コイ血清のアルブミン様蛋白質

穂坂桂一郎

日本医科大学第1生化学教室(指導: 宿谷良一教授)

緒言

系統発生学的に哺乳類¹⁾, 爬虫類²⁾, 鳥類^{4,5)}, 両棲類までの動物の血清中にアルブミンが存在することは物理化学的に確かめられている。

しかし, 魚類の血清中にアルブミンが存在するという確実な証拠はない。現在までのところアルブミンに対して明確な定義はなく, 高等動物においてはゾーン電気泳動で fastest migrating component であることが重要な性質の1つとされている。コイ血清では, セルロースアセタイトおよび免疫電気泳動において fastest migrating component はアルブミンとは異なった蛋白質であることを先の論文⁶⁾で明らかにした。しかし, コイ血清中にディスク電気泳動で高等動物のアルブミンとほぼ同じ位置に泳動される蛋白質が存在する。しかも, 興味深いことにその蛋白質は下等動物になる程その量が少ない。言い換えれば, この蛋白質は系統発生学的に高等になるにしたがってその量が増加する傾向にある。そこで, 著者は血清アルブミンの分子進化という観点からヒトアルブミンとほぼ同じ位置に泳動される蛋白質をコイ血清から精製し, その物理化学的性質を調べた。その結果, この蛋白質は他の動物のアルブミンと良く似た性質を有することが分かったので報告する。

実験材料および方法

東京都中央区築地の野沢屋商店より購入したコイを使って, 前報⁶⁾に記したように血清を採った。

蛋白濃度の測定には, Lowry 氏による銅 Folin 法⁷⁾により結晶ウシ血清アルブミンを基準として測定した。

Ampholine carrier ampholyte は LKB 製, セル

ロースアセタイト (Separax) は富士フィルム製, Sephadex (G-25 および G-100) は Pharmacia 製, DEAE セルロースは Serva 製のものを使用した。DTNB は和光純薬のものを使用した。

電気泳動: ディスク電気泳動は Davis の方法⁸⁾にしたがい, ポリアクリルアミドゲル(細孔ゲル濃度 7.5%, pH 8.9)を支持体として行なった。泳動条件は 0.38 M グリシン緩衝液 (pH 8.3) を用い, 試料がゲル内に入るまで, 1 管当り 2 mA, その後 1 管当り 4 mA の電流をかけ泳動を行なった。泳動に使用した試料はヒト, カエル, コイ, ウナギ各全血清の 30 倍希釈液 0.08 ml およびカラムクロマトグラフィーの分画, 塩析ろ液を蒸留水で透析したもの, TCA・メタノール液に溶解する蛋白質を含む水溶液などをそれぞれ適当に濃縮または希釈したもの 0.08 ml におおの 60%グリセリン 0.02 ml を加えたものを用いて分離用ゲルに直接のせて泳動を行なった。蛋白質は 1%アミドブラック, 糖は Schiff の試薬を用いて染色を行なった。

また, 分子量を測定するために Shapiro 氏の方法⁹⁾にしたがって SDS ディスク電気泳動を行なった。免疫電気泳動およびセルロースアセタイト電気泳動は前報に記載した条件にしたがって行なった⁶⁾。

抗血清: 抗コイ血清の作製は, コイ全血清 0.5 ml と等量の complete Freund's adjuvant (Difco) を emulsion とした抗原乳剤 1.0 ml をウサギの四肢の足蹠皮内に分割して注射し, ブースター後, 前報に記したと同じ方法でえた⁶⁾。

等電点分画: 等電点分画法は LKB 社製の 110 ml カラムを用い, この中にそれぞれの濃度勾配をもった ショ糖と carrier ampholyte の混合溶液 (dense solution と less dense solution をいろいろな割合に混合する) を充填する。Carrier ampholyte は LKB の pH 4~pH 6 のものを使用し, 試料は図 5 の C のビークの横棒の部分の分画を集めコロジオンパックを用いて約 2 ml に濃縮したものをカラムのほぼ中間に位

HOSAKA, KEIICHIRO

略号 DTNB: 5, 5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid),
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate, TCA: Trichloro-
acetic Acid

置るように分割して加えた。泳動条件は最初の1時間は 300 V、その後 400 V の電圧をかけ 22 時間通電した。

通電後カラムを開放し、スピッツグラスに 2.7 ml ずつ分画し、280 nm の紫外外部吸収で蛋白質の存在および量を記録し、それぞれの分画液について pH を測定した。また、ディスク電気泳動で目的の蛋白質のある部分を確認し、その分画を蒸留水で透析後濃縮してから Sephadex G-25 のカラムを用いてショ糖および carrier ampholyte を含まない標品をえた。

チオール基の測定：SH 基の測定は、まず精製したアルブミン様蛋白質の水溶液約 0.5 ml を 2 μM のメルカプトエタノールを含有する 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 2,000 ml で透析した試料 (1.35 mg/ml) 0.2 ml, 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 0.66 ml を 1 ml のキューベットに加え、続いて 10 mM DTNB 0.04 ml を加え攪拌して反応させる。DTNB を加えた直後から波長 412 nm の吸収の時間経過に伴う変化をキャリー自記分光光度計モデル 14 を用いて記録し、反応が終わってから 1% SDS 溶液 0.1 ml を加え、引き続き波長 412 nm の吸収を記録した。SH 基の量は 1 M の DTNB 溶液の波長 412 nm における分子吸光係数が 13,600 として計算した¹⁰⁾。

アミノ酸分析：加水分解用のガラス管に精製したアルブミン様蛋白質 (0.28 mg/ml) 0.2 ml, 蒸留水 0.2 ml, 8 N HCl 1.2 ml を加え真空にしてガラス管を熔封した。加水分解は 110°C で 24, 48, 73 時間行なった。アミノ酸分析は Moore & Stein の方法¹¹⁾にしたがって、JEOL 全自動アミノ酸分析機 JLC-6 AH を用いて行なった。

塩析は Howe の方法¹²⁾にしたがって行なった。0% から 100% までの適当な飽和度の Na₂SO₄ 溶液を調製し、その 4.0 ml とコイ血清 0.2 ml をスピッツグラスに加えよく混合し、37°C の恒温槽中に約 1 時間放置後東洋紙 No. 6 で沈殿した蛋白質を除去し、ろ液中の蛋白量を紫外外部吸収スペクトル法 (280 nm の吸光度測定) およびビュレット法 (ビュレット試薬で発色後 540 nm の吸光度測定) の二つの方法で測定した。これらの操作はすべて 37°C で行なった。

TCA メタノール抽出：Michael の方法¹³⁾にしたがって行なった。まず 0.5 N TCA を含有する 90% メタノール液 (TCA・メタノール液) を調製し、コイ血清 1 ml と TCA・メタノール液 10.0 ml を試験管内で約 30 分間攪拌後 0°C で 10,000 rpm/min, 15 分

の遠心を行ない、上清をビーカーにとり 0.5 N NaOH を加え pH 5.4~5.6 に上げ TCA・メタノール液に溶解している蛋白質を沈殿させる。つぎに 0°C で 10,000 rpm/min, 15 分の遠心後上清を捨て沈殿を 2 ml のペロナール緩衝液 (0.05 M, pH 8.6) に溶解し、同緩衝液 2,000 ml で透析した。透析した試料は適当に希釈してディスク電気泳動を行なった。

実験結果

1. 血清蛋白質の分画

1. セルロースアセテイト電気泳動

図 1 セルロースアセテイト電気泳動像

使用した試料：(A), コイ全血清 2 μl (B), 精製したアルブミン様蛋白質 (1.45 mg/l) 8.8 μl。泳動条件：ペロナール緩衝液 (0.05 M, pH 8.6) を用い、0.7 mA/cm で 55 分間泳動した。

図 1 (A) はコイ全血清 2 μl を矢印の部位にのせ電気泳動を行ないボンソー 3 R で染色後デンストメトリーを行なった結果である。コイ血清の fastest mig-

図 2 ディスク電気泳動像

A: ヒト, B: カエル, C: コイ, D: ウナギの各血清 30 倍希釈液, E: 精製したアルブミン様蛋白質, F: 70% 飽和硫酸ソーダの塩析ろ液を蒸留水で透析したもの, G: TCA・メタノール液に溶解する蛋白水溶液。

泳動条件：1 管当り 4 mA で tracking dye がゲルの底にくるまで泳動した。

rating component はアルブミンではないことが明らかにになっているが、原点と fastest migrating component の間に泳動される蛋白質の中に高等動物のアルブミンに相当する蛋白質のある可能性が考えられる。すでに前報でのべたようにこの種の電気泳動像からは明らかにアルブミンと同定される蛋白質はみられない。

2. ディスク電気泳動

(i) 図2(C)にコイ全血清のディスク電気泳動像を示した。図からわかるようにコイおよびウナギの血清中にヒトおよびカエルのアルブミンとほぼ同じ位置に泳動される蛋白質が存在し、興味深いことにヒト、カエル、コイ、ウナギと下等になるにしたがってその量が少なくなることがわかる。なお、コイのこの成分の血清内濃度はデンシトメトリーでトレースしたあと、そのトレーシング paper の紙の重さを計ってきた。スタンダードとしてカエルのアルブミン(5 mg/ml)を使うと、コイのこの成分は1.0~2.0 mg/ml でヒトのアルブミンの数十分の一の濃度である。

(ii) TCA・メタノール液に溶解する蛋白質：一般に血清蛋白質の中でアルブミンだけが0.05 N TCAを含有する90%メタノールに溶解するといわれている。図2(G)は材料および方法の項に示した方法によってえられた試料の4倍希釈液を用いてディスク電気泳動を行なったものである。これにより、TCA・メタノール液に溶解するのはアルブミンの位置に泳動される蛋白質とその他に2~3の蛋白質がみられる。

(iii) 塩析の結果：図3は硫酸ソーダによるコイ血清の塩析曲線で、横軸に硫酸ソーダの飽和度がとっており、縦軸には上清中に残っている蛋白質量を百分率

図3 塩析曲線

縦軸に塩析ろ液中の蛋白量、横軸に硫酸ソーダの飽和度
(○-○-) : 280 nm の吸光度, (●-●-) : 540 nm の吸光度

で目もった。矢印のところで新しい種類の蛋白質が沈澱し始める。また、この図から、60%飽和で沈澱し始める蛋白質があるが、それ以上の飽和で沈澱し始めるものはみかけ上ない。図2(F)は70%飽和の硫酸ソーダ溶液の塩析ろ液を蒸留水で透析後約4倍に濃縮し電気泳動を行なったものである。これから、塩析により最後に沈澱してくるものの一つにアルブミンの位置に泳動される蛋白質があることがわかる。すなわち、ディスク電気泳動で哺乳類のアルブミンの位置に泳動される蛋白質は比較的高い溶解性を持っている。

以上の結果から、コイ血清中のディスク電気泳動でアルブミンの位置に泳動される蛋白質(以後、アルブミン様蛋白質と呼ぶ)が高等動物のアルブミンに相当するものである可能性が考えられる。したがって、このアルブミン様蛋白質を精製し、その物理化学的性質を調べた。

2. アルブミン様蛋白質

1) 精製：あらかじめ5 mMリン酸緩衝液(pH 7.4)で平衡した Sephadex G-100 のカラム(2.5×87 cm)にコイ血清 4.0 ml をのせ、同緩衝液を流して蛋白質の溶出を行なった。

図4 コイ血清の Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィーの溶出曲線(各分画は3.0 ml)

図4はその溶出曲線であり、各分画は3.0 mlである。各分画についてディスク電気泳動を行なってアルブミン様蛋白質は図の3番目のピークのところに溶出されることを確かめた。したがって3番目のピークの

図中横棒の各分画を集め、上記緩衝液で平衡した DEAE・セルロースカラム (2.4×10.7 cm) に吸着させ 5 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 500 ml と 50 mM リン酸緩衝液 (pH 5.7) 500 ml で pH およびイオン強度の勾配をかけ蛋白質の溶出を行ない、引き続き 50 mM リン酸一ナトリウム 1,000 ml を流して残っている蛋白質の溶出を行なった。

図 5 1 回目の DEAE・セルロースカラムクロマトグラフィーの溶出曲線
図 4 のピーク III の横棒の部分の各分画を用いた。各分画は 10.0 ml。

図 5 はその溶出曲線であり、各分画は 10.0 ml である。各分画についてディスク電気泳動を行なった結果、アルブミン様蛋白質は図 5 のピーク C に溶出されることを確かめた。つぎに図 5 のピーク C の横棒の部分の分画を集め約 2.0 ml に濃縮し、pH 4~pH 6 の carrier ampholyte を用い 22 時間等電点分画を行なった。

図 6 等電点分画像

左側の縦軸は 280 nm の吸光度 (●—●—), 右側の縦軸は pH (—○—○—). (↓) 印はアルブミン様蛋白質の集まっている分画。

図 6 はその結果を示したものである。各分画についてディスク電気泳動を行なった結果、アルブミン様蛋白質は分画番号 25~30 番に存在し、しかもこの分画のピークが対称的であることおよび染色される Band は 1 本のみであることから、この段階までの操作でアルブミン様蛋白質が精製されたと考えられる。引き続き、図 6 の 25~30 番の各分画を蒸留水で透析後約 2 ml に濃縮し、5 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡した Sephadex G-25 のカラムでショ糖および ampholyte を完全に除去した。この標品はディスク電気泳動で均一であった (図 2 (E))。

等電点分画法のかわりに 2 回目の DEAE・セルロースカラムクロマトグラフィーを行なっても均一の標品がえられる。すなわち、図 5 のピーク C に相当する各分画を集め、0.1 N NaOH で pH 7.1 にし蒸留水で 5 倍に希釈してから 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.1) で平衡した DEAE・セルロース・カラム (3.0×6.4 cm) に吸着させ、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.1) 500 ml と 0.4 M NaCl を含有する同緩衝液 500 ml で食塩濃度の直線的濃度勾配をかけて蛋白質の溶出を行なった。

図 7 はその溶出曲線であり、各分画は 9.1 ml である。図中横棒で標識した分画はディスク電気泳動で均一であり、泳動された位置はヒトアルブミンとほぼ同じ位置であった。図 7 の分画番号 25~40 番を集め、2,000 ml の蒸留水で 3 回透析後コロディオンバックを用い氷冷中で約 2 ml に濃縮しアミノ酸分析を行なった。また、上記とまったく同じカラムクロマトグラフィーの操作でえられた蛋白質についてセルロースアセテイト電気泳動、免疫電気泳動および SH 基の測定を行なった。

図 7 2 回目の DEAE・セルロースカラムクロマトグラフィーの溶出曲線

2) セルロースアセテイト電気泳動: 図 1 (B) は精製した標品を 0.1%メルカプトエタノールを含む 50 m

M リン酸緩衝液 (pH 7.1) 2,000 ml で透析したもの (蛋白濃度 1.45 mg/ml) 8.8 μ l を矢印の位置にのせ電気泳動を行なったものである。これからデンストメトリーで描かれる曲線は対称的で, fastest migrating component の少し陰極側に泳動される酸性蛋白質であることがわかる。

図 8 免疫電気泳動像

上半分にコイ全血清 12 μ l 下半分に精製したアルブミン様蛋白質 (3.9 mg/ml) 12 μ l をのせた。泳動条件: 室温, 3 mA/cm で 105 分間泳動した。左: 陽極, 右: 陰極

3) 免疫電気泳動: 図 8 は精製した標品をペロナール緩衝液 (0.05 M, pH 8.6) で透析したもの (蛋白濃度 3.9 mg/ml) 12 μ l を用いて免疫電気泳動を行なった結果である。1 本の沈降線が現われ, 精製された蛋白質が純粋でしかも比較的高い移動度をもつことを示している。

4) 等電点: 等電点分画法 (図 6) によりアルブミン様蛋白質は pH 5.22 に溶出されたので等電点 5.22 である。

図 9 SDS ディスク電気泳動像

縦軸は蛋白質の分子量の対数, 横軸は蛋白質の移動度である。白丸はアルブミン様蛋白質の位置である。

5) 分子量: 図 9 はアルブミン様蛋白質の分子量を決めるために行なった SDS ディスク電気泳動の結果を縦軸に分子量の対数, 横軸に蛋白質の移動度をとって示した。これからアルブミン様蛋白質は 59,000 と計算される。なお, 標準蛋白質としてウシ血清アルブ

ミン (分子量 68,000), 卵白アルブミン (分子量 43,000) を使った。また, 凍結溶解をくり返してウシ血清アルブミンの多量体をつくらせた。

図 10 チオール基の測定

左縦軸に 412 nm の吸光度, 右縦軸に分子当りのチオール基の数, 横軸に時間経過 (分) を示してある。

6) チオール基の測定: 図 10 は精製した試料約 0.5 ml を 2 μ M のメルカプトエタノールを含有する 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 2,000 ml で透析したもの (蛋白濃度 1.35 mg/ml) 0.2 ml と 10 mM DTNB 0.04 ml を材料および方法の項に示した方法で反応させ, 412 nm の吸光度の時間経過に伴う変化を, 縦軸に 412 nm の吸光度, 横軸に時間をとり示したものである。アルブミン様蛋白質の反応液中の濃度は分子量 59,000 とすると 5 μ M であり, 反応が終了ときの吸光度は 0.06 であることおよび 1 M 濃度の DTNB が SH 基と反応すると 412 nm における吸光度は 13,600 であることから 0.06 の吸光度を示す DTNB の濃度は 0.44 μ M である。したがって, アルブミン様蛋白質 1 分子中に遊離の SH 基が 0.88 個あると計算される。この場合蛋白質量を Lowry 法で測ってあるので, その誤差を考えると 1 分子当り 1 個あると思われる。そして SDS を加えても変化しないことから分子中に埋没されている SH 基はないものと考えられる。

7) アミノ酸分析の結果: 表 1 はコイのアルブミン様蛋白質およびヒト, ウシガエル (ウシ) のアルブミンのアミノ酸分析の結果を示したものである。この表より, コイのアルブミン様蛋白質ではグリシン, アスパラギン酸が多く, アルギニン, チロシン, プロリンが少ないことが特徴である。また, ヒト, ウシガエルのアルブミンと比較すると, リジン, ヒスチジン, アスパラギン酸, バリンなどの値は比較的類似しているが, セリン, グリシン, メチオニンはヒト, ウシガエルの値に

表 1 Amino acid analysis

Amino acid	Carp	Bullfrog*	Human**
Lysine	46	55	62
Histidine	25	23	16
Ammonia	—	38	34
Arginine	9	22	24
Aspartic acid	59	58	51
Threonine	32	18	24
Serine	52	24	19
Glutamic acid	52	96	78
Proline	15	20	26
Glycine	70	20	12
Alanine	40	46	62
Valine	33	29	41
Methionine	25	12	6
Isoleucine	25	31	8
Leucine	38	54	60
Tyrosine	13	23	17
Phenylalanine	20	22	30
Half-cystine	—	32	37
Tryptophan	—	4	1

数値は1分子中の各アミノ酸残基の数を示したものである。
* 文献 14), ** 文献 15)

比して高く、アルギニン、グルタミン酸の値は低いことが分かる。

8) その他: コイ全血清 25 倍希釈液を用いてディスク電気泳動後 Schiff の試薬で染色を行なったがアルブミン様蛋白質は染色されなかった。すなわち、この蛋白質は単純蛋白質であると考えられる。

考察

これまでにえられている高等動物の血清アルブミンとディスク電気泳動で同じ位置に泳動されるコイ血清中の蛋白質(アルブミン様蛋白質)の物理化学的性質を検討した。その結果、既知のアルブミンの性質と異なる点として、1) ゾーン電気泳動で fastest migrating component ではない(図 1(B), 図 8) ことがあげられる。しかし、類似した点として、① Schiff の試薬で染色されないこと。すなわち、単純蛋白質である。② ディスク電気泳動で他の動物のアルブミンとほぼ同じ移動度をもつ(図 2)。③ 分子量は少し小さいが 59,000 である(図 9)。④ 等電点が 5.22 である(図 6)。⑤ 塩析で最後に沈澱してくる蛋白質の一つである(図 2(F), 図 3)。⑥ TCA・メタノール液に溶解する蛋白質の一つである。⑦ 1 分子中に遊離の SH 基を 1 個もつ(図 10)。⑧ ゾーン電気泳動で fastest migrating component ではないが、比較的速く泳動される(図 1(B), 図 8) などのことがあげられる。

以上のことから、コイ血清中のアルブミン様蛋白質は分子量は少し小さいが、高等動物のアルブミンに相当するものであらうと考えられる。そして、興味深いことにこの蛋白質は図 2 に示してあるように高等になるにしたがってその量が増加する傾向にある。

結論

コイ血清中にはディスク電気泳動で高等動物のアルブミンとほぼ同じ位置に泳動される蛋白質がある。この蛋白質を Sephadex G-100, DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーおよび等電点分画法を用いて精製し、その物理化学的性質を調べた結果、以下の理由から他の動物で知られている血清アルブミンと類似したものであると考えられる。

- 1) 等電点を pH 5.22 にもつ分子量 59,000 の単純蛋白質である。
- 2) ディスク電気泳動でアルブミンとほぼ同じ位置に泳動され、セルロースアセテイトおよび免疫電気泳動で fastest migrating component ではないが陽極側に比較的速く泳動される。
- 3) 塩析で最後に沈澱する蛋白質の一つである。
- 4) TCA・メタノール液に溶解する。
- 5) 1 分子中に 1 個の SH 基をもっている。

稿を終るに臨み、本実験に終始ご協力を賜った第 1 生化学教室長野弘講師ならびに教室員各位に深く感謝します。

文献

- 1) Schultze, H.E., and Heremans, J.F.: Survey of the plasma proteins. in Molecular Biology of Human Proteins. 1, 173, Elsevier Publishing Co., Amsterdam, 1966.
- 2) Masat, R.J., and Dessauer, H.C.: Plasma albumins of reptiles. Comp. Biochem. Physiol., 25, 199, 1968.
- 3) Fried, M., and Chun, P.W.: Polymorphism in fowl serum albumin-I. Characterization of two genetic variants of fowl serum albumin and definition of peptide differences. Comp. Biochem. Physiol., 39 B, 523, 1971.
- 4) Nagano, H., Shimada, T., and Shukuya, R.: Purification and properties of serum albumin from *Rana catesbeiana*. Biochim. Biophys. Acta, 278, 101, 1972.
- 5) Wallace, D.G., and Wilson, A.C.: Comparison of frog albumins with those of other vertebrates. J. Molec. Evolution, 2, 72, 1972.
- 6) 穂坂桂一郎: コイ血清の fastest migrating component. 日医大誌, 41, 128, 1974.
- 7) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.: Protein measurement with the Fo-

- lin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
- 8) Davis, B.J. : Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404, 1964.
- 9) Shapiro, A.L., Viñuela, E., and Maizel, J.V. : Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 815, 1967.
- 10) Ellman, G.L. : Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70, 1959.
- 11) Moore, S., and Stein, W.H. : Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. *Methods in Enzymology* (Colowick, S.P., and Kaplan, N.O., eds), **6**, 819, Academic Press, New York, 1963.
- 12) Howe, P.E. : The use of sodium sulfate as the globulin precipitant in the determination of proteins in blood. *J. Biol. Chem.*, **49**, 93, 1921.
- 13) Michael, S.E. : The isolation of albumin from blood serum or plasma by means of organic solvents. *Biochem. J.*, **82**, 212, 1962.
- 14) Nagano, H., Shimada, T., and Shukuya, R. : Further characterization of bullfrog serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta*, **310**, 495, 1973.
- 15) Spahr, P.F., and Edsall, J.T. : Amino acid composition of human and bovine serum mercaptalbumins. *J. Biol. Chem.*, **239**, 850, 1964.

(受付 : 1973 年11月26日)