

ソバ種実から得られる低分子性タンパク質の 精製と 2, 3 の理化学的性質

坂本えり奈, 家本 敦子, 清原 利文
(武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科)

Purification and Physicochemical Properties of Low Molecular Weight Proteins from Buckwheat Seeds

Erina Sakamoto, Atsuko Iemoto and Tosifumi Kiyohara

*Department of Food Science and Nutrition,
School of Human Environmental Sciences,
Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663-8558, Japan*

Two low molecular weight proteins were separately isolated in crystalline forms from buckwheat seeds by affinity chromatography on a chitin column, ion exchange chromatography on a CM-cellulose column and gel filtration through a Sephadex G-25 column. The two crystalline proteins thus obtained were referred to as buckwheat chitin-binding proteins I and II, BCP I and II, respectively. Further purification of the crystalline BCP II by high performance liquid chromatography resulted in separation into the three proteins, BCP II a1, II a2 and II b, respectively. These three purified proteins showed a single band on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, indicating that each protein was essentially homogeneous.

The purified BCP II a1, II a2 and II b had the very similar amino acid compositions, mutually, and comprised the total numbers of amino acid residues of 40 to 46, suggesting that they are closely related to each other. The amino acid compositions of the purified proteins revealed that the minimum molecular weights of BCP II a1, II a2 and II b were 4,800, 5,500 and 4,800, respectively. The proteins were stable in the wide range of pH 3 to 11 at lower temperature than 60°C and even in the range of acidic pH at 100°C.

緒 言

ソバはタデ科ソバ属に属する1年生草本である。日本では古代より栽培され、主食あるいは補助食として麺食、粒食あるいは粉食のかたちで食用に供されてきている。ソバ種実のタンパク質は穀類の中でも栄養価(アミノ酸スコア;100)および消化性の点で優れている¹⁾にも拘わらず、ソバ・タンパク質に関する研究は、他の穀類タンパク質のそれと比較し

て少なく、主なものとして、プロテイナーゼ・インヒビター、アレルギー・タンパク質など限られた報告しかない²⁻⁴⁾。

また、キチンはアミノ糖であるN-アセチル-D-グルコサミン残基が多数β-(1, 4)結合した多糖類である。このキチンに結合して、血液凝集作用や抗菌作用を示す低分子性レクチンおよび低分子性タンパク質が、Broekaert W.F.らによって、イラクサ属の雑草(*Urtica dioica*)、パラゴムの木(*Hevea*

brasiliensis)およびアマランサス属センニンコク (*Amaranthus caudatus*)から単離され、それらの性質およびアミノ酸配列などが報告⁵⁻¹⁰⁾されているが、これら3種の植物以外からの報告は見当たらない。

筆者らは、真菌類の細胞壁多糖類であるキチンに結合し、抗菌作用を示すと考えられるタンパク質の存在を新たにソバ種実中に認め、本タンパク質の構造と機能の関係を明らかにする目的で、まず、キチン結合性タンパク質の精製を試み、併せて2, 3の理化学的性質を調べた。

方 法

1. 実験材料

ソバ種実 (*Fagopyrum esculentum* Mönch, 品種名; 信州大そば) はタキイ種苗株式会社から購入し、5℃で保存したものを実験に用いた。また、キチンは和光純薬社製を、CM-セルロースはセルバ社製を、セファデックスはファルマシア社製のものを使用した。その他の試薬類は分析用試薬または試薬特級を用いた。

2. 粗試料液の調製

ソバ粉(1kg)に10倍量の0.1M酢酸溶液を加えて抽出を行い、濾過した後、得た濾液を80℃、10分間加熱処理した。生じた沈殿物は濾過により除去した。得た濾液に1Nアンモニア溶液を加えてpHを8.0に調整した。このように調製した溶液を以下の精製の粗試料液とした。

3. 試料の精製

a. アフィニティクロマトグラフィー カニの甲羅から調製された市販のキチンを予め1N塩酸、イオン交換水、1N水酸化ナトリウム、最後にイオン交換水の順に洗浄した。このように精製したキチンをカラム(2.3×26cm)に充填し、0.05M酢酸-酢酸アンモニウム緩衝液(pH8.0)で予め平衡化したカラムに粗試料液を供した。吸着されたタンパク質の溶出は0.1M酢酸を用いて行った。

b. イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過 試料の精製に用いたCM-セルロースカラム(2.3×25cm)は予め0.05M酢酸-酢酸アンモニウム緩衝液(pH4.1)で平衡化し、試料の溶出は同緩衝液と0.2M酢酸-酢酸アンモニウム緩衝液(pH8.5)からなるpH-濃度勾配法で行った。また、ゲル濾過は予め0.1M酢酸で平衡化したセファデックスG-25カラム(3.2×140cm)を用い、試料は同溶液で溶出

した。

c. 高速液体クロマトグラフィー(HPLC) 結晶タンパク質のさらなる精製は高速液体クロマトグラムシステム(日立製, 655A-12型)を用いて行った。試料は予め0.1%トリフロロ酢酸(TFA)で平衡化したケムコソルブカラムに供した。タンパク質の溶出は0.1%TFAと0.1%TFAを含む70%アセトニトリル溶液による濃度勾配法で行った。

4. タンパク質濃度

タンパク質の濃度は溶液の280nmにおける吸光度を測定し、後で述べる吸光係数を用いて求めた。

5. 精製タンパク質の均一性

得た精製タンパク質の均一性の検討はLaemmli¹¹⁾の方法により、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)を用いて行った。泳動は12%平板ゲルを用い、定電圧(120V)で行った。

6. キチン結合活性および安定性

試料2.5mgを含む各種pH(pH3~11)の0.04M Britton-Robinson 広域緩衝液1mlを30~100℃で10分間加熱処理した。次いで、処理液のpHが8.0になるように0.04M Britton-Robinson 緩衝液(pH8.0)を4mlづつ加えた後、キチン(50mg)と30℃、20分間反応させた。反応液は遠心分離(3000回転/分, 5分間)し、得た上澄液の残存吸光度からキチン結合活性を求め安定性を調べた。

7. アミノ酸分析

タンパク質試料は定沸点塩酸(5.7N)を用い、減圧下、封管中で、110℃、24時間加水分解を行った。アミノ酸の分析¹²⁾は日立アミノ酸自動分析計(835型)により行った。また、TrpはGoodwin and Mortonの方法¹³⁾により測定した。

結果および考察

1. 低分子性タンパク質の精製

1) キチンカラムを用いたアフィニティクロマトグラフィー

方法の項で述べた粗試料液(pH8.0)を予め0.05M酢酸-酢酸アンモニウム緩衝液(pH8.0)で平衡化したキチンカラムに供し、同緩衝液を用いて十分にカラムを洗浄した。溶出は0.1M酢酸を用いて行った。

その結果、吸着されたタンパク質は単一の画分として溶出された。この画分をBuckwheat Chitin-Binding Protein(BCP)と名付けた。その溶出図をFig. 1に示す。得たBCP画分は減圧下で濃縮し、濃縮液は凍結乾燥を行った。

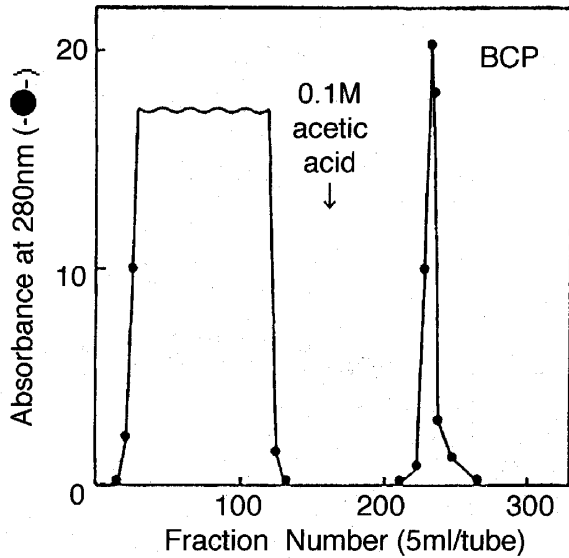


Fig. 1. Affinity Chromatography of a Crude Extract from Buckwheat Flour on a Chitin Column. Sample was put on to a column which was previously equilibrated with 0.05M ammonium acetate buffer, pH 8.0, and the column was washed with the same buffer. Elution was performed with 0.1M acetic acid.

2) CM-セルロースカラムクロマトグラフィー

凍結乾燥した BCP 画分は 0.05M 酢酸-酢酸アンモニウム緩衝液 (pH4.1) に溶解し, 1M 酢酸で pH を 4.1 に調整した後, 予め同緩衝液で平衡化した CM-セルロースカラムに加え, 同緩衝液でカラムを十分に洗浄した. 次に, 同緩衝液と 0.2M 酢酸-酢酸アンモニウム緩衝液 (pH8.5) からなる pH-濃度勾配法で溶出したところ, 大小 2 種のタンパク質画分 (BCP I および II) に分離した (Fig. 2). 得た 2 画分は別々に濃縮した.

3) ゲル濾過

それぞれの画分について, ゲル濾過を行った. その結果, 両タンパク質とも単一の画分として溶出されたので, 各画分について凍結乾燥を行った.

4) 結晶化

凍結乾燥した 2 画分のうち, BCP I 画分は極く微量の水に溶解し冷アセトンを滴加し冷蔵庫に放置したところ, 棒状の結晶を得た. また, BCP II 画分は少量の 0.05M 酢酸-酢酸アンモニウム緩衝液 (pH4.1) に溶解し, 冷蔵庫 (5°C) 中で結晶化を試みた. その結果, BCP II は長方形板状の結晶として析出した (Fig. 3A および 3B).

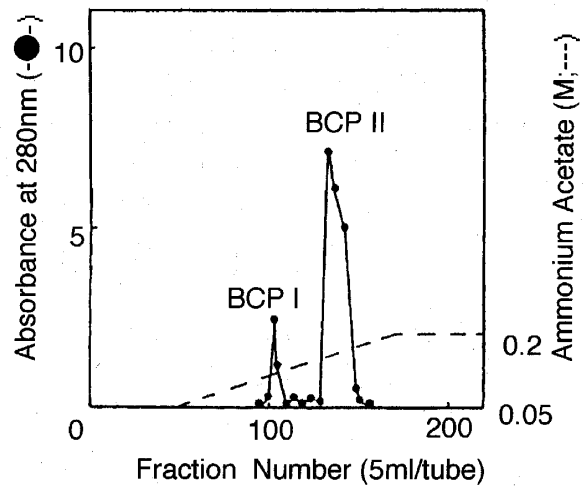
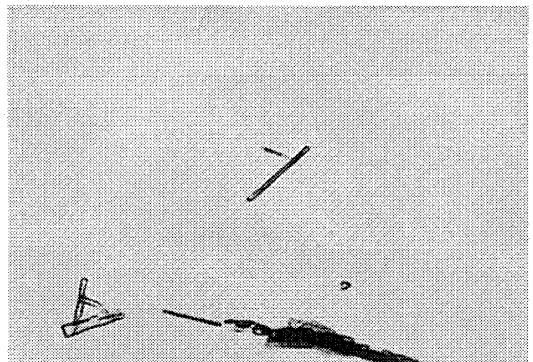


Fig. 2. Ion Exchange Chromatography of the BCP Fraction on a CM-Cellulose Column. Elution was first performed with 0.05M ammonium acetate buffer, pH 4.1, and then with a linear gradient consisting of 300ml of the same buffer and 300ml of 0.2M ammonium acetate.

(A)



(B)

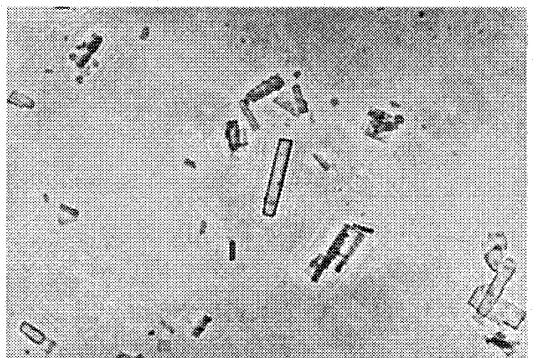


Fig. 3. Crystals of the BCP I (A) and II (B).

なお, 両結晶の収量は, ソバ粉 1kg 当たり, BCP I 画分は約 0.15g, また BCP II 画分は約 1.5g であった.

5) 高速液体クロマトグラフィー

そこで、主画分である結晶 BCP II をさらに精製するために、HPLC を用いて精製したところ、BCP II a1, II a2 および II b の 3 画分に分離された。それぞれの画分を再び HPLC に供し、単一の画分とした。

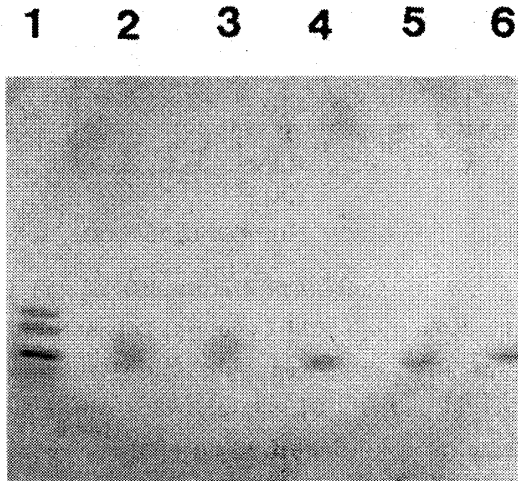


Fig. 4. Electrophoretic Pattern of BCP I, II and the Further Purified Proteins on a SDS-PAGE. Lane 1 was marker proteins; Lanes 2 and 3 show BCP I and II; lanes 4, 5 and 6 show BCP II a1, II a2 and II b in order of number, respectively.

2. 低分子性タンパク質の均一性

これら 3 種の精製タンパク質 (BCP II a1, II a2 および II b) の均一性を SDS-PAGE を用いて検討した結果、得た 3 種の精製タンパク質はそれぞれ単一のバンドとして観察された。この結果から、これら 3 種の精製タンパク質はいずれも均一であることが示唆された。

3. 低分子性タンパク質の性質

1) 安定性

本タンパク質 (BCP II) の安定性を調べたところ、60°C 以下の加熱処理では、用いた pH3~11.0 の範囲内において、また pH5.0 以下の領域では、より高い温度処理においても安定であった。しかし、高い pH 領域 (pH8.0~11.0) における高温処理では、キチン結合活性は消失していた (Fig. 5)。

2) 吸光係数と吸収スペクトル

精製した 3 種のタンパク質 (BCP II a1, II a2 および II b) のうち、BCP II a1 および II a2 の吸光係数 ($E_{280nm}^{0.1\%}$) を求めた。

その結果、BCP II a1 および II a2 の吸光係数はそれぞれ 2.95 および 3.96 であった。

また、典型的な吸収スペクトルの 1 例 (BCP II a1) を Fig. 6 に示す。この吸収スペクトルから判断して、これらのタンパク質中に Trp の存在が示唆された。

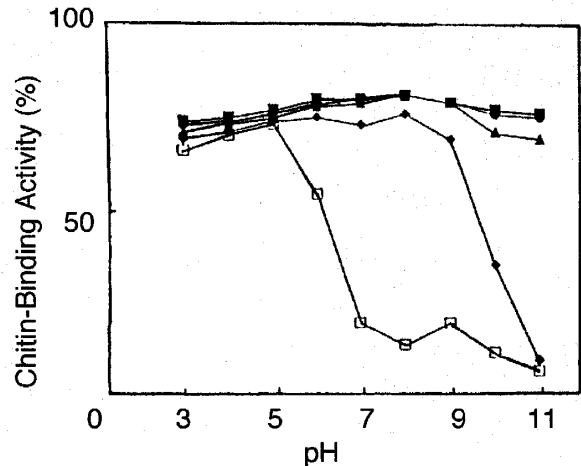


Fig. 5. Thermal and pH Stabilities of BCP II. The sample solution was treated at various pH's and temperatures as described in 'Method'. The chitin binding activity was calculated from the residual absorbance of the reaction mixture. The symbols, ■, ●, ▲, ◆ and □ indicate 30°C, 40°C, 60°C, 80°C and 100°C, respectively.

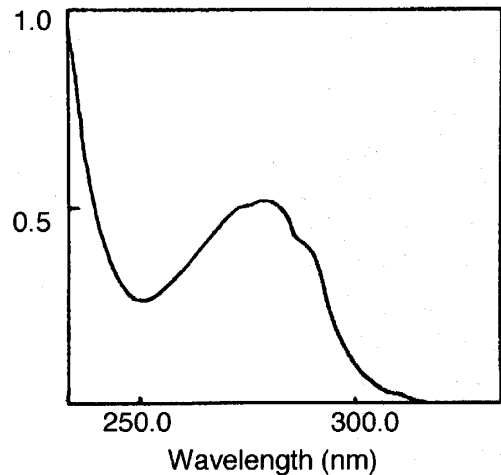


Fig. 6. Typical Absorption Spectrum of Purified BCP II a1.

3) アミノ酸組成

次に、HPLC により精製した 3 種のタンパク質 (BCP II a1, II a2 および II b) のアミノ酸組成を調べた。その結果、BCP II a1 は 40 個のアミノ酸残基からなり、分子量は 4,800 と、BCP II a2 のアミ

Table 1. Comparison of Amino Acid Compositions of the Crystallized and Further Purified BCP II's with Those of Antifungal or Antimicrobial Chitin-Binding Proteins from the Other Families of Plants, Stinging Nettle, UDA⁷⁾, Rubber Tree Latex, Hevein⁹⁾ and *Amaranthus Caudatus* Seeds, Ac-AMP1 and Ac-AMP2.¹⁰⁾

| Amino acid | Chitin-Binding Antifungal or Antimicrobial Proteins | | | | | | |
|------------|---|-------|------|-----|--------|------|------|
| | BCP | | | Ac | | | |
| | II a1 | II a2 | II b | UDA | Hevein | AMP1 | AMP2 |
| Asp | 1 | 1 | 1 | 7 | 7 | 0 | 0 |
| Thr | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| Ser | 3 | 3 | 3 | 11 | 4 | 2 | 2 |
| Glu | 4 | 6 | 4 | 7 | 6 | 2 | 2 |
| Pro | 2 | 3 | 2 | 4 | 2 | 2 | 2 |
| Gly | 10 | 11 | 10 | 17 | 5 | 7 | 7 |
| Ala | 4 | 5 | 4 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| 1/2Cys | 8 | 8 | 8 | 16 | 8 | 6 | 6 |
| Val | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 2 |
| Met | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Ile | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Leu | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| Tyr | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 | 2 |
| Phe | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Lys | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| His | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| Agr | 0 | 1 | 1 | 6 | 1 | 2 | 3 |
| Trp | 2 | 2 | 2 | 5 | 2 | 0 | 0 |
| Total | 40 | 46 | 40 | 89 | 43 | 29 | 30 |

Numbers of amino acids of UDA, Hevein and Ac AMP's are those determined by sequence analysis.

ノ酸残基数は46, (分子量;5,500)また, BCP II bのそれは40(分子量;4,800)と算出された(Table 1).

これらのアミノ酸組成を比較すると, 3者は共にVal, Met, Ile, PheおよびHisを含まない点で共通し, 低分子性タンパク質であるにも拘わらず, 1/2Cys含量およびGly含量が極めて高いことが特徴的であった. また, これらのタンパク質は互いに類似のアミノ酸組成を有していた. このことは, 得た3種のタンパク質が同族のタンパク質(分子種)であることを示唆していた.

Table 1に示すように, 我々がソバから得た3種のBCP(II a1, II a2およびII b)をBroekaert W.F.らによって見出された抗真菌性キチン結合タンパク質(Hevein⁹⁾)と比較すると, これらは非常によく似た特有のアミノ酸組成を有し, 非常に高い1/2Cys含量(全アミノ酸の約20%)およびVal,

Met, IleおよびPheに欠けていることが共通しており, AspおよびGly含量のみが異なっていた.

また, 血液凝集活性をもつことから, レクチンの1種とみなされ, しかも抗菌活性をもち構造的には2種の類似のドメインが直列に配列していると報告されているレクチン(UDA)と比べても, これもまた, 特徴的なアミノ酸組成をもち, BCP(II a1, II a2およびII b)と似たアミノ酸組成を有していた. 一方, 上記の抗真菌タンパク質とは異なり, 真菌類だけでなくグラム陽性細菌にも抗菌作用をもつと報告されているAc-AMP1およびAc-AMP2¹⁰⁾と我々の3種のタンパク質(BCP II a1, II a2およびII b)を比較すると, また類似の特徴的なアミノ酸組成をもっていたが, Asp, Thr, Ala, Met, PheおよびTrp含量ならびにアミノ酸残基の総数の点でやや異なっていた.

これらのことは、我々の3種のタンパク質とUDA, HeveinならびにAc-AMP1およびAc-AMP-2との僅かなアミノ酸組成やアミノ酸残基の差異が、キチンに対する親和性、真菌類に対する抗菌性の強弱あるいは細菌を含む抗菌スペクトルに強く影響を及ぼしている可能性を示唆していることは非常に興味深い。

要約

ソバ種実から、キチンに結合する低分子性タンパク質をアフィニティクロマトグラフィー、CM-セルロースクロマトグラフィー、ゲル濾過および結晶化の各種操作により精製し、2種の結晶(BCP IおよびII)を得た。このうち、結晶BCP IIをさらにHPLCに供し、電気泳動的に均一な3種の精製タンパク質(BCP II a1, II a2およびII b)を単離した。この精製したタンパク質は、高温下でも、酸性から中性までのpH領域において安定であった。

これら3種の精製タンパク質(BCP II a1, II a2およびII b)はアミノ酸残基約40の低分子性(分子量:約5,000)の単純タンパク質であり、3者は共に1/2CysおよびGlyに富み、Met, Ile, PheおよびHisを欠く特徴的なアミノ酸組成を有していた。また、これら類似したアミノ酸組成から、本タンパク質は互いに同族タンパク質(分子種)であることが示唆された。

本研究を行うにあたり、種々のご協力を頂きました神戸大学農学部助教授山形裕士博士に心から厚くお礼申し上げます。

文献

- 1) 日本麺類業団体連合会監修:ソバの基本技術, 第1巻, 柴田書店編, 1995, pp 38-45.
- 2) Ikeda K. and Kusano T., *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 481-485(1983)
- 3) Kiyohara T. and Iwasaki T., *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 581-588(1985)
- 4) Park SS, Abe K, Kimura M, Urisu A and Yamasaki N, *FEBS Lett*, **400**, 103-107 (1997)
- 5) Peumans W.J., Ley M.D. and Broekaert W.F., *Fed. Eeu. Biochem. Soc.*, **177**, 99-103(1984)
- 6) Broekaert W.F., Parijs J.V., Leyns F.,

- Joos H. and Peumans W.J., *Science*, **245**, 1100-1102(1989)
- 7) Beintema J.J. and Peumans, *FEBS Lett.*, **299**, 131-134(1992)
- 8) Parijs J.V., Broekaert W.F., Goldstein i.j., Peumans W.J., *Planta*, **183**, 258-264 (1991)
- 9) Broekaert W.F., Lee H.I., Kush A., Chua N.H. and Raikhel N., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 7633-7637(1990)
- 10) Broekaert W.F., Marien W., Terras M.F., De Bolle M.F.C., Proost J.V., Damme J.V., Dillen L., Claeys, M., Rees S.B., Vanderleyden J. and Bruno Cammue P.A., *Biochemistry*, **31**, 4308-4314(1992)
- 11) Laemmli U.K., *Nature*, **277**, 680(1970)
- 12) Spackmann H.D., Stein W.H. and Moore S., *Anal. Chem.*, **90**, 1190-1195(1958)
- 13) Goodwin T.W. and Morton R.A., *Biochem. J.*, **40**, 628-632(1946)