



Title	ウサギ血球膜の凍結 : 血球膜によるメチルオレンジの結合
Author(s)	竹原, 一郎; TAKEHARA, Ichiro
Citation	低温科学. 生物篇, 32, 25-27
Issue Date	1975-03-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17814
Type	departmental bulletin paper
File Information	32_p25-27.pdf



Ichiro TAKEHARA 1974 Freezing of Red Cell Membranes: Binding of Methyl Orange by Red Cell Membranes. *Low Temperature Science, Ser. B*, 32.

ウサギ血球膜の凍結：血球膜による メチルオレンジの結合*

竹 原 一 郎

(低温科学研究所)

(昭和49年10月受理)

血球膜を凍結した時の変化を、酵素活性などを目安として調べてきた¹⁻⁵⁾。今回は、血球膜によるメチルオレンジの結合が、凍結によってどのような影響を受けるかを調べたので報告する。蛋白質などの巨大分子と簡単なイオンや色素イオンなどの低分子との結合の研究は、その結合の性質を明らかにするばかりでなく、蛋白質などの構造や性質との関係を理解する上に役立っている。従って、血球膜とメチルオレンジとの結合を調べることによって、凍結による膜の状態変化を推測する手掛かりが得られるのではないかと考えた。

膜は Dodge らの方法⁶⁾に従って調製し、20 mOsm の磷酸緩衝液 (pH 7.4) に浮遊させて、採取した血液とほぼ同量の血球膜浮遊液として用いた。この膜浮遊液 0.5 ml を試験管にとり、 -8°C の恒温箱、又は、液体窒素に入れて凍結した。融解は $30\sim 40^{\circ}\text{C}$ の温水中で行った。メチルオレンジの結合量は、次のような方法で測定した。20 mOsm 磷酸緩衝液 (pH 7.4) に溶かしたメチルオレンジ溶液 4 ml に膜浮遊液 0.5 ml を加へ、 0°C に 4~5 時間おいた後、10,000 rpm で 30 分遠心し、その上清についてメチルオレンジの濃度を測り、その減少量から結合量を算定した。メチルオレンジの濃度は、464 nm における吸収から求めた。なお、この波長における分子吸光係数は $26,900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である。得られた結果は、次の式に従って処理した。

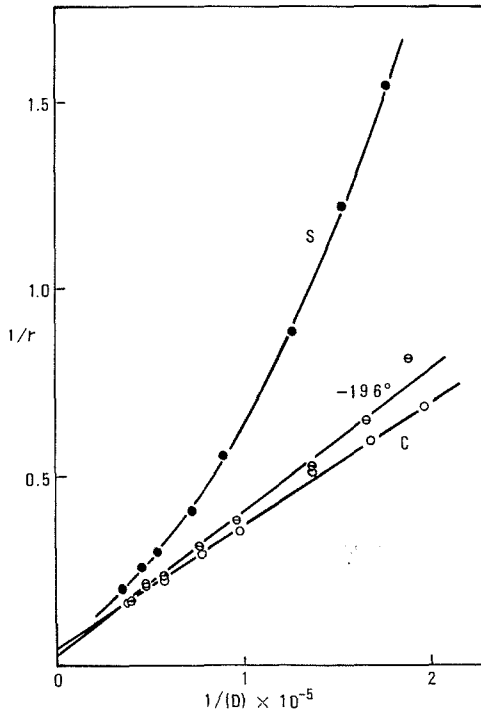
$$1/r = (1/nK \cdot 1/[D]) + 1/n$$

ここで、 r は血球膜乾燥重量 10^6 g 当たり結合したメチルオレンジのモル数、 n は最大結合数、 K は平衡定数、 $[D]$ は結合していないメチルオレンジの濃度である。

上の式に従って表わした結果の一例を第 1 図に示した。図には示さなかったが、 -8°C で凍結した場合は、対照と殆んど同じ直線にのった。又、超音波で膜を壊わした時、図から明らかのように、直線とはならず上向きの曲線となった。この結果は、メチルオレンジの濃度が低くなると、膜の結合力が急速に低下することを意味している。これ程著しくはないが、 -196°C で凍結融解を 6 回繰返した膜でも似た傾向がみられた。 -196°C で 1 回凍結した場合は、図に示した様に対照に比べやや傾斜の大きい直線になった。

このような図から求めた K 及び n の値を第 1 表に示した。 -8°C で凍結した膜では、その

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 1351 号



第1図 ウサギ血球膜に対するメチルオレンジの結合曲線

Cは未凍結, -196° は液体窒素で1回凍結
Sは超音波処理の血球膜

第1表 メチルオレンジに対する血球膜の最大結合数 (n) と平衡定数 (K)

血 球 膜	n	$K \times 10^{-4}$
未 凍 結	22	1.3 ± 0.1
-8°C , 凍 結	23	1.5 ± 0.2
-196°C , 1 回凍 結	49	0.6 ± 0.2

K 及び n は、未凍結の膜と殆んど同じ値であった。一方、 -196°C で凍結した膜では、 K で対照の約 $1/2$ 、 n で約 2 倍の値が得られた。 K の値からみると、比較的高い温度で凍結した膜のメチルオレンジに対する結合力は変わらないが、 -196°C で凍結した時、それがやや低下しているのが明らかである。一方、このような図から求められた n の値は不確実であることを免れないが⁷⁾、 -196°C で凍結した膜のそれは、対照に比べ常に大きい値を示した。このことは、 -196°C での凍結によって、色素に対する膜の結合部位が増加することを意味している。前報^{3,4)}で、血球膜に対するホスホリパーゼCやトリプシンの反応性が凍結によって高まることから、酵素がその作用部

位により近づき易い状態に膜が変化した。即ち、作用部位の増加が反応性の高まる原因と考えた。このような想定は、今回の実験結果からも支持されるように思われる。勿論、酵素の作用部位と色素の結合部位が同一であるかどうかは分らない。又、超音波で機械的に壊した膜の場合、酵素の反応性でみる限り、凍結した膜と同じ結果を示したが、色素の結合でみると(第1図)、その結合力は著しく低下しているように見える。従って、凍結による膜の状態変化は、超音波による膜の細片化とは可成違った変化と考えるとよいのかも知れない。

メチルオレンジに対するウシ血清アルブミンの結合部位は疎水基の特性を持っていることが示唆されており、蛋白質に結合したメチルオレンジの吸収極大は、約 30 nm も短波長に移動している⁸⁾。しかし、血球膜の場合、光散乱の影響が大きくて余りはっきりしないが、このような著しい吸収極大の移動は認められなかった。従って、血球膜の結合部位がウシ血清アルブミンと同じ性質とは考え難い。又、メチルオレンジは陰イオンであるから、反対の電荷をもった解離基が関与していると考えられるが、それだけで説明出来ない事実も多く知られている⁹⁾。更に、ポリリジンを用いた実験で、S-S結合の導入によって適当なマトリックスを作ると、そのような修飾をしなかったポリリジンに比べ、20倍もメチルオレンジの結合力が増加することが知られている¹⁰⁾。血球膜の場合、メチルオレンジとの結合の性質は分らないが、何れにせよ、今回得られた結果から、血球膜の結合部位の数は凍結によって増加する傾向があり、

その結合力はやや低下するものと思われる。この低下は、結合部位の間の相互作用が大きくなる為か、或いは、その付近の構造が変化する為かも知れない。

文 献

- 1) 竹原一郎 1967 ウサギ血球膜 ATPase に対する凍結の影響. 低温科学, 生物篇, **25**, 155-158.
- 2) 竹原一郎 1969 ウサギ血球膜 ATPase に対する凍結の影響 II. 低温科学, 生物篇, **27**, 161-164.
- 3) 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.
- 4) 竹原一郎 1971 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. 低温科学, 生物篇, **29**, 65-68.
- 5) Takehara, I. and Rowe, A. W. 1971 Increase in ATPase activity in red cell membranes as a function of freezing regimen. *Cryobiology*, **8**, 559-565.
- 6) 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.
- 7) Rosenberg, R. M. and Klotz, I. M. 1960 Dye-binding methods. In *A Laboratory Manual of Analytical Methods of Protein Chemistry* (P. Alexander and R. J. Block eds.), Pergamon Press, London, **2**, 133-168.
- 8) Shikama, K. 1968 Denaturation and renaturation of binding sites of bovine serum albumin for methyl orange. *J. Biochem. (Tokyo)*, **64**, 55-63.
- 9) 宇井信生 1954 他物質との相互作用 (水島・赤堀編: 蛋白質化学), 共立出版, 東京, **2**, 321-346.
- 10) Klotz, I. M. and Harris, J. U. 1971 Macromolecule-small molecule interactions. Strong binding by intramolecularly cross-linked polylysine. *Biochemistry*, **10**, 923-926.