

海 亀 卵 白 の 蛋 白 質 に 関 す る 研 究

(第2報) 新タイプの蛋白質“ST-オボアルブミン”
の化学的性質および組成について

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 II. On the Chemical Properties and Constitutions of a New Protein “ST-ovalbumin”

Takao FUKUNAGA and Katsuya KOGA.
(Laboratory of Animal Biochemistry)

目 次

第1章 緒 言	107
第2章 新タイプの蛋白質“ST-オボアルブミン” のDEAE-セルロースカラムクロマトグラ フィー	108
第3章 ST-オボアルブミンの電気泳動	109
第4章 ST-オボアルブミンの滴定曲線	110
第5章 ST-オボアルブミンのゲル透過	111
第1節 塩析により得られたオボアルブミンのゲル 透過	111
第2節 種々の Sephadex による ST-オボアルブ ミンのゲル透過	112
第3節 ST-オボアルブミンの尿素含有緩衝液中 でのゲル透過	112
第4節 ST-オボアルブミンのチオール化合物に よる還元	115
第5節 小 括	116
第6章 ST-オボアルブミンに対する酸、アルカリお よび熱の影響	116
第1節 酸の影響	116
第2節 熱の影響	116
第3節 熱、酸およびアルカリ処理を行なったST- オボアルブミンの CM-セルロースカラム クロマトグラフィー	119
第4節 小 括	121
第7章 ST-オボアルブミンの化学的性質	122
第1節 ST-オボアルブミンの濃度と吸光度との関 係	122
第2節 アミノ酸組成	122
第3節 中性糖の種類とその含量	123
第4節 アミノ糖の種類とその含量	124
第5節 N末端アミノ酸	125
第6節 揮発性酸の含量	126

第7節 窒素含量	127
第8節 小 括	128
第8章 考察と総括	128

第1章 緒 言

前報¹⁾において、海亀卵白は電気泳動、塩濃度勾配抽出、CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにおける分離状態ならびに挙動がニワトリ卵白とは著しく異なることを報告した。また、海亀卵白中もっとも多く、硫酸に対する溶解性からアルブミン系に属する蛋白質が、一般の鳥類のオボアルブミンとは異なる挙動を示すことを認めた。ニワトリ卵白アルブミンについては、詳細に研究され、そのグリコペプチドについては、MONTGOMERY ら²⁻⁵⁾、NEUBERGER ら⁶⁻¹³⁾ および HOUGH ら^{14, 15)} の詳細な研究がある。また、炭水化物は分岐鎖状構造であろうと推定された¹⁵⁾。成田 ら¹⁶⁾ はオボアルブミンを部分加水分解し、N-acetyl-Gly-Ser-Gly-Ile-AlaOH を分離し、これが N 末端から導びかれたものであろうと述べている。

これに対し、海亀卵白アルブミンについては近藤ら¹⁷⁾ の報告をみるのみで、まったく明らかにされていない。したがって、前報¹⁾ で確認した特異なアルブミン (Comp. A)、すなわち、sea-turtle ovalbumin (ST-オボアルブミンと呼称する) を塩析分画、CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにより分離精製し、種々の性質を調べた。この蛋白質の等電点は5.6近傍にあり、*pH* 4.0 では正に荷電しているにもかかわらず、CM-セルロースには吸着されないという、特異な性質が認められた。また、この蛋白質は中性糖

含量も高く6.8%であり、グルコサミン含量も他鳥類のオボアルブミンのそれに比べて高く3.2%であった。これからみて、ST-オボアルブミンはオボムコイドに近い組成の蛋白質であると推察された。さらに、このST-オボアルブミンは熱、酸によって凝固しにくいアルブミンであって、このようなアルブミンは鳥類卵白には存在が認められていない。

このような特異な性質をもつST-オボアルブミンは自然界で産卵孵化する際、保護的役割を十分に果たしているものと考えられるので、本報では、このST-オボアルブミンの種々の化学的性質および組成を明らかにした。

第2章 新タイプの蛋白質“ST-オボアルブミン”の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー

ST-オボアルブミンは前報¹⁾で述べたように、CM-セルロースカラムに吸着されない特異な性質をもつアルブミンである。そこで、アニオン交換セルロースによるカラムクロマトグラフィーを試みた。

使用した DEAE-セルロースは Serva 社ならびに Brown 社製のもので、これを 0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.1) に平衡化して、1.8×6cm になるようにカラムに充填した。上記緩衝液に透析した試料溶液は1%に調整し、その 5ml をカラムに吸着させ塩化ナトリ

ウム濃度の上昇により溶出を行なった。

塩濃度の上昇には、前報¹⁾で用いた塩濃度勾配抽出法の装置を用いた。その結果を図1に示した。

この結果、ST-オボアルブミンは 0.04~0.10M NaCl-Tris-HCl 緩衝液で、1つの画分として溶出され、単一成分であることが確かめられた。

ST-オボアルブミンは前報¹⁾で述べたように、pH 4.0でCM-セルロースに吸着されず、DEAE-セルロースに吸着されるという現象は等電点が4.0以下である可能性を示唆しているが、本報第3章で述べるように、実際に測定された等電点は予期に反して、5.6近傍であった。この非吸着現象はおもに、ST-オボアルブミン分子中におけるアミノ基とカルボキシル基の立体的な位置の相違に基因するものと考えられる。

イオン交換体による蛋白質の吸着において、蛋白質の解離基が主導的役割をもつが、さらに、水素結合や *van der Waals* 力などによる二次的結合も吸着に関与することが知られている。いずれにしても、イオン交換体と蛋白質の結合は固相 (CM-セルロース) と液相 (蛋白質溶液) との反応であり、しかも、吸着に関与するのは、主として蛋白質分子の表面に存在する解離基と考えられる。ところが、移動界面電気泳動においては分子の内部に存在する解離基も蛋白質の荷電に関係していると考えられる。以上のことが CM-セルロースに対する挙動と、電気泳動の挙動の差として現わ

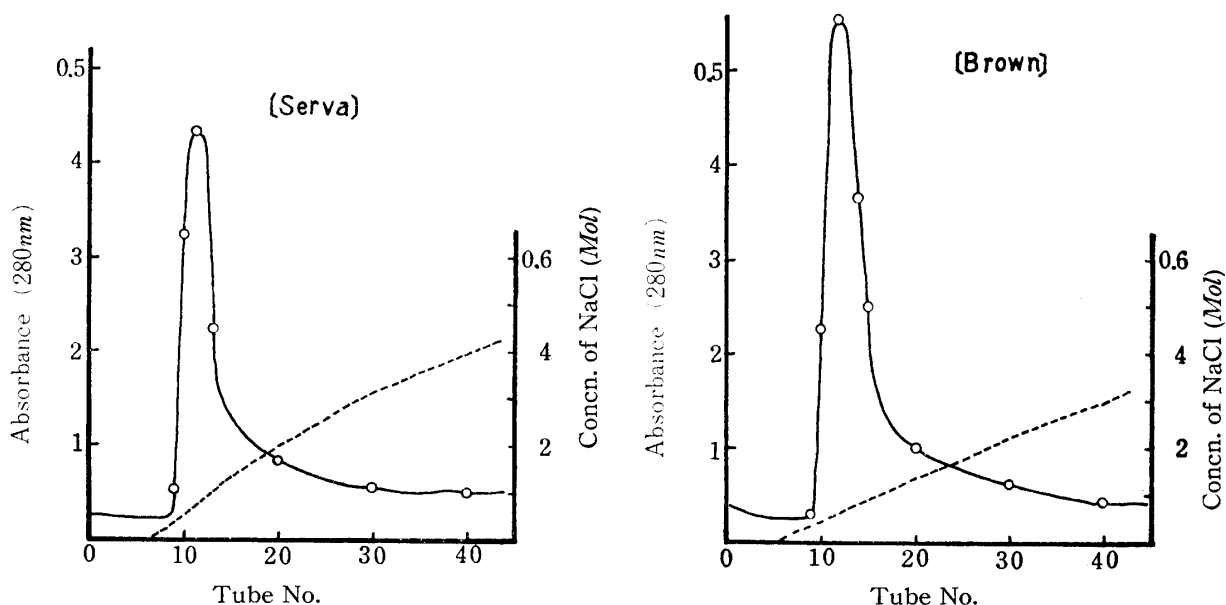


Fig. 1. DEAE-cellulose column chromatography of the ST-ovalbumin.

Both of Serva and Brown company's DEAE-cellulose were used for column chromatography. Column; 1.8×6cm, Fraction size; 5ml, Buffer; 0.05 M Tris-HCl, pH 8.1, —○— Protein, Conc. of salt.

れる可能性がある。したがって、ST-オボアルブミン分子中において、アミノ基は分子の内部に相対的に多く存在し、カルボキシル基は分子の表面に相対的に多く存在して、表面での net charge が負にかたむいていると考えれば、イオン交換セルロースに対する挙動を定性的に説明することができる。

第3章 ST-オボアルブミンの電気泳動

卵白の pH がニワトリ卵白より高いことから、等電点の高い蛋白質が相対的に多く存在することが推定された。卵白中もっとも多い ST-オボアルブミンは CM-セルロースカラムクロマトグラフィーの結果からは、等電点が 4.0 あるいはそれ以下と推定された。そこで、まず ST-オボアルブミンについて、酢酸塩緩衝液 (pH 4.0, イオン強度 0.1) 中で日立 HD-1 型チ

ゼリウスの電気泳動装置による移動界面電気泳動を行ない電気的性質を検討した。なお、塩析によって分離したアルブミン画分についても、同様の条件で電気泳動を行ない、これらの結果をあわせて図2に示した。

塩析によりえたアルブミン画分は電気泳動によって3個のピークを示すが、ST-オボアルブミンは単一のピークのみを示した。この結果からも、ST-オボアルブミンは十分精製されていることが推定された。

ST-オボアルブミンの移動度は $+10.0 \times 10^{-5} (cm^2/sec \cdot volt)$ であり、 pH 4.0 において正に荷電している。このことは等電点が 4.0 以上であることを意味している。したがって、等電点を求めるため、種々の pH のリン酸塩緩衝液、イオン強度 0.1, を用い電気泳動を行ない、つぎの式で移動度を求めた。

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

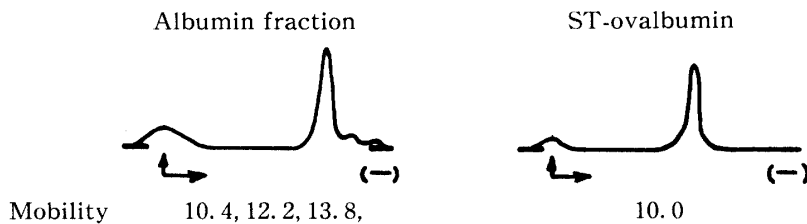


Fig. 2. Electrophoretic diagrams of the albumin fraction and the ST-ovalbumin (ascending side).

Buffer; acetate, pH 4.0, $\mu = 0.1$, Mobility unit; $10^{-5} cm^2/sec. volt$.

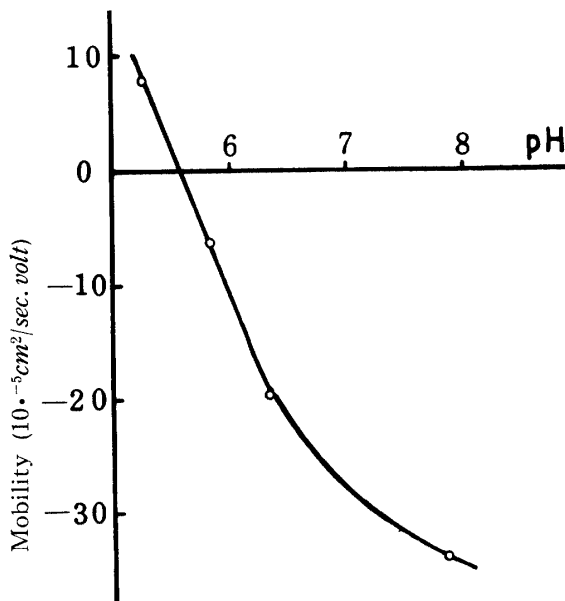


Fig. 3. Mobility of the ST-ovalbumin at different pH values on the ascending side (at $15^\circ C$).

Buffer; Phosphate, $\mu = 0.1$

d = 移動距離 (cm), s = セル断面積 (cm^2), k = 比伝導度 (mho), i = 電流 ($ampere$), t = 泳動時間 ($second$).

この移動度と pH との関係をプロットした結果を図3に示した。

この結果から、ST-オボアルブミンの等電点は 5.6 近傍であることが明らかにされた。近藤ら¹⁷⁾ は比粘度が等電点で最小となり、また、熱凝固が等電点で最大に発現するということから、海亀卵白アルブミンの等電点を求め、5.75 付近にあることを発表している。

一般に、CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにおける溶出 pH はほぼ等電点に近いという考え方は、蛋白質の解離性残基が分子の表面に存在する場合には、肯定できることであり、大部分の蛋白質について通用してきた。

RICHARDS¹⁸⁾ はミオグロビン分子について、X 線を用いた実験で親水性残基の大部分は分子の表面に存在し、疎水性基は内部に多いと述べている。

ST-オボアルブミンの CM-セルロースならびに DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーの挙動

と電気泳動との関係を上述の見地からみれば、ST-オボアルブミンでは親水性基、とくに、アミノ基が通常の他の蛋白質とことなり、分子内部に相対的に多く存在することが考えられる。

ST-オボアルブミンは CM-セルロース、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー、移動界面電気泳動の結果、単一のピークを示し、単一成分であることが認められた。さらに、これを再確認するため、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を試みた。

ディスク電気泳動は WATANABE の方法¹⁹⁾に従い、つぎのゲル組成で行なった。

ポリアクリルアミドゲルの調製

〔試薬〕 A液; 1N HCl 24ml, Tris 18.25g, アクリルアミドモノマー 19.0g, Bis. 1.0g, を水に溶かし 100ml とした。

B液; DMAPN 1.0ml を水で 100ml とした。

C液; (NH₄)₂S₂O₄ 1.0g を水にとかし 100ml とした。

D液; 5N HCl 12ml, Tris 7.5g, TEMED 2.87ml を水にとかし 50ml とした。

E液; アクリルアミドモノマー 10g, Bis 2.5g を水に溶かし 40ml とした。

F液; リボフラビン 4.0mg を水に溶かし 100ml とした。

註) Tris : Tris (hydroxymethyl) aminomethane
Bis : NN' Methylenebisacrylamide
DMAPN : Dimethylaminopropionitrile
TEMED : NNN'N' Tetramethylethylenediamine

装置は硝英製作所のアクリルアミドゲル電気泳動装置の I 型を用いた。

第 1 層 (細孔ゲル) は A : B : C = 2 : 1 : 1 に混合

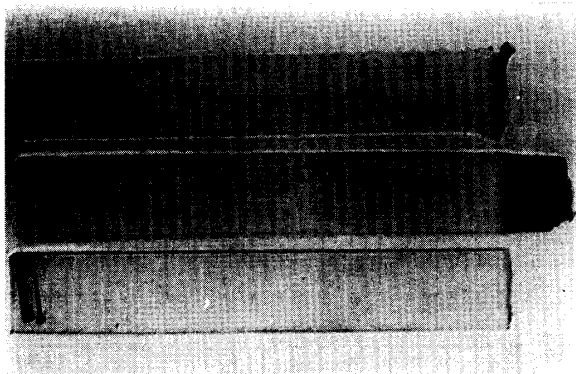


Fig. 4. Electrophoretic patterns of the ST-ovalbumin by polyacrylamide gel.

し、注入して 3~5 分でゲル化した。第 2 層 (粗孔ゲル) は D : E : F : 水 = 1 : 2 : 1 : 5 に混合し、約 60 分間蛍光灯を当ててゲル化を進めた。第 3 層 (試料層) は第 2 層上に、第 2 層の混合液の水の代りに、試料を混合したものを流し込み、第 2 層同様光重合させた。

泳動用緩衝液: Tris 6g, グリシン 28.8g を水に溶かして 100ml とし、10 倍に希釈して使用した。

泳動条件 : 5mA, 5時間。

実験結果を図 4 に示した。

この結果からも、1 個のバンドのみを認めたので、ST-オボアルブミンは純化されたことが確認された。

第 4 章 ST-オボアルブミンの滴定曲線

ST-オボアルブミン水溶液 5ml (蛋白質: 39mg) を分取し、これに種々の量の 0.02N HCl, あるいは 0.02N NaOH を加え、それぞれ蒸留水で 20ml にした後、冷蔵庫に 5 日間放置し、不連続法により滴定曲線を作製した。同時に対照として、0.02N HCl-0.02N NaOH のみについて同一条件で pH を測定した。図 5 にえられた滴定曲線を示す。

この図より明らかなように、ST-オボアルブミンは

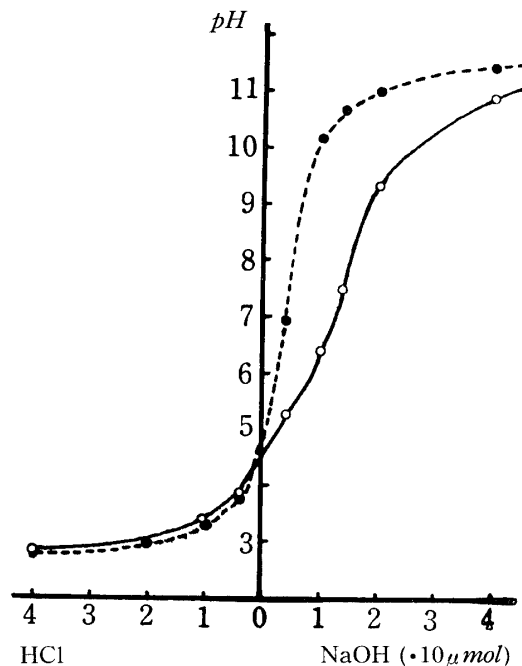


Fig. 5. Titration curve of the ST-ovalbumin.

Protein; 39mg,

Abscissa; added volume

—○—○— ST-ovalbumin,

..... 0.02M HCl-NaOH.

対照に比し、アルカリに対する緩衝作用が大きいのに、酸に対する緩衝作用は小さく、ほとんど認められなかった。また、ST-オボアルブミンは CM-セルロースに吸着されず、DEAE-セルロースに吸着されるということと、滴定曲線において、塩酸の消費はほとんどみられず、か性ソーダのみが消費されることは共通点があるように思われる。すなわち、アミノ基は CM-セルロースに吸着するために必要であるが、ST-オボアルブミンが CM-セルロースに吸着されないことはこのアミノ基の欠除を示唆しており、塩酸の消費が見られないことと符合する。さらに、DEAE-セルロースへの吸着はカルボキシル基の解離を示すものである。しかし、第3章で、すでに述べたように、ST-オボアルブミンの等電点がニワトリ卵白アルブミンより高いことから、ST-オボアルブミンがニワトリ卵白アルブミンに比し、塩基性基が相対的に多く、かつ、この塩基性基は少なくとも、分子の表面には存在せず、分子の内部に存在すると考えれば、今まで述べてきた ST-オボアルブミンの種々の電氣的挙動がうまく説明づけられる。

第5章 ST-オボアルブミンのゲル濾過

第1節 塩析によりえられたオボアルブミンのゲル濾過

前報¹⁾の塩濃度勾配抽出によりえられた硫酸濃度を用いて、アルブミン画分を分離した。この画分について、ゲル濾過を行ない、CM-セルロースカラムクロマトグラフィーの結果と比較した。

ゲル濾過は Sephadex G-75 の $2.2 \times 52\text{cm}$ カラムを用い、 0.1M 酢酸塩緩衝液 $\text{pH } 4.5$ により upward flow 法で行なった。流速は $10 \sim 15\text{ml/hr}$ で 5ml ずつドロップカウンターフラクションコレクターによって分画した。その結果を図6に示した。このゲル濾過によって、3個の画分（溶出順に Comp. a, b, c とする）が分離された。

各画分中の蛋白質質量および量比を表1に示した。

Table 1. Proportion of the components separated from albumin fraction on the Sephadex G-75.

Component	a	b	c	total
Protein (mg)	177.3	40.4	5.2	222.9
Index	79.5	18.1	2.4	100

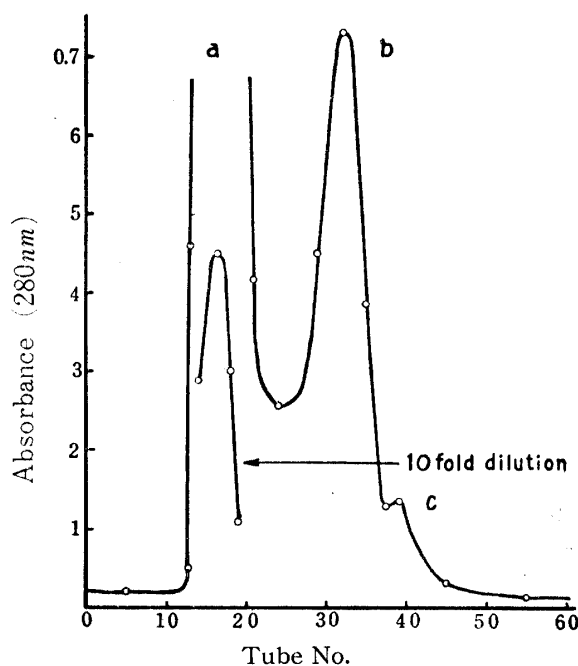


Fig. 6. Gel filtration of the albumin fraction* on Sephadex G-75.

Column ; $2.2 \times 52\text{cm}$, Fraction size ; 5ml , Buffer ; 0.1M acetate, $\text{pH } 4.5$.

* Obtained by the salting-out method.

最初に溶出する Comp. a の溶出位置はブルーデキストランの溶出位置と一致し、したがって、Sephadex G-75 の分画範囲から、Comp. a の分子量は 70000 以上と推定した。また、Comp. a はアルブミン画分中約 80% を占め、もっとも多い成分であり、これを CM-セルロースカラムクロマトグラフィーの結果¹⁾と比較すると、量的にみて CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにおける Comp. A (ST-オボアルブミン) に相当すると考えられる。

第2節 種々の Sephadex による ST-オボアルブミンのゲル濾過

ST-オボアルブミンの分子量を推定するため、まず Sephadex G-100 の $2.2 \times 54\text{cm}$ カラムで 0.1M NaCl - 0.05M Tris-HCl 緩衝液を用いて、ST-オボアルブミンとニワトリ卵白アルブミンのゲル濾過を行ない、両者の溶出曲線を比較した。溶出曲線を図 7 に示した。

その結果、ST-オボアルブミンは Comp. a と同様に、ブルーデキストランの溶出位置に溶出したが、ニ

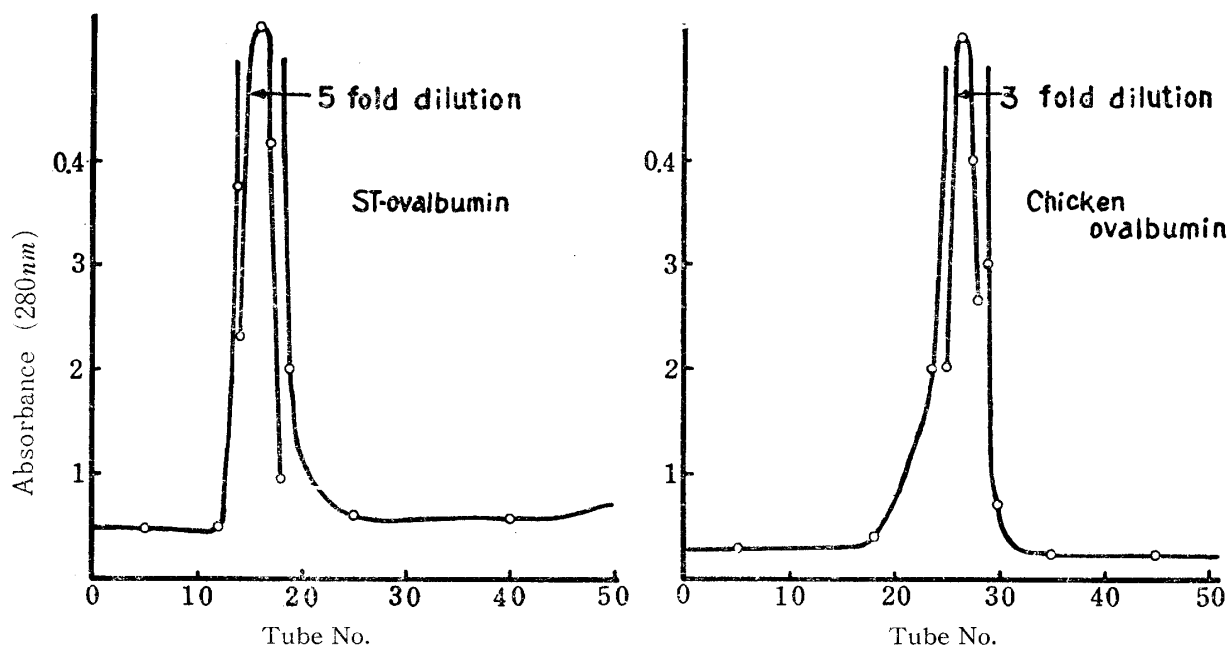


Fig. 7. Gel filtration of the ST-ovalbumin and chicken ovalbumin on Sephadex G-100.

Column ; $2.2 \times 54\text{cm}$, Fraction size ; 5ml ,
Buffer ; 0.1M NaCl - 0.05M Tris-HCl , $\text{pH } 8.1$.

ワトリ卵白アルブミンはこれより 10 本 (50ml) 遅れて溶出した。この結果からも、ST-オボアルブミンの分子量はニワトリ卵白アルブミンのそれ (46000)²⁰⁾ より大きいことが明白である。さらに、Sephadex G-75, G-100, G-150 を用いて 0.1M 酢酸塩緩衝液, $\text{pH } 4.5$ で ST-オボアルブミンのゲル濾過を行ない、その結果を図 8 に示した。

この溶出曲線から明らかなように、いずれの場合も ST-オボアルブミンはブルーデキストランと同じ位置に溶出された。ST-オボアルブミンの分子量を Sephadex G-150 の分画範囲から推定すると、 400000 以上と考えられる。これはニワトリ卵白アルブミンの分子量 (46000)²⁰⁾ に対して、約 10 倍の巨大分子であり、アルブミンとしては他に例をみない。従来、大きな分子量をもつ蛋白質とされていたエデスチン²¹⁾、エクセ

ルシン²²⁾、アマンディン²²⁾、カゼイン²¹⁾、ヘモグロビン²¹⁾ などはいずれも、尿素その他の変性剤により、数分の一の分子量をもつサブユニットに解離することが明らかにされている。また、インシュリン^{23, 24)} や、リシン²⁵⁾ のように 2 つ以上の分子がジスルフィド結合によって結合した例はあるが、現在 1 本鎖で分子量が 100000 以上のものはないと考えられている。このような見地から、ST-オボアルブミンは水素結合、またはジスルフィド結合によって、会合した巨大分子である可能性も考えられるので、この点を明確にするため以下の実験を行なった。

第3節 ST-オボアルブミンの尿素含有緩衝液中でのゲル濾過

第2節において、ST-オボアルブミンはアルブミンとしては例をみない巨大分子であることを推定した

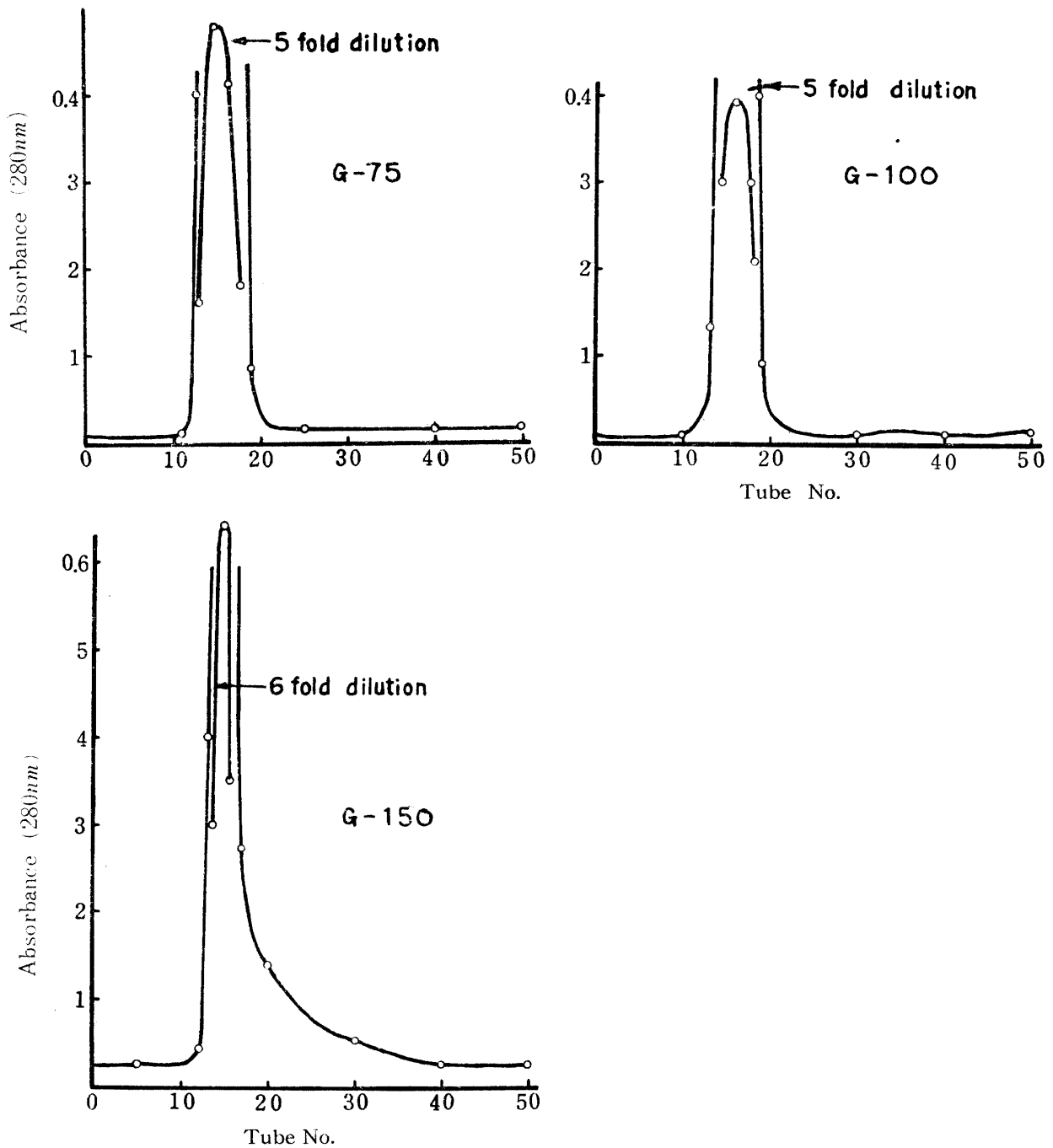


Fig. 8. Gel filtration of the ST-ovalbumin on 3 different forms of Sephadex.

Column ; 2.2×54 cm, Fraction size ; 5 ml,

Buffer ; 0.1 M acetate, pH 4.5.

が、血清アルブミンについては PEDERSEN²⁶⁾ が 0.1 M NaCl-Tris-HCl 緩衝液を用いた Sephadex G-150 によるゲル濾過で、始めてアルブミンの 2, 3 および 4 量体を認めている。

第 2 節の図 7 に示すように、同一緩衝液を用いた結果では、解離している様相は認められなかったので、尿素含有の緩衝液によるゲル濾過を行なった。緩衝液

は 0.1 M 酢酸塩、0.1 M リン酸塩および 0.1 M 炭酸塩緩衝液を用い、尿素濃度は 5~8 M を使用して Sephadex G-100 によるゲル濾過を行ない、その結果の一例を図 9 に示した。

ST-オボアルブミンは pH 4.8~10.6 における尿素含有 (5~8 M) 緩衝液によるゲル濾過において、いづれも尿素を含有しない緩衝液を用いたゲル濾過の場合

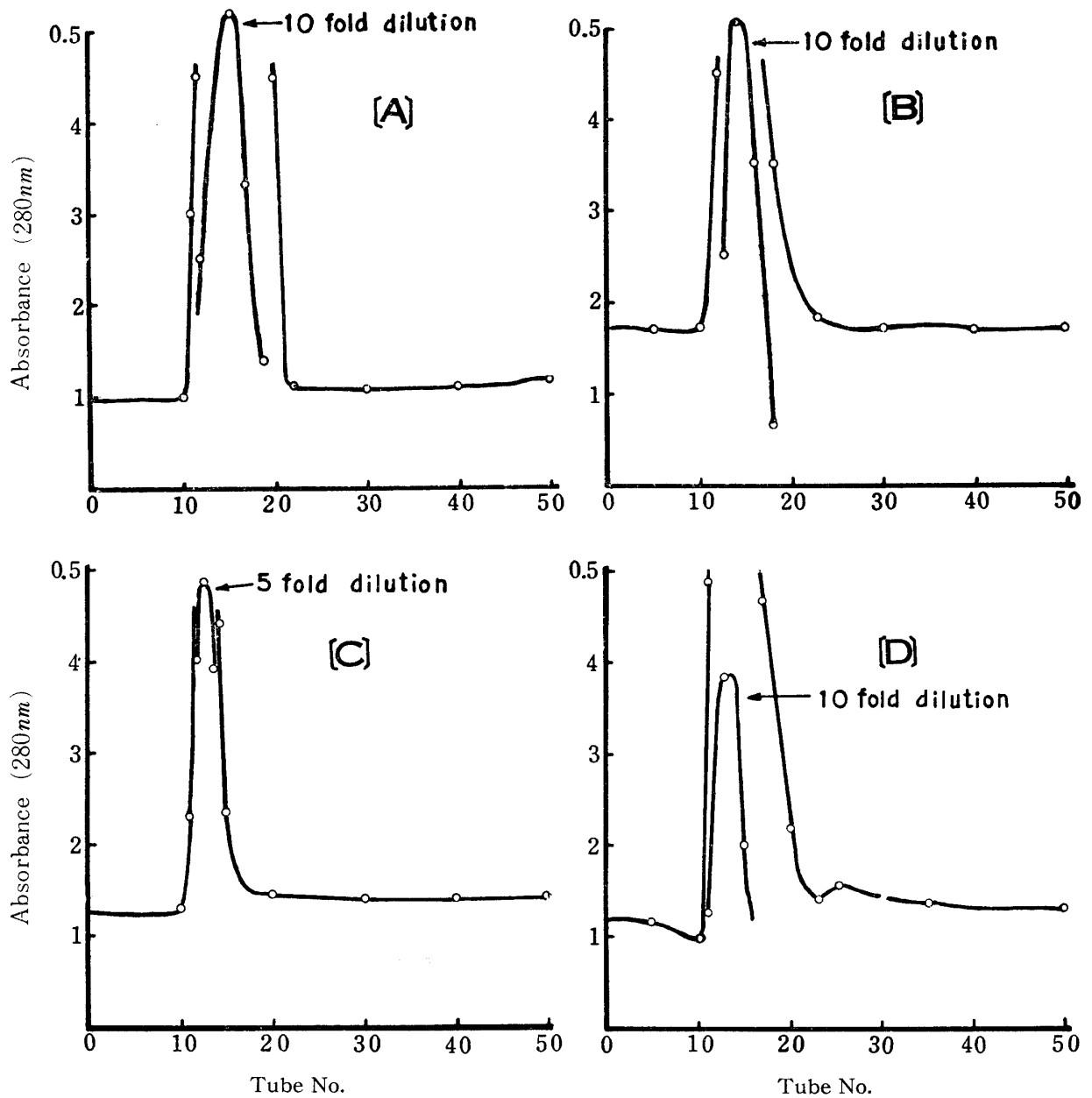


Fig. 9. Gel filtration of the ST-ovalbumin on Sephadex G-100 column with the buffer containing the different amounts of urea.

Column ; $2.2 \times 54 \text{ cm}$, Fraction size ; 5 ml .

Buffer ; (A) 5 M urea in 0.1 M acetate, $\text{pH } 4.8$.

(B) 5 M urea in 0.1 M phosphate, $\text{pH } 8.3$.

(C) 8 M urea in 0.1 M phosphate, $\text{pH } 8.0$.

(D) 7 M urea in 0.1 M carbonate, $\text{pH } 10.6$.

と同じようにブルーデキストランの位置に溶出した。さらに、金属イオンを媒介として会合体形成が行なわれているか否かの検討を試みた。すなわち、 7 M 尿素含有緩衝液に 10^{-3} M の EDTA を添加した液を用いてゲル濾過を行なった。その結果を図 10 に示した。

ST-オボアルブミンは EDTA 添加の場合も、図 9

と同様にブルーデキストランと同じ位置に溶出し、新しいピークは認められなかった。

PEDERSEN²⁶⁾ が述べている牛の血清アルブミンに見られるような会合体も認められず、尿素を用いて水素結合を切断しても、あるいは EDTA を添加して除金属処理を行なっても解離現象は認められなかった。

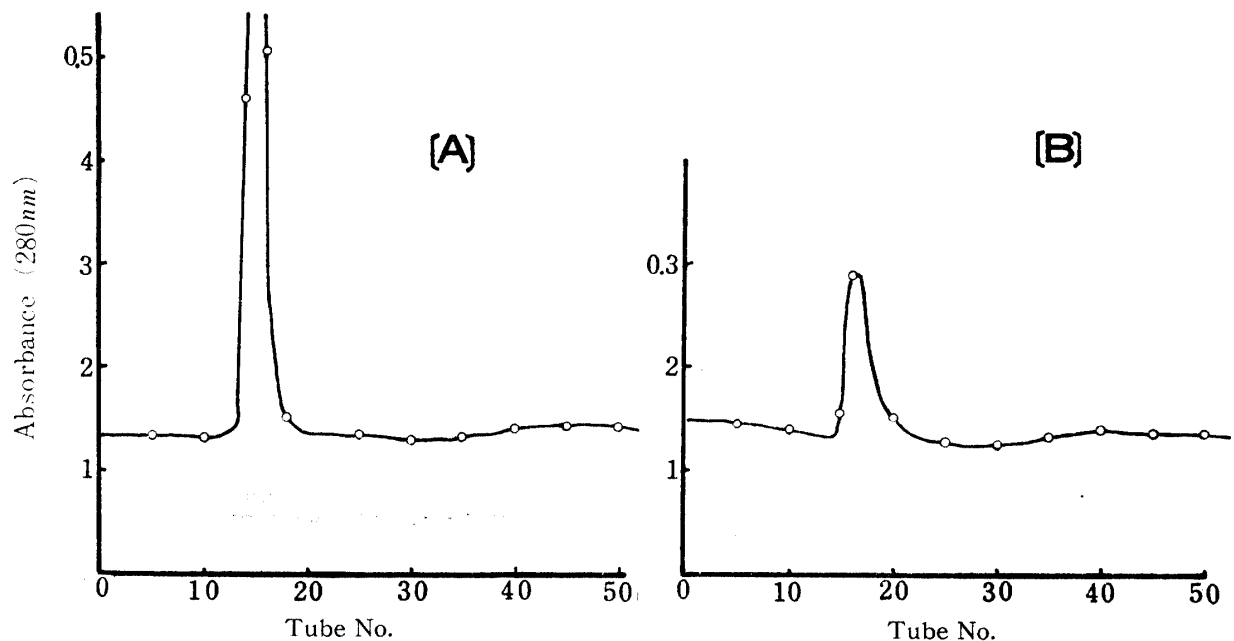


Fig. 10. Gel filtration of the ST-ovalbumin on Sephadex Column with the buffer containing 10^{-3} M ethylenediamine tetraacetate and 7 M urea.

(A) 0.1 M acetate, pH 4.8, Sephadex G-100.

(B) 0.1 M Carbonate, pH 10.0, Sephadex G-150.

Column ; 2.2×54 cm, Fraction size ; 5 ml.

このことから ST-オボアルブミンは会合体ではなく、単一分子として巨大分子量をもつものと考えた。

第4節 ST-オボアルブミンのチオール化合物による還元

MILLER ら²⁷⁾ はインシュリンのチオグリコール酸による還元によって、解離した分子が再結合して、はるかに大きな会合体を形成することを超遠心法により認めている。一方、シスチン含量の少ない血清アルブミンおよび卵白アルブミンについて、同様の実験を試みているが、シスチンが還元されているにもかかわらず肉眼的にもまた、超遠心分析でも変化を示さないことを述べている。

ST-オボアルブミンは異常に大きい分子であるが、インシュリンのようにジスルフィド結合により、数分子が結合したのか、あるいは血清アルブミンおよび卵白アルブミンのように、ジスルフィド結合は分子間結合に関与していないかを確かめるために、チオール化合物によるST-オボアルブミンの還元を行ない、解離が起るか否かを調べた。

還元は 8M 尿素含有のリン酸塩緩衝液 (pH 8.0) に 1M チオグリコール酸塩または 0.5M メルカプトエタノールを加えたものを用いて、アルゴン気中約 60 時間室温で行なった。その後、過剰のヨード酢酸を加え、

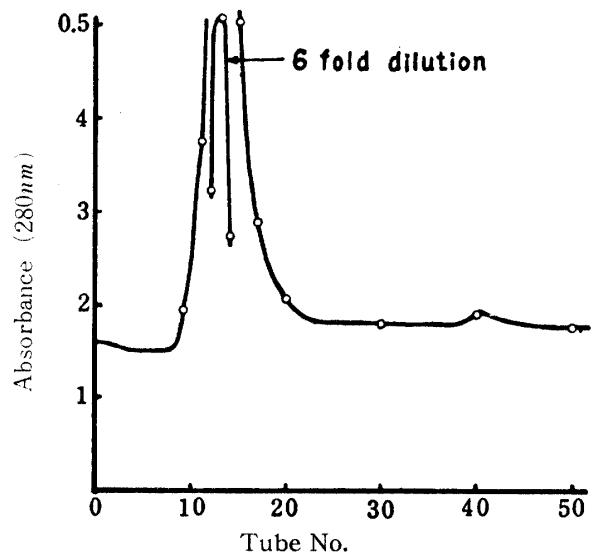


Fig. 11. Gel filtration of the ST-ovalbumin reduced with 1 M thioglycolate on Sephadex G-100.

Column ; 2.2×54 cm,

Fraction size ; 5 ml,

Buffer ; 8 M urea in 0.1 M phosphate, pH 8.0.

上記の尿素含有緩衝液に透析して Sephadex G-100 によるゲル濾過を行なった。その結果を図 11 に示した。

以上の処理によっても、ST-オボアルブミンは依然として同じ位置に溶出され、それ以外には新しい蛋白質のピークは認められなかった。したがって、以上の実験範囲では ST-オボアルブミンはインシュリンのように、ジスルフィド結合によって高分子化されたものではなく、アルブミンという範疇において、血清アルブミンおよび卵白アルブミンと同様に、シスチンは分子内構造にのみ関与しているものと推察される。

第5節 小 括

第2章、第3章においては荷電面から、ST-オボアルブミンの挙動を追究したが、本章ではゲル濾過法により分子の大きさを調べた。その過程で、ST-オボアルブミンはアルブミンとしては異常に大きい分子量をもつことを確認した。現在、蛋白質は単一鎖で 100000 以上の分子量のものはないだろうとまで推測されているので、ST-オボアルブミンについて、尿素による水素結合の切断やチオール化合物によるジスルフィド結合の還元を行なった。その結果、つぎのような結果がえられた。

1) ST-オボアルブミンの分子量は Sephadex G-75, G-100 および G-150 を用いたゲル濾過により、400000 以上と推定した。

2) ST-オボアルブミンは尿素含有 (5~8M) 緩衝液 (pH 4.8~10.6) によっても解離せず、また、EDTA を添加した 7M 尿素含有緩衝液によっても解離しないことから、会合体ではないと推定した。

3) ST-オボアルブミンをチオール化合物によって還元し、カルボキシメチル化した後、Sephadex G-100 によりゲル濾過を行なったが、ST-オボアルブミンのピークのみがえられ新しいピークは認められなかった。したがって、シスチンは血清アルブミン、卵白アルブミンと同様に分子内架橋にあずかっており、ジスルフィド結合を介在とする高分子化は考えられなかった。

以上の結果から、ST-オボアルブミンは単一鎖として巨大分子量をもつ卵白アルブミンであると推定した。

第6章 ST-オボアルブミンに対する酸、アルカリおよび熱の影響

海亀卵は沸騰水中においてもその卵白部は凝固しない。また、海亀卵は産卵後夏の海砂中で太陽の輻射熱

を受け、日中はかなり高温になることが考えられるが実際はその環境下で孵化過程が進行する。これらのことから熱変性を受け難い蛋白質が相対的には多く含まれていることが推定された。そこで、海亀卵白中相対的に多く含まれている成分である ST-オボアルブミンは熱に対する安定性が大きいのではないかと考えられた。したがって、ST-オボアルブミンに対する酸および熱の影響について調べた。さらに、アルカリによる変性の有無を検討した。

第1節 酸の影響

ST-オボアルブミンの 1~2% 水溶液 5ml に 1N HCl を添加して、酸凝固の様相をニワトリ卵白アルブミンと比較した。酸による凝固の状態を図 12 に示した。

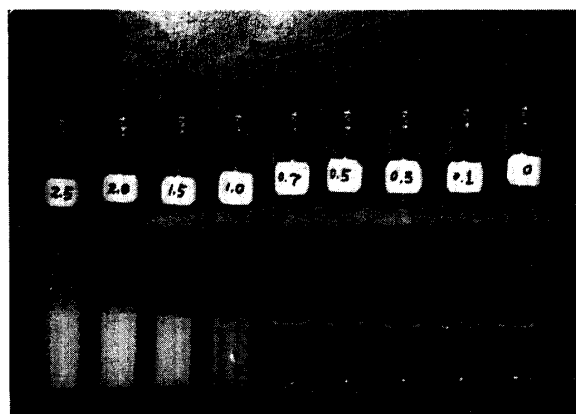
1N HCl 添加の場合は、ニワトリ卵白アルブミンは 0.7~1.0ml の添加によって凝固するのに対し、ST-オボアルブミンは 2ml 加えてもまったく変化せず、さらに、2N, 3N, 4N および 6N HCl を 2ml 加えてもわずかに白濁する程度でまったく凝固しなかった。この現象は蛋白質の構造の複雑さのために簡単には説明できないが、ST-オボアルブミンの化学的組成とともに、これまで述べてきたように立体構造にも大いに関係があると考えられる。

OKUNUKI ら²⁸⁾ は細菌アミラーゼを酸、熱、尿素で処理するとき、変性または不活性化が起り難いことを認め、これは分子中に存在するジスルフィド結合が立体構造を強く保持するのに役立っているためであろうと考えた。

ST-オボアルブミンが酸凝固し難いことは、シスチン含量がニワトリのそれに比べて多いことから (第7章第2節参照) ジスルフィド架橋が分子内に多く存在すること、糖含量が割合に多いこと (第7章第3節参照) などを考慮して、OKUNUKI らの見解を適用すれば肯定できる。

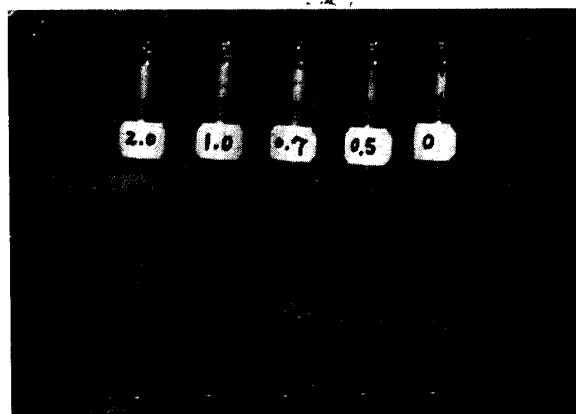
第2節 熱の影響

ST-オボアルブミンが酸凝固し難い蛋白質であること、また、海亀卵の耐熱性の高いことなどから、ST-オボアルブミンは熱凝固し難いのではないかと推測されるが、事実 ST-オボアルブミン 1% 水溶液を 98°C~100°C に加熱してもまったく凝固が見られなかった。したがって、ST-オボアルブミンの 2% 水溶液を用いて凝固温度を測定した。すなわち、ST-オボアルブミンの 2% 水溶液 5ml を逆流冷却器をつけた試験

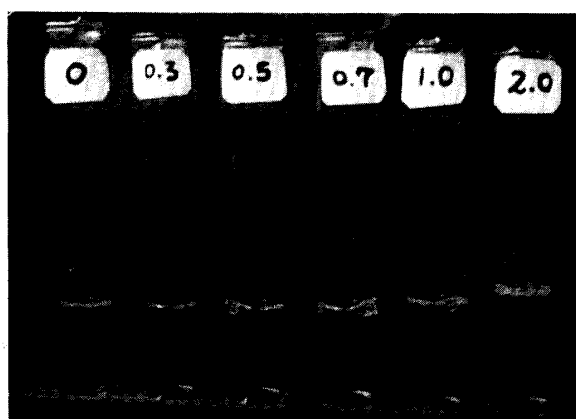


Chicken ovalbumin 1 % soln. 5ml+1N HCl.

The numbers show the volume of hydrochloric acid.

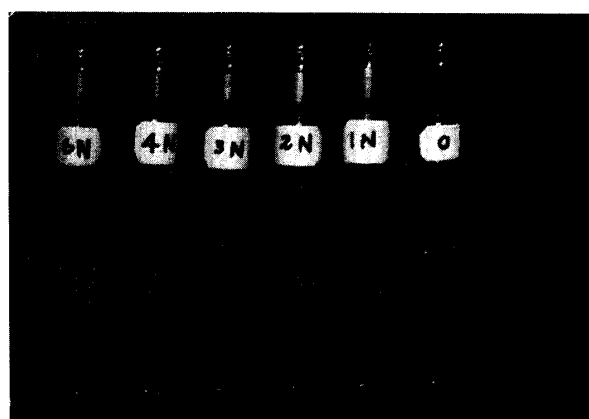


ST-ovalbumin 1 % soln. 5ml+1N HCl.



ST-ovalbumin 2 % soln. 5ml+1N HCl.

The numbers show the volume of hydrochloric acid.



ST-ovalbumin 1 % soln. 5ml+HCl 2ml.

The numbers show the concentration of hydrochloric acid.

Fig. 12. Coagulation of ST-ovalbumin with hydrochloric acid

管に取り、種々の温度に10分間保ち空冷後、遠心分離して上澄液中の残存蛋白質量を測定した。ついで、残存蛋白質量を処理温度に対してプロットし、えられた曲線の変曲点を求め凝固温度とした。処理温度と残存蛋白質量との関係曲線を図13に写真とともに示した。また、1%および0.1%水溶液を加熱した時の写真も同時に示した。

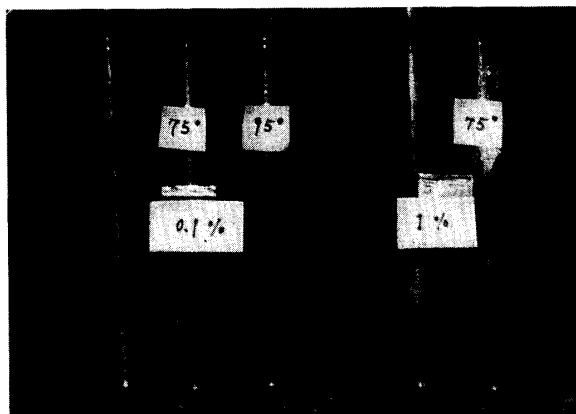
その結果、ST-オボアルブミンの凝固温度はニワトリ卵白アルブミンの64°Cに対して11°C高く、75°Cであることがわかった。

前報¹⁾で述べたように、卵白中の乾物は1.6%、さらに乾物中の窒素含量は8.57%であったが、この値から生卵白の蛋白質含量を計算すると0.86%になる。この値はニワトリ卵白に比し非常に小さい。海亀卵白が煮沸しても凝固しない原因として、海亀卵白の蛋白質濃度が非常に低いこと、また、卵白蛋白質中もっと

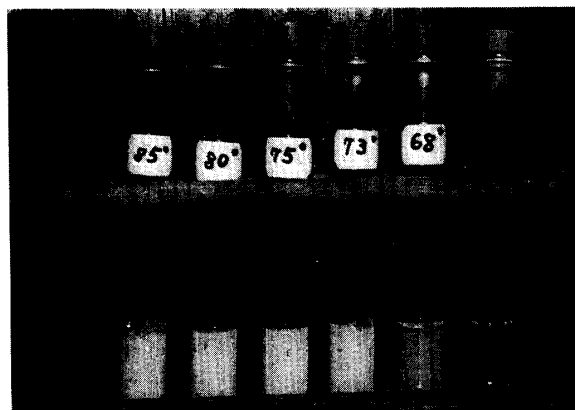
も多いST-オボアルブミンが熱凝固し難いことなどが考えられる。

凝固温度を測定する際、図13[B]に示すようにニワトリ卵白アルブミンの場合と異なり、遠沈後の上澄液は白濁しており、濁度と凝固の温度依存性が異なることが認められた。すなわち、2%水溶液では75°C以下において、すでに白濁が生じているにもかかわらず、凝固は認められなかった。

つぎに、0.1% ST-オボアルブミン水溶液(75°C, 95°C加熱によっても白濁、凝固が認められないもの。図13の写真参照)を一定温度で10分間保った後、水冷し室温にもどした試料について、日立101型分光光度計を用いて吸収スペクトルを測定し、未処理との差を求めて差スペクトルを作製した。未処理および75°C処理したST-オボアルブミンの吸収スペクトルと、種々の温度で加熱処理したST-オボアルブミンの差ス



Concn. of ST-ovalbumin ; 0.1 %, 1 %.



Concn. of ST-ovalbumin ; 2 %.

The numbers show the temperature, at which the sample was treated.

(Photograph) Effect of concentration on heat coagulation of the ST-ovalbumin.

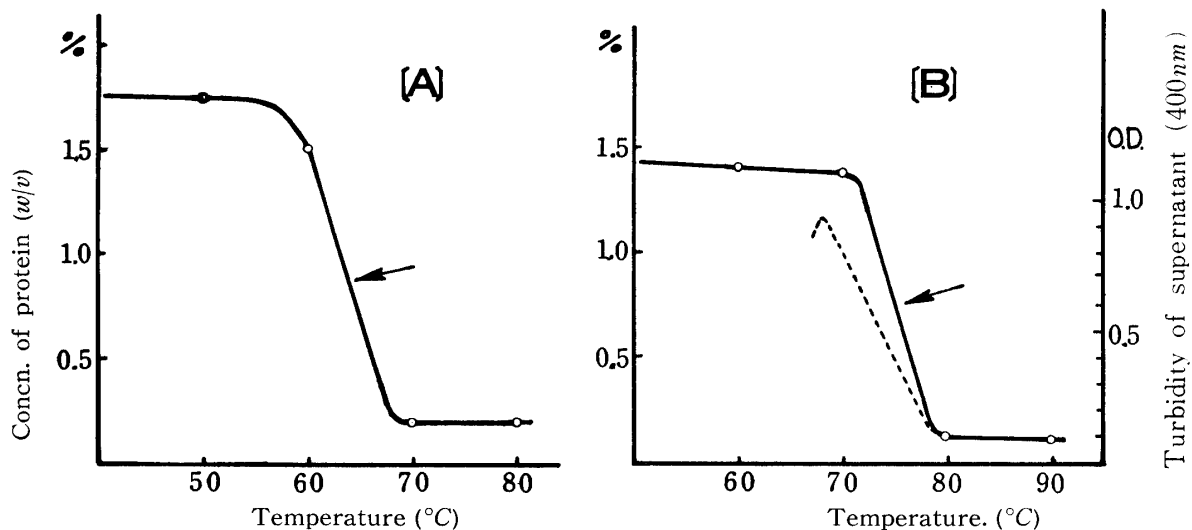


Fig. 13. Coagulation points of the ST-ovalbumin and chicken ovalbumin.

Arrows show the coagulation point.

(A) Chicken ovalbumin, (B) ST-ovalbumin,

—○—○— Protein, Turbidity.

ペクトルを図14に示した。

処理温度が上るにしたがい、270～280nmに吸収極大を、300nm近傍に極小の吸収をもつ負の差スペクトルがえられ、青色移動が確認された。

リゾチームは塩酸グアニジンによる処理の際、3.2 M 塩酸グアニジンの存在では、旋光度あるいは粘度の何れの面からみても変性していない。この差スペクトルは正にピークをもっている。しかし、6.4 M 塩酸グアニジンの存在で変性すると差スペクトルは、未変性のとき正にピークを示した位置に負のピークを持つようになる。すなわち、変性にともなう青色移動がみられるようになることが、認められている^{29, 30)}。ST-オボアルブミンの加熱の際、見られる差スペクトルは

55°C 加熱のものから負のピークを示しており、55°C 付近より変性が起っていることがうかがえる。

GLAZER³¹⁾は、卵白アルブミンは牛の血清アルブミンと異なって、尿素のない状態において pH 2.0～9.0 にわたり、280nm の吸収の変化はあまり示さないことから、差スペクトルはカルボキシル基—チロシン残基間の水素結合のみに帰せられないと述べている。また、浜口²⁹⁾は 250～310nm における差スペクトルは蛋白質の変性によって生ずるのでなく、トリプトファン、チロシン残基のごく近傍に存在する荷電の変化によるものと考えている。

ここに得た ST-オボアルブミンの差スペクトル変化は精度の低いものではあるが、分子内に構造変化が起

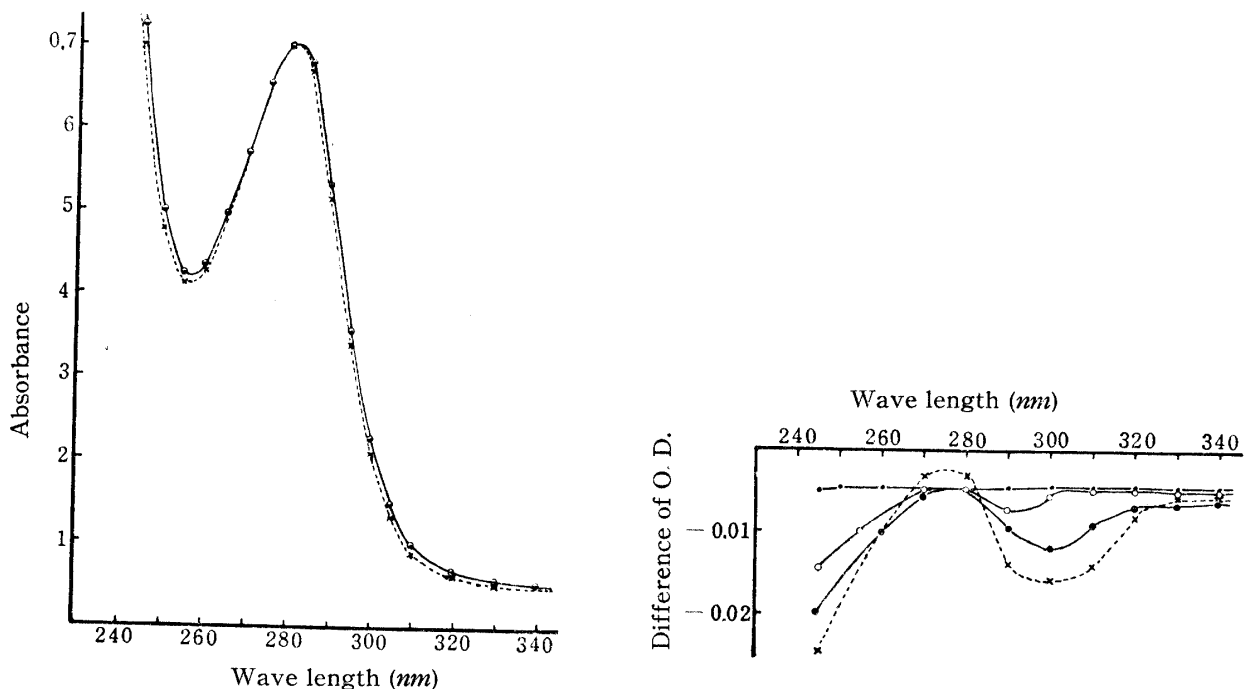


Fig. 14. Effect of temperature on the spectrum of ST-ovalbumin.

Concn. of protein; 85mg% (Concn. to be not coagulated.)

—○—○— Untreated, ———— 45°C, —○—○— 55°C,

—●—●— 65°C, 75°C.

りつつあることを示唆するものである。すなわち、75°C 以下 (65°, 55°C) でも構造変化が起っていることを示し、さらに、75°C (凝固温度) ではそれ以下の温度の場合とは異なって、290 ~ 300nm 付近の吸収は減少し、280nm 付近の吸収の増加がみられるなど、低温の場合と異なる構造変化を起していることが指摘できる。すなわち、ST-オボアルブミンの1%水溶液は煮沸によって熱凝固しないにしても、立体構造の変化が起っていることは明らかである。これらの一連の変化は加熱によって、少なくとも、二段階の変化が起っていることを示唆しているものである。

第3節 熱、酸およびアルカリ処理を行なったST-オボアルブミンのCM-セルロースカラムクロマトグラフィー

1) 熱処理後のST-オボアルブミンについて

本章第2節で述べたST-オボアルブミンの凝固点測定試料中、上澄液の濁度の著しい68°Cと、凝固温度(75°C)の2種を加熱条件として選定し、CM-セルロースカラムクロマトグラフィーの試料とした。すなわち、ST-オボアルブミン1%水溶液(熱凝固を起さない濃度のもの)を68°C, 75°Cでそれぞれ30分間加熱し、前報¹⁾で述べた方法によってCM-セルロースカラム

Table 2. CM-cellulose chromatography of the ST-ovalbumin treated at two different temperatures.

Treated temp. pH for elution	68°C		75°C	
	mg	%	mg	%
4.0	12.6	16.5	0	0
5-6	15.3	20.1	15.9	35.4
8-9	17.4	22.9	17.7	37.4
12-13	30.8	40.5	11.3	25.2

ST-ovalbumin is the component unadsorbed on CM-cellulose column at pH 4.0.

クロマトグラフィーを行なった。その結果を図15に示した。さらに、分離した各成分の割合を表示すると表2の通りである。

加熱処理することにより、pH 5 ~ 6, pH 8 ~ 9の緩衝液の交換のpH領域に溶出する画分の増加がみられた。また、75°C処理のものは1%濃度のST-オボアルブミンであり、熱凝固を起していないものであるが、CM-セルロースカラムに流した場合、素通りの成分が消失している。このことはST-オボアルブミンの1%溶液では、加熱凝固は認められないが、明らかに変性が起っていることを示しており、差スペクト

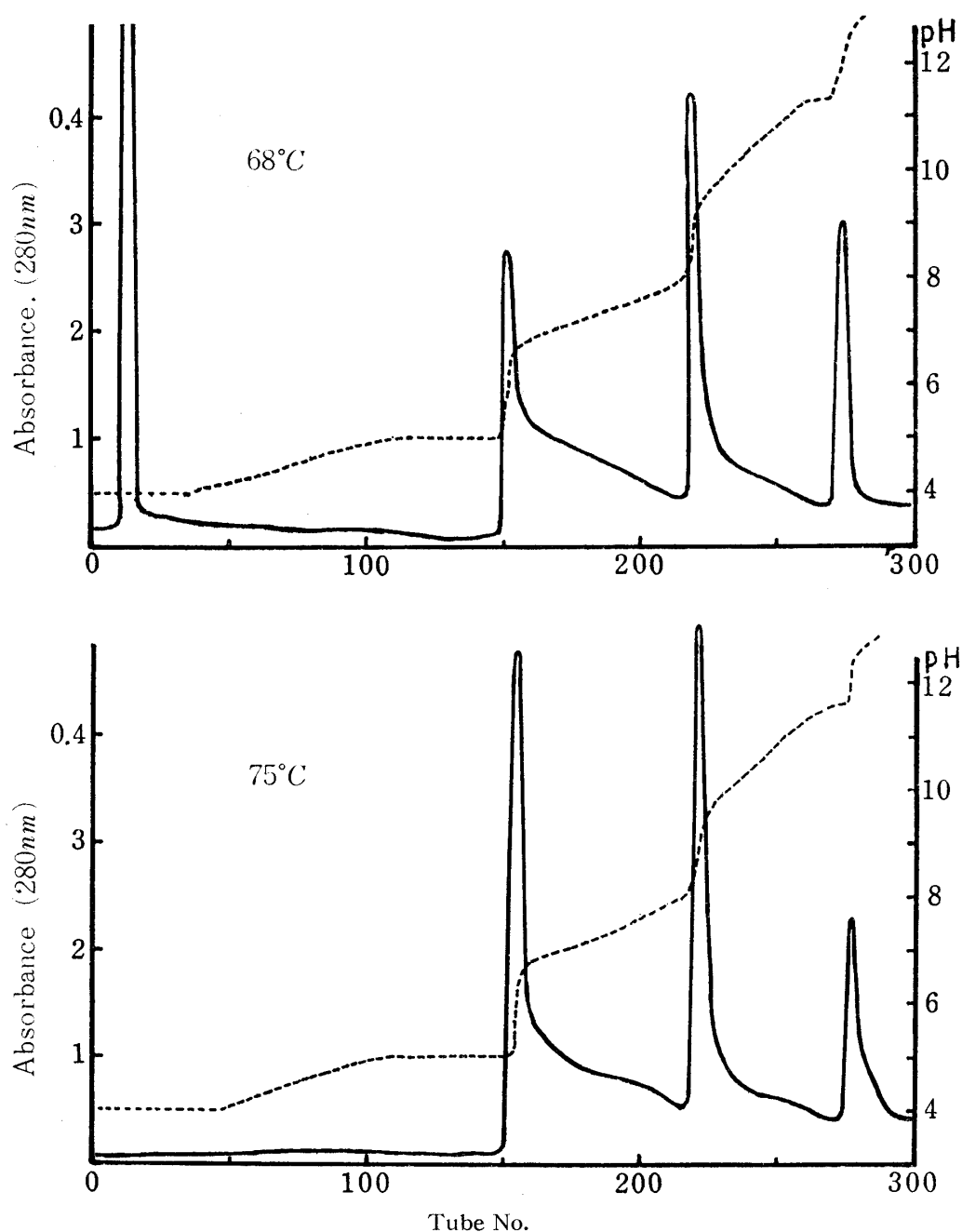


Fig. 15. CM-cellulose column chromatography of the ST-ovalbumin treated at 68° and 75°C.

Column ; 1.8×20cm, Fraction size ; 5ml, protein, pH.

ルの結果ともよく一致していた。

2) 酸およびアルカリ処理後のST-オボアルブミンについて

酸処理 ; 1% ST-オボアルブミン水溶液を 0.02N HCl で pH 2.5 としたものを 0.1N NaOH で pH 4.0 に調整し, CM-セルロースカラムクロマトグラフィー用の 0.025 M 酢酸塩緩衝液 pH 4.0 に透析した。

アルカリ処理 ; 1% ST-オボアルブミン水溶液を

0.02N NaOH で pH 7.0 としたものを 0.1N CH_3COOH で pH 4.0 とし, 上記と同様 0.025M 酢酸塩緩衝液 pH 4.0 に透析した。

上記の両試料について, CM-セルロースカラムクロマトグラフィーを行なった。その結果を図 16 に示した。

酸およびアルカリ処理のいずれにおいても ST-オボアルブミンは完全に吸着された。クロマトグラフィー

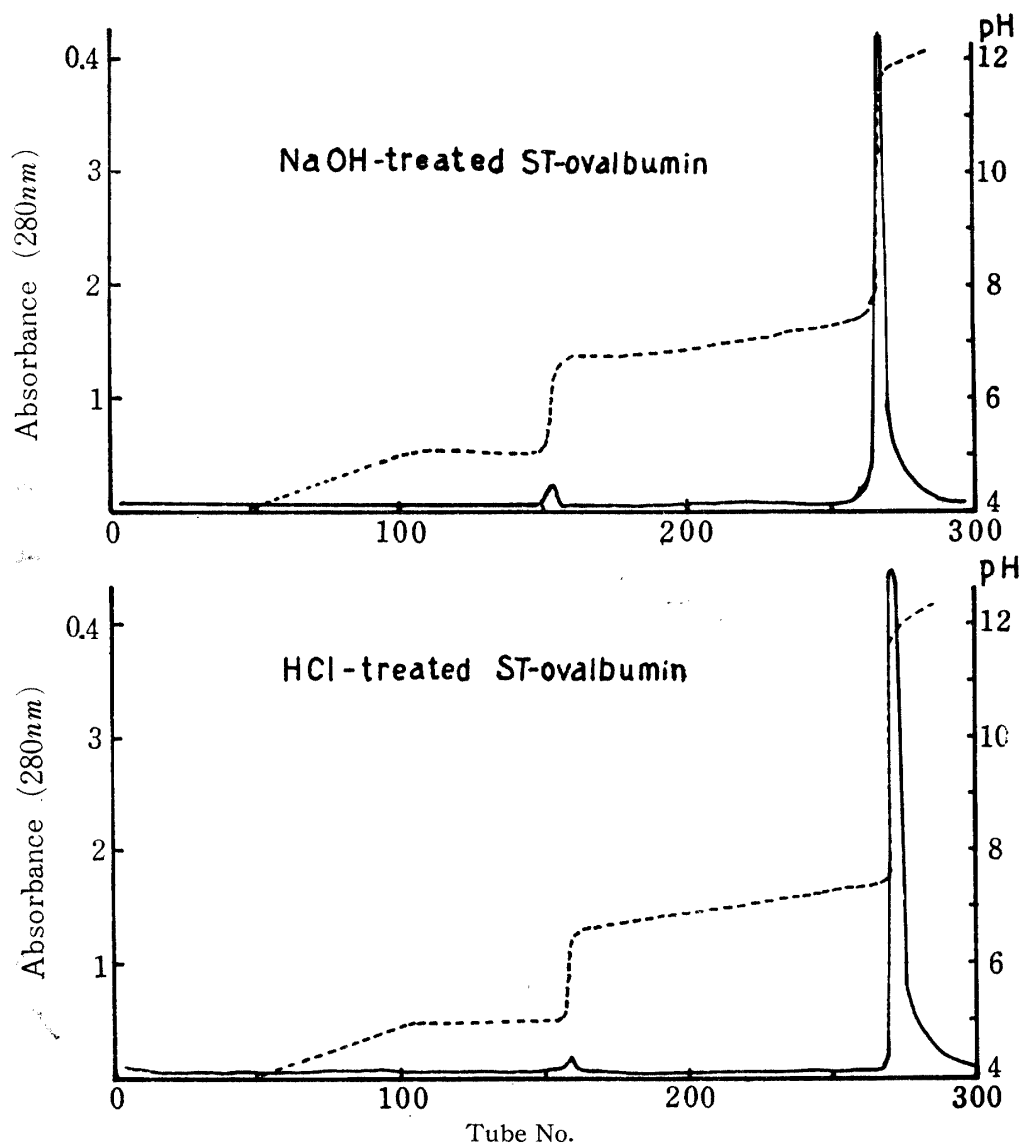


Fig. 16. CM-cellulose column chromatography of the ST-ovalbumin treated by 0.02M NaOH and HCl.

Column; $1.8 \times 20\text{cm}$, Fraction size; 5ml, — Protein, pH.

の状態からみれば、 75°C 処理による変化以上の変性が起っていると考えられる。ST-オボアルブミンは1%溶液では、熱凝固しないし、また、酸凝固をまったく起さないが、いずれも明確に変性が起っていることを示している。変性蛋白質について、CM-セルロースカラムクロマトグラフィーを行なうことは、変性に伴う立体構造の変化を指摘する一手段になりうるものと考えられる。

WHITE³²⁾ は牛のリボスクレアーゼのジスルフィド結合を還元した後、さらに、空気酸化したものおよびアルキル化したものの CM-セルロースカラムクロマトグラフィーを行なっている。これによると、アルキ

ル化によって再生されないものは CM-セルロースカラムクロマトグラムが異なることを示している。

ST-オボアルブミンは、とくに、 $\text{pH} 4.0$ で正に荷電していながら、CM-セルロースカラムに吸着されず、変性が進むと吸着されるという性質があり、変性機構を調べるのに好適な蛋白質であろう。

第4節 小 括

1) ST-オボアルブミンを熱処理する場合は、 55°C 付近よりわずかに分子構造の変化が起るが、少なくとも 68°C までは著しい変化は起らない。

2) ST-オボアルブミンは1%水溶液では煮沸を行

なってもまったく凝固しない。2%水溶液では75°Cで凝固する。その外、1%水溶液の熱処理後の差スペクトルや、CM-セルロースカラムクロマトグラフィーからも、75°C付近で著しく構造変化が起ることを認めた。

3) ST-オボアルブミンは種々の濃度の塩酸添加によってもまったく酸凝固しない。

4) PH4.0でCM-セルロースに吸着されなかったST-オボアルブミンは75°Cにおける加熱処理、塩酸あるいはか性ソーダ処理によってCM-セルロースに完全に吸着されるようになった。

第7章 ST-オボアルブミンの化学的性質

ST-オボアルブミンは海亀卵白中もっとも多く含まれ、アルブミンに属しながらニワトリ卵白アルブミンとは種々の点で異なる性質を示した。前報¹⁾ではCM-セルロースに対する挙動について明らかにし、また、本報においてもST-オボアルブミンの種々の性質について述べてきた。その他の化学的性質も当然異なることが予想されるので、それらの性質を明らかにした。

第1節 ST-オボアルブミンの濃度と吸光度との関係

ST-オボアルブミンは今まで行なった実験において単一成分であることが認められたので、前報¹⁾と同様な方法で、濃度と280nmにおける吸光度との関係を求めた。その結果を図17に示した。

これを関係式で示すと次のようになる。

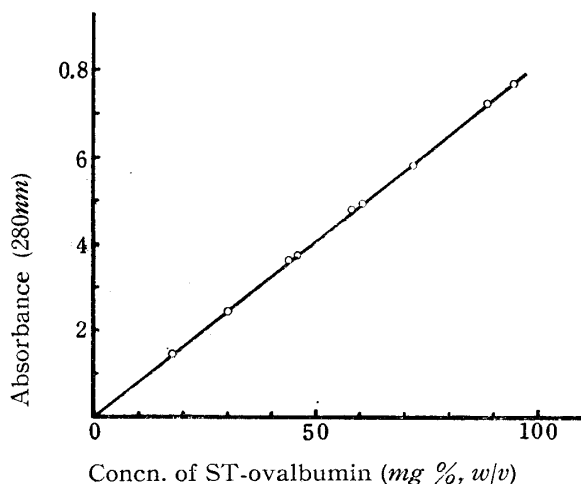


Fig. 17. Relationship between the concentration and absorbance (at 280nm) of the ST-ovalbumin.

$$y = \frac{8.117}{1000}x \{y: OD_{280}, x: ST\text{-オボアルブミン濃度 (mg\%)}\}$$

この関係式は吸光度が0.700以下で LAMBERT-BEER の法則に従うことが認められた。この関係式を前報¹⁾のニワトリ卵白アルブミンのもの $y = \frac{6.409}{1000}x$ と比較すると、ST-オボアルブミンの関係式の勾配が大きいことがわかる。これは、ST-オボアルブミンのアミノ酸組成中、チロシン、トリプトファンおよびフェニルアラニンの含量が多いことを示している。近藤ら¹⁷⁾は海亀卵白より、塩析分離したアルブミンについて測定した吸収スペクトルから、海亀卵白アルブミンはニワトリ卵白アルブミンより多量の環状アミノ酸を含むと推察しており、この結果ともよく一致している。

なお、以後の実験においては、この関係式を用いて蛋白質量を算出した。

第2節 アミノ酸組成

ST-オボアルブミン水溶液に等量の特級塩酸を加え減圧脱気後、窒素ガス置換を行ない、さらに減圧して封管した。これを110°Cの加水分解炉中で24時間加水分解を行なった。加水分解液は減圧濃縮後、アミノ酸分析用希釈緩衝液で一定量に希釈し、柳本高速アミノ酸自動分析機 LC-5S 型によって分析を行なった。なお、チロシン、トリプトファンはともに紫外線吸収測定法³³⁾により求めたが、チロシンはアミノ酸自動分析機による分析結果とよく一致した。アミノ酸の分析結果はニワトリ卵白アルブミンの分析値³⁴⁾と同時に表3に示した。

塩基性アミノ酸含量についてみれば、ST-オボアルブミン 11.73% (84.2mmol/100g) に対して、ニワトリ卵白アルブミン 12.07% (86.4mmol/100g) と類似している。これに反して、酸性アミノ酸含量は前者 18.59% (151.4mmol/100g) に対して、後者 20.95% (169.4mmol/100g) と ST-オボアルブミンが相当に少ない。さらに、アンモニアをアミド態によるものとしてアミノ酸組成をみると、ST-オボアルブミンの塩基性アミノ酸含量 84.2mmol/100g に対し、酸性アミノ酸含量 99.6mmol/100g となり、その差は 15.4mmol/100g となる。これに対し、ニワトリ卵白アルブミン中の塩基性アミノ酸は 86.4mmol/100g、酸性アミノ酸は 122.6mmol/100g で、その差は 36.2mmol/100g となる。これらのアミノ酸組成から両者の蛋白質の等電点の高低を判断すれば、ST-オボアルブミンがニワトリ卵白ア

Table 3. Amino acid composition of the ST-ovalbumin compared with chicken ovalbumin. (Amino acid residues in 100g protein.)

	ST-ovalbumin		**Chicken ovalbumin	
	<i>g</i>	<i>mol</i>	<i>g</i>	<i>mol</i>
Tryptophan	* 0.52	2.8×10^{-3}	1.10	5.9×10^{-3}
Lysine	5.73	44.7	5.30	41.4
Histidine	1.22	8.9	1.94	14.1
Arginine	4.78	30.6	4.83	30.9
Ammonia	0.83	51.8	0.75	46.8
Aspartic acid	7.86	68.3	7.49	65.1
Glutamic acid	10.73	83.1	13.46	104.3
Threonine	4.87	48.2	3.09	30.6
Serine	5.26	60.4	5.91	67.9
Proline	3.21	33.1	2.96	30.5
Glycine	2.87	50.3	2.48	43.5
Alanine	3.17	44.6	5.50	77.4
Cystine/2	1.82	17.7	1.33	13.0
Valine	6.34	64.0	5.56	56.1
Methionine	1.39	10.6	4.26	32.5
Isoleucine	3.74	33.1	5.77	51.0
Leucine	7.95	70.3	6.30	55.7
Tyrosine	5.69	34.9	3.38	20.7
Phenylalanine	7.52	51.1	6.78	46.1
Total	85.50	808.5×10^{-3}	88.19	833.5×10^{-3}

* Tryptophan was estimated by the ultraviolet absorption method.

** Amino acid contents in the chicken ovalbumin were cited from the literature. (34)

ルブミンより高いことは明確であり、このことはすでに述べたST-オボアルブミンの等電点がニワトリ卵白アルブミンの値より高い結果を裏付けている。(第3章参照)

個々のアミノ酸についてみると、ST-オボアルブミンではトリプトファン、ヒスチジン、グルタミン酸、アラニン、メチオニン、イソロイシンが非常に少なく、逆に、スレオニン、シスチン/2、ロイシン、チロシンが非常に多いことが特徴である。

さらに、280nmにおける吸収に関係あるトリプトファン、チロシン、フェニールアラニンの含量はニワトリ卵白アルブミン11.26%に対し、ST-オボアルブミンは13.73%と多く、本章第1節の結果や近藤ら¹⁷⁾の推察を裏付ける結果を得た。

第3節 中性糖の種類とその含量

前報¹⁾の塩濃度勾配抽出において、アルブミン画分はかなりの糖を含むことが認められたので、ST-オボアルブミンについて糖の種類並びに組成を検索した。

糖定量に用いたST-オボアルブミンはCM-セルロースカラムクロマトグラフィー、ついでSephadex G-100によるゲル濾過を行なって得られたものである。したがって、糖反応陽性のCM-セルロースの崩壊物はまったく含んでいないものである。

1) 中性糖の定量 糖の定量はフェノール硫酸法で測定し、ガラクトースに換算した値で示した。

加水分解を行わないST-オボアルブミンの試料については6.7%の値がえられ、封管中で1NH₂SO₄, 100°C 7時間加水分解を行なった試料では6.80~6.85%とやや高い結果がえられた。

ニワトリ卵白アルブミンの糖含量については、NEUBERGERら⁶⁾は1.9~2.0%, MONTGOMERYら²⁾は2.1~2.4%, HOUGHら¹⁴⁾は2.75%と報告しており、著者ら³⁶⁾もニワトリ卵白アルブミンでは1.79%を認めている。ニワトリ卵白アルブミンの糖含量については、研究者により多少の変動はあっても大体1.8~2.7%であるが、ウズラ卵白アルブミンでは2.3~2.4%³⁶⁾, アヒル卵白アルブミンでは3.9~4.0%³⁶⁾,

ハト卵白アルブミンでは8.0%³⁷⁾であって、鳥類の卵白アルブミンには種の違いによって差があり糖含量が可成り大きいものが存在している。

以上の点からも、アルブミンを単純蛋白質とする従来の蛋白質の分類には、定義上、問題があろう。

2) 中性糖の同定 ST-オボアルブミンは多量の糖を含有しているので、中性糖検索のために $1\text{NH}_2\text{SO}_4$ を用い、 100°C で7時間封管中で加水分解した。分解物は Amberlite IR-120、さらに、Amberlite IR-4B カラムを通過させてアミノ酸および硫酸を除去し、減圧濃縮してペーパークロマトグラフィーを行なった。溶媒は水飽和メチルエチルコリジン、水飽和フェノール、ブタノール-酢酸-水を用いて行なった。なかでも、ST-オボアルブミンと糖組成が同じ、人の γ -グロブリンについて CLAMP ら³⁸⁾ が使用した溶媒 ($\text{BuOH}:\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O}=24:6:10$) を用いて3回反覆上昇法により、良く分離することができた。その結果の1例を図18に示した。

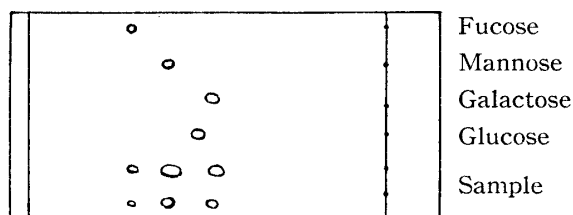


Fig. 18. Paper chromatogram of neutral sugar in the ST-ovalbumin.

Development; Triple ascending method with $n\text{BuOH}-\text{AcOH}-\text{H}_2\text{O}$ (24:6:10)

Color reagent; AgNO_3 in acetone- NaOH in EtOH .

図に見られるように、3個のスポットが認められた。標品との比較、さらに、標品を添加した試料について、ペーパークロマトグラフィーを行なうことによって、構成中性糖はガラクトース、マンノース、フコースであると同定された。このスポットの大きさからマンノースがもっとも多く、ガラクトース、フコースと少ないこともわかった。

3) 中性糖の組成 ST-オボアルブミンの各糖の割合を求めるため、上記同様、ブタノール:酢酸:水 (24:6:10) を用いて、3回反覆上昇法でペーパークロマトグラフィーを行ない、クロマトグラムより蒸留水で各糖を抽出した。各抽出液について NELSON 法³⁹⁾により比色定量を行なった。ST-オボアルブミンの

Table 4. Molar ratio of neutral sugar in the ST-ovalbumin.

Series	Galactose	Mannose	Fucose
No. 1	1.8	2.9	1.0
2	1.8	2.7	1.0
3	2.4	2.9	1.0
4	2.5	3.3	1.0
5	1.8	2.4	1.0
Average	2.1	2.8	1.0

各中性糖の割合をモル比で求め、表4に示した。

5回の実験を繰返し、その平均値はガラクトース:マンノース:フコース=2.1:2.8:1.0、すなわち、2:3:1 となった。

ニワトリ卵白アルブミンについては、NEUBERGER ら⁶⁾ はアルブミン1分子当たり5分子のマンノース、MONTGOMERY ら²⁾ は6分子、HOUGH ら¹⁴⁾ は6.9分子と報告している。

ST-オボアルブミンについては、分子量が決定されていないため、1分子当たりのモル数は算出できないがニワトリ卵白アルブミンの約3倍の糖を含有し、その種類も異なっていることが見出された。

第4節 アミノ糖の種類とその含量

ST-オボアルブミンは糖含量が非常に多いので糖蛋白質であることは明らかである。したがって糖蛋白質と関係の深いアミノ糖についても測定を行なった。

ST-オボアルブミン水溶液に 8NHCl を等量加え、減圧封管後、 100°C で6時間加水分解を行ない、減圧濃縮により塩酸を除去し、真空デシケーター中、かきカリ上で乾燥した。その後の処理は PEARSON の方法⁴⁰⁾に従った。すなわち、Amberlite CG-120 カラム ($0.6\times 39\text{cm}$) を用いてアミノ糖を吸着させ、これを 0.3NHCl で溶出し 1ml ずつドロップカウンター・フラクションコレクターで分取した。溶出液はそのまま ELSON-MORGAN の改良法⁴¹⁾によって発色し、比色定量を行なった。ST-オボアルブミン中のアミノ糖の溶出曲線は標品グルコサミン、ガラクトサミンの溶出曲線とともに図19に示した。

その結果、溶出位置からグルコサミンであることが認められた。別に、上記同様に標品グルコサミンについて発色し、濃度と 530nm における吸光度との関係を求めたところ、図20のように 50r/ml まで LAMBERT-BEER の法則に従うことを認めた。

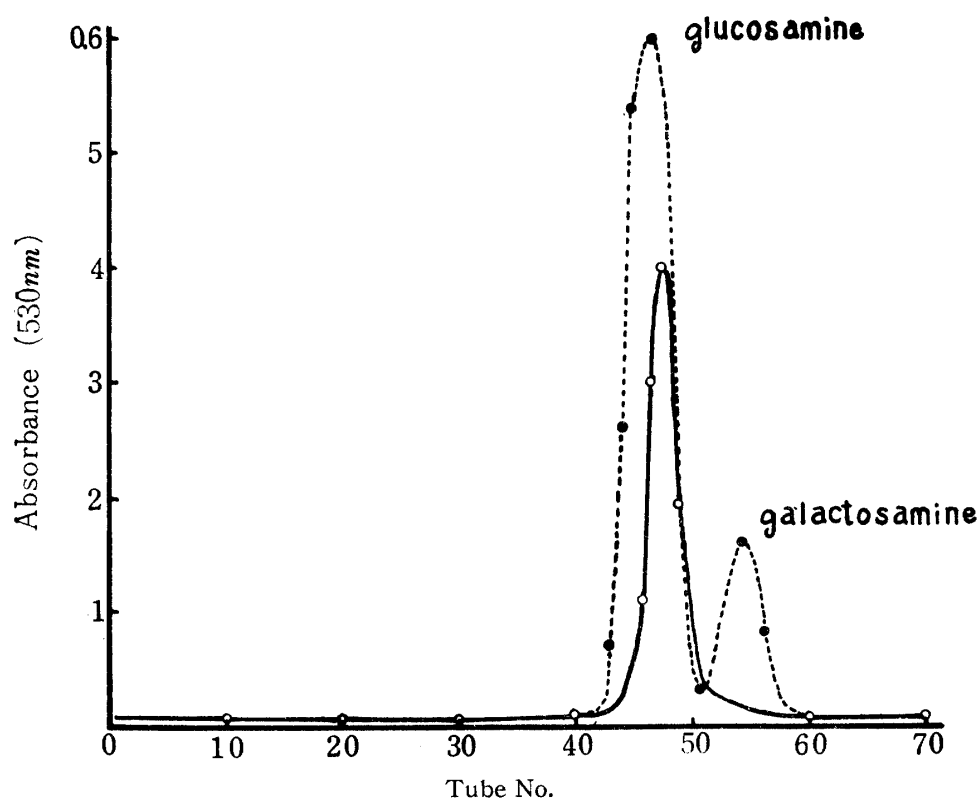


Fig. 19. Chromatography of hexosamine on the Amberlite CG-120 column.

Column; $0.6 \times 39\text{ cm}$, Fraction size; 1 ml

—○—○— Hexosamine in the ST-ovalbumin,

..... Authentic hexosamine (glucosamine $150r$, galactosamine $50r$)

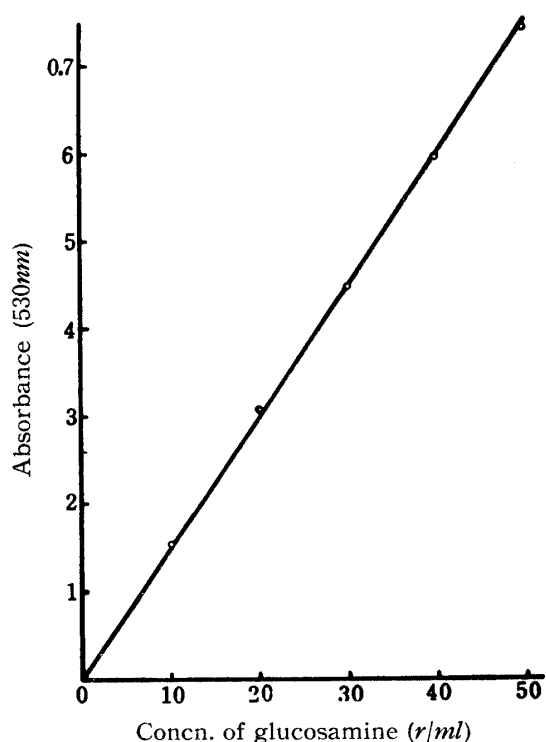


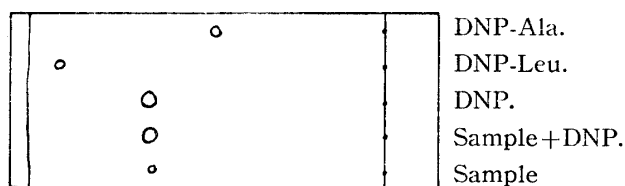
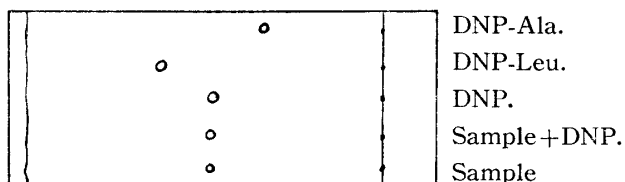
Fig. 20. Calibration curve of glucosamine.

この関係式 $y = \frac{15.1}{1000}x$ (y : OD₅₃₀, x : グルコサミン濃度 (r/ml)) を用いてグルコサミン含量を算出した。同一条件でグルコサミンの回収率は $100 \sim 103\%$ であった。図 19 に示した溶出結果から、ST-オボアルブミンのグルコサミン含量を求めると $3.1 \sim 3.3\%$ ($17.3 \sim 18.4\text{ mmol}/100\text{ g}$) であった。以上の結果から、ST-オボアルブミンは MEYER の定義によるオボムコイドには属さないが、ニワトリ卵白アルブミンのグルコサミンの含量 1.23% (MONTGOMERY ら²⁾), $1.1 \sim 1.3\%$ (NEUBERGER ら⁶⁾), 1.34% (HOUGH ら¹⁴⁾) に比較すると、ST-オボアルブミンのグルコサミン含量は非常に高いことになる。

第5節 N末端アミノ酸

SANGER の DNP 法^{24, 42)}を用いて、ST-オボアルブミンを DNP 化し、それを加水分解して生ずる DNP-アミノ酸について、ペーパークロマトグラフィー⁴³⁾、硅藻土カラムによる分画⁴⁴⁾を行なった。ペーパークロマトグラムの 1 例を図 21 に示した。

Ether soluble fraction

Solvent; *t*-amylalcoholSolvent; *n*-butylalcohol

Acid soluble fraction

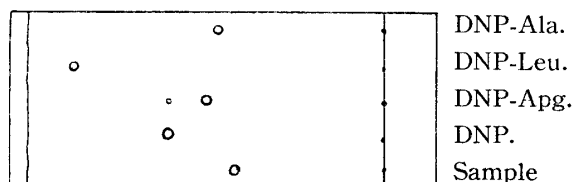
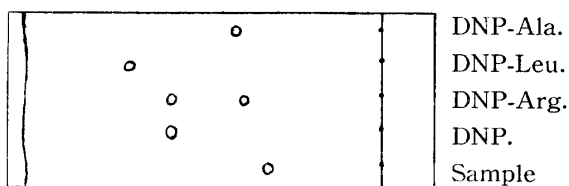
Solvent; *t*-amylalcoholSolvent; *n*-butylalcohol

Fig. 21. Paper chromatograms of the DNP-amino acid obtained from the DNP-ST-ovalbumin.

図から明らかなように、N末端アミノ酸は認められなかった。さらに、エーテル抽出部分にジニトロフェノールと考えられるスポットが存在するので、確認のため飽和水酸化バリウム⁴⁵⁾、濃アンモニア水⁴⁶⁾による加水分解後の遊離アミノ酸を調べたがニンヒドリン陽性物質は認められなかった。

ニワトリ卵白アルブミンのN末端について、PORTER⁴⁷⁾は環状構造をとるか、あるいはN末端アミノ基が炭水化物のようなもので置換されていると報告している。しかし、その後成田ら¹⁶⁾は部分分解によりN-acetyl-Gly-Ser-Gly-Ile-Ala-OH ペプチドの分離に成功し、N末端がアセチル化していることを明らかにした。その他、佐竹ら⁴⁸⁾はニワトリのヘモグロビンからもN-acetyl-Val-Thr-Leuを分離し、同様にN末端がアセチル化されていることを見出している。

これらの報告を参照すればST-オボアルブミンの

N末端がDNP-アミノ酸として認められなかったことは、ニワトリ卵白アルブミンなどと同じようにアセチル基、あるいは他のアシル基によってブロックされている可能性が考えられる。

第6節 揮発性酸の含量

本章第4節で、ST-オボアルブミンのグルコサミン含量はニワトリ卵白アルブミンに比し多いことを述べたが、蛋白質中のグルコサミンはN-アセチルグルコサミンと一般に考えられている。また、本章第5節でもこの蛋白質にはN末端が存在しないことを認め、ニワトリ卵白アルブミンと同様にN末端がアセチル化されている可能性も考えられたので、ST-オボアルブミンから加水分解によって生ずる揮発性酸をNEUBERGER らの方法⁶⁾に準じて、水蒸気蒸留により求めた。

その結果、酢酸として1.22% (20.3mmol/100g) の値がえられ、中性糖、グルコサミン含量と同様に、ニワトリ卵白アルブミン (0.5~0.52%) より多いことがわかった。アセチル含量 20.3mmol/100g はグルコサミン含量 17.3~18.4mmol/100g より多く、グルコサミンがすべて N-アセチル化されても、なお、他の構造に由来した揮発性酸があることになる。したがって、その中には N 末端アミノ基に結合していたアシル基も考えられる。

第7節 窒素含量

ST-オボアルブミンの窒素含量をセミマイクロケルダール法によって定量したところ、その含量は14.1~14.4%であった。この値はニワトリ卵白アルブミンの値 (15.8%²⁰⁾) より少なく、一般蛋白質の窒素含量 16% に比しても、はるかに少なかった。本章第3節で述

べたように、中性糖含量が多いため、蛋白質部分が減少し、窒素含量は少なくなることは肯定できる。また、アミノ酸含量の面からみても、ST-オボアルブミンにおいてはアミノ酸の分子量当り、窒素含量の少ないチロシンが多いことと、逆に、窒素含量の多いアミノ酸のトリプトファン、ヒスチジン、アラニンが少ないことが認められている。(本章第2節参照) さらに、ST-オボアルブミン中に多いグルコサミンも分子量当りの窒素は少ないこと、などからも窒素含量が少なくなることは首肯できる。そこで、ST-オボアルブミンのアミノ酸含量、グルコサミン含量などから、窒素含量を算出してニワトリ卵白アルブミンのものと同時に表5に示した。

すなわち、ニワトリ卵白アルブミンのアミノ酸およびグルコサミン含量から求めた窒素含量は14.14%であるのに対し、ST-オボアルブミンのそれは13.76%

Table 5. Nitrogen content calculated from the amino acid and hexosamine contents.

	ST-ovalbumin		Chicken ovalbumin	
	Amino A. * contents	Calculated nitrogen	Amino A. * contents	Calculated nitrogen
Tryptophan	0.52 ^g	0.08 ^g	1.10 ^g	0.17 ^g
Lysine	5.73	1.25	5.30	1.16
Histidine	1.22	0.37	1.94	0.59
Arginine	4.78	1.71	4.83	1.73
Aspartic acid	7.86	0.96	7.49	0.91
Glutamic acid	10.73	1.16	13.46	1.46
Threonine	4.87	0.67	3.09	0.43
Serine	5.26	0.85	5.91	0.95
Proline	3.21	0.46	2.96	0.43
Glycine	2.87	0.70	2.48	0.61
Alanine	3.17	0.62	5.50	1.08
Cystine/2	1.82	0.25	1.33	0.18
Valine	6.34	0.90	5.56	0.79
Methionine	1.39	0.15	4.26	0.46
Isoleucine	3.74	0.46	5.77	0.71
Leucine	7.95	0.98	6.30	0.78
Tyrosine	5.69	0.49	3.38	0.29
Phenylalanine	7.52	0.72	6.78	0.65
Glucosamine	2.93	0.25	1.16	0.10
Ammonia	0.83	0.73	0.75	0.66
Total	88.43	13.76	89.35	14.14
Measured nitrogen		14.1 - 14.4		15.8**

* Residue in 100g protein.

** The value was cited from the literature. (20)

で実測値と同様に少ない値がえられた。

第8節 小 括

1) アミノ酸分析の結果、ST-オボアルブミンの酸性アミノ酸含量は18.6%で、ニワトリ卵白アルブミンの値21.0%に比し、かなり低い。これに対して、塩基性アミノ酸の含量はニワトリ卵白アルブミンの12.1%に対し、ST-オボアルブミンは11.7%で類似であった。

個々のアミノ酸ではトリプトファン、ヒスチジン、グルタミン酸、アラニン、メチオニン、イソロイシンがニワトリ卵白アルブミンに比し少なく、逆にスレオニン、シスチン²、ロイシン、チロニンが多いのが特徴であった。

2) 中性糖は6.7~6.8%で、その組成はガラクトース、マンノース、フコースからなり、モル比は2:3:1であった。

アミノ糖としてはグルコサミンが認められ、その含量は3.1~3.3% (17.3~18.4mmol/100g)で、中性糖同様に、ニワトリ卵白アルブミンより多かった。

3) N末端アミノ酸はDNP化法で検索したが、ニワトリ卵白アルブミンと同じように認められなかった。したがって、N末端はアセチル化などによってブロックされていると推定した。

4) 加水分解によって生ずる揮発性酸は酢酸として1.22% (20.3mmol/100g)であったが、この値はグルコサミン含量とともに、ニワトリ卵白アルブミンの値より高かった。

5) 全窒素含量は14.1~14.4%であり、アミノ酸、グルコサミン含量から計算した窒素含量とよく一致し、ニワトリ卵白アルブミンの値より低かった。

第8章 考察と総括

前報の海亀卵白アルブミン画分のCM-セルロースカラムクロマトグラフィーにおいて、*pH* 4.0で吸着されない成分がかなり存在することを認めた。したがって、この特異なアルブミンを分離精製し、これをST-オボアルブミンと命名した。このST-オボアルブミンについて、詳細な研究を行なった。

CM-セルロースに吸着されないST-オボアルブミンはDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにおいて、単一ピークを示し、また、ディスク電気泳動においても単一のバンドを示した。第3章で述べたようにまず、*pH* 4.0において、チゼリウス電気泳動を

行なった。その結果、ST-オボアルブミンは*pH* 4.0で陰極に移動し、正に荷電していることが明らかになった。ついで、種々の*pH*における電気泳動より移動度を測定し、ST-オボアルブミンの等電点を求めたところ、5.6近傍にあることが判明した。

また、ST-オボアルブミンの滴定曲線から酸に対する緩衝作用が小さく、アルカリに対しては緩衝作用が大きいこと、すなわち、HClの吸収が小さく、NaOHの吸収が大きいことが認められた。これはアミノ基が分子の内部に存在し、内部で水素結合などに関与し、カルボキシル基が分子表面に相対的に多く露出しているためと考えるならば、CM-セルロースに対する挙動をも理解することができる。

つぎに、第5章においては、ST-オボアルブミンの分子量をゲル濾過によって推定した。その結果、ST-オボアルブミンの分子量はニワトリ卵白アルブミンより大きく、Sephadex G-150による分画範囲からみて400000以上と推定した。ニワトリ卵白アルブミンの分子量(46000)と比較すると、約10倍でありアルブミンとしては、他に例をみない巨大分子であった。(第5章第2節図8参照)

最近では、1本鎖で分子量が100000以上のものはないとまで考えられているので、ST-オボアルブミンがサブユニット構造をもつ可能性を検討した。すなわち、水素結合や金属を媒体とした会合あるいはジスルフィド結合による会合によって、巨大分子を形成している可能性を検討するため、尿素含有緩衝液によるゲル濾過、EDTA-尿素含有緩衝液によるゲル濾過(第5章第3節図9, 10参照)を行なった。さらに、チオグリコール酸またはメルカプトエタノールにより還元したST-オボアルブミンのゲル濾過を行なった(第5章第4節図11参照)が会合体である証拠をうることができなかった。ST-オボアルブミンはシスチンを含んでいるがシスチンはいづれも分子内構造の維持に関与しており、分子間結合には関与していないものと推定された。以上の結果、ST-オボアルブミンは単一鎖として巨大分子量をもつアルブミンであると考えた。

海亀卵は海辺の砂中であって孵化過程中真夏の太陽の輻射熱を受け、かなりの高温になることが考えられるがその環境下で孵化が進行している。また、海亀卵白は煮沸しても凝固しないことから、卵白の性状は卵白蛋白質中、もっとも多く含まれるアルブミンの影響を顕著に受けているものと考えられる。そこで、ST-オボアルブミンに対する熱、酸およびアルカリの作用を調べ第6章に記述した。まず、酸による凝固の状態

を見ると、ニワトリ卵白アルブミンが1%水溶液 5ml に1NHCl, 0.7~1.0ml を添加することによって白濁し凝固したのに反し、ST-オボアルブミンは同じ条件ではまったく変化せず、2%水溶液の場合、わずかに白濁が認められる程度で、まったく凝固を起さなかった。(第6章第1節参照)

熱に対しては、ST-オボアルブミンの1%水溶液は煮沸によってまったく凝固しなかった。このことは海亀卵白が煮沸しても凝固しないことと関連がある。しかし、ST-オボアルブミンの濃度を約2%にすると、凝固することが認められた。その凝固温度は75°Cであり、ニワトリ卵白アルブミンの値64°Cより11°C高かった。(第6章第2節図13参照) この凝固温度以下の温度で白濁を生じることから75°C以下でも変性が起っていることが推察されたので、ST-オボアルブミンを0.1%濃度で種々の温度処理を行ない、その差スペクトルを測定した。その結果、55°C付近から構造変化が起っていることが認められた。(第6章第2節図14参照) すなわち、270~280nmにおいて吸収極大値を示し、300nm付近に極小の吸収を示す差スペクトルがえられ、55~65°C処理では270~280nmにおいて著しい変動は認められないが、75°C処理では吸収の増加がみられた。

以上のことから、変性には少なくとも二段階の変化があるものと考えられた。また、熱、酸およびアルカリ処理の影響をCM-セルロースカラムクロマトグラフィーの挙動からも調べた。

ST-オボアルブミンは前述のようにpH 4.0において、正に荷電しているにもかかわらず、CM-セルロースカラムに吸着されない性質をもっている。68°C以下の温度で処理したST-オボアルブミンは未処理ST-オボアルブミンとほとんど同様に、CM-セルロースカラムには吸着されずに通過するが、75°C加熱処理のST-オボアルブミンは完全に吸着されて、酢酸塩緩衝液からリン酸塩緩衝液への交換部pH域(pH 5~6)並びにリン酸塩緩衝液から炭酸塩緩衝液への交換部pH域(pH 8~9)に溶出してくる。(第6章第3節図15参照) このことから差スペクトルの結果と同様に、75°Cではそれ以下の温度による変化とはまったく異なる構造変化が起っていることを示している。

酸、アルカリにより処理したST-オボアルブミンについても、同様なことを調べた。すなわち、ST-オボアルブミン水溶液を0.02NHCl および NaOH でそれぞれpH 2.5, 7.0 としたものに付き上記同様にCM-セルロースカラムクロマトグラフィーを行なった。両

処理試料はともに完全にCM-セルロースに吸着され、明らかに変性が起っていることを示している。以上のことから、ST-オボアルブミンは酸および熱によって凝固しにくい蛋白質であり、酸およびアルカリによって比較的容易に変性を起すことが認められた。(第6章第3節図16参照)

以上述べてきたCM-セルロース、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー、電気泳動における挙動、滴定曲線の結果、熱、酸およびアルカリ処理によって変性したST-オボアルブミンのCM-セルロースカラムクロマトグラフィーにおける挙動などからみて、ST-オボアルブミンは分子量が400000以上という異常に大きい分子であることも加わって、その構造はアミノ基が相対的に分子の内部に埋没して、分子内で水素結合などを形成し、一方、カルボキシル基はその多くが露出した状態にあると考えた。しかし、電気泳動においては、分子内部のアミノ基も荷電に関与するため、ST-オボアルブミンの等電点はニワトリ卵白アルブミンの等電点より高い5.6近傍という値がえられたものと推察した。一方、クロマトグラフィーにおいては、分子内部に埋没しているアミノ基はpH 4.0において、解離していても、イオン交換に必ずからず、その結果CM-セルロースカラムに吸着されないものと考えられる。しかしながら、熱、酸およびアルカリ処理によってST-オボアルブミンのconformational changeが起り、分子内部に埋没していたアミノ基が表面に露出し、その結果CM-セルロースに吸着されるようになると考えた。

ST-オボアルブミンについて、上記のような性質が明らかにされたので、さらに、化学的組成について研究を行ない、その結果を第7章に記述した。

まず、アミノ酸組成については、酸性アミノ酸が塩基性アミノ酸より多く含まれており、両者の差はST-オボアルブミンでは67.2mmol/100gであるが、ニワトリ卵白アルブミンでは83.0mmol/100gであって、ST-オボアルブミンの酸性アミノ酸含量がニワトリ卵白アルブミンのそれに比し少ない。さらに、アミド態を考慮しても、ST-オボアルブミンは酸性アミノ酸が15.4mmol/100gだけ多いのに比し、ニワトリ卵白アルブミンは36.2mmol/100gだけ多く、前者の方が相対的にカルボキシル基が少ないことを示している。このことは、ST-オボアルブミンの等電点がニワトリ卵白アルブミンのそれより高いという結果(第3章参照)とよく一致している。ST-オボアルブミンの個々の構成アミノ酸についてみると、トリプトファン、ヒスチ

ジン、グルタミン酸、アラニン、メチオニン、イソロイシンは非常に少なく、逆に、スレオニン、シスチン/2、ロイシン、チロシンが非常に多いのが特徴である。

(第7章第2節表3参照)

つぎに、中性糖含量は6.7~6.85%と高く、その組成はガラクトース、マンノース、フコースからなり、モル比は2:3:1であった。(第7章第3節図18,表4参照)

糖蛋白質に関係の深いアミノ糖はグルコサミンのみであった。その含量は3.1~3.3%で、中性糖とともにニワトリ卵白アルブミンに比して非常に多いことがわかった。(第7章第4節図19参照)

また、N末端アミノ酸は遊離の状態ではなく、ブロックされているものと推定した。ST-オボアルブミンから生成される揮発性酸は酢酸として1.22%で、その大部分はアミノ糖に由来するアセチル基と考えられたが、アミノ糖の量よりなお過剰の揮発性酸が測定された。したがって、一部はN末端のアシル化に関与しているものと推定した。

中性糖が多いことから、ST-オボアルブミンの全窒素含量は低く、14.1~14.4%でニワトリ卵白アルブミンより、さらに小さい値を示した。窒素含量をアミノ酸およびグルコサミン含量から算出しても、ニワトリ卵白アルブミンの値14.1%に対し、ST-オボアルブミンの値は13.8%であった。(第7章第7節表5参照)

最後に、ST-オボアルブミンの高い耐熱性は中性糖およびグルコサミン含量が高いことから首肯されるがさらに、ST-オボアルブミンの特異な立体構造も、これに大きな影響を与えているものと推定した。

以上の結果、このST-オボアルブミンは分子量が異常に大きく、立体構造も特異なアルブミンであり、中性糖、アミノ糖およびアミノ酸組成など、ニワトリ卵白アルブミンとは非常に異なる耐熱性のアルブミンであることが認められた。ここに著者が見出した上記の特異的な糖蛋白質の存在が自然環境に適応した海亀卵の孵化過程において、保護的に重要な役割を演じているものと推定した。

要 約

前報において、イオン交換セルロースに対し特異なクロマトグラフ挙動を示す新しいタイプの海亀オボアルブミン(ST-オボアルブミン)を見出した。このST-オボアルブミンの挙動は家禽のオボアルブミンの挙動とは明らかに異なっていた。そこで、ST-オボア

ルブミンを塩析法とCM-セルロースカラムクロマトグラフィーを行なうことにより、純粋に分離し、その化学的性質並びに組成を詳細に調べた。

その結果を要約すれば次の通りである。

1) ST-オボアルブミンは等電点が5.6近傍にあったが、CM-セルロースに吸着されず、DEAE-セルロースに吸着されること、また、滴定曲線から酸吸収はほとんどなく、塩基の吸収が多いことなどから、ST-オボアルブミン分子中ではアミノ基は内部に埋没し、カルボキシル基は表面に露出し、そのほとんどは遊離状態であると推定した。

2) ST-オボアルブミンの分子量は400000以上と推定された。なお、尿素、EDTA-尿素処理およびチオール化合物による還元を行なっても、サブユニット構造は認められなかった。したがって、ST-オボアルブミンは単一鎖の巨大分子であると推定した。

3) ST-オボアルブミンは酸凝固を起さず、また、加熱する際は、1%水溶液では煮沸してもまったく凝固しなかった。しかし、2%水溶液では75°Cで凝固し、その温度はニワトリ卵白アルブミンの凝固点より11°Cも高かった。

海亀卵白の蛋白質濃度は0.86%であり、この濃度の希薄なことが、海亀卵白が煮沸しても凝固しない原因の1つであると考えた。

4) ST-オボアルブミンの0.1%水溶液について、加熱変性を差スペクトル法によって調べた結果、55°C付近から構造変化が起るが65°C付近まで表面的には明らかな変性が認められなかった。一方、変性によりST-オボアルブミンはCM-セルロースに吸着するようになることを認めた。

以上の事実から、変性時の構造変化には少なくとも二段階あることを確かめた。

5) ST-オボアルブミンのアミノ酸組成に関しては、ニワトリ卵白アルブミンに比し、トリプトファン、ヒスチジン、グルタミン酸、アラニン、メチオニンおよびイソロイシンは非常に少なく、スレオニン、シスチン/2、ロイシンおよびチロシンが多かった。また、N末端アミノ酸は認められなかった。ST-オボアルブミンの全窒素含量は14.1~14.4%で、ニワトリ卵白アルブミンより低く、この値はアミノ酸およびアミノ糖含量から求めた窒素含量とほぼ一致した。

6) 中性糖は6.7~6.8%含まれ、その組成はガラクトース、マンノースおよびフコースであり、モル比は2:3:1であった。また、アミノ糖はグルコサミン、おそらくN-アセチルグルコサミンで、含量は3.1~

3.3%であった。ST-オボアルブミン中にはアセチルとして揮発性酸が1.2%含まれていた。その大部分はアミノ糖に由来するものであった。

謝 辞

終りに臨み、本論文を作製するに当り、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、ディスク電気泳動に助力された鹿児島大学農学部橋口勉助教授並びに実験に協力された元本研究室勤務の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の御好意に感謝致します。

文 献

- 1) 福永隆生, 古賀克也: 鹿児島農学術報告, **24**, 89—105. (1974).
- 2) LEE, Y. C. and MONTGOMERY, R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 263-270 (1961).
- 3) LEE, Y. C. and MONTGOMERY, R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **97**, 9-17 (1962).
- 4) CHATTERJEE, A. K. and MONTGOMERY, R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **99**, 426-432 (1962).
- 5) MONTGOMERY, R. and WU, Y. C.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 3547-3554 (1963).
- 6) JOHANSEN, P. G., MARSHALL, R. D. and NEUBERGER, A.: *Biochem. J.*, **77**, 239-247 (1960).
- 7) JOHANSEN, P. G., MARSHALL, R. D. and NEUBERGER, A.: *Biochem. J.*, **78**, 518-527 (1961).
- 8) FRANCOIS, C., MARSHALL, R. D. and NEUBERGER, A.: *Biochem. J.*, **83**, 335-341 (1962).
- 9) FLETCHER, A. P., MARKS, G. S., MARSHALL, R. D. and NEUBERGER, A.: *Biochem. J.*, **87**, 265-273 (1963).
- 10) MARKS, G. S., MARSHALL, R. D. and NEUBERGER, A.: *Biochem. J.*, **87**, 274-281 (1963).
- 11) JOHANSEN, P. G., MARSHALL, R. D. and NEUBERGER, A.: *Nature*, **181**, 1345-1346 (1958).
- 12) GRAHAM, E. R. B. and NEUBERGER, A.: *Biochem. J.*, **106**, 593-600 (1968).
- 13) NEUBERGER, A. and PAPKOFF, H.: *Biochem. J.*, **87**, 581-585 (1963).
- 14) BRAGG, P. D. and HOUGH, L.: *Biochem. J.*, **78**, 11-23 (1961).
- 15) CLAMP, J. R. and HOUGH, L.: *Biochem. J.*, **94**, 502-508 (1965).
- 16) NARITA, K. and ISHII, J.: *J. Biochem.*, **52**, 367-373 (1962).
- 17) 近藤金助, 山田孝雄, 長島正夫: 日化誌, **58**, 108-117 (1937).
- 18) RICHARDS, F. M.: *Ann. Rev. Biochem.*, **32**, 269-297 (1963).
- 19) WATANABE, H.: *Appl. Ent. Zool.*, **3**, 74-80 (1968).
- 20) 水島三一郎, 赤堀四郎: 蛋白質化学, **2**, 138-138 (1954). 共立出版.
- 21) BURK, N. F. and GREENBERG, D. M.: *J. Biol. Chem.*, **87**, 197-238 (1930).
- 22) BURK, N. F.: *J. Biol. Chem.*, **120**, 63-83 (1937).
- 23) SANGER, F.: *Biochem. J.*, **44**, 126-128 (1949).
- 24) SANGER, F.: *Biochem. J.*, **39**, 507-515 (1945).
- 25) 船津勝, 船津軍喜: 蛋白質・核酸・酵素, **13**, 905-912 (1968).
- 26) PEDERSEN, K. O.: *Arch. Biochem. Biophys. Suppl.*, **1**, 157-168 (1962).
- 27) MILLER, G. L. and ANDERSON, K. J. I.: *J. Biol. Chem.*, **144**, 465-473 (1942).
- 28) HAGIHARA, B., NAKAYAMA, T., MATSUBARA, H. and OKUNUKI, K.: *J. Biochem.*, **43**, 469-481 (1956).
- 29) 浜口浩三: タンパク質の立体構造, 83-87 (1967) 共立出版.
- 30) HAMAGUCHI, K. and KURONO, A.: *J. Biochem.*, **54**, 111-122 (1963).
- 31) GLAZER, A. N., MACKENZIE, H. A. and WAKE, R. G.: *Nature*, **180**, 1286-1287 (1957).
- 32) WHITE, JR. F. H.: *J. Biol. Chem.*, **236**, 1353-1358 (1961).
- 33) GOODWIN, T. W. and MORTON, R. A.: *Biochem. J.*, **40**, 628-632 (1946).
- 34) KOGA, K., FUKUNAGA, T. and HIRASE, Y.: *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **8**, (1) 39-51 (1972).
- 35) DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. and SMITH, F.: *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956).
- 36) KOGA, K. and FUKUNAGA, T.: *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **10**, 103-116, (1974).
- 37) 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).
- 38) CLAMP, J. R. and PUTNAM, F. W.: *J. Biol. Chem.*, **239**, 3233-3240 (1964).
- 39) NELSON, N.: *J. Biol. Chem.*, **152**, 375-380 (1944).
- 40) PEARSON, C. H.: *Biochem. J.*, **88**, 540-545 (1963).
- 41) BOAS, N. F.: *J. Biol. Chem.*, **204**, 553-563 (1953).
- 42) SANGER, F.: *Biochem. J.*, **45**, 563-574 (1949).
- 43) BLACKBURN, S. and LOWTHER, A. G.: *Biochem. J.*, **48**, 126-128 (1951).
- 44) MILLS, G. L.: *Biochem. J.*, **50**, 707-712 (1952).
- 45) MILLS, G. L.: *Nature*, **165**, 403-403 (1950).
- 46) LOWTHER, A. G.: *Nature*, **167**, 767-768 (1951).
- 47) PORTER, R. R.: *Biochem. J.*, **46**, 473-478 (1950).
- 48) SATAKE, K., SASAKAWA, S. and MARUYAMA, T.: *J. Biochem.*, **53**, 516-517 (1963).

Summary

In the preceding investigation, the sea-turtle's ovalbumin was found to be a new type albumin showing some specific chromatographic behaviors on the ion exchange cellulose, obviously differing from those observable in the ovalbumin of domestic birds. This protein was called "ST-ovalbumin" and its separation was rendered possible by the salting-out method followed by the chromatography on CM-cellulose column.

Detailed investigations were performed on the chemical constitutions and properties of the ST-ovalbumin.

The results obtained were summarized as follows :

1) The isoelectric point of the ST-ovalbumin was fixed to be approximately 5.6, while, this protein was not adsorbed on CM-cellulose at *pH* 4.0, but was adsorbed on DEAE-cellulose at *pH* 8.1.

Adding to this, on the titration curves, it was noted that absorption of acid by the ST-ovalbumin is negligible, and that of alkali by the ST-ovalbumin is remarkable.

From these facts, the subsidence of the amino-groups of the ST-ovalbumin at the inner part of the molecule, and the exposition of the carboxyl-groups in free forms at the surface were inferred, respectively.

2) In the gel filtration on Sephadex G-75, G-100 and G-150, the elution peaks of the ST-ovalbumin were observed consistently at the 15~16 th tube.

From these gel filtrations, the molecular weight of the ST-ovalbumin was assumed to be about four hundred thousand or more than that.

The clarification of the sub-unit structure of this protein was not realizable even through various experiments using urea, EDTA-urea and thiol compounds.

Hence, the ST-ovalbumin was presumed to be a high molecular compound of the single chain.

3) Unlike the case of chicken ovalbumin, no coagulation was to be brought forth in the ST-ovalbumin aqueous solution either by the addition of *N*-hydrochloric acid, or by being boiled in 1 % aqueous solution. But coagulation occurred at 75°C in 2 % solution, the coagulation point being higher by 11°C than in the former case.

Crude protein content of the sea-turtle's egg white was 0.86 %. From these results, the non-coagulation of the egg white by heating was assumed to be primarily ascribed to the excessively low protein-concentration.

4) As the heat-coagulation of the ST-ovalbumin was not observed up to 1 % solution, the appearance of heat-denaturation was examined on 0.1 % ST-ovalbumin aqueous solution at several temperatures by the differential spectrum method.

The differential spectra produced by being heated at 55°C or above showed the denatured blue shift, and when heated at 75°C, the differential absorption at 270~280 *nm* was ascertained to be larger than the values shown at 55° or 65°C.

On the other hand, after its being treated at 75°C the ST-ovalbumin unadsorbed on CM-cellulose, was adsorbed wholly on to it.

From these facts, the occurrence of the two steps of the conformational change on the heat-denaturation of the ST-ovalbumin was confirmed.

5) Compared with the amino acid constitution of the chicken ovalbumin, the ST-ovalbumin was ascertained to have less amounts of tryptophan, histidine, glutamic acid, alanine, methionine and isoleucine, and more amounts of threonine, cystine, leucine and tyrosine.

No amount of N-terminal amino acid in the ST-ovalbumin was detected by the DNP-method.

The total nitrogen of the ST-ovalbumin was ascertained to be less than that of the chicken ovalbumin.

6) Neutral sugars of the ST-ovalbumin were confirmed to be composed of galactose, mannose and fucose (the molar ratio ; 2 : 3 : 1), the sugar content, being 6.7~6.8 %.

Hexosamine of the ST-ovalbumin was identified as glucosamine, whose content being about 3.2 %.

When calculated as acetic acid, the amount of volatile acid obtained from the ST-ovalbumin was fixed to be 1.2 %, accordingly this acid was presumed to be due to the release from N-acetyl-hexosamine in the ST-ovalbumin,