

細胞分裂抑制物質肝コルニンの研究

2. ラット肝小胞体コルニン画分の分離精製とその化学的性質

岡山大学医学部第一生理学教室

土 井 昭 孚

(昭和53年2月27日受稿)

緒 論

1958年西田等¹⁾により角膜から発見された縮瞳作用を有する生理活性物質コルニンは、その後生体の殆んどあらゆる組織から抽出され、このコルニン画分が更に細胞分裂抑制作用も示すことが報告されてきている。²⁾

コルニン研究の歴史については西田・村上の総説³⁾がある。総説にも述べられているように細胞分裂抑制能を有するコルニンの精製は極めて困難であった。

精製の困難さはコルニンを組織全体から抽出し、これらから精製を行ってきたことに原因の一つがあるのではないかと考えられるため、最近になり細胞分画法を用いて組織のホモジネートを各細胞画分に分けこれらからコルニンを抽出し精製が進められている。

ラット肝上清画分より抽出されるラット肝上清粗コルニン(crude rat liver cytosol cornin (RLCC と呼称) については著者等⁴⁾により報告され、このRLCCの精製と化学的性質については Inaba ら⁵⁾の報告がある。

本論文ではラット肝小胞体のコルニン画分(crude rat liver microsomal cornin : RLMC と呼称)の抽出及び精製法、マウス由来の線維芽細胞である L 929 細胞に対する分裂抑制活性の測定と、この精製コルニン (MF1 と呼称) の化学的性質について調べた成績を報告する。

材料及び方法

小胞体画分の調整；肝臓は24時間絶食させたラットを屠殺直後充分に脱血を行った後に開腹摘出し、冷凍庫(-80℃)に凍結保存していたものを凍結状態のまま細砕し、0.25M Sucrose (pH 7.4) 中で

解氷し、ガラス及びテフロンホモゲナイザーで細胞を破壊した後4層のガーゼで濾過して未砕細胞を除き、800×G 10分の遠沈によって得た上清を10,000×G で10分間遠沈し、その上清を更に105,000×G 60分の超遠沈後その沈渣を小胞体画分とした。

RLMC の抽出；細胞分画法で得た小胞体画分について西田等の方法¹⁾を一部改良してコルニン画分を抽出した。即ち小胞体画分を0.1M NaCl に懸濁し、100℃ 3分間の熱処理を行った後冷却し、遠沈操作により上清を集め、この上清についてエタノール分画法を施し、冷70%エタノール処理の上清より冷90%エタノール処理での沈渣を低速遠沈で集め、10倍容量の冷アセトン及び冷エーテルで処理しアセトン粉末として冷室のデシケーター中に保存した。

Sephadex G-50カラムクロマトグラフィーを用いたゲル濾過によるRLMCの脱塩細分画；Sephadex G-50を蒸留水で3時間煮沸して膨潤させた後流水中で冷却し、内径3cm長さ50cmのカラムに充填した後10ℓの蒸留水を流してゲルを洗う。あらかじめRLMC 50mgを3mℓの蒸留水に溶かしておきこれをカラム上部に重層後流下速度12mℓ/hrで蒸留水を流し、3mℓづつフラクションコレクターで集めた。

薄層クロマトグラフィーによる分子量測定；Sephadex G-100 5.6gを100mℓの5mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4, 0.1M NaCl を含む) 中で3時間煮沸して膨潤後冷却し、20×20cmのガラス板の上に約1mmの厚さに引き延して、上記緩衝液を上槽に入れた湿箱中に置き両端を濾紙で夫々架橋し斜度8°又は10°で1晩放置する。標品はあらかじめ0.1M NaCl を含む Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) に1mg/0.1mℓの濃度に溶かしておきこの約10~20μℓをスポット滴下した。標準蛋白には、チトクロ

ームC, 牛血清アルブミン, 卵白アルブミン及びリアルドラーゼ (ベーリンガー社製) を用いた。標品滴下3~6時間後汚紙 (東洋汙紙, No 51) で写しとり, 風乾後0.25%クマシーブリリアントブルー (メタノール:氷酢酸=9:1溶液) で固定・染色を5分間施し, 蒸留水で数回手早く洗った後脱色液 (メタノール:氷酢酸:水=1:1:8溶液) に浸して脱色した。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法; a) 標準ゲル; 上層ゲル3.75%, 下層ゲル7.5%のアクリルアミドゲルを内径5mm長さ9cmのガラス管に充填し, あらかじめ蒸留水0.1mlに標品1mgを溶かしておいたものを40~60 μ lカラムに重層させ, 上槽及び下槽に電解液としてTris-glycine緩衝液 (pH 8.6) を用い, 3mA/tubeで3.5時間の泳動を行わせた後, 50%メタノール及び7%氷酢酸を含む0.25%クマシーブリリアントブルー染色液で染色・固定を2時間行い, その後数回7%酢酸で液交換を施し脱色した。分離の状態が良好であるか否かを見るため, 標準蛋白としてチトクロームC及び牛血清アルブミンを用いた。

b) SDSゲル; 10%のアクリルアミドゲル用い, 電解液には0.1%SDSを含む0.01Mリン酸緩衝液 (pH 7.2) を用いた。ゲルの調整は, 終末アクリルアミド10%, ビスアクリルアミド0.27%, 過硫酸アンモニウム0.075%, SDS0.1%になるように調合し, この溶液30mlに対し, TEMED0.045mlを加えた。分析する標品はあらかじめ1mgを10mMリン酸緩衝液 (0.1%SDSを含む) に溶かしグリセリンを1滴 (約10 μ l) を加え, 煮沸水中で100 $^{\circ}$ C1分間の熱処理を施し, 冷却させたものを20~30 μ l用いた。標準蛋白にはチトクロームC及びヒストンを用いた。泳動は3mA/tubeで2.5~3時間の泳動時間で行った。固定染色には50%メタノール, 10%氷酢酸を含む0.25%のクマシーブリリアントブルー染色液で2時間行い, 脱色は10%メタノール及び10%氷酢酸を含む水溶液で数回の液交換により行った。

アミノ酸分析; 3mgのMF1を水解用アンブルに入れ, 蒸留水1mlを加えて溶解し次に12N塩酸を1ml加えて封管し, 加水分解炉 (105 $^{\circ}$ C) で12時間水解する。水解後減圧濃縮してその沈渣を0.01N塩酸6mlに溶解する。この3mlをアミノ酸アナライザー (JEOL社製, JLC-6AH型) にかけて分析した。

細胞分裂抑制効果の検定法及びL 929細胞の培養

方法; 前報の方法¹⁾に従い培養試験管を用いた直立静置培養法により行った。即ち対数増殖期にある細胞 (角瓶を母培養容器とした) を 3.5×10^4 個植え込み, 24時間後に標品を含む培養液と液交換し, 更に24時間後に培養液を捨て, CMF (Ca^{++} , Mg^{++} free buffered saline) で洗った後TEP (trypsin 0.05%, EDTA 0.025%のCMF溶液) 処理により細胞を浮遊させ, コールターカウンターで細胞数を計測した。増殖率は対照の増殖率を100%とし, それに対する割合で示した。増殖を50%阻害する標品濃度はID50 (inhibitory dose 50 percent) で表現した。

生体染色法による生細胞率の検定; 細胞浮遊液1mlに対し, Erythrocin B 0.3ml加えて5分以内に血球計算板を用いて生細胞数を算定した。MF1添加による生細胞数の割合は培養試験管に付着していた細胞では95%以上であったが, MF1添加により浮遊したと考えられる細胞は殆んどが死細胞であった。

蛋白質及び糖の定量; 蛋白質の定量は牛血清アルブミンFvを標準タンパクとしてLowry法に従って測定した。糖の定量はフェノール-硫酸法に従って行った。標準糖にはD-グルコース及びD-リボースを用いた。

糖成分の同定; MF1を4N塩酸に溶かし, 100 $^{\circ}$ C4時間の水解を施し, 水を50ml加えて減圧濃縮する操作を5回繰り返した後少量の水に溶かしたものを, シリカゲルプレート (Wakogel G) にスポット滴下した。プレートはあらかじめ, 0.02Mの酢酸ナトリウムに浸漬した後室温で1日風乾後120 $^{\circ}$ C1時間の活性化を施したものをを用いた。

蛋白質分解酵素処理; 5mM Tris緩衝液 (pH7.2) にMF1及びプロテアーゼ (Nagarse) を夫々終末600 μ g/ml, 20 μ g/mlとし, 汙過滅菌後30分間37 $^{\circ}$ Cでincubateする。この反応溶液に対し等量のMEM (通常のMEMの2倍濃度溶液) を加え更に10%の牛血清を加えたものを前述の検定法に従って, 細胞増殖抑制効果を検定した。

実験成績

1kgのラット肝臓より抽出されるRLMCのアセトン粉末としての重量は平均約200mgであった。このRLMCのSephadex G-50カラムを用いたゲル汙過による分離パターンをFig 1に示す。OD 280nmにおける吸収測定により3つの主たるピークが得られる。これらをMF1, MF2及びMF3と呼称す

る。回収率は全体では乾重量として76.3%であり、そのうちMF1は6.6%, MF2及びMF3は夫々43.1%, 26.6%であった。

これら3つの画分のL 929細胞に及ぼす分裂抑制効果を Fig. 2. に示す。MF1に活性の大部分が存在していることが明らかである。

Fig. 3はMF1とRLMCの分裂抑制活性の比較を見たものである。MF1のID₅₀は270 μ g/mlであり, RLMCと比較してほぼ4倍比活性が高くなっている。

Fig. 4はMF1の紫外吸収曲線である。276 nmに極大吸収を示す。Lowry法による蛋白定量からMF1は90%の蛋白質を含み, 不溶性蛋白は3%であった。

Fig. 5は7.5%の標準ゲルを用いたポリアクリルアミドゲル電気泳動によるMF1の泳動パターンである。明らかな一つのピークが観察される。

Fig. 6は薄層クロマトグラフィーによるMF1の分子量測定を示す。MF1はモノピークで標準蛋白の移動距離との比較から分子量約26,000と算出された。

Fig. 7はSDSゲルを用いたポリアクリルアミド

ゲル電気泳動によるMF1の泳動パターンである。2本のバンドが観察される。チトクロームC及びヒストンの標準蛋白の移動距離との比較から約夫々11,000, 15,000の分子量を有していると算出された (Fig. 8)

Table 1はMF1の塩酸加水分解によるアミノ酸組成を示す。酸性アミノ酸23.3%塩基性アミノ酸は

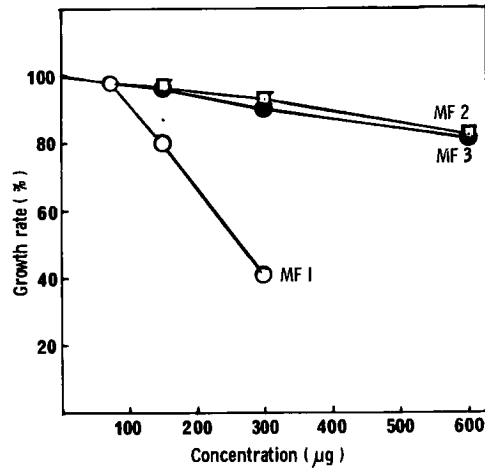


Fig. 2. Antimitotic effect of MF1, MF2 and MF3 on the growth of L-929 cells

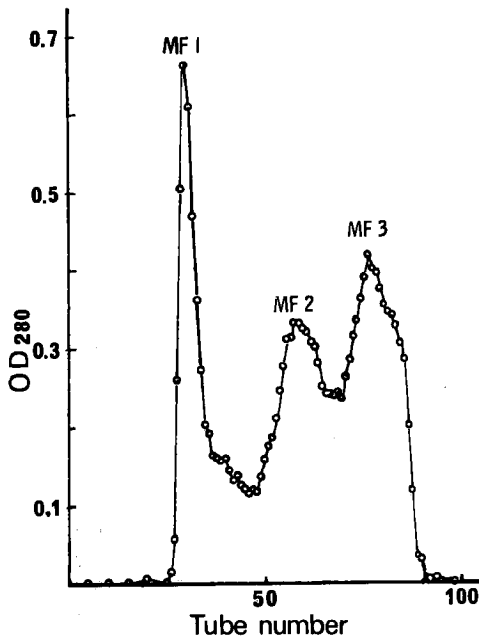


Fig. 1. Elution pattern of RLMC by gel filtration through Sephadex G-50 column.

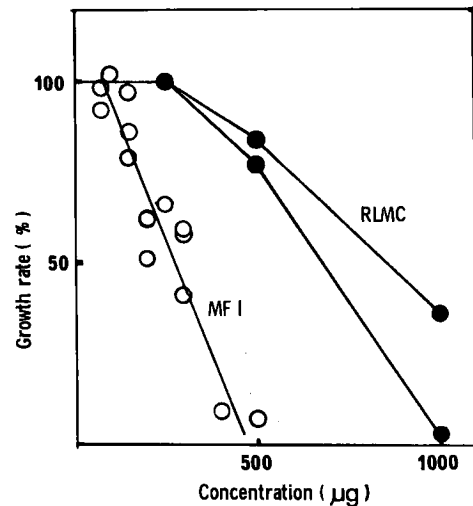


Fig. 3. Antimitotic effect of MF1 and RLMC on the growth of L-929 cells

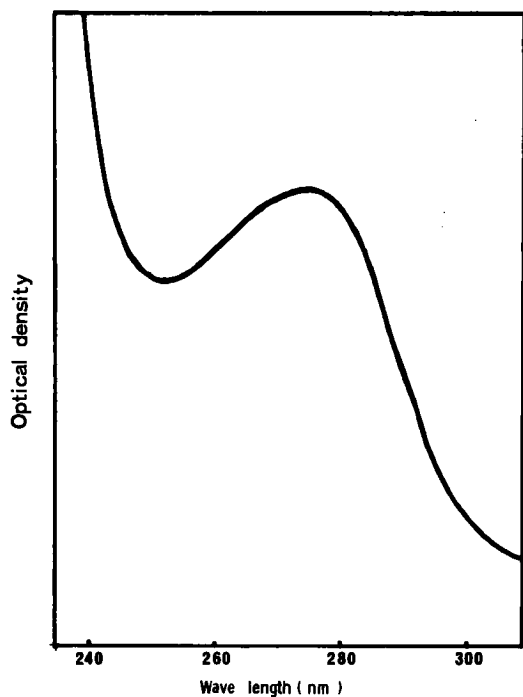


Fig. 4. Ultraviolet absorption spectrum of MF₁

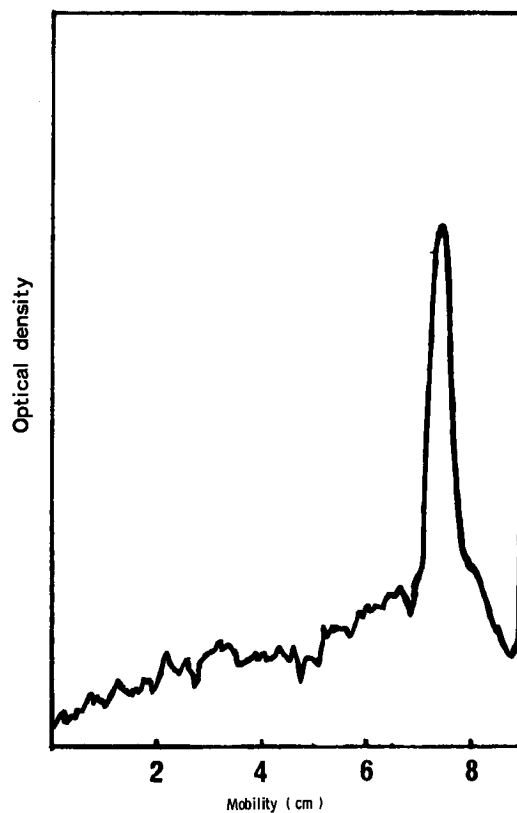


Fig. 5. Electrophoretic pattern of MF₁ in 7.5% polyacrylamide gel (Standard gel pH 8.6)

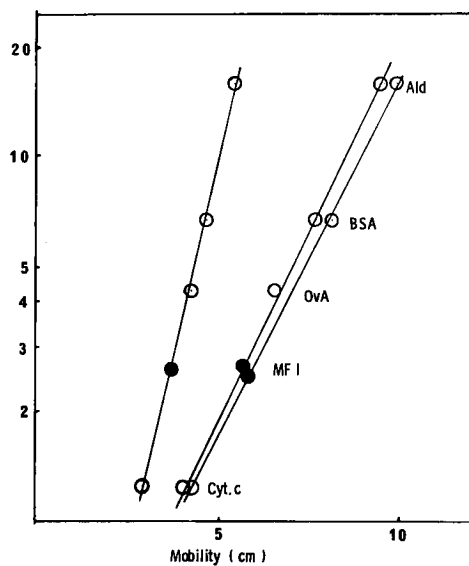


Fig. 6. Molecular weight estimation of MF₁ by thin layer gel filtration
ordinate : molecular weight ($\times 10^4$)
Ald : aldolase, BSA : bovine serum albumin,
OvA : ovalbumin, Cyt.c : cytochrome C (three experiments)

Table 1.
Amino acid composition of MF₁

Amino acid	Percent in moles
arginine	4.9
histidine	trace
lysine	9.9
phenylalanine	3.8
tyrosine	1.4
leucine	8.5
isoleucine	3.8
methionine	trace
cysteine	trace
valine	6.3
alanine	9.6
glycine	9.9
proline	5.8
glutamic acid	11.8
serine	7.1
threonine	5.5
aspartic acid	11.5

14.8%, 含硫アミノ酸は微量であった。

Table 2 は MF1 の蛋白質分解酵素による処理効果を示している。蛋白質分解酵素 Nagarse の 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の処理により, MF1 の細胞分裂抑制効果は著しく減弱する。

考 察

肝抽出物に含まれる細胞分裂抑制因子に関する研究は今迄に数多く報告されている。⁷⁻²¹⁾

細胞分画法を用いた各細胞分画中に存在する細胞分裂抑制活性を有する熱に不安定な因子については肝上清画分については Holley²²⁾ の報告, 小胞体画分については Stich ら¹⁹⁾, Goutier²⁰⁾ らおよび Inaba ら²¹⁾ の報告がある。熱に安定な因子については,

chalone と総称される主として上清画分より抽出される因子が報告されている。^{22, 23)}

本論文で報告したラット肝小胞体画分より抽出されるラット肝小胞体コルニンは熱に安定な蛋白性の因子で約26,000の分子量を有し, 更に SDS 処理により15,000および11,000の分子量を有する2つの成分に分かれる。この因子はアミノ酸組成において, 酸性アミノ酸を多く含むが含硫アミノ酸及びヒスチジンを微量しか含んでいない。L-929 細胞の増殖抑制効果は, 50%の増殖を抑制する比活性にして 260 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり, 組織抽出物として得られた当初のコルニンの比活性 5 mg/ml 比較すると約 20 倍, Ohtsuki²⁴⁾ が報告した牛肝臓コルニンよりも約10倍, 最近 Inaba ら⁹⁾ が報告した RLCC の Fraction I

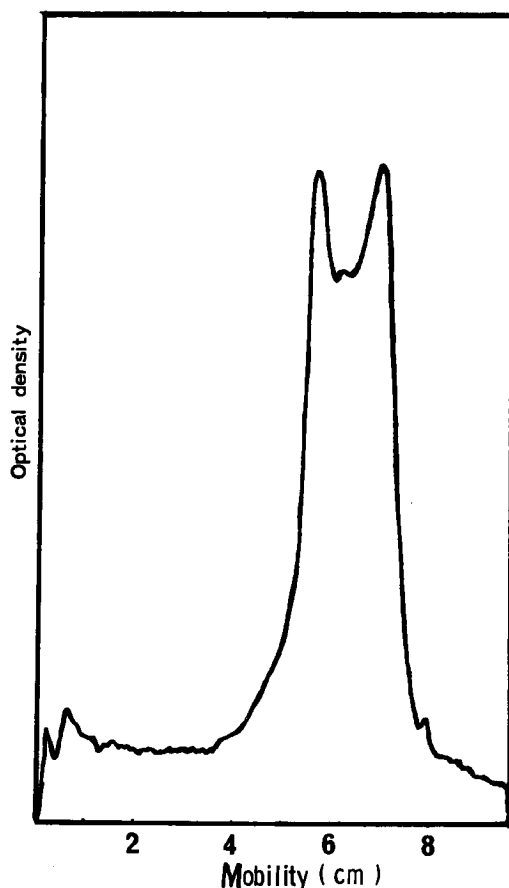


Fig. 7. Electrophoretic pattern of MF1 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

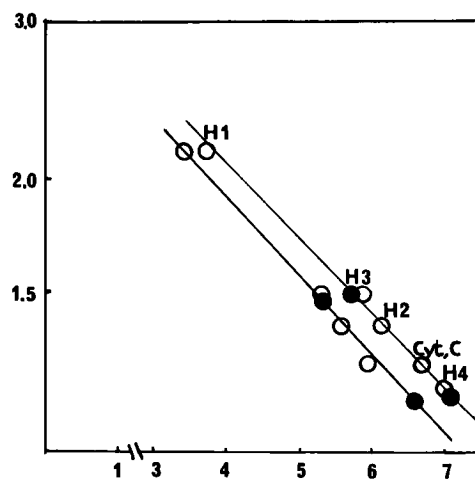


Fig. 8. Molecular weight estimation of two components separated by SDS treatment.
abscissa: mobility (cm)
ordinate: molecular weight ($\times 10^4$)
●; SDS-treated MF1, ○; marker protein (histones and cytochrome C) (two experiments)

	Growth rate (%)
none (GM) *	100
MF1 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	38.4
Protease (9 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	86.4
MF1 + Protease	71.6

*GM: growth medium (MEM supplemented with 10% serum)

Table 2. The inhibitory effect of MF1 with protease treatment on the growth of L-929 cells

(SF₁と称)の約2倍比活性が高く、今迄に報告されたコルニン中最大の比活性を有している。

MF₁は蛋白質を主成分とするが約10%の糖が検出される。この糖は薄層クロマトグラフィーで調べた結果グルコースと同定された。小胞体画分中にはグリコーゲンが混在することはよく知られている。ゲル濾過により得られるMF₁溶液には、グリコーゲンが混在していると思われる乳白色の色がついており、同定されたグルコースは、グリコーゲンが塩酸水解により分解されたものと考えられる。このグリコーゲンの由来は、熱抽出の際に上清に溶出してきたものと推測される。

ポリペプチドが細胞の増殖に関係していることは、Fryklundら²⁴⁾の人血清中に存在する分子量5,000のポリペプチドが細胞の増殖を促進するという報告、Glickら²⁵⁾のHeLa細胞等の表面膜から細胞分裂を阻害するペプチドが得られるという報告、Verly一派ら^{22,23,26)} Sekesら²⁴⁾ Okulovら²⁸⁾のhepatic calone等があるが、MF₁はこれらのポリペプチドとは異なる物質である。しかしこのように細胞の内外に複数個の分子量の異なる蛋白性因子の存在は、細胞内における細胞分裂調節機構が単純なものではなく、数多くの因子によって細かく調節されていることが推測される。

同一組織から精製されたMF₁とSF₁を比較すると、どちらも蛋白性の因子で分子量は夫々26,000及び25,000、とよく似ており、SDS処理で分離される2つのサブユニットのうち、15,000の分子量を有する成分に共通点が見られる。アミノ酸組成においては、酸性アミノ酸を多く含む点では共通点があるが、塩基性アミノ酸はMF₁の方が多く含まれている。SF₁はウニ受精卵に対する強い卵割抑制効果を有するがMF₁はこの効果が比較的弱い。しかし、MF₁はL細胞の増殖抑制効果では約2倍強い。SF₁及びMF₁は100gのラット肝臓から夫々35mg, 1.3mg回収されSF₁はMF₁の約27倍回収率が高い。このように詳細な点ではSF₁とMF₁は異なっているが、この両物質はかなり関係が深いと推測される。

本研究は、組織より抽出される熱に安定な70~90%の冷エタノールで沈澱する画分(コルニン画分)の精製とその化学的性質を明らかにすることを目的

としてきた。今後はコルニンがいかなる作用機作で細胞の増殖を抑えているか、更に本実験で用いた細胞分画法は簡便な方法であり、より精密な細胞分画法に従って細分画してコルニンを単離精製し、コルニンの産生の場合及び産生の機構などについて調べることにより、細胞分裂の調節機構にコルニンがどのように関与しているかを解明していくことが今後の重要な課題である。

結 論

ラット肝小胞体画分よりコルニン画分を抽出し、その精製を試みた。更にこの精製コルニン(MF₁)のアミノ酸組成及び、薄層クロマトグラフィーやポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分離及び分子量測定などを行いその化学的性状について調べた。

1. ラット肝小胞体コルニン画分(RLMC)はL929細胞の分裂を抑制する。このRLMCを更にSephadex G-50カラムにより精製分離を試みMF₁を得た。

2. MF₁がL細胞の分裂を50%抑制する濃度は270μg/mlであり今迄に報告されたコルニン画分中最高の比活性を示した。

3. MF₁のアミノ酸組成は酸性アミノ酸を23%も含み、ヒスチジン及び含硫アミノ酸の含量は極めて低かった。

4. MF₁は276nmに紫外外部吸収を示し蛋白質を主たる成分としており、蛋白質分解酵素の処理により抑制効果は著しく減弱した。

5. MF₁はポリアクリルアミドゲル電気泳動法(標準ゲル)や薄層ゲル濾過ではモノピークを示し、後者により算出された分子量は約26,000であった。

6. MF₁はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により2つの主バンドに分かれ、分子量は夫々15,000, 11,000と算出された。MF₁はこれらの成分が1:1の割合で成り立っていると推定される。

謝 辞

稿を終るに当たり、終始御懇篤な御指導を賜った恩師西田勇教授と研究遂行上の有益な討論及び示唆を頂いた稲葉耕三博士及び教室員一同に心から深謝致します。

参 考 文 献

- 1) 西田勇, 中山沃, 福井三男, 三好実三, 浜村寛; 動眼神経切断後に見られる奇異なる縮腫現象について, 米米子医誌, **9**, 545-550, 1958.
- 2) Ohtsuki, H.; Studies on the cornin extracted from bovine liver I. Purification of the cornin and its physico-chemical properties. *Acta Med. Okayama*, **28**, 1-6, 1974.
- 3) 土井昭孚; 細胞分裂抑制物質肝コルニンの研究. 1. L細胞の形態と付着性に及ぼす肝コルニンの影響, 岡山医誌, **88**, 383-390, 1976.
- 4) 西田勇, 村上哲英; 組織から抽出される細胞分裂調節物質について, 日本生理誌, **34**, 131-146, 1972.
- 5) 土井昭孚, 稲葉耕三, 西田勇; 細胞増殖抑制物質の検定系の検当及びL細胞に及ぼす肝コルニンの効果, 岡山医誌, **88**, 391-395, 1976.
- 6) Inaba, K., A. Doi and I. Nisida; Purification and some characteristics of liver cytosol cornin, an antimitotic substance from rat liver cytosol. *Acta Med. Okayama*, **31**, 203-209, 1977.
- 7) Brues, A. M., Y. Subbarow, E. B. Jackson and C. A. Joseph; Growth inhibition by substances in liver, *J. Exp. Med.*, **72**, 423-438, 1940.
- 8) Druckrey, H. and D. Schmahl, D. Stenhoff, M. Rajewsky, P. Bannasch and T. Flaschenträger; Cytolysierende von Extrakten aus normalen Gegeben auf verschiedene Tumoren der Ratte. *Z. Krebsforsch.*, **63**, 28-56, 1959.
- 9) Katsuta, H. and T. Takaoka; Macromolecular requirements of normal and malignant cells — Analysis with tissue culture —. *Symposia Cell Chem.*, **10**, 91-104, 1960.
- 10) Mori, M. and J. Ukita; Inhibition in vitro of growth rat ascites tumor cells by bovine liver extract, *J. Biochem.*, **51**, 322-334, 1962.
- 11) Sasada, M. and H. Terayama; The nature of rat liver inhibitors of DNA synthesis in hepatoma cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **190**, 62-67, 1969.
- 12) Holley, R. V.; Evidence that a rat liver "inhibitor" of the synthesis of DNA in cultured mammalian cells is arginase. *Biochim. Biophys. Acta*, **145**, 525-527, 1967.
- 13) Nilsson, G. and L. Philipson; Thymidine and uridine metabolism at cell growth inhibition of HeLa cells by human liver extract. *Exp. Cell Res.*, **51**, 275-290, 1968.
- 14) Nilsson, G.; Cell growth inhibition of human cell line by human tissue extracts. *Exp. Cell Res.*, **59**, 207-216, 1970.
- 15) Suzuki, S.; The growth-inhibiting substances in liver extract on rat ascites hepatoma cells in tissue culture. *Japan J. Med.*, **29**, 341-353, 1959.
- 16) Terayama, H. and M. Sasada; Activity of the cell-sap factor inhibiting DNA synthesis of rat ascites hepatoma cells in normal tissues, various malignant and minimal deviation hepatomas, as well as livers during the course of carcinogenesis. *GANN*, **59**, 51-59, 1968.
- 17) Nakahara, W. and F. Fukuoka; Arcinostatic liver factor I. Effect in vitro of homologous liver extract on viability of Ehrlich ascites carcinoma cells. *GANN*, **52**, 197-202, 1961.
- 18) Ohtsuka, H.; *J. Jap. Biochem. Soc.*, **40**, 431-432, 1968.
- 19) Stich, H. F.; Regulation of mitotic rate in mammalian organisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **90**, 603-609, 1960.
- 20) Goutier, R. and I. Bologna; Localisation intracellulaire, dans le foie de rat d'un facteur inhibiteur de la synthèse de l'acide desoxyribonucléique in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, **72**, 40-47, 1963.

- 21) Inaba, K. A. Doi and I. Nisida; Cell growth inhibiting factor in rat liver microsomes. *Cell Struct. Func.* 2, 151-158, 1977.
- 22) Verly, W. G., Y. Deschamps, J. Pushpathadam and M. Desrosiers; The hepatic chalone I. Assay method for the hormone and purification of the rabbit liver chalone. *Can. J. Biochem.*, 49, 1376-1383, 1971.
- 23) Simard, A., L. Corneille, Y. Deschamps and W. G. Verly; Inhibition of cell proliferation in the livers of hepatectomized rats by a rabbit hepatic chalone. *Nat. Acad. Sci., USA*, 71, 1763-1766, 1974.
- 24) Fryklund, M., K. Uthne and H. Sievertsson; Isolation and characterization of polypeptides from human plasma enhancing the growth of human normal culture. *BBRC*, 61, 950-956, 1974.
- 25) Glick, M. C.; Biology and chemistry of eukaryotic cell surfaces. *Miami Winter Symposium*, 7, 213-240, 1975.
- 26) Deschamps, Y. and W. G. Verly; *Biomedicine*, 22, 195, 1975.
- 27) Sekas, G. and R. T. Cook; The isolation of a low molecular weight inhibitor of [³H]-TdR incorporation into hepatic DNA. *Exp. Cell Res.*, 102, 422-425, 1976.
- 28) Okulov, V. B. and L. I. Chelulaeva; *Arkh. Anat. Gistol.*, 70, 106, 1976.

Studies on the cornin extracted from liver
2. Purification of the rat liver microsomal cornin
and its chemical properties

by

Akitaka DOI

Department of Physiology, Okayama University Medical School, Okayama

A crude cornin extracted from rat liver microsomes and the chemical properties of the purified cornin (MF1) were investigated.

1. Crude rat liver microsomal cornin (RLMC) inhibits the growth of L-929 cells. MF1 is purified about 4 fold from RLMC by gel filtration through Sephadex G-50 column.
2. The concentration of MF1 that inhibits the growth of L cells to 50% is 270 μ g/ml and this specific activity is the highest of the cornin fractions reported up to date.
3. The content of acidic amino acids is more than 23% but that of histidine and sulfur-containing amino acids is very low in MF1.
4. MF1 shows the maximum ultraviolet absorption at 276nm and its main substance is a kind of protein, and its inhibitory effect on the cell growth diminishes by protease treatment.
5. MF1 is a single peak both by polyacrylamide gel electrophoresis and by thin layer gel filtration and the molecular weight is calculated about 26,000.
6. MF1 is separated in two bands by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and the molecular weight is estimated to be 11,000 and 15,000 respectively.