ナタネグロブリンの成分および特性について

長野 新子*, 岡本 奨**

東京農工大学農学部農芸化学科

Fractionation and Characterization of Globulin from Rapeseed

Shinko NAGANO and Susumu OKAMOTO

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Tokyo Noko University, Futyu-shi, Tokyo

Even though the defatted rapeseed contains protein more than 30% and its amino acid composition shows nutritionally excellent quality, fundamental studies on this protein have been reported not so much. The purpose of present investigation is to clarify some properties of one of the major proteins of the rapeseed, globulin.

It became clear that the globulins consisted of the three components, α , β and γ , designated in the order of increasing molecular weight. The molecular weight of the α and β components were about 23,000 and 162,000, and the sedimentation constants seemed to be 1S and 12S, respectively. It was found that a part of the globulin molecule was assumed to be composed with several subunits which were bound by disulfide bonds. The results of electrophoresis showed that the α and γ components consisted of the same subunit (M.W. about 13,000), while the β component composed of two kinds of different subunits (M.W. about 32,000 and 19,000). By the gel filtration studies, it became clear that the α and γ components showed the stable characteristics against pH change and heat treatment, while the β component was coagulated by the addition of acid (pH 4.0) and also by the heating at 80°C, and by the treatment with alkali (pH 11.5), the component was unfolded. This acid coagulated β component was not resolubilized although pH was returned. The amino acid compositions of the defatted flour and the unfractionated globulin were examined by the amino acid analyses, and, from these results, it was concluded that the amino acid compositions of these two were similar except several amino acids and these were rich in lysine (6-7 g amino acid/16 g N). It was also found by these analyses that there were remarkable differences in their amino acid compositions between acid-precipitated and supernatant of this globulin.

(Received April 22, 1976)

わが国で油糧種子として大豆について多く用いられているナタネは、その脱脂粕中に 30% 以上のたん白質を含み優秀なアミノ酸組成を持つことが知られてはいたが、甲状腺浮腫因子となる有毒成分チオグルコシドを含むことと、たん白収率の低さのために、その用途はほとんどが肥料に向けられている。ナタネたん白質に関する研究報告はわが国では乏しいが、ナタネの生産国であるカナダではおもに実際の研究が進められ、最近では品種改良により、チオグルコシドをほとんど含まない品種も栽培可能となり、もしたん白収率を高くすることができれば、新たん白源としての利用の道も開けると思われる。ナタネたん白質の基礎的性状についての報告は、Bhatty ら^{1)~3)} や Kodagada ら⁴⁾ や Girault⁵⁾ によ

てなされているが、いずれもさまざまな抽出法によって得たたん白質の特徴が報告されているに過ぎない。本研究は、一般的なたん白質の分画法より得た主要たん白質のうち、グロブリンについてその物理化学的、栄養的特徴を明らかにし、加熱等による変性についても検討を加え、それらの性質が食品としての利用におよぼす影響について考察した。

実験方法

1. 材料

ナタネは、カナダ産の *Brassica campestris* と *Brassica napus* を用いた。この丸ナタネを擂潰器ですりつぶし、石油エーテルを用いて常温で脱脂を行ない、種皮を除き種実のみを分別し、以下の実験に供した。

2. 実験方法

1) ナタネたん白質の分画 脱脂粉末を 0.4 M 塩化ナトリウム溶液で抽出して、その沈殿部を 60% エチル

* 現在、お茶の水女子大学食物化学研究施設

** 現在、昭和女子大学文家政学部

アルコールで抽出し、残渣を pH 11.0 の希アルカリで抽出し、あとは常法に従って分画した。なお、各分画のたん白質はケルダール法によって求め、たん白質換算係数は 5.53⁶⁾ を用いた。

2) グロブリンの調製 グロブリンは、0.4 M 塩化ナトリウム抽出区分を蒸留水に透析して得た。透析より生じたグロブリン沈殿は、凍結乾燥しても溶解度、ゲルろ過パターンにおいて変化がみられなかったため、試料は凍結乾燥したものをを用いた。

3) 溶解度の測定

i) 各 pH による溶解度 0.4% 前後のたん白質溶液に水酸化ナトリウム、あるいは塩酸を加えて所定の pH に調整し、常温で 3 時間攪拌した。これを遠心分離し、上澄の窒素量をケルダール法によって測定した。

ii) 加熱による溶解度 試料を pH 7.6 のリン酸緩衝液に溶解させ、所定の温度に調整した湯浴中で 30 分加熱した。水で急冷後、遠沈した上澄液の溶解度をケルダール法により調べた。

4) 焦点ゲル電気泳動 Ampholine (pH 3.5~10) を含むポリアクリルアミドゲル⁷⁾ を用いて焦点電気泳動を行なった。試料ゲルの染色は、ブロムフェノールブルーで行なった⁸⁾。尿素ゲルの場合は、金沢ら⁹⁾ の方法を参考にした。

5) ゲルろ過 セファデックス G-200 を用い、溶出溶媒は 0.005 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.6, 0.4 M 塩化ナトリウムを含む)、あるいは 1/30 M リン酸緩衝液 (pH 7.6, 塩化ナトリウムを加えて $\mu=0.4$ に調整) を用いた。また、分子量既知の標準たん白質 (Schwarz 社) を用いて分子量も求めた。

6) 超遠心分析 1/30 M リン酸緩衝液に約 1% 濃度になるようにグロブリンを溶解させ、日立 UCA-1 型超遠心分離機を用いて沈降定数を求めた。

7) ディスク電気泳動 ポリアクリルアミドゲルによるディスク電気泳動は、Ornstein¹⁰⁾ および Davis¹¹⁾ の方法に従った。尿素、2-メルカプトエタノール (以下 ME とする) で処理した試料の場合は、泳動中の再会合を防ぐためゲルに尿素を加えて調製した。

8) 差スペクトル¹²⁾ アルカリ処理試料の差スペクトルは 124 spectrophotometer を用い、同濃度の各処理たん白溶液を試料側に、未変性たん白溶液を対照側光路に置いて測定した。

9) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 サブユニットの分子量決定は、分子量既知の標準たん白質を用いて行なった¹³⁾。8 M 尿素で処理したものは 1% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、0.1% ME を含む 0.01 M リン酸緩衝液で 1 夜透析、分子量決定の場合と同様に調製した。また ME を除いて 8 M 尿素処理したものは、

Table 1. Fractionation of oil-free dehulled rapeseed flour (%).

Salt extraction	27.9	Alkali extraction	7.4
Globulin	16.3	Glutelin	7.2
Albumin	3.6	Prolamin	0.2
Nonprotein nitrogen	8.0		
Total 35.3

Fig. 1. Effect of pH on the solubility of rapeseed globulin.

1% SDS を含むリン酸緩衝液で透析し、ME を除いて上と同様に調製した。

10) アミノ酸分析 それぞれの区分を加水分解して、日立アミノ酸自動分析器 KLA-3B 型でアミノ酸分析を行なった。トリプトファンについては Scofone らの NPS 法¹⁴⁾により、NPS-Cl (2-ニトロフェニルスルフェニルクロライド) を用いて個別定量した。

実験結果

1. ナタネたん白質の組成

脱脂粉末を分画すると、Table 1 のようになった。なたねには塩抽出区分と希アルカリ抽出区分が多く、主要たん白質はグロブリンとグルテリンであった。このほかに塩抽出区分を透析する際、透析外液に非たん白態窒素が 8.0% 失われた。

2. グロブリンの溶解性におよぼす pH の影響

溶解度曲線は Fig. 1 のとおりで、pH 4 以下でも最大 45% しか不溶化せず、沈殿部分の pH を 5 以上に戻しても再溶解しなかった。なお、等電点を詳しく調べるための焦点ゲル電気泳動において、pH 5~7 付近で主要なバンドが 4 本認められた (Fig. 2)。ゲルに尿素を加えると、さらに多くのバンドがあらわれた。

Fig. 2. Isoelectric focusing patterns of rapeseed globulin on polyacrylamide gel without (1) and with urea (2).

Fig. 3. Gel filtration patterns of rapeseed globulin on a Sephadex G-200 column (2.5×100).

The full line showed the elution pattern of the native globulin. The dotted line was that of the supernatant treated at pH 3.0 and dialyzed against the elution buffer 0.005 M borate (pH 8.6) containing 0.4 M sodium chloride.

Fig. 4. Ultracentrifugal patterns of about 1% solution of rapeseed globulin. Photographs were taken at 38 min (left) and 54 min (right) after reaching a full speed of 59,600 rpm.

3. グロブリンの高次構造と変性

1) 成分組成 ゲルろ過の結果は Fig. 3 の実線に示されているように、グロブリンは3成分よりなり、これを分子量の小さい順に $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$ と呼ぶことにする。分子量は V_0 に溶出する γ が 50 万以上、 β が 162,000、 α が 23,000 であった。定速後 38 分と 54 分に撮影し

Fig. 5. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of rapeseed globulin.

Alkali-treated protein (2,3) was dialyzed against buffer before running. 5 and 6 was running on the urea gel.

た超遠心沈降図を Fig. 4 に示した。あらわれた2つの界面の沈降定数を計算すると、12S と 1S であった。回転数が約6万回転/分の場合、分子量が1万以下のたん白質は完全な界面が出現しない。この1S (Fig. 4の左図の左のピークと右図の中央のピーク) は、12Sの界面が54分で消えたあとも界面は少ししか移動せず、密度勾配はなだらかになる一方であった。したがって、1S はかなり低分子量であるといえる。また分子量20万以上のたん白質についても、回転数を6万回転/分から落さなければ、定速に達する前に界面が出てしまう。以上のこととゲルろ過より求めた分子量から考えて、1S は α 成分に、12S は β 成分に相当すると思われる。しかし、ポリアクリルアミドゲル電気泳動では、易動度の小さなブロードな1バンドしかあらわれなかった (Fig. 5 の 1)。

2) pH による変化

i) アルカリによる変化 pH 12.5 で処理後、緩衝液で透析したものをポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけると、アルカリ処理時間が長いほど原点にとどまる成分が多くなった (Fig. 5 の 2)。また、 β 成分が高分子量成分になったことが、ゲルろ過よりわかった (Fig. 6)。さらに差スペクトルでは、pH 10.5 以上で 246 nm と 297 nm に吸収があらわれ、分子表面のチロシンと溶媒の相互作用によるレッドシフトが認められるが、pH 11.5 以上になるとブルーシフトが観察され、高次構造の崩壊が起ることを示した (Fig. 7)。

ii) 酸による変化 pH 3.0 で酸沈させたあとの上澄

Fig. 6. Gel filtration patterns of rapeseed globulin treated in alkaline solution, pH 12.5, on a Sephadex G-200 column. Elution buffer was 1/30 M phosphate (pH 7.6, Ionic strength was adjusted at 0.4 with sodium chloride).

Fig. 7. Difference spectra of rapeseed globulin treated in alkaline solutions. pH adjustment was made by adding sodium hydroxide.

をゲルろ過にかけると、Fig. 3 の点線で示されるように β 成分のみ不溶化して沈殿した。酸沈上澄部の電気泳動パターンでは新たなバンドが数本あらわれ、酸によって解離会合成分が生じたことを示した (Fig. 5 の 4)。

3) 尿素添加による変化 未変性グロブリンのバンドのほかに易動度の大きい側に新たに 1 バンドあらわれ、尿素により解離する成分があることが明らかになった (Fig. 5 の 5)。

4) 加熱による変化 80~90°C にかけて溶解度の低下がみられた (Fig. 8)。さらに、90°C で加熱後の上澄部のゲルろ過パターンから、 β 成分が著しく沈殿したことがわかった (Fig. 9)。

5) サブユニット構造 SDS 電気泳動で 3 バンドあらわれた (Fig. 10 の 1)。これを分子量の大きい順に

Fig. 8. Effect of heating temperature on the solubility of rapeseed globulin. The protein was dissolved in 1/30 M phosphate buffer and heated in water bath for 30 min.

Fig. 9. Gel filtration patterns of rapeseed globulin heated at 90°C on a Sephadex G-200 column.

Elution buffer was 1/30 M phosphate (pH 7.6, Ionic strength was adjusted at 0.4 with sodium chloride). The precipitate resulted from heating was removed by centrifugation.

$A_1 \cdot A_2 \cdot A_3$ ・サブユニットと呼ぶことにする。これらの分子量は、 $A_1 \cdot A_2 \cdot A_3$ の順で 32,000, 19,000, 13,000 であった。酸沈部分に相当する β と、酸沈上澄部に相当する $\alpha \cdot \gamma$ を別々に泳動させると、 β は $A_1 \cdot A_2$ サブユニットに、 $\alpha \cdot \gamma$ は A_3 サブユニットに相当するバンドがあらわれた (Fig. 10 の 2, 3)。

次に分子間 S-S 結合の有無を調べるために、ME と 8 M 尿素で処理したグロブリンをポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけると、新たに 2 バンドが低分子側にあらわれた (Fig. 5 の 6)。これを SDS 電気泳動で確認するために、試料調製時に ME を除いて尿素を加えて泳動させた。ME を除いて 8 M 尿素処理したものは、 A_3 のバンドを除いて易動度の変化がみられた (Fig. 10 の 4, 5)。

4. アミノ酸分析

脱脂粉末のアミノ酸組成は、Girault⁵⁾ の値とよく一致していた。粉末とグロブリンのアミノ酸組成は、スレ

Fig. 10. SDS-gel electrophoretic patterns of rapeseed globulin.

Table 2. Amino acid composition of flour and globulin (g amino acid/16 g N).

Amino acid	Flour		Globulin		
	a	b	Total	Acid	
				ppt.	sup.
Lys	6.92	6.49	5.57	4.75	8.76
His	3.17	2.67	3.06	2.53	4.30
Arg	7.12	6.25	6.65	7.77	7.14
Asp	7.60	6.62	6.30	11.41	2.93
Thr	5.20	4.35	3.78	4.56	3.79
Ser	5.32	4.12	4.47	5.31	4.99
Glu	20.61	19.49	22.45	11.81	29.64
Pro	7.70	7.04	9.00	5.08	12.79
Gly	5.67	5.14	5.08	6.13	5.17
Ala	4.98	4.42	4.22	5.00	4.44
Cys	1.51	2.64	2.91	0.62	5.05
Val	5.73	5.23	4.88	6.39	4.88
Met	2.10	1.90	2.22	2.36	2.76
Ile	4.36	3.99	3.95	5.31	3.71
Leu	7.86	6.92	7.14	9.53	7.05
Tyr	3.23	2.89	2.30	3.59	1.96
Phe	4.48	3.77	4.01	5.48	3.60
Try	1.72	1.23	2.25	2.84	1.61
Total	105.28	95.00	100.42	100.47	114.57

a: data from Nagano and Okamoto.

b: data from Girault (1973).

オニン、シスチン、トリプトファンを除いて類似しており、必須アミノ酸、特にリジン含量に富み良好な組成を示した。グロブリン各区分を比べると、シスチン、酸性

アミノ酸・非極性アミノ酸含量に差がみられた (Table 2)。

考 察

グロブリンの3成分のうち最も不安定な構造を持っているのはβ成分で、酸・アルカリ・加熱により unfolding を起こす。このβ成分は、Bhatty ら³⁾ の報告にある中性たん白質 12S に相当すると思われる。このβ成分の酸による不溶化の原因は、植物たん白質に多くみられるフィチン酸の関与でないことも、各成分のリン含量を比較して確かめた。一方、α・γ成分は種々の条件下で安定であり、α成分は Bhatty ら³⁾ の塩基性たん白質 1.7S に相当すると思われる。焦点ゲル電気泳動で、グロブリンの等電点が弱酸性から塩基性に等電点を持つ一部の成分に由来すると思われる。

このようなグロブリンのα・γとβ成分の特徴ある挙動の差は、構成サブユニットの違いによるものではないかと思われる。すなわち、α・γ成分は A₃ サブユニットより構成されており、おそらくγ成分はα成分の会合成分であろう。一方β成分は、A₁・A₂ サブユニットより構成されている。酸による上澄部分のα・γ成分と沈殿部分であるβ成分のシスチン含量が著しく異なることと照合して、これらサブユニット間結合には S-S 結合の関与の差も考えられる。

以上のようなナタネたん白質、特にグロブリンの特徴がたん白収率におよぼす影響について考えてみた。まず、大豆たん白質がほぼグロブリンのみからなるのに対し、ナタネの主要たん白質が1種でないことは、収率を低下させている原因のひとつである。また主要たん白質であるグロブリンは鋭敏な等電点を持たず、沈殿後もホエー部分にたん白質が残存するので、等電沈殿はあまり有効な回収方法でないと思われる。さらに Bhatty¹²⁾ も指摘しているように、非たん白態窒素の多いことも収率を低下させる。しかし、今後回収法に改善が加えられるならば、アミノ酸組成も大豆に匹敵するほど優秀なので、食品として利用される可能性は十分あるといえる。

要 約

脱脂脱皮ナタネより主要たん白質、グロブリンとグルテリンを得た。グロブリンはα、β、γの3成分よりなり、各成分はサブユニットと考えられる3種のたん白質から構成されていた。pH 変化、加熱処理、ME に対する挙動は各成分により異なり、α・γ成分はゲルを過で確かめられる範囲において変化しないが、β成分はこれらの処理に対しても変化した。栄養的にはリジンに富み、良好なアミノ酸組成を示した。グロブリンのアミノ酸組成は、大豆グロブリンに似ていた。

本研究において、実験材料の提供とその調製について適切な助言とご協力をくださいました日清製油研究所の皆様へ深く感謝します。また、種々のご指導をいただきました本学食品化学研究室の渡辺研氏にお礼申し上げます。

文 献

- 1) Bhatti, R.S.: *Cereal Chem.*, **49**, 729 (1972)
- 2) Bhatti, R.S.: *Cereal Chem.*, **50**, 329 (1973)
- 3) Bhatti, R.S., McKenzie, S.L. and Finlatson, A.J.: *Can. J. Biochem.*, **46**, 1191 (1968)
- 4) Kodagada, L.P.K., Yeung, C.Y., Nakai, S. and Powrie, W.D.: *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **6**, 135 (1973)
- 5) Girault, A.: *J. Sci. Food & Agr.*, **24**, 509 (1973)
- 6) Tkachuk, R.: *Cereal Chem.*, **46**, 156 (1969)
- 7) 寺村 貞, 武藤尚志: 化学と生物, **8**, 634 (1970)
- 8) Awdeh, Z.L.: *Science Tools*, **16**, 42 (1969)
- 9) 金沢宏和, 米沢大造: 農化, **47**, 43 (1973)
- 10) Ornstein, L.: *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, Art. 2, 404 (1964)
- 11) Davis, B.J.: *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964)
- 12) 今西 晟: 新しい生物物理化学研究法 (下), 95 (1967), 共立出版 (東京)
- 13) 林 勝哉: 蛋白質の分子量・分子形, 93 (1971), 東京大学出版会 (東京)
- 14) Scoffone, E., Fontana, A. and Rocchi, R.: *Biochemistry*, **7**, 971 (1968)

(昭和51年4月22日受理)