

大豆グリシニンの分子種多様性に関する研究

森 友彦*

京都大学食糧科学研究所

Studies on Heterogeneity of Soybean Glycinin

Tomohiko MORI

Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji 611-0011

ABSTRACT

Glycinins isolated from the seeds of four cultivars of soybean were analyzed by column chromatography and gel electrophoresis, in order to obtain the evidence for heterogeneity of glycinin molecular species. Four soybean cultivars, Shiotsurunoko and York as the A₄ subunit-containing cultivars and Raiden and Suzuyutaka as the A₄ subunit-lacking cultivars, were subjected for analyses of the glycinins. The crude glycinin fraction was prepared from the soybean seeds according to the procedure including the preparation of acetone powder and the cryoprecipitation. The crude glycinin fraction was subjected to chromatographic fractionation by using a column of DEAE-Toyopearl. Significant difference was observed in the elution pattern of column chromatography between the A₄-containing and -lacking soybean cultivars. The fraction eluted earlier exhibited single peak and small amount in the case of the A₄-containing cultivars, while did two peaks and significant amount in the A₄-lacking cultivars. The fraction eluted later exhibited single peak in both the cultivars, however, the fraction comprised 90% and 50% of the total protein in the A₄-containing and -lacking cultivars, respectively. SDS-PAGE analysis showed that the fraction eluted later contained all of the constituent subunits of glycinin in both of the cultivars. In contrast, it was found that the fraction eluted earlier in the case of A₄-lacking cultivar contained only the A₁ and A₂ subunits. Further, when the purified glycinin fraction prepared by sucrose density gradient centrifugation was analyzed by the above mentioned column chromatography and gel electrophoresis, it was shown that the fraction eluted earlier in the case of A₄-containing cultivar also contained only the A₁ and A₂ subunits. These results indicate the occurrence of particular glycinin molecular species composed of the limited kinds of the constituent subunits of glycinin in soybean seeds. *Soy Protein Research, Japan* **1**, 25-30, 1998.

Key words : glycinin, soybean proteins, molecular heterogeneity, subunit composition, soybean cultivars

*〒 611-0011 宇治市五ヶ庄官有地

大豆グリシニンには品種の違いによりサブユニット組成が異なるという多形現象¹⁾が見られるとともに、サブユニット組成の異なるグリシニン分子種が存在するという分子種多様性²⁾が知られている。このようなサブユニット組成に関するバラエティは大豆たん白質の加工機能性に影響を及ぼす要因になるものと予想されることから、本研究では、グリシニン分子種の同定を進め分子種多様性に関する知見を得ることを目的とした。

グリシニンの分子種多様性については、分子サイズの異なる (MW: 340,000, 345,000, 360,000, 375,000) 分子種が存在することを既に見い出している²⁾。しかし、サブユニット組成の違いに基づいての分子種多様性に関してはこれまでにあまり知られていない。通常、グリシニンの精製には陰イオン交換カラムクロマトグラフィーが用いられている。このクロマトグラフィーにおいて、グリシニンは多少ブロードなピークとして溶出される。そのため、サブユニット組成の異なる分子種が存在するとしても、それら分子種の分離は期待できないものと見なしていた。また、このクロマトグ

ラフィーにおいて初期に溶出される画分は主にコングリシニンと見なしていた。しかし、用いる大豆の品種によってはこの初期溶出画分が量的に多い場合があることが認められた。これは、サブユニット組成の異なるグリシニン分子種が存在するとした場合、チャージ的に酸性度の弱い分子種が存在することを示唆するものである。そこで、本研究では、この初期溶出画分に注目しそのようなグリシニン分子種が存在するのかなどについて検討を行った。

方 法

大豆品種として、A₄サブユニットを含む品種であるシロツルノコとYorkおよびA₄サブユニットを含まない品種のライデンとスズユタカを実験に供した。それぞれの大豆品種から、既報の冷沈法により粗グリシニン画分を調製した³⁾。陰イオン交換クロマトグラフィーによるグリシニンの精製にはDEAE-Toyopearlを用い、既報のクロマトグラフィー条件により分画を行った⁴⁾。また、分子量の大小で分画することのできる

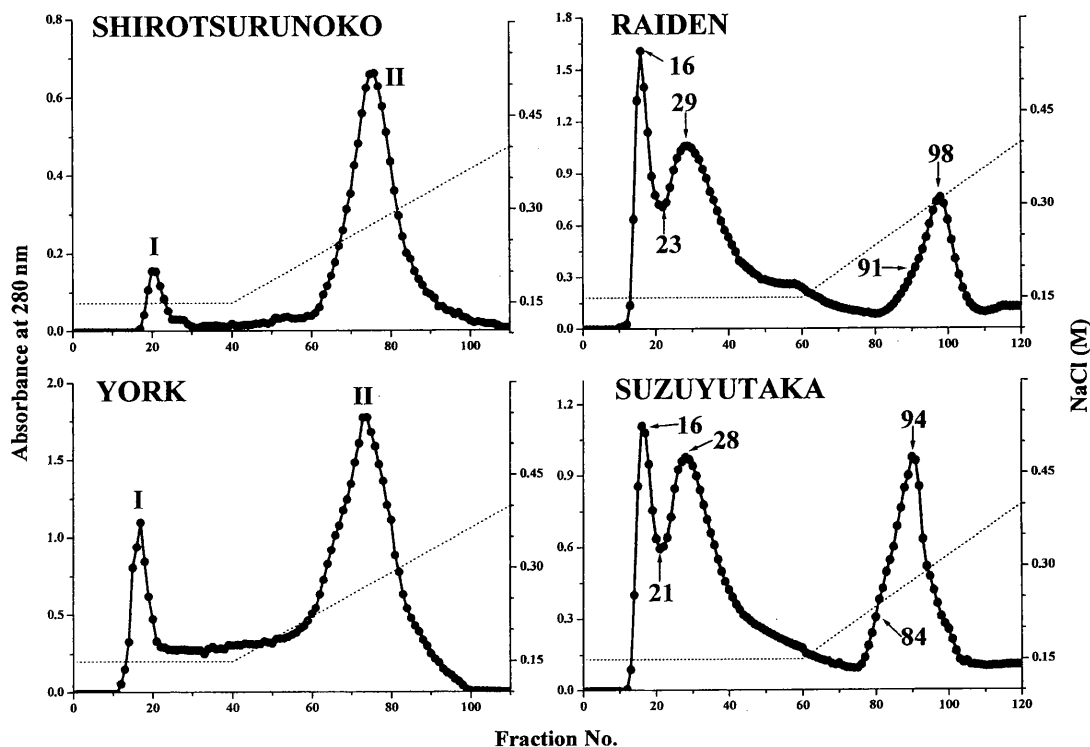


Fig. 1. DEAE-Toyopearl column chromatography of crude glycinin fraction. The crude glycinin fractions prepared by cryoprecipitation from the soybean cultivars of Shirotsurunoko, York, Raisen and Suzuyutaka were applied on the column. Some elution fractions were numbered in the order of eluting from the column. ●—●, absorbance at 280 nm; ·····, concentration of NaCl.

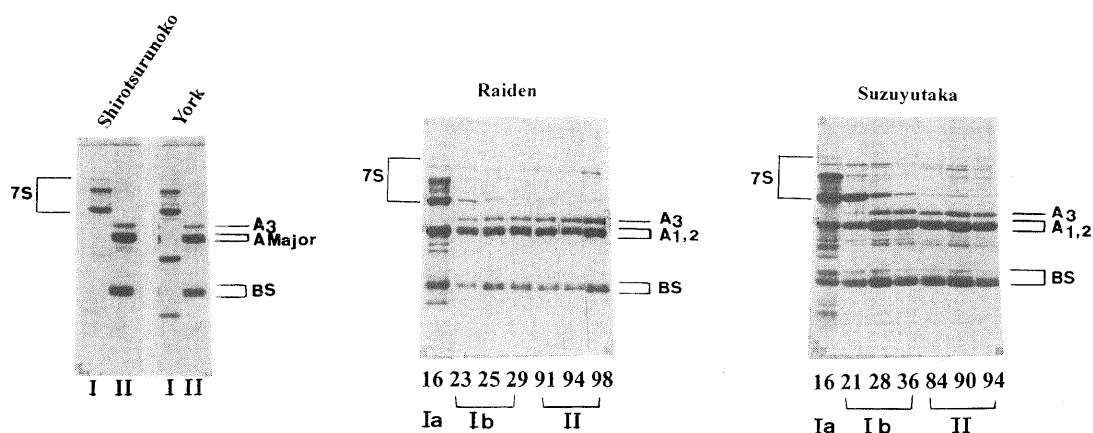


Fig. 2. SDS-PAGE of each fraction obtained from DEAE-Toyopearl column chromatography. The eluted fractions shown in Fig. 1 were electrophoresed in the presence of 2-mercaptoethanol

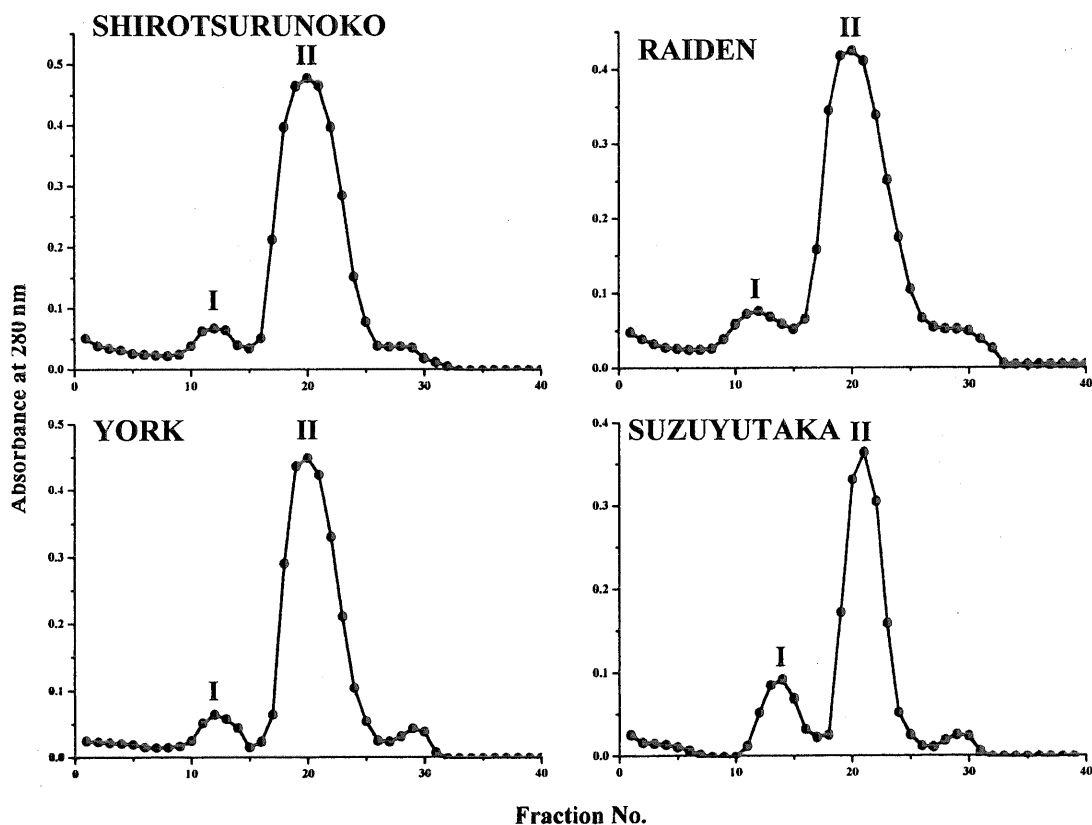


Fig. 3. Sucrose density gradient centrifugation of the crude glycinin fractions. Sedimentation is from left to right.

ショ糖密度勾配遠心によってもグリシニンの精製を行った⁵⁾。グリシニンのサブユニット分析はSDS-PAGEにより行った⁶⁾。

結果と考察

シロツルノコ, York, ライデン, スズユタカからの粗グリシニン画分についてDEAE-Toyopearlを用いたカラムクロマトグラフィーを行った結果, A₄含有品種のシロツルノコとYorkの溶出パターンとA₄欠品種のライデンとスズユタカの溶出パターンに顕著な違いが見られた (Fig. 1)。シロツルノコとYorkでは初期溶出画分 (ピーク I) が単一ピークで小さく後期溶出画分 (ピーク II) が主要部を占めるのに対して, ライデンとスズユタカでは初期溶出画分 (ライデン; ピーク 16, 29: スズユタカ; ピーク 16, 28) が複数ピークで量的にも多く後期溶出画分 (ライデン; ピーク 98: スズユタカ; ピーク 94) は主要部を占めないことがわかった。これら各溶出画分についてSDS-PAGE分析を行った結果 (Fig. 2), シロツルノコとYorkでは初期溶出画分に

グリシニンがほとんど存在しない (レーン I) のに対して, ライデンとスズユタカでは初期溶出画分の1番目のピークにグリシニンのA₁・A₂ (および塩基性サブユニットのBS) サブユニットが存在することがわかった (ライデン; レーン 16: スズユタカ; レーン 16)。2番目のピークについても, A₁・A₂ サブユニットと相対的に低い割合のA₃ サブユニットが存在することがわかった (ライデン; レーン 23, 25, 29: スズユタカ; レーン 21, 28, 36)。また, 早く溶出する程A₃ サブユニットの割合が低いことが示された (ライデン; レーン 23: スズユタカ; レーン 21)。後期溶出画分については, 各大豆品種間で特に差異は見られなかった (シロツルノコ・York; レーン II: ライデン・スズユタカ; レーン 91 ~ 98・84 ~ 94)。以上の結果から, A₄ 欠大豆品種のライデンとスズユタカにはA₃ サブユニットを含まないA₁・A₂ サブユニットのみから成るグリシニンが存在するのではないかと考えられた。

グリシニンは酸性サブユニットと塩基性サブユニットのペアが6コ集合した6量体 (11Sサイズ) として天然に存在するが⁷⁾, イオン強度・pH・変性剤存在

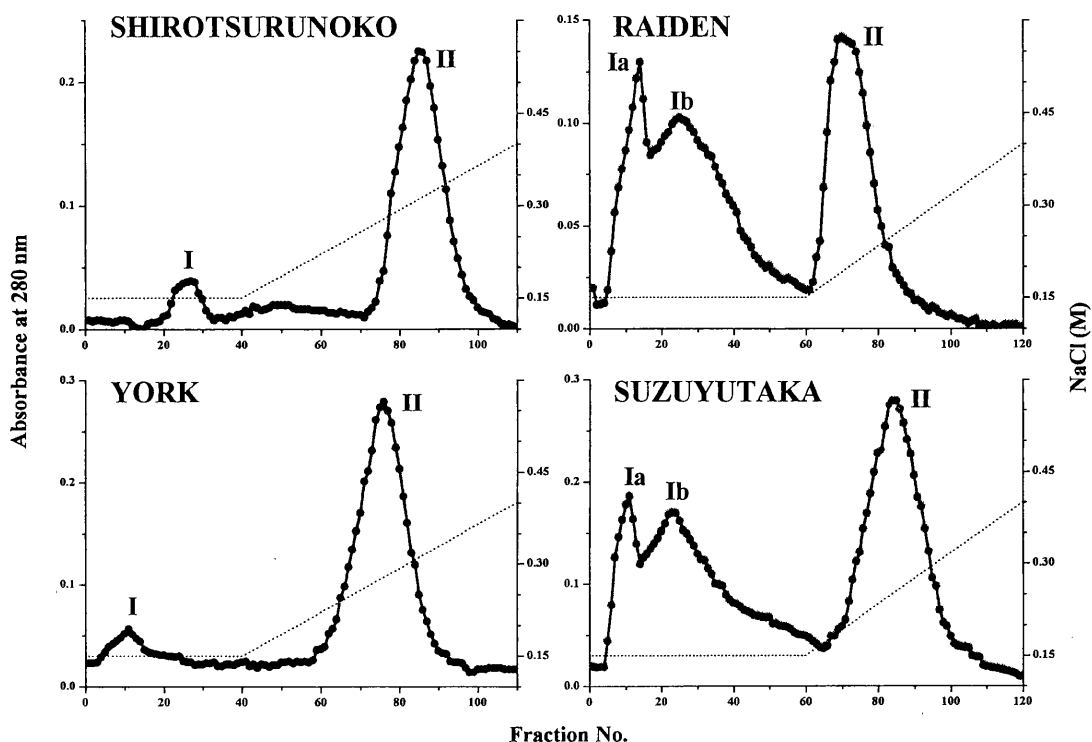


Fig. 4. DEAE-Toyopearl column chromatography of purified glycinin fraction. The purified glycinin fractions obtained by the sucrose density gradient centrifugation were applied on the column. Each elution peak was marked on the chromatogram. ●—●, absorbance at 280 nm; ----, concentration of NaCl.

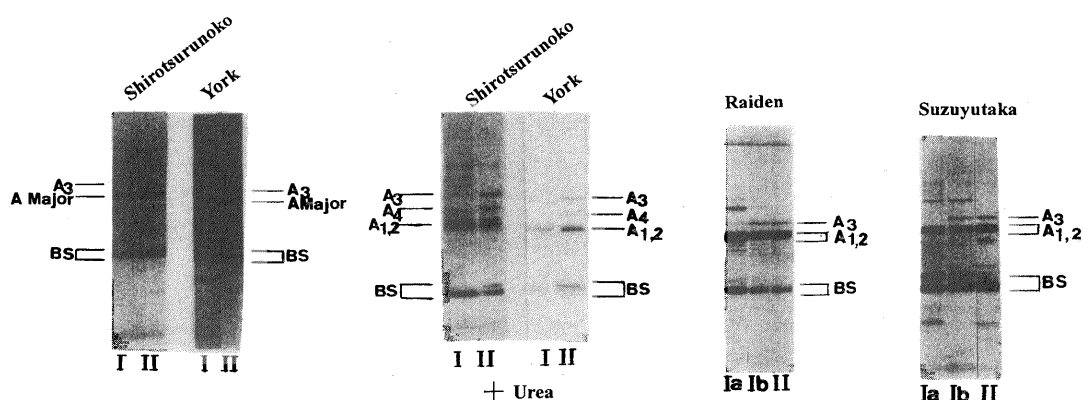


Fig. 5. SDS-PAGE of each peak eluted from DEAE-Toyopearl column chromatography. The eluted peaks shown in Fig. 4 were electrophoresed in the presence of 2-mercaptoethanol under the absence and presence of urea.

等の条件によって3量体(7Sサイズ)や単量体(ベアー, 2Sサイズ)の状態になることが知られている⁷⁾. このため, 上述のA₁・A₂サブユニットのみから成るグリシニン様成分が必ずしも11Sサイズの状態とは限らない可能性がある. そこで, 粗グリシニン画分からショ糖密度勾配遠心により11Sサイズの成分を分離した. ショ糖密度勾配遠心におけるパターンから, 粗グリシニン画分の主成分は各大豆品種において11Sサイズであることがわかった (Fig. 3のピークII). また, SDS-PAGEによるサブユニット分析を行った結果, ピークI (7Sサイズ) およびIIにはそれぞれコングリシニンおよびグリシニンのみが存在することが示された (データ省略). ショ糖密度勾配遠心により分画した11Sサイズのグリシニンについて, さらに, DEAE-Toyopearl カラムクロマトグラフィーを行った. その結果, 各大豆品種の溶出パターン (Fig. 4) は粗グリシニン画分について直接カラムクロマトグラフィーを行った場合の溶出パターン (Fig. 1) とほぼ同様であった. そして, 各溶出画分について SDS-PAGE 分析を行った結果 (Fig. 5), A₄ 欠品種のライデンとスズユタカでは初期溶出画分にA₁・A₂ (およびBS) サブユニットのみが存在し (レーンIa), さらにA₄ 含有品種のシロツルノコとYorkにおいても初期溶出画分にA₁・A₂ (お

よびBS) サブユニットのみが存在することがわかった (レーンI). また, シロツルノコとYorkでは初期溶出画分にA₃ サブユニットはもとよりA₄ サブユニットも存在しないことがわかった (+ Urea, レーンI).

以上の結果から, 大豆のグリシニン分子種としてA₁・A₂ サブユニットのみから成る分子種が天然に存在することが示された. このような分子種の存在は大豆たん白質の加工機能特性の面から興味深いことであるとともに, グリシニン (6量体) の構造形成のメカニズムの観点からも注目すべき現象であると考えられる. A₄ 含有品種ではこの分子種が少くA₄ 欠品種では比較的多く存在することおよびA₄ 含有品種においてA₃ とともにA₄ サブユニットも同時に欠けていることから, グリシニン分子の形成においてA₃ サブユニットが組み込まれるうえでA₄ サブユニットが促進的・協調的な役割を担っている可能性が示唆される. この点については各サブユニットからのグリシニン分子の再構成という手法により追究できるものと考えられる. また, 本研究の結果は, 大豆たん白質の種子中での生合成の過程において各サブユニットの生合成時期や量のコントロールにより分子種の多様性が操作できるのではないかとといった新たな研究課題を提示しているものと思われる.

要 約

大豆からグリシニンを精製する過程において, DEAE-Toyopearl を用いるカラムクロマトグラフィーの溶出パターンが大豆の品種により異なることを見出した. すなわち, A₄ サブユニット欠の大豆品種 (ライデン, スズユタカ) ではA₄ サブユニット含有の大豆品種 (シロツルノコ, York) に比べて初期溶出画分の量が顕著に多かった. この初期溶出画分はカラムに吸着しないで素通りす

るピークとそれに少し遅れて溶出するピークから成り、それぞれのピークについてポリアクリルアミドゲル電気泳動によりサブユニット組成の分析を行った。その結果、素通りピークにはA₃サブユニットが含まれておらず、このピークにはA₃サブユニットを含まないグリシニン分子種が存在することがわかった。また、少し遅れて溶出するピークにはA₃サブユニット含量が比較的少ないグリシニン分子種が存在することが示された。これらA₃サブユニット欠およびA₃サブユニット低含有のグリシニン分子種はいずれも11Sサイズ（六量体）であったことから、これら分子種は天然に存在するものであると考えられる。

文 献

- 1) Mori T, Utsumi S, Inaba H, Kitamura K and Harada K (1981) : Differences in subunit composition of glycinin among soybean cultivars. *J Agric Food Chem*, **29**, 20-23.
- 2) Utsumi S, Inaba H and Mori T (1981) : Heterogeneity of soybean glycinin. *Phytochem*, **20**, 585-589.
- 3) Thanh VH, Okubo K and Shibasaki K (1975) : Isolation and characterization of the multiple 7S globulin of soybean protein. *Plant Physiol*, **56**, 19-22.
- 4) Zheng BA, Matsumura Y and Mori T (1991) : Thermal gelation mechanism of legumin from broad beans. *J Food Sci*, **56**, 722-725.
- 5) Mori T and Utsumi S (1979) : Purification and properties of storage proteins of broad bean. *Agric Biol Chem*, **43**, 577-583.
- 6) Laemmli UK (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, **227**, 680-685.
- 7) Utsumi S, Matsumura Y and Mori T (1997) : Structure-function relationships of soy protein. In : *Food Proteins and Their Applications*. Damodaran S and Paraf A, eds., Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 257-291.