

穀類蛋白質のゲル・クロマトグラフィー

牧 善輔・田代 操・堀内 晶子

The Gel-Chromatography of Cereal Proteins

ZENSUKE MAKI, MISAO TASHIRO and AKIKO HORIUCHI

The proteins of foxtail and proso millets were extracted successively with water, 1 M sodium chloride, 70% ethanol, 0.1 N acetic acid and 0.05 N sodium hydroxide. The fractions obtained from the extracts were analyzed for their amino acid compositions and their elution profiles of gel-chromatography on a Sephadex G-100 column.

Amino acid analyses indicated that all of the fractions from both millets had high glutamic acid and low lysine contents. It was also recognized that the corresponding fractions between both millets, especially the alcohol-soluble fractions had a similar amino acid composition. In the gel-chromatography, the similarity of the elution profiles was observed between both alcohol-soluble fractions.

These findings suggest that the alcohol-soluble proteins of foxtail and proso millets consist of analogous polypeptides.

I 緒 言

主食としての米及び小麦の蛋白質に関する研究は比較的古くから行なわれており、特に米のグルテリン、グロブリン^{1)~4)}、小麦のグリアジン、グルテニン^{5)~8)}に関しては活発な研究が進められている。しかしながら、その他の穀類蛋白質、特にあわ、きび等の雑穀蛋白質に関する研究は数少ない。これらの雑穀はかなりの高蛋白含量を有し、その栄養価も米や小麦に劣らないと考えられる。したがって今後これらの蛋白質に関しては、植物蛋白質の再利用という観点から十分な研究が進められていかなければならない。

前報において、我々は以上の観点から大麦、あわ、きび、もろこしの蛋白質を溶解度法により分別抽出し、その組成並びに抽出蛋白質の電気泳動的特性を検討した⁹⁾。その結果、あわ、きびの水溶性、アルコール可溶性、及びアルカリ可溶性蛋白質間に各々共通な性質が認められた。そこで今回はさらに、あわ、きびについて、それらの蛋白質を溶解度法により分別抽出し、抽出蛋白質についてアミノ酸分析及びゲル・クロマトグラフィーを行ない、これらの化学組成を検討したのでその結果を報告する。

II 実験材料及び方法

1) 供試料

実験に用いた穀類は、市販のあわ及びきび (白きび) で、これらの試料は外皮と一緒に全粒を細かく粉碎し、60から80メッシュのふるいを通る粉末として用いた。

2) 蛋白質成分の抽出分離法

蛋白質を分離抽出する前に、n-ブタノールで約5時間脱脂した。

あわ及びきび蛋白質の抽出は前報⁹⁾と同様にして行なった。すなわち、Victor^ら¹⁰⁾の方法に準じ、水、1 M食塩水、70%エタノール、0.1N酢酸、0.05 N水酸化ナトリウムにより順次抽出した。なお、きびは0.1N酢酸による抽出蛋白質がごくわずかのため抽出を省いた。

3) 窒素の定量

A. O. A. C. のマイクロ・ケルダール法により窒素の分析を行ない、6.25を乗じて蛋白質量とした。

4) アミノ酸分析

常法により、試料を6 N塩酸で110°C、24時間、加水分解を行ない、アミノ酸自動分析機 (日立KL A 5

型)を用いて分析した。

5) ゲル・クロマトグラフィー

溶解度法により分離抽出された各蛋白質画分の凍結乾燥試料を、6 M尿素を含む0.1N酢酸溶液に溶解、遠心分離後、上清を同じ溶液で充分平衡化した Sephadex G-100 カラム (2.0×88cm) に添加しゲル濾過を行なった。溶出液には上述の6 M尿素-0.1N酢酸を用い、流速は30ml/h、4 ml ずつ分画し280nmでの吸光度を測定した。

Ⅲ 結果及び考察

1) 蛋白質の分離抽出

各種溶媒で抽出分離した画分を蒸留水に対して透析し、さらに凍結乾燥して得たものの乾燥重量を表1に示す。100gの脱脂粉末試料より得られた抽出物の総重量は、あわでは6.2g きびでは3.5gであった。

表2にあわ及びきびから得られた各抽出物の蛋白質含量を示す。明らかにあわの方がきびに比べてその各画分共、蛋白質含量の高いことが認められる。一方、あわ及びきびの各画分のうちでは、それらのアルコール可溶性画分の高い蛋白質含量が特徴的であった。

2) 抽出蛋白質のアミノ酸組成

表3にあわ、きびからの抽出蛋白質のアミノ酸組成を示す。各画分共に酸性アミノ酸であるグルタミン

酸、アスパラギン酸の占める割合が多く、又必須アミノ酸の一つであるリジンの含量の低いことが認められる。特にこの傾向の著しいのは、あわ、きび共、その

Table 1. Yield of the Solid Extracts from Millets.*

Fraction	Foxtail Millet	Proso Millet
Water-soluble	0.7	0.4
1 M NaCl-soluble	0.7	0.5
70% Ethanol-soluble	3.0	1.7
0.1 N Acetic acid-soluble	0.1	—
0.05 N NaOH-soluble	1.7	0.9
Total	6.2	3.5

* Grams of solid extract per 100 g of defatted mill fraction.

Table 2. Protein Content of the Solid Extracts.*

Fraction	Foxtail Millet	Proso Millet
Water-soluble	66.2	58.9
1 M NaCl-soluble	83.1	56.9
70% Ethanol-soluble	91.3	81.9
0.1 N Acetic acid-soluble	57.5	—
0.05 N NaOH-soluble	88.1	68.8

* Protein (NX6.25), % dry basis

Table 3. Amino acid Composition of Extracted Proteins from Millets.*

Amino acid	Water-soluble		NaCl-soluble		Alcohol-soluble		Acid-soluble		NaOH-soluble	
	Foxtail	Proso	Foxtail	Proso	Foxtail	Proso	Foxtail	Proso	Foxtail	Proso
Lysine	3.6	6.4	7.9	2.8	0.1	0.1	2.3	—	4.7	2.9
Histidine	1.1	2.9	2.4	3.5	1.6	1.9	1.5	—	2.2	2.4
Arginine	2.1	8.3	9.2	16.8	1.2	1.6	3.1	—	4.7	5.7
Aspartic acid	16.7	11.5	11.3	21.4	7.4	5.5	8.0	—	12.5	8.1
Threonine	5.8	5.4	4.8	2.1	0.4	2.8	3.8	—	4.9	4.2
Serine	5.3	5.8	6.5	5.6	5.8	8.2	7.3	—	5.8	5.0
Glutamic acid	21.7	16.2	17.4	17.5	25.6	25.2	24.4	—	13.8	22.3
Proline	3.7	3.9	3.1	2.8	5.7	4.0	5.7	—	5.7	5.7
Glycine	6.2	7.2	5.8	5.6	0.8	0.6	4.2	—	6.1	4.8
Alanine	7.0	7.0	6.8	3.5	13.9	17.1	8.8	—	7.2	7.3
Half-cystine	1.8	3.0	0	4.2	1.7	1.6	0	—	2.2	1.7
Valine	5.3	5.6	5.5	3.5	3.8	4.2	4.6	—	6.1	5.2
Methionine	2.2	1.7	1.4	1.4	2.5	2.1	2.3	—	3.3	4.0
Isoleucine	4.4	3.1	3.8	2.1	4.5	4.3	3.8	—	4.1	3.9
Leucine	6.6	6.5	7.2	3.5	15.4	14.5	12.2	—	7.8	8.6
Tyrosine	2.9	1.8	2.4	1.4	3.4	0.5	2.7	—	4.5	4.6
Phenylalanine	3.6	3.6	4.1	2.1	6.0	6.1	5.3	—	4.2	4.0

* Grams of amino acid per 100 g of total amino acid. Tryptophan was not determined.

アルコール可溶性蛋白質で、本蛋白質が、あわ、きび両者の可溶性蛋白質の約50%を占めることを考慮すると、これらの雑穀蛋白質の利用に際してはそのリジン欠乏が問題となってくるであろう。一方、あわときびの各抽出蛋白質を比較すると、それぞれ対応する画分は類似のアミノ酸組成を有しており、特にアルコール可溶性画分については、ほとんど同一の組成を有していることが認められる。

3) 抽出蛋白質のゲル・クロマトグラフィー

あわ及びきびからの抽出蛋白質の Sephadex G-100 によるゲル濾過パターンを図1～5に示す。水溶性画分では、図1に示される様に、あわ、きび共 void volume で溶出される高分子量蛋白質と bed volume

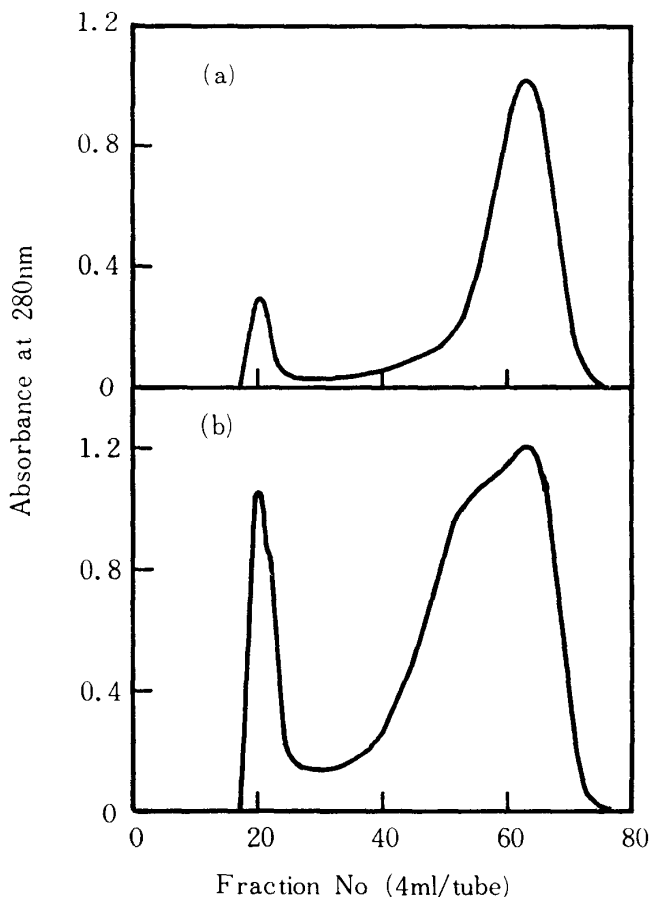


Fig. 1. Gel filtration profiles of the water-soluble fractions on Sephadex G-100. The sample (about 200mg) was dissolved in 5.0 ml of 0.1 N acetic acid contg. 6 M urea and the solution was centrifuged at 10000g for 10 min. The supernatant solution obtained was applied on a Sephadex G-100 column (2.0 × 88cm) equilibrated with 0.1 N acetic acid contg. 6M urea, followed by elution with the same slution at a flow rate of 30 ml/h. Fractions of 4 ml were collected for the determination of the absorbance at 280 nm. (a), foxtail millet; (b), proso millet.

近辺で溶出される低分子量蛋白質の二種類に大別される。Sephadex G-100 の蛋白質分画範囲から推定すると、前者は分子量10万以上であり、後者は1～2万と考えられる。一方、塩溶性画分においては、水溶性画分と同様の蛋白質ピークも認められるが、その他にこれら二種の蛋白質の中間の分子量を有する蛋白質の存在が認められる。これらゲル濾過パターンの多様性から明らかのように、各抽出蛋白質は分子量1万程度から数十万に及ぶものの混合物であると言える。なお、これらの分子量の異なる蛋白質グループがどのようなポリペプチド構成をとっているかについては今後さらに深く検討する必要があると思われる。

あわときびの対応する各画分のゲル濾過パターンの比較から、それぞれ蛋白質の分子量分布パターンに類似点のあることが認められる。水溶性とアルカリ可溶性画分では、あわときびでは、高分子量蛋白質部分と

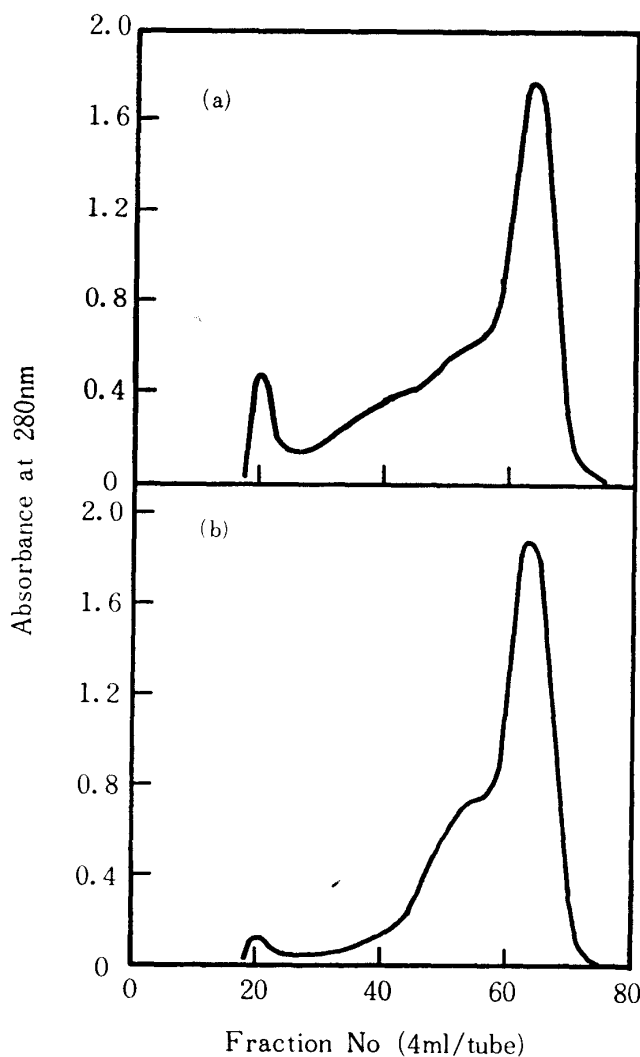


Fig. 2. Gel filtration profiles of the 1 M NaCl-soluble fractions on Sephadex G-100. Chromatographic conditions were the same as those in Fig.1. (a), foxtail millet; (b), proso millet.

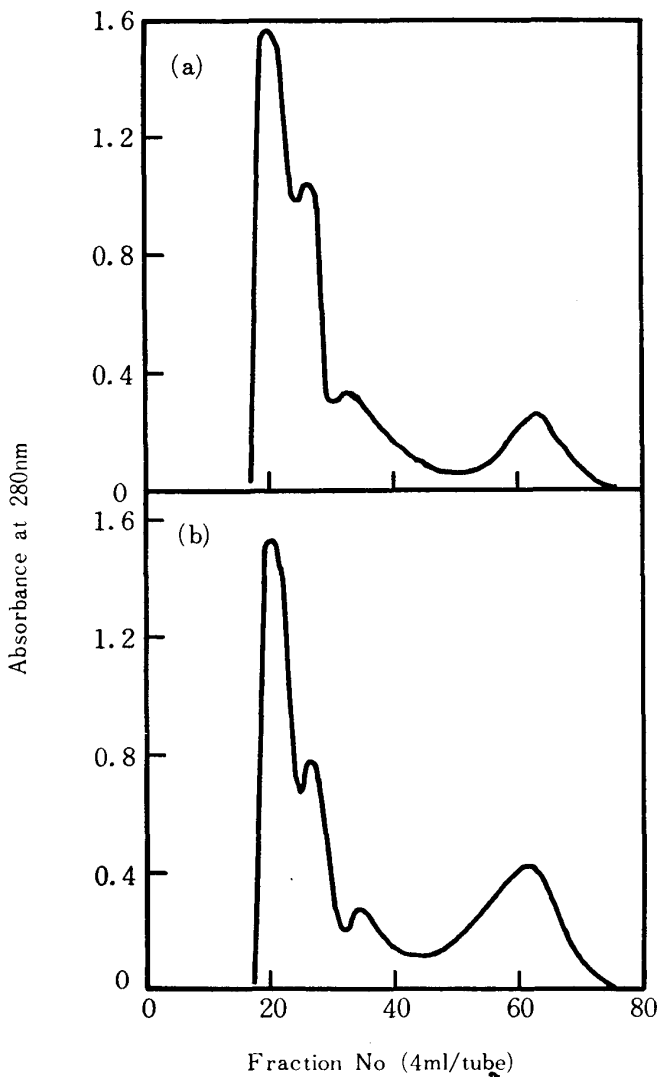


Fig. 3. Gel filtration profiles of the 70% ethanol-soluble fractions on Sephadex G-100. Chromatographic conditions were the same as those in Fig. 1. (a), foxtail millet; (b), proso millet.

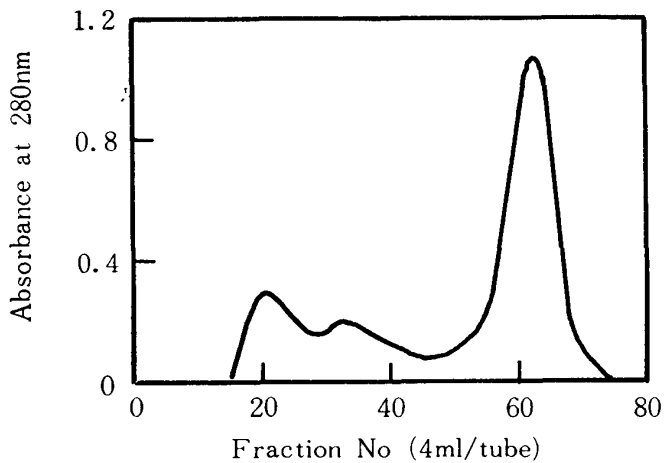


Fig. 4. The gel filtration profile of the 0.1 N acetic acid-soluble fraction from foxtail millet on Sephadex G-100. Chromatographic conditions were the same as those in Fig. 1.

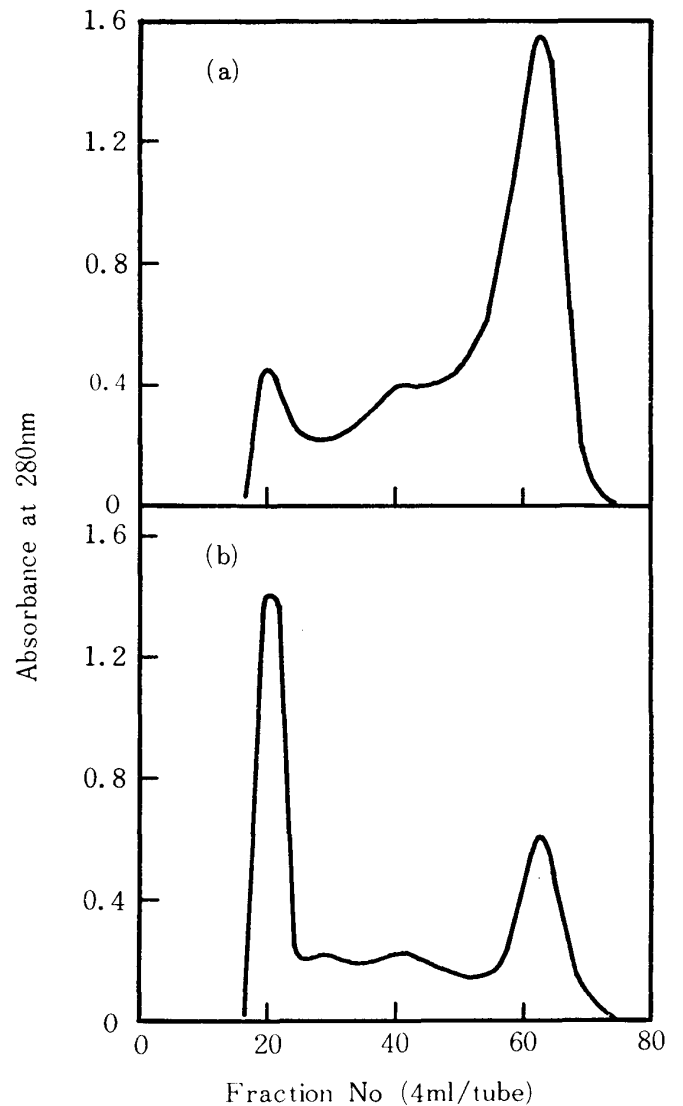


Fig. 5. Gel filtration profiles of the 0.05 N NaOH-soluble fractions on Sephadex G-100. Chromatographic conditions were the same as those in Fig. 1. (a), foxtail millet; (b), proso millet.

低分子量部分との存在比率が若干異なっているものの、塩溶性及びアルコール可溶性画分ではほとんど同一のパターンを示している。特に相同性の著しいのはアルコール可溶性蛋白質であり、このことは先に示されたアミノ酸組成の著しい類似性と共に、あわときび両者の本蛋白質が非常に類似したポリペチドから構成されていることを示すものである。

IV 要 約

あわ及びきびの蛋白質が連続的に、水、1 M NaCl、70%エタノール、0.1 N 酢酸、0.05N NaOH で抽出された。抽出液より得られた各画分について、それらのアミノ酸組成とゲル・クロマトグラフィーにおける溶出パターンが分析された。アミノ酸分析から、あ

わ、きびの各抽出蛋白質共、高いグルタミン酸含量及び低いリジン含量を有することが認められた。さらに、あわときびの対応するそれぞれの画分は類似したアミノ酸組成を有し、特にアルコール可溶性画分はほとんど同一の蛋白質分子量分布を示すパターンを与えた。以上の結果から、あわ、きびにおける可溶性蛋白質は、それぞれその化学組成に類似点があり、特にそれが著しいアルコール可溶性蛋白質は、ほとんど同種のポリペプチドより構成されているものと結論できる。
(1977年7月27日受理)

引用文献

- 1) H. Sawai and Y. Morita : *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 496 (1968)
- 2) H. Sawai, H. Nikaido and Y. Morita : *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 1039 (1970)
- 3) H. Sawai and Y. Morita : *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 61 (1970)
- 4) Y. Morita and M. Horikoshi : *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 651 (1972)
- 5) I. H. Woychik, F. R. Huebner and R. J. Dimler: *Arch. Biochem. Biophys.*, **105**, 151 (1964)
- 6) A. C. Beckwith, J. S. Wall and R. W. Jordan : *Arch. Biochem. Biophys.*, **112**, 16 (1965)
- 7) F. R. Huebner : *J. Agr. Food Chem.*, **18**, 256 (1970)
- 8) 金沢宏和, 米沢大造 : 農化誌, **47**, 17 (1973)
- 9) 堀内晶子, 牧善輔 : 京都府立大学学術報告 (理学・生活科学) 第**26**号, p. 19 (1975)
- 10) Y. Victr wu, K. R. Sexson, J. F. Cavins and G. E. Inglett : *J. Agr. Food Chem.*, **20**, 757 (1972)