

Title	卵白, 卵黄のフラビン結合タンパク質の精製及びその性質の研究
Author(s)	二科, 安三
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/31579
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名・(本籍)	二 科 安 三
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 3 8 8 7 号
学位授与の日付	昭和 52 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医学研究科 生理系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	卵白, 卵黄のフラビン結合タンパク質の精製及びその性質の研究
論文審査委員	(主査) 教授 萩原 文二 (副査) 教授 山野 俊雄 教授 和田 博

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目的 〕

卵白, 卵黄のフラビン結合タンパクの生理的役割は明確ではない。これらのタンパクを精製し, そのスペクトル的性質, 安定性, フラビン誘導体との結合の性質などを研究し, その生理的役割を考察した。

〔 方法ならびに成績 〕

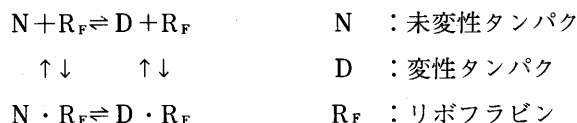
卵白ならびに卵黄のリボフラビン結合タンパク質はオクチルアミンをスパーサーとして3-カルボキシメチルリボフラビンをアガロースに共有結合させたアフィニティカラムクロマトグラフィーによりアポタンパクとして精製した。得られた標品はSDS電気泳動によって単一バンドを示した。その分子量は卵黄のものが卵白のものに比べ若干大きい。

可視部吸収スペクトルではリボフラビンがこのタンパクと結合すると, 第1吸収帯のピーク波長が455nmに移動し, 480nm付近に肩が現われた。また第2吸収帯のピーク波長370nmは移動しないが著しく吸光度が減少することがわかった。7.8-ジクロロリボフラビンの場合もほぼ同様な変化があった(第2吸収帯のピーク波長が345nmから355nmと長波長シフトする点は異なる)。これらの変化はリボフラビンの存在状態がかなり疎水的環境にあることを示し, また第2吸収帯の遷移に大きな影響を与える摂動がタンパク側から与えられていると考えられる。フラビンがこのタンパクに結合したとき, 光励起されたフラビンのエネルギーが効率よく無輻射過程で失われ, けい光が完全に消失する。フラビン環自体がこのタンパクとの結合に直接的に大きく関与していると考えられる。これを利用すると, リボフラビンとの結合定数は約 $5 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ であり, FMN, FADに対する結合定数は数

桁小さいことが示された。

このタンパクはpH 1～pH10で25℃, 24時間温置し, pH 7.0にもどしてもリボフラビンとの結合能をほとんど失わない安定なタンパクであった。

フラビン結合タンパクのトリプトファン残基のけい光強度はリボフラビンの結合によって約10%に減少した。これはトリプトファンからフラビンへの励起エネルギーの移動がかなりあることを示している。このタンパクは塩酸グアニジンによって変性し, そのトリプトファン残基のけい光スペクトルのピーク波長が 343nmから 350nmに移動する。またこのけい光強度は約70%増加する。この変性は可逆的であった。この変性したタンパクはリボフラビンに対する結合能がなく, nativeなタンパクは大きな結合力を持つので, リボフラビンの存在によるこのタンパクの安定化がある。それは



の平衡によって説明される。

未変性なアポタンパクと塩酸グアニジンで変性させたアポタンパクのトリプトファン残基のけい光のヨードイオンによる消光実験によると変性タンパクでは完全に消光を受けるが, nativeなタンパクではほとんど消光を受けない。これはnativeなD-アミノ酸酸化酵素のアポタンパクの場合の約60%が消光を受ける事実と大きな相異がある。これはD-アミノ酸酸化酵素のアポタンパクのトリプトファン残基のけい光がかなり表面からのものであり, 一方リボフラビン結合タンパクの場合にはほとんど内部からの発光であることを示している。

リボフラビンとの結合の速度はフラビンのけい光のストップフロー測定から, ほぼ拡散律速で速く二分子反応で起こることがわかった。

リボフラビン結合タンパクは卵白においてその総タンパク量の 0.6%程度含まれ, 卵黄においても同程度の比率で存在する。しかもこのタンパクは熱, pH, 変性剤に対して安定であることがわかった。それらから, このタンパクの生理的役割は, 生長に重要なリボフラビンの濃度保持, リボフラビンの供給に関与していると考えられる。

〔総括〕

卵白, 卵黄のリボフラビン結合タンパクをリボフラビン固定化カラムにより精製した。

フラビン結合タンパクのリボフラビンに対する結合定数は約 $5 \times 10^6 M^{-1}$ であり, FMN, FAD に対する結合定数は桁小さい。またこのタンパクは広いpH領域で安定であり, 塩酸グアニジンによる変性に対して可逆的であった。

リボフラビン結合タンパクのトリプトファン残基の存在状態はD-アミノ酸酸化酵素アポタンパクなど他のフラビン酵素に比べると著しく異なっていることがわかった。リボフラビンとアポタンパクとの結合は拡散律速に近い二分子反応で起こった。これらの事実はこのタンパクの生理的役割の研究にとって重要な知見を与えると思われる。

論文の審査結果の要旨

著者は卵白、卵黄のリボフラビン結合タンパク質をリボフラビン固定化カラムで、高い純度で簡単な操作で収率よく精製を行ない、いくつかの特異的な性質を明らかにした。すなわち、広いpH領域で安定であること、塩酸グアニジンによる変性が可逆的であることを示した。またリボフラビン結合タンパク質のトリプトファン残基の存在状態が他のフラビン酵素と著しく異なっていることも明らかにした。さらにリボフラビンとアポタンパク質との結合は速い二分子反応であることをも明らかになった。これらの成果は最近注目をあびるBinding Protein, Carrier Proteinの研究に重要な資料を与えるものと考えられ高く評価できる。