

大豆蛋白質に関する研究 (第1報)

——大豆11Sおよび7S蛋白質の分離精製について——

宇 高 京 子

Studies on the Soybean Proteins (1)

——Isolation and Purification of 11S-and 7S-Proteins——

Kyoko UDAKA

〔内容抄録〕

(1)本研究は大豆種実蛋白質各成分の連続的(系統的)分離精製法の確立を目的としている。今回はその一環として主要貯蔵蛋白質であり全種実蛋白質の約70%を占める11Sおよび7S蛋白質の分離精製について検討した。

(2)分離操作の第1段階として初めて酸分別沈澱法を用いた。分画条件を検討した結果、11S蛋白質はWIS画分を、 β -および γ -conglycininと呼ばれる2種の7S蛋白質はFB(およびFC)画分を各々出発材料として、二段階のゲル洄過および一段階のDEAE-セファデックスによるクロマトグラフィーでディスク電気泳動的、免疫電気泳動的、ゲル内二重拡散的、焦点電気泳動的に均一なまでに各成分を精製することが出来た。更に各成分の分子量をゲル洄過法で測定した結果、11S蛋白質の分子量は約367,000また7S蛋白質(β -conglycinin)のそれは約164,000であった。

(3)本分画法の有効性が明らかとなったので、現在15S蛋白質、 β -アミラーゼ、トリプシンインヒビターなどの他の分子種の分離精製についても本法により検討中である。

結 論

大豆種実蛋白質として、11S、7S、15S、トリプシンインヒビター、 β -アミラーゼ、ファイトヘマグルチニン、リポキシダーゼ等が知られている。このうち11Sおよび7S蛋白質は全種実蛋白質の約70%を占めるグロブリン系の貯蔵蛋白質と考えられており、その分離精製に関する報告も多い^{4) 5)}。しかしながら、いずれも1成分の分離精製に関するものであり、系統的分離精製法に対する記述はない。著者らは現在、大豆主要蛋白質の貯蔵器官(organelle)であるプロティンボディー(protein bodies: タンパク顆粒)中に存在する蛋白成分の解析を行っているが、この研究の一環として大豆蛋白質の系統的分離精製法の開発が必要となった。本論文は酸分別沈澱法による大豆11Sおよび7S蛋白質の系統的分離精製について検討したものである。この結果、酸分別沈澱法は大豆主要蛋白成分の同時分画法として有効であることを認めた。

実 験 方 法

1. 試 料

大豆 (*Glycine max* var. Okuhara No. 1) を凍結乾燥後, Willy 型の磨砕機でドライアイスで冷却しながら粉碎した。次いで *n*-ヘキサンの還流により脱脂した後風乾し出発材料とした。

2. 酸分別沈澱法による蛋白質の分画：

脱脂大豆粉末 (50 g) に10倍量の 1 M食塩, 0.01Mジチオスレイトールを含む0.01Mバルビタール緩衝液 (pH7.5) を加えて室温で30分間, マグネチックスターラーで攪拌しながら蛋白質を抽出した。この抽出懸濁液を $105,000 \times g$, 30分間の遠心で残渣および脂肪層を除き清澄な蛋白液を得た。次いで図1に示した如く水性二層分配法により核酸および核蛋白 (ヌクレオプロティン) 画分を除去し, リン酸カリウム中に蛋白溶液を転溶してデキストラン 500 を除いた後, 硫酸沈澱を行った。この沈澱画分を上記バルビタール緩衝液に蛋白濃度が 1 % (W/V) になるように溶解し, 不溶画分を $20,000 \times g$, 15分間の遠心で除き, 上澄液をセルロースチューブに入れて脱塩水に対して 5 °C一夜透析し, 生じた沈澱を $20,000 \times g$, 20分間の遠心で回収して WIS(水不溶性画分) とし, 可溶性画分は 0.01N 塩酸により酸分別沈澱を行った。各分画々分は A (pH 6.8~6.0 での沈澱区分), B (pH 5.9~5.5), C (pH 5.4~5.0), D (pH 4.9~4.5) および E (pH 4.5 での可溶区分) と名付けた。得られた各分画々分は Bio-Gel P-200 などによるゲル濾過, D E A E セファデックスを用いた塩化カリウムの直線的濃度勾配溶出法などにより更に精製した。

3. 分離蛋白質の純度検定

分離精製した蛋白質の純度は, (1)ディスク電気泳動法, (2)ゲル内二重拡散法, (3)サブユニットの解析法, (4)焦点電気泳動法によって検定した。以下に各実験操作について述べる。

(1): 7.5mm × 120mm のゲルカラムを用い, 緩衝液はトリスバルビタール系, ゲル濃度は 7.5%, 泳動条件は 2 mA/a tube, 泳動時間は 2~3 時間で終点はマーカーとして用いたブロムフェノールブルーが完全に流出したときとした。染色は 1 % アミドブラック 10B 溶液で, 脱色は 7 % 酢酸により行った。

(2): 免疫化学的解析

a. 抗血清の調製と免疫電気泳動：

3 % 蛋白溶液 (1M NaCl を含むバルビタール溶液) 1 ml に同量の完全フロインドのアジュバンド²⁾を加えてよく乳化し water in oil 型にし, ウサギの足齶の裏, 背中の皮下又は筋肉内に一ヶ所 0.2 ml づつ注射した。この免疫操作は一週間に一回, 4 回行った後 1 ヶ月休ませ, 二次免疫を行い試採血し重層法で抗体価 64 以上になったとき心臓から全採血した。所定の抗体価に達しないときは, 上述の免疫操作をくり返すか, ブースターをかけた。血清は 56 °C で 30 分間保温して非働化して本実験に用いた。免疫電気泳動は Grabar & Williams の方法³⁾に従って行った。

b. ゲル内二重拡散法

アガロース (Difco 社製) 1 g を 1 M 食塩および 0.01 % のマーゼニンを含む 0.01M のバルビタール緩衝液 (pH7.5), 100 ml 中に入れ湯浴中で加熱溶解後, ペトリ皿上に厚さ 2 mm になる様に流し込む。蓋をかぶせて 1 時間放置後, ペトリ皿の中心に外径 9 mm, 高さ 1.5 cm のガラスの円筒管を寒天層上に垂直に置き更にその円筒管の外縁から 7 mm 離れた所に他の円筒管を各々 60° の角度で 6 個アガロース上に垂直に置いた後アガロース液を静かに流し込み厚さが 5 mm になるようにし, 充分ゲル化させる。ゲル化後円筒管を抜き, 中央の穴に抗血清, 外側の穴には大豆蛋白溶液を入れシールして 25 °C 48 時間以上反応させた後写真撮影を行った。

(3): 0.1 % SDS 溶液中に精製 11 S 蛋白質を溶解後 37 °C で 30 分間保温した後 7.5 % アクリルアミド-アンフォライン液に混合してゲル化させ, 4 mA/a tube で 20 時間電気泳動し, 10 % TCA で十分

洗浄後酢酸でTCAを洗いアミドブラック-10Bで染色した。脱色は7%酢酸液によった。

(4)：(3)の方法でSDSを加えず、蛋白溶液をそのままアクリルアミド-アンフォライン液に加えてゲル化した後泳動した。

4. 分子量の測定

分離蛋白質の分子量の測定はゲル透過法を用いた。ゲルはBio Gel A-5m(fine)を用い、カラムサイズは $2.6 \times 84 \text{ cm}$ 、流速は $3.6 \text{ ml} \cdot \text{hr}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ であった。

5. 走査型電子顕微鏡観察

大豆子葉組織を3mm角に切り、2.5%グルタルアルデヒド-0.5%オスミウムの二重固定後、エタノールによる段階的脱水を行い、この試料をゼラチンカプセル中のセメダイン樹脂に包埋した後、ドライアイス-アセトン中で凍結シタガネで断面を作った後、エチレンオキサイドで樹脂を溶解し断面をとり出す、この断面試料をイソアミルアセテート中で臨界点乾燥後白金蒸着し日立製走査電顕HHS-2R型で観察した。

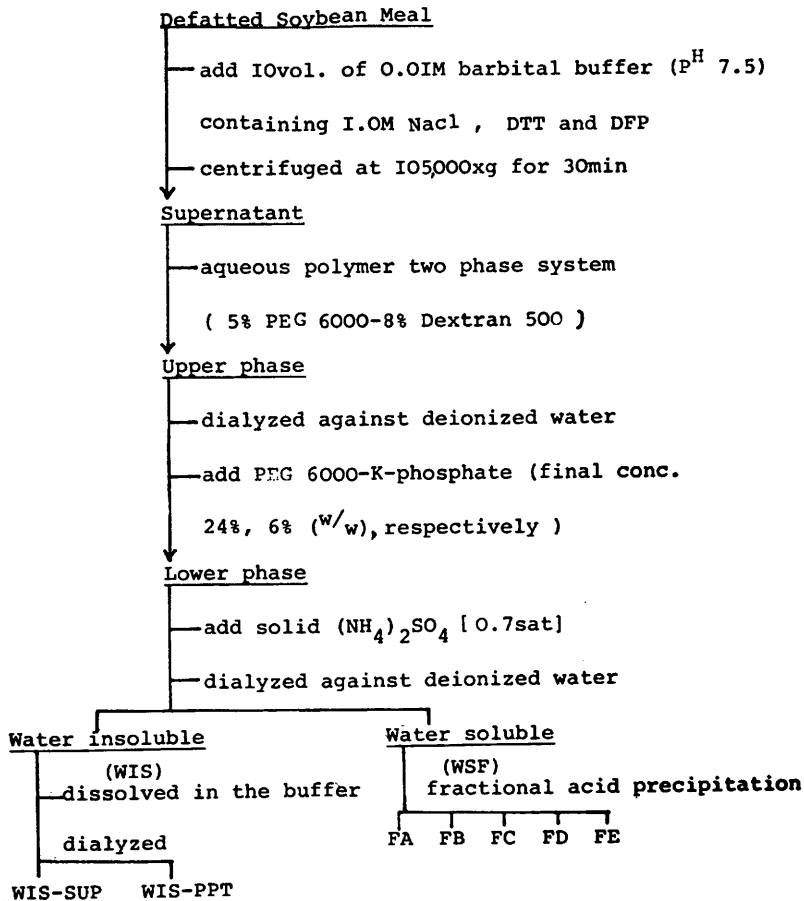


Fig.1. The flow-chart showing the method in fractionation of soybean proteins by fractional acid precipitation method

実験結果

図2に示したのが大豆子葉細胞の内部の走査型電子顕微鏡像である。多数のプロテインボディー

(タンパク顆粒) およびその間隙を満すスフェロゾーム(脂肪球)が認められる。顆粒の大きさは直径 $2\sim 23\mu$ でリポ蛋白質の単分子膜でおおわれており、貯蔵蛋白質が入っている¹⁾。スフェロゾームは直径が $0.1\sim 0.5\mu$ の中性脂肪の貯蔵器官である。本研究に於ける蛋白質抽出条件で細胞質可溶画分(cytosol), プロテインボディー, スフェロゾーム等に含まれる蛋白質の他にミトコンドリア, 核, ロイコプラストなど他の有形体や顆粒中の蛋白質も混入してきていると考えられる。この大豆全可溶性蛋白画分をWSとし、他の分別各画分(WIS, FA~FE)とディスク電気泳動により比較したのが図3である。

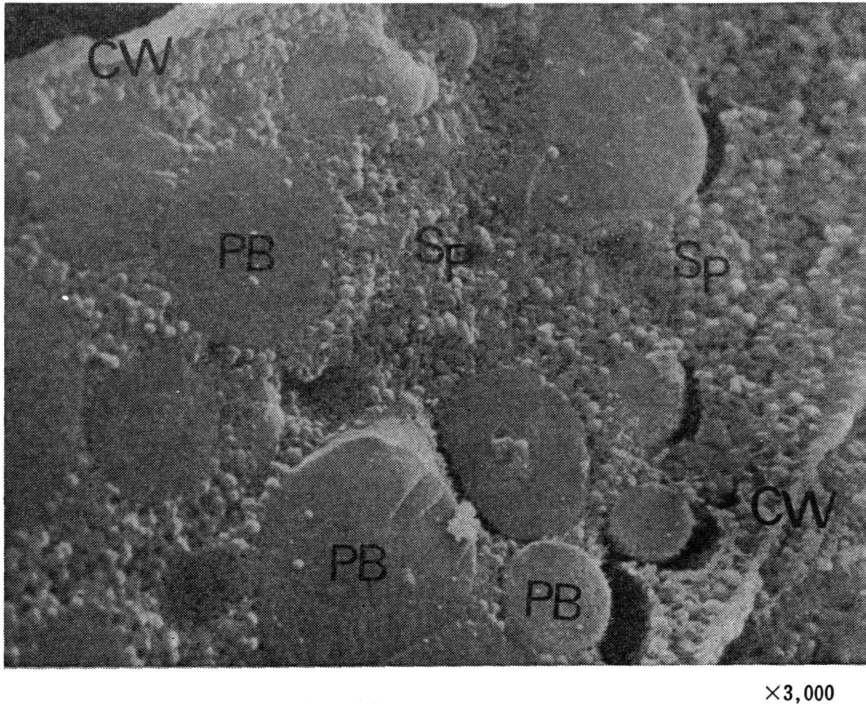


Fig. 2. Scanning electron micrograph of soybean cotyledonary cell
PB : protein bodies Sp : spherosome CW : cell wall

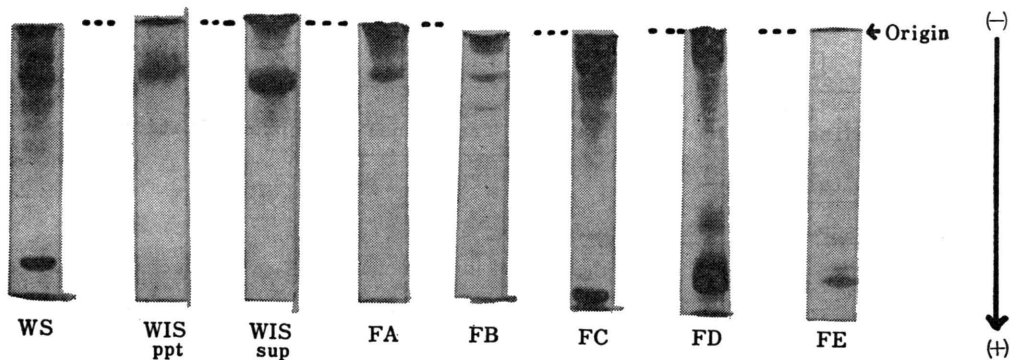


Fig. 3. Comparative Disc Electrophoretic Patterns of Fractions

WIS, FAは移動度の遅いバンド成分からなり、移動位置から主として11S-蛋白質からなるものと思われる。FBとFC画分は遅い移動度の成分と中間成分が主であり、FDおよびFE画分は速い移動度の成分が主である。この様に用いた分別法で明らかに三つの画分に大まかに分けられた。この各分画々分を Bio Gel A-1.5m によるゲルろ過により更に分別したのが図4～6である。図4に於いて、WIS画分の第2ピークは7.5%アクリルアミドゲル電気泳動では1本のバンドを示すが、ジチオスレートで還元して4%ゲル中で泳動すると、15S成分ともう一つの成分に分離した。この電気泳動像のデンストメーター積算値から計算して11S成分はWIS-ppt成分の約90%を占めた。又FB画分のピーク2画分に7S (β -conglycinin⁶⁾)画分が比較的濃縮（デンストメーター値から72%）されており、FC画分のピーク2画分に γ -conglycinin が高濃度で存在することが明らかとなった（デンストメーター値からピーク2成分の約78%）。

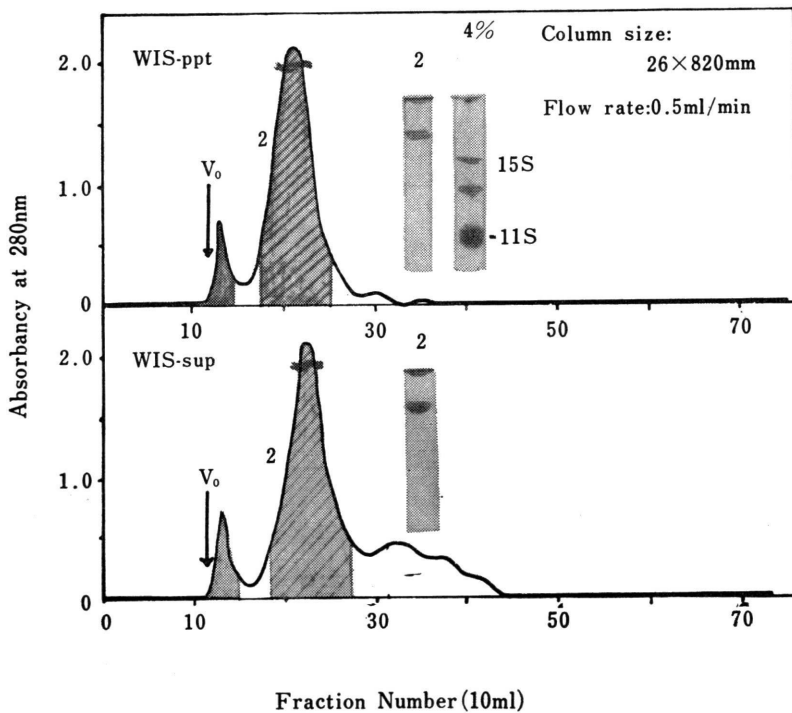


Fig. 4. Gel Filtration Patterns of WIS-ppt and WIS-sup Fractions on Bio-Gel A-1.5m

従って11S-蛋白質、7S-蛋白質（2成分）を電気泳動的、免疫化学的に均一にする為には、WIS-ppt画分、FB（およびFC）画分を各々出発材料としてゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィーにより分離精製してゆくのが有利であると推測されたので、11S成分の精製はWIS-pptのピーク2成分を、Bio Gel P-200によりゲルろ過して低分子画分を除去した後、DEAE-セファデックスA-25を用いたKCl濃度勾配溶出法により行った（図7）。2分子種の7S成分の同時精製はFBおよびFC画分のピーク2成分をBio Gel A-1.5mで再クロマトして主要ピーク区分を集め、コロジオンパックを用いて濃縮した後、Bio Gel P-200を通して低分子を除去しDEAE-セファデックスA-50によるKClの直線的濃度勾配溶出法により行った（図8）。図8の3で明らかのように

ピーク1成分は, γ -conglycinin であり, イオン強度の変化により 7 S \rightleftharpoons 9 S 変換を行うことが確認された。又ピーク3成分は β -conglycinin でありイオン強度によって上記のようなS値の変換はなかった。

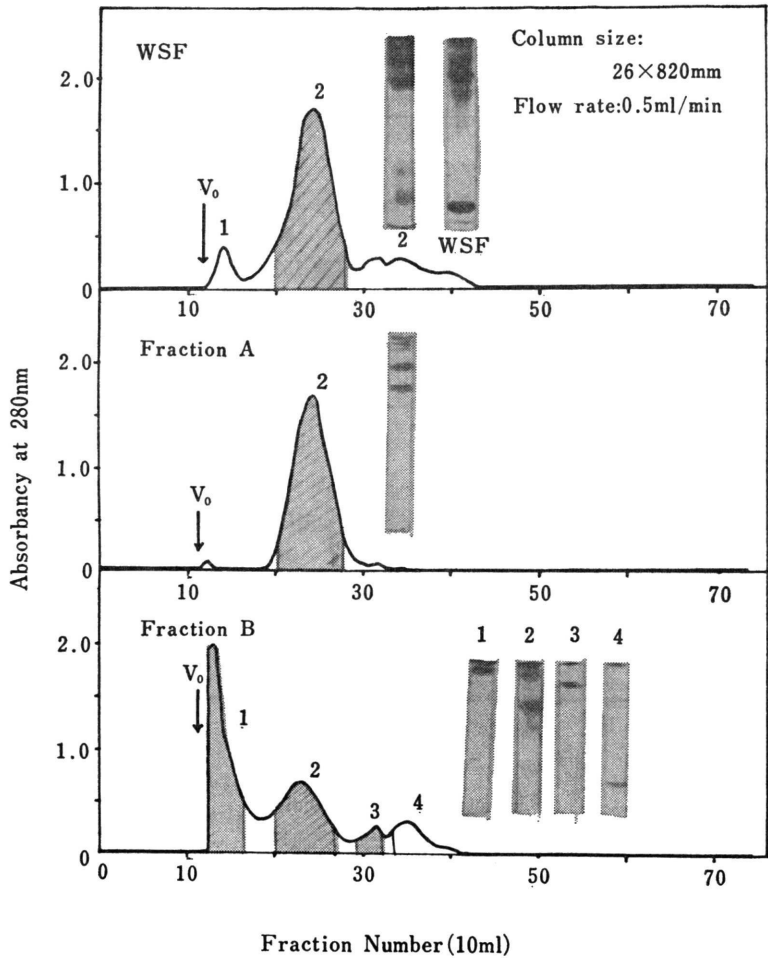


Fig. 5. Gel Filtration Patterns of WSF, FA and FB on Bio-Gel A-1.5m

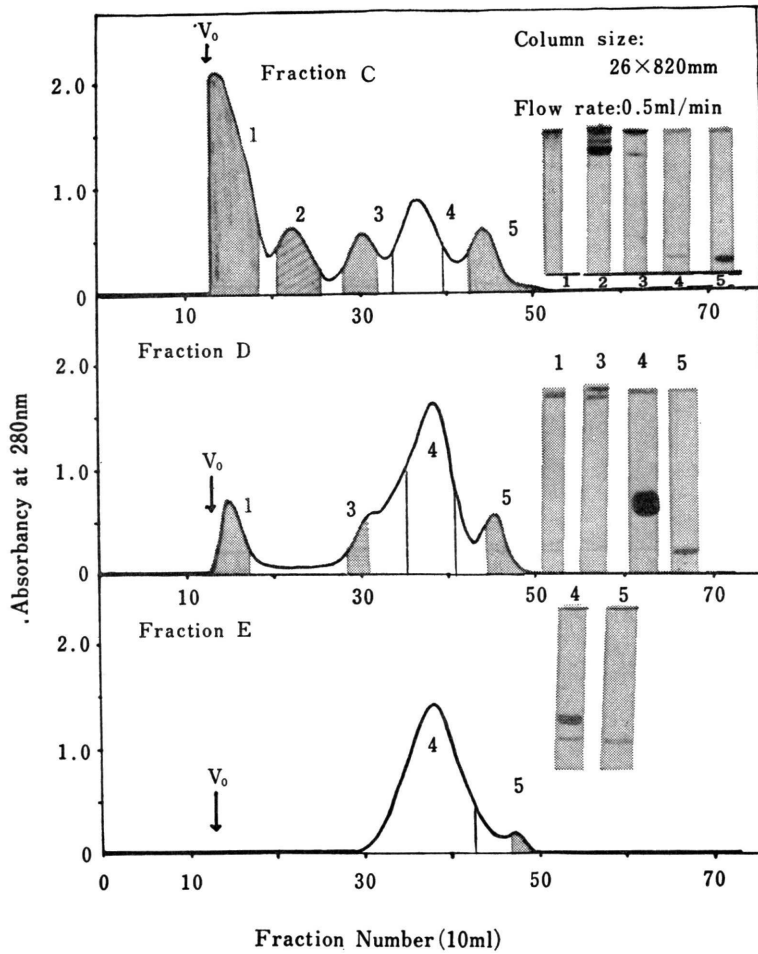


Fig. 6. Gel Filtration Patterns of FC, FD and FE on Bio-Gel A-1.5m

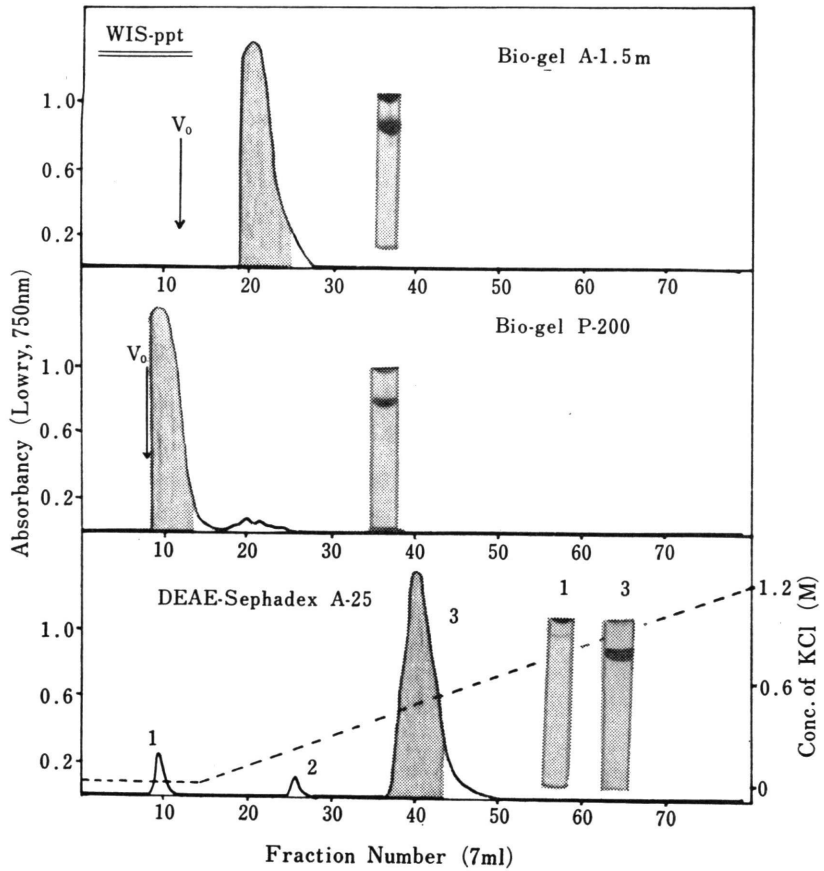


Fig. 7. Purification of the 11S Component

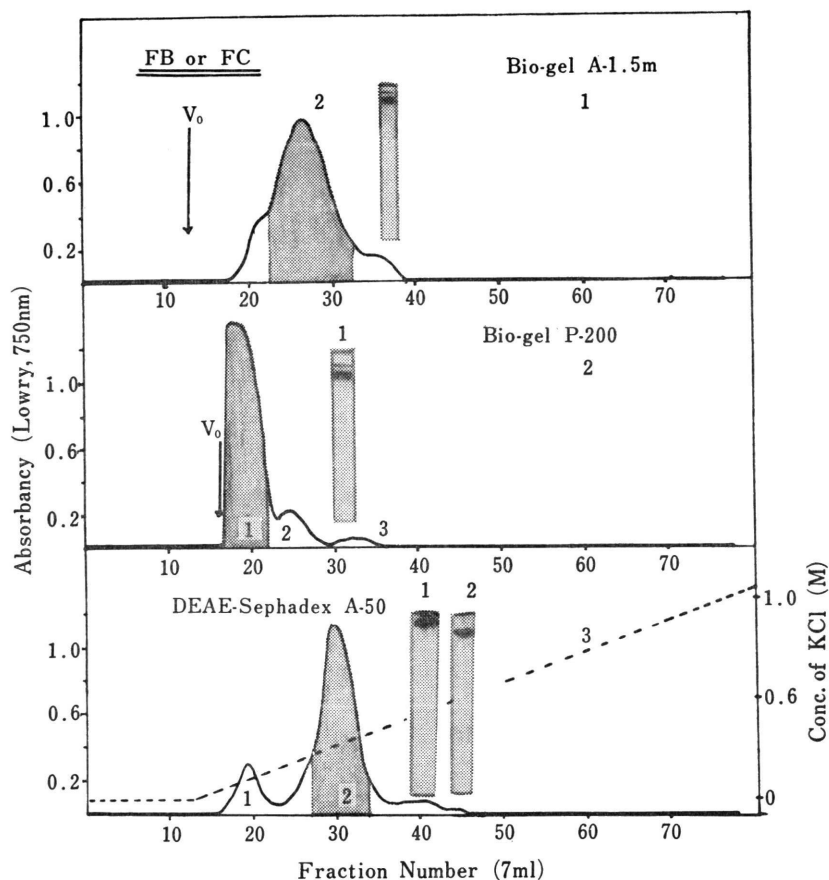


Fig. 8. Purification of the 7S Components

次に電気泳動的に均一なまでに精製した11Sおよび7S (γ -conglycinin の収量が低かった為、以後の実験に用いた7S成分は β -conglycinin である)成分の純度を免疫化学的、焦点電気泳動的に検討したのが図9および図10、図11である。両成分は免疫電気泳動的にも均一であり、11S成分の移動度が7S成分のそれよりもやや大きく且ついずれも本条件(pH 7.5)で陽極方向に沈降線が認められることから酸性蛋白質であることがわかる。すなわち、図11に示した様に7S成分の等電点は約4.6であった。11S成分のそれもほぼ同様であった。次に、11S成分の確認と純度の検定の為に11S成分のSubunit構成を焦点電気泳動で解析したのが図11である。酸性サブユニット3成分、塩基性サブユニット2成分が認められた。又両成分の均一性は、ゲル内二重拡散法に於いても確認された(図9のC)。以上の結果から酸分別沈澱法およびカラムクロマトグラフィーにより11S、7S両蛋白成分を高度に精製し、且つディスク電気泳動の位置から推定した両成分がほぼ目的の成分に間違いのないことが明らかとなったが、更に確認する為にBio Gel A-5mによるゲルろ過からKavを求めて両成分の分子量を算定したのが図12である。指標蛋白質としてLDH(乳酸脱水素酵素)、カタラーゼ、ウレアーゼ、IgMを用いた。図12-Bより、11S成分の分子量は367,000、7S成分のそれは164,000となった。

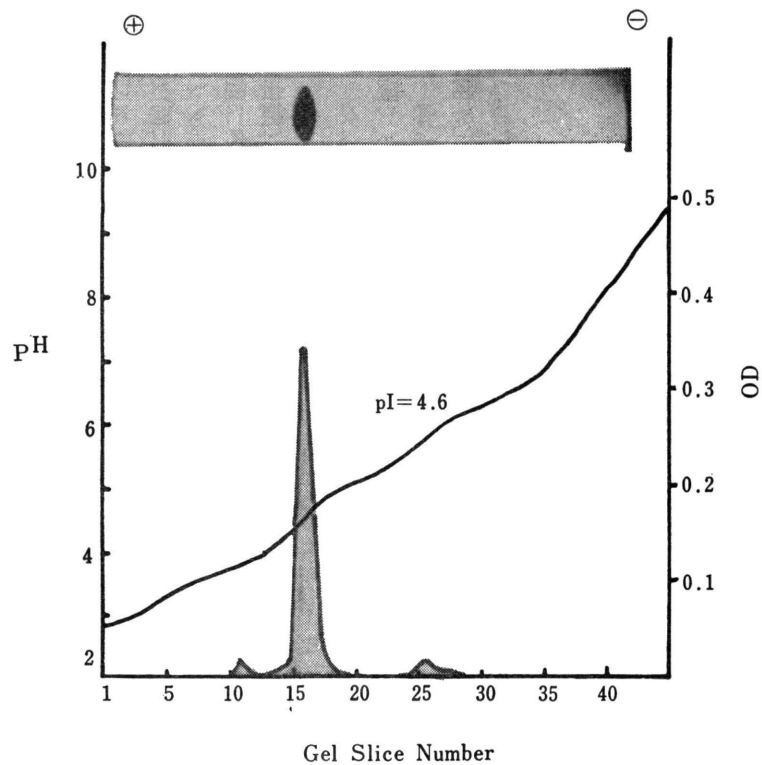


Fig.10. Isoelectrofocusing in Polyacrylamide-gel of the 7S Protein Component of Soybean

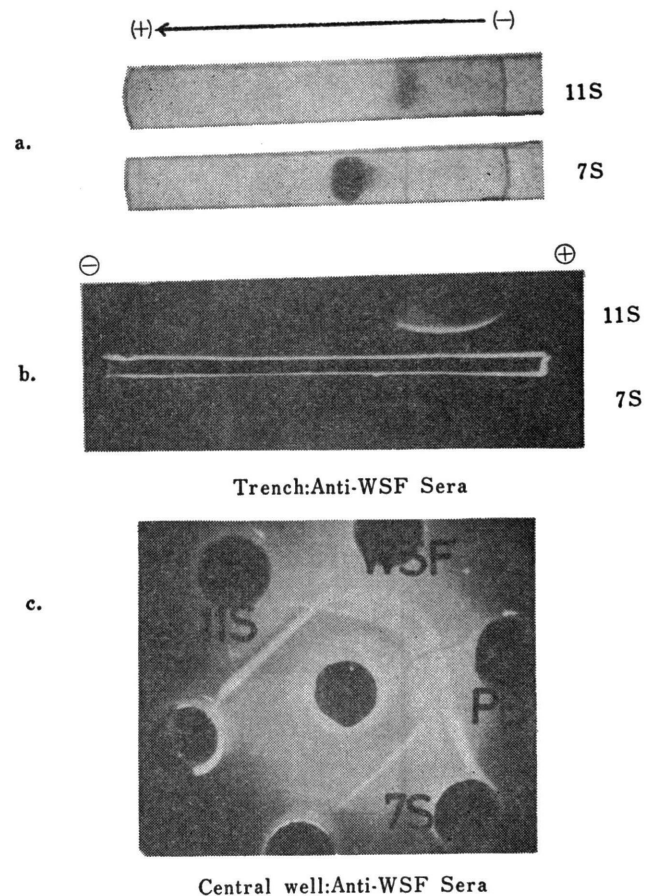


Fig. 9. Confirmation in Purity of the 11S and the 7S Protein Components

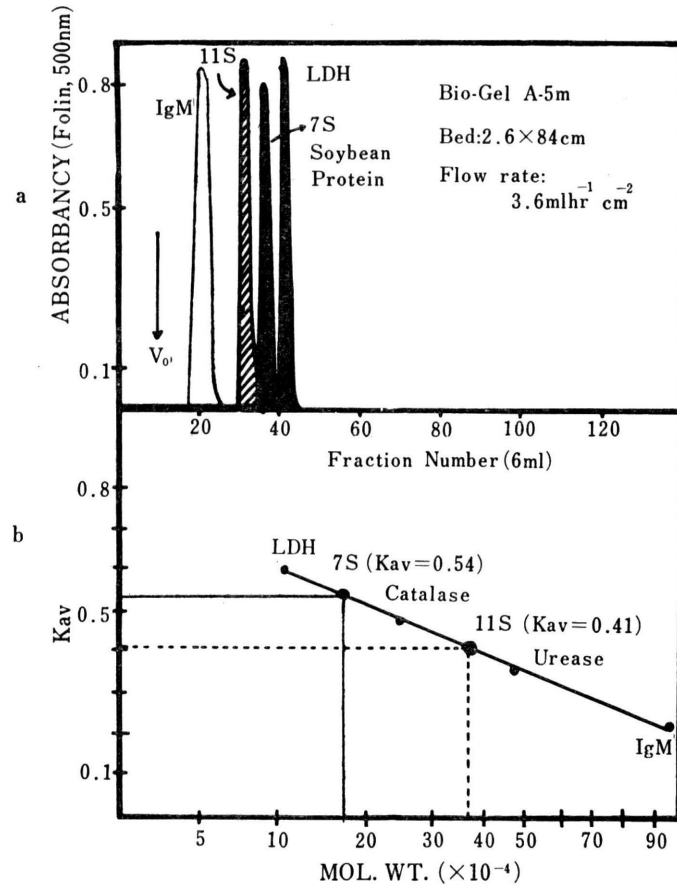


Fig. 12. Molecular Weight Estimations of the 11S- and 7S-Soybean Proteins

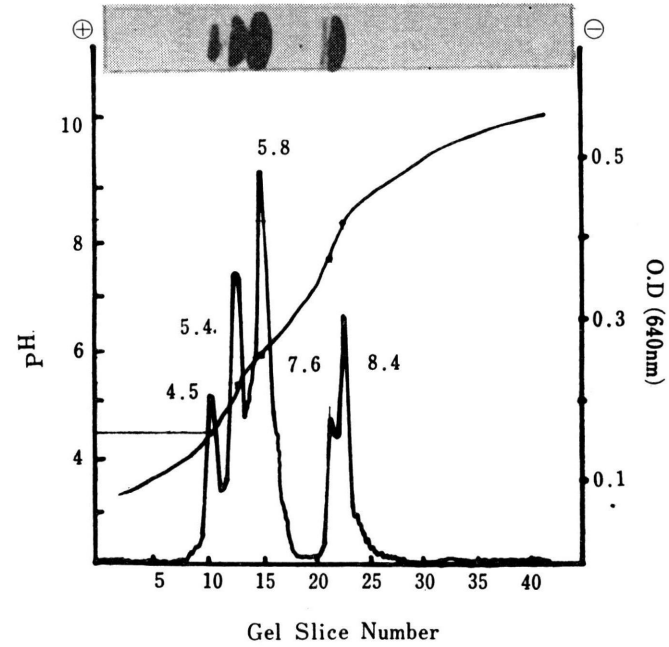


Fig. 11. Isoelectrofocusing in Polyacrylamide Gel of Soybean 11S-Protein Subunits

考 察

従来、個別的に行なわれて来た大豆種実蛋白質の分離精製を系統的に行うことは、細胞中に含まれる蛋白分子種の数（この分子種数は粗抽出蛋白溶液の電気泳動、免疫化学的解析などでは量的な問題の為、決定できない）を明らかにし、プロテインボディー中の蛋白分子種と比較し細胞生理の追究、食品加工上の有害分子種（ファイトヘマグルチニン、トリプシンインヒビター）のバッチ法による簡易除去の検討を行う上で有利な点が多い。本研究では操作的に容易で且つバッチ法が利用出来る分画方法として酸分別沈澱法を用いた。図3に示すように、第1段の操作で11Sおよび7S成分と他の低分子画分が分離されているのが明らかである。この場合、WIS画分と水可溶区分に分別しないで塩濃度を上げて酸分別沈澱を行うとFA, FB, FC各画分の分別が明瞭でなくなり、分離の程度も悪くなるので、溶液のイオン強度(μ)は0.03~0.05の範囲に保つことが重要である。又共沈現象を少なくする為、蛋白質濃度は1%以下にする。11S成分の精製法として従来は冷沈画分（大豆全水可溶区分に稀塩化カルシウムを加えて冷所に放置し生じた沈澱画分）を出発材料としていたが収量が少なく又7S成分の混入も多かった。本法に於いてはWIS画分から出発して、Bio Gel A-1.5mゲルろ過のピーク2画分、Bio Gel P-200のVoid volume画分、DEAE-Sephadexクロマトグラフィーの主ピーク、の3段操作でディスク電気泳動的、免疫化学的、焦点電気泳動的に均一な11S成分を得ることが出来た。2種の7S成分の精製もFB, FC画分を出発材料にして11S成分の場合と同様に3段操作で完了している。従来の7S成分の2成分の同時分画が全く行われていなかった為、各成分の分画時に於ける関連が全く不明であったが、本研究によって分画に際しての両成分の関連が明らかになった。ただ γ -conglycininの収量が少なかったが、これは相対的に β -conglycinin成分より少ないのか、分画過程で他の画分に分散したのかは不明であり今後の検討が必要である。

いずれにせよ、酸分別沈澱法とゲルクロマト法を組み合わせることにより大豆蛋白質成分のかなりの数を分離精製出来そうなので、現在各画分中の他の成分についてもその成分の分離と同定を進めている。なお、本論文は昭和50年度日本農芸化学会および生化学会大会での発表論文の一部である。

謝 辞

本研究は農林省 食品総合研究所理化学部、深澤親房博士の御指導により行いましたものです。ここに記して深く感謝致します。

- 1) 深澤親房：植物酵素蛋白質実験法，蛋白質，核酸，酵素，別冊 1976年 共立出版
C. Fukazawa, K. Uda, K. Kainuma, S. Suzuki : Biochim. Biophys. Acta (in press)
- 2) J. Freund : Amm. Rev. Microbiol., 1, 291 (1947)
- 3) P. Grabar and C. A. Jr. Williams : Biochim. Biophys. Acta, 10, 193 (1953)
- 4) R. E. Roberts and D. R. Briggs : Cereal Chem., 42, 71 (1965)
- 5) I. Koshiyama : Agr. Biol. Chem., 29, 885 (1965)
- 6) N. Catsimpoalas, and C. Ekenstam : Arch. Biochem. Biophys., 129, 490 (1969)