

Hemocyaninの2, 3の性質について : 1. 超遠心分析

小田, 純子
九州大学農学部

小坂部, 勇
九州大学農学部

林, 勝哉
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21434>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 16 (2), pp.247-252, 1957-11. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :

Hemocyanin の 2, 3 の性質について

1. 超遠心分析

小田 純子・小坂部 勇・林 勝哉

On the properties of hemocyanin solution

1. Ultracentrifugal analysis

Junko Oda, Isamu Kosakabe and
Katuya Hayasi

緒 言

ヘモシアニンは或種の無脊椎動物の体液蛋白の主成分で、銅を約 0.2% 含む細胞外呼吸蛋白である。その酸素運搬能などは生化学的に興味ある問題であるが、一方ヘモシアニンは溶媒の pH, イオン強度等外圍条件の変化によつて、典型的な会合—解離を行うものとして、蛋白物理化学の面からも多く研究されている。¹⁾ 近時蛋白分子の会合—解離とその生化学的活性との間の關聯が酵素のトリプシン、キモトリプシン、²⁾ ホルモン蛋白のインシュリン³⁾ 及びウイルス⁴⁾ について明かにされるようになり、この問題は再び注目されるに至つた。

又他面ではカニ繭詰の青変⁵⁾ が、ヘモシアニンに由来するものとして研究が行なわれているが、未だ完全な青変の防止法やその原因については明確なことが判つていない。著者の一人はこの青変問題について検討をつづけているが、カニ体液のヘモシアニンを純粋に分離することを必要としていた。又小田は先にガザミの体液のヘモシアニンを分離し、その物理化学性を報告した。⁶⁾

本報ではトラバガニの体液からヘモシアニンを分離し、その性質を超遠心法により分析した結果を述べる。

実験及びその結果

1. 試料

根室北方のカニ工船上で生きたトラバガニ *Paralithodes camtschatica* から体液を採り、直ちに硫酸を加えて飽和とし、カニ繭詰罐に入れ密封し直送し、ヘモシアニン分離まで冷蔵庫に貯蔵した。硫酸飽和溶液を濾過し沈澱を集め、3~4日間 10°C 内外で流水透析し、次に2日間蒸留水で透析する。血球等の不溶分を残し、ヘモシアニンは完全に溶解し青色を呈するようになる。不溶物を 3,000 r.p.m. で遠心分離し、0.01 N HCl でヘモシアニンの等電点である pH 5.6 にすれば、完全に沈澱する。この沈澱は小さく、3,000 r.p.m. で落ちないので、注意して濾過し、沈澱は水に懸濁させ、1/10 量の 0.005 N NaOH を加えて溶

Table 1. Sedimentation constants of hemocyanin solution under various conditions.

| No | Buffer | μ | pH | Conc. % | Component S_{20} (c) | | | |
|-------|--------------------------------|-------|-----|------------|------------------------|--------------|------|--------------|
| | | | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 0.5 M NaCl+0.5 M acetate | 1.0 | 6.2 | 1.90 | | 10.0 (64) | | 16.2 (36) |
| 2 | 0.5 M NaCl+0.5 M acetate | 1.0 | 6.2 | 0.48 | | 12.6 (63) | | 17.0 (37) |
| 3 | 0.08 M NaCl +0.08 M acetate | 0.16 | 6.1 | 1.00 | | 14.2 | | |
| 4 | 0.05 M NaCl +0.05 M acetate | 0.10 | 6.1 | 1.00 | | 15.1 | | |
| 5 (a) | 0.08 M NaCl +0.08 M acetate | 0.16 | 6.1 | 0.90 | | 14.0 | | |
| 6 | 0.1 M NaCl+0.1 M acetate | 0.16 | 5.0 | 1.00 | | | 15.0 | |
| 7 (b) | 0.1 M carbonate | 0.11 | 8.8 | — | 6.7 | | | |
| 8 | 0.1 M carbonate | 0.11 | 8.8 | 0.62 | 5.7 (89) | 11.1 (8) | | 15.7 (3) |

(a) ; Same sample with No. 1 which has been consisted of two components.

(b) ; Insoluble in pH 6.0.

(c) ; No corrected for solvent density and brackets show the concentration in percent.

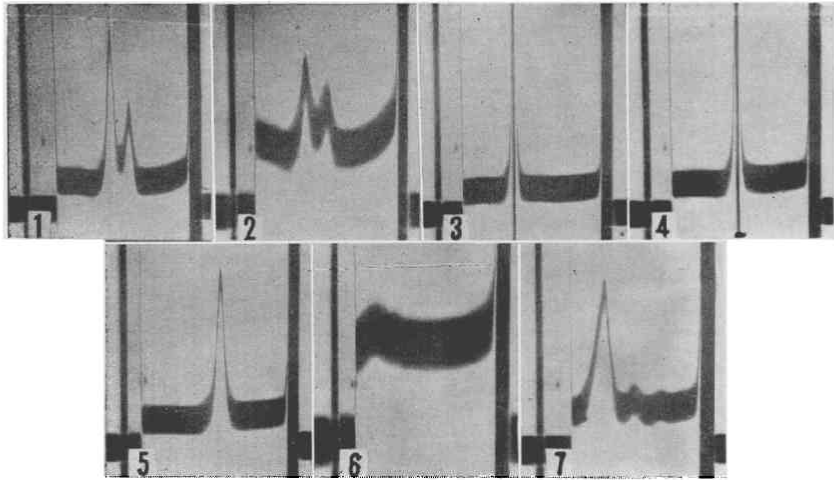


Fig. 1. Ultracentrifugal patterns of hemocyanin solution under various conditions.

| Photo. No. | Condition shown in Table | Time (min) | Photo. No. | Condition shown in Table | Time (min) |
|------------|-----------------------------|---------------|------------|-----------------------------|---------------|
| 1 | No. 1 | 42 | 5 | 6 | 42 |
| 2 | 2 | 36 | 6 | 7 | 26 |
| 3 | 4 | 26 | 7 | 8 | 42 |
| 4 | 5 | 35 | | | |

解せしめる。この操作を4回繰返し、最後に等電沈澱した沈澱は蒸留水で透析する。この水溶液中には銅を失った変性蛋白を含むと考えられるので、0.1 N acetate+0.1M NaCl, pH 6.0 に対して透析すれば、相当量の白色沈澱を得る。4日間透析後 3,000 r.p.m. で沈澱をとり、上澄部をヘモシアオン溶液として、分析に供した。沈澱部分は数回同一緩衝液で洗滌して試料とした。溶液部の蛋白の銅含量は 0.19 g/100 g 蛋白であり、既報のガザミの結果と一致した。沈澱部は 0.11 g/100 g 蛋白であり、約半量の銅が失なはれ、強く変性していると推定出来る。

2. 超遠心

分析は Spinco Model E を用い、56,100 r.p.m. で行つた。前記試料中の水溶液部は表に記した溶媒に透析して測定した。pH 6.1 近傍では何れの場合も沈澱を生じなかつたが、pH 5.0 の場合のみ相当量の沈澱を認めた。この pH はヘモシアオンの等電点に近く、等電沈澱による沈澱の生成であつて、pH 6.0 に於ける変性蛋白の沈澱とは異なる。pH 6.0 で得られた沈澱部分はアルカリ側の溶媒に完全に溶解するので、この種の溶媒に透析し分析した。得られた溶液はすべて青色を呈し、オキシヘモシアオンの型で存在するが、pH 6.0 沈澱部のアルカリ溶液は青褐色を呈している。これらの試料の分析結果の一例を写真及び表で示した。表中の沈降恒数は溶媒の密度及び粘性の補正は行つていない。濃度は屈折率法²⁾による概略の値である。又表中括弧で現した濃度(%)は沈降図より求めた見掛けの値である。イオン強度が高い場合は2個の界面が見られ、これは濃度を小にしても変化がなく、夫々の含有割合も全く変化しない。イオン強度が 0.1 から 0.2 の範囲では、単一で鋭い濃度勾配を持つ界面が現れる。0.5 N acetate+ 0.5 M NaCl pH 6.2 で2個の界面が出現した試料をそのまま、0.08 M acetate+ 0.08 M NaCl pH 6.2 に透析すれば、沈澱を全

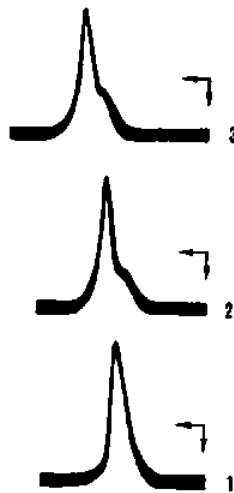


Fig. 2. Electrophoretic pattern (Ascending).

1. 0.1M NaCl+0.1M acetate pH 6.2, C=1.38%, 12 mA, 64 volt, 10°C, 95 min.
2. " " " " " , C=0.37%, 12 mA, 60 volt, 10°C, 110 min.
3. No. 3 in Table, 12 mA, 75 volt, 13°C, 100 min.

く生ずることなく、何れの沈降恒数とも異なる値をもつ単一の界面に完全に還元する。高イオン強度で見られる2個の成分は明かに同一会合—解離系に属する成分で、夫々は単に会合度（重合度）をのみ異にしている成分である。No.6の S_{20} （沈降恒数）は約15であるが、comp.-2に入れなかつたのは、次報で述べるように、この系は濃度をうすめると、解離が進行するところの、複雑な系であるからである。

3. 電気泳動

チゼリウス型電気泳動装置を使用した。測定の一例を図で示した。上昇、下降に於ける像は全く対称である。イオン強度 0.1~0.2 では、超遠心的には単一界面を出現するが、電気泳動像は図の如く、skew しており、濃度を低くするか又はイオン強度を小にすれば、この傾向は強くなり、主界面の麓部に分離しない副界面が顕著に出現する。

考 察

ヘモシアエンはグロブリン系の蛋白質とされているが、相当量の塩が存在しても、等電点での溶解度は極めて小であり、このため等電点もしくはその極近傍での物理化学的測定は困難である。多くのヘモシアエンは等電点では単一成分であり、pHが等電点より離れることによつて解離が起る。この解離はイオン強度及び蛋白濃度によつても強く影響をうける。一般的に見て等電点 pH 5.5 から pH 7.0 までは解離は観察されないで、普通の場合 pH 6.0 近傍で見られる成分は等電点に於けると等しい状態にあるものと見做されている。又解離は臨界的に起るものではなく、広い領域で徐々に進行するもので、解離が起つている場合には多くのものが、数個の成分が共存しているのが常である。本実験に使用した試料のヘモシアエンは、pH 6.0 近傍では、イオン強度によつて解離が強く支配される。即ち塩類濃度の増加により解離平衡がずれて、会合が起るようになる。表に示した S_{20} の値が 16~17 の成分が会合度の高い分子である。この成分が完全会合成分（whole protein）と考えられる。

本試料ではイオン強度が高くなれば会合するが、逆に解離する成分も知られている。¹⁾ イオン強度 0.1~0.2, pH 6.0 近傍で得られる成分は明かに解離成分であり、又 pH 5.0 での成分も解離成分である。ヘモシアエンの解離は 1/2, 1/4, 1/8 に分子が小さくなるように、等分に分子が分裂する。解離成分は少くとも 1/2 以下に分子量が小さくなつているのであるが、興味あることには沈降恒数の間に殆ど差異がない。他の例の如く分子量と沈降恒数が比例するものに較べて特徴的である。このことから会合は軸比が増大するように進行するものであると推論される。アルカリ側では、解離は更に進み、主成分の S_{20} の値は約 6 となる。然しこの場合には解離が完全でなく約 10% 程度の高会合度成分が 2 個存在する。pH 6.2 での沈降成分のアルカリ溶液の褐色は、銅と蛋白間の結合様式が変化し、蛋白質は変性をうけ、銅は 1 個から 2 個に酸化されて呈色したものであろう。何れにしてもこの成分の超遠心像は写真に見るごとく、強く拡散してなだらかな山となり、界面の頂点が明確でない。 S_{20} の値は大略 6.5 である。この成分は銅含量が少いことと考え併せると、ヘモグロビンがヘムを失うとグロビンとなり極めて不安定になり、急速に変性すると類似に、銅を失つた分子が不安定になり、変性をうけ易くなつたものと考えられる。即ち等電沈降で

精製する場合はなるべく、低濃度の酸、アルカリを用いるべきである。0.1 N HCl を用いて pH 5.6 とし、沈澱せしめた成分は完全に不溶化する。pH 6.0 での沈澱部分はこれ以上分析を行なわなかつた。以上から要約すれば、トラバガニのヘモシアニンは他種のヘモシアニンに比し、1/2, 1/4 解離成分が均一成分として得られ、pH 6.0 付近ではイオン強度を増加することにより会合し、又沈降恒数と分子量の間に一次の比例関係がなく、従つて会合は長軸方向に分子間結合が生ずることによつて起つている。

このような会合—解離系では、超遠心的には明かに数個の成分が観察されても、電気泳動によつては単一成分として観察されることは前に報告した。¹⁰⁾ 本実験では超遠心的単一成分が逆に電場の中で解離—会合が明確に見られた。しかし完全に 2 個の成分に分離することはなく、同一界面に於ける濃度分布異常であり、これがイオン強度及び濃度に依存することは明かであるが、その詳細は更に検討する要がある。ただヘモシアニ分子の会合に於いては、静電結合が主な役割を果していることから考えると、斯様な異常が電場中で現れる可能性は充分推察されるものである。

文 献

- 1) K. G. Pedersen; Cold. Spr. Har. Symp. Quant. Biol., 14, 140 (1950).
S. Brohult; J. Phy. Chem., 51, 206 (1947).
- 2) V. Massay, W. F. Harrington, B. S. Hartley; Discuss. Faraday Soc., 20, 24 (1955).
- 3) J. L. Oncley et al.; J. Phy. Chem., 56, 85 (1952).
P. Doty, G. E. Meyers; Discuss. Faraday Soc., 13, 51 (1953).
- 4) H. Fraenkel-Conrat, R. C. Williams; Proc. Natl. Acad. Sci., 41, 690 (1955).
- 5) 金子伊喜雄: 缶詰時報, 31, no. 7 (1952); 32, no. 8 (1953).
谷川英一: ibid, 32, no. 9~no. 12 (1953).
- 6) 小田純子: 農化誌, 30, 347 (1956).
- 7) B. A. Brice, M. Halwer; J. Opt. Soc. Am., 41, 1033 (1951).

Summary

In the present investigation, preparation, purely isolation and physicochemical properties of hemocyanin from fluid of *Paralithodes camtschatica* by ultracentrifugation and electrophoresis are reported and discussed.

The hemocyanin was precipitated by adding ammonium sulfate to 100% of saturation. The ppt of protein was dialysed against water to remove all $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and insoluble materials were removed. The resulting hemocyanin solution was purified by precipitation at isoelectric point several times. The final purified precipitation was dialysed against acetate buffer at pH 6.0, precipitates were removed and subjected to measurements.

From ultracentrifugal measurements, in 0.5 M acetate+0.5 M NaCl at pH 6.1 presence of two components was recognized. In 0.1 M acetate+0.1 M NaCl at pH 6.2, however, the components have reduced to single peak. Also it was observed that over the ionic strength range 0.1~0.2 and the pH range 5.0~6.2, the hemocyanin molecule has consisted of single component and the obvious differences in sedimentation const. under the each condition were not apparent. In 0.1 M carbonate buffer pH 8.8, a main peak (about 90%) having sed. const. $S_{20} = 6$ to 7, which have about one half value in above acetate buffer, was observed.

From the above it was concluded that the component having greater sedimentation constant corresponds to whole protein molecule.