蓖麻子毒性蛋白リシンの化学的研究 (第 2 報)*

連続濾紙電気泳動によるリシンとプロテアーゼとの分離

船 津 軍 喜 (九州大学農学部生物化学教室)

昭和 33 年 9 月 30 日 受 理

緒 言

前報⁽¹⁾で述べた如く硫酸塩析及び等電沈澱により分離されたリシンは単一成分ではなく、毒性と同時にプロテアーゼ作用を有しているが、この両作用は別の蛋白質であろうと推定された。この点を更に明らかにする為に真の毒蛋白であるリシンとプロテアーゼとを分離する必要がある。最近蛋白質のクロマトグラフィに使用されてよい結果を示しているイオン交換樹脂には色々あるが、特に Amberlite IRC-50 (XE-64) が ribonuclease, cytochrome C, lysozyme などの分離によい結果が得られている。著者は Hirs 等⁽²⁾の方法に従い、Amberlite XE-64 で色々の濃度の磷酸塩緩衝剤の pH 6~9 の間でリシンに対する分配係数を求めた結果、何れの場合も不可逆的吸着が起る事がわかった。pH の低い程吸着量が多く、高い程少なくなっている。従って pH 6 の磷酸塩緩衝剤に吸着させたリシンを pH 7 の磷酸塩緩衝剤で溶出させる (この場合 pH 6 では溶出しない) と、リシンが溶出されて来るが、その溶出曲線は鋭いピークをつくらず、毒作用もプロテアーゼ作用も同じ分画に溶出され、この樹脂による両作用の分離に失敗した⁽³⁾。そこで著者は連続濾紙電気泳動によりリシンの分離を試みた結果、真のリシンとプロテアーゼとは別の蛋白質である事を推察するに至ったのでここに報告する。

実験方法及び結果

1. リシン 前報⁽¹⁾の如くして結晶リシンは *Ricinus sanguineus* L. より、又リシン Tb は *Ricinus communis* L. より得られたものを使用した。

2. 連続濾紙電気泳動装置及び泳動条件

第 1 表 両リシンの泳動条件

条件	リシン	リシン Tb	結晶リシン
電 圧	200 V	200 V	200 V
電 流	18~20 mA	15~18 mA	15~18 mA
泳 動 時 間	65 時間	20 時間	20 時間
温 度	室 温	室 温	室 温
泳動分画の液量	8~13cc	2.5~4cc	2.5~4cc

Grassmann⁽⁴⁾の考案せる装置を自製して用いた。東洋濾紙 No. 2 を縦 22 cm, 横 23 cm に切って使い、鋸歯部は 1 cm 間隔に 22 片を作り、下降して来る液を試験管に集めた。緩衝剤は pH 8.6 の硼酸塩緩衝剤 (ペロナル緩衝剤の方が幾分分離がよいが大差ない) ($\mu=0.066$) を用いた。リシンを硼酸塩緩衝剤に溶解し、同緩衝剤に対し一夜氷室で透析後濾過したものを細長い濾紙を通じて泳動濾紙と連絡し泳動を行った。泳動条件は泳動実施度毎に異り、全く一致しない。両リシンの泳動条件は第 1 表の如し。

第 1 図 リシン Tb の泳動各分画の蛋白量とプロテアーゼ活性

●—● 蛋白量 ○—○ 蛋白分解作用

3. 泳動分画の蛋白量及びプロテアーゼ活性 分画液の量は第 1 表に示すように各分画同量ではなく、極側では少なく、中央部になる程多い。従ってこれに水を加えてリシン Tb の場合には 15 cc に、結晶の場合には 5 cc にした。この液について蛋白量とプロテアーゼ活性を求めた。

a) 蛋白量：前報⁽¹⁾に従い、278 m μ での吸光度で求めた。

b) プロテアーゼ活性：前報⁽¹⁾に従いカゼイン-Folin 呈色法により求めた。即ち分画液 0.5 cc に pH 3.0 のカゼイン溶液 (0.6%) 5 cc を加え 37° で 20 時間 incubate する。

* Chemical Studies on Toxic protein Ricin in Castor Bean. Part II. Separation of Protease from Ricin by Continuous Paper Electrophoresis.

By Gunki FUNATSU (Biochemical Laboratory, Faculty of Agriculture, Kyushu University)

第2図 結晶リシンの泳動各分画の蛋白量とプロテアーゼ活性

●—● 蛋白量 ○—○ 蛋白分解作用

第2表 リシン Tb の泳動分画 No. 10 と No. 14 との毒力の比較

蛋白量(γ)	試料	分画 No. 10	分画 No. 14
10		3/3 < 19時間	0/3
2		3/3 < 41 "	0/3
0.66		3/3 < 7日	0/3
0.22		0/3	0/3

* 分母は注射したマウスの頭数
分子はたおれたマウスの頭数

第3図 連続濾紙電気泳動により分離したプロテアーゼのヘモグロビンに対する作用

●—● 生ヘモグロビン
○—○ 尿素変性ヘモグロビン

これらの結果を第1図及び第2図に示す。

4. 毒作用の測定

a) 毒作用の測定法： リシン溶液 0.25cc を約 20 g の充分成熟したマウスの腹腔内に注射後、適当な時間毎に観察した。一つの濃度のリシン溶液につき3頭のマウスを使用し、その毒力はマウスを倒すに要する時間にて比較した。

b) リシン Tb の分画液の毒性： 蛋白量が最も多く、プロテアーゼ活性の最も弱い分画 No. 10 と蛋白量は少ないがプロテアーゼ活性の最も強い分画 No. 14 について毒性試験を行った。即ち硼酸塩緩衝剤を除く為両分画を大量の蒸溜水に対して氷室中で4日間時々水をかえながら透析し、その濾液について行った。なおこの場合の蛋白量は透析中に稀釈されて少ないので、前報⁽¹⁾の如く Lowry 法により求め、蒸溜水で稀釈し両分画のリシン濃度を同じにし毒性試験に供した。その結果を第2表に示す。又結晶の場合は No. 8 と No. 13 とにつき毒性試験を行い、同じ結果を得た。

5. 分画液の血球凝集作用 各分画液の血球凝集作用については精査していないが、No. 10 には強い血球凝集作用が認められ、毒蛋白と血球凝集素とはこの条件では分離されない。

6. プロテアーゼ分画のヘモグロビンに対する作用 リシン Tb のプロテアーゼ作用が他のプロテアーゼと異り、生の蛋白質に作用する事は既に Moulé⁽⁵⁾ により述べられた所であるが、Tb 中のプロテアーゼが直接生の蛋白質に作用するのか或は Tb 中に変性酵素が存在し、それによって一度変性を受けて後作用するのか不明である。現に蓖麻子中に変性酵素の存在が荒谷⁽⁶⁾ によって認められている。これらの点を調べる為に、ここで得られたより純粋なプロテアーゼが生蛋白質に作用するか否かを検討した。即ちリシン Tb のプロテアーゼ活性の強い分画 No. 13~15 を集め、コロジオンの袋に入れて氷室中で蒸溜水に対し4日間透析後、凍結乾燥した。一方牛血からアルコール法により得た結晶ヘモグロビンを凍結乾燥して生の基質とし、これに尿素を加えたものを変性ヘモグロビンとして使用した。乾燥ヘモグロビン粉末 0.14 g を 7 cc の各 pH の緩衝剤に溶解する。又尿素変性の場合には 0.14 g のヘモグロビンを 6 M の尿素溶液 (各 pH の緩衝剤に 6 M になる様に尿素を溶かしたもの) に溶解したものを基質とした。これらの基質溶液 3 cc にプロテアーゼ溶液を一定量加え、20 時間 37° で incubate した後、前記⁽¹⁾の Folin 法にてプロテアーゼ活性を求めた。その結果は第3図の如し。

考 察

第1図及び第2図から明らかな様に、pH 8.6 の硼酸塩緩衝剤 ($\mu=0.066$) ではリシンの大部分は陰極の方に移動し、蛋白量曲線とプロテアーゼ活性曲線とは一致しない。リシン Tb と結晶リシンとの泳動図を比較するに前

報⁽¹⁾に述べたようにプロテアーゼ活性は Tb の方がはるかに強く、しかも Tb の場合は陰極側 (分画 No. 8) にもう 1 つのプロテアーゼ活性が認められる。即ち Tb には 2 種類のプロテアーゼが存在する事が明らかになった。一方蛋白量曲線を比較すると、結晶の鋭いピークに対し Tb の方はその広がりが大きい。これらの事実から、Tb は結晶より不均一である事がわかる。しかしいずれの場合も、そのリシンの主成分とプロテアーゼの分離は同じ傾向を示し、リシンは陰極に、プロテアーゼは陽極に泳動している。更に第 2 表から明らかなように、プロテアーゼ活性の最も強い部分に毒性が認められず、逆にプロテアーゼ活性の弱い部分に強い毒性がある事から考えて真の毒蛋白であるリシンとプロテアーゼとは別の蛋白であり、プロテアーゼは不純物として混入しているものと推察される。

この連続濾紙電気泳動に於いては、濾紙上に通じる電流の為熱を生じ屢々蛋白質を変性に導く。又極の冷却用緩衝液の流速により電流の強さが異り、長時間の泳動において泳動距離に変化を来す事がある。従って近接した泳動をもつ蛋白質の場合は分離がきれに行われぬ欠点を有する。しかしこのリシンの場合のように、毒性蛋白質とプロテアーゼが陰極と陽極とに分れる場合には再現性があり、明らかに別の成分であると言ひ得る。Tb の場合、各分画について毒性試験を行っていないので、陰極のリシンの部分に存在する弱いプロテアーゼ作用がいずれのプロテアーゼの混入によるものかはっきりしない現在、この弱いプロテアーゼ作用が毒性の原因でないと言う事は出来ない。酵素活性は基質の種類、pH、イオン強度、無機イオンの存在など数々の因子の影響により大きく左右されるから、かかる条件では弱い活性でも体内で至適条件におかれた場合に強い活性を示さないとも限らず、従ってリシンの毒作用が Moulé が言う様にプロテアーゼ作用によるものであるという推定を全然否定する事は出来ない。しかし結晶ではプロテアーゼは 1 つと推定され、恐らくリシンとプロテアーゼとは異なるものと思われるので、Tb の場合前記の如く泳動の変化により各成分が少しずつ他の分画に連続的に混入するから、プロテアーゼがリシンの主成分の部分に一部混入したと考えた方が妥当のように思われる。何れにせよ Moulé が行った実験での強いプロテアーゼの大部分はリシンと分離出来たわけであって、彼女が行った実験からのリシンの毒作用の機構はもう一度検討される必要があると言えよう。

pH 8.6 に於いてプロテアーゼは陽極に、リシンは陰極に泳動するから、恐らく前者は酸性蛋白で後者は塩基性蛋白質と考えられる。又プロテアーゼの量がリシンの量に較べて非常に少なく、硫酸塩析や等電沈澱では結晶の場合さえ分離されない事から考え、種実中では或は両者が何らかの形で結びついているかもしれないと推察される。

かかる条件では血球凝集素はリシンと同じ分画に来るので両作用が同じかどうかは不明である。

分離されたプロテアーゼをヘモグロビンに作用させると第 3 図から明らかなように至適 pH は 3~4 にあり、カテプシン系に属する。生と尿素変性ヘモグロビンに対する作用は僅か変性ヘモグロビンに対しての方が強いがトリプシン等と異り生のヘモグロビンにも相当強く作用する事がわかる。しかしその作用機構の詳細については更は今後の研究に俟たねばならない。

要 旨

リシン Tb 及び結晶リシンを pH 8.6 の硼酸塩緩衝剤 ($\mu=0.066$) を用いた連続濾紙電気泳動にかけた結果、毒蛋白リシンは陰極に、プロテアーゼは陽極に泳動した。従ってリシンとプロテアーゼは別の蛋白質であり、プロテアーゼ作用が毒性の原因ではないと推論した。又この濾紙電気泳動では血球凝集作用はリシンの部分に存在し、分離されなかった。

終りに臨み、終始御懇篤な御指導を賜った大島康義教授及び船津勝助教授に深謝致します。

(1) 船津 勝, 船津軍喜: 本誌, 33, 461(1959).

Chem., 292, 32 (1953).

(2) C. H. W. Hirs, W. H. Stein, S. Moore: J. Biol. Chem., 200, 493 (1953).

(5) Y. Moulé: Arch. sci. Physiol., 5, 227 (1951).

(3) 船津軍喜: 未発表.

(6) 荒谷真平, 岩崎望彦: 生体の科学, 4, 173 (1953).

(4) W. Grassmann, K. Hannig: Z. physiol.