

## トリクロール醋酸による多角体蛋白のアルコールへの溶解

江藤, 守総  
九州大学農学部農芸化学教室

<https://doi.org/10.15017/21395>

---

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 15 (4), pp.465-471, 1956-03. 九州大学農学部  
バージョン：  
権利関係：

# トリクロール醋酸による多角体蛋白の アルコールへの溶解

江 藤 守 総

## Dissolution of Polyhedral Protein in Alcohol by Trichloroacetic Acid.

Morifusa Eto

著者は先に家蚕バイラスの封入体である多角体中の核酸を定量した際、トリクロール醋酸 (TCA) 処理後、多角体の約 70% がアルコールに溶解するのを認め、更にそのアルコール可溶物が蛋白質に外ならぬ事を確めた。<sup>3)</sup>

本報では、この現象を蛋白質、酸及び溶媒の面より検討し、アルコールへのこの様な可溶化は多角体蛋白自体の特性であり、存在する特殊な酸によつて惹起される事を明らかにした。この酸効果は TCA が最も強く、溶解蛋白量と TCA の間に一定の関係が存在する。該蛋白と TCA との結合は比較的弱く透析によつて後者が除去される。

### 実 験 法

#### 多角体蛋白の調製

家蚕支×日及び P<sub>21</sub> より常法によつて得られた純白多角体標品を 200 倍量の 0.008 M-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>+0.05M-NaCl に浮かし、25° に 2.5 時間置いて溶解し、不溶分を 3000 rpm で遠心除去し、上澄液を氷冷し予じめ HCl で中和してある 1/8 容の 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を加え、\* 稀醋酸で pH 5 とし生ずる白沈を集め、時々換水しつつ氷室中で大量の蒸溜水に対し 3~4 日間透析する。沈澱を集め、氷冷市販無水アルコール (以下単にアルコールと称す) で洗滌脱水して実験に供す。

#### 蛋白溶解度の測定

2 ml の標線を有する遠沈管に約 1.5 ml のアルコールを入れ、0.5 N の酸 0.1 ml を加へ、氷冷しつつ多角体蛋白を少量の不溶分を認めるに至る迄添加し、最後にアルコールを標線迄満す。10 分間 3000 rpm で遠沈し、上澄液の窒素をマイクロ・ケルダール法で測定する。

ピクリン酸の場合には、その難溶性の為、終濃度の 0.025N アルコール溶液をそのまま使用し、且つ窒素定量に当つては、酸自体の窒素を除去する為、充分流水で透析してピクリン酸の黄色を認めぬ迄に至らしめた。

\* イオン強度を適當にする為である。この処理をしないと、pH 5 としても蛋白の沈澱は生じない。

TCA の場合には種々の酸濃度で溶解度測定を行つた。

添加酸が適当であれば、多角体蛋白は極めて速かに溶解する。蛋白の溶解度測定に際

Table 1. The effect of excessive protein on its solubility.

Addition of protein in	Nitrogen dissolving $\gamma$ /ml
large excess	770
moderate	945

TCA concentration: 0.01 N

し注意すべきは、蛋白を大過剰に加える事なく、僅少の不溶物を認めるに至れば直ちにその添加を止める事である。過剰に加え過ぎると、却つて溶解度を減ずる(表1)。

溶解蛋白と不溶蛋白との間に何らかの相互作用がある様に思われる。

### トリクロール酢酸の定量

Tibbitts 及び Holm の比色法<sup>7)</sup>を多少改変した。

即ち、40~300 $\gamma$  の TCA を含有する試料 0.5 ml を試験管に入れ、50% NaOH 0.065 ml を加え、次いでピリジン 7.5 ml を加える。コルク栓を附し、10 分間振盪後、5 分間沸騰水中で加熱し、直ちに流水で 3 分間冷却する。赤紫色に発色したピリジン液を小遠心管に移し、硫酸紙で蓋して 4 分間 2000 rpm で遠心する。加熱後 10~30 分に光電光度計に緑色フィルターを附して測光する。

## 結 果

### 蛋白質の特異性

微量の TCA の存在でアルコールに溶解する事は多角体蛋白の特性であり、多角体がある中に生産される宿主細胞核にはかかる蛋白が認められないことは既報のとおりである。

ここでは数種の純蛋白質と比較した。使用した卵アルブミンは Merck 製純白粉末、馬血清アルブミンは結晶凍結乾燥標品、カゼインは Hammarsten 法による Merck 製純白粉末である。

表 2 に示す如く、蛋白の TCA によるアルコール可溶化現象は多角体のみ認められる。

Table 2. The comparison in the solubility of polyhedral protein and some other proteins.

Protein	Nitrogen dissolving $\gamma$ /ml
Polyhedral	945
Ovalbumin	40
Serum albumin (Horse)	0
Casein	0

TCA concentration: 0.01 N

### 酸の特異性

酸の存在により多角体蛋白は初めてアルコールに可溶となり、且つこの酸効果は酸の種類で異なる事を前報で述べたが、ここでは之を定量的に更に多くの酸について検討した。

表 3 に各酸濃度 0.025 N の時アルコールに溶解する窒素量を示す。

Table 3. The dissolution of polyhedral protein in alcohol by various acids.

Acid added	Dissociation constant (in water) <sup>2)</sup>	Nitrogen dissolving r/ml
Trichloroacetic	$3 \times 10^{-1}$ (18°)	2000
Perchloric		1000
Sulfosalicylic*		543
Hydrochloric		374
Monochloroacetic	$1.6 \times 10^{-3}$ (25°)	52
Acetic	$1.8 \times 10^{-5}$ (18°)	41
Picric	$1.6 \times 10^{-1}$ (18°)	10
Sulfuric		1
None		37

Acid concentration: 0.025 N

\* This acid is regarded as dibasic acid.

試験した酸の中では TCA が最も強い効果を有する。一般に蛋白沈澱剤として使用される酸に効果の大きいものが多い。然し全ての蛋白沈澱剤に効果があるわけではなく、ピクリン酸、表には示さないがタンニン酸等は全く効果無く、又重金属類も同様に無効果である。本効果の強弱によつて蛋白沈澱剤を幾つかの型に分類し、更にその作用機作を考察する事も可能であろう。

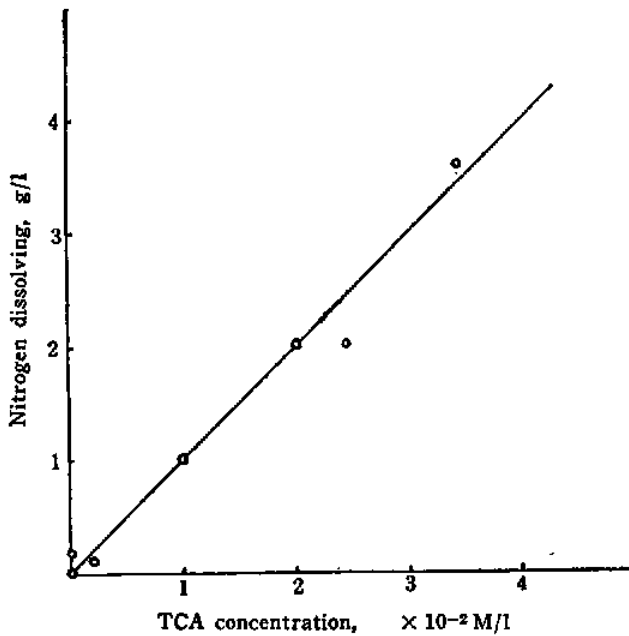


Fig. 1. The relationship between TCA concentration and the solubility of polyhedral protein in alcohol.

酸効果を示すものは或る程度以上の強酸であるが、酸としての強さ（解離恒数）と該効果の間には必ずしも直接的関係は認められず、むしろ陰イオンの影響の方がより強い様である。然し、水素イオンも又不可欠の要素である事が TCA を中和すると全く効果が無くなる事から示される（表 4）。

### 酸濃度の影響

多角体蛋白のアルコールへの溶解度は酸の濃度と共に増加する。第 1 図に示す如く TCA 濃度と溶解度との間には、ほぼ直線的関係が認められる。TCA 0.01 モル当り 1 g の蛋白窒素が溶解する。考察の部に述べる如く、溶解蛋白中に含まれる塩基性アミノ酸の推定量が TCA と等量関係にある事は興味深い。

### 多角体蛋白とトリクロール酢酸との反応

TCA 濃度と溶解蛋白量の間直線的関係が存在する事は、TCA と多角体蛋白の一定の基との間に化学量論的反応が生起する事を示唆している。

TCA が実際に多角体蛋白と附加化合物を作るか否かを検討する目的で次の様な透析実験を行った。

TCA 処理蛋白を蒸留水に対し氷室で透析すると、新たに酸を加えなくてはアルコールに溶解しなくなり、酸効果は透析によつて除去されることを示す。然し、TCA 処理蛋白

Table 5. The removal of TCA by dialysis against alcohol from the freshly prepared alcoholic solution of polyhedral protein and TCA.

Time	TCA/N	
	Exp. 1	Exp. 2
Initial	2.00	1.51
1 day	0.19	—
2 days	—	0.17

The initial solution contained 4000  $\tau$ /ml or 5490  $\tau$ /ml of TCA and 2000  $\tau$ /ml or 3640  $\tau$ /ml of nitrogen in experiment 1 or 2 respectively.

### 溶媒の種類

Holloway 等<sup>5)</sup> は Schmidt-Thannhauser 法による核酸定量に際し、網状赤血球の蛋白がアルコールによつてゲル化する事を認め、且つこの現象はアセトンの代用により避け

Table 4. The effect of hydrogen ion on the solubility of polyhedral protein in alcohol.

	Nitrogen dissolving $\tau$ /ml
TCA	5000*
Neutralized TCA	14.8

TCA concentration: 0.05 N

\* Calculated from Fig 1.

アルコール溶液を水に対し透析すると、やがて白沈を生ずるが、これは TCA・アルコールへの溶解性を著しく減じている。之等の事は、TCA が多角体蛋白と固く結合する事なく、又そのみでは蛋白に強い変化を与えず、アルコールの共存で蛋白が変性する事を示す。

一定の TCA に対する蛋白の飽和アルコール溶液を、調製後直ちに氷室中で 100 倍容のアルコールに対して透析すると、TCA は速やかに除去され（表 5）、同時にゲルが生成沈殿する。

られる事を確めた。然し、多角体蛋白はエタノールの外メタノールやアセトンにも溶解する。水、グリセリン、エーテル、ベンゼン等には溶けない。

## 考 察

以上の如く、多角体蛋白は TCA により最もよくアルコールに溶解する事が示された。

Harfenist と Craig<sup>1)</sup> は向流分配法によるインシュリンの研究に際して溶媒を検討し、TCA を添加するとインシュリンの水相への溶解度を減じ、アルコール相 (2-ブタノール) への溶解度を著しく増す事を認めた。又 Katz<sup>2)</sup> は三弗化酢酸 (乾燥、液体) に多くの蛋白質が殆んど変性する事なく溶解する事を示した。

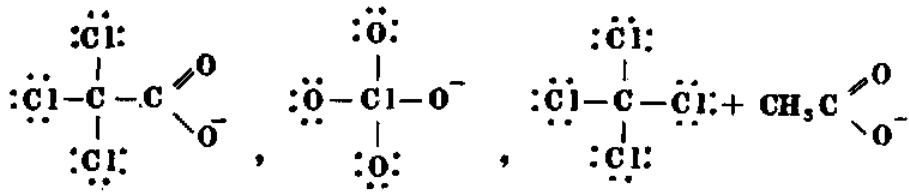
之等の事は、多ハロゲン化脂肪酸が蛋白の有機溶媒への溶解度を増加させる事を示唆する。一般に酸変性によつて蛋白のアルコールへの溶解性が増すと云われるが、多角体蛋白と TCA の場合はその様に簡単には説明されない。例えば酸に特異性がある事や TCA 処理多角体蛋白が水に対する透析で元に戻る事等から単なる一般的な酸変性とは考えられない。TCA の効果はアルコール溶液中で初めて現われるのである。

上記実験結果に示される様に、この溶解現象を考察するには、蛋白質の特性、酸の特性及び溶媒の特性の三者を綜括的に検討しなければならない。

蛋白質の溶解性については、その有するアミノ酸残基の種類、数及び分布、並びにそれらの間に形成される二次構造が重要な因子になると考えられる。Wellington<sup>3)</sup> による多角体蛋白のアミノ酸分析結果を検討すると、システインがその最少成分で、アミノ酸残基 156 ケに対して 1 ケの割合でしか存在せず、該蛋白には恐らく S-S 結合が無いか若しくは極めて稀にしか存在しないと思われる。更に酸性及び塩基性アミノ酸が多く存在する事は、水素結合の外に、それらの間に形成される成塩結合がこの蛋白の二次構造を造り上げていると考えられる。

この様な結合はより強い酸によつて破壊されるであろう。第 4 表に示す如く、水素イオンが蛋白のアルコールへの溶解に必要であり、且つ或る程度以上の強酸がこの溶解現象に必要な事も首肯される。かかる成塩結合の切断が起るとすれば、添加酸と溶解蛋白中の塩基性アミノ酸との間に一定の関係がある筈である。第 1 図に示す様に、TCA と蛋白窒素の間に直線的関係があるが、Bergold<sup>4)</sup> によると本蛋白の窒素含量は 14.8 % なので蛋白 100 g を溶解する為には、図から TCA 約 0.15 モルが必要となる。一方 Wellington のアミノ酸分析結果から該蛋白 100 g には塩基性アミノ酸が 0.147 モル存在することになり、両者の間にはほぼ化学量論的關係が存在する。

この溶解現象に酸の陰イオンが重要な因子である事は第 3 表から明らかである。最も効果の強い TCA と過塩素酸とが電子論的に類似構造を有する事は興味深い。即ち両者とも 3 対の遊離電子を有する極性基を中心の原子の周りに 3 ケ有している。一方、四塩化炭素と酢酸の混合物には全く効果が認められない。この事はアニオン自体がこの特徴ある電子構造を必要とする事を示す。



さて、先に酸と多角体蛋白の反応はプロトンによる塩結合の分解に始まると述べたが、この結果、蛋白表面は強く陽性に荷電する事になり、ア=オンが結合するであろう。この為、酸として TCA や過塩素酸を用うれば、強い極性を有する基が多数蛋白表面に外側に向つて配列する事になる。この為、蛋白は適当な極性を有する有機溶媒に溶解するに至るであろう。

以上の反応はイオン性である為、速かな管で観察と一致する。

この様な蛋白と TCA との結びつきは強固なものではあるまいと思われるが、第5表に示す様に、TCAは透析によつて容易に除去される。

## 綜 括

多角体蛋白は微量の特殊な酸を含有する無水アルコールに溶解する。この現象は蛋白質及び酸の特異性に用せられる。エタノールの外メタノール、アセトンが溶媒として有効である。有効な酸はある程度以上の強酸であるが、一般に酸の強さと該効果の間には一定の関係は認められない。この酸効果はトリクロール醋酸 (TCA) が最も強い。TCA と溶解蛋白量の間には直線関係がある。多角体蛋白のアルコール溶液から、TCA が透析によつて除去された。この様な多角体蛋白の溶解機作について考察を加えた。

結晶血清アルブミンを分与頂いた九大農芸化学教室船津助教授に謹んで謝意を表します。

## 文 献

1. Bergold, G.: Z. Naturforsch. **2b**, 122 (1947).
2. 物化学同好会: 化学恒数表, 密川書店 (1941).
3. Eto, M.: J. Fac. Agr. Kyushu Univ., **10**, 373 (1956).
4. Harfenist, E. J., Craig, L. C.: J. Am. Chem. Soc., **74**, 3083 (1952).
5. Holloway, B. W., Ripley, S. H.: J. Biol. Chem., **196**, 695 (1952).
6. Katz, J. J.: Nature, **174**, 509 (1954).
7. Tibbitts, T. W., Holm, L. G.: J. Agr. Food Chem., **1**, 724 (1953).
8. Wellington, E. F.: Biochem. J., **67**, 334 (1954).

### Summary

In the course of the procedure to determine nucleic acids in the polyhedral bodies, or the inclusion bodies of virus particles, of silkworms, it was observed that the major part of the bodies treated with trichloroacetic acid (TCA) immediately dissolved in alcohol. The material dissolved in alcohol was proved to be protein in the previous paper.<sup>8)</sup>

By the presence of TCA, the polyhedral protein dissolves in acetone and in methyl alcohol as well as in ethyl alcohol, but does not dissolve in water, ether, and benzene.

This phenomenon can be attributed to the specialities of both the protein and the acid. Only the polyhedral protein dissolved in alcohol containing TCA, and no protein having such a property was observed (Table 2).

The dissolution of the protein in alcohol is caused by a minute amount of some special acids (Table 3). TCA has the strongest effect. The acids which have stronger effect are generally stronger acids, and hydrogen ion is an indispensable factor to dissolve the protein in alcohol (Table 4). However, the effectiveness of acids has no direct relationship to their dissociation constants, and the kind of anions seems to be more important.

It is very interesting to note that the two most effective acids, TCA and perchloric acid, are similar to each other in their structures on the electronic aspects. They have likewise three polar radicals around an atom.

A linear relationship is observed between the concentration of TCA and the solubility of the polyhedral protein (Fig. 1). The protein dissolves in alcohol by 1 g. of its nitrogen per 0.01 mole of TCA.

The polyhedral protein treated with TCA became insoluble in alcohol by dialysis against distilled water in the refrigerator. But the dialysed protein dissolved in alcohol by a new addition of TCA. From the freshly prepared alcoholic solution which was saturated with the protein upon the definite amount of TCA, the latter was rapidly removed away and gel-formation was brought about by dialysis against alcohol in the refrigerator (Table 5).

A hypothesis to explain these phenomena was proposed.

Department of Agricultural Chemistry,  
Kyushu University,  
Fukuoka