大豆の複合体

(第2報) プロテオリピドの構成成分について

本木正雄*・山内文男*・柴崎一雄*

Complex Components of Soybean

Part II. On the components of proteolipid

MASAO MOTOKI*, FUMIO YAMAUCHI* and KAZUO SHIBAZAKI*

Fractions of lipid and protein were separated from the proteolipid which had been isolated in the previous study. Determination of the lipid moiety showed that the major components were phospholipids, mainly composed of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidic acid and a small amount of glycolipid. The protein moiety contained more hydrophilic amino acids and less acidic amino acids comparing with the amino acid composition of soybean globulin. From these results, the interaction between the lipid and the protein was supposed to be due to hydrophobic and electrostatic bonds. The protein moiety was separated to two components by gel electrophoresis and had two N-terminal amino acids of alanine (major) and glutamic acid.

(Received Dec. 10, 1974)

前報¹⁾で脱脂した大豆のクロロホルム:メタノール(以下C:Mと略す)抽出液から、まず抽出液と同じ溶媒で透析し、ついで水による透析によってフラップを形成させることにより、薄層クロマトグラフィーで単一なプロテオリピドを分離する方法をのべ、その若干の性質を報告した。

本報では分離されたプロテオリピドの脂質部分と蛋白質部分の構成成分についてその組成分析を行なうと共に、両者の結合について考察を行った。

実験方法

1. プロテオリピドの分離

前報と同じ脱脂した大豆から、二重透析¹⁾によって同じ方法で分離したプロテオリピドを用いた。

2. 脂質と蛋白質部分の分離

プロテオリピドは一般に乾燥すると脂質と蛋白質に切断するといわれているが、これだけでは不十分な場合もあるので MURAKAMI ら²⁾のエタノール:エーテルによる抽出で分離する方法も用いた。

凍結乾燥したプロテオリピド 100 mg を、エタノール:エーテル (3:1, 容量比) 50 ml で 0°C, 3 時間抽出を 3 回繰返した後、遠心分離 (15,000 rpm, 20 分, 0°C) してえた上澄区分を減圧濃縮して脂質部分とした。一方残渣を減圧乾燥して蛋白質部分とした。

3. 脂質部分の組成

(1) 薄層クロマトグラフィー

Kiesel gel G (0.25 mm) の薄層 (20×20 cm) を用い、一次元はクロロホルム:メタノール:14 N アンモニア:水 (65:35:5:2.5, 容量比) で、二次元はクロロホルム:メタノール:アセトン:酢酸:水 (100:20:40:20:10, 容量比) で展開³⁾した。検出は脂質全般をヨウ素蒸気、ジクロルフルオレッセン、リン含有脂質を DITTMER 試薬⁴⁾、コリン含有脂質を DRAGENDORFF 試薬⁵⁾、アミノ基含有脂質をニンヒドリン、糖脂質を Anthron 試薬、有機物全般を重クロム硫酸溶液を用いた。脂質の同定および推定はこれらの呈色試験のほか、標準物質との比較、文献値の R_f 値などを参考にした。

* 東北大学農学部食糧化学科 (仙台市堤通雨宮町 1-1)

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

(2) リン脂質の定量

20~30 μ l のリンを含む脂質画分のクロロホルム溶液を(1)の二次元薄層クロマトグラフィーで展開し、ヨウ素蒸気でスポットを検出してかきとり、クロロホルム：メタノール：水：蟻酸(97:97:4:2, 容量比)で2mlづつ4回抽出し、遠心上澄をBARTLETT法⁶⁾でリンを定量した。回収率は最初のスポットしたリン量に対するスポットのリンの合計の割合で表わした。

(3) 脂肪酸の分析

5%塩酸メタノールで100°C, 3時間半加熱してメチルエステルとし、10% DEGS chromosorb W のステンレスカラム(0.3×300 cm)を用い、190°C, 40 ml N₂/min の条件でガスクロマトグラフィー(島津製, GC-4APTF)を行った。同定は標準物質との比較, 相対保持時間の対数と炭素数の関係およびADAMSの酸化白金触媒による接触還元で行ない、測定結果は半値幅法により全体に対するピーク面積の比で表わした。

4. 蛋白質部分の組成

(1) アミノ酸組成

蛋白質部分 15 mg を 5.7 N 定沸点塩酸を用い、110°C, 24 時間加水分解した後、日立 KLA-2 型アミノ酸自動分析計で分析した。

(2) N 末端分析

蛋白質部分 100 mg を DNP 化⁷⁾し、共沸塩酸で 105°C, 15 時間加水分解し、DNP-アミノ酸を Kiesel gel G の薄層(20×20 cm)を用い、一次元をトルエン:

ピリジン:エチレンモノクロルヒドリン:0.8 N アンモニア水(10:3:6:6, 容量比), 二次元をクロロホルム:ベンジルアルコール:酢酸(70:30:3, 容量比)で展開し、スポットを1%重炭酸ソーダで溶出して360 nmで定量した。

(3) デンブングル電気泳動

蛋白質部分を 8 M 尿素, 0.02 M メルカプトエタノール含有 0.76 M トリス-クエン酸緩衝液(pH 8.6)に溶解し、前報¹⁾で述べた方法でゲル電気泳動を行った。

結 果

1. 脂質と蛋白質の分離

100 mg のプロテオリドから凍結乾燥とエタノール:エーテル混液の抽出によって分離された脂質部分は 33 mg, 残りの蛋白質部分は 56 mg で、100 分比は 37:63 であった。

2. 脂質部分の組成

(1) 脂質部分の薄層クロマトグラフィー

透析前の C:M 抽出物とプロテオリドについての結果を第1図に示した。透析前の抽出物ではアシルステリルグルコシド(ASG), ステリルグルコシド(SG), ジガラクトシルジグリセリド(DGDG), セレブロシド(CS)などの糖脂質と、リン脂質はホスファチジルコリン(PA), ホスファチジルエタノールアミン(PE), ホスファチジン酸(PA), ホスファチジルイノシトール(PI), ホスファチジルセリン(PS)が同定された。溶媒の先端

Fig. 1. Thin-layer chromatogram of lipids

(a) C:M extracts of defatted soybean

(b) Lipid moiety of proteolipid

Sol. I, CHCl₃:MeOH:14N.NH₄OH
(65:35:5, by vol.)

Sol. II, CHCl₃:Aceton:MeOH:AcOH:H₂O
(100:40:20:20:10, by vol.)

近くに現われるリン脂質(DITTMER 試薬陽性)は SINGH⁸⁾らが未熟大豆のリン脂質画分の薄層クロマトグラフィーでアシルホスファチジルエタノールアミン(APE)としているが、カルジオリピンもこの位置近くなのでいずれか確認できなかった。これに比べプロテオリド質の場合は糖脂質として SE が検出されたのみで、リン脂質としては PC, PE, PA が見出されたが、ほかに原点附近の DITTMER 試薬発色部分はリン化合物だけでなく、PI なども混在している可能性があるが同定はできなかった。

(2) リン脂質の定量

プロテオリドの脂質部分と共に透析前の C:M 抽出物¹⁾, 市販大豆レシチン(和光純薬)について定量した結果を第1表に示した。

Table 1. Phospholipid composition
(relative phosphorus amount, %)

Phospholipid	Commercial soybean lecithin	Total lipid*	Proteolipid
Cardiolipin and/or Acylphosphatidyl- ethanolamine	6.2	2.9	
Phosphatidylethanol- amine	24.6	18.2	11.8
Phosphatidylglycerol	0.2	3.9	
Phosphatidylcholine	29.7	41.2	39.7
Phosphatidic acid	10.8	8.5	7.1
Phosphatidylinositol	18.6	20.9	
Phosphatidyl serine	0.3	1.0	40.4
X (unknown)	5.8	3.7	
Recovery	65.3	67.1	60.5

* C:M(2:1) extract of the defatted soybean

大豆レシチンのリン脂質の定量についてはすでに報告がなされているが、薄層クロマトグラフィーによる結果は少ない。従来方法では PS が多い報告⁸⁾であるが、一般に植物には少いとされており⁹⁾、ここでも 1.6% であった。市販レシチンに比べて C:M 抽出物は PC が増加し、PE が減少しているが、原料も異なるので厳密な比較にはならない。プロテオリビドの組成は比較的単純で、PC, PE, PA などが主で、原点附近のリン脂質は分離が不良で定量できなかった。

(3) 脂肪酸組成

結果を第2表に示した。プロテオリビドの構成脂肪酸は大豆リン脂質の結果と同様に、パルミチン酸とリノ-

Table 2. Fatty acid composition

Fatty acid	Proteolipid (%)	Soybean ¹⁰⁾ phospholipid (%)
12:0	0.1	
14:0	0.1	0.2
15:0	0.1	
16:0	36.6	17.3
17:0	0.5	
18:0	3.8	2.7
18:1	5.5	4.3
18:2	48.0	61.7
18:3	2.4	7.8
20:3	4.3	
unknown		4.3

ル酸が多いが、その組成比は異っている。すなわち全リン脂質¹⁰⁾に比べてパルミチン酸が多くリノール酸が少くなっている。このようにプロテオリビドの脂肪酸は必ずしも大豆のリン脂質と同じではなく、幾分飽和度が高かった。

3. 蛋白質部分組成

(1) アミノ酸分析

第3表にプロテオリビドと大豆グロブリン¹¹⁾のアミノ酸分析結果を示す。Try と Cys はこの酸分解の条件では破壊されたとみられ、ほとんど含まれていなかった。プロテオリビドには NH₃ が多いが、これは PE によるものとみられる。蛋白質部分には Gly, Ala, Val, Leu 等の中性アミノ酸の含量が多い。

(2) N 末端アミノ酸分析

エーテル層の DNP-アミノ酸は Ala と Glu でその比は 9:1 でほとんど Ala が主であった。水層、酢酸エチル層とも DNP-His は検出されなかった。

(3) デンブングル電気泳動

プロテオリビドの蛋白質部分の比較のために、水抽出蛋白質も泳動させその結果を第2図に示す。プロテオリビドの蛋白質部分には2つのバンドが認められ、バンド I は水抽出蛋白質のまたは4バンド¹²⁾に相当し、バンド II は 7S 蛋白質の解離体であるバンド 10 に相当する位

Table 3. Amino acid composition
(relative weight %)

Amino acid	Proteolipid	Soybean ¹¹⁾ globulin
Lys	2.9	5.8
His	2.9	2.3
NH ₃	1.2	2.1
Arg	5.0	7.5
Asp	7.4	12.1
Thr	5.5	3.5
Ser	5.5	5.5
Glu	6.5	21.5
Pro	5.5	5.2
Gly	7.5	3.9
Ala	9.8	3.7
Val	7.1	4.5
Met	1.5	1.2
Ileu	6.7	4.6
Leu	12.9	7.6
Tyr	4.9	3.7
Phe	7.3	5.3

Fig. 2. Starch gel electrophoretal patterns and schematic diagrams

A. Water-extracted protein

B. Protein moiety of proteolipid

Using tris-buffer, pH 8.6, containing 8 M urea and 0.02 M mercaptoethanol

置にあった。

(4) 蛋白質部分の溶解性

プロテオリビドの蛋白質部分はクロロホルム：エーテル：メタノールなどの脂溶性溶媒に不溶であり、また水、種々の pH の緩衝液にも不溶であった。この原因は疎水性アミノ酸を多く含むことと共に、変性によって部分的に不溶化されているものとみられ、8 M 尿素、0.02 M メルカプトエタノールを含むトリス-グエン酸緩衝液 (pH 8.6) には溶解した。

考 察

プロテオリビド中の脂質と蛋白質は分離した重量によると 37 : 63 で、前報の分析値の 33 : 66 に近い値を示した。脂質中のリン含量からリン脂質含量 (リン含量 × 25) を計算すると、脂質部分の 65% がリン脂質で、リン脂質が主成分であることは、脂質部分の薄層クロマトグラフィーの結果からも認められた。すなわち透析前の C : M 抽出物には数種の糖脂質が認められたが、プロテオリビド中には SG しか見出されず、他はリン脂質であった。リン脂質中、PC, PE が主成分であることは変りないが、他に PA が認められたのみでリン脂質の種類は少なかった。このことから蛋白質に直接あるいはより強く結合しているのは、脂質のうちでもリン脂質であり、糖脂質はリン脂質-蛋白質複合体にさらに結合し、さらに脂肪などとの会合を助けているものと推定される。

蛋白質部分で特徴的なのはそのアミノ酸組成である。アミノ酸のうちで Ala, Val, Leu, Ileu, Tyr, Pro などの疎水性の強いアミノ酸であり、プロテオリビドには非常に多い。大豆グロブリンと比較するために、文献値¹¹⁾の Try, Cys を除いたアミノ酸の重量%でみると、大豆グロブリンの疎水性アミノ酸が 29% であるのに対

し、このプロテオリビドは 47% に達する。動物組織中のプロテオリビドの疎水性アミノ酸が多いのは一般的傾向であるが、このように大豆でも同じ結果が得られ、脂質と蛋白質の結果はより疎水結合の強い可能性を示している。

つぎに大豆グロブリン中では酸性アミノ酸の Glu と Asp の含量が最も多く、両者で 34% を占めるが、プロテオリビド中ではその半分以下の 14% にすぎない。また塩基性アミノ酸/酸アミノ酸の比は大豆グロブリンが 0.46 であるが、プロテオリビドでは 0.78 に達し塩基性アミノ酸が増加している。このことは、脂質成分でも糖脂質が減少し、酸性の性質のより強いリン脂質が多くなることを考え合せ、蛋白質とリン脂質の静電的な結合を示唆するものと考えられる。

蛋白質部分のサブユニットはゲル電気泳動ならびに N 末端分析によって、少なくとも 2 個あることが示された。前報でプロテオリビドのゲル電気泳動によって、やはり先端近くのバンドとより原点に近いバンドが現れたことから、蛋白質部分は凍結変性しなくとも尿素とメルカプトエタノールによって二つの解離体に分離するものと考えられる。

要 約

脱脂した大豆から分離したプロテオリビドを脂質と蛋白質に分離して、それぞれの構成成分の検討を行った。脂質部分では市販大豆レシチンに比べて、糖脂質が少なく大部分がリン脂質で、そのうち PC と PE, PA が主に認められた。蛋白質部分のアミノ酸組成は疎水性アミノ酸が非常に多く、酸性アミノ酸が減少し相対的に塩基性アミノ酸が増していた。これらのことから脂質と蛋白質の結合は、疎水結合と、静電結合の可能性が示唆された。蛋白質部分は電気泳動によって 2 個の組成に解離し、N 末端はアラニンと少量のグルタミン酸の 2 個であった。

文 献

- 1) 山内文男・本木正雄・柴崎一雄: 食品工誌, 22, 154 (1975).
- 2) MURAKAMI, M., SEKINE, H. and FUNAHASHI, S.: *J. Biochem.*, 51, 431 (1962).
- 3) SINGH, H. and PRIVETT, O. S.: *Lipids*, 5, 692 (1970).
- 4) DITTMER, J. C. and LESTER, R. L.: *J. Lipid Res.*, 5, 126 (1964).
- 5) WAGNER, H. and HÖRHAMMER, L. and WOLF, P.: *Biochem. Z.*, 334, 175 (1961).

-
6) BARTLETT, G.R.: <i>J. Biol. Chem.</i> , 234 , 466 (1959).	10) 柴崎一雄・木村繁昭: 食品工誌, 16 , 277(1969).
7) SANGAR, F. and THOMPSON, E. O. P.: <i>Biochem. J.</i> , 53 , 353 (1953).	11) CATSIMPOOLAS, N., ROGERS, D. A., CIRCLE, S. J. and MEYER, E. W.: <i>Cereal Chem.</i> , 44 , 631 (1967).
8) 中尾典子・江井 仁・太田静行: 油化学, 14 , 278 (1965).	12) 柴崎一雄・大久保一良: 食品工誌, 12 , 521 (1965).
9) WAGNER, H. and WOLF, P.: <i>Fette, seifen,</i>	(昭和 49 年 12 月 10 日受理)
-