[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi* Vol. 55, No. 4, pp. 333~339, 1981]

ダイズ 11S グロブリンのゲル化に及ぼす 還元的アルキル化の効果

藤野吉世, 塚田扶美子, 益本美千代, 長谷川喜代三
(奈良女子大学家政学部食物学科)

昭和 55 年 11 月 10 日 受 理

Effects of Reductive Alkylation on Gelation of Soybean 11 S Globulin

Sachiyo FUJINO, Fumiko TSUKADA, Michiyo MASUMOTO
and Kiyozo HASEGAWA

*Department of Food Science and Nutrition,
Nara Women's University, Nara 630*

Soybean 11 S globulin was modified repeatedly by reductive alkylation by the method of Means and Feeney using sodium borohydride and aqueous formaldehyde solution to investigate 11 S globulin gelation. The extent of modification was determined by the TNBS method. Ultracentrifugal analysis showed a decrease in 11 S component accompanied by dissociation into 2~3 S and 7 S components. A decrease in positive charges was detected by disc electrophoresis. Gel isoelectrofocusing showed little change. In titration curve measurement, pK of lysine decreased pH by 0.5 by the modification. Reductive alkylation increased the critical gelling concentration of soybean 11 S globulin from 7% to 12% at pH 7 and in NaCl concentration of 2%. The alkylated globulin formed a homogeneous gel in protein concentration of 10% at pH 10 and in 5% NaCl, at which native 11 S globulin did not gel. The change in gelation characteristics suggests that the hydrophilic property of the globulin was decreased by reductive alkylation. The gel of reductively alkylated globulin appeared smooth with naked eye as well as under scanning electron microscopy.

(Received November 10, 1980)

緒 言

ダイズタンパク質はさまざまな機能特性と高い栄養価を持つため、加工食品製造のための有用な原料成分としての利用が盛んである。一方、食品タンパク質にさらにより良い栄養価、機能特性、貯蔵性、物理的性状等を与えることを目的として、種々の化学修飾が研究されている⁽¹⁾。還元的アルキル化はタンパク質のアミノ基に種々のアルデヒドを結合させたのちこれを還元して、タンパク質に大小さまざまなタイプの疎水性基を結合させる方法として注目されている⁽²⁾。食品への応用という見地からは還元的メチル化が研究されている⁽³⁾。これはホルムアルデヒドと水素化ホウ素ナトリウムで還元的アルキル化してタンパク質をジメチル化することにより、リジンのアミノ基を保護しようとするものである。

著者らは、さきにゴマおよびダイズタンパク質のゲル化特性について研究して、その結果について報告した^(4,5)。その際、ゴマグロブリンがゲル化しやすい pH 10 においては、ダイズ 11 S グロブリンはゲル化せずに加熱後も溶液のまままでとどまることから、ダイズグロブリンはより親水性が強いと考えられることを指摘しておいた。

本報では、ダイズ 11 S グロブリンの親水性を減ずることにより、これを pH 10 においてゲル化させることが可能となるのではないかと考えて、これにホルムアルデヒドを作用させて還元的アルキル化を施し、この修飾によってもたらされる超遠心的挙動、電気泳動的性質、滴定曲線の変化ならびに、ゲル化に及ぼす還元的アルキル化の効果については肉眼のおよび走査型電子顕微鏡的観察を行ったので、それらの結果について報告する。

実験材料および方法

1. **ダイズ 11S グロブリンの調製** 市販のつの子ダイズを用い、前報⁽⁵⁾と同様に Thanh ら⁽⁶⁾の方法に従って調製した。

2. **試薬** 37% ホルムアルデヒドはメルク社製、アンフォライン (pH 3.5~10 用) は LKB 社製、その他はすべて半井薬品の SP または GR を用いた。

3. **ダイズ 11S グロブリンの還元的アルキル化** 還元的アルキル化は Means と Feeney⁽⁷⁾の方法に従って行った。すなわち、ダイズ 11S グロブリンを 3mg/ml になるように、0.2M ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に溶解し、0°C、pH 9.0 の条件下で水素化ホウ素ナトリウムの粉末を 0.5mg/ml の割合で加え、37% ホルムアルデヒド溶液を緩衝液 1ml 当り 0.5 μ l ずつ 30 分間にわたり 5 分間隔で 6 回添加し、反応させた。なお還元的アルキル化は 1, 2, 3, 6, 10 回と回数を変えて 5 段階行った。2 回目以後の操作は水素化ホウ素ナトリウムおよびホルムアルデヒドの添加を繰り返して行った。反応混合物を 5°C で水透析後、凍結乾燥して以下の実験に用いた。

4. **還元的アルキル化率** 化学修飾の程度の決定のために奥山らの方法⁽⁸⁾に従って TNBS 法によって遊離のリジン量を定量した。すなわち、試料溶液 1ml に 0.15M ホウ酸 4ml, 0.1% TNBS 溶液 (0.1% TNBS および 0.1% 亜硫酸含有) 2ml を順次加え、37°C、2 時間インキュベートしたのち、420 nm の吸光度を測定した。未修飾試料の吸光度から修飾試料の吸光度を引き、これを未修飾試料の吸光度で割り、100 倍してこれを還元的アルキル化率とした。

5. **超遠心分析** 超遠心分析は試料を 0.01M 2-メルカプトエタノール (2-ME) を含むイオン強度 0.5, pH 7.6 のリン酸緩衝液⁽⁹⁾に溶解し、日立分析用超遠心機 (UCA-1 型) を用い、温度 20°C、回転数 51,200 rpm にて行った。

6. **電気泳動** 1) ディスク電気泳動は Davis の方法⁽⁹⁾に従って 7.5% ポリアクリルアミドゲル (pH 9.4) を分離用ゲルに用い、試料を 0.2M 2-ME で処理したものと、処理しないものについて行った。泳動は室温で 3mA/カラムで行った。

2) 等電点電気泳動⁽¹⁰⁾は、5% ポリアクリルアミドゲル (7M 尿素を含む) を用い、pH 3.5~10 用アンフォライ

ン (LKB 社) を 4% 濃度で使用し、4°C、200V 定電圧で 5 時間泳動を行った。

7. **ゲル化** 還元的アルキル化した 11S グロブリンのゲル化は次のように行った。すなわち、前報⁽⁵⁾の 11S グロブリンのゲル化と比較するため、ダイズタンパク質がゲル化しやすい条件 (pH 7, 2% NaCl) と、ゴマタンパク質がゲル化しやすい条件 (pH 10, 5% NaCl) について、前報⁽⁵⁾と同様の操作にて加熱、冷却して行った。ゲル化実験には還元的アルキル化を 3 回繰り返して行ったものを用いた。

8. **走査型電子顕微鏡によるゲルの観察** ゲルはゲル化用試料液 2ml 中に、銅片 (直径 1cm の円形銅板に内径 6mm, 深さ 1.5mm の粗面のくぼみをつくったもの) 2 個を合わせてクリップでとめたもの 1 組を入れ、脱気後、90°C、20 分加熱後、氷冷して銅片のくぼみの中でゲルをつくらせた。このゲルを液体窒素中で凍結切断し、片側に銅片をつけたままのゲルを Gill らの方法⁽¹¹⁾に従って 25% グルタルアルデヒド溶液 (0.1M リン酸緩衝液, pH 7.0) に入れ 2 時間固定後、30% エタノール、次いで 50, 70, 95, 100% と順次濃度をあげたエタノールに移して脱水し、次に酢酸イソアミルに置換し、臨界点乾燥を行い、通常の方法で白金蒸着して検鏡の試料とした。用いた走査電子顕微鏡は日立 S-450 型で、1000 倍で観察した。

実験結果ならびに考察

1. 還元的アルキル化 11S グロブリンの性質

前報^(4,5)でゴマとダイズの混合ゲル化について研究を行い、その際ダイズグロブリンはゴマタンパク質がゲル化しやすい pH 10, 5% NaCl においてはタンパク濃度を 27% に高めてもゲル化しないことを見出した。本報においては、このダイズ 11S グロブリンに還元的アルキル化を施した際に修飾されたグロブリンの性質がどのように変化するかについて調べた。

1) **還元的アルキル化率の測定** TNBS 法によって遊離のリジンを測定し、420nm の吸光度の減少率をリジンの ϵ -アミノ基の修飾率とみなして、修飾回数を横軸に、修飾率を縦軸に表わして Fig. 1 に示した。図からわかるように 3 回までは変化が大きいが、3 回以後は修飾率はあまり増加が見られなかった。

2) **超遠心分析** 未修飾 11S グロブリン、修飾 3 回、6 回、10 回の超遠心分析の結果は Fig. 2 に示す。

アルキル化したものではサブユニットへの解離が起り、11S成分の減少とともに、2〜3Sおよび7S成分の増加がみられた。またアルキル化の回数を増やしても超遠心パターンはほぼ等しく、わずかに2〜3S成分の増加がみられたにすぎなかった。

3) 電気泳動 アルキル化によるチャージの変化を調べるためディスク電気泳動を行った。試料を溶かす緩衝液に0.2M 2-MEを加えたものと、加えないものについて比較した。その結果はFig. 3に示す。図からわかるように、未修飾11Sグロブリンは移動度の小さい3本のバンドが見られたにすぎないが、アルキル化したものは回数の増加とともに移動度が増加し、アルキル化することによりプラスチャージが減少していることがわかる。また0.2M 2-MEを添加した場合では、2-MEがタン

Fig. 1. Relation between Extent of Modification and Number of Times of Reductive Alkylation. Lysine residues in the proteins were determined by TNBS method.

パク分子中の-S-S-結合を切るため多くのバンドが観察され、6回、10回の修飾では明らかにプラス側への移動が大きいたことが観察された。次に等電点電気泳動の結果をFig. 4に示す。アルキル化したものは未修飾のものよりも全体としてバンドがうすくなっている以外はバンドの数、位置ともに大きい変化はなく、アルキル化が等電点電気泳動に与える影響は小さいことがわかった。

4) 滴定曲線 Means と Feeney⁽⁷⁾ はジメチル化により、リジンのpKが約0.4から0.6酸性側に傾くと述べている。Fig. 5は未修飾11Sグロブリンおよびアルキル化10回の11Sグロブリンの滴定曲線を示す。図に示すように、pH 9から11にかけてアルキル化したほうが酸性側にきている。リジンのε-アミノ基のpKのpHが10.2であり、この点においてアルキル化のほうが約pH 0.5酸性側にあることが認められた。また、このことは、より酸性で(CH₃)₂N⁺H- から (CH₃)₂N- に解離することを示しており、pH 9.4でのディスク電気泳動でバンドがプラス側に移行した結果を裏付けていると思われる。

2. アルキル化がゲル化に及ぼす影響

アルキル化がゲル化に及ぼす影響を調べるため、ダイズグロブリンのゲル化しやすい条件(pH 7, 2% NaCl)と、ゴマグロブリンのゲル化しやすい条件(pH 10, 5% NaCl)とでゲル化実験を試みた結果をFig. 6にまとめた。図において□は均一なしっかりしたゲル、○は均一な柔らかいゲル、△は半ゲル、×は完全なゾルを表わす。図からわかるように、pH 7, 2% NaClではアルキル化によりゲル化の臨界濃度は7%から12%に上昇し、色は透明感が増して寒天ゲル様であり、均一でなめらかな

Fig. 2. Ultracentrifugal Patterns of Soybean 11S Globulin and Reductively Alkylated Globulins. Protein concentration were 0.8%. Solvent was 0.5 ionic strength standard phosphate buffer, pH 7.6 containing 0.4M NaCl and 0.01M 2-ME. Photographs were taken at 48 min after maximum speed, 51,200 rpm, was attained. (a), Soybean 11S globulin; (b), 3 times; (c), 6 times; and (d), 10 times repeatedly reductively alkylated globulins.

Fig. 3. Disc Electrophoresis of Soybean 11S Globulin and Alkylated Globulins. (A), Without 2-ME and (B), with 2-ME. (a), Soybean 11S globulin; (b), once; (c), twice; (d), 3 times; (e), 6 times and (f), 10 times repeatedly reductively alkylated globulins.

Fig. 4. Gel-Isoelectrofocusing Patterns of Soybean 11S Globulin and Alkylated Globulins. (a)~(f) are the same as those in Fig. 3.

Fig. 5. Titration Curves of Soybean 11S Globulin and Alkylated Globulin. —, Soybean 11S globulin; ---, 10 times repeatedly reductively alkylated globulin.

Fig. 6. Effect of Reductive Alkylation on the Gelation. (A), pH 7, 2% NaCl; (B), pH 10, 5% NaCl. Temperature, 90°C; heating time length, 20 min. (a), Soybean 11S globulin; (b), 3 times repeatedly reductively alkylated globulin. □, Homogeneous and firm gel formed; ○, homogeneous and soft gel formed; △, semi gel (viscous but non-elastic solution) formed; ×, gel did not formed.

外観を呈した。一方 pH 10, 5% NaCl では、未修飾のものはタンパク濃度 22% でもゲル化しなかったが、アルキル化したものは 8% でゲル化し、10% でしっかりしたゲルとなった。また未修飾 11S グロブリンはこの pH では、加熱後も比較的粘性のある黄褐色のゾル状態であったが、アルキル化したもののゲルは黄色味を帯びた乳白色で均一であった。ここでタンパク質のゲル化について考えてみると、ゲル化とは、まずタンパク質の溶解と加熱による分子のほぐれ、それに引き続く隣接分子間のからまりとからなる連続した過程であり⁽¹²⁾、ダイズ 11S グロブリンの場合は、親水性が大であるために、pH 10 においては、加熱後も溶解性を失わず、ゲル化が起らなかったものと考えられる。それをアルキル化によって、わずかに疎水化することでゲル化することができた。

3. ゲルの走査型電子顕微鏡による観察

Gill ら⁽¹⁴⁾はゲルの微細構造を走査型電子顕微鏡で観察している。本実験では、還元的アルキル化によるゲルの性状の肉眼的観察をさらに詳しく調べるために、ゲルの断面を走査型電子顕微鏡で観察した。その結果を Fig. 7 に示す。pH 7, 2% NaCl において未修飾 11S グロブリンと還元的アルキル化グロブリンを比べると、未

修飾のゲルは細い繊維状構造をもつ網状組織で穴の大きさは不均一であるのに対し、アルキル化したゲルは等方性の穴をもち、大きさが均一になっている。アルキル化ゲルについて pH の効果を見ると、アルキル化グロブリンは pH 7, 2% NaCl では未修飾 11S グロブリンに比べてゲル化しにくくなっているにもかかわらず、形成するゲルは微細な構造になっている。そしてアルキル化したゲルは pH 7 よりも pH 10 においてスポンジ状の緻密な構造をしており、均一でなめらかであるという肉眼的観察が電子顕微鏡下での観察によっても裏付けられた。タンパク濃度の低濃度の柔らかいゲルよりも高濃度のしっかりしたゲルのほうが、構造が細かく密度の高い状態であることが観察された。

以上述べたように、還元的アルキル化という修飾を行うことにより、従来ゲル化しなかった pH 10, 5% NaCl という条件でダイズ 11S グロブリンがなめらかなゲルを生成したことは非常に興味深い。このようなアルキル化によるゲルの構造の変化と、物理的測定法による粘弾性の諸性質の変化との相関関係については、今後の検討課題の一つであると考えている。

要 約

(1) Means と Feeney の方法でダイズ 11S グロブリンの還元的アルキル化を行い、その性質を調べた。

i) 還元的アルキル化の程度は TNBS 法により調べた。

ii) 超遠心分析によって本修飾により 11S 成分の減少と、2~3S 成分および 7S 成分の増加がみられることを明らかにした。

iii) ディスク電気泳動分析によって本修飾によりプラスチャージが減少することを認めた。等電点電気泳動図形には大きな変化はなかった。

iv) 滴定曲線を測定し、本修飾によりリジンの pK が 0.5 pH 低下することを明らかにした。

(2) 還元的アルキル化のゲル化に及ぼす影響をみると、pH 7, 2% NaCl ではゲル化臨界濃度を上昇させた。またアルキル化グロブリンは未修飾ダイズ 11S グロブリンがゲル化しなかった pH 10, 5% NaCl でゲル化した。このことは本修飾により 11S グロブリンの親水性が減少したためであると考えられる。

(3) ダイズ 11S グロブリンと還元的アルキル化グロブリンのゲルの性状を走査型電子顕微鏡で観察し、そ

Fig. 7. Scanning Electron Micrographs of Soybean 11 S Globulin Gels and Alkylated Globulin Gels. Three times repeatedly reductively alkylated globulin was used. (a) and (b), 8% and 12% gels of soybean 11 S globulin at pH 7, 2% NaCl; (c) and (d), 12% and 16% gels of alkylated globulin at pH 7, 2% NaCl; (e) and (f), 8% and 12% gels of alkylated globulin at pH 10, 5% NaCl. Soybean 11 S globulin did not form gel at pH 10, 5% NaCl, as shown in Fig. 6.

の構造の粗密さの相違を肉眼的観察の結果と比較した。

走査型電子顕微鏡観察にご援助をいただいた京大木材研究所、林先生、伊東先生に深く感謝いたします。また標本作成にあたり助力いただいた上口容子、横井祐子さん方に深謝いたします。本研究は昭和 55 年度文部省科学研究費（奨励研究(A)）に負うところが大きい。ここに記して謝意を表します。

-
- (1) R. E. Feeney and J. R. Whitaker 編, 藤巻正生, 荒井綜一監訳:「食品蛋白質」, 学会出版センター, 東京, 1979, p.49.
 - (2) 同上, p.29.
 - (3) F. Galembeck, D. S. Ryan, J. R. Whitaker and R. E. Feeney: *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 238 (1977).
 - (4) 長谷川喜代三, 前田香織, 藤野淑子, 脇長田鶴,

藤野吉世:農化, **52**, 341 (1978).

- (5) 長谷川喜代三, 大脇 薫, 富田晶子, 藤野吉世:農化, **53**, 375 (1979).
- (6) V. H. Thanh and K. Shibasaki: *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 117 (1976).
- (7) G. E. Means and R. E. Feeney: "Chemical Modification of Proteins," Holden-Day, Inc., San Francisco, Calif., 1971, p.216.
- (8) 奥山典生, 笠井久隆:蛋白質 核酸 酵素, **18**, 1153 (1973).
- (9) B. J. Davis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964).
- (10) 日本生化学会編:「生化学実験講座1(タンパク質の化学I)」, 東京化学同人, 東京, 1976, p.290.
- (11) T. A. Gill and M. A. Tung: *J. Food Sci.*, **43**, 1481 (1978).
- (12) A. M. Hermansson: *J. Texture Studies*, **9**, 33 (1978).