

【204】

氏名	田中弘 たなかひろむ
学位の種類	農学博士
学位記番号	論農博第36号
学位授与の日付	昭和38年12月24日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	リン酸カルシウムクロマトグラフィーに現われる 結晶卵白アルブミンの不均一性に関する研究

(主査)
論文調査委員 教授 満田久輝 教授 小野寺幸之進 教授 秦忠夫

論文内容の要旨

Tiselius らの指摘した卵白アルブミンの不均一性に検討を加え、クロマトグラフ成分の電気泳動分析とリン酸の定量を行ない、さらに卵白アルブミンに種々の modification を実施して、クロマトグラフ的性質の変化を観察し、あわせてタンパク質のリン酸カルシウムクロマトグラフィーの機構について考察を加えている。

まず試料として用いた卵白アルブミンは白色レグホーン種の鶏卵から硫酸法により調製し、これを3回再結晶したち蒸留水で透析して硫酸を除き、ついでイオン交換樹脂 Amberlite IRA 400と IRA 120とのカラムを用いて脱塩した。これをシリカゲル上で減圧、凍結乾燥して卵白アルブミンの粉末とし、氷室中3°Cで貯蔵している。pH 6.8において卵白アルブミンのリン酸カルシウムクロマトグラフィーを実施して、溶出に用いるリン酸塩緩衝液の濃度により、卵白アルブミンは 0.03M, 0.05M, 0.075M, 0.1Mおよび 0.2M溶出区分の少なくとも5成分に分かれることを確認した。その見かけ上の量比は Tiselius の行なった分析の結果と異なったので、再結晶をくりかえし、また実験条件も変えて追試しているが、何らの変化も認めていない。ただ供試鶏卵の品種を変えると量比が変化したので、このことから Tiselius らの結果との相違は原料鶏卵の相違に由来するものと結論している。そこで上記5成分を実験の遂行上 0.03Mリン酸緩衝液により溶出される成分とそれ以上の濃度で溶出される成分との二つに区分し、前者を Ea I、後者を Ea II と命名し以下の実験を行なっている。なおこの両者の量比は約 70:30 である。酸変性処理を行なうと、処理前後において未変性部分の Ea I と Ea II の量比は変化しかなかった。この事実は Ea I と Ea II がほぼ同じ速度で変性をおこすことを示しており、両者が構造的によく似たタンパク質であることを示している。さらに Ea I と Ea II とを分離精製して電気泳動分析とリン酸の定量を行なった結果、リン酸基の少ない A₂, A₃成分は Ea I に、リン酸基の多い A₁成分は Ea II に多く含まれることを確認した。また 0.03Mで溶出される区分 (Ea I 区分) の中でも、早く溶出する部分のタンパク質ほどリン酸基の含量が少ないことを明らかにした。この結果はリン酸基の存在がカラムに対する吸着に重要な関与を

していることを示している。しかしながら A₁, A₂, A₃ の 3 成分はどのクロマトグラフ成分にも含まれているから、リン酸カルシウムクロマトグラフィーに現われる 卵白アルブミンの不均一性をリン酸基の結合量の相違だけで説明することはできない。卵白アルブミンは基本的には同一構造をもったタンパク質より違、なっているが、それがこのようなクロマトグラフ的不均一性を示す原因は、分子表面における微小的とくに解離基の相違によるところが大きいと考えられる。そこで卵白アルブミンを酵素的あるいは化学的に modify することにより解離基の相違がクロマトグラフ的挙動に及ぼす影響を調べている。たとえば *B. subtilis* の結晶タンパク分解酵素 "Nagarse" は卵白アルブミンに対し subtilisin と同様の作用をして、これをブラクアルブミンに転換せしめることを硫酸滴定、窒素の遊離速度の測定ならびに遊離した非タンパク質部分のアミノ酸分析によって明らかにしている。つぎに種々の解離基のうち、アミノ基に対して化学的 modification を施し、その影響を検討している。まずホルムアルデヒドを添加して卵白アルブミンのクロマトグラフ分析を実施すると、卵白アルブミンはカラムから非常に溶出し難くなった。すなわち 0.03M 溶出区分はホルムアルデヒド無添加では全体の約 70% を占めているのに対し、1%ホルムアルデヒドの存在では 60% となり、5%のホルムアルデヒドの存在では 6% となった。この実験においては卵白アルブミンは変性していないことを紫外外部吸収スペクトルで確認しているから、上述のクロマトグラフ的性質の変化は $\text{—NH}_3^+ \rightarrow \text{NH} \cdot \text{CH}_2 \text{OH}$ の変化によって生じたものである。このほか脱アミノ卵白アルブミン、グアニジン化卵白アルブミンのクロマトグラフ的性質についても詳細な研究を行ない、タンパク質のリン酸カルシウムクロマトグラフィーの機構について考察を加えている。

論文審査の結果の要旨

卵白アルブミンが電気泳動的に A₁, A₂, A₃ の 3 成分に分かれることは 1939 年 Longsworth らによって初めて報告された。しかしこの 3 成分はリン酸基の含量を異にする以外は全く同一のタンパク質であると信じられてきた。最近になってリン酸カルシウムを用いるクロマトグラフィーにより 4 成分に分かれることが Tiselius らによって報告された。このことは卵白アルブミンの均一性に疑問を投じたものである。著者は 0.03M, 0.05M, 0.075M, 0.1M および 0.2M のリン酸塩緩衝液にて溶出される少なくとも 5 成分に分かれることを確認し、リン酸基の含量に差異のあることを明らかにした。リン酸基の存在がカラムに対する吸着に重要な関与を示しているが、リン酸カルシウムクロマトグラフィーに現われる卵白アルブミンの不均一性をリン酸基の結合量の相違だけで説明することができないので、卵白アルブミンを酵素的あるいは化学的に modify することにより、解離基の相違がクロマトグラフ的挙動に及ぼす影響を調べた。とくにホルムアルデヒド添加の影響のほか、卵白アルブミンに亜硝酸を作用させてそのアミノ基の一部を水酸基に変えることによって脱アミノ卵白アルブミンを調製し、ホルモール滴定により脱アミノ卵白アルブミンの 2 標品のうち、一つ(A)は全アミノ基約 20 個のうち約 1.3 個が、他方(B)は 4.7 個が水酸基に変っていることを確認した。標品 A はクロマトグラフ的性質を変じなかったが、B については変化が認められ、0.03M 溶出区分が 61% に減少した。この場合も紫外外部吸収スペクトル分析によって変性していないことを確かめているので、これは $\text{—NH}_3^+ \rightarrow \text{—OH}$ の変化により卵白アルブミンのカラムに対する吸着が増大したことを示している。また卵白アルブミンに O—メチルイソ尿素を作用させてそのアミノ基を

グアニジノ基にかえることによりグアニジン化卵白アルブミンを調製し、ホルモール滴定によりアミノ基約20個中18個がグアニジノ基に変化したことを認めている。グアニジン化卵白アルブミンのクロマトグラフ分析を行ない、0.03M溶出区分が94%に増加し、また0.02Mの緩衝液でも全体の90%が容易に溶出することを認めている。 $-\text{NH}_3^+ \rightarrow -\text{NH}\cdot\text{C}\begin{matrix} \ll \text{NH}_3^+ \\ \text{NH} \end{matrix}$ の変化によって卵白アルブミンは非常に溶出されやすくなったことを示している。もとの卵白アルブミンとグアニジン化卵白アルブミンとのカルボキシル基の解離域の滴定曲線が全く一致し、かつ pH 6.8 における陰イオン交換クロマトグラフィーにおいて両者のクロマトグラムが全く一致した事実より、グアニジノ基への転換は pH 6.8 における陰イオン基の解離に何ら影響を与えていない。タンパク質のリン酸カルシウムに対する結合性はタンパク質の側鎖基の形状と荷電によって著しく左右されると推定した。カラムに対する結合力の強さは $-\text{NH}\cdot\text{CH}_2\text{OH} > -\text{OH} > -\text{NH}_3^+ > -\text{NH}\cdot\text{C}\begin{matrix} \ll \text{NH}_3^+ \\ \text{NH} \end{matrix}$ の順序となって右側に移るほど弱い。

種々の解離基のうち、アミノ基に対して各種の化学的 modification を行なって、クロマトグラフ的性質の変化を観察した点は、非常に高く評価されている研究である。生化学とくにタンパク質化学の進展に貢献するところきわめて大きい。

よって本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。