

精製ニワトリ・オボムコイドの焦点電気泳動

伊吹文男・金森正雄

FUMIO IBUKI and MASAO KANAMORI

Isoelectrofocusing of purified chicken ovomucoid

要旨：鶏卵白から精製されたオボムコイドを焦点電気泳動法を用いて分画した。オボムコイドは等電点3.52, 3.85, 4.00, 4.15, 4.35および4.50の6成分に分画されたが, 脱フラビン・オボムコイドではpH 3.52のピークは認められなかった。オボムコイドの生物活性の一つであるトリプシン阻害活性はpI 3.52, 3.85, 4.00および4.15の各画分に認められたが, pI 4.35および4.50のピークには認められなかった。また逆に, フラビン結合能はpI 4.15, 4.35および4.50の画分に存在し, それ以外のピークには認められなかった。なお本実験に用いた焦点電気泳動の装置は自作したものであるが, 再現性のある良好な結果が得られた。

I 緒 論

ニワトリの卵白中のオボムコイドは, 古く Mörner¹⁾によって, その存在が報告されて以来, 数多くの調製法やその性質の研究がなされているたんぱく質^{2~4)}である。オボムコイドが熱や有機溶剤に対して比較的安定であるため, その精製には, かなりたんぱく質にとって激しい操作を含むものが多い。金森らは, これらの操作を含まない温和な操作のみで, オボムコイドを調製し, 超遠心的に均一な標品を得ている。上記の各種の調製法によって精製されたオボムコイドも, 何れも超遠心的には, ほぼ均一なたんぱく質⁵⁾であることが知られている。しかしながら, Fredericq²⁾らが電気泳動的にオボムコイドは不均一性を示すことを報告して以来, 近年も Beeley⁶⁾らによって, SE-セファデックスによるオボムコイドの細分画が検討されている。金森らも超遠心的に均一なオボムコイドが CM-セルロースクロマトグラフィーにより4成分に分別されることを報告している。これらの不均一性は主としてオボムコイドたんぱく質中に含まれている糖鎖, 特にシアル酸に由

来するものと考えられ, 微不均一性 (microheterogeneity) と呼ばれる性質のものである。⁸⁾

Vesterberg⁹⁾らによって1966年初めて報告された, たんぱく質の焦点電気泳動法 (isoelectrofocusing) は, たんぱく質がその等電点において易動度が0になることを利用した非常にユニークな方法であり, 単にたんぱく質の等電点の測定のみならず, 広く分別, 精製にも用いられている。この方法の難点は, たんぱく質は一般に等電点において溶解性が低くなり, 沈殿しやすいことであるが, オボムコイドは等電点においても沈殿性を示さず, 本法を利用して分画するのに, 非常に好都合なたんぱく質と考えられる。本論は金森らの方法³⁾により精製したオボムコイドの焦点電気泳動法による細分画の結果を示したものである。また筆者らは, Vesterberg⁹⁾らが報告したのとほぼ同じスケールの焦点電気泳動装置を自作したので, 併せ報告する。

II 試料と実験方法

- 1 オボムコイドおよび脱フラビンオボムコイドの調製

京都府立大学農学部, 栄養・食品化学研究室

Laboratory of Nutritional and Food Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan

昭和52年7月29日受理

オボムコイドは市販鶏卵より金森⁵⁾の方法に従って精製した。脱フラビンも、ほぼ同じ方法に従って調製されたが、pHによる分画は行わず、pH 5.0の酢酸バッファーを用いて、全画分を溶出したのち、透析、凍結乾燥した。

2 トリプシンインヒビター活性の測定

トリプシンは牛豚臓より抽出した2回再結晶標品(NBC)を、基質は α -N-benzoyl-D,L-arginine-p-nitroanilide (BApNA)を用い、既に報告した方法に従って、インヒビター活性を測定した。なお本論におけるインヒビター活性のユニットは、20 μ gのトリプシンを100%阻害する量(50%阻害点より求める)をもって1とした。焦点電気泳動後の各画分は、ショ糖, ampholineなどを含むが、インヒビター活性の測定には、影響しないので、特に透析をする必要はない。

3 フラビン結合能の測定

結合型フラビンが蛍光を発しないのに対し、遊離したフラビンは蛍光を発することを利用して行った。焦点電気泳動後の画分は ampholine を含み、蛍光を有するので、少なくとも24時間以上、攪拌透析する必要がある。

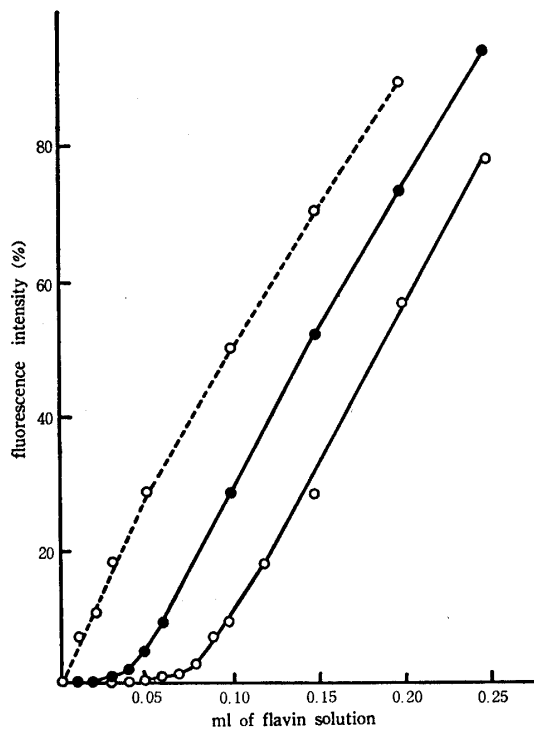


Fig. 1. Measurement of flavin binding activity. ...○... without deflavo-ovomuroid; —●— and —○— with deflavo-ovomuroid from the different fractions, respectively.

ある。透析后0.25mlをとり、1.75mlの0.1Mリン酸バッファー、pH7.2を加えて2.0mlとしたものに、 10^{-5} Mのフラビン溶液を0.01~0.30mlを順次加えていき、その時の蛍光を八木式微量蛍光光度計を用いて測定した。 10^{-6} Mフラビン溶液をT=100%に調節して実験を行った。Fig. 1は測定の実際を示したもので、脱フラビンオボムコイドを含まない試料の蛍光がフラビンの添加と同時に増加するのに対し、脱フラビンオボムコイドを含む試料は、フラビンがたんぱく質に結合している間は、蛍光の増加が認められず、遊離の状態になってから、直線的に蛍光の増加を示している。この直線とX軸の交点よりたんぱく質に結合したフラビン量を求めた。

4 焦点電気泳動

Fig. 2に自作した装置の概要図を示す。カラムAは、

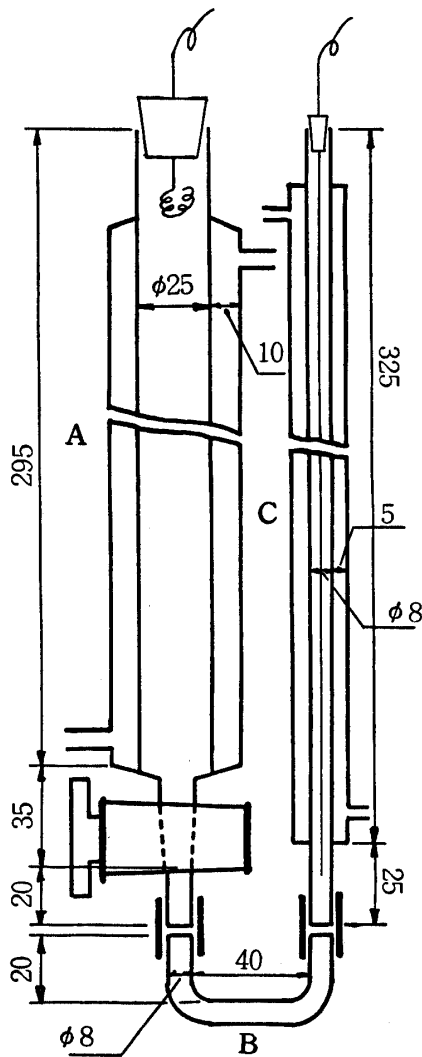


Fig. 2. The apparatus for the isoelectrofocusing. All measures are in millimeters.

本実験においては陰極と ampholine を含み、カラム C は、陽極、B はそれらを結合するU字管である。極は白金線を用いた。作成上、特に注意すべき点は、コックの部分で穴は少くとも 8 mm あることが望ましい。またゴム管で連結するので、B のU字管や、A、C カラムの末端部は、ふくらみをつけない方がよい。電極挿入部のゴム栓は、固く押込まず、単に載せておく程度でよい。A カラムの内径が25mm と太いので、たとえ低温室で泳動を行なうとしても、冷却用の外とう管のあるのが望ましい。

本泳動装置を用いるに際して必要な試料は次の通りである。(a)ampholine conc. solution; 8% の ampholine (LKB 製、通常、40%濃度で販売されているので、使用時に必要量のみ 5 倍に希釈すること) 8.5ml を 28g のショ糖を溶かした液に加え、全量を 60ml とする。(b)ampholine light solution; 8% の ampholine 2.8ml に水を加えて全量を 60ml とする。(c)陽極液; 24g のショ糖を 28ml の水にとかし、0.4ml の濃リン酸を加える。(d)陰極液; 20ml の水に 0.4ml の ethylene diamine を加える。(e)泳動用たんぱく質試料; 10~20mg の試料を 1 ml の水にとかし、カラムに充填する位置のショ糖や ampholine とほぼ同じ濃度に調整する。

カラムへの充填は以下の通りである。まずカラム C より陽極液(c)を充填し、カラム A の下部まで上ってきたところでコックを閉じ、カラム C の上部まで(c)を入れる。次に通常の濃度勾配作成装置に夫々、(a)、(b)を入れ、装置を始動して、カラム C に ampholine を充填する。本実験では、すべてカラム C のほぼ中間まで、溶液が充填した時点で、いったん装置を止め、試料(e)を添加し、あらためて ampholine を充填した。実験によっては、ampholine の(a)、(b)の何れか、あるいは両者に最初から添加しておくことも可能である。ampholine 充填后、その上に陰極液(d)を静かに重層する。ゆっくりとコックを開いてA、C 両カラムを通じさせる。

泳動は、電力ほぼ 1 ワット、泳動時間は 60~70 時間行った。泳動終了后、コックを閉じ連結部のゴム管を切断して、1 分間に 1.5ml 程度の流速で各 1.5ml ずつの画分に分けた。各画分の吸光度 O. D. 280nm および pH を常温で測定した。なお、本論で用いた ampholine は、すべて pH 3~6 の範囲のものである。

III 実験結果と考察

1 オボムコイドの焦点電気泳動

Fig. 3 と Fig. 4 はオボムコイドの焦点電気泳動の結果を示したものである。非常に良い再現性を示し、こ

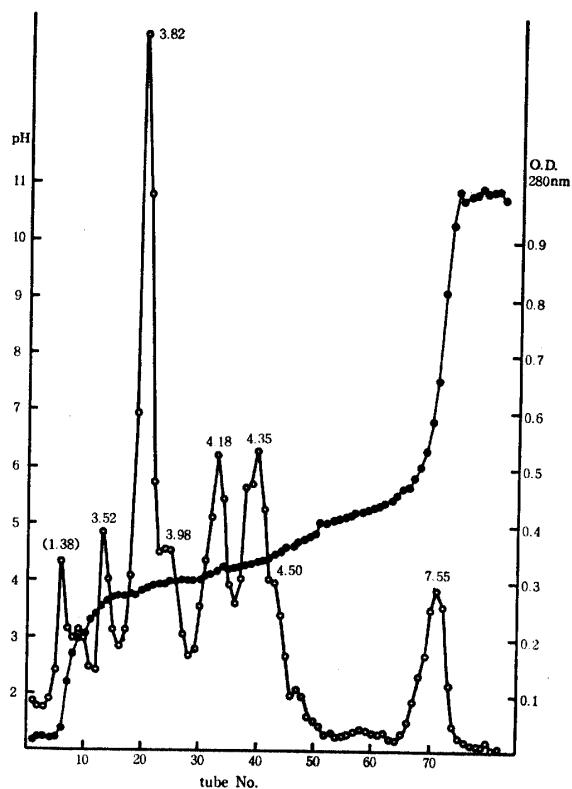


Fig. 3. Isoelectrofocusing of ovomucoid. 23mg of ovomucoid were applied. —●—, pH; —○—, absorbance at 280nm.

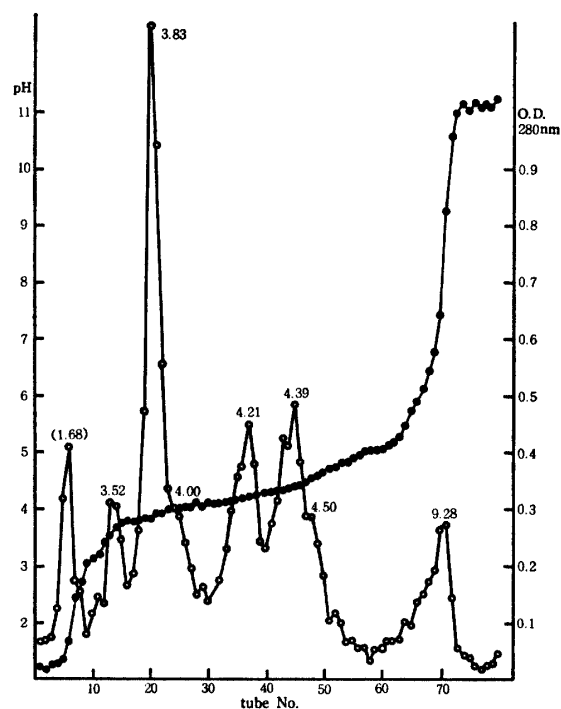


Fig. 4. Isoelectrofocusing of ovomucoid. 21mg of ovomucoid were applied. The signs are the same as those in Fig. 3.

の装置が十分使用し得ることを示している。なお、酸性およびアルカリ性領域にみられるピークは ampholine から由来するものと考えられ、焦点電気泳動に際して、しばしば認められる。しかしこのピークは透析することによって、ほとんどその280nmの吸収を失う。両図より明らかに、オボムコイドは等電点 (pI) とし

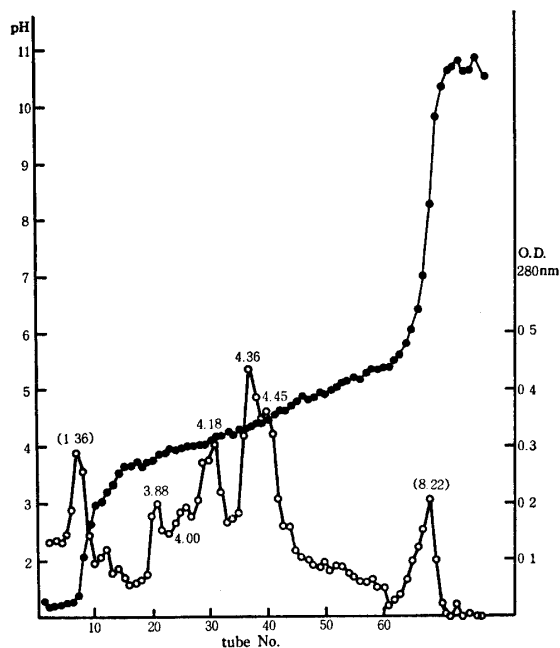


Fig. 5 Isoelectrofocusing of deflavo-ovomuroid. 10mg of protein were applied. The signs are the same as those in Fig. 3.

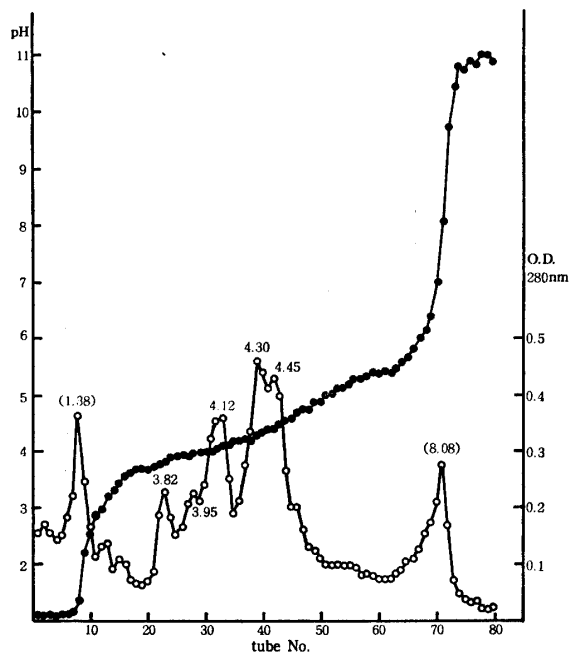


Fig. 6. Isoelectrofocusing of deflavo-ovomuroid. 10mg of protein were applied. The signs are the same as those in Fig. 3.

てpH 3.52, 3.83, 4.00, 4.20, 4.37および4.50の6成分に分画された。pI3.52と3.83のピークはフラビンによる黄色を示し、従ってその高い O. D. 280nmの吸光度もフラビンに由来するものと考えられ、直接たんぱく質量を現わしている訳ではない。他のピークは、ほとんど無色であった。

Fig. 5, 6 は脱フラビンを行ったオボムコイドの焦点電気泳動図を示すが、やはり前同様、非常に良い再現性を示している。pI3.85, 4.00, 4.15, 4.33および4.45にピークが認められたが、脱フラビンを行わないオボムコイドで、明らかに認められたpI3.52のピークは認められなかった。これは CM-セルロースクロマトグラフィーを用いて脱フラビンを行なう際、セルロースに未吸着のたんぱく質が、若干認められることと関連があるものと考えられるが、詳細については未検討である。

以上の結果、および図示しなかった泳動結果を総合してオボムコイドのpIはpH 3.85, 4.00, 4.15, 4.35および若干分離し難い点はあるがpH 4.50であり、脱フラビン操作を行っていないオボムコイドでは、更にpH 3.52にpIを有する画分が認められた。

2 各画分のトリプシン阻害能について

オボムコイドの生物学的活性の一つであるトリプシン阻害能を測定した結果がFig. 7である。本図におい

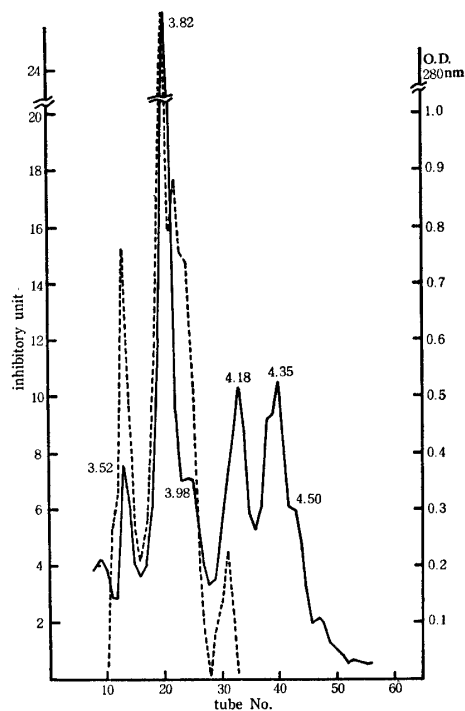


Fig. 7. Trypsin inhibitory activity of ovomucoid. — absorbance at 280 nm; trypsin inhibitory activity.

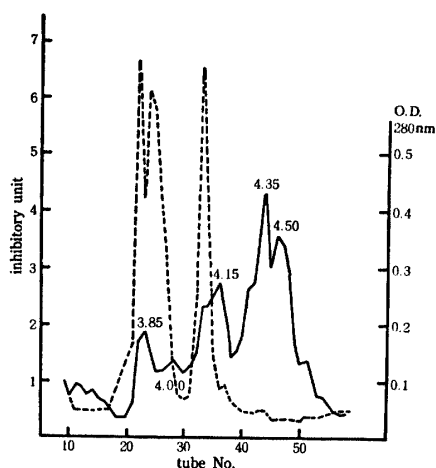


Fig. 8. Trypsin inhibitory activity of deflavo-ovomucoid. The signs are the same as those in Fig. 7.

てはpHの勾配は省略してあるが、各ピークのpHを示してある。明らかにpIの低いピークに強いトリプシン阻害能が認められたが、pI4.18のピークにも若干の阻害能が認められた。Fig. 8は脱フラビノオボムコイドのトリプシンに対する阻害能を測定した結果を示したものである。Fig. 7の結果と同様、pI4.35以外のピークは阻害活性を示している。これらの結果はトリプシン阻害能とフラビンは直接関連していないことを意味している。

3 各画分のフラビン結合能について

Fig. 9は各画分のフラビン結合能を測定したもので、

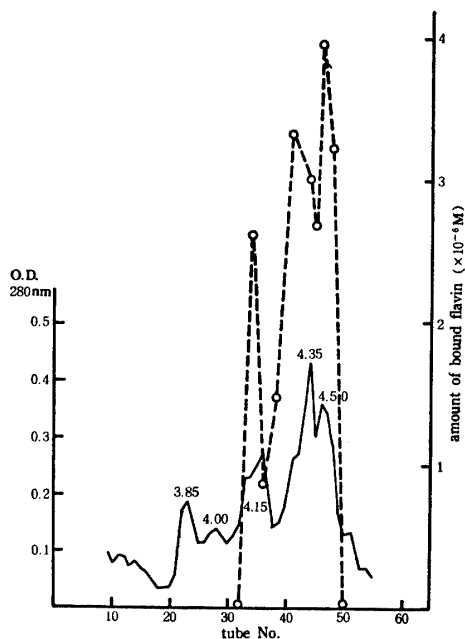


Fig. 9. Flavin binding activity of deflavo-ovomucoid. — absorbance at 280 nm; ---○--- flavin binding activity.

Table 1. Summary of the characteristics of the fractionated chicken ovomucoid

fractionation with isoelectrofocusing			
fraction	isoelectric point	trypsin inhibitory activity	flavin binding activity
I	3.52	+	*
II	3.85	+	—
III	4.00	+	—
IV	4.15	+	+
V	4.35	—	+
VI	4.50	—	+

* The protein peak was not detected in the case of deflavo-ovomucoid.

fractionation with CM-cellulose chromatography^{5,7)}

fraction	pH of buffer for elution	trypsin inhibitory activity	flavin binding activity
I	4.4	+	—
II	4.6	+	—
III	4.8	—	+
IV	5.0	—	+

各画分チューブ当りのフラビン結合量で示してある。実験方法の項で述べた様に、ampholineが蛍光を示すため、インヒビター活性測定と異なり透析の操作が必要となり、定量性に若干疑問があるが、図に示す通り明瞭な結果を得た。すなわち、インヒビター活性とは逆に、pIの高い画分に強いフラビン結合能が認められた。焦点電気泳動でフラビンと共に挙動するpIの低い画分には、フラビン結合能が認められなかった。

Table 1は上記の結果を金森らによるCM-セルロースクロマトグラフィーによって得られた画分との比較を行ったものである。クロマトグラフィーでは段階的にバッファーを代えているために、実際に各ピークが溶出されているpHとは若干のずれが生じているものと考えられる。また当然ながら、クロマトグラフィーで得られた画分は既に脱フラビンされているものである。pIのみを論じる場合、焦点電気泳動によるものが、正確であると考えられるものの、各画分の異同を論じるのは、相当困難である。しかし傾向としては同じ結果が得られ、低い等電点を有するものと低いpHで溶出される画分はトリプシン阻害能を示し、フラビン結合能は示さず、逆に高い等電点を有する画分と、高いpHで溶出される画分は共に、フラビン結合能を示すのに対し、トリプシン阻害能は示さなかった。

引用文献

- 1) C. T. Mörner, *Z. Physiol. Chem.*, **18** (1894) 525
- 2) H. Lineweaver and C. W. Murray, *J. Biol. Chem.*, **171** (1947) 565
- 3) E. Fredericq and H. F. Deutsch, *J. Biol. Chem.*, **181** (1949) 499
- 4) J. G. Davis, C. J. Mapes and J. W. Donovan, *Biochemistry*, **10** (1971) 39
- 5) 金森正雄, 河端 信, *日農化誌*, **38** (1964) 367
- 6) J. G. Beeley, *Biochem. J.*, **123** (1971) 399
- 7) M. Kanamori and M. Kawabata, *Agric. Biol. Chem.*, **33** (1969) 75
- 8) 伊吹文男, 金森正雄, *蛋白質・核酸・酵素*, **21** (1976) 612
- 9) O. Vesterberg and H. Svensson, *Acta Chem. Scand.*, **20** (1966) 820
- 10) M. Kanamori, F. Ibuki, M. Yamada, M. Tashiro and M. Miyoshi, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **21** (1975) 429

Summary

The purified chicken ovomucoid was further fractionated with the method of isoelectrofocusing. The ovomucoid was fractionated into six fractions having the pI value of 3.52, 3.82, 4.00, 4.15, 4.35 and 4.50. The peak of protein with the pI value of 3.52 was not detected in the deflavo-ovomucoid. The trypsin inhibitory activity which was considered to be one of the biological activity of ovomucoid was detected in the fractions of pI value of 3.52, 3.85, 4.00 and 4.15, and the proteins of pI

value of 4.35 and 4.50 did not show the trypsin inhibitory activity. Contrary to the results above mentioned, the flavin binding activity occurred in the peaks of pI value of 4.15, 4.35 and 4.50, and it was not observed in the other peaks.

The apparatus for the isoelectrofocusing used in these experiments was designed and prepared in our laboratory. The satisfactory and reproducible results were obtained with these equipments.