イモ澱粉粒は内部ほど分子の結晶性及び配向性が悪く、しかもヨード・ヨードカリ液溶によく染る成分が多い事が解った。従ってこの澱粉粒の外層部ほど結晶性の良いアミロペクチン分子が多いものと相像される。

終りに終始御懇篤な御指導をいただいた恩師二国二郎教授及び貴重な御助言をいただいた大阪大学理学部仁田勇教授に深く感謝します。(本報告は本学会 33 年度大会で発表した。)

(1) R. E. Rundle, L. W. Daash, D. French : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 66, 130 (1944).	(12) N. P. Badenhuizen : <i>Cereal Chem.</i> , 32, 286 (1955).
(2) D. R. Kregger : <i>Biochem. et Biophys. Acta</i> , 6, 406 (1951).	(13) J. M. G. Cowie, C. T. Greenwood : <i>J. Chem. Soc.</i> , 1957, 2658.
(3) R. E. Rundle, D. French : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 65, 1707 (1943).	(14) R. M. Sandstedt : 天然澱粉の糊化に関する顕微鏡映画, Symposium on Starch and Amylases (1957 年 10 月 26 日, 大阪)
(4) J. A. Radley : "Starch and its Derivatives", Chapman and Hall, London, Vol. 1, p. 235 (1953).	(15) 檜作 進, 二国二郎 : 本学会昭和 32 年度大会で発表.
(5) 檜作 進, 二国二郎 : 本誌, 31, 371 (1957).	(16) R. M. Sandstedt : <i>Supplements to Cereal Chem.</i> , 32, 17 (1955).
(6) 檜作 進, 二国二郎 : 本誌, 31, 525 (1957).	(17) Z. Nikuni, R. L. Whistler : <i>J. Biochem. (Japan)</i> , 44, 227 (1957).
(7) H. Huss : <i>Archiv. Bot.</i> , 18, 1 (1922).	(18) M. M. MacMaster : <i>Cereal Chem.</i> , 30, 63 (1953).
(8) G. V. Caesar : Kerr の "Chemistry and Industry of Starch", Academic Press inc., Publishers, New York, p. 249 (1950).	(19) 二国二郎, 檜作進 : <i>The Memoirs of the Institute of Scientific and Industrial Research</i> , XIV, 173 (1957).
(9) W. J. Katzbeck, R. W. Kerr : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 72, 3208 (1950).	(20) 檜作 進, 二国二郎 : 未発表.
(10) F. Baker, W. J. Whelan : <i>Nature</i> , 166, 34 (1950).	
(11) F. Baker, W. J. Whelan : <i>J. Sci. and</i>	

紫外線照射による β -Lactoglobulin の変性 (その 1)*

坂 村 貞 雄, 小幡弥太郎 (北海道大学農学部農芸化学科)

昭和 33 年 1 月 17 日 受 理

我々は前報⁽¹⁾に於て牛乳のカゼイン部におよぼす紫外線の影響を研究して、 α -カゼインと β -カゼインの著しい相違として、前者が電気泳動的に安定なるに反し、後者は泳動界面が速やかに平たくなることを見出した。今日迄色々の蛋白質について研究が行われて来たが紫外線によるこの様な電気泳動的知見は見当らないので、此の様な現象が他の牛乳蛋白質についても観察されるかどうか、而してこの様な事実が認められるならば蛋白構造とどんな関係があるかを明らかにする事は重要且興味ある問題と考えられる。

本報告に於ては β -lactoglobulin 結晶を用い、紫外線による影響を主として電気泳動、並びに超遠心機による沈降分析により実験した結果、 β -カゼインの如く界面の平坦化が認められると共に、 β -lactoglobulin が inhomogeneous になることを確かめた。この inhomogeneous 化に伴い、 β -lactoglobulin からはアンモニヤの生成が認められるが、一方電気泳動的に安定な α -カゼインからはアンモニヤの生成が認められなかった。従って紫外線を照射した β -lactoglobulin の inhomogeneous 化とアンモニヤの生成の間に密接な関係あることが予想された。

実 験 の 部

I. β -Lactoglobulin β -Lactoglobulin の結晶化は A. H. Palmer^(2,3) 法が広く用いられているが、この方法は α -lactalbumin が共存しているため結晶母を使用しない場合は結晶化困難な欠点がある。我々もこの方法を試み結晶母がなかった為か成功しなかったので、R. Aschaffenburg 等による改良法⁽⁴⁾ (始めに α -lactabu-

* On the Denaturation of β -Lactoglobulin by the Radiation of Ultraviolet Light. Part I.

By Sadao SAKAMURA and Yataro OBATA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

本報告は「紫外線照射によるカゼインの変性に関する研究」に引続き行ったもので、一連の研究を「乳蛋白質の光変性に関する研究」と題し、その第 2 報とする。

第1表 β -Lactoglobulin の 2, 3 の物理化学的性状

単離結晶	文献記載
結晶形: Rectangular (写真参照)	Rectangular ⁽⁸⁾
$E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 280 $m\mu$: 9.0	9.3 ⁽³⁾
電気泳動図 (蛋白濃度 1%, イオン強度 0.1)	1 成分 ^(5,6)
磷酸緩衝液+食塩, pH 6.7: 1 成分	2 成分 ^(5,6)
酢酸緩衝液+食塩, pH 4.7: 2 成分	
沈降恒数 (蛋白濃度 1%)	
酢酸緩衝液+食塩, pH 4.7:	
$S_t \times 10^{13} = 2.65 (\text{sec/cm})$	$S_{20w} \times 10^{13} = 2.68^{(9)}$
分析値 (無水物に換算)	C 53.39, H 7.22 ⁽¹⁰⁾
C 53.63, H 6.72, N 14.71	N 15.6, 15.1

β -Lactoglobulin の結晶写真 第1図 β -Lactoglobulin の吸収スペクトル

磷酸緩衝液 pH 6.7, 濃度 50 mg/100 cc
 ×—× 原 β -lactoglobulin,
 ○—○ 照射 β -lactoglobulin

V. 電気泳動 前報の記載と同じ。各照射試料は溶解するに用いた緩衝液、即ち 0.05 M 磷酸緩衝液 $\mu=0.1$ 及び 0.1 M 酢酸緩衝液 $\mu=0.1$ に対し 24 時間乃至 48 時間透析後実施した。電流 100 V, 9 mA. Schlieren edge angles (θ) は 60° 又は 70° の一定のもので夫々撮影して比較を容易ならしめた。先ず α -カゼインが安定である事を再確認し (写真 1 参照), α -カゼインと β -lactoglobulin を等量混合したものについて見ると、紫外線照射により β -lactoglobulin の峰が平たく減少することが見られた。 β -Lactoglobulin は pH 6.7 の磷酸緩衝液中で

min を沈澱除去する) を用い容易に且収量もよく結晶化することが出来た。なお β -lactoglobulin は pooled milk からのものは少くとも 2 成分からなるとされ^{(5~7)*}, Aschaffenburg によると牛の個体差により β_1 -, β_2 -, $\beta_1+\beta_2$ -lactoglobulin を生産すると言う。本研究に用いた β -lactoglobulin は札幌近郊 M 牧場から入手したホルスタイン牛の pooled milk から搾乳 1 時間後処理したものである。再結晶 1 回後凍結乾燥し

収量は 4 l の全乳から結晶 3.3 g (水分 5.69%) であった。得られた β -lactoglobulin の物理化学的性質は第 1 表の如くで、電気泳動図 (写真 2, 3 参照) は等電点よりアルカリ性側の pH 6.7 磷酸緩衝液では単一の峰を示すが、酸性側の pH 4.7 酢酸緩衝液中では 2 成分の存在を示し、 $\beta_1+\beta_2$ -lactoglobulin に一致するものと考えられる。

II. 紫外線の照射 前報の記載と同様であるが本研究では専ら直接照射を行った。 β -Lactoglobulin を 0.05 M 磷酸緩衝液 (pH 6.7)+0.05 M NaCl, 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.7)+0.1 M NaCl 及び 0.3 M NaCl の 3 溶媒に蛋白濃度 1% になる如く溶解し、13~15 時間照射した。

III. 肉眼的観察 β -Lactoglobulin の 0.3 M NaCl 溶液及び酢酸緩衝液溶液はいずれも照射により沈澱を生じて来た。この

沈澱は食塩の濃度を増加しても最早や溶解せず、稀塩酸・稀アルカリに溶解変性蛋白と考えられる。pH 6.7 では黄褐変するが pH 4.7 では殆んど変化しなかった。

IV. 紫外外部吸収スペクトル 第 1 図に示す如く、蛋白質に特有な 280 $m\mu$ の吸収は原 β -lactoglobulin $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 280 $m\mu=9.0$ であるが、紫外線を照射したものは $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 280 $m\mu=11.8$ で、peak の外全領域に亘り吸収を増加した。之は前報⁽¹⁾に於ける α -カゼインの場合と類似し、トリプトファンの含量の多いリゾチームに於て 280 $m\mu$ 吸収を減少するのと傾向を異にしている⁽¹¹⁾。即ち β -lactoglobulin では照射によりトリプトファン、チロシン共に変化をうけるが、トリプトファンの含量がチロシンのそれに比し少く、トリプトファンの変化が mask され、チロシンの変化が強く現れたとみなしうる。

* 本研究終了後 H. Klostergaard, R. A. Pasternak: *J. Amer. Chem. Soc.*, 79, 5671 (1957) は β_1, β_2 -lactoglobulin を別々に生産する牛を選んで、夫々の β -lactoglobulin の結晶を得ている。

写真 1-(a) α -カゼインの電気泳動図
濃度 1%, 燐酸緩衝液 pH 6.7, イオン強度
0.1, 泳動時間 60 分
(上) 対照 (下) 照射

写真 1-(b) α -カゼイン + β -lactoglobulin
(1:1) 電気泳動図
濃度 1%, 燐酸緩衝液 pH 6.7, イオン強度
0.1, 泳動時間 80 分
(上) 対照 (下) 照射

写真 2-(a) β -lactoglobulin の電気泳
動図 (対照)
濃度 1%, 燐酸緩衝液 pH 6.7, イオン強度 0.1
(上) 泳動時間 90 分 (下) 泳動時間 120 分

写真 2-(b) β -lactoglobulin の電気泳
動図 (照射)
濃度 1%, 燐酸緩衝液 pH 6.7, イオン強度 0.1
(上) 泳動時間 90 分 (下) 泳動時間 120 分

写真 3-(a) β -lactoglobulin の電気泳
動図 (対照)
濃度 1%, 酢酸緩衝液 pH 4.7, イオン強度 0.1
(上) 泳動時間 160 分 (下) 泳動時間 180 分

写真 3-(b) β -lactoglobulin の電気泳
動図 (照射)
濃度 1%, 酢酸緩衝液 pH 4.7, イオン強度 0.1
(上) 泳動時間 160 分 (下) 泳動時間 180 分

は単一の峰を現すが紫外線を照射することにより 2 成分に分れた(写真 2)。更に酸性側の酢酸緩衝液 (pH 4.7) では元々 2 成分に現れる (之は β_1 及び β_2 を示すものと考えられる)⁽⁵⁻⁶⁾ が照射により極めて inhomogeneous になった事を現した(写真 3)。これらの事実から少くとも β -lactoglobulin は紫外線照射により電気泳動的に異なる成分を生じたと見做すことができる。而してこの変化は蛋白分子の表面の電気的性質に変化をきたした為と考えられる。後述する如く沈降分析の結果からも特に沈降恒数に変化ある成分を示さず, Bar-

ron 等⁽¹²⁾ が放射線照射で認めたような Dimer の生成, 或は Svedberg 等⁽¹³⁾ が紫外線照射で報告しているような subunit への解裂は認められなかった。沈降図が平たく変化することは僅か分子量の異なる多数の変性蛋白質が polydisperse している事を暗示した。この様な見地から電気泳動像の変化は蛋白分子の表面構造の相違によって電気的性質を変化したものと想像される。ちなみに α -カゼインが電気泳動的に安定なるに反し, β -lactoglobulin が inhomogeneous になる事は 2, 3 のアミノ酸の分解を測定しても同様に減少の傾向を示し, 又紫外線吸収は同様に増加し, 之らによつては両蛋白質の相違を説明することが出来ない。

VI. 沈降分析 Spinco Model E 型を使用し, 蛋白濃度 1%, 回転数 (nominal speed) 59,780 r. p. m., 16 分

写真 4 超遠心沈降図

Bar angle 70, Full speed 後 64 分撮影
1. β -lactoglobulin pH 6.7 3. β -lactoglobulin pH 4.7
2. 同上照射試料

間隔に撮影した。温度は全て 20° 附近で実施し, 実験範囲内では界面はすべての場合 symmetrical で対照の β -lactoglobulin は pH 6.7 及び 4.7 何れでも鋭い単一の峰を示すが, 紫外線照射したものは峰が平くなる (写真 4 参照)。pH 4.6 の照射試料は沈澱を形成する為実施しなかった。沈降恒数 S_i は 2.5

第2表 蛋白濃度1%溶液1cc中のアンモニヤ

β -Lactoglobulin		α -カゼイン	
対 照 (μ モル)	照 射 (μ モル)	対 照 (μ モル)	照 射 (μ モル)
0.09	0.23	0.11	0.11

$\times 10^{-18}(\text{sec/cm})$ で照射により $2.7 \times 10^{-18}(\text{sec/cm})$ となったが、殆んど差がない。なお測定溶液の粘度は紫外線照射により全く変化を示さず、対照の比粘度 1.044 に対し、照射後も 1.044 であった。

VII. アンモニヤの生成 Conway の微量拡散法⁽¹⁴⁾ でアンモニヤの定量を行った。その結果は第2表の如くである。

即ち α -カゼインでは照射によりアンモニヤの量を増加しないが、 β -lactoglobulin ではアンモニヤの生成が明らかに認められた。従って β -lactoglobulin が電気泳動的に inhomogeneous になる1原因が照射によるアンモニヤの生成による蛋白質の変性分解に基づくものと推論される。今後多くの蛋白質についてアンモニヤの生成とこのアンモニヤが如何なる結合をして居たものか研究を続行する予定である。

要 約

(1) 全牛乳から Aschaffenburg の方法に準じ結晶状に単離した β -lactoglobulin は等電点よりアルカリ性の磷酸緩衝液 pH 6.7 では電気泳動的に単一界面を表わすが、酢酸緩衝液 pH 4.7 では2成分に分れ、Aschaffenburg が混合牛乳から得た $\beta_1 + \beta_2$ -lactoglobulin に該当するものと見られる。

(2) β -Lactoglobulin は紫外線照射により等電点近くでは白濁から沈澱を形成し、アルカリ側では黄褐変する。

(3) β -Lactoglobulin は電気泳動的には単一の界面を示す pH 6.7 溶液に紫外線を照射すると少なくとも2成分に分れ、酸性側では幾つかの界面を表わし、inhomogeneous になることが認められた。

(4) 電気泳動的に inhomogeneous になる原因の1つとして蛋白分子中からアンモニヤの発生が関与しているものと推論した。沈降分析の結果 S_0 には余り変化なく、沈降図観察から変性蛋白が polydisperse しているものと考えられる。

終りに本研究遂行に当り、沈降分析に御援助いただいた北大医学部第一生理学教室今井大雄氏並びに実験試料に関し種々御配慮を寄せられた雪印乳業研究所鈴木徳信氏に感謝の意を表わします。

(本研究の要旨は昭和32年11月、日本農芸化学会北海道支部会で講演したものである。)

(1) 小幡弥太郎, 坂村貞雄: 本誌, 32, 251(1958)

(2) A. M. Palmer: *J. Biol. Chem.*, 104, 359 (1934).

(3) W. G. Gordon, J. Ziegler: *Biochemical Preparation*, 4, 23 (1953).

(4) R. Aschaffenburg, J. Drewry: *Biochem. J.*, 65, 273 (1957).

(5) B. D. Polis, H. W. Schmuckler, J. H. Custer, T. L. McMeekin: *J. Amer. Chem. Soc.*, 72, 4965 (1950).

(6) A. G. Ogston, J. M. A. Tilley: *Biochem. J.*, 59, 644 (1955).

(7) R. Aschaffenburg, J. Drewry: *Nature*, 176, 218 (1955).

(8) D. W. Green, A. C. T. North, R. Aschaffenburg: *Biochim. Biophys. Acta*, 21, 585 (1956).

(9) G. L. Miller, R. H. Golder: *Arch. Biochem. Biophys.*, 36, 249 (1952).

(10) 例えば水島・赤堀編: 蛋白質化学, 3, p. 13.

(11) 小幡弥太郎, 小幡三男: 本誌, 32(2), 158 (1958).

(12) E. S. G. Barron, P. Finkelstein: *Arch. Biochem. Biophys.*, 41, 212 (1952).

(13) T. Svedberg, S. Brohult: *Nature*, 142, 830 (1938).

(14) 標準生化学実験(文光堂版): p. 317(1953).