

# 小麦胚芽中のアルブミン系タンパク質 の分離およびその2,3の性質

山本佳代子\*, 中溝 裕子\*\*

## Separation and Some Properties of Albumins in Wheat Germ.

Kayoko Yamamoto and Hiroko Nakamizo

### I はじめに

小麦はタンパク質源として重要な食糧であり、われわれは主として、胚乳部を製粉して利用している。その際、副産物として得られる胚芽の部分は小麦穀粒の2%にすぎないが、そのタンパク質含量は表皮部、胚乳部に比べ著しく多く、しかも、そのアミノ酸組成はリジン含量が高く、そのケミカルスコアはミルクカゼインに相当するほど優れている。また、小麦穀粒の他の部位に比較して可溶性タンパク質の含量が多いことも知られており<sup>1)</sup>、これら可溶性タンパク質のなかには特異な、また、広範な生理活性を有するものの存在が報告されている。しかし、反面、このような生理活性成分を多く含む胚芽部が小麦粉中に混入すると小麦製品の品質を著しく低下させるおそれがある。

そこで、われわれはタンパク質源として重要になるであろうと予想される小麦胚芽部について可溶性タンパク質、特に、アルブミン系タンパク質を分離、精製し、それら各画分について一般的性質を調べ、さらに、小麦粉の品質評価法として抗原抗体反応の利用を考え、その予備的実験を行う目的で本研究を行った。

### II 実験方法

1. 材料；試料として、1975年度カナダ産カナダウエスタン種の小麦胚芽を日清製粉より入手し、脱脂、粉碎して使用した。Bio-gel P-30はBio Rad Laboratories Co. 製品を、DEAE-Sephadex A-25およびCM-Sephadex C-25はPharmacia Fine Chemicals Co. 製品を、また Freund's Complete Adjuvant は半井化学薬品株式会社の製品をそれぞれ用い

た。また、その他の試薬は市販特級試薬を使用した。

2. 胚芽中のアルブミン分画の分離、精製；脱脂胚芽末に10倍量の0.1M-塩化ナトリウム溶液を加え、可溶成分を抽出した。この抽出液に硫酸アンモニウムを100%飽和になるように加え、塩析を行い、その沈澱物を少量の蒸留水に溶かし、蒸留水に対して透析した。次に、この透析液を遠心分離(1200×g, 15分)し、グロブリン系タンパク質を除去し、得られた上清を凍結乾燥し、粗製アルブミンを調製した。さらに、この粗製アルブミンをBio-gel P-30およびDEAE-Sephadex A-25, CM-Sephadex C-25を用いたクロマトグラフィーを行い、精製した。

3. タンパク質の定量法；タンパク質量はKjeldahl法<sup>2)</sup>またはLowry-Folin法<sup>3)</sup>を用いた。

4. 糖の定量法；糖の定量はフェノール硫酸法<sup>4)</sup>を用いた。

5. 純度の確認および分子量測定；純度の確認にはDisc-電気泳動法<sup>5)</sup>、分子量測定にはSDS-ゲル電気泳動法<sup>6)</sup>を用いた。

6. アミノ酸の分離と定量；試料5mgを精量し、試料の全量に対して6M-塩酸を1000倍量加え、110°Cで24時間分解した。その後、減圧濃縮乾固を行い、日立アミノ酸自動分析機KLA-5Bで分析した。

7. 抗体の調製と定性；粗製アルブミン5mgを1mlの蒸留水に溶かし、この溶液と等量のアジュバントと乳化状態になるまで、よく混合し、この混合液をウサギに3ヶ月間に6回接種し、得られた抗血清について二重拡散法<sup>7)</sup>および免疫電気泳動法<sup>8)</sup>を行った。

### III 結果および考察

1. 胚芽中のアルブミン分画の分離、精製；胚芽中から抽出した粗製アルブミンをBio-gel P-30 カラム

\* 栄養生理学研究室

\*\* 調理学研究室

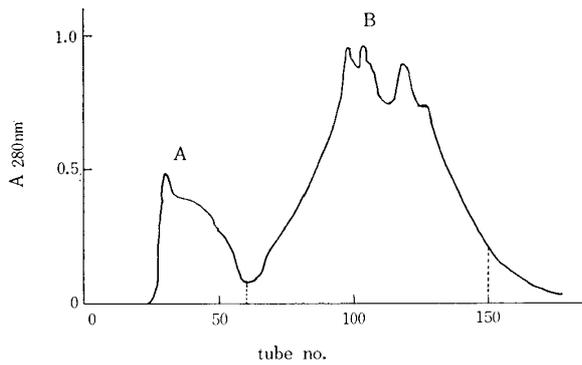


図-1 Bio-gel P-30 カラム (4.2×99 cm) による粗製アルブミンの分画。粗製アルブミン 1g を0.01 M-HCl PH2.0 (0.1M-NaCl を含む) 緩衝液に溶かし、Bio-gel P-30 カラムに加え、0.01M-HCl PH 2.0 (0.1M-NaCl を含む) で溶出し、1 画分 10g で分画した。

により分離した結果は〔図-1〕に示すごとくである。2つの画分に分離でき、それぞれをアルブミンA、Bとした。次に、得られたアルブミンA、B画分はDEAE-Sephadex A-25 カラムおよびCM-Sephadex C-25 カラムを用いてクロマトグラフィーを行い、精製した。〔図-2〕、〔図-3〕に示すごとく、A、B画分はそれぞれ2つの画分に分離できた。それぞれをアルブミン A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> とした。

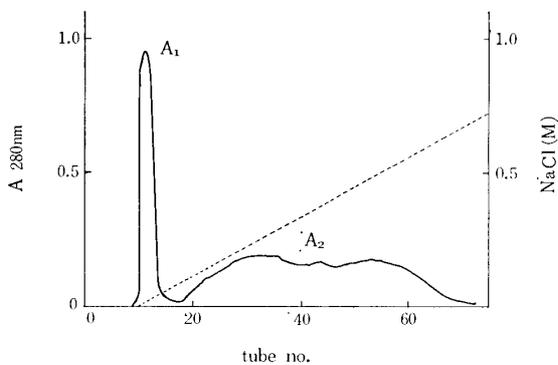


図-2 DEAE-Sephadex A-25 カラム (2.1×60cm) による画分Aのクロマトグラム。画分A 100mg を M/20-トリス-塩酸緩衝液 PH 8.0 に溶かし DEAE-Sephadex A-25 カラムに加え、M/20-トリス-塩酸緩衝液 PH 8.0→M/20-トリス-塩酸緩衝液 PH 8.0 (1M-NaCl を含む) のグレジエントで溶出し、1 画分 5g で分画した。

2. 各アルブミン画分の純度の確認および分子量の測定；〔図-4〕に示すごとく、Disc-電気泳動法を行った結果、アルブミン A<sub>1</sub> は3本、A<sub>2</sub> は2本、B<sub>1</sub> は3本、B<sub>2</sub> は3本のバンドが認められ、それぞれの画分は2～3種類の成分から成る混合物であることが示された。しかし、画分 B<sub>1</sub> は SDS-ゲル電気泳動法を行

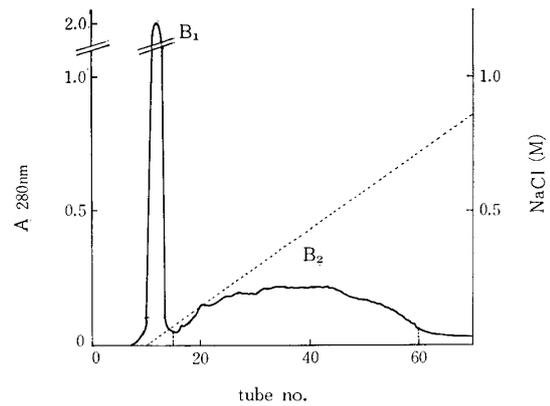


図-3 CM-Sephadex C-25 カラム (2.1×60 cm) による画分Bのクロマトグラム。画分B 100mg を M/20-酢酸緩衝液 PH 4.2 に溶かし、CM-Sephadex C-25 カラムに加え、M/20-酢酸緩衝液 PH 4.2→M/20-酢酸緩衝液 PH 4.2(1M-NaCl を含む) のグレジエントで溶出し、1 画分 5g で分画した。

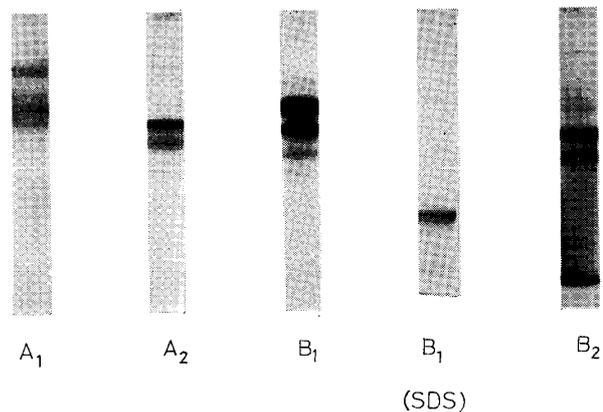


図-4 7%ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動像。B<sub>1</sub>(SDS) のみ 1% SDS を含む 7%ポリアクリルアミド電気泳動像を示している。

った結果、単一のバンドしか認められず、この画分は電気泳動的に均一であることを示した。このことから、アルブミン B<sub>1</sub> は同一のもしくは分子量のはぼ等しいサブユニットから成る解離会合系タンパク質であると考えられた。次に、各アルブミン画分中のタンパク質の分子量を SDS-ゲル電気泳動法により求めた結果は〔図-5〕に示すごとくである。成分のタンパク質は分子量12,700～85,000の範囲から成ることが認められた。

3. 各アルブミンのタンパク質量および糖量；糖はアルブミン A<sub>1</sub> が30% を含むタンパク質画分であるのに対して、A<sub>2</sub>、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> は糖の存在は認められず、タンパク質のみから成る画分であった。

4. 各アルブミン画分のアミノ酸組成；〔表-1〕に示すごとく、主成分のアミノ酸はグルタミン酸で、小麦の他の部位、特に、胚乳部に比較して<sup>1)</sup>、リジン、ア

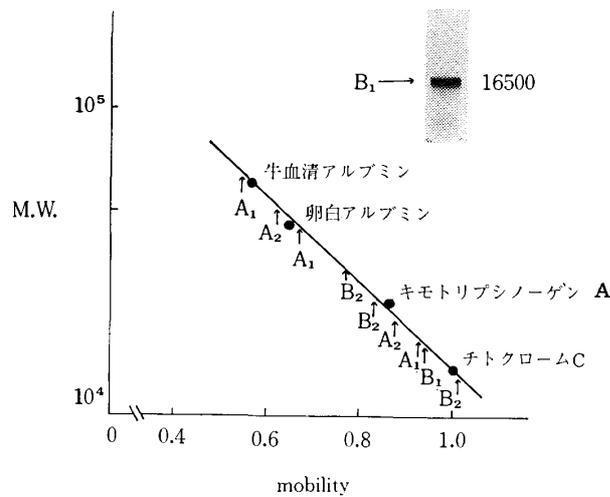


図-5 各アルブミン画分の成分タンパク質の分子量。標準タンパク質として牛血清アルブミン、卵白アルブミン、キモトリプシノーゲンA、チトクロームCを用い SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法によりアルブミン画分 A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 中に含まれる成分アルブミンの分子量を求めた。

表-1 各アルブミン画分のアミノ酸組成

Amino Acid	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>
Lys.	7.7	8.1	7.4	6.3
His.	2.8	2.7	0.9	2.3
Arg.	8.8	8.4	6.0	7.9
Asp.	7.0	8.0	7.8	8.5
Thr.	5.1	4.7	5.9	5.4
Ser.	0.8	6.1	6.2	5.1
Glu.	13.4	14.0	16.0	15.5
Pro.	2.7	2.8	2.8	5.0
Gly.	14.7	10.8	11.6	9.2
Ala.	9.7	9.6	13.0	7.2
Cys.	11.9	0.1	2.7	3.2
Val.	5.2	7.2	4.9	5.9
Met.	2.7	1.1	1.5	2.9
Ileu.	2.9	4.1	2.8	3.5
Leu.	0.2	6.9	5.6	5.8
Tyr.	2.0	2.2	2.0	2.9
Phe.	2.4	3.2	3.2	3.4

(mole%)

ルギニンの塩基性のアミノ酸含量が多いことが認められた。

5. 各アルブミンの抗原性；〔図-6〕はアガロースを塗布したプレートに各アルブミンと抗血清を挿入し、37℃で48時間、反応させた二重拡散法の結果を示している。その結果、アルブミン A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> に沈降線が現われた。また、A<sub>1</sub> と B<sub>2</sub> に同じ抗原性が認められ、

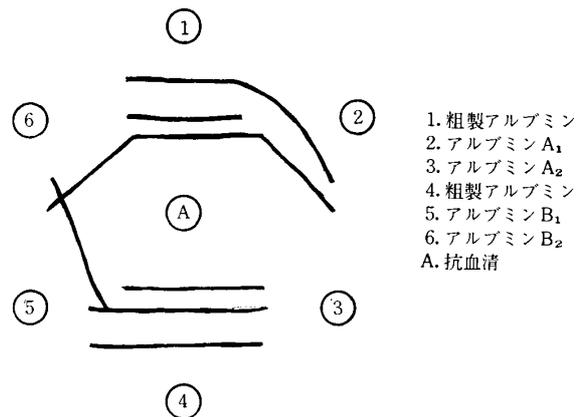


図-6 二重拡散法による各アルブミン画分と抗血清との沈澱反応

B<sub>1</sub> は別の抗原性を示した。しかし、A<sub>2</sub> は抗原性が弱く、沈降線は現われなかった。次に、これら各アルブミンについて免疫電気泳動法を行った結果は〔図-7〕のごとくである。これは先の二重拡散法の結果とよく

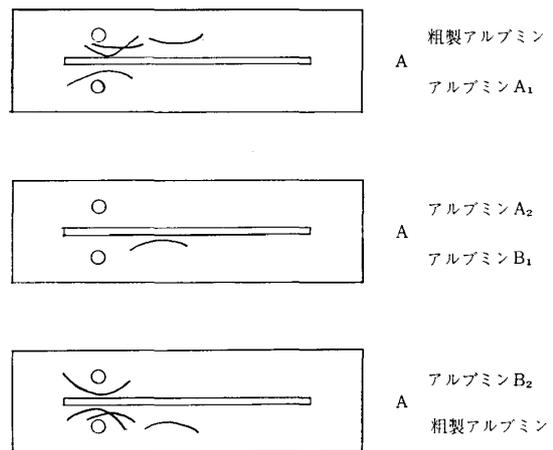


図-7 各アルブミン画分の免疫電気泳動法の結果 (A：抗血清)

一致した。このように小麦胚芽のアルブミンには抗原性が認められた。この結果を利用して小麦粉中に胚芽部が混入しているかどうか、また、どの程度混合しているか、といった小麦粉の品質評価、品質管理ができることが明らかになった。

#### IV 要 約

以上の結果、

1. 小麦胚芽部のアルブミンを抽出、分画した結果、胚芽中に9種類以上のアルブミンの存在が認められた。そして、それぞれの画分成分の分子量は12,700～85,000であった。
2. これら各アルブミン画分のアミノ酸組成を調べた結果、主アミノ酸はグルタミン酸であったが、小麦の

その他の部位のタンパク質に比較して、リジン、アルギニンの塩基性のアミノ酸が多く含まれていた。

3. 次に、各アルブミンの抗原性を調べた結果、二重拡散法および免疫電気泳動法において、アルブミン A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> に強い抗原性が認められたのに対し、A<sub>2</sub> は弱い抗原性しか認められなかった。

本研究についていろいろご助言をいただきました本学食物学科助教授、磯辺貴代子博士、光永俊郎博士に深謝いたします。

#### 参 考 文 献

- 1) Mitsunaga, T. and Mitsuda, H., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **21**, 363 (1975)
- 2) *Official Methods of Analysis of A. O. A. C.* (Horwitz, W., ed.) p.16, (1970), Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- 3) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 4) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J.K., Rebers, P. A., and Smith, F., *Anal. Chem.* **28**, 350 (1956).
- 5) Ornstein, L. and Davis, B., *Ann. New York Acad. Sci.*, **321**, 404 (1964)
- 6) Shapiro, A. L., Vinnela, E. and Maziel, J.V. Jr., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 815 (1967)
- 7) Piazzini, S.E., and Cantagalli, P., *Cereal Chem.* **46**, 642 (1969)
- 8) 免疫化学的同定法 (生化学実験法 3) 東京化学同人 p. 46 (1973)