

蛋白質の微量分離並に定量法

著者	柿本 大壺, 神代 義春
雑誌名	鹿児島大学水産学部紀要=Memoirs of Faculty of Fisheries Kagoshima University
巻	3
号	1
ページ	116-120
別言語のタイトル	Study on the Micro Methods of Separation and Estimation of Protein
URL	http://hdl.handle.net/10232/10648

蛋白質の微量分離並に定量法

柿本大壱・神代義春

Study on the Micro Methods of Separation and Estimation of Protein

Daiichi KAKIMOTO and Yoshiharu KŌJIRO

蛋白質を天然物から分離し、之を純粹にして一つの製品を得るとか、又或る試料中に蛋白質が如何程含有されるかを測定することは、蛋白質を研究する上からも、生化学、食品化学的研究の上からも甚だ重要であることは論を俟ない。従つて蛋白質の分離及び定量法に関しては古くから多くの理化学的研究が行われている。蛋白質は何れの場合もアミノ酸の結合した極めて分子量の大なる物質で、而も両性電解質であるが、此等の性質を利用して、蛋白質の分離又は定量が行われるのである。蛋白質の分離に関して従来広く行われている方法には加熱による凝固、塩析又は酸による凝固、又或る場合は中性塩類により溶解せしめて後透析して純品を得るとか特に一定した方法がないのみならず相当量の試料を必要とし、その上多くの時間を費さねばならない。又定量方法に於ても種々の沈澱剤が用いられているが、之等の沈澱剤の多くは選択性を有し又沈澱の完璧を期し難かつたりするので眞の蛋白質の含量を決定し得ないことすら起り得るのである。前述の如く蛋白質の分離は尙多くの不備不便な点が残されている。今極く微量の試量から蛋白質を分離し、且つその性質例えば構成するアミノ酸の種類を決定する等のことが出来れば、従来の研究に於て比較的試料が微量の為に出来なかつた研究とか、特別微細な細胞から蛋白質を分離するような研究にまで応用出来ると思われ蛋白質の研究範囲を拡大する結果も期待しつつ研究した次第である。著者等の本研究も未だ甚だ不充分ではあるが従来の方法より更に微量の分析が可能であるか否かの予備的研究の一端として濾紙クロマトグラフィーと半透膜を併用し透析を行い、普通クロマトグラフィーに用いる展開剤を水にかえ蛋白質のみを分離する実験を行つた。以下実験法並にその結果を報告する。

実験の部

材料及び研究方法の概要

東洋濾紙 (No. 2) を 3×20 cm の大きさに切り、濾紙クロマトグラフィーの常法に従い試料原点を鉛筆で劃線し、その上に試料、蛋白質溶液をマイクロピペットを用いて正確に採る。之を室温に風乾した後市販コロヂオン (日本薬局方) を一定量スポイトにより滴下せしめつつ濾紙内にコロヂオンを滲透せしめ被膜を作る。コロヂオン被膜が完成したものを下降法により一定の流速の水中で透析を行い、低分子の不純物を透析し去つた後風乾し、試料の吸着している部分を切り抜きアセトンで洗滌してコロヂオン被膜を除去する。此の処理を施したものは蛋白質のみが残存しているので、これを一定量の蒸溜水中で溶出せしめビュレット反応で呈色せしめ光電比色計で蛋白質量を比色定量する。

実験結果

1) 濾紙及びその大きさ

前述の如くコロヂオン被膜を濾紙上に作るのであるから試料が濾紙上にあまり大きく拡がらぬ事が必要である。其の為には少量宛を濾紙上に採取し風乾して後再び試料を同一個所にとる方法もあるが此の方法は屢々煩雑であるので、著者等は試料を一度に 0.005 cc 宛とることとした。即ち本研究を行うにあたり試料が原点にあまり拡がり過ぎないことが肝要である。此の目的の為に蒸溜水と 15% ゼラチン溶液 (0.018088 mg N/cc) をマイクロペットにより採取し、東洋濾紙 No. 50 及び No. 2 を使用して各々試料の拡がりを検べた結果は第1表の通りである。

第1表 試料の原点に於ける拡がり

試料	使用量	径		試料	使用量	径	
		No. 50	No. 2			No. 50	No. 2
水	c.c 0.1	mm 33	mm 35	ゼラチン	(c.c) 0.1	mm 22	mm 23
〃	0.01	13	13.5	〃	0.01	9	9.3
〃	0.005	9	9.5	〃	0.005	6	6.4
〃	0.001	4	5	〃	0.001	3	3

第1表に示した如く、水の場合に於ても 0.005 cc で径が 9 mm であり、従つて蛋白質液を試料とする場合 0.01 cc~0.005 cc の試料で約 6~9 mm の直径に拡がり切り抜いて比色定量する場合約 1 cm² の範囲に切り採れば良い。

2) 濾紙上の半透膜生成について

濾紙上に試料をとり之をコロヂオンによつて被覆出来るか否かに就いて塗布法を変えて透析を行い、塗布の完否をニンヒドリン呈色によつて確めた結果は第2表の通りである。

第2表 濾紙上に於ける透膜試験

方法	濾紙	No.	
		50	2
両面塗布		-	-
片面減圧	片面塗布	±	±
両面減圧		±	+
両面減圧後ソレトシ	滴下	+	+
0.2cc 減圧	0.1cc 塗布	+	+

上表中 + は完全を示し ± は多少不完全、- は不完全を示した。実験の結果濾紙上の試料を両面減圧にしてコロヂオンを浸透せしめるか、0.2 cc のコロヂオンを減圧で引きつつ塗布したる後、0.1 cc のコロヂオンを常圧下表面より塗布したるものは何れも完全である。

3) 透析時間について

蛋白質と共存する低分子の化合物を透析によつて除き蛋白質のみを濾紙上に残そうとするのが此の実験のねらいであるが、この場合所要透析時間を決定するため試料に含まれる不純物としてアミノ酸を考え、これを透析し去るに要せられる透析時間について実験した。

アミノ酸としてはビューレット反応に關係するヒスチジンと水に難溶性のチロジン及び分子量の最も小さなグリシンを用い、前記の方法によつてコロヂオン被膜を施した後流水中で透析し、一定時間後ニンヒドリンにより呈色せしめその呈色が完全に消失した時間をもつて透析終了としたが、その結果は第3表に示す如く、約1時間の透析を必要とすることが分つた。チロジンとヒスチジンとでは難溶性のチロジンの方が透析され易い様に見える。

るが、之はニンヒドリンにより発色する濃度の限界に相違があるためであろう。

第3表 濾紙上に於けるアミノ酸の透析

アミノ酸	時間	10分	20	30	40	50	60	120	180	240	備 考
グリシン		+	+	+	+	-	-	-	-	-	濃度各 50γ 流水量 360cc/min コロヂオン 3/10cc
ヒスチジン		+	+	+	±	±	-	-	-	-	
チロジン		+	+	+	+	-	-	-	-	-	
ゼラチン		+	+	+	+	+	+	+	+	+	

上述の如く1時間の透析で50γのアミノ酸は完全に膜外に流出されることを知った。尙此の種実験は他の多くのアミノ酸類、ポリペプチド等に就いて行うべきであるが、或る時間透析することによつて低分子化合物が蛋白から除き去られることが暗示される。

4) 定量法に対する応用

上述の如く濾紙に吸着されている蛋白質はその上に半透膜を施して透析することによつて共存する低分子化合物を透析し去り蛋白質のみ濾紙上に残すことが出来る。之を更に蛋白質の定量に応用する為に次の方法を試みた。即ち濾紙上に施したコロヂオンをアセトンに溶解せしめて除去すれば蛋白質のみが濾紙に残る。濾紙上のアセトンは蒸発し去り、蛋白質を水に溶解し濾紙より離し、その溶液をビュールレット反応で呈色させ光電比色計により比色すれば蛋白質の定量が可能である。但し此の場合蛋白質により吸光度が異なるから二種類以上の蛋白質の混合する試料には応用出来ない。

試料及び試薬の調製

Biuret 試薬 (Gornall 等の処方) の調製 1l 容メスコルベンに結晶硫酸銅 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 1.5 gm と酒石酸カリソーダ ($\text{Na K} \cdot \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 6 gm を入れ、約 500 cc の水で結晶を溶解せしめた後 2.5 規定の苛性ソーダ溶液 300 cc を加え十分に混和後ヨードカリを加えて全体を 1000 cc にする。此の試薬は褐色瓶内に保存する。

試料の調製及び定量

試料は前述の如く処理したものを透析後アセトンを以て濾紙のコロヂオンを除去し、蛋白質をつけた濾紙の必要部のみをなるべく小さく切り取り、充分乾燥後之を試験管内に移し、2 cc の蒸留水を加え、振盪すること 30 分の後、別に調製したビュールレット試薬を加えて、全体を正確に 7 cc となし、乾燥濾紙で濾過した濾液を常法により光電比色計にて比色した。

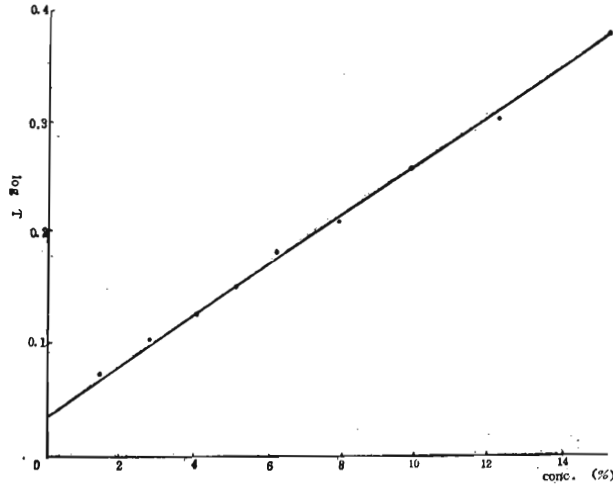
第1図はゼラチンを用いて作成した検量曲線で、此の検量曲線によつて少くともゼラチンの定量は行うことが出来る。

5) 次に蛋白水溶液と蛋白質を濾紙に塗布した場合及び蛋白質を濾紙に滴下後コロヂオンを塗布した場合とで、ビュ

第4表 標準(検量)曲線作成

濃度(%)	回数	1	2	3	平均
17	値	0.036	0.035	0.035	0.035
15		0.378	0.378	0.378	0.378
12		0.306	0.306	0.310	0.307
9.6		0.255	0.255	0.255	0.255
7.68		0.210	0.210	0.210	0.210
6.14		0.180	0.177	0.177	0.178
4.92		0.150	0.148	0.148	0.148
3.93		0.130	0.125	0.125	0.125
2.62		0.096	0.096	0.096	0.096
1.31		0.068	0.068	0.068	0.068
0.66		0.048	0.049	0.049	0.049

第 1 図 標準検量曲線



ーレット反応の吸光度に相違はないかと云う点であるが、此の為に行つた実験を次に示す。

第 5 表 ビューレット反応の吸光度

試験回数	1	2	3	4	5	6	平均
試料の調整							
盲 値	0,037	0,036	0,035	0,035	0,035	0,035	0,035
蛋白質溶液	0,068	0,068	0,065	0,067	0,067	0,067	0,067
蛋白質を濾紙に塗布	0,069	0,066	0,067	0,067	0,067	0,067	0,067
蛋白質を濾紙に滴下後コロジオン塗布	0,067	0,067	0,065	0,067	0,068	0,068	0,067

上表に示す様に、此れ等相互間には差異は認められなかつた。個々の測定値に於ける相違は、光電比色計に於ける誤差の範囲内と認められる。

考 察

使用するコロジオンにより、透析時間とか、その他の能力に相当の差異のあることが想像されるが、本実験では日本薬局方コロジオンを使用した。所要透析時間の測定の為に使用したアミノ酸の濃度は、大体 50 γ 程度としたが、我々が組織中より、又は微細なる細胞内より蛋白質を分離する場合、大部分は蛋白質として存在し、遊離のアミノ酸は概して僅少と思われるので、斯かる試料を用いる場合の透析時間は更に一層短縮されるかもしれないし、又反対にその組織に多量の遊離アミノ酸を含有する場合には、当然長時間を要する筈である。又透析を行う場合の水の流量についても、これを大にすれば一層速かに透析が終るのではないかと思考せられるが、此れにも自ら限界があることと思われる。

本実験に使用した蛋白質はゼラチンのみであつたが、其の他の蛋白質についても、より多くの実験を試みる必要がある。蛋白質の外に Pepton についても実験を行つたが、勿論アミノ酸よりも透析され難いが長時間（6時間）をかければ移動することが確認された。

蛋白質の確認法としては、ニンヒドリン反応の外に酸性染料の Brilliant Milling Green

を用いる方法が優れているとされているが、試薬の都合で本実験には使用しなかつた。

結 論

以上の実験結果より 大体に於て蛋白質の微量分離並に定量は可能であることが認められる。蛋白質としてゼラチンのみでなく、其の他の蛋白質も使用して光電比色計に於る吸光度を測定することや、之を實際に応用して組織中並に極く微細なる細胞より蛋白質を分離定量することは、今後の研究に俟つべきもので、本実験では其の可能性を示したに止つた。

要 約

濾紙並にコロデオンを用いて蛋白質の分離並に定量を行つた。本法に従えば試料が極めて僅少でも分離せられ、且つ定量も可能であることを識つた。従来までの分離並に定量法では、試料を相当多量に要し従つて此れに用いる試薬も大量を必要とした上、試薬等によつて蛋白質がかなり変性せられる場合もあるが、本法によれば極めて僅少の試料でも分離並に定量が行われ、蛋白質の変性もかなり阻止出来るものと思われる。

Résumé

It is necessary to use considerable amount of sample for the separation or estimation of protein. In this study, authors tried to separate the protein from the substance which contains nitrogen compounds and some other impurities, by the application of a modified dialysis method using a piece of filter paper and collodion. By this method, the separation of protein can be accomplished by using remarkably small amount of sample, and more conveniently this procedure can also be applied as a micro method for determining the protein content. In the previous method, the protein has often been denaturated, during the treatment also, but by the author's (the separating procedure of protein can be accomplished without such inconvenient effect.

文 献

- 赤堀四郎：アミノ酸及び蛋白質（著書）
齊藤正行：光電比色計による臨床化学検査（著書）
日本化学総覧第二集 第26巻 第5号
鮫島実三郎：膠質学（著書）