比較して幾分小さかった。

(4) 各ヘミセルローズを構成する糖類の種類にも相違があり、硫酸加水分解液中に検出された糖類は、Aではグルコース、マンノース、キシロース、ウロン酸、Bではグルコース、キシロース、ウロン酸、Cではグルコース、キシロースであった。またいずれのヘミセルローズも、グルコースを主成分としていることが認められた。

(5) これらの3種のヘミセルローズを絶食させたシロネズミに給与して、それらの同化利用性を澱粉の場合と比較検討した結果、Aが最も同化利用性が大きかったが、澱粉には及ばなかった。Bも利用されたが、Cは利用性が非常に小さかった。

附記：御指導を賜った岩田久敬教授に感謝の意を表します。

(1) W. Z. Hassid, R. M. McCready : *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 14, 683 (1942).

(2) 岩田久敬 : 食品化学, p. 448, 養賢堂(1955).

(3) 沢村 真, 黒沢亮一 : 農学会報, 200, 417 (1919).

(4) 山本三喜 : 福岡医学雑誌, 46, 341(1955).

(5) R. D. Lawrence, R. A. McCance : *Biochem. J.*, 25, 570 (1931); C. A. Good, H. Kramer, M. Somogyi : *J. Biol. Chem.*, 100, 485 (1933).

濾紙電気泳動法における泳動距離について (第 2 報)*

アミノ酸の泳動距離の解析 (その 1)

坂 本 清, 斎 藤 絹 子 (鹿児島県立大学短期大学部栄養学教室)

昭和 32 年 6 月 3 日 受 理

前報^(1,2)では濾紙電気泳動法によるアミノ酸の泳動距離及び MG 値の新しい表現法について報告したが、今回は更にグリシンの泳動距離、酸性及び塩基性アミノ酸の泳動距離と時間の関係、MG 値とイオン強度の関係について実験を行った。又一方アミノ酸の泳動距離を検討し数学的解析を行った結果、任意時間における泳動距離、各アミノ酸の濾紙上における静止点の位置、瞬間泳動初速の近似的算出が可能であることを知った。これ等の結果をまとめて報告する。

実 験 の 部

I. 試料、緩衝液、装置並びに実験法

(1) 50mg のアルギニン、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸の各塩酸塩、グリシン、アスパラギン酸の各結晶を 5cc の水にとかし 1/1000 cc を毎回泳動に用いた。デキストランは 5% 水溶液 1/500 cc を使用した。

(2) 緩衝液として pH 8.0, 7.3, 6.5, 5.9, 5.1 ($\mu=0.17$) の磷酸塩緩衝液を用いた。

(3) 使用装置は第 1 図に示す通りで、濾紙両端を支持棒で挟む型、硝子波状板、硝子平板で挟む型を夫々を用いた。濾紙は 1N HCl, 1N NaOH で前処理した東洋濾紙 No. 50, 2×40 cm を使用した。上記装置はいずれも 26.5~27.0° の恒温器におさめ水蒸気を飽和した。又実験にあたっては濾紙の両端から緩衝液が浸透会合して

第 1 図 泳 動 装 置

a) 白金電極, b) 架天橋, c) 緩衝液, d) 濾紙, e) 支持棒,

f) ガラス波状板又はガラス平板*

* f) はガラス板型装置の場合にだけ夫々使用する。

少くとも 30 分以上経過してから、電流を 20 分間通じ、その後試料をマイクロピペットで原点に滴下し、泳動を開始した。泳動は恒電圧で行い、泳動中は 5 分おきにアンメーター値を記録し、その算術平均を平均電流値とした。又アミノ酸は 0.25% ニンヒドリン、ブタノール溶液噴霧後 90° で 10 分間発色させ、デキス

* On the Migration Distance in Paper Electrophoresis. Part II. Analysis of the Migration Distance of Amino Acids. (1)

By Kiyoshi SAKAMOTO and Kinuko SAITO (Laboratory of Nutrition, Faculty of Junior Course, Kagoshima Prefectural University)

本誌, 30, 463 (1956) 所載「濾紙電気泳動法によるアミノ酸の分離について」の続報として、上記論文名で今後の報文を続けることにする。

第2図 各アミノ酸の滴下位置と泳動距離の関係

E・O は電気浸透度, O は毛管浸透距離, 0.6 mA/cm, 6.9 V/cm, 1 時間, pH 7.38 燐酸緩衝液中

第3図 アミノ酸の泳動距離と時間の関係

7.1 V/cm, 0.6 mA/cm, pH 7.3 燐酸緩衝液中, 硝子板法

度測定⁽³⁾の際と同じくアミノ酸の真の泳動距離は次の如くあらわされる筈である。

$$MD_{am} = (MD_1'_{am} - MD_1'_{dex})t \dots\dots\dots(1)$$

MD_{am} は t 時間における真の泳動距離, $MD_1'_{am}$ は単位時間における滴下原点からのアミノ酸の泳動距離, $MD_1'_{dex}$ はデキストランの単位時間における移動距離をあらわす。前報⁽²⁾で吾々はアミノ酸の原点よりの泳動距離と時間との間には直線関係が見出せない事実を述べたが, 適当な装置や条件補正で直線関係を示すことは血清アルブミン⁽³⁾, ロイシン^(5,6)について報告されている。吾々は Tiselius⁽³⁾ 等にならい硝子板で濾紙を強く挟み, アミノ酸, デキストランを同時に 1, 2, 3 時間泳動させて滴下原点からの泳動距離を求めた結果は第3図の如くで, 各アミノ酸の真の泳動距離と時間の間に直線関係が得られた。しかしガラス板に挟む方法は呈色像が拡散するため不鮮明となることが多く, 特にアミノ酸は血清蛋白に比べて著しい。又その上 dark current⁽⁷⁾ のため正確な電流値測定が困難である。分離定性を目的とする際は多少の減速はあっても, 明確な泳動像を得る様に努力することが望ましい。

(3) MG 値とイオン強度: 前報⁽²⁾で MG 値は電圧, 電流, 泳動時間, 濾紙の長さに無関係な恒数となるこ

トランは $HgCl_2$ 飽和ブロム, フェノール, ブルー水溶液⁽⁸⁾を浸透させて検出した。

II. 実験結果ならびに考察

(1) アミノ酸の滴下位置と泳動速度: 前報⁽²⁾でグリシンが pH 7.38 燐酸緩衝液中で濾紙中央原点から陰極側に泳動する事実を述べたが, 今回はデキストランによる原点補正を行って見た。即ち各アミノ酸ならびにデキストランを濾紙の中央点ならびに両極側 2, 4, 6, 8, 10, 12 cm の各点に滴下し 1 時間通電した結果は第2図に示す通りで, 濾紙中央より両極側に近づ

くにつれて泳動速度は次第に減少し, ある点では静止又逆方向への泳動さえ見られる。これは電気浸透, ならびにジュール熱による濾紙面からの水分蒸発を補うための濾紙両端よりの緩衝液の毛管浸透の結果⁽⁴⁾と考えられる。この図で中央原点滴下のデキストランの移動距離は上述の影響による原点の移動を示すものと考えられるから, グリシンは pH 7.38 では見掛けの泳動とは逆に僅かではあるが, 陽極側に泳動していることがわかる。このことはグリシンの等電点からして当然のことである。又この図よりわかる様に物質が濾紙上で泳動する場合にはその滴下位置によつて泳動方向, 泳動速度に著しい差があるから, 見掛けの泳動距離及び泳動方向は何等かの方法で原点補正を行わない限り厳密な意味をもたないこともわかる。

(2) アミノ酸の真の泳動速度: 一般にジュール熱による蒸発を適当な方法で抑える時は血清蛋白易動

第 4 図 pH-MG 曲線
 磷酸緩衝液中, ○: $\mu=0.06\sim0.20$, ●: $\mu=0.17$

とを述べたが, 今回はイオン強度の影響を検討した。前報では夫々異ったイオン強度 ($\mu=0.06\sim0.20$) の磷酸緩衝液中で得た MG 値を報告したが, 更に等イオン強度磷酸緩衝液 ($\mu=0.17$) 中で得た MG 値を図示すれば, 第 4 図の如くで, 緩衝液の種類を一定するとイオン強度は MG 値に影響しないことがわかる。

(4) 泳動距離の数学的解析: 上述の様に蒸発を許す水平型装置中では勿論, 吾々の経験では硝子平板型装置を用いても極めて強く濾紙を挟まない限り濾紙両端からの緩衝液の毛管浸透の影響はさけられなかった。このため分離定性の目的に通常最も多く用いられる蒸発を許す水平型装置に対しては (1) 式の適用が出来ず, 短時間の泳動によって長時間後の相対分離距離を知ることが出来ない。しかし数多くのアミノ酸の泳動を重ねるうち吾々は次の様な興味ある事実を知った。

第 5 図 アミノ酸の各時間における泳動距離と滴下点の関係
 (I) 1 時間, (II) 2 時間, (III) 3 時間, 0.7 mA/cm , 6.9 V/cm , pH 7.3
 磷酸緩衝液中

第 5 図はグリシン, アスパラギン酸, アルギニンを 1, 2, 3 時間蒸発を許す水平型装置内で泳動させて, 夫々の滴下位置における泳動距離を第 2 図と同じ方式で図示したものである。この図から各アミノ酸の泳動距離を示す直線グラフは各時間毎に平行しており, 静止点の位置も各アミノ酸について 3 時間以内では殆んど差のないことがわかる。繁雑になるため図示出来なかったがヒスチジン, グルタミン酸についても夫々同様の結果が得られた。

一方上記装置内で濾紙に通電しつつ泳動開始時及び 1 時間後, 2 時間後に各濾紙上原点にアミノ酸を滴下し, 1 時間泳動した結果を図示したものが第 6 図である。これは上述の各アミノ酸について行ったが皆同様の結果であるのでグリシンのみを図示する。この図により 3 時間の範囲内で各アミノ酸は同一時間泳動を行った場合はどの滴下原点でも泳動距離に変わりなく, したがって各アミノ酸の滴下位置—泳動距離グラフの横軸となす角度は同一時間区分をとる時殆んど変化がないと云える。

第 6 図 グリシンの滴下位置と泳動距離の関係
 ●: 0~1 時間泳動, ○: 1~2 時間泳動, ×: 2~3 時間泳動
 0.7 mA/cm , 6.9 V/cm , pH 7.38 磷酸緩衝液中

之等の結果を総合して考えると各時間におけるアミノ酸の泳動速度は泳動距離—滴下位置グラフを第 7 図の様に区切ることによって図上から求められることに

第7図 単位時間区分による泳動速度作図
単位時間毎の泳動速度 I, II, III, IV, V は対数減衰を示す

第8図 1時間区分によるアミノ酸泳動速度減衰曲線
—— 線は実測値, 線は対数減衰曲線を示す.
0.7 mA/cm, 6.9 V/cm, pH 7.3 磷酸緩衝液中

第9図 各アミノ酸の泳動距離と滴下位置の関係
各アミノ酸の速度減衰率は $II/I = II'/I' = II''/I'' = a'/a$ で互いに等しいことを示す。

なる。この泳動速度減衰は対数減衰に他ならない。実際アミノ酸について 1, 2, 3, 4 時間泳動を行い、各 1 時間区分における泳動距離を時間に対して図示すると、対数減衰曲線とよく似ている。第 8 図はその一例を示したもので、対数減衰曲線の減衰率は 1, 2 時間の各アミノ酸の速度減衰率の平均値を採用した。この様に蒸発を許す水平型装置内におけるアミノ酸の泳動速度減衰率が対数減衰率に非常に似ていることから、吾々は泳動速度をこの方法により解析し、これによって得られる諸式の近似性を確かめることにした。

今アミノ酸の泳動開始時における瞬間泳動初速を V_0' 、単位泳動時間 t_1 間隔における泳動速度減衰率を a'/a とすれば t 時間後における滴下原点よりのアミノ酸の見掛けの泳動距離 MD' は次の様にあらわされる。

$$\int_0^t V_0' (a'/a)^t dt = MD' \dots\dots\dots (2)$$

これを解いて

$$MD' = \frac{V_0'}{\log(a'/a)} \{ (a'/a)^t - 1 \} \dots\dots\dots (3)$$

単位時間 t_1 後における MD' が実測値 MD_1' であれば、見掛けの瞬間泳動初速 V_0' は次式であらわされる。

$$V_0' = \frac{MD_1' \cdot \log(a'/a)}{(a'/a) - 1} \dots\dots\dots (4)$$

この V_0' は濾紙両端よりの緩衝液の浸透の影響を除いたものであるが、電気浸透の影響を受けている。故に真の瞬間泳動初速 V_0 を求めるには Tiselius 等⁽³⁾にないデキストランにより補正を行わねばならない。しかるにこの際デキストランも同様濾紙両端よりの緩衝液浸透の影響を受けているから (4) 式は次の如くあらわされることになる。

$$V_0 = \frac{(MD_1' - MD_1'_{\text{dex}}) \cdot \log a'/a}{a'/a - 1} \dots\dots (5)$$

(5) 式において $MD_1'_{\text{dex}}$ は t_1 時間におけるデキストランの見掛けの移動距離をあらわす。又 t 時間後の見掛けの泳動距離は $t_1/t_2 = n$ として

$$MD' = MD_1' \cdot \frac{(a'/a)^n - 1}{a'/a - 1} \dots\dots\dots (6)$$

であらわされる。もし $t \rightarrow \infty$ となれば極限值は

$$MD_s' = \frac{-MD_1'}{a'/a - 1} \dots\dots\dots (7)$$

でこの値 MD_s' は滴下原点より静止点迄の距離を示すことになる。故に吾々は泳動開始後、任意単位時間 t_1 後の見掛けの泳動距離 MD_1' を実測し、最初 t_1 時間間隔における泳動速度減衰率 a'/a を測定すれば、任意時間における泳動距離、瞬間泳動初速、静止点迄の距離を知ることが出来る筈である。この場合 t_1 時間は任意単位時間区分であるから、同一実験過程では t_1 を大きくとれば a'/a は小となる。実際 a'/a 決定には泳動開

始後 t_1 及び $2t_1$ 時間における原点よりの泳動距離 MD' を実測して算出するのも一方法であろうし、又 t_1 時間後に第 2 図の如き泳動距離-滴下位置グラフを作成して図上より MD_s' を実測して (7) 式より a'/a を求めるのも一つの方法であろう。今回は前者の方法によった。又本報第 2, 第 6 図は勿論前報⁽²⁾でもしばしば述べた様に同一実験過程では各アミノ酸の泳動距離-滴下位置グラフは夫々何時も平行しているので、第 9 図からも明らかな様に各アミノ酸の a'/a は同一実験過程では同一である筈である。しかし実際には濾紙の不均一、濾紙内の溶質堆積、pH の変化、ジュール熱の濾紙面における不均一上昇、その他検出のため各時間における泳動距離を同一濾紙上で計測出来ないこと等から当然避けられない実験誤差が生じ、各アミノ酸の a'/a 実測値の間に 0.00~0.10 程度の差が見られる。このため今回は実験毎に各アミノ酸の a'/a の平均値をとり統計的な正確を期した。硝子板に濾紙を強く挟み完全にジュール熱による蒸発を防ぐ時は a'/a は 1 となるが、通常蒸発を許す水平型装置では水蒸気を飽和させるとアミノ酸の場合 t_1 を 1 時間として 0.7~0.8 程度であり、之より低い値をとる時は装置を再検する必要があると考える。電圧を上げれば泳動速度が大きくなることは前報^(1,2) で述べたが、電圧が上昇すると mA/cm² も上昇するのでジュール熱発生も当然大きくなる。例えば 13 V/cm, 1.2 mA/cm² では $t_1=1$ 時間として a'/a は 0.4~0.5 程度となり、 MD_s' の値はかえって 6~7 V/cm に比べて小さな値となって分離能率をおとすので不必要に電圧を上げることは蒸発を許す装置では避けねばならない。この様な理由から吾々は普通 6~8 V/cm 程度の電位勾配を用いて分離を行っている。第 1 表は泳動実測値ならびに (5), (6), (7) 式による瞬間泳動初速 (mm/hour), 泳動距離 (mm), 静止点 (mm) を比較したもので、瞬間泳動初速の実測値は理論的に硝子板法⁽³⁾ による等速泳動を行う際の泳動速度 (mm/hour) に等しいからこの実測値を採り、静止点 MD_s' (a) は泳動開始後 1 時間, MD_s' (b) は同じく 6 時間に泳動距離-滴下位置グラフを作成し図上で計測した値を示した。この表の (A) は蒸発を許す水平型装置 14 例中の 1 例, (B) は波状硝子板型装置 7 例中の 1 例を掲げた。後者で意外に a'/a が低いのは僅かな間隙に蒸発がおこるためであり、又この方法では呈色像が拡散することが多い欠点もあり、あまり推奨出来ない。この様な一連の実験で得られた結果を示すと次の通りである。蒸発を許す水平型、波状硝子板型両装置を通じ 3 時間後の MD' で実測値は計算値の 97% (86~115%), V_0' で 95% (91~104%), 1 時間後の MD_s' で 97% (92~106%) といずれも極めて良好な近似性を示し、4 時間後の MD' 88% (73~109%), 6 時間後の MD_s' で 81% (72~94%) と低い値を示した。この実験で吾々は出来るだけ条件の一定に留意したが、僅かな実験上の不注意、例えば濾紙の弛緩、濾紙に対する最初の緩衝液

湿潤度の不足、水蒸気飽和の不足、電極及び寒天橋の不均一な配置等はすべて泳動速度に差を生ぜしめる原因となり、時には之等の一つで最大 10 mm 程度の差を生ずることがある。その他抑える事の出来ない条件変化、即ち発熱の不均等、電気浸透度の変化、pH の変化、濾紙固有の不均一性を考える時、前掲の対数減衰諸式による泳動諸値の算出は預期以上の近似性を以て適用出来たと考えて

第 1 表 アミノ酸の MD' , MD_s' (mm), V_0 (mm/hour) の実測値ならびに計算値

(A)		MD'				MD_s'		V_0	a'/a
		1時間	2時間	3時間	4時間	(a)	(b)		
グリシン	計	+10	+17	+23	+27		+38	-2	0.74
	実	+10	+18	+24	+28	+36	+30	-2	0.80
中性アミノ酸	計	-25	-44	-57	-67		-96	-41	0.74
	実	-25	-43	-49	-56	-100	-78	-44	0.72
アスパラギン酸	計	-18	-31	-41	-48		-70	-32	0.74
	実	-18	-30	-38	-44	-70	-58	-29	0.66
グルタミン酸	計	+14	+24	+32	+37		+54	+5	0.74
	実	+14	+24	+30	+34	+51	+46	+6	0.71
ヒスチジン	計	+33	+57	+75	+88		+126	+27	0.74
	実	+33	+60	+68	+71	+120	+95	+31	0.81
アルギニン	計								
	実								
(B)									
グリシン	計	+8	+14	+19	+23		+37	-2	0.78
	実	+8	+14	+22	+25	+35	+32	-2	0.75
中性アミノ酸	計	-26	-46	-61	-72		-118	-40	0.78
	実	-26	-45	-52	-58	-110	-80	-44	0.73
アスパラギン酸	計	-20	-36	-47	-57		-90	-33	0.78
	実	-20	-35	-40	-45	-85	-68	-29	0.75
グルタミン酸	計	+16	+28	+38	+46		+73	+6	0.78
	実	+16	+29	+34	+39	+70	+52	+6	0.81
ヒスチジン	計	+37	+66	+88	+105		+168	+31	0.78
	実	+37	+68	+78	+89	+142	+119	+31	0.84
アルギニン	計								
	実								

(A) 蒸発を許す水中水平型装置内, 7.2 V/cm, 0.65 mA/cm². (B) 波状硝子板型装置内, 7.5 V/cm, 0.65 mA/cm², いづれも pH 7.3 磷酸塩緩衝液 ($\mu=0.17$)

いる。実際之等アミノ酸を燐酸緩衝液を用いて分離する際は分離能率の上から通常 3~4 時間で泳動を打切るのが普通であるから、実際上の適用は充分可能である。なお前掲諸式はジュール熱による蒸発を許す水平型装置に適用されるもので、同じ水平型でも 100 V/cm 程度の高圧濾紙電泳法、Durrum 等の山型装置⁽⁹⁾では別の考慮を要する。なおこの諸式の他物質への適用は血清蛋白でアミノ酸以上の好結果を得たがこれについては次報にゆずる。

要 約

- (1) アミノ酸について濾紙電気泳動法による泳動距離を詳細に検討した。
- (2) 電気浸透補正を行った結果、グリシンは pH 7.38 で陽極側に泳動していることを知った。
- (3) 各アミノ酸についてジュール熱による蒸発を抑え、電気浸透補正を行った結果、泳動距離と時間との間に直線関係が得られた。
- (4) アミノ酸の MG 値は緩衝液の種類を一定すればイオン強度の影響を受けない。
- (5) ジュール熱による濾紙面よりの蒸発を許す水平型装置、波状ガラス板型装置で、アミノ酸の泳動距離を種々検討した結果、泳動距離、静止点の位置、瞬間泳動初速を近似的に算出出来る実験式を得ることが出来た。

稿を終るにのぞみ、御懇篤な御指導、御校閲を賜った九大大島康義教授、船津 勝助教授、種々貴重なる御意見を賜った東大松山晃博士、当学応用物理田中豊助教授に対し厚く感謝の意を表します。又デキストラン粉末を御供与戴いた鹿大医学部生化学大保教授に厚く御礼申し上げます。なお本稿内容は昭和 31 年 3 月及び 32 年 4 月の日本農芸化学会総会、ならびに 32 年 6 月電気泳動学会東部会で報告したことを附記します。

(1) K. Sakamoto, K. Tateoka : <i>Bull. Agr. Chem. Soc. Jap.</i> , 20, 98 (1956).	(5) McDonald et al. : <i>J. Coll. Sci.</i> , 6, 236(1951).
(2) 坂本 清, 楯岡和子 : 本誌, 30, 463(1956).	(6) M. Donald et al. : <i>J. Chem. Educ.</i> , 29, 428 (1952).
(3) Kunkel, Tiselius : <i>J. Gen. Physiol.</i> , 35, 89 (1951).	(7) 森 五彦, 木村陸男 : 薬学, 74, 181(1954).
(4) 平井秀松, 島尾和男 : 電気泳動法, 57(1955).	(8) Durrum et al. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 73, 4875 (1951).

濾紙電気泳動法における泳動距離について (第 3 報)*

アミノ酸の泳動距離の解析 (その 2)

坂本 清, 斎藤 絹子 (鹿児島県立大学短期大学部栄養学教室)

昭和 32 年 月 日 受 理

前報⁽¹⁾で蒸発を許す水平型装置内でのアミノ酸の泳動諸値の近似算出式を提案したが、この度は近似性のやや薄かった若干の値に対して更に検討し、操作の改善で良好な結果の得られることを知った。なお今回は硝子板法を用いて pH-泳動速度曲線を作成し、一方蒸発を許す水平型装置で瞬間泳動初速算出式を用いて得た同様の曲線と比較し極めて近似することを知った。此等の結果をまとめて報告する。

実験結果並びに考察

I. 試料, 薬品, 装置並びに実験法

(1) 試料, 薬品 : アミノ酸は前報⁽¹⁾と同様の試料を用いた。又デキストラン溶液は今回は 2% 水溶液 3/1000 cc を用いた。濃度数, cc 数を変えた理由については考察の項にゆずる。

此等物質の検出法及び使用緩衝液はいずれも前報⁽¹⁾と同一であるので省略する。

(2) 装置並びに実験法 : 1 N-HCl, 1 N-NaOH で前処理した東洋濾紙 No. 50 を 2×35 cm に切り前報⁽¹⁾と同様の装置にはさむ。これ等の装置は 26.5~27.0° の密閉恒温器中におき、実験の際は濾紙の両端より緩衝液が浸透会合して 1 時間経過後、20 分間使用電流を通じて後試料を原点に滴下し定電圧の下で泳動を行った。水蒸

* On the Migration Distance in Paper Electrophoresis. Part III. Analysis of the Migration Distance of Amino Acids (2).

By Kiyoshi SAKAMOTO and Kinuko SAITO (Laboratory of Nutrition, Faculty of Junior Course, Kagoshima Prefectural University)