

Verdohemochrome の生成とその性状に関する研究

第 2 篇

Verdohemochrome と蛋白質との結合に関する検討

岡山大学医学部第一内科教室 (指導 小坂淳夫教授)

形 見 重 男 *

[昭和34年9月23日 受稿]

緒 言

血色素から胆汁色素の生成過程において、予め血色素 globin が変性した後に胆汁色素への分解が始まるのか、補欠簇 heme が先ず分解した後に globin が変性するかに就ては R. Lemberg, G. Barkan の間に久しく論争が繰返された。一方教室の永井によれば反応開始時血色素 globin は健全であることが要求されるが、教室の正岡, 人見及び長島らは choleglobin 段階への分解に先立ち globin は変性すると言ひ、長島はその変性は過酸化水素による変性乃至之と類似の過程であるとしている。又上代らはその変性は perturbation ともいふべき可逆性の軽い変性であると唱えた。

処で血色素の胆汁色素への分解過程に生ずる中間産物として R. Lemberg は choleglobin, verdohemoglobin の2段階の中間過程を推定し、教室の湯浅, 間賀らは中間過程の複雑な段階を分析している。それによれば choleglobin, verdohemoglobin の補欠簇は verdohemochrome 乃至その類似物質, biliverdin, bilirhodin, bilirubin 等に分割されるという。一方これら中間物質を分光化学的に検討した研究も R. Lemberg, 上代, 菊地, 教室の尼子, 竹田らに依つてなされ、630m μ , 670m μ に吸収極大をもつ物質が確認されている。

又 hematin が生体内で胆汁色素に分解される際、教室阿曾沼は血清 albumin と結合し methemalbumin となつて分解されるものと考え、教室中西, 下村修によつて詳細な分解過程の研究がなされた。以上の如く血色素或は hematin が胆汁色素に分解される過程は各方面より検討されたにも拘らず、その中間物質の性状については抽出乃至分析操作に問題があるため

尙一定した結論がえられていない。そこで著者は上記の諸家の研究と全く立場を代えて、直接 verdohemochrome を精製し、これと血色素 globin 或は血清 albumin との結合を検討し、その分光像の確認から中間物質の性状を改めて検討しようと試みた。

実験材料並に方法

1. Hemin の調製法

R. Willstätter の方法に準拠し、牛血液より調製し、再結晶させたものを使用した。

2. Verdohemochrome の調製法

R. Lemberg の方法により、新鮮 hemin より調製した。

3. Verdohematin の調製法

新鮮 verdohemochrome 粉末を R. Lemberg の方法を参照して、先づ chloroform に溶解し、これを蒸留水で3回洗滌し、無水硫酸曹達で脱水後濾過し、この chloroform 溶液を低下圧40°C、で chloroform を蒸発させ使用した。

4. Native globin の調製法

従来用いられている M. L. Anson & A. E. Mirsky の方法は、globin の変性を免れず、native globin の収量が著しく少く不適當であるから、E. M. Jope の方法を参照して行つた。即ち新鮮な牛血液を材料とし、脱線維素し、且つ脱脂綿で濾過し、これを遠沈して血球のみを集め、生理的食塩水で10回洗つた後当量のアリミナクリーム、及び全容量の $\frac{1}{4}$ トルオールとを大型遠沈管内で混合し、一夜水室に放置、翌朝管底の透明な濃厚血色素溶液層をサイフォンで取出し、東洋濾紙No.101を使用し、Buchner 漏斗で吸引濾過する。次にこの血色素溶液に洗滌した石炭ガスを通じて一酸

化炭素 hemoglobin を作る。即ち一酸化炭素 hemoglobin から, globin を分離する方が蛋白の酸化的分解変性を防止できる点が本法の長所である。この一酸化炭素 hemoglobin 10ml を4°C以下に冷却しながら, この中へ1.5%に塩酸を含む15°Cの acetone 200 ml をゆつくり40分~50分かかつて加えると, 白色の沈澱が生じる, この沈澱を集めて冷却した acetone で更に2回~3回洗い, その後炭酸バリウム浮遊 acetone で洗う。この沈澱が native globin である。これを蒸留水で溶解して, 15%程度の水溶液にして, セロファン膜に入れ, M/30 第二磷酸カリで透析する。透析は冷凍室内で行い, 大型タンクに入れた5 Lの M/30 第二磷酸カリ液を朝夕2回, 液の温度を十分に低温に保つた上で取替え, 3昼夜透析を行なつた。透析後沈澱は東洋濾紙 No.6 で濾過すると, 清澄な濾液を得た。この濾液の一部を硫酸アンモニウムで半飽和してみても, 更に沈澱を生じる事はなかつたので, 上述の如くして得られた濾液は透析完全であると見なし, これを冷凍真空乾燥器にて粉末結晶として保存し実験に用いた。

5. 血清分離法

健康成人より早朝空腹時, 静脈より採血し, 30分間, 37°C 孵卵器中放置し, 氷室に1時間保存し, 溶血せぬ様に注意しつつ血清を分離した。

6. 血清変性法

血清を60°Cで30分間加温し, 又血清に6%苛性曹達1/10量加えて行つた。

7. 吸光曲線の測定法

第I編に準じて行つた。

8. 濾紙 chromatography

教室後藤の方法に準じて行つた。濾紙は独逸の Schleicher & Schüll 製 Nr.2043aを, 又展界剤には2%蔗糖溶液を使用した。試料を濾紙の先端より6 cmの処に, 直径1.0cmの斑点として, 毛細管 pipette で付着せしめ, 展界は原点から12cmの高さまで行なつた。その後室温で乾燥し, 蛋白の検定は bromphenol blue を用い, 10分間浸した後取出し, 洗滌液を2乃至3回取換えながら2%酢液溶液で30分位洗つた。

9. 濾紙電気泳動法

夏目製作所製小林式濾紙電気泳動装置を用い, 電流値6 mA/12cm, 電圧230V/23cm 流動時間5時間, 濾紙は Schleicher & Schüll 製 Nr 2043a, 緩衝液は Veronal 曹達緩衝液 pH 8.5, $\mu=0.045$ を用い, 泳動後のものは, 110°Cの乾燥器で加熱乾燥した後, bromphenol blue で染色した。

実験成績

1. Verdohematin と人血清混合液の分光化学的実験

Verdohematin 20mg を N/10 NaOH 0.8ml に溶解し 3.2ml の蒸留水を加えたものに, Soerensen 磷酸塩緩衝液 pH 7.05 の液 40ml を加えて全量 44ml とした。この中より 5.5ml づつを容量 100ml の三角 flask 中に容れ, 各々に未変性血清, 加温変性血清, アルカリ変性血清を 2.0ml づつと, 対照として Soerensen 磷酸塩緩衝液 pH 7.05 のもの 2.0ml を混合し, 各混合液の pH を測定した後, 37°C, 30分間, 恒温槽中で反応させ, 溶液の吸光曲線を Beckman DK 型自記分光光度計にて測定した。

先づ未変性の自然血清を加えた場合に 800 μ より吸光曲線を描くと, 650 μ を中心とする吸収帯を認めた。次に加温変性させた血清を加えたものでは, 同様 650 μ を中心とする吸収帯を得た。アルカリ変性させた血清使用の場合は, 655 μ を中心とする吸収帯を有し 560 μ にも小膨隆を生じた。

次にそれらの各々に sodium dithionite を添加すると, 血清混和液はオリーブ色であつたものが緑色調となつた。自然血清, 加温変性血清を加えたものに sodium dithionite を添加すると, 各々の吸収極大 650 μ は増大し尖鋭な吸収棘に変化した。又アルカリ変性の場合は 655 μ は同じく増大して尖鋭な吸収棘に変化し, 560 μ にみられた小膨隆は消失している。吸収極大の吸光係数は fig. 1, 2 の如く, アルカリ変性血清混和の場合一番高く, 加温変性血清, 自然血清混和の順に低かつた。

一方対照の verdohematin を Soerensen 磷酸塩緩衝液に溶解しただけのものは, 600 μ を中心とする巾の広い吸収帯を示し, 血清混合の場合とは吸収曲線を異にし, 更に sodium dithionite を一刀尖加えれば, 添加瞬間は緑色調を呈し, 直ちに自記分光光度計にて測定すると 630 μ に吸収極大を生じたが, 時間を経過すると速やかに黄色調となつた。

Sodium dithionite 添加により鮮明な緑色調となつた血清混和の各溶液を氷室に48時間放置し, その後で吸光曲線を描写すると fig. 1 に示す如く尙赤色部に吸収を残し, 対照の verdohematin 磷酸塩緩衝液では完全に黄色調となり, 赤色部に何等の吸収を残さないのと異なる。

以上により verdohematin と, 血清蛋白とは結合をいとなみ新たな吸収を生じ, sodium dithionite により verdohematin を verdohem に還元する

Fig. 1 The Absorption Curves on the Combination of Verdohematin and Serum

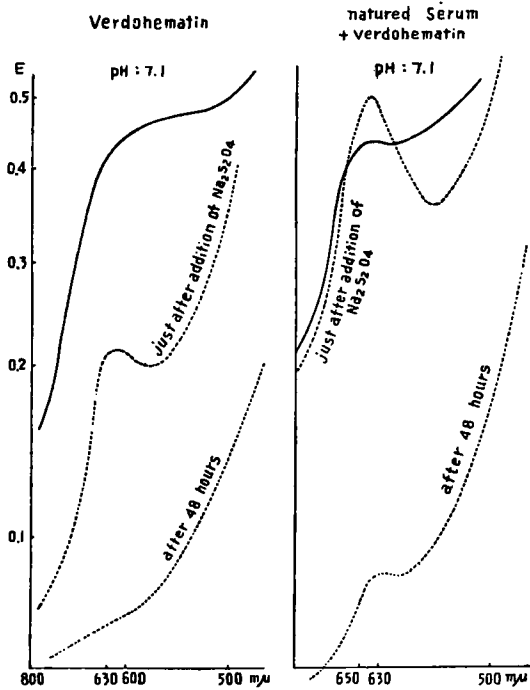


Fig. 2 The Absorption Curves on the Combination of Verdohematin and Serum

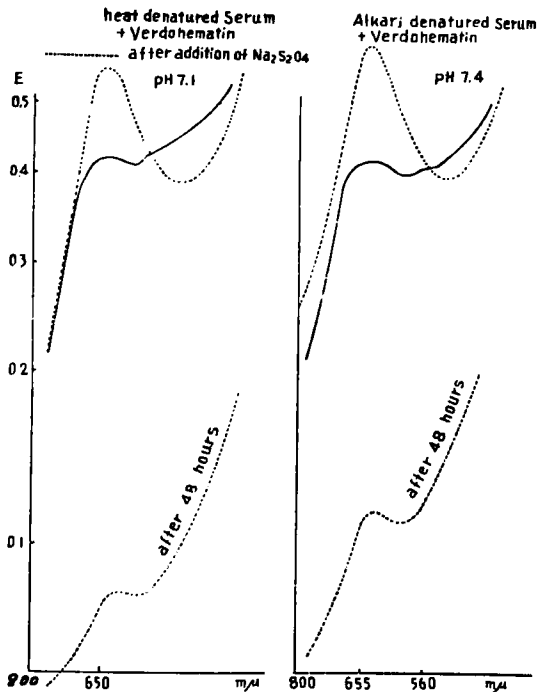
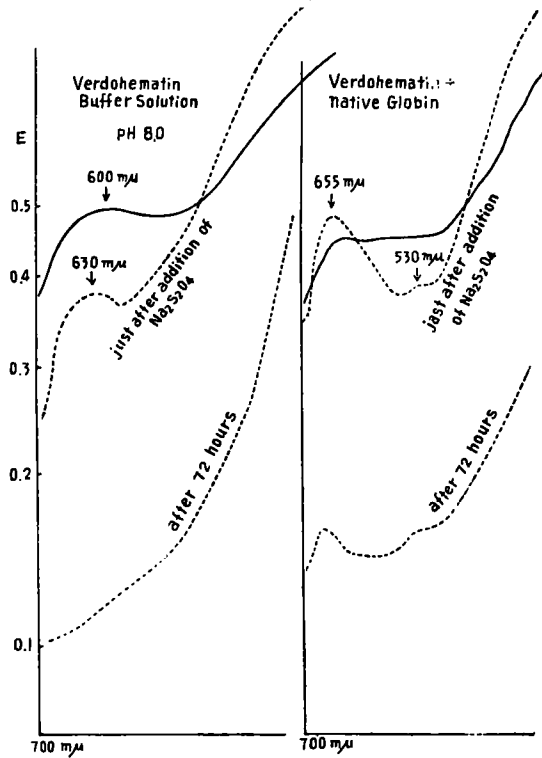


Fig. 3 The Absorption Curves on the Combination of Verdohematin and native Globin



と、蛋白との結合力を増大することとなる。予め血清蛋白に変性操作を加えておけば、verdohem との結合力は増すものと考えられる。又 verdohematin を磷酸塩緩衝溶液に溶解させたものは空气中に放置すると不安定で分解するが、予め蛋白と結合させておけば比較的安定であつた。

2. 濾紙クロマトグラフィによる verdohemochrome と血清蛋白との結合に関する検討。

Verdohematin 5 mg を Soerensen 磷酸塩緩衝溶液 pH 8.0 の 5.0ml に溶解し、それより 1.0ml を取り血清 1.0ml に混和し、30分間 37°C の孵卵器に入れ反応させた後、これを展界した。対照の verdohematin 磷酸塩緩衝溶液は原点に止るが、血清混和の場合、verdohematin は Rf. 0.8 に展開された。次で蛋白染色を行うと蛋白部分は verdohematin 部位に一致した。

3. 濾紙電気泳動法による verdohemochrome と血清蛋白との結合に関する検討。

濾紙クロマトグラフィ実験に用いたと同一の液を使用し、対照に血清のみと、verdohematin を Soerensen 磷酸塩緩衝溶液に溶解した液とを泳動させた。その結果対照の verdohematin 液は原点に

止まり、時間の経過につれて純物理的拡散現象でびまん性に拡がり、特有の帯を持たない。一方予め血清と結合させた verdohematin は泳動5時間目において、帯状に泳動した。この部位は血清のみを泳動させた場合の albumin 部に一致した。従つて verdohematin の結合は albumin の結合に外ならない。

4. Verdohematin を血色素 globin と混合した場合の吸光曲線について。

0.1mg/ml verdohematin, 7.5mg/ml globin 濃度, pH 8.0 になる様調製した混和液を氷室に約40時間放置したものを, Beckman 自記分光光度計により吸光曲線を描くと, 対照の verdohematin を磷酸塩緩衝溶液に溶解したものに比較して, 赤色部吸収は長波長に略 50m μ 移動した巾の広い吸収帯となつている。これに Sodium dithionite を加えると緑色調は増加し, 655m μ に尖鋭なる吸収を生じ, 530m μ にも小なる吸収棘を生じた。(fig. 3)

次に Sodium dithionite 添加後72時間氷室に放置した液の吸光曲線を描くと対照の verdohematin は前実験同様赤色部吸収を残さないが, globin 結合のものは赤色部吸収を残した。

5. 濾紙電気泳動法による globin と verdohematin との結合に関する検討。

Soerensen 磷酸塩緩衝溶液 pH 8.0 に夫々 globin を 38mg/ml, verdohematin を 1.0mg/ml 濃度になる様に調製した混和液を, 氷室中に40時間放置した後, 濾紙電気泳動を行つた。この際同時に pH 8.0 にした血清のみを泳動させたものと, pH 8.0 の Soerensen 磷酸塩緩衝溶液に globin を 3.8mg/ml 濃度に溶解した液を泳動させたものとを対照とした。

その結果 verdohematin は帯状に泳動し, 泳動5時間で蛋白染色を行つると, globin 部に一致して verdohematin の泳動が認められた。ちなみに globin 蛋白の泳動は血清の β , γ -globulin 分割の中間であつた。

考 按

Verdohematin を人の未変性血清に加えると, 650 m μ を中心とする新たな吸収極大がえられ, verdohematin は自然血清と結合することが確定される。

又自然血清に代え, 加温変性の血清を加えた場合も 650m μ に, アルカリ変性を加えた血清を添加すると 655m μ に夫々同様の吸収極大を生ずるが, アルカリ変性の血清を添加した場合には外に 560m μ に小さい吸収棘がえられた。これらの各々に Sodium dithionite を添加して還元を行つると, 自然血清を用いた場

合でも, 上記の加温変性を加えた血清を用いた場合でも, 何れも 650m μ に鋭い吸収棘をもつ吸光曲線がえられた。又アルカリ変性を加えた血清を用いた場合は 655m μ に鋭い吸収棘をもつ吸光曲線がえられた。

次に verdohematin に人の未変性血清を加え, 濾紙 chromatography を行つると verdohematin 単独では展開されないが, この場合は血清蛋白と一致して展開された, 又濾紙電気泳動法を行つると, albumin と一致して泳動された。これらのことから verdohematin は添加された血清中の albumin と結合して albumin verdohemochrome を生じ, 650m μ に吸収極大を生じたものと思われる。

処で教室の下村(修)は N. H. Fairley の唱えた methemalbumin を hematin と人血清より調製し, これに l-ascorbin 酸と分子酸素を作用させて, その胆汁色素への分解を分光化学的に追求したが, その際 albumin verdohemochrome 乃至 albumin verdohemichrome に相当する吸収極大を見出しえなかつたが, 反応1時間より sodium dithionite 及び6%苛性曹達を加えた還元変性法により変性 albumin verdohemochrome と思われる660m μ を中心とする吸光極大をえている。著者がえた albumin verdohemichrome を sodium dithionite で還元した場合, 及び albumin を加温変性した後調製した変性 albumin verdohemichrome を sodium dithionite により還元した場合はいずれも明瞭に650 m μ に吸収極大をえ, 又 albumin をアルカリ変性した後調製した変性 albumin verdohemichrome を sodium dithionite により還元した場合は 655m μ に明瞭に吸収極大をえていることから, 下村がえた 660 m μ を中心とする吸光極大も下村が推定したごとく変性 albumin verdohemochrome と断定しても誤りはないと思われる。ただ還元変性を行なかつた反応液に albumin verdohemichrome の吸収極大がえられていない理由については, 著者の実験でその吸収極大は 650m μ にはあるが, verdohematin の吸光曲線より僅かに膨隆した極大であつたことと, 下村(修)の研究では methemalbumin の吸収極大は 623, 540, 500m μ にあるため, 反応開始後に生ずると考えられる albumin verdohemichrome の吸収極大 650m μ の山は 623m μ の極大に覆われ, 発見困難であつたものと思われる。

次に verdohematin と未変性血色素 globin との混合では 650m μ を中心とする幅広い吸収極大を生じ, verdohematin の吸収極大が 50m μ だけ長波長に移動する。この際 sodium dithionite を加え還元すると

655 μ に鋭い吸収の棘を生じ、別に 530 μ に小さい吸収の棘を生じた。又 verdohematin と未変性 globin を混合した液を濾紙電気泳動法により泳動すると、verdohematin は globin と泳動し、両者が結合している事が分る。

処で教室の尼子によれば血色素に l-ascorbin 酸と分子酸素を作用させ、その反応過程を追及すると、始め 670 μ に、次に 630 μ に吸収の山を生じ、反応の進行と共に 630 μ は 670 μ の吸収極大に優位するが、更に進行すると 670 μ のみの吸収極大を生ずるといふ。この際 3% 苛性曹達と sodium dithionite で還元変性を行うと、初期の 670 μ は変性しないが、反応後期の 670 μ 及び 630 μ はともに 618 μ に移動するという。この際生ずる 670 μ 及び 630 μ の吸収極大をもつ物質の本態についてはこの際論じないとしても、これらの物質は、著者が先に verdohematin と未変性 globin とを結合させて生成した globin verdohemichrome とは構造上若干異なるものと断じえられよう。このことは R. Lemberg が、次で上代らが血色素の分解中に verdohemo-globin なる過程を想定し、その構造式は globin verdohemochrome 乃至 globin verdohemichrome であると考えた推論に疑義の念を与えるものである。

文

- 1) Lemberg, R. : *Perspectiv & in Biochemistry*, Cambridge Univer. Press, London, 137, 1937.
- 2) Barkan, G., & O. Schales : *Z. phys. Chem*, **248**, 97, 1937 ; *Nature*, **142**, 836, 1938.
- 3) 永井 : *医学研究*, **22**, 8, 1100, 昭27.
- 4) 正岡 : *医学研究*, **23**, 9, 1709, 昭28.
- 5) 人見 : *医学研究*, **23**, 3, 398, 昭28.
- 6) 長島 : *医学研究*, **24**, 9, 1862, 昭29.
- 7) 上代 : *The protein*, **4**, No. 4, 110, 1953.
- 8) 湯浅 : *医学研究*, **24**, 7, 1371, 昭29.
- 9) 間賀 : *医学研究*, **26**, 8, 2053, 昭31.

結 論

verdohematin を R. Lemberg の方法で調製し、予め調製した人血清及び血色素 globin との結合につき検討を加え、次の結果をえた。

1. Verdohematin は人血清 albumin と結合し、albumin verdohemichrome 及び変性 albumin verdohemichrome を生ずる。
2. Hematin が人血清と結合して生じた methemalbumin が胆汁色素へと分解される過程において albumin verdohemochrome 乃至 albumin verdohemichrome を生ずることを分光化学的に証明した。
3. Verdohematin は未変性血色素 globin と結合して globin verdohemichrome を生ずる。
4. 血色素より胆汁色素への分解過程には globin verdohemichrome に一致する吸光極大はえられなかつた。従つて choleglobin 乃至 verdohemoglobin と命名される物質と globinverdohemochrome との間には若干化学構造式を異にする。
5. Verdohematin は albumin 乃至 globin と結合することにより酸化に対し比較的安定であつた。

献

- 10) Lemberg, R. : *Hematin Compounds and Bile Pigments*, Intersc, Publishers., Inc., New York, 1949.
- 11) 上代 : *生化学*, **26**, 177, 1954.
- 12) 尼子 : *医学研究*, **27**, 7, 1584, 昭32.
- 13) 竹田 : *医学研究*, 掲載中.
- 14) Failey, N. H. : *Nature*, **139**, 588, 1937. : **142**, 1156, 1938. *Brit. med. J.*, **11**, 213, 1940.
- 15) 中西 : *医学研究*, **26**, 4, 816, 昭31.
- 16) 後藤 : *医学研究*, **26**, 8, 1998, 昭31.
- 17) Jope, E. M. : *Nature*, **164**, 122, 1949.
- 18) 下村(修) : *医学研究* : **29**, 2, 318, 昭34.

Studies on the Formation of Verdohemochrome and its Property

Part 2

Studies on the Combination of Verdohemochrome and Protein

By

Shigeo KATAMI

The First Department of Internal Medicine Okayama University, Medical School

(Director : Prof. K. Kosaka)

Conclusions

The combination of the verdohematin produced by the method of R. Lemberg and the human serum which was previously produced or globin of hemoglobin was observed. And the results were as follows.

1. Verdohematin combined with albumin of human serum and albumin verdohemichrome and degenerative albumin verdohemichrome were produced.

2. The production of albumin verdohemochrome and albumin verdohemichrome was spectrochemically observed on the decomposition process of the methemalbumin, which was produced by the combination of hematin with human serum, to bile pigment.

3. Verdohematin combined with globin of unchanged hemoglobin and globin verdohemichrome was produced.

4. The adsorption maximum agreeing with that of globinverdohemichrome was not obtained on the decomposition process of hemoglobin to bile pigment. Therefore, there were some difference of chemical constitutional formula between the substances named choleglobin or verdohemoglobin.

5. Verdohematin was relatively stable to the oxydation by the combination with albumin and globin.
