

氏 名 (本籍)	き た むら けい すけ 喜 多 村 啓 介
学位の種類	農 学 博 士
学位記番号	農 博 第 200 号
学位授与年月日	昭和 52 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 食糧化学専攻
学位論文題目	大豆 11S 蛋白質のサブユニット に関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 柴 崎 一 雄 教授 辻 村 克 良

教授 金 田 尚 志

論文内容要旨

11S蛋白質は、大豆種子全蛋白質の25～30%を占める主要蛋白質であり、プロティンボディーと呼ばれる子葉細胞内粒子中に局在し、酸性アミノ酸(Asp, Glu)を多量に含む典型的な植物性蛋白質であり、pH 4.9に等電点を有すグロブリン様蛋白質である。31～36万の分子量を示し数個のサブユニットから構成されるオリゴメリックな蛋白質であるが、現在までのところ、均一な分子構造を有するものと考えられている。

これまで11S蛋白質はその物理的・化学的性質の全く異なった酸性サブユニットと塩基性サブユニットから構成されていること、また酸性及び塩基性サブユニットは各々さらに等電点のわずかな違いにより幾種類かに分けられることは一致した見解として得られていたが、サブユニットの種類やそれらの量比についてはまだ一致した結果が得られていない。またサブユニット間の物理的・化学的関係やその解離・会合反応の性質については系統的な研究がほとんど為されていない。

本研究は、このような見地に立って、大豆11S蛋白質をサブユニットレベルで明らかにしようとしたものである。

第I章 11S蛋白質の分画と精製

これまで、11S蛋白質精製の出発物質として主に冷沈蛋白質区分が用いられていたが、冷沈操作で濃縮される11S蛋白質の収率は数%と低く、種子中の一部の11Sを濃縮している可能性もあり、また純度もそれ程高いものではなかった。そこで本法では、出発物質として冷沈蛋白質の代わりに大久保法によって調製した濃縮効率の高い粗11S蛋白質区分を用いた。

11Sの精製は、粗11S区分に混入する7Sが糖蛋白質であることに着目し、ConA-Sepharose 4Bを用いたアフィニティークロマトで7Sを吸着除去するという新法を導入することにより、これまで11Sの精製を困難にしていた主要原因を解決し、さらにSepharose 6Bによるゲルろ過、及びDEAE-Sephadex A-50によるイオン交換クロマトによって行った(第1図)。精製11Sは超遠心的及びディスク電気泳動的に均一であった。

第II章 酸性サブユニットの単離と物理的・化学的性質

従来、11Sサブユニットの分画は高濃度の尿素と2-MEの存在下、弱アルカリ性側、室温で行われていたが、これらの条件下では分画中に2-MEが溶存酸素によって酸化され溶出液の280nmの吸光度が変化したり、尿素溶液から生成するシアン酸イオンの影響を強く受けることが観察された。

そこで本法では、11Sを還元後ヨードアセトアミド化したRCAM-11Sを試料として用い、弱酸性側(pH 6.0～6.5)、低温で尿素系DEAE-Sephadex A-50イオン交換カラムクロマトを行うことにより、従来の報告と異なる4種類の酸性サブユニット(A₁, A₂, A₃, A₄)を分画することができた。分画された各サブユニットは、尿素系平板ゲル電気泳動で元のサブユニット泳動パ

ンドと同じ移動度を示す単一泳動バンドを与えたことから、分画中のシアン酸の影響が押えられていることが確認された(第2図)。

これら酸性サブユニットの分子量、N-末端アミノ酸及びアミノ酸組成を第I及びII表に示した。

第III章 酸性サブユニットの一次構造レベルでの比較

4種類の酸性サブユニットのアミノ酸配列の比較を、初めて調製されたサブユニットの抗体を用いた免疫学的手法により、またCNBr-処理物をゲル電気泳動及びBio-Gel P-100を用いたゲルろ過法で分析することにより、さらにサブユニットのトリプシン消化物を強酸性樹脂を用いたイオン交換カラムクロマト法で分析することによって検討した。

その結果、A₁とA₂のCNBr-処理物のゲル電気泳動パターンが僅かに異なること、及び少なくとも3個以上のトリプシン消化ペプチドピークが異なることから、A₁、A₂サブユニットはきわめて類似した一次構造を有するが、異なった2種のポリペプチド鎖であるものと推定された。抗-A₃血清に対しA₁及びA₂サブユニットは約50%の免疫交差反応率を示し(第3図)、またA₁、A₂、A₃のトリプシン消化物が、互いに比較的類似したイオン交換クロマトグラムを示したことから、これら3種類のサブユニットの一次構造にはかなりの類似性があるものと推定された。一方、A₄サブユニットは血清学的には他の3種類の酸性サブユニットと区別されるものであった(第3図)が、トリプシン消化物の溶出パターンには、他の酸性サブユニットの溶出パターンとの間にある程度の類似が認められた。

これらの結果から、11S蛋白質の4種類の酸性サブユニットは、一次構造レベルで互いに相同的な関係にあるサブユニット(ポリペプチド鎖)であるものと推定された。

このことは、ソラマメやエンドウなど他の豆科種子にも広く存在することが知られている11S蛋白質成分のサブユニット間にも一次構造レベルの相同性があることを示唆するものとして興味深い。

第VI章 サブユニット構造

4種類の酸性サブユニットと酸性側尿素系ゲル電気泳動法で識別された4種類の塩基性サブユニット(B₁、B₂、B₃、B₄)の11S分子中の存在量比を尿素系ゲル電気泳動バンドの染色比、及び尿素系イオン交換カラムクロマトでのサブユニットの溶出ピーク面積比から検討した。また非還元変性状態で11Sの分子量が酸性サブユニットの分子量の約2倍値を示し、また沈降定数も約3Sと還元した場合の約2Sよりも大きいことから、ポリペプチド鎖まで解離されない中間物の存在が考えられたので、ジスルフィド結合を開裂しない状態で11Sのサブユニット(中間サブユニット)の分画を試みた。分画は、S-S交換反応を防ぐため11S中のフリーのSH基をヨードアセトアミドで修飾した後、6M尿素存在下、DEAE-Sephadex A-50カラムクロマトで行った。

これらサブユニットの存在モル比は、 $A_1 : A_2 : A_3 : A_4$ 、及び $B_1 : B_2 : B_3 : B_4$ がともに $1 : 1 : 2 : 2$ であり、全酸性対全塩基性サブユニットのモル比は $1 : 1$ であった。中間サブユニットは3種類 (IS-1, 2, 及び3) 分画され、各々の構成ポリペプチド鎖は、IS-1が A_1 (or A_2) - B_3 、IS-2が A_3 - B_1 (or B_2)、IS-3は A_4 - B_4 であった。11S蛋白質のサブユニット組成を第III表に要約して示した。

これらの結果及び従来からの知見から、11Sは、3個の中間サブユニットから成るポリペプチド鎖組成の僅かに異なった2個の半量体(7S)から構成され、各々の半量体は1モルの A_1 か A_2 、1モルの A_3 及び A_4 、1モルの B_1 か B_2 及び1モルの B_3 及び B_4 を有するサブユニット構造をとるものと推定された。

第V章 11S蛋白質の復元

これまで、11Sは高濃度尿素変性などで不可逆的に解離変性し、復元されないものと考えられていた。しかし、従来からの報告と異なり11Sも7Sと同様、変性状態から透析で変性剤を除去することにより容易に免疫活性を回復することを観察した。そこで、11Sが鎖間にジスルフィド結合を有する多鎖蛋白質であることに注目し、非還元変性(8M尿素変性)と還元変性(8M尿素-0.2M2-ME変性)状態から、11Sの復元を検討した。復元は透析によって変性剤を除去することによって行い、復元された11Sの精製は、免疫活性、及び電気泳動的挙動を基準として、Sephrose 6Bによるゲルろ過で行った。精製した復元11Sの諸性質を生々の11Sと比較し復元度を検討した。

その結果、11Sは非還元変性状態から約70%の収率で復元された。精製した復元11Sは、ゲルろ過、超遠心、ゲル電気泳動、免疫二重拡散及びCD的に生々の11Sと区別出来ず、またサブユニット組成及びトリプシンによる被分解性にも差異がなかった。一方、還元変性状態から、11Sは見掛け上、約20%の収率で復元(再酸化)されたが、精製した復元(再酸化)11Sは、生々の11Sと明らかに異なったCD曲線を与え、またサブユニット組成及びトリプシンによる被分解性にも差異が認められた。

これらの結果と第IV章の結果から、11Sの非還元変性状態(中間サブユニット)への解離変性は可逆的であるが、還元変性状態(ポリペプチド鎖)への解離変性は不可逆的であると推定され、11Sの解離会合様式を第4図の様に示した。

11Sが中間サブユニットから容易に再構成される蛋白質であることが示されたことは、異なった大豆品種あるいは他の豆科種子の11S成分を中間サブユニットレベルで組み換えることにより、これら11S成分の蛋白化学的差異や系統関係を検討することを可能にしたものとして興味深い。

Defatted soybean meal
 | adjustment of pH and ionic strength
 Crude IIS (Okubo's crude IIS)
 | fractionation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 Fractionated IIS (Wolf's fraction VI)
 | affinity chromatography on a ConA-Sepharose 4B column
 Non-adsorbed fraction
 | gel filtration on a Sepharose 6B column
 | ion exchange chromatography on a DEAE-Sephadex A-50 column
 Purified IIS globulin

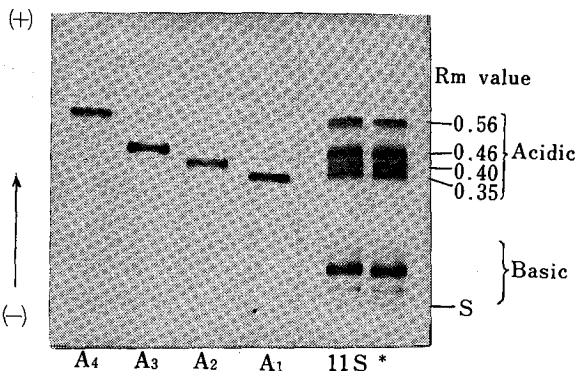


Fig. 2. Slab gel electrophoresis of isolated acidic subunits, RCAM-IIS and IIS globulin in alkaline urea system.

Gel, 0.04 M tris-citrate (pH 8.7) containing 7.5 % polyacrylamide (5.0 % Bis), 7 M urea and 0.02 M 2-ME; Sample buffer, 0.04 M tris-citrate (pH 8.7) containing 8 M urea and 0.2 M 2-ME.

* RCAM-IIS. Gel was stained with Amido Black 10 B.

Electrophoresis was carried out for 4.5 hr at a constant voltage of 225 V.

g. 1. Fractionation and purification of IIS.

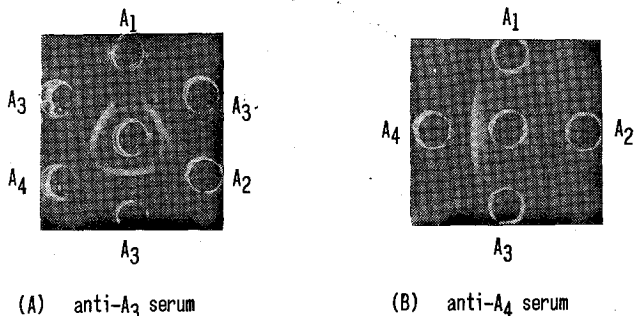


Fig. 3. Double immunodiffusion in agar gel of the acidic subunits.

Each peripheral well of the antigens contains 0.1 % of the four acidic subunits.

Dissociation-Association Scheme for IIS Globulin

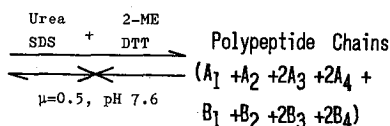
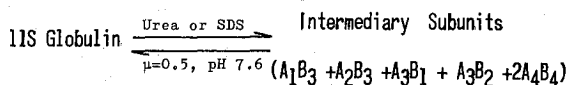


Fig. 4.

Table 1. Physical chemical properties of the subunits (polypeptides)

Subunit	Molecular weight ^{a)}	N-terminal amino acid ^{b)}
A ₁	37,000	Phe
A ₂	37,000	Phe
A ₃	37,000	Leu (Ile)
A ₄	45,000	Leu (Ile)
Basic	22,500	Gly

a) by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

b) by DNP-amino acid method

Table 2. Amino acid composition of the subunits and IIS globulin

Amino acid	A ₁	A ₂	(AA res. % / TAA res.)		Basic ¹⁾	IIS
			A ₃	A ₄		
Lys	5.7	5.8	3.8	3.4	3.3	4.1
His	1.5	1.6	0.8	3.5	1.6	1.8
Arg	4.9	4.7	6.3	5.2	5.4	5.9
Cys ²⁾	1.4	1.5	1.6	0.9	0.7	1.1
Asp	11.3	10.7	11.5	12.1	14.0	11.8
Thr	3.8	3.6	3.6	4.3	4.7	4.2
Ser	6.2	5.9	5.4	8.8	8.6	6.6
Glu	26.5	26.4	25.7	24.9	13.4	18.8
Pro	5.5	5.7	4.6	7.2	5.3	6.3
Gly	9.1	8.9	8.6	7.8	6.7	7.8
Ala	3.5	4.7	6.0	3.2	7.5	6.7
Val	4.2	4.2	5.8	5.1	6.6	5.6
Met	0.9	0.9	1.7	0.9	1.2	1.0
Ile	5.1	5.0	4.2	2.9	4.8	4.6
Leu	5.0	5.4	5.1	5.0	9.0	7.2
Tyr	2.3	2.0	2.1	2.1	2.8	2.5
Phe	3.2	3.2	3.4	2.8	4.6	3.9

¹⁾ Determined as Carboxy methyl cysteine.

²⁾ Undesorbable fraction of RCAM-IIS dissolved in 0.06 M phosphate buffer (pH 6.3) containing 6 M urea to DEAE-Sephadex A-50 equilibrated with the buffer.

Table 3. Subunit Composition of Soybean IIS Globulin

Polypeptide Chains		Intermediary Subunits
A ₁ : A ₂ : A ₃ : A ₄	B ₁ : B ₂ : B ₃ : B ₄	IS-1 : IS-2 : IS-3
= 1 : 1 : 2 : 2	= 1 : 1 : 2 : 2	= 1 : 1 : 1
A ₁ (or A ₂) —s-s— B ₃		IS-1 (58,000)
(37,000)	(22,500)	
A ₃ —s-s— B ₁ (or B ₂)		IS-2 (60,000)
(37,000)	(22,500)	
A ₄ —s-s— B ₄		IS-3 (63,000)
(45,000)	(22,500)	

$$\text{IIS Globulin} = 2(\text{IS-1} + \text{IS-2} + \text{IS-3}) = \text{A}_1 + \text{A}_2 + 2\text{A}_3 + 2\text{A}_4 + \text{B}_1 + \text{B}_2 + 2\text{B}_3 + 2\text{B}_4$$

M.W. (360,000) (362,000) (373,000)

審査結果の要旨

11S は全蛋白質の 25～30% を占め、分子量は 31～36 万で数個のサブユニットから構成されている。物理化学的性質の全く異なった酸性および塩基性サブユニットからなり、各々さらに等電点のわずかな違いにより幾種類かに分けられる。現在迄にサブユニットの種類や量比、またこの間の物理化学的関係や解離会合反応については知られていないので、大豆 11S 蛋白質をサブユニットのレベルで明らかにすることが本論文の目的である。

大久保法により得た粗 11S からアフィニティークロマトで主混入物の 7S を吸着除去する新法を行い、ゲルろ過およびイオン交換クロマト等により精製して試料とした。

11S を還元後ヨードアセトアミド化し、弱酸性、低温で尿素系 DEAE-セファデックス A-50 クロマトで、初めて 4 種類の酸性サブユニットを単離し、分子量、アミノ酸組成および N-末端アミノ酸等を明らかにした。

ついでアミノ酸配列を免疫学的手法、ゲルろ過、イオン交換クロマト等により比較検討した結果、4 種類は一次構造レベルで互に相同的な関係にあるものと考えられた。

他方酸性側尿素系ゲル電気泳動法で塩基性サブユニット 4 種類を見出し、量比を明らかにしたばかりでなく、中間サブユニット 3 種類も分画に成功し、11S のサブユニット構造を明らかにした。ついでこれらサブユニットから元の 11S の復元を検討して構造を確認した。復元は透析によって変性剤を除去することによって行なった。

従来、生理活性がなく単なる貯蔵蛋白質と考えられて解明の進まなかった種子蛋白質もサブユニットレベルで解明されたことは植物化学としてばかりでなく植物性蛋白質の利用上からも非常に有益な知見を加えたもので、審査員一同は学位を授与するのに十分な資格あるものと判断した。