

きびアルコール可溶性蛋白質の構成ポリペプチド

牧 善 輔・田 代 操

Component Polypeptides of Alcohol-Soluble Protein from Proso Millet

ZENSUKE MAKI and MISAO TASHIRO

The alcohol-soluble protein from proso millet was prepared by extraction with 70% ethanol. This protein was fractionated into four fractions, F-1, F-2, F-3 and F-4 by gel filtration on Sephadex G-100, and F-1 having the molecular weight of more than 100,000 and F-2 having that of between 40,000-100,000 were shown to be main fractions. On the other hand, the gel filtration profile of the reduced and S-cyanoethylated protein showed that the F-1 fraction disappeared and the F-2 fraction increased. The amino acid composition of F-1 was almost identical with that of F-2. Further, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis indicated that the reduced and S-cyanoethylated alcohol-soluble protein, F-1 and F-2 gave the same electrophoretic patterns which had the single main polypeptide band corresponding to the molecular weight of 20,000.

These results suggested that the alcohol-soluble protein from proso millet was composed of the polymers of the primary polypeptide chain having the molecular weight of 20,000.

I 緒 言

前報において、我々は雑穀蛋白質の再利用という観点から、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その化学組成を明らかにした¹⁾。本報においては、特にきびについて、その可溶性蛋白質中約半量を占めるアルコール可溶性蛋白質をとりあげ、その構成ポリペプチドの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

きび(白きび)は市販品を用い、全粒を細かく粉碎した後、60メッシュのふるいを通る粉末として得た。

2) アルコール可溶性蛋白質の分離抽出法

蛋白質を分離抽出する前に、n-ブタノールできび粉の脱脂を行なった。

アルコール可溶性蛋白質の抽出は Wu ら²⁾の方法に準じた。すなわち、脱脂きび粉 100 g に対して

500 ml の 1 M 食塩水を加え、60 分間 5℃ で攪拌した後遠心分離 (10000 g, 20 分) を行ない、塩水溶性蛋白質を含む上清を除去した。残渣について同様の操作を 2 回繰返した後、さらに残渣より食塩を除くため 2 回水洗した。次に、70% エタノール 500 ml を残渣に加え、60 分間、60℃ で振とうした後遠心分離し上清を集めた。残渣については、さらに上の操作を繰返し、2 回目の抽出を行なった。3 回目の抽出においては残渣を 5℃ で 1 夜 70% エタノール中に浸漬し、ついで上記操作を繰返した。3 回の抽出操作により得られた上清は吸引ろ過され、蒸留水に対して透析され、風乾濃縮後凍結乾燥された。

3) ゲルろ過

凍結乾燥された蛋白質試料を 3 ml の 6 M 尿素を含む 0.1 N 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) に添加しゲルろ過を行なった。溶出液には上述の 6 M 尿素を含む 0.1 N 酢酸溶液を用い、流速は 20 ml/h, 3 ml ずつ分画し 280 nm での吸光度を測定した。

4) 還元及び S-シアノエチル化

Beckwith ら³⁾ が小麦グリアジンに適用した条件に準じて SS 結合を還元切断し, S-シアノエチル化を行なった。すなわち, 試料 100 mg を 6 M 尿素及び 0.01 M エチレンジアミンテトラアセテイトを含む 0.1 M トリス 塩酸緩衝液 (pH 7.4) 10 ml に溶解又は懸濁させ, 30 分間窒素ガスを吹き込んだ後, β -メルカプトエタノール 0.1 ml を加えて 1 夜室温で放置し SS 結合を還元切断した。生じた SH 基をアルキル化するために, アクリロニトリル 0.2 ml を加えて 45 分間反応させた。最後に 2 N 酢酸で pH 3.5 にし, 0.01 N 酢酸に対して透析して試薬類を除いた後, 凍結乾燥して S-シアノエチル化した試料を得た。

5) 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 KLA 5 型) を用いて分析した。

6) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Weber と Osborn⁴⁾ の方法に従い, アルコール可溶性蛋白質及びそのゲル透過で分画した各画分を電気泳動した。蛋白質の変性は 1% ソジウムドデシルサルフェイト中, 37°C で 1 夜放置することによりなされた。なお, 還元剤である β -メルカプトエタノールを加えた場合と加えない場合との 2 通りで変性を行なった。泳動後ゲルはコマーゼブリアントブルーで染色され, 検出された蛋白質バンドの分子量は, 分子量既知の標準蛋白質であるチトクローム C (分子量 12400), ミオグロビン (分子量 17800), キモトリプシノーゲン A (分子量 25000), 卵白アルブミン (分子量 45000), 牛血清アルブミン (分子量 67000) を用いて得られた分子量測定用標準曲線より評価された。

III 実験結果及び考察

1) アルコール可溶性蛋白質のゲル透過

図 1 に, きびより抽出されたアルコール可溶性蛋白質のゲル透過パターンを示す。本蛋白質はゲル透過により図に示すように, F-1 から F-4 の 4 つのピークに分画された。この結果は前報¹⁾ で報告した結果と全く同じであり, 本蛋白質は Void Volume で溶出する F-1 の様な分子量 10 万以上に相当する蛋白質と F-2 から F-4 の様な分子量 1 万程度から 10 万程度までの蛋白質との混合物と言える。

図 2 は アルコール可溶性蛋白質を還元さらに S-シアノエチル化したもののゲル透過パターンである。明らかにこのパターンは図 1 と異なる形を示した。すなわち, 図 1 では最も高い吸光度を示した F-1 が図

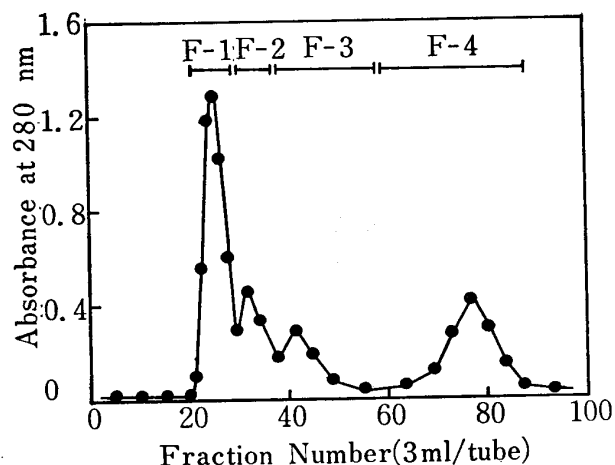


Fig. 1. The gel filtration profile of the alcohol-soluble protein on Sephadex G-100. The sample (about 100 mg) was dissolved in 3.0 ml of 0.1 N acetic acid containing 6 M urea and the solution was centrifuged at 10,000 g for 10 min. The supernatant solution was then applied on a Sephadex G-100 column (2.0×88 cm) equilibrated with 0.1 N acetic acid containing 6 M urea, followed by elution with the same solution at a flow rate of 20 ml/h. Fractions of 3 ml were collected for the determination of the absorbance at 280 nm.

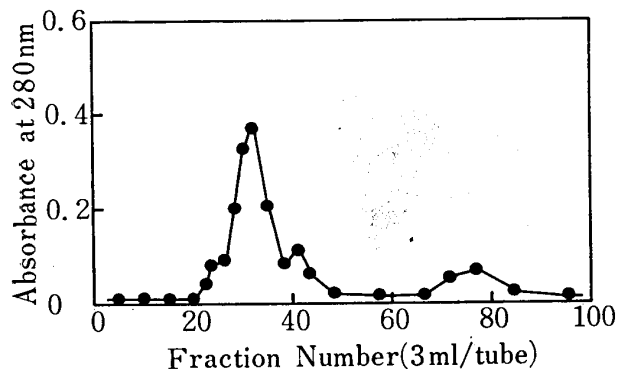


Fig. 2. The gel filtration profile of the S-cyanoethylated alcohol-soluble protein on Sephadex G-100. The sample (about 30 mg) was dissolved in 3.0 ml of 0.1 N acetic acid containing 6 M urea. After centrifugation, the supernatant solution was applied on a Sephadex G-100 column (2.0×88 cm). Chromatographic conditions were the same as those in Fig. 1.

2では消失している。又, F-1 が消失した分だけ F-2 が増加していることも興味ある点である。F-3, F-4 においては S-シアノエチル化した場合も

Table 1. Amino Acid Composition of the Alcohol-Soluble Protein, F-1, F-2, and F-3*.

Amino acid	Alcohol-soluble protein	F-1	F-2	F-3
Lysine	0.1	0.1	0.1	0.5
Histidine	1.4	1.3	1.2	0.7
Arginine	2.0	1.7	1.3	3.1
Aspartic acid	4.7	5.4	5.8	3.2
Threonine	3.2	2.6	3.1	5.5
Serine	6.1	7.1	7.0	3.4
Glutamic acid	24.5	25.4	25.9	25.8
Proline	9.3	8.7	9.3	12.3
Glycine	1.4	0.9	1.2	3.9
Alanine	9.9	12.4	11.3	6.6
Cystine	2.0	0.8	1.0	3.8
Valine	4.2	4.6	4.9	3.2
Methionine	5.3	1.8	1.7	7.1
Isoleucine	4.1	4.4	4.4	5.2
Leucine	13.2	14.5	14.3	8.8
Tyrosine	3.5	2.7	1.9	3.1
Phenylalanine	5.1	5.8	5.7	3.8

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

変動のないことから、アルコール可溶性蛋白質の S-シアノエチル化は、F-1 画分を低分子化して F-2 画分にしたと考えられる。この実験結果を説明する 1 つの仮説として次のことが考えられる。すなわち、F-1 は F-2 の 会合体であるということである。恐らく、F-1, F-2 を構成するポリペプチドは同一であり、F-1 が分子間 SS 結合を多く有する架橋度の高いポリペプチドより構成されているのに対し、F-2 は分子間 SS 結合を有しないか、又は、有していても非常に少ない、架橋度の低いポリペプチドより構成されているのであろう。F-3, F-4 に関しては、これらはアルコール可溶性蛋白質のマイナー画分でもあり、還元 S-シアノエチル化の前後でその分子量が変化しないことからみても F-1 及び F-2 とは全く別種のポリペプチドより構成されているものと思われる。

2) アミノ酸組成

表 1 に、アルコール可溶性蛋白質及びゲル洩過で分画した F-1, F-2, F-3 のアミノ酸組成を示す。F-4 は試料の都合上分析できなかった。このアミノ酸分析の結果は明らかに先のゲル洩過の結果より得られた推測を強く支持するものである。すなわち、F-1, F-2 のアミノ酸組成は殆んど同一であり、これらが同種のポリペプチドより成っていることを示唆する。一方、F-3 においては、その組成は明らかに F-1, F-2 と異り、リジン等の塩基性アミノ酸の含量が増加している。さらに Whole のアルコール可溶性蛋白質のア

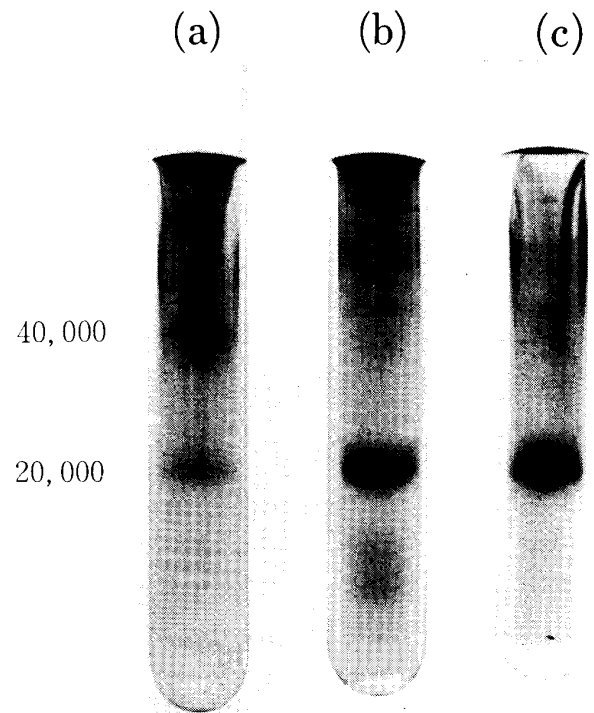


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of the alcohol-soluble protein. Electrophoresis was performed in 10% gels. A current of 8 mA per tube was supplied for 7 hr at room temperature. (a), the sample denatured without β -mercaptoethanol; (b), the sample denatured with β -mercaptoethanol; (c), reduced and S-cyanoethylated sample.

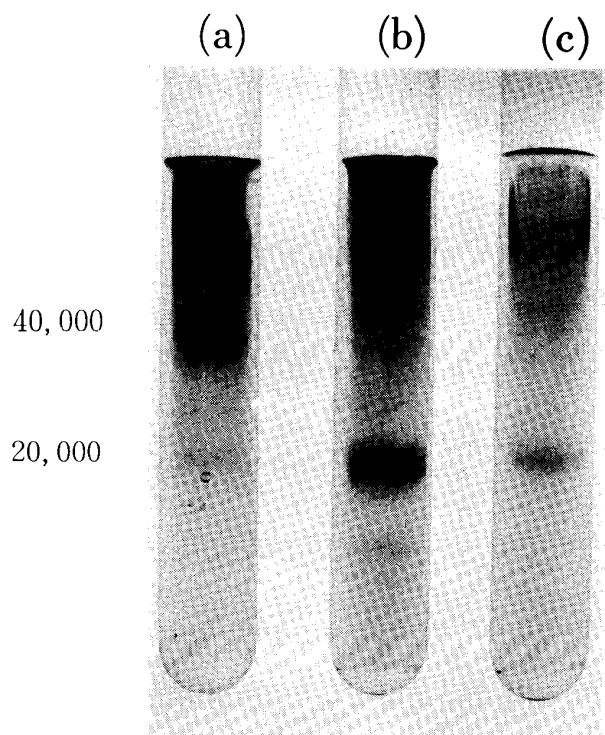


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of F-1. Experimental procedures were the same as those in Fig. 3. (a), the sample denatured without β -mercaptoethanol; (b), the sample denatured with β -mercaptoethanol; (c), reduced and S-cyanoethylated sample.

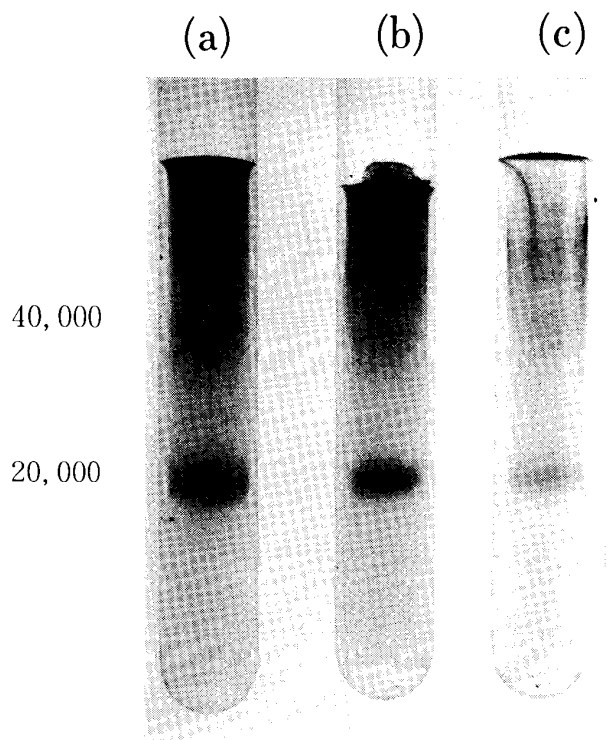


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of F-2. Experimental conditions were the same as those in Fig. 3. (a), the sample denatured without β -mercaptoethanol; (b), the sample denatured with β -mercaptoethanol; (c), reduced and S-cyanoethylated sample.

ミノ酸組成は F-1, F-2 の組成と著しい類似性を見せている。これは F-1, F-2 がアルコール可溶性蛋白質の主成分であることから当然ではあるが、逆にこのことは F-1, F-2 が本蛋白質を特徴づける本体であるとも言えよう。

3) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

先のゲル濾過及びアミノ酸分析の結果より推定された点を明らかにするために、SDS-ゲル電気泳動が行なわれた。すなわち、アルコール可溶性蛋白質と再ゲル濾過で単離精製された F-1, F-2 が試料とされた。これらは、還元され S-シアノエチル化されたものもそれぞれ用意された。図 3 は Whole のアルコール可溶性蛋白質の泳動パターンであり、図 4 は F-1, 図 5 は F-2 のパターンである。又、それぞれの a, b, c は、還元せずに泳動したものの、 β -メルカプトエタノールで還元後泳動したものの、そして還元後 S-シアノエチル化して泳動したもののパターンを示している。図 3-a から明らかなように、アルコール可溶性蛋白質は分子量 2 万以上の複数のポリペプチドより成っていることがわかる。特にその内、分子量 2 万と 4 万のもの

が主成分である。一方、F-1, F-2 についても、これらは先と同様に分子量 2 万以上のポリペプチドより成っていると言えるが、F-1 がその主構成ポリペプチドの分子量を 4 万とするのに対し、F-2 は 2 万のものが主成分である。さらに、図 3-b, 3-c, 図 4-b, 4-c, 図 5-b, 5-c で明らかなように、これらは還元されたり又 S-シアノエチル化されたりすると全て同一泳動パターン、すなわち、主構成ポリペプチドの分子量が 2 万となってしまう。この結果は明らかに先の推測を支持するものであり、したがってアルコール可溶性蛋白質の主成分である F-1, F-2 は基本単位として分子量 2 万の共通のポリペプチドより成っていると結論できる。そして F-2 が主に SS 結合で架橋していない分子量 2 万のポリペプチドの会合体であるのに対し、F-1 は主に分子量 4 万のポリペプチド、これは分子量 2 万のものが SS 架橋されて出来ているものであるが、その会合体であると言える。恐らく、これら会合体を成立させている結合は、F-1, F-2 のアミノ酸組成における疎水性アミノ酸残基含量の高さから

考えて、主にペプチド間の疎水結合であると思われる。

IV 要 約

70% アルコール抽出により、きびからアルコール可溶性蛋白質が得られた。本蛋白質は Sephadex G-100 でのゲル濾過により F-1 から F-4 の 4 画分に分離され、その内分子量約 10 万以上に相当する F-1、分子量約 4 万から 10 万に相当する F-2 が主要画分であると示された。一方、アルコール可溶性蛋白質を還元さらに S-シアノエチル化した後、同様にゲル濾過を行なうと、先の F-1 に相当する画分が消失し F-2 に相当する画分が増加した。アミノ酸分析からは、F-1、F-2 の組成は全んど同一であることが示された。非還元系での SDS-ゲル電気泳動では、アルコール可溶性蛋白質は主にポリペプチドとして分子量 4 万と 2 万の両者、F-1 は分子量 4 万、F-2 は分子量 2 万のものを示した。さらにこれらを還元 S-シアノエチル化した場合、その電気泳動パターンは皆同一とな

り、分子量 2 万を与えるポリペプチドの主バンドのみとなった。

以上の結果より、きびアルコール可溶性蛋白質は基本単位として分子量 2 万のポリペプチドを有し、これが SS 結合や疎水結合等によりさまざまに分子量を異にするポリペプチド会合体を構成していると結論できる。

(1978年7月27日 受理)

引 用 文 献

- 1) 牧 善輔, 田代 操, 堀内晶子: 京都府立大学
学術報告 (理学・生活科学) 第 28 号, P. 17
(1977)
- 2) Y.V. Wu, K.R. Sexson, J.F. Cavins and G.E.
Inglett: *J. Agr. Food Chem.*, **20**, 757 (1972)
- 3) A.C. Beckwith, J.S. Wall and R.W. Jordan:
Arch. Biochem. Biophys., **112**, 16 (1965)
- 4) K. Weber and M. Osborn: *J. Biol. Chem.*, **244**,
4406 (1969)