

かし蛹の体液蛋白質の塩析曲線は、蛋白濃度を変えても特に顕著な変化は認められなかった⁽⁶⁾。

塩析時の温度の影響については、すでに多数の実験が行われており、一般に各塩濃度における沈殿量は温度変化に伴い変化するが、溶解度曲線の傾斜は一定である。しかしながら体液中の蛋白質がそれぞれ温度係数を異にすることも考えられ、この点についてはなお検討を要する。

要

約

家蚕体液蛋白質の塩析法による分別について厳密な検討を加えるために、沈殿剤として硫酸、硫酸ナトリウム、リン酸カリ、硫酸マグネシウムならびに食塩の濃厚溶液を用い、1.5~8 の pH 範囲にわたって塩析を試みた。

その結果、塩析法は各蛋白成分の単離には勿論、予備的な分別に対しても甚だ不適当であることがわかった。この原因は既報の実験結果と併せ考えれば、家蚕体液蛋白質の解離-会合性ならびに各蛋白質間の相互作用に基づく共沈現象によるものと推察される。

終りに貴重な御助言並びに御鞭撻を戴いた九州大学農学部船津勝教授に厚く御礼申し上げます。

(1) 小田純子：本誌，33，845 (1959).

64，144 (1956).

(2) 稲神 馨：日蚕誌，20，383 (1951).

(5) M. R. Rachinsky, J. F. Foster : *ibid.*,

(3) 小田純子：本誌，32，748 (1957).

70，283 (1957).

(4) C. A. Zittle : *Arch. Biochem. Biophys.*,

(6) 小田純子：未発表。

昆虫体液の蛋白質に関する研究 (第 7 報)*

家蚕体液蛋白質に及ぼす加熱の効果

小 田 純 子 (九州大学農学部農芸化学教室)

昭和 34 年 4 月 7 日 受 理

緒

言

一般に蛋白質の変性現象は非常に古くから認められ、この問題に関する研究は極めて多い。しかしながら特にこの変性現象が重要視されるようになったのは比較的新しく、蛋白質の構造と機能との関連性について多方面から注目され、興味が持たれるようになり、一方これに伴い蛋白質の構造を解明するための重要な実験の手段が確立されてきたことに由る。さらに変性の機構を知るために動力学的ならびに熱力学的研究方法も適用され、蛋白質の変性の反応様式あるいは変性に際して生ずる構造変化などについて重要な知見が得られるようになった。かくして変性現象を追究することは、蛋白質の特異的な構造を知るための一つの手がかりを与えるものである。

家蚕体液蛋白質は、すでに報告してきたように種々の特徴的な性質を持っている。殊に蛋白質分子の解離-会合および蛋白質間の相互作用の強さなどはその顕著なものである^(1,2)。蛋白質の変性現象として最も古くから知られている熱凝固は、加熱温度、溶液の pH、イオン強度、蛋白質濃度などの関数であり⁽³⁻⁵⁾、また蛋白質以外の混在物によっても影響を蒙り、蛋白質により特徴的な挙動を示すものである⁽⁶⁻¹²⁾。そこで本実験では加熱により蚕体液蛋白質が示す挙動を溶解度により検討し、さらに超遠心ならびに電気泳動的性質を追究した。また 100° に加熱しても凝固しない蛋白質を分離し、これが低分子量であることを確かめた。

実 験 方 法

1) 試料体液 既報⁽¹³⁾に従って 5 令 5~6 日目の家蚕より体液を採取し、遠心分離した透明液を試料体液とした。チロシンナーゼ阻害剤として青酸カリを用いた。

2) 加熱処理 試料体液を pH ならびにイオン強度を異にする炭酸塩、リン酸塩およびリン酸ナトリウム-クエン酸緩衝液に 2 昼夜透析した。透析中に少量の沈殿を生じたものは遠心分離して透明溶液とした。かくして得られた蛋白溶液は、緩衝液で所定の濃度に希釈した。加熱処理は温度および時間を変えて試験管内で行い、後速やかに冷却した。溶液中に残存する蛋白量は、一夜放置後遠心分離して加熱により生じた凝固物を除去し、上

* Studies on the Proteins of Insect Hemolymph. Part VII. Heat Denaturation.

By Junko ODA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University)

澄液を適当に希釈して、ベックマン DU 分光光度計を用い 278 m μ における吸光度を測定した。

3) 塩析 すべて前報に準じて行った⁽¹³⁾。

4) 超遠心ならびに電気泳動 沈降分析はスピスコ E 型超遠心機を用いて行い、電気泳動は日立製 HT-B 型チセリウス装置により測定を行った。

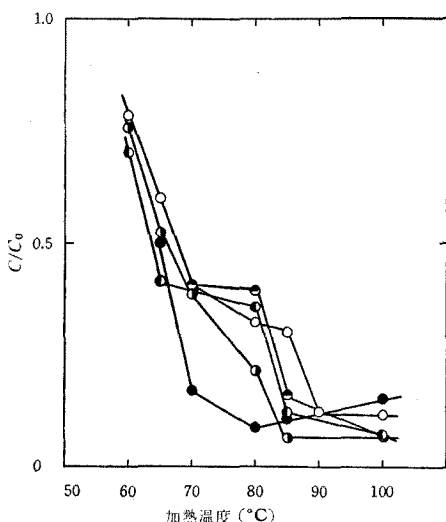
実験結果ならびに考察

1) 熱凝固に及ぼす加熱温度の影響 種々の pH およびイオン強度において、加熱温度を 50° から 100° 迄変化させた時の熱凝固の模様を観察した。

pH 9 以上の溶液は 100° まで加熱しても外観的に全く変化が認められなかった。ただ蛋白濃度が 3% 以上に高くなると、1 昼夜以上放置する時肉眼的に若干の粘度の増大が見られた。

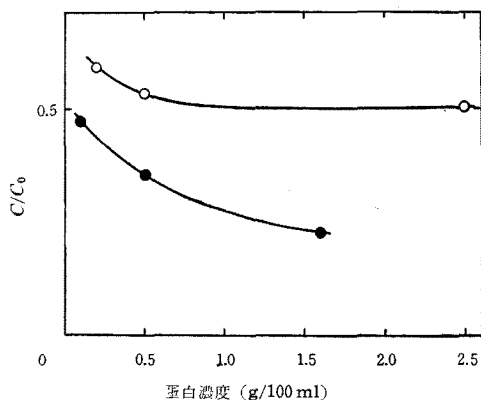
pH 4~7 間では 50° では蛋白分子が会合して大粒子となるが沈殿を生ずるに至らず、60° 以上になって巨視的な凝固物となって落ちる。

pH 3 において 60° 以下では溶液はわずかに濁濁するが、5,000 r. p. m. 程度では沈降しない。さらに温度が高



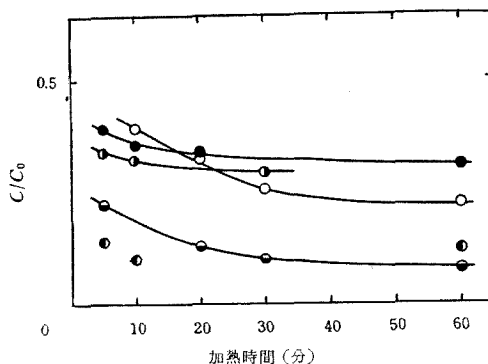
第 1 図 種々の温度における熱凝固

- : リン酸塩緩衝液, pH 7, イオン強度 0.01
 - ◐: " " " 7, " 0.1
 - : リン酸塩 (0.05M) + 食塩, pH 7, イオン強度 1.0
 - ◐: リン酸ナトリウム-クエン酸緩衝液, pH 4, イオン強度 0.09
 - : " " " 3, " 0.09
- C₀: 初濃度, C: 溶液中に残存する蛋白濃度



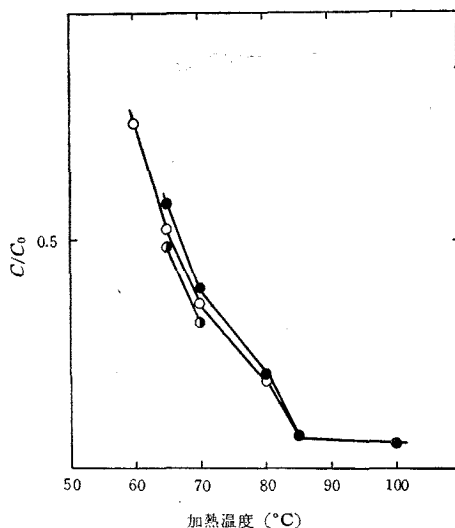
第 3 図 熱凝固におよぼす蛋白濃度の影響(その 1)

- : リン酸塩, pH 7, イオン強度 0.1, 加熱条件 65°, 10 分
- : リン酸ナトリウム-クエン酸, pH 4, イオン強度 0.09, 加熱条件 80°, 10 分



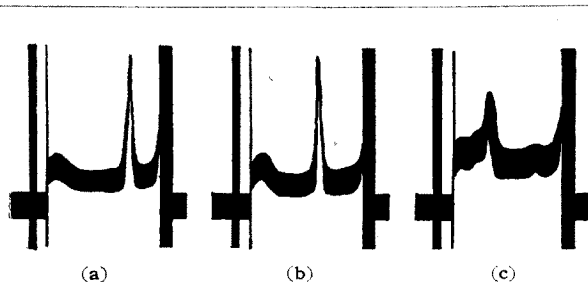
第 2 図 加熱時間による熱凝固の変化
加熱温度: 80°

- : リン酸塩緩衝液, pH 7, イオン強度 0.01
- ◐: " " " 7, " 0.1
- : リン酸塩 + 食塩, " 7, " 1.0
- ◐: リン酸ナトリウム-クエン酸緩衝液, pH 4, イオン強度 0.09
- : " " " 3, " 0.09



第 4 図 熱凝固におよぼす蛋白濃度の影響(その 2)

- 条件: 10 分加熱 (リン酸塩, pH 7, イオン強度 0.1)
- : 蛋白濃度 0.05% ○: 蛋白濃度 0.5%
- ◐: " 2%



第 5 図 加熱溶液の超遠心沈降図

56,100 r.p.m., 室温

- (a) 70°, 5 分 (リン酸塩, pH 7, イオン強度 0.15) 加熱
 (b) 80°, 5 分 (" " " " " ") 加熱
 (c) 70°, 5 分 (" " " " " ") 加熱, 測定 pH 9.5

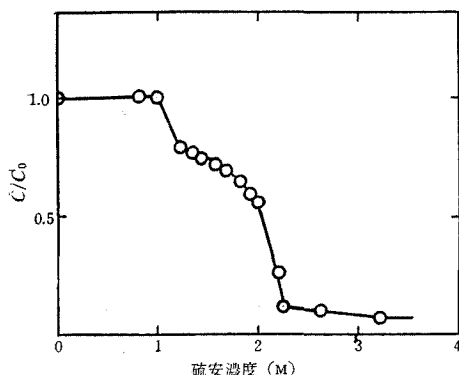
くなると粘性が増し放置するとゲル状の凝固物を生ずる。蛋白濃度 3% では 80° で数秒内に急激に透明なゲルになる。

第 1 図は蛋白質濃度 0.5% において、全蛋白量に対する溶液中に残存する蛋白量の比を加熱温度に対してプロットしたものである。図から明らかなように pH 4 及び 7 では同じ傾向を有し、70° 以下ならびに 80° 以上では、変性現象の特徴である所の温度上昇による反応速度恒数の増大が顕著であるが、70~80° では反応速度恒数の温度変化が僅少である。ただ pH 7 でイオン強度が 0.1 の場合は 0.01 および 1.0 の場合と異なり、“水平領域”が明瞭に現われなかった。なお pH 3 では 70° まで急激に進み、これ以上の温度でもほぼ同じ溶解度を示した。

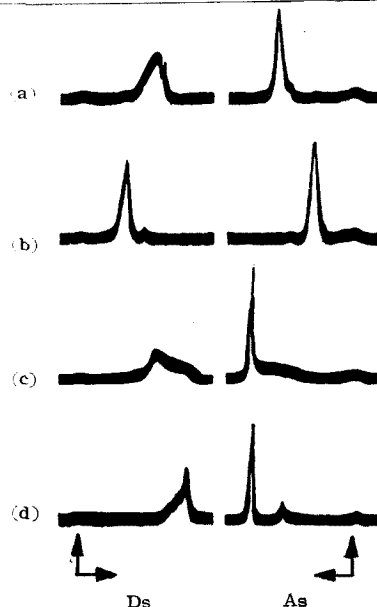
2) 加熱時間の影響 80° における熱凝固に及ぼす加熱時間の影響を第 2 図に示した。pH ならびにイオン強度により溶解度の絶対値は異なるが、加熱時間と溶液中に残存する蛋白量の関係は何れも 1 本の直線ではなく、初期において沈澱量の増加が著しい。特にリン酸塩, pH 7 を溶媒とする時顕著であった。

3) 蛋白濃度の影響 第 3 および 4 図に示したようにすべて類似の傾向を持ち、初蛋白濃度が高い程溶液中の残存率は減少する。即ち加熱により凝集し易い。

4) 超遠心ならびに電気泳動 リン酸塩緩衝液 (pH 7, イオン強度 0.15) 中でそれぞれ 70° 及び 80° に 5 分加熱し、生じた沈澱を除去した上澄溶液の沈降図を第 5 図に示した。両温度で沈降図は等しく、2 個の界面 (2.5 S, 15 S) のみが認められ、中間の成分は存在しない。そして 2 成分の沈降恒数および界面の拡がりは無処理の蛋白質に等しく、沈降恒数の分布に変化は起っていないと考えられる。この沈降図形から無処理体液中の 7 S 蛋白 (Comp. 2) は熱に対して最も不安定で容易に凝集して不溶性になることがわかる。他方 2.5 S および



第 7 図 加熱溶液 (70°, 10 分, 燐酸塩, pH 7, イオン強度 0.1) の塩析曲線



第 6 図 加熱溶液の電気泳動図

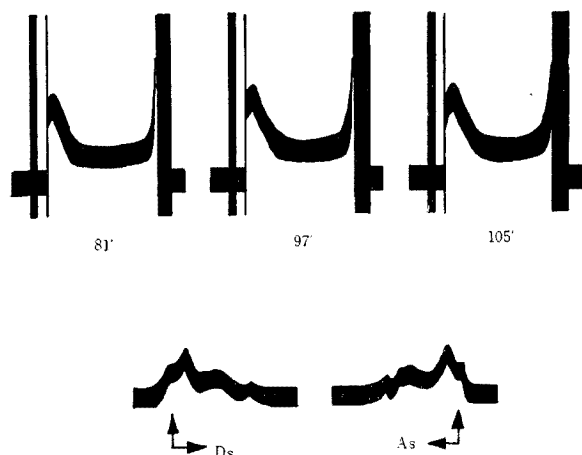
加熱条件: 70°, 5 分 (リン酸塩, pH 7, イオン強度 0.15)

- (a) 炭酸塩緩衝液, pH 9.5, イオン強度 0.2
 (b) リン酸塩緩衝液, pH 7.0, イオン強度 0.2
 (c) リン酸ナトリウム-クエン酸, pH 3.0, イオン強度 0.075
 (d) リン酸ナトリウム-クエン酸, pH 3.0, イオン強度 0.15

15 S 蛋白は、少なくとも 80° までは比較的安定である。

さらにこの加熱溶液を pH 9 以上にするると解離が認められた。従って 15 S 蛋白の解離能力は、加熱によって失われないものである。

次に 70° に加熱した溶液の電気泳動像を第 6 図に示したが、80° においても全く同じ像が得られた。中性およびアルカリ性の pH では何れも主界面のほかに小さい副界面が現れる。他方酸性側では主界面とその裾に拡がった遅い界面が出現し、無処理体液に類似する。中性以上の pH で超遠心で明瞭に 2 界面が観察されるが、電気泳動で分離しないのは加熱しない蛋白質についてもすでに認めたことで 2.5 S と 15 S 蛋白が近似する移動度を有するためと考えられる。



第 8 図 熱凝固しない蛋白の超遠心沈降および電気泳動図

超遠心：56,100 r. p. m., 18.5° 電泳：10mA, 82 V, 15°, 81°

加熱し、生じた凝固物を除去し、上澄液にエタノールを 90% まで添加すると沈殿を生ず（総蛋白質の数%程度の量）。これを少量の蒸留水に溶解し、再び 100° に 15 分間加熱して生ずる極少量の沈殿を除去し、この操作を反覆し最後に蒸留水に透析し熱凝固しない分画とした。このものはビュレット反応その他の蛋白反応を示し、純水によく溶解する。緩衝液に透析し沈降分析を行った結果第 8 図の如き像が得られた。即ち 1 個の界面のみで、他の主蛋白成分は全く混在しない。沈降恒数 S_{20} は約 0.95×10^{-13} で他の主成分に比し極めて小さい。一方電気泳動像は数個の界面から成り均一でない。この低分子量の蛋白質が無処理体液中に本来存在するものか、あるいは加熱によって 2 次的に生じたものかは確言できない。しかしながら高等動物の血清中の糖蛋白質は加熱により凝固せず、糖蛋白質を分離精製する手段の 1 つとして血清中の他の蛋白質を加熱凝固せしめる方法も用いられている⁽¹⁴⁾。蚕体液中のこの微量蛋白質も糖反応陽性であり、今後定量的に検討したい。

要 約

(1) 家蚕体液の蛋白質の熱凝固現象を加熱温度、加熱時間、pH、イオン強度ならびに蛋白質濃度の関数として追究した。pH により熱凝固速度が異なり、pH 9 では全く凝固しない。初蛋白濃度が増すと溶液中に残存する蛋白質の初蛋白量に対する比は減少する。加熱時間を長くしても同様である。

(2) リン酸塩 (pH 7, $\mu=0.15$) 中で 70° ならびに 80° に加熱した溶液を、超遠心ならびに電気泳動により分析した結果、2.5 S (Comp-1) および 15 S 蛋白 (Comp-3) のみから成り、7 S 蛋白 (Comp-2) は全く存在しなかった。即ち 7 S 蛋白が熱に対して最も不安定である。

(3) 熱凝固しない蛋白を分離し、超遠心的に均一であることを確かめた。このものの沈降恒数の値は、概略 0.95×10^{-13} であった。

終りに貴重なる御助言と御鞭撻を戴いた九州大学農学部船津 勝教授に厚く御礼申し上げます。

- | | |
|---|---|
| (1) 小田純子：本誌，32，754 (1957)。 | (8) J. Van der Scheer et al. : <i>J. Immunol.</i> , 40, 39 (1941)。 |
| (2) 小田純子：本誌，33，845 (1959)。 | (9) J. F. Foster, R. C. Rhee : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 40, 437 (1952)。 |
| (3) Jensen et al. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 185, 411 (1950)。 | (10) L. K. Steinrauf, W. B. Dandliker : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 80, 3833 (1958)。 |
| (4) M. Levy, R. C. Warner : <i>J. Phys. Chem.</i> , 58, 106 (1954)。 | (11) R. C. Warner, M. Levy : <i>J. Phys. Chem.</i> , 58, 106 (1954)。 |
| (5) M. Levy, A. E. Benaglia : <i>J. Biol. Chem.</i> , 186, 829 (1950)。 | (12) R. C. Warner, M. Levy : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 80, 58 (1958)。 |
| (6) D. R. Briggs, R. Hull : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 67, 2007 (1945)。 | (13) 小田純子：本誌，33，850 (1959)。 |
| (7) G. R. Cooper, H. Neurath : <i>J. Phys. Chem.</i> , 47, 383 (1943)。 | (14) C. Rimington : <i>Biochem. J.</i> , 34, 931 |