米胚芽 γ グロブリンの熱変性

堀越 昌子*, 上杉 外勢*, 林 宏子*, 森田 雄平**

* 滋賀大学教育学部家政科 ** 京都大学食糧科学研究所

Heat Denaturation of γ Globulin of Rice Embryo

Masako Horikoshi*, Tose Uesugi*, Hiroko Hayashi*, Yuhei Morita**

*Faculty of Education, Shiga University, Otsu-shi, Shiga

**Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji-shi, Kyoto

J. Jap. Soc. Food and Nutr., 25 (7), 561~564 (1972)

The denaturation of γ globulin of rice embryo by heating was investigated. The viscosity of γ globulin from rice embryo increased markedly by heating the solution at 80°C for 30 min. By heating at 100°C for 30 min, gelation was observed. Accompanying with the increase in the viscosity, the detectable sulfhydryl groups of γ globulin increased markedly. The process apparently exhibited two steps. In comparison with heat denaturation, the effect of urea at room temperature was found to be milder and the conformation change appeared to be reversible.

Calcium ions stimulated heat denaturation and gelation of γ globulin solution. By heat-treatment at 70°C for 30 min with calcium ion, the viscosity and sulfhydryl groups of γ globulin rapidly increased. At 80°C with calcium ion, the change of the exposed sulfhydryl groups appeared within 3 min, and the protein partially precipitated.

These facts suggest that the heat denaturation was more drastic and irreversible, and the structural change of the protein should involve the unfolding of the peptide chains as well as the destruction of the subunit dissociation.

(Received May 27, 1972)

米穀粒中には、アルブミン、グロブリン、プロラミンおよびグルテリンのたん白質が含まれている。これらのうちグロブリンは糠および胚芽に多く含有されており、超遠心的に $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ の4種に区別できる¹⁾。7Sの沈降係数をもつ γ グロブリンは胚芽や糠の部分に多く、とくに胚芽グロブリンの80%を占め、生化学、植物生理学上で興味あるたん白質であるばかりでなく、米たん白質の高度利用の観点からみても重要な研究対象であろう。

このたん白質は沢井、森田²⁾の研究によって $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$ グロブリンの3成分から構成されていることが明らかにされ、とくに γ_1, γ_3 グロブリンについてはその物理化学的性質や化学組成、高次構造などが明らかにされた^{3)~6)}。

本報では米たん白質の高度利用開発を目的として、米胚芽 γ グロブリンの加熱および尿素による変性現象、およびこれに及ぼすカルシウムイオンの影響を検討し、変性に伴う γ グロブリンの構造変化を考察した。

実験方法

1. 材料

米胚芽 γ グロブリンは、沢井、森田²⁾の方法に従い、1970年度産米胚芽から調製した。すなわち米胚芽の抽出液から水透析によりグロブリン画分を調製し、このうちの0.27M塩化ナトリウム溶液可溶画分からセファデックスG-200によるゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した。このものは組成分として約等量の γ_1, γ_2 グロブリンを含有している。

実験にはとくに記載しない限り0.8M塩化ナトリウムを含有する0.08Mリン酸塩緩衝液(pH 6.84)に溶解した γ グロブリン溶液を使用した。たん白質濃度は銅Folin法と280m μ での吸光度測定法とを組み合わせで行ない、 γ グロブリンの280m μ での吸光係数、 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 280m μ は7.2の値を用いた。

* 〒520 滋賀県大津市石山平津町 197

** 〒611 京都府宇治市五ヶ庄

2. 粘度測定

Ubbelohde 粘度計を使用し、 $20^{\circ}\text{C} \pm 0.01^{\circ}\text{C}$ で粘度を測定した。0.8 M 塩化ナトリウム-0.08 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.84) 2 ml が流下する時間は 126.5 秒であった。

3. スルフヒドリル基 (SH 基) の定量

Ellman⁷⁾ の方法に従い、たん白質溶液に 5,5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸) 試薬を加え、2 分後に 412 m μ の吸光度を測定した。定量には pH 8.0 での分子吸光係数、 $\epsilon=13,600$ の値を使用した。なお尿素はスルフヒドリル基の定量を妨害しないので尿素を除かず測定した。

実験結果

1. 加熱処理による比粘度と SH 基の変化

γ グロブリンの 0.5, 1.0, 1.5, 2.0% 溶液をそれぞれ 20, 40, 60, 70, 80, 100 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間処理したのち粘度を測定した。その結果の一部を Fig. 1 に示した。

この図から γ グロブリンの粘度は、80 $^{\circ}\text{C}$ 30 分間加熱処理のとき急激に増加していることがわかる。100 $^{\circ}\text{C}$ 加熱処理では、たん白質溶液は半透明ゼラチン状のゲル化をおこす。たん白質濃度が高いほど粘度の増加率は高く 1.5%, 2.0% 溶液では 80 $^{\circ}\text{C}$ 処理で一部沈殿が生成した。

これらの結果から、 γ グロブリンは 80 $^{\circ}\text{C}$ 加熱処理で急速な変性にともない粘度増加を起こしていることがわかるが、これは分子内の水素結合、静電結合などで保持された高次構造が熱運動により破壊され、たん白質分子の伸張を引き起こすためであると考えられる。またたん白質濃度が高いほど粘度増加率が高く、不溶化しやすいのは、伸張したたん白質分子の相互作用がより起こりや

Fig. 1. Specific viscosity of γ globulin solution after heat-treatment for 30 min.

Protein concentration: $\circ$ -0.5%, $\times$ -1.5%, $\bullet$ -1.0%, Δ -2.0%

Viscosity measurements were carried out with an Ubbelohde viscometer having the flow time of 126.5 seconds with 2 ml of 0.08 M phosphate buffer containing 0.8 M sodium chloride (pH 6.84) at $20 \pm 0.01^{\circ}\text{C}$.

Fig. 2. Changes in amount of SH groups of γ globulin after heat-treatment.

Protein concentration: 0.05%

Heat-treatment: Δ -40 $^{\circ}\text{C}$, $\circ$ -70 $^{\circ}\text{C}$, $\times$ -60 $^{\circ}\text{C}$, $\bullet$ -80 $^{\circ}\text{C}$

The DTNB reagent (0.025 ml) was added to 3 ml of γ globulin solution (pH 8.0) and the absorbance at 412 m μ was measured after 2 min. Results were expressed as moles (SH) using the molecular extinction coefficient (13,600/M/cm).

すいためであろう。さらに 100 $^{\circ}\text{C}$ 処理でのゲル化は高温で急速に伸張したたん白質分子が相互に網目状の会合を起こしたためと考えられる。

このような γ グロブリンの熱変性は検出される SH 基数の変化からも追跡できる。Fig. 2 は 0.05% γ グロブリンについて加熱処理を行ない、検出される SH 基数を経時的に追跡した実験結果を示してある。

すなわち 80 $^{\circ}\text{C}$ 加熱処理で分子内部にうずまっていた SH 基が、急速に分子表面にあらわれており、この現象は加熱処理による粘度の上昇現象とよく一致している。経時的には SH 基の露出は 80 $^{\circ}\text{C}$ 加熱 0~10 分、10~30 分の 2 段階で起こっており、1 段階目で 85% が、あとの 15% は 2 段階目で分子表面にあらわれている。

なお比較のために、各種濃度の尿素共存下で検出できる SH 基数の経時変化を測定した結果を Fig. 3 に示した。図より γ グロブリンは 4 M 尿素濃度では徐々に SH 基数が増加するのに対し、6 M 以上の尿素濃度では最初の 1~2 分間で急激に増加し、ついでわずかに減少することがわかる。この場合に出現する SH 基数は 80 $^{\circ}\text{C}$ 加熱処理の場合の約半量である。また 6 M, 8 M 尿素濃度で 20 分間処理した γ グロブリン溶液を 0.8 M 塩化ナトリウム-0.03 M リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) に対して一夜透析して尿素を除き SH 基数を調べてみると、尿素添加前の SH 基数と一致していた。

これらの事実は、 γ グロブリンの分子構造は尿素では完全には破壊されず、かつ変性は可逆的であるのに対し 80 $^{\circ}\text{C}$ 加熱処理では分子構造が修復のきかないほど破壊され、不可逆的な変性をうけることを示唆している。

Fig. 3. Changes in amount of SH groups of γ globulin after urea-treatment.

Protein concentration : 0.05%

Urea concentration : Δ -2 M, $\circ$ -6 M, $\times$ -4 M, $\bullet$ -8 M

2. 加熱変性におよぼすカルシウムイオンの影響

γ グロブリンの熱変性現象が、カルシウムイオンの存在でどのように影響されるかを調べた結果の一部を示すと Fig. 4 のとおりである。実験はたん白質濃度 0.5%, カルシウムイオン濃度 1, 10, 100 mM で行なった。

この図から、 γ グロブリンの粘度はカルシウムイオンが存在すると、70°C 30 分間加熱処理で急激な上昇を起していることがわかる。またカルシウムイオンが多いほど粘度上昇は著しく、カルシウムイオン 100 mM 80°C 処理では、ゲル化をおこし、1, 10 mM の場合でも一部不溶化をおこした。カルシウムイオンにより粘度上昇、ゲル化が促進されるのは γ グロブリン分子内のカルボキシル基や水酸基とカルシウムイオンが結合することによって加熱処理による unfolding の平衡を、分子を変性させる方向にずらし、つぎつぎ伸張した分子間で会合をお

Fig. 4. Specific viscosity of γ globulin solution after heat-treatment for 30 min with calcium ion.

Protein concentration : 0.5%

Calcium ion concentration : $\circ$ -1 mM, $\bullet$ -10 mM, $\times$ -100 mM

Fig. 5. Changes in amount of SH groups of γ globulin after heat-treatment with calcium ion.

Protein concentration : 0.05%

Calcium ion concentration : 10 mM

Heat-treatment : $\times$ -60°C, $\circ$ -70°C, $\bullet$ -80°C

こしていくからと考えられる。

このようなカルシウムイオンの効果は S H 基出現数を追跡しても明らかに認められる。Fig. 5 に示すとおり、 γ グロブリンの分子内 S H 基はカルシウムイオン 10 mM 存在下では、70°C 加熱処理ですでに分子表面にあらわれるが、これはカルシウムイオンが存在しないときの 80°C 加熱処理にほぼ相当している。カルシウムイオン存在下での 80°C 加熱では最初の 3 分間で急速に S H 基が分子表面にあらわれ、それ以上の加熱では不溶化が起こった。これらの結果はカルシウムイオン存在下の粘度上昇現象とよく一致しておりカルシウムイオンは γ グロブリンの熱変性を促進させる効果をもつことを示している。

考 察

本報告の実験成績は、米胚芽 γ グロブリンが溶液中で 80°C 30 分加熱処理により変性をうけ、これに伴って溶液の粘度をまし、また検出される S H 基の量が著しく増大することを示した。尿素変性との比較を行なった結果では、熱変性の方がはるかに大きい構造変化を伴いつつ不可逆であることが特徴である。

さきに沢井、森田⁴⁾は精製した γ_1 グロブリンの尿素変性を超遠心分析、紫外領域での差吸収スペクトル測定、S H 基滴定、ポリアクリルアミド電気泳動法などを用いて詳細に研究した結果、種々の物性は尿素溶液約 4 M に変移点を持ち、これが主として四次構造の破壊すなわち subunit への解離に伴う現象であることを明らかにするとともに S H 基、カルボキシル基および疎水結合が高次構造維持に重要な役割を果たしていることを示唆した。しかしながらこのような尿素変性は、分子の大きさや S H 基滴定数からみる限りでは可逆的である。これに対して尿素よりもさらに強力な変性剤塩酸グアニジンの作用

は、 γ グロブリンのより大きな構造変化をもたらし、しかもこの変化は2段階であってかつ不可逆的である。今回報告した加熱処理による変性もこれに似て構造変化が大きくまた不可逆的である。これは塩酸グアニジンや加熱処理が、四次構造の破壊ばかりでなく二次、三次構造の大きな変化を伴い、しかもある中間段階を経て天然のものとは違った準安定構造に移転するのであろう。

これは尿素変性の場合には主として疎水結合の破壊をもたらすのに対し、加熱変性では水素結合やイオン結合の破壊が主であり、熱運動によってこれらの不安定な結合が破られ伸張した分子またはサブユニットが新たな疎水結合を形成して、天然とは違ったある準安定な構造を形成するのであろう。新たな結合は、たん白質濃度が低いときには主として分子内部で起こるのに対し、たん白質濃度が高いときには相互に凝集して不溶化を起こす。

また100°C処理のようにきわめて急速な変性の場合には、分子間の不安定な結合が優先してゲル化を起こすものと考えられる。もちろん好気的な条件下で長い間にわたる処理をすれば分子間にS-S結合を生じて不溶化、またはゲル化が促進されるのはいうまでもない。

沢井、森田⁴⁾が尿素変性において水素イオン濃度によって促進されることを示したこと、および今回の実験でカルシウムイオンが熱変性を促進することは、いずれも γ グロブリン分子中の陰性荷電の減少と変性促進との関連性を示唆している。これはイオン結合の破壊や解離したカルボキシル基と水酸基との間の水素結合の破壊が分子構造変化を促進することを示している。どのような結合がどの程度分子構造の保持に寄与しているかは、さらに詳細な熱力学的研究にまたねばならない。

いずれにしても本実験に示した γ グロブリンの特性は比較的希薄な溶液についての成績であるけれども、これらの特性は未変性の成分たん白質 γ_1 、 γ_2 、 γ_3 グロブリンの特性とともに、大豆グロブリン7Sおよび11S成分たん白質の特性と、きわめて類似していることがわかる⁸⁾。 γ グロブリンの高度利用を目的とする場合は、大豆たん白質について得られているような高濃度での変性現象^{9)~11)}や凍結¹²⁾¹³⁾、乾燥¹⁴⁾に伴う物性変化に関する重要な問題であるので、今後大豆たん白質と比較しながらこれらの問題を研究する予定である。

要 約

1) 米胚芽 γ グロブリン溶液の粘度は80°C 30分間の加熱処理で急激に増加し、1.5%以上の濃度では一部不溶化する。100°C加熱処理では、 γ グロブリン溶液は不可逆的なゲル化をおこす。

2) γ グロブリンの分子内部のS-H基は、80°C加熱処理で急速に分子表面にあらわれる。その反応は最初の10

分間で85%まですみ、あとの15%はその後の20分間で分子表面にあらわれる。

3) γ グロブリンの尿素変性では、分子内のS-H基は尿素濃度6Mで最初の3分間に、8M濃度では1分間に分子表面に現われ、その後徐々に減少する。加熱変性の場合と比べると分子表面にあらわれるS-H基数は最大限で約半数であり尿素を除いたあとのS-H基は減少する。

4) カルシウムイオンが存在すると、 γ グロブリン溶液の粘度は、70°C 30分間加熱処理で顕著に上昇する。カルシウムイオンは多いほど粘度上昇は著しく、1, 10 mMカルシウム濃度で80°Cに加熱すると一部不溶化し、100 mMの濃度ではゲル化を起こす。

5) カルシウムイオンが存在するときの γ グロブリン内部のS-H基は、70°C加熱処理で分子表面にあらわれる。これはカルシウムイオンがないときの80°C加熱処理にほぼ相当する。カルシウムイオン存在下の80°C加熱では最初の3分間で急速にS-H基が分子表面にあらわれ、それ以上の加熱では一部不溶化する。

本研究にあたり、材料を提供された大倉酒造および有益な助言をいただいた藤沢薬品工業株式会社沢井秀樹博士に深く感謝する。

文 献

- 1) Morita, Y. and Yoshida, C.: *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 664 (1968)
- 2) Sawai, H. and Morita, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 53 (1970)
- 3) Sawai, H. and Morita, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 61 (1970)
- 4) Sawai, H. and Morita, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 771 (1970)
- 5) Morita, Y., Sawai, H., Hamaguchi, K. and Ikeda, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1231 (1971)
- 6) Morita, Y. and Horikoshi, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 651 (1972)
- 7) Ellman, G. L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70 (1959)
- 8) Wolf, W. J. and Tamura, T.: *Cereal Chem.*, **46**, 331 (1969)
- 9) Catsimpoalas, N. and Meyer, E. W.: *Cereal Chem.*, **47**, 559 (1970)
- 10) Catsimpoalas, N. and Meyer, E. W.: *Cereal Chem.*, **48**, 150 (1971)
- 11) Catsimpoalas, N. and Meyer, E. W.: *Cereal Chem.*, **48**, 159 (1971)
- 12) Hashizume, K., Kakiuchi, K., Koyama, E. and Watanabe, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 449 (1971)
- 13) Saio, K., Kajikawa, M. and Watanabe, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 890 (1971)
- 14) Fukushima, D. and Buren, J. V.: *Cereal Chem.*, **47**, 687 (1970)

(昭和47年5月27日受理)