前放電して妨害し、中性近傍では水酸化アルミニウムが沈澱し、アルカリ性に於けるアルミン酸イオンは還元波を生じないからである。この様な非緩衝溶液 $\text{pH} \approx 4$ 中に於けるアルミニウムの半波電位は $E_{1/2} = -1.76\text{V}$ 対S.C.E.である。

操作 混合水酸化物は温 $6\text{N-H}_2\text{SO}_4$ の5mlを用いて溶解せしめ、 LiOH 溶液を用いて $\text{Fe}(\text{OH})_3$ の沈澱する直前の酸性迄中和し、水銀陰極槽に移し電解を行う。電解終了後メチルオレンジ・インヂゴカーミン混合指示薬を用いて更に正確に $\text{pH} \approx 4$ にまで中和し、然る後定容に稀釈してポーラログラムを記録し定量する。電解分離は1アンペア時位で終了する($\text{Fe} = 10\text{mg}$ の場合)がなお赤血塩を外部指示薬的に用い、第1鉄イオンの呈色を示さなくなる迄行えばよい。又酸の中和にはすべて LiOH を使う方がよい。 NaOH も使つて差支えがないが Al 波の拡散電流範囲が狭くなる恐れがある。

(その他)

斯様な定電流水銀陰極ポーラログラフ法は第1表より明かな如く、更にタングステン、ウラン等の分析に今後広く利用されると思われる。

(未了)

本文起草に當り、恩師石橋雅義教授に種々御懇篤なる御示唆を頂きました事を深く感謝致します。

文 献

- 1) W. Gibbs : Chem. News, **42**, 291 (1880), Z. anal. Chem., **22**, 558 (1883).
- 2) J. A. Maxwell, R. P. Graham : Chem. Revs., **46**, 471 (1950).
- 3) J. J. Lingane, L. Meites : Anal. Chem., **19**, 159 (1947).
- 4) R. P. Graham, J. A. Maxwell : Anal. Chem., **23**, 1123 (1951).
- 5) 石橋, 藤永: Proceedings of the 1st International Polarographic Congr. Prague, Vol 1, 106 (1950) 及び日化誌, **73**, 783 (1952).
- 6) 石橋, 藤永, 山田: 日化第7年会 (1954), 電気化学会第21回大会 (1954).
- 7) 石橋, 藤永: 化学誌, **9**, 168 (1953).
- 8) E. J. Center, R. C. Overbeck, D. I. Chase : Anal. Chem., **23**, 1134 (1951).
- 9) 吉田: Oriental J. Diseases Infants, **23**, 15 (1938).
- 10) P. N. Kovalenko : Zavodskaya Lab., **14**, 386 (1948).

〔蛋白波に関する諸問題, I〕

蛋白波とSH基*

小 出 眞 次**

1 は し が き

蛋白質中のSH基は蛋白質の示す種々の生化学的な作用においてきわめて重要な役割を演じている。例えば、いわゆるSH酵素においてはその蛋白担体中のSH基が活性であるときは酵素反応は活性であるが、SH基が酸化されたり置換されたりするときは不活性になることがよく

知られている。そこで蛋白質中の遊離SH基の定量が種々の方法によつて提案されているが、ポーラログラフ蛋白波はBrdickaによるその発見以来蛋白質中のSH基によつて蛋白波が出現するものと信ぜられてきたので、「蛋白波によつて蛋白質中の遊離SH基が定量できるのではないか」と多くの人達によつて考えられた。又いわゆる「ポーラログラフ血清反応」においても、その発見は蛋白波が血清蛋白質のSH基の活性度をあらわすものとの仮定から出発し

* Polarographic Protein Wave and SH-group
Shinji Koide, 京都大学農学部農芸化学教室

たのであるが、この血清反応が血清のどのような病理学的な変化に対応しているかを明らかにするためにも蛋白波の機構、とくに蛋白波と蛋白質のSH基との関係を明らかにすることが要望される。今後、蛋白波を応用するためには、まず「蛋白波は何をあらわしているか」ということを明らかにしなければならないが、そのなかでも最も重要な鍵となる蛋白波とSH基との関係についてこれまでになされた研究業績をまとめて紹介する。なお、本稿においては蛋白波についての詳細は省略するから参考書についてこれを見られたい¹⁾。

2 Brdicka のSH基説

1933年、Brdicka²⁾はコバルトアミン溶液よりのCo⁺⁺の還元波に生ずる極大波を抑制する目的で血清を添加したところ極大波は抑制されたが、新しく2つの極大波（いわゆる蛋白波）を生ずることを見出した。これは全くそのときBrdicka自身も述べているように“remarkable and rather unexpected phenomenon”であった。丁度そのとき既にその極大抑制力が知られていた血清が手許にあつたという偶然の機会が、血清、コバルト塩、アンモニアの組合わせを生み出し、Heyrovsky研究室においてポーログラフイーの研究をはじめたばかりのBrdickaをして蛋白波の発見者たらしめたとも云えるのである。そして、Brdickaはこの不思議な現象の解明にひたむきに進んで行く。「何故血清を加えることによつてこのような現象が現れたのであろうか？」このときBrdickaの脳裡には当然それ以前にBabicka及びHeyrovsky³⁾によつて発見されていた血清による“Albumin wave”の現象が浮び出ていたことであろう。「血清以外の蛋白質でもこのような現象はみられないのであろうか？」これを検討してみると血清のアルブミン、グロブリン、オイグロブリン、卵白溶液、乳精、インシュリン、各種のWine-vinegar、ビール、葡萄酒、羊毛の水抽出液等では蛋白波はみられたが、ゼラチン、Fermented vinegar、絹の水抽出液などでは蛋白波はみられなかつた。この区分はAlbumin

waveの場合にもあてはまり、これはおそらくそれらの蛋白質を構成するアミノ酸の種類の相異に基づくのであろうと考えた。そこで蛋白質の代りに2, 3のアミノ酸を加えるとglyocol, asparagine, creatine, creatinine, arginine, leucine, tyrosineでは蛋白波はみられなかつたが、シスチンでは蛋白波の第2の極大波の電位にひとつの極大波があらわれた。シスチンは殆んどすべての蛋白質中に存在するが、ゼラチンや絹の蛋白質には含まれていない。しかも、これらの蛋白は蛋白波を示さない。この注目すべき事実より「シスチン又はシステインを構成アミノ酸として含む蛋白質だけが蛋白波を示す」という重大な結論をひき出した。更に、シスチン、システイン、グルタチオン等について詳しく検討した結果、それらの示す接触波（シスチン波）と蛋白波との間にきわめて密接な関係があることを確めた。ただ、この場合次のような相違がみられた。

(1) 蛋白波は2段の極大波としてあらわれるが、シスチン波は1段であり*、その電位は蛋白波の2段目のものに大略等しい。

(2) 蛋白波は2価、3価いずれのコバルト塩を用いてもあらわれるが、シスチン波は2価のコバルト塩の存在する場合にのみあらわれる**。

シスチン波の種々の実験事実よりBrdickaはSH基よりの水素の接触還元によるという電

* シスチン濃度が高い場合にはシスチン波よりも陽の電位にもうひとつの極大波があらわれる。普通のシスチン波の波高は滴下極の表面積に比例し、コバルト塩の濃度とは直線関係ではなく接触波の特性を示すが、高い濃度であらわれるもう一方の極大波の波高はコバルト塩の濃度に比例し、滴下時間 t の $1/6$ 乗に比例し、拡散律速を示している。Müller⁴⁾はこの事実より、前者は電極表面でつくられるコバルトアマルガムの接觸的な作用によるもので、後者は電極表面に拡散してくるコバルト・システイン錯化合物の作用によるものであると述べている。

** システインの比較的高濃度(>10⁻³M)ではコバルトアミン溶液においてもシスチン波はみられるとの観察もある。

極反応機構を推定したが、最近の綜説においてもほぼ同様に次のように述べている⁶⁾。

2価のコバルトイオンとシステインを含むpH 約9.5の NH_3 , NH_4Cl 溶液中では次の錯化合物の存在が考えられる。

ここでSH基は中心のコバルト原子の Co-ordination-sphere の中に入っている。このことは一方ではSH基の酸としての性質を増し、他方ではこの錯化合物からのコバルトの電解析出後においてさえこの結合をadsorption bond としてある程度保つてであろう。そして、電極表面に適当な吸着層を生じ、これは水素過電圧をいちぢるしく下げる強い接触力をもっている。このようにして電極における水素の析出による電流が流れシスチン波をあらわすことになる。コバルトアミンがシステインとこのような錯化合物をつくりにくいことは、コバルトアミン溶液中ではシスチン波のあらわれないことを現わしている。しかし、蛋白質ではコバルトアミンが電極で2価に還元後にこのような錯化合物がつくられる。これはシステイン核との錯化合物生成をさまたげるアンモニアの Coordinatively bound molecule が蛋白の中和力によってとりさられるであろうからであると説明している。

Stromberg⁷⁾も電極で析出したコバルト上に吸着されたSH基による水素過電圧の低下によつて蛋白波があらわれ、この吸着は錯化合物中のシステインの硫黄とコバルトとの間の Co-ordinative bond に由来すると述べている。

これらの電極反応機構の当否は別としてもシスチン波に関するかぎり、システインのSH基が主役を演じているであろうということは種々の経験的事実よりあきらかである。例えば、

homocysteine や β, β -dimethyl cysteine, thioglycolic acid 等のSH化合物はすべてシスチン波を示すが同じ含硫アミノ酸でもSH基をもたない methionine, djenkolic acid, benzoyl cysteine 等はシスチン波を示さない。又、SH基と反応してSH基を不活性にするヨード錯酸の添加によつてシステインによるシスチン波は抑制されるが、一方、シスチンによるシスチン波は抑制されなかつたという事実等はこれによく裏書きしている^{8)*}。

Brdicka は蛋白波においても、蛋白質を構成するシスチン（或いはシステイン）によつてシスチン波と同様な現象が起るものと類推した。そして、蛋白波の場合はシステイン単独の場合よりもSH基が活性であるため、より陽の電位で接触波があらわれるものと説明した⁹⁾。しかしながら蛋白波の場合については果してこのような類推だけで正しいであろうか。蛋白質中にシスチン或いはシステイン核が含まれるときはそれらが単独で存在するときとちがつていろいろちがつた性質を持ちうるであろう。Brdicka⁶⁾は蛋白波のいろいろちがつた形のあらわれることを蛋白分子中のこれらの核の結合のちがいによるのであらうとし、又、接触反応はSH基になりあう基によつても影響されるであらうと考えている。アンモニアの濃度が高いとき蛋白波の形が単一なまゝい極大波になつてしまうという事実によつてこのような考え方は支持されるであらうと述べている。

3 蛋白質のSH含量との関係

Brdicka はシステイン或いはシスチンを含む蛋白質だけが蛋白波を示すことを明らかにしたが、蛋白波が蛋白質中のSH基の作用に基づくとするならば、SH基或いは電極にてそれに還元しうるSS基を多くもつ蛋白質程、その蛋白波の波高は大きくなければならない。単一な蛋

* 最近、秦、松下¹⁰⁾はシスチン、システインの各種誘導体を合成してそのシスチン波を調べた結果、SH基がmaskされた化合物はシスチン波の低下或いは消失を示すが、 NH_2 基をmaskしてもかかる現象をみとめなかつた。

白質についてみると、蛋白質の種類によつて波高が異なることは多くの人達によつて見出されたが、例えば、秦¹⁰⁾は各蛋白質の0.02%溶液について血清アルブミン、卵アルブミン、 α -カゼイン、 β -カゼインの蛋白波を比較したが、その波高は各蛋白質のシスチン含量の高い程高かつた。シスチンを含まない β -カゼインは蛋白波を示さず、勿論 β -カゼインにシスチンを加えただけでは蛋白波はあらわれなかつた。このように蛋白波は蛋白質中のSH含量とあきらかに関係するが、化学処理によつて蛋白質中にSH基を導入すると蛋白波は増強される。秦、松下¹¹⁾はカゼインを dithioglycolic acid で thioglycol 化することによつてカゼインのSH基を増強した。この場合カゼイン中の lysine の ϵ -NH₂ に dithioglycolic acid は結合するものと考えられている。thioglycol 化したカゼインはカゼインそのものより確に蛋白波は高くなつたが、蛋白波の性質は必ずしもカゼインそのものとは一致していない。例えばカゼインによる蛋白波はコバルトアミンの濃度($5 \times 10^{-4} \sim 3 \times 10^{-3} M$)に比例して高くなるが、thioglycol 化したカゼインの蛋白波はコバルトアミン濃度が高くなるとかえつて低くなる。温度による影響はカゼインそのものによるより thioglycol 化したカゼインによる方がいちぢるしい。又、システイン等のSH基はH₂O₂処理によつて cysteic acid (RSO₃H) に酸化され、cysteic acid はきわめて低いシスチン波しか示さないが、thioglycol 化したカゼインをH₂O₂で処理するとその蛋白波の波高はきわめていぢるしく減少した。蛋白波を示さないゼラチンを同様に thioglycol 化しても蛋白波を示すようになる。

これらの実験事実によつて蛋白波と蛋白質のSH含量との間に密接な関係があることがあきらかにされたが、蛋白中に含まれるすべてのSH基が同じ状態にあるわけではなく、蛋白波をあらわすのに活性なSH基と不活性なSH基とに分けられることもありうるので、単に蛋白質中の総SH量だけで論じうるであらうか。このことは次項変性の影響の場合にも観察することができるであらうが、このようないわば巨視的な見

方とはちがつてもう少し微視的な研究をつけくわえておく。

最近、Millar¹²⁻¹³⁾は蛋白波についてのきわめて綿密な研究を行つたが、その中で次のような興味ある実験結果を得た。蛋白波の波高と蛋白濃度との関係は周知のように Langmuir の吸着等温式と同じような式であらわされる。

$$H = \frac{aBC}{1+aC} \dots \dots \dots (1)$$

Hは波高、Cは蛋白濃度、a、Bは恒数である。Cが大きくなるとHは限界値(H_{max})に達し、Bにひとしくなる。HがBに達する速さはaに比例している。(1)式は次のようにかきかえられる。

$$\frac{C}{H} = \frac{1}{aB} + \frac{C}{B} \dots \dots \dots (2)$$

C/HとCとは直線関係にあり、これよりBとaは決定できる。電極表面に吸着される分子が大きいときには、与えられた面積中に詰めこまれる分子の数は分子の大きさ又は Protein aggregate の大きさによつて影響されるので、これらの大きさによつてBの値はきまらべきである。今Bの値とX線廻接によつて得られた protein aggregate の容積との関係をしらべると、予期された通り、大きい分子程電極の単位表面積当りに供給される量は少なく、従つて、large aggregate volume の蛋白質程Bの値は小さかつた。次にBの値と次の比 (total potential RSH/protein aggregate volume) との関係をしらべた。ここにいう total potential RSH (μ moles/g. protein) は蛋白質中に含まれるシステインのモル数とシスチンのモル数の2倍の和である。この結果も直線関係が得られこの結果より Millar は蛋白質中の total potential RSH がポーラログラフ的に有効であると結論している。Millar は又、蛋白波に対する溶液のpHの影響をしらべたが、中性及び酸性では蛋白波の波高は一定でありこのときの波高(i_a)と total potential RSH との間に直線関係を見出し、この結果からも酸性溶液ではすべての potential SH基がポーラログラフ的に活性であると結論している。緩衝系のpK附近にpHが

達すると蛋白波の波高は極大値に達し、この場合もその波高と total potential RSH との間に関係のあることを見出したが、その関係は直線的ではなかつた。このように Millar は蛋白質中のすべての SH 基がひとしく蛋白波を示すのに活性であると述べているが、これはあきらかに変性による影響についての多くの説明とは対立している。Millar はこれらの変性の研究に用いられている緩衝液は pH が約 9.3 であるがこれが変性蛋白の添加によつて少し酸性になるならば、蛋白波の波高と pH との関係より明らかなように波高は増加する。従つて、変性によつて不活性の SH 基が活性になつたというような説明は不用であると述べている。

4 変性の影響

蛋白質の熱変性、紫外線照射による変性、アルカリ変性の場合において、変性の経過とともに蛋白波の波高はある時間で極大値に達し、ついで下降するという一般的な様相を示す¹⁾。これは SH 基説の立場からは次のように説明され、変性の過程が (A) 分子の変形、(B) 分子の会合(凝縮)という 2 つの過程の継起反応であることと対応している。(A) の反応によつて蛋白内部のポーラログラフ的に不活性な SH 基も活性になり、活性な SH 基は増加し波高は増加するが、一方、ついで (B) の反応でポーラログラフ的に不活性な分子に変化し波高の低下を来すので、時間の経過と共に波高は極大値を通る丘陵型を示して変化するのであろう。アルカリ変性の場合の温度が高いときはおそらく (B) の反応の温度効果が大きいので、(B) の反応が速く起り、(A) の反応で蛋白波が増強されてもすぐ不活性化されてゆくので波高の低下のみがみられる。秦、松下¹⁵⁾は鶏卵アルブミンのアルカリ変性において、遊離 SH 基の生成を AgNO_3 による電流滴定法によつて測定し、変性処理による遊離 SH 基の増加を観察した*。同様な変性処理の蛋白

波に及ぼす影響と比較すると必ずしも両者は平行ではなかつたが、遊離 SH 基の増加は蛋白波の増強を示していた。

変性処理による SH 基の増加は種々の方法によつて示され、これが定性的には蛋白波の増強としてあらわれるので、蛋白波の SH 基説に対して変性処理の研究は最も効果的であるようであるが、現在未だ定量的な結論は得られていない。

5 SH 試薬の作用

蛋白波が蛋白質中の遊離の SH 基によるならば、いわゆる SH 試薬によつて SH 基を不活性化するならば、それだけ蛋白波は抑制あるいは消失しなければならないと考えられる。Müller 等¹⁶⁾は血漿のアルカリ変性の場合についてヨード醋酸を作用させたとき、その蛋白波の波高を比較したところ、正常人からの 52 例では $93.7 \pm 0.5\%$ 、種々の疾患の患者の 155 例では $93.2 \pm 0.3\%$ の 8 つの例では $88.4 \pm 0.7\%$ にしか波高は低下しなかつた。即ち、これらの例ではヨード醋酸によつては波高の低下は殆んどみられない。Baumbergar¹⁷⁾はフィブリノーゲンにヨード醋酸を加えても蛋白波は抑制されなかつたが、Duponal WA で処理すると蛋白波はヨード醋酸で抑制された。

秦、松下¹⁵⁾は変性卵アルブミンを p-chloro-mercuribenzoate で処理したところ、電流滴定の結果から遊離の SH 基は完全に消失したのかかわらず蛋白波には何らの影響をもみとめ得なかつた。そこで、蛋白質の SH 基に p-chloro-mercuribenzoate が結合しても、蛋白波があらわれる電極電位においてはこの結合が切れるか、或いは、結合していても蛋白波の出現には何等差支えないのではなからうかと考えた。更に彼等は dinitrofluorobenzene の作用を種々の蛋白質についてしらべた¹⁸⁾。アルカリ変性した卵アルブミン (0.032%) に dinitrofluorobenzene を作用させると蛋白波の波高は減少し、dinitrofluorobenzene の濃度が $4 \times 10^{-3} \text{M}$ 以上ではその減少は限界値に達し、約 40% にまで減少するが完全には消失しない。次に

* 変性処理時間を 15 分間とし、アルカリの濃度を 0 ~ 0.6M に変化させた。アルカリ濃度零ではシステイン量は零、NaOH 0.2M でシステイン量は大体一定値 0.86% に達した。

変性卵アルブミンをあらかじめ p-chloromercuribenzoate で処理し、ついで dinitrofluorobenzene で処理すると蛋白波の低下はみられなかった。このことは p-chloromercuribenzoate が SH 基に結合し dinitrofluorobenzene の作用を防害しているためと解釈される。これらの事実は蛋白波の出現には SH 基が最も大なる役割を果しているであろうことをよく理解させるが、これらの SH 試薬によつても蛋白波を完全に抑制し得ないことは注意しなければならない。

6 あとがき

以上述べたところによつて、蛋白波の出現には蛋白質中の SH 基の存在が必要であり、量的にもある程度関係がみられるが、未だ定量的な関係は得られていない。蛋白波の全体に SH 基が寄与しているのか、あるいはその一部が蛋白質中の他の特殊な基によるのかも不明である。ピリジン及びピリジン核を有する有機化合物によつて水素過電圧が下げられ、いわゆる接触還元波があらわれるが、これとは全く関係がないだろうか。とくに興味のあるのは、浜本、山内等¹⁰⁾及び館、筆者等²⁰⁾によつて研究されたビタミン B₁ 及びその類縁化合物によるコバルト塩溶液中の接触波がシスチン波よりもむしろ蛋白波に類似の現象を示し、しかもこれらは必ずしも SH 基と直接関係しないという事実を示している。筆者等はコバルト塩溶液中の接触波を次のように分類した。

(a) 蛋白波：含硫アミノ酸をふくむ蛋白質の存在による。コバルト塩は 2 価でも 3 価でも同じ。2 段波をしめす。

(b) シスチン波：システイン、シスチン等 SH 基或いは SS 基の存在による。コバルト塩は 2 価のときだけにあらわれる。一般に 1 段波。

(c) B₁ などによる接触波：コバルト塩は 2 価でも 3 価でも同じ。2 段波をしめすものがある。

(d) β -phenyl- β -alamine, histidine などによる特殊な接触波。

今後これらの接触波を比較検討してゆくなれば、Brdicka の発見以来の蛋白波の機構についての SH 仮説はさらにより確固とした基礎の上において批判されるであろう。

〔附記〕 本稿起草にあたり御教示と資料を提供された京都大学食糧科学研究所秦助教にお禮を申し上げます。

文 献

- 1) 館勇編「ポーラログラフィー」(昭29, 岩波書店) 385頁.
- 2) R. Brdicka: Collection Czech. Chem. Comm. 5, (1933) 112.
- 3) J. Babicka and J. Heyrovsky: ibid 2 (1930) 270.
- 4) R. Brdicka: ibid 5, (1933) 148.
- 5) O.H. Müller: Fed. Proc. 8 (1949) No 1, 119.
- 6) R. Brdicka: Research 1 (1947) 25.
- 7) A.G. Stromberg: Zurn. fis. chim. 20, (1946) 409.
- 8) R. Brdicka: J. Chim. phys. 35, (1938) 89.
- 9) R. Brdicka: Collection Czech. Chem. Comm. 11, (1939) 614.
- 10) 秦: 食研報告, No. 6 (1951) 45.
- 11) 秦, 松下: 日本農芸化学会大会(昭29, 4)にて発表.
- 12) G.J. Millar: Biochem. J. 53 (1953) 385.
- 13) G.J. Millar: ibid. 393.
- 14) 秦, 松下: 食研報告, No. 7 (1951) 42.
- 15) O.H. Müller and J.S. Davis: Arch. Biochem. 15, (1947) 39.
- 16) J.P. Baumbergar: Am. J. Physiol. 133 (1941) 206.
- 17) 秦, 松下: 日本農芸化学会大会(昭29, 4)にて発表.
- 18) 山内: ビタミン, 1, (1948) 199, 7, (1954) 257, 274.
- 19) 館, 小出: 農化, 25, (1951~52) 145, 330, 26, (1952) 249, 255.