

鶏卵 Flavoprotein のアガロースゲル (セファロース 4B) への固定化

河端 信・大槻 耕三・田口 邦子

Immobilization of Egg White and Egg Yolk Flavoproteins on Agarose-gel Beads (Sephacrose 4B)

MAKOTO KAWABATA, KOZO OHTSUKI and KUNIKO TAGUCHI

Immobilization of Egg White and Egg Yolk Flavoproteins on Agarose-gel Beads (Sephacrose 4B) was tried by the CNBr activation method. The immobilized egg white flavoprotein had 63% of riboflavin-binding capacity of that of native flavoprotein, and the immobilized egg yolk flavoprotein had 74%. Both of the immobilized flavoproteins were resistant against a denaturing reagent, 2 M or 6 M urea.

These immobilized apoproteins are useful as column packing materials for the determination of free and bound riboflavins in various materials and may be used for various purposes in laboratory or industrially owing to their stability.

I 緒 言

ニワトリ卵中のフラビンは卵白中および卵黄中にリボフラビンの形で存在しており、さらにこのリボフラビンと特異的にかなり強く結合するタンパク質が卵白中と卵黄中の両方に存在することが知られている^{1)~8)}。

卵白中にこのタンパク質 (Egg White flavoprotein) についてはオボムコイド画分に存在することが報告されており、タンパク質化学的な報告も多い^{1)~4), 12)}。

卵黄中のフラビン結合性タンパク質 (Egg Yolk flavoprotein) については河端ら⁹⁾は卵黄の水溶性タンパク質画分中にこれが存在することを見出し、さらにウズラ卵黄中にも同種のタンパク質が存在することも報告している。

卵白 flavoprotein の各種化学試薬に対する安定性はすでに河端らにより詳細に研究され報告されている⁶⁾。これによると flavoprotein の apoprotein 中のアミノ基やチロシン残基が修飾されてもリボフラビン結合能の変化は少ないが、タンパク質の立体構造を大きく変化させるような S-S 結合の切断、8M尿素による変性などでは apoprotein のリボフラビン結合能は失われる。

以上の知見をもとにして今回著者らは卵白および卵

黄の flavoprotein を、ブロムシアンによって活性化した agarose-gel-beads (Sephacrose 4B) に化学結合法によって固定化した⁹⁾。この活性 Sepharose は主にタンパク質中の一部のアミノ基と弱アルカリ性水溶液中という生体物質に対して比較的温和な条件下でカップリング反応が進むことが知られており、また全操作が比較的容易なのとあいまって多くの酵素類の固定化や不溶化に用いられている。本研究において flavoprotein の apoprotein をリボフラビン結合能を保ったまま Sepharose に固定化することに成功したので二三の結果とともに報告する。

II 実験材料および方法

(1) 鶏 卵

本学付属農場の Shaver starcross 288種のものを使用した。割卵して卵白と卵黄をセパレーターで分離し卵黄は膜を破らないようにして1%食塩水、ついで水で表面を洗い付着している卵白を除く。

(2) 卵白 flavoprotein の分離精製

卵白を 0.05M 酢酸緩衝液, pH4.4 で3倍に希釈してよく均一化したのちろ過してオボムチンなど不溶性区分を除く。ろ液を 0.05M 酢酸緩衝液, pH4.4 で平衡させた DEAE-セルロースカラム (3×40cm) に通し黄

色の flavoprotein を含むオボムコイド画分のみを吸着させ、同緩衝液でこのカラムを洗う。つぎに 0.5 M 食塩を含む 0.05M 酢酸緩衝液, pH3.6 で溶出し脱塩したのち凍結乾燥する。この粗 flavoprotein 500mg を 100 ml の 0.1 M 酢酸緩衝液, pH 4.0 に溶かし pH メーターで再び pH を 4.0 に調整する。この溶液を 0.1M 酢酸緩衝液, pH 4.0 に平衡化された CM-Sephadex C-50 のカラム (1.8×45cm) に加え 0.1 M 酢酸緩衝液, pH 4.0 でこのカラムを洗浄する。この条件下では flavoprotein からリポフラビンが遊離する。リポフラビンおよび吸着されないタンパク質が洗浄されたカラムに次に 0.2 M 酢酸緩衝液, pH 4.4 を流す。溶出液はフラクションコレクターに 10ml ずつ分取し同時に東洋紙製ユビコン UV-540 で連続的に 280 nm の紫外吸光を記録させ、タンパク質の溶出をモニターする。pH 4.4 でタンパク質のピークの溶出が終ると次に pH 4.6, pH 4.8, pH 5.0 と 0.2 M 酢酸緩衝液による stepwise elution を行う。ここでフラビン結合能がある pH 4.6 で溶出されるタンパク質を集め脱塩し凍結乾燥して apoprotein を得た (収量約130mg)。

(3) 卵黄 flavoprotein の分離精製

上記(1)で得た卵黄から卵黄液を集める。これをクエン酸緩衝液を用いる分別沈澱, DEAE-セルロースおよび CM-Sephadex C-50を用いる河端ら⁵⁾の方法によって精製して apoprotein を得る。

(4) 卵白および卵黄 flavoprotein の Sepharose へのブROMシアン活性化法による固定

蒸留水で充分洗浄した agarose-gel beads (商品名: Sepharose 4 B, Pharmacia, Sweden) 約20ml に 2 M Na₂CO₃ 14ml を加え、さらに 0.5 ml のアセトニトリルに溶かしたブROMシアン (CNBr) 1 g を加え 1~2 分間攪拌して gel を活性化する⁹⁾。これを吸引濾過し 0.1 M NaHCO₃, pH 9.5 で洗浄し、次に蒸留水で洗浄し、再び NaHCO₃ と蒸留水で洗浄する。この活性化 gel 2.0ml の総窒素量の定量を(5)の方法で行ない活性化 gel の窒素量とする。残りの活性 gel 18ml を等分し一方に卵白 flavoprotein 40mg を、他方に卵黄 flavoprotein 40mg を加え 0.5 M NaCl を含む 0.2 M NaHCO₃, pH 9.5 10ml ずつをそれぞれ加えカップリングを 4°C で約20時間行なう。次にそれぞれに充分の蒸留水を加えろ過し gel を集める。さらに 0.5 M NaCl を含む 0.1 M 酢酸緩衝液, pH 4.0 で洗浄し、次に 2 M 尿素溶液で洗い、再び 0.5 M NaCl を含む 0.1 M NaHCO₃, pH 10.0 で洗浄し、化学結合以外の力で吸着されているタンパク質を除く。agarose-gel bead に固定化された卵白および卵黄 flavoprotein の

量は、それぞれ約 0.5 ml を目盛付共栓遠沈管にとり 3000r.p.m. 5 分間、遠心分離し、gel bead の容量を定め、(5)の方法で総窒素量を定量し、上記活性化 gel の窒素量との差をもってタンパク態窒素量としこれから逆算して決定した。

(5) 総窒素量

AOAC ミクロケールダール法により測定した¹⁰⁾。

(6) フラビン結合能の測定

フラビンは遊離の状態では 530 nm に螢光をもつが、apoprotein と結合するとこの螢光が失われる。この性質を利用して 0.05 M リン酸緩衝液, pH 6.0 中でコタキ・島津製八木式微量螢光光度計を用いて結合能を測定した。

固定化された卵白および卵黄 flavoprotein のフラビン結合量の測定は次のようにする。apoprotein-Sepharose をガラス製カラムにつめ 0.05 M リン酸緩衝液 pH 6.0 を流し平衡化する。pH が 6.0 ではリポフラビンは apoprotein とモル比で 1:1 に結合するので、まずこのカラムに過剰のリポフラビン溶液 (75 μg/ml) 2 ml を加え 0.05 M リン酸緩衝液, pH 6.0 を流す。apoprotein-Sepharose はリポフラビンで飽和され余剰のリポフラビンがカラムから溶出されてくる。さらに 0.05 M リン酸緩衝液 pH 6.0 を流し続けカラムからの溶出液がリポフラビンの螢光を示さなくなるまで洗う。この螢光はミツミ社製紫外線検出器 SJ-1031A31A で調べた。apoprotein に結合したリポフラビンは pH 4.0 以下では再びリポフラビンが遊離してくるので、上記のカラムに次に 0.2 M 酢酸緩衝液 pH 3.8 を流し、溶出してくるリポフラビンを全量集め螢光光度計で螢光を、または日立 181 型分光光度計でリポフラビンの 450 nm ($\epsilon=12.2 \times 10^3$) の光吸収¹¹⁾を測定して、この apoprotein-Sepharose に結合していたリポフラビンの量を定量する。

III 結果および考察

活性化 Sepharose と卵白および卵黄 flavoprotein とのカップリングは方法(4)に従って行ったがカップリングの際それぞれのタンパク質はリポフラビン結合部位を保護する意味と flavoprotein の固定化が成功したか否かを知る目安 (flavoprotein は黄色を呈しているので固定化に成功すると反応 Sepharose を洗浄した後も黄色の色が gel に残ることから判断できる。)とするために、apoprotein ではなくリポフラビンを飽和した flavoprotein を用いた。なおこのカップリング後 0.1 M 酢酸緩衝液 pH 3.8 で gel を充分洗浄したところ、黄色が失われることと 0.05 M リン酸緩衝液 pH

Table I. Features of Immobilized Egg White and Egg Yolk Flavoproteins

	(1) Quantity of protein (mg of apoprotein / ml of Sepharose)	Riboflavin binding capacity (mole of riboflavin / mole of apoprotein) in 0.05 M phosphate buffer, pH 6.0.		
		(2)	(3) +2M Urea	(4) +6M Urea
Immobilized egg white flavoprotein	1.7	0.63	0.29	0.25
Immobilized egg yolk flavoprotein	1.2	0.74	0.35	0.33

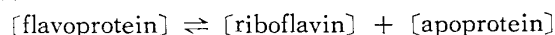
6.0 に平衡化したこの洗浄 gel にリボフラビンを加えると再び黄色に gel が着色することから上記カップリング反応によって gel はリボフラビンと直接反応して共有結合が生成したのではなく、むしろ apoprotein 部との共有結合が生成したものと考えられる。Table I の (1) に Sepharose 1 ml に固定化されたそれぞれの flavoprotein の量を示す。カップリング反応の際のタンパク質の濃度によって固定化されるタンパク質量は変化するが今回の方法の(4)で述べたタンパク質量のみに限って実験を行った。ブロムシアンによって活性化された Sepharose はタンパク質中のリジン残基の ϵ -アミノ基と反応するのであるが、前に報告⁶⁾したように flavoprotein はリジン残基の ϵ -アミノ基を化学修飾してもフラビン結合能に大きな変化がなかったことから今回の実験でも flavoprotein をこの方法で固定化してもフラビン結合能は失なわれないと予想していた。Table I の(2)に固定化卵白および卵黄 flavoprotein のリボフラビン結合能を示す。固定化されていないそれぞれの native flavoprotein はモル比でリボフラビンと 1 : 1 で結合するのであるが、(2)の結果から結合能が固定化により卵白では63%に、卵黄では74%に減少したことがわかる。これはカップリングにより flavoprotein の一部の分子が全くフラビン結合能を失う様な反応または変性を受けたためであろうと考えられる。

固定化された flavoprotein の安定性を知るために、可逆的変性剤である尿素を用いてリボフラビン結合能を調べた (Table I の(3)および(4))。この結果から 2 M 尿素中では固定化 flavoprotein は部分的に変性を受けリボフラビン結合能が Table I の(2)の場合に比べ卵白では46%に、卵黄では47%に減少している。また 6 M 尿素中ではいずれの固定化 flavoprotein も 2 M 尿素中とほぼ同程度の結合能を保持していることが明らかとなった。前報⁶⁾では固定化されていない卵白の native flavoprotein は 6 M 尿素中ではリボフラビン結合能をかなり弱めていて、また 8 M 尿素中では

全く結合能を持たなかったのであるが、今回の実験で flavoprotein は Sepharose に固定化されることにより安定化されたものと考えられる。

これら尿素変性を受けた卵白および卵黄の固定化 flavoprotein カラムを 0.05 M リン酸緩衝液, pH 6.0 でよく洗浄して尿素をとり除くと再びいずれのカラムもリボフラビン結合能力を回復した。

flavoprotein に含まれているリボフラビンは pH 4.0 以上では (一説には pH 3.5 から pH 8.0) かなり強く結合していることが知られている。すなわち



の平衡が左にかたよっていて平衡定数 K の値が卵黄の場合で $2.65 \times 10^{-9} \text{M}$ である⁸⁾。固定化された卵黄および卵白の flavoprotein のリボフラビン結合能力を見るために、Fig. 1 に示した様な実験を試みた。まず固定化卵白および卵黄 flavoprotein-Sepharose をカラムに充填し、0.1 M 酢酸緩衝液 pH 3.8 で十分に洗いいりボフラビンを完全にカラムから取り除いて apoprotein-Sepharose の状態にする。次に 0.05 M リン酸緩衝液, pH 6.0 でこれらのカラムを平衡化する。対照として flavoprotein を固定化していない Sepharose をカラムに充填し同条件で処理した。Fig. 1 の(A)に示すように Sepharose のみのカラムに卵白および卵黄 flavoprotein を流すとタンパク質のピークとリボフラビンの吸収 (450nm) のピークが一致しており、flavoprotein はこのカラムの充填剤と interaction なく通過したことが明らかである。卵黄の flavoprotein 3 mg を 0.05 M リン酸緩衝液, pH 6.0, 2 ml に溶かし、これを卵白および卵黄 apoprotein-Sepharose カラムに加えた場合のクロマトグラムをそれぞれ(B)および(C)に示す。これから明らかかなようにいずれの場合も、flavoprotein に結合していたリボフラビンは pH 6.0 の条件下にもかかわらずカラムの固定化 apoprotein の方に移行した。さらに卵白の flavoprotein 3 mg を上記と同じ緩衝液 2ml に溶かしこれを卵白の apoprotein-Sepharose カラムおよび卵黄の apoprotein-Sepharose カラムに

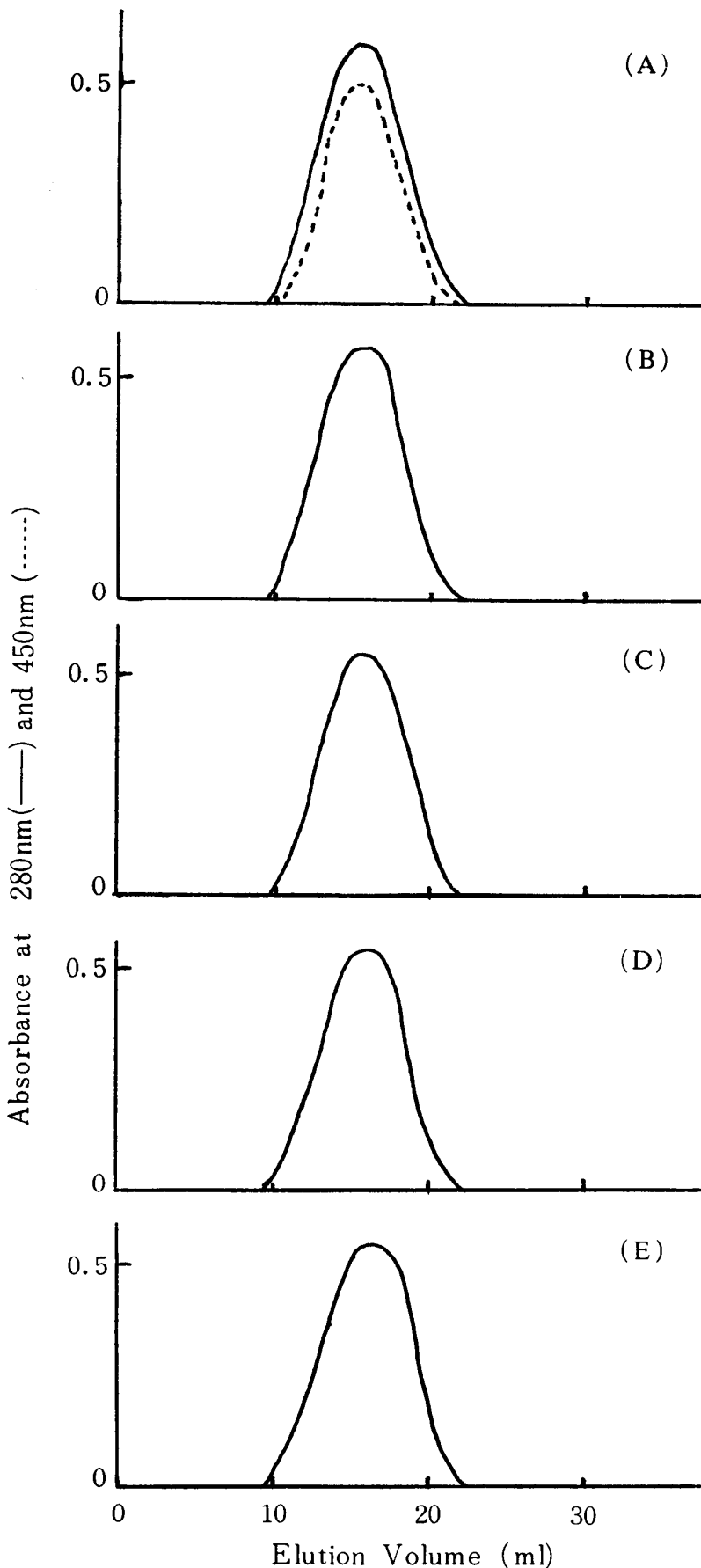


Fig. 1. Chromatography of egg flavo-proteins on Sepharose column (A) ; on egg white apoprotein-Sepharose column (B), (D); on egg yolk apoprotein-Sepharose column (C), (E). All the columns (1.8×6cm) were equilibrated with 0.05M phosphate buffer, pH 6.0. Egg yolk flavoprotein, 3 mg/2 ml of the phosphate buffer, was applied on each column (A), (B) or (C), and the elution was carried out with 0.05 M phosphate buffer, pH 6.0. Egg white flavoprotein, 3 mg/2 ml of the phosphate buffer, was applied on each column (D) or (E), and the elution was carried out with 0.05 M phosphate buffer, pH 6.0. Egg white flavoprotein was also applied on the column (A), and the similar chromatographic pattern to that of (A) was obtained. Chromatographic patterns of (B), (C), (D) and (E) represent that riboflavin was absorbed on each column and only apoprotein of egg white or egg yolk was eluted.

加えるとクロマトグラムはそれぞれ(D)および(E)のようになって、やはりこの場合も flavoprotein に結合していたリボフラビンは固定化 apoprotein の方へ移った。リボフラビンと各種 apoprotein との螢光滴定の結果からは卵白 apoprotein の方が卵黄 apoprotein よりもリボフラビンとの結合力が強いのであるが、この両者の値は Fig. 1 の実験からもオーダー的には同程度のものと考えられる。また固定化されたそれぞれの apoprotein は遊離状のそれぞれの apoprotein と比べフラビン結合力は大きく減じたとは考えられない。

Fig. 1 の結果から、固定化した卵白および卵黄の apoprotein はこれをカラムに充填して pH 6.0 で流すことにより、遊離のリボフラビンは勿論であるが、いろいろな生体物質に含まれる結合型のリボフラビンもカラムの方へ移行させることにより正確なリボフラビン(ビタミン B₂)の定量に応用できることを示唆して

いる。

IV 要 約

卵白および卵黄中に含まれるリボフラビン結合性タンパク質の flavoprotein を Sepharose (agarose-gel beads) にブロムシアンを用いる化学的結合法により固定化した。固定化された flavoprotein はもとの flavoprotein に比べ25~35%程度フラビン結合能を減ずるが、尿素などの変性剤に対してはかえって安定性を示した。この固定化 flavoprotein はカラムの充填剤として使用するとリボフラビンの脱吸着が溶出緩衝液の pHを変化させるだけで可能であるので、リボフラビンの定量、希薄溶液からリボフラビンの回収、脱フラビンなど種々の応用が考えられる。

本研究を行うにあたり御協力戴きました深間信子氏、前川正氏、徳田彩子氏に感謝致します。

(1977年7月29日受理)

文 献

- 1) 金森正雄, 前田一郎; 農化, **32**, 337(1958)
- 2) 金森正雄, 河端 信; 農化, **38**, 367(1964)
- 3) M. Kanamori and M. Kawabata; *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 75 (1969)
- 4) M. B. Rhodes, N. Bennet and R. E. Feeney; *J. Biol. Chem.*, **234**, 2054(1959)
- 5) 河端 信, 田口邦子, 林 義男; 農化, **47**, 111 (1973)
- 6) 河端 信, 田口邦子; 京都府立大学学術報告, 理学・生活科学, **24**, 7 (1973)
- 7) W. Ostrowski, B. Skarzynski and Z. Zak; *Biochim. Biophys. Acta*, **59**, 515 (1962)
- 8) W. Ostrowski and A. Krawczyk; *Acta Chem. Scand.*, **17**, S 241 (1963)
- 9) S. C. March, I. Parikh and P. Cuatrecasas; *Anal. Biochem.*, **60**, 149 (1974)
- 10) W. Horwitz; "Method of Analysis of the AO AC", 11th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, p858 (1970)
- 11) L. G. Whitby; *Biochem. J.*, **54**, 437 (1953)
- 12) 日高義雄, 松岡芳隆; 農化, **51**, 165 (1977)