Ik) 얻을 수 있었다. 精製한 試料는 그의 純度를 알기 위해 Poly acryl amide 의 Disc electrophoresis 로 확인한 후 K-型 Bence Jones 蛋白質의 一種인 As 와 λ -型의 一種인 Im를 6N-HCl 로 105°C 에서 20時間 加水分解후 Amino 酸 組成을 살펴 보았다. DNP 法으로 試料 K-型(As, Ko, Ta)의 蛋白質의 N-末端을 檢出해 Ta는 glutamic acid, Ko, As는 Aspartic acid임을 확인하였으며 Paper 上에 나타난 DNP-Amino 酸은 5% NaHCO₃ (pH8) 4ml 에 抽出해 그 收量을 $\epsilon=18.1 \times 10^3$ DNP Asp $\epsilon=17.4 \times 10^3$ DNP Glu 에 依해 算出하였더니 Ko는 54.3%, As는 65%이였으며 Ta는 85%의 收量이였다 λ -型의 Im, Ik 의 試料도 DNP 法으로 N-末端을 檢出해 보았더니 檢出되지 아니하였다.

參 考 文 獻

1. H.Bence Jones: Lancet 2, 88 (1847)
2. G. M. Edelman, J. A. Gally: J. Expl. med. 166, 207 (1962)
3. F.W. Putman, A. Yiyake; J. Biol. Chem. 227, 1083 (1957)
4. F.W. Putman, A. Yiyoke; Science 120, 848 (1954)
5. K. Titani, F.W. Putman; Science 147, 1304

- (1965)
6. K. Titani, E. Whitley; Science 149, 1090(1965)
7. K. Titani, F. Whitley, F.W. Putman; Science 152, 1513(1966)
8. F.W. Putman, K. Titani; Proc. Roy. Soc. B. 166, 124 (1966)
9. N. Hirschmann, L.C. Craig; Proc. Natl. Acad. Sic. 53, 1403 (1965)
10. K. Titani, M. Wikler, F.W. Putman; Science 155, 828 (1967)
11. M. Wikler, K. Titani, F.W. Putman J. Bio. Chem. 242, 1668 (1967)
12. C. Milstein; Nature 209, 370 (1966)
13. W.R. Cray, W.J. Dreyer; Science 155, 465 (1967)
14. G.M. Bernier, F.W. Putman; Biochem Biophys. Acta 86, 295 (1964)
15. N. Hilschman, L.C. Craig; Proc. Natl. Acad. Sci. 53, 1405 (1965)
16. F. Sanger; Biochem. J. 39, 507(1945)
17. H. Fraenkel Conrat, J.I. Harris; Method of Biochemical Analysis. 2, 359 (1963)
18. Protein, Nucleic Acid, Enzyme (Tokyo) 8, 9 (1963)
19. ibid 8, 10 (1963)
20. ibid 8, 12 (1963)
21. ibid 8, 16 (1963)
22. Frank W. Putman, K. Titani; Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Vol. XXXII (1967)
23. Hood L. Gray, W.R. Dreyer; J. Mol. Bio. 22, 179 (1966)
24. Wikler M. Titani K. Shinoda T. Shinoda T. Putman F.W.; J. Biochem. 242, 1668 (1967)