

濃厚卵白オボムチンの形態と
その構成成分との関連性に関する研究

早 川 茂

濃厚卵白オボムチンの形態とその構成
成分との関連性に関する研究

早川 茂

名古屋大学図書
和 748464

報告番号	甲第 1196 号
------	-----------

目次

緒論 1

文献 //

第一章 溶存性オボムチン，不溶性オボムチンへの音波処理に関する基礎的研究について

1. 緒言 14

2. 実験方法 16

3. 実験結果と考察 21

4. 要約 32

5. 文献 33

第二章 溶存性オボムチンの音波処理による解離について

1. 緒言 34

2. 実験方法 37

3. 実験結果 44

4. 考察	57
5. 要約	63
6. 文献	65

第三章 不溶性オボムチンの音波処理による解離成分のサブユニット構造とその分子量について

1. 緒言	67
2. 実験方法	69
3. 実験結果	73
4. 考察	83
5. 要約	88
6. 文献	90

第四章 音波処理不溶性オボムチンと音波処理溶存性オボムチンから得られた成分間あるいはβ成分間の物理化学的同一性について

1. 緒言	92
2. 実験方法	95

3.	実験結果	100
4.	考察	113
5.	要約	120
6.	文献	122

第五章 種々の環境におけるオボムチンの
濁度変化ならびに粘度変化について

1.	緒言	124
2.	実験方法	126
3.	実験結果	128
4.	考察	147
5.	要約	156
6.	文献	158

総合考察	160
------	-----

謝辞	168
----	-----

濃厚卵白オボムチンの形態とその構成成分との関連性に関する研究

緒論

鳥卵は栄養価が高く、かつ手軽に入手出来ることから、古くから食用に供されてきた。鳥卵の中でもとりわけ鶏卵は多く消費されている。

鶏卵は卵殻、卵殻膜、卵白、カラザ、卵黄膜、卵黄からなっている。卵白は9割近くが水分であり、残りの固形分の大部分がタンパク質である。卵白を構成しているタンパク質には多くの種類があるが、主として、オボアルブミン、コンアルブミン、オボムコイド、オボグロブリン、リゾチーム、オボムチンがあげられる。

卵白は四つの層、すなわち、粘度の高いゲ

ル状の濃厚卵白と濃厚卵白をはさむようにして存在する粘度の低い内水様卵白と外水様卵白さらに卵黄膜を包んでそこから明瞭な繊維として濃厚卵白の中に伸びるカラザ層とに分けられる。濃厚卵白は1mmほどの間隔で離れている微細な繊維層である不透明な層とその間にはさまれた透明な層からなり、それらの層によって不均一なゲルが形成されている。²⁻⁶⁾

さらに、上記の繊維層は膨潤したオボムチンからなると考えられている。^{2,4,7)}

オボムチンについての研究は古くから行われており、主として2つの面からオボムチンを研究対象としてきた。1つは、卵白がインフルエンザビールスによる赤血球凝集の阻害作用を有すること、もう1つは卵白が高粘性のゲル構造を有することである。

卵白のインフルエンザビールスによる赤血球凝集の阻害活性は多くの研究者によって研究され、その活性がオボムチンと非常に密接な関係があると報告された。⁸⁻¹⁷⁾ Lanni's ¹¹⁻¹⁵⁾

は卵白中のどの成分が赤血球凝集阻害作用を持つかを粘度，超遠心，電気泳動，電子顕微鏡等を用いて調べた。その結果，赤血球凝集阻害作用をもつものは沈降係数 $31 \sim 37.5$ ，分子量 > 60 万，電気泳動移動度 -3.5 ， -6.7 ， $-10 \times 10^5 \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1} \text{ volt}^{-1}$ の $5 \sim 10 \mu\mu$ の幅をもつ繊維状物質であり，極めて粘性の高い，熱に安定な非透析性のタンパク質 - 糖複合体であることが分かった。従うは，これらのことから，赤血球凝集阻害物質は卵白の構造タンパク質であるオボムチンと同一であると考えた。

一方，卵白が簡単に濃厚卵白と水様卵白とに分けられることから，濃厚卵白と水様卵白との違いについて調べられるようになった。Almquist と Lorenz²⁾，MacNally⁴⁾，Balls と Hoover¹⁸⁾ は濃厚卵白のオボムチン含量は水様卵白のオボムチン含量よりもはるかに高いことを見いだした。現在の調製法により得られるオボムチンとは異なり，当時の調製法により得られるオボムチンはかすりの不純物を含んでいるという間

題点はあるにしても、後の得た知見により濃厚卵白におけるオボムチンの役割が注目され始めた。

さて、卵を貯蔵すると濃厚卵白のゲル構造がこわれ、濃厚卵白の量ならびにゲル強度がともに減少し、同時に水様卵白の量が増加する。この現象は主として温度、貯蔵期間そして pH のようなその他の要因によって影響を受ける。この現象は卵白の水様化 (Egg White Thinning) と呼ばれ、卵の加工・利用上の観点からの品質の保持と…う点で重大な関心が払われてきた。そして、この卵白の水様化とオボムチンとの関係について、前述の濃厚卵白におけるオボムチンの役割とあわせて非常に多くの人が研究を行って来た。¹⁸⁻²¹⁾

卵白の水様化は微生物によって引き起こされるものでなく、主たる要因は卵白自体にあるということが確認された。^{19,20)} 佐藤と中村²¹⁻²⁴⁾ は貯蔵卵の分析結果から、貯蔵濃厚卵白中のオボムチンの減少と貯蔵水様卵白におけるコ

ンアルブミン百分の減少とグロブリン百分の増加を認めた。さらに、濃厚卵白が水様化した後でもオボムチンは水様卵白から回収されることから、卵白水様化はオボムチン繊維の崩壊によるものであると考えられるようになった。^{18,24)} これらのことから、オボムチン繊維が貯蔵中に存在崩壊するかどうかという点に研究の焦点が当てられるようになった。

Hoover²⁵⁾ はシステインあるいはチオグリコール酸が濃厚卵白を水様化させることを示し、MacDonnell ら²⁶⁾ は少量の H_2S , SO_2 が外気中に存在することにより水様化が起きるということを見いだした。このことから、彼らはオボムチンの SS 結合の開裂により水様化が起きると考えた。しかしながら、卵白中の還元性物質はオボアルブミンの SH 基が主であるが、この SH 基は通常タンパク質鎖の中に包みこまれてゐる。さらに、貯蔵中に還元性物質の増加も認められないので SS 結合の還元による水様化という考えは一時期根拠のないもので

あると見取されてゐた。しかしながら、最近
になつて、Donovan ら^{28,29)} はオボムチンのSS結
合がOHイオンによつて加水分解されることに
より、濃厚卵白やオボムチンの粘度、分子量
がともに極端に減少することを報告した。ま
た、Beveridge と Nakai²⁹⁾ は PCMB (p-chloromercuribenzoate)
や $HgCl_2$ により濃厚卵白中のSH基をブロックす
ることにより卵白水様化を抑えることが出来
るといふことを報告した。このように、オボ
ムチンのSS結合の開裂による卵白水様化の
可能性が再び示唆されるようになった。

一方、Meyer と Hahnel³⁰⁾ のリゾチームがムコイ
ド様物質に作用することにより還元性物質が
増加するといふ知見から端を遡してリゾチー
ムに焦点をあてた研究が行われるようになった。
しかしながら、卵白から単離したオボム
コイドとリゾチームをインキュベートしても
還元性物質の増加は見られなかつた。ところが、
オボムチンとリゾチームをインキュベー
トすると沈殿が生成することが見いだされた。

Hawthorne³¹⁾ は卵白の水様化はオボムチンへのリゾチームの作用によるものであると考えた。この Hawthorne の示唆したオボムチン-リゾチーム複合体の考えは Cotterill と Winter³²⁾ によって引き継がれた。彼らは、沈殿となるオボムチン-リゾチーム複合体の量が pH の上昇にともない減少することを見いだし、卵白水様化の原因として貯蔵中の pH の上昇によるオボムチン-リゾチーム複合体における相互作用の弱化をあげた。さらに、Brooke と Hale^{33,34)} は濃厚卵白のゲルの粘弾性についての研究から、卵白水様化の初期の段階に考えられていたオボムチン繊維の単なる崩壊よりもむしろオボムチン-リゾチーム複合体の網目構造の崩壊の方が卵白水様化をよりよく説明できると提案した。加藤ら³⁵⁻³⁷⁾ や Robinson³⁸⁻⁴⁰⁾ はオボムチンを還元剤で可溶化することにより 2 成分 (α 成分, β 成分) に分別し、濃厚卵白を貯蔵すると主としてオボムチンの β 成分が水様卵白に移行することを見い出した。このことから彼らはオ

オボムチン-リゾチーム複合体からの β 成分の溶脱による網目構造の崩壊を卵白水様化の要因としてあげた。

以上のように卵白水様化に関する二つの考え方—i)貯蔵中におけるオボムチンのSS結合の開裂, ii)貯蔵中のpH上昇によるオボムチン-リゾチーム複体の網目構造の崩壊—が相譲らぬまま現在に到っている。この理由としては、それぞれの考え方を立証する直接的証拠に欠けるためであると思われる。直接的証拠を得るのが難かしい理由の一つとして、卵白水様化が長時間必要とすること(殻付卵の場合、濃厚卵白の半分が水様化するのに 30°C で10数日必要とする。)と卵白がオボムチン以外に種々のタンパク質を含む複合系であるという点があげられる。複合系という点を克服するため、著者ら⁴⁾は濃厚卵白から単離した不溶性オボムチンを種々の溶液中で 30°C 、15日間無菌的に貯蔵し、 β オボムチンの可溶化の原因をつきとめようと試みた。その結果、

彼らは卵白水様化に関して新たな知見を加えた。すなわち、 $\text{pH } 9 \sim 10$ の緩衝液中で不溶性オボムチンを貯蔵した時、約 50% の不溶性オボムチンが可溶化することを見いだした。また、イオン強度 0.1 (卵白の無機塩含量から計算した卵白のイオン強度に相当) の緩衝液 ($\text{pH } 9.6$) 中で不溶性オボムチンを貯蔵した時、主として α オボムチンが可溶化した。ところが、緩衝液のイオン強度を下げるかあるいは 5% 濃度になるようオボアルブミンを添加して、その中で不溶性オボムチンを貯蔵すると可溶化するオボムチン中の α オボムチンの量が減少し、逆に β オボムチンの量が増加した。とくに、イオン強度 10^{-4} の塩溶液を用いた時は可溶化したオボムチンの大部分を β オボムチンが占めていた。このようにリゾチームを含まない精製したオボムチンを用いて卵白水様化をより簡単な系で再現させることができた。そして、彼らは β オボムチンの可溶化を伴う卵白水様化は貯蔵中の pH の上昇、卵白中

の種々のタンパク質によるイオン強度の引下げ、高い貯蔵温度という要因によって引き起こされると提案した。このうち最も重要な要因であると思われる希薄溶液におけるイオンが Donovan²⁷⁾らの示唆のようにオボムチンのSS結合に作用するかどうかは明らかではない。

したがって、鶏卵貯蔵中における卵白水様化の機構についてより理解を深めるためにはオボムチンの分子構造、不溶性オボムチンと溶解性オボムチンの形態と物理化学的性質における差異の由来、オボムチンおよびその構成成分に対するイオンの影響ならびに構成成分間の相互作用について詳しく調べる必要がある。

本論文においては濃厚卵白水様化の機構の一端詳細な解明に資する目的をもち、上記の基礎的な諸問題について研究を行った。

REFERENCES

- 1) A.L. Romanoff and A.J. Romanoff, "The Avian Egg" J. Wiley and Sons, Inc., New York 1949.
- 2) H.J. Almquist and F.W. Rorenz, U.S. Egg Poultry Mag., 38(4) 20 (1932).
- 3) G.C. Heringa and S.H.K. Valk, Proc. Acad. Sci. Amsterdam, 33, 530 (1930).
- 4) E. MacNally, Proc. Soc. Exptl. Biol., 30, 1254 (1932-33).
- 5) P. Schaible, J.M. Moore and J.A. Davidson, U.S. Egg Poultry Mag., 41(12), 38 (1935).
- 6) T. Moran and H.P. Hale, J. Exptl. Biol., 13, 35 (1936).
- 7) H.J. Almquist, J.W. Givens and A. Klose, Ind. Eng. Chem., 26, 847 (1934).
- 8) A. Gottschalk and P.E. Lind, Brit. J. Exptl. Path., 30, 85 (1949).
- 9) A. Gottschalk and P.E. Lind, Nature, 164(4162), 232 (1949).
- 10) G.S. Fazekas and A. Gottschalk, Brit. J. Exptl. Path., 32, 21 (1951).
- 11) F. Lanni and J.W. Beard, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 68, 312 (1948).
- 12) E.A. Eckert, F. Lanni, D. Beard and J.W. Beard, Science, 109, 463 (1949).
- 13) F. Lanni, D.G. Sharp, E.A. Eckert, E.S. Dillon, D. Beard and J.W. Beard, J. Biol. Chem., 179, 1275 (1949).
- 14) D.G. Sharp, F. Lanni and J.W. Beard, J. Biol. Chem., 185, 681 (1950).
- 15) D.G. Sharp, F. Lanni, Y.T. Lanni, T.Z. Csaky and J.W. Beard, Arch. Biochem., 30, 251 (1951).
- 16) J.D. Stone, Aust. j. Exptl. Biol. Med. Sci., 27, 557 (1949).
- 17) T.F. Sugihara, L.R. MacDonnell, C.A. Knight and R.E. Feeney, Biochim. Biophys. Acta, 16, 404 (1955).

- 18) A.K. Balls and S.R. Hoover, *Ind. Eng. Chem.*, 32, 594 (1940)
- 19) R.E. Feeney, R.B. Silva and L.R. MacDonnell, *Poultry Sci.*,
30, 645 (1951)
- 20) B.R. Baliga, S.B. Kadkol and N.L. Lahiry, *Ind. J. Technol.*,
2, 69 (1964)
- 21) 佐藤 泰, 中村良 *日畜会報* 29, 297 (1958)
- 22) 佐藤 泰, 中村良 *日農化誌* 33, 872 (1959)
- 23) 佐藤 泰, 中村良, 吉川良秀, 高木幸吉 *日農化誌* 34, 1000 (1960)
- 24) 佐藤 泰, 中村良 *日農化誌* 38, 342 (1964)
- 25) S.R. Hoover, Doctorial Thesis (1940) Georgetown Univ. Washington
D.C., 45p
- 26) L.R. MacDonnell, H. Lineweaver and R.E. Feeney, *Poultry Sci.*,
30, 856 (1951)
- 27) J.W. Donovan, J.G. Davis and M.B. Wiele, *J. Agric. Food Chem.*,
20, 223 (1972)
- 28) Y. Tomimatsu and J.W. Donovan, *J. Agric. Food Chem.*, 20, 1067 (1972)
- 29) T. Beveridge and S. Nakai, *J. Food Sci.*, 40, 864 (1975)
- 30) K. Meyer and E. Hahnel, *J. Biol. Chem.*, 163, 723 (1945)
- 31) J.R. Hawthorne, *Biochim. Biophys. Acta*, 6, 28 (1950)
- 32) O.J. Cotterill and A.R. Winter, *Poultry Sci.*, 34, 679 (1955)
- 33) J. Brooks and H.P. Hale, *Biochim. Biophys. Acta*, 32, 237 (1959)
- 34) J. Brooks and H.P. Hale, *ibid*, 46, 289 (1961)
- 35) A. Kato, R. Nakamura and Y. Sato, *Agric. Biol. Chem.*,
35, 351 (1971)
- 36) A. Kato and Y. Sato, *ibid*, 35, 439 (1971)
- 37) A. Kato and Y. Sato, *ibid*, 36, 831 (1972)

- 38) D.S. Robinson and J.B. Monsey, *Biochem. J.*, 121, 537 (1971)
- 39) D.S. Robinson and J.B. Monsey, *J. Sci. Food Agric.*, 23, 29 (1972)
- 40) D.S. Robinson, "Egg Formation and Production" p65 by B.M. Freeman
and P.E. Lake, British Poultry Science Ltd, Edinburgh, 1972.
- 41) Y. Sato, S. Hayakawa and R. Nakamura, *J. Agric. Food Chem.*,
24, 796 (1976)

第一章 溶存性オボムチン，不溶性オボムチンへの音波処理に関する基礎的研究について

1. 緒言

オボムチンは濃厚卵白のゲル状構造を保持するといわれてゐる糖タンパク質である。^{1,2)}

濃厚卵白におけるオボムチンの構造はいぜん明らかになつてゐない。そこで、オボムチンの分子構造を明らかにする必要がある。

オボムチンはメルカプトエタノール等の還元剤で処理することにより、糖含量の低い α オボムチンと糖含量の高い β オボムチンの二成分に解離する。³⁻⁵⁾ この還元剤を用ゐる方法はオボムチンのSS結合を切断し、オボムチンを最小単位にまでしてしまふ。したがつて、オボムチンの分子的構成を知るためには好ましい方法ではない。

音波処理は会合したある種のタンパク質分子を重大な損傷を与えずに解離させることができるといわれている。⁶⁻⁸⁾

そこで、音波処理^法を溶存性・不溶性オボムチンに適用し、音波処理の及ぼす影響についての基礎的研究を行った。

2. 実験方法

1) 実験材料の調製

1) 溶存性オボムチンの調製

溶存性オボムチンの調製は Young と Gardner⁹⁾ と加藤ら¹⁰⁾の方法を改良して行った。すなわち、ホワイトレグホン種から得られた産卵後6時間以内の鶏卵から卵白をとり出した。この卵白をふるい(9個/cm²の直径2mmの穴を有する直径8cmの円形容器)を用いることにより濃厚卵白と水様卵白とに分けた。濃厚卵白を泡が立たないように低速でホモゲナイザーにより均質化した。均質化した濃厚卵白を超遠心分離(59,000×g, 1時間)により、ゲル状部分と液状部分とに分けた。

液状部分は3倍容の水で希釈した後、1N塩酸によりpH6に調整した。一夜低温室に静置した後、生じた沈殿を遠心することなしにデカンテーションにより集めた。集めた沈殿を水で2回洗浄し、0.4M NaClを含むpH9,

0.1M 炭酸塩 (Menzel) 緩衝液に溶かした。この溶液 (粗オボムチン溶液) を Sepharose 4B のカラムにのせ、同じ緩衝液を用いて溶出した。そして、各フラクションを 280 m μ の吸光度とリゾチーム活性について測定し (図1), void volume の位置に溶出するリゾチームを含まない画分を集めた。このような方法で濃厚卵白液状部分から調製したオボムチンを溶存性オボムチンと名づけた。

ロ) 不溶性オボムチンの調製

不溶性オボムチンは加藤らの方法¹⁰⁾により濃厚卵白ゲル状部分から調製した。ゲル状部分も 2% KCl を用いて直接洗浄し、洗液がタンパク質を含まなくなるまで (等量の 10% トリクロル酢酸を加えて白濁が生じなくなるまで) 洗浄、遠心 (6000 rpm, 30分) を繰返した。精製したオボムチンのゲル中の KCl は水に対して透析することにより除去した。こうして得られたオボムチンを不溶性オボムチンと名づけた。

ハ) その他のタンパク質の調製

オボアルブミンは Sørensen と Höyrup の方法¹¹⁾ により調製した。

リゾチームは Alderton と Fevald の方法¹²⁾ により調製した。

牛血清アルブミンとガンマグロブリンは Mann Research Lab. より購入した。

2) リゾチーム活性の測定

リゾチーム活性は Gäumann と Böhrer の方法¹³⁾ により測定した。基質として用いた *Micrococcus lysodeikticus* の粉末は Warthington Biochemical 社より購入した。

3) SDS ホリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS 電気泳動は Weber と Osborn の方法¹⁴⁾ により行った。0.1% SDS を含む 5% ホリアクリルアミドゲルを用いた。緩衝液として 0.1% SDS を含む 0.2M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.6) を用い、6 mA/tube で 2 ~ 3 時間泳動した。マーカー色

素としてBPBを用いた。泳動後、ゲルを7%酢酸を含む1%アミドブラック10Bによって染色した。7%酢酸で脱色後、泳動パターンをデンストメーターにより記録した。なお、分子量をもとめるための検量線は第三章第2図を参照された。

4) 化学分析

全窒素はケルダール法により定量した。

ヘキソースはフェノール硫酸法¹⁵⁾により定量した。

シアル酸はWarrenの方法¹⁶⁾により定量した。

アミノ酸組成はJLC-6AHアミノ酸自動分析機を用いて分析した。試料は6N塩酸を含む減圧封管中で110℃、24時間加水分解した。システインはEllmanの方法¹⁷⁾により定量した。

5) 溶存性オボムチンと不溶性オボムチン

への音波処理

溶存性、不溶性オボムチンをpH 9.5, イオン強度0.01の炭酸塩緩衝液に對して十分に透析

した後、100 W、9 kHz で 2 °C に おい て 10 分 間
音 波 処 理 し た。

3. 実験結果と考察

不溶性オボムチンを音波処理することにより、一部の不溶物（不溶性オボムチンの全窒素に対して2.5%；表1）を残して大部分が溶解した。溶存性オボムチンは音波処理により^{は生}沈殿しなかった。なお、溶存性オボムチンの音波処理による変化については第二章に詳細に述べる。

そして、不溶性オボムチンと溶存性オボムチンを音波処理した際に低分子物質の遊離が観察された。そこで、溶存性、不溶性オボムチンを音波処理した後、分子量1万以下の低分子物質を限外口過により分別した。そして、低分子物質中の各成分（窒素、ヘキソース、シアル酸）のオボムチンの各成分の全量に対する割合をもとめ、その値を表1に示した。溶存性オボムチンの場合、低分子物質中の窒素、ヘキソースの量は全体の1%以下にすぎなかった。シアル酸の量は全体の4%

に相当した。一方、不溶性オボムチンの場合、低分子物質中にシアル酸は検出されなかった。また、窒素、ヘキソースともに全体の1%以下にすぎなかった。

不溶性オボムチンのSS結合をチオグリコール酸¹⁸⁾やメルカプトエタノール³⁾により切断し、不溶性オボムチンを溶解した場合でも、%のオボムチンが低分子化する。したがって、オボムチンの1%程度の低分子化は音波処理に特有のものであるとは限らざると考えられる。ただし、この低分子物質がオボムチンのゲル状構造にどのような働きをしているかはいまのところ明らかではない。

ところで、不溶性オボムチンを音波処理した際に不溶物が残ったが、この不溶物をメルカプトエタノールを含むSDS溶液中に溶解して(全部は溶けなかった)SDS電気泳動にかけたところ、原点にとどまるオボムチンと思われるバンド以外にリゾチーム、コンアルブミン、オボアルブミンの分子量と同じ位置に

かなり濃いバンドが検出された。そして、この不溶物のアミノ酸組成には特徴的な様相は見られなかった(表2)。

溶存性オボムチンと不溶性オボムチンを音波処理した際に生じた低分子物質のアミノ酸組成を表2に示した。参考としてオボムチンと同条件で音波処理したオボアルブミンから生じた低分子物質のアミノ酸組成も示した。

低分子物質中のアミノ酸は親水性のアミノ酸特にセリン、グルタミン酸、グリシンが圧倒的に多かった。溶存性オボムチン、不溶性オボムチンから遊離した低分子物質のアミノ酸の数はもとのオボムチンのアミノ酸1000個あたり1~2個にすぎなかった。しかしながら、オボアルブミンにくらべると10倍近くのアミノ酸が遊離することになり、オボムチンの特性を反映していると思われる。

オボアルブミン等のモデルタンパク質を用いて音波処理によるアミノ酸残基、ポリペプチド鎖、分子内・分子間SS結合への影響を

調べた。

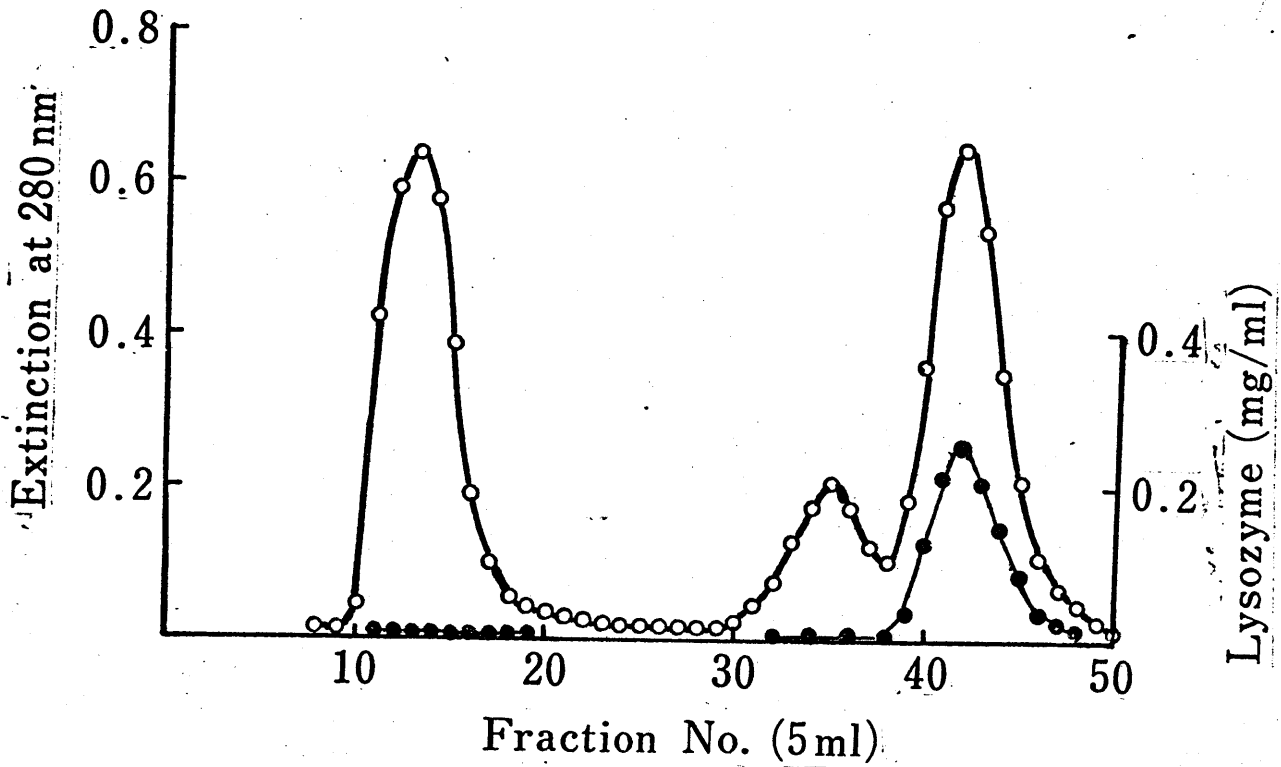
オボムチンと同じ条件下で音波処理したオボアルブミン、リゾチームのアミノ酸組成を表3に示した。音波処理したものと未処理のもの間には全く差は認められなかった。また、音波処理したリゾチームあるいは音波処理溶存性オボムチン中には遊離のSH基は検出されなかった。

音波処理したオボアルブミンと牛血清アルブミンのSDS電気泳動のパターンを図2に示した。音波処理オボアルブミンは未処理オボアルブミンと同一のパターンを示し、分子量45,000の位置に一本のピークとあった。また、音波処理牛血清アルブミンも未処理牛血清アルブミンと同一のパターンを示し、その主要なピークは分子量67,000の位置であった。

音波処理ガンマグロブリンのSDS電気泳動のパターンを図3に示した。よく知られているように、ガンマグロブリンは2本のH鎖と2本のL鎖が分子間のSS結合によって分子

量 16 万の分子を形成している。そこで、分子間 SS 結合が音波処理によりどのような影響を受けるかを調べるために還元剤を用いずに SDS 電気泳動を行った。その結果、音波処理ガンマグロブリンは未処理のガンマグロブリンと同一の電気泳動パターンを示し、分子量 16 万の位置にある主ピークに全く変化はみられなかった。

以上の結果から、これらモデルタンパク質は音波処理により、アミノ酸残基の分解やペプチド結合の開裂そして分子間ないし分子内の SS 結合の開裂が起きないということを示唆している。これらのことから完全にオボムチンにあてはまるという確証はないが、オボムチンが上記のモデルタンパク質と同じ性質をもつと考えるならば、音波処理は少くともオボムチンのアミノ酸残基、ポリペプチド鎖、SS 結合には影響しないと考えられる。



I-Fig. 1. Gel Filtration of Crude Ovomucin on a Sepharose 4B.

The column was eluted with 0.1 M Menzel buffer (pH 9) containing 0.4 M NaCl. o—o, the extinction at 280 nm; ●—●, lysozyme activity.

I-Table I The Ratio of Small Molecular Material ^{a)} or Insoluble Material ^{b)} to Sonicated Soluble and Insoluble Ovomucins.

The ratio of content of each component in small molecular material or insoluble material to total content of the component in sonicated ovomucins are shown as percent.

	Small molecular material			Insoluble material
	Nitrogen	Hexose	Sialic acid	Nitrogen
Soluble ovomucin	0.4 %	0.6 %	4.0 %	0.0 %
Insoluble ovomucin	0.9 %	0.8 %	0 %	2.5 %

a) Small molecular material was obtained by ultrafiltration of sonicated ovomucins.

b) Insoluble material was obtained from sonicated insoluble ovomucin.

I- Table II. Amino Acid Composition of Small Molecular Material and Insoluble Material Obtained from Sonicated Soluble and Insoluble Ovomucins.

Values are shown as μ mole per gram of sonicated ovomucins.

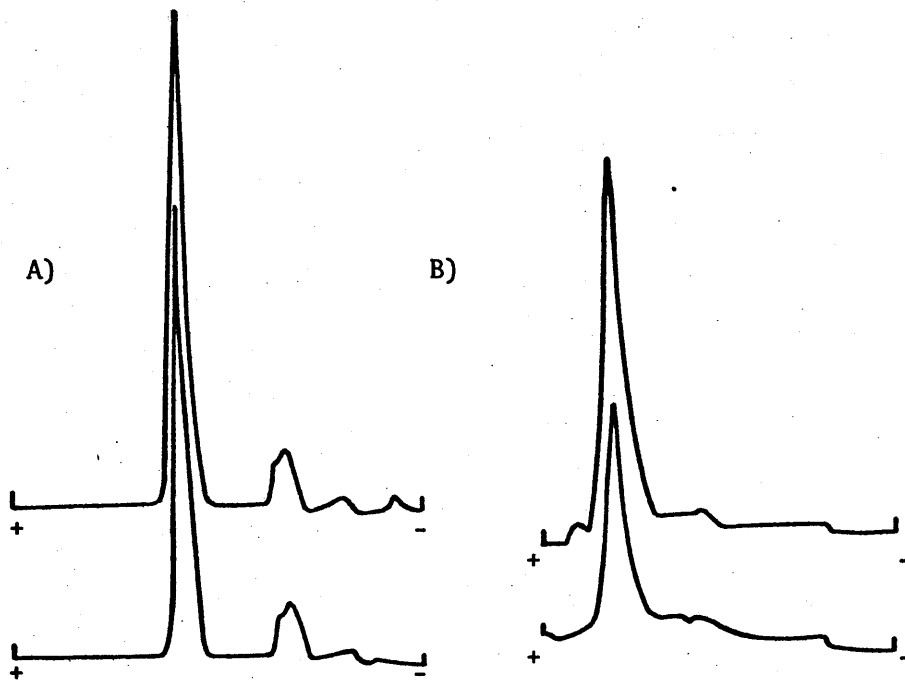
	Small molecular material		Insoluble material	Ovalbumin
	Insoluble ovomucin	Soluble ovomucin		
Lysine	0.39	0.42	6.4	0.09
Histidine	0.68	0.60	4.0	0.18
Arginine	0.20	0.33	8.3	0.08
Aspartic acid	0.60	1.04	12.2	0.09
Threonine	0.46	0.83	9.2	0.04
Serine	1.09	1.88	12.4	0.15
Glutamic acid	1.45	2.38	14.1	0.18
Proline	0.20	0.15	9.5	0
Glycine	1.80	1.87	9.1	0.19
Alanine	0.67	1.34	12.7	0.14
Cystine (half)	0	0	3.6	0
Valine	0.32	0.51	13.6	0.03
Methionine	0.03	0.18	4.0	0.01
Isoleucine	0.26	0.34	6.5	0.03
Leucine	0.30	0.40	20.6	0.02
Tyrosine	0.07	0	4.0	0
Phenylalanine	0.44	0.23	5.7	0.13
Total μ mole	8.96	12.50	156.0	1.36
Total weight (mg)	1.14	1.59	19.8	0.17

I- Table III. Influence of Sonication on Amino Acid

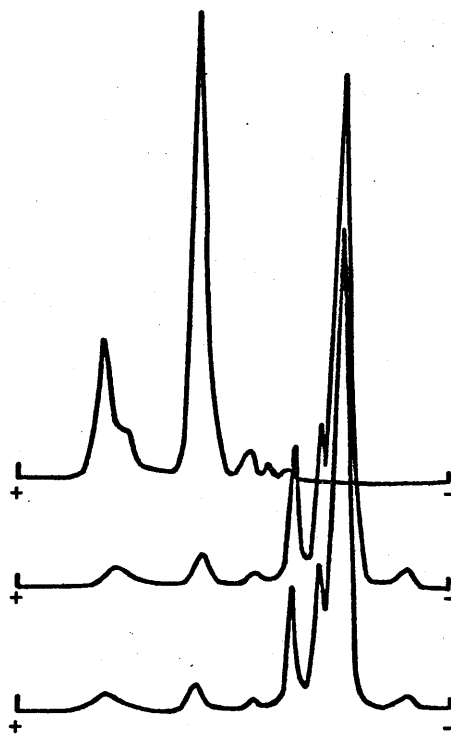
Composition of Ovalbumin and Lysozyme

All values are shown as mole per mole of protein.

	Sonicated Ovalbumin	Ovalbumin	Sonicated Lysozyme	Lysozyme
Lysine	23	23	7	7
Histidine	7	7	1	1
Arginine	15	15	11	11
Aspartic acid	33	33	20	20
Serine	37	37	10	10
Threonine	16	16	7	7
Glutamic acid	47	48	6	6
Proline	12	12	2	2
Glycine	19	20	12	12
Alanine	39	38	12	11
Cystine	3	2	3	3
Valine	28	29	5	5
Methionine	16	16	2	2
Isoleucine	25	26	6	6
Leucine	33	32	9	9
Tyrosine	12	12	4	4
Phenylalanine	22	21	4	4



I- Fig. 2. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Sonicated or Non-sonicated Bovine Serum Albumin (A) and Ovalbumin (B). Both Lower are Sonicated Proteins.



I- Fig. 3. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis
of Gamma Globulin and Sonicated Gamma Globulin.
Upper : Gamma Globulin with 2-mercaptoethanol,
Middle : Gamma Globulin without 2-mercaptoethanol,
Lower : Sonicated Gamma Globulin without 2-mercapto-
ethanol.

4. 要約

1) 溶解性オホムチンと不溶性オホムチンは音波処理により、1%程度の低分子物質を遊離した。この低分子物質の遊離はオホムチンの構造的特異性に由来すると推定された。

2) オホアルブミン等のモデルタンパク質を用いて、オホムチンと同じ条件下で音波処理した結果、アミノ酸残基の分解、ポリペプチド鎖の切断、SS結合の切断は認められなかった。したがって、音波処理はオホムチンの一次構造、SS結合には影響しないと考えられた。

5 REFERENCES

- 1) H.J. Almquist and F.W. Rorenz, U.S. Egg Poultry Mag., 38(4), 20 (1932).
- 2) E. MacNally, Proc. Soc. Exptl. Biol., 30, 1254 (1932-33).
- 3) A. Kato and Y. Sato, Agric. Biol. Chem., 35, 439 (1971).
- 4) A. Kato and Y. Sato, *ibid*, 36, 831 (1972).
- 5) D.S. Robinson and J.B. Monsey, Biochem. J., 121, 537 (1971).
- 6) K. Mihashi, Arch. Biochem. Biophys., 107, 441 (1964).
- 7) P.F. Davison and M.P. Drake, Biochemistry, 5, 313 (1966).
- 8) M. Hoshino, Biochim. Biophys. Acta, 403, 544 (1975).
- 9) L. Young and F.A. Gardner, J. Food Sci., 37, 8 (1972).
- 10) A. Kato, R. Nakamura and Y. Sato, Agric. Biol. Chem., 34, 854 (1970).
- 11) S.P.L. Sørensen and M. Höyrup, Z. Physiol. Chem., 103, 15 (1918).
- 12) G. Alderton and H.L. Fevold, J. Biol. Chem., 164, 1 (1946).
- 13) E. Gäumann and E. Böhni, Helv. Chem. Acta, 30, 24 (1947).
- 14) K. Weber and M. Osborn, J. Biol. Chem., 244, 4406 (1969).
- 15) M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton and F. Smith, Anal. Chem., 28, 350 (1956).
- 16) L. Warren, J. Biol. Chem., 234, 1971 (1959).
- 17) G.D. Ellman, Arch. Biochem. Biophys., 82, 70 (1959).
- 18) R. Nakamura, A. Kato and Y. Sato, Nippon Nōgeikagaku Kaishi, 43, 105 (1969).

第二章 溶存性オボムチンの音波処理による解離について

1. 緒言

オボムチンという名は卵白のゲル構造を維持する糖タンパク質に与えられた¹⁾。オボムチンは極めて大きな分子量²⁻⁴⁾と高い粘度⁵⁻⁸⁾をもつ糖タンパク質であり、その構成糖としてマンノース、ガラクトース、Nアセチルグルコサミン、Nアセチルガラクトサミン、Nアセチルノイラミン酸(シアル酸)、硫酸エステルがあげられる^{9,10)}。また、オボムチンは糖含量約15%の α 成分(α オボムチン)と糖含量約60%の β 成分(β オボムチン)という2成分から構成されている^{9,10)}。

緒論において述べたように、濃厚卵白の高粘度のゲルはオボムチンとリゾチームの間の相互作用によって保持されていると多くの

研究者によって考えられてきた。¹¹⁻¹⁵⁾ 加藤らもまた、オボムチンの構成成分である α オボムチンと β オボムチンがリゾチームとの間で相互作用することにより形成された複合体が濃厚卵白のゲルを保持していると考えた。¹⁶⁻¹⁷⁾

ところが、TomimatsuとDonovanは分子量22万のいくつかのサブユニットから構成されているオボムチン鎖が、リゾチームの有無に関係なく、ある特異的な部位において会合した結果できた高分子が濃厚卵白のゲルを保持するオボムチンであると提案している。³⁾

このように、濃厚卵白におけるオボムチンの構造についてはいぜん明らかにはなっていない。したがって、オボムチンの分子構造をより明らかにする必要がある。

前章において、不溶性オボムチンが音波処理により可溶化することを見出し、そして、音波処理が不溶性オボムチン、溶存性オボムチンに及ぼす影響についての基礎的知見を得た。そこで、溶存性オボムチンと不溶性オボ

ムチンは音波処理により同様な分子構造上の影響を受けると考えられる。そこで、本章において、実験上扱いやすい溶存性オボムチンのみを用いて、音波処理による溶存性オボムチンの解離について調べた。

2. 実験方法

1) 溶存性オボムチンの調製

溶存性オボムチンは第一章と同じ方法により調製した。

2) 溶存性オボムチンへの音波処理

溶存性オボムチンへの音波処理は第一章と同じ条件下で行った。

3) 音波処理溶存性オボムチンの還元

音波処理溶存性オボムチンのSS結合の還元は Small と Lamm¹⁸⁾ の方法により行った。すなわち、0.1M ジチオスレイトール (DTT) と 6M 塩酸グアニジンを含む 0.5M トリス塩酸緩衝液 (pH 8) に音波処理溶存性オボムチンを溶解し、20℃、16時間静置した。生じたSH基を 0.24M ヨード酢酸と 4M 塩酸グアニジンを含む 1M トリス溶液を添加し、1時間反応させることによりアルキル化した。

4) 粘度測定

オボムチンの粘度測定はオストワルド型粘度計を用いて行った。この粘度計はサンプルとして蒸留水を用いた時、25℃において100秒要するものであった。測定温度は25℃±0.1℃であり、電子冷熱装置（クールユニット）を用いてコントロールした。用いたオボムチンの濃度は0.2～7 mg/mlの範囲内であり、イオン強度0.1の炭酸塩緩衝液（PH 9.3）を溶媒として用いた。また、オボムチン濃度は窒素係数8.77にもとづいてケルダール法により求めた。

還元粘度 (η_{red}) は次式により計算した。

$$\eta_{red} = \eta_{sp} / c \quad \text{ここで, } \eta_{sp} \text{ は}$$

$\eta_{solution} / \eta_{solvent} - 1$ であり、 c はタンパク質濃度である。

固有粘度は種々の濃度における還元粘度を濃度0に外挿することにより求めた。

5) 光散乱測定

光散乱測定は島津製作所製の photoelectric light scattering photometer, Type PG-21 を用いて行った。測定は波長 4360 \AA , 30° から 135° の間の角度分布で行った。溶媒はすべて pH 9.5, イオン強度 0.01 の炭酸塩緩衝液を用いた。溶液はすべて Millipore filter によりろ過した。測定は Kamata と Nakahara¹⁹⁾ の一濃度法にもとづき, 低タンパク質濃度 (0.2 mg/ml 以下) で行った。オホムチンの屈折係数 (dn/dc) は Tomimatsu と Donovan³⁾ によつてオホムチンに用いられた値 0.182 を用いた。オホムチン濃度は窒素係数 8.77 (溶存性オホムチンの窒素含量 11.4% から計算) にもとづき, ケルダール法により求めた。

6) 密度勾配電気泳動

密度勾配電気泳動は LKB 7900 Uniphor column を用いて行った。pH 8.2, 0.3 M ホウ酸緩衝液中のシヨ糖濃度を 0 から 40% まで変えてシヨ糖による密度勾配をカラム内に形成した。試料

をカラムの上端にのせた。300Vの定電圧で24時間、4°Cにおいて泳動を行った。泳動後、カラム内の溶液を下から5mlずつ試験管に分画した。ショ糖を完全に除去するため各フラクションを0.3Mホウ酸緩衝液に對して徹底的に透析した。透析後、各フラクションを10mlに定容した。フェノール硫酸法²⁰⁾によりヘキソースを染色させ、その490nmの吸光度を測定した。

7) セルロースアセテート電気泳動

セルロースアセテート電気泳動はセルロースアセテート膜として幅6cmのセパラックス(常光産業より購入)を用い、室温で50Vの定電圧で2時間行った。泳動後、3%酢酸を含む0.5%アルシアンブル-8GS (pH 3)あるいは6%TCAを含む1%ホンソー3Rを用いて膜を染色し、3%酢酸により脱色した。

8) DEAEセルロースカラムクロマトグラフィー

DEAEセルロース (DE 52, Whatmann) とあらかじめ 0.01 M トリス塩酸緩衝液 ($\text{pH } 8$) で平衡化した後, オボムチン溶液を流してオボムチンをカラムに吸着させた。 $0 \sim 0.5\text{ M}$ の NaCl の濃度勾配ともつ 1000 ml の 0.01 M トリス塩酸緩衝液 ($\text{pH } 8$) を溶出液として用いてオボムチンを溶出させた。溶出液を 10 ml ずつ分画し, 各フラクションのヘキソースをフェノール硫酸法²⁰⁾ により発色させ, その $490\text{ m}\mu$ における吸光度を測定した。

9) 糖分析

全ヘキソース含量はオルシノール法²¹⁾ により定量した。標準試料としてガラクトースとマンノースの等量混合物を用いた。ガラクトースとマンノースの分別定量はガスクロを用いて行った²²⁾。すなわち, サンプル ($5 \sim 20\text{ mg}$) を 1 N 硫酸 (2 ml) を含む封管中で 100°C で 3 時間加水分解した。加水分解後, 分解液中の硫酸を Dowex 1 (酢酸型) のカラムを通すこと

により除去した。そして、糖を含む溶出液と凍結乾燥した。これをピロジニン-ヘキサメチルジシアンートリメチルシリルクロライド (5:2:1) を用いて 80℃, 15 分間反応させることにより TMS 化した。その 2 μl をシリコン OV-1 を充てんしたガラスカラムに注入し、すべてのヘキソースのピークが出てくるまでカラムを 170℃ に保持した。

全ヘキソサミンの定量は Neuhaus と Letzring²³⁾ により改良された Eleon - Morgan 法により行った。標準試料としてグルコサミンを用いた。ガラクトサミンとグルコサミンの分別定量は JLC-5AH 自動アミノ酸分析機 (日本電子) を用いて行った。試料 (4 mg) を 3 N 塩酸 (1 ml) を含む封管中で 100℃, 4 時間加水分解した。加水分解物を減圧下で乾固して塩酸を除去し、0.01 N 塩酸に溶かして用いた。

シアル酸の定量は Warren のチオバルビツール酸法²⁴⁾ により行った。試料を^(4~10 mg) 0.1 N 硫酸 (2 ml) を含む封管中で 80℃, 1 時間加水分解した。

硫酸エステル²⁵⁾の定量は Dodgson と Spencer の方法により行、 E 。試料を 6 N 塩酸を含む封管中で 100°C 、9 時間加水分解した。

10). アミノ酸分析

試料 (4 mg) を 6 N 塩酸を含む減圧封管中で 110°C 、24 時間加水分解した。加水分解の際生ずる不溶物を口過により除去した後に、加水分解物を減圧下で乾固し塩酸を除去した。

0.01 N 塩酸に溶解した試料を JLC-5AH アミノ酸自動分析機を用いて分析した。トリプトファンは Goodwin と Morton の方法²⁶⁾により未加水分解試料を用いて定量した。

3. 実験結果

溶存性オボムチンの分子量（光散乱法）と還元粘度の音波処理による変化を図1に示した。分子量，還元粘度はともに処理時間の経過とともに急激に減少した。すなわち，10秒間の処理で分子量，還元粘度は半減し，1分間で $\frac{1}{2}$ ほどになった。1分以降は著しい減少は見られなかった。

オボムチンの還元粘度の濃度依存性を図2に示した。溶存性オボムチンは極めて高い濃度依存性を示した。一方，音波処理溶存性オボムチンあるいは還元音波処理溶存性オボムチンの還元粘度は低く，しかも濃度依存性をほとんど示さなかった。

溶存性オボムチンと音波処理溶存性オボムチンのセルロースアセテート電気泳動による泳動図を図3に示した。溶存性オボムチンはホソソ-（タンパク質染色試薬）とアルシアインブルー（酸性糖タンパク質染色試薬）の両

染色液により、いずれも原点近くに広がったバンドとなった。しかしながら、音波処理溶存性オボムチンは明瞭な2つのバンドとなった。一つは易動度が大きくアルシアンブルーによってのみ染色される成分であり、もう一つは原点から若干移動しただけの易動度の小さい、ホンソーによってのみ染色される成分である。

溶存性オボムチンと音波処理溶存性オボムチンの密度勾配電気泳動における溶出パターンを図4に示した。溶存性オボムチンは一つの広がった非対称のピークとなった。一方、音波処理溶存性オボムチンは対称なピークが2つとなった。一つはより陽極側に泳動する成分であり、これをセルロースアセテート電気泳動にかけると、易動度の大きいアルシアンブルーによって染色される成分と一致することになった。もう一つのピークはあまり泳動しない成分であり、これをセルロースアセテート電気泳動にかけると、易動度の小さいホンソーによって染色される成分と一致する

ことがわかった。

DEAEセルロースクロマトにおける音波処理溶存性オボムチンの溶出パターンを図5に示した。音波処理溶存性オボムチンは2つのピークを示した。最初のピークは約0.15M NaClで溶出され、後のピークは約0.3M NaClで溶出された。それぞれのピークの成分をセルロースアセテート電気泳動にかけたところ、最初のピークはホンソーンでのみ染色される易動度の小さい成分と一致し、後のピークはアルシアンブルーでのみ染色される易動度の大きい成分と一致することがわかった。還元したオボムチンから得られた α 成分は電気泳動易動度が小さく、ホンソーンによって染色され、 β 成分は易動度が大きく、アルシアンブルーによって染色された。そこで、DEAEセルロースクロマトを用いて音波処理溶存性オボムチンから分離した2成分のうち初めに溶出した成分を音波処理 α オボムチン、後に溶出した成分を音波処理 β オボムチンと名付け、これらの

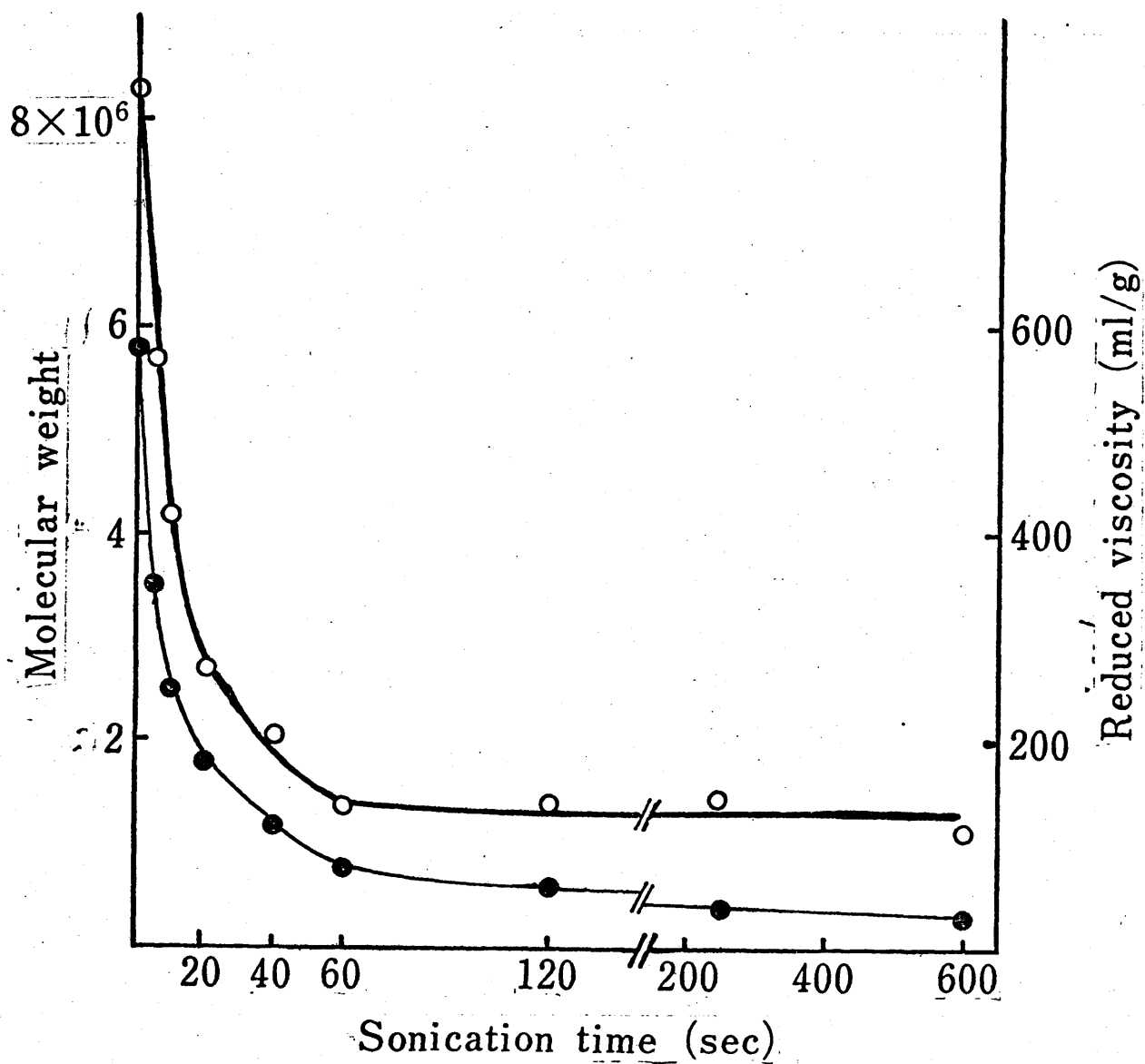
化学組成を分析し、還元 α オボムチンと還元 β オボムチンとそれぞれ比較検討した。

音波処理 α オボムチンと音波処理 β オボムチンの糖組成とアミノ酸組成を表し、2に示した。加藤と佐藤⁹⁾による還元 α オボムチンのS成分(α オボムチン)とF成分(β オボムチン)あるいはRobinsonとMoney¹⁰⁾による還元 α 、 β オボムチンの糖組成、アミノ酸組成も比較のため記した。音波処理 α オボムチンの糖含量は乾物あたり15%ほどであり、その組成は還元 α オボムチンの組成とほとんど同じであった。音波処理 β オボムチンの糖含量は55%と高く、とりわけシアル酸を多く含んでいるのが特徴的であった。その糖組成は還元 β オボムチンの組成とほとんど同じであった。

音波処理 α オボムチンの主たるアミノ酸はアスパラギン酸、グルタミン酸の酸性アミノ酸であり、これは還元 α オボムチンの特徴と同じである。そして、全体のアミノ酸組成も還元 α オボムチンと酷似していた。音波処理

βオボムチンの主たるアミノ酸はスレオニン、セリンであり、全体の30%近くを占める。これは還元βオボムチンの特徴ともよく一致する。そして、アミノ酸組成全体をみても、若干のアミノ酸(アスパラギン酸、グルタミン酸、ロイシン、チロシン)において差はみられたものの、ほぼ還元βオボムチンと類似していた。

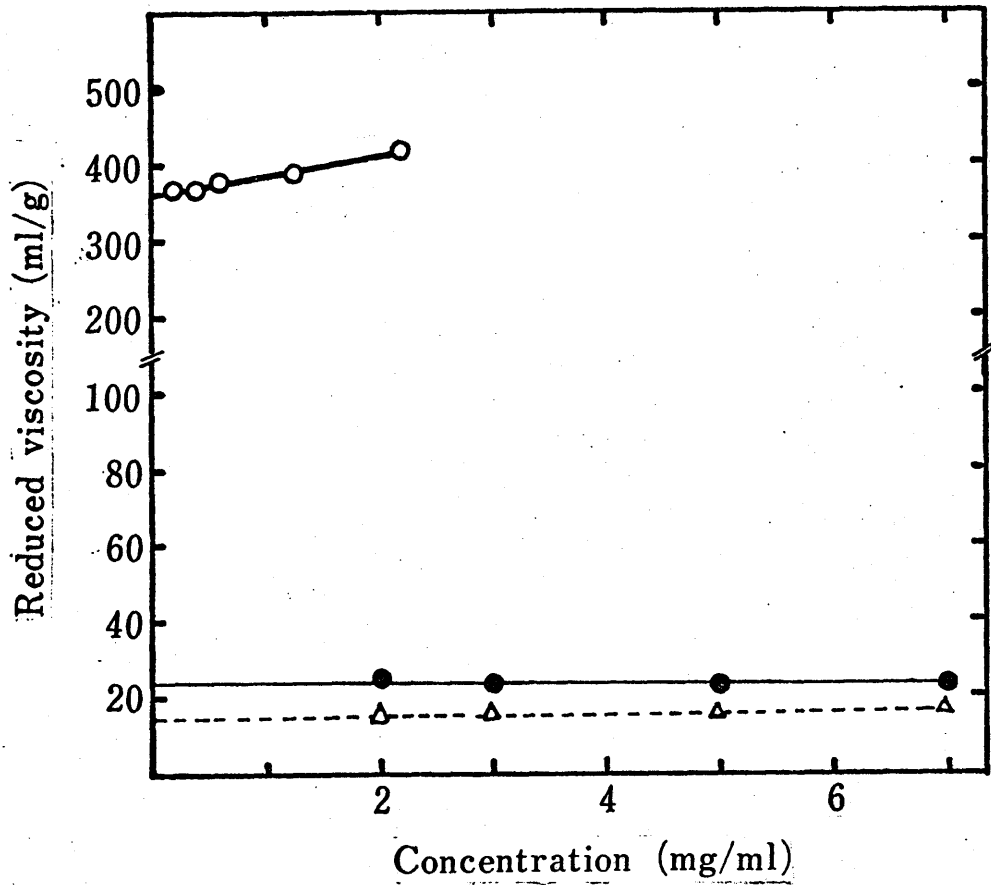
溶存性オボムチン、音波処理溶存性オボムチン、音波処理後還元した溶存性オボムチンの分子量(光散乱法)と固有粘度を表3に示した。音波処理溶存性オボムチンの分子量、固有粘度はそれぞれ溶存性オボムチンの $\frac{1}{7\sim 8}$ 、 $\frac{1}{5}$ であり、還元音波処理溶存性オボムチンの5倍、1.5倍に相当し、溶存性オボムチンと還元音波処理溶存性オボムチンの中間の値を示した。



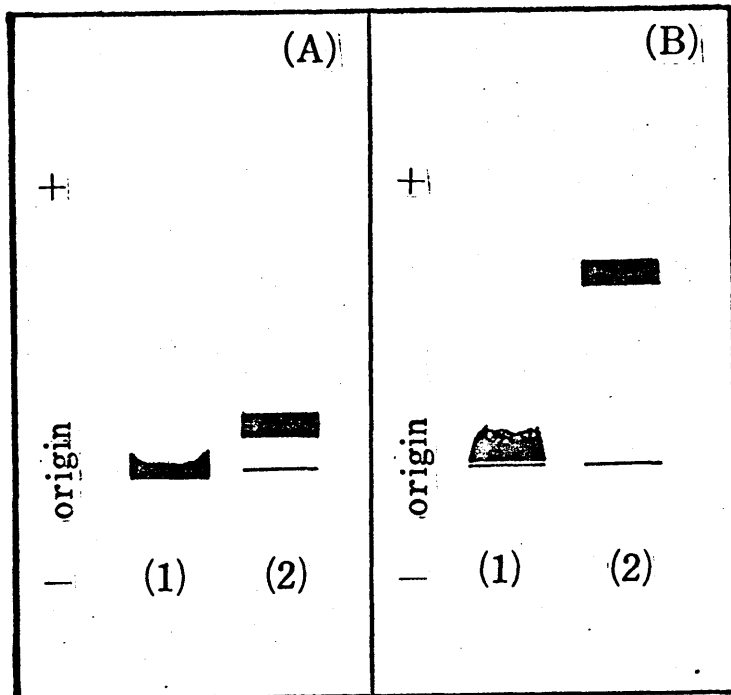
II- Fig. 1. Influence of Sonication on the Soluble Ovomucin.

Ovomucin concentration was 2.2 mg/ml in reduced viscosity measurement.

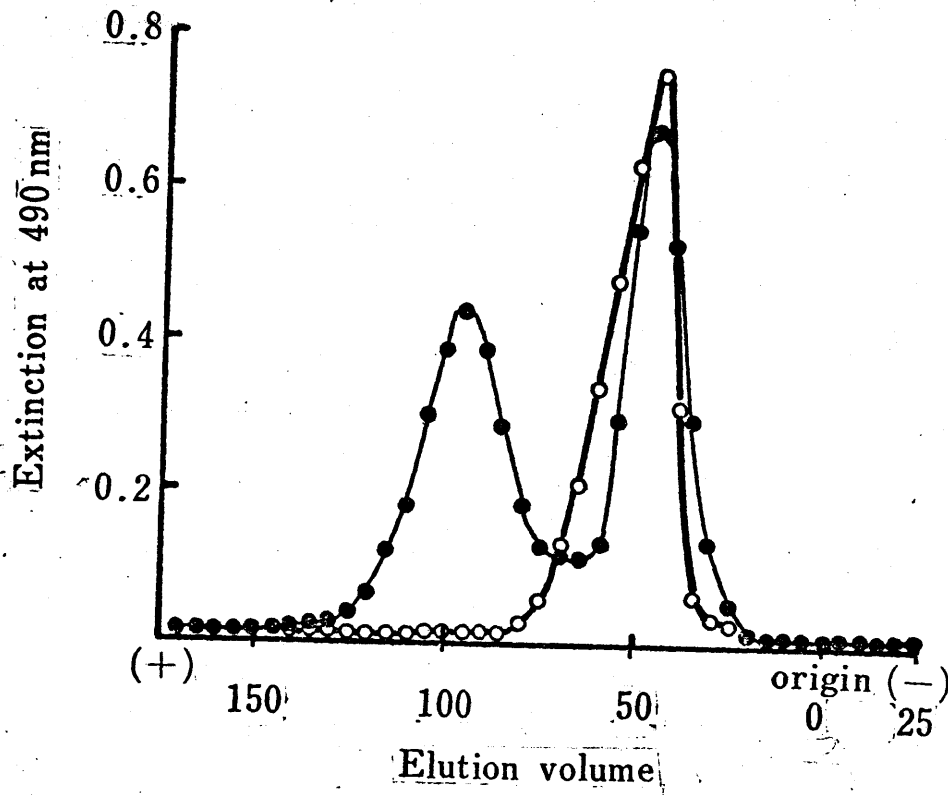
○—○, molecular weight; ●—●, reduced viscosity.



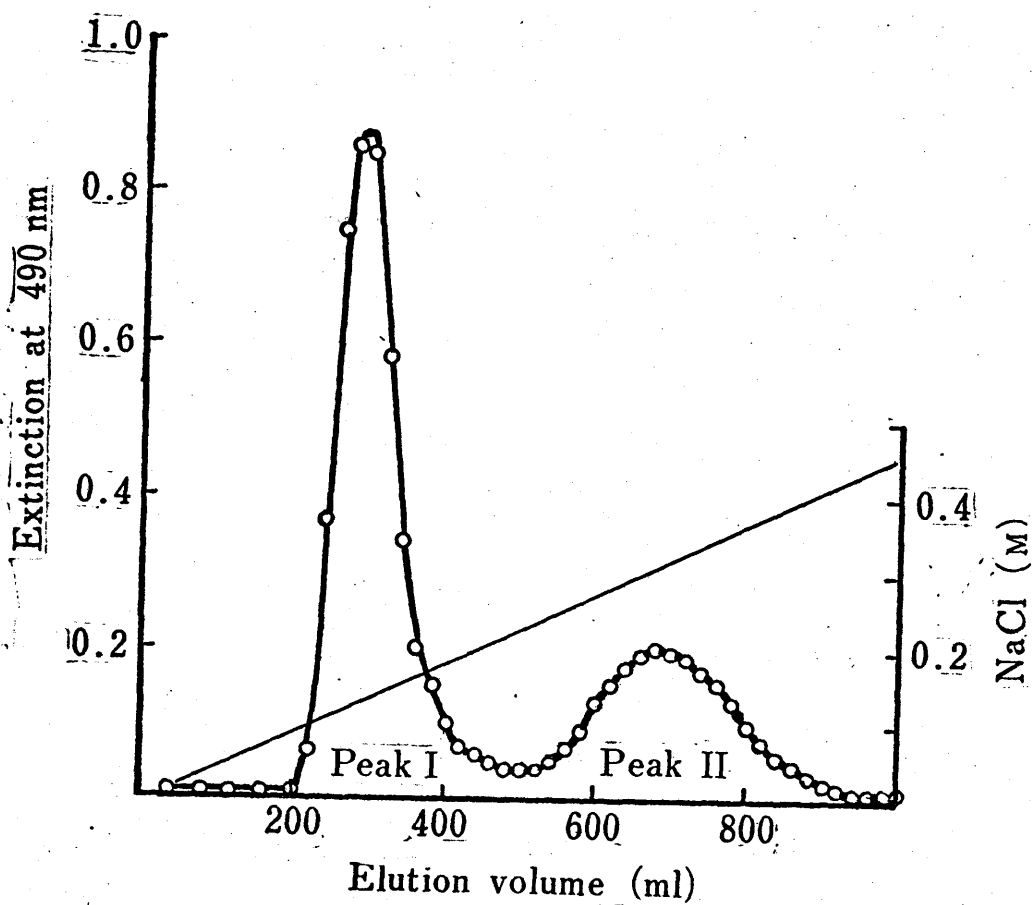
II- Fig. 2. Concentration-dependence of Reduced Viscosity of Ovomucins. \circ — \circ , soluble ovomucin; \bullet — \bullet , sonicated soluble ovomucin; Δ ---- Δ , sonicated & reduced soluble ovomucin.



II- Fig. 3. Cellulose Acetate Electrophoresis of the Soluble Ovomucin (1) and Sonicated Soluble Ovomucin (2). The strips were stained with Ponceau (A) or Alcian Blue (B).



II- Fig. 4. Elution Patterns in Density Gradient Electrophoresis of the Soluble Ovomucin and Sonicated Soluble Ovomucin.
 o—o, soluble ovomucin; ●—●, sonicated soluble ovomucin.



II- Fig. 5. DEAE-cellulose Column Chromatography of Sonicated Soluble Ovomucin. $\circ-\circ$, the extinction at 490 nm; $—$, NaCl concentration (M).

II- Table I. Carbohydrate Composition of Sonicated α and β -Ovomucins

Values were shown as % per dry matter.

Component	Sonicated α -ovomucin	Reduced S- ^{a)} component	Reduced ^{b)} α -ovomucin	Sonicated β -ovomucin	Reduced F- ^{a)} component	Reduced ^{b)} β -ovomucin
Hexose	6.3	6.8	6.4	19.8	18.4	23.3
Galactose	4.4	2.5	1.8	19.4	16.6	19.2
Mannose	1.9	4.1	4.6	0.4	1.5	4.1
<i>N</i> -Acetyl hexosamine	7.5	8.2	7.3	19.1	22.5	19.7
<i>N</i> -Acetyl galactosamine	0	0	0.6	8.0	9.7	8.7
<i>N</i> -Acetyl glucosamine	7.5	8.2	6.7	11.1	12.8	11.0
Sialic acid	0.3	0.8	1.0	12.6	11.4	13.8
Sulfate	0.4	0.06	0.7	3.1	1.2	2.7

a) Kato and Sato (1971).⁹⁾b) Robinson and Monsey (1971).¹⁰⁾

II-Table II. Amino Acid Composition of Sonicated α and β -Ovomucins

Values were shown as moles per 100 moles amino acid.

	Sonicated α -ovomucin	Reduced S- ^{a)} component	Reduced ^{b)} α -ovomucin	Sonicated β -ovomucin	Reduced F- ^{a)} component	Reduced ^{b)} β -ovomucin
Lysine	5.6	6.6	5.5	5.7	5.8	5.1
Histidine	2.1	1.6	2.1	1.9	1.3	1.7
Arginine	2.7	2.2	2.7	2.4	2.4	2.6
Aspartic acid	10.4	13.9	9.9	4.8	8.7	7.2
Threonine	6.6	8.0	7.5	13.5	14.7	13.3
Serine	7.9	8.4	8.1	15.2	14.5	14.4
Glutamic acid	9.9	10.3	11.4	6.5	8.1	8.6
Proline	5.4	3.2	5.4	7.2	4.9	7.4
Glycine	7.4	8.2	6.8	5.3	6.8	4.6
Alanine	4.9	4.8	4.8	5.2	6.2	6.4
Cystine (half)	6.7	4.0	8.7	3.4	2.3	5.4
Valine	6.4	7.6	6.1	4.2	5.5	4.9
Methionine	1.7	2.3	0.8	1.1	1.8	1.4
Isoleucine	6.8	4.7	4.6	8.6	4.2	3.9
Leucine	6.8	6.2	6.4	7.4	7.3	6.9
Tyrosine	3.6	3.7	3.4	5.1	2.8	2.5
Phenylalanine	3.9	4.5	4.4	2.5	3.5	3.0
Tryptophan	1.3	—	1.3	2.0	—	0.8

a) Kato and Sato (1971).⁹⁾b) Robinson and Monsey (1971).¹⁰⁾

II- Table III. Molecular Weight and Intrinsic Viscosity
of Soluble Ovomucins

	Molecular weight (x 10,000)	Intrinsic viscosity (ml/g)
Soluble ovomucin	830 (± 40)	365
Sonicated soluble ovomucin	110 (± 15)	24
Sonicated and reduced soluble ovomucin	23 (± 3)	15

4. 考察

溶存性オボムチンの分子量は830万と、いう大きな値を示したが、Lanniら²⁾によつて調製されたオボムチンの分子量は(沈降係数から計算すると)760万であり、溶存性オボムチンとよく一致した。しかしながら、TomimatsuとDonovan³⁾によつて全濃厚卵白から調製されたオボムチンの分子量(光散乱法)は溶存性オボムチンよりもはるかに大きな値(2300万~5600万)を示した。また、本実験で調製した溶存性オボムチンの固有粘度は365 ml/g (pH 9.3, イオン強度0.1)であり、加藤ら⁴⁾の全濃厚卵白から調製したオボムチン(260 ml/g; pH 9.6, イオン強度0.25)あるいはDonovanら⁵⁾の全濃厚卵白から調製したオボムチン(280 ml/g; pH 9.7, イオン強度0.11)よりもやや高い値を示した。

生の溶存性オボムチンは還元したオボムチン^{9,10)}あるいは音波処理したオボムチンと異なり、密度勾配電気泳動等、電気泳動によつ

2成分に分離しなかつた。このことと分子量
が大きく粘度が高いこととを考へ合わせると
溶存性オボムチンは高度に会合した分子とし
て存在し、その会合した分子は α オボムチン
と β オボムチンの2成分間の相互作用によ
って形成されていると考えられる。

溶存性オボムチンの分子量と還元粘度が音
波処理時間の経過とともに減少し(図1)、
密度勾配電気泳動(図4)、セルロースアセ
テート電気泳動(図3)、DEAEセルロースク
ロマト(図5)により音波処理した溶存性オ
ボムチンが2成分に分離した。このことから、
溶存性オボムチンは音波処理により α オボム
チンと β オボムチンの間の結合が断裂するこ
とによって、より小さな分子へと解離してい
くと考えられた。音波処理により断裂すると
思われる結合は、いまのところ明らかではない。
第一章において明らかのように、音波処理は
タンパク質の一次構造、SS結合、アミノ酸
側鎖には影響を及ぼさないという点、音波処

理によつて溶存性オボムチンから微量の低分子物質が遊離してきたが(第一章参照), このような低分子物質の出現はオボムチンのSS結合をチオグリコール酸⁸⁾やメルカプトエタノール¹⁶⁾により切断した場合にも生ずる(オボムチンのうち2%が低分子化した)という点, 音波処理 α , β オボムチンの糖組成とアミノ酸組成がほとんど同じである(表1, 2)という点, 以上の3点から, 音波処理により開裂する部位は溶存性オボムチンの α , β の2成分が結合あるいは相互作用している点に限定できると考えられる。

音波処理 α オボムチンの糖組成とアミノ酸組成の結果から, 音波処理 α オボムチンと還元 α オボムチンは全く同一の成分であると考えられ, DEAEセルロースクロマトにより最初に溶出した成分を α オボムチンと名付けたのは妥当であつた。一方, 音波処理 β オボムチンの糖組成とアミノ酸組成の結果から, 音波処理 β オボムチンの組成は全体としては還元

β オボムチンの組成とほとんど同じであったが、いくつかのアミノ酸に差違が認められた。特にアスパラギン酸とグルタミン酸の量が還元 β オボムチンにくらべて少ないということは精製の程度の違いから生じたと推定される。すなわち、 α オボムチンは他のアミノ酸にくらべてアスパラギン酸とグルタミン酸の酸性アミノ酸の含量が高いため、 β オボムチンに α オボムチンが混在すると β オボムチン中の酸性アミノ酸の含量が高くなる。したがって、酸性アミノ酸含量の低い音波処理 β オボムチンは還元 β オボムチンよりも精製されたものであると考えられる。そして、音波処理 β オボムチンと還元 β オボムチンとは同一成分からなっていると考えられるので、DEAEセルロースクロマトで後に落出した成分を β オボムチンと名付けたのは妥当であった。

RobinsonとMonney¹⁰⁾は単量体である還元 α オボムチンの分子量が21万であることを報告し、TomimatsuとDonovan³⁾もまた、オボムチンの最小

単位の分子量が22万であることを報告している。還元した音波処理溶存性オボムチンの分子量が23万であった(表3)ことから、オボムチンの最小単位の分子量は21万~23万であると考えられる。また、音波処理溶存性オボムチンの分子量と固有粘度の値が溶存性オボムチンと還元音波処理溶存性オボムチンとの中間の値を示すことから、音波処理溶存性オボムチン分子は高度に会合した分子と最小単位の分子との中間に位置する分子であると考えられる。音波処理 α オボムチンと音波処理 β オボムチンの分子の少なくともいずれか一方はそれぞれの単量体が分子間SS結合によって高分子化したものであると考えられるが、この点については今後さらに検討する必要がある。また、溶存性オボムチンは音波処理 α オボムチンと音波処理 β オボムチンの分子が音波処理で切断されるある特異的な結合によって会合し高分子化したものであると考えられるが、同様に、不溶性オボムチンも同じ

ような様式によって、溶解性オボムチンよりも高度に会合し高分子化したオボムチンの形態であると考えられる。

5. 要約

1) 濃厚卵白液状部分から得られた溶存性オボムチンは高度に会合した分子として存在すると考えられた。

2) 溶存性オボムチンの分子量と粘度は音波処理により著しく減少した。そして、音波処理溶存性オボムチンは密度勾配電気泳動、セルロースアセテート電気泳動、DEAEセルロースクロマトにより2成分に分別できた。

3) 音波処理溶存性オボムチンの2成分の糖組成、アミノ酸組成から、音波処理 α オボムチンは還元 α オボムチンと同一の成分であり、音波処理 β オボムチンは還元 β オボムチンと同一の成分であることがわかった。

4) 音波処理溶存性オボムチンは高度に会合した溶存性オボムチンとオボムチン単量体

この中間の大きさをもつ分子から構成されて
いると考えられた。

6. REFERENCES

- 1) A.L. Romanoff and A.J. Romanoff, "The Avian Egg" J. Wiley and Sons, Inc., New York 1949.
- 2) F. Lanni, D.G. Sharp, E.A. Eckert, E.S. Dillon, D. Beard and J.W. Beard, J. Biol. Chem., 179, 1275 (1949).
- 3) Y. Tomimatsu and J.W. Donovan, J. Agric. Food Chem., 20, 1067 (1972).
- 4) M.L. Lyndrup, Prep. Biochem., 3, 149 (1973).
- 5) J.W. Donovan, J.G. Davis and L.M. White, Biochim. Biophys. Acta, 207, 190 (1970).
- 6) J.W. Donovan, J.G. Davis and M.B. Wiele, J. Agric. Food Chem., 20, 223 (1972).
- 7) A. Kato, R. Nakamura and Y. Sato, Agric. Biol. Chem., 34 854 (1970).
- 8) R. Nakamura, A. Kato and Y. Sato, Nippon Nogeikagaku Kaishi, 43, 105 (1969).
- 9) A. Kato and Y. Sato, Agric. Biol. Chem., 35, 439 (1971).
- 10) D.S. Robinson and J.B. Monsey, Biochem. J., 121, 537 (1971).
- 11) J.R. Hawthorne, Biochim. Biophys. Acta, 6, 28 (1950).
- 12) O.J. Cotterill and A.R. Winter, Poultry Sci., 34, 679 (1955).
- 13) J. Brooks and H.P. Hale, Biochim. Biophys. Acta, 32, 237 (1959).
- 14) J. Brooks and H.P. Hale, *ibid*, 46, 289 (1961).
- 15) D.S. Robinson, "Egg Formation and Egg Production" B.M. Freeman, M.P. Drake, British Poultry Sci. Ltd., Edinburgh, 1972, p 77.
- 16) A. Kato, R. Nakamura and Y. Sato, Agric. Biol. Chem., 35, 351 (1971).
- 17) A. Kato and Y. Sato, *ibid*, 36, 831 (1972).

- 18) P.A. Small and M.E. Lamm, *Biochemistry*, 5, 259 (1966).
- 19) T. Kamata and H. Nakahara, *J. Colloid Interface Sci.*,
43, 89 (1973).
- 20) M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton and F. Smith,
Anal. Chem., 28, 350 (1956).
- 21) C. Francois, R.D. Marshall and A. Neuberger, *Biochem. J.*,
83, 335 (1962).
- 22) C.C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita and W.W. Wells,
J. Am. Chem. Soc., 85, 2497 (1963).
- 23) O.W. Neuhaus and M. Letzring, *Anal. Chem.*, 29, 1230 (1957).
- 24) L. Warren, *J. Biol. Chem.*, 234, 1971 (1959).
- 25) K.S. Dodgson and B. Spencer, *Biochem. J.*, 55, 436 (1953).
- 26) T.W. Goodwin and R.A. Morton, *ibid*, 40, 628 (1946).

第三章 不溶性オボムチンの音波処理による解離成分のサブユニット構造とその分子量について

1. 緒言

鶏卵卵白の高粘性はその構成成分であるオボムチンによって維持されているといわれている。^{1,2)} オボムチンは極めて大きな分子量と高い粘度をもつ糖タンパク質であり、³⁻⁸⁾ 糖含量の低い α 成分と糖含量の高い β 成分がある特異的な部位において結合することにより形成されているといわれている。⁹⁻¹²⁾

前章において、溶解性オボムチンが音波処理により解離し、 α オボムチンと β オボムチンの2成分に分別できたことを述べた。また、音波処理溶解性オボムチンが高度に会合したオボムチンとオボムチン単量体との中間の大きさをもつ分子からなることを提案した。

本章においては、不溶性オボムチンを用いて、その音波処理による解離成分（以後、音波処理 α オボムチン、音波処理 β オボムチンと称す）のサブユニット構造とその単量体の分子量を調べた。

2. 実験方法

1) 不溶性オボムチン, 音波処理 α オボムチン, 音波処理 β オボムチンの調製

不溶性オボムチンは第一章と同じ方法で調製した。この不溶性オボムチンを pH 9.5, イオン強度 0.01 の炭酸塩緩衝液に対して透析した後, 100W・9KHz で 2°C において 10 分間音波処理した。少量の不溶物を遠心分離法 (10000 rpm 20 分) により除去した後, 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8) に対して透析した。そして, 第二章の音波処理溶存性オボムチンと同じ方法により DEAE セルロースクロマトを行い, α オボムチンと β オボムチンとに分別した。

2) 音波処理 α オボムチンと音波処理 β オボムチンの還元

音波処理 α , β オボムチンの還元は第二章の音波処理溶存性オボムチンの還元と同じ方法で行った。Sカルボキシメチル化した音波

処理 α オボムチン, 音波処理 β オボムチンを本章においてそれぞれ SCM α オボムチン, SCM β オボムチンと省略した。

3) 各種タンパク質の調製

オボアルブミンは Sprenger と Hyrup の方法¹³⁾により調製した。ミオシンは Szent-Györgyi の方法¹⁴⁾により雄鶏胸筋より調製した。 β ガラクトシダーゼとカタラーゼはシグマ社より購入した。ガンマグロブリンと牛血清アルブミンは Mann Research Lab. より購入した。

4) SDS ホリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS 電気泳動は Weber と Orborn の方法¹⁵⁾により行った。0.1% SDS を含む 5% ホリアクリルアミドゲルを用いた。マーカ色素として BPB を用いた。泳動後, ゲルを 7% 酢酸を含む 1% アミドブラック 10 B により染色した。分子量検量線の作製のためのマーカタンパク質としてミオシン, ガンマグロブリン, 牛血

精アルブミン, オホアルブミンを用いた。

5) 超遠心分析

沈降速度実験は日立UCA1A分析用超遠心機を用いて行った。ダブルセクターセルを用い、 25°C , $60,000\text{rpm}$ で遠心した。見かけの沈降係数から溶媒の粘度, 密度等を補正して S_{20w} を計算した。塩酸グアニジンの粘度と密度はKawaharaとTanford¹⁶⁾の値に従って補正した。

沈降平衡もまた日立UCA1A分析用超遠心機を用いて行った。光学系としてRayleighの干渉光学系を用いた。SCM α オホムチンは 20°C , 9690rpm で遠心した。用いたタンパク質濃度は 4mg/ml であり, 6M 塩酸グアニジンを含む 0.1M トリス塩酸緩衝液($\text{pH}8$)に溶解したものである。音波処理 β オホムチンは 20°C , 3783rpm で遠心した。3つの異なる濃度の音波処理 β オホムチン溶液($2, 3, 4\text{mg/ml}$)を試料として用いた。いずれも 0.1M トリス塩酸緩衝液($\text{pH}8$)に溶解したものである。また, 音

波処理 α オボムチンと音波処理 β オボムチンの偏比容をアミノ酸組成と糖組成から計算するとそれぞれ0.712, 0.683であった。ただし、塩酸グアニジン中ではタンパク質の偏比容は0.01だけ低くなる¹⁷⁾ので6M塩酸グアニジン中でのSCM α オボムチンの偏比容は0.702となる。これらの偏比容の値を用いて分子量を計算した。

6) ゲル口過

ゲル口過はLKBのウルトロゲルACA22を用いて行った。カラムは 1.5×40 cmのもつを用い上昇法で溶出した。溶出液として0.1Mトリス塩酸緩衝液 (pH 8) あるいは3M NaCl, 3M塩酸グアニジン, 1% SDSを含む0.1Mトリス塩酸緩衝液 (pH 8) を用いた。分子量検量線作製のためのマーカータンパク質として β ガラクトシダーゼ, ミオシン, カタラーゼ, ガンマグロブリンを用いた。

3. 実験結果

3.1. 各種オボムチン試料の沈降係数

音波処理 α , β オボムチンとSCM α , β オボムチンの種々の溶液中における沈降係数を表1に示した。ほとんどの試料は超遠心沈降パターンにおいて単一の対称的なピークを示したが、音波処理 α オボムチンのみは0.1M NaCl中で非対称な広がりたピークとなり正しい沈降係数の値をもとめることが出来なかった。

音波処理 α オボムチンの沈降係数は6M塩酸グアニジン中では4.9Sであったが、0.1Mジチオスレイトール(DTT)を添加することにより2.4Sと半減した。また、音波処理 α オボムチンをSCM化することにより6M塩酸グアニジン中での沈降係数が減少することも観察された。しかしながら、0.1M NaCl中でのSCM α オボムチンの沈降係数は6M塩酸グアニジン中における値の約2倍であった。

一方、6M塩酸グアニジン中における音波

処理 β オボムチンの沈降係数は $0.1M$ DTT の添加によりほとんど変化しなかった。 $0.1M$ NaCl あるいは $6M$ 塩酸グアニジン中において音波処理 β オボムチンと SCM β オボムチンの沈降係数の間にほとんど差はなかった。

3.2. ゲルコロ過法による分子量の推定

ウルトロゲル ACA 22 のゲルコロ過による分子量既知の各種マーカータンパク質の分配係数を分子量の対数に対してプロットしたものを図 1 に示した。

音波処理 α , β オボムチンと SCM α , β オボムチンの種々の溶液中における分配係数から図 1 を用いて推定した。その結果を表 2 に示した。 $3M$ NaCl, $3M$ 塩酸グアニジン, 1% SDS 溶液中における音波処理 α オボムチンの分子量は SCM α オボムチンの分子量の約 $1.5 \sim 2$ 倍であった。ところが、 $0.1M$ トリス塩酸中では逆に、 SCM α オボムチンの分子量は音波処理 α オボムチンの約 1.5 倍であった。一方、

音波処理 β オボムチンとSCM β オボムチンの分子量は0.1Mトリス塩酸, 3M NaCl, 1% SDSのいずれの溶液中においても同じであった。

3.3. SDS電気泳動

音波処理 α オボムチンのSDS電気泳動図ならびに分子量既知マーカータンパク質の相対移動度を分子量の対数に対してプロットしたものを図2に示した。メルカプトエタノール(2-ME)を添加しない場合, 音波処理 α オボムチンは^{主として}分子量17万から27万の間にかかり広がったバンドとなった。一方, 2-MEを添加した場合, 分子量11万の位置に一本のバンドとなった。一方, 音波処理 β オボムチンは2-MEの添加の有無にかかわらず原点近くに一本のバンドとなったが, 音波処理 β オボムチンは糖含量が極めて高く, 分子量が大きいため分子量をとめることは出来なかった。

3.4. 超遠心沈降平衡法による分子量の計

算

α オボムチン, β オボムチンの最小ユニットと考えられる SCM α オボムチンと音波処理 β オボムチンの分子量を沈降平衡法によってもとめた値を表 3 に示した。SCM α オボムチンは薄い塩溶液中では分子量が大きくなる傾向があるので 6 M 塩酸グアニジン中で測定した。SCM α オボムチンと音波処理 β オボムチンはともに r^2 に対する $\ln C$ (r : 回転中心からの距離, C : タンパク質濃度) のプロットが下にまがる曲線を描いた。均一な理想溶液では $\ln C$ 対 r^2 のプロットが直線になり, その傾きから分子量が計算できるが, プロットが下にまがる曲線の場合は, 一般には溶液が非理想溶液であることを示し, プロットの傾きから分子量を計算することが出来ない。したがって, セル内における中心からの距離の異なるいくつかの点における接線の傾きを最小二乗法によりもとめ, この傾きからみかけの分子量を計算した。そして, そのみかけの分

子量の逆数を濃度に対しプロットし、濃度の
に外挿して分子量をもとめた。こうして得ら
れた SCM のオボムチンと音波処理 β オボムチ
ンの分子量はそれぞれ 18 万、40 万であった。

III-Table I. Sedimentation Coefficients of Sonicated α - and β -Ovomucins in Various Solutions

All values are shown as $s_{20,w}$ at a protein concentration of 5 mg/ml. All solutions contained 0.01 M Tris-HCl (pH 8).

	0.1 M NaCl	6 M guanidine-HCl	6 M guanidine-HCl plus 0.1 M dithiothreitol
α -Ovomucin	-	4.9 S	2.4 S
SCM α -Ovomucin	6.2 S	3.4 S	-
β -Ovomucin	5.1 S	7.0 S	7.4 S
SCM β -Ovomucin	4.7 S	6.5 S	-

III-Table II. Molecular Weight by Gel Filtration of Sonicated α - and β -Ovomucins in Various Solutions

	0.1 M Tris-HCl	3 M NaCl ^a	3 M guani- dine-HCl ^a	1 % SDS ^a
α -Ovomucin	3.5×10^5	3.6×10^5	4.1×10^5	3.5×10^5
SCM α -Ovomucin	4.7	2.4	2.9	2.1
β -Ovomucin	5.1	5.0	-	4.5
SCM β -Ovomucin	5.1	5.0	-	4.5

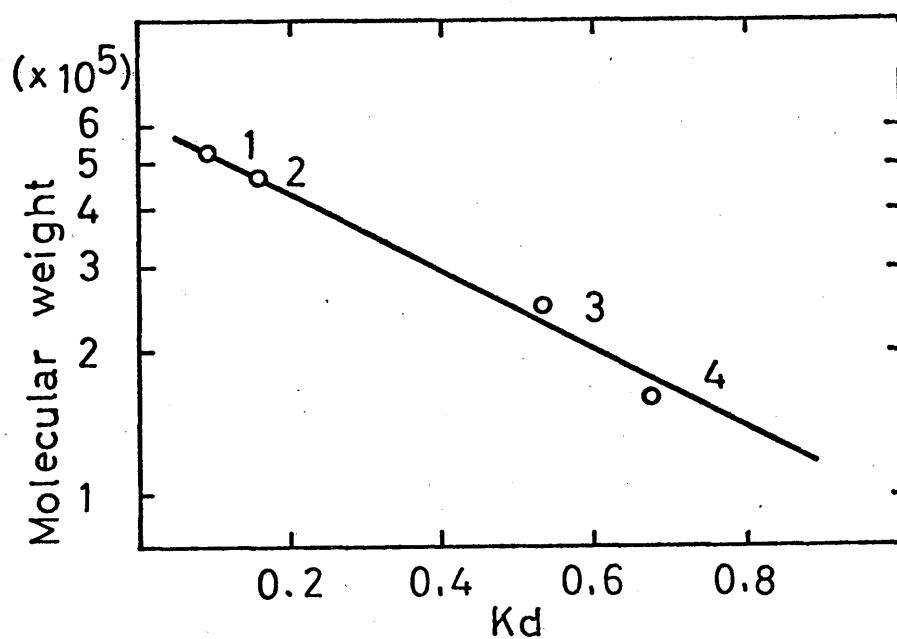
^a All solutions contained 0.1 M Tris-HCl (pH 8).

III- Table III. Molecular Weights of Sonicated SCM α -Ovomucin and Sonicated β -Ovomucin by Sedimentation Equilibrium

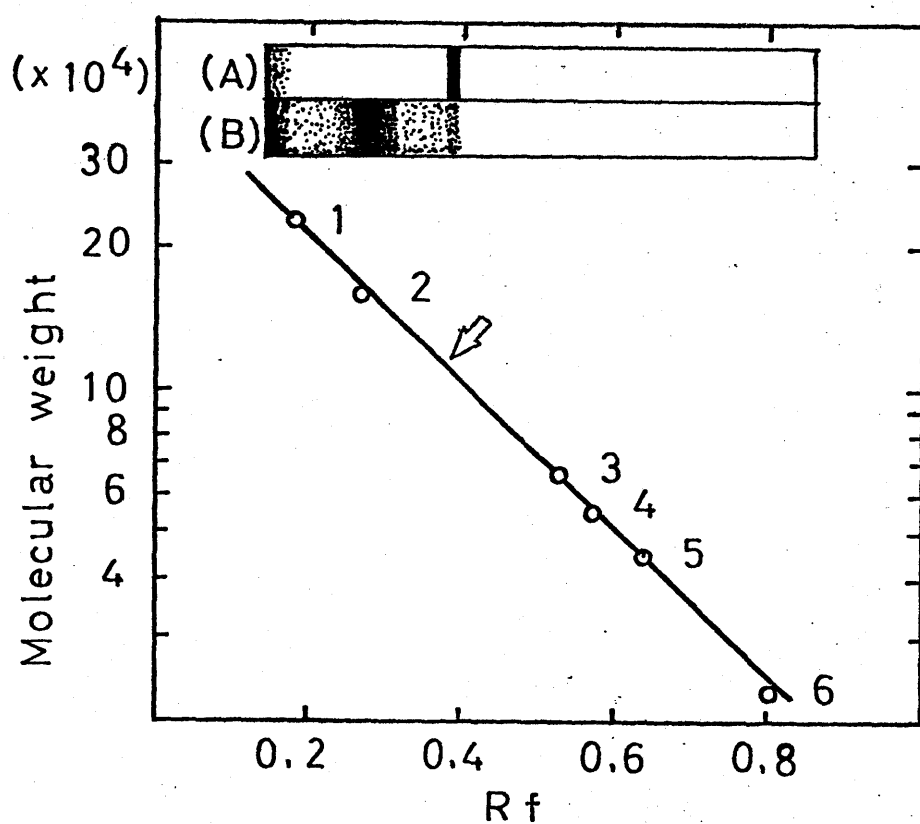
	Molecular weight
SCM α -Ovomucin	1.8×10^5 ^a
β -Ovomucin	$4.0 \pm 0.1 \times 10^5$ ^b

^a Experiment was performed at 20°C and at 9690 rpm. Value was taken from a trial of one concentration, 4 mg/ml in 0.1 M Tris-HCl (pH 8) containing 6 M guanidine-HCl.

^b Experiment was performed at 20°C and at 3783 rpm. Value was shown as an average of trials at three different concentrations, 2, 3 and 4 mg/ml in 0.1 M Tris-HCl (pH 8).



III- Fig. 1. Plot of Log of the Molecular Weight vs. Distribution Coefficients by Gel Filtration on Ultrogel ACA 22. The molecular weight markers were 1) β -galactosidase, 2) myosin, 3) catalase and 4) gamma globulin.



III- Fig. 2. SDS Gel Electrophoresis of the Sonicated α -Ovomucin and Plot of Log of the Molecular Weight vs. Relative Mobilities.

(A) with 2-mercaptoethanol, (B) without 2-mercaptoethanol.

The arrow shows the sonicated α -ovomucin with 2-mercaptoethanol.

The molecular weight markers were 1) myosin, 2) gamma globulin, 3) bovine serum albumin, 4) gamma globulin heavy chain, 5) ovalbumin and 6) gamma globulin light chain.

4. 考察

図2, 表1・2から, 音波処理 α オボムチンのSS結合を断裂させることによりその分子量, 沈降係数が3M NaCl, 3-6M 塩酸グアニジン, 1% SDSの各溶液中ではほぼ半減することが明らかに存った。これらの溶液中ではほとんどのタンパク質が解離すると考えられるのでSCM α オボムチンはこれらの溶液中では単量体として存在していると考えられる。したがって, 音波処理 α オボムチンは α オボムチン単量体の分子間のSS結合による重合体であることが明らかに存った。一般的に, 糖タンパク質は荷電的にあるいは分子量的に微少不均一性をもつといわれている¹⁸⁾ので何個の単量体が音波処理 α オボムチンを形成しているかをまとめるのは困難ではあるが平均的数値からみると音波処理 α オボムチンは α オボムチンの二量体であるといえる。第一章において明らかのように, 音波処理はタンパク質分子中のSS結合に影響を及ぼさな^いとい

うことから、 α オボムチンは不溶性オボムチン分子中においても分子間SS結合によって重合した α オボムチン二量体として存在すると推定される。

ところで、 $0.1M$ NaCl, $0.1M$ トリス塩酸緩衝液中におけるSCM α オボムチンの分子量と沈降係数が $3M$ NaCl, $3-6M$ 塩酸グアニジン等の溶液における値の約2倍になった。このことは、 α オボムチン単量体は希薄塩溶液中では重合して二量体に転ずる傾向があることを示唆している。RobinsonとMorsey¹¹⁾も同様の報告をしている。すなわち、還元 α オボムチンは塩酸グアニジンが存在しないとき凝集が起きるため、リン酸緩衝液中ではその沈降係数はより大きな値となったと述べている。

一方、表1.2に見られるように音波処理 β オボムチンの $6M$ 塩酸グアニジン中における沈降係数がDTTの添加によってほとんど変化しない。また、音波処理 β オボムチンの沈降係数と分子量は $0.1M$ NaCl, $0.1M$ トリス塩酸, 6

M 塩酸グアニジン, 3 M NaCl, 1 % SDS のい
ずれの溶液においてもほとんど差が認められ
ない。したがって, 音波処理 β オボムチンは
分子間に SS 結合をもたない単量体であると
結論された。ところで, 音波処理 β オボムチ
ンおよび SCM β オボムチンの 6 M 塩酸グア
ニジン中における沈降係数が 0.1 M NaCl 中におけ
る値よりも大きかった。これは, 塩酸グア
ニジン中で重合が起こるからであると考え
るよりもむしろ, 音波処理 β オボムチンの沈
降係数は 0.1 M NaCl 溶液において濃度依存性が高
く (第四章参照), その濃度依存性が 6 M 塩
酸グアニジン溶液において減少するため沈
降係数が増加したと考える方が妥当である。
音波処理 β オボムチンの濃度が 0.2 % と低い時
にはその沈降係数が 0.1 M NaCl 中で 6.8 S, 6 M
塩酸グアニジン中で 7.1 S と両者の値にほとん
ど差がなかったという結果からも上記の考察
の妥当性がうかがえる。

表 3 に示したように, α オボムチン単量体

の分子量 18万と、いう値は Robinson と Morrey¹⁸⁾ によ
 って報告された値 21万よりも若干小さかった。
 αオボムチン単量体 (18万) と βオボムチン
 単量体 (40万) の分子量とそれらの溶存性オ
 ボムチン中の含量 (α : β = 87 : 13) から計
 算すると溶存性オボムチンの α, β オボムチ
 ン単量体混合物の平均分子量は 21万となる。
 この値は前章における音波処理後還元した溶
 存性オボムチンの分子量 (23万) とよく一致
 し, Tomimatsu と Donovan¹⁹⁾ のオボムチンの最小単
 位の分子量にもよく一致していた。このこと
 から上記の α, β オボムチンの単量体の分
 子量の 18万, 40万と、いう値のある程度の正確
 さがうかがえる。

SDS 電気泳動, ゲル口過, 沈降平衡によ
 りもとめた分子量の値にかなりの差がみられた。
 多くの糖タンパク質は側鎖に糖をもつため,
 通常のタンパク質とは異なり SDS 電気泳動,
 ゲル口過において異常な挙動を示すといわれて
 いる。¹⁹⁾ そのため正確な分子量をもとめるのが

困難である。したがって、現在のところでは沈降平衡による測定が糖タンパク質に対して、より正確な分子量を与えられると思われる。しかしながら、オボムチンの場合、糖含量が極めて高いために偏比容の計算値に若干の誤差が出ることと、 $\ln C$ 対 r^2 のプロットが曲線になるために外挿法により分子量を計算したことを考えあわせると、この沈降平衡法によりもとめた分子量の値がまったく正確な値であるとは言えない。

あらかじめグリコシダーゼを用いて糖タンパク質から糖鎖を除いた後に沈降平衡により分子量をもとめるという方法によってかなり正確な値を出せたという報告^{20,21)}もあり、今後、オボムチンへの適用も検討する必要がある。

5. 要約

1) 不溶性オボムチンの音波処理により分離した α オボムチン, β オボムチンのサブユニット構造とその分子量について沈降速度, ゲル口過, SDS電気泳動, 沈降平衡により調べた。

2) 不溶性オボムチンより調製した音波処理 α オボムチンのSS結合を還元することにより, 音波処理 α オボムチン分子は3M NaCl, 3-6M塩酸グアニジン, 1% SDS溶液中においてより小さな分子に転じた。このことから, 音波処理 α オボムチンは α オボムチン単量体が分子間SS結合により重合したものであると考えられた。また, α オボムチン単量体は薄い塩溶液中では2量体になる傾向があった。

3) 不溶性オボムチンより調製した音波処理 β オボムチンはSS結合を還元してその

分子の大きさを変えなかったことから、 β オボムチン単量体からなると考えられた。

4) 沈降平衡法により求めた α オボムチン単量体、 β オボムチン単量体の分子量はそれぞれ18万、40万であった。

6 . REFERENCES

- 1) H.J. Almquist and F.W. Rorenz, U.S. Egg Poultry Mag., 38(4), 20 (1932).
- 2) E. MacNally, Proc. Soc. Exptl. Biol., 30, 1254 (1932-33).
- 3) F. Lanni, D.G. Sharp, E.A. Eckert, E.S. Dillon, D. Beard and J.W. Beard, J. Biol. Chem., 179, 1275 (1949).
- 4) A. Kato, R. Nakamura and Y. Sato, Agric. Biol. Chem., 34, 854 (1970).
- 5) J.W. Donovan, J.G. Davis and L.M. White, Biochim, Biophys. Acta, 207, 190 (1970).
- 6) J.W. Donovan, J.G. Davis and M.B. Wiele, J. Agric. Food Chem., 20, 223 (1972).
- 7) Y. Tomimatsu and J.W. Donovan, *ibid*, 20, 1067 (1972).
- 8) T. Beveridge and S. Nakai, J. Food Sci., 40, 864 (1975).
- 9) A. Kato, R. Nakamura and Y. Sato, Agric. Biol. Chem., 35, 351 (1971).
- 10) A. Kato and Y. Sato, *ibid*, 36, 831 (1972).
- 11) D.S. Robinson and J.B. Monsey, Biochem. J., 121, 537 (1971).
- 12) D.S. Robinson, "Egg Formation and Production" p65 by B.M. Freeman and P.E. Lake, British Poultry Science Ltd, Edinburgh, 1972.
- 13) S.P.L. Sørensen and M. Höyrup, Z. Physiol. Chem., 103, 15 (1918).
- 14) A. Szent-Györgi, "Chemistry of Muscular Contraction," Academic Press, New York, 1951, p146.
- 15) K. Weber and M. Osborn, J. Biol. Chem., 244, 4406 (1969).

- 16) K. Kawahara and C. Tanford, J. Biol. Chem., 241, 3228 (1966).
- 17) C. Tanford, K. Kawahara and S. Lapanje, J. Am. Chem. Soc.,
89, 729 (1967).
- 18) R.A. Gibbons, "Glycoproteins" p31 by A. Gottschalk, Elsevier
Publishing Co., 1972.
- 19) 松村 剛 「糖タンパク質の構造と機能」 P53 吉沢善作・山科郁男,
南江堂, 1978.
- 20) H.D. Hill, J.A. Reynolde and R.L. Hill, J. Biol. Chem.,
252, 3791 (1977).
- 21) R.B. Trimble and F. Maley, *ibid*, 252, 4409 (1977).

第四章 音波処理不溶性オボムチンと音波
処理溶存性オボムチンから得られた α 成分
間あるいは β 成分間の物理化学的同一性に
ついて

1. 緒言

鶏卵卵白は内水様卵白，濃厚卵白，外水様
卵白およびカラザからなっている。濃厚卵白
は超遠心によりゲル状部分と液状部分に分け
られる。¹⁾ 佐藤と早川²⁾は濃厚卵白の液状部分
は水様卵白とほとんど同じタンパク質組成を
もち，その粘度もほぼ等しいことを報告した。
そして，液状部分と水様卵白から得られたオ
ボムチンの糖組成とアミノ酸組成はほとんど
同じであるところから，彼らは濃厚卵白はゲ
ル状部分の囊状構造に包まれた一部の水様卵
白をもち層であると推定した。このような構
造をもち濃厚卵白のゲル状部分と液状部分の

粘度を調べてみるとゲル状部分の方がはるかに高い値を示した。²⁾ また、ゲル状部分から得られた不溶性オボムチンの粘度、分子量は液状部分あるいは水様卵白から得られた溶存性オボムチンの粘度、分子量よりもはるかに高かった。(不溶性オボムチン：粘度 260 g/ml ³⁾、分子量 $40 \sim 240 \times 10^6$ ⁴⁾、溶存性オボムチン：粘度 130 g/ml ³⁾、分子量 8.3×10^6 ^{第二章)})

このように、ゲル状部分と液状部分の粘度の差はそれらに含まれる不溶性オボムチンと溶存性オボムチンの性質の差に由来することは明らかである。しかしながら、不溶^性オボムチンと溶存性オボムチンの性質(粘度、分子量、溶解性)における差が何によって生じるかは明らかではない。

第一章～第三章において示したように不溶性オボムチン、溶存性オボムチンを音波処理することにより α オボムチンと β オボムチンの2成分に解離させることが出来る。したがって、本章においては不溶性オボムチンと溶存

性オボムチンの性質の差を調べるために不溶性オボムチンと溶存性オボムチンの音波処理による解離成分間の物理化学的性質を比較検討した。

2. 実験方法

1) 音波処理 α オボムチン と音波処理 β オボムチンの調製

溶存性オボムチンからの音波処理 α , β オボムチンは第二章と同じ方法により調製した。この音波処理 α オボムチン, 音波処理 β オボムチンをそれぞれ $S\alpha-OM(S)$, $S\beta-OM(S)$ と省略した。

不溶性オボムチンからの音波処理 α , β オボムチンは第三章と同じ方法により調製した。この音波処理 α オボムチン, 音波処理 β オボムチンをそれぞれ $S\alpha-OM(I)$, $S\beta-OM(S)$ と省略した。

2) DEAE セルロースカラムクロマトグラフ

1 -

音波処理した不溶性オボムチンと溶存性オボムチンをそれぞれ DEAE セルロースカラム ($2 \times 40 \text{ cm}$) に吸着させ, $0 \sim 0.5 \text{ M NaCl}$ の濃

度勾配をもつ 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8) を用いて溶出させ、分画した。各フラクションのヘキソース濃度をフェノール硫酸法⁵⁾によりもとめ、ヘキソース濃度にもとずいて溶出パターンを描いた。

3) ゲル口過

ゲル口過はセファロース 4B カラム (2.5 × 40 cm) を用いて上昇法により行った。溶出液として 0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8) を用いた。分画した各フラクションのヘキソース濃度をフェノール硫酸法⁵⁾によりもとめ、ヘキソース濃度にもとずいて溶出パターンを描いた。

4) 円二色性 (Circular Dichroism : CD) の測定

円二色性の測定は J-40 A spectropolarimeter (Japan Spectroscopic Co Ltd) を用いて行った。0.1 cm のセルを用い 200 nm から 300 nm の間の波長で測定した。

5) セルロースアセテート電気泳動

セルロースアセテート電気泳動は常光産業より購入したセルロースアセテート膜(セパラックス, 中6cm)を用いて行った。泳動はpH 8.2のホウ酸緩衝液を用いて50V定電圧下で2時間室温において行った。泳動後, 1% ホンソー3Rあるいは0.5% アルシアンブルー-8 GSを用いて膜を染色した。

6) SDS ホリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS 電気泳動は0.1% SDSを含む5% ホリアクリルアミドゲルを用いてWeberとOrbannの方法⁶⁾に従って行った。泳動後, 0.5% アミドブラック10Bあるいは過ヨウ素酸-シッフ試薬(PAS)を用いてゲルを染色した。

7) 沈降速度実験

沈降速度実験は日立UCA1A分析用超遠心機を用い, 20°Cにおいて6000回転で行った。0.05 M NaClを含む0.05 M トリス塩酸緩衝液(pH 8)

を溶媒として用い、種々のタンパク質濃度における沈降係数をもとめた。さらに、この沈降係数を濃度の対外挿することにより S° 値を計算した。

8) 糖分析

全ヘキソースはオルシノール法⁷⁾により定量した。ガラクトースとマンノースはガスクロマトグラフィー⁸⁾により分別定量した。

全ヘキソサミンは Neuhaus と Letzring の方法⁹⁾により定量した。グルコサミンとガラクトサミンはアミノ酸自動分析機により分別定量した。いずれの場合も N-アセチルヘキソサミンとして表示した。

シアル酸は Warren の方法¹⁰⁾により定量した。

硫酸基は Dodgson と Spencer の方法¹¹⁾により定量した。

なお、詳細は第一章、第二章の記述と同じである。

9) アミノ酸分析

試料を減圧封管中で 110°C 、24時間、6N塩酸で加水分解した。この加水分解物をJLC 5 AH アミノ酸自動分析機により分析した。トリプトファン。定量は行われなかった。

3. 実験結果

音波処理した不溶性・溶存性オボムチンの DEAE セルロースクロマトによる溶出パターンを図1に示した。SD-OM(I)とSD-OM(S)はほぼ同じ NaCl 濃度 (約 0.15 M) で溶出した。Sβ-OM(I) (約 0.25 M) は Sβ-OM(S) (約 0.30 M) よりも若干低い NaCl 濃度で溶出した。それぞれのピーク面積を表1の糖含量 (SD-OM(I); 6.3%, SD-OM(S); 6.3%, Sβ-OM(I); 20.1%, Sβ-OM(S); 19.8%) から換算することによりそれぞれのピークのオボムチン量を計算した。その結果、不溶性オボムチン中のαオボムチンとβオボムチンの重量比は66:34であり、溶存性オボムチン中のαオボムチンとβオボムチンの重量比は87:13であった。

SD-OM(I), SD-OM(S), Sβ-OM(I), Sβ-OM(S)の糖組成とアミノ酸組成を表1, 表2に示した。SD-OM(I)とSD-OM(S)の糖組成はシアル酸の若干の差を除いてほとんど同じであった。

また、 $S\beta\text{-OM(I)}$ の糖含量は約60%であり、 $S\beta\text{-OM(S)}$ の55%よりも5%ほど高いものの組成自体は両者において極めて似ていた。

$S\alpha\text{-OM(I)}$ のアミノ酸組成は $S\alpha\text{-OM(S)}$ とほとんど同一であった。また、 $S\beta\text{-OM(I)}$ のアミノ酸組成は $S\beta\text{-OM(S)}$ と比較的似てはいるが $S\beta\text{-OM(S)}$ にくらべてセリン、スレオニン、プロリンの含量が高く、酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸の含量が低かった。

セフアロース4Bのゲル透過による $S\alpha\text{-OM(I)}$ 、 $S\alpha\text{-OM(S)}$ 、 $S\beta\text{-OM(I)}$ 、 $S\beta\text{-OM(S)}$ の溶出パターンを図2に示した。 $S\alpha\text{-OM(I)}$ と $S\alpha\text{-OM(S)}$ は全く同じ位置に溶出した。 $S\beta\text{-OM(I)}$ と $S\beta\text{-OM(S)}$ もまた同じ位置に溶出した。

$S\alpha\text{-OM(I)}$ 、 $S\alpha\text{-OM(S)}$ 、 $S\beta\text{-OM(I)}$ 、 $S\beta\text{-OM(S)}$ のCDスペクトルを図3に示した。 $S\alpha\text{-OM(I)}$ と $S\alpha\text{-OM(S)}$ とは極めて類似したCDスペクトルを示した。このCDスペクトルは α ヘリックスをもつランダムコイルと β 構造の混合物の特徴を示していた。¹²⁾ $S\beta\text{-OM(I)}$ は $S\beta\text{-$

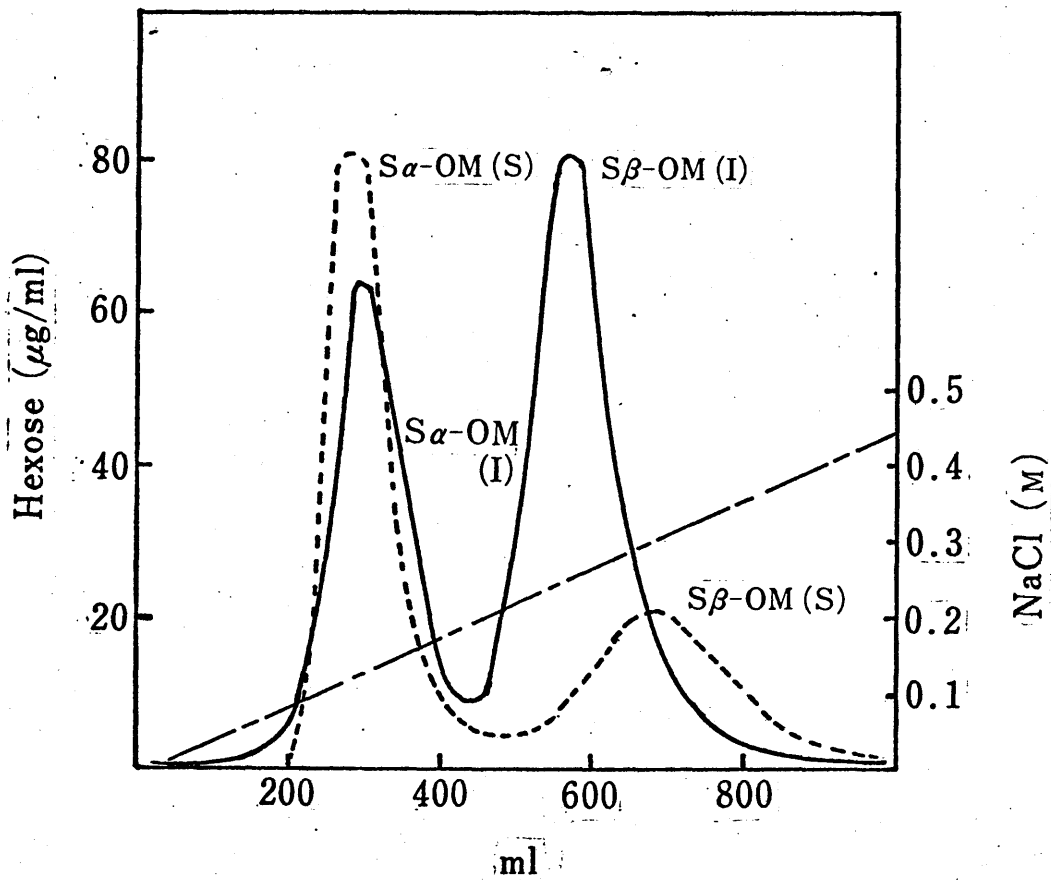
$OM(S)$ とは若干異なるスペクトルを示し、 $S\beta-OM(I)$ のスペクトルは主としてランダムコイルからなるものの特徴を示していた。¹²⁾

$S\alpha-OM(I)$, $S\alpha-OM(S)$, $S\beta-OM(I)$, $S\beta-OM(S)$ のセルロースアセテート電気泳動によるパターンを図4に示した。 $S\alpha-OM(I)$ と $S\alpha-OM(S)$ そしてそれらの等量混合物はいずれも原点近くに一本のバンドとなった。 $S\beta-OM(I)$ と $S\beta-OM(S)$ そしてそれらの等量混合物はいずれもかなりの距離を移動して一本のバンドとなった。

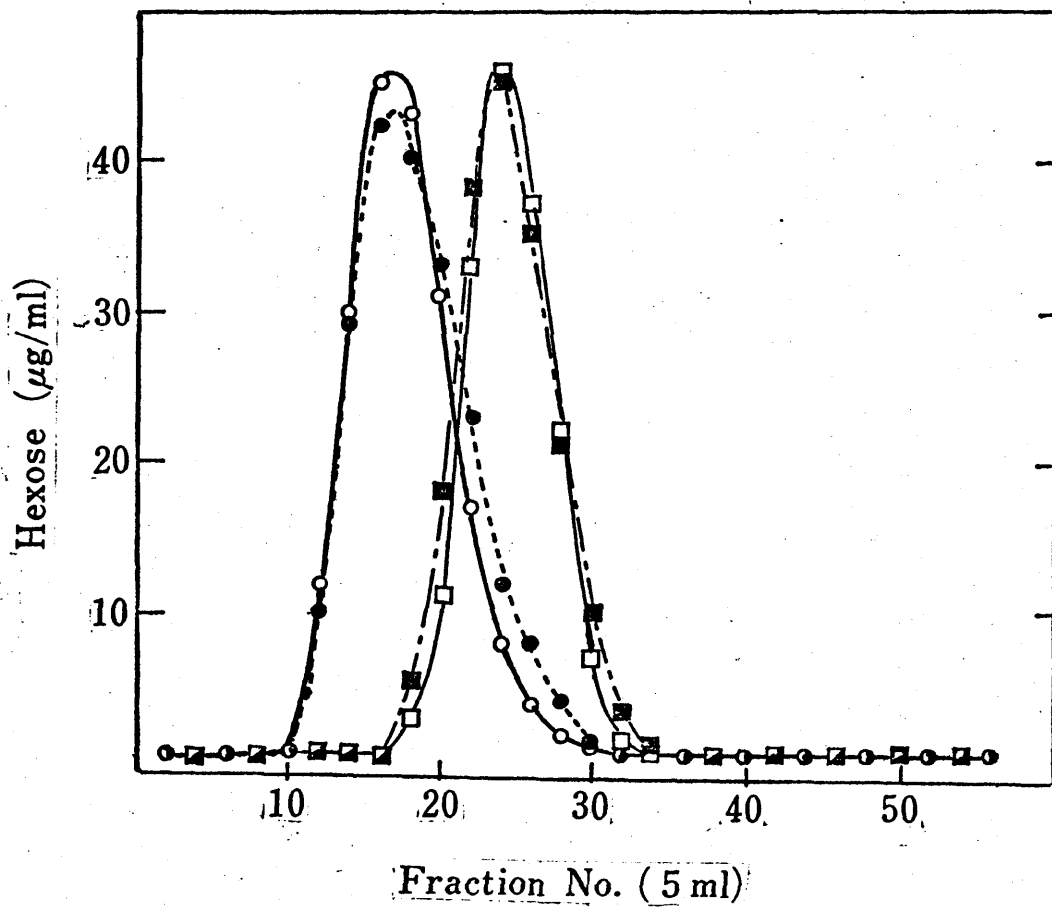
$S\beta-OM(I)$ と $S\beta-OM(S)$ の0.5%濃度における沈降パターンを図5に示した。そして、 $S\beta-OM(I)$ と $S\beta-OM(S)$ の沈降係数の濃度依存性を図6に示した。 $S\beta-OM(I)$, $S\beta-OM(S)$ のいずれも単一の対称的なピークを示した。また、 $S\beta-OM(I)$ と $S\beta-OM(S)$ の沈降係数はいずれも高い濃度依存性を示し、濃度0に外挿した S 値はそれぞれ9.7 S と10.9 S であった。なお、 $S\alpha-OM(I)$ と $S\alpha-OM(S)$ は第三章でも示したようにブロードな非対称なピークとなり沈降係数の正しい

値は計算出来なかつた。

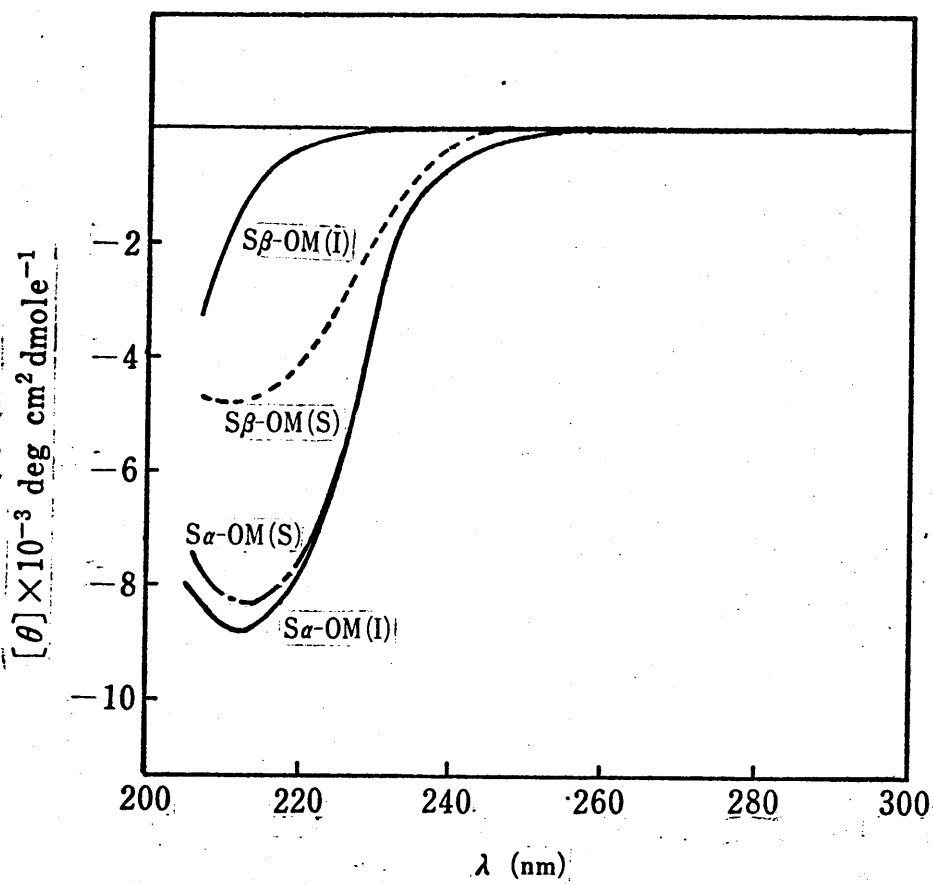
S α -OM(I)とS α -OM(S)のSDS電気泳動パターンを図7に示した。S α -OM(I)とS α -OM(S)そしてそれらの等量混合物はいずれも一本のバンドとなつた。



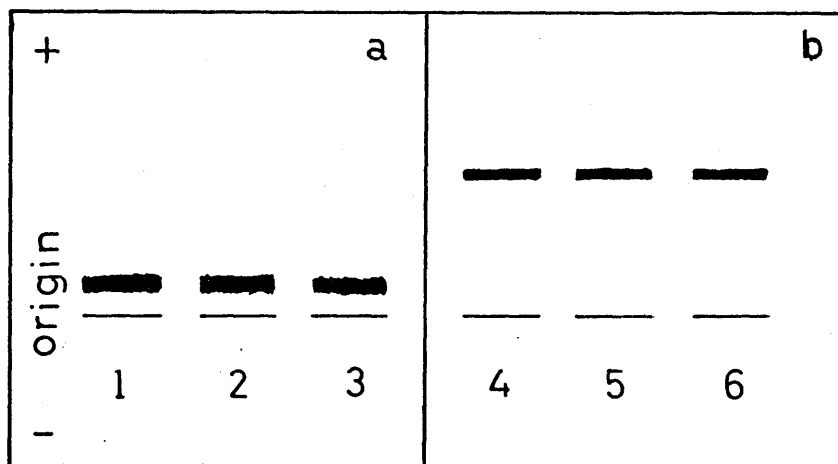
IV- Fig. 1. DEAE-cellulose Column Chromatography of the Sonicated Insoluble and Soluble Ovomucins. —, sonicated insoluble ovomucin; -----, sonicated soluble ovomucin; - - - , NaCl concentration.



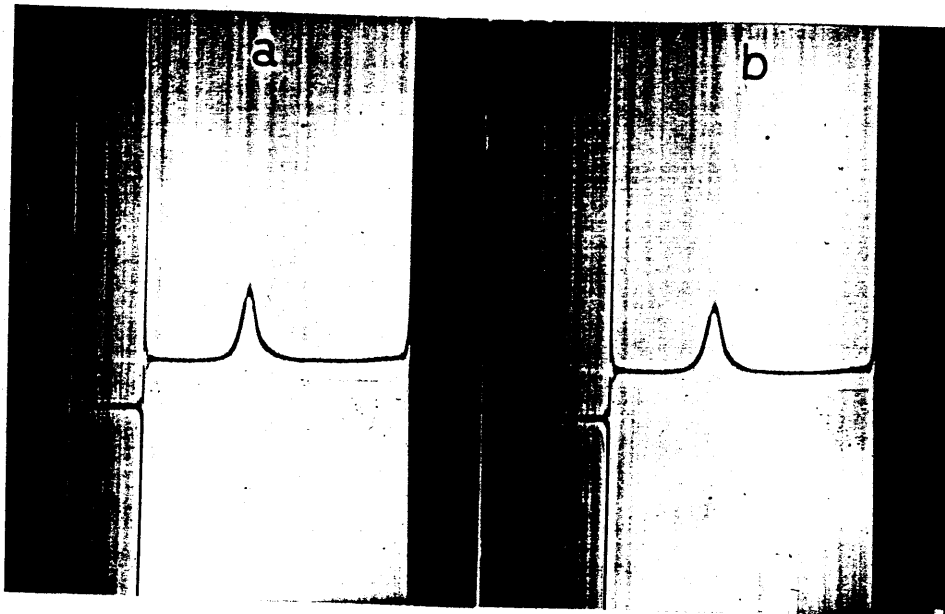
IV- Fig. 2. Gel Filtration of the Sonicated α and β -Ovomucins on a Sepharose 4B. \square — \square , S α -OM(I) ; \blacksquare — \blacksquare , S α -OM(S) ; \circ — \circ , S β -OM(I) ; \bullet — \bullet , S β -OM(S).



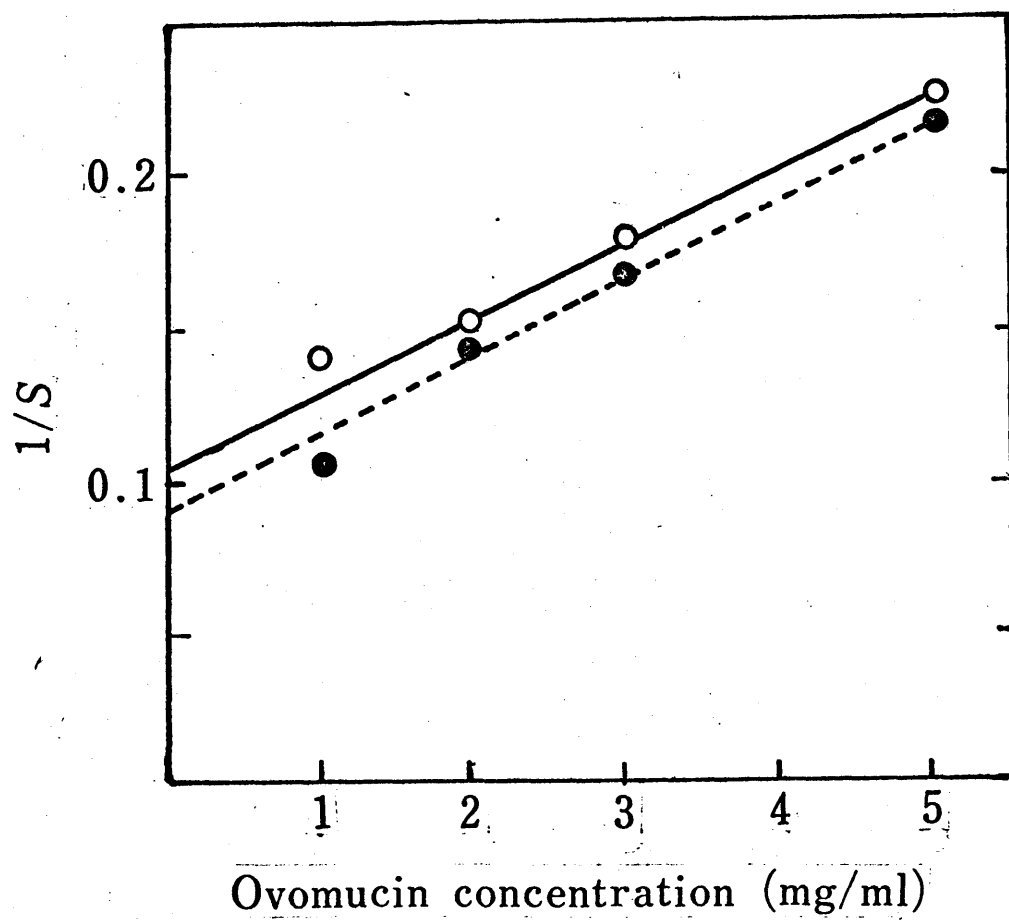
IV- Fig. 3. Circular Dichroism Spectra of the Sonicated α - and β -Ovomucins.



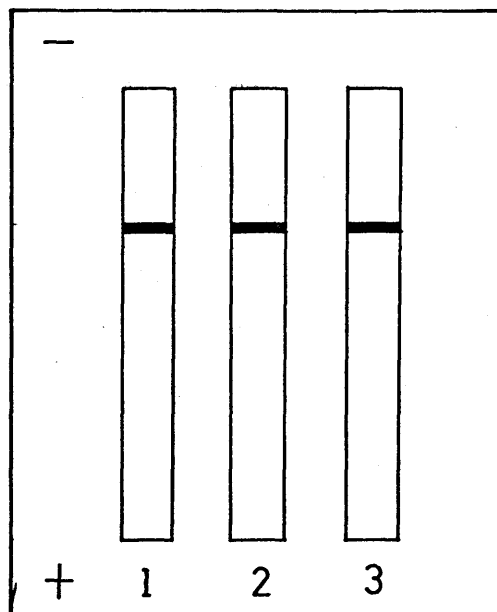
IV- Fig. 4. Cellulose Acetate Electrophoresis of the Sonicated α - and β -Ovomucins. The strips were stained with Ponceau (a) or Alcian Blue (b). 1) $S\alpha$ -OM(I), 2) equal mixture of $S\alpha$ -OM(I) and $S\alpha$ -OM(S), 3) $S\alpha$ -OM(S), 4) $S\beta$ -OM(I), 5) equal mixture of $S\beta$ -OM(I) and $S\beta$ -OM(S) and 6) $S\beta$ -OM(S).



IV- Fig. 5. Sedimentation-velocity Experiments with the Sonicated β -Ovomucins (0.5 % w/v). Frames were recorded after 60 min at 60,000 rpm. The temperature was 20°C.
a) S β -OM(I) and b) S β -OM(S).



IV-Fig. 6. Concentration-dependence of Sedimentation Coefficient of the Sonicated β -Ovomucins. \circ — \circ , $S\beta$ -OM(I); \bullet --- \bullet , $S\beta$ -OM(S).



IV-Fig. 7. Polyacrylamide Gel Electrophoresis in Sodium Dodecyl Sulfate (5 % acrylamide) of the Sonicated α -Ovomucin. The gels were stained with Amido Black 10B. 1) S α -OM(I), 2) equal mixture of S α -OM(I) and S α -OM(S) and 3) S α -OM(S).

IV-Table I. Carbohydrate Composition of Sonicated α - and β -Ovomucins.

Values are shown in % per dry matter.

Component	S α -OM(I)	S α -OM(S)	S β -OM(I)	S β -OM(S)
Hexose	6.3	6.3	20.1	19.8
Galactose	4.3	4.4	19.7	19.4
Mannose	2.0	1.9	0.4	0.4
N-Acetylhexosamine	8.5	7.5	21.6	19.1
N-Acetylgalactosamine	0	0	9.8	8.0
N-Acetylglucosamine	8.5	7.5	11.8	11.1
Sialic acid	0.7	0.3	15.3	12.6
Sulfate	0.2	0.4	2.9	3.1

IV- Table II. Amino Acid Composition of Sonicated α - and β -Ovomucins.

Values are shown in moles per 100 moles of amino acid.

	S α -OM(I)	S α -OM(S)	S β -OM(I)	S β -OM(S)
Lysine	5.8	5.6	3.0	5.7
Histidine	2.1	2.1	1.1	1.9
Arginine	2.6	2.7	1.1	2.4
Aspartic acid	10.6	10.4	2.6	4.8
Threonine	6.7	6.6	20.0	13.5
Serine	7.8	7.9	18.4	15.2
Glutamic acid	9.4	9.9	5.6	6.5
Proline	5.6	5.4	8.9	7.2
Glycine	7.7	7.4	2.1	3.7
Alanine	4.8	4.9	6.0	5.2
Cystine (half)	7.0	6.7	2.5	3.4
Valine	6.7	6.4	3.1	4.2
Methionine	1.7	1.7	1.1	1.1
Isoleucine	5.6	6.8	7.2	8.6
Leucine	7.2	6.8	7.3	7.4
Tyrosine	3.5	3.6	6.1	5.1
Phenylalanine	4.0	3.9	2.6	2.5

4. 考察

4.1. $S\alpha$ -OM(I) と $S\alpha$ -OM(S)

ゲル透過, CD スペクトル, セルロースアセテート電気泳動から $S\alpha$ -OM(I) は $S\alpha$ -OM(S) と同じ分子量分布, 同じタンパク質二次構造, 同じ電気的性質をもっていると考えられた。

そして, SDS 電気泳動から $S\alpha$ -OM(I) と $S\alpha$ -OM(S) とは同じ分子量をもつ α オボムチン単量体から構成されていることが明らかになった。

$S\alpha$ -OM(I) あるいは $S\alpha$ -OM(S) の CD スペクトルは Donovan ら^{B)} の未分画のオボムチンの CD スペクトルとよく似ていた。彼らはその CD スペクトルからオボムチンは 70% の β 構造と 30% のランダムコイルからなっていると計算した。しかしながら, 彼らの調製したオボムチンが不溶性オボムチンに相当するのかわかるとか溶解性オボムチンに相当するのかわかるとかは不明であるためその中に含まれている β オボムチンがどの程度 CD スペクトルに影響しているのかわか

らないので単純に上記の数字を $S\alpha\text{-OM}(I)$ あるいは $S\alpha\text{-OM}(S)$ と比較することはできない。

表1, 表2から, $S\alpha\text{-OM}(I)$ と $S\alpha\text{-OM}(S)$ の糖組成とアミノ酸組成はほとんど同じであるといえる。ただし, $S\alpha\text{-OM}(I)$ の方が $S\alpha\text{-OM}(S)$ にくらべて2倍以上のシアロ酸を含んでいた。しかしながら, α オボムチン単量体(分子量18万: 第三章より)1分子あたりのシアロ酸の分子数は $S\alpha\text{-OM}(I)$ において4個, $S\alpha\text{-OM}(S)$ において2個と非常に少なく, タンパク質の性質にはほとんど影響しないと考えられる。そして, 第一章において述べたように溶解性オボムチンは音波処理により全シアロ酸の4%ほどが遊離する。そのため $S\alpha\text{-OM}(S)$ のシアロ酸含量が $S\alpha\text{-OM}(I)$ にくらべて低くなったと考えられるので音波処理前の α オボムチンのシアロ酸含量は両者において異なるものと推定された。

以上の結果ならびに考察から, $S\alpha\text{-OM}(I)$ と $S\alpha\text{-OM}(S)$ は同じ α オボムチン単量体からなる

同一の成分によつて構成されていると結論した。

4.2. S β -OM(I) と S β -OM(S)

S β -OM(I) と S β -OM(S) の糖組成はほとんど同じである、 α にもかわらず両者のアミノ酸組成にはいくらかの差がみられた。S β -OM(I) のスレオニン、セリン、プロリンの合計が47%であり、S β -OM(S) の合計36%にくらべてかなり多い。また、S β -OM(I) の酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸の合計は13%であり、S β -OM(S) の合計81%にくらべてかなり少ない。このアミノ酸の組成における差はS β -OM(S) に少量の α オボムチンが混在するためであると推定した。その理由は以下に述べる通りである。

α オボムチンすなわちS α -OM(I) のセリン、スレオニン、プロリンの含量は全アミノ酸の約 $\frac{1}{4}$ にすぎないが、 β オボムチンすなわちS β -OM(I) では全体の約半分を占める。そして、S α -OM(I) の酸性・塩基性アミノ酸の含量は全

アミノ酸の約 $\frac{1}{3}$ を占めるが、 $S\beta\text{-OM(I)}$ のそれは約 $\frac{1}{6}$ にすぎない。加えて、 $S\alpha\text{-OM(I)}$ の乾燥重量に対するタンパク質部分の割合は $S\beta\text{-OM(I)}$ の4~5倍である($S\alpha\text{-OM(I)}$:^約75%, $S\beta\text{-OM(I)}$:^約18%)。したがって、極めて少量でも $S\alpha\text{-OM(I)}$ が $S\beta\text{-OM(I)}$ に混在することにより $S\beta\text{-OM(I)}$ のセリン、スレオニン、プロリンの量が減少し、酸性・塩基性アミノ酸の量が増加することになる。ところが、糖含量において $S\beta\text{-OM(I)}$ は $S\alpha\text{-OM(I)}$ の約4倍($S\beta\text{-OM(I)}$:^約60%, $S\alpha\text{-OM(I)}$:^約15%)であるため、少量の $S\alpha\text{-OM(I)}$ が $S\beta\text{-OM(I)}$ に混在しても糖組成にはほとんど影響しないことになる。実際に多くの粘液性糖タンパク質は極めて少量のセリン、スレオニン、プロリンを含んでいる。たとえば、*bovine submaxillary gland glycoprotein*のセリン、スレオニン、プロリンの合計の全アミノ酸に対する割合は47%⁽¹⁴⁾であり、*dog gastric mucosa glycoprotein*は78%⁽¹⁵⁾、*rabbit small intestinal mucosa*は79%⁽¹⁶⁾、*chick allantoic fluid*は66%⁽¹⁷⁾である。し

たがって、セリン、スレオニン、プロリンの含量の高い $S\beta\text{-OM(I)}$ の方が $S\beta\text{-OM(S)}$ よりも精製された形態であると推定される。

CD スペクトルは $S\beta\text{-OM(I)}$ が主としてランダムコイルからなっているが、 $S\beta\text{-OM(I)}$ は β 構造を含んでいることを示している。 $S\alpha\text{-OM(I)}$ あるいは $S\alpha\text{-OM(S)}$ が β 構造を多く含んでいることから $S\beta\text{-OM(S)}$ が少量の α オホムチンを含んでいることが推定される。

沈降速度実験において見られるように $S\beta\text{-OM(I)}$ と $S\beta\text{-OM(S)}$ の濃度 0 における沈降係数はそれぞれ 9.7 S と 10.9 S であり、 $S\beta\text{-OM(S)}$ の方が $S\beta\text{-OM(I)}$ よりも若干大きな分子であるといえる。第三章において示したように $S\beta\text{-OM(I)}$ はそれ自身単量体であるので、 $S\beta\text{-OM(S)}$ は少量の α オホムチンが β オホムチン単量体に結合しているものであると考えられる。

ところで、ゲル透過、セルロースアセテート電気泳動において見られるように $S\beta\text{-OM(I)}$ と $S\beta\text{-OM(S)}$ はほぼ同じ分子量分布、電気的性

質をもつが、これらの性質は少量の α オボムチンの結合によつては影響をうけなからであると考えられる。

以上のような結果ならびに考察から次のように結論した。 $S\beta$ -OM(I)と $S\beta$ -OM(S)は同一の β オボムチン単量体からなり、少量の α オボムチンが $S\beta$ -OM(S)中の β オボムチンに結合してゐるために $S\beta$ -OM(I)と $S\beta$ -OM(S)との間に若干の物理化学的差異が生じたのである。

4.3. 不溶性オボムチンと溶存性オボムチン

不溶性オボムチンと溶存性オボムチンの粘性、分子量、溶解性における差の原因をつきとめるためにそれぞれの構成成分について差異を検討したが、それぞれの α オボムチン、 β オボムチンは同一の成分であるという結論に達した。ただし、 $S\beta$ -OM(S)には少量の α オボムチンが結合してゐるという違いはあったが、このことは粘性、分子量、溶解性の差の重大な原因とはなり得ないだろう。そこで、

構成成分の物理化学的差、よつともむしろ構成成分の相対的な含量の差によるものではないかと考えるに到った。すなわち、不溶性オボムチンは34%のβオボムチンを含み、溶存性オボムチンの13%という値の約2.5倍に相当する。したがって、βオボムチンの含量の差が不溶性オボムチンと溶存性オボムチンの粘性、分子量、溶解性における差に重大な影響を及ぼしていると考えられる。

5. 要約

1) 不溶性オボムチンと溶存性オボムチンから得た音波処理 α オボムチンの物理化学的性質を電気泳動, CD, 超遠心沈降速度および糖組成, アミノ酸組成により比較検討したところ, 両者は同一の成分であった。

2) 不溶性オボムチンと溶存性オボムチンから得た音波処理 β オボムチンの物理化学的性質も同様にして比較検討した。溶存性オボムチンから得たものには少量の α オボムチンが結合していた。一方, 不溶性オボムチンから得たものは β オボムチンのみからなっていた。そのため両者の物理化学的性質に若干の差がみられたが, 両者の β オボムチンはほぼ同一の成分であると考えられた。

3) 不溶性オボムチンは溶存性オボムチンよりも β オボムチンを2.5倍ほど多く含有して

いる。そこで、不溶性オボムチンと溶存性オボムチンの粘性、分子量、溶解性における差はそれぞれの構成成分の性質の差に由来するよりもむしろβオボムチンの含量の差に由来するものであると考えられた。

6. REFERENCES

- 1) A. Kato, R. Nakamura and Y. Sato, *Agric. Biol. Chem.*, 35, 351 (1971).
- 2) Y. Sato and S. Hayakawa, *Nippon Nōgeikagaku Kaishi*, 51, 47 (1977).
- 3) A. Kato, R. Nakamura and Y. Sato, *Agric. Boil. Chem.*, 34, 854 (1970).
- 4) Y. Tomimatsu and J.W. Donovan, *J. Agric. Food Chem.*, 20, 1067 (1972).
- 5) M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton and F. Smith, *Anal. Chem.*, 28, 350 (1956).
- 6) K. Weber and M. Osborn, *J. Biol. Chem.*, 244, 4406 (1969).
- 7) C. Francois, R.D. Marshall and A. Neuberger, *Biochem. J.*, 83, 335 (1962).
- 8) C.C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita and W.W. Wells, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2497 (1963).
- 9) O.W. Neuhaus and M. Letzring, *Anal. Chem.*, 29, 1230 (1957).
- 10) L. Warren, *J. Biol. Chem.*, 234, 1971 (1959).
- 11) K.S. Dodgson and B. Spencer, *Biochem. J.*, 55, 436 (1953).
- 12) Y.H. Chen, J.T. Yang and K.H. Chau, *Biochemistry*, 13, 3350 (1974).
- 13) J.W. Donovan, J.G. Davis and L.M. White, *Biochim. Biophys. Acta*, 207, 190 (1970).
- 14) G. Tettamanti and W. Pigman, *Arch. Biochem. Biophys.*, 124, 41 (1968).

- 15) T. Pamer, G.B.J. Glass and M.I. Horowitz, *Biochemistry*, 7,
3821 (1968).
- 16) T. Nemoto and Z. Yoshizawa, *Biochim. Biophys. Acta*, 192, 37 (1969).
- 17) K. Meyer, V.P. Bhavanandan, D. Yung, L.T. Lee and C. Howe,
Proc. Natl. Acad. Sci. US, 58, 1655 (1967).

第五章 種々の環境におけるオボムチンの 濁度変化ならびに粘度変化について

1. 緒言

濃厚卵白を超遠心分離することにより得られたゲル状部分から調製した不溶性オボムチンは液状部分から調製した溶存性オボムチンにくらべて粘度、分子量が極めて高く、これらのオボムチンがある特異的な部位で結合している α オボムチンと β オボムチンのサブユニット構造からなっていることは既に述べた(1-6, 第二・三章)。

第四章において明らかになったように、不溶性オボムチンと溶存性オボムチンの音波処理による解離成分(α オボムチン、 β オボムチン)の間にはほとんど差はみられなかった。また、不溶性オボムチンの粘度、分子量が溶存性オボムチンにくらべて高いのは不溶性オボムチンが β オボムチンをより多く含有しているためであることを示唆した。

そこで、オボムチンの粘性における β オボムチンの役割を一層明らかにするために、さらには、 α オボムチンと β オボムチンとの相互作用機構と結合部位を明らかにするために、解離させた α 、 β オボムチンから、あるいは溶存性オボムチンから不溶性オボムチン様のゲルを再形成する必要がある。そこで、ゲル再形成の第一段階として、種々の環境下でのオボムチンの濁度と粘度の変化について調べた。

2. 実験方法

1) 実験材料の調製

溶存性オボムチン，不溶性オボムチンは第一章と同じ方法で調製した。

音波処理 α ， β オボムチンは第三章に述べた方法により，不溶性オボムチンから調製した。本章においては便宜上，音波処理 α ， β オボムチンを α -OM， β -OMと省略した。それぞれのオボムチン溶液の濃度は Λ キソース含量にもとづき計算した。 Λ キソースはフェノール硫酸法²⁾により定量した。

リゾチームは生化学工業から6回再結晶したものを購入した。

2) 濁度測定

濁度の測定は島津分光光度計 QV-50 を用い，660 m μ の波長における吸光度で表示した。

3) 粘度測定

粘度の測定は測定粘度範囲の異なる2種のコーンプレート型粘度計（E型粘度計，東京計器製）を用いて行った。一つは低粘度測定で3 cp ~ 30 cpの粘度の測定に適用でき，もう一つは高粘度測定用で25.6 cp ~ 2560 cpの粘度の測定に適用できる。（cp: centi poise）測定は20℃で一定のずり速度（76.8 sec⁻¹）で行った。存在すれば，溶存性オボムチンが非ニュートン流体すなわちその粘度はずり速度が増加するにつれて減少するという特性を呈した溶液であるからである。したがって，この測定で得られた粘度はみかけの粘度として表わした。

測定は1分間隔で10分間行い，その10回の読みの平均からみかけの粘度を計算した。さらに，一試料のみかけの粘度は3ないし5回繰り返し行った測定の平均値から求めた。

3. 実験結果

1. [α -OMと β -OMの種々の環境における濁度変化]

α -OM, β -OMの濁度に対するPHの影響を図1に示した。 α -OMはPH4.6以下で急激に白濁し始めた。 β -OMは全PH領域を通じて白濁しなかった。 α -OMと β -OMの等量混合物は α -OMのみの場合よりも若干低いPHすなわちPH4以下で白濁し始めた。

α -OM, β -OMの濁度に対するNaCl濃度の影響を図2に示した。 α -OMの濁度はNaCl濃度の増加に伴い増加し、40mMで最大となり、それ以上の濃度では減少した。 β -OMはいずれの濃度においても白濁しなかった。 α -OMと β -OMの等量混合物の濁度は α -OMのみの場合とほぼ同じ傾向を示すが、若干高いNaCl濃度(70~80mM)で最大となった。また、LiClやKClを用いた時でもNaClとほぼ同じ傾向を示した。

α -OM, β -OMの濁度に対する CaCl_2 濃度の影響

を図3に示した。 α -OMの濁度はカルシウム濃度が増加するにつれて増加し、3~4 mMのカルシウム濃度で最大となった。 β -OMはいずれのカルシウム濃度においても白濁しなかった。 α -OMと β -OMの等量混合物の濁度は α -OMのみの場合と同様にカルシウム濃度が増加するにしたがい増加し、10~20 mMで最大となった。 CaCl_2 の代わりに MgCl_2 を用いた場合もほぼ同じ傾向を示した。 HgCl_2 を用いた場合には CaCl_2 とは若干異なり、 HgCl_2 濃度の増加を続けても一旦増加した濁度は減少することはなかった。

リゾチーム共存下における α -OM、 β -OMの濁度に対するpHの影響を図4に示した。 α -OMはリゾチームの存在しない場合(図1)と異なり、pH 5~9.5という広い範囲のpHで白濁し、pH 4以下では白濁しなかった。 β -OMはpH 4以下で白濁した。 α -OMと β -OMの等量混合物は β -OMとよく似た傾向を示すが、 β -OMよりも若干高いpHで白濁した。

リゾチーム共存下における α -OM、 β -OMの濁

度に対する NaCl 濃度の影響を図 5 に示した。 α -OM は 60 mM 以下の濃度では白濁するが、それ以上の濃度で減少し始めた。ところが、 β -OM の濁度は NaCl 濃度が増加するにつれて増加し、60 mM の濃度で最大となった。 α -OM と β -OM の等量混合物は β -OM とほぼ同じ傾向を示した。

リゾチーム存在下における α -OM と β -OM の等量混合物の濁度に対するカルシウム濃度の影響を図 6 に示した。その濁度はカルシウム濃度が増加するにつれて増加し、5 ~ 10 mM の濃度で最大となった。また、濁度が最大となる条件下での α -OM と β -OM の等量混合物の粘度は、濁度のない条件下での粘度にくらべて低いことも見いだされた。

2. [溶存性オボムチンの種々の環境における粘度変化]

濃厚卵白，その液状部分とゲル状部分，溶存性オボムチン，不溶性オボムチンのみかけの粘度を表 1 に示した。濃厚卵白のみかけの

粘度は液状部分の約3倍であった。不溶性オボムチンのみかけの粘度は溶存性オボムチンの約4倍であった。

溶存性オボムチンのみかけの粘度の濃度依存性を図7に示した。溶存性オボムチンのみかけの粘度は1.5 mg/ml から2.5 mg/ml の間で急激に増加した。さらに、3.5 mg/ml 以上の濃度になると溶存性オボムチンは均質なゲルとなった。

溶存性オボムチンのみかけの粘度に対するPHの影響を図8に示した。塩濃度が低い場合にはPH7以下で溶存性オボムチンは凝集し、沈殿となった。この実験では、沈殿の生成を防ぐためにそれぞれの溶液に0.5M NaCl を加えて実験し、PH5までは沈殿は生じなかった。溶存性オボムチンのみかけの粘度はPHが増加するにつれて減少した。

溶存性オボムチンのみかけの粘度に対するNaCl濃度の影響を図9に示した。NaCl濃度が増加するにつれてみかけの粘度は減少し、80 mMの濃度で最小となった。20 mM以上の濃度で

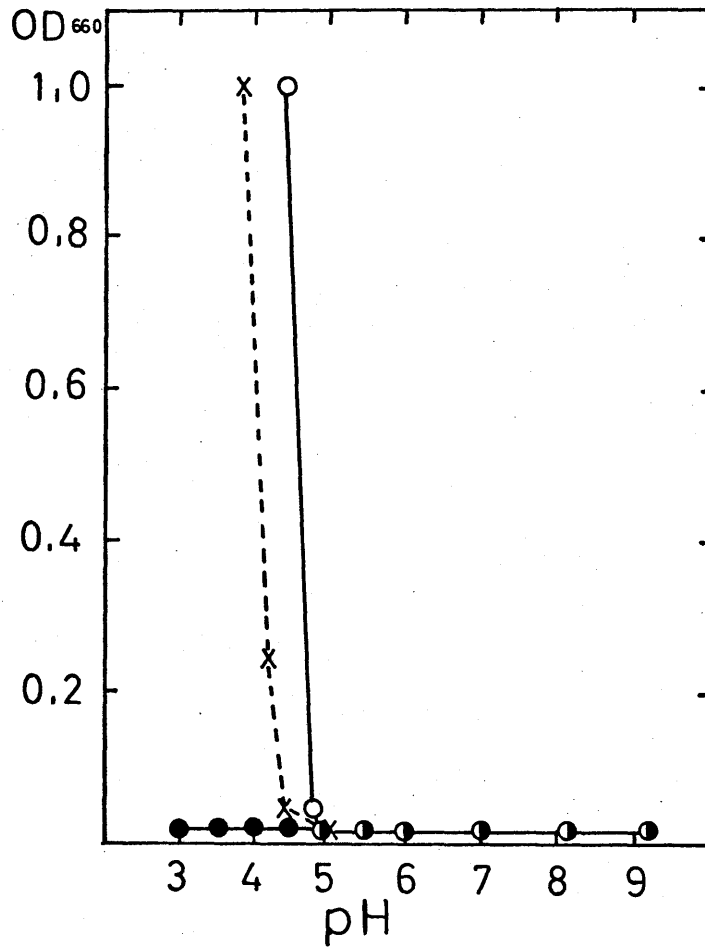
はみかけの粘度はほとんど変化しなかった。

溶存性オボムチンのみかけの粘度に対するリゾチーム添加の影響を図10に示した。β-OMの存在いかんにかかわらず、みかけの粘度はリゾチームの添加により著しく減少した。なお、溶存性オボムチンは1mg/ml以上のリゾチームを添加することにより沈殿を生ずるが、β-OMが共存することにより沈殿の生成を防ぐことが出来た。

溶存性オボムチンのみかけの粘度に対するβ-OMの添加の影響を図11に示した。みかけの粘度はβ-OMの添加により若干増加した。4mMのカルシウムが共存した場合には、みかけの粘度はβ-OMの添加によりか存りの増加を示した。

溶存性オボムチンのみかけの粘度に対するカルシウム濃度の影響を図12に示した。みかけの粘度はカルシウム濃度が増加するにつれて若干減少した。ところが、β-OMが共存する場合には、みかけの粘度はカルシウムを添加

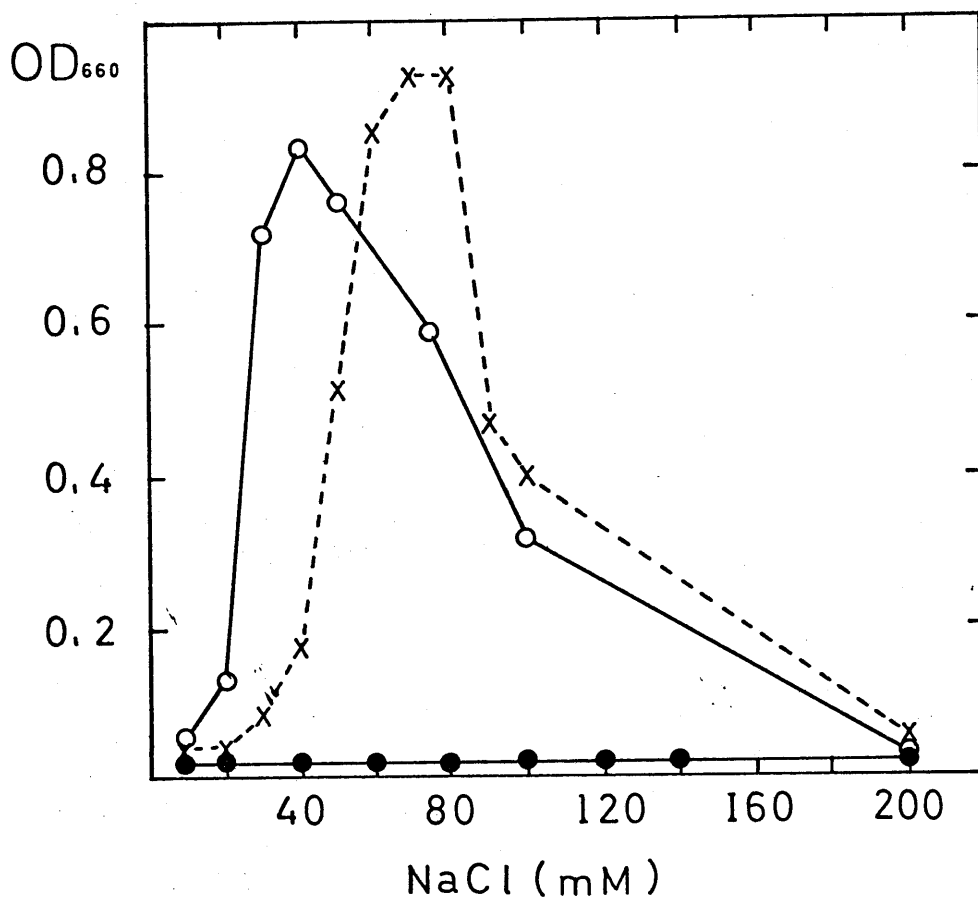
することによりかなり増加し、4～6 mMの濃度で最大の値を示した。そして、みかけの粘度は6 mM以上のカルシウム濃度で急速に減少し、 β -DMの存在しない場合と同程度の値となった。



V- Fig. 1. Influence of pH on the Turbidity of

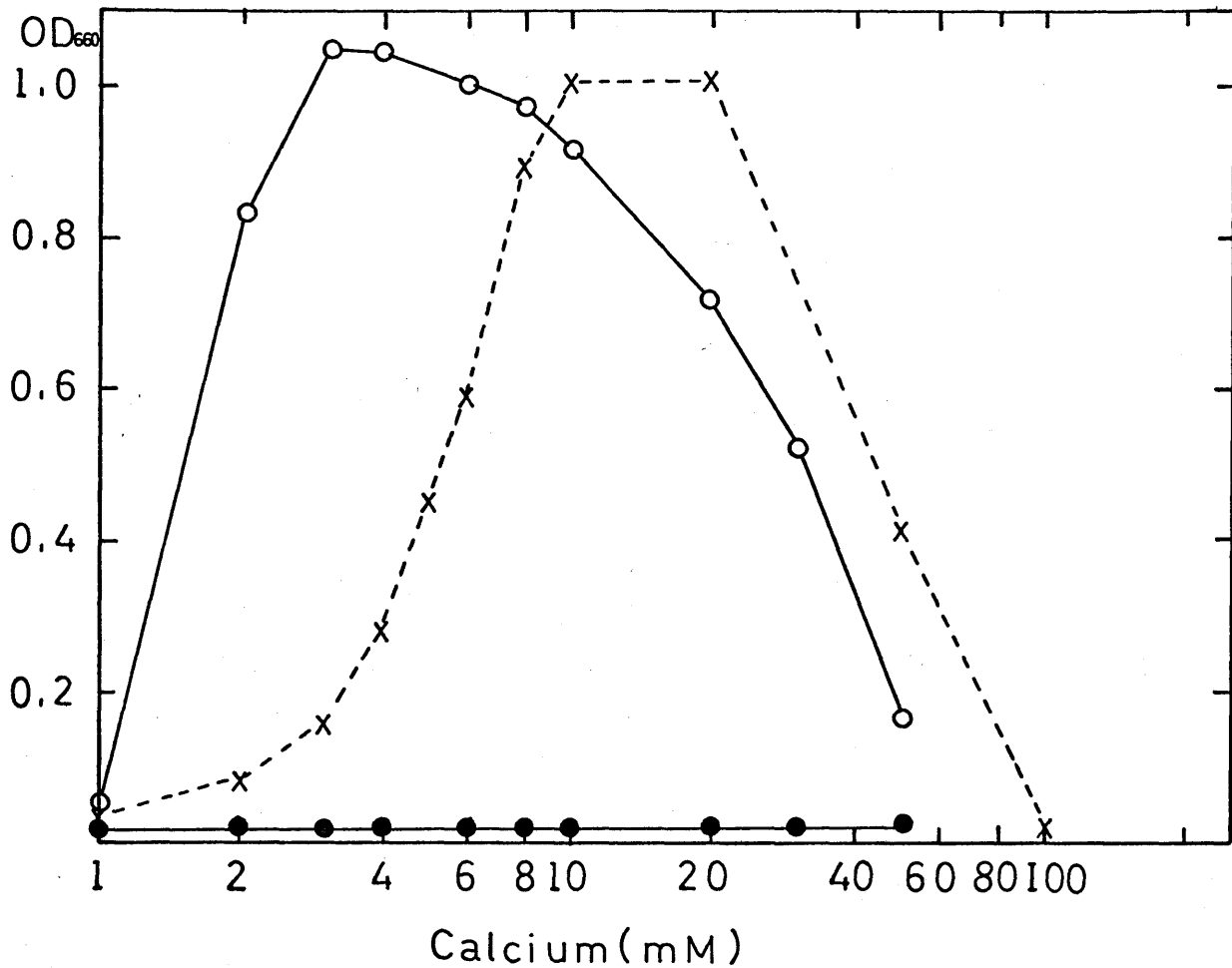
α -OM and β -OM. o—o, α -OM; ●—●, β -OM;
 x----x, ^{equal} mixture of α -OM and β -OM.

Ovomucins were dissolved in 0.01 M Tris and adjusted pH with 0.1 N HCl. Protein concentration was 0.2 % for α -OM and β -OM and 0.4 % for the mixture.



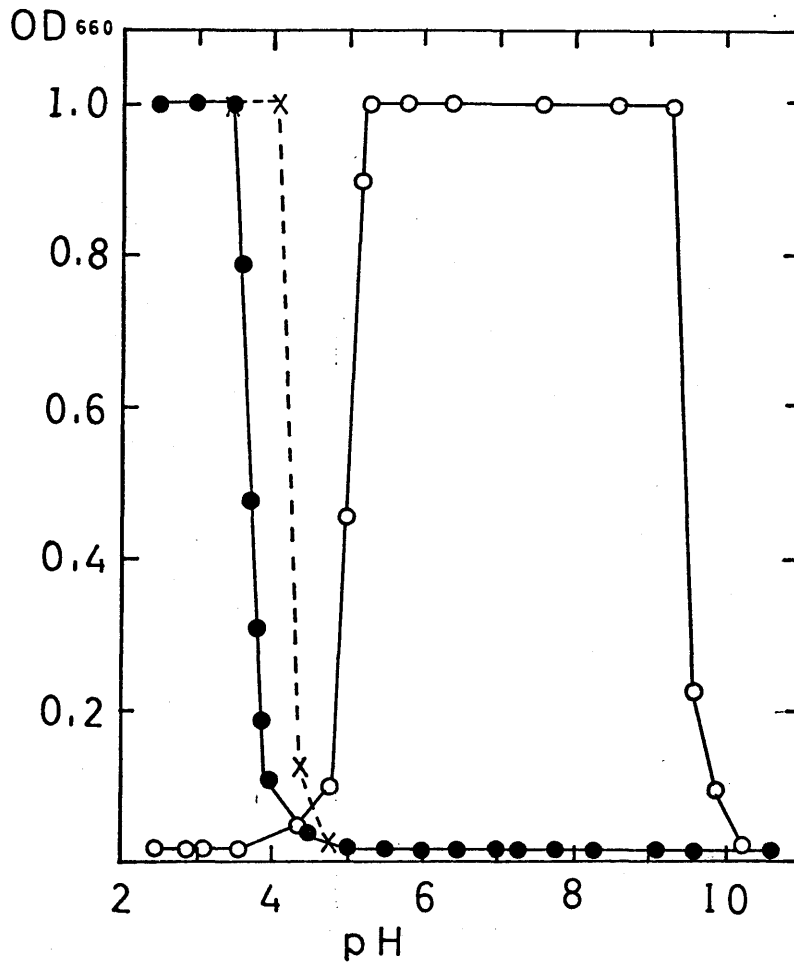
V- Fig. 2. Influence of NaCl Concentration on the Turbidity of α -OM and β -OM.

○—○, α -OM; ●—●, β -OM; x----x, ^{equal} mixture of α -OM and β -OM. Ovomucins were dissolved in 0.01 M Tris and adjusted to pH 4.8 with 0.1 N HCl. Protein concentration was 0.2 % for α -OM and β -OM and 0.4 % for the mixture.



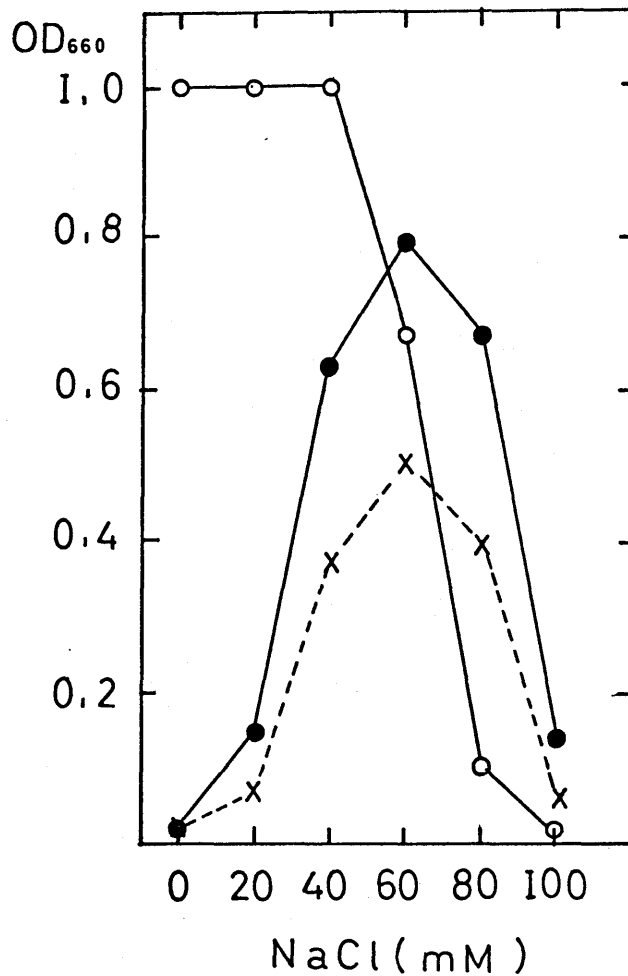
V- Fig. 3. Influence of Calcium Concentration on the Turbidity of α -OM and β -OM.

o—o, α -OM; ●—●, β -OM; x----x,
 equal mixture of α -OM and β -OM. Ovomucins were dissolved in 0.01 M Tris and adjusted to pH 5 with 0.1 N HCl. Protein concentration was 0.2 % for α -OM and β -OM and 0.4 % for the mixture.



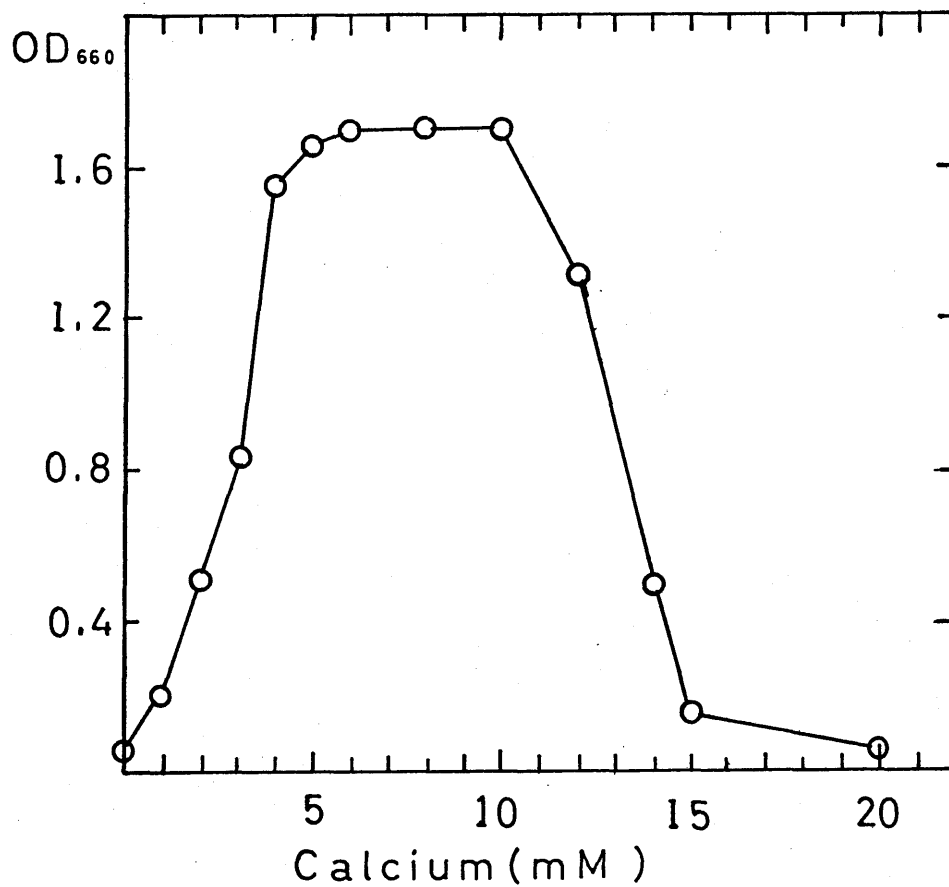
V- Fig. 4. Influence of pH on the Turbidity of α -OM and β -OM in the Presence of Lysozyme.

○—○, α -OM; ●—●, β -OM; x----x, equal mixture of α -OM and β -OM. Ovomucins were dissolved in 0.01 M Tris and adjusted pH with 0.1 N HCl. Ovomucin concentration was 0.1 % for α -OM and β -OM and 0.2 % for the mixture and lysozyme concentration was 0.1 %.



V- Fig. 5. Influence of NaCl on the Turbidity of α -OM and β -OM in the Presence of Lysozyme.

○—○, α -OM; ●—●, β -OM; x----x, equal mixture of α -OM and β -OM. Ovomucins were dissolved in 0.01 M Tris and adjusted to pH 6.6 with 0.1 N HCl. Ovomucin concentration was 0.1 % for α -OM and β -OM and 0.2 % for the mixture and lysozyme concentration was 0.1 %.



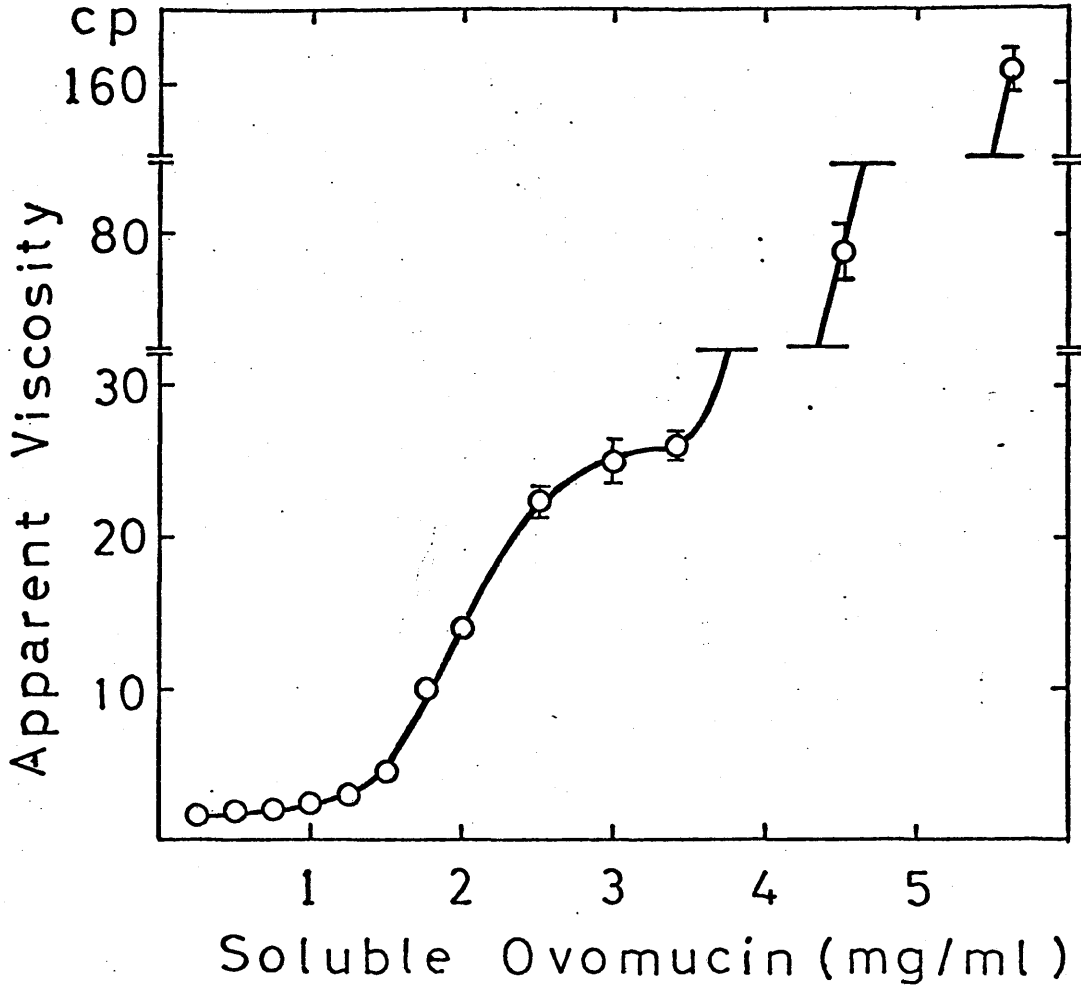
V- Fig. 6. Influence of Calcium on the Turbidity of equal mixture of α -OM and β -OM in the Presence of Lysozyme.

Ovomucin was dissolved in 0.01 M Tris and adjusted to pH 6.75 with 0.1 N HCl. Ovomucin concentration for the mixture was 0.2 % and lysozyme concentration was 0.1 %.

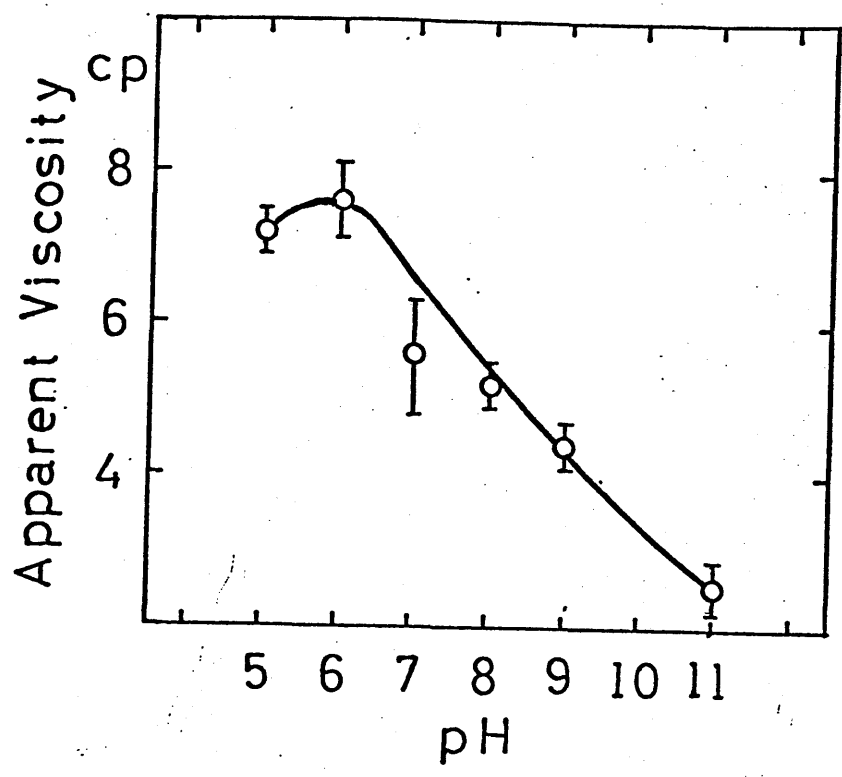
V- Table I. Apparent Viscosities of the Egg Whites and the Ovomucins

Materials	Apparent Viscosity (cp) ^a
Thick White	15.1 ± 1.0
Liquid Fraction	5.1 ± 0.3
Gel Fraction	179.0 ± 2.6
Soluble Ovomucin (0.15 %)	4.6 ± 0.1
Insoluble Ovomucin (0.15 %)	18.0 ± 1.0

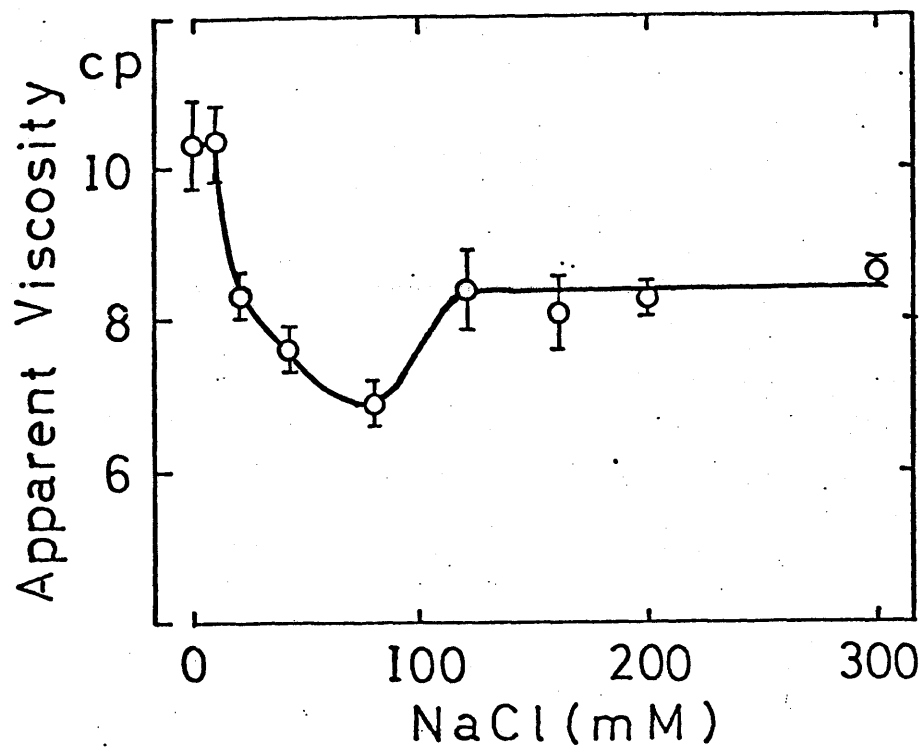
^a All viscosities were measured at 76.8 sec^{-1} of shear rate. Values were shown at an average of three or five times determination and standard deviation.



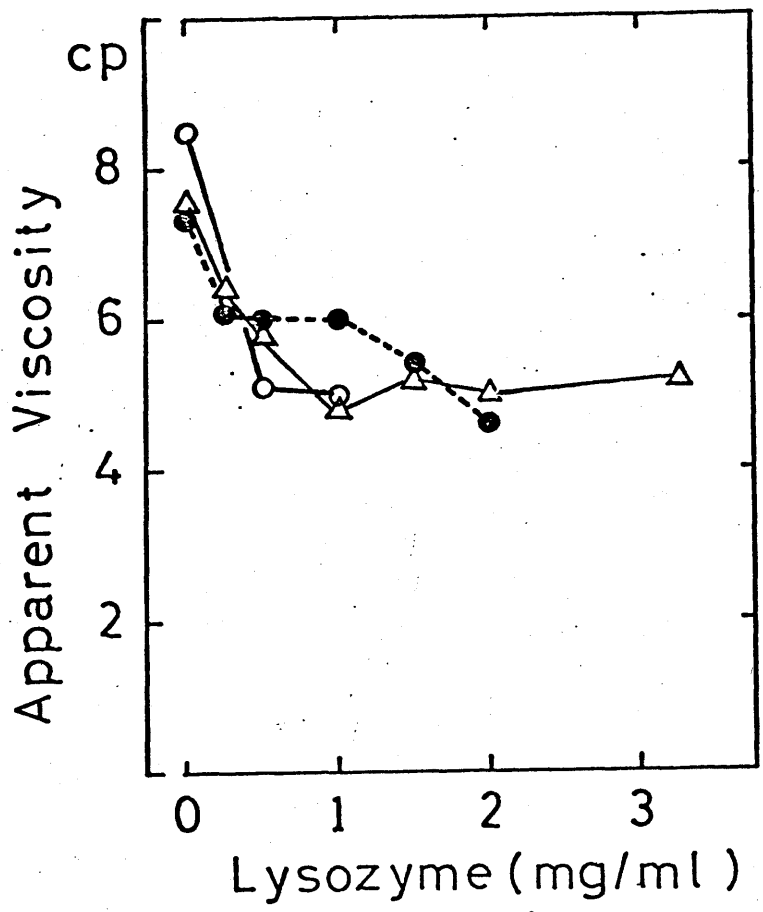
V-Fig. 7. Concentration Dependence of the Apparent Viscosity of the Soluble Ovomucin. The soluble ovomucin solution contained 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 8). Vertical lines indicate standard deviation and it was within ± 0.2 in the case of no mark.



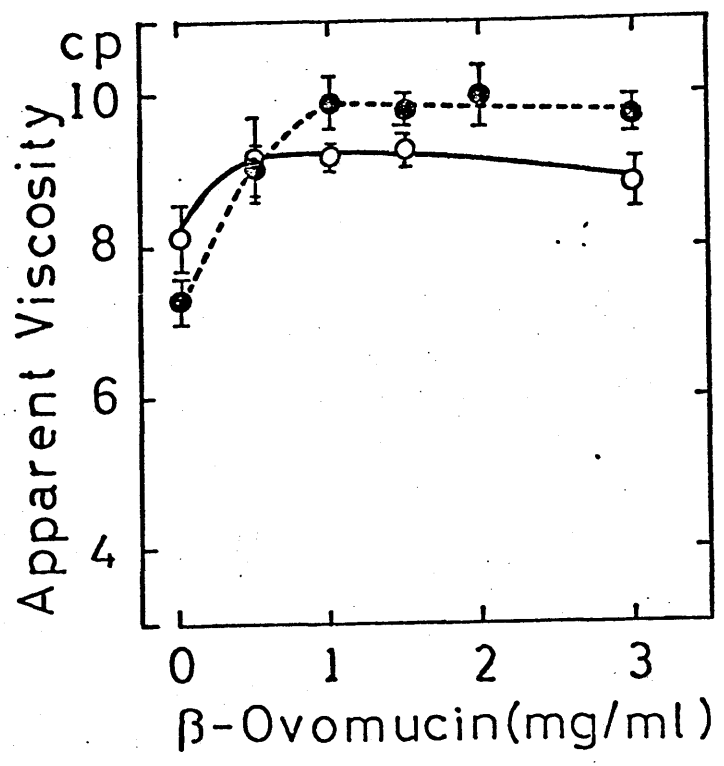
V- Fig. 8. Effect of pH on Apparent Viscosity of the Soluble Ovomucin. The soluble ovomucin concentration was 0.175 % in 0.01 M Tris-HCl buffer adjusted pH with HCl or NaOH. All solution contained 0.5 M NaCl. Vertical lines indicate standard deviation.



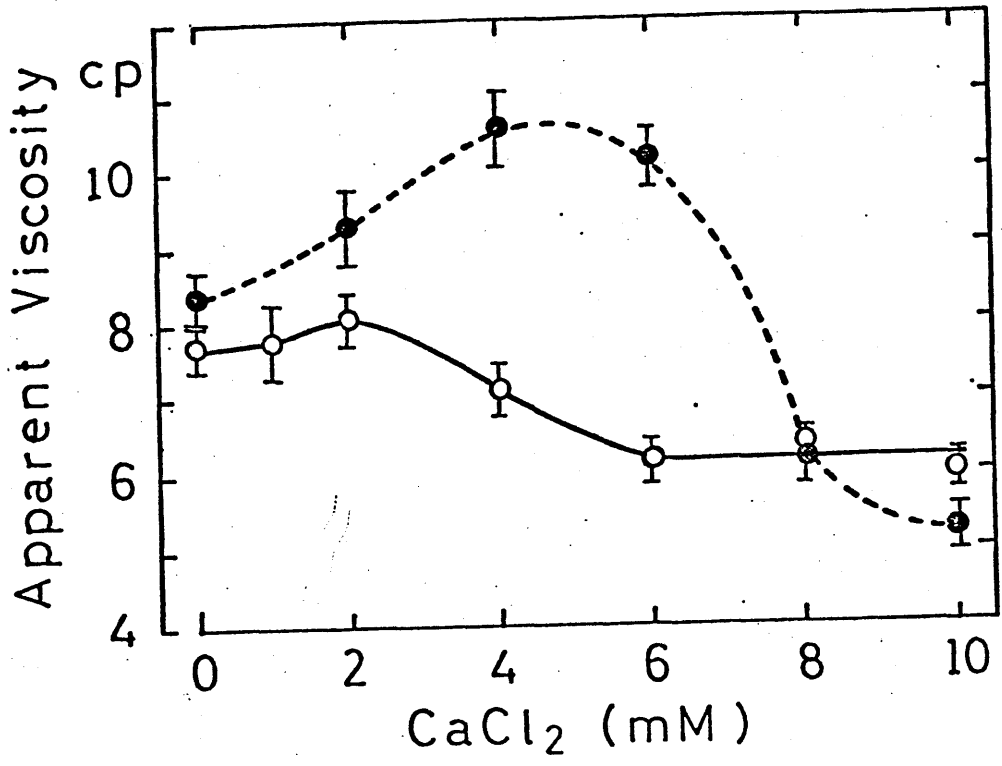
V- Fig. 9. Effect of NaCl on Apparent Viscosity of the Soluble Ovomucin. The soluble ovomucin concentration was 0.175 % in 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 8). Vertical lines indicate standard deviation.



V- Fig. 10. Effect of Lysozyme on Apparent Viscosity of the Soluble Ovomucin. The soluble ovomucin concentration was 0.175 % containing no (o), 1 mg/ml (●) and 2 mg/ml (Δ) sonicated β-ovomucin in 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 8). All standard deviation were within ± 0.5.



V- Fig. 11. Effect of the Sonicated β -Ovomucin on Apparent Viscosity of the Soluble Ovomucin. The soluble ovomucin concentration was 0.175 % containing no CaCl_2 (o) or 4 mM CaCl_2 (●) in 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 8). Vertical lines indicate standard deviation.



V- Fig. 12. Effect of Calcium on Apparent Viscosity of the Soluble Ovomucin. The soluble ovomucin concentration was 0.175 % containing no sonicated β -ovomucin (o) and 1.5 mg/ml sonicated β -ovomucin (●) in 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 8). Vertical lines indicate standard deviation.

4. 考察

図2, 3において見られるように α -OMはある特定の塩濃度の領域(1価のカチオンの場合は30~50 mM, 2価のカチオンの場合は3~6 mM)で濁度が最大となる。なぜこのような性質を有するのかは明らかではないが、卵白内のナトリウム濃度, カルシウム濃度がそれぞれ70~80 mM, 3~4 mMである^{8,9)}ことを考えるならば, この α -OMの性質は卵白内でのオボムチンのゲル構造保持あるいは卵白水様化において何らかの特徴的役割をもつて関係しているのであろう。

著者ら¹⁰⁾は, 卵白水様化のモデル実験の一つとして, 単離した不溶性オボムチンを長期間無菌的に貯蔵した。そして, 貯蔵溶液のイオン強度が高い時には α オボムチンが, イオン強度の低い時には β オボムチンが主として溶け出すということを報告した。この点について, α オボムチン, β オボムチンの両者

の結合の切断の条件は別としても、上述の α オボムチンの濁度、塩濃度に対する特異的性質がその原因の一部として関連すると考えられる。

ところで、 α -OMと β -OMの等量混合物の濁度は α -OMと同じ傾向の変化を示すが、濁度が最大となる塩濃度は α -OMの場合よりも幾分多い方にずれてゐた。これは、いすれのPH、塩濃度においても白濁しない β -OMの影響によるものであると考えられる。ところが、リゾチームが共存した場合は、 α -OMと β -OMの等量混合物は β -OMと同じ傾向の変化を示すことから、 β -OMは α -OMとリゾチームとの相互作用を弱める作用があると考えられる。

加藤ら¹¹⁾は、 β オボムチンは α オボムチンよりもはるかに強くリゾチームと相互作用し、白濁するということを報告し、オボムチンの構造保持におけるリゾチームの役割を述べた。しかしながら、図5に見られるように40mM以下のNaCl濃度においては β -OMよりも α -OMの方が

が高い濁度を示すので、 $\frac{1}{15}$ リン酸緩衝液中で調べたオボムチンとリゾチームの相互作用の結果のみによってどちらのオボムチンが強く相互作用すると断定するのは正しくないといえる。

白濁したオボムチンの粘度を測定すると白濁していないオボムチンにくらべて低い値を示し、濁度という指標は粘度とは無関係であることを示している。したがって、オボムチンの卵白水様化に伴う粘度変化を濁度で説明しようとするのは無理があると考えられる。

表1から、濃厚卵白や不溶性オボムチンの見かけの粘度はいずれも15cp以上であるところから、15cp以上のみかけの粘度をもつ溶液は極めて高い粘性をもつ溶液であるといえる。溶解性オボムチンは1.5mg/ml以下の濃度では低い粘度(<5cp)しか示さないが、2mg/ml以上の濃度では不溶性オボムチンに匹敵する粘度(>15cp)になった。さらに濃度を上げるこ

とにより、溶存性オボムチンから均質なゲルをつくることも可能であった。多くの糖タンパク質は低濃度においてさえ高い粘度をもち、そのうちの一部はゲルを形成する。そして、糖タンパク質の高粘性は糖タンパク質における多くの分子間結合あるいは糖タンパク質分子自体のもっている粘弾性に由来するといわれている¹²⁾。オボムチンが前者の分子間結合をもつサブユニット構造からなっていることは第三章においてすでに述べた。

さて、図10に見られるように溶存性オボムチンのpH8におけるみかけの粘度はリゾチームを添加することにより減少した。Donovanら¹³⁾はpH10.45においてリゾチームをオボムチンに添加しても粘度はたゞして変化しなかったと報告している。しかしながら、図4~6に見られるように、リゾチーム添加により生ずるオボムチンの濁度は溶液の環境条件(pH, 塩濃度)により変化するのでDonovanらの結果と比較して一概に同意することは出来ない。ま

た、加藤ら¹³⁾はリゾチームの添加によりオボムチンの濁度が増加することから、オボムチンのゲル状構造がオボムチン-リゾチーム相互作用により保持されていると推定し、Robinson¹⁴⁾はゲル状構造を保持するリゾチームで架橋したオボムチン-リゾチーム複合体が過剰のリゾチームにより架橋のないオボムチン-リゾチーム複合体に解離し、ゲル状構造が崩壊するということを推定している。

しかしながら、不溶性オボムチンはリゾチームなしでゲル状構造を保持できるとのことと、溶存性オボムチンもリゾチームがなくても高濃度にあればゲルを形成することができるといふ事実からみてもオボムチンとリゾチームが複合体をつくることによつてのみゲル状構造を保持するといふ考えにはいまのところ疑問点が残る。ただし、溶存性オボムチンのみかけの粘度がリゾチームの添加によつて減少するのは、過剰のリゾチームによつてオボムチン-リゾチーム複合体が架橋のある

集合体から架橋のないものへと解離するため
 よりむしろ、リゾチームが溶存性オボムチ
 ンと複合体を形成することにより溶存性オボ
 ムチンに引っつきまわって、水が放出される
 ためである可能性が高いと考えられる。

濃厚卵白液状部分中の溶存性オボムチンの
 含量は0.2%であるといわれている。ところが、
 図7、表1からも明らかのように、0.2% (2
 mg/ml) の溶存性オボムチンのみかけの粘度は
 液状部分のみかけの粘度よりもはるかに高か
 った。卵白は70~80 mMのナトリウム^{8.9)}と3~
 4 mg/mlのリゾチーム¹⁵⁾を含み、その条件下で
 は、溶存性オボムチンは低いみかけの粘度の
 値を示す(図9、10)。そのために溶存性オ
 ボムチンは卵白内では低い粘度におさえられ
 ていると考えられる。したがって、卵白から
 ナトリウムやリゾチームを除去することによ
 り、卵白の粘度を飛躍的に増大させることが
 出来ると考えられる。

Stevenon¹⁶⁾ は Tamm Horsfall glycoprotein の粘度が、

6~7 mM のカルシウムを添加することにより増加し、最終的にはゲルを形成することを報告した。そして、この Tamm Horsfall glycoprotein 分子上の全 COOH 基の 8 割がカルシウムによって中和された時にゲル形成が起きるということが Cleave ら¹⁷⁾ によって見いだされた。Suzuki と Hashimoto¹⁸⁾ は 2 価の金属イオンがフィブリン単量体の重合を促進し、これらのイオンがフィブリンの COOH 基に結合することを報告した。さらに、Gugler ら¹⁹⁾ は顎下腺の主要構成糖タンパク質 (ムチン様糖タンパク質) がカルシウムと結合して高分子の凝集体となることを報告した。このように、99% の糖タンパク質は 2 価のカチオン (特にカルシウム) と結合して重合する傾向がある。図 11, 12 において見られたように、溶存性オボムチンと β -OM の共存下で少量のカルシウムを添加することにより粘度が増加した。これは、溶存性オボムチン分子と β -OM 分子上の陰性基 (グルタミン酸, アスパラギン酸の COOH 基, シアル酸の

COOH基, エステル硫酸) の陰イオンの間にカルシウムが架橋的に結合したためであると推定される。

さて, 表1に見られるように, 溶存性オボムチンのみかけの粘度は同じ濃度の不溶性オボムチンの見かけの粘度の約4分の1であった。したがって, 溶存性オボムチンからゲルを形成するためには粘度を4倍に高める必要がある。確かに溶存性オボムチンの濃度を上げることによって簡単にゲルを形成することは出来た(図7)。しかしながら, あくまで卵白を対象としている以上, 卵白中に存在する程度の濃度でゲルを形成する条件があるに違いない。本実験においては, オボムチンの卵白中でみられる濃度においては図11, 12のように溶存性オボムチンと β -OMの共存下において少量のカルシウムを添加した時にみられる粘度増加はせいぜい2~3割であって, とても4倍まで増加させることは出来なかった。これは, 溶存性オボムチンと β -OMの会合が不

十分であり、連続的な架橋が出来なくてゲル形成にまでは到らなかつたためであると考えられる。それゆゑ、溶存性オホムチンもゲル形成に導くためのより適当な実験条件やより効果的な添加物を見出すために今後さらに検討する必要がある。

5. 要約

1) 音波処理 α , β オボムチン (α -OM, β -OM) の種々の環境における濁度変化を調べた結果, α -OMは pH 4.6以下で白濁し, その濁度は 40 mM NaCl あるいは 3 ~ 4 mM CaCl_2 で最大となった。 β -OMは、いずれの pH, 塩濃度においても白濁しなかった。 α -OM と β -OM の等量混合物は α -OM とほぼ同じ傾向を示した。

2) リゾチーム共存下における α -OM, β -OM の濁度変化を調べた結果, α -OMは pH 5 ~ 9.5 の間で白濁し, β -OMは pH 4 以下で白濁した。 したがって, α -OM と β -OM の濁度は NaCl 濃度により特徴的様相を示した。 すなわち, pH 6.6において, 60 mM 以下の NaCl 濃度では α -OM の方が β -OM よりも濁度が高く, 60 mM 以上の NaCl 濃度では逆に β -OM の方が濁度が高くなった。 α -OM と β -OM の等量混合物は β -OM と同じ傾向を示した。

3) 溶存性オボムチンの種々の環境における粘度変化をコーンプレート型粘度計によって調べた。その結果、溶存性オボムチンの粘度は 1.5 mg/ml 以上の濃度で急激に増加し、高濃度の溶存性オボムチンは不溶性オボムチンに匹敵する粘度をもつ均質なゲルになった。

溶存性オボムチンに NaCl 、リゾチームを添加することによりみかけの粘度が減少することから、卵白からナトリウムイオンとリゾチームを除去することにより卵白の粘度を著しく増加させることが出来るであろうと推定した。

溶存性オボムチンのみかけの粘度は $\beta\text{-DM}$ 共存下で少量のカルシウムを添加することにより増加した。しかしながら、この粘度の増加はゲル形成にまでは到らなかった。

6 REFERENCES

- 1) A. Kato, R. Nakamura and Y. Sato, *Agric. Biol. Chem.*, 35, 351 (1971).
- 2) Y. Sato and S. Hayakawa, *Nippon Nōgeikagaku Kaishi*, 51, 47 (1977).
- 3) A. Kato, R. Nakamura and Y. Sato, *Agric. Biol. Chem.*, 34, 854 (1970).
- 4) Y. Tomimatsu and J.W. Donovan, *J. Agric. Food Chem.*, 20, 1067 (1972).
- 5) A. Kato and Y. Sato, *Agric. Biol. Chem.*, 35, 439 (1971).
- 6) D.S. Robinson and J.B. Monsey, *Biochem. J.*, 121, 537 (1971).
- 7) M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton and F. Smith, *Anal. Chem.*, 28, 350 (1956).
- 8) A.L. Romanoff and A.J. Romanoff, "The Avian Egg" ed. by J. Wiley and Sons Inc., New York, 1949 p 681 .
- 9) Y. Sato, R. Nakamura, Y. Yoshikawa and K. Takagi, *Nippon Nōgeikagaku Kaishi*, 34, 1000 (1960).
- 10) Y. Sato, S. Hayakawa and R. Nakamura, *J. Agric. Food Chem.*, 24, 798 (1976).
- 11) A. Kato and Y. Sato, *Agric. Biol. Chem.*, 36, 831 (1972).
- 12) R.A. Gibbons, "Glycoproteins" ed. by A. Gottschalk, Elsevier, Amsterdam, 1972 p 31 .
- 13) J.W. Donovan, J.G. Davis and M.B. Wiele, *J. Agric. Food Chem.*, 20, 223 (1972).

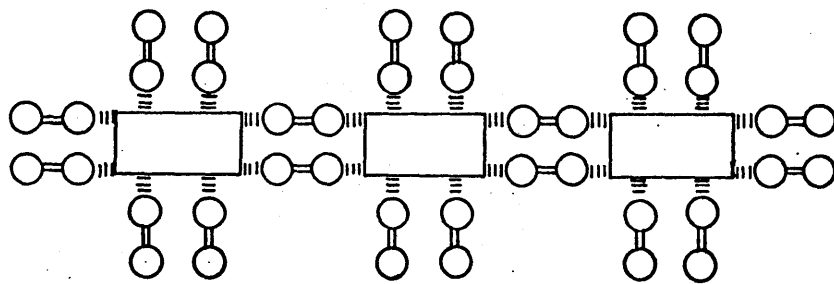
- 14) D.S. Robinson, "Egg Formation and Egg Production" ed. by B.M. Freeman and P.E. Lake, British Poultry Sci., Edinburgh, 1972 p 77.
- 15) A.B. Gilbert, "Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl " Vol. 3 ed. by D.J. Bell and B.M. Freeman, Academic Press, London New York, 1971 p 1291.
- 16) F.K. Stevenson, A.J. Cleave and P.W. Kent, Biochim. Biophys. Acta, 236, 59 (1971).
- 17) A.J. Cleave, P.W. Kent and A.R. Peacocke, *ibid*, 285, 208 (1972).
- 18) K. Suzuki and S. Hashimoto, *ibid*, 439, 310 (1976).
- 19) E. Gugler, C.J. Pallavicini, H. Swerdlow and P.A. Sant'Agnese, J. Pediatrics, 71, 585 (1967).

総合考察

第一章から第五章までに得られた事実にもとずいて不溶性オボムチン、溶存性オボムチンの分子構造の推定を試みた。言うまでもなく、不溶性オボムチンと溶存性オボムチンは同じ α 、 β オボムチンからなっているという第四章の推定にもとづいている。

まず、溶存性オボムチンであるが、その分子量は複合体として830万、その構成成分である α オボムチン単量体の分子量は18万、 β オボムチン単量体の分子量は40万と測定された。そして、 α オボムチンと β オボムチンの構成比が87:13であった。これらのことから、溶存性オボムチンの1分子中に含まれる α オボムチン単量体と β オボムチン単量体の数を計算すると、溶存性オボムチン1分子は40分子の α オボムチン単量体と3分子の β オボムチン単量体からなっていることになる。(こ

れから溶存性オボムチンの分子量を逆に換算
 すると $18万 \times 40 + 40万 \times 3 = 840万$ となり、ま
 たその構成比は $86:14$ になる。) そして、音
 波処理後の還元の有無によって違せられる分
 子量の測定値の比較から、音波処理 α オボム
 チンが分子間SS結合をもつ2量体から主と
 してなり、音波処理 β オボムチンが単量体か
 らなると推定される。これらの知見から溶存
 性オボムチンの分子構造について次のような
 模式図が推定された。



○ α オボムチン

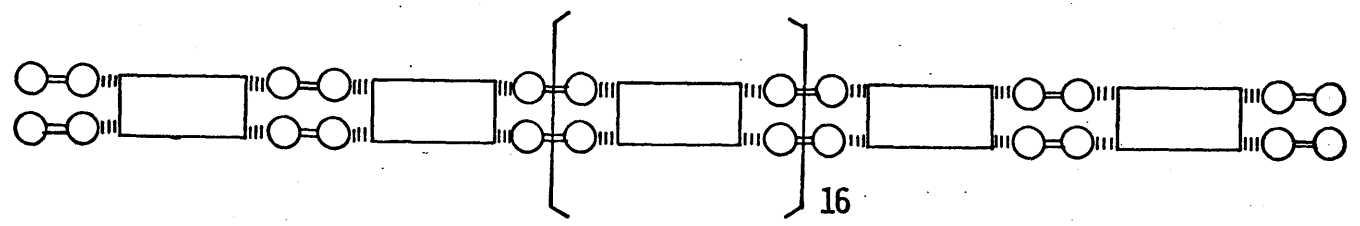
□ β オボムチン

≡ SS 結合

||| 音波処理により切断される結合

一方、不溶性オボムチンの方は分子量については本論文において調べていないが、Tomina-
 tauとDonovan¹⁾が光散乱によつて6M塩酸グアニジン中でもとめた値を不溶性オボムチン単分子の分子量とするとその分子量は230万である。α, βオボムチン単量体の分子量はそれぞれ18万, 40万であり, α, βオボムチンの構成比は66:34であつた。これらの値から、不溶性オボムチン1分子は84分子のαオボムチン単量体と20分子のβオボムチン単量体からなることとなる。(これから逆に検算すると分子量 $18万 \times 84 + 40万 \times 20 = 2312万$ となり, また, αオボムチンとβオボムチンの構成比が65.4:34.6となる。)

溶存性オボムチンと同じように不溶性オボムチンの分子構造について模式図を推定すると次のようになる。



ここで、溶存性オボムチンのように β オボムチンの結合部位が最大8個所であると仮定するならば、溶存性オボムチンはこれ以上大きな分子へと会合することは出来ない。ところが、不溶性オボムチンは結合部位がまだ残っているため、さらに不溶性オボムチン分子どうしが会合してより大きな分子となり、最終的にゲル化することが出来るであろう。実際、TomimatsuとDonovan¹⁾は中性付近のpHでオボムチンの分子量は2億7千万程度になることを報告している。このように β オボムチンの量が増すことによりオボムチンは会合してどんどん大きな分子になってゆくことができるであろう。

溶存性オボムチンと不溶性オボムチンはいずれも音波処理により α オボムチン2量体と β オボムチン単量体へと解離することはすでに述べた。そして、オボムチンがメルカプト

1) Y. Tomimatsu and J.W. Donovan, J. Agric. Food Chem., 20, 1067 (1972).

エタノール等の還元剤により α オボムチンと β オボムチンに解離することも既に証明された事実である。そこで、還元剤により不溶性・溶存性オボムチンがどのような構造上の影響を受けるかを上記の構造から考えてみよう。

還元剤がまず α オボムチン n 量体の分子間S-S結合を切断する。その結果、いくつかの α オボムチン単量体と n 個の α オボムチンの結合した β オボムチンが得られる。それと同時に、還元剤が α オボムチンと β オボムチンの分子内S-S結合を切断し、両オボムチンの構造が変化する。そのことにより、 α オボムチンと β オボムチンの結合部位（音波処理によって切断される部位）にOHイオンが侵入しやすくなるかあるいはその結合部位が表面にあらわれるかしてその結合部位がOHイオンによって切断される。そして、最終的に α オボムチン単量体と β オボムチン単量体となると推定される。

さて、このような分子構造をもつと考えら

れる不溶性オボムチンと卵白水様化との関係
を見てみよう。緒論においても述べたように、
卵白水様化は不溶性オボムチン中の β オボム
チンの溶脱によって起きるといわれている。
ところが、前述の模式図では β オボムチンの
みの溶脱は不可能である。そこで、第五章の
実験にもとづいて考えると、 α オボムチンと
 β オボムチンの両方が一たん溶け、その後、
何らかの理由で α オボムチンのみ那不溶化す
るといふ考えも成立する。すなわち、第五章、
図4に見られるように α オボムチンはリゾチ
ームを添加するとpH 5~9.5の範囲で自濁し、
最終的には沈殿となる。したがって、卵白水
様化においては、一たん溶け出した α オボム
チンが卵白内のリゾチームと相互作用して沈
殿するため、結果的に β オボムチンだけが溶
け出したように見えるのではないかと考えら
れる。それゆえに上記の考え方によれば、不
溶性オボムチンが β オボムチンのみを溶脱さ
せるような特別な構造をもつ必要はないとい

うことになる。

ところで、溶存性オボムチンが少量のカルシウムの共存下で β オボムチンを添加すると粘度が増加するという事実が示された(第五章参照)。これを溶存性オボムチンの構造との関連から考えると次のように推論される。

カルシウムが溶存性オボムチン中の α オボムチンと添加した β オボムチンとの結合のなかだちをすすめるならば、 β オボムチンを架橋として溶存性オボムチンが高度に会合してゲルを形成するはずである。ところが実際には、粘度の増加はみられたもののゲル形成にまでは到らなかった。したがって、まず、カルシウムが溶存性オボムチン中の一部の β オボムチンに結合し、この結合したカルシウムに添加した β オボムチンが結合すると考えられる。結局、溶存性オボムチンに β オボムチンとカルシウムを添加した場合、溶存性オボムチン分子に若干の β オボムチン分子が結合した状態にとどまり、溶存性オボムチン分子どうし

の会合は起らないのであろう。

このような推定構造を作業仮説として、ゲル形成および繊維形成の実験を重ねることにより、濃厚卵白のゲル構造およびオボムチンの推定構造をより正しい姿に訂正することが今後の研究に要求されると思われるのである。

謝 辞

本研究を行うにあたりまして終始御指導
いただきました佐藤泰教授に感謝いたします。

有意義な御助言をいただきました食品製造
化学第二研究室の皆様感謝いたします。

また、円二色性の測定について御教示を
いただきました野口肇教授に感謝いたします。

超遠心沈降平衡の測定をしていただきました
京都大学食糧科学研究所の樋笠隆彦氏に、
また、その御便宜をほかさせていただきました
同研究所の松下雪郎教授に感謝いたします。

報文目錄

1. S. Hayakawa and Y. Sato, " Studies on the Dissociation of the Soluble Ovomucin by Sonication " Agric. Biol. Chem., 40 2397 - 2404 (1976).
2. S. Hayakawa and Y. Sato, " Physicochemical Identity of α -Ovomucins or β -Ovomucins Obtained from the Sonicated Insoluble and Soluble Ovomucins " Agric. Biol. Chem., 41, 1185 - 1191 (1977).
3. S. Hayakawa and Y. Sato, " Subunit Structures of Sonicated α and β -Ovomucin and Their Molecular Weights Estimated by Sedimentation Equilibrium " Agric. Biol. Chem., 42, 957 - 961 (1978).
4. S. Hayakawa and Y. Sato, " Viscometric Behaviour of Soluble Ovomucin " Agric. Biol. Chem., 42, (1978) 掲載予定