

生物化学実験法

蛋白質の定量法

第2版

菅原 潔・副島正美 著

58.173

U

著者紹介

菅原 潔：茨城大学助教授（生物化学研究室）

現住所 茨城県稲敷郡阿見町阿見

若栗字降木 444 の 149

副島正美：茨城大学教授（農産物利用学研究室）

現住所 土浦市小松町 847-1

瓜谷郁三・志村憲助 編集 生物化学実験法 7
中村道徳・船津 勝

蛋白質の定量法・第2版

1977 年 7 月 5 日 初版発行

検印
廃止

© 著 者

すが けい きたし
菅 原 潔
そえ じま まさ み
副 島 正 美
発行者 加藤 一郎

発行所 財団法人 東京大学出版会

113 東京都文京区本郷 東大構内 電話 (811) 8814 振替東京 6-59964

研究社印刷・新栄社製本

3345-64573-5149

「生物化学実験法」編集の趣旨

この双書を企画したのは、次のような理由によります。

たとえば、ある生物の蛋白質を研究するとします。その場合には、含まれている蛋白質の定量、抽出、分離、精製、構造および性質の研究といったようなことが必要となります。ところで、最初に蛋白質の存在量を定量するとして、沢山ある生物化学の実験書を開いて見ると「蛋白質の定量法」という項目にいくつかの方法がそれぞれ記載されています。したがって、そこにあるどれかの方法でやれば一応の結果は得られるはずですが、一面、あまり沢山の方法があるために、どれを採用してよいかに迷ってしまうのではないのでしょうか。

どの方法を選ぶかは、その時の目的によります。より鋭敏な方法がほしいとか、安価な試薬ですむ方法、あるいは試料は沢山使ってもできるだけ正確な値が知りたいとか、また逆に少々ラフでもできるだけ少量の試料でさらに迅速に定量したいとか、などが選択の理由になります。たとえば、純粋な蛋白質と、細胞抽出液のように他の物質が混在する状態での蛋白質の定量では、方法がおのずから異なるのはむしろ当然です。

このようなことは、蛋白質に限らず、糖の定量でも磷酸の定量でも全く同じであり、また定量に限らず、抽出・分離あるいは細胞内分布の研究の場合でも事情は同様だと考えられます。

こう考えてもう一度成書を眺めてみると、上に述べたようなそれぞれの方法についてその適用性、長所、短所、鋭敏さ、特異性および原理まで書いてあるのはごく稀のようです。また書いてあっても、多くは相互に直接比較できる形では書かれていません。

したがって、この双書では、執筆する人の経験に基づいて文献のデータを整理していただき、その人の経験を加味しながら、できるだけ批判的に、かつ上に述べたような多くの問題点を十分考慮して書いていただくことにしました。

また、他の分野で開発され発展してきた方法であるために、それが生物化学の研究に適用されれば極めて有力な手段となりうるにもかかわらず、あまり使われていないものがあります。たとえば免疫化学的な方法もその一つです。この双書では、そのようなものもできるだけ取り上げて行くつもりです。

本双書の企画は、主として雑誌「化学と生物」に連載されたものを基礎とし、さらに詳細な解説を加えて大学院生のみならず学部学生にも理解できるようにしたものです。

1969 年 3 月

瓜谷郁三 志村憲助 中村道徳 船津勝

は じ め に

人間にとって“もっとも重要なもの、”または人間が“第一にとり上げねばならぬもの”という意味から、蛋白質がギリシャ語の“Proteios”にちなんで“Protein”と命名されたのは約150年ばかり前のことである(Mulder, 1839). 生命現象が発現し、さらにその生命が伝達継承される過程で、核酸とともに抜群の役割と機能とを司っている蛋白質については、現在まで世界中でいかに多くの研究者技術者が直接、間接の関心を寄せてきたことであろうか。私どもも長年その魅力にとりつかれて、その存在様式の解明に参加できることを夢みつつ暗中摸索を続けているものである。

数年前に「蛋白質の定量法」についてのまとめを、私どもの共通の師である志村教授を含む編集委員の方々から依頼されて、いとも簡単にお引き受けしてしまった。しかし実際に、「定量法」をまとめようとすると、もっとも基本的な操作の一つであると漠然と感じていたものが、その内容に意外に曖昧な面が多く、またその手段は複雑多岐にわたり、このテーマでの類書が見当らないこともあって、種々の困難な問題と直面させられた。問題点の一例をあげてみよう。「蛋白質の定量法」であるからにはすべての蛋白質に普遍的な特性が利用されていることが望ましい。しかし厳密に検討すると、定量法として利用されている性質は必ずしも普遍性の面で満足できないものが多いし、また満足できる性質にもとづいて定量を実施する場合には別の重大な制約が存在することを知るのである。そこで私どもは最初にその経緯をやや詳しく述べ、個々の定量法の紹介に先立って、当面する問題点について明らかにするとともに、定量法を分類し、研究の目的に応じた方法選択の基準について提案を行うことにした。この書き方が少しでも読者のお役に立てば大きな喜びである。

また本書の執筆については、第3章、第4章、第5章を主として菅原が、その他の章を主として副島が担当した。読み返してみると、内容に舌足らずの点も多々あるが、できるだけ正確に記載することを期したいので、御気付きの個

処について御叱正，御教示をいただければ望外の幸せである。

最後に本書のまとめに 当って，多くの御援助や有益な御批判をいただいた，東京大学の中村道德教授，理化学研究所の中村啓治氏をはじめとする多くの先輩，友人諸兄弟に対して，衷心より謝意を表する次第である。

昭和 46 年 8 月

副 島 正 美
菅 原 潔

第2版へのまえがき

この「蛋白質の定量法」が刊行されたのは昭和46年の9月であるから、ほぼ5年半を経過したことになる。この間、生化学的な実験手法は、アミノ酸分析にその例をとれば、カラムの内径が9mmから6mmへ、さらにオートサンプラーから積分計へとマイクロ化、高性能化されて、 μ mole から n mole へと変わってきた。ちょうど真空管からトランジスタへと変化したのと似たような現象が、生化学の領域の研究方法にも見受けられるようになったのである。必然的に、酵素をはじめ、蛋白質を取り扱う実験室でも、漸次マイクロ化が進められてきている。

このような状況を背景に、蛋白質の微量定量化に関する要望も強く、螢光法などの応用も交えて、 μ g より ng へと微量化が進められつつある。しかし一方、従来より生化学の領域では最も多く使用されてきた Lowry 法に対する期待も依然として高い。この方法は、多種類の物質により妨害をうけることから、たとえば Triton X-100 の存在下における定量法など、この方法の改良法、妨害排除法などに関する報告も少なくない。しかし、これらの新しい定量法もしくは改良法は、それぞれ一長一短があり、あらゆる場合に適用しうる唯一の定量法はないといったほうが良心的であろう。本書は、それぞれ、研究目的、研究条件、対象とする蛋白質の種類、あるいは夾雑物の種類など諸々の条件に応じて、最も適した方法を選択していただくことを前提にまとめている。読者の研究の能率化、質的向上に幾分なりとも役立てていただければ誠にうれしく思う次第である。

昭和52年4月

菅原 深
副島 正美

目 次

「生物化学実験法」編集の趣旨

はじめに

第2版へのまえがき

I. 序 説	3
II. 蛋白質の定量法の分類と方法の選択	12
II-1 Kjeldahl 法	13
(i) 原 理	13
(ii) 長 所	14
(iii) 短 所	14
II-2 フェノール試薬法 (Lowry らによる改良法)	14
(i) 原 理	14
(ii) 長 所	14
(iii) 短 所	15
II-3 ビュレット法	15
(i) 原 理	15
(ii) 長 所	15
(iii) 短 所	15
II-4 UV 法	16
A. 280 nm で測定する方法	16
(i) 原 理	16
(ii) 長 所	16
(iii) 短 所	16
B. 215~225 nm で測定する方法	16

(i) 原 理	16
(ii) 長 所	17
(iii) 短 所	17
II-5 色素結合法	17
(i) 原 理	17
(ii) 長 所	17
(iii) 短 所	18
II-6 各種微量定量法の特徴と方法の選択	20
III. Kjeldahl 法	25
III-1 Kjeldahl 分解	25
(i) 方法の原理	25
(ii) 蛋白質成分の分離	26
(iii) 試料の分解条件	27
III-2 アンモニアの定量法	34
(i) 蒸留滴定法	36
(ii) Conway の微量拡散分析法	39
(iii) Nessler 法	46
(iv) インドフェノール法	48
III-3 直接比色定量する法	61
(i) ヨードメトリーを応用する法	61
(ii) Nessler 法の応用	62
(iii) インドフェノール法の応用	64
III-4 蛋白質量の算出	67
III-5 自動分析化の試み	68
III-6 共存する硝酸塩のアンモニウム化	70
III-7 二酸化チタンと硫酸銅を触媒とする分解方法	73
IV. ビュレット法	74

IV-1	可視領域で測定するビュレット法	79
(i)	Gornall らの方法	79
(ii)	Westley-Lambeth の方法	82
(iii)	食品その他、固体試料に使用できる方法	84
IV-2	紫外領域で測定するマイクロビュレット法	88
(i)	Itzhaki および Gill のマイクロビュレット法	88
V.	フェノール試薬法	95
V-1	原 理	95
V-2	Lowry らの方法	98
V-3	Lowry 法の Miller による改良法	108
V-4	Lowry 法のプロテアーゼ作用測定への応用	109
V-5	磷酸濃度の高い試料のために応用した Lowry 法の例	109
V-6	メンブレンフィルターと Lowry 法との組合せ	110
V-7	Lowry 法の妨害物質	112
V-8	妨害物質存在下での Lowry 法	117
V-9	SH 化合物存在下での Lowry 法	121
V-10	Triton X-100 存在下での Lowry 法	123
(i)	ChandraRajan-Klein の (B) 法	123
(ii)	著者らの方法	127
(iii)	Wang-Smith 法	128
(iv)	Dulley-Grieve の方法	129
(v)	ChandraRajan-Klein の (A) 法	130
V-11	その他の改良法	131
VI.	紫外外部吸収スペクトル法 (UV 法)	133
VI-1	280 nm で測定する方法	133
VI-2	215~225 nm で測定する方法	138

(i) 操作法	139
(ii) 注 意	139
VI-3 191~194 nm で測定する方法	140
VI-4 224~233.3 nm で測定する方法	144
VI-5 各種蛋白質の ϵ_M および $A_{1cm}^{1\%}$	146
VII. 色素結合法	147
VII-1 Methyl orange 法	151
VII-2 Amido black 10 B 法	153
VII-3 Eosin Y 法	154
VII-4 メンブレンフィルターと色素を用いる微量定量法	155
VII-5 濾紙と色素を用いる微量定量法	160
VII-6 Amido black 10 B	161
VII-7 Coomassie brilliant blue	162
VII-8 TNBS 法	165
VIII. 物理的方法, その他	166
VIII-1 屈折率法	166
VIII-2 ラジオアイソトープ (RI) 法	169
VIII-3 比濁法	169
VIII-4 放射性ニッケル (^{63}Ni) による微量定量法	171
IX. ニンヒドリン法	174
X. 螢 光 法	179
X-1 フルオレサミン法	179
(i) Böhlen らのフルオレサミン法	180
(ii) メンブレンフィルターを用いるフルオレサミン法	183

X-2	チアミンによる微量定量法	185
X-3	DNS 法	188
XI.	結 び	189
文 献		191
索 引		199

瓜谷郁三・志村憲助・中村道德・船津 勝二 編集
生物化学実験法

蛋白質の定量法

第2版

菅原 潔・副島正美 著

東京大学出版会

I. 序 説

ここ数年の間に立体構造を含めて結晶の全構造の明らかになった蛋白質は、リゾチーム、ミオグロビンなど十指に余るほどになった。このような急速な発展の主要な原因はもちろん構造分析に用いられる各種理化学的手段の飛躍的進歩にある。

しかし蛋白質の構造分析の基本ともいえる定量法については、種々な方法が提案されているとはいえ、依然として19世紀末に確立された Kjeldahl 法が標準法と呼ばれるような中心的位置を堅持している。その理由はその分析原理の素晴らしさにもよるが、「蛋白質の定量法」という言葉の概念の曖昧さと複雑さが他の方法の発展を妨げてきたのを見逃すわけにはゆかない。

そこで具体的な方法を紹介する前に、まず定量の目的から検討を進め、問題点を指摘してゆくことにしたい。この方法の目的を一口でいえば、「一定質量または容量の試料に含まれる蛋白質成分の質量を測定または算出すること」である。しかし蛋白質、糖質、脂質、無機塩類などを定量する場合には、ビタミンやホルモンを定量する場合のように化学的に純粋な成分を個別的に定量する方法のほかに、蛋白質成分全体を一括して定量する方法がしばしば必要となる。前者の化学的ないし生物学的な意味で純粋な、特定の蛋白質成分を定量しようとする個別的定量法の場合は、その成分の存在する状況によって方法の難易度が異なる。すなわち粗原料中に含まれる場合は、その成分のきわだった特徴が捕えられぬ限り非常に困難な作業になるし、精製が進んでほとんど単一成分に近くなった場合には、共存する物質と異なった性質を利用しさえすれば、

表 I-1 単純蛋白質の2,3の物理的性質

蛋白質	結晶化	溶解性			熱凝固 60°C~80°C	硫酸塩析	分布など
		蒸留水	0.9%食塩水	pH 3~4 pH 8~9 アルコール			
albumin	できるものが多い	溶	溶	溶	する	2/3 飽和以上	動物組織・細胞に広く分布。酵素活性を示すものもある。
euglobulin	できるものもある	不溶	溶	溶	する	1/3 飽和以下	動物組織・細胞に広く分布。酵素活性を示すものもある。
pseudo-globulin	できるものもある	溶	溶	溶	する	1/3~2/3 飽和	
glutelin	困難	不溶	不溶	溶	しない	—	禾穀類の種実に多い。水とねると粘性にとんでくる。
prolamine	困難	不溶	不溶	溶	しない	—	
protamin	—	溶	溶	溶	しない	—	魚類の精子, ある種の花粉中に局在。核蛋白として存在。
histon	—	溶	溶	不溶	しない	—	核蛋白として存在。変性し難い。
albuminoid	困難	不溶	不溶	不溶	しない	—	構造蛋白質として存在。安定。

どんな方法で定量してもよい理屈である。これに対して一括定量法の場合は蛋白質に共通する特徴を捕えることが必要で、このために限られた範囲内から選ばれざるを得ない。

上の問題をもっと正確に理解するために、ある生体組織から一つの酵素を分離精製する過程の一段階を例にとって考えてみよう。

精製の程度を知るために、その段階での試料中の酵素比活性 (specific activity) を測定せねばならない。酵素比活性とは、国際生化学連合 (IBU) のリポート (1961) によれば、「蛋白質 1mg 当りの酵素単位 (enzyme unit) である。」と定義されている。ところで酵素単位とは、酵素の強さ (活性度) を測る尺度であるが、「酵素が十分活性を示しうる状態において、通常は 25°C, 1 分間当りに基質の 1 μ mole を変化させる酵素量を 1 単位とする相対的な表示である」と定義されている。したがって、基質の変化量から酵素単位を測定する方法は、「ある活性な酵素蛋白質の個別的定量法である」ということになる。一方試料中の蛋白質量 (mg) は失活している酵素蛋白質や共存蛋白質を含むものであるから、当然その定量方法は別の適当なものを選ぶ必要がある。ただし酵素を精製する最終段階で、その比活性が最大になった純粋な標品については、安定な活性度が完全に保障される限り、一定量の試料中の蛋白質量を算出するために酵素単位を測定すれば十分であることはいうまでもない。

さて試料中の蛋白質量、すなわち全蛋白質 (total proteins) の量を定量する方法の選択について考えてみよう。たとえば、上記の酵素精製の各段階において、試料の一部を採取して、その中の蛋白質成分を他の成分と分別し、乾燥後秤量して定量する直接的な方法は、多くの場合原理的には可能である。しかし、この操作はあまりに煩雑であり、分別操作中の損失の積重ねを考えると定量方法としては推奨できないものである。その主要な原因は蛋白質と定義される成分の多様な性質、たとえば種々な溶解性 (表 I-1 参照) 等に基づくものである。また乾燥蛋白質標品の結合水量の正確な測定にも多くの困難が伴うのが普通である。

それでは全蛋白質量を他の簡便な理化学的方法から選んでみたらどうかとい

表 I-2 2, 3 の単純蛋白質の N 含量, アミノ酸組成 (%) および分子量 (Tristram & Smith, 1963)

分 類	serum albumin	ovalbumin	lacto-globulin	gliadine	histon	salmine	gelatin	fibroin
N (%)	albumin	albumin	globulin	prolamine	histon	protamin	albumi-noid	albumi-noid
	15.8	15.76	16.0	17.66	17.9	30.7	18.14	18.3
分 子 量	65,000	46,000	37,700 (約 40,000)	15,500	4,000	—	—	—
glycine	1.49	2.32	1.22	0	4.18	2.51	20.9	32.57
alanine	6.30	5.36	5.50	1.70	6.46	1.20	8.78	26.73
serine	3.12	6.75	3.32	4.06	3.60	5.80	3.49	13.54
threonine	4.85	3.42	4.41	1.78	4.79	0	1.88	1.19
proline	4.33	3.04	5.40	11.43	3.55	7.25	13.79	0.38
hydroxyproline	0	0	0	0	0	—	12.17	0
valine	4.95	5.96	5.41	2.25	4.70	3.47	2.19	2.85
isoleucine	2.28	6.04	5.01	10.27	4.06	1.04	1.48	1.04
leucine	9.24	7.94	12.17		7.77	0	2.87	0.86
phenylalanine	5.18	6.86	3.39	5.74	2.88	0	1.99	0.92
tyrosine	5.40	3.33	3.33	2.88	2.73	0	0.26	10.86
tryptophan	0.27	1.09	—	6.02	0	—	0	0.36
cystine	4.89	0.43	2.46	2.21	0.68	—	0	0