

原 著

還元剤処理に伴う鶏卵オボムコイドの熱凝固性について

渡辺弘子 加藤保子

川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科

(平成7年10月18日受理)

Study on Heat-Coagulation of Hen's Ovomucoid Treated with Reducting Agent

Hiroko WATANABE and Yasuko KATO

*Department of Clinical Nutrition
Faculty of Medical Professions
Kawasaki University of Medical Welfare
Kurashiki, 701-01, Japan
(Accepted Oct. 18, 1995)*

Key words : ovomucoid, ovalbumin, heat-coagulation, cystein, disulfide bond

Abstract

Coagulation of heated ovomucoid (OM) was investigated in the pH region from acidic to neutral. Interaction between OM and ovalbumin (OVA) which have intramolecular disulfide bonds was examined. Furthermore, heat coagulation of OM and/or OVA was tested after treatment with cystein as reductant, due to exchange of disulfide bonds between intramolecule and intermolecule. It was likely that interchanges between sulfhydryl and disulfide groups in OM and OVA were formed at pH4.0, 5.0 and 6.0; however, a considerable amount of OM was remained as soluble. Thus OM was not completely coagulated by heating under this experimental condition.

要 約

酸性から中性条件下で100℃, 10分間加熱した場合のオボムコイドの熱凝固性を調べた。さらに分子内S-S結合を有するオボアルブミンとオボムコイドの相互作用及び、S-S還元剤であるシステインでタンパク質分子内S-S結合を還元した場合の、タンパク質分子間S-S結合の再編成によるオボムコイドの熱凝固性も調べた。その結果、pH4.0, 5.0, 6.0でオボムコイドとオボアルブミンのSH/SS交換反応が起こりやすかったが、依然として可溶性画分

にオボムコイドの残存が観察された。システインを添加してもオボムコイドの凝固はほとんど変化しなかった。以上のようにこの実験条件下ではオボムコイドは完全には熱凝固されなかった。

結 言

卵アレルギーの主要原因物質は主として卵白タンパク質である。卵白タンパク質の中でも、アレルギーとしての性質が最もよく調べられているのは、オボムコイドであり、食餌性アレルギータンパク質の代表的タンパク質のひとつとされている。オボムコイドは、分子量28,000、3種のドメインより形成される¹⁾。各ドメインには3個ずつのS-S結合が存在する。これによりオボムコイド分子の熱安定性は高く保たれ、アレルギー活性も高い熱安定性を示すことが確かめられている²⁾。即ち、殻付卵を100℃で20分間加熱してもオボムコイドの抗原性は十分残存しており、100℃、45分間という長時間の加熱によっても、その抗原性を完全に消失させることはできなかった³⁾と報告されている。このように通常の調理で行われる加熱条件下では、オボムコイドは熱変性を受けにくく、抗原性は十分残存していると思われる。

しかし、オボムコイドのS-S結合を還元することでオボムコイド分子が変化しその免疫化学的性質が変化するという⁴⁾。還元剤存在下での加熱によるオボムコイドの熱凝固性に関する詳細は、よく知られていない。

そこで、オボムコイド溶液を酸性から中性条件下で、他のタンパク質と共に加熱あるいは、オボムコイドに還元剤を作用させ加熱した場合のオボムコイドの凝固性を調べた。

実験方法

1. 材料および試薬

オボムコイドおよびオボアルブミンは名古屋大学松田幹先生よりの供与による。緩衝液の試薬およびシステイン一塩酸塩等すべて和光純薬工業(株)製特級のものを使用した。

2. 各pH緩衝液によるオボムコイド溶液の調整

卵白より抽出したオボムコイド、オボアルブミンのそれぞれ3 mg/ml水溶液を調整した。0.3

M酢酸緩衝溶液 (pH3.4, 4.0, 5.0) および0.2 Mリン酸二水素カリウム一リン酸水素二ナトリウム緩衝溶液 (pH6.0, 7.0, 7.5) を調整した。オボムコイド水溶液とこれらの緩衝液を用いて両タンパク質の最終濃度を1 mg/mlに調整した。

3. オボムコイドおよびオボアルブミン混合溶液の調整

上記pH3.4-7.5の緩衝液とオボムコイド水溶液、オボアルブミン水溶液を等量ずつ混合し、各々の最終濃度を1 mg/mlとした。

4. 還元剤の影響 (システイン一塩酸塩)

各pHの緩衝液を用いてシステイン一塩酸塩を0.226mg/mlとし、この溶液とオボムコイド水溶液および水を各等量混合してシステインの最終濃度を428.9mMに調整した。オボムコイドとオボアルブミンの混合溶液においてもオボムコイド水溶液、オボアルブミン水溶液および各pHのシステイン緩衝液を等量ずつ混合してシステインの最終濃度を上記と同様に調整した。

5. タンパク質の定量

タンパク質の定量はLowry法⁵⁾により、牛血清アルブミンを基準液とした。

6. 加熱試料溶液の調整

各試料溶液を沸騰水浴中で、10分間加熱後直ちに氷冷し、14,000rpmで20分間遠心し、上清を以下の実験に用いた。

7. ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

加熱試料溶液50 μ lを等量のsample bufferと混合して泳動試料とした。2-メルカプトエタノール(2-ME)添加試料は、上記の泳動試料に5%の2-MEを添加し、100℃で3分間加熱した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、アクリルアミド濃度12.5%のゲルを用いてLaemmliら⁶⁾の方法で行った。各試料は10 μ lずつ泳動した。泳動後は、クマシーブリリアントブルー染色を行い、7%酢酸で脱色した。

8. イムノブロットイング

各試料溶液中のオボムコイドの免疫学的検出

をイムノブロッティング法⁷⁾を用いて行った。泳動後の SDS-PAGE ゲルをニトロセルロースシートに転写し、ウサギ抗オボムコイド及び peroxidase 標識ヤギ抗ウサギ IgG を用い 4-クロロ-1-ナフトールを用いて発色した。

実験結果および考察

1. pH の影響

一般に、タンパク質は等電点 (pI) 近くではタンパク質分子が不安定化し沈殿しやすくなる。そこで、オボムコイドを pH3.4 から 7.5 までの緩衝液中で加熱し、pH による熱凝固性を調べた。pH を調整したオボムコイド溶液を 100°C で 10 分間加熱・冷却後、遠心分離して可溶性タンパク質画分を得た。加熱前後の各々のタンパク質量を定量し、加熱後の可溶性タンパク質量の割合を加熱前タンパク質量に対する割合として求めた。酸性から中性における pH では、100°C で加熱してもオボムコイドはほとんど可溶化されていた。オボムコイドの pI は 3.9–4.5 であるが、pH4.0 でもオボムコイドは凝固しなかった。しかし pH 4.0 においてのみ他の試料より可溶性タンパク質の割合が小さくなっていった。可溶化画分でオボムコイドの重合化が生じているか否かを調べるために、SDS-PAGE を行った。しかし、オボムコイド分子の重合化も生じていなかった。

2. 他のタンパク質との相互作用

オボアルブミンは卵白中に最も多量に存在するタンパク質で、分子内に S-S 結合 1 個と遊離の SH 基を 4 個もっている。一方、オボムコイドは 9 個の S-S 結合をもつ。そこでオボムコイドにオボアルブミンを加えて加熱した場合の SH/SS 交換反応やその他の相互作用によるオボムコイドの熱凝固性を調べた。オボアルブミンとオボムコイドの等濃度混合溶液 (各 1 mg/ml) を調製した。この pH3.4 から 7.5 までの試料を 100°C で 10 分間加熱後遠心し、可溶性画分を得た。加熱後の可溶性タンパク質の加熱前に対する割合を算出し、その結果を図 1 に示した。pH4.0, 5.0, 6.0 で加熱後の可溶性タンパク質量は半量以下となった。オボムコイド、オボアルブミンの混合系で加熱したため、オボムコイドが凝固しているとは限らない。そこで、可溶性画分の 2-ME

無添加の SDS-PAGE 及びウサギ抗オボムコイド抗体を用いたイムノブロッティングを行い、オボムコイドの挙動を調べた。SDS-PAGE の泳動パターンを図 2 A に示した。pH4.0 と 5.0 以外では、下層泳動ゲル内に入りきらない高分子の凝集体が認められた。凝集体の増加と同時に単量体オボアルブミンのバンドは減少していた。pH

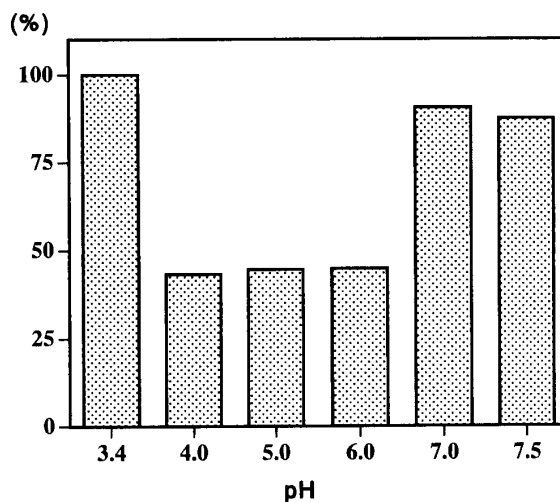


図 1 加熱前に対する加熱後の可溶性タンパク質の割合
オボムコイドとオボアルブミンの混合溶液

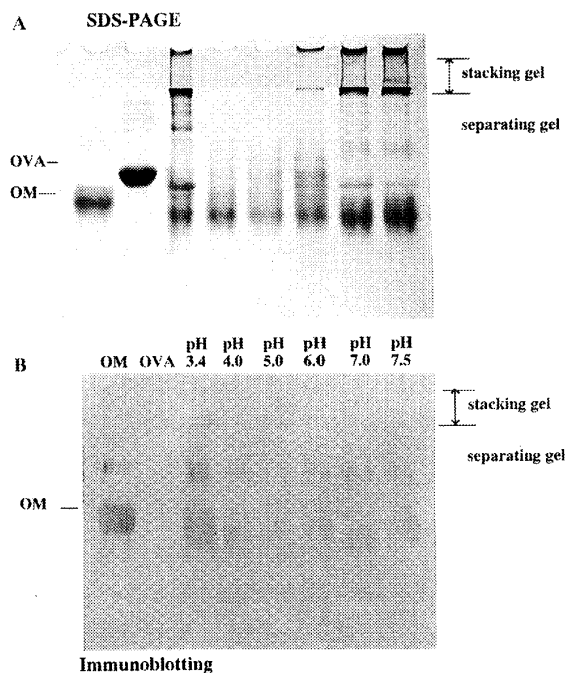


図 2 pH3.4 から pH7.5 におけるオボムコイドとオボアルブミンの混合溶液の加熱後の可溶性画分の SDS-PAGE パターン (A) と Immunoblotting 分析 (B)

4.0と5.0でもオボアルブミンがかなり消失していた。オボアルブミンはその等電点である4.7付近を境にして、酸性側とアルカリ性側の両方において、ごく狭い範囲のpH域でゲルを形成する^{8,9)}ことよりこれらのpHの試料中のオボアルブミンはゲル化あるいは凝固したと考えられる。

一方、オボムコイドの残存性をイムノブロッティングで調べた(図2B)。pH4.0, 5.0では単量体オボムコイド部分の発色が薄くなっているのが認められ、pH3.4, 7.0および7.5においては濃縮ゲル内の凝集体の部分にも発色がみられた。これらの結果から、加熱凝固したタンパク質はオボアルブミンが大部分であるが(図1および図2A)、オボムコイドも可溶性凝集体に含まれていることが認められた。pH3.4以外のpH試料ではオボムコイド部分の発色が薄くなったが、オボムコイドは残存していることが観察された。

可溶化画分に、SDS-PAGEの濃縮ゲル内にとどまっている高分子の重合体が認められた(図2A)。これらの重合体が、オボムコイドとオボアルブミンのSH/SS交換反応によって形成されたものであるかどうかを確認するために、2-MEでS-S結合を切断したSDS-PAGEを行った。未還元(-2ME) SDS-PAGEで濃縮ゲル内に凝集体が認められたpH3.4, 7.0, 7.5の試料は、2MEで還元することによって、オボムコイド及びオボアルブミンの単量体が認められた(図3)。この結果から、オボムコイドとオボアルブミンの混合溶液を加熱すると、分子間および分子内SH/SS交換反応により高分子の重合体が形成されたものと推察された。

3. 還元剤の影響

卵白のゲル形成性については加熱処理の場合が最もよく研究されており、卵白構成タンパク質の中ではオボアルブミンについての研究が多い。分子内にS-S結合をもつリゾチームあるいはコンアルブミンは、還元剤を加えることによりゲル形成性を示すことが報告されている^{10,11)}。そこで、これらのタンパク質同様に分子内にS-S結合をもつオボムコイドにSH化合物であるシステイン-塩酸塩を酸性から中性条件下で作用させ、加熱処理を行い、オボムコイドの凝固性に与える影響を調べた。なお、システイン-

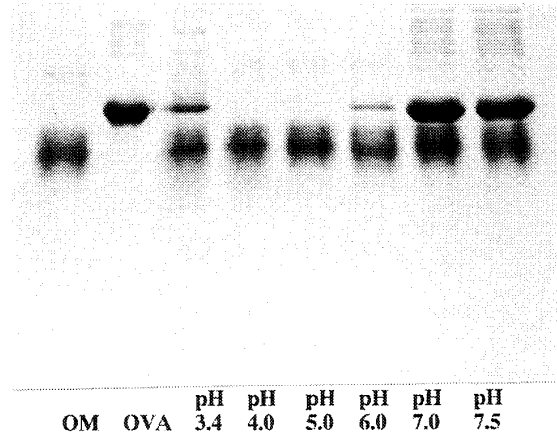


図3 オボムコイドとオボアルブミンの混合溶液の加熱後の可溶性画分に2-メルカプトエタノールを添加した試料のSDS-PAGEの泳動パターン

塩酸塩を各pHの緩衝液に添加しても各試料のpHは変化しなかった。オボムコイドにシステインを添加したpH3.4から7.5の試料を100℃で10分間加熱し、加熱前のタンパク質量に対する加熱後の可溶性タンパク質の割合を求めた。pH4.0でわずかに可溶性タンパク質が減少していたが、システイン無添加の系とほとんど同じ傾向を示した。

オボムコイドとオボアルブミンの混合系についても検討した。すなわち、オボムコイド・オボアルブミン混合溶液に上記同様にシステインを作用させ、オボムコイドの熱凝固性を調べた。これまでと同様に、加熱後の可溶性タンパク質の割合を求め、可溶性画分のSDS-PAGE、ウサギ抗オボムコイドを用いたイムノブロッティングを行った。図4に加熱後の可溶性タンパク質の割合を示したが、システイン無添加のオボムコイドとオボアルブミンの混合溶液の加熱変化(図1)とほぼ等しい傾向にあった。2-ME無添加のSDS-PAGEの泳動パターンをみると(図5A)、pH4.0, 5.0および6.0ではオボアルブミンがほぼ消失しており、pH4.0と5.0以外では泳動しない高分子の凝集体が認められた。同時にオボアルブミンのバンドがうすくなっているのが観察された。イムノブロッティングにおいてはpH4.0-7.0で単量体オボムコイドの発色が薄いことが認められたが、pH3.4, 7.0, 7.5では濃縮

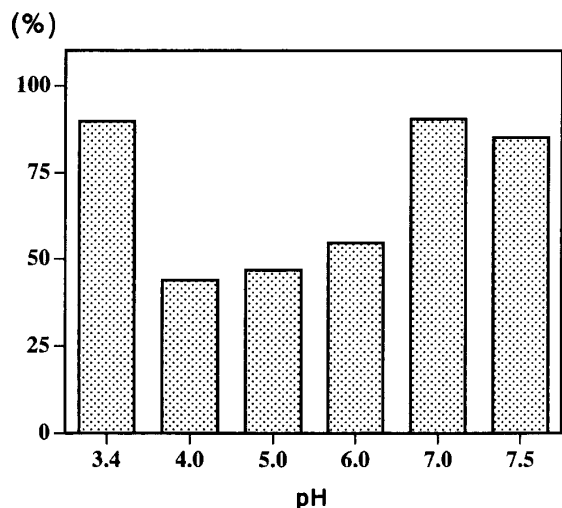


図4 加熱前に対する加熱後の可溶性タンパク質の割合

システインを添加したオボムコイドとオボアルブミンの混合溶液

ゲル部分にも発色が認められた(図5B)。濃縮ゲル内の凝集体は、2-MEでS-S結合を切断したSDS-PAGEを行い、オボムコイドとオボアルブミンのSH/SS交換反応による重合体であることを確認した。以上のようにオボムコイドとオボアルブミンにシステインを添加した系でもpH4.0, 5.0, 6.0でオボムコイドとオボアルブミンのSH/SS交換反応が起こりやすく、他のpHの試料より熱凝固性が大きかった。しかしオボムコイドは完全には凝固されなかった。また、還元剤としてのシステインは、オボムコイド・オボアルブミンの相互作用にはほとんど影響を及ぼさなかった。

鶏卵卵白中のアレルゲンタンパク質といわれているタンパク質には、オボムコイド以外にオボアルブミン、コンアルブミン、リゾチームが報告されており^{12,13)}、一般に熱安定性が高く熱変性を受けにくい。

リゾチームは、通常のpH域ではゲルを形成し

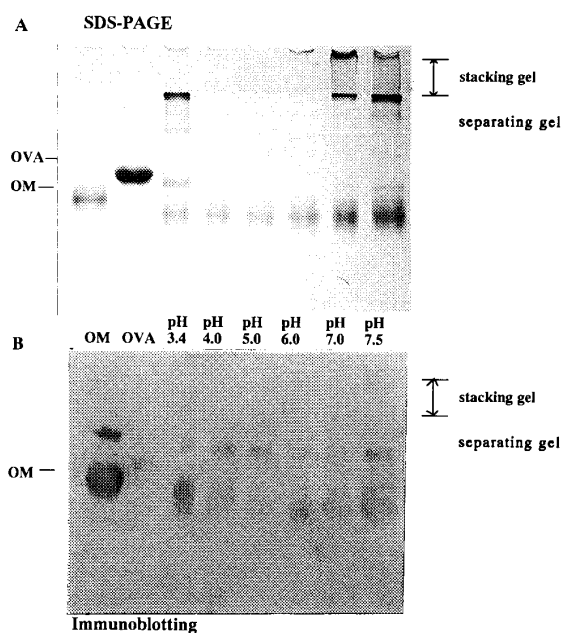


図5 システインを添加したオボムコイドとオボアルブミンの混合溶液の加熱後の可溶性画分のSDS-PAGEパターン(A)とImmunoblotting分析(B)

ないといわれていた¹⁴⁾が、あらかじめSH化合物を加えて分子内S-S結合を部分的に切断することにより、ゲル形成性が認められた¹⁰⁾という報告や、リゾチームと同様に分子内に多くのS-S結合をもつコンアルブミンについても、還元剤を加えることにより37°Cという低い温度でもゲル形成性を示した¹¹⁾という報告がある。

オボムコイドは分子内にS-S結合をもつことにより、熱安定性が非常に高いことが知られている。S-S還元剤であるシステインを酸性から中性化で作用させ、加熱による凝固を試みた。さらに卵白タンパク質であるオボアルブミン存在下でも同様の実験を行った。しかし、この実験条件下では、オボムコイドは完全には熱凝固されなかった。

文 献

- 1) Kato I, Schrode J, Kohr W J and Laskowski M Jr (1987) Chicken ovomucoid : determination of its amino acid sequence, determination of the trypsin reaction site, and preparation of all three of its domains. *Biochemistry*, **26**, 193-201.
- 2) Matsuda T, Watanabe K and Nakamura R (1982) Immunochemical studies on thermal denaturation

- of ovomucoid. *Biochimica et Biophysica Acta*, **707**, 121—128.
- 3) GU J, Matsuda T and Nakamura R (1986) Antigenicity of ovomucoid remaining in boiled shell eggs. *Journal of Food Science*, **51**, 1448—1450.
 - 4) Morton J I and Deutsch H F (1961) Immunochemical studies of modified ovomucoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **93**, 661—665.
 - 5) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Ranball RJ (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265—275.
 - 6) Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680—685.
 - 7) Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**, 4350—4354.
 - 8) Egelanddal B (1980) Heat-induced gelling in solutions of ovalbumin. *Journal of Food Science*, **45**, 570—573.
 - 9) Nakamura R, Fukano T and Taniguchi M (1982) Heat-induced gelation of hens yolk low density lipoprotein dispersion. *Journal of Food Science*, **47**, 1449—1453.
 - 10) Hayakawa S and Nakamura R (1986) Optimization approaches to thermally induced egg white lysozyme gel. *Agricultural and Biological Chemistry*, **50**, 2039—2046.
 - 11) Hirose M, Oe H and Doi E (1986) Thiol-dependent gelation of egg white. *Agricultural and Biological Chemistry*, **50**, 59—64.
 - 12) Langeland T and Harbitz O (1983) A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white. V. Purification and identification of a major allergen (antigen 22) in hen's egg white. *Allergy*, **38**, 131—139.
 - 13) Anet J, Back JF, Backer RS, Barnett D, Burley RW and Howden MEH (1985) Allergens in the white and yolk of hen's egg. A study of IgE binding by egg proteins. *International Archives of Allergy and Immunology*, **77**, 364—371.
 - 14) Hegg P-O (1982) Conditions for the formation of heat-induced gels. *Journal of Food Science*, **47**, 1241—1244.