昆虫体液の蛋白質に関する研究 (第6報)*

家蚕体液蛋白質の塩析曲線

小 田 純 子 (九州大学農学部農芸化学教室)

昭和 34 年 4 月 7 日 受 理

緒 言

蚕体液中の蛋白質が外因条件の変化に鋭敏で、容易に解離-会合を起すことは前報⁽¹⁾で詳しく検討した。この特殊な蛋白質に認められる複雑な挙動が各蛋白成分の分別精製を困難にする原因の1つと考えられる。

一般に高い塩濃度の溶液中において、蛋白質は多くの塩類によって塩析され、広範囲にわたってその液解度はイオン強度と直線関係にある。この塩析法は蛋白質の混合物から個々の蛋白質を分離する手段として古くから使用されて来た。特に鋭敏な分離方法ではないが、分別操作中に蛋白質の変性のおそれが比較的少いたため、今なお血液蛋白、酵素蛋白、組織蛋白などの濃縮、分別、精製に関する最も重要な手段の1つである。

蚕体液の蛋白質についても塩析法が適用され⁽²⁾、半飽和以下の硫酸濃度で沈殿する蛋白質と、溶液中に残存するものとの比を求め、蚕の健康度判定の1基準とされた。しかしこれらの分画は超遠心機で観察すると何れも数個のピークから成る混合物である。また筆者もさきに多量の蚕体液を用いて硫酸による塩析を試みたが、好結果は得られなかった。そこで本実験では塩析条件をさらに厳密に検討し、各種塩類による塩析効果の比較、蛋白質の pH の影響などを追究したのでその結果を報告する。

実 験 方 法

1) 試料体液 5 令 5~6 日目の春蚕児より体液を採取し、遠心分離して僅かの沈降物を除去した。チロシン-アゼ阻害剤として青酸カリを用いた。得られた黄色透明体液を氷室内で 2 昼夜緩衝液に透析して実験に供した。

2) 塩 析

a) 緩衝液および塩類溶液 : 試料溶液の塩析中における pH の過激な変化を防ぐために、イオン強度 0.15 のリン酸塩、炭酸塩、醋酸塩ならびにリン酸ナトリウム-クエン酸緩衝液を用いた。塩析沈殿剤として硫酸、硫酸ナトリウム、硫酸マグネシウムおよび食塩をそれぞれ上記緩衝液に溶解した濃厚溶液ならびに 3M リン酸カリウム緩衝液を使用した。

b) 塩析 : 望む pH の緩衝液に透析した試料溶液を同緩衝液で 2% に希釈し、この溶液 1 ml に沈殿剤を加え、全容積が 10 ml になるように緩衝液を加えて完全に混合する。約 15 時間 30° に放置した後、遠心分離を行って沈殿を分ける。上澄液を適当に希釈して 278m μ における吸光度をベックマン DU 分光光度計で測定した。

c) 沈降分析 : スピスコ E 型超遠心機を用い、56,100 r. p. m., 厚さ 12 mm のセルで測定を行った。

実験結果ならびに考察

1) 各種沈殿剤による溶解度-イオン強度曲線 一般に蛋白質の分別沈殿剤として特に有効とされている、即ち高い塩析恒数を持つ硫酸、硫酸ナトリウムおよびリン酸塩の濃厚溶液のほかに、ここではさらに塩析され易い特殊な蛋白質について屢々用いられる濃厚硫酸マグネシウムおよび食塩溶液を用いて、蚕体液蛋白質の溶解度-イオン強度曲線を描いた(第1図)。図に見られるように硫酸、硫酸ナトリウム、リン酸塩を用いた場合は類似の塩析曲線が得られ、何れも飽和濃度に近くなると大部分の蛋白質が沈殿する。これらの塩析曲線はそれぞれ1個の明瞭な分節を持ち、さらに不明瞭ながらも1個の分節が認められる。他方硫酸マグネシウムならびに食塩を用いると少くとも中性附近の pH では、飽和に近い濃厚溶液中でも全蛋白質の約 20% のみが沈殿するに過ぎない。

2. 塩析曲線に及ぼす pH の影響

a) 硫酸による沈殿 : pH 3~9 におけるそれぞれの沈殿曲線を第2および3図に示した。pH 5 以上では沈殿曲線の形は類似するが、分節の位置ならびに同一イオン強度における溶解度は異なる。他方 pH 4.2 以下の低 pH では、pH 5 以上の曲線と著るしく相違し、全体液蛋白質の約 20% 近くが、すでに極めて低い塩濃度で沈

* Studies on the Proteins of Insect Hemolymph. Part VI. Salting-out Behavior.

By Junko ODA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University)

第 1 図 各種塩類による塩析曲線 (pH 6)

○: 硫酸アンモニウム, ●: 硫酸ナトリウム
 ●: リン酸カリ, ●: 食塩, ●: 硫酸マグネシウム
 C_0 : 初濃度, C : 溶液中に残存する蛋白濃度

第 2 図 pH による塩析曲線の変化 (その 1)

●: pH 6.0, ○: pH 5.0, ●: pH 7.8

第 3 図 pH による塩析曲線の変化 (その 2)

○: pH 3.0 ●: pH 4.2

第 4 図 pH による塩析曲線の変化 (その 3)

●: pH 3.1 ○: pH 2.6

第 5 図 2.4 M 食塩中における pH-溶解度曲線

第 6 図 濃厚硫酸溶液中での pH-溶解度曲線

1. イオン強度 2.4 2. イオン強度 6.0

第7図 硫酸による各分画および純水不溶分画の沈降図

56,100 r. p. m., 室温

- (a) 1.4 M 硫酸沈殿, 測定溶液 0.1 M 食塩, pH 6.5
 (b) 純水不溶分画, " 0.1 M リン酸塩, pH 7.0
 (c) 2.2~2.6 M 硫酸沈殿, " 0.1 M 食塩, pH 6.5

塩濃度で初期に落ちる沈殿は難溶であるため、本実験ではこれ以上追究しなかった。なお電気泳動法により検討した結果は後に報告する。

4) 沈降分析 第1図中の明確な分節、硫酸濃度 1.4 M までに沈殿する蛋白を集め、溶解、再沈殿を繰返しした後 0.1 M 食塩に透析して沈降分析を行った(第7図(a))。このものは蒸留水に透析すると大部分が沈殿となって落ちる。

また無処理の体液を中性で蒸留水に透析して生じた沈殿をリン酸塩緩衝液に溶解し、透析したものの沈降図を第7図(b)に示した。この沈殿の量は数回の実験において常に一定でなくかなりの変動が見られた。特に長時間蒸留水に透析した場合、中性で希薄塩類に不溶になることがある。この純水不溶の分画は中性付近において硫酸濃度 1.4 M で大部分が塩析される。しかしながら体液を水に透析した後 pH を 5 以下に下げると、再び中性に戻した時塩類不溶の沈殿を生じ、異なる結果が得られる⁽⁹⁾。

以上の結果、塩析において初期に沈殿する分画は、純水に溶解し難いものであることが言える。しかしこれらの分画の沈降図(第7図(a),(b))は各界面の面積に差はあるが、共に数種の蛋白成分の混合物である。

次に硫酸濃度 2.2~2.6 M で塩析される分画を集め、数回再沈殿を繰返した後蒸留水に透析し、生じた極微量の沈殿を除去した溶液の沈降図を第7図(c)に示した。1成分の減少は認められるが矢張り3界面が出現する。

これらの測定結果から、硫酸、硫酸ナトリウム、リン酸カリの如き塩析恒数の大きい塩類を用い、各分節に基づいて分別沈殿を行っても、全く効果がないことがわかる。従って塩析法は、蚕体液蛋白質の単離には勿論予備的な分別手段としても不適当である。本実験の結果もまた既に報告したように、昆虫体液蛋白質の複雑さを強調するものである。

なお塩析に際して蛋白濃度は最終 0.2% とし、濃度変化による塩析曲線の違いについては検討しなかった。し

殿する。

b) 食塩による沈殿：食塩はフィブリノーゲンの如き極めて塩析されやすい蛋白質の分別に使われているが、上記のように蚕体液蛋白質は中性付近では1部分のみしか沈殿しない。しかし pH が低くなると第4図に示すように食塩濃度が飽和に近い所ではほとんど全蛋白質が沈殿する。沈殿曲線の傾向は、硫酸によるもの(第3図)に類似する。

3) 定イオン強度における pH-溶解度曲線

a) 食塩、イオン強度 2.4：定イオン強度の食塩中で pH 1.5~7 間の溶解度変化を第5図に示した。図から明らかなように、pH 2.3 以下、3.0~4.2 および 5.0~7.0 のそれぞれの範囲内では pH を変えても溶解度は殆んど変化しない。しかしその間例えば pH 4.2~5.0 では、僅かの pH の差が鋭敏に影響し、溶解度が著るしく異なる。即ち曲線の傾斜が極めて大きい。

b) 硫酸、イオン強度 2.4：pH 2~7 間の溶解度変化を第6図に示した。曲線の形は前の食塩の場合に酷似する

c) 硫酸、イオン強度 6.0：さらに硫酸濃度を増しイオン強度 6.0 の場合の pH-溶解度曲線を第6図に示した。極めて特徴的な曲線が得られ、pH 3 および 6 附近に溶解度の極大点が認められ、pH 4 附近に極小点が存在する(但し高 pH での測定は若干の不明瞭さを免れなかった)。

このように特に低 pH における溶解度曲線の複雑性は、蛋白質分子の解離からも予想されるところであるが、さらに等電点の影響ならびに或る種の Conformational Change^(4,5)などの問題が重複したものと推察される。しかし低 pH で塩析により得られる沈殿は、1部は水あるいは希薄塩類に溶解し難い。特に極めて低

かし蛹の体液蛋白質の塩析曲線は、蛋白濃度を変えても特に顕著な変化は認められなかった⁽⁶⁾。

塩析時の温度の影響については、すでに多数の実験が行われており、一般に各塩濃度における沈殿量は温度変化に伴い変化するが、溶解度曲線の傾斜は一定である。しかしながら体液中の蛋白質がそれぞれ温度係数を異にすることも考えられ、この点についてはなお検討を要する。

要

約

家蚕体液蛋白質の塩析法による分別について厳密な検討を加えるために、沈殿剤として硫酸、硫酸ナトリウム、リン酸カリ、硫酸マグネシウムならびに食塩の濃厚溶液を用い、1.5~8 の pH 範囲にわたって塩析を試みた。

その結果、塩析法は各蛋白成分の単離には勿論、予備的な分別に対しても甚だ不適当であることがわかった。この原因は既報の実験結果と併せ考えれば、家蚕体液蛋白質の解離-会合性ならびに各蛋白質間の相互作用に基づく共沈現象によるものと推察される。

終りに貴重な御助言並びに御鞭撻を戴いた九州大学農学部船津勝教授に厚く御礼申し上げます。

(1) 小田純子：本誌，33，845 (1959).

64，144 (1956).

(2) 稲神 馨：日蚕誌，20，383 (1951).

(5) M. R. Rachinsky, J. F. Foster : *ibid.*,

(3) 小田純子：本誌，32，748 (1957).

70，283 (1957).

(4) C. A. Zittle : *Arch. Biochem. Biophys.*,

(6) 小田純子：未発表。

昆虫体液の蛋白質に関する研究 (第 7 報)*

家蚕体液蛋白質に及ぼす加熱の効果

小 田 純 子 (九州大学農学部農芸化学教室)

昭和 34 年 4 月 7 日 受 理

緒

言

一般に蛋白質の変性現象は非常に古くから認められ、この問題に関する研究は極めて多い。しかしながら特にこの変性現象が重要視されるようになったのは比較的新しく、蛋白質の構造と機能との関連性について多方面から注目され、興味が持たれるようになり、一方これに伴い蛋白質の構造を解明するための重要な実験の手段が確立されてきたことに由る。さらに変性の機構を知るために動力学的ならびに熱力学的研究方法も適用され、蛋白質の変性の反応様式あるいは変性に際して生ずる構造変化などについて重要な知見が得られるようになった。かくして変性現象を追究することは、蛋白質の特異的な構造を知るための一つの手がかりを与えるものである。

家蚕体液蛋白質は、すでに報告してきたように種々の特徴的な性質を持っている。殊に蛋白質分子の解離-会合および蛋白質間の相互作用の強さなどはその顕著なものである^(1,2)。蛋白質の変性現象として最も古くから知られている熱凝固は、加熱温度、溶液の pH、イオン強度、蛋白質濃度などの関数であり⁽³⁻⁵⁾、また蛋白質以外の混在物によっても影響を蒙り、蛋白質により特徴的な挙動を示すものである⁽⁶⁻¹²⁾。そこで本実験では加熱により蚕体液蛋白質が示す挙動を溶解度により検討し、さらに超遠心ならびに電気泳動的性質を追究した。また 100° に加熱しても凝固しない蛋白質を分離し、これが低分子量であることを確かめた。

実 験 方 法

1) 試料体液 既報⁽¹³⁾に従って 5 令 5~6 日目の家蚕より体液を採取し、遠心分離した透明液を試料体液とした。チロシンナーゼ阻害剤として青酸カリを用いた。

2) 加熱処理 試料体液を pH ならびにイオン強度を異にする炭酸塩、リン酸塩およびリン酸ナトリウム-クエン酸緩衝液に 2 昼夜透析した。透析中に少量の沈殿を生じたものは遠心分離して透明溶液とした。かくして得られた蛋白溶液は、緩衝液で所定の濃度に希釈した。加熱処理は温度および時間を変えて試験管内で行い、後速やかに冷却した。溶液中に残存する蛋白量は、一夜放置後遠心分離して加熱により生じた凝固物を除去し、上

* Studies on the Proteins of Insect Hemolymph. Part VII. Heat Denaturation.

By Junko ODA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University)