血合筋肉の化学的研究—VI. 血合ミオグロビン及び血液ヘモグロビンの溶解度

松浦文雄・橋本周久
(東京大学農学部)

Chemical Studies on the Red Muscle, "Chiai" of Fishes—VI.
Solubilities of Red Muscle Myoglobins and Blood Hemoglobins
Fumio MATSUURA and Kanehisa HASHIMOTO

The solubilities of myoglobins (Mb's) of tuna, *Parathunnus sibi* and swordfish, *Makaira mitsukurii* were determined in the phosphate buffer solution of high ionic strength and compared with those of some other Mb's and hemoglobins (Hb's). In the first experiment, solubility determinations were carried out on carbonyl derivatives of these pigments in the phosphate buffer solution of constant pH (6.6) and at constant temperature (20°C.). The results obtained are shown in Fig. 1 and Table 1. It is obvious that the solubilities of Mb's of tuna and swordfish lie between fish or mammalian Hb's on one side and horse Mb (and probably those of beef, dog, etc., as judged from the solubility data on these species and horse Mb's in concentrated ammonium sulfate solution⁹⁾) on the other side, rather being nearer to the former. It seems, therefore, that DRABKIN's method of Mb determination²⁾, based on the selective salting-out of Hb in phosphate buffer solution (3 M, pH 6.6, and $I/2$ ca. 6), is not always adaptable in cases of fish. In addition, the solubilities of carbonyl-, reduced-, cyanmet-, and met-Mb of tuna were compared and found to be very close to each other, although met-form is slightly more soluble than the others. Recrystallization of this pigment effected no appreciable change in the solubility.

The second experiment, performed to study the influence of pH and temperature on the solubility of tuna met-Mb, resulted in some interesting findings (Fig's. 2 A and 2 B). As shown in Fig. 2 A, this Mb has no minimal solubility between pH 7.20 and 6.00 and that was true also between pH 6.20 and 4.54, in spite of the fact that the isoelectric point of this Mb is found between pH 6 and 7¹³⁾¹⁴⁾. This phenomenon is perhaps due to the interaction between the Mb molecule and some of the ionic components of the salt. Fig. 2B shows that this protein has a typical negative temperature coefficient over a wider range of temperature (0°~44°C.), which seems to be one of the relatively rare cases.

Thus fish Mb's proved to be fairly species-specific in respect to solubility, as well as to the other properties previously reported¹⁾.

先にマクロ深部血合より調製せるミオグロビン (Mb と略) が結晶形, 二三誘導体のスペクトルの性質に於いて既知の種々の脊椎動物 Mb とかなり異なることを報じたが¹⁾, これらの実験中, 更に溶解度の点でもマクロ Mb が他の脊椎動物と少からず相違しているのではあるまいかと思われる節があつた。例えばマクロ Mb の場合 DRABKIN 法²⁾ で平行して測定した Mb 定量値が必ずしも良く一致しなかつたこと, この定量の最終段階に於いて得られる phosphate 3M 処理濾液を放置すると屢々 Mb 結晶の析出したこと, 又 SCHMID 法³⁾ で Mb 標品を調製する際, ヘモグロビン (以下 Hb と略) の塩析に用いられる phosphate 濃度 (3M) で Mb の濃厚溶液からその相当量が塩析されること, 同じく結晶化の際加える phosphate の量が対照の馬 Mb の場合より遙に少量で足りたこと等がそれである。一方 MORGAN⁴⁾ によると馬カルボニル Mb (COMb) は phosphate 3M 濃度 (pH 6.6) で極めて良く溶けるが同 Hb は僅々 1mg/l 程度しか溶けないと云われ, 之が DRABKIN²⁾ による筋肉中 Mb 定量法の基礎となつている。従つて若し上述の如くマクロ類 Mb

1956 年 7 月 18 日受理

本報告の一部は昭和 30 年 4 月 5 日日本農学大会水産部会に於いて講演した。

この phosphate 溶液中の溶解度が馬 Mb に比して著しく低い様な事実があるとすれば、DRABKIN 法によつて魚肉 Mb を定量する場合は特に試料溶液中の Mb 濃度につき充分に注意する必要がある。更に魚類 Mb の溶解度が Hb のそれに近い様なことがあれば本法の適用が不可能とさえなる。又 Hb についても逆の意味から、即ちマグロ Hb が馬に於けると同様に phosphate に対する溶解度が低いかが直接 Mb 定量上にも関係してくる。斯る理由で魚類色素蛋白の定量上並びに Mb 標品調製上の資とすべく旁々比較生物化学的興味からメバチ、マカジキ等の Mb, Hb の濃厚 phosphate 溶液中の溶解度を測定した処、予想通り之らの Mb の溶解度は対照とした馬心臓 Mb に比し著しく低いことが判つた。尙魚 Mb の溶解度に対する pH 及び温度の影響の点に於いても二・三種の特性とおぼしき知見を得たので以下今日迄の経過を報告する。

実 験 の 部

蛋白の溶解度は結晶としての溶解度と無定形物質としての値とは異なること⁵⁾が知られている。従つて溶解度の測定に當つてはその何れかに統一する必要がある。本実験に於いては凡て無定形物質としての溶解度を測定したものである。

〔実験 1〕 先づ筋肉色素定量法の実際に即し、一定 pH 及び温度の下に於ける phosphate 濃度と魚 Mb, Hb の溶解度との関係を調べた。

試料： メバチ深部血合、マカジキ血合及び比較のため馬心臓から SCHMID 法³⁾に略々準じて met-Mb (MMb) 又は COMb の結晶を調製、少量の蒸留水に溶解し透析して塩を除去したものを用いた。又再結晶処理の溶解度に及ぼす影響を見るためメバチ Mb は再結晶したものの溶解度をも測定した。Hb としてはメジ、メバチ、マカジキ、シマガツオ等の血液 Hb を用いた。但しメジのは結晶化したものを用い、他は充分量の血液が得られず結晶化することが出来なかつたので略々 ROCHE⁶⁾に従つて Hb の純粋溶液を調製し測定に供した。即ち洗滌血球を溶血、stroma を除去後等量の後述の phosphate stock solution と混和し暫時放置後濾過してうる透明溶液である。

Phosphate stock solution： 計算量の $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ と K_2HPO_4 とを水に溶解し $\Gamma/2$ 8, pH 6.6, の本溶液を調製しおき凡ての測定に用いた。

色素蛋白濃度の測定法： Mb, Hb 各原溶液及び溶解度試験に於ける濾液中の色素蛋白量の測定に當つては何れも cyanmet 誘導体となし、BECKMAN spectrophotometer でその 540 m μ に於ける吸収極大の吸光値を測定し、DRABKIN⁷⁾の与えている分子吸光係数を一応採用して濃度を算出した。即ち Mb では 11300 (分子量 16400), Hb では 11500 (分子量 16700—Fe 1 瓦原子当り)である。

溶解度測定操作： ROCHE⁶⁾, ITANO⁸⁾の方法を参考にし大要次を如く行つた。約 40 cc 容の共栓試験管を並べ、phosphate stock solution と蒸留水とを種々の割合に加え次いで濃厚色素蛋白水溶液一定量宛を各々に静かに加え計 10 cc となし添加色素蛋白量は一定 (約 20 mg) 且 phosphate 濃度の異なる一列の溶液を作る。一定温度 (20°C) の水浴中に暫時放置して恒温に達せしめた後、泡立たぬよう注意して管の顛倒を繰返し内容液を混和、Mb の場合には直ちに恒温器中で濾過する。Hb の場合には平衡のため必要な時間の間、時々顛倒しつつ恒温器中に放置、然る後に濾過した。濾液の色素蛋白濃度はそのまま、又は稀釈した後、前述の如くして測定した。Mb の場合溶解上の平衡が速に達成されることは混和後の放置時間を種々変えても色素蛋白濃度に漸増的傾向の見られないこと、又この値、即ち過飽和側からの測定値が未飽和側からの測定値 (phosphate で塩析せる色素蛋白に水を添加して溶解の平衡に達せしめる方法) に殆ど一致したことから明かである。Hb の場合はシマガツオの如く比較的溶解性の高いものでは Mb に似て急速に平衡が成立するも、他にあつては平衡達成に少くとも 24 時間を要した。濾過には東洋濾紙製硬質濾紙 (No. 4) を用いた。

測定色素蛋白の形態は安定性其のを考慮して主に CO 形としたが、メバチ Mb については他の形態、met 形 (MMb), cyanmet 形 (MMbCN), 還元形 (Mb) をも測定、比較してみた。これらの中 met 形、cyanmet 形は操作中他の化合形態に変る畏れはないが、COMb 及び還元 Mb では oxy 形となること或は更に MMb にまで酸化されることの可能性がある。之を防ぐため還元形では試験管に各液を注入後、微量の

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を加え又管の上部空間を N_2 で置換した。CO 形では CO 飽和の phosphate stock solution, 同蒸溜水, CO 形色素蛋白溶液を試験管に秤取後, 上部空間を CO で置換した。かゝる注意によつて夫々還元, CO 両形色素蛋白の溶解度を測定し得たことを濾液のスペクトル測定によつて確認した。

〔実験 2〕 次にイオン強度を一定にした場合の温度或は pH と Mb 溶解度との関係を調べた。

試料： メバチ深部血合 Mb (実験 1 参照) で調製中自動酸化して met 形 となつたものをそのまま使用した。

Phosphate stock solution： イオン強度等しく且 pH を異にする phosphate stock solution の一系列を用意する必要がある。そこで先ず何れもイオン強度 7.0 の A 液 (pH 5.90, NaH_2PO_4 と K_2HPO_4 とを含む) 及び B 液 (pH 9.7, K_2HPO_4 のみを含む) とを調製し, 次いで両液の混合比を色々変えて叙上の一列の stock solution を作つた。

温度の control： 室温以上の温度を要する場合は恒温器を, 又室温以下の温度の場合は冷室を利用し, 種々の温度での溶解度の測定を行つた。

結果と考察

本法によつて色素蛋白の溶解度を測定するとき厳密には蛋白によつてイオンが結合されることの諸影響や, 濃厚 phosphate 溶液の稀釈に伴う体積の収縮, 還元剤等の添加によるイオン強度の増加, 濾過時の濾紙による色素蛋白の吸着等をも考慮しなくてはならないがそれらは何れも極く小さいと思われるので一応無視

Fig. 1. The solubilities of Mb's and Hb's of fish in phosphate buffer solution (pH 6.6, temperature 20°C.).

- I *Makaira mitsukurii* (マカジキ), carbonyl-Hb.
- II *Thunnus orientalis*, immature (メジ), carbonyl-Hb.
- III *Bramidae* sp. (シマガツオ), carbonyl-Hb.
- V *Parathunnus sibi* (メバチ), carbonyl-Hb.
- IV *Parathunnus sibi* (メバチ), carbonyl-Mb.
- VI *Parathunnus sibi* (メバチ), met-Mb.
- VII *Makaira mitsukurii* (マカジキ), carbonyl-Mb.
- VIII Horse carbonyl-Mb

Hb は数十 mg/l 程度溶ける。一方メバチ, マカジキの Mb は夫々 1.6, 2.5 g/l 前後溶解するが同じ Mb でも馬のは実に 148 g/l という高い値を示す (尙馬 Hb は本実験の下では余りにも早く結晶化するため無定形物質としての溶解度を求めえなかつたので表中に引用せる文献値⁵⁾を参照され度い)。脊椎動物の Mb phosphate 溶液中での溶解性に関する文献は前述の如く MORGAN⁴⁾ が馬 Mb は 3 M phosphate 濃度で極めて良く溶けると云っているのを見るのみで他には見当たらないが, ROOPE¹⁰⁾ が硫酸を用いて牛, 犬 及び馬各 Mb の

まず実験 I の結果を Fig. 1 に示す。之によると測定範囲内ではこれらの魚種の Mb, Hb 何れも溶解度の対数は温度及び pH が一定の場合は phosphate の $\Gamma/2$ の増大と共に直線的に減少し良く SOHN の式, $\log S = \log S' - Ks' \Gamma/2$ (S は蛋白の溶解度, g/l; Ks' , p' 共に夫々の蛋白に特有な恒数) を満足すること, 更に諸種の色素蛋白についてえられた直線の勾配が酷似していることが認められる。尙本実験に於ける各色素蛋白の Ks' , p' の値を二, 三の文献値⁵⁾と共に Table 1 に示す。之らの図表から明かな如くメバチ Mb の四種誘導体の溶解度は相似しているが, met 形でやゝ大であり, 又人 Hb⁹⁾ の場合と異つて還元形が他の誘導体と全く異なる溶解度を示すことがない。尙本 Mb を再結晶した場合溶解度の上に変化が見られるか否かを見た所, 再結晶の影響は殆ど認められなかつた。次に注目されることはメバチ, マカジキ両 Mb は確かに同魚種又は他の魚種の Hb より高い溶解度を示しているが, 馬 Mb の夫よりは遙かに低い。DRABKIN²⁾ の Mb 定量法に於いて Hb の選択的塩析を行う時の phosphate 濃度は 3 M (pH 6.6) で之は $\Gamma/2$ 約 6 に当る。そこでこのときの各色素蛋白の溶解度を Table 1 に併記してみた。それによればメジ, マカジキ Hb は $\Gamma/2$ 6

では溶存量は極めて小さいがメバチ, シマガツオの

Table 1. Solubility constants (K_s' and β') of fish Mb's and Hb's in phosphate buffer solution of pH 6.6 at 20°C., and their solubilities at $\Gamma/2$ 6.0

Species and derivatives		K_s'	β'	Solubility (g./l.)*	Remarks
<i>Parathunnus sibi</i>	MbCO	1.76	10.8	1.62	Present data
"	MMb	1.76	10.8	1.91	
"	Mb	1.81	11.0	1.52	
"	MMbCN	1.76	10.8	1.62	
<i>Makaira mitsukurii</i>	MbCO	1.70	10.6	2.46	
Horse	"	2.03	14.4	148	
<i>Parathunnus sibi</i>	HbCO	2.33	12.8	0.059	
<i>Thunnus orientalis</i> †	"	2.08	10.7	0.015	
<i>Makaira mitsukurii</i>	"	2.05	10.4	0.012	
<i>Bramidae</i> sp.	"	1.85	10.0	0.071	
Horse	HbCO	1.04	4.0	0.006	ROCHE <i>et al.</i> ⁵⁾ (pH 6.50~6.55, 21~22°C.)
Beef	"	1.82	10.2	0.182	
Human	"	2.33	12.5	0.036	
Rabbit	"	2.10	12.3	0.450	

* Solubility in phosphate buffer solution of $\Gamma/2$ 6.0 and pH 6.6, at 20°C.

† Immature.

溶解度を測定比較した実験結果から推して phosphate 溶液中でも恐らく本実験中の馬 Mb と同程度の高い溶解度を示すのではないと思われる。尙詳細は省略するが著者らはカツオ、ブリ、サバ等の Mb について略々同様の実験を試み上記メバチ乃至マカジキ Mb と相似た溶解度を示すことを見ている。これらの結果に鑑みて一般に魚 Mb の溶解度は高等脊椎動物 Mb のよりは著しく小さいと云つて良いと思われる。かくて DR-ABKIN²⁾ の Mb 分離定量法ではマカジキの Mb, Hb 両色素は略々定量的に分ちうるも、メバチではこの $\Gamma/2$ でも将又より高い $\Gamma/2$ でも両色素の定量的分離は不充分である。他方馬ではこの $\Gamma/2$ で両色素は殆ど完全に分たれ又他の高等脊椎動物の場合も $\Gamma/2$ 6 又はそれ以上での両色素の定量的分離は可能と思われる。斯くの如く DARBIN 法²⁾は魚種によつては必ずしも適用し得ない事実、又分離が良好でもその $\Gamma/2$ での魚 Mb の溶解度が馬に比して甚だ小さい事実は魚 Mb の同法による定量乃至調製への応用に際して余程綿密な注意を必要とするものである。

次に実験 II の結果は Fig. 2(A,B) に示す如くである。先づ Fig. 2A によれば明かにメバチ Mb の溶解度はどの温度でも pH 低下と共に急激に減少して居り例えば 29° では pH 7 から pH 6 に下るに従い溶解度は約 1/10 に激減している。 $\Gamma/2$ 5.6 でサバ MHb についても同様の傾向が観察され又馬 HbCO¹¹⁾ でも pH 7.5 から 6.6 に低下するにつれ溶解度は約 1/10 に減少するとの報告がある。一般に蛋白の溶解度はその等電点付近で最小の値を示し、馬 Hb^{11) 12)} でもその事実が認められているにも拘らず本実験に於ける pH の範囲内では斯くの如き点を見出しえない。そこで更に pH 6.50~5.17 ($\Gamma/2$ 5.67), pH 5.50~4.54 ($\Gamma/2$ 4.86) の各 pH の範囲での本 Mb の溶解度を測定したが、溶解度は依然 pH の低下と共に減少の一途を辿り最小溶解度の pH を見出すことは出来なかつた。マクロ Mb の等電点が電気泳動的測定によれば pH 6~7 間にある

Fig. 2. The influence of pH and temperature on the solubility of tuna, *Parathunnus sibi* met-Mb in phosphate buffer solution, $\Gamma/2$ 6.16. The influence of pH, see Fig. A, while that of temperature, Fig. B.

こと¹³⁾¹⁴⁾から考えてこの現象は Mb 分子と溶液中の種々のイオンとの特殊の相互作用によるものであろうか。Fig. 2B は Fig. 2A と同一の結果を温度の影響の面から見易くしたものである。測定せよの pH でも Mb の溶解度は測定温度範囲 (0~44°C) では温度上昇と共に直線的に減少すること即ち負の温度係数を有することが明かである。温度が 0° から 40° に上ると溶解度は略々半減する。濃厚塩類溶液中で蛋白が負の温度係数を示す例は古くから知られて居り、人 Hb⁹⁾、馬 Hb¹¹⁾、馬 Mb¹⁵⁾ もこの例に属する。即ち人 Hb の諸種誘導体は 25° 付近で最小値となる様な曲線を描いて溶解度は変化する。次の馬の色素蛋白に関する二論文は温度による溶解度の変化を特に詳しく見ている訳ではないが馬 HbCO は 0° での溶解度が 25° の時の夫の 10 倍近くにも達すること、馬 Mb は 0° 付近で常温に於けるよりも高い溶解度を示すことを報じている。茲に測定した魚 Mb の如くかなり広い温度域に亘つて負の温度係数を示す例は珍しいことと思われる。

結 語

本実験により魚類 (メバチ、マカジキ等) Mb は魚類及び一般脊椎動物 Hb より高い溶解度を示すが、馬等高等動物 Mb より遙かに低いこと、又その溶解度は pH 低下と共に減少し等電点付近に於いても最小値を示さず且温度上昇に伴つて直線的に減少することを明かにした。凡てこれらの現象は魚類 Mb の種特異性の現れと解されその定量上も大いに注意を要する事柄と思われる。

了りに臨み終始御指導を賜つた森高次郎教授に深謝する。尙本研究費の一部は文部省総合科学研究費により支払われた。爰に記して謝意を表する。

文 献

- 1) 松浦文雄・橋本周久：本誌，**20**，946 (1955).
- 2) D.L. DRABKIN： *J. Biol. Chem.*，**182**，317 (1950).
- 3) K. SCHMID： *Helv. Chim. Acta*，**32**，105 (1949).
- 4) V.E. MORGAN： *J. Biol. Chem.*，**112**，557 (1935).
- 5) J. ROCHE, Y. DERRIEN, & M. MOUTTE： *Compt. rend. soc. biol.*，**135**，1235 (1941).
- 6) J. ROCHE, Y. DERRIEN, J. REYNAUD, G. LAURENT & M. ROQUES： *Bull. soc. chim. biol.*，**36**，51 (1954).
- 7) D.L. DRABKIN： *Am. J. Med. Sci.*，**209**，268 (1945).
- 8) H.E. ITANO： *Arch. Biochem. Biophys.*，**47**，148 (1953).
- 9) E.M. JOPE & J.R.P. O'BRIEN： "Haemoglobin", Butterworths Sci. Publ., London (1949), p. 269.
- 10) J. ROCHE & Y. DERRIEN： *Compt. rend. soc. biol.*，**136**，41 (1942).
- 11) A.A. GREEN： *J. Biol. Chem.*，**93**，495 (1931).
- 12) A.A. GREEN： *Ibid.*，**93**，517 (1931).
- 13) J.V. HUYS： *Arch. internat. Physiol.*，**62**，16 (1954).
- 14) 松浦文雄・橋本周久：昭和 31 年 4 月 6 日日本水産学会年会講演
- 15) R.A. LAWRIE： *Nature*，**167**，802 (1951).