



Title	ウサギ血球膜の凍結 : 血球膜に対するトリプシンの反応性
Author(s)	竹原, 一郎; TAKEHARA, Ichiro
Citation	低温科学. 生物篇, 29, 65-68
Issue Date	1972-02-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17784
Type	departmental bulletin paper
File Information	29_p65-68.pdf



ウサギ血球膜の凍結：血球膜に対する トリプシンの反応性*

竹原 一郎

(低温科学研究所)

(昭和46年9月受理)

I. はしがき

前に、ホスホリパーゼCに対する感受性が、凍結したウサギ血球膜において高まることを報告し、膜のホスホリピッドの状態が、この酵素の作用し易いような変化を起すと推論した¹⁾。今回の実験では、凍結による膜の蛋白質の状態変化について何らかの知見を得たいと考え、血球膜に対する蛋白質分解酵素トリプシン作用が凍結によって変化するか否かを調べた。

II. 材料と方法

血球膜は、ウサギから採血後、直ちに Dodge *et al.* の方法²⁾ によって調製した。尚、この実験には pH 7.4-血球膜のみを用いた。

膜浮遊液 0.5 ml を試験管にとり、 -10° 及び -20°C の恒温箱に入れるか、液体窒素に振りながら入れて凍結した。融解は、 $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ の温水中で行なった。

トリプシンは、ベーリンガー・マンハイムの製品を、使用直前に、0.001 N HCl に溶かして用いた。血球膜浮遊液 0.5 ml, 20 mOsm 磷酸緩衝液 (pH 7.4) 2.0 ml に、適当な濃度の酵素液 0.05 ml を加えて、 30°C で反応させた。適当な時間の後、10% トリクロル醋酸 5 ml を加えて反応を止め、 $50\sim 60^{\circ}\text{C}$ で約 30 分加温してから、遠沈により上清を分離した。その上清の 275 μm における吸光度を、トリプシンを反応させなかったものの上清を対照として測定し、その活性を比較した。尚、膜浮遊液を凍結しただけでは、この吸光度の増加はほとんど認められなかった。

円偏光二色性 (CD と略記) の測定には、CD 装置を付けた JASCO の自記旋光分散計 (ORD/UV-5) を用いた。

III. 結果と考察

トリプシン反応の時間的变化を、未凍結の膜と -196°C で3度凍結融解を繰返した膜とについて比べてみると、少なくとも反応の初期段階では、凍結した膜の方がトリプシンの作用を受け易いことを示している (第1表)。又、反応混液中の酵素濃度が 0.005% から 0.06% の間では、同じ傾向を示した。第2表に示すように、各温度で凍結した後、トリプシンを作用させると、

* 北海道大学低温科学研究所業績 第1166号

第1表 ウサギ血球膜に対するトリプシン作用の時間的变化

反応時間 (分)	吸光度 275 m μ					
	2	5	10	15	30	60
未凍結	0.013	0.021	0.034	0.050	0.081	0.102
	0.013	0.019	0.037	0.047	0.070	0.096
	—	0.016	0.031	0.049	0.077	0.105
-196°Cで3回凍結	0.026	0.047	0.064	0.080	0.099	0.120
	0.024	0.040	0.063	0.064	0.080	0.107
	—	0.040	0.059	0.071	0.096	0.122

トリプシン濃度: 0.02% 反応温度: 30°C

-10°Cで凍結した膜でも未凍結のそれに比べ、その感受性は高まっている。しかし、-196°Cで凍結したからといって、それ程著しい反応の増大はみられない。又、-196°Cで凍結した膜と同程度のトリプシンに対する感受性の増大は、超音波で膜を細片にした場合にも認められた(第3表)。尚、膜を超音波でこわしただけでトリプシンを作用させなければ、上清における吸光度の増加は認められなかった。モルモットの血球膜にトリプシンを、37°Cで10分間作用させると細片になることが報告されているが³⁾、ウサギの未凍結血球膜では、形態上の変化は全く観察されなかった。凍結した膜では、しわだらけに縮んだ膜の一部が、トリプシンを作用させている間に、膨らんでくるものもあるのが観察された。

一般に、蛋白質分解酵素は、nativeな蛋白質には比較的作用しにくく、作用したとしても分解速度が極めて遅い場合が多い。従って、蛋白質を完全に分解する場合には、それを変性させてランダム・コイル構造にすることが必要だとされている。この酵素が作用しにくい球状蛋白質の場合でも、すべてがヘリックス構造をしているのではなくて、ヘリックスとランダム・コイル部分との相互作用が強く、酵素がその作用部位に近づきにくい状態にあると考えられている。血球膜の場合には、このような蛋白質の場合とは異なり、特に変性させなくとも、蛋白質分解酵素の作用を受け易いことが知られており^{3,4)}、作用部位が可成り露出しているものと考えられる。従って、このような場合、未凍結の膜と凍結した膜とに対するトリプシン

第2表 凍結温度とトリプシン作用

反応時間 (分)	吸光度 275 m μ		
	4	5	10
未凍結	0.025	0.030	0.051
-10°	0.039	0.049	0.079
-20°	0.048	0.048	0.074
-196°(×1)	—	—	0.081
-196°(×2)	0.056	0.060	0.088

トリプシン濃度: 0.04% 反応温度: 30°C

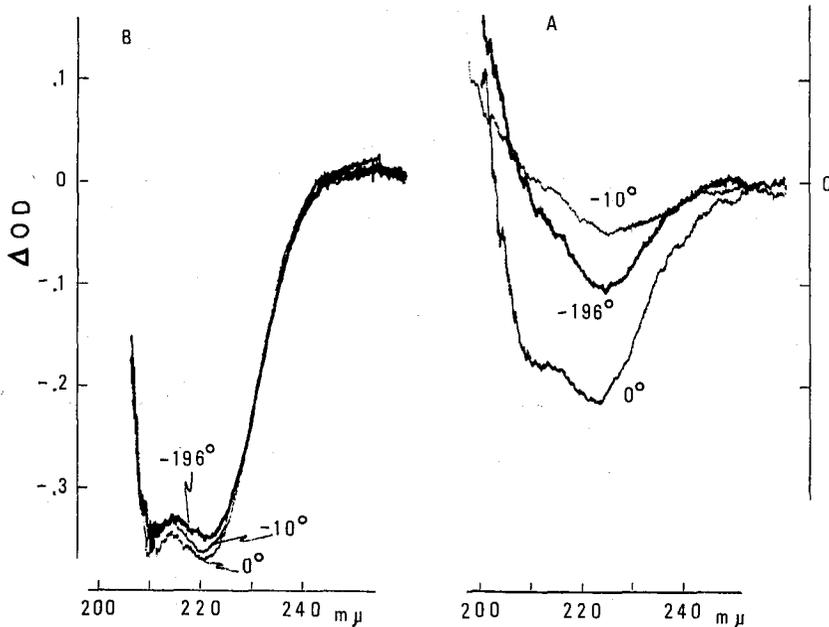
第3表 トリプシン作用と凍結及び超音波破壊

反応時間 (分)	吸光度 275 m μ	
	10	15
未凍結	0.030	0.055
	0.027	0.053
-196°C(×1)	0.051	0.072
	0.053	0.072
-196°C(×3)	0.053	0.075
	0.050	0.075
超音波	0.050	0.075
	0.050	0.076

トリプシン濃度: 0.02% 反応温度: 30°C
超音波: 10 kc, 200 W, 10分

作用の今回の実験でみられた程度の差を、蛋白質の著しい変性によると考えるのはむしろかしいように思われる。むしろ、この結果は、トリプシンがその作用部位により近づき易い状態に膜が変化した、即ち、基質濃度が高まった為と考えるべきであろう。このことは、凍結が膜の形態上の大きな変化をもたらすこと、超音波でこわした膜でも凍結と同程度のトリプシン作用の増大の起ることからみても、容易に考えられることであろう。勿論、この場合にも、蛋白質自体の構造変化が起っている可能性は否定出来ない。

もし血球膜を構成している蛋白質の構造が、凍結によって大きな変化を受けるとすれば、CDの測定から知ることが出来る筈である。特に、蛋白質の2次構造の変化はCDに大きな影響を及ぼすことが知られている。第1図-Aに示したように、20 mOsmの磷酸緩衝液中での測定では、凍結条件によって、CDスペクトルに大きな差の生ずることが観察された。しかし、この結果をそのまま蛋白質の構造変化によるものとする、 -196°C で凍結した膜の方が、 -10°C で凍結したものよりトリプシンに対する感受性が高まるという結果と一致しないことになる。多分、このようなCDの大きな差は、主として形態上の大きな変化による光散乱の増加の為と考えてよいであろう。事実、位相差顕微鏡で観察すると、 -196°C で凍結した膜は溶媒に可成りよく分散しているが、個々の膜は収縮してしまっている。一方、 -10°C で凍結した場合には、収縮した膜が幾つか集まって、大きな塊まりとなっている。この影響を除く為に、このような膜を2-クロロエタノールに溶かしてCDを測定してみると、これら膜のスペクトルの差異は殆んど無くなってしまった(第1図-B)。2-クロロエタノールはヘリックス溶媒であるから、少々の構造変化はこの測定に現われない可能性もあるが、トリプシンを用いた実験結果



第1図 血球膜浮遊液のCDに対する凍結の影響

膜浮遊液を20 mOsm 磷酸緩衝液 (pH 7.4) (A) 及び2-クロロエタノール (B) で6倍に稀釈、1 mm セルで測定。スケールは0.002

と考え合せると、凍結によって、少なくとも蛋白質の2次構造の変化は、多分起っていないと考えてよいであろう。

摘 要

ウサギ血球膜を凍結した時、その構成成分の一つである蛋白質にどのような変化が起るか調べた。凍結前後、膜にトリプシンを作用させて、その反応性が変化するかどうかをその目安として用いた。凍結後、膜に対するトリプシンの反応性は高まるが、液体窒素で3回凍結してもその高まりはそれ程大きくならなかった。この結果から、膜の蛋白質自体は、凍結によって著しい変性は受けないと考えられた。この推論は、円偏光二色性の測定からも支持されるように思われた。

採血は浅田実氏、円偏光二色性の測定には花房尚史氏のお世話になった。ここに深く感謝する。

文 献

- 1) 竹原一郎 1970 ウサギ血球膜の凍結：血球膜に対するホスホリパーゼCの反応性。低温科学，生物篇，**28**, 87-89.
- 2) Dodge, J. T., Mitchell, C. and Hanahan, D. J. 1963 The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 119-130.
- 3) Marchesi, V. T. and Palade, G. E. 1967 Inactivation of adenosine triphosphatase and disruption of red cell membranes by trypsin: Protective effect of adenosine triphosphate. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **58**, 991-995.
- 4) Steck, T. L., Fairbanks, G. and Wallach, D. F. H. 1971 Disposition of major proteins in the isolated erythrocyte membrane. Proteolytic dissection. *Biochemistry*, **10**, 2617-2624.

Summary

Conformational changes of proteins in the frozen and thawed membranes of rabbit red cells were examined by measuring the reactivity of trypsin on the membranes. The reactivity on frozen and thawed membranes invariably increased although the degree of increase is small. The results suggested that drastic conformational changes of proteins may not occur in membranes after freeze-thawing. This seemed to be supported by the results of circular dichroism measurements of membrane suspensions too.