可溶性羊毛蛋白の研究 (第1報)*

 α -Keratose の電泳, 沈降, 光散乱について

宮崎 芳光 (佐賀大学農学部)

昭和 34 年 6 月 20 日 受理

緒 言

羊毛のシスチン溶液の物理化学的な測定は古くから試みられており、ペプチッド結合を破壊せずにシスチンの S-S 結合 (disulphide bond) を開裂させて溶液試料を調製する方法等広く研究されている。

羊毛中のシスチンを peracetic acid で酸化溶解して^(1,2)調製した可溶性羊毛ケラチンの 1 つのフラクション, α -keratose の超遠心像は尿素或いはドデシル硫酸ソーダの添加により明瞭なピークを示しているが、著者は適当な緩衝液のみによって明瞭なピークの均一成分を得た。この溶液の光散乱を測定して粒子量を決定し、又 α -keratose の蛋白濃度の変化による解離の様式が緩衝液の種類によって異なることを見出したのでこれを報告する。

実 験

I. 実験方法

羊毛試料の調製 羊毛試料は Corfield⁽⁸⁾ 等の方法に準拠して、Australian Merino 64 s quality の処女羊毛を使用し、この羊毛の雨露で汚れた先端部分を除いて、残りの部分を使用した。これをベンゼン-メタノールの共沸混合溶液を用い、58.4° で、30 分、5 回処理して羊毛脂を除去し、風乾後更に 50° の温湯で充分に水洗した。これを再び風乾し、附着している植物質を櫛で除き、脱脂を完全にするために更に 1 回ベンゼン-メタノールで処理し、水洗し、風乾したものを羊毛試料とした。

Peracetic acid の合成 Peracetic acid の合成には 90% 過酸化水素水を使用した方が 30% のものを使用した場合より、合成された peracetic acid 中に残存する過酸化水素の量が少く、より好ましくなるが本実験では 30% 過酸化水素水を使用した。合成は Greenspan⁽⁴⁾ の法に従った。

酸化羊毛の調製 Peracetic acid-酸化羊毛の調製は Alexander⁽¹⁾ に従って行なった。著者の使用した 1.6 % peracetic acid は 30% の過酸化水素水より調製したため、その中に過酸化水素を約 5% 含有しているが、この過酸化水素のみの分解は困難なので実験にはこの混液を使用した。このため過酸化水素水のシスチンに対する作用を調べて第 1 表の結果を得た。Peracetic acid と過酸化水素の定量は D'Ans⁽⁵⁾ の法により、シスチンの定量は Sinohara 法⁽⁶⁾によった。第 1 表の結果から 3 時間処理は Alexander⁽⁸⁾ の結果に比し、酸化されたシスチン量として約 10% 高い値が得られているが、過酸化水素水による酸化作用が附加されていると考えられる。又 24 時間処理の場合も同様と考えられる。Peracetic acid は disulphide 結合に特異的に作用するが過酸化水素の作用は non-specific であるから^(7,8) この際ペプチッド結合もこの程度の作用を受けていると考えられる⁽²⁾。本実験で使用した酸化羊毛は、過酸化水素約 5% を含む、1.6% peracetic acid で、23°~25°、24 時間処理したものである。

第 1 表 各種処理によるシスチン含量の変化

Peracetic acid (%, W/V)	過酸化 水素水 (%, W/V)	時間 (時)	シスチン 含量 (%)	酸化されたシ スチン量 (最 初の量に対す る%)
1.6	5.6	24	0.2	98.4
0	5.6	24	9.1	26.6
1.6	4.8	24	0.3	97.5
0	4.8	24	10.4	16.1
1.6	5.6	3	1.4	88.7
0	5.6	3	10.7	13.7
1.6	4.8	3	1.7	86.3
無処理			12.4	100.0

ン量として約 10% 高い値が得られているが、過酸化水素水による酸化作用が附加されていると考えられる。又 24 時間処理の場合も同様と考えられる。Peracetic acid は disulphide 結合に特異的に作用するが過酸化水素の作用は non-specific であるから^(7,8) この際ペプチッド結合もこの程度の作用を受けていると考えられる⁽²⁾。本実験で使用した酸化羊毛は、過酸化水素約 5% を含む、1.6% peracetic acid で、23°~25°、24 時間処理したものである。

 α -Keratose 溶液の調製 α -Keratose 溶液の調

製法には Alexander⁽⁸⁾ の法、Corfield⁽⁹⁾ の法等があるが、本実験では Alexander の方法を使用した。即ち酸化羊毛を 0.3 N のアンモニア水中で攪拌溶解し、3000 r. p. m. で遠心分離して得た (α + γ)-keratose の溶液に塩酸溶液を加えて等電沈澱する部分を緩衝溶液に溶解、或いは 8 M 尿素を加えた緩衝溶液に溶解し、その後透析して γ -keratose を除去し、 α -keratose とした。 α -keratose の酸による沈澱物はアルカリの添加により溶解し、可逆的变化と思われるが、このアルカリ性溶液からの等電点は最初のものとは幾分異った値を示す。従って

* Studies on the Soluble Wool Protein. Part I. Electrophoresis, Sedimentation and Light Scattering of α -Keratose.

By Yoshimitsu MIYAZAKI (Faculty of Agriculture, Saga University)

等電点は明確さを欠くが、 α -keratose の沈澱は約 pH 4.9 附近から生じ始めて、4.0 で完了する。

α -Keratose 溶液の比粘度は調製後時間の経過と共に減少し、最初の 24 時間が著しく約 100 時間後に一定値になり、その後は貯蔵状態によって違うが、相当に安定となることが報告されている^(10,11)。著者の使用した試料はこの安定な状態の溶液である。

II. 実験結果

電気泳動 電気泳動は日立 HT-B 型ゼリウス装置を使用し、イオン強度 0.1 で測定した。泳動に供した試料の測定条件を第 2 表に示す。電気泳動図はまとめて第 1 図に示した。又炭酸塩緩衝液の下降界面に於ける見

第 2 表 電気泳動図の測定条件

図番号	溶 媒		pH	蛋白濃度 (%)	泳動時間 (秒)	電 流 (Amp.)	温度 (°C)
	緩衝液	尿 素					
1	炭酸塩	8 M	10.6	0.39	58	6	3
2	"	"	"	0.66	55	6	3
3	"	"	"	0.89	71	6	11
4	"	—	10.0	1.07	59	6	12
5	"	—	10.6	1.29	47	7	12
6	ペロナール塩	—	8.8	1.56	67	10	14

掛けの移動度 u' 、と蛋白濃度の関係の 1 例は第 2 図に示した。

ここで u' と真の移動度 u 、との間には $u' = u/\kappa A$ なる関係があり、 κ は溶媒の比電導度、 A はセルの断面積である。

超遠心分析 測定には Spinco Model E を使用した。 α -

第 1 図 α -Keratose の電気泳動図

第 2 図 見掛けの移動度(u')と蛋白濃度との関係
炭酸塩緩衝液, μ 0.1, pH 10.6, 下降界面

keratose 溶液は第 1 表中の 6 と同様であり、ペロナル緩衝液 (μ 0.1, pH 8.8) に透析したもので、蛋白濃度は 1.6% である。沈降像から α -keratose 溶液は均一なものであることが明らかになった。沈降定数を算出した結果 $s_{2.8} = 2.1S$ であり、水の粘度の項だけ補正して近似値を求めると $s_{20w} = 2.5S$ となる。

光散乱 散乱強度は Brice Phoenix 光散乱光度計で、蛋白濃度は Phoenix 示差屈折計で測定した。測定温度は、 $10^{\circ} \sim 14^{\circ}$ 、除塵は 20,410 r. p. m., $45 \sim 60$ 分で行った。ペロナル塩、炭酸塩の両緩衝液及びこれ等に 5 M/l 尿素を添加した緩衝液中で測定した散乱強度の変化の結果を第 4 図に示した。

第 4 図から明らかなように、 $(H_c/\tau)_{c \rightarrow 0}$ の値はペロナル塩、炭酸塩共に良く一致していて $(H_c/\tau)_{c \rightarrow 0} = 2.0 \times 10^{-6}$ であり、 $(H_c/\tau)_{c \rightarrow 0} = 1/M$ から粒子量は

56,100 r.p.m. 64 min. 56,100 r.p.m. 96 min.
第 3 図 α -Keratose の沈降図

第 4 図 緩衝液の種類及び 5 M/l 尿素的添加による散乱強度の変化

- ペロナール塩緩衝液: pH 8.6, μ 0.1
- 炭酸塩 " : pH 10.6, μ 0.1
- ペロナール塩緩衝液+尿素: pH 8.6, μ 0.1
- 炭酸塩 " +尿素: pH 10.0, μ 0.1

されている。下降界面での対称は蛋白濃度の増加により、蛋白分子間の相互作用が強く現れた結果生じたものと考えられる。S-carboxymethyl keratine 2 の電泳図の蛋白濃度依存性について Gillespie⁽¹³⁾ は単量体と会合体の平衡系の存在を想定しており、又絹フィブロイン溶液の光散乱測定から林⁽¹⁵⁾ は蛋白濃度変化が分散度に変化を与えると共に、分子型も変化させ、解離-会合能を変化させると報告している、ペロナール塩緩衝液中での電泳図が、炭酸塩緩衝液の場合と異り、蛋白濃度 1.6% という高濃度でも下降界面に対称が出現せず、又散乱強度の測定の結果、ペロナール塩では炭酸塩と異り、濃度の影響を比較的受けない事と併せ考えると、約 0.5% 以上の蛋白濃度では、ペロナール塩の場合の図の対称は分子間相互作用の弱いことを示し、炭酸塩での蛋白濃度の増加による対称は、分子間相互作用の結果蛋白の荷電に影響を与えたものと推定される。

沈降図は従来 pH 13 以外は 2 つのピークを示すという報告⁽¹¹⁾があるが、著者の沈降図はこれに反して、殆んど純粋な 1 つのピークを示した。これは使用した緩衝液の種類の相違が解離の様式にも相違を及ぼしたものと考えられる。この事は散乱強度測定の場合、5 M 尿素的添加が炭酸塩の場合にのみ異常を示すこととも関連があると考えられる。

α -Keratose の粒子量 500,000 及び 5 M 尿素添加の場合の 105,000 は Harrap⁽¹⁶⁾ 等の S-carboxymethyl keratine 2 の 450,000 及びこれにドデシル硫酸ソーダを加えた場合の 142,000 (蛋白として 95,000) にそれぞれ一致している。然しながら一方、 α -keratose にドデシル硫酸ソーダ、或いは 8 M 尿素添加で得た粒子量 45,000~50,000 という報告⁽¹¹⁾があり、著者が調製した α -keratose も尿素濃度の増加により更に解離し、50,000 程度の粒子量を与えるものと思われる。

要

約

著者の調製した α -keratose の電泳図は炭酸塩緩衝液の場合、下降界面に濃度依存性がみられた。沈降図はペロナール塩緩衝液の場合単一のピークを示し均一な成分である事が分った。この S_{20w} は 2.5 S であった。散乱

500,000 と算出される。炭酸塩に 5 M 尿素有添加したものは低濃度で異常値を示し (H_c/τ)_{c→0} は求められなかった。ペロナール塩に 5 M 尿素有添加した場合は (H_c/τ)_{c→0} = 9.5×10^{-6} となり、粒子量は 105,000 である。

考 察

著者が調製した α -keratose は電気泳動的には、イオン強度 0.1, pH 8.8~10.6 ではその殆んどが単一成分であり、僅かに移動の早い副成分が含まれている。8 M 尿素で処理した場合の泳動図は無処理の場合と大差なく、O'Donnell⁽¹⁰⁾ の報告と一致している。炭酸塩緩衝液 (μ 0.1, pH 10.6) 中の上昇界面は蛋白濃度の影響を受けないが、下降界面ではイオン強度 0.1, 蛋白濃度 0.39% では対称な図が得られ、濃度が高くなるにつれて図が崩れて対称になる。又下降界面の見掛けの移動度 (u') は濃度に依存しているのでも移動度も濃度依存性があると考えられる。電気泳動図の蛋白濃度の増加による対称は可溶性羊毛蛋白の一つのフラクションである, keratine 2 (component 2) 及びその誘導体である S-carboxymethyl keratine 2 の泳動図でも観察され^(12,13) α -keratose の場合と非常に良く似た傾向を示している。又絹フィブロイン溶液では、低イオン強度 (0.08 以下) で下降界面から得られた移動度に異常な蛋白濃度依存性があると報告⁽¹⁴⁾

強度測定より粒子量 500,000 を得た。5 M 尿素添加の場合には粒子量は 105,000 となった。

本実験を御指導下さった、佐大三山教授、九大山藤教授、渡辺助教授並びに実験に有益な御助言と原稿の校閲を願った九大林勝哉助教授に厚く感謝します。尚本研究は文部省内地研究員として九大農学部で行なったものであり、羊毛試料は中央毛織株式会社より頂いたものである。

- (1) P. Alexander, R. F. Hudson, M. Fox : *Biochem. J.*, 46, 27 (1950).
- (2) I. J. O'Donnell, E. F. Woods : *Proc. Int. Wool Text. Res. Conf. Aust.*, B, 48 (1955).
- (3) M. C. Corfield, A. Robson : *Biochem. J.*, 59, 62 (1955).
- (4) F. P. Greenspan : *J. Am. Chem. Soc.*, 68, 907 (1946).
- (5) J. D'Ans, W. Frey : *Ber.*, 45, 1845 (1912).
- (6) K. Shinohara : *J. Biol. Chem.*, 109, 665 ; 110, 263 ; 112, 671, 683 (1935).
- (7) P. Alexander, M. Fox, R. F. Hudson : *Biochem. J.*, 49, 129 (1951).
- (8) P. Alexander, R. F. Hudson : *Wool its chemistry and physics*, Chapman and Hall Ltd., London (1954).
- (9) M. C. Corfield, A. Robson : *Biochem. J.*, 68, 348 (1958).
- (10) I. J. O'Donnell, E. F. Woods : *Proc. Int. Wool Text. Res. Conf. Aust.*, B, 71 (1955).
- (11) I. J. O'Donnell, E. F. Woods : *J. Polymer Sci.*, 21, 397 (1956).
- (12) J. M. Gillespie, F. G. Lennox : *Aust. J. Biol. Sci.*, 8, 97 (1955).
- (13) J. M. Gillespie : *Proc. Int. Wool Text. Res. Conf. Aust.*, B, 35 (1955).
- (14) 林 勝哉 : 日化誌, 79, 127 (1958).
- (15) 林 勝哉 : 日化誌, 78, 1351 (1957).
- (16) B. S. Harrap, E. F. Woods : *C. A.*, 53, 3837 (1959).

蜂 蜜 の 研 究 (第2報)*

コージビオース, ニゲロース, マルトース及び

イソマルトースの分離

渡 辺 敏 幸, 麻 生 清 (東北大学農学部農芸化学科)

昭和 34 年 6 月 24 日 受 理

前報⁽¹⁾に於いて主として東北地方産蜂蜜 15 種の一般分析、糖の濾紙クロマトグラフィー (PPC) 及びハギの蜂蜜については活性炭カラムクロマトグラフィー (Carbon CC) による糖類の分別を行った結果、蜂蜜中の糖類としてフラクトース、グルコース、シュクロース、マルトース、メレチトースの他オリゴ糖 17, 合計 22 のスポットを認め、その中 15 がケトースを含む糖である事を報告した。

蜂蜜中のグルコ二糖類については White 等⁽²⁾が各種二糖類の赤外線吸収スペクトルを報告している中で 1,3- α 結合のニゲロースを蜂蜜から分離したと報告しており、マルトースについては Malyoth⁽³⁾, Vavrukh⁽⁴⁾, White 等⁽⁵⁾, Goldschmidt 等⁽⁶⁾, Galanti 等⁽⁷⁾など多くの研究者が蜂蜜中に存在することを PPC で指摘しているが結晶状に分離していない。又 1,6- α 結合のイソマルトースについても Goldschmidt 等⁽⁶⁾ が蜂蜜中に存在することを PPC で認めているが同じく結晶状に分離しておらず、その他のグルコ二糖類については報告が見当たらない。

そこで蜂蜜中の二糖類を更に詳しくしらべる目的でハギの蜂蜜 2.5 kg を Carbon CC で分別した二糖類のフラクションについて PPC 及び濾紙電気泳動 (PI) により検索した結果、グルコ二糖類では前報で報告したマルトースの他に α -結合を有する 3 種のグルコ二糖類コージビオース, ニゲロース (サケビオース) 及びイソマルトースの存在することを見出し、それらを結晶状に分離して証明するためそれらの各フラクションを pH=10 の硼酸緩衝液を用いる Carbon CC⁽⁸⁾ や、更にはアセチル化後マグネソール : セライトカラムクロマトグラフィー

* Studies on Honey. Part II. Isolation of Kojibiose, Nigerose, Maltose and Isomaltose.

By Toshiyuki WATANABE and Kiyoshi ASO (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai, Japan)

本報告中コージビオースの分離については *Nature*, 183, 1740 (1959) に、イソマルトースの分離については *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 23, 342 (1959) に速報として発表した。