ピーナツ蛋白質に関する研究

(第1報) アラキンのサブユニットへの解離について

四ッ橋一公*・柴崎一雄*

Studies on Peanut Proteins

Part I. Dissociation of arachin into subunits

KAZUHIRO YOTSUHASHI and KAZUO SHIBASAKI

The effect of urea, guanidine-HCl and 2-mercaptoethanol on the dissociation of arachin into subunits was investigated by using ultracentrifuge and starch gel electrophoresis, at pH 8.6.

The sedimentation constant of arachin was changed into 9S (monomer form) at low ionic strength and into 14S (dimer form) at high ionic strength. Arachin was dissociated into 1.5S subunit with denaturants, but the dimer form was more stable on the dissociation than the monomer form.

On gel electrophoresis arachin was dissociated into subunits most clearly at the presence of 8M urea and 0.03M 2-mercaptoethanol. Six major, 2 semi-major and 14 minor bands were detected in the anode side of the sample slot and 3 minor bands were found in the cathode side, on the dissociated band pattern.

Disulfide bonds seemed not to be participated in the binding between the subunits.

(Received Feb. 23, 1973)

ピーナツには約 25% の蛋白質が含まれ、そのほとんどはグロブリンで、硫酸塩析でアラキンとコンアラキンに分画される¹⁾。アラキンはサブユニット構造をとっており、その会合体成分は沈降定数 9S (分子量 18 万) でイオン強度を高めると 14.6S (33 万) になることが JOHNSON ら²⁾によって報告された。

アラキンのサブユニットは、沈降速度法、浸透圧測定法およびN末端アミノ酸のモル数から、平均分子量 3 万前後 (1.5S~1.9S) でその数は 6 本と推定されている^{3)~6)}。TOMBS^{5)~7)} は個々の種子粒中に含まれるアラキンのゲル電気泳動からごくわずかに易動度を異にする 3 種類のアラキンをみつけ、変性剤処理後の泳動図より各々のサブユニット構造について考察している。しかしながら、変性剤を透析除去後の試料を用いた TOMBS の報告では、サブユニットへの解離と識別が不十分であることが認められた。

そこで、本報ではアラキンの変性剤と SS 還元剤によ

るサブユニットへの解離条件について種々検討し、ゲル電気泳動におけるサブユニットの識別を明確にするとともに、さらにサブユニット構造の安定性について検討したので報告する。

実験方法

1. 試料調製

石油エーテル (b.p. 30~60°C) で脱脂したピーナツ (スペイン種) から 10% NaCl で蛋白質を抽出し (窒素抽出率 84%), JONES ら¹⁾ の硫酸塩析法に準じてアラキンとコンアラキンに分画した (第1図)。両者はさらに塩析をくりかえすことによって精製し、超遠心沈降分析およびゲル電気泳動の結果から各々他方を含まない試料を調製した。得られたアラキンとコンアラキンの割合は 7:3 (w/w) であった。なお、アラキンの溶解度が低温で著しく減少するのが観察されたため、抽出および塩析は室温 (20°C) で行なった。

* 東北大学農学部食糧化学科 (仙台市堤通兩宮町 1 の 1)

Dept. of Food Chem., Fac. of Agr., Tohoku University, Sendai.

Fig. 1. Preparation of Arachin and Conarachin.

2. 超遠心沈降分析

試料を溶媒に溶解し室温で1時間放置後、日立UCA-1A型分析用超遠心機を用いて55,430および60,000 rpm., 18~20°C, 蛋白質濃度1.0%で沈降速度を測定し、その値を $S_{20,w}$ に補正した。

3. デンブゲル電気泳動

溶媒100 mlに加水分解デンプンを14 gの割合で加えたゲルを常法通り10×2×5 mmの試料溝を持つ16×16または16×7 cmで厚さ6 mmの水平式泳動槽に作製した⁸⁾。泳動はゲル中に0.076 M トリス-クエン酸緩衝液(pH 8.6), 電極槽に0.3 M ホウ酸-水酸化ナトリウム緩衝液(pH 8.5)を用いたPoulík⁹⁾の不連続緩衝液系で行ない、褐色の不連続界面が試料溝から10 cm泳動するまで通電した(180 V, 8~9時間)。

各成分のサブユニット組成を直接的に明らかにする目的で、試料を未変性状態で泳動後、そのゲルを泳動方向に幅2~3 mmに切り取って8 M尿素と0.03 M 2-メルカプトエタノールを含むゲルにはめ込み、それとは直角方向に泳動させた(二次元ゲル電気泳動)。

泳動後、ゲルを厚さ半分に切り、アミドブラック10B染色で蛋白質を検出した。

結果と考察

1. 超遠心沈降挙動

Fig. 2. Sedimentation Patterns of Arachin

(A) in 0.076 M tris-citrate buffer (pH 8.6).

(B) in the same buffer containing 0.4 M NaCl.

a) no denaturant. b) 8 M urea. c) 4 M guanidine-HCl. d) 0.05 M 2-mercaptoethanol. e) 8 M urea and 0.05 M 2-mercaptoethanol. f) 4 M guanidine-HCl and 0.05 M 2-mercaptoethanol.

アラキンは変性剤により1.5S~1.9Sのサブユニットへ解離することが明らかにされているが^{3)~5)}、本報ではこのサブユニットへの解離におよぼすイオン強度とSS還元剤の影響について沈降速度法により検討した。

第2図に低イオン強度(0.076 M トリス-クエン酸緩衝液, pH 8.6)と高イオン強度(0.4 M NaCl 含有同緩衝液)でのアラキンの超遠心沈降挙動を示した。低イオン強度では9Sピークが主であり、他に少量の14Sピークが検出された(第2図a)。高イオン強度では14Sピークが主となり、透析によってイオン強度を低下させると再び9Sピークが主となった。これらイオン強度に対する9Sと14Sの挙動はJOHNSONら³⁾の報告と一致した。そこで、9Sの状態にある低イオン強度と、14Sの

状態にある高イオン強度とでのアラキンのサブユニット構造の安定性について調べた。アラキンを 8 M 尿素および 4 M 塩酸グアニジンで 1 時間反応させると、低イオン強度では全て 1.5 S のサブユニットへ解離するが、高イオン強度ではこの他に 11 S のピークが検出された(第 2 図 b, c)。この 11 S ピークは反応後 3 時間放置すると消失し全て 1.5 S になることから 14 S 成分の解離中間体であり、したがってアラキンは 9 S よりも 14 S である方が尿素および塩酸グアニジンに対して安定でサブユニットへ解離しにくいと推察された。

次に、SS 還元剤として 2-メルカプトエタノールを用い、サブユニット間の結合に關与する SS 結合の存在について検討した。しかし、低、高イオン強度、未変性および変性状態いずれにおいてもその添加の影響は全く認められなかった(第 2 図 d, e, f)。したがって、少なくとも沈降挙動から検出できる範囲では、アラキン分子間およびそのサブユニット間の結合に SS 結合が關与していないであろうと推察された。

2. ゲル電気泳動挙動

アラキン画分はゲル電気泳動において試料溝より陽極側で 2 本の主バンド(A と B) にわかれ、また小さなバンドが試料溝とバンド B との間で 2 本、バンド A よりもさらに陽極側で 3~4 本検出された(第 3~5 図, none urea)。本報では、尿素および 2-メルカプトエタノールに対するこれら各成分のゲル電気泳動挙動を調べ、各々のサブユニット組成について検討した。

(1) 尿素濃度の影響

Fig. 3. Effect of Urea Treatment on Electrophoretical Behavior of Arachin

Arachin was dissolved in buffer (pH 8.6) with various concentrations of urea and stood for 60 min. at 26°C, then run on starch gel without urea.

Fig. 4. Effect of Urea on Electrophoretical Behavior of Arachin

Arachin was run on starch gels with various concentrations of urea.

Fig. 5. Effect of 2-Mercaptoethanol on Electrophoretical Behavior of Arachin

Arachin was run on starch gels with various concentrations of 2-mercaptoethanol.

試料を各濃度の尿素を含む緩衝液に溶解し、1 時間放置後、変性剤を含まないゲルで泳動させた(第 3 図)。バンド A は 4 M 尿素、バンド B は 9 M 尿素処理で完全に消失した。さらに各濃度の尿素を含むゲルで泳動させた結果、バンド A は 3 M 尿素、バンド B は 6 M 尿素存在下で完全に消失した(第 4 図)。したがって、バンド A は B に比べてサブユニットへ解離しやすい成分とみられる。

尿素処理濃度を増すとともに、バンド A よりも速く泳動する多数の小さなバンド(解離体成分)と、試料溝とバンド B の間に帯のように大きく広がった一つのバンドが現われた(第 3 図)。この大きく広がったバンドは尿素存在下の泳動で不鮮明ではあるが 6 本の大きなバンドに解離した(第 4 図)。

Fig. 6. Effect of Urea and 2-Mercaptoethanol on Electrophoretic Behavior of Arachin

Arachin was run on starch gels with 8 M urea and various concentrations of 2-mercaptoethanol.

(2) 2-メルカプトエタノール濃度の影響

試料を各濃度の 2-メルカプトエタノールを含むゲルで泳動させた(第5図)。2-メルカプトエタノールの濃度を増すとともにバンド全部の易動度は著しく減少した。このとき、緩衝液の pH, 泳動時の電流、ゲルと電極の緩衝液の移動界面を示す褐色線の泳動時間にはほとんど変化が認められなかった。しかしながら、分子間 SS 結合が切断されて解離したと思われるバンドは認められず、各バンドにおける量的な変化も観察されなかった。

(3) 尿素と 2-メルカプトエタノール濃度の影響

試料を 8 M 尿素と各濃度の 2-メルカプトエタノールを含むゲルで泳動させた(第6図)。この場合も、尿素を含まないときと同様、2-メルカプトエタノール濃度を増加させるとバンド全部の易動度は著しく低下した。尿素のみを含むゲルでの泳動で解離した不鮮明な 6 本の主バンドは、2-メルカプトエタノールの添加で鮮明な鋭いバンドになった。この主 6 バンドの変化は、2-メルカプトエタノール無添加で不鮮明ではあるがすでに 6 本のバンドに解離していることから、もともとこれら主サブユニット間に SS 結合が関与していたからではなくて、SS 交換反応によって一部のサブユニットが重合したかあるいはサブユニット分子内部の SS 結合のため unfolding が一定に進行せず、したがって 2-メルカプトエタノール無添加で不鮮明になったと思われる。

一方、これら主解離体バンドよりもさらに陽極側へ泳動する多数の小さな解離体バンドは、2-メルカプトエタノール添加の有無にかかわらず鮮明なバンドとなり、数

Fig. 7. Gel Electrophoretic Patterns of Arachin Subunits

Arachin was run on starch gel with 8 M urea and 0.03 M 2-mercaptoethanol.

* stained in green with Amido Black 10 B.

および量の明らかな変化は観察されなかった。したがって、これらの成分は明らかに分子間 SS 結合とは関係しておらず、また SS 交換反応による重合も行なわない成分とみられる。

(4) サブユニット組成

POULIK⁹⁾ の不連続緩衝液系によるデンプンゲル電気泳動で、上記の結果から、アラキンは 8 M 尿素と 0.03 M 2-メルカプトエタノールを含むゲルで最も明確にサブユニットへ解離した。その結果、試料溝より陽極側に 6 本の主バンド(陽極側からバンド a~f, 全体の約 80%), 2 本の小バンド(α と β , 数%) および 14 本の微量バンド、陰極側に 3 本の微量バンドが検出された(第7図)。なお、アミドブラック 10B で蛋白質は通常濃紺に染色されるが、2 本の主バンド b (No. 14) と c (No. 15), 1 本の小バンド α (No. 7), 4 本の微量バンド No. 4, 5, 6, 12 は青緑色に染色されているのが、とくに赤外線ランプのもとで観察されバンドの識別に有効であった。

サブユニットへ未解離の試料を変性剤と還元剤を含むゲルで泳動させても泳動中に十分に解離するのが認められたことから、二次元ゲル電気泳動法でアラキン画分の各成分のサブユニット組成を調べた。バンド A と B はいずれも第7図と全く同じ 6 バンドを主とする 25 バンドに解離した(第8図)。バンド B よりも A の方が量的に多

Fig. 8. Two Dimensional Gel Electrophoretic Patterns of Arachin

I. on starch gel with 0.03 M 2-mercaptoethanol.

II. on starch gel with 8 M urea and 0.03 M 2-mercaptoethanol.

いこと(第3~5図), ゲルと同じ緩衝液中で 14S 成分よりも 9S 成分の方が主であること(第1図 a, d), バンド B よりも A の方がサブユニットへ解離しやすいこと(第3, 4図), 14S 成分よりも 9S 成分の方がサブユニットへ解離しやすいこと(第2図 b, c, e, f), さらにデンプンゲルが分子篩効果を持つことから, バンド A は 9S 成分, バンド B は 14S 成分に相当する。しかも両者は全く同じ解離体バンドよりなることから, TOMBS⁷⁾¹⁰⁾ がポリアクリルアミドゲルの pore size と易動度から推定したように, バンド A はアラキンの単量体, バンド B は二量体に相当することがサブユニットレベルでの電気泳動によって確認された。したがって, 用いた溶媒条件では単量体と二量体の混在していることが明らかである。試料溝とバンド B の間の小さなバンド C と D は, 量的に少ないので小さな解離体バンドは明らかでないが, 6 主バンドが検出されたことからさらに会合した三量体や四量体などに相当すると思われる。バンド A よりも速く泳動する 3~4 本の小さなバンドは, バンド A および B 中の解離体バンド α , β などと易動度がほぼ同じでありコンアラキン成分とは異なること, また試料調製時の凍結乾燥によってさえ解離してくることから, 非常に解離しやすいアラキンの解離体成分の一部と思われる。なお, 本研究で用いた試料からは解離体バンド組成を異にするアラキンは見出されなかった。

これら一連のゲル電気泳動の結果から, 明らかに, 変性剤を透析除去した試料での電気泳動による TOMBS のサブユニットの識別⁵⁾⁶⁾は不十分であり, さらに解離の

不十分な泳動図から 3 種類のアラキンのサブユニット構造の相違を論じているのは適切でないと思われる。また, 解離しやすいサブユニットが存在することから, 彼の報告したごくわずかに易動度を異にする 3 種類のアラキンにしても, そのいずれかが試料調製時に一部のサブユニットが取れた成分である可能性もあり, 今後さらに十分な検討を要するところである。

サブユニットの分子量および N 末端アミノ酸のモル数から CATER⁸⁾⁴⁾ や TOMBS⁵⁾⁶⁾ はアラキンは 6 本のサブユニットからなると報告しているが, ほぼ同割合の 6 本の主バンドに解離することから, 主サブユニットは数において一致する。しかしこのことから逆に主サブユニットの数が 6 本であるとすると泳動図における主バンドは各々単一のサブユニットからなると推定され, したがってアラキンの主サブユニットはたとえ N 末端アミノ酸の同じものがあっても全部異なった種類のものからなることが示唆される。多数の微量バンドが検出されたが, これらの大半は主サブユニットよりも低濃度の変性剤で解離してくる結合力の弱い成分で, 変性剤および還元剤を含まないゲルでの電気泳動においても鋭いバンドとして検出され主サブユニットとは挙動を異にした。コンアラキン成分とは異なること¹¹⁾から, おそらくアラキン分子に結合した成分とみられるが, さらに試料を精製して検討していく必要があろう。

起遠心沈降分析(第2図)とゲル電気泳動(第5, 6図)の結果から, アラキンおよびそのサブユニット間の結合に SS 結合が関与しているとは認められなかった。したがって, アラキンは通常 SS 結合によって重合せず, またサブユニット間の結合は SS 結合を除いた水素結合や疎水結合などによって保持されているとみられる。イオン強度を高めるとサブユニットへの解離がおさえられるが(第2図), これは高イオン強度で形成される二量体が単量体よりも変性剤に対して安定なため(第2~4図)ということが考えられた。

要 約

アラキンのサブユニットへの解離におよぼす尿素, 塩酸グアニジン, 2-メルカプトエタノールの影響について起遠心沈降分析とデンプンゲル電気泳動で検討した。アラキンは, 低イオン強度では 9S (単量体) へ, 高イオン強度では 14S (二量体) へ変化し, 変性剤により 1.5S のサブユニットへ解離するが, 前者に比べて後者の方が安定でありサブユニットへ解離しにくいことがわかった。電気泳動において, サブユニットは 8M 尿素と

0.03 M 2-メルカプトエタノールを含むゲルで最もよく解離し、試料溝より陽極側で6本の主バンド、2本の小バンドおよび14本の微量バンド、陰極側で3本の微量バンドが検出された。これらサブユニット間の結合にSS結合が関与しているとは認められなかった。

本報告は、1971年2月25日に日本農芸化学会東北支部例会(仙台)で発表した。

文 献

- 1) JONES, D. B. and HORN, M. J.: *J. Agr. Res.*, **40**, 672 (1930).
- 2) JOHNSON, P. and SHOOTER, E. M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **5**, 36 (1950).
- 3) CATER, C. W., NAISMITH, W. E. F., THOMPSON, R. H. K. and URE, G. R.: *Nature*, **180**, 971 (1957).
- 4) CATER, C. W. and NAISMITH, W. E. F.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **77**, 98 (1958).
- 5) TOMBS, M. P.: *Biochem. J.*, **96**, 119 (1965).
- 6) TOMBS, M. P. and LOWE, M.: *Biochem. J.*, **105**, 181 (1967).
- 7) TOMBS, M. P.: *Nature*, **200**, 1321 (1963).
- 8) SMITHIES, O.: *Biochem. J.*, **61**, 629 (1955).
- 9) POULIK, M. D.: *Nature*, **180**, 1477 (1957).
- 10) TOMBS, M. P.: *Analyt. Biochem.*, **13**, 121 (1965).
- 11) 四ッ橋一公・柴崎一雄: (未発表)

(昭和48年2月23日受理)