

人間と魚類の血清蛋白質に関する 比較生化学的研究

齋 藤 要

緒 言

血液は血管系を通じて生体内を速やかに循環し、組織とか器管の内部環境の一部として生命現象の維持にあずかる複雑な流動体である。血液から細胞（主として血球）をとり除いた液体は血漿（plasma）で、血漿より fibrin を除いた液体を血清（serum）と称する。

血清は多くの無機及び有機の化合物を含む複雑なコロイド溶液で、血液が生体内を循環している時は血球を浮かべ、また生体に必要な、あるいは不必要となった物質の運搬作用をなし、その一成分である血清蛋白質は栄養、免疫及び体液調整作用などに関与する血液の基本的構成物質であるといわれている⁽¹⁾。従ってその理化学的性質について動物の分類学上の位置による種族特異性の有無を検討することは単に比較生化学的な立場より興味深い研究課題であるのみならず動物の生理、生態的な諸現象を理解するための基礎資料としても価値あるものと思われる。

従来、血清蛋白質の理化学的性質に関する研究は、人間をはじめとする陸棲脊椎動物を対象としたものが多く、下等脊椎動物である魚類を対象とした研究は極めて少ない。また単に魚類と称しても、それには分類学上の位置を異にする硬骨魚類と軟骨魚類とがあり、さらに棲息環境を異にする淡水魚類と海水魚類とがある。

著者は、これらの脊椎動物相互間の生理、生態的諸現象には著しい相異が

(1) F. Wuhrmann, C. Wunderly: "Die Bluteiweisskörper des Menschen"
Benno Schwabe Co., Basal, (1952), p. 141.

あることから、それとの関連において血液の諸性質における種属特異性に関する研究を続け、若干の結果を報告してきたが、本論文では血清蛋白質の組成について比較生化学的立場より検討して得た結果の要約を述べることにする。

I 実 験 の 部

実験材料：

実験材料は人間及び魚類(15種)ともに成体で、同種の材料には出来得る限り、棲息環境、採集の時期、その他生理、生態的諸条件の類似したものを使用し、特に採血時に苦悶の激しかった個体は除外した。その理由については既に報告してある。

採 血 法：

人間は常法により、また魚類は鰓孔の後部膜を切開して心臓を幾分露出させ、注射針を動脈球から心室の方向に入れ、心臓の縮期に従って採血した。

血清の分離法：

血液を冷蔵庫(4~6℃)の中に約6時間放置したのちに遠心分離(3000rpm, 10分間)して得られる血清を使用した。

II 血清蛋白量と血清非蛋白態窒素量にみられる種属特異性

著者は既に人間と魚類の血液及び血漿の蛋白量について検討した結果を報告しているが、さらに血清蛋白質の組成を検討するに先立ち供試血清について蛋白量と非蛋白態窒素量を求めたところ、それらの量に種属的差異のあることと血清蛋白計の使用は供試動物の種類によって吟味する必要のあること

(2) 斎藤要：日水誌, 19, 1134 (1954).

(4) 同誌, 20, 196 (1954).

(6) 同誌, 20, 881 (1955).

(8) 同誌, 22, 752 (1957).

(10) 同誌, 22, 768 (1957).

(12) 同誌, 24, 531 (1958).

(14) 同誌, 7, 192 (1959).

(3) 同誌, 19, 1139 (1954).

(5) 同誌, 20, 202 (1954).

(7) 同誌, 20, 885 (1955).

(9) 同誌, 22, 760 (1957).

(11) 同誌, 22, 773 (1957).

(13) 鹿児島大学紀要, 5, 160 (1957).

(15) 同誌, 9, 1 (1961).

を明らかにし得た。

実験方法：

蛋白態窒素及び非蛋白態窒素の定量は標準法である Micro-Kjeldahl 法⁽¹⁶⁾を用い、さらに日立製蛋白計 PRP-B型) による測定も併用した。また尿素及び trimethethylamine oxide は、それぞれ Urease-Nessler 法⁽¹⁷⁾と Dyer 改良法^{(18),(19)}により定量した。

実験結果及び考察：

供試血清について蛋白態窒素量と非蛋白態窒素量を求めた結果の数列を示すと第1表の如くである。

第1表 供試血清の蛋白態窒素量と非蛋白態窒素量

供 試 動 物 (♂)	実 験 数	蛋 白 態 窒 素 量 (g/dl)	非蛋白態窒素量 (mg/dl)
人 間	10	1.18	31
コ イ Cyprinus carpio	15	0.82	44
フ ナ Carassius auratus	16	0.79	42
クロカジキ Makaira mazara	8	0.95	64
ゴマサバ Scomber tapeinocephalus	21	1.01	66
チダイ Evynnis japonica	10	0.86	53
ヒメダイ Pristipomoides filamentosus	6	0.82	57
シロザメ Mustelus griseus	13	0.51	1115
アカエイ Dasyatis akajei	6	0.53	1204

この結果からも蛋白量には人間が魚類よりも多い傾向のあることが理解される。また15種の魚類について検討した結果では、活動性の洄游性魚類は非活動性の魚類より一般に多く、さらに顕著な差異はシロザメの如き軟骨魚類では、人間の約 1/2 量を示すということである。このような種属的差異は単に血清蛋白量のみならず血液総蛋白量と相関性の高い特数 (赤血球平均恒

(16) 京都大学農学部農芸化学教室編集：“農芸化学実験書”，中巻，産業図書，東京 (1951) p. 505.

(17) 斎藤正行：“光電比色計による臨床化学検査”，南山堂，東京 (1962) p. 94.

(18) 佐々木林治郎，藤卷正生：日農化誌，27，420 (1953).

(19) 斎藤要，鮫島宗雄：日農化誌，30，531 (1965).

(14) 数, hemoglobin 量, 血漿蛋白量⁽⁴⁾にもみられるのである。

なお, 第1表の結果はほぼ同時期に採集した成体(♂)についての測定値であるが, 人血清に関する報告によると時期とか成長過程で多少の変動のあることが知られているが, 魚類でも同様な傾向の認められることについては^{(20),(21)}既に報告⁽¹²⁾してある。

つぎに, 動物の血清中には蛋白質以外の窒素化合物として尿素, アミノ酸, 尿酸, クレアチニン, クレアチン, アンモニアなどが含まれており, その多くは蛋白代謝の中間産物または終末産物である。供試血清について非蛋白態窒素化合物の総量をあらわす窒素量を求めた結果の数例を示すと第1表の如くである。

この結果からも非蛋白態窒素量には蛋白量とは逆に人間が魚類よりも少ない傾向のあることが理解される。また15種の魚類について検討した結果では, 一般に海水魚が淡水魚より多く, さらに顕著な差異はシロザメの如き軟骨魚類では, 人間の約35倍量を示すということである。これらの軟骨魚類の非蛋白態窒素化合物の主成分が尿素(H_2NCONH_2)及び trimethylamine oxide ($(CH_3)_3N \rightarrow O$) であることは第2表の結果から明らかである。

第2表 シロザメ (*Mustelus griseus*) とアカエイ (*Dasyatis akajei*) の血清に含まれる非蛋白態窒素の組成

供試動物(♂)	実験 例数	非蛋白態 窒素量 (mg/dl)	尿素態 窒素量 (mg/dl)	Trimethylamine oxide 態窒素量 (mg/dl)	揮発性塩基 態窒素量 (mg/dl)
シロザメ <i>Mustelus griseus</i>	5	1021	762	208	20
アカエイ <i>Dasyatis akajei</i>	3	1198	895	256	17

軟骨魚類では血液のみならず筋肉にも非蛋白態窒素量が極めて多いことは, 既に1920年代に Denis⁽²²⁾とか Smith⁽²³⁾氏などによって報告されている。

(20) 福山忠昭, 村田達雄: 山口臨床医学, 1, 25 (1953).

(21) 芳我考一: 慈大杉本生理論文集, 4, 498 (1961).

(22) W. Denis: J. Biol. Chem., 54, 693 (1922).

(23) H. W. Smith: J. Biol. Chem., 81, 407 (1929).

尿素は、人間では前述の如く蛋白代謝の終末産物として排泄されるが、これらの魚種では、両化合物を体内に保持することによって体液の滲透圧が海水よりもやや高くなっている。この滲透圧勾配が水の体内に入るのを促し、体内から尿素が逸失するのをふせぐために尿素に対し不透過性の鰓をもっており、また尿中へ逃げ去るのをふせぐために腎管の中に特別な尿素吸収節を有している。即ち軟骨魚類は硬骨魚より分類学上から下等といわれているが棲息環境に対しより合理的な滲透圧調整機能を有しているともいえるのである。

人血清以外への蛋白計 (屈折法) 使用の吟味 :

血清蛋白濃度の定量法として、標準法の Kjeldahl 法は操作が繁雑で、しかも時間を要するために最近では簡易測定法として蛋白計法が盛んに用いられるようになった。本法は、蛋白濃度と屈折率との間に比例的な関係のあることを利用した方法で、血清の使用量が二、三滴ですみ、複雑な操作が全くないために測定誤差の導入される余地が少なく、正確な測定値が得られるといわれている。^{(24)~(26)} 著者も本実験で日立製 PRP-B 型蛋白計の使用を試みたところ、第 3 表に示したような結果を得た。

第 3 表 供試動物の屈折法と Micro-Kjeldahl 法による血清蛋白測定値

供 試 動 物 (♂)	実 験 例 数	血清総蛋白質量 (g/dl)	
		屈 折 法 [*]	Micro- Kjeldahl 法
人 間	6	7.7	7.2
コ イ <i>Cyprinus carpio</i>	6	5.4	5.1
ゴ マ サ バ <i>Scomber tapeinocephalus</i>	6	7.1	6.8
マ ア ジ <i>Trachurus japonicus</i>	5	6.6	6.1
シ ロ ザ メ <i>Mustelus griseus</i>	5	5.2	3.5
ツ ノ ザ メ <i>Squalus mitsukurii</i>	5	5.6	3.2
ア カ エ イ <i>Dasyatis akajei</i>	6	5.8	3.0

* 日立製蛋白計 (PRP-B 型) による測定値

(24) 吉川春寿 : 日新医学, 34, 6 (1957).

(25) 藤井暢三 : “生化学実験法” 南山堂, 東京 (1955), p. 514.

(26) 入沢宏, 入沢彩 : 広島医学, 7, 436 (1964).

即ち、供試血清のなかで人間とか硬骨魚では、Kjeldahl 値との間に大差はないのであるが軟骨魚の血清では、蛋白計値が Kjeldahl 値の 1.5 倍から 2 倍を示すのである。この事実からしても蛋白計法は供試動物の種類によっては正確を期し難く、その使用には吟味を要することが明らかである。もともと本法は血清中の蛋白質以外の成分濃度がほぼ一定であるという仮定のもとに考案されたものであるが、前述の如き異常のずれは人間と軟骨魚の非蛋白態窒素量にみられる種属特異性と関連のある現象と考えられる。そこでつぎの検討を行った。

軟骨魚の供試血清を 磷酸塩緩衝液 ($\text{Mol}/15 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ — $\text{Mol}/15 \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ 混液, pH 7.3) に対し約 4℃ で 10 時間透析した試料について蛋白量を求めると蛋白計値が Kjeldahl 値の 1.2 倍から 1.3 倍を示し、原血清にみられた大差が消失するのである。この結果より蛋白計の異常なずれには、尿素量とか trimethylamine oxide 量が関係していることは明らかであり、さらに試料の血清蛋白組成にみられる種属特異性(後述)も無視し得ない一因をなしていると思われる。従って、本実験では Kjeldahl 法により蛋白量を求めたが、ときには脊椎動物は勿論、無脊椎動物の体液蛋白量を蛋白計で測定した報告⁽²⁶⁾もみうけるが、その結果には疑問がある。また人間の場合でも腎不全により尿素量が増加した血清では、その影響は当然考えておくべきであろう。

Ⅲ 血清蛋白組成にみられる種族特異性

1. Tiselius 法による分析

前述の如く供試血清の蛋白量にはかなりの種属的差異が認められるのであるが、その差異の生化学的意義を知るためには同蛋白の組成について検討することが必要である。

近年、蛋白質の理化学的研究法の進歩に伴い蛋白質の分割に電気泳動法が使用されるようになり、その混合系を分析して量的組成や蛋白成分の種類を決定することが比較的迅速かつ正確に行い得るようになった。特に Tiselius 法は再現性のある分析法として一般に用いられている。本法による血清蛋白

質の組成に関する研究は多数あるが、それは高等脊椎動物を主体としたもので下等脊椎動物についての研究は極めて少ない。特に海産の硬骨魚と軟骨魚を対象とした系統的研究はみあたらず、僅に Deutsch & Gooloe⁽²⁷⁾ 氏、Deutsch & McShan⁽²⁸⁾ 氏などが各種の陸棲脊椎動物と共に淡水産のコイ及びナマズなどについて報告しているに過ぎない。そこで著者は、これらの淡水魚とは棲息環境と分類学上の位置を異にする 13 種の海産硬骨魚と軟骨魚を主体とし、本法により血清蛋白質の分析を行ったところ、人間とは勿論、魚種間にも種属特異性のあることを明らかにし得た。

実験方法：

既に報告した如く、人間に比べて魚種の赤血球は一般に溶血し易いため分離した血清が hemoglobin によって着色することがある。また、その血清にも人間の血清 lipamia に類似した溷濁現象がしばしばみられた。このような血清より得られた泳動図では α -globulin あるいは β -globulin 区分附近の泳動峰が増大する傾向も認められたので、分析値に少なからぬ影響を与えると思われる程度に溶血あるいは溷濁した血清は除外した。

泳動装置と泳動条件：供試血清の泳動には日立製 Tiselius 装置 (HT-B 型) を用い、電気泳動研究会の標準法に準拠した条件で実験を行った。⁽²⁹⁾ 本法では、泳動試料の前処理として磷酸塩緩衝液 (Mol/10 KH_2PO_4 1 容—Mol/10 Na_2HPO_4 16 容混液, pH 8.0, μ 0.28) で稀釈してから、セロファン紙囊に入れ、40 倍量の Mol/20 同緩衝液に対して約 4℃ で 20 時間透析するのであるが、軟骨魚の血清には透析操作の過程ですら析出する特殊な蛋白質が存在するという興味深い現象が観察された。この蛋白質については後述するが、本泳動には、その透析上澄液を用いた。

実験結果：

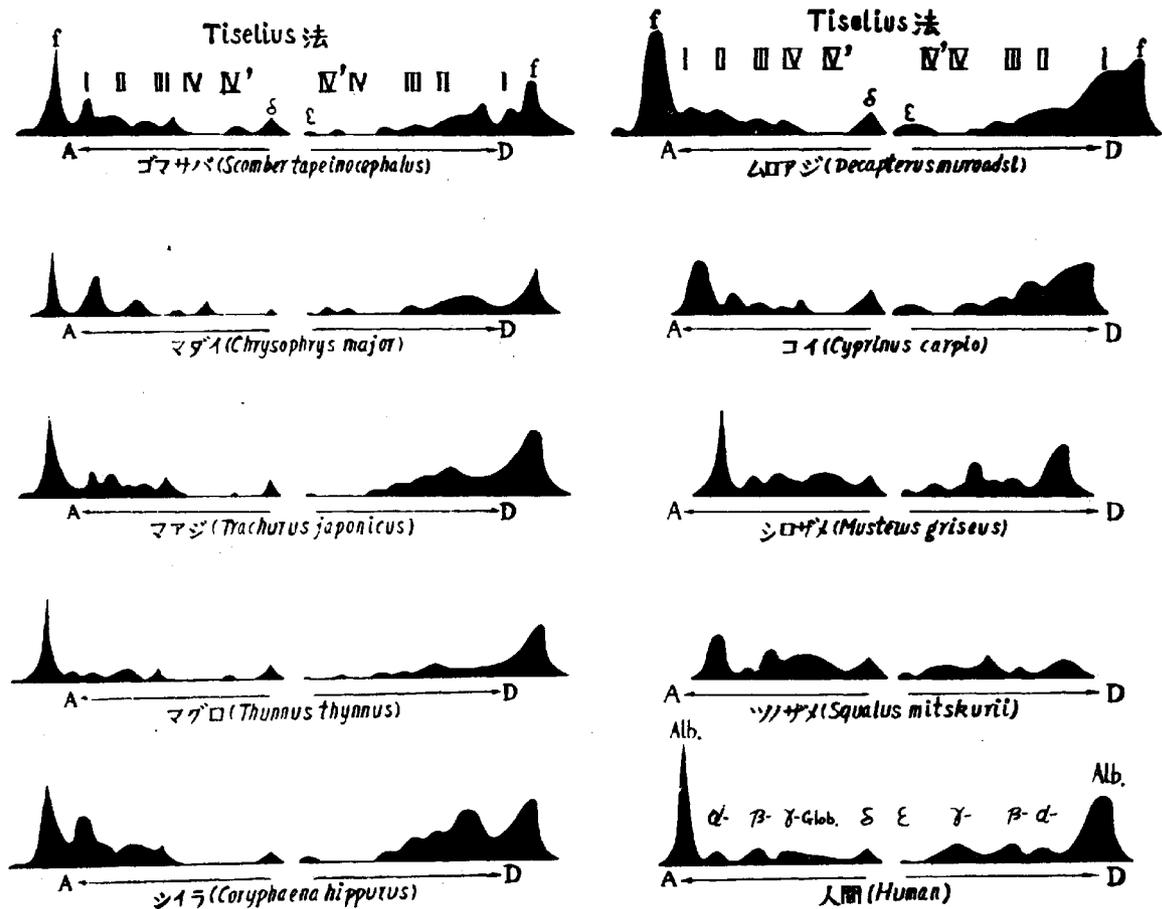
本泳動条件下における血清蛋白質の泳動過程を観察すると、各試料ともに

(27) H. F. Deutsch, M. B. Goodloe: J. Biol. Chem., 161, 1 (1945).

(28) H. F. Deutsch, W. H. McShan: J. Biol. Chem., 180, 219 (1949).

(29) 電気泳動研究会：生物物理化学, 2, 392 (1964).

第 1 図 供試動物の血清蛋白泳動図



泳動条件：磷酸塩緩衝液 pH 7.8, μ 0.14, 電流強度 0.27 mA/mm², 泳動時間上昇脚 3000 秒, 下降脚 3300 秒, 泳動温度 10℃, 蛋白質濃度 1.6~1.8 g/dl.

泳動開始後 30 分は成分の分離が一般に不十分で, 約 45 分後より良好となる。つぎに泳動開始後 50 分 (上昇脚) 及び 55 分 (下降脚) に撮影した供試血清の泳動図の数例を示すと第 1 図の如くである。

この結果によると供試動物の種類により泳動図にはかなりの差異が認められる。また同一血清でも上昇脚 (A) と下降脚 (D) とでは濃度勾配曲線の形が異なり, 両者間に鏡像的な関係はみられない。一般に上昇脚は下降脚よりも泳動速度は早く, 且つ各成分の分離能も良好である。

蛋白質の分類：Tiselius 氏によって人間の血清蛋白質は電気泳動的には易動度の順に albumin, α-, β-, 及び γ-globulin に分けられることが明らかにされている。⁽³⁰⁾ 本泳動条件下でも人間の血清蛋白質は前記 4 区分に分離するこ

(30) A. Tiselius: Biochem. J., 31, 313 (1937).

とは第1図の結果から明らかである。ところで泳動分析に伴う一つの制約として、ある成分の量的な変化から、そこに含まれる質的な変化の内容を充分に知ることが出来ないため泳動峰の数と蛋白組成との関係については現在もなお種々議論されている。この点が Tiselius 法によって、異種動物間の蛋白組成を比較検討する場合の問題点であるが、著者は易動度の近似値な成分を一群として *f*, I, II, III, IV 及び IV' の各区分に分類して論ずることにした。

供試血清について蛋白濃度比と相対易動度を求めた結果の数例を示すと第4表の如くである。

第4表 供試血清蛋白質の濃度比と相対易動度 (Tiselius 法)

供 試 動 物 (♂)	実験 例数	成 分						Alb.* Glob.
		<i>f</i>	I	II	III	IV	IV'	
コ イ Cyprinus carpio	14		55.7 96.0	16.2 77.9	20.5 56.3	7.6 36.9		1.3
フ ナ Carassius auratus	4		53.4 99.5	17.0 78.3	25.5 58.1	4.1 39.2		1.1
マ グ ロ Thunnus thynnus	8	54.3 122.4	16.2 101.5	19.4 78.9	7.9 59.1		2.2 16.6	2.4
ゴ マ サ バ Scomber tapeinocephalus	12	47.4 118.6	20.2 102.3	22.1 79.4	8.3 54.3		2.0 17.1	2.1
シ イ ラ Coryphaena hippurus	5	41.5 120.3	23.2 102.3	26.6 77.3	8.7 58.5			1.8
マ ダ イ Chrysophrys major	7	34.8 120.4	37.0 96.1	18.4 75.5	4.7 54.9	5.1 34.6		2.5
シ ロ ザ メ Mustelus griseus	6			35.9 83.5	11.1 63.7	19.4 48.9	33.6 17.9	
ツ ノ ザ メ Squalus mitsukurii	10			33.3 84.0	7.2 67.3	24.6 46.2	34.9 18.4	
人 間	8		Alb. 56.8 100.0	α - Glob. 8.1 79.2	β - Glob. 14.6 60.5	γ -Glob. 22.5 21.5		1.3
家 兎	4		58.2 102.4	8.7 76.6	10.8 62.3	20.3 21.8		1.4

各供試魚共に上段の数値は濃度比、下段の数値は相対易動度を表わす。

* 区分 *f* 及び I を albumin 区分として求めた値を示す。

泳動条件：M/20 磷酸塩緩衝液 pH 7.8, μ 0.14, 電流強度 0.27 mA/mm², 泳動時間 3300 秒, 泳動温度 10°C, 蛋白質濃度 1.6~1.8g/dl.

相対易動度：人間の血清 albumin の移動量を 100 として求めた各成分の相対易動度を供試血清について検討すると、海産硬骨魚に属するゴマサバなどの血清では高易動度区分に人間の血清 albumin より易動度の高い区分 *f* が認められるのに対し淡水産硬骨魚に属するコイなどの血清では *f* 区分の存在を確認出来なかった。また軟骨魚に属するシロザメなどの血清では区分 *f* のみならず、その易動度からみれば人間の血清 albumin に相当する区分 *I* もみられなかった。即ちこれらの血清には、泳動的に globulin 成分しか認められないという顕著な種属特異性のあることが了解される。

つぎに低易動度区分の組成をみると人間と魚類間にはかなりの差異がみられ、特に軟骨魚には *IV* 及び *IV'* 区分が明らかに認められる。

濃度比：供試血清の泳動図より planimeter 法で求めた各区分の平均濃度比を第 4 表に併記した。なお供試動物について成長度とか採集時期のほぼ等しい同種の個体間では濃度比が比較的一定であることを確認している。第 4 表の結果によると淡水産硬骨魚に属するコイの血清では、人間の場合と同様に易動度からみれば血清 albumin に相当する区分 *I* が各区分中で最大濃度比を示している。これに対し海産硬骨魚に属するゴマサバなどの血清では、区分 *f* が最大濃度比を示す傾向がみられ、さらにこれらの硬骨魚では、人間に比べ γ -globulin に相当すると思われる低易動度区分の濃度比が極めて低く、その存在が泳動的に確認出来ない試料すらあったことも注目すべき事実である。つぎに海産軟骨魚に属するシロザメの血清では区分 *II* と *IV'* の濃度比が他の区分よりも高い結果となっている。

albumin と globulin の比：供試血清の区分 *f* 及び *I* を易動度より albumin 区分、他の区分を globulin 区分として求めた両区分の比 (A/G) を第 4 表に併記した。この結果によると、人間に比べ海産硬骨魚に属する魚種の A/G 値は高くなっている。

以上述べた如く Tiselius 法による分析結果では人間と魚類とでは血清蛋白質の高低両易動度区分にわたって質的にも、また量的にもかなり種属特異性が認められるのである。

2. 濾紙電気泳動法による分析

本法に関しては Wieland 氏などによる⁽³¹⁾発表以来多くの検討と改良が加えられ、特に 1951 年 Grassmann 氏などにより泳動後の濾紙から比較的簡単に泳動曲線を求める直接比色法が⁽³²⁾考察されてからは血清蛋白質の分析法として普及し、その後、濾紙の代りにセルローズアセテート膜を使用する方法が広く普及しているが、ここでは濾紙電気泳動法によって得られた結果をのべることにする。

本法の分析精度は Tiselius 法より劣るが、一方独自の長を有する。例えば後法では、実施困難な微量血清でも容易に検討し得るのみならず血清中の複合蛋白質の分析をも同時に行えるのである。著者は、供試血清についての泳動条件を吟味し、その結果に基づいて血清蛋白質の分析を行ったところ、本法によっても供試動物間にかなり種属特異性のあることが再確認出来た。

A. 泳動条件

Tiselius 法の泳動条件に関しては電気泳動研究会の標準法が⁽²⁹⁾規定されているが濾紙電気泳動法では現在のところ基準はないから装置或は試料の種類に応じて泳動条件を検討する必要がある。そこで供試血清について予備実験を行ったが、つぎにその結果の概要を述べる。

泳動装置：一般に本法の装置は、Grassmann-Hannig 式あるいは Kunkel-Tiselius 式の改良型であるが、本実験には東洋濾紙式泳動装置 C 号を用いた。著者は本装置をそのまま使用すると通電中に電極槽より発生するガスのため泳動像の乱れることを確め得たので開放型の電極槽を密閉型に改め、内部に発生したガスを装置外へ排気し得るように改造して好結果を得た。また血清蛋白質の泳動には濾紙の長さ約 20 cm で充分であるから本装置に附属している濾紙保持枠のベークライト板間の距離を約 18 cm に短縮し、さらに泳動をほぼ一定の温度 (8℃) で行うために装置を低温恒温槽中に納めて使用

(31) T. Wieland, E. Fischer: Naturwissenschaften, 35, 29 (1948).

(32) W. Grassmann, K. Hannig, M. Knedel: Deut. Med. Wochschr., 76, 333 (1951).

した。

血清使用量：この量は、試料の蛋白濃度あるいは使用する濾紙の巾などにより加減する必要がある。著者の検討した結果によると濾紙巾1 cm 当り蛋白質として0.3~0.4 mg 量が適当であった。

濾紙の種類：我国では東洋濾紙の No. 50 及び No. 51 が多く用いられているが前者は蛋白質に対する吸着作用が強いためか泳動速度は後者に比べてかなり遅い傾向がみられたので本実験では No. 51 を使用した。

緩衝液の種類とイオン強度：人間の血清蛋白質の泳動には多く veronal 緩衝液が用いられている。しかし veronal 及びその塩類は高価でもあるため、著者は磷酸塩、硼酸塩及び炭酸塩緩衝液を試験的に用いてみた。その結果これらの緩衝液では通電による液自体の pH の変化が一般に veronal 緩衝液よりも大きく、また硼酸及び炭酸塩緩衝液では血清蛋白質の各区分が濾紙上に広く拡散したかのような泳動図を示し、泳動像相互間の境界が veronal 緩衝液を用いた場合に比べて不明瞭となるが多かった。つぎに供試血清について所定イオン強度の veronal 緩衝液（例、イオン強度 $\mu=0.1$ の場合の組成：1 l 中に veronal-Na 5.88 g, 酢酸ソーダ 3.88 g, 蔞酸カリ 1.38 g 及び Mol/10 HCl 20 cc を含む, pH 8.9）と磷酸塩緩衝液（例、 $\mu=0.14$ の場合の組成：Mol/20 Na_2HPO_4 16 容と Mol/20 KH_2PO_4 1 容の混液, pH 7.8）を用いて泳動した後に bromophenol blue (BPB) で常法により染色した結果⁽³³⁾によると、供試血清蛋白の泳動速度は磷酸塩緩衝液中では veronal 緩衝液の場合より早くなるが、一方泳動像の鮮明度及び分離能において前者が後者より幾分劣るようである。またイオン強度が 0.05 の場合は両液とも高易動度区分 (albumin 区分) の泳動速度が余りにも早いため泳動像は不鮮明となり、しかも低易動度区分 (γ -globulin 区分) は幾分陰極側に泳動する傾向がみられる。一方イオン強度 0.2 の場合は泳動速度が極めて遅く、各区分の分離が悪い結果となっており、イオン強度 0.1 では前二者に比べて泳動像は鮮

⁽³³⁾ 森 五彦, 小林茂三郎：“濾紙電気泳動法の実際”, 南江堂, 東京 (1960), p. 108.

明で且つ各区分の分離も良好であった。なお、泳動速度は一般に酸性側では遅く、アルカリ性側では早くなる傾向がみられ、また各血清とも緩衝液のpHは6.0及び7.0の場合より8.0及び8.9の方が分離した成分数が多いという結果を得た。

電流強度と緩衝液の使用回数：濾紙電気泳動法には定電流と定電圧の何れがよいかは種々議論もあるが著者は定電流を使用し、電流強度の影響をveronal緩衝液(pH8.9, μ 0.1)を用い、供試血清について検討した結果によると0.3~0.4 mA/cmの場合が泳動像も鮮明で、しかも各成分の分離精度は良好であった。一般にこれより強電流では速く泳動するが像は乱れがちとなり、これより弱電流では泳動が遅く、且つ分離能も悪くなる傾向がみられた。つぎにveronal緩衝液は使用回数に伴って液自体のpHが変化し、各成分の泳動速度は低くなるようである。そこで再使用の緩衝液でも泳動速度を調節する意味で電流値を変えることにより新緩衝液と同様な泳動図が得られるか否かについて検討したが、その結果は電流値を高めても高易動度区分の泳動が新緩衝液の場合より遅くなるのに対し低易動度区分は速くなる傾向がみられた。すなわち、相対易動度の基準となる血液 albumin の移動量を一定にしても他の区分がそれに対して常に比例的な割合に移動するとは限らず、電流値とか緩衝液の新旧によって、移動量が変化することが明らかである。従って著者は定量値を求める泳動には総て同一電流値と新緩衝液を用いることにした。

B. 供試血清に対する透析処理必要の有無に関する検討

供試動物中で特に軟骨魚の血清には極めて多量の非蛋白態窒素化合物が含まれていることについては既に述べた。Tiselius法では透析処理後の血清を使用するから、原血清に含まれている低分子化合物の影響は殆んどないものと思われるが、本法では一般に原血清をそのまま使用するから軟骨魚の如き特異な組成を有する試料においては共存する物質が泳動結果に影響をおよぼす可能性も一応考えられるので若干の検討を行った。

ツノザメの血清をセロファン紙囊に入れ約4℃の磷酸塩緩衝液中で20時

間透析したものと原血清とについて求めた泳動図は類似し、両者の主要蛋白区分の濃度比と相対易動度を示すと第5表の如くである。

第5表 原血清と透析血清中の蛋白質主要区分の濃度比と相対易動度
試料 ツノザメ *Squalus mitsukurii*

使用血清	成 分		
	2	3	4
原血清	33.4	14.8	38.7
	84.6	54.2	32.9
透析血清	35.1	17.5	36.4
	86.2	52.9	31.1

上段の数値は濃度比，下段の数値は相対易動度

泳動条件：Veronal 緩衝液，pH 8.9， μ 0.1，電流強度 0.32 mA/cm，泳動時間 20 時間，泳動温度 7~10℃。

この結果より両血清の分析値間に大差のないことは明らかで、この程度の差は、本法では許容誤差の範囲内であることを確かめている。従って血清中の非蛋白態窒素化合物の影響は特に考慮する必要がなく、原血清をそのまま使用しても差し支えないと考えられる。さらに前述の如く軟骨魚の血清には透析操作中ですら析出する特殊な蛋白質が少量ながら存在する事実よりしても原血清を使用することが望ましいと思われるので本実験においては透析処理を行わなかった。

C. 血清蛋白質の分析

前述の諸結果に基き、著者は各試料とも原血清を用い、新 veronal 緩衝液 (pH 8.9, μ 0.1), 電流強度 0.32 mA/cm, 泳動時間 20 時間, 泳動温度 7~10℃ の条件で分析を行った。

本法によると人血清は易動度の順に albumin, α_1 , α_2 , β 及び γ -globulin の 5 区分に分離し Tiselius 法の場合と分離能の異なることが了解される。従って両法による分離区分相互間の同定については検討すべき問題があるので一応 Tiselius 法の分離成分とは異なる記号を用い、相対易動度の近似的な成分を一群として F, 1, 2, 3, 4, 5 及び 6 の各区分に大別した。

相対易動度及び濃度比：泳動後の濾紙を常法により amidoschwarz 10-B

で染色し、東洋理化工業式濾紙光電比色計 (filter-VO 2) によって両者の値を求めた結果は第6表の如くである。

第6表 供試血清蛋白質の濃度比と相対易動度 (濾紙電気泳動法)

供試動物 (♂)	実験 例数	成 分						
		F	1	2	3	4	5	6
コ イ Cyprinus carpio	7		48.7 97.6	11.2 72.1	21.8 50.3	10.2 37.4	8.1 17.4	
マ グ ロ Thunnus thynnus	5	47.2 120.2	14.4 93.4	24.1 70.6	11.4 47.2		2.9 15.3	
ゴ マ サ バ Scomber tapeinocephalus	9	33.8 115.7	10.2 103.0	32.5 73.3	16.9 48.2		6.6 14.5	
シ イ ラ Coryphaena hippurus	5	33.4 118.4	24.6 91.4	22.3 68.7	13.5 50.5	6.2 25.3		
ム ロ ア ジ Decapterus muroadsi	4	49.4 114.2	10.6 91.4	28.1 72.7	9.8 46.3	2.1 22.8		
マ ダ イ Chrysophrys major	3	26.8 119.6	25.7 92.2	26.2 78.8	14.0 53.0	7.3 26.1		
シ ロ ザ メ Mustelus griseus	13			35.4 86.0	18.6 51.9	33.3 30.9	9.0 10.6	3.7 3.2
ツ ノ ザ メ Squalus mitsukurii	10			33.0 86.0	13.1 51.0	39.4 29.2	10.4 9.7	4.1 4.5
ア カ エ イ Dasyatis akajei	6			25.9 88.5	22.2 64.6	32.9 31.4	12.1 12.7	6.9 3.5
ア カ エ イ Dasyatis akajei *	1			23.7 87.3	9.2 56.6	29.3 29.1	31.7 10.4	6.1 -12.1
人 間	6		Alb. 54.3 100.0	α_1 - Glob. 3.6 85.0	α_2 - Glob. 4.1 69.2	β - Glob. 13.3 47.7	γ -Glob. 24.7 16.1	

各供試魚共に上段の数値は濃度比、下段の数値は相対易動度を表わす。

泳動条件: Veronal 緩衝液, pH 8.9, μ 0.1, 電流強度 0.32 mA/cm, 泳動時間 20 時間, 泳動温度 7~10°C.

* 供試アカエイ中では大型 (体重 3830g) の特例で、一尾しか採集出来なかったが、本試料では区分 6 が幾分陰極側に泳動した。

人間の血清 albumin の移動量を 100 として求めた各成分の相対易動度を供試血清について検討すると、海産硬骨魚に属するゴマサバなどの血清では Tiselius 法の結果と同様に人血清 albumin より易動度の高い区分 F が明らかに認められ、しかも区分 F と区分 2 の濃度比が一般に高いのに対し淡水産硬骨魚に属するコイには区分 F がみられず区分 1 の濃度比が最も高い、

またこれら血清では人血清に比べて γ -globulin に対応する低易動度区分の濃度比が極めて低い結果となっている。一方軟骨魚に属するシロザメなどの血清では区分 F のみならず易動度からみれば albumin に相当する区分 1 の存在も確認出来なかった。また濃度比では、区分 2 及び 4 の値が他の区分より高い。さらに軟骨魚の血清には人血清の γ -globulin より易動度の低い区分 (5 及び 6) の存在することが Tiselis 法の結果よりも顕著に認められた。特に区分 6 は原点附近より殆んど泳動しない区分で濃度比は 4~6% を示し、供試動物中では、軟骨魚の場合にのみみられる特殊な蛋白質である。前述の如く軟骨魚の血清には生理的 pH に近い磷酸塩緩衝液中で析出する蛋白質が存在するが、この析出蛋白を除いた血清では区分 6 が殆んど認められなくなり、また析出蛋白を単独で泳動すると、それが原点附近より殆んど移動しないことも確かめている。さらに一般的な事実として易動度の低い蛋白質ほど塩類溶液に対する溶解度の低いことも知られている⁽³⁴⁾。これらの事実より区分 6 は前述の緩衝液中で析出する特殊な蛋白質に相当する成分と推定される。

D. Tiselius 法の結果との比較

一般に Tiselius 法が濾紙電気泳動法に比べて血清蛋白質の分析にすぐれた精度を有することは周知の如くであるが、本実験で得られた両法の泳動結果について若干の比較検討を試みた。前述の如く Tiselius 法と、濾紙電気泳動法とでは同種の血清でも分離した血清蛋白質の区分数が必ずしも等しくなく、供試動物の血清では前法より後法の方が区分数が多くなっている。従って両法の区分番号は正確に対応するとは限らず、種類によっては同数番号の区分でも相対易動度と濃度比とにかなり差がみられる場合のあることは当然と思われる。相対易動度は両法ともに泳動条件により多少変化するが、特に濾紙電気泳動法ではその影響を受けることが多いようである。本実験では B P B を混入した人間の血清を各試料と同時に泳動し、相対易動度の基準となる albumin の移動量が一定となるように条件を規定したが、この場合で

(34) H. Svenson: J. Biol. Chem., 139, 805 (1940).

も他の区分は albumin に対して常に比例的な 役合に移動するとは限らず、濾紙上の位置によって各区分の泳動速度に高低のあることも観察された。この原因としては、両極よりの電気滲透の影響とか、ジュール熱による濾紙上の温度分布が必ずしも一様でないことなどが考えられる。濾紙電気泳動法では Tiselius 法に比べて一般に albumin 区分の濃度比が低くなっている。この一因として考えられることは、前法では血清蛋白質の一部が濾紙に吸着されるため後法の場合よりも電場で移動し難くなることである。さらに無視し得ない一般的原因として考えられることは蛋白質の濃度と色素結合量との関係が蛋白質の種類によって異なることである。^{(35),(36)} そのため人血清では albumin 及び globulin 区分の濃度比の実測値に補正係数を乗じて Tiselius 法の結果に一致させようとする試みがある。⁽³⁷⁾ しかし、このような係数が蛋白組成の異なる魚類の血清にも適用し得るとは考えられない。現に著者は後述する如く軟骨魚と他の供試動物とでは血清蛋白質と色素の結合性に著しい差のあることを明らかにしている。⁽¹⁵⁾

以上要するに濾紙電気泳動法の定量的応用については方法論的に多くの改良が行われていても、濾紙による蛋白吸着とか電気滲透あるいは蛋白質と色素の結合量などの問題には、本質的になお解決されていない点があると考えられる。従って未知要素の多い不等脊椎動物の血清分析には Tiselius 法による分析値と比較検討して論ずることが望ましい。

3. 塩析滴定法による分析

最近、塩類の飽和度を連続的に変化させ、それに伴って変化する蛋白質の溶解量や析出量から混合蛋白系を分析する方法が行なわれるようになった。例えば Tenow 氏等⁽³⁸⁾は筋肉の myosin 区を硫酸アンモニウム濃度の変化に従って変化する 278 m μ における減光率によって分析し、この区分には幾つか

(35) H.D. Cremer, A. Tiselius: Biochem. Z., 320, 273 (1960).

(36) F.A. Pezold, U. Peiser: Klin. Wochschr., 31, 982 (1963).

(37) H. Esser: Münch. Med. Wochschr., 93, 985 (1961).

(38) M. Tenow, O. Snellman: Biochem. et Biophys. Acta., 15, 395 (1964).

の成分の共存することを示している。また曾我美氏等は、^{(39),(40)}塩析による濁濁度と蛋白濃度との間に Beer 氏の法則と同一関係が成立することを確かめ、前述の減光率の代りに濁濁度を用い、この変化から人血清、卵白アルブミン及び肝細胞液の塩析滴定曲線を求めている。この方法は従来の塩析法のように窒素を測定する必要がなく、操作が簡単であるのみならず少量の試料で実施し得る長所がある。そこで、著者は本法によって供試動物血清の塩析滴定曲線を求めたところ、その組成と値にかなり種属特異性のあることを認めた。

⁽⁴⁰⁾濁濁度滴定法：供試血清を蛋白濃度約 0.4 g/dl によるように Mol/20 磷酸塩緩衝液 (pH 7.3) で稀釈し、その 5 cc を硫酸アンモニウム飽和溶液で滴定する。滴定後に一分間の振盪を行い日立光電光度計 (EPO-II 型) で濁濁度 (T) を求め、硫酸アンモニウム飽和度 (C) の変化 (ΔC) と T の変化 (ΔT) の値より $\Delta T/\Delta C$ を算出し、この値を縦軸に、(C) を横軸にとり塩析曲線を求めた。なお実験中の液温は約 20℃ とした。

実験結果：

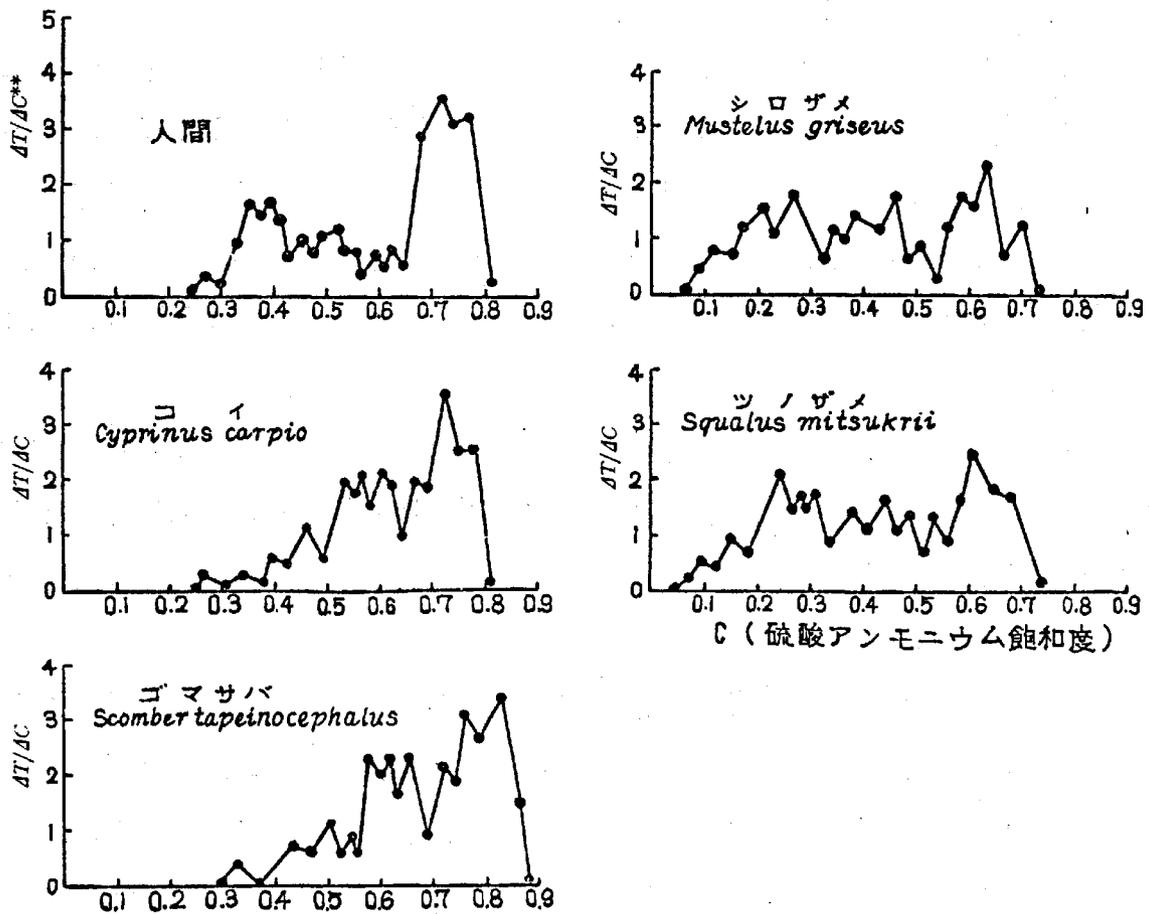
供試血清の塩析滴定曲線の数例を示すと第 2 図の如くである。(次頁)

図の結果よりも人間に比べて硬骨魚に属するコイ及びマサバの血清蛋白質には硫酸アンモニウムの低飽和度 (0.3~0.4) で析出する区分の少ないことが了解される。一方軟骨魚に属するシロザメ及びツノザメの血清では 0.3 以下の低飽和度で析出する区分がかなり認められるのに対し高飽和度 (0.7~0.8) で析出する区分が他の供試動物より極めて少ない結果となっている。また同種の試料の塩析滴定曲線と電気泳動図 (第 1 図) を比較すると、両者間にある程度の相似性が認められる。一般に易動度の大きい蛋白質ほど塩類溶液に対する溶解度の高い事実からして前述の低易動度析出区分と高易動度析出区分は各々電気泳動法の γ -globulin 区分と albumin 区分に対応する区分と推定されるが本法による分離峰の数は、電気泳動法の場合よりかなり多い結果となっている。この点については既に曾我美氏等も人血清で同様な傾

(39) 曾我美勝：日本生理学誌, 17, 125 (1955).

(40) 曾我美勝, 桃谷好英, 井上康夫：化学, 10, 851 (1965).

第2図 供試血清蛋白質の塩析滴定曲線*



* 濁濁度滴定法によって求めた曲線 (蛋白質濃度 0.4% 溶液)

** ΔT は濁濁度の変化量, ΔC は飽和度の変化量, $\Delta T/\Delta C$ は正規確率紙上に求めた積分型の滴定曲線より算出した値。

向のあることを確認し、本法は混合蛋白系の簡単な微細分割法ともいえる。⁽⁴⁰⁾

次に軟骨魚の血清中には生理的 pH に近い Mol/20 磷酸塩緩衝液中ですら析出する特殊な蛋白質の存在することは既に述べたが、この場合の濁濁度を本実験の稀釈条件で求めると、他の試料が $T=100\%$ であるのに対し $T=83\sim 87\%$ (総蛋白質の 6~8%) を示す。これも顕著な種属特異性の一つである。なお濁濁液に少量の硫酸アンモニウムを添加 (飽和度 0.05~0.06) すると、濁濁が殆んど消失することから軟骨魚の血清にみられる特殊な蛋白質は、ほぼ一定のイオン強度で顕著な塩溶効果を示すのであるが、これは同血清の氷点降下度が他の脊椎動物の場合よりかなり高い事実と関係のあることとも考へられ興味深い現象である。

Ⅳ 血清複合蛋白質の組成にみられる種属特異性

単に血清蛋白質と称しても人間等では、そのなかにリポ蛋白質とか糖蛋白質の如き複合蛋白質の存在することが明らかにされている^{(41)~(43)}。しかるに魚類の血清複合蛋白質に関する研究としては僅に Drilhon⁽⁴⁴⁾氏がコイとウナギのリポ蛋白質について検討した報告を知る程度で、糖蛋白質については未だ研究されていないようである。著者は濾紙電気泳動法の長所、即ち Tiselius 法では実施不可能な複合蛋白質の分析をも同時に行えることを利用し、供試動物について血清中のリポ蛋白質のみならず、新に糖蛋白質をも各々 sudan black-B (SBBと略す) 反応と periodic acid-Schiff (PASと略す) 反応にて検討したところ、供試動物間の両蛋白質の泳動的性質がかなり異なるという結果を得た。

泳動条件：泳動装置及び操作は、Ⅲの2と略々同様であるが、本実験では血清使用量を約2倍(0.5~0.6 mg/cm)にして泳動した。これは単位蛋白質量に対するSBB反応とPAS反応の呈色度(吸光度)がASIO-B反応の場合より小さいためである。

リポ蛋白質と糖蛋白質の検出法：これらは各々 Feldman⁽⁴⁵⁾法(SBB反応)と Hotchkiss-McManus⁽⁴⁵⁾法(PAS反応)に準じて行ったが、両法ともに細胞化学の分野で組織を対象とした方式であるから本実験では種々検討した結果に基き濾紙に吸着した両蛋白の検出に適するように反応時間と使用薬品の一部を改変して実施した。その大要は次の如くである。

SBB反応：泳動後の乾燥濾紙を50%アルコール液に5分間浸した後、SBB試薬を20分間反応させ、先づ同アルコール液で、次に純水で洗浄し乾燥後パラフィンに封入した。

PAS反応：泳動後の乾燥濾紙を、過ヨード酸液に5分間浸した後、純水

(41) H. A. Macheboeuf: Compt. rend., 188, 109 (1929).

(42) G. Blix: J. Biol. Chem., 137, 485 (1941).

(43) L. F. Hewitt: Biochem. J., 33, 1496 (1939).

(44) A. Drilhon: Compt. rend., 238, 940 (1964).

(45) 市川収：“細胞化学” 本田書店、東京 (1953), pp. 124, 177.

で洗浄し、次に Schiff 試薬を 20 分間反応させ亜硫酸水で洗浄し乾燥後パラフィンに封入した。なお Hotchkiss 氏の原法では過ヨード酸液で処理後、ヨードカリとチオ硫酸塩を含む還元剤で洗浄しているが、本実験ではその必要が全く認められなかったので省略した。

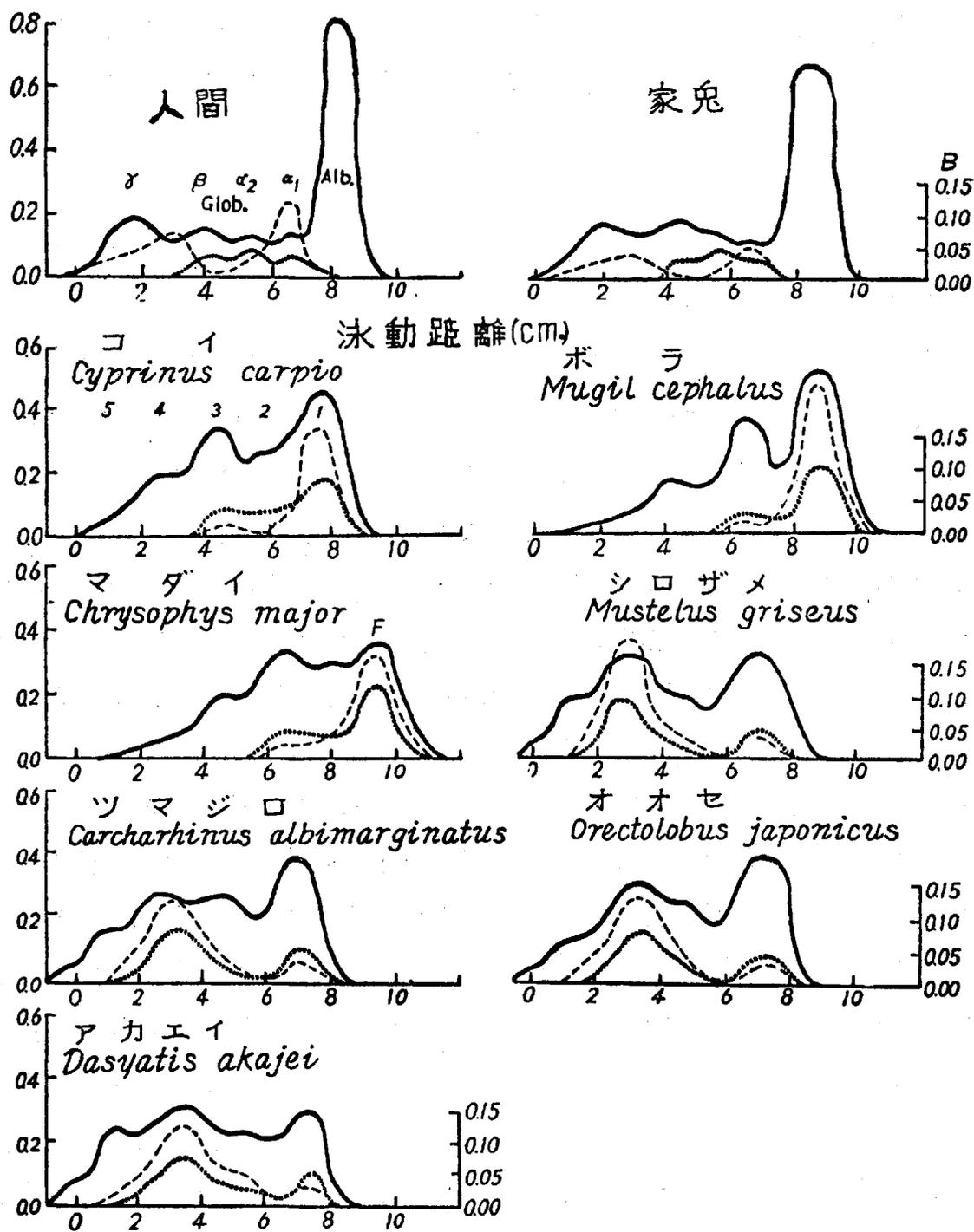
実験結果：

供試血清の全蛋白泳動曲線と、リポ蛋白及び糖蛋白の泳動曲線の数例を示すと第 3 図の如くである。(次頁)

これらの泳動曲線より各々の相対易動度を知り得るが、両蛋白質の正確な濃度比を求めるには、なお検討すべき問題があると考えられるので濃度については定性的に論ずることにした。図の結果による人間の血清では、糖蛋白質の反応が α_2 , α_1 , β -globulin 区分またリポ蛋白質の反応は α_1 , β と γ 間及び γ -globulin 区分の順に強く認められたが、易動度の最も高い albumin 区分には両反応が殆んど認められなかった。なお人血清では家兎の場合より前記各区分のリポ蛋白反応が強く認められることは図の結果より了解される。一方硬骨魚に属する、コイとかマダイの血清ではリポ蛋白質と糖蛋白質の反応が易動度の最も高い区分 F あるいは区分 1 即ち albumin 区分に顕著で、ほかに区分 2 及び区分 3 にも認められるが albumin 区分と、他の区分とではリポ蛋白質の呈色度に著しい差がみられる。また軟骨魚に属するシロザメ及びアカエイ等の血清では albumin 区分は認められないのであるが globulin 区分で易動度の最も高い区分 2 よりも区分 4 附近に両反応が顕著であって、特に両区分のリポ蛋白質の呈色度にかかなりの差がみられる。さらに人間と魚類を比較すると前者では、血清中の主要な糖蛋白質とリポ蛋白質とで易動度に明らかな差が認められるのに対し魚類では各々近似した易動度を示す傾向がみられる。

以上の結果から魚類にも人間と同様に複合蛋白の存在することは明らかであるが、相対易動度からみた両蛋白質の性質にはかなり種属的差異があると解される。さらに分類学上の位置が異なる動物間では、例え、近似した易動度を示す血清蛋白質区分でも、リポ蛋白質と糖蛋白質からみた相互の組成に

第3図 供試血清中の糖蛋白質とリポ蛋白質の泳動曲線



——— 血清蛋白質 (amidschwarz-10B 反応で検出)
 - - - - - リポ蛋白質 (sudan black-B 反応で検出)
 ····· 糖蛋白質 (過ヨード酸 Schiff 反応で検出)
 A : 血清蛋白質とリポ蛋白質の $-\text{Log } T.$, B : 糖蛋白質の $-\text{Log } T.$

は著しく異なる場合のあることも了解される。最近、哺乳動物を対象とした血清中の複合蛋白質の生理的機能特になん細胞との関係が明らかにされつつあるが、^{(46),(47)}それらの泳動的性質に前述の如き種属特異性の認められることは比較生化学的な立場からも興味深い現象と思われる。

V 考 察

本実験の結果によれば人間と魚類間は勿論、魚類間でも内部環境と外部環境との滲透圧勾配が異なる供試魚相互間の血清蛋白組成に明らかな特異性が認められるのであるが、この現象を血清蛋白の機能と関連づけて若干の考察を試みた。人血清蛋白の生理的機能に関する研究によると高易動度の albumin 区分は生体の組織蛋白に対する栄養的機能とか体液調整機能などにも関与している^{(1),(48),(49)}のであるが、ここでは高易動度血清蛋白区分の組成にみられた種属特異性を供試動物の体滲透圧の維持調整作用と関連づけて考えてみよう。

人間はさておき魚類血液の物理化学的な全滲透圧は必ずしも外部環境の滲透圧に適応した値を示さないから魚類にとって体滲透圧の維持調節作用は生存上特に重要な問題と考えられる。この作用については従来腎臓と鰓にある特殊細胞(塩類吸収細胞、塩類排泄細胞及び尿素吸収節など)の塩類とか尿素に対する調整機能にその説明を求めているようである。^{(50)~(53)}

このような細胞の機能は勿論環境に対する重要な適応現象とみられるが、そのみで体滲透圧の維持調節作用は充分解明されたわけではなく、未解決の問題も多いと云われている。⁽⁵⁰⁾一般に血清の示す物理化学的な全滲透圧は、含

(46) 村上 誠：生物と化学，5，118 (1967)。

(47) 坂上利夫，三成 修：蛋核酸酵素 (別冊) 219 (1967)。

(48) 黒田嘉一郎：“血液化学”，朝倉書店，東京 (1964) p. 514。

(49) 赤堀四郎，水島三一郎：“蛋白質化学” 3 卷，共立出版，東京 (1965)，p. 343。

(50) E. Baldwin：“比較生化学入門”，みすず書房，東京 (1956)，p. 23。

(51) F. Vles：“Cours de physique Biologique”，Vigot Frères Éditeurs, Paris (1927)，p. 113。

(52) E. Baldwin：“Dynamic Aspects of Biochemistry” Cambridge University press., (1966)，p. 112。

(53) J. A. Ramsay：“動物比較生理学”，納谷書店，東京 (1965)，p. 66。

有塩類量（軟骨魚では低分子窒素化合物量）に支配され、蛋白質は高濃度で存在するにも拘らず分子量が大きいため全滲透圧に対しては実際上の影響が少ないと思われる。しかし体液中の塩類量は棲息環境の如何を問わず脊椎動物では略々一定（約1%）である。⁽⁵⁰⁾ また生体内の水分保持作用とか体液交換作用は主として低分子イオンが細胞壁を容易に透過するのに対し蛋白質は透過し難いことなどのために起る流体静力学的圧ならびにコロイド的滲透圧の差によって行なわれるのである。例えば人間では血清 albumin が血清蛋白中で最も小さく（約7万、globulin は平均約30万）、しかも水和性（水和量約40%）の強い球状分子として体滲透圧と水分の調整機能に関与し、特に血液の示すコロイド的滲透圧の約80%は albumin によって保持されている。^{(1),(49),(54)} 勿論、人間と魚類とでは同様に論じ得ない要素があるにしても生体内における水分の代謝には高易動度血清蛋白区分の組成も関係すると考えられる。そこで、この関係を内部環境の滲透圧 (Δe) と内部環境の滲透圧 (Δi) との勾配に関連づけて検討してみる。

海産硬骨魚では Δi が Δe よりかなり低いために水の体外への逸散を防ぐと共に体内に水を積極的に保持する機能が必要であるが、これに属するものの血清蛋白には albumin に相当する区分1と、区分1より易動度の高い区分 f が略々最大濃度比で存在し、しかも A/G が他の供試動物より高いのである。また淡水産軟骨魚では Δi が Δe より高いために水の体内に入るのを促すので前者のように水を保持する機能を特に発達させる必要はないのであるが、これに属するものの血清蛋白には、区分 f が殆んど認められず、しかも A/G 値が高者よりも低いのである。さらに軟骨魚では血液中に多量の低分子窒素化合物を含むため Δi は Δe より幾分高いからコロイド的滲透圧の高い蛋白質の存在しないことが望ましいのであるが、これに属するものの血清蛋白には区分1と区分 f の albumin 区分が認められないのである。 f 区分、すなわち albumin より易動度の大きい成分は Vor-Fraktion または

(54) 平井秀松, 島尾和男: 生化学, 21, 54, 109 (1949).

Präalbumin と称せられ動物の体液中に微量ながら存在すると報告されている^{(27),(55),(56)}が、その生理的機能は殆んど不明といわれている^{(54),(57)}。本実験で確認した区分 *f* の泳動的性質は第4表と第5表に示したが、その泳動過程を観察すると区分1の泳動峰より時間の経過に伴って別れて来るようにみえること、さらに⁽¹⁴⁾塩析処理した場合の沈澱挙動とか色素イオンとの結合性などより考えて、血清蛋白中では分子量の小さい、水和性に富む成分と推察し得る。しかも同区分は海産硬骨魚の血清蛋白中に略々最大濃度比で存在することより、この区分は体組織にみられる水分調整作用とあいまって水分を水和性によって体内に保持すると同時に自由水の減少に伴う体滲透圧とコロイド的滲透圧の増大作用にも関与していると考えられる。この考察に対して、次に述べる事実は参考資料となろう。前述の如く区分 *f* は易動度からみれば人間の脳脊髄液の如き低蛋白濃度の体液中に多く発見される Präalbumin に対応する成分である。このような体液が生体内で生理的等張を保つには含有成分としてコロイド的滲透圧の高い蛋白質の存在を必要とするが、Präalbumin はその要求に応じた機能を果たしていることが充分考えられる。さらに入沢氏等は節足動物の体液蛋白を濾紙電気泳動法により検討したところ、海産のアカデガニ、フナムシ及びガザミの体液中には何れも albumin より易動度の高い成分が認められるのに対し陸棲のバッタ類には認められなかったと報告している⁽²⁶⁾。勿論、魚類と節足動物とでは体滲透圧の維持調節作用がかなり異なるから同一には論じ得ないが、分類学上同門に属する動物相互の間にも棲息環境を異にすると体液蛋白の組成に特異性がみられる事実として注目に値する。

次に低易動度血清蛋白区分の組成にみられる種属特異性であるが、硬骨魚では、人間の γ -globulin に相当する区分の濃度比が極めて低く時には存在が確認出来ぬ場合すらあった。人間ではこの区分が血清蛋白質の約20%を占め、種々の抗体を含み免疫現象などに関与する重要な成分といわれている

(55) H. Esser: Münch. Med. Wochschr., 94, 2316 (1962).

(56) G. Gries: Klin. Wochschr., 31, 644 (1963).

(57) 赤堀四郎: "酵素研究法" 1巻, 朝倉書店, 東京 (1965), p. 483.

る。しかし人間でも新生児ではこの成分が極めて少く、成長過程で変動することも知られている⁽⁴⁹⁾。また、同区分は、異種動物間でも一般的に進化、疾病、寿命などの諸条件で質的あるいは量的にも消長のある成分といえるが、これらの条件に人間と魚類とでは著しい差異があり、例えば人間の同区分には特定の細菌を溶解する Iysozyme をかなり含んでいるの⁽¹⁾に対し魚類の血清には同酵素が認められないのである。さらに軟骨魚の血清には γ -globulin よりかなり易動度の低い蛋白質の存在することを明らかにしたが、Connell 氏は、軟骨魚の筋肉中には硬骨魚に比べて易動度の極めて低い成分が多く存在していると報告している⁽⁵⁸⁾。この事実より血清蛋白質と筋肉蛋白質との間には、組成的にも関連性のあることが推察され、生化学的にも興味深い問題を提示していると思われる。

以上述べたように、人間と魚類の血清蛋白組成にみられる種属特異性は供試動物間の進化の段階及び生理・生態的諸条件の差異を反映する現象と考えられるが、これを、さらに究明するには特異蛋白の単離による理化学的性質の追求を基盤としてより高次の総合的研究を必要とすることは勿論である。

総 括

本論文においては人間と魚類を対象とし比較生化学的な立場より血清蛋白質の組成について検討した結果を述べたのであるが、若干の新しい実験的事実によって人間と魚類間には勿論、魚類相互間にも分類学の位置とか棲息環境等の相違を反映した種属特異性のあることを確認した。その結果を要約すれば次の如くである。

1. 魚類の血清蛋白量は一般に人間より少ない。特に軟骨魚類に属する魚種の蛋白量は人間の約 $\frac{1}{2}$ 量であるが、血清の非蛋白態窒素量は人間の約 35 倍量を示す。

2. 人間の血清蛋白濃度の簡易測定法として繁用されている屈析法（蛋白

⁽⁵⁸⁾ J. J. Connell: Biochem. J., 55, 378 (1953).

計法)は特異的成分組成を有する軟骨魚類に属する魚種の血清には使用し得ないことを明らかにした。

3. 供試動物の血清蛋白質組成を所定条件下の Tiselius と濾紙電気泳動法により検討したところ、海産硬骨魚類に属する魚種の血清には人間の血清 albumin よりさらに易動度の高い区分 f の存在が明らかに認められ、しかも人間では albumin が血清蛋白質中で最大濃度比を示すのに対し同魚種では f 区分が最大濃度比を示す傾向がみられた。また軟骨魚類に属する魚種の血清には区分 f のみならず albumin 区分の存在が認められず易動度からみれば globulin 区分の区分 II 及び IV' の濃度比が他の区分より高い値を示した。人間の血清では低易動度成分の γ -globulin が約 20% の濃度比を示すのに対し硬骨魚類に属する魚種の血清では γ -globulin に相当する区分の濃度比が極めて低く、時にはその存在の確認に困難を感ずることもあった。一方軟骨魚類に属する魚種では人間及び硬骨魚の場合より低易動度区分の濃度比がかなり高く、しかも同区分には他の供試動物にみられない特異な低易動度を示す蛋白質の存在することを明らかにした。

4. 血清蛋白質の albumin/globulin 値は人間より海産硬骨魚に属する魚種が高く、軟骨魚では albumin 区分が認められない。この関係は塩析法によっても確認した。

5. 供試動物の血清蛋白質について塩析曲線を求めたところ、硬骨魚類に属する魚種では、人間に比べ硫酸アンモニウムの低飽和度 (0.3~0.4) で析出する区分が著しく少ないことを認めた。一方軟骨魚類に属する魚種の血清では 0.3 以下の飽和度で析出する区分がかなり存在するのに対し高飽和度 (0.7 以上) で析出する区分が極めて少なく、さらに同魚種の血清中には生理的 pH (7.0~7.3) に近い Mol/20 磷酸塩緩衝液中ですら析出する易動度の極めて低い特殊な蛋白質の存在することを確認した。

6. 供試動物の血清複合蛋白質について検討したところ、人間と同じく魚類にも血清中にリポ蛋白質と糖蛋白質の存在することを確認するとともに人間と魚類間は勿論、魚類中でも硬骨魚と軟骨魚とでは両蛋白質の泳動的性質

にかなり差異のあることを明らかにした。即ち、人間では血清中の主要な糖蛋白質とリポ蛋白質の易動度に明らかな差が認められるのに対し魚類では両蛋白質が各々近似した易動度を示すことを認めた。また人間の血清蛋白質では易動度の最も高い albumin 区分に糖蛋白質とリポ蛋白質の反応が殆んど認められないのに対し硬骨魚類に属する魚種では albumin 区分に両蛋白質が最も顕著に認められた。一方軟骨魚では逆に低易動度の区分 4 附近に両蛋白質が顕著に認められた。従って分類学上の位置がかなり異なる動物間では、例え近似した易動度を示す血清蛋白質の区分でも糖蛋白質とリポ蛋白質の反応からみた相互の組成には著しく異なる場合のあることが明らかとなった。

7. 供試動物の血清蛋白質の組成にみられた種属特異性を主として、体滲透圧の維持調節作用に関連づけて考察を述べた。