

岡山医学会雑誌

第71巻 2号 (第760号)

昭和34年2月28日発行

612.123/4

血清脂蛋白の研究

岡山大学医学部病理学教室 (指導: 妹尾左知丸教授)

専攻生 戸倉又晴

〔昭和33年10月17日受稿〕

脂質は糖質と共に重要な生体のエネルギー源である。一方に又脂質は蛋白質と結合して脂蛋白の形で、細胞の化学的乃至形態学的構成要素として重要な役割を果している事は衆知の如くである。例えば Green¹⁾ その他によつてその構造が明かにされて来た呼吸酵素系と脂質との関係、或は Danielli²⁾ の実験から誘導された細胞膜構造、更にミトコンドリアの膜構造に関する仮説、或は又 Swanson³⁾ その他によるミトコンドリア、ミクロゾーム等の分析値等から見れば、脂質は如何に細胞の構造と密接に関係し、又生体内の化学反応に関係しているかが窺えよう。しかし脂質のもつこれ等重要な作用は生化学の分野でも未だ充分な解明が与えられていない現状であり、又生体内に於ける脂質と蛋白の結合状態が如何なるものかについても、必ずしも充分明かにされているとは云えない。組織化学乃至細胞化学的には、これ等は一般に仮面脂質と云う分野に入れられている⁴⁾。そしてこのような固い結合は、固定その他によつて変化した形のものである可能性は極めて強く (神田⁵⁾)、組織化学的検索に当つてもこの点は充分に注意されねばならない。一方又諸種の脂溶性ホル

モン、或はビタミンが極めて類似の構造を示しながら、その僅か一部の活性原子団の相違により全く異つた作用を示す事等を考える時、酵素をも含めて蛋白と脂質はその結合形態に於て又は特異な構成要素として生命現象の重要な担手である事は想像にかたくない所である。著者は血清中の脂蛋白の組織化学的反応様式が細胞の脂蛋白と非常に類似する事から、血清を用いて主として組織化学的方法に倣い、脂質と蛋白質の結合様式、又は脂質の種類を究明する事を企図し、電気泳動法による定量法を確立し、之によつて脂質代謝に重大な変化が起ると考えられる癩患者血清を分析し、新しい知見を得たのでここに報告する。報告の順序は次の如くである。

第1編 濾紙電気泳動法の吟味及び改良

第2編 血清脂蛋白の電気泳動、特に仮面脂質について

第3編 濾紙電気泳動法による脂蛋白分割中の各種脂質の定量的研究

第4編 癩患者血清中の蛋白、脂質及び脂蛋白の研究

第 1 編

濾紙電気泳動法の吟味及び改良

Tawett⁶⁾ によつて始められ Consden⁷⁾ や Kunkel⁸⁾ 等により再発見された濾紙クロマトグラフ法及び濾紙電気泳動法は、生化学のあらゆる分野に於て大

い貢献をなし生化学の領域に長足の進歩をもたらした。微量物質を用いての本法による定性乃至定量分析的価値については今更云うまでもない事であり、

著者はこの点を利用して血清脂蛋白の分析を企図した。然し実際に行つて見ると従来の方法に種々の疑問と不完全さを発見し、又脂質の定量的分析のためには新しい方法を考案せねばならなかつた。濾紙電気泳動に関する研究は近年非常に数を増加して来たが、これ等は必ずしも泳動法自体に対し十分に検討され、適確な方法によつて実験されているとは云えない。特に脂蛋白の研究には泳動装置そのものを十分に吟味する必要がある。以下著者が改良した電気泳動法について述べる。

実験と観察並に考案

著者は定電圧装置を作り、色々の濾紙電気泳動装置を自作し色素・蛋白等を泳動させ、その装置の特性を研究し本実験のための基礎実験とした。

濾紙電気泳動法を用いて分析を行う場合、泳動物質の分子の大きさとその荷電、電流・電圧・液相のpHとイオン濃度、温度・湿度・泳動濾紙の傾斜角・電極の分極性等が泳動の状態に著しい影響を与える⁹⁾事は明かであり、正確な値を得るためにはこれらの条件を最小限の一定範囲内に止めて実験を行う必要がある。著者はすべての実験を水平法で行つたので、この場合についての吟味を次に述べる。

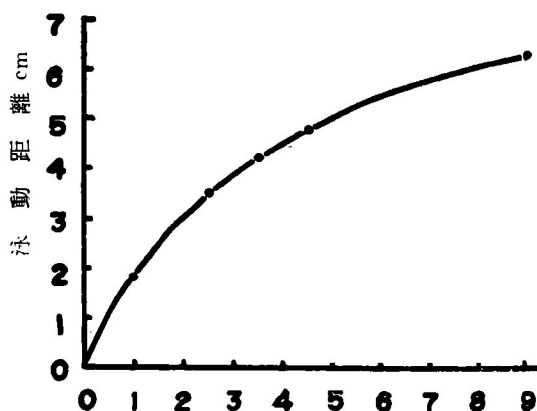
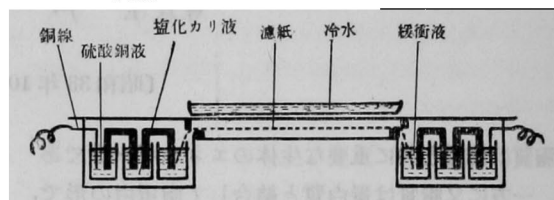
a) 泳動装置の吟味 濾紙を水平に張つて之を空气中に於て物質を展開させる場合には、空間の大きさが泳動に著しい関係をもち、空間が広いと濾紙の内部抵抗による発熱によつて水分が蒸発し、両極の槽から毛管現象によつて水分が中心に向つて流れ、この流れが泳動を支配する。実験の結果濾紙を取りまく気相を濾紙の上下5mm程度にする場合は、泳動中の濾紙の周囲に充分な湿度が保たれ通電の際に生ずる熱のために水分を蒸発する事が少く、蒸発によつて起る濾紙上への溶媒の流れを最小限に止める事が出来る。又通電の際に起る分極は通電中に濾紙上のイオン濃度の変化を来とし、泳動速度に時間的変異を与える要因となる。これは電極として硫酸銅・塩化カリの不分極電導子を使用する事によつて解決される。このようにして分極を防ぐとペロナル緩衝液は40~50回の使用に堪える(普通の方法で分極を防がねば5~6回で使用不能になる)。又緩衝液には屢々細菌が繁殖するが之は微量のマーゾニン添加によつて防がれる。

b) 泳動条件の吟味: 泳動に当つて濾紙に予め定められた原点に鉛筆で線を引き濾紙全体を緩衝液で湿して両極間に張り、原点の部分の吸収紙で押え

て水分を取り、ここに厳密に一定量の液(試料を小ピペットで取り之を一定の速さで1回に原線上の端から端まで動かして完全になくなる量)を取つて塗り泳動を開始する。原点は常に一方の極から一定の距離に置く。電圧は130 V, 0.55 mA, 7~9時間泳動を行つた。なお濾紙は出来るだけ一直線に張り水平で、傾いてはいけぬ。傾いていると傾斜した側の方がよく伸び泳動像が乱れる。

このようにして細心の注意を払つて組立てた装置を用いて充分注意して血清蛋白を泳動し、泳動時間と泳動距離の相関関係を調べて見ると図1の如くに

図1 濾紙電気泳動装置及び泳動時間と距離の関係



泳動時間 (時間)

130 V, 0.55mA, pH 8.4 (磷酸緩衝液), 27°C.

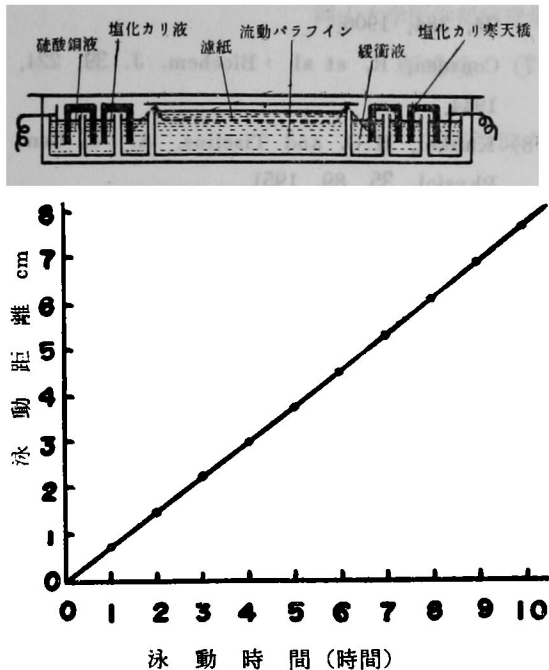
家兎血清蛋白質

なる。即ち時間と共に泳動度が低下し、泳動距離と泳動時間の関係は拋物線を以つて示される。この現象は Toluidin blue を濾紙上の陽極側・陰極側・中心等の種々の点に原線を置いて泳動する場合に明かに認められた。即ち原線を泳動方向の極に近い所に置いたもの程泳動距離が短くなる。この事は上記の如く濾紙上の溶媒の水分が蒸発し、それに従つて溶媒が両極から流れて来る事によるものと思われる。

濾紙から水分の蒸発を防ぐにはガラス板の間に濾紙を挟む方法や、トルオール等の疎水性溶媒中で泳動せしめる方法等があるが、実験の結果は流動パラ

フィン中で泳動させる方法をとる場合に於て最も理想的な状態が観察された。即ち空気層を流動パラフィンで置きかえて水の蒸発を完全に防止すると図2の如く泳動距離と時間の間に直線的関係が成立す

図2 流動パラフィンを使用した泳動装置及びその泳動時間と距離の関係



130 V, 0.55mA, pH 8.4 (磷酸緩衝液), 27°C
家兔血清蛋白質

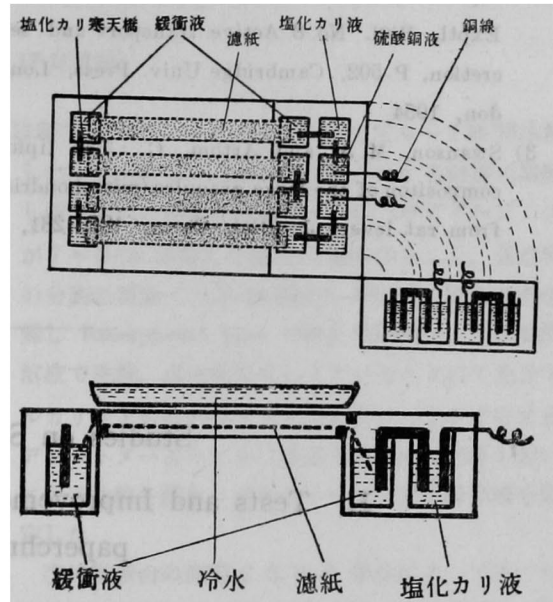
る。なお緩衝液槽の高さと流動パラフィン中の濾紙の高さを同一にすれば、サイホン式機構による液流をも防ぐ事が出来る。このようにして泳動中に起る液流を完全に防ぐ場合には泳動速度は一定しガラス板法によるよりも鮮明な蛋白分離像が得られる。

c) 同時に数枚の濾紙を使用する場合の吟味：次に同一材料について色々な処理を施しその影響を同一条件下で比較観察するためには、同時に数枚の濾紙を用いて展開を行う事が理想的である。現在時間の節約を主目的として多数の材料を一時に展開する装置が作られているが、その多くは同一緩衝液から3～4枚の濾紙を平行に連結するか、広い濾紙を使用してそれに多くの試料を展開している。このような方法では全く同一材料を展開する場合にもその泳動像は必ずしも常に同一のものが得られるとは限らず、個々の濾紙にかなりの差異を生ずるのが普通である。その原因は個々の濾紙或は濾紙の各部に於ける僅かの湿り具合の差によつて、部分的にイオン濃度に差を生じ電流をよく通す部分と通さない部分

が出来るためである。このような状態を避けるためには、濾紙を直列に連結し各濾紙を通る電流の量を一定にすればよい。

以上のような条件を経て満足するような装置を作れば、定電圧装置の下に於ては、少くとも同時に数枚の濾紙を理想的な同一条件下に試料を展開する事が出来る。以上の理論と実験結果に基いて著者は図

図3 直列式濾紙電気泳動装置



3に示すような装置を考案し、之を血清蛋白の展開に用い理想的な結果を得る事が出来た。

上記は一般血清蛋白の展開のために著者が考案した最良の方法である。しかし脂蛋白の展開には、流動パラフィンその他の有機溶媒を使用する事は出来ない。有機溶媒の使用は脂蛋白の脂質を溶出させる結果になると共にズダン色素で染色した像が非常に乱れるので、以下の実験には止むを得ず濾紙の上下に5mmの幅の湿室を作つて空气中で展開した。

結 論

濾紙電気泳動法に於ける泳動像を左右する要因を追求し、理想的な結果を得るために泳動装置の改良を試み、図3に示すような装置を用いる事により常に正確に且つ一様な泳動像を得る事が出来た。

稿を終るに臨み本研究に当り終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました妹尾教授に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) Green, D. E. : Organization in relation to enzymic function, Symposia Soc. Exptl. Biol. (No. 10) Mitochondria and other cytoplasmic inclusions, P. 50, Cambridge Univ. Press, London, 1957.
- 2) Danielli, J. F. : Morphological and molecular aspects of active transport, Symposia Soc. Exptl. Biol. No. 8 Active transport and secretion, P. 502, Cambridge Univ. Press, London, 1954.
- 3) Swanson, M. A. and Artom, C. : The lipid composition of the large granules (mitochondria) from rat liver, J. Biol. Chem. 187, 281, 1950.
- 4) リゾン著 (今泉訳) 組織化学及び細胞化学, 白水社, 東京, 1954.
- 5) 神田三郎 : 岡山医学会雑誌 68 2019, 1956.
- 6) Tswett, M. : Verhandl. Dtsch. Bot. Gesel. 24, 384, 1906.
- 7) Consden, R. et al. : Biochem. J. 39, 224, 1944.
- 8) Kunkel, H. G. and Tiselius, A. : J. Gen. Physiol. 35, 89, 1951.
- 9) 小林茂三郎, 森五彦 : 濾紙電気泳動法の実際, 南江堂, 東京, 1955.

Studies on Serum Lipoprotein

1. Tests and Improvements of the method of Electropaperchromatography

By

Mataharu TOKURA

Department of Pathology, Okayama University Medical School
(Director : Prof. S. Seno)

The pictures of the serum protein extended by electropaperchromatography show varieties being greatly influenced by the distance of start line from the pole and the space surrounding the paper, even if other conditions, the electric strength, the time for extension, the pH of the buffer and others are kept in constant. The reason is the added effect of the liquid stream occurring on the paper to the movement of the charged protein molecules for the opposite pole. The liquid stream on the paper stretched horizontally is caused by the evaporation of water from the paper warmed by electric streaming. This can be diminished by filling the space with liquid paraffin. The pictures of the extended protein on the several papers arranged parallel between two poles show the different patterns from each others. This is caused by differences of the water content in each paper by which electric streaming varies. Serial arrangement of the papers between two poles gives always good results, yielding almost the same picture in each paper. From those observations the author designed and constructed a new apparatus for electropaperchromatography for serum protein. Using this apparatus (Fig. 3) filling the whole space with liquid paraffin, 4 papers gave always constant results which enabled the comparison of the components of serum and the other paraffin insoluble fractions.