大豆蛋白質の食品化学的研究*

(第9報) 大豆蛋白質 11S 成分の酸変性における
高次構造の変化

蜂 屋 巖**・大久保一良**・柴崎 一雄**

Food Chemical Study of Soybean Protein

Part IX. Conformational change of 11S component of soybean
proteins in acid

IWA0 HATSIYA, KAZUYOSHI OKUBO and KAZUO SHIBASAKI

The conformational change of the 11S component of soybean proteins in acid was measured by ultraviolet difference spectra, optical rotatory dispersion and circular dichroism. Below pH 4, the change of tertiary structure that the tyrosine residues were exposed and the tryptophan residues were buried into the molecule was recognized, and, between pH 2 and 0.64, the change was attained to maximum. The secondary structure, β -structure, of the 11S component was almost stable at pH 1.22.

(Received May 19, 1972)

前報¹⁾で、大豆蛋白質の主成分である 11S 成分を用い、アルカリ変性における高次構造の変化を検討し、そのおもな二次構造である β 構造がアルカリに対してかなり安定であることを明らかにした。引き続き、本報では酸変性における高次構造の変化を、前報同様に紫外吸収差スペクトル、旋光分散、円偏光二色性の方法により検討した。

て磷酸緩衝液で蛋白質濃度を調整した溶液 (pH 7.6, $\mu=0.5$) を用い、275~300 nm における差スペクトルを日立の自記分光光度計 EPS-2 で測定した。加熱変性処理として封管試料液を沸騰水中で 1 時間加熱し、室温に冷却後ただちに差スペクトルを測定した。また、6.3 M 尿素変性による差スペクトルの測定は下記のとおりに行った。すなわち、

実 験 方 法

1. 試料の調製

前報に従って、1968 年の宮城県岩沼産の大豆(ネマシラズ)から超遠心分析、ゲル電気泳動分析で単一な 11S 成分を調製した。この 11S 成分を 0.5 M 塩化ナトリウム溶液に溶解させ、20,000 rpm, 30 分間遠心してわずかの不溶成分を除き、各濃度の塩酸で蛋白質濃度と pH を調整し、試料溶液とした。試料溶液の蛋白質濃度はその窒素量と 280 nm での吸光度から求めた。

2. 紫外吸収差スペクトル

各試料溶液を 3 時間室温に放置後、reference 側とし

A: 未変性溶液, B: 6.3 M 尿素変性溶液

A': 未変性溶液に用いた溶媒, B': 6.3 M 尿素液

差スペクトル測定の際の蛋白質濃度は 0.15~0.20 で、各溶液の pH は日立-堀場 pH メーター F-5 で測定した。

3. 長波長領域での旋光分散

各酸性 pH の試料について、前報¹⁾同様に、300~600 nm における旋光度を日本分光の自記分光旋光計 ORD/

* 大豆の食品化学的研究 (第 22 報)

** 東北大学農学部食糧化学科 (仙台市堤通兩宮町 1)

Department of Food Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai-shi.

UV-5 で測定し, Moffit-Yang の式から a_0 , b_0 値を算出した。

4. 短波長領域での旋光度および円偏光二色性

各酸性 pH の試料について, 前報¹⁾同様に, 300 nm 以下での旋光度および円偏光二色性を測定し, 還元平均残基旋光度 $[\theta]$ および有効残基構円率 $[\theta]$ を求めた。

結果および考察

1. 紫外吸収差スペクトル

蛋白質分子の変性ではチロシン, トリプトファン残基の状態差に基づく紫外吸収スペクトルの短波長側への移動 (denaturation blue shift) が生じ, このことはそれらの残基が変性により分子の表面に露出し, より低い屈折率の溶媒に接するために生じる現象と理解されている²⁾。そこで 11S 成分の酸変性による側鎖の存在状態を知るために denaturation blue shift の測定を行ない, ほぼ完全変性と考えられる尿素変性の場合と比較した。11S 成分は酸性領域の高イオン強度で不溶化沈澱を生じ³⁾, 差スペクトルの測定が困難であったが, 低イオン強度, 低蛋白質濃度では完全に溶解し, 光学的測定が容易であった。

11S 成分の酸性領域および 6.3 M 尿素溶液での 275 ~ 300 nm における差スペクトルを第 1, 2 図に示した。6.3 M 尿素においては, 280, 287, 292 nm にそれぞれ負のピークを示す典型的な denaturation blue shift が認められた。一般に蛋白質の denaturation blue shift においては 275 と 285 nm にチロシンとトリプトファン残基による負のピークが認められ, 292 nm にトリプトファンのみに由来する負のピークの生ずることが知られている²⁾。11S 成分の尿素変性においても 292 nm にトリプトファン残基の分子表面への露出によるピークが顕著に生じたが, 酸変性では pH の低下に伴い 292 nm のピークが消失し, 281 と 287 nm の負のピークのみが著るしく増大した。次に, 287 nm のピークの高さを各酸性 pH に対してプロットすると (第 3 図), pH の低下に伴い負のピークが著るしく増大し, pH 2 以下では一定値を示した。このことは酸変性による三次構造の破壊が pH の低下に伴って進行し, pH 2 ~ 0.64 ではそれ以上の酸変性による三次構造の変化が生じないことを意味するものと考えられる。

しかし, pH 2 以下ではトリプトファン残基に由来するピークが出現しないことから, トリプトファン残基の挙動がチロシンのそれと異なることが予想される。そこでさらに酸変性を進めるために, pH 0.64 で加熱処理す

Fig. 1. Difference spectra of 11S component in urea solution.

Fig. 2. Difference spectra of 11S component in acid solution.

A: pH 4.00 vs pH 7.60
B: pH 2.84 vs pH 7.60
C: pH 2.08 vs pH 7.60
D: pH 1.48 vs pH 7.60

Fig. 3. Effect of pH on Difference Optical Density (at 287 nm) of 11S vs pH 7.60

ると (第 4 図) 291 nm にピークが認められ, その加熱処理の無加熱に対する差スペクトル (第 4 図, 破線) では, 292 nm に顕著なトリプトファンのピークが認めら

Fig. 4. Difference spectra of 11S in acid solution.

A: pH 0.64 vs pH 7.60
 A': pH 0.64 (in boiling water for 1 hr.)
 vs pH 7.60
 B: A' vs A

Fig. 5. Effect of pH on $E_{292}/E_{281\text{nm}}$ of 11S

れた。また、トリプトファンとチロシン残基の挙動の相違を反映する⁴⁾ 292 と 281 nm のピークの高さの比を各 pH, 加熱および尿素処理において求めた結果(第5図), pH 7.6 ではその比が 0.42 であったのに対し, pH 4 近辺では著しく大きく, さらに pH が低下するにつれてその値が低下し, pH 1.5 近辺で最小になり, pH 0.64 で幾分増加した。さらに pH 0.64 で加熱すると 1.71 と増加し, 6.3 M 尿素の場合の 1.73 にほぼ等しい値を示した。これらの結果は, トリプトファン残基がチロシン残基の挙動と異なり, pH 4 近辺で最も溶媒と接し, pH の低下に伴って埋没状態になり, 加熱および尿素で再び露出することを意味するものと考えられる。したがって, トリプトファン残基はむしろ溶媒と容易に接し易い 11S 成分の分子表面に近い領域に存在していることが暗示される。浜口ら⁶⁾ はリゾチームの中性溶液に対して求めた酸性溶液の差スペクトルが blue shift し, トリプトファン残基のピークが大きく出現したことを示し

た。しかし, 粘性および旋光分散の測定から, この差スペクトルは denaturation blue shift でなく, トリプトファン残基のごく近傍に存在するカルボキシル基の荷電の変化による影響であると考察している。pH 4 における 11S 成分の場合にも 281 と 292 nm の差吸光度比が 6.3 M 尿素と pH 0.64 の加熱処理よりはるかに高く, 次章の a_0 値がさほど大きく変化していないことから, トリプトファン近傍のカルボキシル基の影響を大きく受けているものと考えられる。

2. 長波長領域での旋光分散 (ORD)

各酸性 pH における 11S 成分の 300~600 nm での ORD より, Moffitt-Yang の式⁶⁾に従い, a_0 , b_0 値を求め, 第6図に示した。その結果, b_0 値は各 pH で 0 に近い値でほとんど変化が認められなかったが, a_0 値は pH 4.0 から直線的に変化し, pH 2.0 以下で最高値 -500° を示した。 b_0 値が小さく, その変化の少ないことから, 11S 成分は α ヘリックスをほとんど含んでいないことが確認されたが, 二次構造としての β 構造と三次構造を反映する a_0 値に大きな変化が認められ, pH 2 以下でのその値 (-500°) はアルカリ変性での値¹¹⁾ (-490° , pH 12.60) にほぼ等しく, 8.3 M 尿素の場合¹¹⁾ (-640°) より約 -100° 大きかった。このことは, 酸変性においてもアルカリ変性と同程度の高次構造の変化が生じ, その高次構造が完全に破壊されずにある高次構造が安定に存在していることを意味するものと考えられる。また, 各酸性 pH における a_0 値の変化挙動が前章での denaturation blue shift のそれとほぼ一致していることより, この高次構造の変化はおもに三次構造の変化に由来していると考えられ, 11S のおもな二次構造である β 構造は崩壊せずに安定に存在していることが予想される。

Fig. 6. Parameters of the Moffitt-Young equation of 11S component at various pH.

Fig. 7. ORD and CD spectra of 11S component

A (ORD), A' (CD): pH 5.80
 B (ORD), B' (CD): pH 12.84
 C (ORD), C' (CD): pH 1.22
 D (ORD), D' (CD): 8.3 M urea

3. 短波長領域での旋光分散 (ORD) および円偏光二色性 (CD)

前報¹⁾ 同様に溶媒の吸収によるノイズを避けるために緩衝液を用いず、塩酸で pH 1.22 に調整し、短波長領域での ORD および CD を測定して、還元平均残基旋光度 $[m']$ および有効残基構円率 $[\theta]$ を求めた。比較のために、前報でのアルカリおよび 8.3 M 尿素変性の Cotton 効果²⁾ および CD スペクトル³⁾ を併せ第7図に示した。その結果、pH 1.22 での酸変性においては、変性による左旋性のわずかの増加にもかかわらず、未変性、アルカリ変性同様に 230 nm に明瞭な谷の存在が認められた。11S 成分における 230 nm の谷は β 構造の存在を示し、酸変性でもアルカリ変性同様に破壊されずに残っている β 構造の存在が明らかである。

より明瞭に α -ヘリックスと β 構造を区別できる CD スペクトル (第7図) においても、酸変性の場合には、

未変性、アルカリ変性同様に 218 nm に β 構造に由来する負のピークが認められた。ピークの深さから比較すると、酸変性の方がアルカリ変性よりその β 構造が安定に存在し、より未変性の状態に近いことがわかった。このことは、酸変性における 11S 成分の β 構造はほぼ安定していることを意味し、denaturation blue shift および Moffitt-Yang の a_0 の大きな変化はおもにその三次構造の変化を反映しているものと考えられる。

要 約

大豆蛋白質の主成分である 11S 成分を用い、基本的な変性のひとつと考えられる酸変性について、それに伴う高次構造の変化を紫外吸収差スペクトル、旋光分散、円偏光二色性の方法により検討した。その結果、11S 成分は、pH 4 近辺からチロシン残基が露出するが、トリプトファン残基が埋没する三次構造変化を受け、pH 2 ~ 0.64 でその変化は一定になることが認められた。また、11S 成分のおもな二次構造である β 構造は、pH 1.22 の酸変性において、ほぼ安定に存在していることがわかった。

文 献

- 1) 柴崎一雄・蜂屋 巖・大久保一良: 食品工誌, **19**, (12), 557 (1972).
- 2) 統生物物理学講座, 第七巻, (吉岡書店).
- 3) WOLF, W.J., et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 5730 (1958).
- 4) IMANISHI, A., et al.: *J. Biochem.*, **55**, 562 (1964).
- 5) OGASAWARA, K., and HAMAGUCHI, K.: *J. Biochem.*, **61**, 199 (1967).
- 6) MOFFITT, W.: *J. Chem. Phys.*, **25**, 467 (1956).
(昭和47年5月19日受理)