

## 大豆蛋白質の酸分別沈殿法による分画画分の免疫化学的解析

宇高京子 南雲葉子

(昭和55年9月30日受理)

### Immunological Analysis of Soybean Protein Fractions obtained by the Method of a Fractional Acid Precipitation

Kyoko UDAKA and Yoko NAGUMO

(Received September 30, 1980)

#### 緒 言

前報に続き著者らは大豆主要貯蔵蛋白質各成分の分離精製法について研究を進めているが、本論文では前報と同様に酸分別沈殿法によって得た各画分に免疫化学的解析を試みた。大豆蛋白質成分の解析に免疫化学的手法をとり入れたのは Catsimpoolas ら<sup>4)</sup> が始めてである。免疫化学的手法による特異蛋白質の定量法として、沈降反応および補体結合反応などの液相法と、Simple Radial Immundiffusion 法(単純放射状ゲル拡散法)<sup>5)</sup>、ロケット法<sup>6)</sup> および二次元免疫電気泳動法<sup>7)</sup> などの固相(ゲル)法があるが、ここでは Ouchterlong のゲル内二重拡散法<sup>8)</sup> を用いた。

#### 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. 酸分別沈殿法による蛋白質の分画

前報<sup>1)3)</sup>の通りおこなった。

3. ゲル濾過法: 前報<sup>2)3)</sup>の通りおこなった。

4. SDS-ディスク電気泳動法によるサブユニットの検定

(1)試薬の調製 (a)0.5 M-リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.2) (b)1% SDS (硫酸ドデシルナトリウム)溶液 (c)10% SDS 溶液 (d)22.2% アクリルアミド0.6% N. N. N'-N'-メチレンビスアクリルアミド溶液 (e) N. N. N'. N'.-

テトラメチルエチレンジアミン溶液 (TEMED) (f) 2-メルカプトエタノール液 (g)30% 蔗糖緩衝液 (ブロムフェノールブルーを含む) (h) 1% アミドブラック 10 B 染色液 (i) 1.5% 過硫酸アンモニウム液

(2)ゲルの調製 (a): (b): 水: (d)=6 ml: 3 ml: 6 ml: 13.5 ml の割合でよく攪拌しロータリーポンプで約5分間脱気した後水中で冷やし、これに素早く (e), (i)を0.04 ml, 1.5 ml ずつ加えて気泡が生じないように静かに攪拌し、これをゲルカラムに入れ重合させた。

(3)試料の調製 (c), (g)をそれぞれ 2:1 の割合で混合し、これに終濃度が 10 mM になるように(f)を加えた。この溶液に試料溶液を等量混和し50℃で2時間保温し試料とした。

(4)泳動条件 0.1% SDS を含む 0.1M-リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.2)を用いた。泳動条件は 2 mA/カラムで約14時間泳動して、1% アミドブラック 10 B で約10分染色し、7% 酢酸中での電気脱色をおこなった。

5. Ouchterlong のゲル内二重拡散法<sup>8)</sup>

本研究での単一な蛋白成分に対する抗血清の調製は次のようにおこなった。すなわち、Bio-gel A-1.5 m セファロース 4B およびコンカナバリ A などを用いて分離精製した各種の電気泳動的、超遠心的に均一な 11 S-蛋白質(グリシン)、7-S 蛋白質( $\beta$ -および  $\gamma$ -コングリニン)の各成分を食塩バルビタール緩衝液に 1~2 mg 蛋白質/ml の濃度で溶解後、これに Freund の完全アジュバンド<sup>9)</sup> を等量加え注射器を用いて充分乳化した(Water in oil の形になるまで乳化する)。免疫は一週間間隔で3回ウサギの四肢の指掌部、背部皮内、大腿部筋肉、肩胛骨下にそれぞれ 0.1 ml ずつ注入した。これはできるだけ多くの抗体産生細胞を動員して抗体量(すな

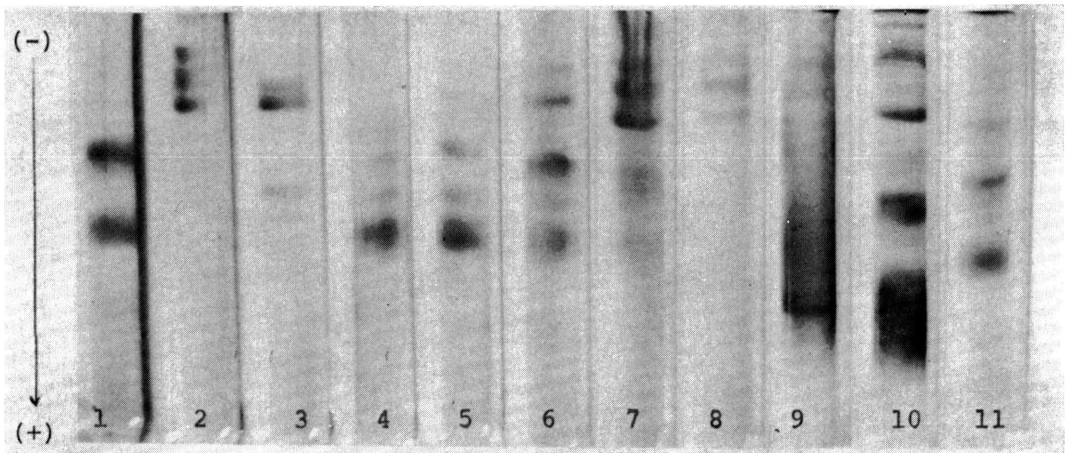


Fig. 1 SDS Electrophoresis of Soybean Protein Fractions Separated by the Method of Fractional Acid Precipitation

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis was performed according to Weber and Osborn using 10% gel containing 2.6% bisacrylamide. Electrophoresis with a 0.1—0.2 mg protein sample was usually carried out for 15 hrs with a current of 2 mA per gel column. Gels were stained with Amido-Blak 10 B for 1 hr followed by destaining with 7% acetic acid.

1 : glycinin ; 2 :  $\beta$ -conglycinin ; 3 :  $\gamma$ -conglycinin ; 4 : WIS ; 5 : FA ; 6 : FB ; 7 : FC ; 8 : FD ; 9 : FE ; 10 : FF ; 11 : WIS

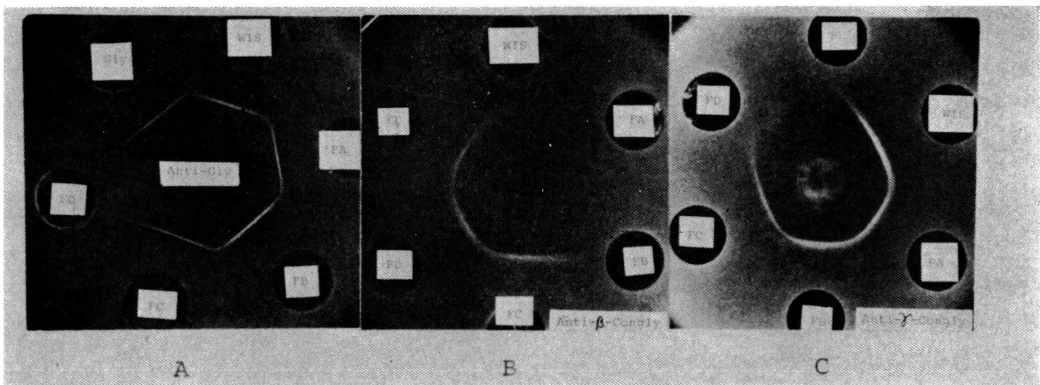


Fig. 2 Ouchterlony Double Diffusion Patterns of Soybean Protein Fractions revealed with Ab (Gly), and Ab (7S)

Double gel diffusion in 1% agarose was carried out in petridish according to the method of Ouchterlony. The gel medium consisted of 1% agarose solution in 0.05 M barbital buffer (pH 8.0) containing 1.0 M NaCl and 0.001 M merthiolate. The reactants were allowed to diffuse at 20°C for 7 days in a moist chamber. Results were recorded photographically. A : soybean protein fractions separated by the method of fractional acid precipitation were reacted with a rabbit anti-glycinin serum. Peripheral wells contains antiserum ; B : with anti- $\beta$ -conglycinin serum ; C : with anti- $\gamma$ -conglycinin serum.

わち抗体価)を上げることを目指したためである。その後1ヶ月間ウサギを休養させた後、同様な免疫操作を1回おこない、1~2週間後に耳静脈より2~5 mlの血液をとり、その血清を用いて Ouchterlony のマイクロ法又は抗体稀釈重層法で抗体価を求めた。所定の稀釈倍数で沈降線が得られたか、あるいは抗体価が64倍以上になった時、心臓穿刺か頸動脈より全採血を行なった。所定の抗体価が得られなかった場合は更に同様の免疫操作を続ける。血清は凝固血液を一夜冷所(5°C)に放置することにより得た。これを56°Cで30分間保温し補体活性を破壊した後(この操作を非働化という)、0.01% マーゼンを加えドライアイスアセトン中で急速凍結し保存した。Ouchterlony 法の場合、アガロース濃度は1%で抗原穴と抗体穴の距離はそれらの外縁から測定して7 mmとした。拡散時間は48~72時間(20°C)で沈降線に変化が認められなくなった時、写真撮影をおこなった。

#### 研究結果および考察

Fig. 1 に示したようにグリシニンサブユニットは位動度の遅いサブユニットと速いサブユニットの二つに分けられた。一方、 $\beta$ -コングリシニンのサブユニットはグリシニンのそれよりも位動度が少く主として3~4つに分けられた。また $\gamma$ -コングリシニンのそれは $\beta$ -コングリシニンと同じ付近に位動度をもつ一つのサブユニットがある。またグリシニンの二つのサブユニットの間に位動度をもつもう一つのサブユニットから成っていた。したがってこれらの泳動バンドからも WIS, FA, FB, FC 画分にグリシニン成分が存在し、 $\gamma$ -コングリシニンは、WIS, FA, FB 画分に、 $\beta$ -コングリシニンは FC, FD, FE 画分に存在することが確められた。特に FD 画分はほぼ均一な $\beta$ -コングリシニンのサブユニット像を示した。次に上記5で得た抗血清に酸分別沈殿法によって得た各分画画分の蛋白質成分の変化を、Ouchterlony のゲル内二重拡散法で検討したのが Fig. 2 である。Fig. 2-A に示すように抗グリシニン血清と反応する酸分別画分は、WIS, FA, FB, FC で FD 画分以下は反応しない。同様に抗 $\beta$ -コングリシニンの反応性をみると、FC, FD, FE 画分と反応するが WIS, FA, FB 画分とは反

応しなかった (Fig. 2-B)。一方、 $\gamma$ -コングリシニン血清との反応性は WIS, FA, FB, FC 画分との間に存在し、FD 以下の画分とは全く反応しなかった (Fig. 2-C 参照) すなわち、以上の結果はスラブゲル電気泳動法、ディスク電気泳動法、超遠心分析像による結果とよく一致した。

#### 要 約

大豆主要貯蔵蛋白質成分である 11 S-蛋白質 (グリシニン), 7 S-蛋白質 ( $\beta$ -および  $\gamma$ -コングリシニン) 等の大容量の連続的分離精製法について、SDS-ディスク電気泳動法および免疫化学的解析をおこなった。その結果、グリシニン成分は主に 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となった。その精製度も酸分別沈殿画分からの出発であれば大豆蛋白質成分の連続的分別法としてより有効であると思われる。

この論文は昭和53年度日本生化学会において研究発表した一部である。

#### 謝 辞

本研究をおこなうにあたり、御指導を賜りました農林水産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。

#### 文 献

- 1) 宇高京子：家政大学研究紀要 **16**, 25 (1976)
- 2) 宇高京子 // **19**, 21 (1979)
- 3) : 東京大学学位論文 (昭和52年度)
- 4) N. Catsimpoalas, C. Ekenstam : Arch. Biochem. Biophys, **129**, 490, (1969)
- 5) C. Mancini, A. O. Carbonara, J. H. Heremans : Immunochemistry, **2**, 235 (1965)
- 6) C. B. Laurell : Anal. Biochem., **15**, 45 (1966)
- 7) C. B. Laurell : Anal. Biochem., **10**, 358 (1965)
- 8) O. Ouchterlony : Proger. Allergy., **6**, 30 (1962)
- 9) J. Freund : Ann. Rev Microbiol., **1**, 21 (1947)