

濾紙電気泳動法による蛋白の研究 (1)

写真フィルムを用いて蛋白分解酵素の濾紙泳動図形を作成する方法に就いて

Studies on Protein Paper Electrophoresis.

(Part 1) Photo Film Method for Detection of Protease Spots on Paper Electrophoretic Patterns.

大 和 田 寛

(高知大学農学部 生物及食品化学研究室)

濾紙電気泳動法は最近酵素蛋白の研究に対して非常に有用な手段となって来た。その一因は、酵素の作用力を利用し、ある反応液を噴霧する事によって、容易にその spot を、濾紙に確認出来ること、また濾紙を細断して各部の酵素力を測定する事により、比較的容易に濾紙上の分布を知る事が出来る事にある。現在までに、すでにいろいろな酵素類が、之の様な手段で研究されて居る。例へば Jermyn⁽¹⁾ は Horse Radish の汁液の泳動濾紙に、Benzidin 或は Guaiacol と過酸化水素水の混液を噴霧して Peroxidase の spot を呈色せしめ、その multiplicity を証明して居る。また、Heinrich⁽²⁾ は、Pepsin の泳動濾紙を、1 cm 幅に細断し、各切片を Edestin⁽³⁾ に作用せしめて、Pepsin activity を測定し、その分布を見て居る。同様の手段を、Nikkila 等は、Amylase 或は、Trypsin に適用して居る。

筆者は、蛋白分解酵素の濾紙電気泳動的研究を行うに当り、更に簡便な方法を試みた。即ち蛋白分解酵素の泳動濾紙を、写真用フィルムの膜面に密着。作用せしめ、濾紙上の酵素 spot の作用による gelatin 膜の溶脱によって、spot を確認及び定量する事の可能性について、本実験を試みた。

〔実験並に考察〕

使用したフィルムは、“さくら”のスライド用ポジフィルムである。之を一定の光源で一定時間露出し、FD-105 現像液を用いて 20 分現像した。

試用した蛋白分解酵素は、Trysin, Pepsin 及び Papain の三種で、何れも市販のものを夫々下記の如く調製した。

i) Trypsin 溶液 — Trypsin 1 gr. を硼酸緩衝液 (pH=8.6) 10 ml に溶解し、同一緩衝液を用いて順次倍々に稀釈した。

ii) Pepsin 溶液 — 醋酸緩衝液 (pH=4.8) を用い、i) と同様に調製した。

iii) Papain 溶液 A — Papain 0.5 gr. を、枸橼酸緩衝液 (pH=5.9) 10 ml に溶解し、同様に倍々に稀釈して用いた。

iv) Papain 溶液 B — Papain 1 gr. を 0.1 M KCN を含む枸橼酸緩衝液 (pH=5.9) 10 ml に溶解、濾過後、40°C に 2 時間放置して活性化した後同様に稀釈した。

之等の各酵素溶液 0.01 ml^(註1) をマイクロベツトを用いて、幅 3.5cm、長さ 17~11cm の濾紙片に、四乃至三箇所、略等間隔に spot した。

註1. 但し Papain 溶液 A を用いた場合のみ 0.005 ml.

予め緩衝液^(註2)に充分浸漬し、スポンジを用いて、軽く拭き取ったフィルムの膜面に、上記の各濾紙片を重ね、更に別の濾紙を、同じく緩衝液に浸し、新聞紙の間で余分の液を吸いとらせたものを重ね、之を二枚のガラス板の間に狭み、ビニールテープで四方を閉じて、30°Cの恒温器中に、所要時間放置後、水中で、フィルムと濾紙をはなし、充分水洗、乾燥した。かくして得た。フィルムを、更に印画紙に、反転焼付けて得た図形を、Fig. 1~Fig. 4に示す。

上の結果から、或る濃度以上の spot では、それ等と同じフィルムに作用されれば、その活力の、凡その量的関係を認め得る事が判った。然しフィルムを異にする場合、同一条件で作用さす事は、本実験の方法では、仲々困難であり、比較するに至らなかった。反応方法に尚一考を要する所である。

尚各酵素を通じて、相当少濃度で、spotの検出が可能であるが、余りに activity が弱い場合、長時作用させると、Fig. 4(c)に見る如く、膜面が不規則に侵される。更に長時間(50時間以上)作用せしめた場合、例外なく膜面が悉く離脱した。従って少くとも50時間以内に肉眼で認め得る程度にフィルム膜面を侵蝕する丈の活度が必要である。之の限界値を知る為に、本実験に用いた酵素の活度を、通常の如く、gelatinを基質とする Formol 滴定法で測定した結果、Trypsin 溶液については、5%溶液 1 ml に対し、10.7 [PU] gel. Form E. μ eq. COOH、また不活性 Papain 溶液 B についてはその5%溶液 1 ml に対し、12.5 [PU] gel. Form E. μ eq. COOH なる値を得た。従って Papain B 5% 溶液 0.005 ml は 0.062 [PU] gel. Form E. μ eq. COOH、また Trypsin 5% 溶液 0.01 ml は 0.11 [PU] gel. Form E. μ eq. COOH となる。之の結果、本実験で確認し得た最少酵素活度は、Trypsin では 0.003 [PU] gel. Form E. μ eq. COOH、また Papain では 0.003 [PU] gel. Form E. μ eq. COOH となる。従って大体、0.005 [PU] gel. Form E. μ eq. COOH 程度以上の活度を持つ spot に対しては、本法の利用が可能といへよう。

次に、本法の定量的目的のため、Fig. 1~4の図形に対し、数字的表現を与へる手段として、フィルム膜面脱剝部の光線透過量の測定を試みた。即ち、光源として、8,000 Lux の太陽光線を用いフィルムを光度計の入射面に密着せしめて之を通る光量を測定した。その結果を第一表に示す。

Table 1. Fig. 1~4 に示したフィルム膜面の脱剝図形を透過する光線量

	酵 素 種 類	酵 素 液 濃 度 %	作 用 時 間 hr.	透 過 光 線 量 lux
Fig. 1-a	Trypsin	10	2	1600
	"	5	"	950
	"	2.5	"	300
	"	1.2	"	320
Fig. 2-a	Pepsin	10	21.5	650
	"	5	"	310
	"	2.5	"	300
	"	1.2	"	260
Fig. 2-b	Pepsin	1.2	26	170
	"	0.6	"	150
	"	0.3	"	50
	"	0.15	"	30
Fig. 3-a	Papain B	10	1.5	600
	"	5	"	110
	"	2.5	"	75
	"	1.2	"	28

註2. 各酵素を溶かすに用いた緩衝液。但し Papain 溶液 B の場合は、膜面の銀粒子の溶出を恐れて、KCN を含まぬものを用いた。

	酵素種類	酵素液濃度 %	作用時間 hr.	透過光線量 lux
Fig. 3-c	Papain B	5	18	2000
	"	2.5	"	1800
	"	1.2	"	1300
	"			
Fig. 4-a	Papain A	5	18	1400
	"	2.5	"	900
	"	1.2	"	300
	"	0.6	"	100

この結果が示すように酵素量と透過光線量或は反応時間と透過光線量との間には比例的関係は殆んど見出せない。甚しい場合は、逆の関係さへも起る。之の因としては膜面から濾紙を剥がす際の擦れ等、偶発的な物理的原因があげられる。透過光線量の少い例では比較的比例関係に近い事は之の事を物語って居る。即ちかかる場合は反応の進行度の少さい場合で、従って膜面の安定度も高いわけである。結局、教式的表現のためには極力、反応度を抑へることが望ましい。但し之の場合は肉眼的判定の困難は、さげられない。

最後に、此の方法を実際の濾紙電気泳動図形に適用して見た。

泳動に用いた試量は、本学部で栽培中の4倍体パパイヤからとった汁液を alcohol で沈澱しめ、ether で洗滌、乾燥した粗パパインである。

泳動方法としては、枠を用いて濾紙を緊張せしめる水平法^{(4),(5)}と、Kunkelの装置⁽⁶⁾にならって、ガラス板の間に濾紙を挟み、上から一定の圧力をかける方法の二法を併用した。後の場合ポリエチレン紙をガラス板と濾紙の間に挿入した。濾紙は東洋濾紙 No. 51 A の長さ 40 cm、幅 13 cm のものを用い、略等間隔に、四箇所酵素液を spot して、一定時間泳動させた後、直ちに 40°C 以下で真空乾燥し、各 spot を中心にして、泳動方向に平行に、四片に切断、その中の一片は、100°C で処理後 Bromphenol-氷醋酸緩衝液で染色し、残りの三片はフィルム法による spot の検出に用いた。フィルム法の実施要領は、前述の通りである。両法による泳動図形を Fig. 5 に示す。

尚、Fig. 5 に示した a, b, c 各泳動実験の条件は下記の通りである。

	a	b	c
蛋白濃度及び量	3%; 0.0 ml	4.1%; 0.01 ml	4.1%; 0.01 ml
泳動法	水平法	ガラス板法	ガラス板法
緩衝液	拘縁酸 pH 5.9	同 左	同 左
電位勾配	4 Volt/cm	2 Volt/cm	3~4 Volt/cm
泳動時間	18 時間	19 時間	9 時間

Fig. 5 に見る如く何れの場合も Papain の泳動図形はフィルム膜面に明瞭に現われた。

更に、Fig. 5-a のフィルム泳動図型はパパインの二つの活性 component の存在を示して居る。之は同じ泳動濾紙でも、染色法では認め難いものであり、本法の応用面に多大の興味を与へるものである。

要 約

1) 蛋白分解酵素を濾紙に spot し、之をフィルム膜面に作用せしめることにより、spot の位置は勿論、大約の活力関係をも判定し得ることを知った。

2) 此の方法によつて検出し得る最少の spot は酵素活性が大約 0.005 [PU] gel. Form E. μ eq. COOH と考へてよい。

3) 此の方法を、粗 Papain について行った、濾紙電気泳動に應用し、其の応用性を認め得た。

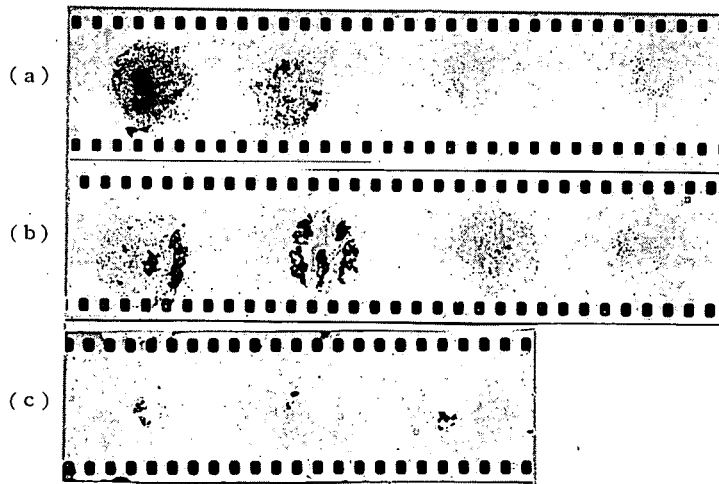
4) 将来、定量的表現の可能性をも期待し得る。

文 献

- (1) Jermyn, M. A., and Thomas R.; *Biochem. J.*, **56**, 631 (1954)
- (2) Heinlich W. D. *Biochem. Z.* **323**, 469 (1953)
- (3) Nikkilä E. A., Ekholm K. and Silvola H.; *H. Acta. Chem. Scand.*, **6**, 617 (1953)
- (4) 小林茂三郎; *生物物理化学* **2**, 3 (1954)
- (5) 森 五彦, 小林茂三郎; *濾紙電気泳動の実際* p. 110
- (6) Block R. J., Durrum E. L. and Zweig G., "A Manual of paper chromatography and paper Electrophoresis" 2nd Ed. (1958) p. 513

(昭和33年9月29日受理)

Fig. 1 濾紙上に spot した Trypsin 溶液による、フィルム膜面の脱剝図形

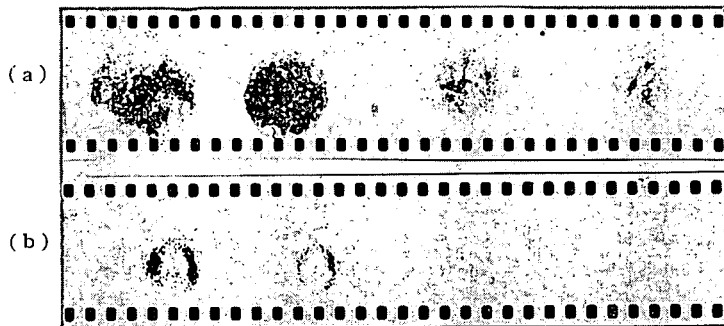


(a) は左より 10%、5%、2.5%、1.2% 溶液各 0.01 ml を spot したもの。作用時間 2 時間

(b) は同様 10%、5%、2.5%、1.2% 各 0.01 ml。作用時間 9.5 時間

(c) は同様 0.6%、0.3%、0.15% 各 0.01 ml。作用時間 26.5 時間

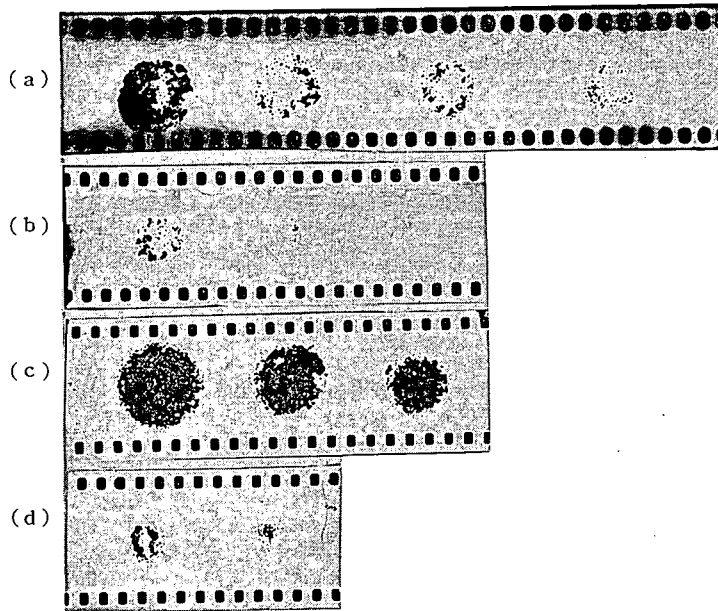
Fig. 2 濾紙上に spot した Pepsin 溶液による、フィルム膜面の脱剝図形



(a) は左より 10%、5%、2.5%、1.2%、溶液各 0.01 ml を spot したもの。作用時間 21.5 時間

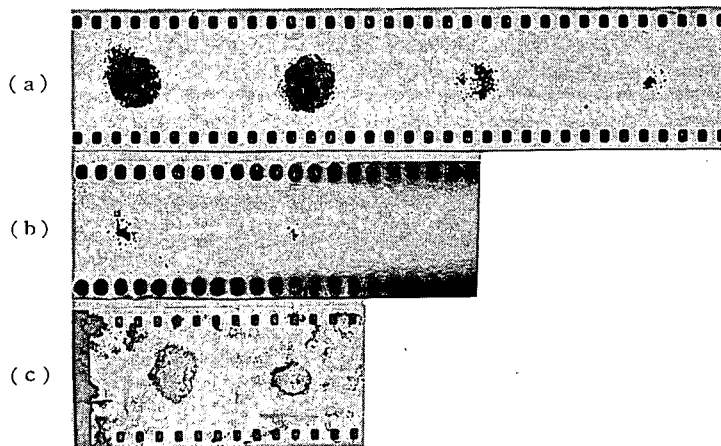
(b) は同様 1.2%、0.6%、0.3%、各 0.01 ml。作用時間 26 時間

Fig. 3 濾紙上に spot した活性化 Papain 溶液Bによる、フィルム膜面の脱剝図形



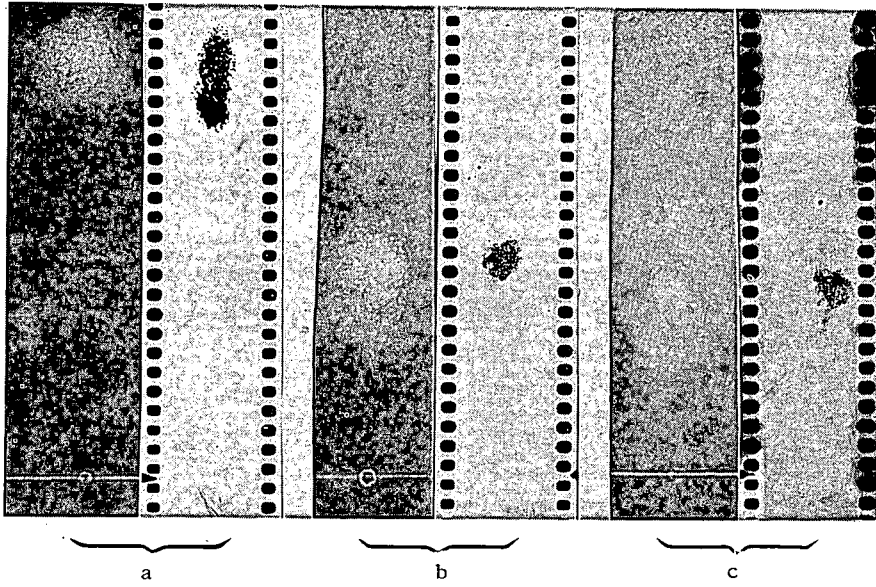
- (a) は左より 10%, 5%, 2.5%, 1.2% 溶液 0.01 ml を spot したもの. 作用時間 1.5時間
(b) は同様 0.6%, 0.3%, 0.15% 各 0.01 ml. 作用時間 3.5時間
(c) は同様 5%, 2.5%, 1.2% 各 0.01 ml. 作用時間 18時間
(d) は同様 0.3%, 0.15% 各 0.01 ml. 作用時間 18時間

Fig. 4 濾紙上に spot された非活性 Papain 溶液Aによるフィルム膜面の脱剝図形



- (a) は左より 5%, 2.5%, 1.2%, 0.61% 溶液各 0.005 ml を spot したもの. 作用時間 18時間
(b) は同様 0.6%, 0.3%, 0.15% 各 0.005 ml. 作用時間 23時間
(c) は同様 0.3%, 0.15% 各 0.005 ml. 作用時間 50時間

Fig. 5 染色法及びフィルム法による粗パピンの濾紙電気泳動図形



a, b, c 各組の左側は染色法, 右側はフィルム法. 染色法図形に見える○印は spot の原点. フィルム法図形の横の切り込みは泳動濾紙をフィルムに作用させた際, spot の泳動出発線に相当した箇所を示す.

