

生体内の鉄及び含鉄成分に関する研究 (第4報)⁽⁶⁾

馬の脾臓鉄蛋白について

金森正雄, 田中 収, 中川 淳

Studies on Form of Iron and Iron-containing Material in Living Tissue.

IV. On the Iron-containing Protein of Horse Spleen.⁽⁶⁾

By

MASAO KANAMRI • OSAMU TANAKA • JUN NAKAGAWA

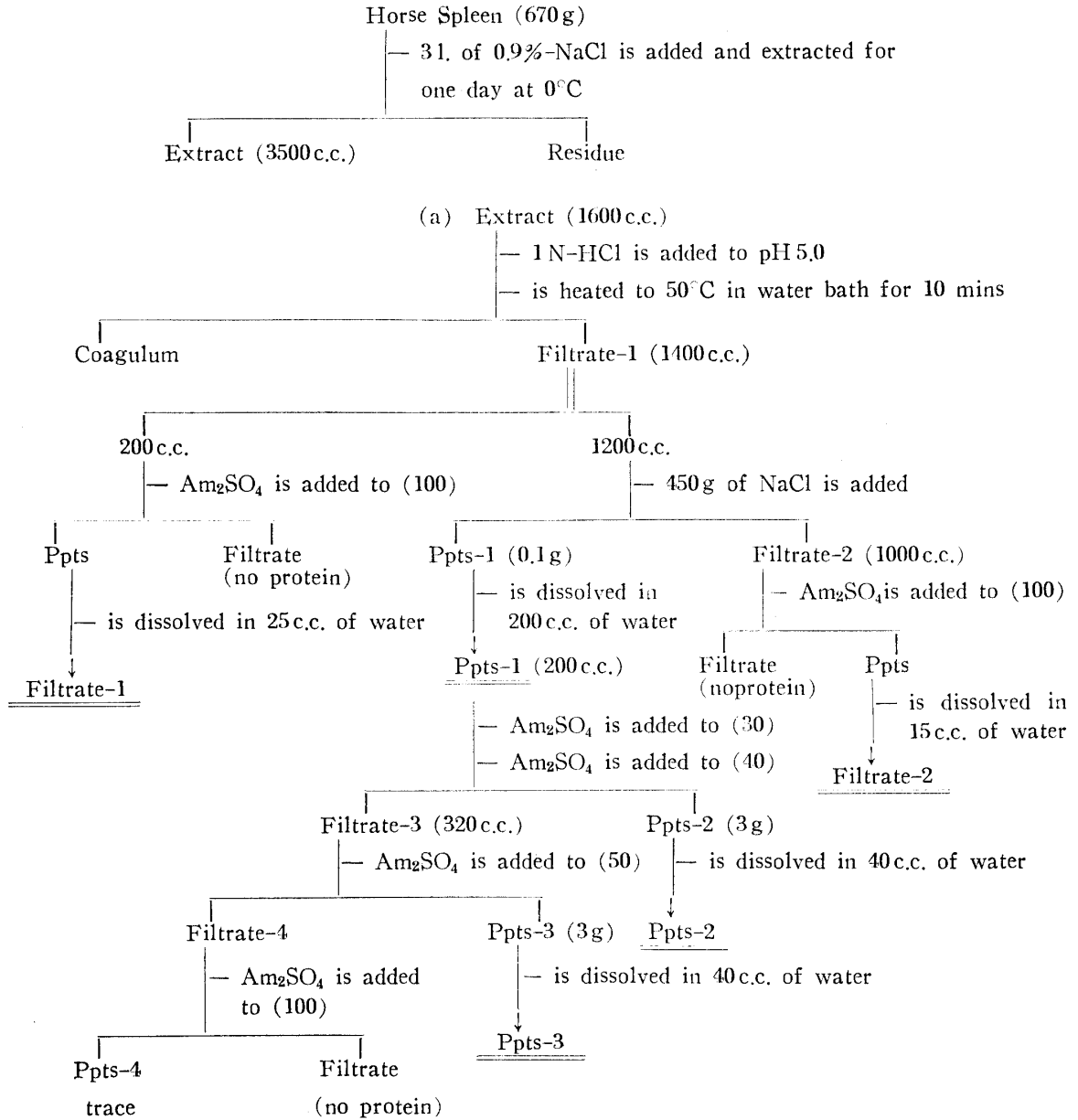
A. 緒 言

Iron porphyrin とは別に, 有機性の鉄化合物が, 生体中に存在することは, 既に 2, 3 の研究者によつて報告されている。即ち Schmiedeberg⁽⁴⁾ は pig liver から鉄含有蛋白質を調製し 7% の鉄を含むことを認めて, 之を“ferratin” と称名したことがこの種研究の嚆矢であつて次いで Laufberger⁽⁵⁾ が horse spleen から 20% の鉄を含む結晶性蛋白質を分離し, その鉄が ferric state であることを確めて, この蛋白質を“ferritin” と称名した。続いて Michaelis⁽⁶⁾ は ferritin から鉄を除去して, 無色の iron free protein を結晶状に分離して, 之を“apoferritin” と称名した。著者等は是等 ferritin, apoferritin を多量に含有すると言われる spleen を材料として, 是等一連の含鉄蛋白質を分離し, 夫々の性質の検討並に, 含有鉄の形態及び variability に関聯して, 生理的意義を究明する目的を以て, 実験を行つてゐるのである。それはこれらの蛋白質が血液の造成及び貧血に関与すると, 推論されるからである。著者等は馬の脾臓蛋白質から ferritin を単離して, 之が単一蛋白質であることを, 電気泳動的に証明し得たので以下その次第を順を追うて記す。

B. horse spleen protein の分別と電気泳動的分析

屠殺直後の horse spleen を出来る限り細切して, Granick & Michaelis⁽⁷⁾ 及び Mazur & Shorr⁽⁸⁾ 法を modify した Table 1 (a), Table 2 (d) に示した如き方法によつて ferritin を分別単離し, 又一方之とは別に Table 1 (b), (c); Table 2 (e) に示した如き硫酸による分別沈澱法によつて spleen protein を分別したが, 是等分別した各 fraction は総て暗赤色な蛋白質溶液であつた。ここに得られた各 fraction について pH=8.0, ionic strength $\mu=0.1$ の N/10 phosphate buffer を使用して, 48 hrs 0°C で dialysis を行い, Donnan's Membrane Equilibrium に達せしめた後, 4°C, potential gradient 3~6 volt, cm⁻¹ で電気泳動分析を行つた。その結果は Fig 1 Table 3 に示す如くであつた。

Table 1. Fractionation of Proteins in Horse Spleen.



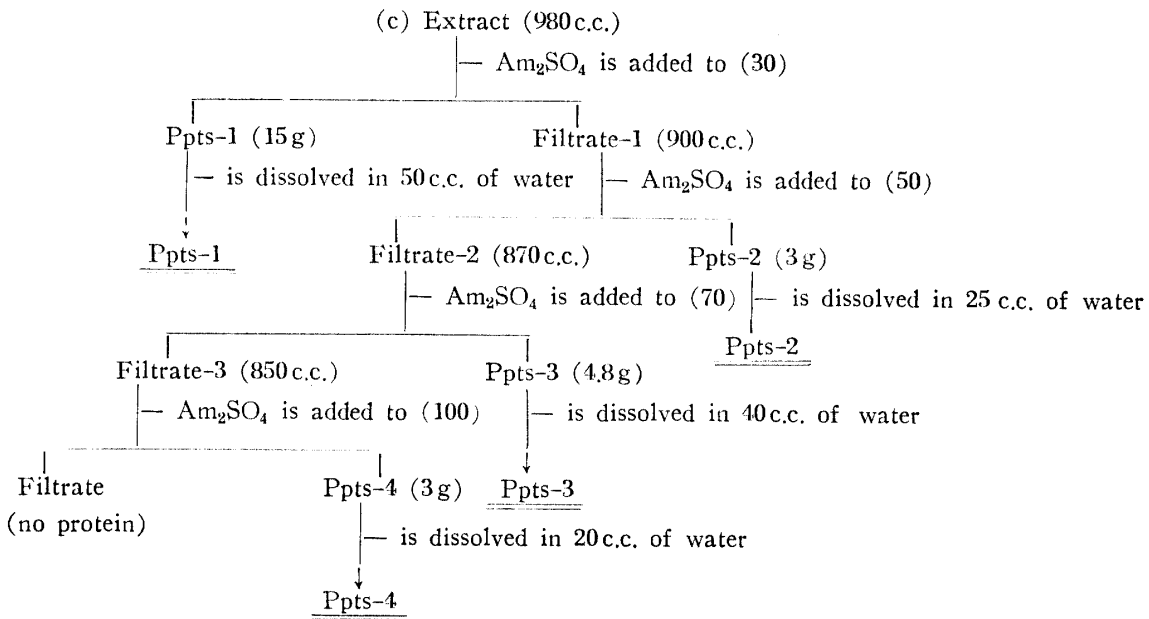
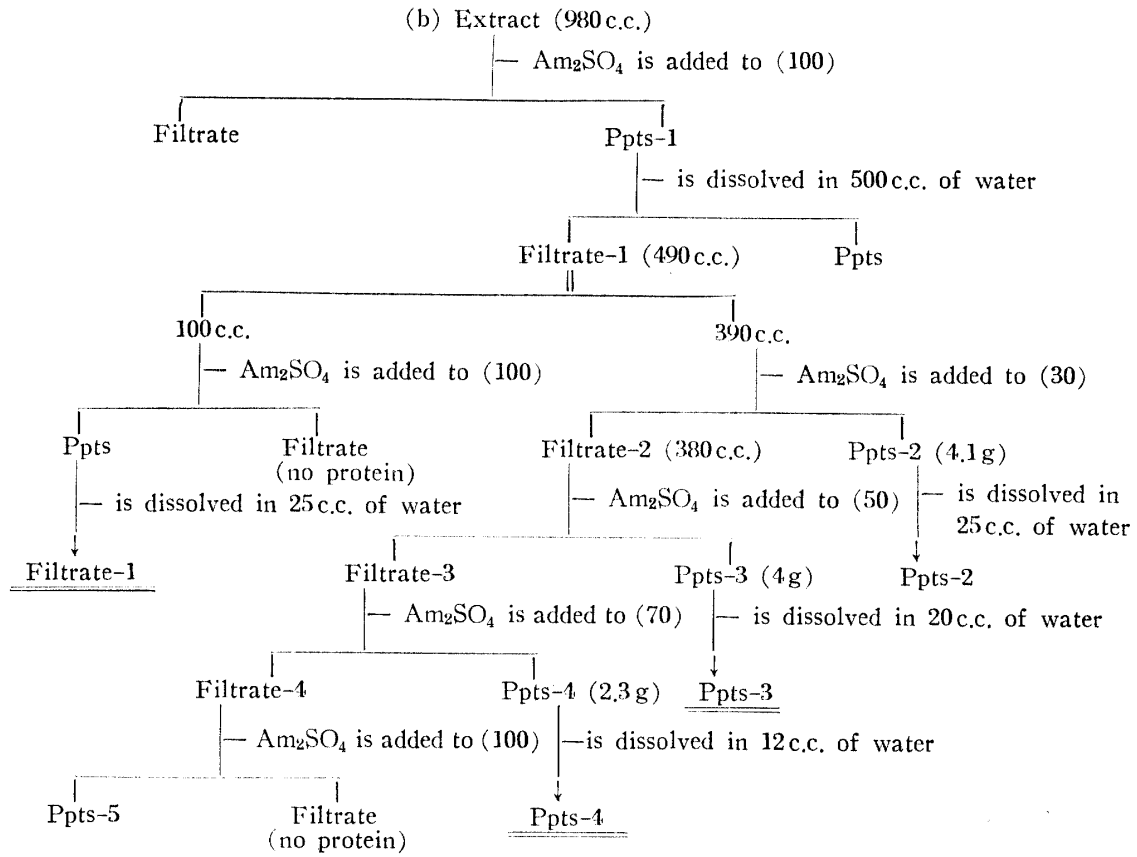


Table 2. Fractionation of Proteins in Horse Spleen.

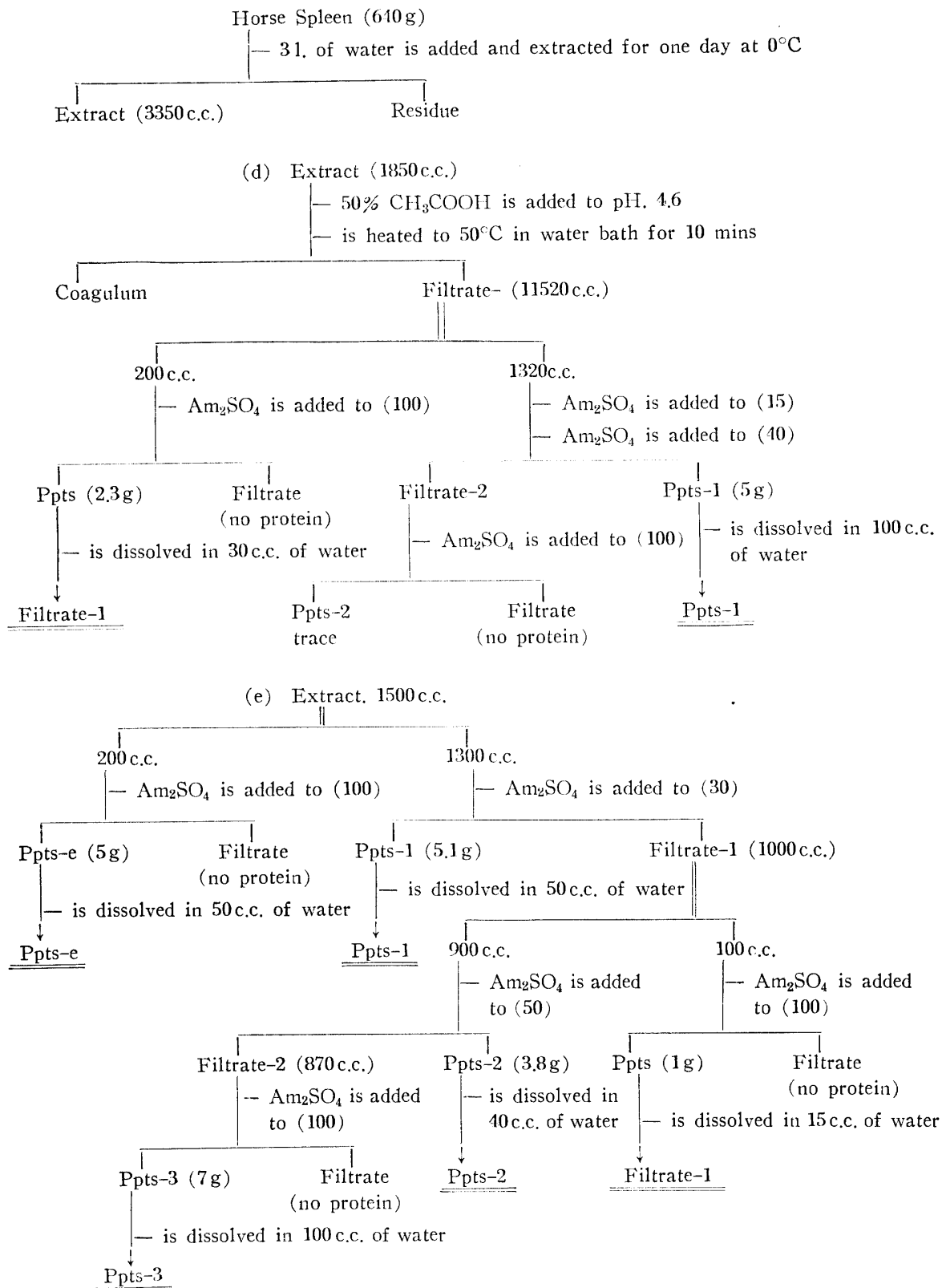
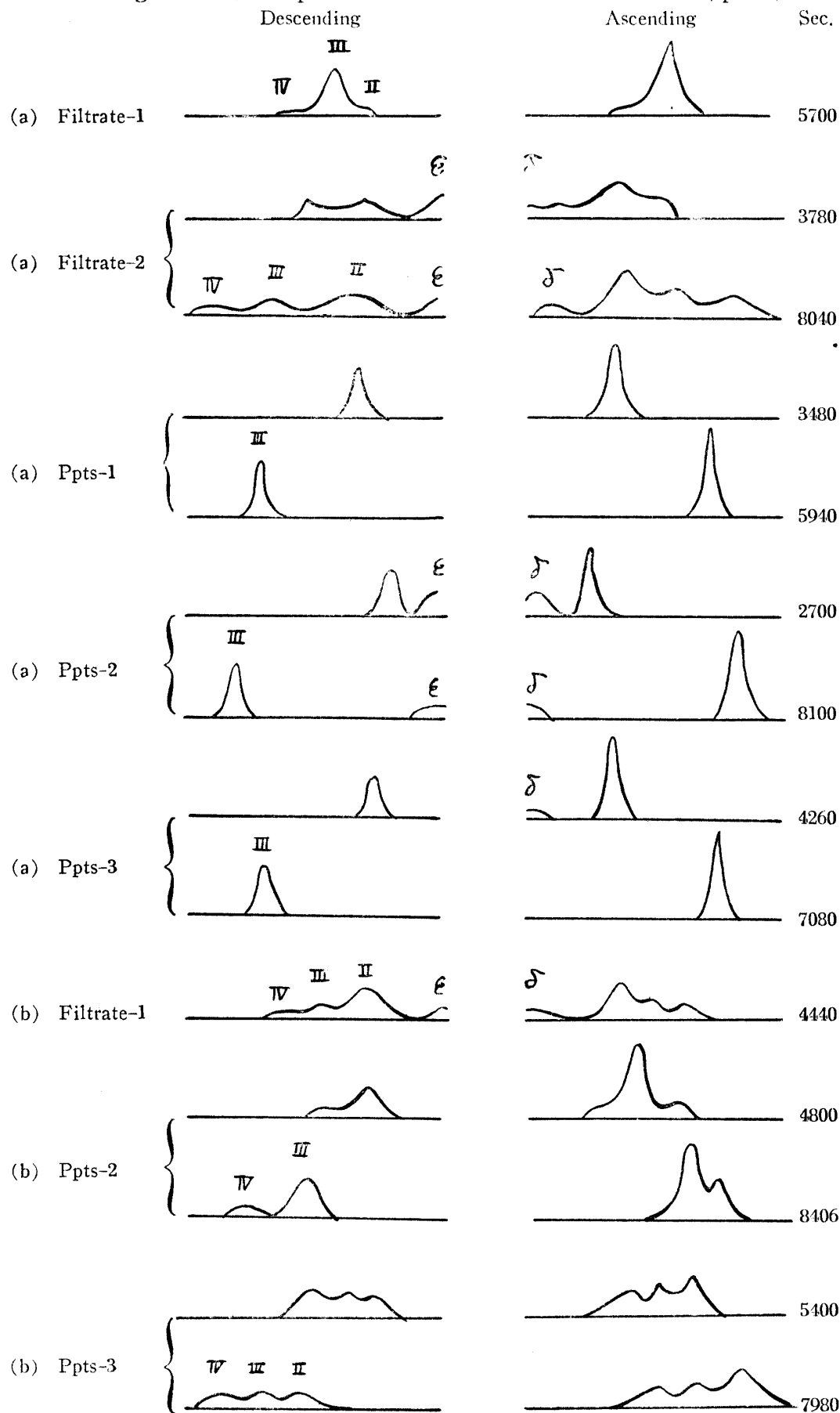
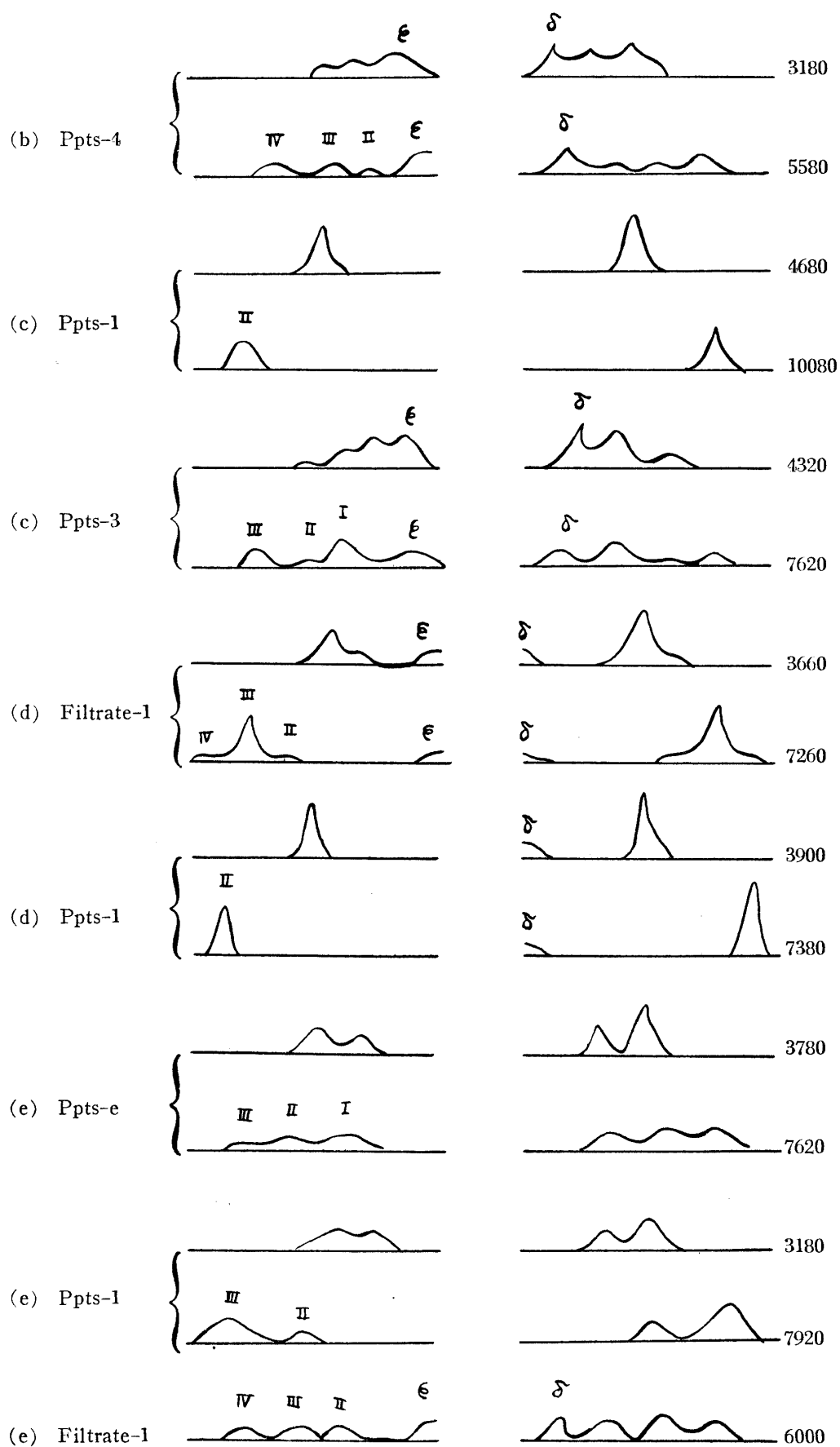


Fig. 1. Electrophoretic Patterns of Proteins in Horse Spleen.





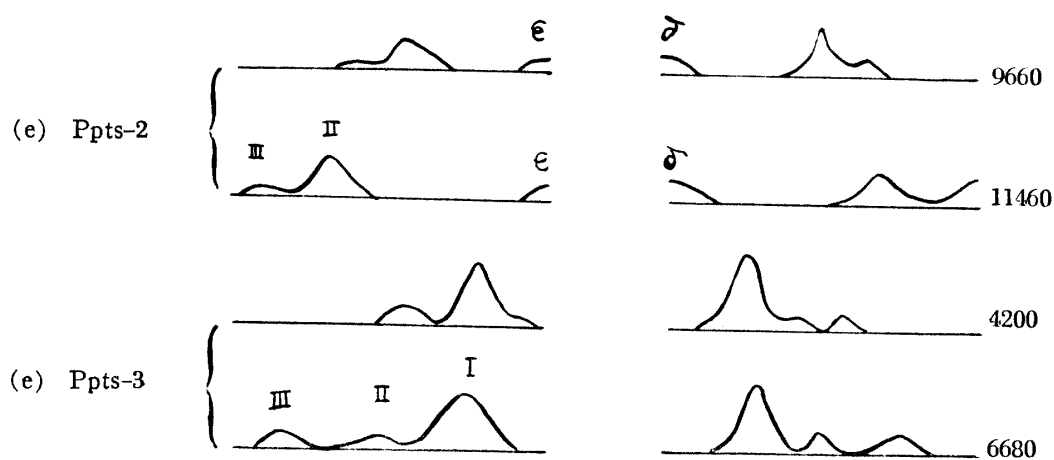


Table. 3. Mabilty of Fractionated Components of Horse Spleen.

(at. 4°C, N/10 phosphate buffer, pH=8.0, ionic strength $\mu=0.1$)

Signs of Fraction	Components and Mobility (-) $\times 10^{-5} \text{cm}^2, \text{volt}^{-1}, \text{sec}^{-1}$				Potential Gradient volt, cm^{-1}
	I	II	III	IV	
(a) Filtrate-1	—	4.4	6.2	8.0	5.9
(a) Filtrate-2	—	4.1	6.0	7.8	6.0
(a) Ppts-1	—	—	6.5	—	5.5
(a) Ppts-2	—	—	6.1	—	4.6
(a) Ppts-3	—	—	6.3	—	4.4
(b) Filtrate-1	—	4.4	6.6	8.9	4.4
(b) Ppts-2	—	—	6.4	8.2	3.0
(b) Ppts-3	—	4.1	6.2	8.4	4.2
(b) Ppts-4	—	3.7	5.8	7.9	3.4
(c) Ppts-1	—	4.3	—	—	4.0
(c) Ppts-3	2.3	4.6	6.3	—	3.1
(d) Filtrate-1	—	4.1	6.7	8.3	4.9
(d) Ppts-1	—	—	6.2	—	4.9
(e) Ppts-e	2.1	4.0	6.3	—	4.5
(e) Ppts-1	—	4.2	6.0	—	4.3
(e) Filtrate-1	—	4.0	6.5	8.6	4.6
(e) Ppts-2	—	4.1	6.4	—	3.9
(e) Ppts-3	2.7	4.6	—	7.9	4.7

C. 考 察

Table 1 (a), Table 2 (d), Table 3 に説示した如く, 50°C 10分の熱処理を行い, coagulum を除去した Filt-1 は 0.9% NaCl soluble 及び water soluble protein で 50°C 10分 non coagulable protein を含み, component III, III, IV の 3 component を含み, III を主体蛋白質成分としている。之から NaCl 飽和及び Am_2SO_4 (15)~(40) によつて得られた Ppts-1 は, 何れも component III を含み Granick⁽³⁾⁽⁴⁾ 氏等による ferritin に相当する fraction であつて, 同氏等は, 70°C の加熱処理によつて得ているが, 著者等は 50°C 10分の処理を行つて充分目的を達成し得た。即ち Fig 1 に図示した如く Table 1 (a), Table 2 (d) より得た Ppts-1 は何れも component III を含む monocomponent protein で, その mobility は夫々 -6.5 , $-6.2 \times 10^{-5} \text{cm}^2, \text{volt}^{-1}, \text{sec}^{-1}$ であつた。Table 1 (a) の Ppts-1 を Am_2SO_4 (30)~(40), (40)~(50) で分別沈澱したところの Ppts-2 Ppts-3 も亦 component III から成り $-6.1, -6.3 \times 10^{-5} \text{cm}^2, \text{volt}^{-1}, \text{sec}^{-1}$ の mobility を有する mono component protein であつた。是等総て Granick⁽³⁾⁽⁴⁾ et al. の得た ferritin とその mobility を同一にしている。この各 fraction は何れも暗赤色を呈し, 易動度を相等しくする点及び single boundary として泳動する点から考察すると, 何れも同一な mono component protein であると判定し得る。次に是等同一の protein fraction 即ち Table 1 (a) の Ppts-2, Ppts-3 及び Table 2 (d) の Ppts-1 を合してその鉄含量を前報⁽⁵⁾の如く thioglycollic acid method 及び $\alpha\alpha'$ -dipyridyl method を併用して定量した値は, Table 4 に示した如く, total iron は ferritin protein に対して 21.21% の高含量を示し, 而もその iron の全部が ferric state であつた。依つてこの各 fraction は何れも ferric iron を 21.21% 含む, 易動度 $-6.2 \times 10^{-5} \text{cm}^2, \text{volt}^{-1}, \text{sec}^{-1}$ を有する ferritin であると断定し得る。

Table 4. Iron and Protein Content of Ferritin Solution

	mg. in 10 c.c. of Sample Solution	% in Dry matter	% in Protein	mg Fe/mg. N
Total-nitrogen	7.12	—	—	—
Protein	44.50	—	—	—
Dry matter	68.9	64.53	—	—
Ash	16.1	—	—	—
Total-iron	9.44	13.70	21.21	—
Ferrous-iron	trace	—	—	—
Ferric-iron	9.44	13.70	21.21	—
Ferritin solution	—	—	—	1.33

Table 1 (b) に示した 0.9% NaCl soluble, Am_2SO_4 (0)~(100) で沈澱する protein で

water soluble protein である Fil-1 は, component Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ を含むが, Ⅱ を主体蛋白としており, 之を Am_2SO_4 (0)~(30), (30)~(50), (50)~(70) で分別沈澱した Ppts-2, Ppts-3, Ppts-4 は夫々 component Ⅲ, Ⅳ 及び Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ から或る di-, tri-component protein であつたが, Ppts-2 はその大部分は, component Ⅲ の ferritin で, 僅かに Ⅳ を含んでいるに過ぎなかつた。従つて Am_2SO_4 (0)~(30) で殆どの ferritin が分別沈澱されるようである。

次に Table 1 c) の Am_2SO_4 (30) で沈澱する Ppts-1 は component Ⅱ のみから成る monocomponent protein であつて, その mobility は $-4.3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ であつた。Ppts-3 は多量の component Ⅰ 及び Ⅲ と僅少の Ⅱ とから成り, Ppts-2 は恐らく component Ⅲ を主体とするのではなからうかと推察される。

Table 2 (e) の Ppts-e は component Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ から成つており, component Ⅳ は含まぬが, 之を処理した Am_2SO_4 (30)~(100) fraction. 即ち Fil-1 に component Ⅳ を出現させている。更に之は Am_2SO_4 (50)~(100) で沈澱する Ppts-3 の fraction 中に含まれているが, これは他の component から denaturate して出来たものか, 或は類似構造のため, mild な fractionation によつて始めて出現するのかの何れかの理由によるものであらうと推論される。

亦 Table 1, Table 2 より判る如く, 50°C 10分の熱処理によつて, ferritin の構成分である component Ⅲ のみは noncoagulable で而も water soluble であつたが, 他の component Ⅰ, Ⅱ, Ⅳ は何れも coagulable であることが推測される。其他 water soluble の場合及び, gentle な fractionation の場合に component Ⅰ が良く出現し, NaCl soluble の場合には water soluble に比して component Ⅳ を多く含む, 従つて component Ⅳ は denaturate によつて出現するのではなくて, むしろ globulin 系に属しているためではなからうかとも考えられる。

終りに臨み終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜つた恩師京都大学農学部教授近藤金助先生に深甚の謝意を表する次第である。尙本研究費の一部は文部省科学研究費によるもので, 茲に附記して謝意を表する。

D. 要 約

(1) 電気泳動分析によつて, 0.9% NaCl soluble 及び water soluble な horse spleen protein は component Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ から成り立っていることを確認した。

(2) Component Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ の mobility を 4°C , N/10 phosphate buffer solution (ionic strength $\mu=0.1$, pH=8.0) に於て測定算出した。

(3) horse spleen protein から ferritin を分別単離するには, その食塩抽出液及び水抽出液を 50°C で 10 分間熱処理した後, 食塩或は硫安の分別沈澱を行えばよいことを確認したと同時に前処理を行わずに, 直接硫安による分別沈澱のみを行つても ferritin は得られることを確めた。

(4) 分離した ferritin は電気泳動的に均一であり、その mobility は 4°C , N/10 phosphate buffer solution ($\mu=0.1$ pH=8.0) に於て $-6.2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ であり、その鉄含有量は、蛋白中 21.21% であつて然も全部の鉄が ferric state であることを確認した。

(5) 著者等によつて分別された、horse spleen protein は ferritin と component II を除いて他は di- 及び tri- component protein であつた。

(6) 50°C 10分の加熱処理によつて、component I. II. IV は不可逆的に凝固し、component III は凝固せぬことを確認した。

文 献

- (1) O. SCHMIEDEBERG: Arch. oxptt. Path. Pharmakol **33** (1894) 101
- (2) M. LAUFBERGER: Bull. Soc. Chim. Biol **19** (1937) 1575
- (3) S. GRANICK: J. Biol. Chem. **146** (1942) 451
 " : J. Biol. Chem. **149** (1943) 157
 S. GRANICK & I. MICHAELIS: J. Biol. Chem. **147** (1943) 91
- (4) A. MAZUR & E. SHORR: J. Biol. Chem. **176** (1948) 771
- (5) 金森: 西京大学学術報告, 農学, 第2号。
- (6) 本報告は1951年5月4日, 日本農芸化学会大会に於て講演。

Summary

(1) I have realized, 0.9%-NaCl-soluble and water-soluble protein of horse spleen are compose of component I. II. III. IV by electrophoretic analysis.

(2) I have calculated the mobility of component I. II. III. IV at 4°C , N/10 phosphate buffer ($\mu=0.1$ pH=8.0)

(3) To isolate the ferritin from horse spleen protein it can obtain by the fractionated precipitation of NaCl or $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ after the NaCl-extract or water-extract of spleen protein warm at 50°C for 10 mins, or without it, it can obtain only by the way of fractionated precipitation of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

(4) I have realized, the ferritin is homogeneous electrophoretically and the mobility of it is $-6.2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ at 4°C , N/10 phosphate buffer solution ($\mu=0.1$ pH=8.0) and iron content of it is 21.21% against protein and the form of ferritin iron is all ferric state.

(5) I have realized, the protein which is except component II and ferritin which is fractionated from horse spleen protein by the author is di- or tri-component protein.

(6) I have decided, component I. II. IV is coagulate irreversible and component III is not coagulate in the state of warm at 50°C for 10 mins.