

魚類血液の生化学的研究—XV

— 血清蛋白質と色素イオンの結合性に
みられる種属特異性—

斎 藤 要

Biochemical Studies on the Fish Blood—XV

On the Species Specificity in the Combination of Serum
Protein with Anionic and Cationic Dyes

Kaname SAITŌ

Abstract

Combination of fish serum protein with a cationic dye, methylene blue and with two anionic dyes, methyl orange and bromophenol blue, was studied by equilibrium dialysis, paper electrophoretic analysis and spectrophotometry. The results obtained were summarized as follows.

1) As to the binding ability with methyl orange of various serum proteins, it was ascertained that a considerable amount of methyl orange can be bound with the serum protein of teleosts such as, *Scomber tapeinocephalus*, *Nippon spinosus*, *Chrysophrys major*, *Thunnus thynnus*, *Coryphaena hippurus* and *Mugil cephalus*, and also with the mammalian serum protein (rabbit and bovine), but to the serum protein of elasmobranchs such as *Dasyatis akajei*, *Mustelus griseus*, *Orectolobus japonicus* and *Carcharhinus albimarginatus*, such binding ability was barely observed. (Fig. 1). While, the amount of methylene blue bound to serum protein was found to be quite small in any cases. (Fig. 2). In case of teleosts, the binding ability with methyl orange of serum protein varied with kinds of fish and was found in the following order.

Bovine (control) > *Scomber tapeinocephalus*, *Thunnus thynnus* > *Chrysophrys major*, *Mugil cephalus*.

2) In the electrophoretic diagrams obtained from the mixture of serum and bromophenol blue, in case of teleosts and control animals there were two peaks of A and B, while in elasmobranchs there was one (A) peak only. (Fig. 5). Peak A (purple) is occasioned by free bromophenol blue and Peak B (blue) is brought forth by the combination of albumin fraction and bromophenol blue. Namely, in case of serum protein of teleosts and control animals there were observed the combination of bromophenol blue with albumin component and a metachromasis according to this combination, but in case of serum protein of elasmobranchs no such phenomenon could be observed.

3) In the adsorption spectra obtained from the mixture of serum and bromophenol blue, in case of elasmobranchs the adsorption maximum was observed, as in the case of free bromophenol blue (blank), at about 595 m μ , while in teleosts and control animals the maximum was at about 605 m μ . (Fig. 6). That is, the serum protein of elasmobranchs does not show metachromasis. In the case in which methylene blue and congo red were used in place of bromophenol blue no such difference in adsorption maximum was found between any samples. (Fig. 7 and 8). From these results it has been ascertained that the serum protein of elasmobranchs, unlike that of teleosts or higher vertebrates, is lacking in albumin component which is rich in cation radicals.

1. 色素イオンの結合能*

最近、蛋白質と色素イオンとの結合量を測定して、蛋白分子内にある近づき易く、且つ自由にイオン化出来る基を簡単に定量することが可能となり、これによつて蛋白質の性質とか組成を比較し得るようになった。

Klotz 等¹⁾の研究によつて、哺乳動物では血清蛋白質の種類により色素イオンの結合量が著しく異なることが明らかにされているから、各種動物の血清蛋白質について色素イオンの結合量を求め、これを比較検討することにより組成の一端を伺うことも可能と考えられる。しかし魚類を対象としたこの種の研究は未だ行われていないようである。

著者は平衡透析法によつて魚種別に血清蛋白質と色素イオンとの結合量を求めたところ、硬骨魚類と軟骨魚類とでは該蛋白質と methyl orange (anion) との結合量に著しい差異のあることと、その差異は前報^{2,3,4)}で述べた魚類血清蛋白質の組成にみられる種属特異性と密接な関係のあることを確認し得た。

実 験 の 部

実 験 材 料

実験材料の選択にあつては前報⁵⁾で述べた事項に留意し、同種の材料には出来得る限り環境及び生理、生態的諸条件の類似したものをを用いた。

魚種：供試魚の種名と各々の平均体重を示すと次の如くである。

硬 骨 魚 類

コ イ	<i>Cyprinus carpio</i> (LINNÉ)	530 g
ボ ラ	<i>Mugil cephalus</i> LINNÉ	480 g
マ グ イ	<i>Chrysophys major</i> TEMMINCK et SCHLEGEL	710 g
ア ラ	<i>Nippon spinosus</i> CUVIER et VALENCIENNES	1,420 g
シ イ ラ	<i>Coryphena nippurus</i> LINNÉ	1,010 g
ゴマサバ	<i>Scomber tapeinocephalus</i> BLEEKER	960 g
カ ツ オ	<i>Katsuwonus Pelamis</i> (LINNÉ)	1,310 g
マ グ ロ	<i>Thunnus thynnus</i> (LINNÉ)	71 kg

軟 骨 魚 類

シロザメ	<i>Mustelus griseus</i> PIETSCHMANN	2,180 g
オ オ セ	<i>Orectolobus japonicus</i> REGAN	22 kg
ツマジロ	<i>Carcharhinus albimarginatus</i> (RÜPPL)	14 kg
アカエイ	<i>Dasyatis akajei</i> (MÜLLER et HENLE)	1,890 g
ツノザメ	<i>Squalus mitsukurii</i> JORDAN et FOWLER	11 kg

対照動物としては人間、家兎及びウシを用い、また標準血清蛋白質としては精製 albumin (米国. Armour Lab. 牛血製) を用いた。

採集の時期と水域：供試海産魚類は 1958 年 10 月から 1959 年 3 月までの間に鹿児島湾及びその近海で採集したもので、当時の水温は表層で 17~19°C、100 米層で 13~14°C を示

* 本報告は 1959 年 4 月日本水産学会年次大会 (東京) で発表した。

した。またコイは鹿児島市内の養魚池より同時期に求めたもので当時の水温は 10~14°C であった。

実験方法

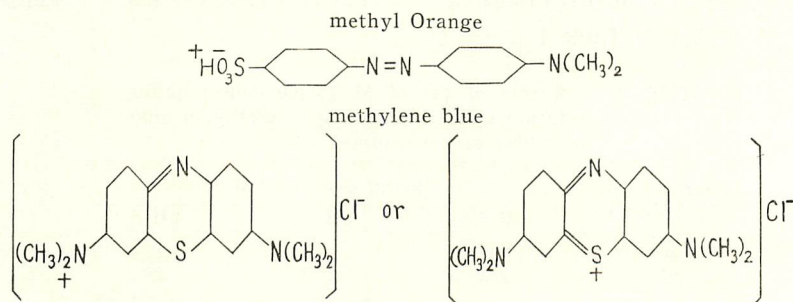
採血法：採集直後直ちに、魚体の胸部或は鰓孔の後部膜を切開して心臓を幾分露出させ、注射針を動脈球から心室の方向に入れ、心臓の収縮期に従つて採血した。

血清の分離法：血液を氷蔵庫 (4~6°C) 中に約 6 時間放置した後に遠心分離 (3,000 r.p.m. 10 分間) して得られる血清を使用した。

血清蛋白質溶液の調製：分離した血清をセロファン紙囊に入れ、Mol/15 磷酸塩緩衝液 (pH 7.3) 中において約 4°C で 20 時間透析した後、所定濃度 (蛋白態窒素 2.5~3.0mg/5 ml) の溶液を調製した。なお必要に応じて血清をそのまま同緩衝液で所定濃度の蛋白質溶液となるように稀釈して用いた。

結合量の測定法：Klotz 氏⁶⁾の用いている平衡透析法に準拠した。即ち色素溶液と蛋白質溶液をセロファン膜で界し、両者が平衡に達した後、色素溶液の濃度を測定し、一方対照として蛋白質を含まないだけで、その他は同一条件とした場合の色素溶液の濃度を測定し、両者の差から蛋白質と結合した色素量を算出した。

色素としては anion の methyl orange (国産特級品の再結晶品) と cation の methylene blue (Merck 製、化学用) を用いた。



実施にあたっては右田、大竹氏等⁷⁾の透析法を若干変更し、次の如く行つた。

透析器：セロファン紙はかなり色素を吸着するので表面積の僅かな差も大きく影響することになる。methylene blue の場合は特にこの傾向が強くみられた。そこで表面積を一定にするため著者は直径 31 mm、長さ 60 mm の硝子管の一端にセロファン紙をはりつけた透析器を用いた。

管の側面にセロファン紙を密着させるためゴムバンドを数回まき、その上に融点約 60°C のパラフィン塗りを塗り、ゴムバンドの部分とセロファン紙の折り曲げた部分を完全にパラフィンで覆う。セロファン紙は予め蒸留水で 30 分間煮沸した後、新しい蒸留水に一夜浸漬したものをを用いた。また用いたセロファン紙は略々均質とみなし得ることは一枚の紙から 9 個の切片を切り各々前記の如くして作つた透析器を用いて、methyl orange (濃度 10×10^{-5} Mol/l) を溶媒に対し透析し、平衡達成後、色素の濃度を測定した結果、信頼限界度 $5.52 \pm 0.04 \times 10^{-5}$ Mol/l を得たことから諒解される。

透析操作：前記の血清蛋白質溶液 5 ml を透析器内に入れ、これを一定の濃度の色素溶液 10 ml を入れた管瓶中に各々浸し、管瓶にゴム栓を施し、6~8°C の冷室に 48 時間静置す

る。なお管瓶底面と透析器のセロファン紙とが密着しないように、直径約 3 mm の硝子棒を三角形に折り曲げたものを敷いて、その上に透析器を置いた。

色素の結合量及び結合能力の比較：平衡達成後、色素溶液槽中の色素濃度を比色定量する。(EPO-II 日立光電光度計、液層巾 1 cm、測定波長 methyl orange 溶液では 460 m μ 、methylene blue 溶液では 670 m μ)。この濃度 [A] は結合に与らなかつた色素の濃度である。同様にして対照(色素溶液-蛋白質の溶媒系)における色素の平衡濃度 [A₀] を求めると、[A₀] - [A] から蛋白質と結合した色素の量がわかる。この結合量から各種血清蛋白質の色素に対する結合能力を比較するため、色素濃度を広い範囲に変化させて検討し、Klotz 氏等⁹⁾に従い色素濃度 [A] (対数目盛) と蛋白態窒素 1 mg 当りの色素結合量 r との関係を図示した。

実験結果

A. 実験条件の吟味

結合量の測定は前述の平衡透析法によつたが、更に二・三の実験条件について検討した。

緩衝液の pH と色素濃度の影響：Klotz 氏等⁹⁾のウシの血清 albumin についての結果では、磷酸イオンは色素と蛋白質の結合を妨げることが最も少ないとされている。そこで本実験でも磷酸塩緩衝液 (Mol/15KH₂PO₄-Mol/15 Na₂HPO₄ 混液) を用いたが、次に家兎の血清蛋白質を試料とし、methyl orange との結合に及ぼす緩衝液の pH と色素濃度の影響について検討した結果を Table 1 に示した。

Table 1. Influence of pH of M./15 phosphate buffer solution upon the binding of methyl orange to rabbit serum protein.

Concn. of dye (10 ⁻⁶ M./l.)	Bound dye (10 ⁻⁸ M.)		
	pH 5.3	pH 7.3	pH 8.7
40	13.5	13.5	13.8
80	28.5	28.8	29.2

Equilibrium dialysis: 5 ml. of protein solution (prot.-N concn. 2.5~3.0 mg./5 ml.) in the inside cell was dialyzed against 10 ml. of dye solution in the outside cell through cellophane for 48 hr. at 6~8°C. Control dialysis was set up in order to make correction for adsorption of dye on membrane itself. Amount of bound dye was calculated from the difference in the equilibrium concentration of free dye in the outside cell between protein-containing dialysis system and control.

この結果によると、実験の pH 域では何れの pH でも結合量に大差のないことが諒解され、このような結果はコイ及びシロザメの血清蛋白質の場合にも認められた。更に色素濃度を 2 倍にしても結合量が 2 倍になるとは限らないことも明らかである。

以上の結果に基づき本実験では血清の生理的 pH に近い pH 7.3 の磷酸塩緩衝液を使用し、色素濃度を比較的広い範囲に変化させて実験した。

緩衝液中の蛋白質濃度の影響：対照試料とした標準血清 albumin とウシの血清蛋白質を用い、これらと methyl orange の結合に及ぼす蛋白質濃度の影響について検討した結果を Tabel 2 に示した。この結果によると、試料液の蛋白質濃度が増加しても、それに比例して結合量は増加しないことが認められる。従つて本実験では、蛋白質濃度が 2.5~3.0 mg/5ml になるように条件を規定して実験した。

Table 2. Influence of protein concentration upon the binding of methyl orange to serum protein.

Sample	Concn. of protein (N mg./5 ml.)	Bound dye (10^{-8} M.)
Albumin*	4.0	28.5
	2.0	19.5
	1.0	11.2
Bovine**	6.0	22.2
	3.0	15.4
	1.5	8.7

Concn. of dye 40×10^{-6} M./l., M./15 phosphate buffer solution pH 7.3.

* The bovine serum albumin was obtained from Armour Laboratories (U. S. A.).

** Dialyzed serum.

B. 血清蛋白質と methyl orange 及び methylene blue との結合

透析血清の結合曲線：前述の条件で調製した供試材料の血清蛋白質溶液を用い、methyl orange 及び methylene blue の所定濃度における該蛋白質の色素結合量 r を求めて得た結合曲線は Fig. 1 及び 2 の如くである。なお、この結果は各材料とも 6~10 個体について求めた値の平均値である。

Fig. 1 の [A] は対照とした標準血清 albumin とウシの血清蛋白質の結合曲線であるが、両者共に methyl orange の濃度に応じてかなりの結合量を示すことは明らかである。また単位蛋白態窒素量当りの結合量は前者が後者よりかなり多い結果となつている。

次に図の [B], [C] は硬骨魚類に属する ボラ、マダイ、アラ及びゴマサバ等の結合曲線であるが、これらの硬骨魚類でも血清蛋白質は methyl orange とかなり結合することは明らかである。しかし各々の結合能力は対照動物の場合より一般に小さく、魚種により若干の差があることも伺える。即ちゴマサバとかマグロの如き洞泳魚はマダイとかボラ等より結合能力が高い結果となつている。魚肉の actomyosin に対する methyl orange の結合量にも魚種による差のあることを右田、大竹氏等が報告⁷⁾している。

図の [D] は軟骨魚類に属するシロザメ、オオセ、ツマジロ及びアカエイの結果であるが、これらの魚類の場合は血清蛋白質と methyl orange との結合が明らかでない。即ち対照動物及び硬骨魚類の場合に比べ結合能に著しい差異が認められる。

Fig. 2 は cation 色素である methylene blue の場合の結果であるが、これによると対照動物及び各供試魚共に血清蛋白質と methylene blue との結合能は極めて小さいことが諒解され、anion 色素の場合にみられたような顕著な種属的差異は認められない。

原血清の結合曲線：軟骨魚類と硬骨魚類とは血清の成分組成、特に非蛋白態窒素化合物量⁹⁾に著しい差異がある。そこで、これらの物質（主として尿素と trimethylamine oxide）が共存した場合の影響を知る意味で、透析処理をしない原血清を用いて methyl orange との結合曲線を求めてみた。その代表的な結果が Fig. 3 である。

これによると、各試料とも原血清の場合も透析血清の場合と略々同様な結合曲線を示すことが諒解される。Klotz 氏等⁹⁾は高濃度の尿素が血清 albumin と methyl orange との結合を妨げるばかりでなく、既に来上がつている結合をも切ると報告しているが、本実験条件下では原血清（供試軟骨魚の血清尿素量 762~897 mg/dl）をそのまま使用しても血清蛋

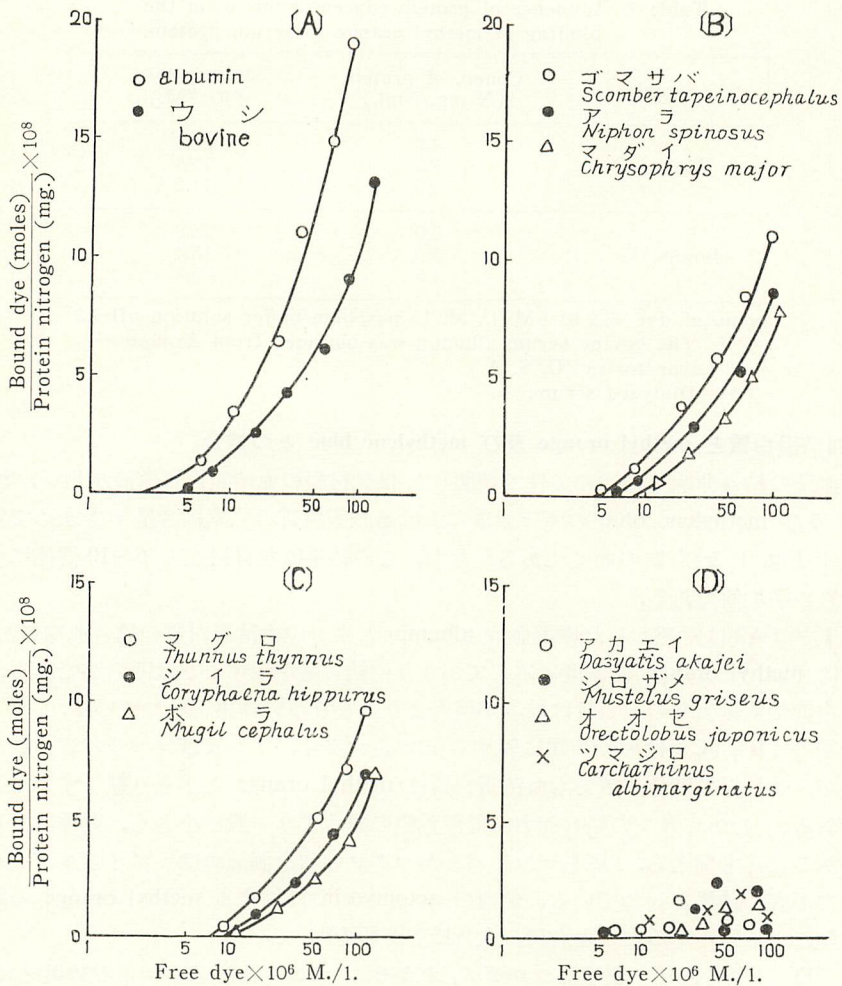


Fig. 1. Binding of methyl orange to serum proteins of fishes and bovine in phosphate buffer solution at pH 7.3.

[A]: Control. [B]: Marine teleosts. [C]: Marine teleosts.
[D]: Marine elasmobranchs.

白質と該色素の結合性に対する共存成分の影響は殆んどないことが明らかである。

混合血清の結合曲線：前述の如く軟骨魚類の血清蛋白質は methyl orange との結合が顕著でないが、これに結合の顕著な標準血清 albumin 及び他の供試血清を種々の割合で混合した場合についても結合量を求めてみた。次に等蛋白質量混合液について得られた結合曲線を Fig. 4 に示した。

この結果よりも明らかな如く、シロザメとかアカエイ等の血清に標準血清 albumin, ウシ及びマダイ等の血清を混合すると色素濃度に応じてかなりの結合量を示すようになる。

このような傾向は透析血清を用いた混合血清の場合にも同様に認められた。なお軟骨魚類の血清には生理的 pH に近い磷酸塩緩衝液の添加によつて沈殿する易動度の極めて低い特殊な蛋白質の存在することを発見¹⁰⁾しているが、この蛋白質を透析管中に共存させた場合

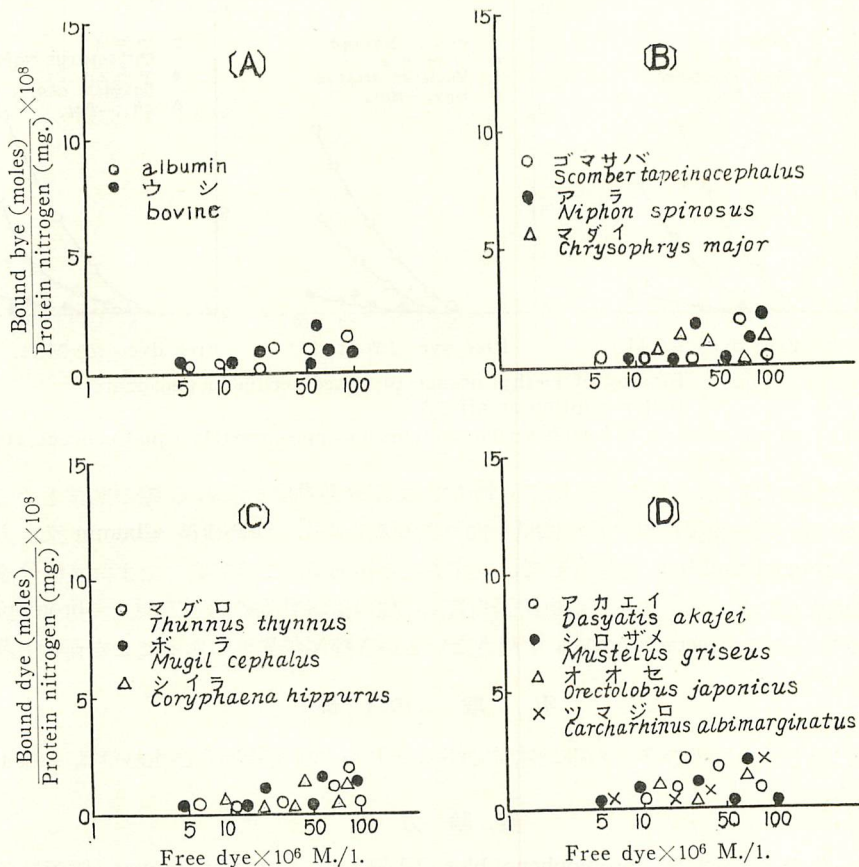


Fig. 2. Binding of methylene blue to serum proteins of fishes and bovine in phosphate buffer solution at pH 7.3.

[A]: Control. [B]: Marine teleosts. [C]: Marine teleosts. [D]: Marine elasmobranchs.

も除去した場合も両色素の結合性に殆んど変化のないことを確認している。

2. 色素イオンによる変色性 (metachromasis)*

A. 血清と色素混液の泳動図にみられる metachromasis

魚類の血清蛋白質の濾紙電気泳動法による分析結果については前報³⁾で述べたが、著者はその実験中に血清蛋白質と bromo-phenol blue との結合現象について興味あ

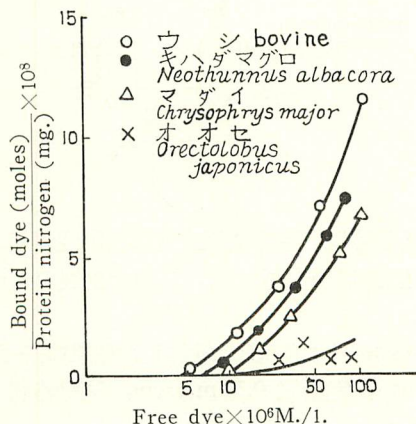


Fig. 3. Binding of methyl orange to serum of fishes and bovine in phosphate buffer solution at pH 7.3.

* 本報告は 1958 年 11 月、日本水産学会九州大会で発表した。

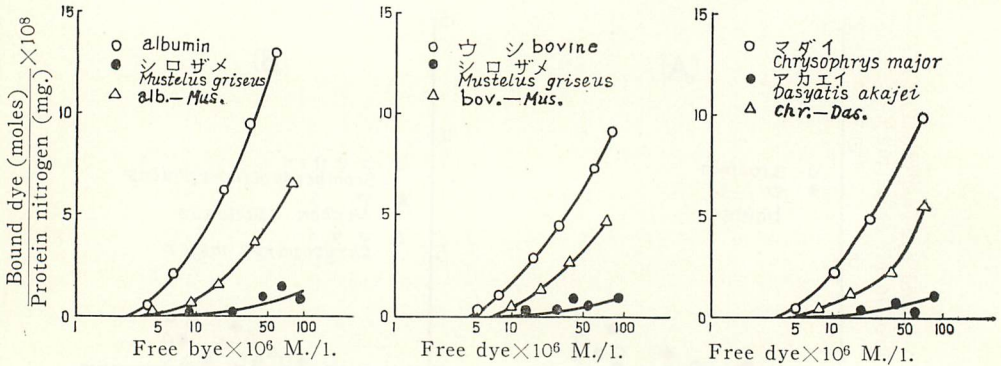


Fig. 4. Binding of methyl orange to mixed serum in phosphate buffer solution at pH 7.3.

△ The mixtures contained each serum proteins in approximately equal concentration.

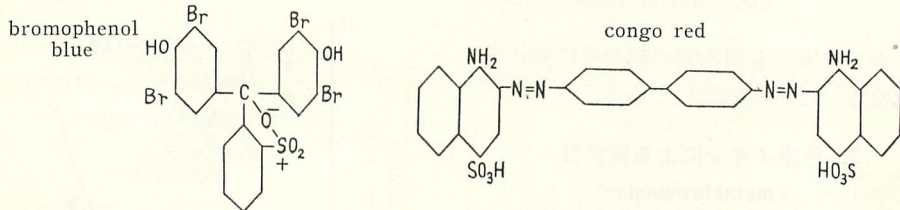
る事実を見いだした。即ち濾紙電気泳動法では相対易動度を求める際の基準となる血清 albumin の一定時間後における移動量を簡単に知るために、予め血清 albumin 又は人間の血清に bromophenol blue を混合して泳動することがある。この方法をたまたま軟骨魚類の血清に適用したところ、同魚類の血清蛋白質は、他の供試動物の場合と異なり bromophenol blue の結合に伴う metachromasis を起さないという種属特異性のあることを確認し得た。

実験の部

実験に供した魚種及び各々の平均体重並びにそれらの採集時期及び水域等は本報 1 と同様である。

実験方法

血清一色素混液の調製：bromophenol blue (国産特級品), methyl orange (国産特級品), methylene blue (Merck 製化学用) 及び congo red (国産一級品) を用い、各々の血清飽和溶液を調製した。



泳動装置：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密閉型とし、装置を自製の氷箱中に納め得るように改造した。(詳細は前報³⁾参照)

泳動条件：前報³⁾で検討した結果に基づき東洋濾紙 No. 51 と磷酸緩衝液 (pH 7.8, μ 0.1) を用い、電流値 0.32 mA/cm, 泳動時間 15 時間, 泳動温度 6~8°C, 蛋白質濃度 0.2~0.3 mg/cm の条件で泳動した。

泳動曲線：泳動後の濾紙を乾燥後、流動パラフィンに浸し、東洋理化学工業式濾紙光電比色計 (S-1 型, filter V-02) によつて求めた。

実験結果

bromophenol blue と血清混液の泳動図：供試血清の該色素飽和溶液を所定条件下で泳動し、濾紙光電比色計により求めた泳動曲線を示すと Fig. 5 の如くである。図の [A] は bromophenol blue のみを単独で泳動した場合の結果であるが、anion 色素である bromophenol blue は陽極に向つてかなり移動することが諒解される。図の [B] は標準血清 albumin と bromophenol blue 混液の泳動曲線であるが、この場合は A と B の二つの泳動峰がみられる。B は albumin と bromophenol blue の結合物の泳動峰で、A は albumin とは結合しない遊離の bromophenol blue の泳動峰であることは各々の易動度より確認できる。この場合 A 峰は紫色であるのに対し B 峰は青色を呈した。この事実より血清 albumin は bromophenol blue と結合すると共に変色現象、即ち metachromasis を起すことが諒解される。

図の [C] はウシの血清に bromophenol blue を混合した場合の泳動曲線であるが、この場合には [B] の血清 albumin の場合と同様に A と B の泳動峰が認められ、albumin 以

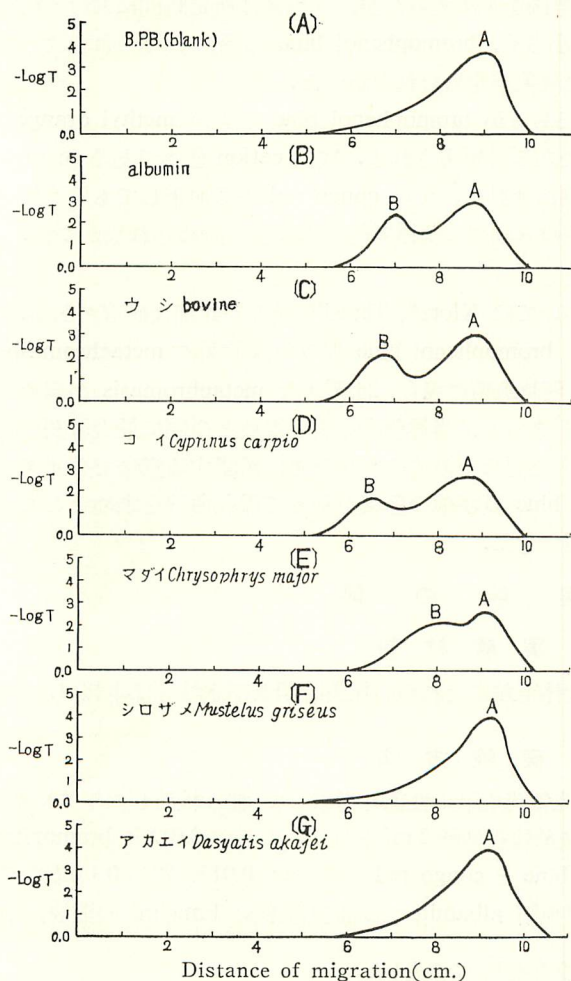


Fig. 5.

Paper electrophoretic diagrams of serum-bromophenol blue mixtures.

[A], [B] and [C]: Control.
[D] and [E]: Teleosts.
[F] and [G]: Elasmobranchs.

A: Purple colored peak.
B: Blue colored peak.

Phosphate buffer solution pH 7.8; μ 0.1; intensity of current 0.32 m A/cm.; duration of electrophoresis 15 hr.; temp. 6~8°C.; protein concentration 0.2~0.3 mg./cm.

外の蛋白質 (α_1 , α_2 , β 及び γ -globulin 区分) の泳動部分には bromophenol blue による着色, 即ち結合が認められない. 勿論これらの globulin 区分でも, 常法¹¹⁾により変性剤 (HgCl_2) を含む bromophenol blue 溶液で染色すると着色する. (前報⁹⁾参照)

図の [D] と [E] は硬骨魚類に属するコイとマダイの泳動曲線であるが, これらの場合も対照動物の場合と略々同様に 2 個の泳動峰と metachromasis が認められる. このような現象は他の供試硬骨魚の場合にもみられた.

一方軟骨魚類に属するシロザメとアカエイでは [F] 及び [G] に示した如く, [A] の場合と略々同様な泳動曲線を示す. 即ち A の泳動峰のみがみられ, 対照動物と硬骨魚類にみられた B の青色の泳動峰は認められない. このような現象は他の供試軟骨魚の場合にも確認された. 以上の事実より, 軟骨魚類の血清には他の実験材料にみられるような albumin 区分が殆んど存在しないことが証明され, そのために同魚類の血清蛋白質は bromophenol blue と metachromasis を起さないという種属特異性を示すことが諒解される.

他の色素と血清混液の泳動図: 平衡透析法では albumin と明らかな結合を示した methyl orange についても同様な条件で泳動図を求めてみたが, 本色素は所定時間における陽極に対する易動度が albumin 区分より小さく, bromophenol blue の場合にみられたような同区分との結合とか, それに伴う変色現象が認められなかった.

この結果より同じく anion 色素であるが bromophenol blue の方が methyl orange よりも, 血清 albumin との結合が強固であると推定される. 次に cation 色素である methylene blue では血清蛋白質とは逆に陰極側に泳動し, また congo red では通電しても原点附近に止まり, これらの両色素と血清混液の泳動図には種属的差異は全く認められなかった.

B. 血清と色素混液の吸収曲線*

蛋白質と色素混液の吸収曲線については Klotz⁹⁾, Teresi¹²⁾ 氏等の詳細な研究がある.

前述の如く, 軟骨魚類では血清と bromophenol blue 混液の泳動図に metachromasis が認められないのに対し対照動物と硬骨魚類の場合には顕著な metachromasis が認められた. このような metachromasis が起きると, 当然色素原液と混液との間に最大波長の変化が伴うと考えられる. そこで炉紙上で認めた前述の現象を更に確認する意味で分光光度計を用い, 血清に bromophenol blue 及び他の色素を加えて吸収曲線を求めたところ, metachromasis を更に数値的に解明できた.

実 験 の 部

実 験 材 料

実験に供した魚種及び各々の平均体重並にそれらの採集時期及び水域等は本報 1. と同様である.

実 験 方 法

血清-色素混液の調製: 使用した光電光度計の性能を考慮して, 種々検討した結果に基づき, 血清 0.2 ml に所定 pH の Mol/15 磷酸塩緩衝液 2 ml を加え, これに 0.01% bromophenol blue 溶液 0.1 ml, また methylene blue と congo red の場合は 0.01% 溶液 0.1 ml を添加して波長の測定に供した. なお標準血清 albumin では蛋白態窒素 1 mg/ml の溶液, また

* 本報告は 1958 年 11 月, 日本水産学会九州大会で発表した.

透析血清の場合は蛋白態窒素 2.5 mg/ml の溶液を調製し、これらの 0.2 ml を用いた。

吸収曲線の作成：日立分光光度計 EPU-2 型で求めた D を縦軸に、横軸に λ (m μ) をとつて表わした。

実験結果

bromophenol blue と血清混液の吸収曲線：pH 7.3 の磷酸塩緩衝液を用い、前述の条件で調製した bromophenol blue と血清の混液について求めた吸収曲線を Fig. 6 に示した。

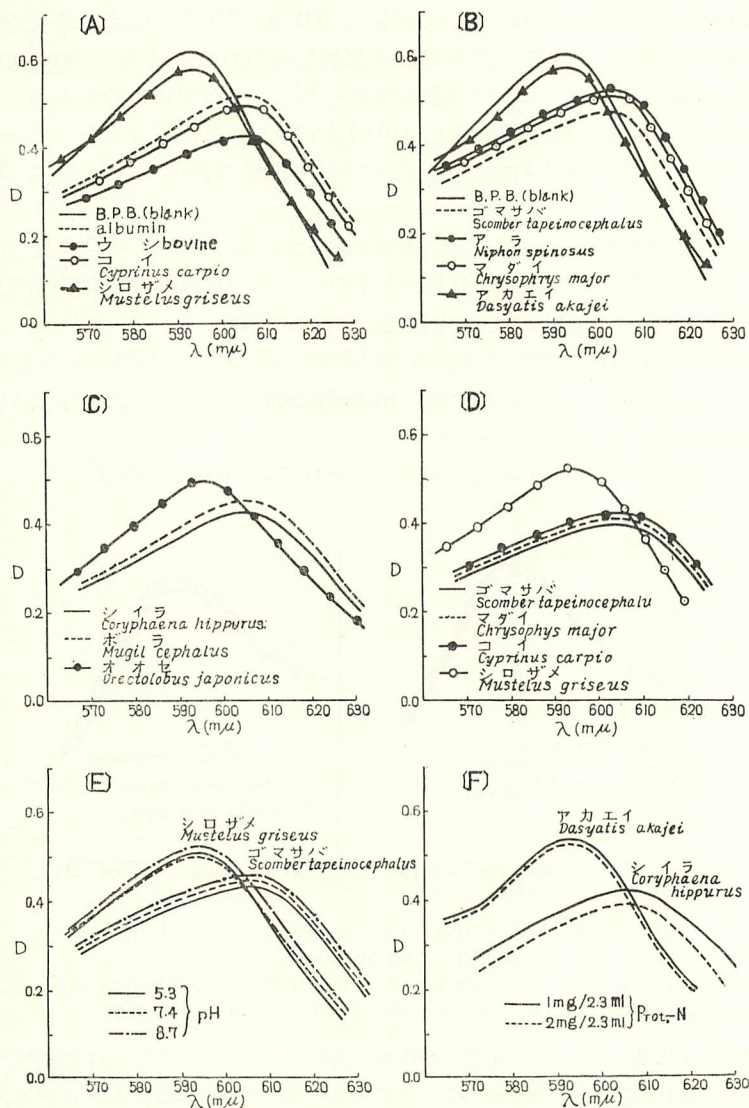


Fig. 6. Absorption spectra of bromophenol blue solution in serum of fishes and bovine.

[A], [B] and [C]: Original serum. [D]: Dialyzed serum.
[E]: Effect of pH. [F]: Effect of protein concentration.

The serum-dye mixture consisted of 0.1 ml. of 0.015% bromophenol blue, 2.0 ml. of M./15 phosphate buffer solution, and 0.2 ml. of serum.

図 [A] の結果より, bromophenol blue の blank では最大波長が $595 m\mu$ 附近にみられるのに対し, これに標準血清 albumin とカウシの血清を添加すると最大波長が $605 m\mu$ 附近に変化することが諒解される。

魚類では図の [A], [B], 及び [C] に示すように, 軟骨魚類に属するシロサメ, アカエイ, オオセ等の血清では bromophenol blue の blank と略々同様に最大波長が $595 m\mu$ 附近にみられるのに対しコイ, ゴマサバ, アラ, マダイ及びボラの如き硬骨魚類の血清では標準血清 albumin 及び対照動物の場合と同様に $605 m\mu$ 附近に最大波長が認められる。

以上の結果より供試軟骨魚類の血清は他の実験材料の血清とは異り bromophenol blue と metachromasis を起さないという種属特異性のあることが明らかである。

このような特異性は緩衝液の pH を変化 (pH 5.3~8.7) させた場合とか, 混液中の蛋白質量を変化 (窒素として 0.5~2.5 mg) させた場合にも同様に認められた (Fig. 6 [E] 及び [F] 参照)。

以上は血清をそのまま使用した場合の結果であるが, 前述の如く硬骨魚類と軟骨魚類とは血清の非蛋白態窒素量に著しい差異があるので, 蛋白質以外の共存成分の影響を知る意味で, 透析処理をした血清についても同様に検討してみた。

その結果を Fig. 6 [D] に示したが, 各試料共に前述の原血清の場合と大差のない結果であった。これらの事実より原血清の示す metachromasis に対しては共存する蛋白質以外の成分の影響は極めて少ないことが伺える。

他の色素と血清混液の吸収曲線: 供試血清と methylene blue の混液について求めた吸収曲線を Fig. 7 に示した。

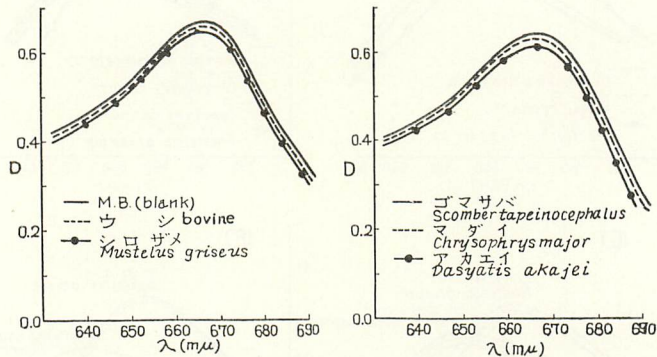


Fig. 7. Absorption spectra of methylene blue solution in serum of fishes and bovine.

The serum-dye mixture consisted of 0.1 ml. of 0.01 % methylene blue, 2.0 ml. of M./15 phosphate buffer solution (pH 7.3), and 0.2 ml. of serum.

即ち本色素の blank では最大波長が $665 m\mu$ 附近にあるが, これに対照動物 (人及び家兎), 硬骨魚類に属するコイ, ゴマサバ, マダイ及び軟骨魚類に属するシロサメ, アカエイ等の血清を添加しても最大波長に殆んど変化がみられない。

次に congo red と血清の混液について求めた吸収曲線を Fig. 8 図に示した。

congo red の blank では最大波長が $495 m\mu$ 附近にあるが, これに供試血清を添加しても最大波長に殆んど変化がみられない。

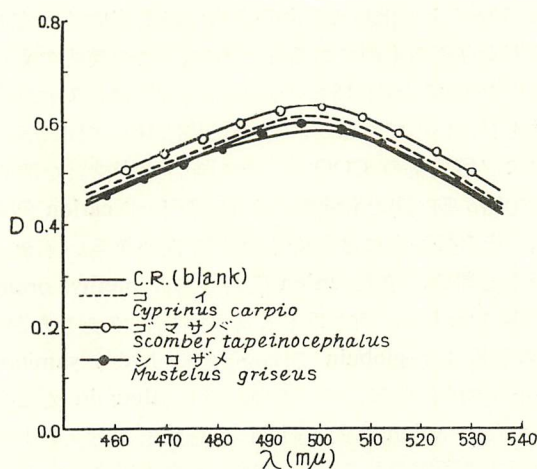


Fig. 8.
Absorption spectra of congo red solution in serum of fishes.

The serum-dye mixture consisted of 0.1 ml. of 0.01% congo red, 2.0 ml. of M./15 phosphate buffer solution (pH 7.3), and 0.2 ml. of serum.

即ち、これらの色素では bromophenol blue の場合にみられた様な metachromasis における顕著な種属的差異は認められなかつた。尤も methylene blue の場合は一色性の色素であるから、これが当然の結果とも考えられる。

考 察

以上の実験結果より、血清蛋白質と色素の結合性にみられる種属的差異は、実験材料間の血清蛋白質組成の差異に由来すると推察されるので、両者の関係について若干の考察を試みた。

Klotz 氏等の報告¹⁾によると、15種の球状蛋白質の中で、pH 7 附近で cation 色素と結合したものは殆んどなく、また methyl orange と結合したものは血清 albumin と β -lactoglobulin のみで、血清 globulin 等は結合しないとのことである。本実験でも血清 albumin (牛血製) は methyl orange (anion) と明らかに結合するのに対し methylene blue (cation) との結合は殆んど認められなかつた。これらの事実より、Fig. 1 [A] に示したウシの血清蛋白質の結合曲線には、それに含まれる血清 albumin (総蛋白質量の約 50% を占める) が支配的に関係していることは確かである。また methyl orange とかなりの結合量を示した供試硬骨魚類の血清蛋白質にも albumin 区分の存在することは既に確認^{2,3)}しているが、methyl orange との結合が明らかでない供試軟骨魚類の血清蛋白質には、前報^{2,3)}で述べた如く albumin 区分が認められないことは注目し得る。これらの血清蛋白質でも、これに精製 albumin 或は albumin 区分を含む血清蛋白質を添加するとかなりの結合量を示す事実や、前述の Klotz 氏等¹⁾の結果等よりしても同魚類の血清蛋白質と methyl orange との結合性にみられ特異性は、その血清蛋白質に albumin 区分を欠いている事実由来する現象と解される。このことは特に Fig. 5 の実験結果より立証される。

次に本報の実験結果によれば、血清蛋白質と色素イオンとの結合性にみられる種属的差異は、何れも anion 色素である methyl orange と bromophenol blue の場合に認められた。一般に血清蛋白質と色素イオンが結合するためには、蛋白質分子内に対応するイオン基の存在を必要とするが、只存在するというだけでは不十分で、そのイオン基は色素イオンが近づき得るような位置にあり、且つ分子内結合等でしばられていない自由にイオン化出

来る基でなければならない。このようなイオン化基は蛋白分子中で最も反応性に富んだ基であつて、蛋白質の機能に大きな影響を与えるものであるところに、この反応のもつ重要な意義がある。前述の如く Klotz 氏等¹⁾の試みた約 15 種の球状蛋白質では、7 に近い pH で、cation 色素と結合したものは殆んどないのであるが、この現象に対して同氏等¹⁾は用いた蛋白質の分子内の OH 基が酸性アミノ酸残基の COO^- と特に強い水素結合を造るためではないかと想像している。供試魚の血清蛋白質でも種類の如何を問わず cation 色素と結合し難いことが認められたことより、その分子内には色素イオンに近づき易いイオン化した anion 基量の極めて少ない事は推察し得る。また anion 色素である methyl orange の場合、血清 albumin はかなりの結合量を示すのに対し同じく球状蛋白質でありながら γ -globulin は結合しないのである。この現象は γ -globulin では分子中に hydroxyamino 酸残基が多いので cation 基は OH 基と分子内結合を起しているのに対し albumin では分子中に OH 基より cation 基がかなり多いため anion 色素と顕著に結合すると考えられる²⁾。魚類の血清蛋白質のアミノ酸残基の組成は不明であるから詳細な考察は出来ないが、本実験の結果より、軟骨魚類は血清中に albumin 区分を欠き硬骨魚類よりも血清蛋白質の分子中におけるイオン化した cation 基量、即ち反応性に富む基の量が著しく少ないという種属特異性のあることは諒解される。それにも拘らず軟骨魚類は硬骨魚類に優るとも劣らぬ活潑な生活現象を営んでいることは比較生化学的にも興味深い問題を提示しているようである。

摘 要

拾数種の魚類について血清蛋白質と methyl orange (anion 色素)、bromophenol blue (anion 色素) 及び methylene blue (cation 色素) 等との結合性を所定条件下の平衡透析法、電気泳動法及び吸収波長測定法により検討し、硬骨魚類と軟骨魚類とでは血清蛋白質と anion 色素との結合体はかなり種属特異性のあることを明らかにした。

I) 硬骨魚類に属する供試魚の血清蛋白質は対照動物(人間、家兎及びウシ)の場合と同様に methyl orange と顕著な結合を示すのに対し軟骨魚類に属するものでは両者の結合が明らかでなかつた。一方 methylene blue に対しては、各試料共に結合量は極めて少なく、methyl orange の場合にみられたような明確な種属の差異は認められなかつた。これらの事実より硬骨魚類と軟骨魚類とでは血清蛋白質分子中のイオン化した cation 基量にかなり相異のあることが諒解される。

methyl orange の単位血清蛋白質量当りの結合量は供試魚が対照動物の場合より一般に少なく、また硬骨魚類に属するものでも魚種により若干の差のあることを認めた。

II) 血清と bromophenol blue 混液の泳動図を求めたところ、対照動物と硬骨魚類の場合には bromophenol blue (紫色) と albumin 区分の結合した泳動峰(青色)が認められたのに対し、軟骨魚類の場合は、この泳動峰がみられなかつた。即ち対照動物と硬骨魚類の血清では albumin 区分に対する bromophenol blue の結合と、それに伴う metachromasis が認められるが軟骨魚類に属する供試魚の血清ではこの現象が全く認められなかつた。この事実からも軟骨魚類の血清蛋白質は albumin 区分を欠いていることが諒解された。

III) 血清または血清蛋白質と bromophenol blue 混液の吸収曲線を求めたところ、軟骨魚類に属する供試魚では bromophenol blue の blank と同様に約 595 $m\mu$ に最大吸収波長

が認められるのに対し、対照動物と硬骨魚類の場合は最大吸収波長が約 605 m μ に変化し、metachromasis が明らかにみられた。bromophenol blue の代わりに, methylene blue 或は congo red を用いた場合は各試料共に最大吸収波長の変化が殆んどみられなかつた。

以上述べた如く硬骨魚類と軟骨魚類とでは血清蛋白質と anion 色素との結合性に顕著な種属的差異のあることを認めたが、これは両魚類間における血清蛋白質組成の差異、特に軟骨魚類の血清にはイオン化した cation 基量に富む albumin 区分が認められないという事実に起因すると各種の実験結果より推定した。

終りに本研究を行うに当り、北海道大学中村幸彦教授並に文献を御教示下さつた東海区水産研究所大竹茂夫技官に深謝する。また本研究費の一部は文部省科学研究費の支出に仰いだ。記して謝意を表する。

文 献

- 1) Neurath, N. and K. Bailey: "The Proteins", Vol. 1, Part B, (1953), pp. 773~789.
- 2) 齋藤 要: 日水誌., 22, 752~759 (1957).
- 3) 齋藤 要: 日水誌., 22, 760~767 (1957).
- 4) 齋藤 要: 日水誌., 24, 531~534 (1958).
- 5) 齋藤 要: 日水誌., 20, 196~201 (1954).
- 6) Klotz, I. M., F. Marian Walker and Lita B. Pivan: *J. Am. Chem. Soc.*, 68, 1486~1490 (1946).
- 7) 右田正男, 大竹茂夫: 日水誌., 22, 260~264 (1956).
- 8) Klotz, I. M. and J. M. Urquhart: *J. Phys. and Colloid Chem.*, 53, 100~103 (1949).
- 9) Klotz, I. M., H. Triwush and F. Marian Walker: *J. Am. Chem. Soc.*, 70, 2935~2941 (1948).
- 10) 齋藤 要: 日本水産学会秋期大会 (仙台), 講演発表 (1960).
- 11) 森 五彦, 小林茂三郎: "沔紙電気泳動法の実際", 南江堂, 東京 (1955) pp. 113~115.
- 12) Teresi, J. D.: *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 3972~3978 (1950).