魚類血液の生化学的研究—Ⅸ.

血清蛋白質の濾紙電気泳動法による分析について*

斎藤 要

(鹿児島大学水産学部)

Biochemical Studies on the Fish Blood—K.

On the Paper Electrophoretic Analysis of Serum Proteins

Kaname SAITŌ

(1) In the paper electrophoretic analysis of the serum proteins of fish, it was found to be very important to select the kind of buffer solution, its pH and ionic strength.

(2) The existence of such characteristics of the serum protein composition as reported in the former paper was equally ascertained. Moreover in the serum of both shark and skate, the existence of the component invested with the less mobility than that of γ -globulin contained in the human serum was also ascertained.

(3) As the result of applying paper electrophoresis both to the shark serum containing large amounts of non-protein nitrogen compounds and to its dialysed one, it was ascertained that, from the qualitative analytical point of view, even in the case of the original serum, the influences of the co-existing non-protein substances might safely be put out of consideration.

(4) TISELIUS method was found to be more effective for separating each component protein than the paper electrophoresis. And under the ordinary condition, paper electrophoresis gives a higher value, relative proportion of component, to the fraction with low mobility and a lower to the fraction with high mobility than those obtained by TISELIUS method.

濾紙電気泳動法に関しては 1948 年 WIELAND 等¹⁾の発表以来多くの検討と改良が加えられ、特に 1951 年 GRASSMAN 等²⁾によつて泳動後の濾紙より比較的簡単に泳動曲線を得る直接比色法が完成されてからは、血清蛋白質の分析法として一般に普及した。本法はその分析精度より考え、定量的応用については多少の疑問も残されているが、一方独自の特長を有する。例えば血清の使用量が微量ですむから TISELIUS 法では実施困難と考えられる小型魚の血清でも容易に検討し得るのみならず、血清中の複合蛋白質の分析をも同時に行える。従つて実験目的によつては本法にもかなりの利用価値があるので著者は TISELIUS 法と併用しているが、本報では魚類の血清を試料とした場合の泳動条件並にその泳動結果を TISELIUS 法と比較して得た若干の知見を報告する。

実 験 の 部

実験材料：実験に供した魚種、採集の時期及び水域等については第Ⅷ報⁴⁾を参照されたい。

泳動装置：本法には各種の装置が考案されているが、我国で多く使用されているものは GRASSMAN-HANNIG³⁾及び KUNKEL-TISELIUS⁵⁾の変法である。本実験では東洋濾紙式電気泳動装置 C 号を一部改造して用いた。即ち本装置附属の開放型電極槽をゴム栓容器に改め、通電により内部に発生したガスを装置外に排気し得るようにした。又本装置附属の濾紙保持枠では長さ約 34 cm の濾紙を必要とするが、血清蛋白質の泳動には、その長さ約 20 cm で充分である。従つて濾紙節約のため保持枠のベークライト板間の距離を約 18 cm に短縮し、更らに泳動を略々一定温度 (7~10°C) で行うため、装置を自製の氷箱中に納めうるように改造して用いた。

1. 泳動条件の吟味

TISELIUS 法の泳動条件 (第Ⅷ報⁴⁾ 参照) に関しては電気泳動研究会の標準法が規定されているが、濾紙法では現在のところ一定の規準はないようである。従つて使用する泳動装置又は試料の種類に応じて検討する必要がある。このような意味で若干の予備実験を行つたが、次にその結果の概要を述べる。

1956 年 8 月 18 日受理

* 1955 年 4 月、日本水産学会年次大会で一部発表

血清の使用量：これは試料の蛋白質濃度或は使用する濾紙中等により加減すべきであつて、著者の検討した結果では濾紙巾1 cm 当り、蛋白質として0.3~0.4 mg 量が適当であつた。従つて2 cm 巾の濾紙を使用すれば供試硬骨魚の血清（蛋白質濃度、5~7 g/dl）では0.01 cc、又供試軟骨魚の血清（蛋白質濃度、3~4 g/dl）では0.02 cc で充分である。

濾紙の種類：我国では東洋濾紙の No. 50 及び 51 が多く用いられているが、No. 50 は蛋白質に対する吸着力が強いためか、泳動速度は No. 51 に比べて、かなり遅い傾向がみられたので本実験では No. 51 を使用した。

緩衝液の種類とイオン強度：人間の血清蛋白質の泳動には多く Veronal 緩衝液が使用されているが、Veronal 及びその塩類は高価でもあるため、著者は磷酸塩、硼酸塩及び炭酸塩緩衝液を試験的に用いてみた。その結果によれば、これらの緩衝液では一般に通電による液自体の pH 変化が Veronal 緩衝液よりも大きく、特に硼酸塩及び炭酸塩緩衝液では血清蛋白質中の各成分が濾紙上に広く拡散したかのような泳動図を示し泳動像相互間の境界が Veronal 緩衝液を用いた場合に比べて不明瞭となることが多かつた。

次に人間及びコイの血清を各々所定イオン強度の Veronal 緩衝液（例、 $\mu=0.1$ の場合は、1 l 中に Veronal-Na 5.88 g, 酢酸ソーダ 3.88 g, 蔞酸カリ 1.38 g, M/10 HCl 20 cc を含む、pH 8.9）と磷酸塩緩衝液（例、 $\mu=0.14$ の場合は M/20 Na_2HPO_4 16 容と M/20 KH_2PO_4 1 容との混液、pH 7.8）を用いて泳動した後 B.P.B (Bromophenol blue) で常法の如く染色した泳動図を Fig. 1 に示した。

Fig. 1. Effect of kind and ionic strength of buffer solution on the paper electrophoretic diagram of serum proteins.

The paper was stained with 1% bromophenolblue solution HgCl_2 .

Intensity of current 0.32mA/cm., duration of electrophoresis 12 hrs.

図の結果から考えると、供試血清蛋白質の泳動速度は磷酸塩緩衝液中では Veronal 緩衝液の場合よりも早くなるが、一方泳動像の鮮明度及び分離能は幾分劣るようである。又イオン強度が 0.05 の場合は両緩衝液共に高易動度成分の泳動速度が余りにも大きいために泳動像は不鮮明となり、しかも γ -Globulin 区分は陰極に泳動する傾向がみられる。イオン強度 0.2 の場合は反対に泳動速度が遅く、各成分の分離が極めて悪い結果となつてゐる。一方イオン強度 0.1 では前二者の場合に比べて泳動像は鮮明で、且つ各成分の分離精度も良好であつた。

緩衝液の pH：人間、コイ及びゴマサバの血清を所定 pH の Veronal 緩衝液中で泳動した場合の泳動図を Fig. 2 に示した。

図の結果によると、供試動物の血清蛋白質は一般に酸性側では泳動速度が遅く、アルカリ性側では早くなる傾向がみられる。又各血清共に pH 6.0 及び 7.0 の緩衝液を用いた場合よりも pH 8.0 及び 8.9 の方が

Fig. 2. Effect of pH of buffer solution on the paper electrophoretic diagram of serum proteins Veronal buffer solution, intensity of current 0.32 mA/cm., duration of electrophoresis 17 hrs.

分離した成分数は明らかに多かつた。

緩衝液の使用回数と電流値の影響：泳動には定電流と定電圧の何れがよいかは議論もあるが、著者は定電流を使用している。この場合の電流値の影響を Veronal 緩衝液を用い、人間及びコイの血清について検討した結果によると、0.3~0.4 mA/cm の場合が泳動像も鮮明で、しかも各成分の分離精度は良好であつた。一般にこれより強電流では速く泳動するも像が乱れがちとなり、又弱電流では泳動がおそく、各成分の分離能は悪くなる傾向がみられた。

次に緩衝液を繰返して使用出来るとすれば、実験操作が簡単になるのみならず、高価な Veronal 緩衝液が節約出来ることになる。しかし著者の検討した結果では、一般にその使用回数に伴つて液自体の pH が変化し、更に各成分の泳動速度が明らかに遅くなる傾向が認められた。そこで古い緩衝液でも、泳動速度を調節するために、電流値を変えることによつて、再使用し得る可否かについて検討した。即ちコイ、マダイ及びゴマサバの血清を試料とし、Veronal 緩衝液を用いて 0.32 mA/cm で 20 時間通電した後、その緩衝液を再び用い、電流を 0.40 mA/cm に高めて 22 時間通電して求めた各泳動図を Fig. 3 に示した。なお、この場合の泳動時間は試料と同時に泳動した人血清の Albumin が所定移動量（約 8 cm）に達する迄の所要時間を意味する。

図の結果によれば、緩衝液を再使用した場合には電流を強くしても供試血清の高易動度区分（後述の F 区分）の泳動が遅くなり、これと反対に低易動度区分は幾分速くなる傾向がみられる。即ち相対易動度の基準となる Albumin の移動量を規定しても、他の成分がそれに対して常に比例的な割合に移動するとは限らず、泳動時の電流値或は緩衝液の性質によつて、各成分の泳動距離が変化する場合のあることは明らかである。従つて著者は定量値を求める泳動には総て同一電流値と新しい緩衝液を用いた。

2. 血清蛋白質の分析

前述の結果に基づき、新 Veronal 緩衝液（pH 8.9, $\mu=0.1$ ）を用い、電流値 3.2 mA/cm の条件で求めた、各供試血清の代表的な泳動図を Fig. 4 に示した。

本法によると人血清の蛋白質は Albumin と $\alpha_1, \alpha_2, \beta$ 及び γ -Globulin の 5 区分に分離する。しかし魚類ゴマサバ *Scomber tapeinocephalus* Buffer solution コイ *Cyprinus carpio* Buffer solution

Fig. 3. Effect of re-use of buffer solution on the paper electrophoretic diagram of serum proteins. Veronal buffer solution, pH 8.9, μ 0.1, *Intensity of current 0.32 mA/cm., duration of electrophoresis 20 hrs, **Intensity of current 0.4 mA/cm., duration of electrophoresis 22 hrs.

の血清蛋白質の分類法には基準もなく、又 TISELIUS 法による分離成分(第Ⅶ報⁴⁾ 参照) との同定についても、後述の如くなお検討すべき問題があるので、本報では一応易動度の近似値的な成分を一群として F, 1, 2, 3, 4, 5 及び 6 の各区分に大別した。

相対易動度：人血清の Albumin の移動量を 100 として、供試血清の各区分の相対易動度を求めた結果は Table 1 の如くである。

即ち、海産硬骨魚に属する魚種の血清には TISELIUS 法の結果と同様に Albumin より更に易動度の大きい F 区分 (第Ⅶ報の f 区分に相当する) が明らかに認められるのに対し、淡水産硬骨魚のコイではこの区分はみられなかった。又海産軟骨魚のシロザメ、ツノザメ及びアカエイには F のみではなく、易動度からは Albumin に相当する区分 1 も欠けている。一方これらの血清には γ -Globulin より更に易動度の小さい区分 (5 と 6) の存在することが TISELIUS 法の場合よりも明らかに認められた。特に区分 6 はアカエイの血清にみられた陰極に移動する成分である。CONNELL⁶⁾ は軟骨魚の筋肉抽出液中にも同様な成分のみられることを報告している (第Ⅷ報⁴⁾ 参照)。

濃度比：泳動後の濾紙を Amidochwarz 10-B (A. S. 10-B) で染色し、東洋理化学工業式濾紙光電比色計によつて求めた、各供試血清の泳動曲線と平均濃度比を各々 Fig. 5 及び Table 1 に示した。

この結果によれば、供試海産硬骨魚の血清では、一般に区分 F 及び 2 の濃度比が大きいのにに対し、淡水産硬骨魚のコイでは区分 1 が大きい。又両者共に γ -Globulin に相当する成分の濃度比は対照血清 (人間及び家兎) に比べて小さく、肉眼的には濾紙上に単独の泳動像として確認出来ぬ場合が多かつた。供試海産軟骨魚では区分 2 及び 4 の濃度比が大きく、又特有成分と思われる区分 5 及び 6 もかなりの値を示している。

3. サメ類の血清に対する透析処理必要の有無に関する検討。

軟骨魚の血清は他の脊椎動物のものに比べて、非蛋白質態窒素化合物 (主として尿素及び Trimethylamine oxide) を特異的に多く含んでいるが⁷⁾ TISELIUS 法では透析処理後の血清を使用するから、原血清中に含まれる低分子化合物の影響は殆んどないものと思われる。しかし濾紙泳動法では通常、原血清を使用するために共存する該物質が泳動結果に影響を与える可能性も一応考えられるので、次に若干の検討を試みた。

即ち河口帯で捕獲したシロザメの幼魚の血清 (該血清には同種の成魚のものとは異なり区分 1 の存在が認められる、第Ⅶ報⁴⁾ 及び第Ⅸ報¹²⁾ 参照) をセロファン紙裏に入れ、約 4°C において緩衝液中で 20 時間透析したものと原血清とについて求めた泳動図を Fig. 6 に示した。

図の結果によれば、原血清 (2.9 g/dl) と透析血清 (1.7 g/dl) とでは蛋白質濃度が異なるため、後者の泳動図は前者のものに比べて肉眼的に低易動度成分が特にうすくみえるようである。しかし比色計で各成分の濃度比を求めると略々等しい値を示し、且つ分離した成分の数及び相対易度にも殆んど差はみられなかった。このような傾向は、他のサメ類の場合にも同様に認められたことより、原血清を使用しても、一般的に共存する低分子窒素化合物の影響は特に考慮する必要はないものと考えられる。

4. TISELIUS 法との比較。

一般に TISELIUS 法が濾紙泳動法に比べて、血清蛋白質の分析に優れた精度を有することは周知の如くであるが、GRASSMANN⁸⁾ 或は LEVIN⁹⁾ 等の人血清を用いた実験結果では、両法の分析値が比較的一致すると報告されている。しかしその結果は実験条件又は材料によつて異なることも予測されるので、次に著者の採

Fig. 4. Paper electrophoretic diagrams of serum proteins of various fishes. Veronal buffer solution pH 8.9, μ 0.1, intensity of current 0.32 mA/cm., temp. 7~10°C., duration of electrophoresis 20 hrs.

Table 1. Paper electrophoretic analyses of serum proteins of various fish

Species	No. of serum examined	F	Component					
			1	2	3	4	5	6
Marine elasmobranch								
シロザメ <i>Mustelus griseus</i>	8			36.6 86.4	18.4 52.1	35.2 29.6	9.8 4.2	
ツノザメ <i>Squalus mitsukurii</i>	6			33.0 85.1	13.1 53.9	40.4 29.4	14.5 4.7	
アカエイ <i>Dasyatis akajei</i>	1			23.7 87.3	9.2 56.6	29.3 29.1	31.7 10.4	6.1 -12.1
Marine teleost								
マダイ <i>Chrysophrys major</i>	3	26.8 119.6	31.7 92.2	26.2 78.8	14.0 53.0	7.3 26.1		
ムロアジ <i>Decapterus muroadsi</i>	4	49.4 114.2	10.6 91.4	28.1 72.7	9.8 46.3	2.1 22.8		
シイラ <i>Coryphaena hippurus</i>	4	33.4 118.4	25.6 91.4	22.3 68.7	13.5 50.5	6.2 25.3		
ゴマサバ <i>Scomber tapeinocephalus</i>	9	33.8 115.7	10.2 103.0	32.5 73.3	16.9 38.2	6.6 14.5		
マダラ <i>Thunnus thynnus</i> *	5	47.2 120.2	14.4 93.4	24.1 70.6	11.4 41.2	2.9 15.3		
Freshwater teleost								
コイ <i>Cyprinus carpio</i>	7		48.7 94.6	11.2 72.1	21.8 50.3	10.2 37.4	8.1 17.4	
Control (Human)	6		Alb 54.3 100.0	α_1 3.6 85.0	α_2 4.1 69.2	β 13.3 47.7	γ 24.7 15.1	

For each component, the values for the first reading are given in per cent of total protein ; for the second reading in relative mobility.
 Veronal buffer solution pH 8.9, μ 0.1, intensity of current 0.32 mA/cm., temp. 7~10°C., duration of electrophoresis 20 hrs.

* Immature fishes

Fig. 5. Paper electrophoretic curve of serum proteins of various fishes
Veronal buffer solution pH 8.9, μ 0.1, intensity of current 0.32 mA/cm., duration of electrophoresis 20 hrs. -Log T obtained from the paper stained with saturated solution of Amidoshwarz-10B by TOYOUR-IKA. densito meter. (Model S-1, Filter V-02)

Fig. 6. Paper electrophoretic diagrams of original and dialysed serum of shark.
Veronal buffer solution pH 8.9, μ 0.1, intensity of current 0.32 mA/cm., duration of electrophoresis 20 hrs.

用した泳動条件下における、両法の結果について若干の検討を試みた。

濾紙泳動法で求めた泳動図 (Fig. 4 参照) と泳動曲線 (Fig. 5 参照) では、一般に各成分間の境界が TISELIUS 法の結果に比べて不明瞭となることが多く、時にはその区別が不可能な場合すらあつた。従つて血清蛋白質に対する分離精度は TISELIUS 法はるかに優れていることは明らかである。

相対易動度：両法共に泳動条件により、この値は多少変化するが、特に濾紙泳動法ではその影響を受けることが多いようである。本実験では B.P.B を混入した人血清を各試料と同時に泳動して、相対易動度の基準となる Albumin (泳動図上に着色成分となつて判別される) の移動量が一定となるように条件を規定したが、この場合でも他の各成分は Albumin に対して常に比例的な割合に移動することは限らなかつた。例えば泳動中の電流値或は緩衝液の新旧、pH 及びイオン強度の変化等によつて、各成分は異なる相対易動度を示すことが屢々あつた (Fig. 1, 2 及び 3 参照)。

濃度比：供試魚では同一血清でも両法の濃度比にかなりの差が認められ、一般に濾紙泳動法は TISELIUS 法に比べて高易動度成分の値が低く、反対に低易動度成分は高くなる傾向がある。この現象は血清蛋白質の一部が濾紙に吸着されるために TISELIUS 法よりも電場で移動し難くなることや、各成分の色素結合力が必

Fig. 7. Effect of stain dye on the paper electrophoretic diagram of serum Proteins.

Veronal buffer solution pH 8.9, μ 0.1, intensity of current 0.32 mA/cm., duration of electrophoresis 20 hrs.

* Bromophenol blue

** Amidoschwarz 10-B.

ずしも蛋白質濃度に比例しないこと^{10,11)}などに関係があるように思われる。

本実験においては B. P. B と A. S. 10-B を使用したが、B. P. B は Globulin よりも Albumin と良く結合することが知られている¹⁰⁾。又人血清では A. S. 10-B を用いると TISELIUS 法の濃度比に比較的近い値が得られるとも報告³⁾されているが Fig. 7 に示した如く、A. S. 10-B を用いると B. P. B の場合よりも、一般に泳動像が不鮮明となり、蛋白質の泳動しない濾紙面までも、かなり染色される。しかも両者の分析値に大差はなく、TISELIUS 法に比べて共に低易動度成分の濃度比が高くなる傾向が認められた。

以上要するに、濾紙電気泳動法による血清蛋白質の定量法は、方法論的には多くの改良が行われていても、用いた濾紙による蛋白質の吸着、透過、拡散並に色素結合能力等の問題について未だ本質的に解決されてないと考えられる。従つて魚類の血清蛋白質の如く、未知要素の多い試料では、TISELIUS 法による分析結果と比較検討することが望ましいと思われる。

要 約

1. 濾紙電気泳動法で魚類の血清蛋白質を分析する場合の使用装置並に泳動条件について若干の検討を加え、特に緩衝液の種類、pH 及びイオン強度の選定が重要であることを確認した。

2. 濾紙電気泳動法によつても魚類の血清蛋白質組成に第Ⅷ報¹⁾で述べた如き特性のあることが定性的に認められ、特に供試海産軟骨魚(シロザメ、ツノザメ、アカエイ)の血清には γ -Globulin より更に易動度の小さい成分の存在することが TISELIUS 法の場合よりも一層明らかに認められた。

3. 非蛋白窒化合物を特異的に多く含むサメ類の血清と、それを一定条件で透析した血清とについて濾紙電気泳動法を試みたところ、定性的には原血清を使用しても共存する該物質の影響は特に考慮する必要のないことを明らかにした。

4. 濾紙電気泳動法と TISELIUS 法によつて得られた魚類血清蛋白質の分析値を比較したところ、濾紙電気泳動法は TISELIUS 法に比べて、一般に高易動度成分(Albumin 区分)の濃度比は低く、反対に低易動度成分(Globulin 区分)は高い値を示す傾向がみられた。

以上の結果に基づき、濾紙電気泳動法の定量的応用に関して若干の考察を述べた。

本研究を行うに当り、種々御協力を賜つた本学高田幸二教授、練習船乗組員各位並に鹿児島県水産試験場上田忠男氏に深謝する。なお、本研究費の一部は文部省科学研究助成補助金の支出に仰いだ。記して謝意を表する。

文 献

- 1) T. WIELAND und E. FISCHER : *Naturwissenschaften*, **35**, 29 (1948).
- 2) W. GRASSMANN, K. HANNIG und M. KNEDEL : *Deut. Med. Wschr.*, **76**, 333 (1951).
- 3) W. GRASSMANN und K. HANNIG : *Z. physiol. Chem.*, **290**, 1 (1952).
- 4) 斎藤要 : 日水会誌, **22**, 752 (1957).
- 5) H. G. KUNKEL und A. TISELIUS : *Naturwissenschaften*, **37**, 93 (1950).
- 6) J. J. CONNELL : *Biochem. J.*, **55**, 378 (1953).
- 7) 斎藤要 : 日水会誌, **20**, 196 (1954).
- 8) B. LEVIN and V. G. OBERHOLZER : *Am. J. Clin. Pathol.*, **23**, 205 (1953).
- 9) 杉本良一 : "電気泳動技術" 納谷書店, 東京 (1955), pp. 73.
- 10) H. D. CREMER und A. TISELIUS : *Biochem. Z.*, **320**, 273 (1950).
- 11) F. A. PEZOLD und U. PEISER : *Klin. Wschr.*, **31**, 982 (1953).
- 12) 斎藤要 : 日水会誌, **22**, 773 (1957).