

(8)

鳥卵オボアルブミンおよびオボムコイドの化学的性質と
加熱構造変化に関する比較研究

丸尾 知実

ダチョウ (Ost) 卵白主要タンパク質、オボアルブミン(OVA)、オボムコイド (OVM) の化学構造や特性については、今なお不明な点が多い。そこで、本研究では両タンパク質のアミノ酸配列、翻訳後修飾等の化学構造の一部明らかにするとともに、加熱処理に伴う構造の変化を、分光学的手法や作製したモノクローナル抗体 (MAb) を利用して、ニワトリ (Chi) タンパク質と比較解析した。

OstOVA のトリプシン分解ペプチドを用いて内部アミノ酸配列解析を行った結果、HPLC 分取により得られた 5 種のうち 4 種のペプチドについて配列を解明した。得られた 4 配列は、ChiOVA の 187-194、200-208、280-283 および 370-377 残基目に相当すると思われた。OstOVA の翻訳後修飾のうち、結合糖は ChiOVA と比べ顕著に多く、中性糖含量は約 2 倍であった。ChiOVA には 0~2 個のリン酸基が結合しているが、OstOVA の平均結合リン酸基数は 1 個であった。また、遊離の SH 基数は、ChiOVA は 1 分子あたり 4 個のところ、OstOVA は 3 個と算定された。OstOVM では 25~44 kD の間に広がる不均一な 3 画分が確認されたが、それらの N 末端 15 残基のアミノ酸配列に差異はなかった。一方、脱糖処理により、SDS-PAGE では約 25 kDa の 1 本のバンドに収束したことから、OstOVM の 3 画分のポリペプチド鎖は翻訳産物として同一で、不均一性は結合糖鎖によるものと推察された。また脱糖した ChiOVA と OstOVA の分子量がほぼ同じことから、ポリペプチド鎖およびドメイン構造は類似していると思われた。OstOVM の糖鎖修飾は ChiOVM と同程度と推測され、中性糖の含量は ChiOVM の約 3 倍の約 16%であった。

OstOVA 構造研究用ツールとして OstOVA 特異的 MAb を作製した。得られた 4 抗体はいずれも IgG₁ で、各種鳥卵 9 種の OVA との結合特異性が異なり、OstOVA との結合における解離定数は $1.65 \times 10^{-7} \sim 8.33 \times 10^{-9}$ であった。

OVA および OVM の加熱による構造変化の過程を、濁度、凝集特異的色素による蛍光、タンパク質自然蛍光および、上記 MAb を用いた抗体結合性等の変化を指標として Chi タンパク質と比較して解析した。その結果、中性では ChiOVA 分子の集合は 65°C、OstOVA では 75°C 付近で開始したと推定され、OstOVA のほうが 10°C 高かった。また ChiOVA は 71°C 付近から沈殿に至ると推測されたが、OstOVA は容易に沈殿しなかった。加熱構造変化が著しい酸性においても、OstOVA の分子集合や沈殿が始まる温度は ChiOVA に比べ、約 20°C 高かった。以上のように、OstOVA は ChiOVA に比較して加熱安定性が顕著に高いことが明らかになった。

(8)

Comparative study on chemical structure and thermostability of
avian ovalbumin and ovomucoid

Tomomi Maruo

The chemical structure and properties of ostrich (Ost) ovalbumin (OVA) and ovomucoid (OVM), major egg white proteins, are not yet fully elucidated. In the present study, the partial amino acid sequences and the post-translational modifications of OstOVA and OstOVM were compared to those of chicken (Chi) proteins. Moreover, the studies comparing Ost and Chi proteins were performed on the structural changes under heat treatment by using spectrometrical methods and specific monoclonal antibodies (MAbs) established during this study.

The amino acid sequences of 4 peptides isolated by HPLC from tryptic peptides of OstOVA were aligned with that of ChiOVA and suggested to correspond to residues 187-194, 200-208, 280-283 and 370-377 of ChiOVA sequence. The carbohydrate content of OstOVA was much higher than that of ChiOVA, and double amounts of neural sugars were bound to OstOVA. The number of phosphorylation sites in ChiOVA is known to be 0 to 2, while OstOVA was found to bind around one phosphoryl group. ChiOVA has 4 free sulfhydryl groups, while the number of groups in OstOVA was estimated to be 3.

Although OstOVM consisted of three heterogeneous fractions with a size distribution between 25 and 44 kDa, 15 residues of the N-termini of the fractions were identical and deglycosylated OstOVM formed a single 25 kDa band on SDS-PAGE. This suggests that the three fractions are translated from a single gene and the heterogeneity in size is caused by glycosylation. The similarity in size between Ost and Chi OVM polypeptides also suggests that the structural feature of OstOVM resembles the three-domain structure of ChiOVM. The extent of OstOVM glycosylation appeared comparable to that of ChiOVM but OstOVM gave 3 times higher neutral sugar content (approximately 16%) than did ChiOVM.

The hybridomas producing anti-OstOVA MAb were established. The four kinds of MAbs obtained showed different binding specificity to OVAs from 9 avian species and their dissociation constants (Kd) in the binding to OstOVA were 8.33×10^{-9} to $1.65 \times 10^{-7} \text{ mol}^{-1}$.

The structural changes of OVA and OVM under heat treatment were monitored by turbidity, fluorescence emitted by an aggregation-specific reagent or the proteins themselves. Moreover, the binding of the MAbs mentioned above to heat-treated OstOVA was analyzed by ELISA. In neutral pH, ChiOVA started to aggregate at around 65°C, while OstOVA did so at around 75°C. In acidic pH, the temperatures to start aggregation and precipitation were coincidentally 20°C higher in OstOVA than in ChiOVA. OstOVA thus appeared remarkably heat-stable compared to ChiOVA.