

海亀卵白の蛋白質に関する研究

(第1報) とくに電気泳動, 塩濃度勾配抽出および
CM-セルロースカラムクロマトグラフィー

福永隆生・古賀克也

(昭和48年8月25日受理)

Studies on the Sea-turtle's Egg White Proteins

1. On the Electrophoresis, Gradient Extraction with Salt and CM-cellulose Column Chromatography.

Takao FUKUNAGA and Katsuya KOGA

(Laboratory of Animal Biochemistry)

緒言

卵は生態学上は比較的簡単な構造をもっているにもかかわらず, 受精により発生を開始すると, 次第に複雑な構造の成体へと変化してゆくため, 古くから生物学者の興味ある研究対象となった。また, 発生の開始とともに起る種々の酵素の活性上昇と, 代謝回転などは生化学者の強い関心を寄せてきた問題である。また一方, 卵は受精後, 一個の成体が発生するまでの間, 外部からの栄養源の補給なしに成育するので, 栄養価値の高い食品として大いに利用されてきた。

卵に関して種々な面から行なわれた研究のうち, とくにニワトリ卵白に関する蛋白質化学的な研究は古くから行なわれており, すでに個々の構成蛋白質の分離, 性質についての詳細な知見がえられている。

FEENEY らは CM-セルロースを用いて, ニワトリ卵白構成成分の分離を行なっており¹⁾, その外, 構成成分についての研究も, 多くの研究者²⁻⁸⁾により行なわれている。

オボアルブミンについては N 末端がアセチル化されたペプチドが分離されることにより, N 末端構造が解明され⁶⁾, また, オボアルブミンのグリコペプチドの糖結合部位が明らかにされる^{7, 8)} など, 構成蛋白質の一次構造も明らかにされつつある。

以上のように, ニワトリ卵白については, かなり詳しく研究されているが, ニワトリ以外の卵生動物の卵白構成蛋白質に関する研究は少なく, FEENEY ら⁹⁻¹²⁾, や著者ら¹³⁻²⁰⁾ の報告以外にはわずかの報告がみられ

るに過ぎない。しかし, これらの研究には, 単に, ニワトリ卵白について行なわれた実験方法をそのまま用いたに過ぎないものが多く, 個々の卵白についての分画条件を検討した上での研究はほとんど見られない。

著者らはこの観点に立って, 分類学上の位置が異なる鳥類, たとえば, ウズラ, エミュー, ハトおよびアヒルの卵白について, 電気泳動, CM-セルロースカラムクロマトグラフィーおよび塩濃度勾配抽出を行ない, 比較生化学的立場から研究を行なった。その結果, 種によって相違点があることを認め, ニワトリ卵白には認められないグロブリン系糖蛋白質を, ウズラおよびアヒル卵白に見出した^{16, 20)}。また, 鳥類に限らず, 分類学上異なる亀や蛇などの卵白の研究は発生学上, または, 分類学上のみならず, 蛋白質化学にとっても興味深い成果を提供するものと考えられる。

海亀 (*Caretta caretta olivacea*) は亜熱帯に棲息し, 鹿児島県の南西海岸, または, 屋久島の栗生海岸に, 初夏の頃上陸して砂浜に産卵する。卵は砂中で太陽熱を受けて孵化することが知られている。ニワトリ卵白は巨視的には約 59°C 位から変性し, 64°C 付近で凝固する。これに反し, 海亀卵は砂浜中で, 夏期の強い太陽の輻射熱を受けて放置されながら, なお, 安定である。また, 海亀卵白には定性的にリゾチームの溶菌作用を認めることができなかった。ニワトリの卵をはじめウズラ, アヒルおよびその他の鳥類の卵は一般に, 沸騰水中に長時間保持すれば熱凝固を起すが, 海亀卵の卵白には熱凝固が認められない。著者らはこれらの現象から, 海亀卵白の構成蛋白質はニワトリ卵白のものとは著しく異なり, さらに, 熱変性し難い糖蛋

白質の存在, ならびに, それが相対的に多く存在することを予想した. このような特殊な蛋白質の存在が, 自然環境に適応した海亀卵の発生孵化過程において, おそらく保護的な役割を演じているものと推測される. したがって, 比較生化学的の面から, ニワトリ卵白との相違を明らかにするため, 海亀卵白の性状, 構成蛋白質の分離を試みた.

海亀卵については, 古く近藤らの報告^{21, 22)}があるが, それによれば, 海亀卵白アルブミンの等電点は5.75, 凝固温度は75°Cで, ニワトリ卵白アルブミンとは異なることが示唆されているが, 詳細な研究は行なわれていない. 著者らは, まず, 移動界面電気泳動, 塩濃度勾配抽出, CM-セルロースカラムクロマトグラフィなどにより, 構成蛋白質の分離を行ない, 卵白蛋白質の挙動を調べた.

実験材料

実験材料として用いた海亀卵は鹿児島県熊毛郡屋久島栗生海岸で, 赤海亀 (*Caretta caretta olivacea*) が産卵した直後のものを採取し, 船便で運んだもので産卵後1~2日経過したものであった. これを割卵し卵白を注意深く分離した. 海亀卵および卵白の一般性状は表1に示すとおりである.

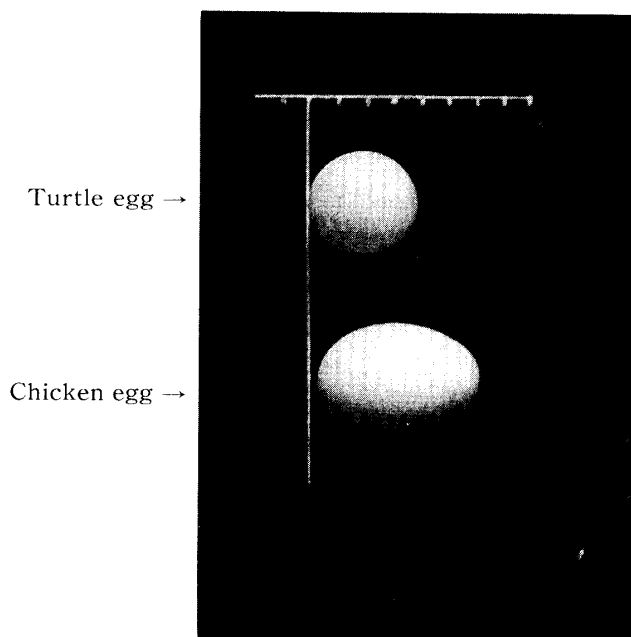
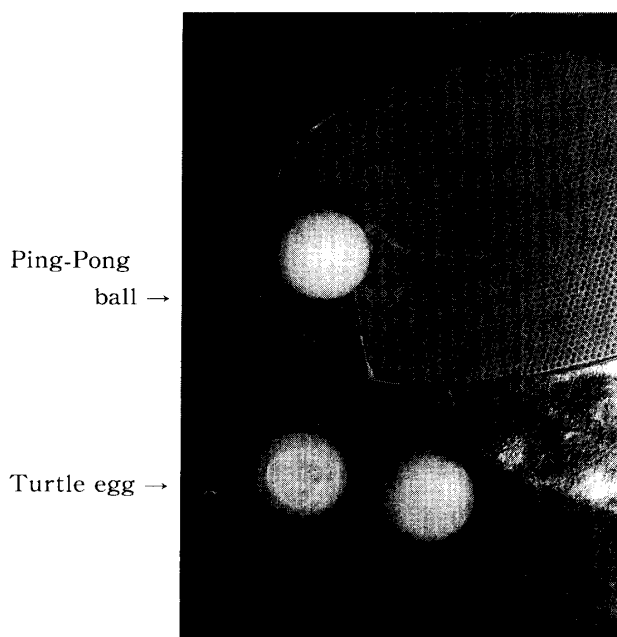
写真に示すように, 海亀卵はピンポンの球と同じ大きさで卵殻の柔らかい卵である. 数日放置すれば水分が蒸散してへこむが, 水に浸すと再び原形に復帰する.

全卵中の卵白の割合はニワトリの卵よりやや少ない程度であるが, 卵白中の乾物は非常に少なく, わずか1.6%にすぎない. さらに, 乾物中の窒素含量も非

Table 1. Some properties of turtle egg.

		Turtle egg		Chicken egg	
Weight of entire egg	(g)	29.0	—33.0	52.4	—67.2
White/Yolk	(w/w)	1.2	— 1.5	1.9	— 2.3
White/Egg x 100	(%)	52.3	—56.3	58.4	—62.5
Dry matter of egg white	(%)	1.59	— 1.63	10.5	—11.5
Specific gravity of homogenized egg white at 30°C		1.0095—	1.0097	1.039—	1.052
*Nitrogen content in dry matter	(%)	8.47	— 8.78	13.8	—14.1
pH of homogenized egg white		8.29	— 8.80	7.90	— 8.30

* Nitrogen content in dry matter of emu egg white; 12.2% (KOGA)
Nitrogen content in dry matter of quail egg white; 17.5% (KOGA)



常に少なく、8.57%で、これから粗蛋白質量を求めると、生卵白中0.857%となり、乾物中の約半分に相当した。このことから、海亀卵白の比重がニワトリ卵白のものより小さいことも首肯できる。

海亀卵白の pH はニワトリ卵白のものよりやや高かった。このことは等電点の高い蛋白質の存在を示唆している。

海亀は5~7月に産卵するので、海亀卵の入手は時期的に限られる。したがって、本研究では産卵時、大量に入手した新鮮卵から卵白を分離し、ホモゲナイズしたのち凍結乾燥し、粉末として貯蔵したものを卵白試料として用いた。乾燥卵白に新鮮卵白とはほぼ等しくなるように水を加え、ついで、塩分などを除くため水に対して透析を行なうと、かなりの沈殿が生じた。そこで、可溶部と不溶部の割合を測定したところ前者36~38%に対し、後者は62~64%であった。この可溶部の窒素含量は15.1~15.2%である。不溶部はオボムチン系の蛋白質、または、多糖類ではないかと考えられたが、本研究ではこれについての研究は行なわなかった。

実験方法

(1) 電気泳動 使用した緩衝液は所定のイオン強度、 pH になるように試薬を秤量し、調製した緩衝液はガラス電極 pH メーターで pH を確かめた。

電気泳動用試料は海亀卵白の凍結乾燥粉末を種々の緩衝液(酢酸塩、リン酸塩、炭酸塩緩衝液: pH 5~10)にとかし、5~10°C で2~3日間透析を行ない、可溶性蛋白質について、移動界面電気泳動を行なった。蛋白質濃度はとくに指定しない場合には1%溶液とした。

電気泳動は日立 HD-1 型ゼリウス電気泳動装置を使用し、試料の比伝導度はコールラウシュブリッジにより比抵抗を測定し、その逆数により求めた。泳動電流は6mA の定電流を用いた。この移動度は泳動時の写真より移動距離を測定し、次の式で求めた。

$$\text{移動度} = \frac{d}{t} \times \frac{ks}{i} \text{ (cm}^2/\text{sec} \cdot \text{volt)}$$

d = 移動距離 (cm), s = セル断面積 (cm²), k = 比伝導度 (mho), i = 電流 (ampere), t = 泳動時間 (second)

(2) 蛋白質濃度の測定 卵白中含量がもっとも多く、かつ、代表的な蛋白質であるニワトリ卵白アルブミンを分離精製²³⁾し、電気泳動的に単一になったものを標準として使用した。ニワトリ卵白アルブミンの約1%水溶液を調製し、一定量を蒸発乾燥させて、重

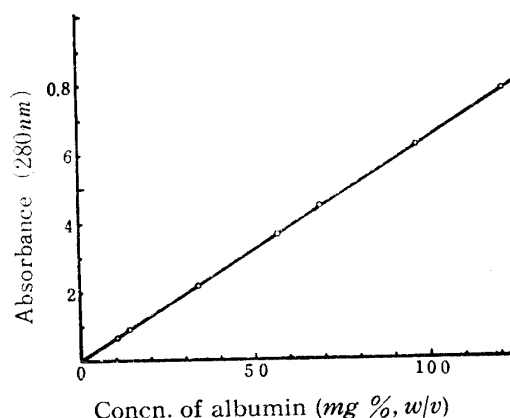


Fig 1. Relationship between the concentration and absorbance (at 280 nm) of chicken ovalbumin.

量法により正確な濃度を求めた。上記1%水溶液を種々の割合に希釈し、日立101型分光光度計により280nmの吸光度を測定し、濃度との関係性を求めたところ、図1に示すような直線がえられた。この関係式はつぎの通りである。

$$y = \frac{6.409}{1000} x \quad \{y: \text{O.D}_{280}, \quad x: \text{オボアルブミン濃度 (mg \% w/v)}\}$$

この y の値が0.700までは LAMBERT-BEER の法則に従った。本報告における蛋白質濃度の算出は上記の式によった。

(3) 糖の定量 中性糖の定量はフェノール硫酸法²⁴⁾によって行なった。海亀卵白中にガラクトースが存在することを定性的に認めたので、ガラクトースを標品として用い、濃度と吸光度との関係式を求めた。吸光度は島津ボッシュロム回折格子型光電光度計を用い、490nmで測定した。その関係は図2のようになり、関係式はつぎの通りである。

$$y = \frac{1}{80}(x + 1.07) \quad \{y: \text{O.D}_{490}, \quad x: \text{ガラクトース濃度 (r/ml)}\}$$

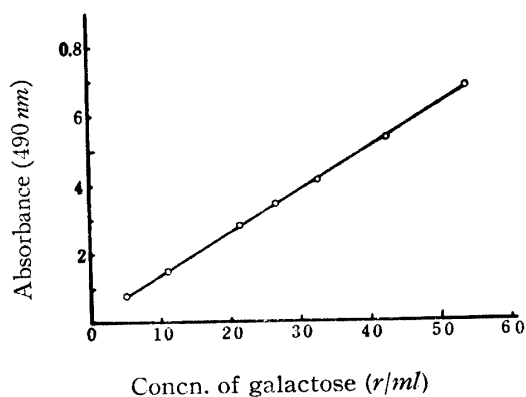


Fig 2. Relationship between the concentration and absorbance (at 490nm) of galactose.

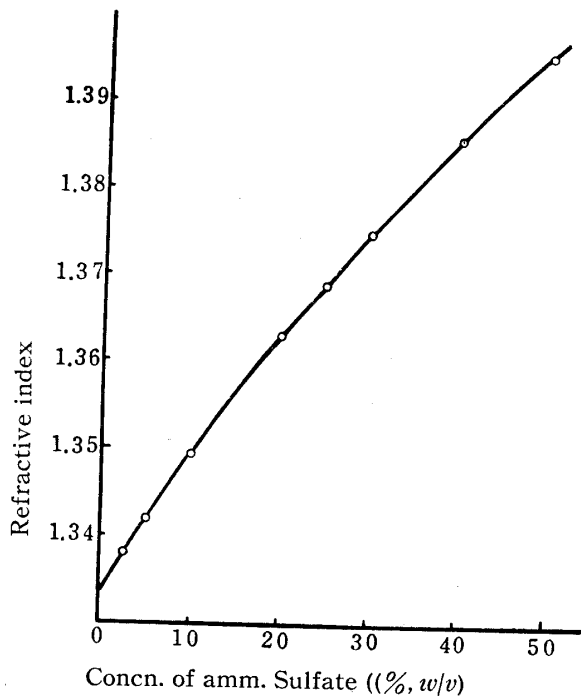


Fig 3. Relationship between the concentration and refractive index of ammonium sulfate solution at 19°C.

ガラクトース濃度が $5r/ml$ から $50r/ml$ の範囲内で LAMBERT-BEER の法則に従った。

この直線は原点を通らなかったが、DUBOIS ら²⁴⁾ も同様な結果をえており、発色機構が複雑なためと考えた。本報告における糖量の算出は上記の式によった。

(4) 塩濃度勾配抽出 塩濃度勾配抽出用の塩としては硫酸を用い、抽出直前の硫酸濃度はアッペの屈折計を用いて測定した。屈折率の測定は流水温度 (19°C) で行ない、予かじめ硫酸濃度と屈折率との関係を探った。その結果は図3のように convex curve を描いたので、硫酸濃度は測定した屈折率の値から図上で求めた。

塩濃度勾配抽出用の試料は卵白の凍結乾燥粉末約 $900mg$ を用い、これに水 $15ml$ を加えて溶解し、遠心分離によって不溶物を除いた上澄液 $4ml$ に飽和硫酸溶液 $6ml$ を加え、さらに、硫酸の粉末を加えて完全飽和にし蛋白質を沈殿させた。これにセライト 545 (和光純薬製) $1g$ を加えよく混和した。一方、図4に示すガラスフィルター 3G-3 の部分にセライト 545, $2g$ を飽和硫酸溶液に懸濁したものを注ぎ込み、その上に、上記蛋白質沈殿-セライト混和物を飽和硫酸溶液で洗いながら均一に載せた。

溶出液は $5ml$ ずつ、フラクションコレクターで集め、蛋白質および糖の量を測定した。抽出操作は副

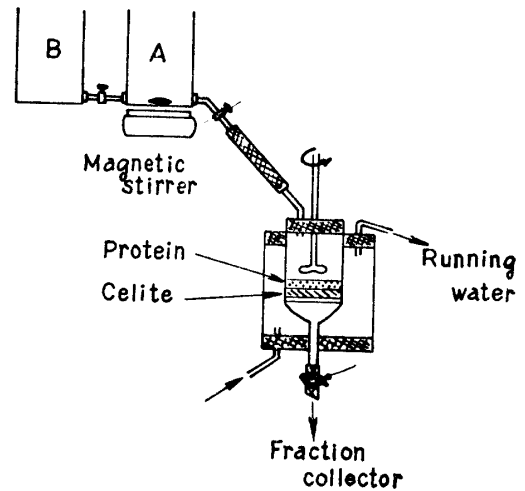


Fig 4. Apparatus for the gradient extraction with ammonium sulfate.
A; Saturated ammonium sulfate soln.
B; Water.

島²⁵⁾、古賀^{13,14)}の方法にしたがって行ない、最初の $18\sim 19$ 本までは飽和硫酸溶液のみを流し、以後は硫酸濃度を徐々に下げた。溶出液について $280nm$ における吸光度を測定し、前述した蛋白質検量直線式を用い、蛋白質量を算出した。さらに、その溶液は加水分解することなしにフェノール硫酸法²⁴⁾で発色させ、 $490nm$ における吸光度を測定し、前述の糖検量直線式によって糖含量を算出した。

(5) CM-セルロースカラムクロマトグラフィー CM-セルロースは Serva 社製ならびに Brown 社製のものを使用した。その交換容量は CM-セルロース $1g$ 当たり、ニワトリ卵白アルブミンとして $250\sim 300mg$ であった。金森ら⁴⁾、古賀^{13,14)}の方法にしたがって、CM-セルロースは $0.025M$ 酢酸塩緩衝液 $pH4.0$ で平衡化したのち、カラム ($1.8 \times 20cm$) に充填した。

試料は凍結乾燥粉末を $0.025M$ 酢酸塩緩衝液 $pH4.0$ に溶かし、同一緩衝液に対し $5^\circ C$ で $2\sim 3$ 日間透析した。透析液は遠心分離後、約 1% 溶液になるように調整し、その $20ml$ を CM-セルロースカラムに吸着させた。

溶出用の緩衝液は塩濃度勾配の場合と同様に、図4の2個の下口瓶に下記の緩衝液を入れ、gradient に pH を上昇させた。使用した緩衝液はつぎの通りである。

$0.025M$ acetate buffer, $pH4.0$, $250ml$ - $0.025M$ CH_3COONa , $250ml$.

$0.025M$ phosphate buffer, $pH5.4$, $500ml$ - $0.025M$ Na_2HPO_4 , $500ml$.

0.05M carbonate buffer, pH9.0, 500ml-0.05M Na₂CO₃, 500ml.

0.05M Na₂CO₃, 100ml.

0.05M NaOH, 200ml.

溶出液は5ml ずつフラクションコレクターで分取し、pH測定後、日立101型分光光度計で280nmにおける吸光度を測定し、蛋白質量を算出した。

(6) ゲル透過 Sephadex G-50, G-75, G-100, G-150を膨潤させた後、2.2×54cm カラムに充填した。これに緩衝液を流して平衡化した後、試料5mlを流し、upward flow 法によりゲル透過を行なった。溶出液はドロップカウンターフラクションコレクターにより5ml ずつ分画した。

結果および考察

1) 海亀卵白の移動界面電気泳動

海亀卵白の性状は表1に記したように、種々の点でニワトリ卵白と異なっていた。とくに、海亀卵白のpH値がニワトリ卵白の値より高いことは等電点の高い蛋白質の存在を示唆している。ここでは蛋白質の分画を行なう際の指標とするため、移動界面電気泳動法により、海亀卵白の電気的挙動を調べたのでその結果を図5に示した。

この結果をニワトリ卵白の電気泳動像と比較すると大きな相違が認められた。すなわち、用いた泳動条件では3~4個のピークを認めたが、pH9.7以下では、常に、陰極に移動する成分が存在し、pH9.8以上では、これが認められない。このことは等電点が9.7~9.8近傍にある成分が存在することを示すものである。そこで、種々のpHでμ=0.1における電気泳動を行ない、泳動図より、明瞭な成分についての移動度を求め、pHと移動度との関係をプロットしたところ、

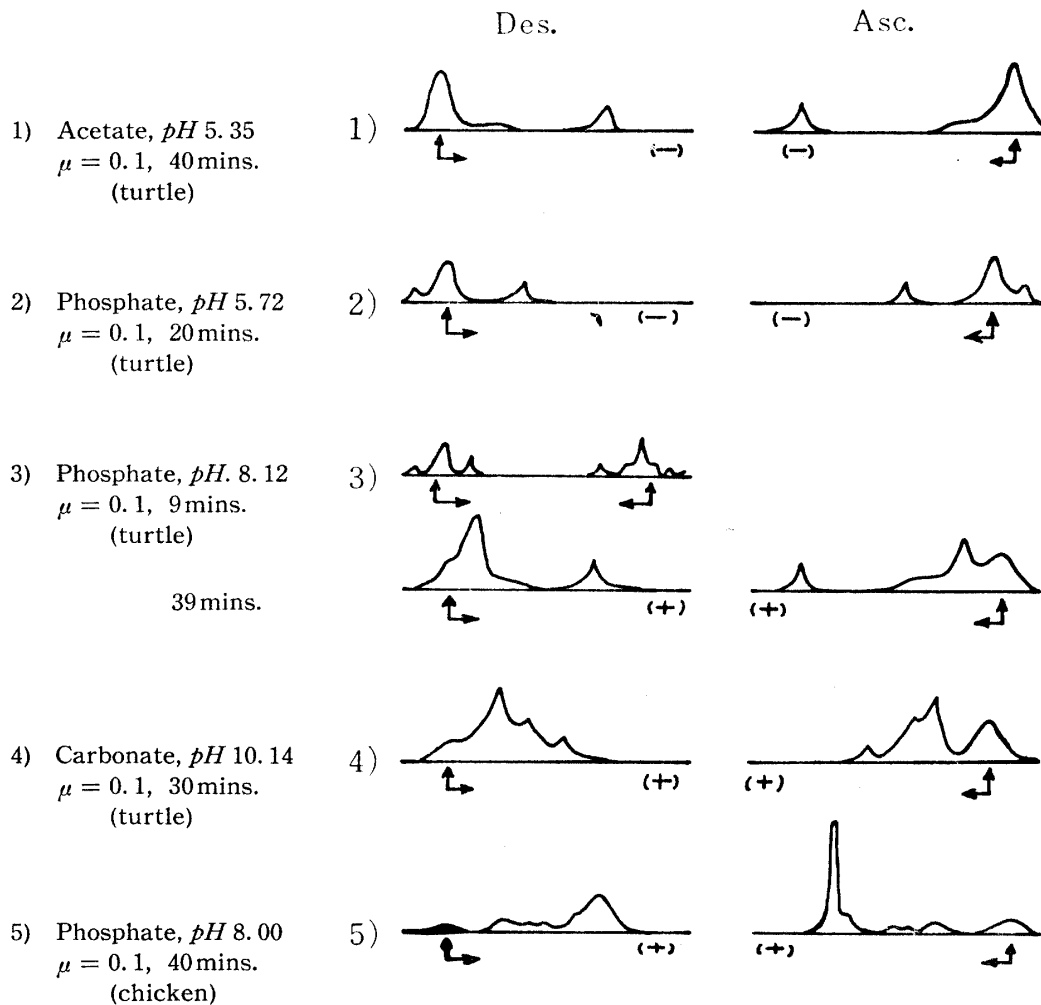


Fig 5. Electrophoretic diagrams of the turtle and chicken egg white proteins. Concn. of protein ; 1%

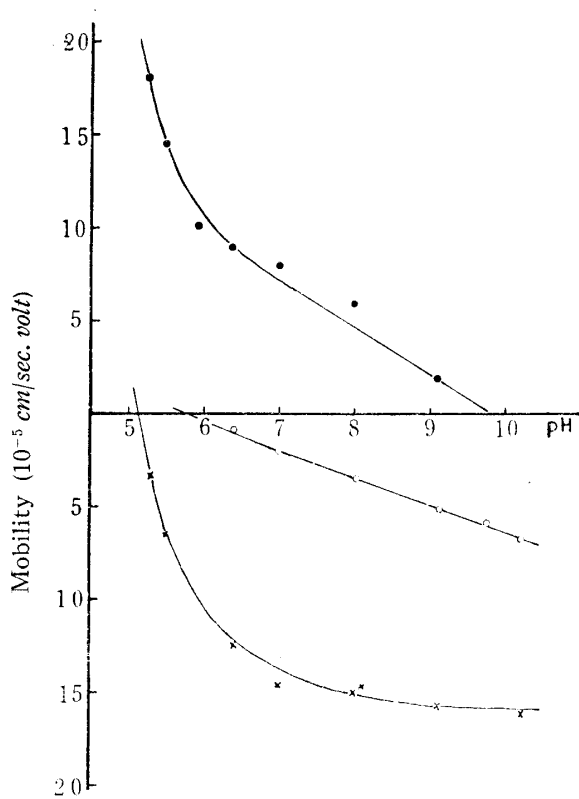


Fig 6. Relationship between pH values and electrophoretic mobilities of several constitutional proteins of egg white.

図6に示すような結果がえられた。

LONGSWORTH ら²⁶⁾ はニワトリ卵白の各成分について電気泳動を行ない、移動度と pH の関係より各成分の等電点を明らかにしている。本実験においても、同様な方法で明瞭な3成分(等電点の低い方より、Comp. T₁, T₂, T₃ とする)について等電点がほぼ明らかになったが、その値はそれぞれ5.1~5.3, 5.6~5.8, 9.7~9.8であった。Comp. T₁ は等電点から、ニワトリ卵白アルブミンに近い成分であったが、Comp. T₂ は等電点5.6~5.8であり、これがもっとも多い成分である。Comp. T₃ は等電点9.7~9.8で塩基性の糖蛋白質、または、リゾチームと推定された。

つぎに、ニワトリ卵白アルブミンを分離精製²³⁾ し、海亀卵白に加えて、イオン強度0.1, pH 8 および10で電気泳動を行なった。その結果は図7の通りで、海亀卵白でもっとも泳動の速い Comp. T₁ がニワトリ卵白アルブミンと一致することが観察されたが、これはむしろ、Comp. T₁ の移動度が非常に近いために一緒に移動するように見えたものと考えられる。

ニワトリ卵白中、もっとも多いアルブミンに移動度が類似する Comp. T₁ は海亀卵白中では非常に少なく、アルブミンより等電点の高い Comp. T₂ T₃ の割合が多い。卵蛋白質中、両者で80~90%を占めてい

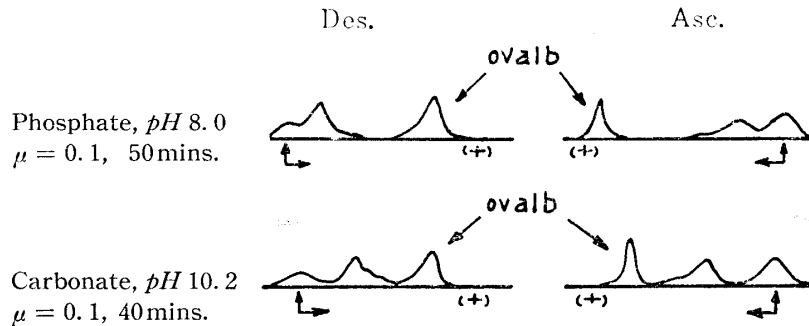


Fig 7. Electrophoretic diagrams of the mixture of turtle egg white and chicken ovalbumin.

ovalb.; chicken ovalbumin

る。この結果は表1の海亀卵白の pH が高いという現象を裏付けるものである。つぎに、イオン強度と移動度、イオン強度と各成分の面積比の関係をしらべて、 c/μ と移動度、 c/μ と各成分比を図8と図9に示した。

その結果、イオン強度の低下とともに移動度は大きくなり、両者は直線関係を示すことが認められた。また、各成分の面積比についてみると、Comp. T₁, T₂ はイオン強度の低下とともに減少し、Comp. T₃ は逆に

増加する結果がえられた。すなわち、Comp. T₁, T₂ の面積比と Comp. T₃ の面積比とはイオン強度に対して逆の依存性をもつことが判明した。

ARMSTRONG²⁷⁾, AOKI ら²⁸⁾ はイオン強度変化を c/μ で表わし、この値と移動度との関係および成分中のアルブミンの占める割合との関係について述べており、 $c/\mu \rightarrow 0$ により、移動度およびアルブミンの面積比は一定値に近づくことを示している。また、FORSYTHE ら²⁹⁾ はイオン強度の増加により、移動度

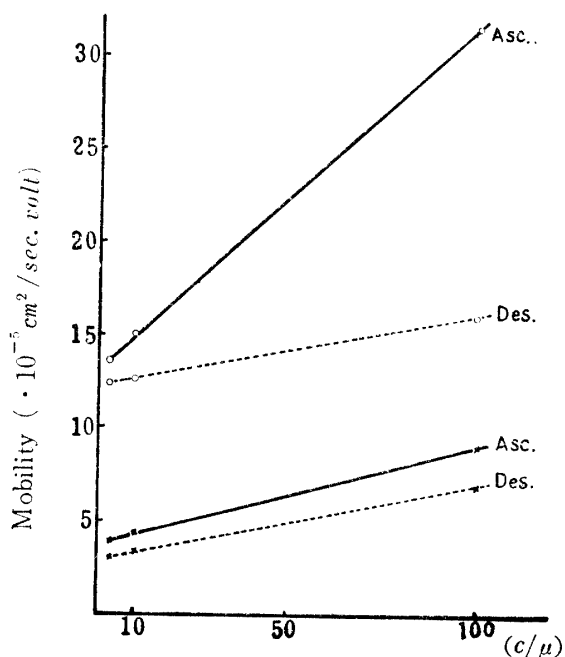


Fig 8. Effect of ionic strength on the electrophoretic mobilities of the turtle egg white.

—○—○— pH 10, Comp. T₁
 —×—×— pH 8, Comp. T₂

が小さくなると述べている。PERLMANN ら³⁰⁾は血清アルブミンとγ-グロブリンの面積比を調べ、イオン強度の増加によりアルブミンの占める割合は減少し、γ-グロブリンは増加すると述べている。すなわち、両者の面積比はイオン強度に対して逆の依存性を示すことになる。

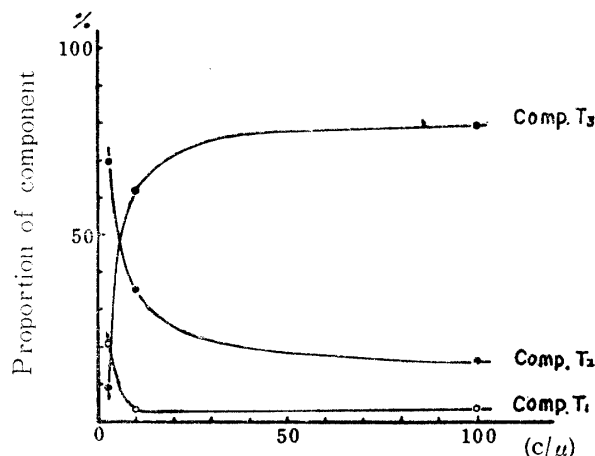


Fig 9. Relation between the ionic strength and the ratio of area of each component in the turtle egg white.

海亀卵白における Comp. T₁ および T₂ と、Comp. T₃ とのイオン強度依存性の違いは構造上の差異に基づくことを示唆するものであろう。

2) 海亀卵白蛋白質の塩濃度勾配抽出法による分画

蛋白質の塩析分離を行なう場合、それぞれの蛋白質分画のための硫酸濃度は塩濃度勾配抽出曲線より明らかにされる。

副島²⁹⁾はペパインの精製に当り、従来、0.4 飽和硫酸濃度で沈殿を集めていたが、この抽出法によれば蛋白質のピークは0.43~0.475 飽和の部分、すなわち、0.4 飽和よりむしろ、高濃度のところに現われ、そこに比活性がもっとも大きい成分があることを報告している。

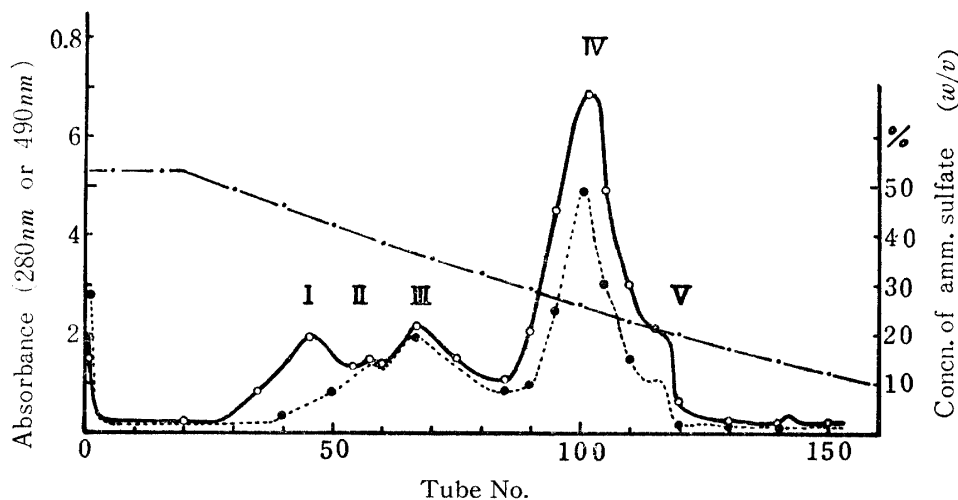


Fig 10. Separation of the turtle egg white proteins by the gradient extraction with ammonium sulfate.

Fraction size ; 5 ml, —○—○— Protein,
 Sugar, —●—●— Amm. sulfate.

Table 2. Proportion and sugar content of the components separated from turtle egg white by gradient extraction with ammonium sulfate.

Component	I	II	III	IV	V
Concn. of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (w/v %)	48 40	40 36	36 32	32 23	23 15
Protein index	11—15	4—9	12—21	48	14—15
Sugar-Protein ratio (10^{-2})	0—1.1	4.5		3.6	

海亀卵白蛋白質を分画するため、まず、塩濃度勾配抽出法により分画を行ない、その結果を図10に示した。

分画図に示すように、5個（硫酸濃度の高い方より Comp. I, II, III, IV, V と名付ける）のピークが認められ、各ピークが溶出される硫酸濃度は、それぞれ、48→40% (0.9→0.75 飽和), 40→36% (0.75→0.68 飽和), 36→32% (0.68→0.6 飽和), 32→23% (0.60→0.43 飽和), 23% 以下であった。なお、Comp. I, II, III は明確な分離が出来ないので、一括して CM-セルロースカラムクロマトグラフィーおよびゲル濾過の実験に供した。

図10の結果より、各成分の割合と糖含量を求め表2に示した。

Comp. IV がもっとも多く、溶出硫酸濃度からみて、アルブミンと考えられるが、その割合は48%で

あり、ニワトリ卵白 83%¹³⁾、ウズラ卵白 74%¹³⁾ に比較すれば非常に低い。これは Comp. I 11~15%、Comp. II 4~9%、Comp. III 12~21% でありアルブミンより高濃度硫酸で溶出する画分が37~38%も含まれているためと考えられ、この点は海亀卵白の成分割合上の特徴である。

一方、糖含量をみると、Comp. I は糖をほとんど含まず、Comp. II, III は分離が悪く、含量としてかなり高い含量を示し、Comp. IV, すなわち、アルブミンは3.6%であった。

COHN ら³¹⁾ は馬の血清より、2/3 飽和以上の硫酸で沈殿する部分を糖蛋白質、および酵素区分として分離している。また、ニワトリ卵白について金森ら³²⁾、古賀¹³⁾ もこの部分をオボムコイド画分としている。海亀卵白のこの成分は糖含量などから見ても、糖蛋白質のみを含むとは考えられない。近藤ら²¹⁾ はこの海亀

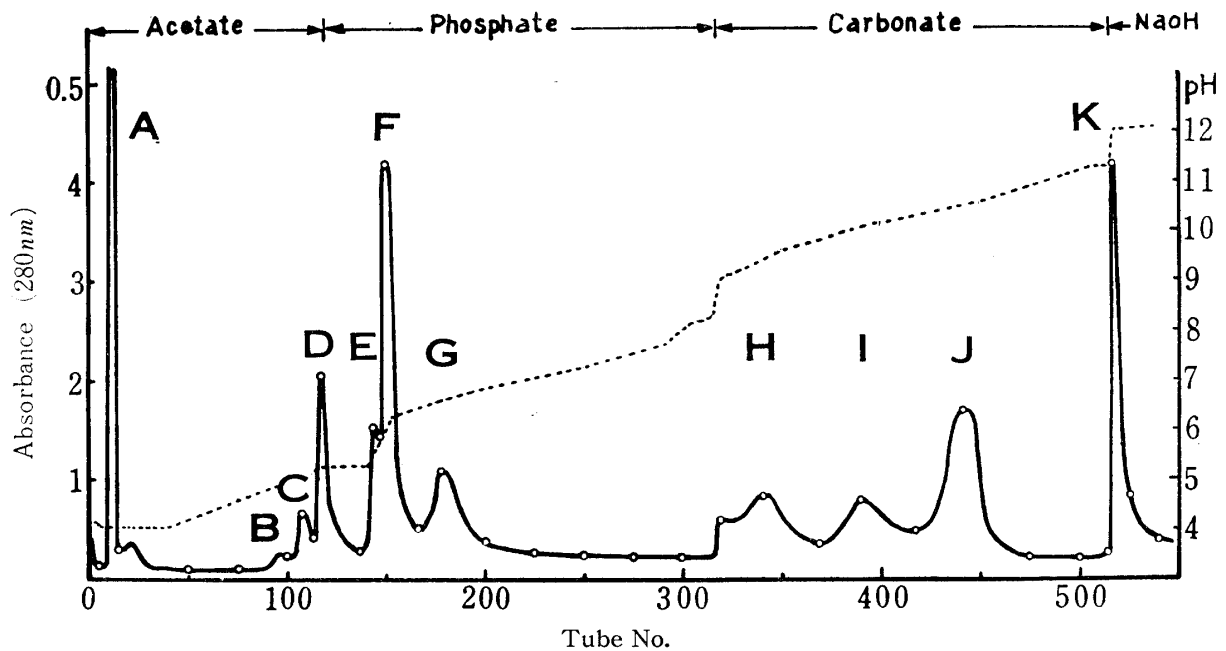


Fig. 11. CM-cellulose column chromatography of the turtle egg white proteins.

Column; 1.8×20cm, Fraction size; 5 ml,

—○— Protein, pH.

Table 3. Protein content and *pH* values for elution of the components separated from turtle egg white by CM-cellulose column chromatography.

Component	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	others	total
<i>pH</i> value for elution	4.0	4.8	5.0	5.2	5.6	6.0	6.6	9.5	10.0	10.5			
Protein (mg)	55.1	2.0	4.3	14.0	6.5	19.5	23.1	24.8	19.5	37.4	25.7	47.4	279.3
Protein index	19.7	0.7	1.5	5.0	2.3	7.0	8.3	8.9	7.0	13.4	9.2	17.0	100

卵白特有の Comp. I, II, III については、まったく報告していない。この成分については後述する。

3) 海亀卵白の CM-セルロースカラムクロマトグラフィー

全卵白の可溶性蛋白質は CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにより、図 11 に示すように 10 個の成分に分画された。

これらの構成成分は古賀¹³⁾が報告しているニワトリ卵白、およびウズラ卵白の 8 成分に比して多く、また、溶出曲線も異なっていた。10 個の成分の溶出 *pH* は 4.0, 4.8, 5.0, 5.2, 5.6, 6.0, 6.6, 9.5, 10.0, 10.5 (それぞれ Comp. A, B, C, D, E, F, G, H, I, J とする) であった。Comp. K はカラム操作中変性した蛋白質と考えられる。

各成分の量的関係を表 3 に示した。

Comp. A は 0.025*M* 酢酸塩緩衝液, *pH* 4.0 で CM-

セルロースに吸着されない蛋白質であるが、用いた実験条件の範囲内では同一 CM-セルロースカラムに 160mg および 470mg の卵白蛋白質を含む試料をそれぞれ流下させても、蛋白質量に無関係に吸着されないで流出するので over charge によって素通りしたものではない。この蛋白質成分の量は全成分中もっとも多く、全蛋白質量の約 20% を占めていた。この成分は明らかに、蛋白質の反応 (ビウレット反応) を示し、金森ら³³⁾の述べている anionic protein, または、リボフラビンなどとは異なり, *pH* 4.0 で正に荷電していることなど、蛋白質化学的に見て極めて興味深いものである。

Comp. A に次いで、リゾチーム様蛋白質 Comp. J が相対的に多く存在し、ニワトリ卵白アルブミンと同じ位置に溶出する Comp. B, C の量は少ない。塩濃度勾配抽出で、もっとも多いアルブミンが CM-セル

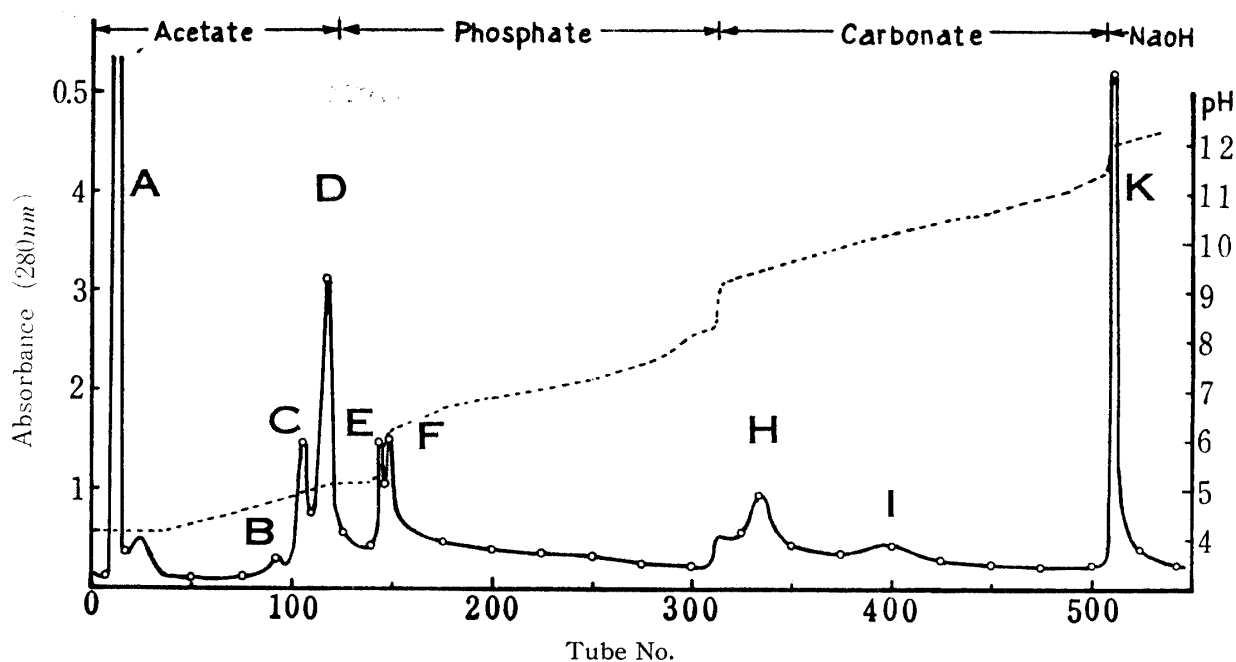


Fig. 12. CM-cellulose column chromatography of the albumin fraction obtained by the salting-out method.

Column ; 1.8×20cm, Fraction size ; 5 ml,
 —○—○— Protein, *pH*.

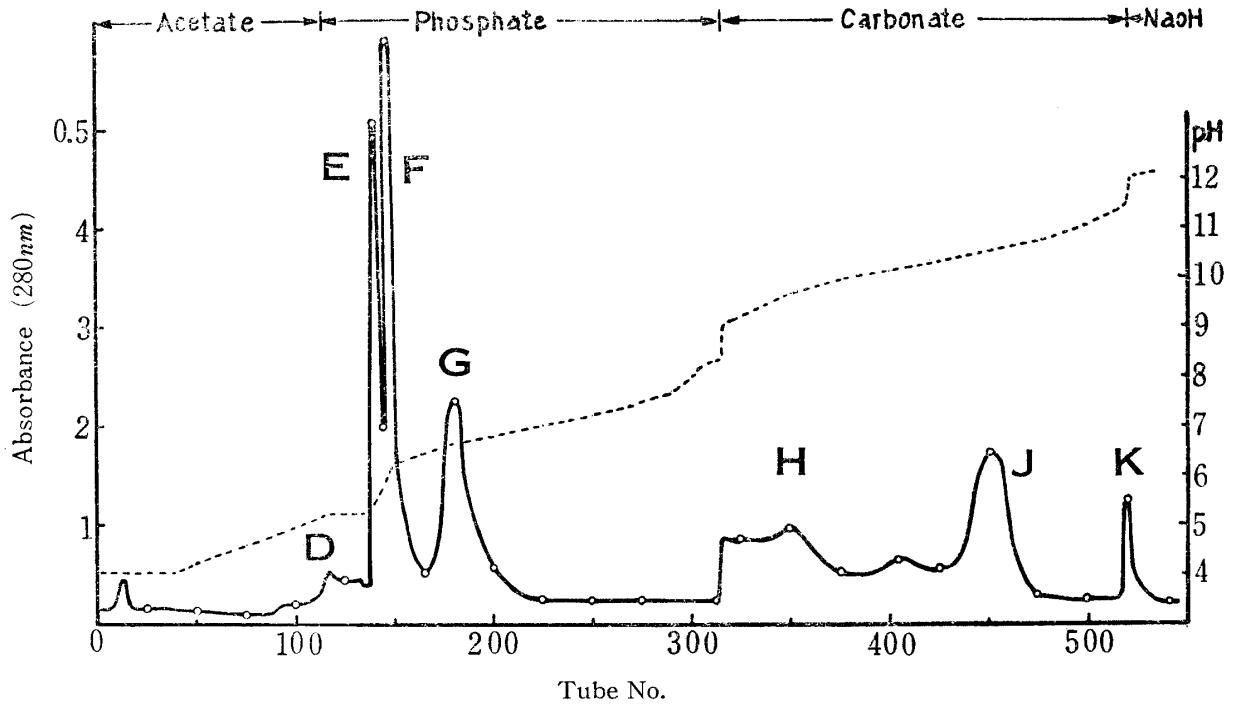


Fig. 13. CM-cellulose column chromatography of the Comp. I. II. III mixture obtained by the salting-out method.

Column ; 1.8×20cm, Fraction size ; 5 ml,
 —○—○— Protein, pH.

ロースカラムクロマトグラフィーで溶出される成分のどれに相当するか、正確に判断することができないので、塩濃度勾配抽出で得られた硫酸濃度を用いて塩析分画したアルブミン画分と、Comp. I. II. III 混合画分をそれぞれ別々に CM-セルロースカラムクロマト

グラフィーを行なった。

アルブミン画分について、全卵白と同じ条件を用い、CM-セルロースカラムクロマトグラフィーを行なった結果を図12に、海亀卵白特有の Comp. I. II. III 混合画分についての結果を図13に示した。

Table 4. Proportion of the components separated from albumin fraction by CM-cellulose column chromatography.

Component	A	B	C	D	E	F	H	I	K	others	total
Protein (mg)	206.5	3.9	10.8	20.7	5.9	9.1	22.1	9.2	25.8	86.9	400.7
Protein index	51.5	1.0	2.7	5.2	1.5	2.3	5.5	2.3	6.4	21.7	100
	85.2*	1.7*	4.5*	8.6*							100

* Ratio among A, B, C and D components.

Table 5. Proportion of the components separated from Comp. I. II. III mixture by CM-cellulose column chromatography.

Component	D	E	F	G	H	J	K	others	total
Protein (mg)	11.2	20.2	31.5	41.9	30.2	44.3	11.8	79.6	270.7
Protein index	4.1	7.4	11.6	15.5	11.1	16.4	4.4	29.4	100
		12.0*	18.7*	25.0*	17.9*	26.5*			100

* Ratio among E, F, G, H and J components.

さらにこれらの成分割合を表4, 表5に示した。アルブミン画分においては Comp. A, B, C, D, E, F, H, I および K が認められ, 全卵白の溶出曲線と比較しても, Comp. E, F, H, I は減少し, Comp. G, J は完全に消失している。これに対して, Comp. I. II. III 混合画分では Comp. A, B, C, D はほとんど消失しているが, これに反して, Comp. E, F, G, H, J が顕著に出現していることが明らかである。これらのことから, アルブミン画分の主成分は Comp. A, B, C, D (溶出 pH 4.0, 4.8, 5.0, 5.2) であり, 海亀卵白特有の Comp. I. II. III 混合画分の主成分は Comp. E, F, G, H, J (溶出 pH 5.6, 6.0, 6.6, 9.5, 10.5) と考えられる。

Comp. A, B, C, D の合計量は全卵白中 27% であり, なかでも Comp. A の含量は約 20% であった。これに対して, アルブミン画分中では Comp. A は 52% を占め, さらに, アルブミン画分の主成分 Comp. A, B, C, D 中における割合は 85% にも達している。この量的にもっとも多い Comp. A は CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにおける挙動のみからみると等電点が 4.0 または, それ以下であると判断されるが, 実際には予想に反し, 4.0 以上であることが認められた。この Comp. A は極めて興味ある性質ならびに成分を有する特異なオボアルブミンであり著者はこれを ST-オボアルブミンと名付けた。この ST-オボアルブミンについての研究は次報で詳細に述べることとする。

Comp. I. II. III. 混合画分中の各成分の割合をみると Comp. J, G がもっとも多く, それぞれ約 16% を占め, ついで Comp. F, H, E と少なくなるが顕著な差は認められなかった。

塩濃度勾配抽出法, すなわち, 塩に対する溶解性による分別法で, 3成分と認められたものが CM-セルロースカラムクロマトグラフィーでは 5成分に分離される。この Comp. I. II. III 混合画分は硫酸濃度 0.9 → 0.6 飽和で分画されたものであり, ニワトリ卵白の場合ではオボムコイドに該当する画分であるが, 海亀卵白においては CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにより分画された 5成分中には糖をほとんど含まないものもあり, 不明な点が多い。ニワトリ卵白の CM-セルロースカラムによる溶出 pH のみから判断すれば, Comp. E, F はコンアルブミン, Comp. H はアビジン, Comp. J はリゾチームに該当するが Comp. G に相当するものは見当たらない。これは溶解性からみると, オボムコイドや酵素類とも一応考えられるが, さらに詳細な研究が必要である。

4) 高濃度硫酸で塩析された画分 (Comp. I. II. III 混合画分) のゲル濾過

塩濃度勾配抽出において, アルブミンより高濃度硫酸溶液 (0.9 → 0.6 飽和) で溶出する Comp. I, II, III 画分は海亀卵白に顕著に現われる特有の成分である。ニワトリ卵白についての実験結果^{13, 32)} からみると, この画分に含まれる蛋白質は糖蛋白質と考えられる。また, COHN ら³¹⁾ は馬の血清から分画したこれ

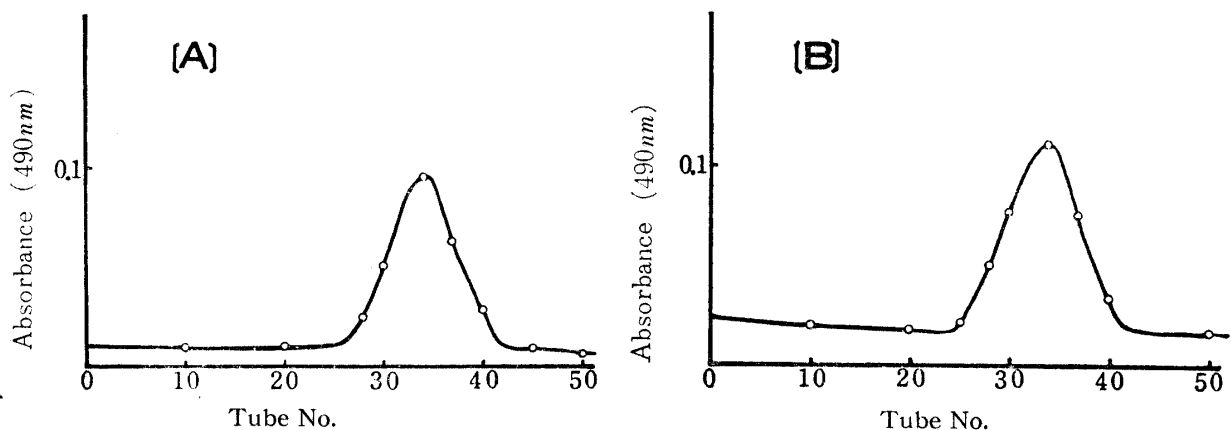


Fig. 14. Gel filtration of the decomposed substance eluted from CM-cellulose column with buffers.

Decomposed substance was eluted from CM-cellulose with 0.025 M phosphate buffer (pH 8) (A) and 0.05 M Carbonate buffer (pH 10) (B).

Color developing was performed by the phenol-sulfuric acid method.

Column; Sephadex G-100, 2.2 × 54 cm, Fraction size; 5 ml,

Buffer; 0.1 M acetate, pH 4.5.

に相当する画分に糖蛋白質, 酵素を認めている. そこで, Comp. I. II. III 混合画分の各蛋白質の分子量分布, 糖含量について調べた.

まず, CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにより分画した卵白蛋白質の糖含量は非常に変動するので, つぎのことを行なった.

CM-セルロースカラムに $0.025M$ 酢酸塩, $0.025M$ リン酸塩緩衝液, ついで, $0.05M$ 炭酸塩緩衝液のみを流し, 分取液について, フェノール硫酸法²⁴⁾により呈色度の測定を行なった. その結果, とくに, 緩衝液の交換の際の pH 領域に可成りの量の CM-セルロースの崩壊物が溶出し, 他の pH 域にも微量の崩壊

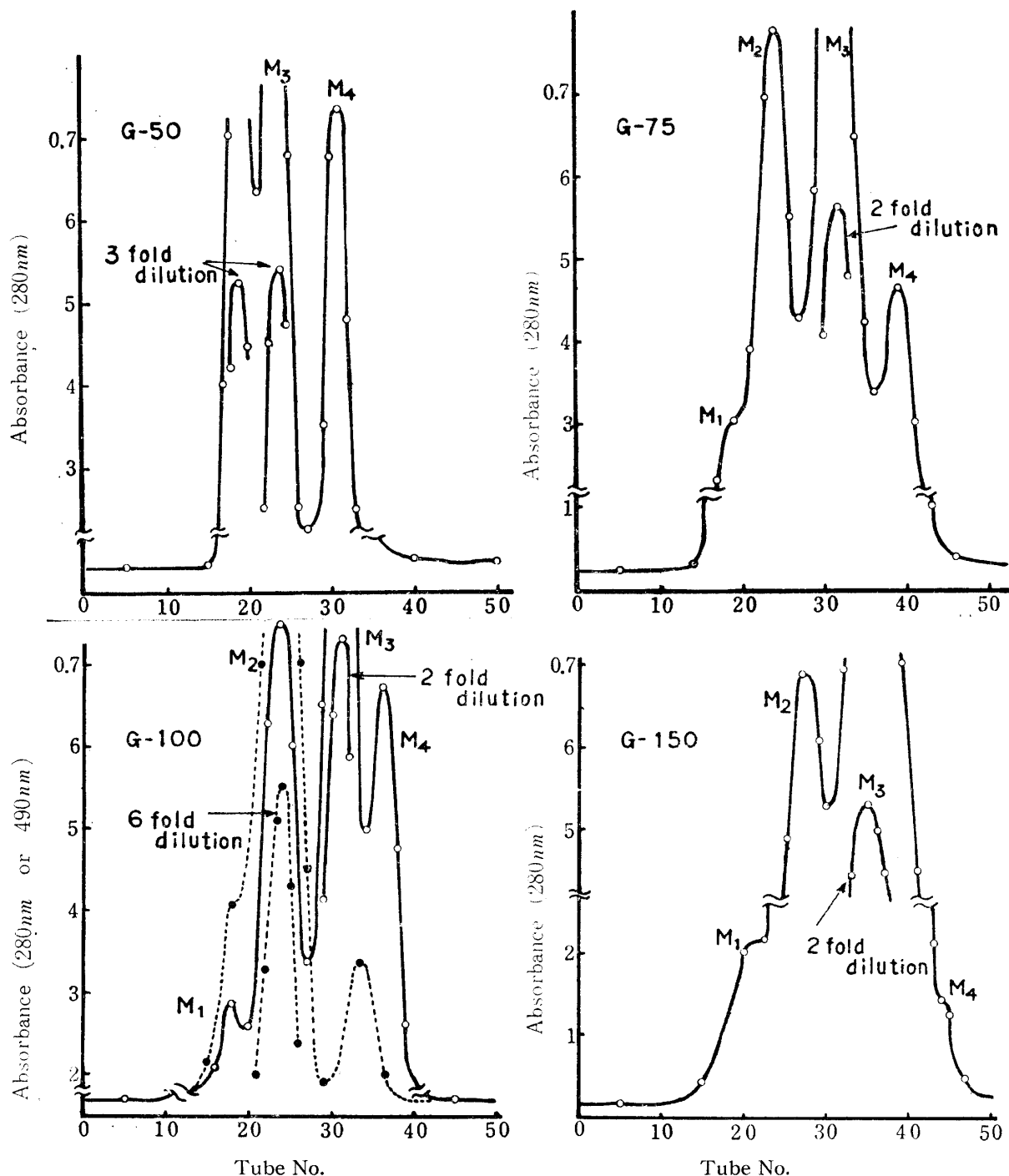


Fig. 15. Gel filtration of the Comp. I. II. III mixture on 4 different forms of Sephadex. Column; $2.2 \times 54cm$, Fraction size; $5ml$, Buffer; $0.1M$ acetate, pH 4.5, —○— Protein, Sugar.

物が溶出することが認められた。したがって、CM-セルロースカラムクロマトグラフィー、ついで、ゲル濾過を行なって分画した蛋白質画分について、糖の定量を行なう場合には、混入した CM-セルロース崩壊物の影響が考えられるのでゲル濾過における崩壊物の溶出位置をあらかじめ調べた。

CM-セルロースカラムから 0.025 M リン酸塩緩衝液 pH 8 および 0.05 M 炭酸塩緩衝液 pH 10 で溶出する液について Sephadex G-100 によるゲル濾過を行なった。溶出液中の糖の定量はフェノール硫酸法²⁴⁾で行ない、その糖の溶出位置を図 14 に示した。

CM-セルロースカラムには蛋白質を流していないため蛋白質の溶出はなく、糖が 33~34 本 (165~170ml) に溶出された。したがって、CM-セルロースの崩壊物と同じ位置に溶出される蛋白質の糖含量の測定は非常に困難であることがわかった。したがって、つぎに行なう Comp. I, II, III 混合画分のゲル濾過においては、CM-セルロースカラムクロマトグラフィーを行なわない試料についてのみ糖の定量を行なった。

まず、塩析分画した Comp. I, II, III 混合画分の分子量分布および糖含量をみるため Sephadex G-50, G-75, G-100, G-150 によるゲル濾過を行なった。その結果を図 15 に示した。

図 15 に示すように G-75 および G-100 ゲル濾過によって分離がもっともよく行なわれたので、それらの溶出像から蛋白質成分の分子量分布を推定した。分子量の大きいものから列挙すると、Comp. M₁, M₂, M₃, M₄ となり、4 成分に分離した。分子量分布が広い場合、Comp. M₁, M₂ は G-150, G-100 により、Comp. M₃, M₄ は G-75, G-50 によって良好な分離がえられた。溶出液の糖含量はすべての実験を通じて測定したが図 15 には 1 例のみを示した。各成分の割合、糖蛋白質比 (S-P 比) を表 6 に示した。

各成分の割合をみると Comp. M₁ は 8~11% を占

め、もっとも分子量の大きい成分である。Comp. M₂ はニワトリ卵白アルブミンに近い分子量であり、25~29% を占め、さらに、やや分子量の小さい Comp. M₃ は成分中もっとも多く、36~44% を占めていた。分子量のもっとも小さい Comp. M₄ は 18~22% であった。

各成分の糖含量についてみると、Comp. M₁ が 7~10%、Comp. M₂ が 16~17% であり、ともに高い糖含量を示した。したがって、両者は糖蛋白質であると考へた。これに対して、Comp. M₃ および M₄ はほとんど糖を含まず、なかでも Comp. M₄ は分子量がもっとも小さく、リゾチームであろうと推定した。

以上の結果から、アルブミンより高濃度硫酸で溶出される Comp. I, II, III 成分中にはほとんど糖を含まない蛋白質の存在が明らかになった。なお、糖を含まない蛋白質の含量も Comp. I, II, III 混合画分中約 60% を占めている。

つぎに、ここで得た Comp. M₁, M₂, M₃, M₄ と CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにおける Comp. E, F, G, H, J との関係を明らかにするため次記の実験を行なった。まず、CM-セルロースカラムクロマトグラフィーを行ない、Comp. E (溶出 pH 5.6), F(6.0), G(6.6), H(9.5), J(10.5) の 5 成分を分離し、これをさらに、前述したゲル濾過と同じ条件で Sephadex G-100 によりゲル濾過を行なった。その結果は図 16 の通りである。

Comp. E, F および G はいずれも Sephadex G-100 によるゲル濾過で、主成分は 32~33 本目に溶出する。すなわち、この 3 成分の溶出位置は図 15 に示した Comp. M₃ の溶出位置に一致する。このことは、Comp. E, F および G はそれぞれ等電点は異なるが分子量はほぼ等しいことを示しており、さらに、Comp. M₃ が糖をほとんど含まないこと (表 6 参照) などから、これら 3 成分も糖蛋白質ではなく、単純蛋

Table 6. Analysis of the components obtained from Comp. I, II, III mixture by gel filtration through different Sephadex.

Sephadex	G-50		G-75		G-100		G-150	
	Protein index	S-P ratio	Protein index	S-P ratio	Protein index	S-P ratio	Protein index	S-P ratio
M ₁	41.9	0.13	9.5	0.10	11.2	0.07	8.1	0.08
M ₂			28.4	0.17	28.5	0.17	24.5	0.16
M ₃	35.6	0.01	44.3	0.01	38.1	0.01	67.4	0.01
M ₄	22.5	0.01	17.8	0.02	22.3	0.02		

S-P ratio; Sugar-Protein ratio.

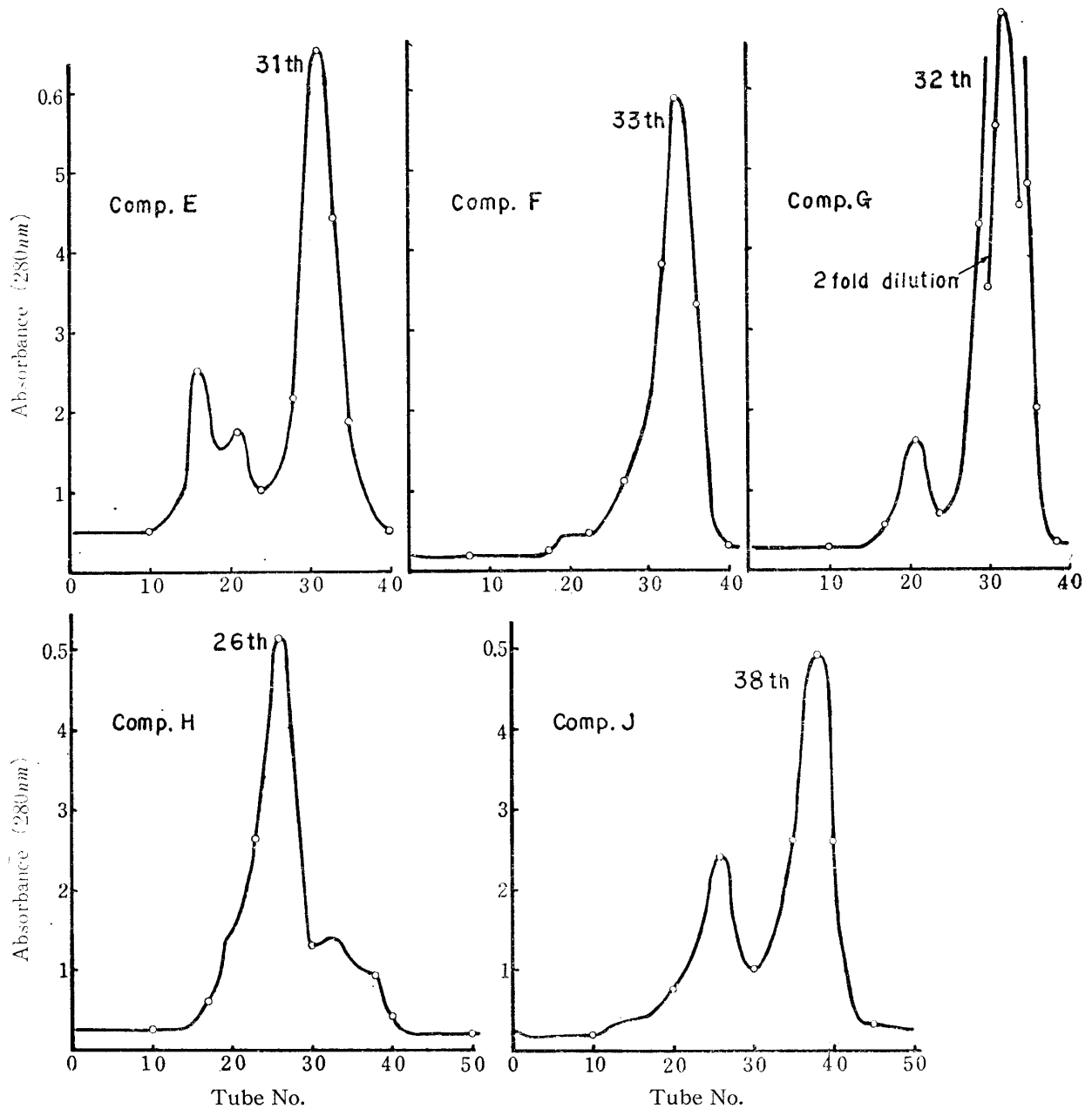


Fig. 16. Gel filtration of each component obtained by CM-cellulose column chromatography, on Sephadex G-100.

Column; $2.2 \times 54 \text{ cm}$, Fraction size; 5 ml , Buffer; 0.1 M acetate, pH 4.5.

白質であると推定した。

Comp. H はゲル濾過によりその主成分が26本目に溶出し, Comp. M₂ (図15参照)の溶出位置と一致する。さらに, ニワトリ卵白アルブミンのゲル濾過における溶出位置とほぼ一致することから, Comp. Hの分子量はニワトリ卵白アルブミンの分子量(46000)²⁴⁾と類似することが推定された。

Comp. Jはゲル濾過の結果より, 分子量はもっとも小さく, 溶出位置から Comp. M₄である。すなわち,

Comp. JはCM-セルロースカラムクロマトグラフィーによる溶出 pH および分子量が極めて小さいことからリゾチームと推定した。しかし, *Micrococcus lysodeikticus*に対する溶菌作用は認めることはできなかった。

以上の結果をさらに確認する目的で, Comp. I, II, III混合画分のSephadex G-100によるゲル濾過によって分離したComp. M₂, M₃をCM-セルロースカラムクロマトグラフィーにかけた。その結果を図17に

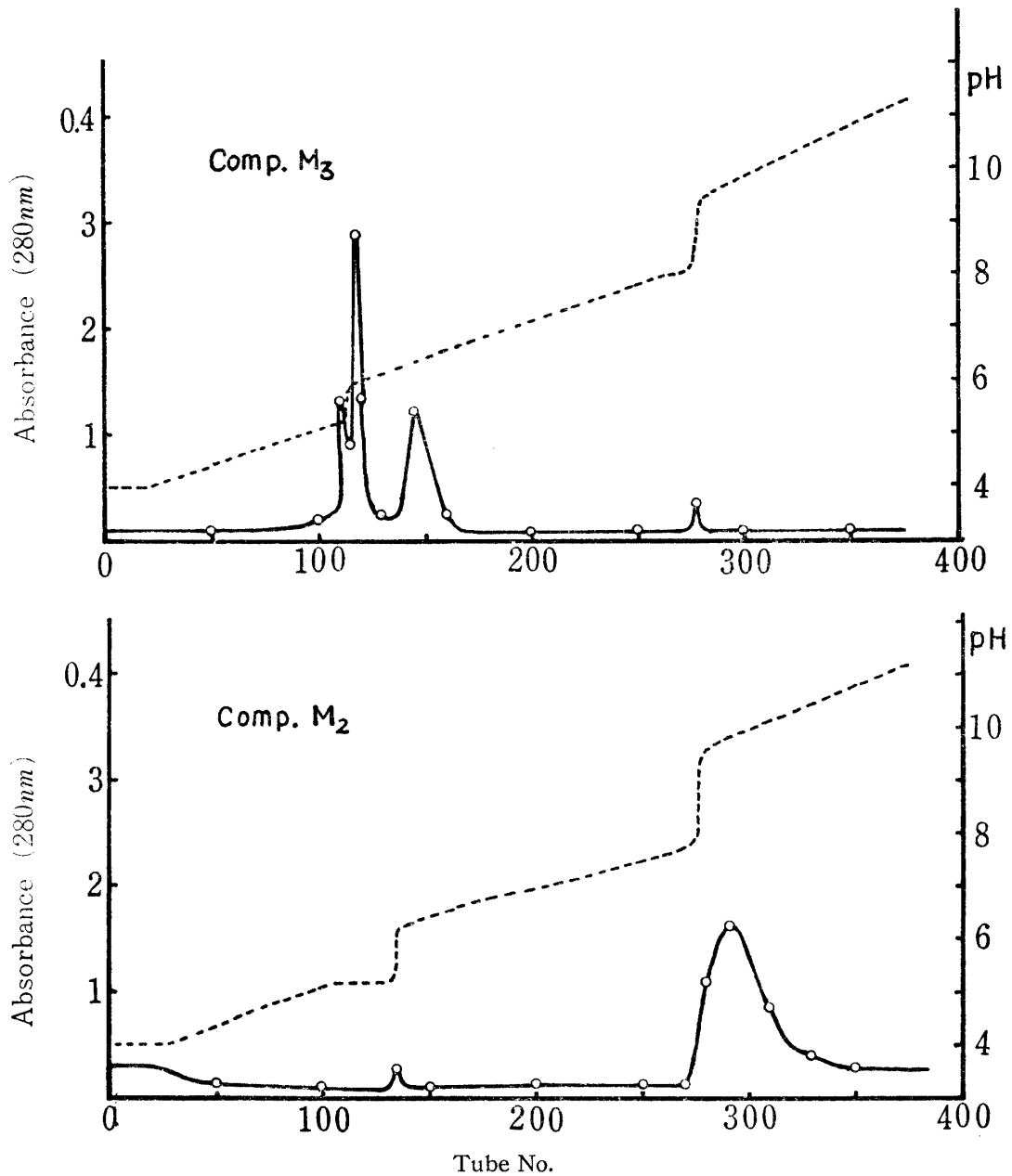


Fig. 17. Elution diagrams of Comp. M_2 and M_3 by CM-cellulose column chromatography. Column; $1.8 \times 20\text{cm}$, Fraction size; 5ml , —○—○— Protein, pH.

示した。

この結果, Comp. M_2 の溶出 pH は 9.8 で 1 個のピークを示し, CM-セルロースカラムクロマトグラフィー (図 11 参照) における Comp. H に一致することが認められた。Comp. M_3 は pH 5.4, 5.8~6.0, 6.4~6.5 に溶出する 3 個のピークを示した。これら 3 成分はそれぞれ単純蛋白質であり, Comp. E, F および G に相当することが明らかになり, 前述の結果と一致した。Comp. E, F, G, H および J の個々の性質については今後さらに詳細な検討が必要である。

要 約

海亀卵白の一般性状を調べ, ついで, 電気泳動, 塩濃度勾配抽出およびイオン交換セルロースカラムクロマトグラフィーにより, 構成蛋白質の分離を行ない, その性質を調べた。

その結果を要約すればつぎの通りである。

1) 海亀卵白の乾物量は 1.6%, 乾物中の窒素含量は 8.5~8.8% で, ニワトリ卵白に比し著しく低い値が

えられた。したがって、生卵白中の粗蛋白質量は 0.86% となり、異常に低いことが認められた。

2) 海亀卵白の *pH* 値はニワトリ卵白の値より高い。これは卵白中に等電点の高い蛋白質が相対的に多く存在することを示唆するものであったが、電気泳動により等電点の高い Comp. T₂, T₃ (IEP; 5.6~5.8, 9.7~9.9) が卵白蛋白質中 80~90% を占めることを認めた。

3) 硫酸による塩濃度勾配抽出においては、アルブミンよりも高濃度硫酸 (0.9 → 0.6 飽和) で溶出される成分が 37~38% を占めていた。この成分は CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにより 5 個の成分 (Comp. E, F, G, H, J) に分画され、Comp. H はニワトリ卵白アルブミンと類似の分子量で糖含量 17% の塩基性蛋白質であった。Comp. E, F, G は分子量が Comp. H よりやや小さく、糖を含まない蛋白質であった。Comp. J は分子量および CM-セルロースカラムクロマトグラフィーによる溶出 *pH* からリゾチームと考えられた。

4) 塩析でえられたアルブミンについて、CM-セルロースカラムクロマトグラフィーを行なった結果、*pH* 4.0 で吸着されない成分がアルブミン画分中約 85% を占めていた。

この特異なアルブミンを ST-オボアルブミン (Sea-turtle ovalbumin) と名づけた。

謝 辞

終りに臨み、本論文の作製に当り、御指導御鞭撻を賜った九州大学農学部船津勝教授並びに、林勝哉教授に感謝の意を表します。また、実験に協力された元本研究室勤務加納恭子嬢に感謝致します。

なお、実験材料の採取に際して、御協力を戴いた鹿児島県熊毛郡屋久町栗生中学校の皆様御好意に感謝致します。

文 献

- 1) FEENEY, R. E., RHODES, M. B. and AZARI, P. R.: *J. Biol. Chem.*, **230**, 399~408 (1958).
- 2) 金森正雄, 前田一郎: 西京大学術報告 (農学), **9**, 83~88 (1957).
- 3) 金森正雄: 西京大学術報告 (農学), **10**, 1~7 (1957).
- 4) 金森正雄, 河端信: 京都府立大学術報告, **11**, 182~186 (1959).
- 5) 金森正雄, 河端信: 京都府立大学術報告, **12**, 145~151 (1960).
- 6) NARITA, K. and ISHII, J.: *J. Biochem.*, **52**, 367~373 (1962).
- 7) MARKS, G. S., MARSHALL, R. D. and NEUBERGER, A.: *Biochem. J.*, **87**, 274-281 (1963).
- 8) JOHANSEN, P. G., MARSHALL, R. D. and NEUBERGER, A.: *Nature*, **181**, 1345-1346 (1958).
- 9) FEENEY, R. E., OSUGA, D. T. and MAEDA, H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **119**, 124-132 (1967).
- 10) FEENEY, R. E., STEVENS, F. C. and OSUGA, D. T.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 1415-1418 (1963).
- 11) CLARK, J. R., OSUGA, D. T. and FEENEY, R. E.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 3621-3631 (1963).
- 12) FEENEY, R. E., RHODES, M. B. and BENNETT, N.: *J. Biol. Chem.*, **235**, 1686-1693 (1960).
- 13) KOGA, K.: *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **7**, (1) 15-33 (1969).
- 14) KOGA, K.: *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **7**, (1) 35-46 (1969).
- 15) KOGA, K., FUKUNAGA, T. and HIRASE, Y.: *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **8**, (1) 39-51 (1972).
- 16) 古賀克也, 福永隆生, 田畑道広: 農化大会講演要旨, 307-307 (1970).
- 17) 古賀克也, 実方紘泰, 福永隆生: 日畜大会 (第 57 回) 講演要旨, 59-60 (1969).
- 18) 古賀克也, 福永隆生, 江崎正: 農化大会講演要旨, 308-308 (1970).
- 19) 古賀克也, 福永隆生, 山村隆治: 農化関西・西日本支部合同大会講演要旨, 15-15 (1971).
- 20) 古賀克也, 福永隆生, 内山康四郎: 農化関西・西日本支部合同大会講演要旨, 16-16 (1971).
- 21) 近藤金助, 山田孝雄, 長島正夫: 日化誌, **58**, 108-117 (1937).
- 22) 近藤金助, 長島正夫, 森重新一: 農化誌, **15**, 737-743 (1939).
- 23) 平井秀松: 標準生化学実験法, 580-580 (1953). 文光堂
- 24) DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. and SMITH, F.: *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956).
- 25) 副島正夫: 蛋白質・核酸・酵素, **9**, 1235-1243 (1964).
- 26) LONGSWORTH, L. G., CANNAN, R. K. and MAC INNES, D. A.: *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 2580-2590 (1940).
- 27) ARMSTRONG, S. H. JR, BUDKA, M. J. E. and MORRISON, K. C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 416-429 (1947).
- 28) AOKI, K. and FOSTER, J. F.: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3385-3396 (1957).
- 29) FORSYTHE, R. H. and FOSTER, J. F.: *J. Biol. Chem.*, **184**, 377-383 (1950).
- 30) PERLMANN, G. E. and KAUFMAN, D.: *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 638-641 (1945).
- 31) COHN, E. J., MC MEEKIN, T. L., ONCLEY, J. L., NEWELL, J. M. and HUGHES, W. L.: *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 3386-3393 (1940).
- 32) 金森正雄, 河端信: 農化誌, **38**, 367-371 (1964).
- 33) 河端信, 金森正雄: 京都府立大学術報告, **12**, 152-154 (1960).
- 34) 水島三一郎, 赤堀四郎: 蛋白質化学, **2**, 138-138 (1954) 共立出版。

Summary

A sea-turtle (*Caretta caretta olivacea*) lays a lot of eggs in summer on the sandy coast of Yaku-island lying south in Kyushu-Province; the hatching is to be, normally, carried out by the function of the radiative-heat of the sun, received the eggs buried under the sand. On the other hand, it was observed that its egg white is not to be coagulated even if it is left in the boiling water. Hence, it was assumed that the sea-turtle's egg white contains a large amount of glycoprotein which is not coagulable by heat-treatment.

The authors examined some general chemical properties of the sea-turtle's egg white and then investigated the constitutional proteins of the egg white by the moving boundary electrophoresis, the gradient extraction with ammonium sulfate, the salting-out method and the CM-cellulose chromatography.

The results obtained were summarized as follows:

1) Dry matter content in the sea-turtle's egg white in comparison with that in the chicken's egg white was remarkably small, amounting only to 1.6 %; the protein content being one-half of the dry matter content.

2) The *pH* value of the sea-turtle's egg white was higher than that of the chicken's egg white, and this suggests that the protein having a high isoelectric point is contained more in the sea-turtle's egg white than it is in the chicken's. Through electrophoretic studies, the amounts of the proteins having relatively high isoelectric points such as component T₂ and T₃ (IEP; 5.6~5.8 and 9.7~9.9, respectively) were confirmed to be 80~90 % in the protein of the sea-turtle's egg white.

3) By the gradient extraction with ammonium sulfate, the amount of the ovomucoid fraction extracted from the sea-turtle's egg white protein by 0.9 → 0.6 saturated ammonium sulfate was ascertained to be remarkably large, amounting to 37~38 % in the soluble protein.

The ovomucoid fraction was separated into five components (Comp. E, F, G, H and J) on CM-cellulose column chromatography, the molecular weight of the component H resembling that of the chicken ovalbumin; however, it was proved to be a basic glycoprotein, in which the neutral sugar content was 17 %. The molecular weights of the component E, F and G were ascertained, respectively, to be smaller than the value of the chicken ovalbumin, sugar content being little. Judging from the molecular weight and the chromatographic behavior on CM-cellulose, component J is assumed to be lysozyme.

4) No less than 85 % of ovalbumin was confirmed to be a unique ovalbumin which is to be undisorbed on CM-cellulose column at *pH* 4.0, which was called "ST-ovalbumin".