

大豆蛋白中の硫黄の形態に就て

森 茂 樹

A 緒 言

蛋白の加水分解物より分離せられた含硫黄アミノ酸としては Cystine の外に Methionine, 更に最近に至り発見せられた, Lanthionine⁽¹⁾ がある. 蛋白に含まれる含硫基として或る場合には之等の既知のアミノ酸基以外の結合例へば Thiazoline⁽²⁾ の如き基の存在することも豫想せられて居るが通常, 蛋白の加水分解物より分離せられる含硫黄アミノ酸としては Cystine 及び Methionine が主であることは蛋白中兩者の分析値より算出した硫黄含量の和が蛋白の全硫黄量と多くの場合殆ど合致する事實⁽³⁾ により首肯出来る.

抑もアミノ酸の中 Cystine が Tryptophane 及び Lysine 等と共に動物の成長に必須であることは古く Osborne 及び Mendel (1911) が指摘したところであるが, 其後 Hopkins 等 (1921) は Cysteine が Glutathione 即ち γ -Glutamylcysteinylglycine の形態を以て生體酸化還元に重要な役割を演ずることを明かにした. 1922年に Methionine が発見せられて以來その生理的意義並びに代謝上 Cystine との関係が次第に明かとなり, その結果 Methionine は Cystine より更に重要なアミノ酸であることが明かにせられた.⁽⁴⁾ 而して乍らこの兩種のアミノ酸は種々なる中間化合物を通じて互に交替し得るものと考へられるから生理上, 栄養上共に重要なことに於て變りがない.

含硫黄アミノ酸は栄養上、生理上斯くの如く重要である以外に蛋白分子の構成及び變性現象に硫黄の結合が密接なる関係のあることは近時屢々論議せられて居るところでその意味に於ても蛋白中の硫黄の形態及びその含量を明かにすることは重要である. 依つて大豆及び脱脂大豆蛋白中の Cystine 及び Methionine 含量を定量し, 併せて生大豆及び新鮮度を異にする脱脂大豆蛋白のスルフヒドリル基量を比較し, 變質の進むに従つて蛋白中の硫黄の結合に變化が起ることを確めた. その結果を報告する次第である.

B 實驗成績並びに考察

I 全硫黄, Cystine 及び Methionine の定量

(a) 供 試 蛋 白

新鮮生大豆 (昭和15年秋期收穫, 昭和16年3月迄貯藏せるもの) を碎粉し10%食鹽水にて抽

出し、硫酸アンモニウムを飽和して生ずる沈澱を濾別して水に溶解し、透折して生ずる沈澱に食鹽水を加へて 0.5n NaCl 溶液となし、[※] 濾紙パルプ層を通して濾過して得たる殆ど透明なる濾液を再び透折して生じた沈澱をメタノール及びエーテルを用ひて乾燥した。即ちこの方法は大体 Osborne 等⁽⁵⁾の Glycinin 調製の順序に倣つたものである。尚ほ抽出及び濾過は出来る限り冷温に保ち透折は終始 0°C の冷蔵庫内にて行つた。

脱脂大豆蛋白² 脱脂大豆に10倍量の10%食鹽水を加へて抽出し、抽出液を 0°C に於て透折した沈澱をメタノール及びエーテルを用ひ脱水乾燥した。

(b) 全 硫 黄

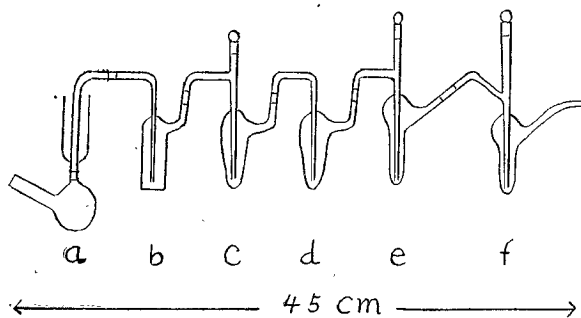
過酸化曹達熔融法⁽⁶⁾によつて定量した。

(c) Cystine, Methionine 及び硫化水素

Cystine 及び Methionine は Baernstein⁽⁷⁾の方法を改良した Kuhn⁽⁸⁾の方法に倣ひ第1圖の如き装置により乾燥蛋白を沃化水素 (d=1.7) にて加水分解し、發生する硫化水素、Methionine より生ずる沃化メチル及び反應容器に残留する Cysteine を夫々沃度滴定法により定量した。

その定量結果は第1表の通りである。各數値は夫々2—3回の定量値の平均値である。

第 1 圖



- | | |
|--|--------------------------|
| (a) 反 應 容 器 | 試料に沃化水素(d,1.7)を加へて反應せしめる |
| (b) 1%赤燐懸濁液を充たす | 試薬より發生する沃度を捕集する |
| (c) 20% CdCl ₂ , 20% BaCl ₂ 混液を充たす | 蛋白の加水分解により生ずる硫化水素を捕集する |
| (d) 飽和昇汞液を充たす | 試薬より發生する燐化水素を捕集する |

※このとき相當量の不溶解分がある。

早豐年製油株式会社工場より製造後一週間以内に送達せられたものを直ちに硝子容器に密閉して常温暗所に貯藏した。

(e)(f)氷醋酸，醋酸加里，臭素混液を充たす Methionine より發生する沃化メチルを捕集し沃素酸に酸化する

第 1 表

| 供試蛋白 | 全硫黄 % | 全硫黄量中 | | | | | | 回收率 % |
|------------|-------|--------------|--------------------|--------|--------------|--------------------|--------|--------|
| | | Methionine % | Cystine (SH+S-S) % | 硫化水素 % | Methionine % | Cystine (SH+S-S) % | 硫化水素 % | |
| 生大豆蛋白 (a) | 0.834 | 1.84 | 1.63 | 0.02 | 47.36 | 51.80 | 2.40 | 101.56 |
| 〃 (b) | 0.842 | 1.85 | 1.63 | 0.02 | 47.15 | 52.26 | 2.38 | 101.79 |
| 〃 (c) | 0.846 | 1.81 | 1.69 | 0.02 | 45.98 | 54.04 | 2.36 | 102.38 |
| 脱脂大豆蛋白 (a) | 0.812 | 1.79 | 1.63 | 0.01 | 48.39 | 53.20 | 1.25 | 102.84 |
| 〃 (b) | 0.808 | 1.82 | 1.56 | 0.02 | 48.38 | 50.99 | 2.47 | 101.84 |

※ 生大豆 { (a) 京大攝津農場産
(b) 市販品
(c) 市販品

脱脂大豆 { (a) 昭和15年7月以降7箇月貯藏
(b) 昭和14年11月以降11箇月貯藏

II スルフヒドリル基量

(a) 供試蛋白

生大豆及び脱脂大豆につき夫々前記同様の方法により蛋白を分離し乾燥を行はず下記の如く直ちに沃度醋酸アミドを反應せしめ SH 基を定量した。

(b) 定量方法

前述の方法により透折して得た蛋白の沈澱に磷酸緩衝液を加へ PH 7.0—7.2 の溶液となし、その一定量に沃度醋酸アミドの一定量を加へ一定条件の下にて反應せしめ別報⁽⁹⁾の方法により SH 基を定量し、同時に溶液の窒素量をも定量し Cysteine として百分率に算出した結果は第 2 表の通りである。

第 2 表

| 供試蛋白 | Cysteine % |
|------------|------------|
| 生大豆蛋白 (a) | 0.32 |
| 〃 (b) | 0.36 |
| 〃 (c) | 0.28 |
| 脱脂大豆蛋白 (a) | 0.13 |
| 〃 (b) | 0.07 |
| 〃 (c)※ | 0.04 |

※ 脱脂大豆 (c) 昭和13年11月以降27箇月貯藏

(c) SH 基發現に対する水素イオン濃度の影響

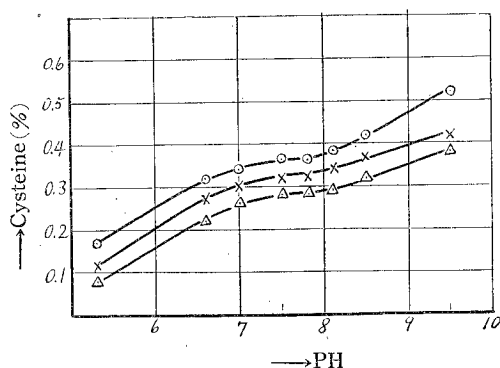
蛋白のスルフヒドリル基の發現は水素イオン濃度によつて著しい影響を受ける。今、生大豆蛋白に就て行つた定量結果を示せば第 3 表の如くである。(第 3 表を圖示すれば第 2 圖の通りで

ある)

第 3 表

| PH | 緩 衝 液 | (a) | (b) | (c) | |
|-----|-------|---------------|---------------|---------------|------|
| | | Cysteine % | Cysteine % | Cysteine % | |
| 5.3 | 醋 酸 鹽 | 0.12 | 0.17 | 0.08 | |
| 6.6 | | 0.27 | 0.32 | 0.22 | |
| 7.0 | | 磷 酸 鹽 | 0.30 | 0.34 | 0.26 |
| 7.5 | | | 0.32 | 0.36 | 0.28 |
| 7.8 | 0.32 | | 0.36 | 0.28 | |
| 8.1 | 硼 酸 鹽 | 0.34 | 0.38 | 0.29 | |
| 8.5 | | 0.37 | 0.42 | 0.32 | |
| 9.5 | | 0.42 | 0.52 | 0.38 | |

第 2 圖



C. 考 察

大豆蛋白の主要なる部分を占める Glycinin の全硫黄, Cystine 及び Methionine 含量は夫々第1表の如くで又この値を Baernstein⁽¹⁰⁾ の實驗値と比較して見ると第4表の如くで筆者の實驗値と殆ど一致する。

第 4 表

| 實 驗 者 | 供試蛋白 | 全硫黄量 | Cystine (SH+S-S) | Methio- nine | 硫化水素 | 全 硫 黄 量 中 | | | 回 收 率 |
|------------|------------|------|---------------------|-----------------|------|---------------------|-----------------|------|-------|
| | | | | | | Cystine (SH+S-S) | Methi- onine | 硫化水素 | |
| | | % | % | % | % | % | % | % | % |
| Baernstein | "Glycinin" | 0.84 | 1.69 | 1.84 | — | 53.7 | 47.2 | — | 100.9 |
| 筆 者 | (a) | 0.83 | 1.63 | 1.84 | 0.02 | 51.8 | 47.4 | 2.4 | 101.6 |
| | (b) | 0.84 | 1.63 | 1.85 | 0.02 | 52.3 | 47.2 | 2.4 | 101.8 |
| | (c) | 0.85 | 1.69 | 1.81 | 0.02 | 54.0 | 46.0 | 2.4 | 102.4 |

斯様に大豆蛋白 (Glycinin に就て) の含硫黄アミノ酸としては Cystine 及び Methionine より成り而して両者が大略同量宛含有せられることは分析結果によつて明かである。

扱て、蛋白の Cystine 基は一部又は全部 SH 或ひは S-S 結合をなし、その形態及び割合は蛋白の種類及び状態によつて著しく變動のあることは近時多くの研究によつて明かである。生大豆蛋白に於ては相當量の Cysteine 基を含み、筆者の實驗に於ては全 Cystine(SH+S-S)の22%の Cysteine を含むものがあつた。但しこの割合は新鮮大豆に於ても第2表に於けるが如く相當の差異があるばかりでなく、同一試料に於ても調製操作上の僅かの相違例へば透折の溫度、時間等によつても差異の現れることを經驗するほどに微妙なものであるから更に特別な方法によつて生體蛋白に最も近い状態に分離して定量を行つた場合には SH 量は更に多いものと考へられる。^{*}

斯様に新鮮大豆蛋白の SH 量は多少の相違はあるとしても Cysteine として約 0.3% 或ひはそれ以上であるが脱脂大豆蛋白に於ては新鮮なるものに於ても更に少く新鮮度に逆比例して減少の傾向を示して居る。この事實より考へると脱脂大豆蛋白が貯藏中に受ける變化は硫黄の結合に關しては SH→S-S なる變化か或ひは分子内に Steric hindrance することによつて見掛上消滅するものか上の實驗の範圍に於ては不明であるが、一種の酸化現象であると考へられる。その原因は恐らく蛋白變性酵素の作用に因るものであらう。

自然状態に於て SH 基を含む蛋白は大豆蛋白に限らない。例へば Myosin⁽¹¹⁾ Hemoglobin 及び Crystallin⁽¹²⁾等がそれである。(第5表参照)

第 5 表

| Material | Cysteine % |
|--|------------|
| Hemoglobin (at PH 7.3) | 0.10 |
| Protein of Crystallin lens (at PH 7.2) | 0.36 |
| Myosin, rabbit | 0.7—0.8 |
| „ , halibut | 0.8 |
| „ , frog | 0.7—0.8 |

Mirsky 等はこれを reactive SH と呼んで居るがスルフヒドリル基は水素イオン濃度の或る限界に於ては殆ど一定であるがアルカリ側に於て増加して更に reactive となる。この傾向は第2圖の如く大豆蛋白に於ても全く同様である。斯様に活性スルフヒドリル基の増減の少い一定の PH の限界は Biological activity と密接なる關係のあるものと考へられる。

D 要 旨

1 生大豆及び脱脂大豆蛋白(主に Glycinin)の全硫黄、Cystine 及び Methionine を定量した。その結果は大豆蛋白に於て全硫黄量0.83—0.85%、Cystine 1.63—1.69%、Methio-

^{*}この點に就ては更に實驗を追捕する考へである。

nine 1.81—1.85%で全硫黄量の52—54%は Cystine, 46—47%は Methionine である。

2 生大豆蛋白には活性スルフィドリル基約 0.3% (全Cystineの約20%) を含むが脱脂大豆蛋白に於ては新鮮度に逆比例して減少することを明かにした。

終りに臨み本研究を行ふに當り御懇篤なる御指導を賜りたる恩師近藤金助先生に謹んで感謝の意を捧げ、併せて實驗材料の入手に當り特別なる配慮を忝うせし豊年製油株式会社菊池土用三氏に深く謝意を表する。尚ほ本研究は文部省科學研究費の補助によつて遂行し得たのである。記して以て感謝の意を表する。

文 獻

- (1) M. J. Horn, D. B. Jones & S. J. Ringel: J. Biol. Chem., **138**, 141 (1941)
- (2) K. Linderström-Lang & C. F. Jacobsen: J. Biol. Chem., **137**, 443 (1941)
- (3) H. D. Baernstein: J. Biol. Chem., **97** 669 (1932); **115**, 33 (1936)
- (4) M. Womack, K. S. Kemmerer & W. C. Rose: J. Biol. Chem., **121**, 403 (1937);
W. C. Rose & E. E. Rice: J. Biol. Chem., **130**, 305 (1939)
- (5) T. B. Osborne & G. Campbell: J. Amer. Chem. Soc., **20**, 419 (1898)
- (6) T. B. Osborne: J. Amer. Chem. Soc., **24**, 140 (1902);
H. C. Sherman: J. Amer. Chem. Soc., **24**, 1100 (1902)
- (7) H. Baernstein: J. Biol. Chem., **115**, 25 (1936)
- (8) R. Kuhn, L. Birkofer u. F. W. Quackenbush: Ber Deutsch. Chem. Ges., **72**,
407 (1939)
- (9) 森: 化學研究所講演集, **12**, 123 (1942)
- (10) Baernstein (1932), 前掲
- (11) A. E. Mirsky: J. Gen. Physiol., **19**, 559 (1935—1936)
- (12) A. E. Mirsky & M. L. Anson: J. Gen. Physiol., **19**, 439 (1935—1936)