

大豆7S蛋白質 (β -および γ -コングリシニン) の分離精製について

宇高京子

(昭和58年9月30日受理)

Isolation and Purification of Soybean 7S proteins (β -and γ -conglycinins)

Kyoko UDAKA

(Received September 30, 1983)

緒言

大豆は古来から日本人の食生活に欠かせない重要な蛋白質の給源として利用されて来た。近年、その重要性は食品加工技術の急速な進歩と相まって一層増大する傾向にある。とりわけ、種々の食品素材から適当な食品加工特性 functional property をもつ成分のみを取り出し、混合することで、栄養的にもバランスがとれ、しかも加工特性の面でも優れた性質を持つ素材を開発しようとする。いわゆる組立食品 Fabricated food の概念が導入されるに及んで、良質な蛋白質を多く含む大豆への期待には著しいものがある。本論文では、このような観点に立って、大豆 7S 蛋白質 (β -および γ -コングリシニン) の分離精製法について検討したので報告する。

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粗 7S-蛋白質画分の分離：
前報¹⁾²⁾にしたがって酸分別沈澱を行ない画分 FD を主として用いたが比較のため WIS, FA, FB, FC, FE および FF 画分も用いた。
3. ゲル炉過法：前報²⁾³⁾の通り行なった
4. コンカナバリン A-セファロース 4B によるアフィニティークロマトグラフィーでの分画：上記2.の酸分別沈澱法によって得た各画分をコンカナバリン A-セファロース 4B (カラムサイズ 8×150 mm), 流速 1 ml/10

min, 2 ml ずつ集め 280 nm で吸光度を測定した。1.0 M-食塩および 10 mM-2-メルカプトエタノールを含む 0.01 M-バルビタール緩衝液 (pH 8.0, 20°C) で完全に吸着させた。吸着した糖蛋白質の溶出は 0.1 M- α -methyl-D-mannoside を含む上記バルビタール緩衝液でおこなった。

5. グラジエントスラブゲル電気泳動²⁾：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ゲルである。

実験結果および考察

大豆グロブリンの90%近くを占めるグリシニン、 β -および γ -コングリシニンの三成分を一連の分離操作の過程で、高純度にしかも容易にかつ、収率よく精製する方法の確立はこれまでほとんどおこなわれていない。この原因の1つに、これらのグロブリン成分がイオン強度および pH の変化に伴い複雑に解離会合する性質をもつことが挙げられる⁴⁾。また、主要成分であるグリシニンが、いわゆる低温沈澱蛋白質 cryoprotein としての性質をもつため、収率はともかく、他の2成分の精製に較べて容易であったことにも基因している。このいわゆる冷沈蛋白質画分 Cold Insoluble Fraction, CIF と略記す)に回収されるグリシニン量は、Ca 塩の添加 (1~10 mM) によって CIF の沈澱を充分におこなった場合でも、全グリシニン量の約60%であり⁵⁾⁶⁾、残りはなお可溶化状態で定量的には沈澱しないことを筆者ら²⁾により明らかにした。このため、グリシニン精製の有効な出発材料の1つである CIF を充分沈澱除去した上澄液を 7S 成分精製のための出発材料として用いても、かなりの量のグリシニンが混入しているため、更に何段階かの精製操作が必要であった。とりわけ、 γ -コングリシニン量は β -コ

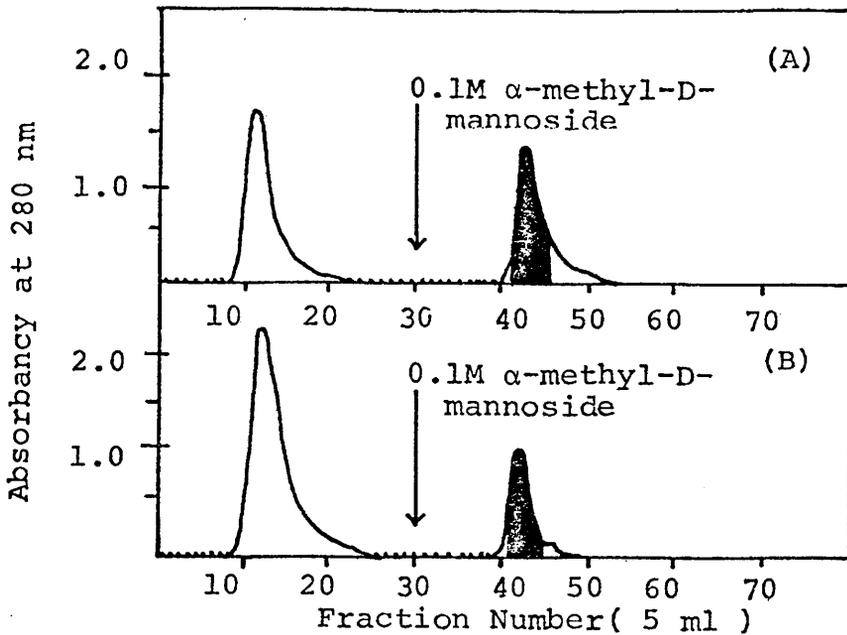


Fig. 1 Affinity Chromatograms of Fractions 1 and 2 of WIS on Con A-Sepharose 4B

Sample (120 mg protein) was applied to a column of Con A-Sepharose 4B (column size: 8 x 150 mm) at a flow-rate of 1 ml per 10 min. in the pH 8.0 barbital buffer (0.01 M) containing 1.0M NaCl and 10 mM 2-mercaptoethanol (20°C). After the filtrate fraction was completely eluted, adsorbed fraction to the column was eluted with the buffer containing 0.1M α -methyl-D-mannoside. (A): fraction 1 of WIS; (B): fraction 2 of WIS.

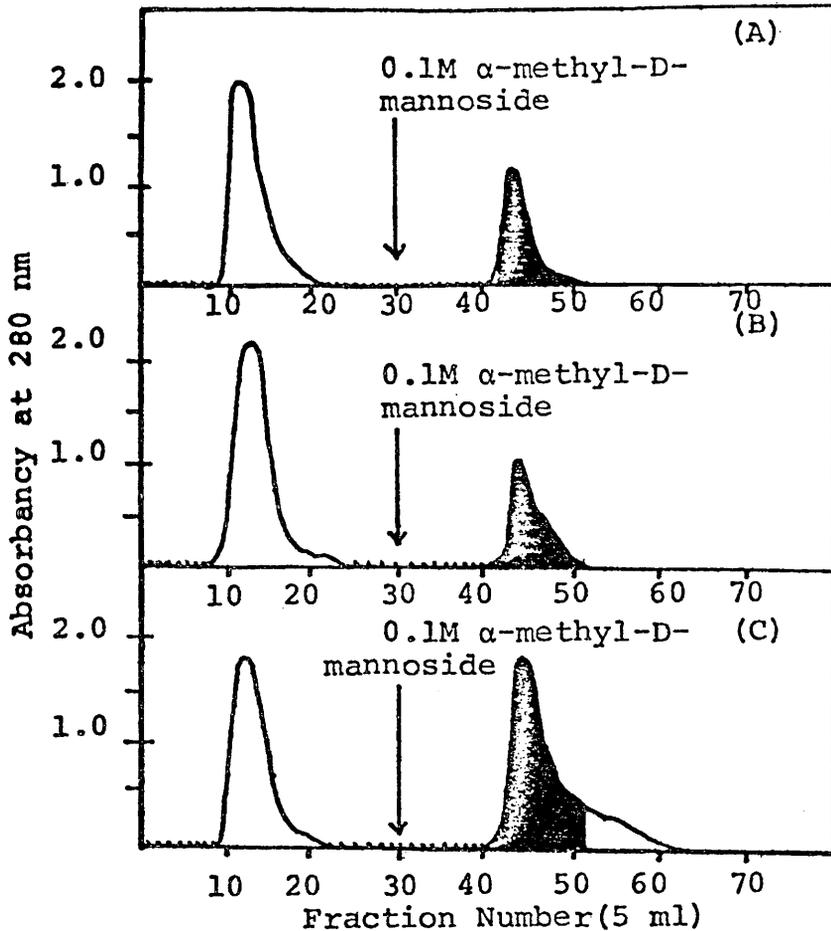


Fig. 2 Affinity Chromatograms of Fraction 3 of FA, Fraction 3 of FB and Fraction 1 of FC on Con A-Sepharose 4B

Samples (85 mg-162 mg dissolved in 5 ml) were applied to a column of Con A-Sepharose 4B (column size: 8 x 150 mm) and eluted with a flow-rate of 1 ml per 10 min in 0.01M barbital buffer (pH 8.0) containing 1.0M NaCl and 10 mM 2-mercaptoethanol at 20°C. After eluted with the buffer system described above, adsorbed fractions to the columns were eluted with the buffer containing 0.1M α -methyl-D-mannoside. (A): fraction 3 of FA; (B): fraction 3 of FB; (C): fraction 1 of FC.

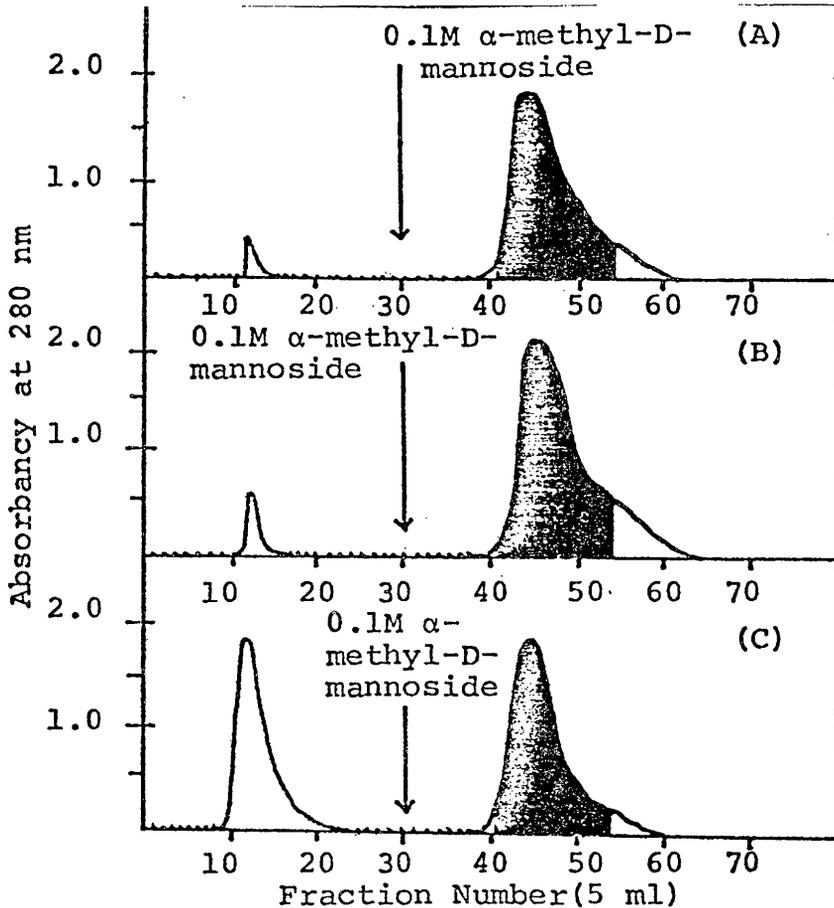


Fig. 3 Affinity Chromatograms of Fraction 2 of FD, Fraction 1 of FE and Fraction 3 of FF on Con A-Sepharose 4B

Sample (120 mg protein dissolved in 5 ml of the buffer as described below) was applied to a column of Con A-Sepharose 4B and was eluted with a flow-rate of 1 ml per 10 min in 0.01M barbital buffer containing 1.0M NaCl and 10 mM Na_2 -EDTA (pH 8.0) at 20°C. After the filtrate fraction was completely eluted with the buffer, adsorbed fraction to the column was eluted with the buffer supplemented with 0.1M α -methyl-D-mannoside. (A): fraction 2 of FD; (B): fraction 1 of FE; (C): fraction 3 of FF.

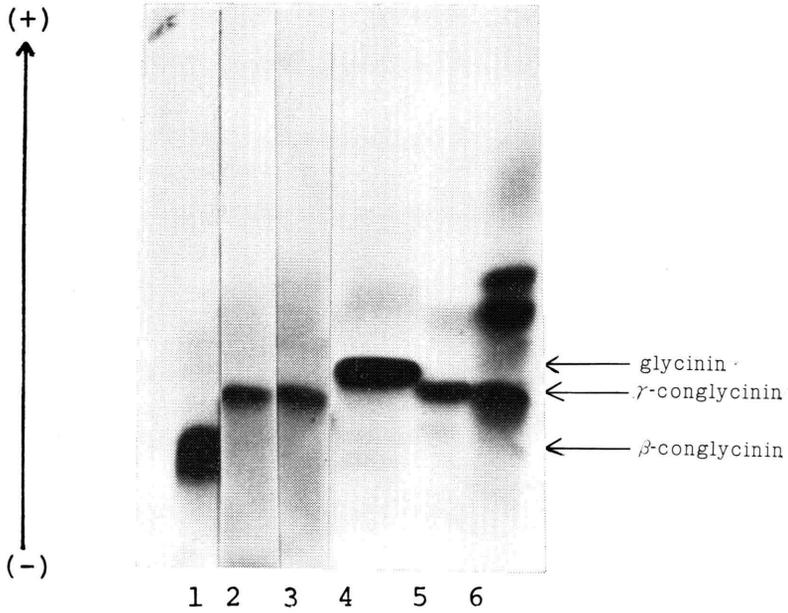


Fig. 4 Slab-Gel Electrophoretic Patterns of Adsorbed Fractions to Con A-Sepharose 4B

The slab-gel electrophoresis was carried out for 16 hrs at 125v on 4-30% gradient gel with 0.1M Tris-borate buffer containing 2 mM Na₂-EDTA (pH 7.2). slot 1: adsorbed fraction in fraction 1 of FC; slot 2: adsorbed fraction in fraction 3 of FB; slot 3: adsorbed fraction in fraction 3 of FA; slot 4: glycinin; slot 5: adsorbed fraction in fraction 2 of WIS; slot 6: adsorbed fraction in fraction 1 of WIS.

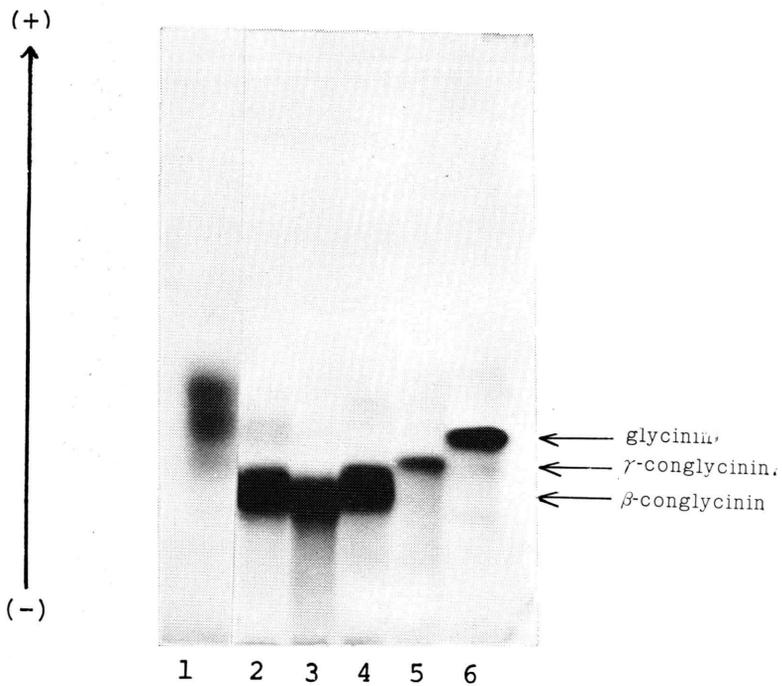


Fig. 5 Slab-Gel Electrophoretic Patterns of Adsorbed Fractions to Con A-Sepharose 4B

The slab-gel electrophoresis was carried out for 16 hrs at 125v on 4-30% gradient gel with 0.1M Tris-borate buffer containing 2 mM Na₂-EDTA(pH 7.2). slot 1: adsorbed fraction in fraction 3 of FE; slot 2: adsorbed fraction in fraction 1 of FE; slot 3: adsorbed fraction in fraction 2 of FD; slot 4: β-conglycinin; slot 5: γ-conglycinin; slot 6: glycinin.

ングリシニン量の約半分 (この量的関係は免疫化学的手法を用いて筆者らにより初めて定量した²⁾) であることから、多段階の精製操作を用いることは著しい収率の低下をもたらすことになる。これらのことから、大豆グロブリン主要成分の有効な連続的分離製法の開発が進まなかったものと思われる。そこで筆者は、これらの従来法にとらわれない新しい立場から β -および γ -コングリシニン各成分の効率的な分離精製法を試みた。その結果、酸分別沈殿法を精製操作の第 1 段階に用い、次いでゲル濾過法およびコンカナバリン A によるアフィニティークロマトグラフィーを用いた。すなわち、グリシニンは糖蛋白質ではないが、 β - および γ - コングリシニンはマンノース、グルコサミン等を側鎖に含む糖蛋白質であるので、コンカナバリン A を結合したセファロース 4B を用いて、これら 7S 蛋白質と 11S 蛋白質との分離精製は可能となる。その結果が Fig. 1~Fig. 3 の通りである。この酸分別沈殿法で得た 7 画分においては FC 画分を境いにしてグリシニン、 β - および γ - コングリシニンとが完全に分離されている (Fig. 4 および Fig. 5)。すなわち β - コングリシニンの精製は FD, FE 画分を出発材料とするとよい。 γ - コングリシニン精製の場合は WIS, FA, FB 画分を出発材料とし、次に Bio-gel A-1.5 m でゲル濾過し、WIS-1~3, FA-1~3 および FB-1~3 を回収し、これをコンカナバリン 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。この方法は γ - コングリシニンの含量が他の主要グロブリン成分のそれと較べて少ないことを考えるとき、本精製法の優れた特徴のつに挙げられるだろう。

要 約

1. β - コングリシニンの精製は FD, FE 画分を出発材料とするとよい。
2. γ - コングリシニンの精製は WIS, FA および FB 画分を出発材料とし、Bio-gel A-1.5 m でゲル濾過し、WIS-1~3, FA-1~3 および FB-1~3 を回収し、これをコンカナバリン A・セファロース 4B 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。

文 献

- 1) 宇高京子：東京家政大学研究紀要 16, 25 (1976)
- 2) 宇高京子：東京大学学位論文 (1978)
- 3) 宇高京子：東京家政大学研究紀要 19, 21 (1979)
- 4) W. J. Wolf, A. J. Sey : Arch. Biochem. Biophys., 110, 47 (1965)
- 5) 宇高京子：日本食品工業学会第23回大会発表要旨 p. 18
- 6) 深沢親房：蛋白質核酸酵素別冊「植物酵素蛋白質研究法」134 (1976)