卵白アルブミンを用いたゲル形成機構の解析†

土井悦四郎

(京都大学食糧科学研究所)

1. はじめに

卵白が加熱により白濁したゲルを生じることはよく知られている。卵白アルブミン (ovalbumin) は卵白の蛋白質の 50% 以上を示める主要な蛋白質であって⁽¹⁾, 加熱により同じように白濁したゲルを形成する。卵白アルブミンは容易に純粋な結晶標品が得られるので⁽²⁾, 古くより食品ゲルの研究材料として用いられてきた。Barbu and Joly⁽³⁾は、卵白アルブミンなどの球状蛋白質は、加熱により unfolding せず、球状のまま end-to-end に凝集して、ゲル化するという説を出した。Tomb⁽⁴⁾は、このような球状蛋白の凝集の仕方の両極端として、球状の蛋白質が一列に連った、“string of beads”と、不規則に寄り集った“random aggregation”の2つのタイプをあげている。Clark らは⁽⁵⁾, 血清アルブミンその他の蛋白質の加熱ゲルにおいて、球状の蛋白質が、ひも状に連った“string of beads”型のポリマー形成が、ゲルの基本となり、この線状ポリマーがお互いに結合してゲルの網目構造を形成するというモデルを提出している。卵白アルブミンにおいても、このような線状ポリマーの形成が基本となっている実験事実が見出されている。

2. ゲルの性状に対する pH 塩濃度の影響

加熱による卵白アルブミンの凝集体の形成について、Nakamura ら⁽⁶⁾は、pH と塩濃度の影響を検討して、その反応が、蛋白質の変性と、それに続く凝集体形成の二段階よりなるとし、その制御要因は、静電的反発力であるとしている。Hegg ら⁽⁷⁾は pH と塩濃度を変えて卵白アルブミンを加熱することにより、透明ゲル、半透明ゲル、ゲル状沈殿、沈殿が得られ、ゲルの形成を凝集沈殿と、非凝集の中間としてとらえている。また彼らは、凝集沈殿は、蛋白質の変性温度よりも低い温度で生じ、ゲル形成は、変性温度と同じか、あるいはより高い温度で

生じると述べている。しかし、彼らは、変性温度を示差熱分析により得ている。この方法で得られた変性温度は他の方法で得られる変性温度⁽⁸⁾よりも高い値を示している可能性がある。Egelandsdal⁽⁹⁾は 8.2% の卵白溶液の塩濃度と pH を変えて、加熱ゲルの固さを測定している。ゲル強度はアルブミンの等電点 (pH 4.7) 付近で弱く、その両側の酸性側とアルカリ側の pH で強く (固く) なり、二つのピークが見られる。塩濃度が高いと、ピークの位置は、等電点から、より離れた pH へと移行する。これらの結果を総合して、Nakamura らと同様に、ゲル形成は第一義的には、静電的反発力により支配されていると結論している。筆者らの研究室においても上記と同じような実験を行い、ゲル強度とゲルの透明度について次のような結果を得ている⁽¹⁰⁾。

20 mM の食塩を含む 5% 卵白アルブミンの溶液を、各 pH において 80°C, 1 時間加熱し、ゲル強度とゲルの透明度を測定したのが図 1 である。等電点に近い、pH 4~6 の間ではゲル強度の低い白濁したゲルが得られる。それよりも少し酸性側の pH 3.5~4.0, およびアルカリ側の pH 6.0~6.5 の間で、濁度の急激な変化が認められる。pH 3.5 と 6.5 ではわずかに濁ったゲルが得られ、ゲル強度は、この 2 カ所で極大値を示す。pH 3.5 より酸性側と pH 6.5 よりアルカリ側の pH で透明なゲルが得られるが、pH が等電点より離れるに従ってゲル強度は低下する。

pH 3.5, 5.5, 7.5 の 3 点において、塩濃度をいろいろと変えて同様な実験を行うと、pH 5.5 では、ゲル強度の弱い白濁したゲル、または、凝固物を含む懸濁液が得られた。pH 3.5 と 6.5 では、塩濃度 0 で、透明な溶液が得られ、塩濃度が増加すると、濁度が急激に増大し、ゲル強度は最初増加するが、やや濁りの生じ始める塩濃度で極大値を示し、さらにそれより高い塩濃度では減少する。この実験で、卵白アルブミンの濃度、pH、イオン強度を適当に選ぶことにより、加熱後に透明な溶液、

† Mechanism of Gel Formation of Ovalbumin.
Etsushiro Doi (Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji 611)

透明なゲル、懸濁溶液、白濁ゲルの4つの形態を自由に得ることができた。

このようにして得たゲルは、SDS により可溶化され、SDS-HPLC によって分子量を分析すると、モノマー、ダイマーを含む比較的低分子のポリマーよりなっている。(分子間 S-S 結合による重合度はそれほど多くないことを示す。)メルカプトエタノールと SDS の存在下ではすべてモノマーとなる。

3. 二段階加熱による透明ゲルの形成⁽¹¹⁾

前記の実験条件では比較的狭い pH、塩濃度の範囲で透明ゲルが得られた。しかしあらかじめ透明溶液の得られる条件(たとえば、塩濃度 0, pH 7.5)で加熱し、その後塩を加えて再加熱すると、より広い塩濃度の範囲で

図1 卵白アルブミンゲルの透明度, Hardness と pH の関係
5% 卵白アルブミン, 20 mM NaCl, 80°C
1 時間加熱

ゲル強度のすぐれた、透明または透明に近いゲルが得られる。この事実は、透明溶液を与える加熱条件で、すでにゲルの基本となる構造が形成されていることを示している。透明ゲルあるいはわずかに白濁したゲルが、最大のゲル強度を与えることは、このような条件下で最も良好な三次元のネットワークが形成されていることを示している。

4. 卵白アルブミンの加熱により得られる線状高分子物質について

卵白アルブミンを低塩濃度、等電点より離れた pH で、加熱して得られる透明溶液は、ゲル構造の基本となる高分子物質を含んでおり、ゲル形成機構の解明に好適の材料である。Kato らは^(12,13) pH 7.9, 0.01 M リン酸緩衝液の条件で卵白アルブミンを加熱し、得られた、透明溶液を、低角レーザー光散乱とゲル濾過を組み合わせた装置により分析し、分子量、1 千万以上の高分子物質が得られていることを示した。

筆者らも⁽¹⁴⁾ pH 7.0 で加熱して得られる透明溶液を種々の方法で分析し、以下の結果を得た。この溶液は、超遠心分析で、22 s の鋭いピークを与え、固有粘度は、native な蛋白質の 10 倍以上となり、高分子の存在を示した。遠紫外域における CD スペクトルは、native のものとは異なるが比較的良く似ており、ランダム構造の CD スペクトルとは著しく異なっていた。透過型電顕により、枝分れの無い線状の高分子の存在が確認された。この高分子物質は、光散乱分析の結果を Zimm Plot し分子量が、1000 万に達する高分子であることが判明した。HPLC-ゲル濾過、固有粘度の分析結果を併せて

図2 加熱による卵白アルブミンの変性と重合

図3 卵白アルブミンの加熱ゲル形成の模式図

Yamakawa and Fujii⁽¹⁵⁾ の worm-like モデルを適用すると、この線状高分子の剛直性の指標となる持続長 ($q=250 \text{ \AA}$) が得られた。この値は、鎖の剛直性が、二重らせん DNA の約半分位であることを示しており、電子顕微鏡像から見て妥当な値と考えられる。鎖のなかでモノマーの占める長さ ($28.6 \text{ \AA}$) と、鎖の直径 ($115 \text{ \AA}$) も得られている。この直径についてはなお検討の余地がある。HPLC を用いて 75°C および 80°C におけるモノマーの消失速度を測定すると、この反応がほぼ一次反応に従っており、蛋白質の変性が、ポリマー形成の律速段階であることを示している。

5. 卵白アルブミンゲル形成のモデル

以上の実験事実よりゲル形成反応をモデルにより説明する。卵白アルブミンの分子は加熱により変性して、疎水性側鎖の一部を分子の外側に露出するが、分子全体は球状を保っている。この変性により生じた疎水性相互作用（引力）とそれに対抗する静電的反発力とのバランスにより線状の高分子 “string of beads” または不定形の凝集体 “random aggregates” を生じる。（図2）

この両者の存在割合は、蛋白質濃度、pH、イオン強度により異なる（図3）。低蛋白濃度、等電点より離れた pH、低イオン強度ではポリマーの形成は生じないで、モノマーのまま存在するであろう（図3、左端の図）。pH がやや等電点に近づき、イオン強度が少し高くなると線状ポリマーが形成される。このポリマー間の反発が少なく、お互いにかみ合うような条件で、ゲル強度の高い透明ゲルが得られる。等電点の近くでは、不定形の凝集体の形成が主として生じている。透明なゲルを生成する条件との中間の条件では、線状ポリマーの間に、凝集体の混在した系となり不透明でかつ、強度の低いゲルとなる。

以上のモデルは、透明ゲルあるいはやや白濁したゲルが、強度の高いゲルを形成する点、および一度線状ポリ

マーが形成すると、二段階加熱で、広い塩濃度範囲で透明ゲルが形成される点をよく説明することができる。

おわりに

筆者らのモデルでは、分子が球形を保ったまま、線状のポリマーを形成し、このポリマーがゲルネットワークを作ると仮定したが、より極端な pH 条件、たとえば pH 10 以上のアルカリ側で加熱した場合、蛋白質はランダムコイルにまで変性し、異なった型のゲル形成が行われている可能性がある⁽¹⁶⁾。

球状の蛋白質が、どのようにして “string of beads” となるのか？ 図2のように並ぶのか、場合によっては全体がヘリックスを巻いている可能性についても、さらに詳細な検討を必要とする。

- (1) D. T. Osuga and R. E. Feeney: “Food Proteins,” ed. by J. R. Whitaker and S. R. Tammenbaum, Avi Publishing Company, Inc. Westpoint, Connecticut, 1977, p. 209.
- (2) S. P. L. Soerensen and M. Hoyrup: *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, **29**, 12 (1915-1917).
- (3) E. Barbu and M. Joly: *Discuss. Faraday Soc.*, **13**, 77 (1953).
- (4) M. P. Tombs: *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, **57**, 158 (1974).
- (5) A. H. Clark, F. J. Judge, J. B. Richards, J. M. Stubbs and A. Suggett: *Int. J. Pept. Protein Res.*, **17**, 380 (1981).
- (6) R. Nakamura, H. Sugiyama and Y. Sato: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 819 (1978).
- (7) P. O. Hegg, H. Martens and B. Löfqvist: *J. Sci. Food Agric.*, **30**, 981 (1979).
- (8) R. Nakamura, M. Hirai and Y. Takemori: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 149 (1980).
- (9) B. Egelanddal: *J. Food Sci.*, **45**, 570 (1980).
- (10) H. Hatta, N. Kitabatake and E. Doi: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2083 (1985).
- (11) N. Kitabatake, H. Hatta and E. Doi: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 771 (1987).
- (12) A. Kato, Y. Nagase, N. Matsudomi and K. Kobayashi: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1829 (1983).
- (13) A. Kato and T. Takagi: *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 1 (1987).
- (14) 小関泰平, 福田 猛, 北島直文, 土井悦四郎: 日本農芸化学会昭和 62 年度大会講演要旨集, 1987, p. 280.
- (15) H. Yamakawa and M. Fujii: *Macromolecules*, **7**, 128 (1974).
- (16) F. S. M. Van Kleef: *Biopolymers*, **25**, 31 (1986).