

卵蛋白に関する研究 (III)

繊維状 CMC の調製と卵白 flavoprotein の分別

金森正雄・河端信

M. KANAMORI M. KAWABATA : Studies on egg protein(III).
Preparation of fibrous CMC and fractionation
of egg white flavoprotein.

A. 緒言

蛋白の分離分別に従来用いられている方法としては、塩析法、吸着法、電気泳動法、其他各種イオン交換樹脂、澱粉、Celite, methyl cellulose, Ca-phosphate gel 等を用いるカラムクロマト法等種々の方法があるが、何れの方法も鋭敏に而も多量を一度に分離出来ない欠点がある。最近これらの欠点を除き、一時に多量を而も鋭敏に分別出来る Cellulose ion exchanger が注目されて来ている。即ち Cellulose を用いた anion exchanger としては diethylaminoethyl cellulose (DEAEC) 及び cellulose に epichlorohydrin と triethanol amine を作用させて作った Ecteola cellulose があり、又 cation exchanger として CMC 及び Phosphate cellulose があり、それぞれ蛋白、酵素に応用されて良成績をあげている。

Peterson 及び Sober⁽¹⁾ がはじめて CMC (carboxymethyl-cellulose) を cation exchanger として蛋白のカラムクロマトに応用して、CMC が蛋白の吸着に対して驚異的な能力をもっていること、及び吸着蛋白溶出にあたり、極めて緩和な条件、即ち pH 並びにイオン強度の僅かな変化により、鋭敏な分離を起すことを発見し、更に多くの研究者⁽²⁾ によって蛋白質、酵素の調製、精製及び希薄蛋白溶液の濃縮並びに分離分別の困難な蛋白試料の直接分離などに利用され、優れた成績をあげている。

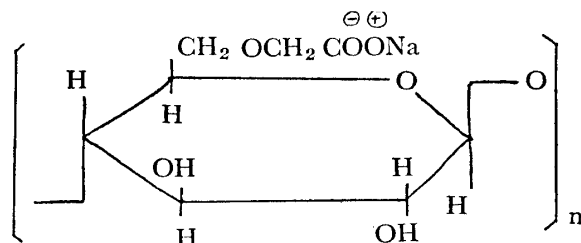
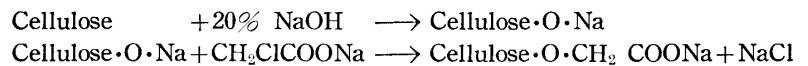
著者等は Peterson 及び Sober⁽¹⁾ の方法に準じて CMC を調製し実験を行つたが、CMC 製品が powder

であるために、蛋白吸着能は優れているけれども、吸着蛋白の溶出には常に一定の圧力を必要とし、又溶出にも長時間を要し、実験操作上に多くの不便を伴うことがわかつた。そこで、著者等はこれら実験上の不便を解消するため、原料として繊維状の Rayon cellulose を用い、下記する特殊な方法によつて、繊維状 CMC を調製してその優秀性を実証し、続いてこれを用いて卵白 flavoprotein の分別を行つたので、その詳細について報告する。

B. 実験結果並びに考察

〔I〕 繊維状 CMC の調製とその D. S. 及び蛋白吸着能について

Table-1 Preparation of C. M. C.



Cellulose (Rayon pulp)

- iso-propanol
- blend
- 20% NaOH
- blend
- CH₂ClCOOH
- blend
- incubate
- neutralize
- filter
- wash
- dry

C. M. C. - Na

(A) 繊維状 CMC の調製法

繊維状 CMC の調製材料として Rayon pulp の平均重合度 800~900 の cellulose と isopropanol, 20% NaOH 及び CH₂Cl COOH を用い、まづ cellulose を NaOH 処理してアルカリ繊維を作り、これに CH₂Cl COONa を作用させてエーテル化して CMC を調製する。

繊維状 CMC 調製の反応式、CMC の推定構造式及び調製操作は Table-1 に示す如くである。

CMC の調製は Table-1 に示した如く、原料として Rayon pulp を用い、この pulp Ag に alkali cellulose を作る際に cellulose の重合度を低下させずに、反応を均一に而も mild に進行させるために、isopropanol 5~10Ag を添加して充分攪拌し、これに 20%NaOH を 1.8~2Ag 加え pulp を充分アルカリ化して alkali cellulose を作る。以上の操作は総て室温で行い、次に出来た alkali cellulose に Bg の CH₂ClCOOH を 2Bg の iopropanol に溶解したものを加えて均一に攪拌した後、40°C の恒温器中で 12時間反応させてエーテル化する。エーテル化が終れば phenolphthalein を指示薬として HCl で中和し浣布で滌過して Cl⁻ の反応がなくなる迄水洗し、ethanol で脱水、真空乾燥すれば繊維状の CMC が得られる。このようにして得られる CMC の平均重合度は約600位である。尚 CH₂Cl COONa と Cellulose を構成する glucose 1分子単位当りのモル比を変えて反応させることによつて、エーテル化度の異なる種々の CMC を調製することが出来る。

(B) エーテル化度 D.S. (Degree of Substitution) の測定法

CMC はその D.S. によつて著しく性質を異にするのであり、CMC の D.S. と重合度と水に対する凝膠性との関係は小西⁽⁹⁾等により Fig-1 に示した如く詳しく報告されているが、図から明らかな如くカラムクロマトに使用出来る CMC は平均 D.S.=0.3 以下のものでなければならぬわけで、従つて著者等は 0.3 以下の D.S. を有する繊維状 CMC 4 種を調製して、エーテル化度、滴定曲線及び ionizing group の数を求めてみた。

cellulose はその両端にある glucose を除く他の総ての glucose 中に 3ヶの OH 基を有するので、エーテル化を適当にすることによつて、種々の D.S. をもつ CMC を調製することが出来る。CMC の glucose 1単位当り 1ヶの carboxy-methyl 基を有するものをエーテル化度 D.S.=1 と称するのであつて、灰化法滴定法及び比色法によつてその D.S. を測定する。著者等は下記の灰化法及び滴定曲線から D.S. を決定

した。

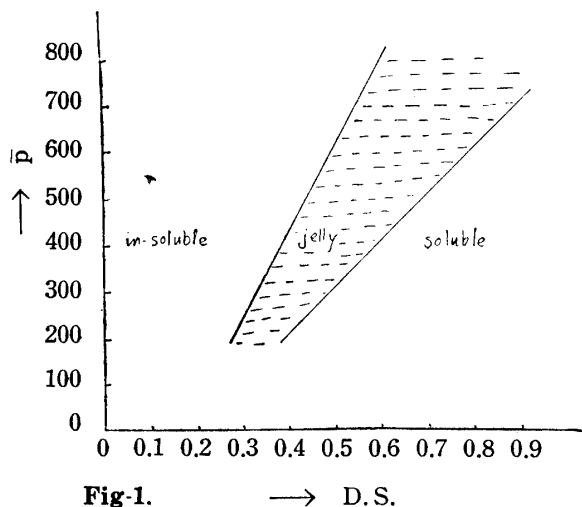


Fig-1. → D.S.

(1) 灰化法による D.S. の測定

まづ CMC の D.S. を測定する前に D.S. の補正值として、酸、アルカリ度を測定する。即ち CMC 1g を精秤し、これに水 200ml を加え、更に N/10 H₂SO₄ 5ml を正確に添加して10分間 boil する。冷却後 phenolphthalein を指示薬として N/10 KOH で滴定し、下式より酸度或はアルカリ度を測定する。

$$\text{酸度或はアルカリ度} = \frac{\text{N/10 H}_2\text{SO}_4 - \text{N/10 KOH}}{\text{試料(g)}} \quad \begin{matrix} (-) & (+) \end{matrix}$$

次に CMC 0.5~0.7g を精秤しルツボで灰化し、冷却後 500ml ビーカーにルツボを移して、水 250ml を加え、更に N/10 H₂SO₄ 35ml を正確に加えて30分 boil する。冷却後 phenolphthalein を指示薬として過剰の H₂SO₄ を N/10 KOH で滴定する。先に求めた酸度或はアルカリ度を補正值として次式から D.S. を求めることが出来る。

$$A = \frac{\text{N/10 H}_2\text{SO}_4 - \text{N/10 KOH}}{\text{試料(g)} - (\text{酸度或はアルカリ度})} \quad (1)$$

$$\text{D.S.} = \frac{162 \times A}{10000 - 80A} \quad (2)$$

(1)式に於けるAは 1g CMC の ionizing group (解離する anionic group) の m.mol. equivalent の10倍量の値である。

この方法により著者等の調製した4種の CMC の D.S. を測定した結果を示すと次の Table-2 の如くであつた。

(2) 滴定曲線による D.S. の測定

CMC 1g を精秤して水 100ml を加えて攪拌しながら、硝子電極 pH meter で N/10 HCl を滴下しな

Table-2. Determination of D. S. by means of ashing.

(a) Acidity or Alkalinity.

CH ₂ Cl COONa/glucose unit	N/10 KOH ml	Acidity or Alkalinity
0.1	5.10	-0.2166
0.2	5.04	-0.1519
0.4	5.04	-0.1519
0.6	4.90	-0.012

(b) Values of D. S.

CH ₂ Cl COONa/glucose unit	N/10 KOH ml	$\left(\frac{A}{10}\right)$ m. mol. eq/g	D. S.
0.1	31.40	0.297	0.049
0.2	29.76	0.553	0.094
0.4	23.38	0.867	0.151
0.6	22.48	1.138	0.203

Tabl-3 Determination of D. S. by means of titration curves.

CH ₂ Cl COONa/glucose unit	Ionizing group (m. mol. eq/g)	pK'	D. S.
0.1	0.30	4.7	0.050
0.2	0.55	4.8	0.093
0.4	0.86	4.5	0.150
0.6	1.14	4.4	0.202

から滴定曲線を求め、これから ionizing group の数を求め D. S. を算出する。その結果は Fig-2, Table-3 に示した如くで、灰化法によつて求めた D. S. と全く一致した。

(C) 繊維状 CMC column 蛋白吸着能

CMC はその ionizing group の数により即ち D. S. によつて蛋白吸着能が異なるので、さきに調製した4種の繊維状 CMC column について、卵白蛋白を用いて蛋白吸着能を調べた結果、Table-4, Fig-4 に示す如き結果を得た。

吸着に用いた蛋白は卵白を blend して、等量の acetate buffer (pH4.0, $\mu=0.025$) を加え、同じ buffer で 2°, 2日間透析した後濾過したものをを用い4種の CMC 各1g宛を pH4.0, $\mu=0.025$ acetate buffer で一夜 bufferize して 1×20cm column に充填して実験を行った。

Table-4, Fig-4 からわかる如く D. S. =0.1 以上

になると急激に蛋白の吸着能が増大する。D. S. =0.2 附近の CMC であれば、使用した CMC の約半量の蛋白を吸着出来て而もその吸着蛋白の溶出回収率は93%以上で、カラムクロマト用には優れたものであることが確認された。

尚繊維状 CMC はこれと同じ D. S. を有する CMC powder と比較して蛋白吸着能は変りなく、実験操作の簡単な点極めて優れている。

(II) 卵白 flavoprotein の繊維状 CMC による分別について

卵白中に存在する flavoprotein は Deutsch⁽⁴⁾ 及び Forsythe⁽⁵⁾ によつて flavin と conalbumin との結合物であることが報告されたが、著者⁽⁶⁾等はこれが誤りで flavin と ovomucoid との結合物であることを新に発見確認して、その電気泳動的な諸性質、濾紙泳動及びスペクトル等について詳細に報告したが、この

Table-4 Adsorption Capacity of C. M. C.

C. M. C.	Ionizing groups meq. /g.	pK'	Specific adsorption mg. protein/100mg. of C. M. C.
D. S. =0.049	0.297	4.7	8.7
D. S. =0.093	0.553	4.8	9.8
D. S. =0.151	0.867	4.5	45.2
D. S. =0.203	1.138	4.4	48.3
※ D. S. =0.126	—	—	27.3

* powdered CMC

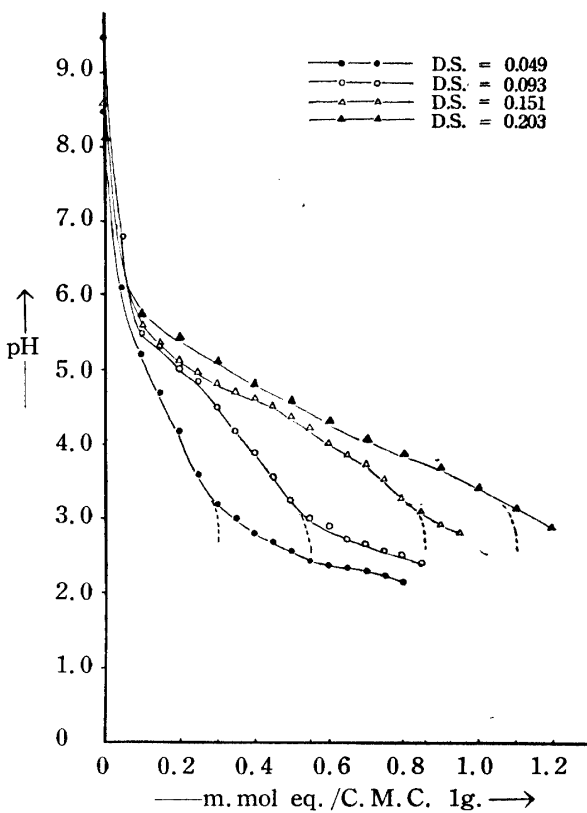


Fig-2 Titration Curves of C. M. C.

flavoprotein が前述の繊維状 CMC によつて如何なる成分に分別されるかを実験したのでその結果について報告する。

卵白 flavoprotein はさきに述べた著者⁽⁶⁾等の方法によつて調製した。即ち卵白からアルブミンを除去した後、硫酸分別を繰返し、硫酸 3.0M 飽和以上の区分を取り、更にこれを 70°C、5 分の熱処理を行つて残存するアルブミン、コンアルブミンを完全に除去して得られる。

この flavoprotein 約 150mg を pH4.0, $\mu=0.025$ の acetate buffer にとかし、あらかじめ同じ buffer で充分 bufferize した繊維状 CMC column (2×20cm) に吸着させ、同じ buffer で洗滌した後、等イオン強

度の各種 pH の buffer で溶出した。elution rate は 180ml/hr で fraction size 5ml の fraction collector を用いてカラムクロマトを行い 280m μ の吸収を測定して蛋白量を求めた。その結果は Fig-5 に示す如くであつた。

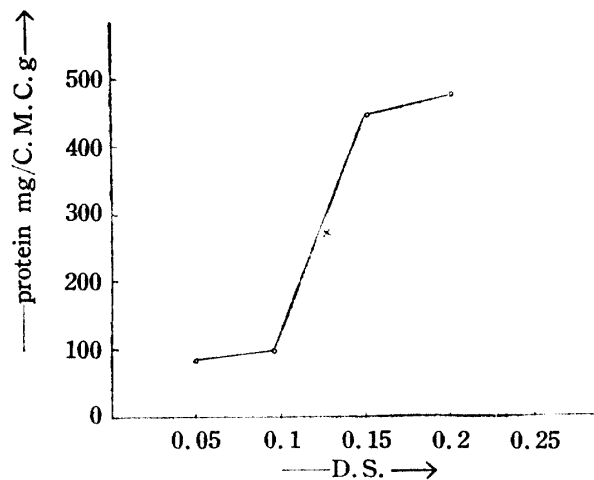


Fig-4 Adsorption capacity of various kinds of CMC.

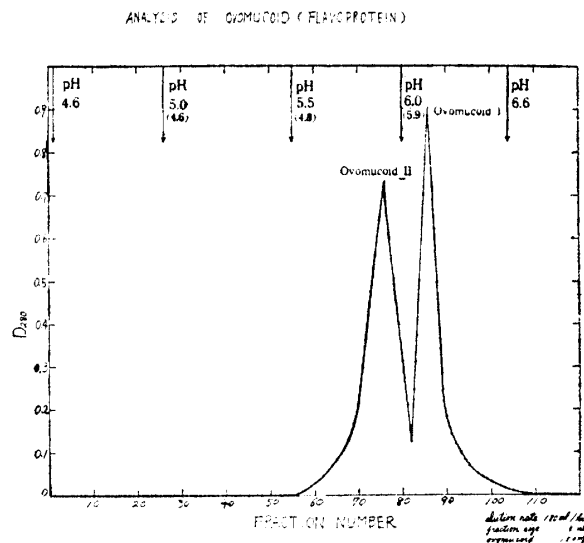


Fig-5

さきに報告した如く卵白 flavoprotein の flavin 部分は pH4.0 以下の酸性側では容易に蛋白部分である ovomucoid からはなれるので, column を pH4.0 の acetate buffer で充分洗滌することにより, flavin は殆ど蛋白からはなれて流出する. flavin を流出させた後 pH4.6, 5.0, 5.5, 6.0, 6.6 の各 buffer で蛋白を溶出すれば Fig-5 の如く ovomucoid I, II の 2 成分に分れることが確認出来た. その 2 成分の含有比率は ovomucoid I : ovomucoid II = 1 : 1.1 であり, 両成分と flavin との結合を調べたところ何れも flavin と結合することが認められたが, その結合度合に差があった. この結果から flavoprotein の apoprotein が何れの成分であるか判断し兼ねるのであるが, その結合度合の差から何れか一方が即ち ovomucoid I が flavoprotein の apoprotein ではなからうかとも推察出来る. 然し乍ら何れも flavin と結合する結合基を有する点を考慮すれば共に flavoprotein の apoprotein とも考えられる.

又従来 ovomucoid は trypsin inhibitor として知られ, その inhibitor が ovomucoid I, 及び II の何れに存在するのか, 又その本体は何か不明であるが, ovomucoid 中の flavin の結合基と何等かの関係があるのではなからうかとも trypsin inhibition に関する実験からも推察されるが, これらの諸問題は更に研究を要する点で目下追求中である.

要 約

- (1) 蛋白質のカラムクロマト用の新しい繊維状 CMC を特殊な方法で調製し, その D.S., 性質, 滴定曲線, 並びに蛋白吸着能を調べ, 極めて優秀な

cation exchanger であることを認めた.

- (2) 繊維状 CMC 1g 当りの平均蛋白吸着量は約 0.5g で, その吸着能力は驚異的で, 而も吸着蛋白の溶出回収率は 93% 以上で蛋白及び酵素の調製, 精製に極めて便利であることを実証した.
- (3) 卵白の新発見 flavoprotein を繊維状 CMC によって分別して, その蛋白部分が 2 成分からなることを確認し, この flavoprotein の apoprotein について考察した.

文 献

- (1) E. A. PETERSON and H. A. SOBER; J. Am. Chem. Soc. **78**, 751 (1956).
E. A. PETERSON and H. A. SOBER; *ibid.* **76**, 1711 (1954).
- (2) M. B. RHODES, P. R. AZARI and R. E. FEENEY; J. Biol. Chem. **230**, 339 (1957).
STIG E. G. ÅQVIST and C. B. ANFINSEN; *ibid.* **234**, 1112 (1959).
- (3) 小西 谷, 小田英二: 樹脂加工 1月号 10頁, (1958).
- (4) J. A. BAIN and H. F. DEUTSCH. J. Biol. Chem. **172**, 547 (1948).
- (5) R. H. FORSYTHE and J. F. FOSTER; *ibid.* **184**, 377, 385 (1950).
- (6) 金森正雄, 前田一郎: 西京大学学報, 農学, **9**, 83. (1957)
- (7) 金森正雄, 前田一郎: 西京大学学報, 農学, **10**, 1. (1958)
- (8) 金森正雄, 前田一郎: 日農化, **32**, 337. (1958).

Summary

1. The authors prepared a fibrous carboxymethyl cellulose (CMC) cation exchanger, the new adsorbent for column chromatography of proteins, by our own method, and investigated the degree of substitution (D.S.), physical properties, titration curves and protein adsorption capacity of the adsorbent.

It was shown that this fibrous CMC possess high capacity for the adsorption of protein, and was excellent cation exchanging adsorbent for column chromatography of proteins.

2. The average amount of protein adsorbed by this adsorbent was 0.5g of protein per 1g of

fibrous CMC. It is very high adsorption capacity, moreover recovery of adsorbed protein on the column in effluent solution exceeded 93%, and this adsorbent will be very useful in preparation and purification of proteins or enzymes.

3. By the chromatographic resolution of newly found flavoprotein of egg white on the fibrous CMC column, it was confirmed that protein moiety of this flavoprotein consist of two components. The apo-proteins of this flavoprotein were discussed.