[農化 第 41 卷, 第 3 号, p.79~83, 1967]

ポーログラフ法を応用した蛋白質の微量定量法について

河田 義孝, 林 屋 慶 三*

(京都府立朱雀高等学校, *京都工芸繊維大学繊維学部)

昭和 41 年 6 月 25 日 受 理

The Application of Polarographic Method for the Quantitative Micro-Determination of Proteins

By Yoshitaka KAWADA and Keizo HAYASHIYA*

*Kyoto Prefectural Suzaku High School ; *Faculty of Textile Fibers,
Kyoto University of Technical Arts and Textile Fibers*

(1) An improved method for the determination of protein by biuret reaction is shown. This method does not rest on usual colorimetric method for a colored matter formed by biuret reaction between protein and copper solutions, but is based on the measurement of free copper left behind the formation of protein-copper complex.

(2) When copper sulfate and protein solutions are less than 2×10^{-4} M and 8×10^{-2} mg/ml in concentrations respectively, free copper left behind the formation of protein-copper complex is measurable by polarographic technics without any disturbance for electrode reaction, indicating that a) reduction wave of copper is not disturbed by the waves of protein and protein-copper complex because electric potential for the former is apart to plus side tolerably from the latter's, b) no decrease of copper wave height with some high polymer substance such as protein is observed at thus low concentrations, c) some contaminants such as amino acids and sugars do not give any effects for the measurement of copper.

(3) Several kinds of proteins such as milk albumin, lysozyme, globulin, casein and bovine serum albumin, except gelatin, gave no specific differences each other for quantitative results. Gelatin will be measured to a little higher amount than real concentration.

Thus the improved method should be available for the microanalysis of proteins and be fit to use as a practical method for various samples such as animal bloods.

(Received June 25, 1966)

緒 言

蛋白質の定量法として 芳香族アミノ酸残基の特性を利用する方法, ペプチド結合の存在を利用する方法, あるいはこれらを基礎にした種々の改良法などが報告されているが, 前者の方法は非常に感度が高いという利点はあるが, 蛋白質の種類による定量値の差異が大きいうという欠点に伴い, 後者はペプチド結合が銅と錯塩を形成して安定な発色を行なうので, 蛋白質の種類による定量値の差異は少ないが, 感度が低いという欠点がある。これらの改良法として, 最近では, Nielsen⁽¹⁾, Westley⁽²⁾

や, 副島ら^(3,4)の報文や総説がみられるが, いずれの方法にも長短相半ばするものをもっているのが現状のようである。筆者らは本報において, ビウレット法およびポーログラフ法による銅の定量法を組合わせて, 比較的微量, かつ簡便な蛋白質の定量法について述べたい。

ビウレット法は, 蛋白質のペプチド結合が銅と安定な錯塩を作ることを利用している。そこで筆者らは, 蛋白質を含む水酸化ナトリウム溶液に, 一定濃度の硫酸銅を過剰に加えて蛋白質銅錯塩を形成させ, いわゆるビウレット反応を行なわせ, しかるのち, 過剰の銅をポーラロ

グラフ法によって測定し、蛋白質銅錯塩の形成のために消費された銅を間接的に測定し、その値から一反応液中の蛋白質を定量することを骨子としている。

実験方法

1. 実験に供した蛋白質：市販の mlik albumin, lysozyme, globulin, casein, bovin serum albumin, gelatin などの純粋な蛋白質、および人血漿とカイコの血液のような粗蛋白質液を用いた。粗蛋白質液の調製法は下記によった。

2. 装置：島津製自記ポーログラフ RP-2 型。

3. ポーログラフ法の電解液の条件： 2×10^{-4} M CuSO_4 , 1 N NaOH, 蛋白質 $0 \sim 8 \times 10^{-2}$ mg/ml であり、各成分の 10 倍濃度溶液をつくり、電解液調製の際に混和し、純水で 10 倍に希釈した。これを H 型電解瓶に移し、キップの装置によって発生させた水素ガスを、ピロガロール溶液中を通して洗滌した後、電解液に飽和させて除酸素し (15 分間)、飽和カロメル電極 (SCE) を対極として、温度 25° で電解した。

4. 滴水水銀電極の特性：純水中、温度 25° 、零加電圧において $m = 1.33 \text{ mg/sec.}$ 、また 0.3 V において $t = 5.41 \text{ sec./drop}$ であった。なお感度は $0.01 \mu\text{A/mm}$ とした。

5. カイコの血液および乾燥人血漿中の蛋白質の定量：カイコの脚を切って流出する血液を氷冷した遠心沈殿管にとり、3,000 r. p. m. で 15 分間遠心分離する。上澄 1 ml をマイクロピペットで 100 ml 容メスフラスコにとり、1 N NaOH 10 ml を加えて、純水で希釈して 100 ml 定容として原液とした。

Trichloroacetic acid (TCA) で処理して不純物を除去する場合は、前記の血液の上澄 1 ml を遠心沈殿管にとり、10% TCA 9 ml を加えて、15 分間遠心分離し、蛋白質を沈殿させて、上澄液をすてる。沈殿した蛋白質を純水に懸濁させ、再び遠心して沈殿させてのち上澄をすてた。これをさらに 2 回繰返したのち、1 N NaOH 10 ml を加えて蛋白質を溶解し、100 ml 容メスフラスコに洗い込み、純水を加えて 100 ml とし、これを原液とした。

乾燥人血漿については、一定量秤量したものについて上と同様の処理をして、ある程度の精製を行なった。

以上の方法によって得た原液について、上述の条件でポーログラフを使用し、蛋白質を定量した。またビウレット法は常法⁽⁵⁾によった。

実験の結果および考察

1. 蛋白質の濃度と銅の還元波

白井⁽⁶⁾は、水酸化カリウム支持塩中の銅の還元液について研究し、1 M 水酸化カリウム支持塩中の銅の直流ポーログラムは、銅が 2×10^{-4} M 以下では半波電位が -0.44 V (vs NCE) にある 1 段波で、銅および水酸化カリウムの濃度が高くなると、1 段波、2 段波、3 段波となり、交流ポーログラムの頂点電位の移動から、第 1 波は、

の反応によるものであり、第 2 波、第 3 波は $[\text{Cu}(\text{OH})_4]^{2-}$ による還元波であることを推定している。筆者らも、水酸化ナトリウム支持塩中の銅の還元波について検討を加えたところ、銅が 2×10^{-4} M 以下では典型的な 1 段波であるが、 5×10^{-4} M 付近から極大波が現われはじめ、 2×10^{-3} M では 2 つの波 (第 1 波、第 2 波) に分離し、第 2 波に極大波をとまうことがわかった。

以上の予備実験から、電解液の条件を 2×10^{-4} M CuSO_4 , 1 N NaOH として、銅濃度を低濃度とし、したがって定量すべき蛋白質も $0 \sim 8 \times 10^{-2}$ mg/ml という微量についてビウレット反応を完結させてのち、わずかに残存する過剰の銅を測定することにした。かくして残存する銅をポーログラフ法で測定した結果は Fig. 1, および Fig. 2 に示したとおりである。

Fig. 1. The Relation between the Concentration of Proteins and the Reduction Wave of Copper.

Proteins: Bovine serum albumin

a: 0, b: 2×10^{-2} mg/ml, c: 4×10^{-2} mg/ml,

d: 6×10^{-2} mg/ml, e: 8×10^{-2} mg/ml

NaOH 1 N, CuSO_4 2×10^{-4} M.

Fig. 2. The Relation between the Concentration of Proteins and the Wave Height of the Reduction Wave of Copper.

Solid line: Bovine serum albumin

Broken line: Gelatin

NaOH 1 N, CuSO_4 2×10^{-4} M.

Fig. 1 は上述のように, serum albumin を銅と反応させてのち, 残存した銅を定量した結果で, serum albumin 濃度 8×10^{-2} mg/ml 以下では, serum albumin の濃度が大になるに従って残存する銅の波高が低下して, 蛋白質に銅が定量的に消費されることを示している. Fig. 2 も同様の実験であるが, 使用した蛋白質のうち gelatin のみは他の蛋白質とくらべて, ビウレット反応にやや相違があるようで, 残存銅量も多少の変動があることをしめした. milk albumin, lysozyme, globulin, casein についても同様の実験を行なったが, これらは bovine serum albumin の結果と大体一致した. なお波高は交点法⁽⁷⁾によって求めた.

この方法で蛋白質を定量する場合, 銅の還元波の再現性が問題となるが, 同一電解液で繰返し銅の波高を測定

した場合の各回の測定値と, その平均値および平均値に付随すべき公算誤差を Table I に示した. 表よりこの方法は, 一定量の銅液に一定量の蛋白質を加えた場合の反応は定量的で, 残存した銅もつねに満足すべき一定値を示すことから, 蛋白質の定量として充分使用し得ると考える. その場合, 蛋白質の濃度をできるだけ低濃度に調製することが望ましい, といえる.

半波電位については, 蛋白質の種類や濃度による差はなく, -0.45 V (vs SCE) であった.

ポーラログラフ法において, 極大波抑制の

ために, 高分子化合物や界面活性物質などが使用されるが, これらが多い場合は, 一般に波高の低下をきたす. そこで, 前述の蛋白質濃度の増加による銅の還元波の波高の低下は, 銅が蛋白質と錯塩を作ったことだけに依存しているかどうかについて, 若干の検討を試みた. すなわちビウレット反応の最小単位である diglycyl glycine (DGG) について上述の定量法を試みた.

DGG は低分子化合物であって, ペプチド結合 2 個を

有し, DGG の量に対して銅の量が過剰の場合は, 銅の還元波と, さらにそれより負の電位に DGG 銅錯塩の還元波が得られ, しかも DGG は電極反応を妨害しないと予想される. しかして, Fig. 3 の a は, DGG の濃度 8×10^{-5} M のときの還元波を示したものであるが, 1 つが $\text{Cu}(\text{OH})_2$ の還元波, 他は DGG 銅錯塩の還元波であると考えられる. 図でわかる

Fig. 3. The Influence of High Polymers upon the Reduction Wave of Copper.

a: DGG 8×10^{-5} M, PVA 0

b: DGG 8×10^{-5} M,

PVA 6×10^{-2} mg/ml

NaOH 1 N, CuSO_4 2×10^{-4} M

TABLE I. THE WAVE HEIGHT OF THE REDUCTION WAVE OF COPPER IN THE SAME ELECTROLYTIC SOLUTION AND ITS REPRODUCIBILITY

Concentration of protein (mg/ml)	Wave height (mm)										Mean and probable error (mm)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0	104	104	105	104	105	105	105	105	104	105	104.6 ± 0.1101
2×10^{-3}	84	85	85	85	84	85	85	85	85	84	84.7 ± 0.1031
4×10^{-3}	64	64	65	65	65	64	65	65	65	65	64.7 ± 0.1031
6×10^{-3}	44	44	44	44	44	44	45	44	45	44	44.2 ± 0.0899
8×10^{-3}	30	29	28	28	29	28	28	28	28	29	28.5 ± 0.1508

CuSO_4 2×10^{-4} M, NaOH 1 N, sensitivity $0.01 \mu\text{A}/\text{mm}$.

Fig. 4. The Relation between the Concentration of Diglycyl Glycine and the Wave Height of the Reduction Wave of Copper.

Diglycyl glycine a: 0 , b: 4×10^{-5} M, c: 8×10^{-5} M, d: 1.2×10^{-4} M, e: 1.6×10^{-4} M, f: 2×10^{-4} M
PVA 6×10^{-2} mg/ml, NaOH 1 N, CuSO_4 2×10^{-4} M.

ように、銅の還元波と DGG 銅錯塩の還元波は、半波電位の差が少ないため 2 つの波の分離が悪い。この点が蛋白質の場合と異なるので、電極反応を蛋白質と類似させるため、高分子化合物の polyvinyl alcohol (PVA, 重合度 1,300) を一定量加えてその影響をしらべた。Fig. 3b に示したように、PVA は 6×10^{-2} mg/ml 程度では銅の波高に対しては影響をあたえず、半波電位をより負の電位に移行させることがわかった。そこで、筆者らは PVA の濃度を 6×10^{-2} mg/ml として、DGG の濃度を変化させた場合の銅の波高の変化を Fig. 4 に示した。波高を求めるための作図法は交点法によった。図から DGG の濃度が増加するに従って銅の波高が低下することがわかる。同一電解液で 10 回繰返しポーログラムをとったときの、波高の平均値 (mm) および付随すべき公算誤差は、DGG の濃度が 0 , 4×10^{-5} M, 8×10^{-5} M, 1.2×10^{-4} M において、それぞれ 104.6 ± 0.1101 , 82.2 ± 0.1589 , 62.8 ± 0.1960 , 42.2 ± 0.1682 で求められた。また図から、DGG 銅錯塩の波高は、銅の波高の減少に逆比例して増加することがわかる。

以上の結果から、1 N NaOH を支持塩として、 8×10^{-2} mg/ml 以下の蛋白質に一定量の硫酸銅を加えて蛋白質銅錯塩を形成させ、過剰の銅を測定した場合、半波電位 -0.45 V の波は、銅によってのみ起こる還元波である。したがって、波高の変動を知ることによって、銅の量の

変動がわかり、間接的には蛋白質の量を定量することが可能である。

2. 銅の還元波に対する不純物の影響

定量を迅速かつ簡単に行なうことが目的の場合は、影響をおよぼす不純物の処理が厄介である。筆者らは主として、この定量法を血液中の蛋白質の定量に適用した場合を考えて、この点について検討した。

Table II に示したように、カイコの血液および人血漿中の蛋白質を、あらかじめ TCA で沈殿させ、不純物を除去した粗蛋白質液について測定した場合と、無処理の血液について測定した場合とで、両者の蛋白質量に差はきわめて少なかった。したがって、この方法は実用的

TABLE II. COMPARISON OF PROTEIN CONCENTRATION DETERMINED BY POLAROGRAPHIC METHOD WITH THAT BY BIURET METHOD.

Protein Concentration in Blood of Silk-Worms. (g/100 ml)

	Polarographic method		Biuret method	
	Non-treatment	TCA treatment	Non-treatment	TCA treatment
Fifth stage				
Third day	2.5	2.6	2.8	2.6
Sixth day	5.0	4.7	5.3	4.8
Tenth day	8.5	8.3	9.1	8.2

The Percentage of Proteins Contained in the Dried Human Blood-Plasma. (%)

Polarographic method		Biuret method	
Non-treatment	TCA treatment	Non-treatment	TCA treatment
92	92	93	92

TABLE III. THE INFLUENCE OF AMINO ACID AND SUGARS ON THE REDUCTION WAVE OF COPPER.

Amino acid and sugars	Concentration (M)	Wave height (mm)
—	0	55
Glucose	5×10^{-4}	55
Trehalose	5×10^{-4}	54
Leucin	1×10^{-4}	55
Aspartic acid	1×10^{-3}	56
Lysin	1×10^{-3}	55
Cystin	8×10^{-6}	55
Methionin	5×10^{-4}	55
Tyrosin	5×10^{-4}	55
Hydroxylamin	1×10^{-3}	54
Tholeonin	1×10^{-3}	54

CuSO_4 2×10^{-4} M, NaOH 1 N,
Bovine serum albumin 5×10^{-2} mg/ml.

にも蛋白質の定量が可能であり、かつ、不純物の影響は無視し得ることを示している。

なお、念のため血液中に多量存在と思われる諸物質の影響を調べ、Table III に示した。表でわかるように、cystin が最も影響大であるが、血液の場合は 1,000 倍程度に希釈して電解に供するので、 $8 \times 10^{-6} M$ より低い濃度になり、実際には影響をあたえない。他の諸物質についても同様で、定量を阻害するとは思われない。

3. ビウレット法との比較

ビウレット法が、蛋白質銅錯塩の量を比色定量しているのに反し、本法は、蛋白質溶液に水酸化ナトリウム溶液と、一定濃度の硫酸銅とを過剰に加えて蛋白質銅錯塩を形成させ、余った銅をポーラログラフ法で知り、間接的に蛋白質銅錯塩を定量することになるので、二者を比較すると Table II に示したように、ポーラログラフ法で測定した無処理の血液中の蛋白質、および血液を TCA 処理した粗蛋白質の定量値はほぼ等しく、またこれは、あらかじめ TCA 処理をして精製した蛋白質をビウレット法で測定した定量値と一致し、無処理の血液をビウレット法で測定した値は、上の 3 者に比べてやや大きな開きがある。これはビウレット法が比較的高濃度の蛋白質を比色定量する方法であるから、無処理のカイコの血液の場合は、血液が最初から少々着色しているために、定量値がやや大になって測定されるものと考えられる。

つぎに感度を比較すると、ビウレット法が蛋白質濃度約 0.2~2 mg/ml を最適濃度としている⁽⁶⁾のに反し、本法は 0.01~0.08 mg/ml を適当とする。

要 約

(1) 蛋白質の定量法の一つであるビウレット法の改良法として、蛋白質溶液の 1 N NaOH 溶液に、正確に

一定量の硫酸銅を含ませ、錯塩形成後の過剰の遊離の銅量をポーラログラフ法によって定量し、銅と結合した蛋白質量を間接的に測定する方法について研究した。

(2) 蛋白質濃度が 8×10^{-2} mg/ml 以下で、硫酸銅濃度が $2 \times 10^{-4} M$ 以下という微量定量の場合には、蛋白質と銅とは定量的に結合し、かつ、ポーラログラフ法による過剰の銅量の測定に、何ら支障がみられない。

(3) a) 蛋白質銅錯塩の還元波は、銅の還元波の電位より負にずれるために両還元波を分離して測定でき、b) いわゆる高分子物質などによる銅の波高の低下も、この濃度では無視され、c) アミノ酸、糖類などの不純物が存在する場合にも、その影響をうけない。d) 蛋白質濃度が $1 \times 10^{-2} \sim 8 \times 10^{-2}$ mg/ml の範囲が最も適当な測定範囲で微量定量が可能であり、e) 蛋白質の種類による定量値の差異もほとんどみられない。

最後に、この研究を行なうにあたって、ご助言をいただいた京都大学食糧科学研究所長秦忠夫博士、並びに京都大学農学部教授千田貢博士に対し感謝の意を表する。なお本研究は、日本農芸化学会昭和 39 年度大会において発表したものである。

- (1) H. Nielsen : *Acta Chem. Scand.*, **12**, 38 (1958).
- (2) J. Westley et al. : *Biochim. Biophys. Acta*, **40**, 364 (1960).
- (3) 副島正美ら : 化学と生物, **4**, 37 (1966).
- (4) 副島正美ら : 同上, **4**, 90 (1966).
- (5) 日本化学会編 : 実験化学講座, **23**, 37 (1957).
- (6) 白井ひで子 : 日化, **80**, 1435 (1959).
- (7) 武者宗一郎 : ポーラログラフイー, 151 (1961).