蛍光色素モノブロモバイメイン標識による大豆タンパク質 ジスルフィド結合の解析

門間美千子[§], 関 友子, 羽鹿牧太*

独立行政法人食品総合研究所

* 独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構作物研究所

Analysis of Disulfide Bonds in Soybean Proteins using Fluorescence Labeling by Monobromobimane (mBBBr)

Michiko Momma[§], Tomoko Seki and Makita Hajika*

National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642

* National Institute of Crop Science, 2-1-18 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8518

Disulfides bonds in soybean proteins were estimated by labeling with a fluorescent reagent, monobromobimane (mBBBr) and subsequent electrophoresis. Prior to the labeling by mBBBr, disulfide bonds in the proteins were chemically reduced by 0.5 mM dithiothreitol (DTT) at room temperature. Acidic and basic subunits of glycinin, and Bowman-Birk protease inhibitors were detected as major bands in the soybean proteins. It is found that fluorescence intensity of basic subunit of glycinin correlated significantly to the rupture stress of Tofu using 33 varieties of domestic soybean.

(Received Dec. 24, 2003 ; Accepted May 14, 2004)

良質のタンパク質を含む大豆は、アジアを中心に重要な食糧資源となっており、近年は様々な健康機能についても注目されている。発酵食品・非発酵食品を含め、その用途範囲は広く、代表的なものに豆腐があげられる。豆腐に加工することにより、大豆の有害成分が除去され、タンパク質の消化性も飛躍的に改善される。また、調理が容易になり、油あげやがんもどき、凍り豆腐にも加工される。我が国で消費される食品用大豆の約半分が豆腐加工に使用されている。

大豆タンパク質の豆腐ゲル形成については数多くの研究が行われてきた^{1)~3)}。豆腐ゲルのネットワーク構造は、大豆タンパク質が加熱変性し、解離会合、凝集することにより形成される。大豆タンパク質の加熱によるゲル化のメカニズムについては詳細に調べられ、タンパク質分子が、疎水結合を主力として線状会合体を形成し、続いてSS結合による分岐状会合体をつくり、これに水素結合が補ってネットワークをつくると考えられている⁴⁾。大豆の主要タンパク質の中ではグリシニン（11S グロブリン）のSS結合の含量が高く、単離大豆タンパク質を用いた実験で、11S グロブリンのSS結合が、ゲルの硬さに影響することが

示されている⁵⁾。

実際の豆腐加工試験において、Todaらは、凝固剤濃度を最適化することにより、タンパク質含量が豆腐の硬さと相関することを示した⁶⁾。しかし、それぞれのタンパク質成分やさらにそのサブユニット成分と豆腐加工特性の関係は不明である。

また、大豆は主要貯蔵タンパク質以外にも、豆臭発生に関与するリポキシゲナーゼや、プロテアーゼインヒビター、主要アレルゲンタンパク質である *Gly m Bd 30K* 等のSSタンパク質を含んでいる。こういったSSタンパク質の多くが、化学的あるいは酵素的にSS結合を還元することにより失活することが報告されており^{7)~9)}、タンパク質のSS架橋結合の効率的な制御は、食品加工において重要な課題と考えられる。

本研究では、近年、アレルゲンタンパク質の検索¹⁰⁾等に活用されている、蛍光色素モノブロモバイメイン (mBBBr) による標識手法¹¹⁾¹²⁾を用い、大豆タンパク質中でのSS結合の分布状況を調べ、さらにSSタンパク質と、国産大豆品種の豆腐加工適性との関係を検討した。

実験方法

1. 試料

国産大豆 33 品種 (表 1) を試料として用いた。試料大豆

〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

* 〒305-8518 茨城県つくば市観音台 2-1-18

[§] 連絡先 (Corresponding author), michiko@affrc.go.jp

表 1 mBBBr による蛍光標識および豆腐加工試験に用いた大豆品種

1 大袖の舞	11 スズマル	21 いちひめ	31 すずこがね
2 カリュタカ	12 おおすず	22 タチナガハ	32 むらゆたか
3 キタムスメ	13 コスズ	23 たまうらら	33 フクユタカ
4 ツルムスメ	14 ミヤギシロメ	24 納豆小粒	
5 トヨコマチ	15 リュウホウ	25 ハタユタカ	
6 トヨホマレ	16 スズユタカ	26 ナカセンナリ	
7 トヨムスメ	17 エンレイ	27 ほうえん	
8 ハヤヒカリ	18 オオツル	28 ギンレイ	
9 ユウヅル	19 タマホマレ	29 あやこがね	
10 音更大袖振	20 アキシロメ	30 さやなみ	

10 g を小型粉碎機（柴田 SCM40-A）で 1 分間粉碎後、60 メッシュの篩にかけ試料粉末とした。試料粉末は使用時まで -20°C で保存した。

2. タンパク質の還元とモノプロモバイメイン (mBBBr) による蛍光標識

試料粉末 500 mg を、抽出用緩衝液 (1 mM フェニルメタンソルホニルフルオライド (PMSF), 0.02% アジ化ナトリウム, 30 mM トリス緩衝液, pH 7.9) 10 ml と混合し、ヒスコトロン (日音医理科 NS-50) で 1 分間ホモジナイズした後、 $10\,000\times g$ で 20 分間遠心した。上清をさらに $10\,000\times g$ で 10 分間遠心分離し、この上清を試料溶液とした。試料溶液 $10\,\mu\text{l}$ を、0.5 mM ジチオスレイトール (DTT) を含む緩衝液 (30 mM Tris-HCl, pH 7.9) に添加し、室温で 20 分おき、SS 結合を還元した。次に、20 mM mBBBr を $5\,\mu\text{l}$ 加え、室温で 15 分間おいた後、100 mM β -メルカプトエタノールを $10\,\mu\text{l}$ 、20% SDS を $5\,\mu\text{l}$ 加え反応を停止し、さらに 80% グリセロールと 0.005% プロモフェノールを含む SDS-PAGE 試料液を添加した。コントロールとして、還元処理をしていない試料を同様に mBBBr で標識した。

3. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

2. で得られた mBBBr 標識試料を、分子量マーカー (プレシジョンプロテインスタンダード、バイオラッド 161-0362) とともに、5-20% ポリアクリルアミドゲル (アトール PAGEL 520L) を用いて、Leamml 法¹³⁾により、80 分間 20 mA 定電流で電気泳動した。多検体の比較に際しては、一枚のゲルで泳動できる試料数が 7 点に限られるため、各ゲルで同一試料 (品種: エンレイ) を泳動し、ゲル間の蛍光強度の誤差を補正した。泳動後のゲルを 12% トリクロ酢酸で 1 時間固定後、脱色液 (40% (v/v) メタノール, 10% (v/v) 酢酸) 中で 2 時間浸とうし、過剰な mBBBr を除いた。蛍光標識されたタンパク質を 365 nm のトランスイルミネータ上で検出し、黄色フィルターを装着したポラロイドカメラで写真撮影した。また、同様に 365 nm で検出したバンドの蛍光強度を、画像解析装置 (バイオラッド ゲルドック 1000, モレキュラーイメージャー) で計測した。計測後のゲルをクーマジーブリリアントブルー (CBB) R250 で染色し、同画像解析装置のデンストメー

ターから画像を取り込み、バンド濃度を測定した。これらの結果から、mBBBr 標識したときの主要バンドの蛍光強度と CBB 染色におけるバンド濃度を比較した。

通常の SDS-PAGE パターンと mBBBr 標識電気泳動のパターンを比較するため、2. で得られた、DTT による還元処理ならびに mBBBr 標識を行っていない試料溶液についても Leamml 法¹³⁾により SDS-PAGE を行い、CBB R250 で染色した。

4. 二次元電気泳動

大豆 (品種: トヨムスメ) の SS タンパク質を、2. に述べた方法で蛍光標識した。これを蒸留水中で 3 時間透析後、ウルトラフリー MS (ミリポア) で 7 倍に濃縮したものを、二次元電気泳動で分析した。泳動はマルチフォア II システム (アマシャムフェルマシアバイオテック) を用い、前報¹⁴⁾と同様に、機器添付説明書に従って行った。すなわち、試料溶液 $50\,\mu\text{l}$ に膨潤用溶液 (8 M 尿素, 2% CHAPS, 痕跡量のプロモフェノールブルーを含む保存溶液に 7 mg/2.5 ml DTT と $50\,\mu\text{l}/2.5\,\text{ml}$ の IPG 緩衝液 (3-10NL) を加えたもの) $100\,\mu\text{l}$ を混合し、試料液とした。膨潤トレイに、試料液 $125\,\mu\text{l}$ を滴下し、IPG ストリップ (pH3-10NL, 7 cm) を一晩膨潤した。膨潤後の IPG ストリップを、軽く水洗した後、水平型電気泳動装置に装着し、200~3500 V で 90 分間、3500 V で 65 分間等電点泳動した。泳動後の IPG ストリップを、SDS 平衡化緩衝液 (50 mM トリス緩衝液, pH 8.8, 6 M 尿素, 30% (w/v) グリセロール, 2% SDS, 痕跡量のプロモフェノールブルー, 10 mg/ml DTT) 中で 15 分間振とうした。これを封入用アガロース溶液 (0.5% アガロース, 痕跡量のプロモフェノールブルーを含む SDS 泳動緩衝液を加熱溶解したもの) で、5~20% グラジエントゲル (アトール NPG-D520L) に固定し、縦型電気泳動装置 (アトール AE6450/6440) を用いて泳動した。泳動後のゲルを上記 SDS-PAGE の場合と同様に処理し SS タンパク質および全タンパク質を検出した。

5. 充填豆腐の調製と破断応力の測定

大豆 25 g に 3 倍量の水を加え、室温で 16 時間浸漬後、大豆の重量を測定し、乾燥重量の 6 倍となるように水を加えた。これをミキサーで 1 分間磨砕した後、ミラクロスで

絞りとり、さらに 95℃ で 5 分間加熱し、豆乳を得た。豆乳 50 ml を 100 ml のガラスビーカーに入れ、これに 0.178 g/0.6 ml グルコノデルタラクトン (GDL, 藤沢製薬 豆腐用 フジグルコン) を加え混合し、80℃ で 1 時間加熱後水冷した。形成された充填豆腐 (直径 49 mm, 高さ 25 mm) をビーカーに入れたまま、卓上型物性測定器 (山電 TPU-2S) を用いてゲル強度を測定した。測定は直径 8 mm のプランジャーを用い、毎秒 2.5 mm の速度で 17 mm 貫入して破断強度を測定し破断応力を求めた。

実験結果および考察

1. 大豆タンパク質 SS 結合の蛍光標識

大豆タンパク質の SS 結合を蛍光色素 mBBr で標識後、SDS 電気泳動した典型的なパターンを Fig. 1 に示した。タンパク質の SS 結合を還元する方法としては、今回使用した室温下での 0.5 mMDTT 処理の他に、5 mMDTT 存在下での 100℃ 加熱、 β -メルカプトエタノール、大腸菌由来のチオレドキシン *h* とチオレドキシン還元酵素を用いたチオレドキシン酵素系、グルタチオン酵素系等があげられ

る。これらの還元方法について予備実験を行ったところ、室温での 0.5 mMDTT 処理とチオレドキシン酵素系で同程度の強い蛍光標識が見られた。そこで、本研究では、操作が簡便な 0.5 mMDTT による室温での還元処理を行った。

Fig. 1A に示したように、SDS-PAGE では、グリシニン (11S グロブリン) と β -コングリシニン (7S グロブリン) が主要なタンパク質として検出される。タンパク質の SS 結合を DTT によって還元した後、蛍光色素 mBBr で標識すると、グリシニンの酸性サブユニットおよび塩基性サブユニットに由来するバンドが強く蛍光標識された。mBBr 標識に先立って還元処理をしていないコントロール (Fig. 1A 中央) でも、グリシニンのサブユニット成分、特に塩基性サブユニットのうち B3 成分に薄い蛍光標識がみられ、システイン残基の一部が遊離していることが示された。Wolf らは、グリシニンを完全に還元したときの SH 量 (42 mol/mol of glycinin) のうち約 4% が自然状態で遊離していること報告している¹⁵⁾¹⁶⁾。グリシニンの各サブユニットの他には、低分子量領域の Bowman-Birk プロテアーゼインヒビターが、強く蛍光標識された。これらの主要なバン

Fig. 1 mBBr (monobromobimane) labeling of soybean extract

A, SDS-PAGE (CBB stained) and mBBr labeling

Left, SDS-PAGE (CBB stained); Middle, mBBr labeling, non-reduced (control); Right, mBBr labeling, reduced by 0.5 mM DTT LX, lipoxygenase²⁰⁾; α and α' , α -subunits of β -conglucinin²⁰⁾; β , β -subunits of β -conglycinin²⁰⁾; A3, GA, acidic subunits of glycinin²⁰⁾; Lc, lectin¹⁸⁾; Gm, Gly m Bd 30K²¹⁾; Deh, dehydrin²²⁾; B3, GB, basic subunits of glycinin²⁰⁾; BBI, Bowman-Birk protease inhibitor (confirmed by SDS-PAGE of commercial protein).

B, Relative fluorescence intensity of glycinin subunits and Bowman-Birk protease inhibitor in mBBr labeled gel (a) and density of those in CBB stained gel (b)

□, acidic subunits of glycinin; ▨, basic subunits of glycinin; ■, Bowman-Birk protease inhibitor.

Samples, 4, Tsurumusume, 7, Toyomusume, 16, Suzuyutaka, 17, Enrei, 22, Tachinagaha, 33, Fukuyutaka

ドの他に、 β -コングリシニンの α -、 α' -サブユニットや、大豆の主要アレルゲンである *Gly m Bd 30K* と見られるバンドが検出された。

2. デンシトメトリーによる蛍光強度の測定

上に述べたように、大豆タンパク質の mBBR 標識では、主として、グリシニンの酸性および塩基性サブユニット、ならびに Bowman-Birk プロテアーゼインヒビターが検出されることが明らかになった。次に、国産大豆 6 品種について、これらの主要バンドの mBBR 蛍光標識強度と、CBB 染色したときの濃度をデンシトメーターで測定した (Fig. 1B)。グラフの縦軸は、デンシトメーターでの相対的計測値を示している。

CBB 染色濃度では、グリシニンの各サブユニットのうち、塩基性サブユニットの方が全般的に高い値を示した。これに対して、タンパク質の SS 結合を検出する mBBR 標識では、グリシニン各サブユニットの蛍光強度は同程度か、酸性サブユニットの方がやや高い傾向があった。

Bowman-Birk プロテアーゼインヒビターの CBB 染色濃度は、いずれの品種でも非常に低かったが、mBBR 標識では、グリシニンの各サブユニットと同等の高い値を示した。つまり、タンパク質量は少ないが、多量のシステイン残基をもつために、mBBR によって強く標識されていることを示している。Bowman-Birk プロテアーゼインヒビターには、10 種類の多型が報告されている。大豆の系統により含まれる多型成分は異なるが、全般にシステイン含量は高く、例えば C-II では全アミノ酸の 18% がシステインである¹⁷⁾。

以上の結果から、大豆タンパク質に含まれる SS 結合のうち、主として、グリシニンの酸性サブユニット、塩基性サブユニットおよび Bowman-Birk プロテアーゼインヒビターが、DTT による温和な還元条件で検出されること

が明らかとなった。これらの SS タンパク質が大豆加工工程において、解裂・再会合しネットワーク構造を形成に関与するものと考えられる。

3. 二次元 mBBR 標識電気泳動

大豆タンパク質での SS 結合の分布をさらに詳細に検討するために、蛍光標識したタンパク質を二次元電気泳動で分離した (Fig. 2)。SDS-PAGE でグリシニン酸性サブユニットが検出される分子量 35 kDa 付近には、広範囲にグリシニン酸性サブユニットのスポットが検出された。微量成分を検出できるよう多量のサンプルを泳動しているため、スポットの分離が悪くなっているが、酸性サブユニット成分のパターンは、Lei ら¹⁸⁾ による、大豆タンパク質の二次元電気泳動パターンと一致した。Fig. 2A に見られるように、この分子量領域では、グリシニン酸性サブユニット以外のタンパク質はほとんど検出されなかった。

グリシニン塩基性サブユニットは、今回用いたような等電点電気泳動条件では陽極側にシフトして検出されてこないことが知られている¹⁸⁾。そのため、Fig. 2A の蛍光標識タンパク質の二次元電気泳動において、分子量 20 kDa 付近の領域で、Kunitz トリプシンインヒビター (KI) のみが検出された。Sato ら¹⁹⁾ の定量解析によると Kunitz トリプシンインヒビターはグリシニンの約 8% 程度存在し、分子内に 2 個の SS 結合をもっている。したがって、Fig. 1B のグリシニン塩基性サブユニットバンドの蛍光強度には、Kunitz トリプシンインヒビターの混在の影響があるものと考えられる。また、この分子量領域の塩基性側には、mBBR 蛍光標識では検出されないが、CBB によって染色される複数のスポット (Fig. 2B, a) がみられた。SDS-PAGE ゲルを CBB 染色したとき (Fig. 1B)、グリシニンの塩基性サブユニットの濃度が高いことには、これらの成分が関与しているものと考えられる。

Fig. 2 Two-dimensional electrophoresis of mBBR labeled protein

A ; mBBR labeled protein

B ; CBB stained SDS-PAGE

arrows, mBBR-labeled proteins ; KI, Kunitz trypsin inhibitor¹⁸⁾ ; a, 20 kDa proteins, which are not labeled with mBBR ; b, β -subunits of β -conglycinin¹⁸⁾ ; c, dehydrin²²⁾.

分子量 15 kDa 付近には酸性側に強く蛍光標識される複数のスポットが検出された。先に述べたように、Bowman-Birk プロテアーゼインヒビターが、システイン含量が高く、多型性があることから、これらのスポットは Bowman-Birk プロテアーゼインヒビターと推定された。

全体として、二次元電気泳動 CBB 染色で検出されたスポット (Fig. 2B) のうち 17 個のスポットが mBBBr で標識されていた。SS 結合をもたないことが知られている、 β -コングリシニンの β -サブユニット (Fig. 2B, b) やデハイドリン (Fig. 2B, c) は、CBB 染色でのみ検出された。

4. 豆腐加工試験

豆腐ゲルの硬さに対する SS タンパク質成分の影響を調べるため、大豆タンパク質 mBBBr 蛍光標識 SDS-PAGE における主要バンドの蛍光強度と、豆腐の破断応力との関係を検討した。国産大豆 33 品種から、グルコノデルタラクトンを用いて凝固、調製した充填豆腐の破断応力を、Fig. 3 に示した。豆腐破断応力には、約 3 倍の開きがあり、ナカセンナリやハタユタカが高い値を示し、トヨコマチ、コスズ等の破断応力が低かった。この 33 品種の大豆品種について、Fig. 1B と同様に、グリシニンの酸性サブユニット、塩基性サブユニット、Bowman-Birk プロテアーゼインヒビターの蛍光標識強度を測定し、豆腐の破断応力と大豆タンパク質 SS 結合の蛍光標識強度との相関を調べた。Fig. 4 に、各タンパク質バンドの蛍光強度と豆腐破断応力との関係を示す。グリシニン塩基性サブユニットは、相関係数 0.69 で豆腐破断応力と正の相関があった (Fig. 4B)。グリシニン酸性サブユニットも正の相関を示したが、相関係数

は 0.39 とやや低かった。一方、Bowman-Birk プロテアーゼインヒビターの蛍光強度と、豆腐の破断応力の間には相関関係は見られなかった (Fig. 4C)。つまり、Bowman-Birk プロテアーゼインヒビターは多量の SS 結合を含有しているが、これらの SS 結合は豆腐ゲルネットワークには関与していないものと推察される。

大豆タンパク質が熱変性し、ゲルネットワーク構造を形成する際に、タンパク質分子間の SS 結合による架橋が重要な役割を果たしている。Saio らは、大豆の SH 試薬で処理した 7S および 11S グロブリン (β -コングリシニンおよびグリシニン) を塩化カルシウム存在下でゲル化し、11S グロブリン (グリシニン) の SS 結合が豆腐ゲルの硬さに寄与していることを示した⁵⁾。今回の実験で、33 種の国産大豆から調製した豆腐において、グリシニンサブユニットの SS 結合標識強度と、豆腐の破断応力の間に関係が見られた。このことにより、実際の豆腐加工特性におけるグリシニン SS 結合の重要性が示された。特に、グリシニン塩基性サブユニットの SS 架橋結合と、豆腐の硬さの関係が明らかとなった。一方、Bowman-Birk プロテアーゼインヒビターは、多量の SS 結合を含有しているが、その混在は、ゲルネットワークの構造にほとんど寄与していないことが示唆された。

今回の実験結果で蛍光標識法を用いることにより、大豆タンパク質成分の SS 結合の解析を容易に行うことができ、大豆に含まれるそれぞれのタンパク質の SS 結合と、食品特性との関係を解明するのに役立つことが示された。

国産大豆はロットが小さいことが利用の制限要因になっ

Fig. 3 Rupture stress of tofu gel prepared from 33 varieties of soybean

1, Ohsodenomai, 2, Kariyutaka, 3, Kitamusume, 4, Tsurumusume, 5, Toyokomachi, 6, Toyohomare, 7, Toyomusume, 8, Hayahikari, 9, Yuzuru, 10, Otohoke-ohhurisode, 11, Suzumaru, 12, Ohsuzu, 13, Kosuzu, 14, Miyagishirome, 15, Ryuho, 16, Suzuyutaka, 17, Enrei, 18, Ohtsuru, 19, Tamahomare, 20, Akishirome, 21, Ichihime, 22, Tachinagaha, 23, Tamaurara, 24, Nattosyoryu, 25, Hatayutaka, 26, Nakasen-nari, 27, Hoh-en, 28, Ginrei, 29, Ayakogane, 30, Sayanami, 31, Suzukogane, 32, Murayutaka, 33, Fukuyutaka

Fig. 4 Relationship between mBBR-labeled intensity and rapture stress of Tofu

A, Glycinin acidic subunit ; B, glycinin basic subunit ; C, Bowman-Birk protease inhibitors.

*, $p < 0.02$; **, $p < 0.001$

ており、簡便な豆腐加工適性評価の開発が期待される。その他にも、大豆の主要アレルゲンである *Gly m Bd 30K* タンパク質や、豆臭原因酵素であるリボキシゲナーゼ等の、大豆を利用する上で問題となる重要性の高い SS タンパク質の解析への応用も期待される。一方、グリシニン塩基性サブユニットバンドでの Kunitz トリプシンインヒビターの混在に見られるように、SDS-PAGE による分析だけでは、タンパク質の識別がむずかしい場合がある。電気泳動条件の検討や二次元電気泳動法の活用により、詳細な解析方法を開発していく必要がある。

要 約

大豆タンパク質の SS 結合をジチオスレイトールで還元し、蛍光色素モノブロモバイメイン (mBBR) で標識し、電気泳動で解析した。グリシニンの酸性サブユニット、塩基性サブユニット、Bowman-Birk プロテアーゼインヒビターに由来する主要バンドが見出された。二次元電気泳動上のスポットのうち、17 個のポリペプチドが mBBR 蛍光標識で検出された。国産大豆 33 品種について、mBBR 標識されたバンドの蛍光強度と、豆腐の物性の関係を調べた。グリシニン塩基性サブユニットおよび酸性サブユニット

が、それぞれ相関係数 0.69 および 0.39 で豆腐の破断応力と正の相関があったが、Bowman-Birk プロテアーゼインヒビターには豆腐破断応力との相関関係が見られなかった。豆腐のゲル形成にはグリシニンの塩基性サブユニット成分が寄与するものと推定された。

データの統計処理についてご指導いただいた食品総合研究所内藤成弘博士に感謝いたします。本研究の一部は、農林水産省食品総合プロジェクト「健全な食生活による生活習慣病予防のための研究開発」(1-405) により実施されたものであり、ここに謝意を表します。

文 献

- 1) Mori, T., Nakamura, T., Utsumi, S., Gelation mechanism of soybean 11S globulin : Formation of soluble aggregates as transient intermediates, *J. Food Sci.*, **47**, 26-30 (1981).
- 2) Ono, T., Katho, S., Mothizukki, K., Influences of calcium and pH on protein solubility in soybean milk, *Biosci., Biotech., Biochem.*, **57**, 24-28 (1993).
- 3) Fukushima, D., Recent progress in research and technology on soybeans, *Food Sci. Technol. Res.*, **7**, 8-16 (2001).

- 4) Kohyama, K., Sano, Y., Doi, E., Rheological characteristics and gelation mechanism of tofu (soybean curd), *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1808-1812 (1995).
- 5) Saio, K., Kajikawa, M., Watanabe, T., Food Processing Characteristics of soybean proteins. Part II Effect of sulfhydryl groups on physical properties of tofu-gel, *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 890-898 (1971).
- 6) Toda, K., Ono, T., Kitamura, K., Hajika, M., Takahashi, K., Nakamura, Y., Seed protein content and consistency of tofu prepared with different magnesium chloride concentrations in Japanese soybean varieties, *Breeding Sci.*, **53**, 217-223 (2003).
- 7) 門間美千子, 杉本敏男, 橋詰和宗, 斎尾恭子, 大豆ホモジネート中のリボキシゲナーゼ活性に対する各種阻害剤の効果, 日本食品工業学会誌, **37**, 625-627 (1990).
- 8) Buchanan, B.B., Adamidi, C., Lozano, R.M., Yee, B.C., Momma, M., Kobrehel, K., Ermel, R., Frick O.L., Thioredoxin-linked mitigation of allergic responses to wheat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5372-5377 (1997).
- 9) del Val, G., Yee, B.C., Lozano, R.M., Buchanan, B.B., Ermel, R.W., Lee, Y.-M., Frick, O.L., Thioredoxin treatment increases digestibility and lowers allergenicity of milk, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **103**, 690-697 (1999).
- 10) Yano, H. and Kuroda, S., Identification of Disulfide Proteins in the Salt Soluble Fraction of Rice (*Oryza sativa*) Seed., *Cereal Chem.*, **80**, 172-174 (2003).
- 11) O'Keefe, D.O., Quantitative electrophoretic analysis of proteins labeled with monobormobimane, *Analytical Biochem.*, **222**, 86-94 (1994).
- 12) Wong, J.H., Yano, H., Lee, Y.-M., Cho, M.-J., Buchanan, B. B., Identification of thioredoxin-linked proteins by fluorescence labeling combined with isoelectric focusing/sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *Methods Enzymol.*, **347**, 339-349 (2002).
- 13) Leammli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 14) 門間美千子, 大豆ホエー熱可溶性タンパク質の凍結変性保護効果, 食科工, **50**, 428-430 (2003).
- 15) Wolf, W.J., Sulfhydryl content of glycinin: Effect of reducing agent, *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 168-176 (1993).
- 16) Draper, M., Catsimpoalas, N., Disulfide and sulfhydryl groups in glycinin, *Cereal Chem.*, **55**, 16-23 (1978).
- 17) Odani, S., Ikenaka, T., Studies on soybean trypsin inhibitors. XI. Complete amino acid sequence of soybean trypsin-chymotrypsin-elastase inhibitor, C-II, *J. Biochem.*, **82**, 1523-1531 (1977).
- 18) Lei, M.-G., Tyrell, D., Bassette, R., Reeck, G.R., Two-dimensional electrophoretic analysis of soybean proteins, *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 963-968 (1983).
- 19) Sato, K., Yamagishi, T., Yamauchi, F., Quantitative analysis of soybean proteins by densitometry on gel electrophoresis, *Cereal Chem.*, **63**, 493-496 (1986).
- 20) Sathe, S.K., Lilley, G.G., Mason, A.C., Weaver, C.M., High-resolution sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of soybean (*Glycin max* L.) seed proteins., *Cereal Chem.*, **64**, 380-384 (1987).
- 21) Ogawa, T., Tsuji, H., Bando, N., Kitamura, K., Zhu, Y.-L., Hirano, H., Nishikawa, K., Identification of the soybean allergenic protein *Gly m* Bd 30K, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein., *Biosci., Biotech., Biochem.*, **57**, 1030-1033 (1993).
- 22) Momma, M., Haraguchi, K., Saito, M., Chikuni, K., Harada, K., Purification and characterization of the acid soluble 26-kDapolypeptide from soybean seeds. *Biosci., Biotech., Biochem.*, **61**, 1286-1291 (1997).

(平成 15 年 12 月 24 日受付, 平成 16 年 5 月 14 日受理)