

# 大豆蛋白質の酸分別沈澱法による分画画分の塩基性および 酸性条件下に於けるサブユニットの解折

宇高京子 南雲葉子

(昭和 53 年 9 月 30 日 受理)

Analysis for Subunit Structures of Basic-  
and Acidic Conditional Fractions obtained  
by the Method of a Fractional Acid Precipitation of Soybean Protein.

Kyoko UDAKA Yoko NAGUMO

(Received September 30, 1978)

## 緒 言

大豆種実蛋白質としてグリシニン (11S-蛋白質),  $\beta$ -および  $\gamma$ -コングリシニン (7S-蛋白質), 15S-蛋白質, トリブシンインヒビター,  $\beta$ -アミラーゼ, レクチン, リボキナーゼ等が知られている。このうち, グリシニンおよび 7 S 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であり, その分離精製法に関する報告は多い。例えば, グリシニンの精製法としては以下の方法がこれまでに開発されている。すなわち, 水抽出蛋白質から冷所に放置することによって得られる冷沈蛋白質 (CIF) は超遠心的に 60% の 11S 成分の純度をもつ画分であるが, この CIF を出発材料としての精製法にはゲル濾過法<sup>1-3)</sup>, イオン交換クロマトグラフィー法<sup>4)</sup>, およびアフィニティークロマトグラフィー法等<sup>5)</sup>がある。また 7S 蛋白質の 1 つである  $\beta$ -コングリシニンの精製として, CIF 画分を除いた上澄画分のゲル濾過法<sup>6)</sup>, 酸処理法<sup>7)</sup>, および硫酸分画法<sup>8)</sup>等がある。また, 7S 蛋白質のもう 1 つの成分である  $\gamma$ -コングリシニンの精製法としては, これまでにアフィニティークロマトによる越山等の方法<sup>9)</sup> および Catsimpoalas のゲル濾過とイオン交換クロマト法を組み合わせた方法<sup>10)</sup>がある。しかしながら, これらの方法はいずれも一成分の分離精製に関するものであり, 分離にさいしての他の成分との関係については全く言及されていない。そこで著者らは大豆貯蔵蛋白質各成分の連続的分離精製法について研究を進め, 精製操作の第一段階として, 酸分別沈澱法を確立した<sup>12)</sup>。本論文ではその酸分別沈澱法によって得た各画分を塩基性お

大豆蛋白質に関する研究 (第 4 報)  
食品学第 3 研究室

および酢酸酸性尿素ゲル電気泳動法によりサブユニットの検定をおこなったので報告する。

## 研究方法

1. 試料 大豆 (Glycine max var. Okuhara No. 1) を凍結乾燥後, ウィリー型の磨砕機でドライアイスーアセトン中で冷却しながら粉碎し, 次いで *n*-ヘキサンで脱脂後, 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 前報<sup>11)</sup>の通りおこなった。
3. ゲル濾過法 上記の酸分別沈澱法によって得た各画分を Bio-gel A-1.5 m (Bio Rad 社製) によりゲル濾過を行なった。1 M-食塩を含む 0.01 M-バルビタール緩衝液 (pH 8.0), カラムサイズ 26×820 mm, 流速 0.5 ml/min, 10 ml ずつ集め, 280 nm で吸光度を測定した。
4. アルカリ性尿素ゲル電気泳動法<sup>12)</sup> 試料調製は試料と 9M-尿素を 1 : 3 の割合で混和し, DTT を少量加え, 50°C で 2 時間保温後用いた。緩衝液はトリス-グリシン系 (pH 8.3) を用い, 泳動条件は 2 mA/a tube で 2 時間泳動し, マーカーとしてブromフェノールブルーを用いた。染色は 1% アミドブラック 10 B 液を用い, 7% 酢酸で脱色を行なった。
5. 酢酸酸性尿素ゲル電気泳動法<sup>12)</sup> 試料の調製および泳動条件は上記, アルカリ性尿素ゲル電気泳動法と同様である。緩衝液は 0.1 N-酢酸溶液を用いた。

## 研究結果および考察

Fig. 1 および Fig. 2 に示したのは酸分別沈澱法により得た各画分 (WIS~FF) を Bio-gel A-1.5 m でゲル

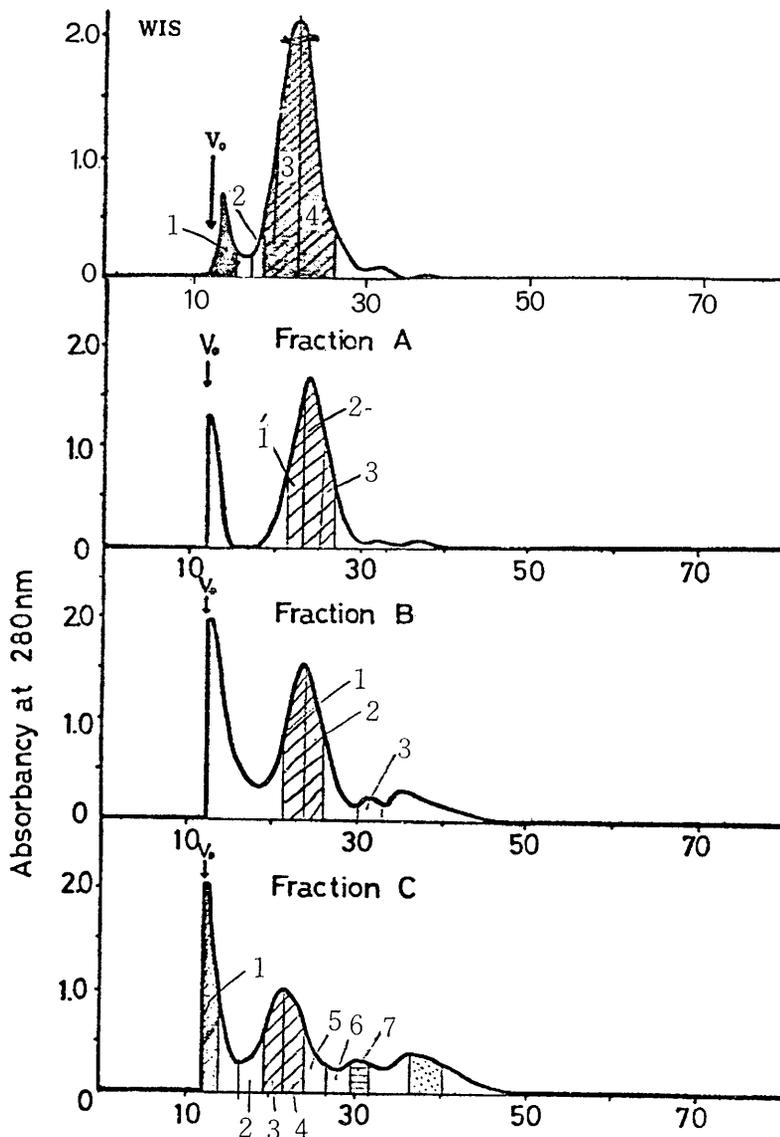


Fig. 1 Gel Filtration Patterns of WIS, FA, FB, and FC on Bio-gel A-1.5m  
Gel Filtration was carried out with a Flow-rate of 0.5 ml/min. on Bio-gel  
A-1.5 m (column size : 26 × 820 mm) at 20°C

ろ過した溶出図である。各画分の溶出部位を図の様に区分し、各区分に存在する蛋白成分をサブユニット構造から検討することを試みた。Fig. 3 に示したようにまず、酸分別各画分のサブユニット像について検討したその結果、WIS 画分はマーカーとして用いた主要三成分のサブユニット像から大部分がグリニン成分であり、そこに一部  $\gamma$ -コングリニン成分が混入していることが明

らかとなった。FA, FB 画分も同様な結果であった。一方、FD 画分はほぼ  $\beta$ -コングリニン成分のみで、FE 画分は  $\beta$ -コングリニン成分の他にサブユニットではないが  $\beta$ -アミラーゼ分子のバンドも認められた。そこで、次に分別各画分をゲルろ過し、Fig. 1 および Fig. 2 に従って分画した各画分のサブユニットについて検討した。Fig. 4 に示した電気泳動像は WIS, FA, FB 画分

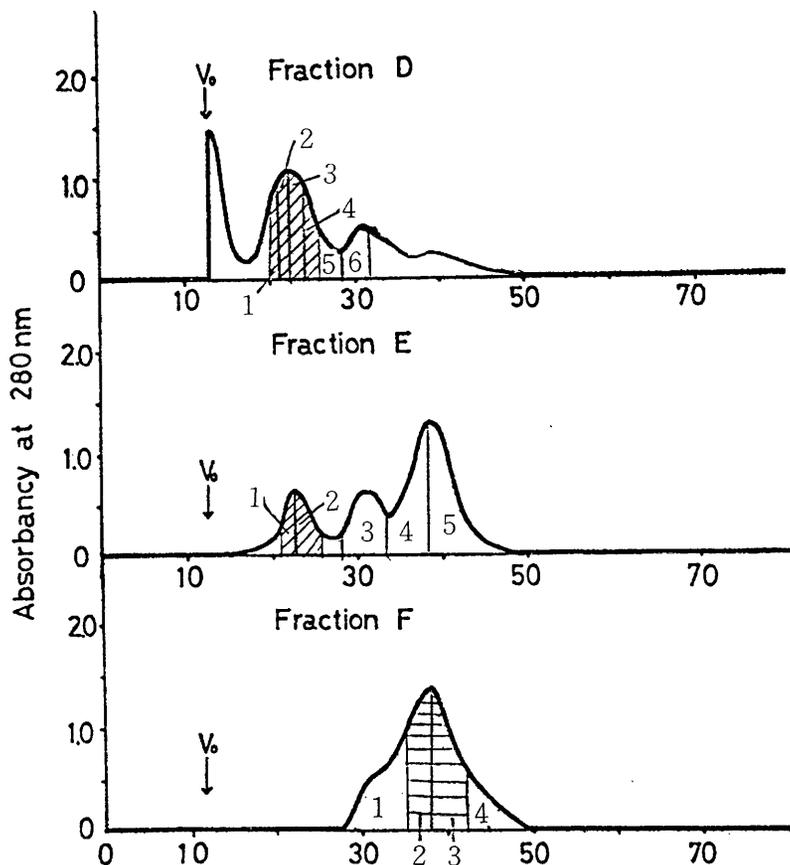


Fig. 2 Gel Filtration Patterns of FD, FE, and FF on Bio-gel A-1.5 m  
Gel Filtration was carried out with a Flow-rate of 0.5 ml/min. on Bio-gel  
A-1.5 m (column size : 26 × 820 mm) at 20°C

のゲル透過画分のサブユニット像であるが、マーカーのバンドから推定して、WIS-1~WIS-4の大部分を占めるのはグリシン成分である。また、一部分 $\gamma$ -コングリシン成分が混入している（移動度の遅い不明瞭なサブユニットのバンド）一方、FA画分になると $\gamma$ -コングリシンのサブユニット成分の量がグリシンの量より増大している。同様の傾向がFB画分にも認められた。さらにFC画分の場合（Fig. 5）はFC-1~FC-5区分まではグリシンの存在が認められた。FD画分の場合（Fig. 6）はそのほとんどが $\beta$ -コングリシン成分である（特にFD-1~FD-4）FEおよびFF画分について示したのがFig. 7である。FE-2区分にみられるのが $\beta$ -コングリシン成分であるがその他の区分についてはサブユニット像からだけでは不明確である。

次に、酸分別沈澱各画分のサブユニット解析を酢酸酸性尿素ゲル電気泳動法により行なったのがFig. 8である。その結果はアルカリ性尿素ゲル電気泳動像（Fig. 3~Fig. 7）から解析した結果とほぼ同じであった。すなわち、WIS, FA, FB画分はグリシン成分が主であり、その他に少量の $\gamma$ -コングリシン成分が存在している。FC画分になるとグリシン、 $\beta$ -コングリシンの存在が認められる。FD画分になるとほとんど均一な $\beta$ -コングリシンから成る。FE画分も主に $\beta$ -コングリシンから成っている。次に、これらの画分をゲル透過して得た各区分の蛋白組成をみた。Fig. 9に示したのは、WIS, FA, FB画分から得た各区分の酢酸酸性尿素ゲル電気泳動像である。WIS-1~WIS-4区分はいずれもグリシン成分と一部 $\gamma$ -コングリシン成分から成っている。一方、FA

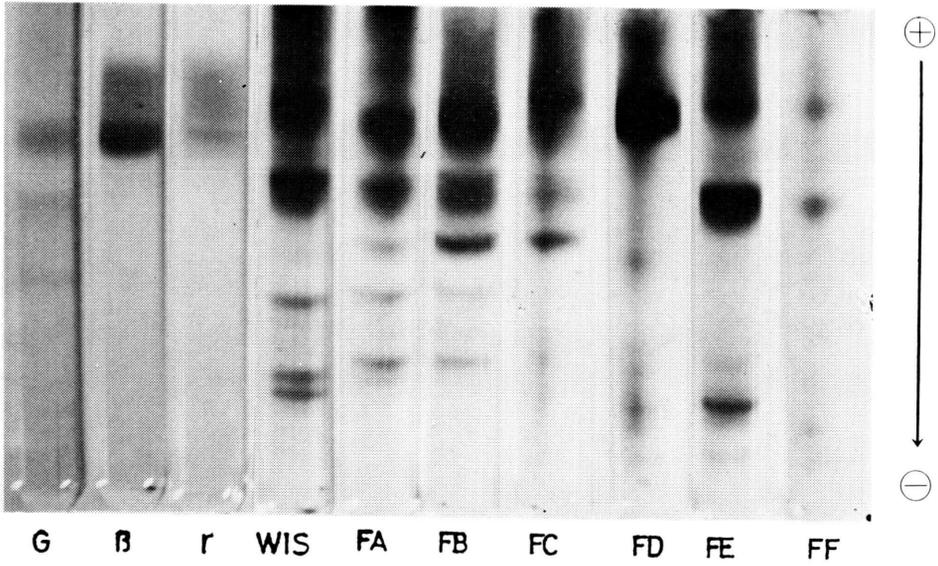


Fig. 3 Comparative Disc Alkaline-Urea Electrophoretic Patterns of Soybean Protein Fraction ractionated by Bio-gel A-1.5 m on Polyacrylamide Gel.

G,  $\beta$  and  $\gamma$  indicate Glycinin,  $\beta$ -conglycinin and  $\gamma$ -conglycinin, respectively, as used for Markers.

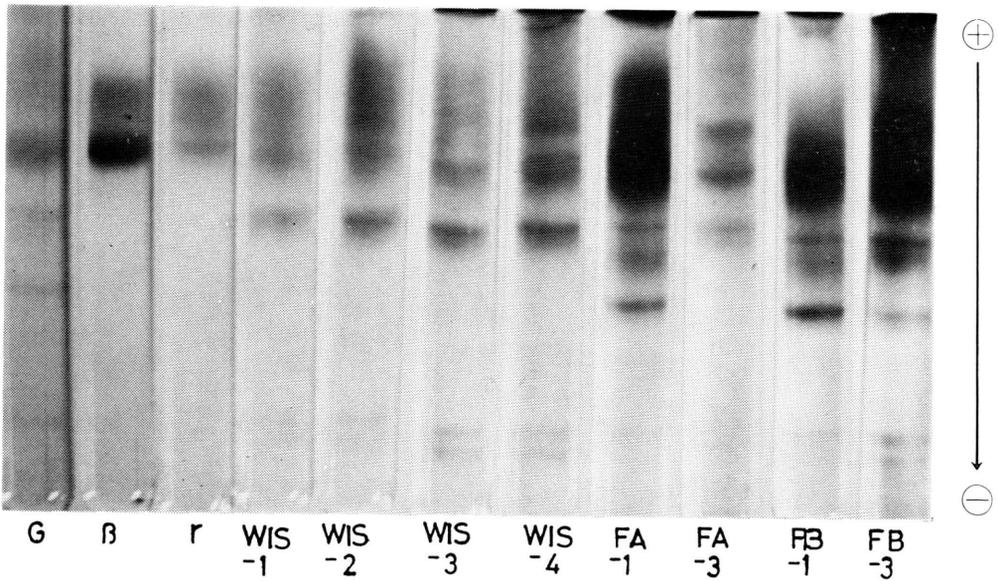


Fig. 4 Comparative Disc Alkaline-Urea Electrophoretic Patterns of Soybean Protein Fractions fractionated by Bio-gel A-1.5 m on Polyacrylamide Gel.

G,  $\beta$  and  $\gamma$  indicate Glycinin,  $\beta$ -conglycinin and  $\gamma$ -conglycinin, respectively, as used for Markers.

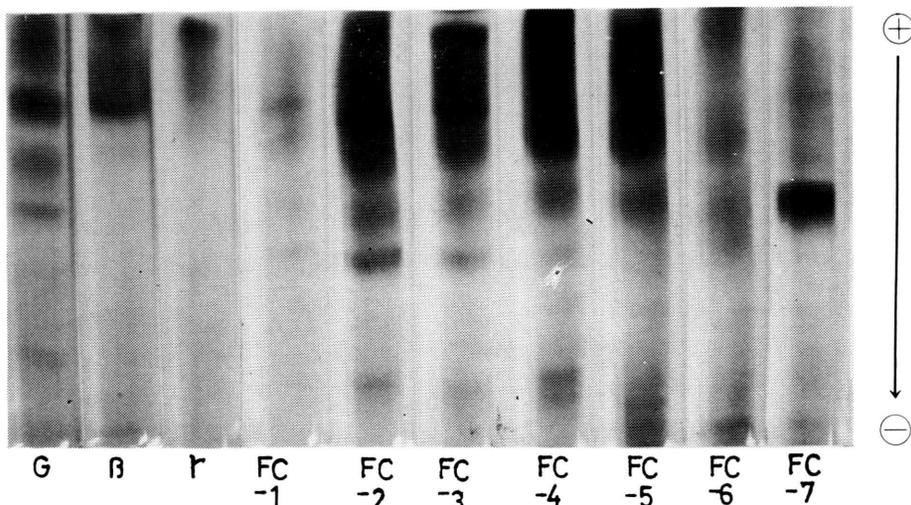


Fig. 5 Comparative Disc Alkaline-Urea Electrophoretic Patterns of Soybean Protein Fractions fractionated by Bio-gel A-1.5 m on Polyacrylamide Gel.

G,  $\beta$  and  $\gamma$  indicate Glycinin,  $\beta$ -conglycinin and  $\gamma$ -conglycinin, respectively, as used for Markers.

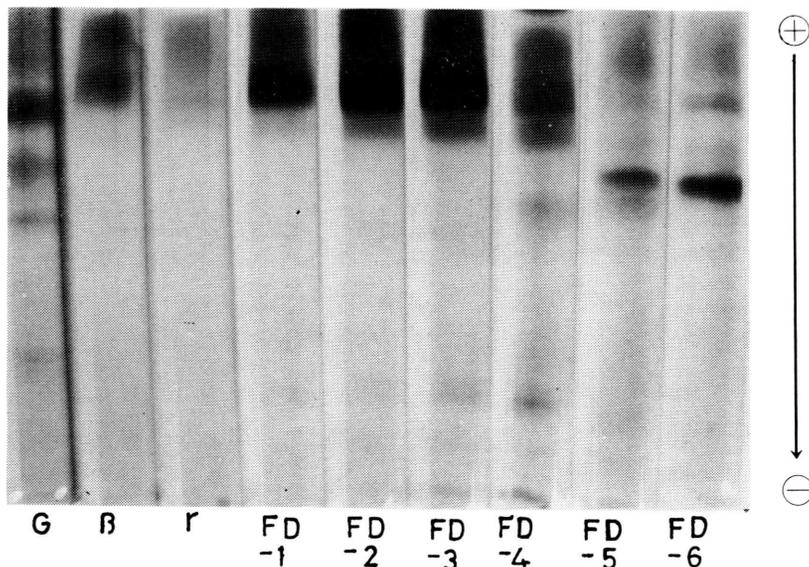


Fig. 6 Comparative Disc Alkaline-Urea Electrophoretic Patterns of Soybean Protein Fractions fractionated by Bio-gel A-1.5 m on Polyacrylamide Gel.

G,  $\beta$  and  $\gamma$  indicate Glycinin,  $\beta$ -conglycinin and  $\gamma$ -conglycinin, respectively, as used for Markers.

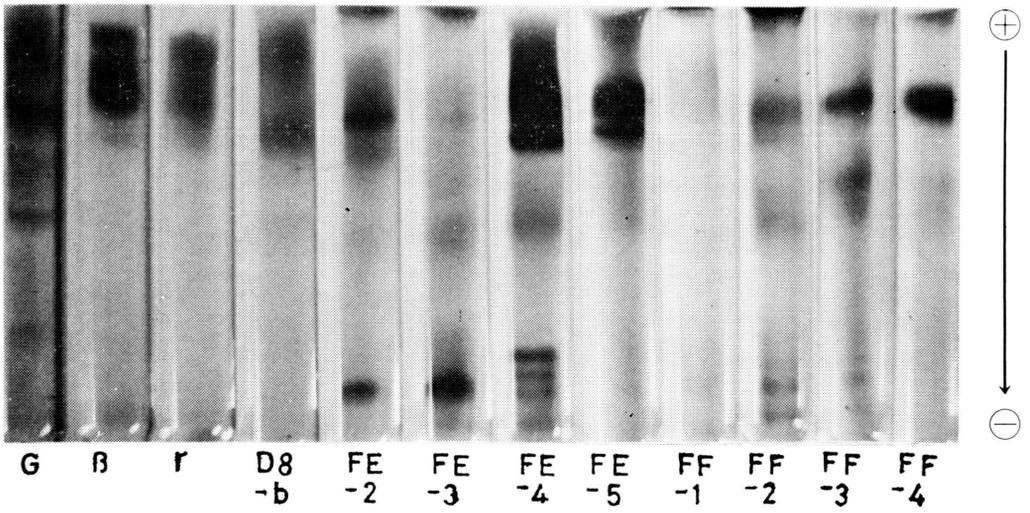


Fig. 7 Comparative Disc Alkaline-Urea Electrophoretic Patterns of Soybean Protein Fractions fractionated by Bio-gel A-1.5 m on Polyacrylamide Gel.

G,  $\beta$  and  $\gamma$  indicate Glycinin,  $\beta$ -conglycinin and  $\gamma$ -conglycinin, respectively, as used for Markers.

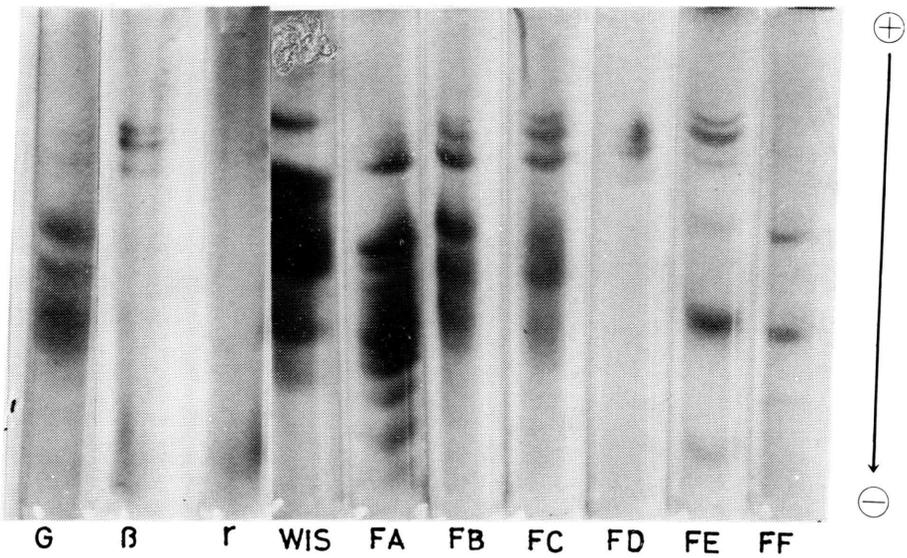


Fig. 8 Comparative Disc Acetic Acid-Urea Electrophoretic Patterns of Soybean Protein Fractions fractionated by Bio-gel A-1.5 m on Polyacrylamide Gel.

G,  $\beta$  and  $\gamma$  indicate Glycinin,  $\beta$ -conglycinin and  $\gamma$ -conglycinin, respectively, as used for Markers.

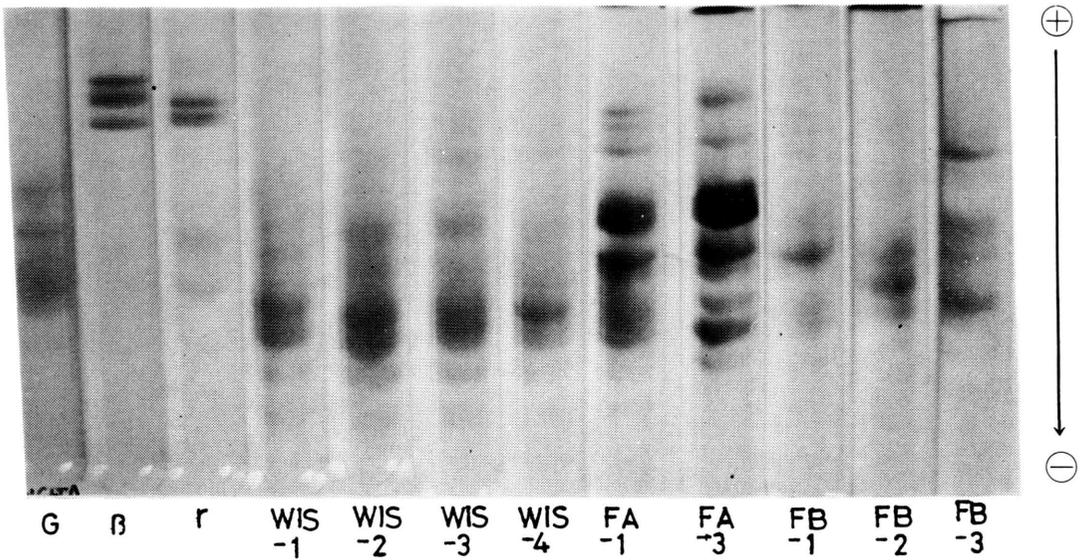


Fig. 9 Comparative Disc Acetic Acid-Urea Electrophoretic Patterns of Soybean Protein Fractions fractionated by Bio-gel A-1.5 m on Polyacrylamide Gel.

G, β and γ indicate Glycinin, β-conglycinin and γ-conglycinin, respectively, as used for Markers.

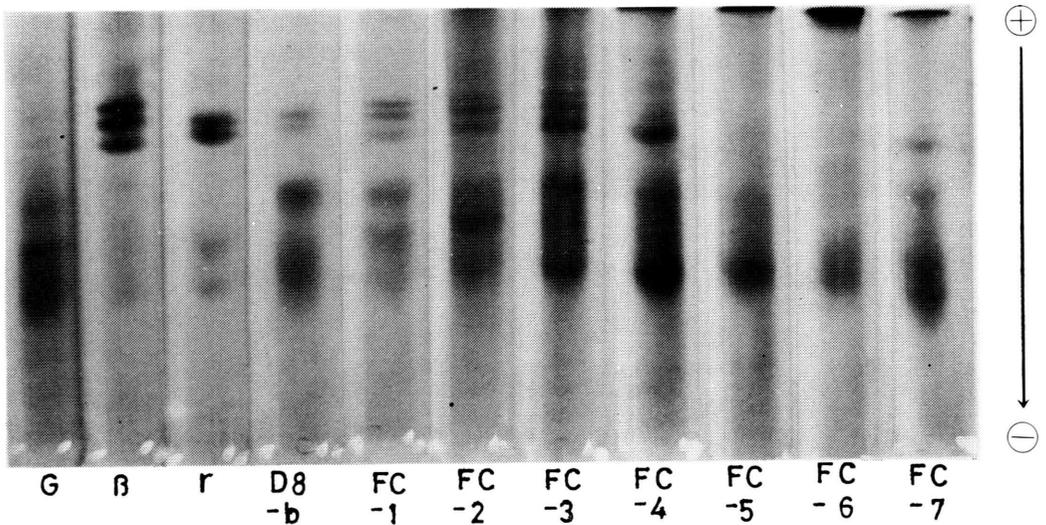


Fig. 10 Comparative Disc Acetic Acid-Urea Electrophoretic Patterns of Soybean Protein Fractions fractionated by Bio-gel A-1.5 m on Polyacrylamide Gel.

G, β and γ indicate Glycinin, β-conglycinin and γ-conglycinin, respectively, as used for Markers.

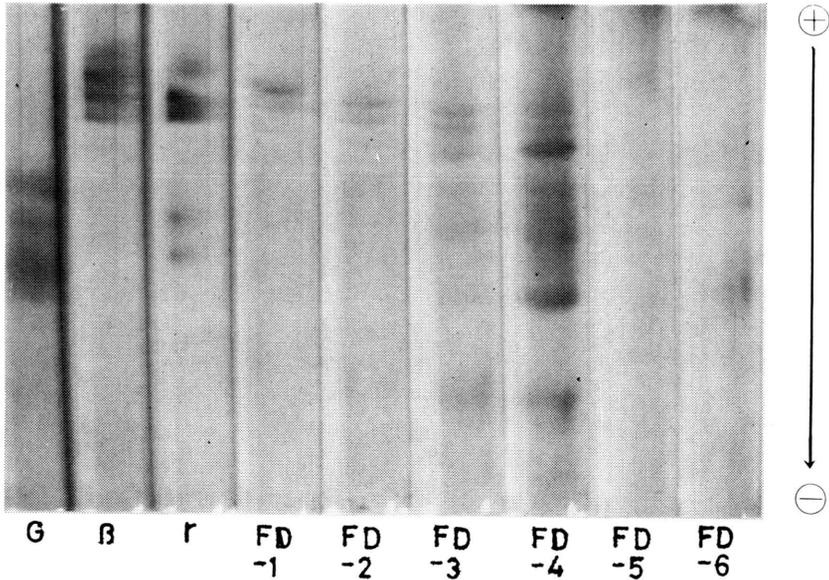


Fig. 11 Comparative Disc Acetic Acid-Urea Electrophoretic Patterns of Soybean Protein Fractions fractionated by Bio-gel A-1.5 m on Polyacrylamide Gel.

G,  $\beta$ - and  $\gamma$  indicate Glycinin,  $\beta$ -conglycinin and  $\gamma$ -conglycinin, respectively, as used for Markers.

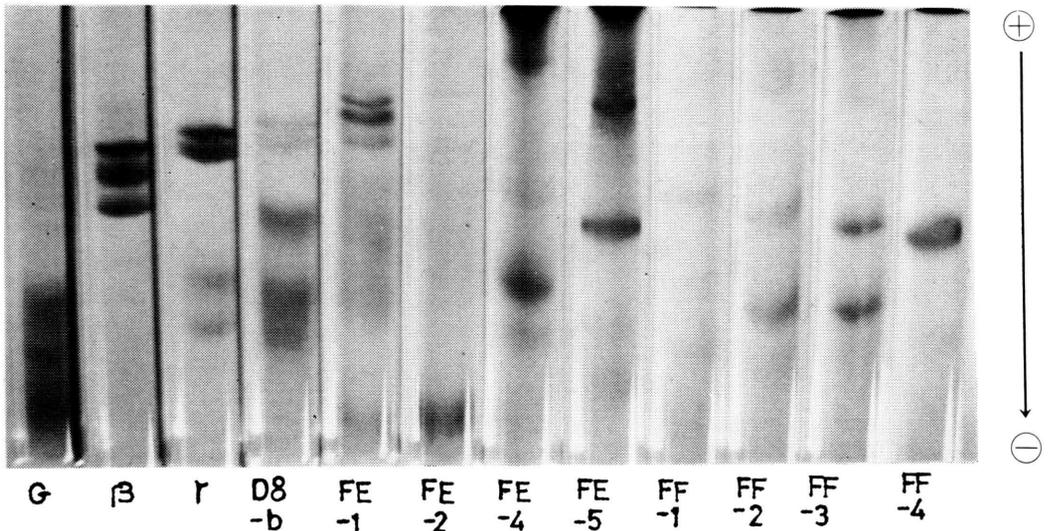


Fig. 12 Comparative Disc Acetic Acid-Urea Electrophoretic Patterns of Soybean Protein Fractions fractionated by Bio-gel A-1.5 m on Polyacrylamide Gel.

G,  $\beta$  and  $\gamma$  indicate Glycinin,  $\beta$ -conglycinin and  $\gamma$ -conglycinin, respectively, as used for Markers.

画分はグリシン成分の他に  $\gamma$ -および  $\beta$ -コングリシニンの一部分が混在していることを示している。更に FB 画分は FA 画分と同様な泳動像を示した。また, Fig. 10 に示したのは FC-1~FC-7 区分であるが, FA, FB 画分と同様な泳動像を示した。Fig. 11では FD 画分の泳動像を示すが, そのパターンから主に  $\beta$ -コングリシニンの存在を示す。Fig. 12では, その他の低分子蛋白質であるトリブシンインヒビター (Knitz 型), レクチン (フアイトヘマグルチニン),  $\beta$ -アミラーゼの存在を示す。

### 要 約

大豆主要貯蔵蛋白質成分であるグリシン (11S-蛋白質),  $\beta$ -コングリシニンおよび  $\gamma$ -コングリシニン (7S-蛋白質) 等の大容量の連続分離精製法について, サブユニット組成から検討した。用いたアルカリ性尿素ゲル, および酢酸酸性尿素ゲル電気泳動法からグリシン成分は主に WIS, FA, FB 画分に,  $\beta$ -コングリシニン成分は FC, FD, FE 画分に,  $\gamma$ -コングリシニン成分は WIS, FA, FB, FC 画分に存在することが明らかであり, その精製度も, わずか二段操作でかなり高くなっているものと考えられ, 大豆蛋白質成分の連続的分別法として有効であると思われる。

### 謝 辞

本研究を行なうにあたり, 御指導を賜りました農林

省食品総合研究所理化学部, 深沢親房博士に深く感謝いたします。

1. H. Mitsuda, T. Kusano, K. Hasegawa : *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 7 (1965)
2. I. Koshiyama : *Int. J. Peptide Protein Res.*, **4**, 167 (1972)
3. A. C. Eldridge, W. J. Wolf : *Cereal Chem.*, **44**, 645 (1967)
4. N. Catsimpoalas, D. A. Rogers, S. J. Circle, E. W. Meyer : *Cereal Chem.*, **44**, 631 (1967)
5. K. Kitamura, K. Okubo, K. Shibasaki : *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 1083 (1974)
6. I. Koshiyama : *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 885 (1965)
7. I. Koshiyama : *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 2257 (1972)
8. R. C. Robert, D. R. Briggs : *Cereal Chem.*, **42**, 71 (1965)
9. I. Koshiyama, D. Fukushima : *Phytochem.*, **15**, 161 (1976)
10. N. Catsimpoalas, C. Ekenstam : *Arch. Biochem. Biophys.*, **129**, 490 (1969)
11. 宇高京子 : 東京家政大学研究紀要第16集 (1977)
12. 宇高京子 : 昭和52年度 東京大学学位論文