

大豆蛋白質の酸分別沈殿法による分画画分のグラジエント スラブゲル電気泳動法による解析*

宇高京子 南雲葉子

(昭和54年9月29日受理)

Analysis for the Gradient Slab Gel Electrophoresis of Soybean Protein Fractions obtained by the Fractional Acid Precipitation Method

Kyoko UDAKA and Yoko NAGUMO

(Received September 29, 1979)

緒 言

大豆は我が国に於いて、豆腐、味噌、納豆、醤油などとして日本人の食生活に欠かさない重要な植物性蛋白質の給源である。大豆蛋白質の新しい食品への利用が急速に高まりつつある現在、大豆蛋白質の理化学的性質についてより多くのより新しい基礎的情報がますます必要とされよう。

大豆種子蛋白質の大部分は子葉 (cotyledon) 中に存在し、その大豆種子蛋白質の約90%は水で抽出され、さらに、水抽出蛋白質の約90%は pH 4~5 で等電沈殿し、沈殿蛋白質は大豆グロブリンとして分離できる。いわゆる生物活性を持たない貯蔵形態の蛋白質である。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ており、精製操作の第1段階として、酸分別沈殿法を確立した^{1)~4)}。本論文では前報^{5)~6)}と同様に、その酸分別沈殿法によって得た各画分を濃度勾配スラブゲル電気泳動法で検定をおこなったので報告する。

実験方法

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アセトン中で冷却しながら粉砕し、次いでn-ヘキサンで脱脂後、風乾し、出発材料とした。
2. 酸分別沈殿法による蛋白質の分画
前報^{5)~6)}の通りおこなった。
3. ゲル濾過法 上記の酸分別沈殿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。1M-食塩を含む 0.01M-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. スラブゲル電気泳動法¹⁾

用いたゲルは解析感度を高めるために4~30%のポリアクリルアミドの濃度勾配をつけた、いわゆるグラジエントゲルである。マイクロシリンジで適当量の上記、分画画分試料をサンプルアプリーケーター内に注入し、75Vで30分泳動させた後、125Vに切り変えて約16時間泳動する。アミドブラック 10B液で約10分染色し、7%酢酸で電気脱色をおこなった。

実験結果および考察

Fig. 1 は酸分別沈殿法によって得た7画分 (WIS~FF) のスラブゲル電気泳動像である。マーカーとしてグリシン (11S蛋白質), γ -コングリニン, β -コングリニンをを用いた。この泳動像から WIS, FA, FB 画分の主要成分はグリニン成分であった。FC, FD 画分はほとんど均一な β -コングリニン成分であった。また FE 画分は β -コングリニンの他にレクチンおよびトリプシンインヒビターを含んでいた。FF 画分はレクチン, β -アミラーゼ, トリプシンインヒビターを含んでいた。従ってグリニンの精製のための出発画分として、WIS, FA または FB が有効であり、 β -コングリニンの場合は FC, FD画分が有効である。 γ -コングリニンの場合は FA および FB 画分、レクチンと β -アミラーゼは FF 画分をその出発材料とした。

次に酸分別沈殿画分を Bio-gel A-1.5 m でゲル濾過した。その得られたパターンは前報⁶⁾の通りである。すな

食品学第3研究室

*大豆蛋白質に関する研究 (第5報)

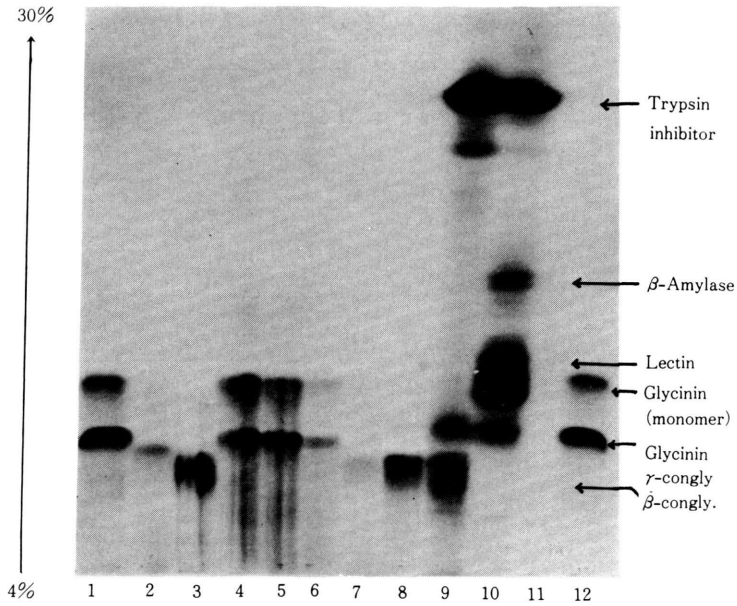


Fig. 1 Slab Gel Electrophoresis of Soybean Protein Fractions obtained by Fractional Acid precipitation Method

The discontinuous slab gel electrophoresis (gel gradient : 4—30%) was carried out for 16 hrs at 125 V under the chilled buffer system. Gels were stained with Amido Black 10B.

1 : glycinin, 2 : γ -coglycinin, 3 : β -conglycinin, 4 : WIS, 5 : FA, 6 : FB, 7 : FC, 8 : FD, 9 : FE, 10 : FF, 11 : Trypsin inhibitor (Kunitz), 12 : glycinin

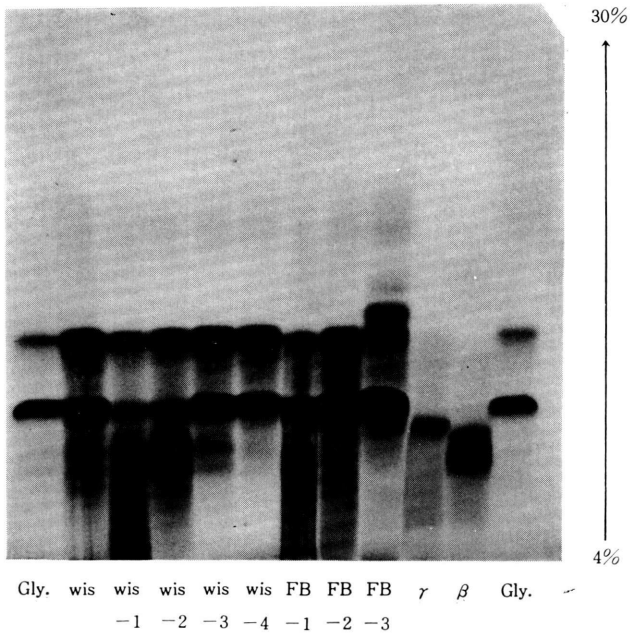


Fig. 2 Slab Gel Electrophoretic Patterns of Acid precipitated Soybean Protein Fractions fractionated by Bio-gel A-1.5 m
Gly, β and γ indicate Glycinin, β -conglycinin and γ -conglycinin, respectively, as used for Markers.

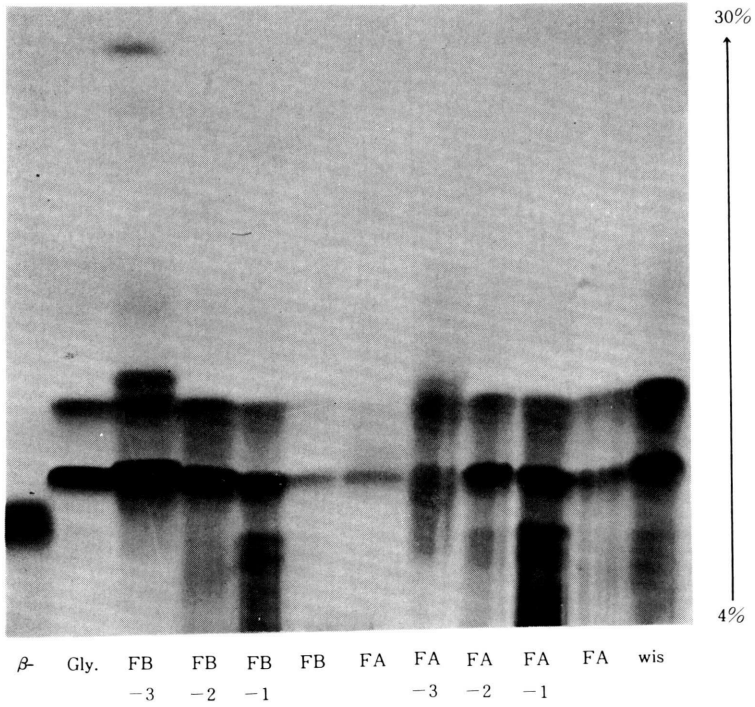


Fig. 3 Slab Gel Electrophoretic Patterns of Acid precipitated Soybean Protein Fractions fractionated by Bio-gel A-1.5 m

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

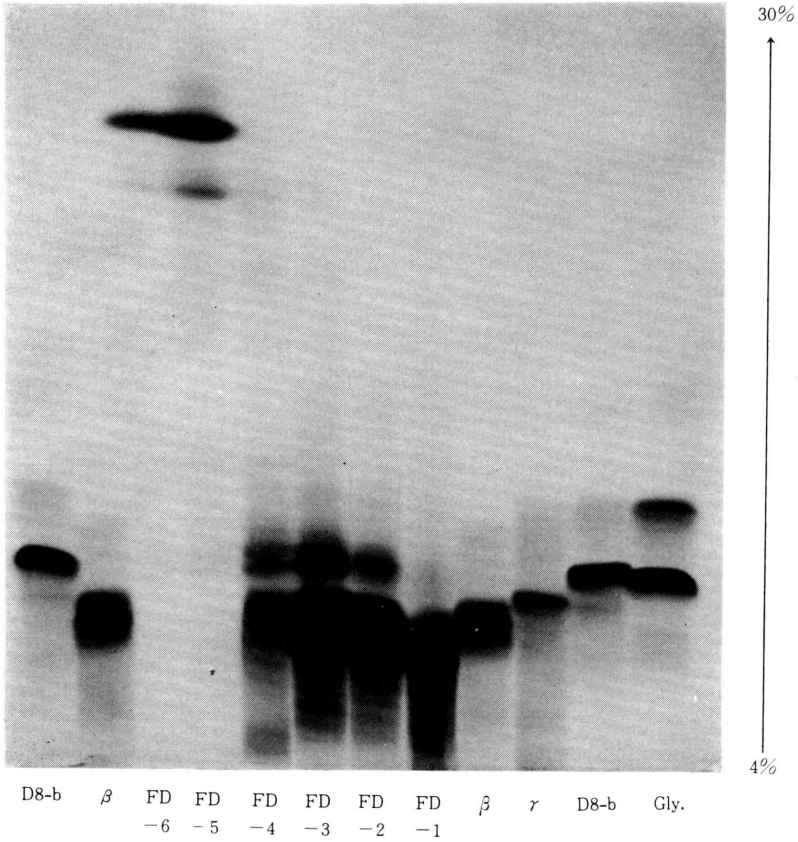
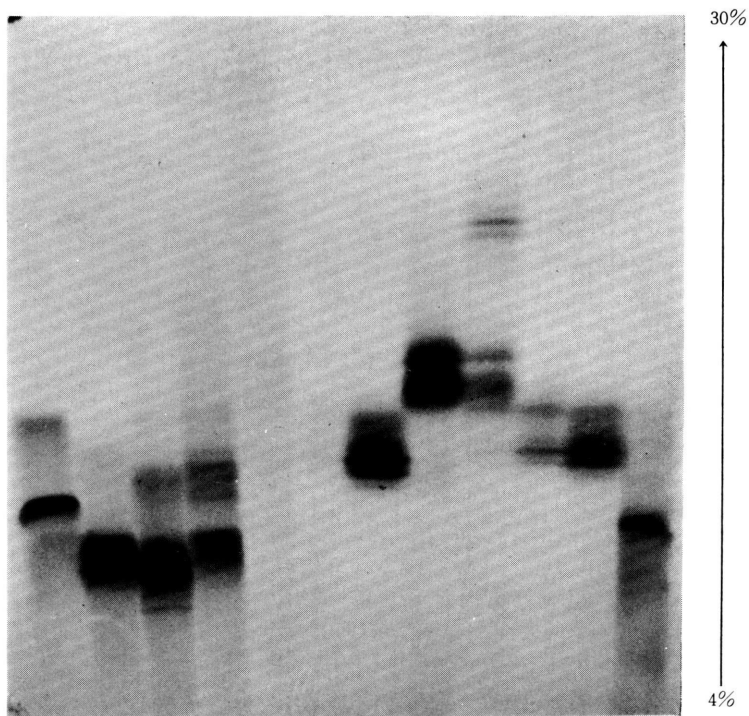


Fig. 5 Slab Gel Electrophoretic Patterns of Acid precipitated Soybean Protein Fractions fractionated by Bio-gel A-1.5 m

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



Cly. β FE FE FE FE FE FF FF FF FF γ
 -1 -2 -3 -4 -5 -1 -2 -3 -4

Fig. 6 Slab Gel Electrophoretic Patterns of Acid precipitated Soybean Protein Fractions fractionated by Bio-gel A-1.5 m

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

わち WIS 画分は 4 区分に, 以下 FA, FB, FC, FD, FE, FF の順に, 3, 3, 7, 6, 5, 4 区分に分けその区分を硫酸沈殿 (0.8飽和) により濃縮した後, スラブ電気泳動をおこなった. Fig. 2から Fig. 6に示したのがその各画分の電気泳動像である. WIS の場合, Fig. 2に示したように 1~3 区分まではグリニン成分の他に γ -コングリニンの 1 成分および 15S 蛋白成分の混入が認められるが WIS-4 はほぼグリニン成分のみから成っていた. FA 画分は 1~2 区分まではやはり少量の γ -コングリニンおよび 15S 蛋白成分の混入が認められるが, FA-3 では, ほぼ均一なグリニン成分であった. 同様に FB 画分の場合は 1 および 2 区分は γ -コングリニンと 15S 蛋白成分の混入が認められたが, FB-3 はほぼグリニン成分から成っていた. FC 画分は FC-2 に 7S 成分の混入がみられるが, FC-3 ではグリニン成分が多く, FC-4~5 では γ -コングリニン成分が混入していた. また, FC-5~7 ではトリプシンインヒビターも認められる. FD 画分の場合は FD-1 はほぼ均一な β -コングリニンであるが FD-2~4 では少量の γ -コングリニンが混入していた. FD-5~FD-6 は, ほぼ均一なトリプシンインヒビターであった. 一方, FE 画分の場合, FE-1 が β -コングリニン成分を含み, FE-2 が β -コングリニンの一部ならびにレクチンを含んでいた. FE-5 は, ほぼレクチン成分のみから成っていた. FF 画分の場合は FF-1 が β -アミラーゼ, FF-2 がトリプシンインヒビターおよび β -アミラーゼを含み, FF-3~4 はレクチンを含んでいた. β -アミラーゼ (分子量約 5700) は電気泳動ではレクチンよりも移動が大きいのに反して, カラムの溶出図ではレクチンよりも早く溶出されてくるのはレクチンが糖蛋白であるために, Bio-gel A を構成するマンノース部分との相互作用によって溶出速度が遅れてくるものと考えられた.

要 約

大豆主要貯蔵蛋白質成分であるグリニン (11S-蛋白

質), β -コングリニンおよび γ -コングリニン (7S-蛋白質) 等の大容量の連続分離精製法について 4~30% 濃度勾配スラブゲル電気泳動法でその解析をおこなった. その結果, 前報¹⁾ と全く同様な結果を得た. すなわち, グリニン (分子量約 30万) の精製は WIS, FA または FB を Bio-gel A-1.5 m でゲル透過し, WIS の場合は WIS-4, FA の場合は FA-3, FB の場合は FB-3 を集めることによって, 均一なグリニン成分を分離することが出来た. β -コングリニン (分子量約 16万) の場合は, FC, FD, または FE 画分を出発材料とし Bio-gel A-1.5 m でゲル透過し, FD の場合は FD-1 または FD-2 を出発材料とし, FE の場合は FE-1 を回収することによって電気泳動的にほぼ均一な成分を得ることが出来た. γ -コングリニン (分子量約 10万 6000) の場合は WIS, FA または FB を出発材料とし Bio-gel A-1.5 m でゲル透過し, WIS-1~3, FA-1~2 および FB-1~2 を回収し, これをコンカナバリ A-セファロース 4B (Pharmacia社製) を用いたアフィニティークロマトグラフィーをおこないその吸着区分を回収するとよいと考えている.

この論文は昭和54年度日本農芸化学会で研究発表した一部である.

文 献

- 1) 宇高京子: 昭和52年度, 東京大学学位論文
- 2) K. Udaka and C. Fukazawa: *Abstract of International Conference on Regulation of Developmental Process in Plants*, Halle (Saale), GDR., 1978, p. 10
- 3) 宇高京子, 深沢親房, 原田久也: 生化学, **49** (8), 737 (1977)
- 4) 宇高京子, 三輪 操, 中村恵, 深沢親房: 生化学, **50** (9), 858 (1978)
- 5) 宇高京子: 東京家政大学研究紀要, **16**, 25 (1976)
- 6) 宇高京子: 同 上 **19**, 21 (1979)