

## 卵蛋白に関する研究 IV

## 卵白新フラビン蛋白について

金森正雄・河端 信

M. KANAMORI and M. KAWABATA: Studies on egg protein (IV)  
New flavoprotein of egg white.

**摘要** 卵白から新しい Flavoprotein を約 0.8% の収量で得、その flavin 部分は free riboflavin であることを認めた。

卵白 flavoprotein は ovomucoid fraction 中に集中して存在することを確認した。ovomucoid fraction は pulp 状 CMC column chromatography 及び electrophoresis によつて I~V の 5 成分から成ることを確認した。

M. B. Rhodes らの plate test を改良した筆者らの独特の方法で ovomucoid の antitryptic activity を測定して、ovomucoid 5 成分のうち antitryptic activity は component I, II, III, の 3 成分蛋白中にあ

り、component III がその主要部分であることがわかると同時に IV, V component には antitryptic activity が全然なかつた。

ovomucoid の antitryptic activity は熱に対して可成り安定で 90° 20 分の熱処理は活性に全然影響を与えず、100° 5 分の熱処理によつてその活性は 94 に低下した。

ovomucoid 5 成分のうち IV, V, component と free riboflavin とが結合したものが卵白中の新しい Flavoprotein であることがわかり、これに対して筆者らは Flavomucoid K<sub>1</sub> 及び K<sub>2</sub> と命名した。

## 結 言

卵白中に free riboflavin, FMN, FAD が常成分として存在することが知られており、卵白中の flavoprotein は ironbinding protein である conalbumin と free riboflavin とが結合したものであると、J. A. Bain & H. F. Deutsch<sup>1)</sup> によつて 1948 年報告され、其後も同じ見解が R. H. Forsythe & J. F. Foster<sup>2)</sup> 及び H. R. Mahler & Dorothee G. Elove<sup>3)</sup> らによつて発表されているが、筆者<sup>4)</sup> らは 1957 年 conalbumin の研究から卵白中に存在する free riboflavin が conalbumin 及び ovalbumin とは結合せず ovomucoid 様蛋白と特異的に結合して、未発見の新しい flavoprotein を形成し卵白の常成分蛋白として存在することを発見報告した。

一方 ovomucoid は、電気泳動的に古くから L. G. Longworth et al<sup>5)</sup>, H. Lineweaver & C. W. Murray<sup>6)</sup>, H. F. Deutsch et al<sup>7)</sup>, M. Jutisz et al<sup>8)</sup>, M. Bier et al<sup>9)</sup> などにより詳細に研究されており、ovomucoid は pH 4~5  $I/2=0.01$  の条件下で電気泳動を行えば 5 成分蛋白に分れ、その中の 3 成分蛋白が主

要構成成分蛋白であることが報告され、その 5 成分蛋白の等電点はそれぞれ pH 4.41, 4.28, 4.17, 4.01, 3.83 であることが知られている。

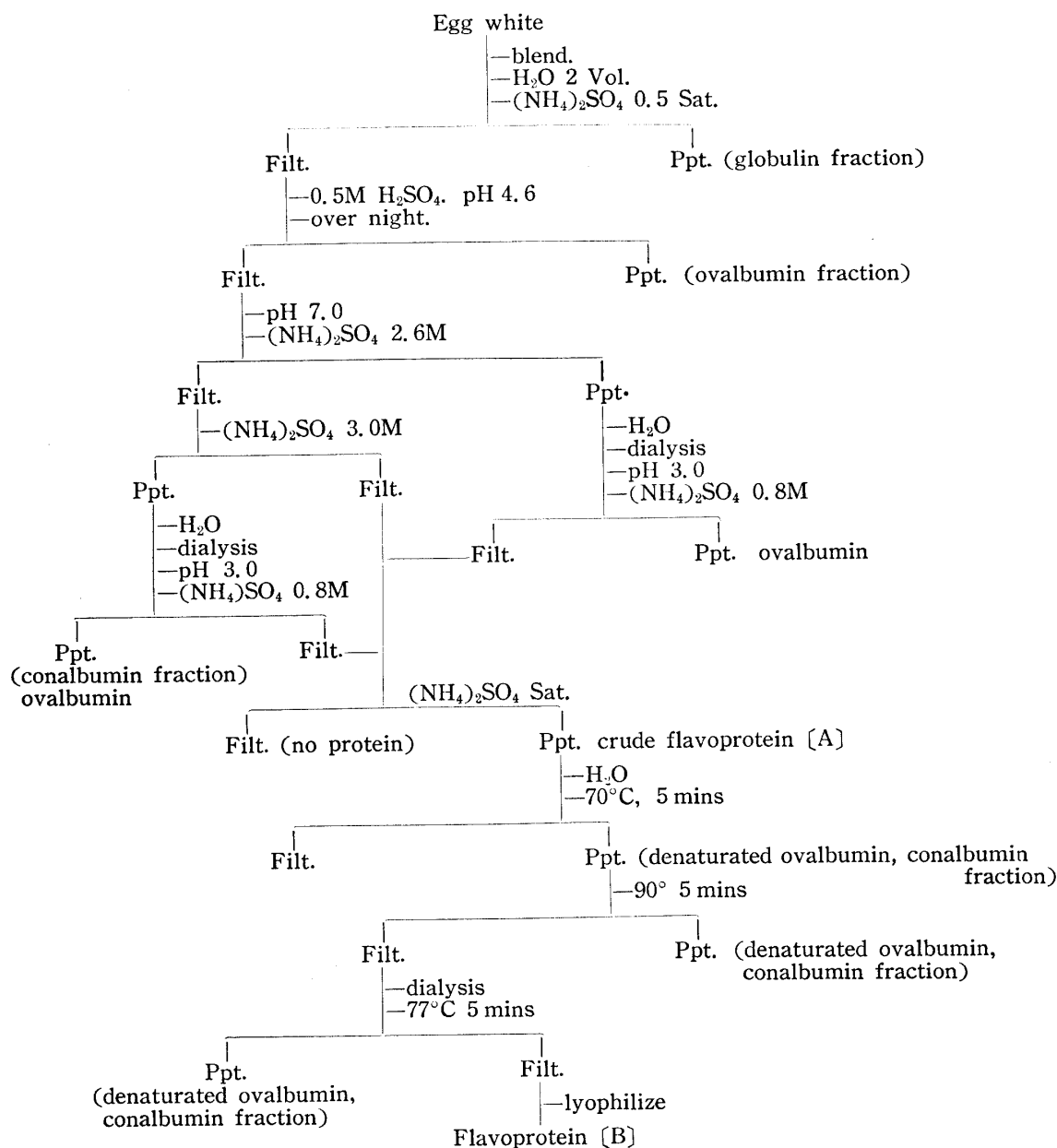
筆者らは ovomucoid のこの 5 成分蛋白が、何れも free riboflavin と結合する能力を有するのか、或はそのうちの特定成分蛋白のみが free riboflavin と結合して flavoprotein を形成しているのかを究明し、併せて ovomucoid のもつ antitryptic activity と新しい flavoprotein との関係を詳細に研究したので、以下にその結果を報告する。

## 実験結果並びに考察

## 〔I〕卵白 Flavoprotein の分離

卵白 ovomucoid の purification には Robert C. Warner & I. Weber, L. Hesselvik<sup>11)</sup>, L. G. Longworth et al<sup>5)</sup>, H. Lineweaver et al<sup>6)</sup>, H. F. Deutsch<sup>7)</sup> らの各種の方法がある。このうち酸性側で操作して、ovomucoid を得る方法は、何れの方法の場合にも単離操作中に riboflavin が ovomucoid から離脱するため flavoprotein が ovomucoid fraction に得られないので、加熱処理を併用する塩析分別法に

Table 1.



よつて精製 ovomucoid を得る Robert C. Warner & I. Weber 法を改良した Table 1 に表示した如き筆者らの独特な方法で flavoprotein を分離した。

(II) 卵白 Flavoprotein の繊維状 C. M. C. によるカラムクロマトグラフィ及び電気泳動分析

さきに報告した筆者<sup>12)</sup>らの研究室で創製した特殊繊維状 C. M. C. を使用して, Table 1 に表示した Flavoprotein [A] fraction 及び [B] fraction の column chromatography を次の要領で行った。

即ち, エーテル化度 D. S. = 0.2 の繊維状 C. M. C. 5g を pH 4.0  $\Gamma/2=0.025$  acetate buffer で 2 日間十分 bufferize した後 column (2×20cm) に均一になるように詰め, 試料 500mg を同じ buffer で十分透析した後これを column に吸着させ, 次に同じ組成

の buffer で十分洗滌する。次に pH 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.3 の  $\Gamma/2=0.025$  acetate buffer 及び pH 8.0  $\Gamma/2=0.025$  phosphate buffer で 3ml/min の溶出速度で溶出し, 280 m $\mu$  の optical density を測定して得た column chromatography は Fig. 1, Fig. 2 に示した如くである。

Fig. 1, Fig. 2 からわかる如く Flavoprotein [A] fraction 及び [B] fraction は共に I~VI の 6 成分蛋白から組成されており, 加熱処理操作によつて ovalbumin, conalbumin fraction である VI fraction は変性蛋白として凝固沈澱し除去され, 次第に flavoprotein が純化されてゆくことが認められた。

Flavoprotein [B] fraction を更に加熱処理数回を繰返し, 繊維状 C. M. C. による再クロマトを繰返す

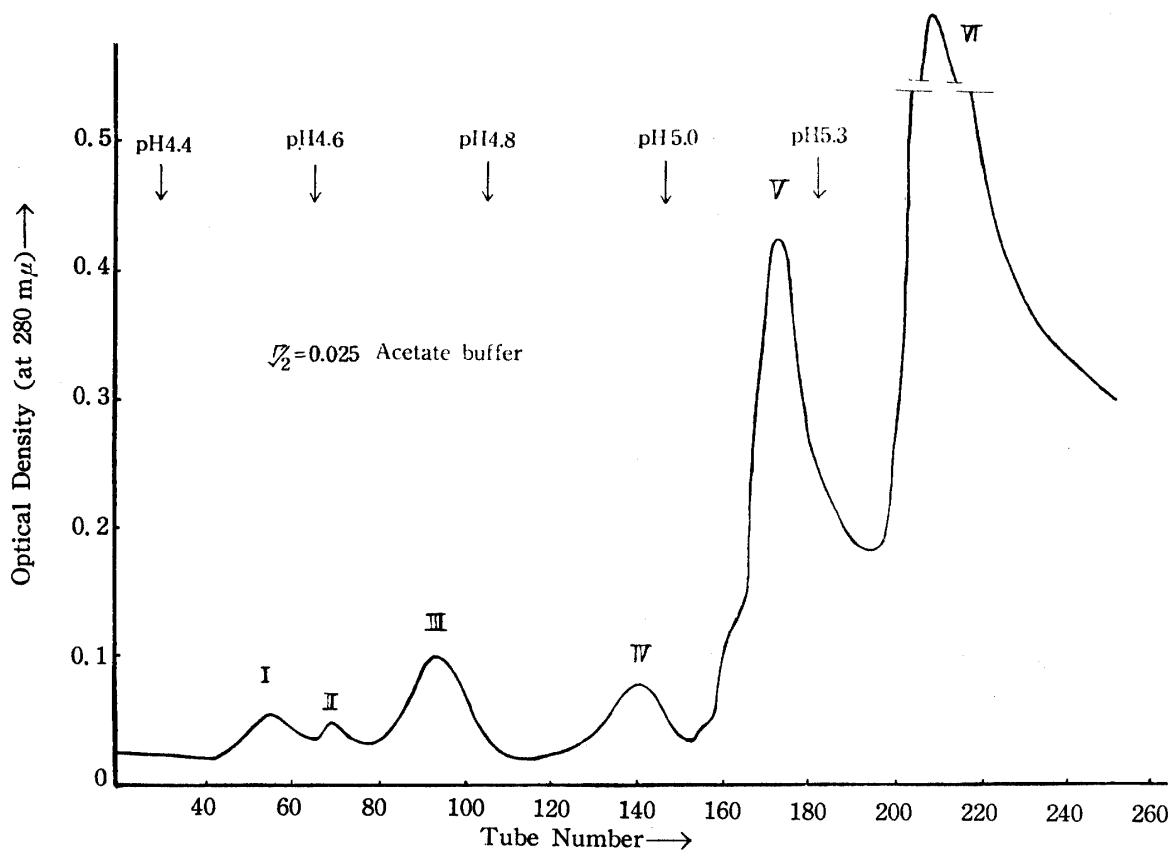


Fig. 1 CMC Column Chromatogram of Flavoprotein [A]

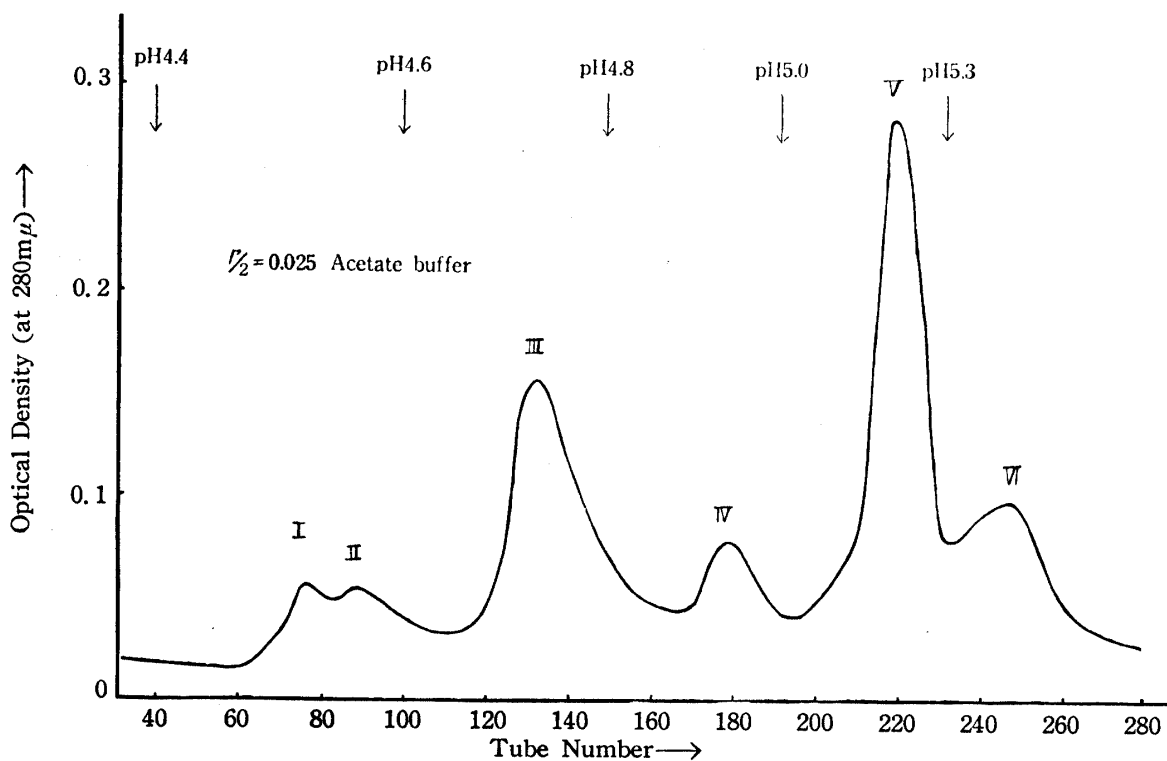


Fig. 2 CMC Column Chromatogram of Flavoprotein [B]

ことにより I~V の 5 成分蛋白から成る flavoprotein の apoprotein を純粋に分離することが出来た。即ち flavoprotein の apoprotein と一応考えられる蛋白は

pH 4.4, 4.6, 4.8, 5.0  $\Gamma/2=0.025$  acetate buffer でそれぞれ溶出される I, II, III, IV, V 成分から成ることがわかり、その物理化学的性質から ovomucoid

であることが確認された。

次にこの I~V 成分である flavoprotein の apoprotein を  $\Gamma/2=0.01$ , pH 4.6 acetate buffer,  $\Gamma/2=0.01$ , pH 4.6 acetate buffer,  $\Gamma/2=0.1$ , pH 8.0 phosphate buffer で  $10^{\circ}\text{C}$ , 電位勾配 3~5 Volt/cm で電気泳動を行ったところ,  $\Gamma/2=0.01$ , pH 4.6 acetate buffer で泳動した場合 5 components から成ることが認められ, 繊維状 C.M.C. Column chromatography の結果と全く一致した結果が得られた。尚  $\Gamma/2=0.1$  pH 8.0 phosphate buffer で泳動した場合には 3 components から組成されている結果がみられた。その理由を考察すれば, 各成分が非常に近似的な等電点を有するため, イオン強度を高め然も中性付近で泳動を行えば互に分離しないことが推定される。

尚, 筆者らが行ったさきの paper chromatography 及び spectrophotometry の研究結果から, 新しい Flavoprotein の yellow color は free riboflavin であること及び flavoprotein の apoprotein が ovomucoid 様蛋白質と推定したが, 上記の実験結果から考察して新しい Flavoprotein の apoprotein は ovomucoid 成分中に存在することが認められるわけで, この ovomucoid の各成分 I~V component がそれぞれ個々に riboflavin と特異的に結合するのか, 或はその特定成分蛋白のみが結合して flavoprotein を形成しているのか不明であるので, この ovomucoid 各成分蛋白と riboflavin との結合能を調べた。

### (III) Ovomuroid 組成蛋白と free riboflavin との結合能

flavoprotein の apoprotein と推定される ovomucoid の各組成蛋白が free riboflavin と結合するか否かを free riboflavin 滴下による蛍光の出現及び free riboflavin 溶液中に ovomucoid の各成分蛋白を滴下することによる蛍光の消失を調べる方法, 並びに各成分蛋白に十分量の free riboflavin を pH 8.0 phosphate buffer の存在下で結合させた後, 流水透析を 2 日間行つてその各々について結合 riboflavin 量を定量する方法によつて, ovomucoid 各成分蛋白と free riboflavin との結合能及び結合比率を調べたところ, ovomucoid 各成分蛋白の中 I. II. III. 各成分蛋白は riboflavin との結合能は全然ないが, IV 及び V 成分蛋白は ovomucoid の平均分子量を 27,000 とし, それぞれ略 1 mol 対 1 mol の割合で結合していることがわかつた。

従つて, flavoprotein の apoprotein と考えられた ovomucoid 組成蛋白 I, II, III, IV, V components のうち IV 及び V component のみが flavoprotein の apoprotein であることが確認されたので, この IV

及び V component と riboflavin との結合した flavoprotein に対して筆者らは flavomuroid  $K_1$  及び  $K_2$  と命名した。

尚この Flavomuroid  $K_1$  及び  $K_2$  の apoprotein は free riboflavin 以外に FMN, FAD とも結合する性質をもっていることを認めた。

卵白中には total riboflavin<sup>13)</sup> として 4.49  $\gamma/g$  の riboflavin を含有し, そのうち FAD は約 54% の 2.44  $\gamma/g$ , FMN は約 3% の 0.14  $\gamma/g$ , free riboflavin が約 43% の 1.91  $\gamma/g$  含まれており, この riboflavin の分布から卵白中では flavoprotein の apoprotein は free riboflavin 以外の FMN 或は FAD とも結合して Flavoprotein を形成していることが当然推定される訳で, 即ち卵白中に存在する flavoprotein はその配合群として free riboflavin, FMN 及び FAD が考えられるわけであるが, 筆者らの方法で単離して得た flavomuroid  $K_1$  及び  $K_2$  は何れも free riboflavin と結合した Flavoprotein であつた。

### (IV) ovomucoid 各組成蛋白の antitryptic activity と Flavomuroid $K_1$ 及び $K_2$ との関係について

1953年 Bier, Terminells, Duke, Gibbs & Nord<sup>9)</sup> らは ovomucoid を electroconvection method によつて等電点 3.83, 4.01, 4.17, 4.28, 4.41 でそれぞれ分別して 5 components を得, その各々について antitryptic activity を調べたところ, 試料蛋白の活力の 7~8 倍の活力値があつたことを報告発表した。尚, 筆者らは ovomucoid 区分を繊維状 C.M.C. column で分割して得た 5 components について, それらの有する antitryptic activity を測定比較し, 併せて Flavomuroid  $K_1$   $K_2$  と antitryptic activity との関係を究明するため以下に記した方法によつて実験を行つた。

#### Antitryptic activity の測定法

ovomuroid の有する特異的な性質から antitryptic activity 測定法として従来から用いられている Anson<sup>14)</sup> らの  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  を除蛋白剤として使用する方法は使用し難いので, M. B. Rhodes, R. M. Hill & R. E. Feeney<sup>15)</sup> らの spot plate test を改良した次の方法で測定した。

試薬として (i) trypsin (Merck 社製, 蛋白質 5.7%), (ii) 基質には p-toluene sulfonyl arginine methyl ester, (iii) buffer には 0.015M tris (hydroxymethyl) amino methane pH 8.0, (iv) 指示薬として 0.002% phenol red を用いた。

測定方法は試験管 (1×5 cm) に 0.2 ml substrate buffer indicator mixture (0.02M p-toluenesulfonyl

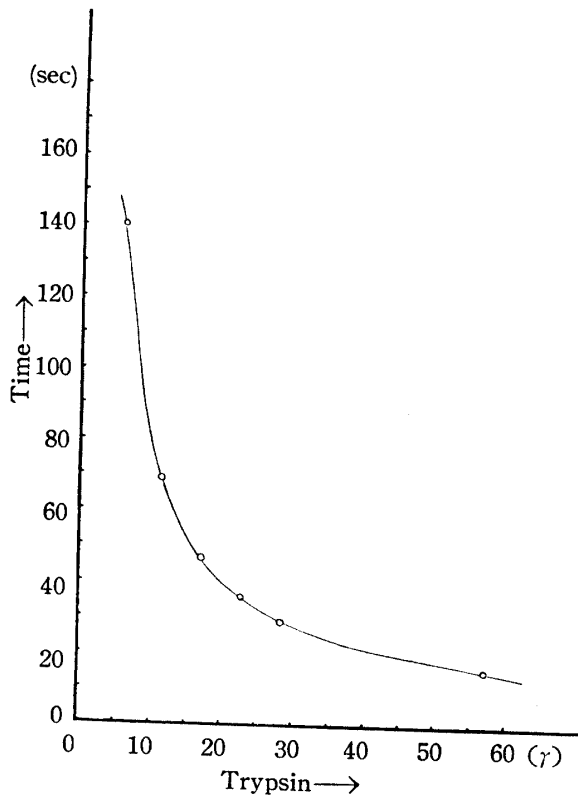


Fig. 3 Trypsin Activity Assay.

Trypsin 0.1 ml.  
 0.02M p-toluene sulfonyl arginine methyl ester } 0.2 ml.  
 0.015M tris buffer pH 8.0  
 0.002% phenol red  
 temp. 37°C

arginine methyl ester, 0.015M tris buffer pH 8.0, 0.002% phenol red) を加え, 更に 0.01~0.1 ml の trypsin inhibitor (20~200γ) を添加して 37°C で温度平衡に達せしめるため 2分放置後 trypsin 0.02 ml を添加すると同時に計時し, 指示薬の赤色が黄色に変色するまでの時間を測定する。

本法を用いて添加 trypsin 量を種々に変えて変色時間を計時した結果は Fig. 3 の如くであった。

次に卵白を加熱処理することなく硫酸分割して得た crude flavoprotein a (硫酸 2.6M飽和~完沈区分) をそれぞれ硫酸 2.6M飽和~3.0M飽和区分である b fraction 及び硫酸 3.0M飽和~完沈区分の c fraction に分け, c fraction を更に 70°C 13分, 70°C 20分, 90°C 10分の熱処理して凝固蛋白を除去して得られる区分をそれぞれ d, e, f fraction とし, この a~f の各 fraction について上述の測定法でその antitryptic activity を調べたところ Fig. 4 の如き結果が得られた。

Fig. 4 の結果からわかる如く, 硫酸 2.6M飽和~3.0M飽和区分である b fraction は主として conalbumin と ovalbumin とを含んでいるのであるが, こ

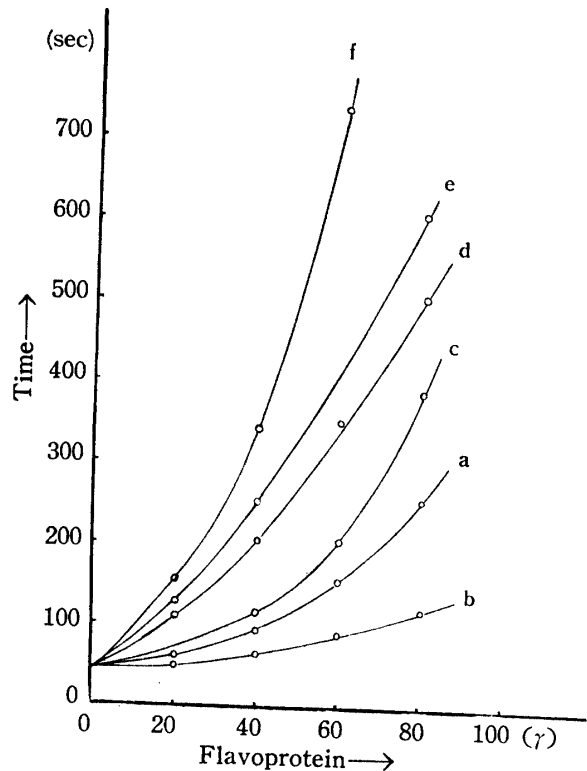


Fig. 4 Antitryptic Activity of Flavoprotein Fraction.

a : (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.6 mol~fraction,  
 b : (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.6 mol~3.0 mol fraction,  
 c : (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.0 mol~fraction,  
 d : b fraction 70°C 13 mins,  
 e : b fraction 70°C 20 mins,  
 f : b fraction 90°C 10 mins,  
 trypsin 17.1 γ, temp. 37°C

の fraction には殆んど antitryptic activity は認められない。即ち, 混在する僅少の ovomucoid のため僅かな trypsin inhibitor をもっている。c fraction は大部分 ovomucoid であり, 僅かな conalbumin, ovalbumin を含んでいるが, 可成り強力な antitryptic activity を有することがみとめられる。c fraction を更に熱処理して得た d, e, f 各 fraction は熱処理により, 混在する conalbumin, ovalbumin が変性沈澱除去されるため antitryptic activity は非常に高くなることがわかった。尚処理温度が高くなるほど activity は高くなる結果が得られたが, 100° 5分の加熱処理をすればその活力は 90°C 10分の加熱処理時の活力の $\frac{1}{4}$ に低下することが認められた。

従つて antitryptic activity の損失なしに ovomucoid 以外の不純蛋白除去のための加熱温度の限界は 90°C 20分以下である。又上記何れの加熱処理の条件下でも riboflavin は蛋白と結合して Flavoprotein として存在し, 確認され, flavoprotein の純化のためには antitryptic activity の低下を起さぬ程度の加熱処理が極めて有効であることがわかった。尚 90°C 20分以下の加熱処理では ovomucoid は変性しないことが

その活力から一応推定される。

次に加熱処理による antitryptic activity の上昇を考察してみると、勿論加熱による ovomucoid 以外の不純蛋白の凝固にもよるが、今1つの理由としては、ovomucoid の trypsin inhibitor の本体及び antitryptic activity を示す機作が判明しない現在では軽々しく論ずることは出来ないけれども、仮りに ovomucoid 自身の構造とか、末端アミノ基とか、或は構成特定 peptide とかが antitryptic activity と密接な関係があるとするならば、これら trypsin inhibitor と考えられる構造なり、fraction が加熱処理による ovomucoid の変性のため出現するのではなからうかとも推定されるわけであるが、これは更に詳しく検討研究を要する問題である。

更に前記 Table 1 に表示した Flavoprotein [B] fraction を繊維状 C.M.C. で column chromatography して得た各区分、即ち Fig. 2 の I~VI 各 component について antitryptic activity を測定したところ Fig. 5 に示す如き結果が得られた。

Fig. 5 の結果から明らか如く pH 4.6 で溶出される III fraction が最も antitryptic activity が強く、次いで pH 4.4 で溶出される I. II. fraction 及び pH 4.8 溶出される IV fraction の順に活力は低下し、pH 5.0 で溶出される V fraction 及び pH 5.3 で溶出される VI fraction (加熱処理操作によつて凝固除去される区分で主として ovalbumin, conalbumin を含む fraction である) は殆んど antitryptic activity

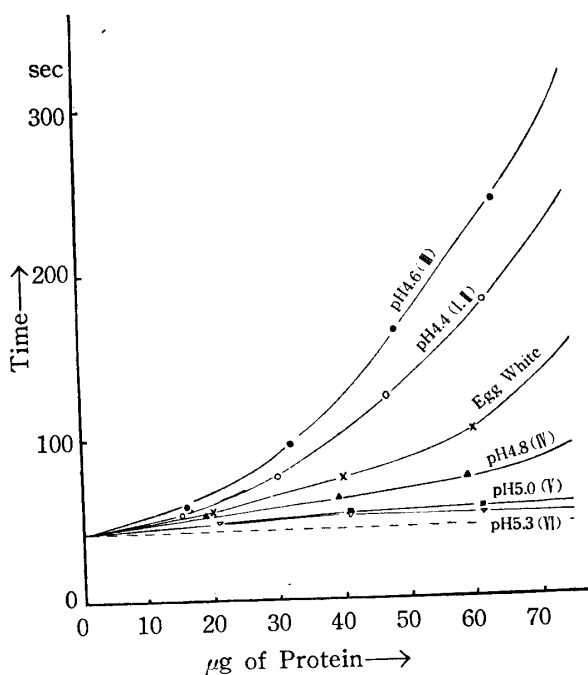


Fig. 5 Antitryptic Activity of Each Fraction (unheated)

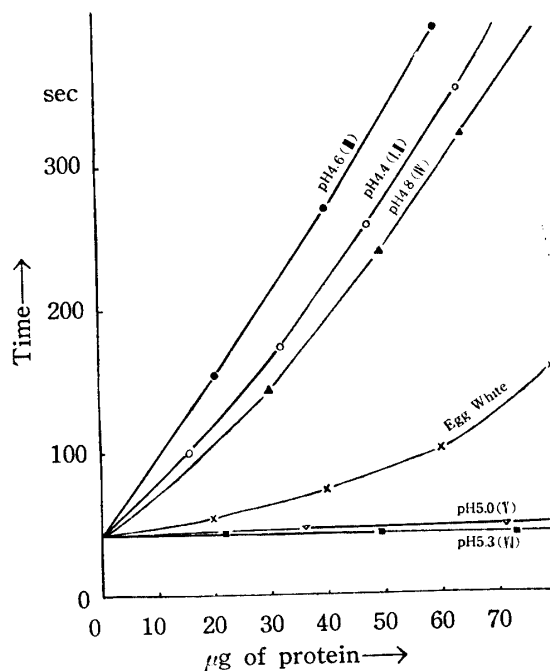


Fig. 6 Antitryptic Activity of Each Fraction (heated)

は示さなかつた。

次に Flavoprotein [B] fraction を加熱処理して得られた Flavoprotein [A] fraction を繊維状 C.M.C. column chromatography して得た Fig. 3 に示した I~VI 各 component について antitryptic activity を測定した結果は Fig. 6 に示した通りであり、Fig. 5 と同じように pH 4.4, 4.6, 4.8 でそれぞれ溶出される I, II, III component のみ活力を有していた。

更に Fig. 3 で得られた V component を再クロマトすると Fig. 7 の如く IV, V, VI 各 component に分別され、大部分の V component と僅かな IV 及

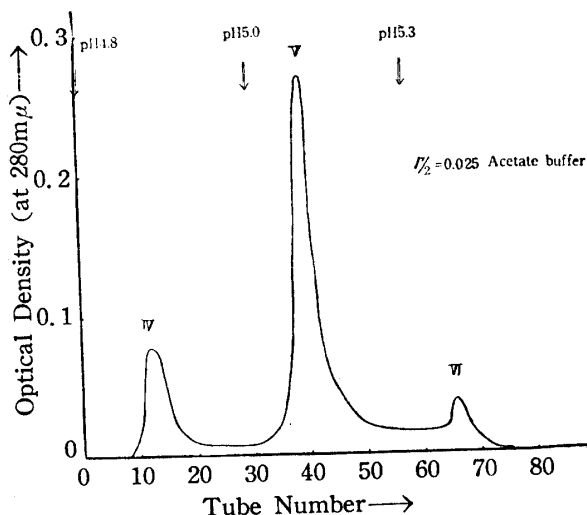


Fig. 7 CMC Recolumn chromatogram of Component V.

び VI component を含むのであるが、このうち VI component は加熱処理によつて凝固する成分であり、antitryptic activity は全然なかつた。もし Fig. 5 及び Fig. 6 に示した如く、IV component に可成り antitryptic activity があるものとすれば、Fig. 7 で得られた IV component にも antitryptic activity がある筈であるが、活力を測定してみれば皆無であつた。このことから pH 4.8 で溶出される IV component が活力を有しているのは混在するところの pH 4.6 で溶出される III component のため、事実 Fig. 3 で得られた IV component を再クロマトすれば可成りの III component を含んでいた。以上の諸点から IV component には一応 antitryptic activity はないものと断定することが出来る。

以上の実験結果から、Flavoprotein (ovomucoid fraction を総称して) 各 fraction 中 antitryptic activity に関係のある成分は I, II 及び III 成分蛋白で、そのうち III 成分蛋白が antitryptic activity 作用の主要部分であることが確認され、又筆者らが新しく発見命名した Flavomucoid K<sub>1</sub> 及び K<sub>2</sub> は ovomucoid のもつ antitryptic activity とは無関係であることを認めた。即ち ovomucoid 成分のうち I, II 及び III 成分蛋白が trypsin inhibitor で IV 及び V 成分が Flavomucoid K<sub>1</sub> 及び K<sub>2</sub> として卵白中の Flavoprotein を形成していることがわかつた。

#### 参 考 文 献

- 1) J. A. BAIN and H. F. DEUTSCH (1948) : J. Biol. Chem. **172**, 547.
- 2) R. H. FORSYTHE and J. F. FOSTER (1950) : *ibid.*,

- 184, 377, 385.
- 3) H. R. MAHLER and D. G. ELOVE (1954) : *ibid.*, **210**, 165.
- 4) 金森正雄・前田一郎 (1957) : 西京大学報告, **9**, 83.  
金森正雄・前田一郎 (1958) : 農化, **33**, 337.  
金森正雄 (1958) : 西京大学報告, **10**, 1.
- 5) L. G. LOGSWORTH et al. (1940) : J. Am. Chem. Soc. **62**, 2580.
- 6) H. LINEWEAVER and C. W. MURRAY (1947) : J. Biol. Chem. **171**, 565.
- 7) E. FREDERICQ and H. F. DEUTSCH (1949) : *ibid.*, **181**, 499.  
E. FREDERICQ and H. F. DEUTSCH (1949) : Federation Proc. **8**, 199.
- 8) M. JUTISZ et al. (1956) : Biochem. et Biophys. Acta. **23**, 173.
- 9) M. BIER et al. (1953) : Arch. Biochem. Biophys. **47**, 465.
- 10) R. C. WARNER and I. WEBER (1951) : J. Biol. Chem. **191**, 173.
- 11) L. HESSELVIK (1938) : Z. Physiol. Chem. **254**, 194.
- 12) 金森正雄・河端 信 (1959) : 京都府立大学報告, **11**, 182.
- 13) 満田久輝・河合文雄・三好歳雄 (1958) : 農化, **32**, 847.
- 14) M. L. ANSON (1938) : J. Gen. Physiol. **22**, 79.
- 15) M. B. RHODES et al. (1957) : Anal. Chem. **29**, 376.

#### Summary

1 The new flavoproteins have been obtained from egg white and yield of this protein was 0.8% of whole egg white protein and it recognized that flavin moiety of this flavoprotein is free riboflavin.

2 It is confirmed by its physico-chemical properties, that the new flavoprotein is concentrated in the ovomucoid fraction.

3 By means of fibrous C. M. C. column chromatography, and electrophoresis, it has been confirmed that the ovomucoid fraction is consist of five components.

4 Antitryptic activities of ovomucoid fraction have been determined by the authors method which modified the spot plate test of M. B. Rhodes et al, it is found that antitryptic activities have

been existed in the component I, II and III, and component III protein is main component of antitryptic activity of ovomucoid while component IV and V have no activity.

5 The antitryptic activity of ovomucoid is not effected by heat treatment at 90°C for 20 minutes but by the treatment at 100°C for 5 minutes, its activity has been reduced to 3/4 of original activity.

6 The authors recognized that the newly found flavoprotein of egg white is composed of IV and V component of ovomucoid and free riboflavin. The authors named these two kinds of new flavoproteins as flavomucoid K<sub>1</sub> and K<sub>2</sub> respectively.