

ウズラ卵白リゾチームについて その1: ウズラ卵白 リゾチームの精製

著者	金田 信, 加藤 郁之進, 富永 直友
雑誌名	鹿児島大学理学部紀要
巻	1
ページ	67-73
別言語のタイトル	Studies on Quail Egg-White Lysozyme (I) Crystallization of Quail Egg-White Lysozyme
URL	http://hdl.handle.net/10232/00001737

ウズラ卵白リゾチームについて

その1: ウズラ卵白リゾチームの精製

金田 信・加藤 郁之進・富永直友

Studies on Quail Egg-White Lysozyme (I) Crystallization of Quail Egg-White Lysozyme

By

Makoto KANEDA, Ikunoshin KATO, Naotomo TOMINAGA
(Faculty of Science, Kagoshima University, Kagoshima, Japan)

ニワトリの卵白リゾチームは早くから結晶化され¹⁾, 一次構造はもちろん^{2)~8)}, 立体構造さえも明らかにされている⁹⁾。しかしその他の鳥類の卵白リゾチームで一次構造, 立体構造の明らかにされたものは見当たらない。

アヒル¹⁰⁾, 七面鳥¹⁰⁾などの卵白リゾチームは分離精製され, アミノ酸組成も明らかにされており, アミノ酸組成から推測すると, ニワトリ卵白と極めて類似しているが, 多少の差異が認められ, 全く同一物とは考えられない。

ウズラ卵白リゾチームもこれらの鳥類のリゾチームに類似していると推測されるが, 分離精製された報告は未だ見当たらない。

著者らはこれら鳥類卵白リゾチームの化学構造を明らかにし, その種による差異, および構造と活性の関連性を明らかにしようと考え, まずウズラ卵白リゾチームの分離精製を試みた。

実験材料および方法

ウズラ卵: 鹿児島市内の養鶏場より購入の新鮮なる卵を用いた。

イオン交換体: CMセルロース (セルバ社製)

基質: 活性測定に用いた菌体は *Micrococcus lysodeikticus* (生化学工業KK製)

電気泳動: セルロースアセテート膜 (OXO社製) 染色剤ポンソー3R* (常光産業製)

沈降定数測定, アミノ酸分析: 大阪大学蛋白質研究所に依頼分析した。

CMセルロースカラムクロマトグラフィー: 前もって0.02Mリン酸緩衝液(pH 8.0)で平衡化したCMセルロースカラムを用いる。酵素をカラムに吸着させた後, 勾配溶出を行ない, 一分12mlずつを集める。展開は0.02Mリン酸緩衝液(pH 8.0)をベースにし, 塩化ナトリウムの量を次のように変化させて勾配溶出を行なった。

塩化ナトリウム 0 M (700ml) → 塩化ナトリウム 0.8 M (700ml)

N末端アミノ酸分析法¹²⁾: N末端アミノ酸の分析にはDNP法を用いた。

* Ponceau 3R: Disodium 1-(2, 4, 5-trimethyl-phenylazo)-2-naphthol-3, 6-disulphate.

実験結果

[I] ウズラ卵白リゾチームの精製

(1) ウズラ卵より粗リゾチームの調製

新鮮ウズラ卵 (200コ) より卵白 (800ml) を分離し Fig. 1 に示す処理をした。

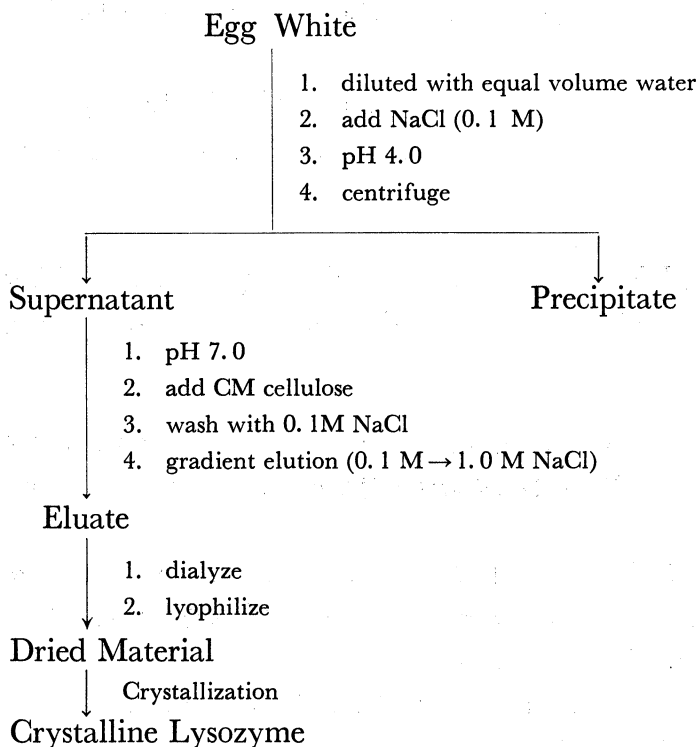


Fig. 1. Preparation of Quail Egg White Lysozyme.

まず泡立てないようにホモジナイズした後、卵白と等量の水を加えた。次に固体の塩化ナトリウムを0.1Mになるまで加えた。1N塩酸を徐々に加えると白濁する。pH 4に調節して一夜放置後に沈殿を遠心分離して除去した。上清液に1N水酸化ナトリウム溶液を徐々に加えてpH 7附近にもどし、あらかじめpH 7.0に平衡化した活性化CMセルロースを加えて攪拌し、バッチ法で吸着させた。このCMセルロースを0.1M塩化ナトリウム溶液で洗い、吸着されない部分を十分に除く、このCMセルロースを0.1M塩化ナトリウム溶液に懸濁してカラム(3.5×50)に充填した。次にFig. 1に示した勾配溶出を行ない、溶出液を20mlずつ分取して280mμに於ける吸光度を測定した。その結果はFig. 2に示す。

活性のある画分(No. 100~165)を集めてVisking tubeに入れ、流水中に一晚、更に純水中に一晚の透析を行なった。透析液を凍結乾燥して粗リゾチーム(約1g)を得た。

(2) リゾチームの結晶化

凍結乾燥して得られた粗リゾチーム1gに純水40mlを加え、完全に溶解しないので、0.5N塩酸を加えてpH 4附近にして溶かし、次に0.5N水酸化ナトリウムにてpH 8.3に調節した。生じた沈殿は遠心分離して除去した。この沈殿には活性はみられなかった。上清液に塩化ナトリウム1gを加えて冷所に放置した。3日後に容器のガラス壁に一面に結晶が生じているのがみら

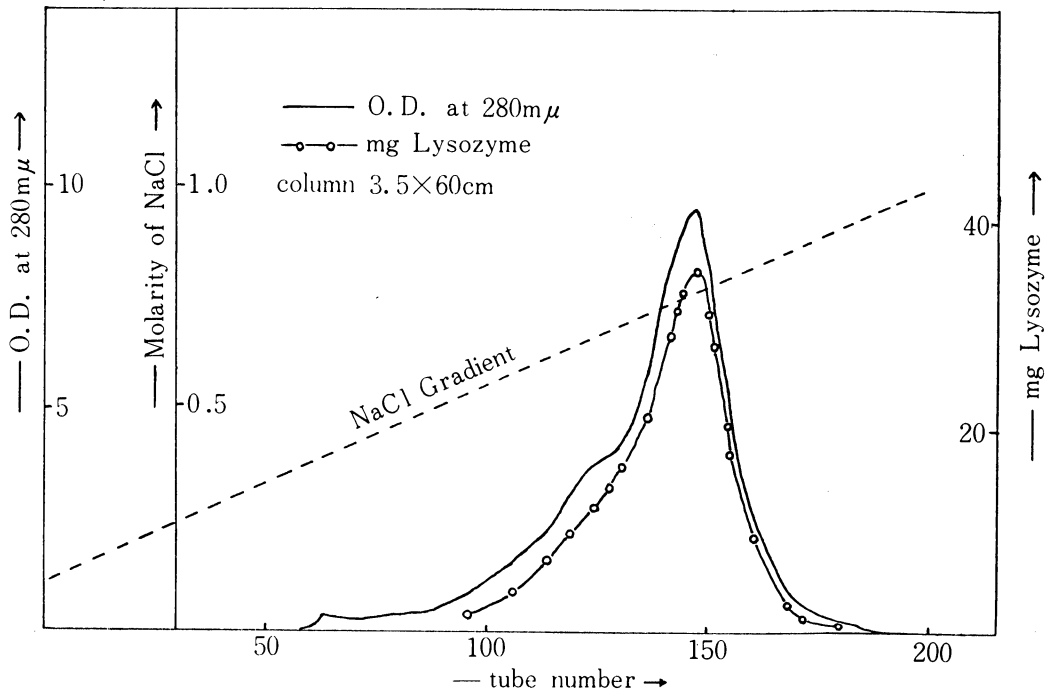


Fig. 2. CM-Cellulose Chromatography of Quail Egg White Lysozyme.

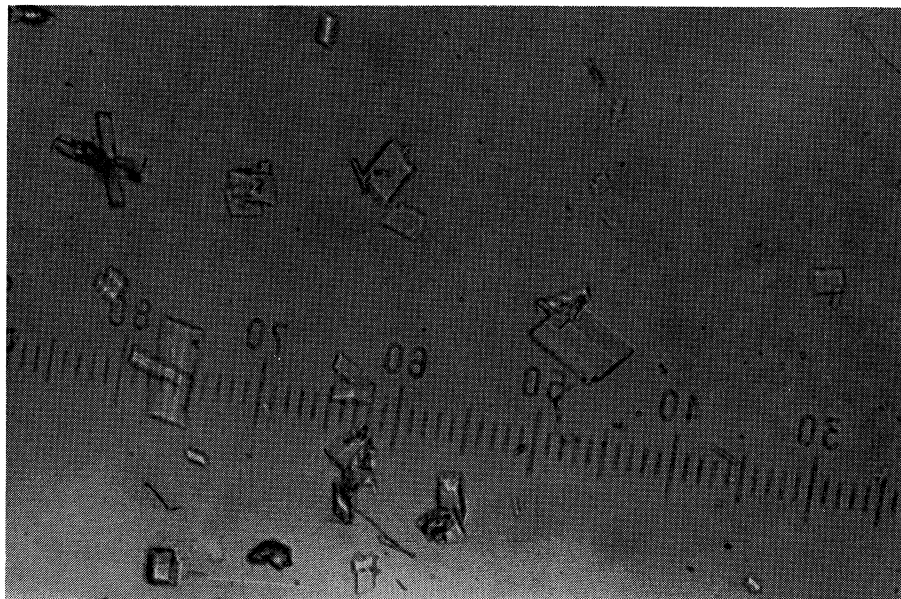


Fig. 3. Crystalline Quail Egg-White Lysozyme.
One Division 0.01 mm

れた。母液を傾斜にて除き、壁の結晶を冷水にて素早く洗い、スパチュラにてかき集めて取出してから純水に溶かし、凍結乾燥して結晶化リゾチームを得た。更に同様の結晶を2回行なった。Fig. 3 にその結晶写真を示した。

[II] ウズラ卵白リゾチームの性質

(1) CM セルロースカラムクロマトグラフィー

[I] の方法で結晶化したリゾチーム (以下リゾチームとのみ記す) 200mg を 0.02M リン酸

緩衝液 (pH 8.0) 20ml に溶かし、実験方法で述べた方法および展開液を用いたカラムクロマトグラフィーを行なった。その結果を Fig. 4 に示す。

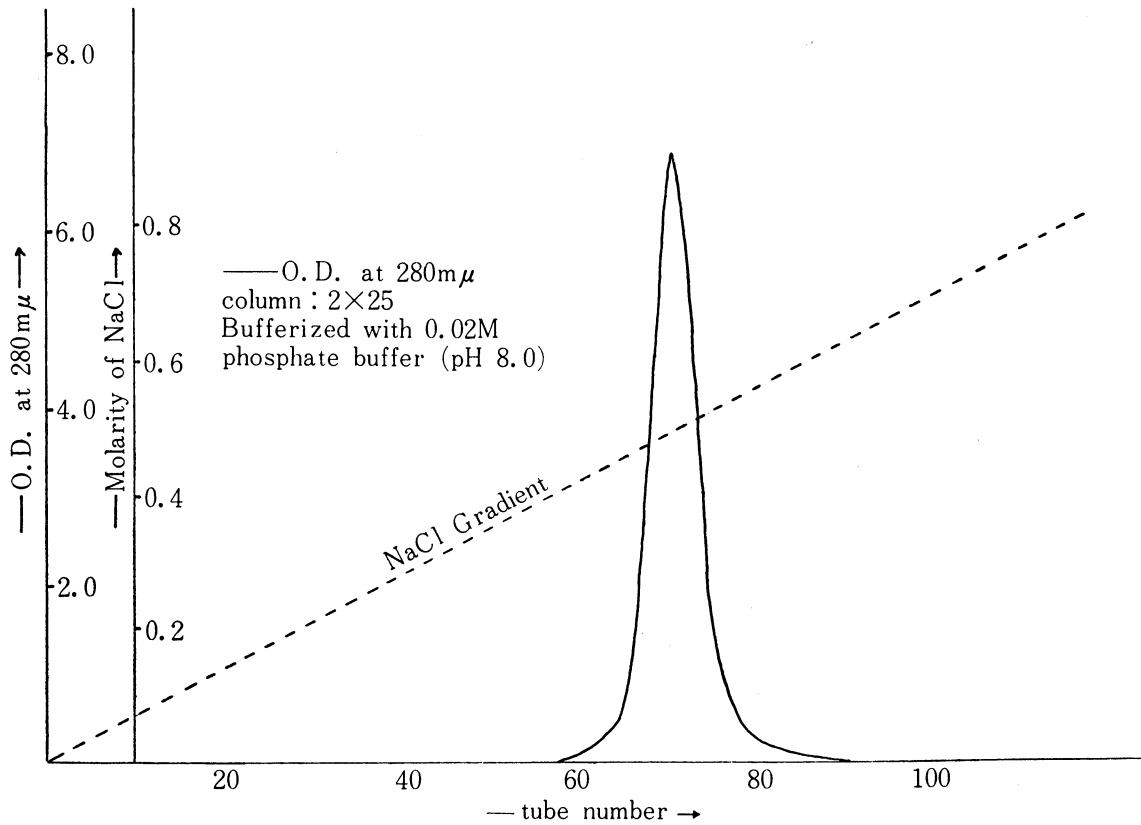


Fig. 4. CM-Cellulose Chromatography of Quail Egg White Lysozyme (Crystal)

280m μ に於ける吸収曲線からわかるように、一成分とみられる鋭いピークを示した。

(2) セルロースアセテート膜による電気泳動

リゾチームをベロナール緩衝液 pH 8.6, 0.07M に 1% になるように溶かしセルロースアセテート膜につけてから、実験方法で述べた条件で泳動を行なった。泳動終了後、ポンソー 3 R にて染色した結果、Fig. 5 に示すように原線より陰極側 1.8cm の位置に単一のバンドが得られた。

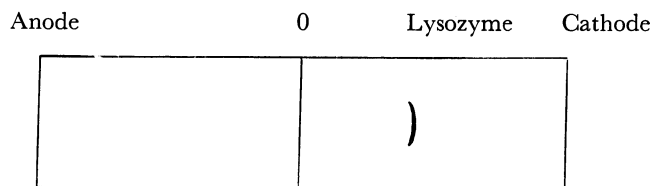


Fig. 5. Electrophoretic pattern of Quail Egg-White Lysozyme on Cellulose Acetate Strip.

Veronal, Veronal-Na: 0.07M, pH 8.6.
 0.5mA/cm, 20 min., 25°C.

(3) 沈降定数の測定

Fig. 6 に示すような単一成分のパターンが得られた。沈降定数は $S_{20}=1.67$ であり、ニワトリ

卵白リゾチームとほぼ等しいので分子量は約1.4~1.5万と推測される。

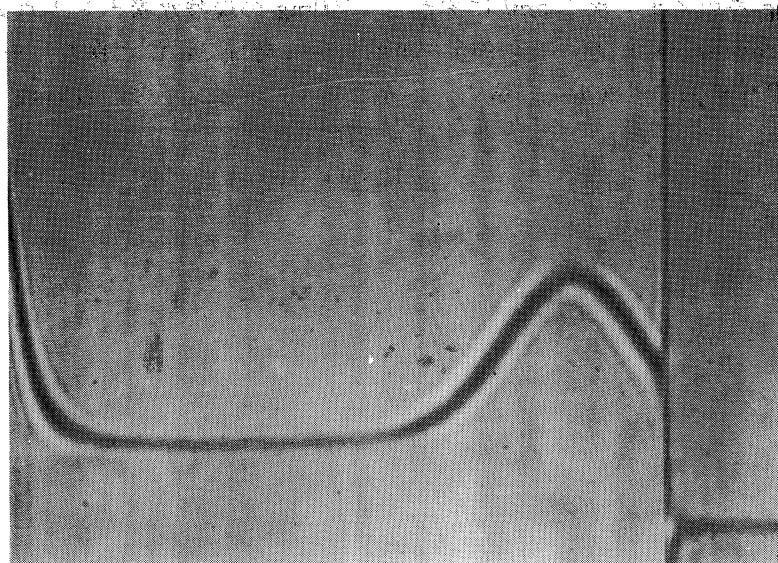


Fig. 6. Sedimentation Pattern of Crystalline Quail Egg-White Lysozyme 100 minutes after reaching the speed of 49,900 r. p. m.
Solvent: Acetate buffer, 0.1M, pH 5.7
Concentration: 1.17%

(4) アミノ酸分析

試料約 3mg に共沸塩酸を加えて封管し、温度 110°C にて、24, 48, 72 時間の 3 種の加水分解を行ない、塩酸を除去した後に柴田アミノ酸自動分析器にて分析を行なった。その結果を Table 1 に示す。トリプトファンは紫外部吸収測定法により求めた。

Table 1. Amino Acid Composition of Quail Egg-White Lysozyme.

	Quail	Hen	Difference from Hen
Ala	12	12	
Arg	10	11	-1
Asp	20	21	-1
1/2Cys	8	8	
Glu	5	5	
Gly	11	12	-1
His	2	1	+1
Ileu	6	6	
Leu	8	8	
Lys	7	6	+1
Met	2	2	
Phe	2	3	-1
Pro	2	2	
Ser	10	10	
Thr	7	7	
Trp	6	6	
Tyr	4	3	+1
Val	7	6	+1

(5) N末端アミノ酸の分析

リゾチーム 15mg を脱イオン水 1.5ml に溶かし、100mg の炭酸水素ナトリウムと 1.5ml の 5% 2,4 dinitrofluorobenzene エタノール溶液を加え、3~4 時間 35°C に保ち、その間振とうを続けた。生じた DNP-protein を遠沈して集め、エタノール、アセトンにて数回洗った。共沸塩酸で加水分解 (110°C, 15 時間) した後、エーテル可溶分を抽出し、二次元ペーパークロマトグラフィーを行ない、その結果を Fig. 7 に示した。標準 DNP アミノ酸と比較し、N末端アミノ酸はリジンと同定した。

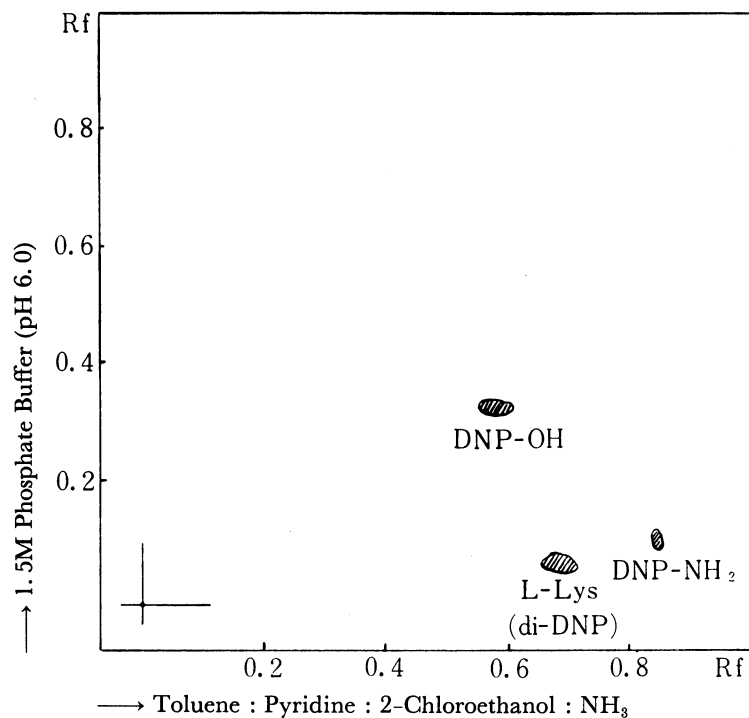


Fig. 7. Paper Chromatogram of Dinitrophenyl Compounds derived from DNP-Lysozyme.

考 察

著者等が結晶化したウズラ卵白リゾチームは実験結果からわかるように CM セルロースクロマトグラフィー、セルロースアセテート膜による電気泳動、超遠心機による沈降測定、N末端アミノ酸の分析などの方法によって検定した結果ではほぼ単一なリゾチームであると推定される。従来各種の鳥類の卵、動物臓器、植物などからリゾチームを分離精製した報告は多いが、結晶化された例はニワトリ卵白リゾチームのみであり、その他のリゾチームの結晶化は、著者等のウズラ卵白リゾチームの結晶化が唯一の例であると考えられる。ニワトリ卵白リゾチームは卵白より容易に直接結晶化が可能であることはよく知られている。著者等は結晶ウズラ卵白リゾチームを種に用い、ニワトリ卵白リゾチームの直接結晶化とほぼ同じ方法で、ウズラ卵白より結晶化を試みているが未だ直接結晶化には成功しておらず引きつづき検討を行なっている。

本研究を行なうにあたり、超遠心分析、アミノ酸分析など多大の御助力を賜った大阪大学蛋白質研究所成田耕造教授に心から感謝します。

文 献

- 1) Alderton, G., Ward, W. H., Fevold, H. L.: *J. Biol. Chem.*, **157**, 43 (1945)
- 2) Jollès, J., Jollès, P.: *Compt. Rend.*, **253**, 2773 (1961)
- 3) Jollès, J., Jauregui-Adell, J., Bernier, I., Jollès, P.: *Biochim. Biophys. Acta*, **258**, 3296 (1964)
- 4) Jollès, J., Jollès, P.: *Biochim. Biophys. Acta*, **45**, 407 (1960)
- 5) Jollès, J., Jauregui-Adell, J., Jollès, P.: *Biochim. Biophys. Acta*, **71**, 488 (1963)
- 6) Jollès, J., Jauregui-Adell, J., Jollès, J.: *Compt. Rend.* **258**, 3926 (1963)
- 7) Canfield, R. E., Anfinsen, C. B.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 2684 (1963)
- 8) Canfield, R. E.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 2698 (1963)
- 9) Blake, C. C. F., Koening, D. E., Mair, G. A., North, A. C. T., Phillips, D. C., Sorma, U. R.: *Nature*, **206**, 757 (1965)
- 10) IMANISHI, M., Shinka, S., Miyagawa, N., Amano, T., Tsugita, A.: *Biken Journal* **9**, 107 (1966)
- 11) 前川 一之: 化学の領域増刊67号, 263, (1965)
- 12) 藤岡 英子・岩井浩一: 蛋白質核酸酵素, **5**, 355 (1960)
- 13) Rhodes, M. B., Azari, P. R., Feeney, R. E.: *J. Biol. Chem.*, **230**, 399 (1958)
- 14) 浜口 浩三: 生化学, **38**, 1 (1966)