らも支持される。しかしこのことは必ずしも全ての生物体が乳糖-1-燐酸を直接的に利用することができないことを意味しているものでなく、これを直接的にグルコース-1-燐酸とガラクトースに分解する酵素系の存在も充分考えられる。

α - 及び β -乳糖-1-燐酸ととの間の生物学的な相違を *Saccharomyces fragilis* 及び *Escherichia coli* を用いて検討した。第 2 図及び第 3 図に示すように、これらの菌によつての 2 つの乳糖燐酸異性体の利用にはほとんど差が認められなかった。このことはこれらの微生物が燐酸エステル結合を切った後、乳糖燐酸を利用していると考えられるので、燐酸の離脱によつて遊離された乳糖は直ちに変旋光をおこし平衡状態になるので、その菌の β -galactosidase が α -乳糖により大きな affinity を持っていますが、それは菌の酸素吸収或いは増殖にあらわれてこないであろう。

検討した微生物において全て乳糖を炭素源とした方が乳糖燐酸を炭素源としたものより遙かに生育がよかった。第 2 図に示すようにその生育初期においては両者の相違が認められないが、乳糖燐酸の場合は早く生育が止ってしまう。これは代謝生産物による阻害作用のように思われるが、この点に関してはさらに詳しく検討されねばならない。

4. 要 約

乳糖-1-燐酸に対する β -galactosidase の作用を実験し、 α - 及び β -乳糖-1-燐酸はいずれもこの作用を受けないことを明らかにした。

乳糖を利用する微生物を用いて乳糖-1-燐酸の利用を検討した結果、これを利用しうる微生物は全て phosphatase 作用を有し、その作用を欠く菌はこれを炭素源として利用できないことを明らかにした。

Saccharomyces fragilis 及び *Escherichia coli* を用いて α - と β -乳糖-1-燐酸ととの間の相違を検討し、菌の生育及び酸素吸収の両面から検討した結果、この 2 つの異性体の間にはほとんど差を認めることができなかった。

終りに臨み終始御懇篤な御指導と御校閲を賜った佐々木林治郎先生並びに津郷友吉先生に深く感謝致します。又乳糖燐酸酵母を御提供下さいました山口辰良氏にも深く御礼申し上げます。

(1) 佐々木林治郎, 谷口宏吉 : 本誌, 33, 111 (1959).	(5) P. P. Gray, H. Rothchild : <i>Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.</i> , 13, 902 (1941).
(2) W. Pigman : <i>The Carbohydrates</i> , p. 49 (1957).	(6) W. E. Trevelyan, P. P. Proter, J. E. Harrison : <i>Nature</i> , 166, 444 (1950).
(3) J. E. Gander, W. E. Petersen, P. D. Boyer : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 69, 85 (1957).	(7) W. Pigman : <i>Adv. in Enzymol.</i> , 4, 41 (1944).
(4) 佐々木林治郎, 谷口宏吉 : 本誌, 33, 183 (1959).	(8) O. Folin, V. Ciocalteu : <i>J. Biol. Chem.</i> , 73, 627 (1927).

リゾチームのポーラログラフ的研究 (第 1 報)*

塩化コバルトによる蛋白波について

伊 藤 昌 英 (三重県立大学水産学部化学教室)

昭和 33 年 7 月 24 日 受 理

緒 言

ポーラログラフ蛋白波を解明するために従来いろいろの蛋白質が調べられ、また蛋白波によつて個々の蛋白質の性質、構造或いは生物学的な活性等を推論しようとする試みもしばしばなされてきた^(1~3)。また蛋白質の挙動は一般にその等電点附近において観察するのが望ましいのであるが、蛋白波を出現させるための電解緩衝液に制約されて等電点附近で蛋白波を調べることは大抵の場合に極めて困難で、もっぱらアンモニア緩衝液中 pH 9.5 附近において研究されている。

卵白リゾチームは結晶状にうる事が容易で⁽⁴⁾、したがって純離し易く、またシスチン含量が極めて高く⁽⁵⁾、

* Polarographic Studies of Lysozyme. Part I. The Catalytic Protein Wave of Lysozyme in Ammonia Buffer Containing Cobaltous Chloride.

By Masahide ITO (Chemical Laboratory, Faculty of Fisheries, Prefectural University of Mie)

しかも等電点が電解液の pH 値に近い等の興味ある性質を有し、最近そのアミノ酸序列も次第に明らかにせられつつあるので⁽⁶⁾、そのポーラログラフ蛋白波を調べることは蛋白質、酵素の蛋白波の研究に、また蛋白波そのものの解明に資するところが大きいと考え、種々の条件下にリゾチームの蛋白波を詳しく研究した。本報では塩化コバルトを用いた場合のリゾチームの蛋白波と、その波高に対する電解液成分濃度および温度の影響について調べ、その結果を報告する。

実 験 の 部

1. リゾチームの調製 新鮮な鶏卵白から Alderton 等⁽⁴⁾の直接結晶化の方法に従って調製し、4回再結晶を行った等電点結晶リゾチームを使用した。原液の蛋白質濃度はセミマイクロゲル法で定量した蛋白態窒素量で表わし 1.535 mgN/ml である。

第1図 各種蛋白波の比較

(a) リゾチーム, (b) 血清アルブミン, (c) 卵アルブミン, (d) カゼイン;
蛋白質濃度, 0.0115 mgN/ml; CoCl_2 , $1 \times 10^{-3} \text{M}$; NH_4Cl , 0.1N; NH_3 , 0.1N;
温度, $20 \pm 0.2^\circ$.

第2図 蛋白波に対する蛋白質濃度の影響

蛋白質濃度 (mgN/ml), (a) 0.0614, (b) 0.0307, (c) 0.0154, (d) 0.0077, (e) 0.0038;
 CoCl_2 , $1 \times 10^{-3} \text{M}$; NH_4Cl , 0.1N; NH_3 , 0.1N; 温度, $20 \pm 0.2^\circ$.

量で表わし 1.535 mgN/ml である。

2. 装置 柳本製写真記録型ポーラログラフを使用し、検流計の最大感度は $3.67 \times 10^{-9} \text{ A/mm/m}$ で、感度 1/100 として使用した。滴下水銀電極の特性は緩衝液中、温度 $20 \pm 0.2^\circ$ 、零加電圧において $m = 0.794 \text{ mg/sec}$, $t = 4.1 \text{ sec/drop}$ である。

3. 実験方法 まずリゾチームの蛋白波の形状を調べるために、 CoCl_2 を用いて下記基準組成の電解液で得られるリゾチームの蛋白波を同一条件下に二、三の他の蛋白質の蛋白波と比較した。基準組成の電解液はリゾチーム溶液 (蛋白質濃度 0.1535 mgN/ml) 0.5 ml に 1N NH_4Cl , 10^{-2}M CoCl_2 , 1N NH_3 および 1N KCl の各 1 ml を加え、再蒸溜水にて 10 ml に稀釈して調製した。他の蛋白質の場合も同様で各蛋白質の最終濃度を 0.0115 mgN/ml とした。

さらにリゾチームの蛋白波の特性を調べるために、この電解液成分のうち、一成分のみの濃度を第1表に示す濃度範囲に変化し、その他はすべて一定にして蛋白波の変化を調べ、各成分

第1表 電解液成分の濃度範囲

電解液成分	濃度範囲
蛋白質	0.0038~0.0614 mgN/ml
CoCl_2	$0.25 \times 10^{-3} \sim 3.0 \times 10^{-3} \text{M}$
NH_4Cl	0.025~0.4 N
NH_3	0.025~0.4 N

濃度の影響を検討した。また電解温度の影響を $10\sim 50^\circ$ の範囲について検討した。

電解操作、作図法等はすべて常法⁽²⁾に従った。波高は蛋白二段液の前の方の波を第一波、後の方の波を第二波とし、いずれも mm 単位で表示した。

実 験 結 果

各種蛋白波の比較

リゾチームの蛋白波を同一条件下に結晶馬血清アルブミン*、結晶卵アルブミン**および市販の Hammarsten のカゼイン等の蛋白波と比較すると第 1 図のようになる。

リゾチームは他のものに比して特異な波形を示し、第二波の波高が著るしく高く、第一波、第二波とも極大が認められない。またリゾチーム、血清アルブミン、卵アルブミン、カゼインの順に波高が低くなる傾向が認められる。

リゾチームの蛋白波に対する電解液成分濃度の影響

1. 蛋白質濃度の影響

CoCl_2 , NH_4Cl , NH_3 の各濃度および電解温度をすべて一定とし、蛋白質濃度のみを $0.0038\sim 0.0614 \text{ mgN/ml}$ の範囲に変化すると蛋白波は第 2 図の如く変化する。

波形は蛋白質濃度とともに変化する。濃度が低い場合には第一波、第二波がいずれも明瞭に認められるが、高濃度では蛋白波全体が極めて急な傾斜を示し、第一波、二波の区別が判然としなくなる。また濃度と波高との関係は第一波、第二波とも吸着関係を示し、 0.0154 mgN/ml 附近から限界値に達する。この場合いわゆる交叉効果⁽⁷⁾は認められない。

2. コバルト塩濃度の影響

蛋白質, NH_4Cl , NH_3 の各濃度および温度をすべて一定とし、

第 3 図 蛋白波に対するコバルト塩濃度の影響

CoCl_2 濃度 ($\times 10^{-3} \text{ M}$), (a) 3.0, (b) 2.0, (c) 1.0, (d) 0.5, (e) 0.25; 蛋白質濃度, 0.0077 mgN/ml ; NH_4Cl , 0.1 N ; NH_3 , 0.1 N ; 温度, $20 \pm 0.2^\circ$.

第 4 図 蛋白波に対する塩化アンモニウム濃度の影響

NH_4Cl 濃度 (N), (a) 0.4, (b) 0.2, (c) 0.1, (d) 0.05, (e) 0.025; 蛋白質濃度, 0.0077 mgN/ml ; CoCl_2 , $1 \times 10^{-3} \text{ M}$; NH_3 , 0.1 N ; 温度, $20 \pm 0.2^\circ$.

* 京都大学食糧科学研究所 秦 忠夫教授の御好意により分与されたものである。

** Sørensen⁽⁷⁾ の方法に従って調製し 4 回再結晶を行ったものである。

第5図 蛋白波に対するアンモニア濃度の影響
 NH_3 濃度 (N), (a) 0.4, (b) 0.2, (c) 0.1, (d) 0.05, (e) 0.025;
 蛋白質濃度, 0.0077 mgN/ml; CoCl_2 , $1 \times 10^{-3} \text{M}$; NH_4Cl , 0.1N; 温度, $20 \pm 0.2^\circ$.

第6図 蛋白波に対する温度の影響
 温度, (a) 10° , (b) 20° , (c) 30° , (d) 40° , (e) 50° ;
 蛋白質濃度, 0.0077 mgN/ml; CoCl_2 , $1 \times 10^{-3} \text{M}$; NH_4Cl , 0.1N; NH_3 , 0.1N.

波形は NH_3 濃度の増加とともに著るしく変化する。すなわち NH_3 濃度が低い場合には第二波の極大は判然としなが、濃度を増加すると第一波、第二波とも著るしく増大し、高濃度では第一波が第二波にほとんど一致し、あたかも一段波の形状を示すようになり、第二波の極大が著明に現われる。また濃度と波高との関係は第一波、第二波とも大体直線関係を示し、 NH_3 濃度の増加によって波高は著るしく高められる。

蛋白波に対する電解温度の影響

上記基準組成の電解液を $10 \sim 50^\circ$ の各温度で電解し、その際の蛋白波の変化を調べると第6図の如くなる。

波形は 30° 附近まではあまり著るしい変化が認められないが、それ以上の温度では第一波と第二波がほとんど連続し、単一の波形に変化する傾向が認められる。また温度と波高との関係は第一波と第二波とで異なり第一波

CoCl_2 濃度のみを $0.25 \times 10^{-3} \sim 3.0 \times 10^{-3} \text{M}$ の範囲に変化させると蛋白波は第3図の如く変化する。

波形は CoCl_2 濃度の増加とともに多少変し、低濃度では第一波の極大は明瞭に認められるが、第二波の極大は判然としない。しかしながら濃度を増加するといずれも著明に増大し、高濃度では両者を明瞭に区別できるようになる。また濃度と波高との関係は第一波はやや曲線になるが、第二波はほぼ直線関係を示す。

3. 塩化アンモニウム濃度の影響 蛋白質, CoCl_2 , NH_3 の各濃度および温度をすべて一定とし、 NH_4Cl 濃度のみを $0.025 \sim 0.4 \text{N}$ の範囲に変化させると蛋白波は第4図の如く変化する。

波形は NH_4Cl 濃度の変化によってあまり著るしい影響を受けないが、濃度を増加すると第一波、第二波とも多少増大し、極大が明瞭になる傾向が認められる。また濃度と波高との関係は低濃度では第一波、第二波とも濃度とともに増大するが、高濃度ではいずれも限界値に達する。

4. アンモニア濃度の影響

蛋白質, CoCl_2 , NH_4Cl の各濃度および温度をすべて一定とし、 NH_3 濃度のみを $0.025 \sim 0.4 \text{N}$ の範囲に変化させると、蛋白波は第5図の如く変化する。

は温度の上昇とともに大体直線的に徐々に増大するが、第二波はほとんど一定であり、いずれも高温における波高の低下は認められない。

考 察

上述の如くリゾチームは CoCl_2 を含むアンモニア緩衝液において蛋白波を示すが、その形状は他の蛋白質に比して著しく異なり(第 1 図)、極めて傾斜の急な特異な蛋白波が認められる。しかも波高は著しく高く第一波よりも第二波の方が高い。一般に蛋白波は蛋白質の種類によって異なるのみならず⁽⁸⁻¹⁰⁾、蛋白質の物理的ならびに化学的性質の相異によっても異なり⁽¹¹⁾、なかんずくシスチン含量と蛋白波との間には密接な関係があることはすでに明らかにせられている^(9,11)。そこで各蛋白質のシスチン含量と蛋白波との関係を検討すると、すでに秦⁽⁹⁾が論じた如く、シスチン含量の高い蛋白質ほど波高が高いことが認められる。すなわち第 2 表に示す如くシスチン含量はリゾチームが最高で、カゼインが最低であり、ここに掲げたシスチン含量による蛋白質の順序は第 1 図に示した蛋白波の波高による蛋白質の順序とよく一致する。

第 2 表 各種蛋白質のシスチン含量

蛋白質名	シスチン含量	著 者
卵白リゾチーム	6.80%	G. R. Tristram (1949) ⁽⁵⁾
馬血清アルブミン	5.20	秦 忠夫 (1951) ⁽⁹⁾
卵アルブミン	1.95	秦 忠夫 (1951) ⁽⁹⁾
全カゼイン	0.34	W. G. Gordon (1949) ⁽¹⁸⁾

また一般に電解条件を変化すると蛋白波がそれに応じて著しく変化することはすでにしばしば報告されているので^(9,12,14,15)、ここではリゾチームの蛋白波に対する電解液成分濃度および温度の影響について調べた。その結果、これらの条件の変化に応じて蛋白波は種々変化するが、その挙動は温度の影響を除いて他の蛋白質の場合^(9,14,15)と極めて類似している。すなわち波高と蛋白質濃度との間には吸着関係が(第 2 図)、 CoCl_2 濃度との間にはほぼ直線関係が(第 3 図)それぞれ認められる。また NH_4Cl 濃度の影響は濃度によって異なり、低濃度では波高は濃度とともに増大するが、高濃度では限界値に達する(第 4 図)。さらに NH_3 濃度の増加は波高を著しく高め、波高は NH_3 濃度とともにほぼ直線的に増大する(第 5 図)。これに反して温度の影響は他の蛋白質の場合と異なり、波高と温度の間にはリゾチーム特有の関係がみられ、高温における波高の低下は認められない(第 6 図)。

一般にこのように蛋白波が電解条件の変化によって何故種々の挙動を示すかについては、現在のところ十分明らかでないが、ただリゾチームが特有の蛋白波を示し、波高が著しく高いことおよび波高に対する温度の影響が少いこと等は、リゾチーム特有の構造によるものと想像され、特にシスチン含量が極めて高いことに基因するものと考えられる。また等電点が電解液の pH に近いこともその原因の一つであろう。

なおこれらの結果を別報⁽¹⁶⁾に述べた tris (ethylenediamine) cobalt (III) 錯塩によるリゾチームの蛋白波と比較すると、両者の間には多くの類似点が認められるが、各蛋白波の波形および蛋白波に対する NH_3 濃度の影響は著しく異なっており、すでに別報で論じたごとく、コバルト錯塩の特徴が蛋白波に著しい影響を与えることがわかる。このことはコバルト錯塩として hexamine cobalt (III) 錯塩を用いると、リゾチームの蛋白波はさらに特異な挙動を示すことから推定され極めて興味深いが、これについては次報⁽¹⁷⁾で報告したい。

総 括

塩化コバルトを用いてアンモニア緩衝液中におけるリゾチームのポーラログラフ蛋白波を調べた。その結果、リゾチームの蛋白波は血清アルブミン、卵アルブミン、カゼイン等の蛋白波に比べると波形が著しく異なり、波高は最大である。また波高とシスチン含量との間には密接な関係がある。さらに波高に対する電解液の各成分濃度の影響は既報の蛋白質の場合と極めて類似しているが、温度の影響はリゾチームに特有で高温における波高の低下はないことを認めた。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜った京都大学食糧科学研究所 秦 忠夫教授、京都大学農学部 館勇教授に深甚なる謝意を表します。

(1) I. M. Kolthoff, J. J. Lingane : "Polarography", 2nd Ed., Vol. 2, p. 849~876 (1952), Interscience Publishers.

(2) 館 勇 : "ポーラログラフイー", 385~410 頁 (1954), 岩波書店。

(3) M. Brezina, P. Zuman : "Die Polarographie in der Medizin, Biochemie und Pharmazie", S. 532~618 (1956), Akademische Verlags.

(4) G. Alderton, H. L. Fevold : Biochemical

- Preparation*, 1, 67 (1949).
- (5) G. R. Tristram : *Advances in Protein Chemistry*, 5, 83 (1949).
- (6) A. R. Thompson : *Biochem. J.*, 60, 507 (1955); 61, 253 (1955).
- (7) S. P. L. Sørensen, M. Höyrup : *Z. Physiol. Chem.*, 103, 15 (1918).
- (8) C. Tropp, L. Jühling, F. Geiger : *Z. Physiol. Chem.*, 262, 225 (1939).
- (9) 秦 忠夫 : 京都大学食糧科学研究所報告, 第 6 号, 45 頁 (1951).
- (10) C. Carruthers : *J. Biol. Chem.*, 171, 641 (1947).
- (11) G. J. Millar : *Biochem. J.*, 53, 385, 393 (1953).
- (12) 秦 忠夫 : “ポーラログラフイー”, 4, 11 (1956).
- (13) W. G. Gordon, W. F. Sennett, R. S. Cable, M. Morris : *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 3293 (1949).
- (14) R. Brdicka : *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, 5, 112 (1933).
- (15) 秦 忠夫 : 京都大学食糧科学研究所報告, 第 7 号, 33 頁 (1951).
- (16) 伊藤昌英 : 本誌, 32, 201 (1958).
- (17) 伊藤昌英 : 本誌, 33, 238 (1959).

リゾチームのポーラログラフ的研究 (第 2 報)* Hexamminecobalt (III) chloride による蛋白波について

伊 藤 昌 英 (三重県立大学水産学部化学教室)

昭和 33 年 7 月 24 日 受 理

緒 言

前報⁽¹⁾においては塩化コバルトによるリゾチームのポーラログラフ蛋白波について詳細に検討し, リゾチームは特異な蛋白波を示すことを報告した. また別報⁽²⁾のごとく tris (ethylenediamine) cobalt (III) 錯塩を用いてコバルト錯塩の面から蛋白波を調べると, 従来の蛋白波とは全く異った単一の極大波が得られることをみいだした. そこで本報ではヘキサアミンコバルト (III) 錯塩 ($\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$) を用いてリゾチームの蛋白波を詳しく検討した. その結果, リゾチームの蛋白波ならびにその挙動は非常に特異的であることを認め, さらに前報の塩化コバルトによる蛋白波と比較すると, 二, 三の点で著しい相違があることもみいだしたので, それらの結果をまとめて報告する.

実 験 の 部

1. リゾチームの調製 前報に同じ.

2. 装置, 実験方法 ポーラログラフ, 滴下水銀電極はいずれも前報⁽¹⁾と同じものを使用した. 実験方法はコバルト錯塩として CoCl_2 の代りに $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ を用い, 前報と全く同じようにした. 電解液の基準組成を示すと次の通りである. すなわちリゾチーム溶液 (蛋白質濃度 0.1535 mgN/ml) 0.5 ml に 1 N NH_4Cl , 10^{-2} M $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$, 1 N NH_3 および 1 N KCl の各 1 ml を加え, 再蒸留水にて 10 ml に希釈する.

実 験 結 果

各種蛋白波の比較

$\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ を用いた場合のリゾチームの蛋白波を同一条件下に結晶馬血清アルブミン**, 結晶卵アルブミン***, 市販の Hammarsten のカゼインの蛋白波と比較すると第 1 図のようになる.

波形は蛋白質相互にかなり異なり, 波高も CoCl_2 を用いた場合⁽¹⁾よりも一般に高く, 特に第二波が著明に増大する. リゾチームは他の蛋白質に比してやはり特異な波形を示し, 波高は最大である. しかもリゾチーム, 血清アルブミン, 卵アルブミン, カゼインの順に波高が低下し, 各蛋白質のシスチン含量に対応している. この関係は CoCl_2 を用いた場合と同様である.

* Polarographic Studies of Lysozyme. Part II. The Catalytic Protein Wave of Lysozyme in Ammonia Buffer Containing Hexamminecobalt (III) Chloride.

By Masahide ITO (Chemical Laboratory, Faculty of Fisheries, Prefectural University of Mie)

** 京都大学食糧科学研究所 秦 忠夫教授の御好意により分与されたものである.

*** Sørensen⁽³⁾ の方法に従って調製し, 前報⁽¹⁾と同様 4 回再結晶を行ったものである.