

天然物中の有効成分の単離とその性質および応用に関する研究

The Study of Isolations, Characters and Utilizations of the Useful Components in the Natural Products

赤池 照子・佐藤 雅, 宇高 京子

卜部 澄子・松山しのぶ, 山口 功・安藤 紀子

古くから人類は天然からの産物の中の有効な成分を巧みに利用して生活に役だてていたが、近代化学の進歩はこれらを化学合成化合物に代替し、多くの公害問題や薬害をもたらしている。従って、これらの問題を解決するために、最近では改めて天然素材の利用が見直されている。本研究はこのような観点に立ち、数種の植物や昆虫に含まれる成分を単離し、あるものはその化学構造を決定し、あるものはその性質を検討し、またあるものはその有効利用に道を開こうとするものである。

赤池・佐藤らの天然色素の環境別の経時的変化に関する研究では、南米の昆虫から得られる天然色素であるコチニール（アントラキノン系色素の一種で本来は carminic acid）を鹿膠、三千本膠、調合膠などの各種展開剤に溶解し、その展開剤溶液を測定板に塗布して変退色の経時的変化の測定を行ない、その利用の際に最も安定な条件を検索しようとしている。例えば、膠の色素溶液は通常、温度と湿度によって発色状態が異なると云われているので、その測定の際に先ずそれぞれ温度の異なった環境を用意して、各種濃度の色素成分を含む展開剤溶液を紙および杉板に塗布し、フェドメーターでその変退色の経時変化を測定した。その結果から、色素・鹿膠展開剤溶液が最も安定で、次いで三千本膠であった。やはり色素濃度の低いものほど

退色が早いこと、また温度の相違、すなわち20℃と30℃程度の違いによる影響はほとんど認められなかったということである。

宇高による大豆貯蔵タンパク質の生化学的および生物に対する影響に関する研究は本研究所報告本巻に記載されているので、本稿を参照されたい。

卜部・松山らのフラボノイド系色素の生成と利用に関する研究では、ハイビスカス (*Malvaceae hibiscus* L.) の萼部分も含んだ花部に含まれている色素（色素本体はデルフィニジンとシアニジンの混合体のアントシアニンで、結合糖はキシロースと微量のガラクトース）が水溶性であり、ハイビスカスが清涼飲料やハーブ茶として世界的に愛飲されており、この人畜無害の色素をレーキ化することにより、別の用途への拡大が考えられるとして、この色素の配糖体でのレーキ化を試みた。試料のハイビスカスは中国福建省産で、色素沈殿剤として無毒なリントングステン酸、リンモリブデン酸、硫酸アルミニウムカリウム、炭酸カルシウム、塩化カルシウムなどを用いた。色素分画はアンバーライトカラムで精製し、その有効分画を凍結乾燥することにより、色素の粉末を得た。レーキ化に際して、色素と沈殿剤との溶解濃度、pH、混合方法などで微妙にレーキ化状態が異なることが判明した。その他、各種条件による生成レ

ーキの重量測定, 色相測量, レーキの顕微鏡観察などを試みた。

山口・安藤らのアロエベラ (*Aloe vera* (L.) Burm.f.) の葉肉中の有効成分の単離と化学構造の決定に関する研究では, 昭和62年夏に栃木県大田原市にある郡司農場からアロエベラの株を購入し, 葉の外部の皮をナイフで剥きとり, 葉肉ゲルのみを集めて凍結乾燥したものを試料とした。試料の一部はICP発光分析装置による含有無機イオンの測定に用い, 残りの大部分を有機溶媒の極性順に, 溶媒による抽出を行った。n-ヘキサン抽出分画中から白色針状結晶を得, これを β -シトステロールであると同定した。他の油状のn-ヘキサン分画についてはカラムによる分画精製ができなかったため, Gas-Msによる分離同定を試みた結果, 直鎖状炭化水素の数種を同定することができた。以下, 他の有機溶媒で抽出し得た試料について, 明らかになりしだい順次, 発表して行く所存である。

上記で紹介した各研究者はそれぞれ異なる試料を取り扱ってはいるが, 目的とするところは皆同じである。すなわち, それからの試料に何か有用な成分が含まれていないかどうか, また試料に含まれている成分の中で, 利用方法を工夫することによって, 何か新しい用途がひらけないかどうかを鋭意研究しているのであって, 今後の発展が期待される(山口記)。

1 大豆貯蔵蛋白質の生化学的および生物に対する影響に関する基礎的研究

(1)発芽大豆の経時的变化に伴う大豆貯蔵蛋白質の変化

研究分担者 宇高 京子

1. 緒言

種子は形態的に未分化な状態にあり生理的に極めて活性の低い固体であるが, いったん休眠が解除されると休眠器官内部の代謝系が活発化し胚が発育できうる状態におかれる。さらに光, 水, 温度, ガス, pHなど外的条件に影響されながらも, さらに成長を続け, ついに「幼根が種皮を破る」という形態的な現象を最終過程として, それに先立って起こる一連の細胞内生理生化学的变化を一般に「発芽」という。このように休眠および発芽は, 生体内における遺伝的機構にくみこまれた高位の制御によってもたらされた特殊な生理状態にあると考えられる。したがって大豆貯蔵蛋白質の分解はまさに, この発芽過程を進める上での第一段階であり中でも蛋白顆粒 (protein bodies) の分解は劇的であり, 発芽後8日目まで全く蛋白顆粒は認められなくなる。従来から宇高らは発芽過程での第一段階であるこの異化作用 (catabolism) に関与するプロテアーゼと蛋白顆粒内蛋白質との関連に重点をおいて検討している。そこで本論文では発芽時の大豆貯蔵蛋白質の変化についての基礎的実験結果を得たので報告する。

2. 実験方法

1 試料の調製

大豆種子 (ボンミノリ種, 遺伝子型IIa, 早生) は低温保存2年以内のものをを用い, いわゆる石豆は避ける。大豆乾燥種子を1%洗剤で洗った後, 70%エタノール中で30秒, 次に5%晒し粉液に浸漬し, これを滅菌水で十分に晒し粉液を洗い流した後, 滅菌シャーレー上で滅菌水を

浸みこませたガーゼを置き、20°Cの恒温室に放置し発芽さす。試料採取は0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12日目に各々行い以下の実験に供した。

2 発芽各時期からの蛋白質の抽出

発芽大豆を各日ごとに20粒づつとり胚軸および幼根を取り除いた後、1.0M-食塩を含む0.01M-バルビタール緩衝液15mlを加え、Ultra-Turrax ホモゲナイザーで3分間摩砕する(4°C)、次に日立高速冷却遠心機で15000rpm、20分間遠心し上澄液を試料として用いた。

3 デイスク電気泳動法¹⁾

7.5%濃度ゲル、トリス-グリシン緩衝液、電圧125Vでブロムフェノールブルー(BPB)の青色が消失するまで電気泳動する。1%アミノブラック10Bで1時間染色、7%酢酸で脱色する。

4 スラブ電気泳動法²⁾

4%~30%の濃度勾配アクリルアミドゲル、トリス-ホウ酸緩衝液、電圧70Vで30分泳動後、電圧125Vで約16時間泳動する。染色、脱色は上記と同様に行う。

³⁾
5 SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法
10%濃度ゲル、リン酸ナトリウム緩衝液、BPBの青色が消失するまで電気泳動する。染色、脱色は上記と同様に行う。

6 酢酸酸性尿素ゲル電気泳動法

(1)アクリルアミド80g, ビスアクリルアミド0.4g, 尿素36gを純水で100mlとする。(2)氷酢酸43ml, NNN'-テトラメチルエチレンジアミン4ml, 尿素36gを純水で100mlとする。(3)過硫酸アンモニウム0.14g, 尿素36gを純水で100mlとする。次に上記の(1):(2):(3)を2:1:5の割合でよく混和しゲルカラム(5×70mm)に注入し重合さす。試料は50°C, 2時間

保温しよく尿素変性させておく、0.1M-酢酸泳動用緩衝液を用いる。90Vで30分間、次に150Vで約2時間電気泳動する。染色、脱色は前述と同様に行う。

7 セファロース4B抗体カラム(immunoabsorbent)による発芽各時期からのグリシニンフラグメントの分離

グリシニンに対する抗体を不溶化し発芽各時期から抗原フラグメントを回収しプロテアーゼによる分離過程を明らかにすることを目的として免疫吸着剤の調製を行った。従来、不溶化抗体の担体としてポリアミノポリスチレン、プロモアセチルセルロースなどが用いられていたが、いずれも非特異的吸着が多く、かつ、吸着容量も低いため良い担体とは言えないので、Axenらの方法⁴⁾⁵⁾を用いた。

7-1 準備操作

市販 BrCN-セファロース4Bの40mlを0.1M-炭酸水素ナトリウム1ℓで洗浄する。ウサギ抗グリシニン抗体(γ-グロブリン画分)12mgを0.1M-炭酸水素ナトリウム(0.15M食塩を含む)100mlに溶かし、苛性ソーダpH9.5~10.0に調製した溶液中に上記のBrCN-セファロース4Bを加え、室温で16時間振とうしたのち濾過した。次に、1M-食塩を含む上記緩衝液50mlに懸濁し室温で30分振とうした後、濾過し得られた吸着体を更に1M-食塩を含む緩衝液50ml, ついで水200mlで洗浄後使用した。この抗体カラムに正常血清のγ-グロブリン画分(20mg/ml)を10ml流した後、1.0M食塩を含む0.02M-バルビタール緩衝液(pH8.0)200mlで洗浄した後、1M-酢酸50mlで洗い、直ちに上記バルビタール緩衝液で平衡化した。

7-2 分離操作

カラム(12×500mm)につめ、上記バルビタール緩衝液で充分平衡化した後、同じ緩衝液に対

して12時間透析した試料を乗せカラムクロマトグラフィーを行った。吸着画分の溶出は1M-酢酸によった。カラムの流速は出来るだけ遅くした。(1 ml/5 min)。

8 免疫吸着剤により分離したグリシニンフラグメントの補体結合反応による特異性解析

抗原と抗体を反応させた時、両者が対応していれば抗原抗体反応がおこる、この結果を定量的に測定する方法として定量沈降反応法などがあるが、使用抗原が微量の場合は不適である。この様な場合の定量的解析法の一つが、本研究で用いた補体結合反応である。

抗原抗体結合物が補体を結合するという特性を利用することにより、抗原と抗体を判定する方法である。反応系(抗原と抗体)に補体を加え、この補体が消失するか否かを、さらに溶血系(赤血球と溶血素)を加えることによって逆に抗原と抗体が対応していたか否かを判定するのである。すなわち溶血反応が起きなかったとすれば、それは遊離の補体がなかったことであり、従って抗原と抗体は対応していたものと判定される。また溶血反応が起きたならば遊離の補体があったことであり抗原と抗体は対応していなかったと判定される。本反応を模式的に示したのが Fig. 4 である。

補体結合反応には、抗原、抗体、補体、赤血球及び溶血素の5つの反応因子が関与する。以下用いた各因子について述べる。

8-1 抗原

グリシニン分子と免疫吸着剤ならびディスク電気泳動法により分離したグリシニン抗原フラグメント、B1およびB2成分

8-2 抗血清

抗グリシニン抗血清を各々その抗補体作用を除くため56°C30分間加温し非動化して用いた。

8-3 補体

若く健康なモルモット3匹から各々心臓穿刺により約5mlの採血をし、氷室に2~3時間、静置し分離した血清を用いた。血清は0.2mlづつ分注後、密栓し、ドライアイス-アセトンで凍結後冷凍庫に保存した。一度溶解し用いた血清の残りは捨てた。また補体血清の希釈は0.015M-硫酸マグネシウム0.01M-塩化カルシウムを含む0.01M-トリス-塩酸生理食塩水(pH7.4)を用いて行った。

8-4 ヒツジ血球浮遊液

ヒツジのけい動脈より50mlの部分採血を行った。この血液を上記生理食塩水に10%の割合でクエン酸ナトリウムを溶かし、その1.5mlに0.1mlのホルマリンを混和し冷蔵庫に保存した。使用時はこの血液に2~3倍の生理食塩水を加え、よく混和し、遠心沈澱した。上清は捨て沈澱に2~3倍の0.015M-硫酸マグネシウム、0.01M塩化カルシウムを含む0.01M-トリス塩酸生理食塩水(pH7.4)を加え、再遠心した。この操作を3回繰り返した。最後に血球量2.5mlに97.5mlの上記トリス-塩酸生理食塩水を加えよく混和し、2.5%血球浮遊液とした。

8-5 溶血素(hemolysin)

溶血素は Rabbit Anti-Sheep Erythrocyte Stroma Serum (N.B.C.製の凍結乾燥粉末)を用いた。すなわち上記市販 Hemolysin 粉末にトリス-塩酸食塩水を加え溶解し、Levine and Vunakis 法を用いた。

8-5-1 溶血素単位の測定

前記市販抗ヒツジ溶血素をトリス-塩酸食塩水で100倍に希釈後、その0.2mlをとり希釈度100~5000までの段階的希釈液を作った。これら溶血素各希釈液0.25mlを各試験管にとり、それに2.5%ヒツジ血球浮遊液0.25mlを加えてよく混和し、血球感作のため10分間室温に放置した後、各試験管に1:30の補体希釈液0.5mlとト

リス塩酸食塩水0.5mlとを加え混和し、38℃、30分間恒温槽中で保温した。完全溶血を示す溶血素の希釈倍数を1単位として、その2単位を補体、抗原単位の測定、本試験に用いた。

8-5-2 補体単位の測定

補体をトリス-塩酸食塩水で30倍に希釈し、各試験管に段階的に希釈した補体を入れ、0.25ml抗体（本試験に用いる濃度）を加え、更に上記希釈液を加えて1.0mlとする。これに感作血球液0.5mlを加え、混和し、38℃、30分間恒温槽中で保温した。完全溶血を示す補体の希釈倍数を1単位とし、本試験には2単位を用いた。感作血球液は2.5%血球浮遊液と2単位溶血素希釈液0.25mlとを等量よく混和し、冷蔵庫中で一夜反応させて用いた。

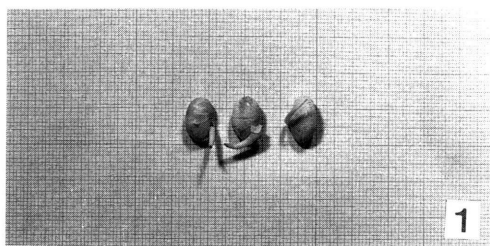
8-6 補体結合反応試験

各列8本ずつ9列の小試験管を用意した。第1列の全試験管に1:8希釈抗血清0.25ml、第2列には1:16希釈抗血清0.25ml、以下最後の列を残して順次2倍希釈抗血清を0.25mlずつ加える。最後の列には硫酸マグネシウム、塩化カルシウムを含むトリス塩酸生理食塩水を0.25mlずつ加えて抗原の抗補体作用をみる対照とした。また、各列の第1管に抗原原液、第2管に1:2希釈抗原、以下順次第7管まで2倍希釈した抗原を0.25mlずつ加えた。抗原は前もって希釈しておいた(7.2/μg蛋白/0.25ml)。第8管は上記生理食塩水を0.25mlずつ加えて血清の抗補体作用をみる対照とした。次に全試験管に0.5mlずつの補体(2単位)を加え、よく混和し、5~8℃の冷蔵庫で17時間反応させた。その後全試験管に感作血球液0.5mlを加えた。38℃、1時間反応後、波長413nmで吸光度を測定した。得た値を完全溶血の値から差し引いた値、すなわち完全溶血価に対する百分率を抗原の溶血阻止率として表す。

3. 実験結果と考察

Fig. Iは大豆種子の発芽各過程を示した。本実験条件下では浸漬後24時間で発芽しはじめる(1-1)。発芽6日目から根毛の発達が著しく(1-5)、8日目から上胚軸の伸びが始まる(1-6)。

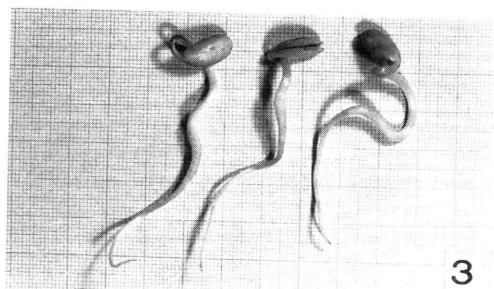
Fig. 1 Morphological Aspect of Soybean Seed during Germination



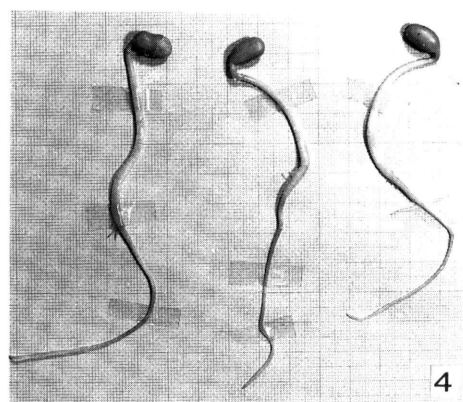
1-1. 1Day during Germination



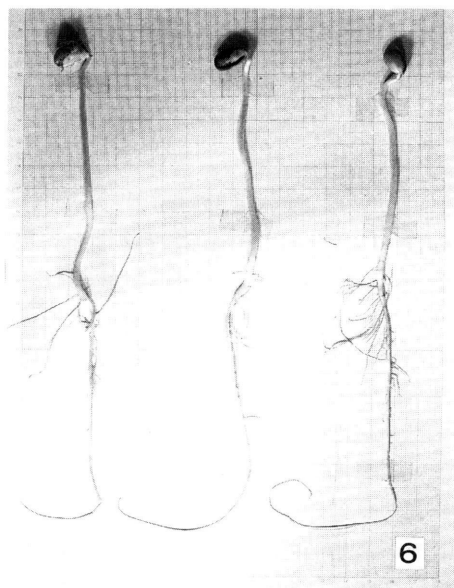
1-2. 2Days during Germination



1-3. 3Days during Germination



1-4. 4Days during Germination

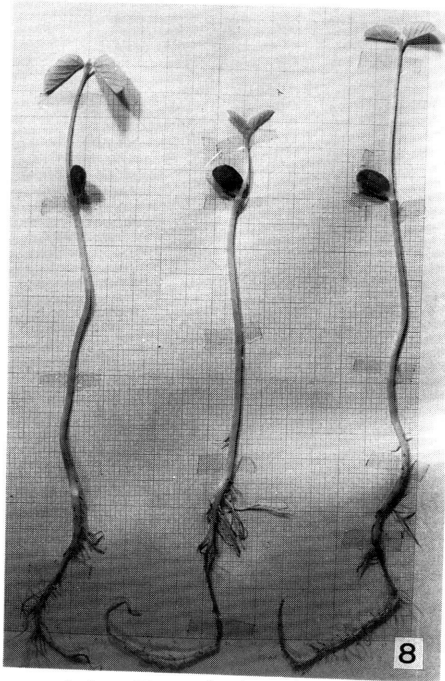


1-5. 6Days during Germination

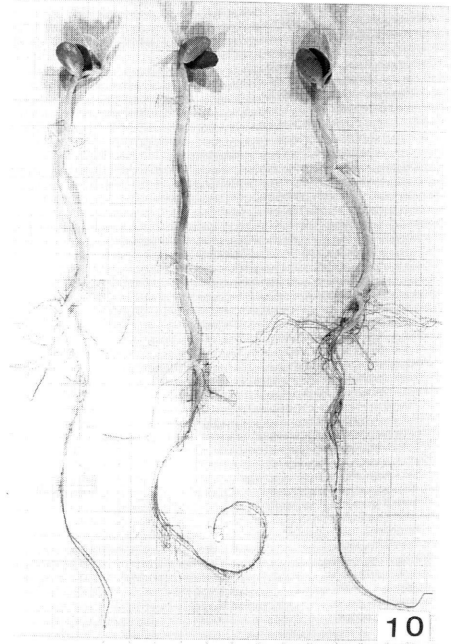
Fig・2 は大豆種子の発芽各時期における蛋白質の変化とディスク電気泳動像で比較した。高分子画分(蛋白分子量約30万以上)は発芽3日目を境に急激に分解され、14日目で完全に分解された。Fig・3 は大豆種子の発芽各時期における蛋白質の変化をスラブゲル電気泳動像で比較した。11S蛋白質は発芽2〜3日目頃より分解が始まり一方7S蛋白質は発芽2日目頃より急速に変化がみられ7日目以内で、ほとんど見られなくなった。Fig・4 は大豆種子の発芽各時期の蛋白質とくに、酸性サブユニットおよび塩基性サブユニットの変化をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動像で比較した。発芽3〜4日目から7S蛋白質の分解が始まり6日目ではほとんど見られなくなる。また11S蛋白質の酸性サブユニットは4日目よりみうけられ6日目より顕著に現われて、7、8、9日目とその

まま続いている。塩基性サブユニットは3日目から移動度が大きくなるが、そのままの状態でも9日目に至っても、そのバンドはそのまま見受けられた。Fig・5 は大豆種子の発芽各時期の酸性サブユニットおよび塩基性サブユニットの変化を酢酸酸性尿素ゲル電気泳動像で比較した。発芽4日目から7S蛋白質の分解が認められ、8日目から消えはじめ、9日目ではほとんど見られなくなった。11S蛋白質は4日目から分解が認められ塩基性サブユニットはそのままであるが酸性サブユニットは急速に分解しはじめた。発芽8日目〜9日目あたりから塩基性サブユニットも変化が現われた。

以上これらの変化を大豆種子の形態的变化からみると、発芽5日目前後は胚軸および根毛が形成される時期であり、発芽8日目では上脛軸が急速に伸長しはじめる時期であり、これら内



1-6. 8Days during Germination



1-7. 10Days during Germination

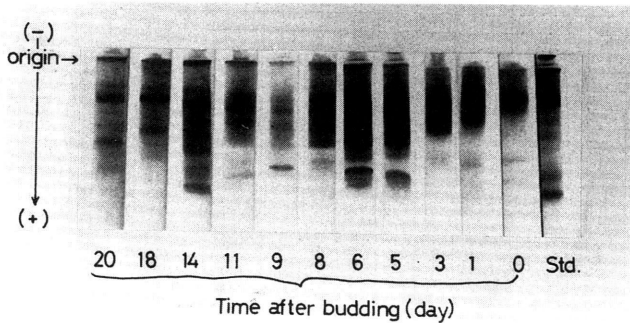


Fig. 2 Comparative Disc Electrophoretic Pterns of Soybean Proteins during Germination

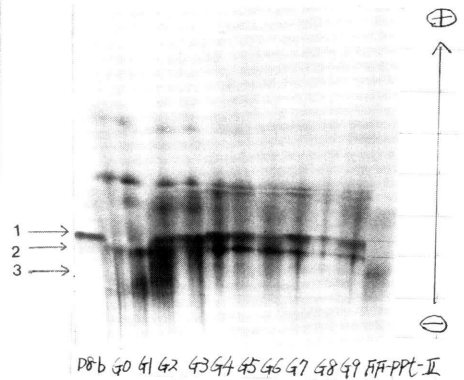


Fig. 3 Gradient Slab-Gel Electrophoretic Patterns of Soybean Proteins during Germination
1. Residue of 11S-Protein
2. 11S-Protein
3. 7S-Protein

部の蛋白質の変化と大豆種子の形態的变化とは一致した。そこで、11S蛋白質(グリシニン)の分解過程をより詳しく知るために発芽各時期から抗グリシニン抗体と反応性を持つ、ポリペプチド(グリシニン抗原フラグメント)の分離を免疫吸着剤を用いて行った。Fig. 7-(A)に示したようにグリシニン抗体結合セファローズ4Bカラムに発芽各時期から抽出した全可溶性蛋

白画分をアフィニティークロマトグラフィーで分画した。抗グリシニン抗体と反応しない成分および overload した抗原はすべて始めのピーク(素通り画分)に溶出される。一方、抗体と結合した抗原活性成分は1M-酢酸で溶出された。溶出区分を集め再アフィニティークロマ

Fig. 4 Complement Fixation Procedures

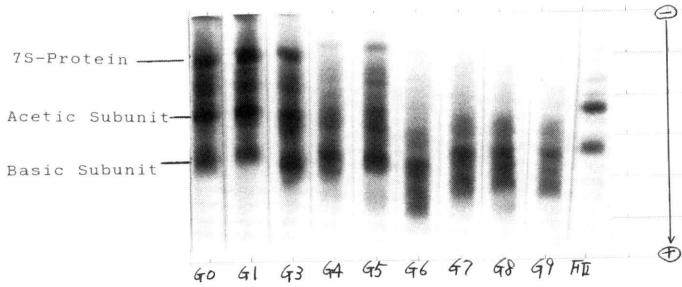
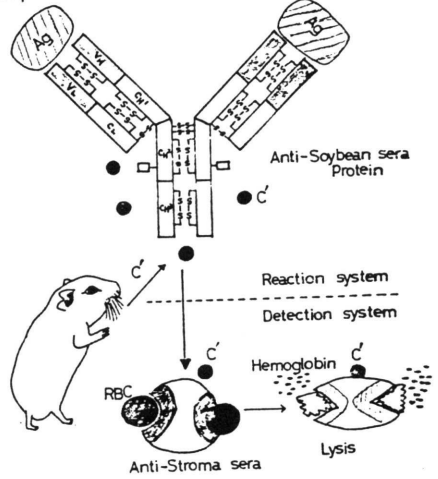


Fig.5 SDS-Electrophoretic Patterns of Soybean Proteins Subunits during Germination

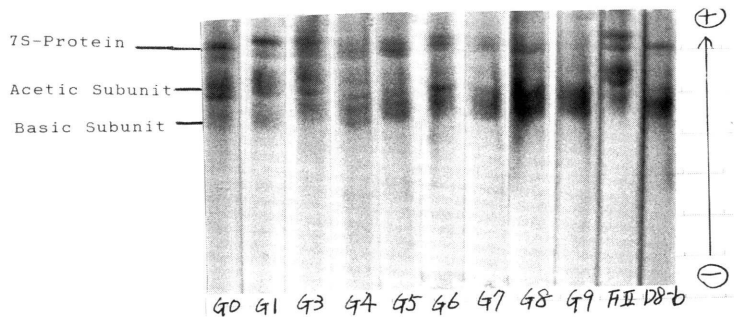


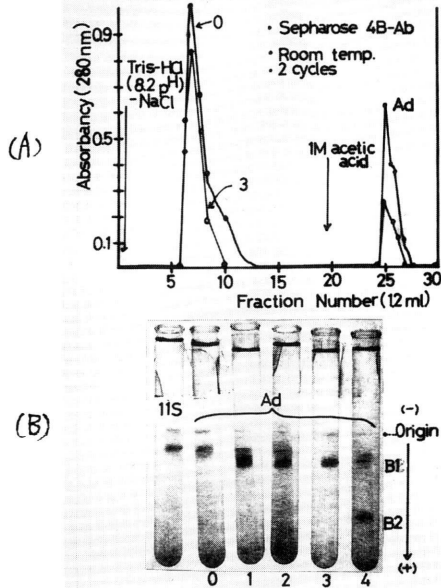
Fig.6 Acetic Acid-Electrophoretic Patterns of Soybean Proteins Subunits during Germination

ドグラフィーを行い精製し、濃縮した後、Fig. 7-(B)に示したディスク電気泳動像でその成分を比較した。その結果、発芽2日目の抗原成分は標準グリシニン成分と同じ移動度のものとやや早い成分とに分けることが出来た。この現象は発芽3日目も同様であった。発芽4日目以降になると抗原成分は2つのバンドに分かれた。1つは発芽3日目で認められた成分であり、もう1つの成分はより移動度の大きな成分であった。以上の結果からグリシニン成分(11S蛋白質)の分解は発芽の初期(発芽3~4日目まで)と中期(発芽4~6日目まで)で異なることが示された。すなわち、発芽3~4日目(初期)まではグリシニン成分はエキソ型に分解され、

発芽4~5日目(中期)以降はさらにエンド型に分解され、より急速に抗原性を失っていくものと考えられる。また、もう一方の7S蛋白質(コングリシニン)の分解は発芽の初期頃からはじまり発芽8日目前後では全く認められなくなった。

文献

Fig. 7 Isolation of Soybean 11S-Protein Fraction by Using Ab(11S)-Column



- (1) D.E.Williams, R.A.Reisfeld ; Ann. New York Acad. Sci., 121, part 2, 373, (1964)
- (2) 宇高 京子 ; 東京家政大学研究紀要 20(2), (1980)
- (3) U.K.Laemmli ; Nature (London) 227, 680, (1970)
- (4) R. Axen, J. Porath, S. Ernback ; Nature, 214, 1302, (1967)
- (5) J. Porath, R. Axen, S. Ernback ; Nature, 215, 1491, (1967)
- (6) L. Levine and H.V.Vunakis ; Methods in Engymology (ed C.H.W.Hirs) 11, 928, Academic Press New York (1967)