

## 15. 卵白アルブミンを用いた実験の教材化

萬 木 貢  
北海道立旭川東高等学校

[要約] 日常生活に関連の深い食品として鶏卵の卵白を取り上げ、その主成分であるアルブミンの結晶化と、溶液のpHに対しタンパク質の電気泳動する方向の違いから等電点を理解する実験、そして卵白のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量の測定を行った。

[キーワード] SDSポリアクリルアミド電気泳動、卵白、アルブミン、等電点

### 1. はじめに

身の回りの物質を通して科学的な見方ができるように指導することは重要である。これまで、日常生活に関連の深い食品として牛乳・脱脂乳を取り上げ、カゼイン蛋白の分子量を測定する実験の教材化を行った<sup>1)</sup>。また、SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）-電気泳動装置（垂直型、主にタンパク質用）と水平型アガロース電気泳動装置（主にDNA用）それぞれ別々であった電気泳動装置を、1台で両方が可能な簡易ゲル電気泳動装置を開発した<sup>2)</sup>。ここでは、タンパク質の名称のもととなった鶏卵の卵白について、その化学的性質の理解を深めるため、実験の教材化を行ったので報告する。

鶏卵は牛乳と並んで、人類の食品として利用されてきた。両者とも栄養的にもきわめて優れ、生活に不可欠な食品の一つとなっている。教材化は卵白の主成分である卵白アルブミン（オボアルブミン）の結晶化とタンパク質の等電点を理解するため、簡易電気泳動実験を行い、そして卵白のSDS-ゲル電気泳動により、蛋白に含まれるタンパク質の分子量の測定実験を行った。

### 2. 実験

#### (1) 卵白アルブミンの結晶化

化学Ⅱの高等学校学習指導要領には「生活と物質」の内容を取り扱うことになっている。身近に存在するタンパク質を取り扱う場合、タンパク質を分離、精製するまでには、材料の磨砕、抽出からはじめて、硫酸分画、クロマトグラフィなどの操作を経なくてはならないのがふつうである。



図1 卵白に含まれる不純物（殻座）

タンパク質の中には、容易に結晶が得られるものがある。鶏卵の卵白に含まれるオボアルブミンあるいはグロブリン（リゾチーム）などがその例である。卵白の中に含まれている数多いタンパク質の中で代表的なものは、卵白アルブミンである。卵白中の主なタンパク質名とその含量を表1に示す。ここでは、硫酸塩析という方式で、卵白アルブミンの結

晶化を行った。

表1 卵白中の主なタンパク質<sup>3)</sup>

タンパク質	卵白中の相対量(%)	等電点
オボアルブミン	54	4.6
コンアルブミン	13	6.6
オボムコイド	11	3.9-4.3
リゾチーム(G <sub>1</sub> グロブリン)	3.5	3.5

[原理] タンパク質の水に対する溶解度は、塩濃度が低い場合はそのイオン強度に比例して増加する(塩溶効果)が、塩の濃度が高くなると、溶解度は逆に減少する(塩析効果)。溶解度は温度、pHによって変化し、一般に温度が低いと溶解度が減少し、タンパク質の等電点pHにおいて溶解度は最小となる。

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(硫酸)が塩析剤として最もよく用いられるのは、塩析効果が大きくかつ溶解度がきわめて大きいので十分なイオン強度が得られるからである<sup>4)</sup>。卵白中のアルブミンは蒸留水や希塩水溶液に可溶であるが、オボムコイドは硫酸アンモニウム溶液に不溶、グロブリンは蒸留水には不溶であることを利用して分離する。タンパク質を構成するアミノ酸には側鎖に解離性の原子団をもつものがあるので、溶液のpHによって荷電状態が変化する。したがって、タンパク質には固有の等電点が見られ、卵白アルブミンの等電点は4.6である。

[器具・試薬]

300ml ビーカー、ガーゼ、0.1mol/l 硫酸、硫酸アンモニウムの飽和水溶液

[操作]

- ①比較的に新鮮な鶏卵1個の殻を割って、内容物を300mlのビーカーに静かに落とす。
- ②注意して卵黄を取り除く。
- ③泡立たないように注意して30分ほど撹拌してから
- ④3枚に重ねたガーゼ層を通して殻座(からぎ:卵黄を卵殻に固定している白い紐状の組織)などの不純物を取り除く。(図1)

- ⑤撹拌しながら0.1mol/l硫酸を徐々に加えて、pHを4.6に調製する。不溶物が生じていれば、再びガーゼ層を用いて取り除く。
- ⑥ろ液が不透明であれば、さらにろ紙を用いて濁らせている物質を取り除く。
- ⑦ろ液と同一体積の硫酸アンモニウムの飽和水溶液(水1L当たり、硫酸アンモニウム767gを加えたもの)を用意しておく。
- ⑧撹拌しながら、卵白溶液に硫酸アンモニウム飽和溶液を徐々にすべて添加する。沈殿が生じたならば、ろ紙で除去する。
- ⑨ろ液に飽和硫酸アンモニウム水溶液を、わずかに白濁してくるまで添加する。
- ⑩この溶液を冷蔵庫中に放置し、ときどき撹拌する。

(2) 卵白の簡易電気泳動実験

溶液のpHに対してタンパク質は等電点に応じて異なる方向へ(陽極か陰極)電気泳動することを理解するため以下のような実験を行った。図2に示すようにガラス板(10cm×10cm)上に硝酸ナトリウム水溶液を浸したろ紙をのせ、平行に向き合わせた二つのクリップでろ紙の両端をガラス板ごと固定した。ビーカー内で卵白を撹拌しながら0.1mol/l硫酸を徐々に加えて、pHを4.6に調製する。たこ糸を十分に浸した後、ピンセットでたこ糸を取りだし、ろ紙の中央を横切り両端のクリップに平行な直線上にのせた。

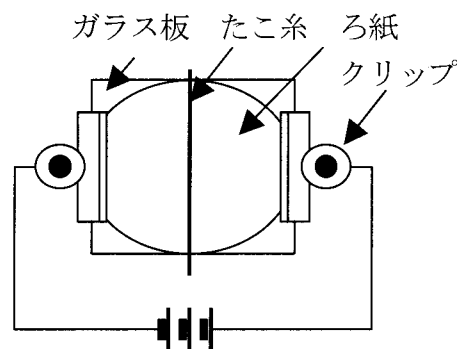


図2 簡易電気泳動装置

クリップに100V直流電圧をかけ泳動開始5分後にニンヒドリン溶液をろ紙上に滴下

しホットプレートで加熱した。

### (3) 卵白の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

平板ゲル用ガラス板 2 枚の間にシリコン製パッキングを挟み込み、両端をクリップで止め 4 つ折りにした新聞紙上に垂直に立てた。表 2 に示す割合で調製したゲル溶液をガラス板の間に流し込み、その後サンプルコームを挿入した。

表 2 SDS-PAGE でのゲル溶液の調製

アクリルアミド濃度	10%
蒸留水	3.56ml
0.5MTris-1.5M グリシン(pH8.9)	2.25ml
10%SDS	90 $\mu$ l
30%アクリルアミド	3.01ml
10%APS	99.6 $\mu$ l
TEMED	18 $\mu$ l

表 3 泳動用緩衝溶液

1.5M グリシン - 0.5MTris 緩衝液 (pH8.9)	20ml
10% SDS	2ml
蒸留水	178ml
全 容	200ml

室温下で、15~20 分間ほどでアクリルアミドは重合するので、その間に泳動用緩衝溶液を作った (表 3)。泳動槽の下部に約 100ml の泳動用緩衝溶液を加え、ゲルを保存したガラス板を本体に固定した。泳動槽上部にも泳動緩衝溶液を十分加え、マイクロシリンジでタンパク質試料を 10  $\mu$  l、サンプルコームで作った穴に静かに注入した。20mA の電流を約 70 分間流し、マーカースのブロモフェノールブルー (BPB) の色が下部まで泳動されたら電流を切った。電極槽からガラス板をはずし、ガラス板からゲルを取出してバットの中に入れ、染色液 (0.125%クーマシーブルアントブルー (CBB) 溶液) を加えて 8 の字シェーカーなどで 15~20 分間インキュベートした。次にゲルを脱染色液に浸し再び 8 の字シェーカーに

のせた。1~2 時間ごと脱染色液を変えることを 3~4 回行うと蛋白バンドのみが染色されて残る。これを適当に切りろ紙上にのせ乾燥させた。アクリルアミド単量体は神経毒であるから、未重合単体が残存するはずのゲルの取扱いにも充分注意した。

### 3. 結果と考察

#### (1) 卵白アルブミンの結晶化

10 日間冷蔵庫中に放置したシャーレの底を顕微鏡で観察した。結果を図 3 に示す。

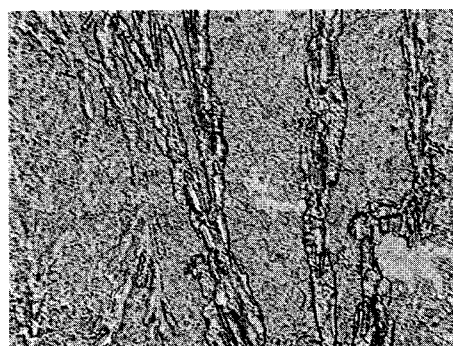


図 3 卵白アルブミンの結晶 (150 倍)

#### (2) 卵白の簡易電気泳動実験

結果を図 4 に示す。表 1 より溶液の pH を 4.6 に調整することにより等電点 < 4.6 のタンパク質は各解離基の電荷総量 < 0 で陽極側

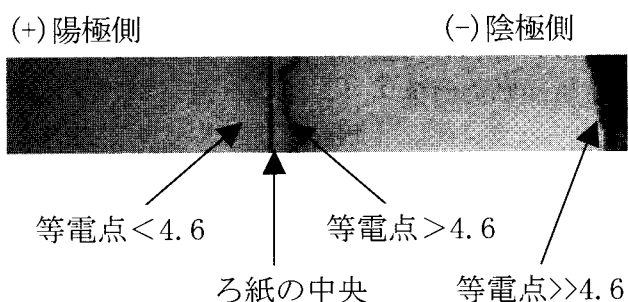


図 4 卵白の簡易電気泳動図

へ、また等電点 > 4.6 のタンパク質は電荷総量が正であることを示している。

#### (3) 卵白の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

陰イオン界面活性剤である SDS はタンパク質と結合して不溶性タンパク質を可溶化した

りすることが知られている。SDS が結合したタンパク質はほぼ均一の負電荷を帯びた複合体をつくる。このようなタンパク質-SDS 複合体はタンパク質固有の電荷が、多量に結合した SDS の負電荷でマスクされて一定の電荷密度をもつ。

卵白を SDS-電気泳動 (SDS-PAGE) にかけた結果を図 5 に示す。図 5 の列 3, 4 は卵白、列 1, 2 のホタテ貝柱と、列 5~7 のハム (筋肉) は、分子量を測定するために用いた標準試料、すなわちホタテ貝柱の横紋筋から調整した天然アクトミオシン (分子量 22 万 (11 万×2) のミオシン重鎖、分子量 4.2 万のアクチン、分子量 3.4 万のトロポミオシンと分子量 1.8 万のミオシン軽鎖から構成される) の泳動像である。ゲル上端からのバンドの相対移動距離と既知分子量 (対数) との関係を図 6 に示す。

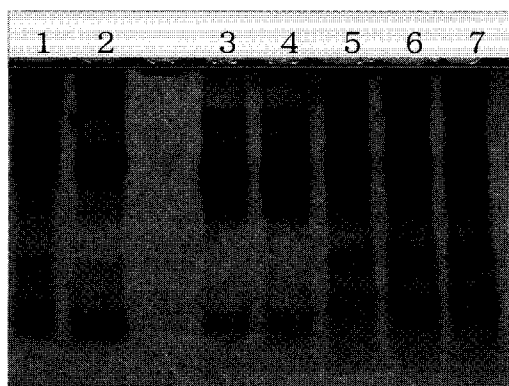


図 5 卵白の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果

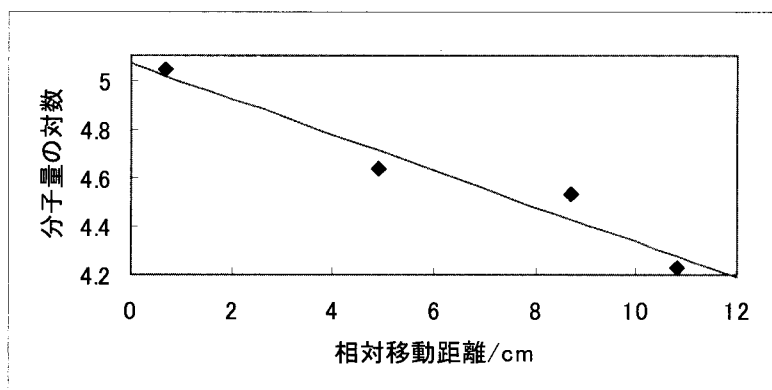


図 6 相対移動距離と分子量の関係

図 6 から既知分子量のタンパク質の泳動距離から卵白に含まれるタンパク質の分子量を算定した。表 4 は求めた分子量とこれに対応するタンパク質名を示す。文献値と測定値とは良好な一致を示した。

表 4 卵白タンパク質の種類と分子量<sup>3, 5~7)</sup>

タンパク質名	測定値	文献値
コンアルブミン	7.8 万	7.8 万
オボアルブミン	4.6 万	4.5 万
G <sub>1</sub> グロブリン(リゾチーム)	1.6 万	1.4 万

#### 4. おわりに

アルブミンの役割はまだ解明されていないが、発生に重要なはたらきを持つとも言われている。卵白は身近な食品であると同時に生物にとって興味・関心を引く物質でもあり、科学的な思考力の育成に寄与する教材と考えられる。

#### 謝 辞

本研究を行うに当たり、助言を頂きました元北海道教育大学教授矢沢洋一先生に感謝いたします。また、実験にあたり、武田科学振興財団より助成を頂きました。

#### 参考文献

- 1) 萬木、三木、松田、長谷部、矢沢、タンパク質を理解するための牛乳カゼインを用いた実験の教材化、化学と教育 52 巻 8 号。
- 2) 萬木、簡易ゲル電気泳動の開発とカゼイン蛋白を用いた実験の教材化、平成 16 年度全国理科教育大会研究発表論文集。
- 3) 森田茂広訳、卵の科学と技術、学窓社、昭和 54 年。
- 4) 武藤尚志、クルマトグラフィおよび電気泳動のための蛋白質標準の調整、化学と生物、Vol. 8, No. 9
- 5) 下西・永井・長谷・本田共編、新生物化学実験のてびき 2、化学同人 (1996)。
- 6) 日本生化学会編：新生物化学実験講座 I、東京化学同人、(1990)。
- 7) 川岸・中村編著、新しい食品化学、三共出版 (2000)。