

ライソソームのポーラログラフ蛋白波の挙動

小笠原八十吉*・木元幸一**・草間正夫**

(昭和58年 9月17日受理)

The Behavior in Polarographic Protein Waves of Lysosomes

Yasokichi OGASAWARA, Kōichi KIMOTO and Masao KUSAMA

(Received September 17, 1983)

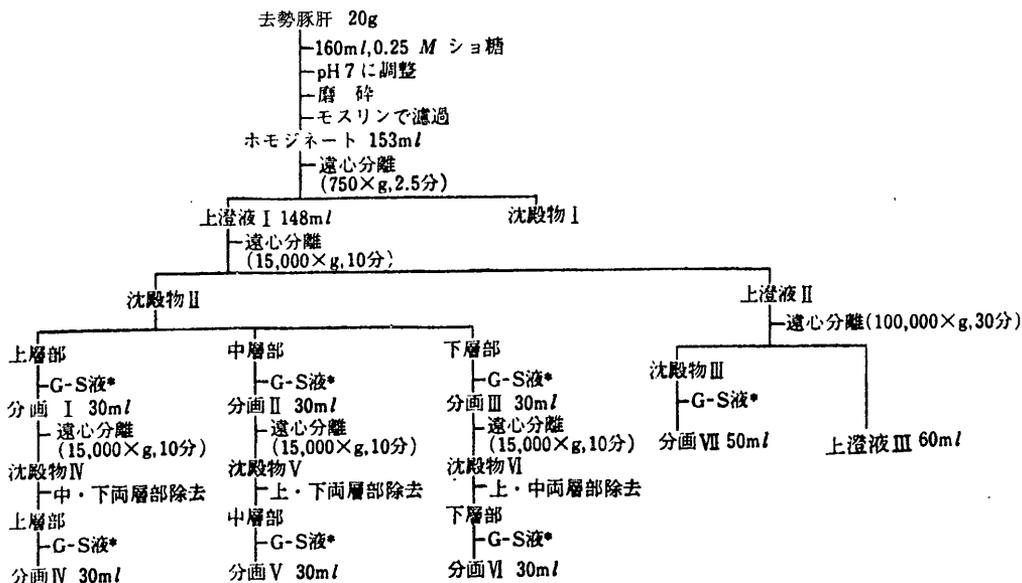
緒 言

蛋白質は直接には滴下電極において酸化波または還元波を示さないが、ポーラログラフ的には2価または3価の C_0 イオンの存在下で、蛋白波とよばれる極めて特異な波を生ずる。蛋白波をあらわすのはシスチンまたはシステインを含む蛋白質のみであり、蛋白質の種類によってその蛋白波の様相も異なっている。したがって、このような特異な蛋白波を測定していくならば、それぞれの蛋白質の特性をさらによく示すことができる^{1)~10)}。

いっぽう、ライソソームは、生細胞内に存在する1種の小顆粒であって、その内部には多種類の酸性水解酵素類を保有する一消化器官といえる¹¹⁾。それゆえに、ライソソームをポーラログラフ的に検討していくならば、特異な蛋白波をあらわしていくものと期待できる。

本報においては、まず、去勢豚肝から、ライソソームの調製過程における各分画を分離した。分離した各分画の蛋白質の特性を明らかにしていくために、それぞれの条件下における各分画のポーラログラフ蛋白波を比較検討した。以下それらの結果について報告する。

表 1 ライソソームの調製



* G-S液：グリコーゲン (0.4mg/μl) を含む0.2Mショ糖液の略。調製の全操作を0°Cの冷室内で行なった。

* 化学研究室
** 栄養学研究室

実験方法

1 試料の調製法

表1に示す既報¹²⁾の方法に準拠して、去勢豚肝のライソソームの調製過程における各分画を分離した。

2 蛋白波の測定法

特に指示のない限り、ポーログラフ蛋白波の測定における電解液の終濃度は、 10^{-3} M CoCl_2 , 0.1 M NH_4Cl および 0.2 M NH_4OH であり、また電解温度は 25°C であった。滴水水銀電極の特性は、 25°C で試料を含まない支持電解液中の零Vにおいて、 $m=1.107 \text{ mg/sec}$, $t=4.2 \text{ sec/drop}$ であった。波高は既報の方法^{6)~8)}によって、 C_0 波の極大部分から第1波および第2波の極大までの距離を測定し、mmであらわし、 $S=0.08 \mu\text{A/mm}$ であった。

3 蛋白量の測定法

各分画の蛋白量は、既報の方法⁹⁾に準拠して Cu-Folin 呈色法によって測定した。

結果

1 ライソソーム分画の蛋白波

(1) 蛋白質濃度の影響

蛋白質濃度のみを変化させ、その他の電解液組成および電解温度を一定にした場合のポーログラフ波を測定し、その結果を図1に示した。これによれば、ライソソーム分画(ライソソームに富む分画VIをさす)における

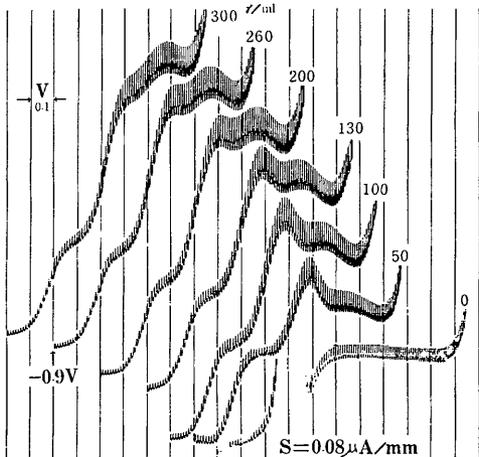


Fig. 1. Relation between protein waves and protein concentrations in lysosomal fraction.

蛋白波の第1波または第2波の極大は -1.4 または -1.55 V付近に位し、第1波と第2波の区別は明瞭であった。

ライソソーム分画における蛋白質濃度とその蛋白波の波高との間には直線の関係の成立しないことは、他の蛋白質の場合と同一であった^{7)~9)}。170 γ/ml の蛋白質濃度付近にその Crossing point を認めた。この Crossing point は蛋白質の種類によって相違することから、これを蛋白質の特性を示す1つの鍵とすることができる^{6),7)}。

(2) CoCl_2 濃度の影響

CoCl_2 濃度のみを変化させ、その他の条件を一定にした場合のポーログラフ波を測定し、その結果を図2に示した。極めて鮮明な波をあらわし、その濃度と波高の間には直線の関係は成立しなかった。 Co^{++} 濃度を増せばその波高も増大したが、第1波の波高が第2波のそれよりも常に高く、Crossing point は認められなかった。

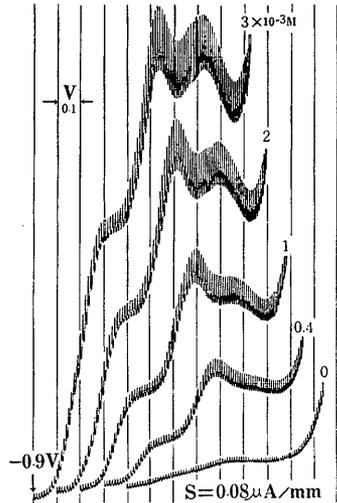


Fig. 2. Relation between protein waves and CoCl_2 concentrations in lysosomal fraction.

(3) NH_4Cl 濃度の影響

NH_4Cl 濃度のみを変化させ、その他の条件を一定にした場合の蛋白波を測定し、図3に示した。 NH_4Cl 濃度の0.1 M付近までは、その濃度を増せばその波高も増大したが、それ以上の濃度ではその波高は常にはば一定であった。その第1波の波高のほうが常に高く、Crossing point は認められなかった。このようなことは、他の肉類の蛋白波の場合にも見られる傾向であった⁹⁾。

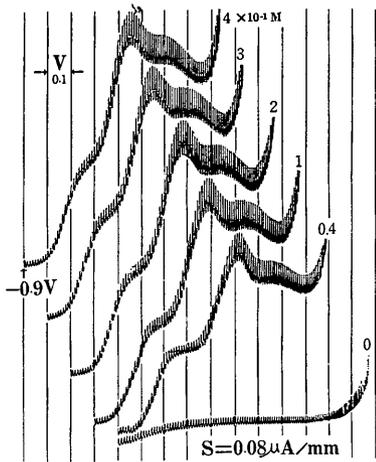


Fig. 3. Relation between protein waves and NH_4Cl concentrations in lysosomal fraction.

(4) NH_4OH 濃度の影響

NH_4OH 濃度のみを変化させ、その他の条件を一定にした場合の蛋白波を測定し、図4を得た。 NH_4OH 濃度を増せばその波高も増大したが、必ずしも直線的関係は成立しなかった。また、 NH_4OH 濃度の 0.12 M 付近にその Crossing point が位し、それ以上の濃度では常に第1波の波高のほうが高かった。このような傾向は、牛肉⁹⁾ や兎肉のトロポミオシン¹⁰⁾などの蛋白波でも見られた。

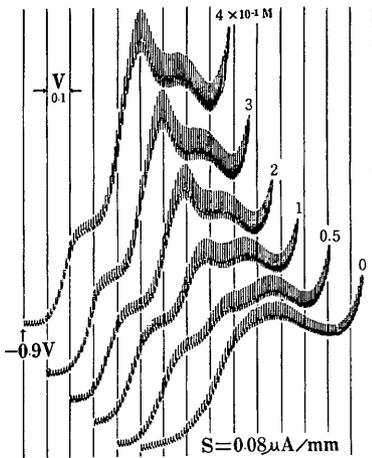


Fig. 4. Relation between protein waves and NH_4OH concentrations in lysosomal fraction.

(5) 電解温度の影響

他を一定にし、電解温度のみを変化させた場合の蛋白波を測定し、図5に示した。電解温度の11°C付近にその Crossing point が認められ、それ以上の温度では第1波の波高のほうが高くなった。得られた蛋白波はいずれも鮮明な波をあらわしたが、25°C以上の高温では波高の増大は認められなかった。

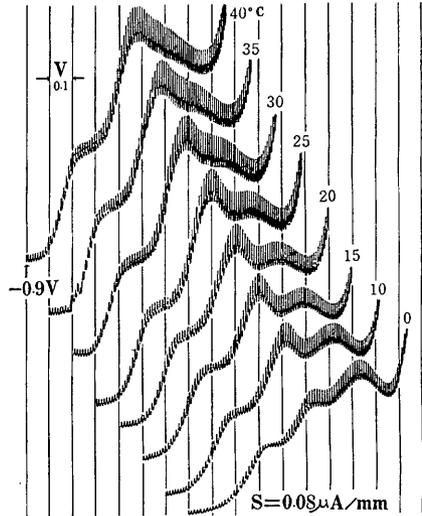


Fig. 5. Relation between protein waves and electrolyzing temperatures in lysosomal fraction.

2 調製過程における蛋白波

(1) 蛋白質濃度の影響

表1に従ってライソソーム分画(分画VI)を調製すると共に、いっぽうでは、特にその調製過程におけるホモジネート、上澄液III、分画IV、ミトコンドリア分画(ミトコンドリアに富む分画Vをさす)およびマイクロソーム分画(マイクロソームに富む分画VIIをさす)を分取し、それらのポーログラフ蛋白波を測定した。図6~図11は、それら蛋白波とその蛋白質濃度との関係を示したものである。

まず、ホモジネートおよび上澄液IIIの蛋白波の場合には(図6、図7および図11のAとB)、蛋白質濃度の増すにつれて、その波高も増大していき、Crossing point は認められなかった。この場合、第2波の波高のほうが常に高かった。このような傾向はマイクロソーム分画の蛋白波の場合にも認められたが(図8と図11のC)、この場合には、蛋白質濃度の 45 γ/ml 付近に Crossing point を認めることができた。以上のように、これら3者の蛋白

波の波形はほぼ近似した傾向をあらわした。けれども、ホモジネートやミクロソーム分画の蛋白波に比較すれば、上澄液Ⅲのその場合には、極めて低い蛋白質濃度でも鮮明にして高い波高をあらわした。

いっぽう、分画Ⅳ、ミトコンドリア分画およびライソソーム分画の場合には(図1, 図9, 図10, 図11のD~F), 高い蛋白質濃度でなければ、よい蛋白波をあらわさなかった。また、分画Ⅳ, ミトコンドリアおよびライソソーム分画の蛋白波は、それぞれ120, 100または170 γ/ml 付近に Crossing point をあらわしたが、それよりも低い蛋白質濃度では常に第1波の波高のほうが高かった。この点、ホモジネート, 分画Ⅲおよびミクロソーム分画の場合とかなり異なっている。さらにまた、分画Ⅳやミトコンドリア分画の場合には、蛋白波の第1波と第

2波の両波高の差は、極めて小さいものであった。この点も、著しく大きな間隔をもっているホモジネート, 上澄液Ⅲおよびミクロソーム分画の場合と著しく異なっている。

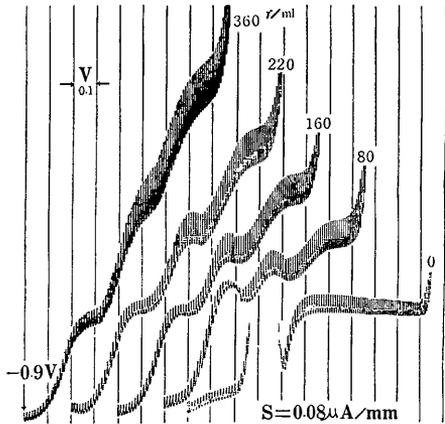


Fig. 6. Relation between protein waves and protein concentrations in homogenate.

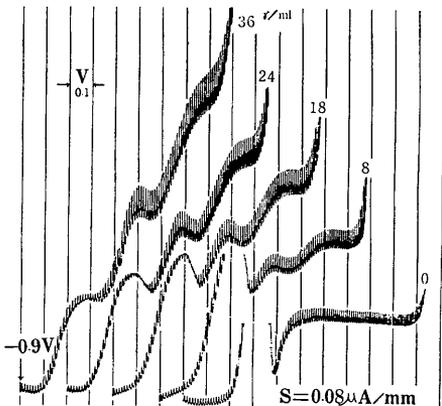


Fig. 7. Relation between protein waves and protein concentrations in supernatant III.

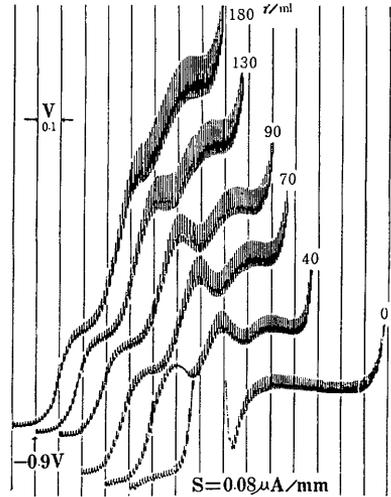


Fig. 8. Relation between protein waves and protein concentrations in microsomal fraction.

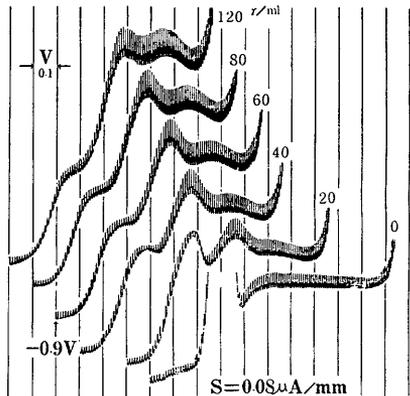


Fig. 9. Relation between protein waves and protein concentrations in fraction IV.

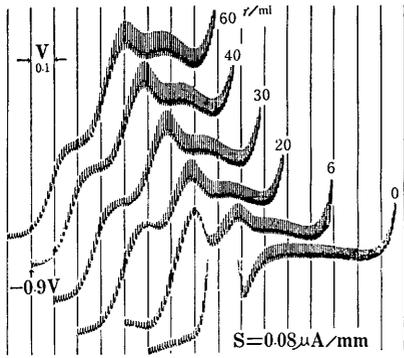


Fig. 10. Relation between protein waves and protein concentrations in mitochondrial fraction.

(2) NH_4OH 濃度の影響

図12は、蛋白波の波高と NH_4OH 濃度との関係を示したものである。いずれの蛋白波の場合にも、 NH_4OH 濃度を増せば、その第1波と第2波の波高も増大していった。この場合、ホモジネート、上澄液Ⅲおよびミクロソーム分画の場合には、その第2波の波高のほうが常に高く、また、Crossing point も認められなかった。

いっぽう、分画Ⅳ、ミトコンドリア分画およびライソソーム分画の場合には、 NH_4OH 濃度の 0.1 M 付近に常にそれら蛋白波の Crossing point があらわれた。この 0.1 M よりもその濃度を増せば、常に第1波の波高のほうが高くなった。これらの点も、ホモジネート、上澄液Ⅲおよびミクロソーム分画の場合と著しく異なっている。

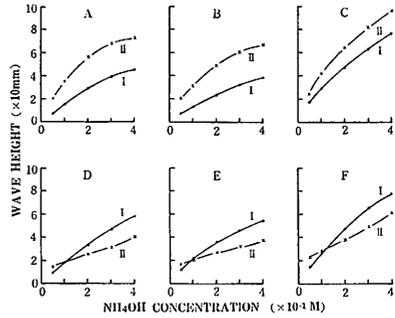
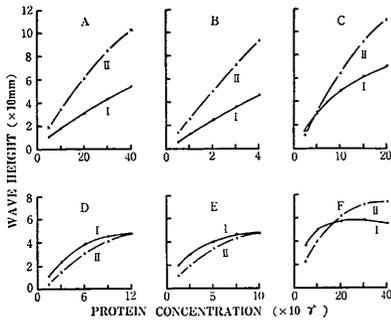


Fig. 11. Relation between wave heights and protein concentrations in each fraction.

Fig. 12. Relation between wave heights and NH_4OH concentrations in each fraction.

I : First waves II : Second waves

I : First waves II : Second waves

A : Homogenate B : Supernatant Ⅲ
C : Microsomal fraction D : Fraction Ⅳ
E : Mitochondrial fraction F : Lysosomal fraction

A : Homogenate B : Supernatant Ⅲ
C : Microsomal fraction D : Fraction Ⅳ
E : Mitochondrial fraction
F : Lysosomal fraction

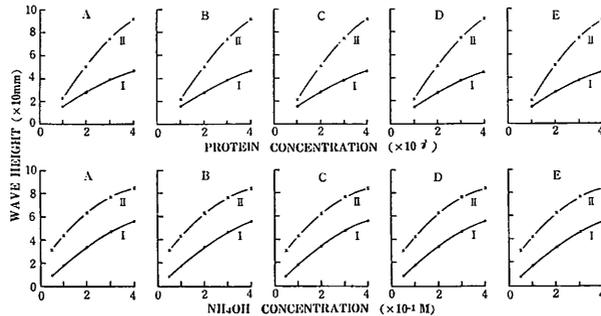


Fig. 13. Relation between centrifugal forces and wave heights in supernatant Ⅲ.

I : First waves II : Second waves

A : 15,000×g B : 40,000×g C : 60,000×g
D : 80,000×g E : 100,000×g

3 遠心分離と蛋白波との関係

表1に示す上澄液IIを、15,000~100,000×gで30分間遠心分離後、5種類の上澄液IIIを分取した。分取したそれらの蛋白波を測定し、図13を得た。蛋白質またはNH₄OHのいずれの濃度変化に対する蛋白波の場合にも、その他の条件を一定にしたものでは、常に一定の波高曲線をあらわした。100,000×gへと遠心力を増すにつれて、沈殿量も増大していき、したがって、上澄液III中の蛋白量もその分だけ減少する。けれども、図13に示す波高曲線はいずれもほぼ一定であった。このことは、除去されていくミクロソーム分画(分画VII)の蛋白質は、上澄液IIIの蛋白波にあまり干渉しなかったことを示すものである。

4 冷保蔵と蛋白波との関係

上澄液IIを0℃で0~4日間冷保蔵後、100,000×gで30分間遠心分離して、5種類の上澄液IIIを分取した。それぞれの蛋白波を測定し、図14を得た。ただし、蛋白質濃度は7数の代りに特に試料液のml数であらわした。これによれば、蛋白質またはNH₄OHのいずれの濃度変化に対する蛋白波の場合にも、0℃保蔵の進むにつれて、その波高が次第に低下していった。けれども、いずれの保蔵日数の場合にも、第2波の波高のほうが常に高く、その波形における著しい変化は認められなかった。ただし、冷保蔵4日後のものでは、蛋白波の第1波と第2波の間隔が著しく狭くなって、その波形もかなり変化した。かかる蛋白波の変化から見れば、0℃保蔵にもかかわらず、蛋白量の減少や蛋白構造の変化が進んでいるものと考えられた。

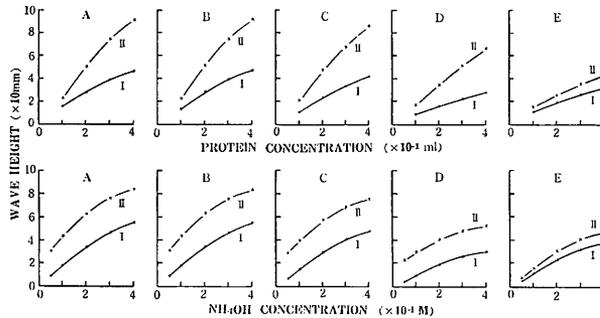


Fig. 14. Relation between 0°C storage and wave heights in supernatant III.

I : First waves II : Second waves
 A : 0 day B : 1 day C : 2 days D : 3 days E : 4 days

5 高温処理と蛋白波との関係

上澄液IIを0~70℃で2時間加熱処理後、ただちにその蛋白波を測定し、図15に示した。ただし、蛋白質濃度

は7数の代りに試料液のml数であらわした。これによれば、蛋白質またはNH₄OHのいずれの濃度変化に対する蛋白波の場合にも、処理温度が高まるにつれて、そ

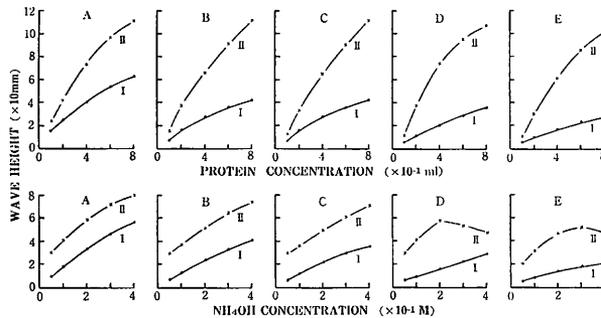


Fig. 15. Relation between temperatures and wave heights in supernatant II.

I : First waves II : Second waves
 A : 0°C B : 37°C C : 50°C D : 60°C E : 70°C

の第1波と第2波の間隔が次第に増大していった。そして、第2波の波高のほうが常に高く、その蛋白波の波形そのものはほぼ類似していた。けれども、60°または70°C処理の場合には、図15の NH_4OH 濃度変化における蛋白波に示すように、その波形もかなり変化していった。かかる変化から見れば、高温に進むにつれて、そのなかに存在する蛋白質の構造も、次第に変化していくものと考えられる。

考 察

去勢豚肝から、ライソソームの調製過程における各分画を分離し、さらに分離した各分画のポーラログラフ蛋白波を比較検討した。その結果、ライソソームの調製過程における各分画の蛋白波は、ライソソーム分画やミトコンドリア分画などに属するグループと、ミクロソーム分画などに属するグループの2つに大別できることを見出した。

ミクロソーム分画、上澄液Ⅲおよびホモジネートなどの蛋白波は、通常第1波の波高が第2波のそれよりも低く、鮮明な波をあらわした。また、 NH_4OH 濃度変化に対するそれらの蛋白波では、その Crossing point は認められなかった。いっぽう、ライソソーム分画、ミトコンドリア分画および分画Ⅳなどの蛋白波では、170 γ/ml 以下の蛋白質濃度または 0.1 M 付近以上の NH_4OH 濃度の場合には、第1波の波高が第2波のそれよりも高く、鮮明な波をあらわした。また、 NH_4OH 濃度変化に対するそれらの蛋白波では、その NH_4OH 濃度の 0.1 M 付近に Crossing point が認められた。以上のように、蛋白波から見れば、両グループを明瞭に区別することができる。けれども、同一グループ内の蛋白波では、波形そのものからは区別できにくかった。しかし、図11に示すような波高曲線を作成していくならば、その波高曲線の変化や蛋白質濃度に対する感度などから、それらのものでも区別できるようになった。

表1に示すように、15,000 \times g の遠心分離で沈降しなかった区分が上澄液Ⅱである。この場合、15,000 \times g から次第に遠心力を強めて 100,000 \times g に及ぶならば、さらに沈降量を増し、やがて表1に示す分画Ⅶ（ミクロソーム分画）と上澄液Ⅲが分離する。このとき、上澄液Ⅱにおける全蛋白量の24%がミクロソーム分画側に沈降した。図13は、かくして得られた各上澄液Ⅲの蛋白波である。この結果から見れば、いずれの遠心力の場合にも、

ほぼ一定した波をあらわした。このことは、ミクロソーム分画蛋白質の除去量にかかわらず、上澄液Ⅲの蛋白波は常に安定していることを示すものである。

いうまでもなく、ミクロソームは軽い顆粒であって、その大部分は上澄液Ⅱ側に移行する¹³⁾。また、ホモジネートに存在するライソソームカテプシンの約15%は、この上澄液Ⅱ側に移行する¹²⁾。したがって、かかる上澄液Ⅱ内の蛋白質は、冷保蔵下といえども、そのライソソームのカテプシン作用を受けていく。図14は、かかる上澄液Ⅱを0°Cで4日にいたるまで保蔵後、さらにその上澄液Ⅲの蛋白波を測定した結果である。これから見れば、冷保蔵が進むにつれて、ライソソームのカテプシン作用も強まっていった。けれども、0°C保蔵3日以内のものでは、その蛋白波における大きな変化を示さなかった。このことは、そのなかに存在する蛋白質にも大きな変化をあたえなかったことを示すものである。しかし、4日後に及べば、かなりの変化をあたえたことは、図14の波からよくわかる。

一般に、温度が昇れば、ライソソームやミクロソーム顆粒膜の崩壊も強まっていく^{12),13)}。したがって、存在するライソソームのカテプシンによる蛋白質の分解作用も促進される¹⁴⁾。さらに、高温下では酵素作用を旺盛にするいっぽうでは、それら酵素類の失活もおこっていく。図15は、上澄液Ⅱを0°~70°Cで2時間加温処理後、さらに蛋白波を測定した結果である。これから見れば、温度が高まれば、そのなかに存在するライソソームのカテプシンによる蛋白質の分解作用も強まっていった。けれども、50°C以下では、それらの蛋白波に大きな変化をあたえなかった。このことは、そのなかに存在する蛋白質をも、大きく変化させなかったことを示すものである。けれども、60°C以上に及べば、大きく変化させることは、図15の波からよくわかる。著者らはすでに、ペプシン、パペインまたはトリプシンなどによる蛋白分解作用が進むにつれて、第1波の波高よりも第2波のそれが著増していくことを報告した⁹⁾。著者らはさらに、SH基アミノ酸の遊離量を増すにつれて、かかる第2波の波高を増大させていくことをも明らかにした^{9),10)}。これらから図15に示す波の変化を見れば、高温下におけるカテプシンの分解力をよく理解できる。以上のように、ライソソームの調製過程における各分画の蛋白質の変化を明らかにする上に、ポーラログラフ蛋白波は大いに役立っていくものと期待できる。

要 約

(1) 豚肝ライソソームの調製過程における各分画のポーラログラフ蛋白波の変化を比較検討した。

(2) ライソソームの調製過程における各分画の蛋白波は、ライソソーム分画やミトコンドリア分画などに属するグループと、ミクロソーム分画などに属するグループに2大別できることを見出した。

(3) ライソソームとミクロソームの両分画における蛋白質は、ポーラログラフ的によく区別できた。

(4) 上澄液区分の蛋白波は、そのなかに存在するミクロソーム含量に左右されることなく、ほぼ安定した波をあらわした。

(5) ライソソームカタペシンを共雑する上澄液区分を0°Cで3日間以内または50°C以下で2時間放置しても、その区分の蛋白波に大きな変化をあたえなかった。

文 献

1) J. Kadlecěk and Y. Kalous : *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem. (Czech.)*, **105**, 225 (1979)
 2) G. Munshi and V. Kalous : *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **42**, 1929 (1977)

3) M. Senda, T. Ikeda and H. Kinoshita : *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **3**, 253 (1976)
 4) S. Kwee : *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **3**, 264 (1976)
 5) F. Scheller, H. J. Pruemke, H. E. Schmidt, and P. Mohr : *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **3**, 328 (1976)
 6) 秦 忠夫 : 京大食研報告, **6**, 45 (1951)
 7) 館 勇 : ポーラログラフイー, 岩波書店, pp. 386~410 (1954)
 8) T. Obara and Y. Ogasawara : *J. Food Sci.*, **28** (1), 8 (1963)
 9) 小原哲二郎・小笠原八十吉 : 農化誌, **33**, 762 (1959); **34**, 59 (1960)
 10) 小原哲二郎・小笠原八十吉 : *Radioisotopes*, **9** (3), 259 (1960); **11** (3), 283 (1962); **12** (1), 27 (1963)
 11) T. Brachet and A. E. Mirsky : *The Cell*, **II**, 442 (1961)
 12) 小笠原八十吉 : 農化誌, **40**, 347, 371 (1966)
 13) A. V. S. de Reuck and M. P. Cameron : *Lysosomes*, 1~427 (1963)
 14) 小笠原八十吉 : 食工誌, **18**, 191 (1971)

Summary

Comparative studies were made on the polarographic protein waves of the fractions which were separated during the preparation of lysosomes from hog-liver.

The protein waves of fractions were found to be classified into two groups by their characteristic shapes. Lysosome fraction and mitochondria fraction were in the same group, while microsome fraction was in the other. The protein in lysosome fraction was, therefore, polarographically different from the protein in microsome fraction.

Under the experimental conditions, the polarograms of supernatant solutions showed almost constant protein waves if the protein concentration of the solutions were the same. The supernatant solution in which lysosomal cathepsin was contaminated, was stored at 0°C up to three days, or two hours at 50°C or below. After these treatments, no significant change was observed in the polarographic protein waves of the supernatant solution.