
総 説

植物性食品材料中のチアミン結合 タンパク質について

光 永 俊 郎

Thiamine-binding Proteins in Plant Foodstuffs

Toshio Mitsunaga

1. はじめに

チアミンと高い親和性をもって構造特異的に結合するタンパク質が、1970年に始めて大腸菌のペリプラズムに存在することが見いだされた¹⁾。このチアミン結合タンパク質は、チアミンニリン酸依存性のアポ酵素とは区別されるタンパク質である。この発見のきっかけは、大腸菌のチアミン要求変異株 (70-23) を用いて TPP の細胞膜輸送機能を検討中、菌体を浸透圧ショックにかけると、チアミンの輸送能が著しく低下し、同時にショック液中にチアミン結合能が認められたことによる²⁾。その後同株³⁾ はじめ大腸菌 KG33 株^{3,4)} や Crookes 株⁵⁾ のショック液よりも、チアミン結合タンパク質が単離されて、それぞれのタンパク質化学的性質についても詳細に研究された。これらの大腸菌のチアミン結合タンパク質は分子量が、35,000~39,000の単一なポリペプチドで、チアミンとの結合の K_i 値 (9-50 nM) は大腸菌のチアミン要求性変異株の最大増殖を与えるのに必要なチアミン濃度 10~50 nM とよく一致している。このような大腸菌のチアミン結合タンパク質の生理機能についてはこれらの性質に加えてショック細胞へのチアミン結合タンパク質の添加によるチアミン輸送能の部分的回復、増殖培地中のチアミン濃度の増加にともなうチアミン輸送能の低下とチアミン結合タンパク質の生合成の抑制の相関性、さらに結合反応と輸送反応の間にみられる基質特異性の類似性などから、大腸菌のチアミン輸送系の構成成分の一

京都女子大学食物学科食品学第4研究室

つとして機能することが推定されている。

大腸菌のチアミン結合タンパク質の発見に引き続いて、微生物では、乳酸菌⁶⁾ (*Lactobacillus casei*) や酵母⁷⁾ (*Saccharomyces cerevisiae*) にも、その存在が認められた。乳酸菌のチアミン結合タンパク質は細胞膜画分に存在し、疎水性のアミノ酸に富む分子量29,000のタンパク質であることが明らかにされた。また酵母の浸透圧ショック液中に存在するチアミン結合タンパク質は、分子量が約140,000の糖タンパク質でチアミンとの結合反応の至適 pH は5.5で、チアミンに対する K_d 値は、25 nM と測定されている。一方、酵母の音波破碎液やプロトプラストの lysis 液より調製した粗膜画分に見いだされた膜結合性チアミン結合タンパク質のチアミンに対する K_d 値 (0.17 μ M), 反応至適 pH (5.0), 外因性チアミンによる抑制およびチアミン類似体による阻害などの諸性質は、酵母細胞のチアミン輸送系のそれらとよく一致している。

動物組織のチアミン結合タンパク質については、1979年に Muniyappa らにより、ニワトリの卵白中に分子量38,000のチアミン結合タンパク質が存在することが報告され⁸⁾、続いて卵黄にもこれとほぼ同一の性質を示すチアミン結合タンパク質が存在することが確認された⁹⁾。哺乳動物では、ラットの神経組織や、心臓、肝臓などの1% Triton X-100 抽出液をゲル濾過にかけると、分子量20万以上の画分中にチオクロム蛍光を示すタンパク質としてチアミン結合タンパク質が検出されている¹⁰⁾。またこれとは別に、Nishino ら¹¹⁾ は、ラットの脳や肝臓の cytosol 中にチアミンニリン

酸やチアミン三リン酸などのチアミンリン酸エステルと特異的に結合して、TPP-ATP リン酸転移酵素反応に直接関与する興味あるタンパク質の存在することを明らかにしている。

一方、植物では、1980年に Nishino¹²⁾ らにより米ぬか中にチアミン結合タンパク質の存在が認められた。そこで、種々の植物性食品材料中にこれらチアミン結合タンパク質が存在するかどうか。存在するならば、どのような分布を示すか。どのような性質を示すか。調理、加工時にどのように挙動するのか。また、なぜ存在するのか。ということ明らかにすることは、家政学、植物生理学だけでなく、生化学、食品加工学の立場においても興味ある研究課題であると考え、この5年間、筆者は植物性食品材料中のチアミン結合タンパク質について検討してきた。筆者が得た結果を中心として、この総説をまとめた。

2. 植物性食品材料中のチアミン結合物質の存在¹³⁾

植物性食品材料中にチアミン結合能を有する物質の存在を検索するために、先ず、試料として穀類（小麦粉、小麦胚芽、小麦麩、そば、とうもろこし）、いも

類（じゃがいも、さつまいも、さといも）、種実類（ごま、落花生、ひまわりの種子、栗、くるみ）、豆類（大豆、小豆、いんげん豆、えんどう、そら豆）、野菜類（大根、パセリ、キャベツ、にんじん、なす）、果実類（りんご、みかん、いちご）、きのこ類（しいたけ、えのきだけ）、藻類（昆布、わかめ）、嗜好品類（抹茶）の計31種類を選び、それぞれ市販品を購入して実験に供した。これらの試料のうち、小麦胚芽、ごま、落花生、くるみ、大豆は石油エーテルで脱脂後、粉碎して使用した。

穀類、種実類、豆類、藻類、抹茶はそれぞれの粉砕物に対して同重量の海砂と少量の0.05 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0, 1% NaCl 含有) を加え、乳鉢中で混合磨砕し、ペースト状にした。これに10倍量の同緩衝液を加え、十分混合した。また野菜類、果実類、きのこ類は、細断、もしくは、おろし金でおろした後、少量の海砂を加え、乳鉢中で混合磨砕した。これに5倍量の0.05 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0, 1% NaCl 含有) を加えて十分混合した。各混合液は4°Cで2時間放置後、遠心分離し、得られた上清を緩衝液に対して24時間透析した。透析後、Lowry らの方法でタンパク質濃度を測定し、各抽出液の濃度を4 mg/

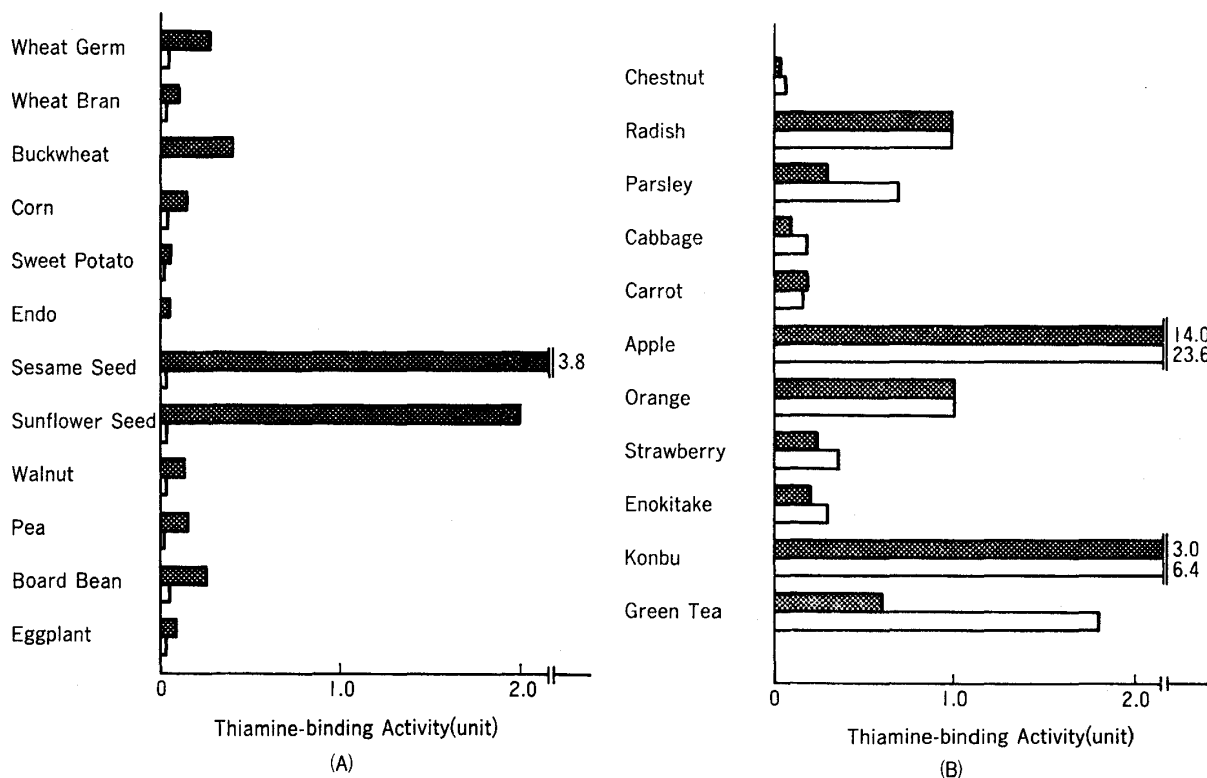


図1 各種植物性食品材料のチアミン結合活性
(A) 熱不安定物質 (B) 熱安定物質

Slashed bar: thiamine-binding activity before heat-treatment, blank bar: thiamine-binding activity after heat-treatment.

ml に上記緩衝液で調整して試料液とした。また、4 mg/ml 以下の濃度のもは、そのまま試料液として用いた。チアミン結合能の測定は各試料液 3.0 ml を透析チューブに入れ、0.5 μ g/ml のチアミン塩酸塩を含む 0.05 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0, 1% NaCl 含有) 500 ml 中で 4°C, 48時間透析した後、透析内・外液中のチアミン濃度をチオクロム蛍光法により測定した。試料のチアミン結合量は透析内・外液のチアミン濃度の差より求め、タンパク質 1 mg 当たりチアミン 1 μ g の結合量を 1 unit として表わした。

各試料液および 100°C で10分間加熱処理した後の試料液について、チアミン結合能の測定を行なった結果を図1に示した。図1(A)に示す12種類の試料はチアミン結合能が認められたが、熱処理すると結合性がほとんど失われた。これに対して図1(B)に示す11種類の試料はそれぞれ結合能を有するが、熱処理による結合活性の損失はなく、多くは逆に増加が認められた。さらに供試した試料のうち、小麦粉、じゃがいも、落花生、大豆、小豆、いんげん豆、しいたけ、わかめの8種類の食品材料中には、用いた測定条件下ではチアミン結合能が認められなかった。これらの実験結果より、植物性食品材料にはチアミン結合物質を含むものと含まないものがあり、チアミン結合物質には熱に対して安定なものと不安定なものの2種類が存在し、前者はタンパク質で、後者は非タンパク性物質である

ことが推定された。

3. チアミン結合物質の性質

このような植物性食品材料中のチアミン結合物質についてプロテアーゼに対する挙動、タンパク質濃度とチアミン結合量、および活性成分の単離条件について検討した。

3.1 チアミン結合物質のプロテアーゼに対する挙動

チアミン結合物質がタンパク質と考えられる試料を中心にプロテアーゼに対する挙動を調べた。検討試料として、小麦胚芽、そば、ひまわりの種子、ごまを選び、比較試料として大根および抹茶をプロテアーゼとしてプロナーゼを用いた。各抽出液 (タンパク質濃度 4 mg/ml) 4 ml に対して、プロナーゼ溶液 (4 mg/ml) 1 ml を加え、pH 7.0, 37°C で一定時間反応させた。反応後 4°C でチアミン結合能を測定した。同濃度に調整した各抽出液にプロナーゼを加えた混合液を対照として結合能を測定し、それぞれの試料について時間経過に伴う失活率を求めた。その結果は図2のようになり、抹茶および大根では反応2時間までまったく変化が認められないのに対して、小麦胚芽、そばは1時間で約50%、2時間で80~90%の失活が認められた。さらにごま、ひまわりの種子は1時間で90%もの失活を示した。したがって植物性食品中の易熱性チアミン結合物質はチアミン結合タンパク質とみなしてよいと

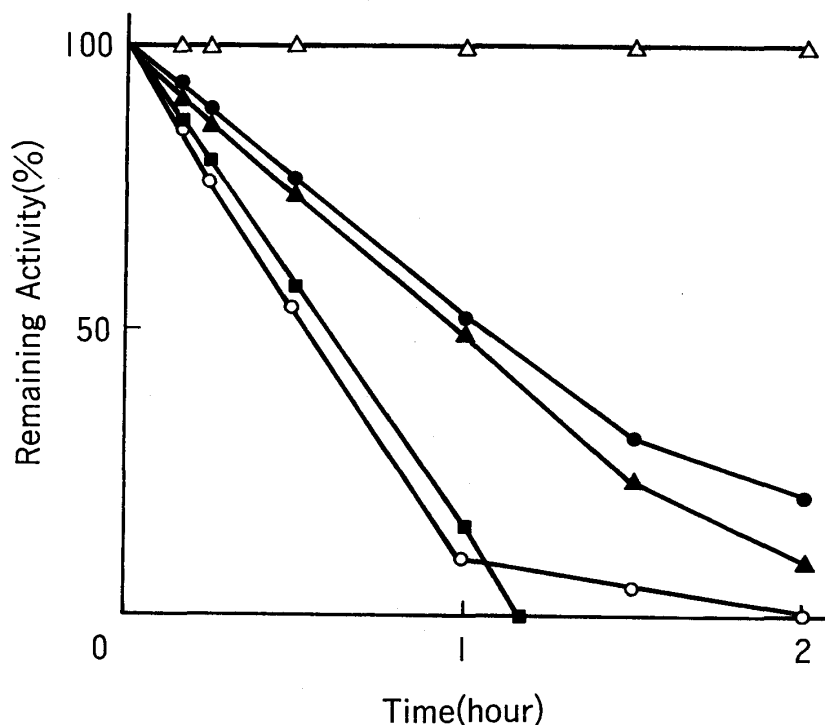


図2 プロナーゼ処理によるチアミン結合能の変化

△ Raddish or green tea, ● wheat germ, ▲ buckwheat, ■ sesame, ○ sunflower seed.

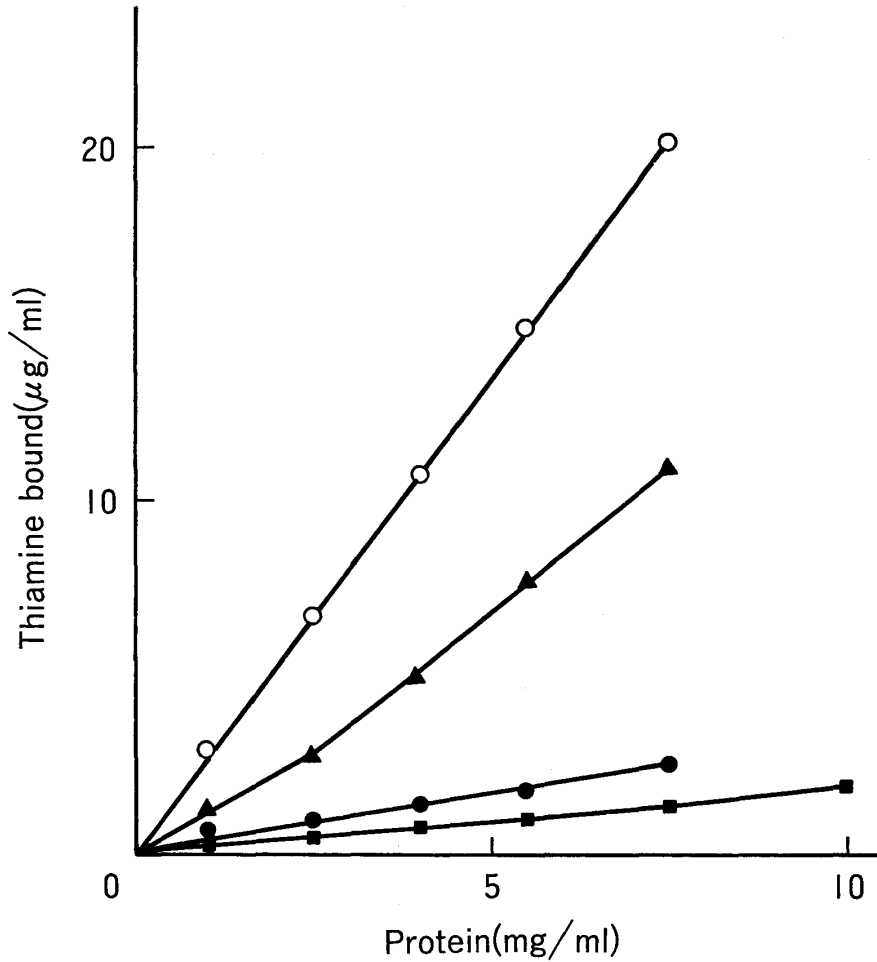


図3 チアミン結合能のタンパク質濃度依存性

● Wheat germ, ▲ buck wheat, ■ sesame ○ sunflower seed

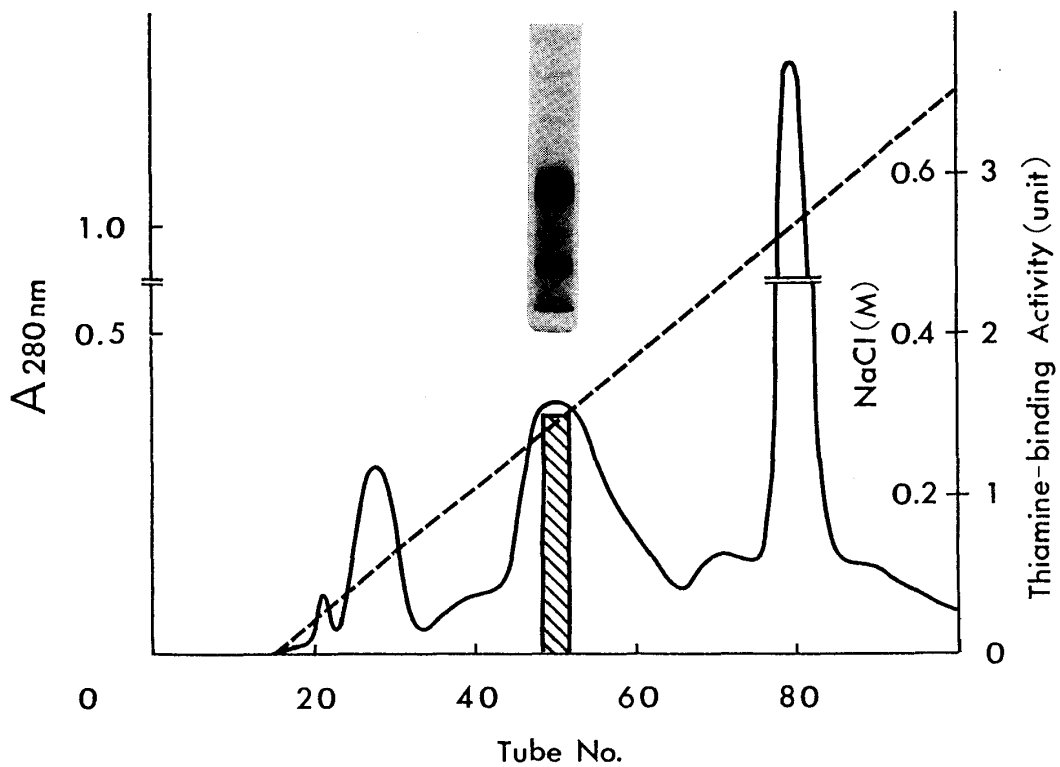


図4

考えられた。

3.2 タンパク質濃度とチアミン結合量

各試料液のタンパク質濃度を変えることによってチアミン結合量がどのように変化するかを調べた。その結果図3に示すように易熱性で、プロナーゼにより失活するチアミン結合物質を含むひまわりの種子、そば、ごま、小麦胚芽の各試料についてチアミン結合量はタンパク質濃度に対する依存性のあることが認められた。

3.3 チアミン結合物質の単離

植物性食品材料中にはタンパク性チアミン結合物質と非タンパク性チアミン結合物質の存在が推察されたので、それぞれの活性成分の分画を試みて、その確認を行った。タンパク性チアミン結合物質を含んでいると考えられるそば、ごまと非タンパク性チアミン結合物質を含んでいると考えられる大根と抹茶を選び、検討を行った。

各抽出液を塩析して、活性成分が沈でんするか、溶液部分に存在するか、次に透析、イオン交換クロマトグラフィーを行い、活性画分がタンパク質か、糖か、その他の成分かを調べた。その結果、抹茶においてはクロロフィルを含む画分に、大根では炭水化物を含む画分にチアミン結合活性が移行した。植物性食品に含まれる耐熱性の結合物質が色素もしくは炭水化物であることが予測された。

一方、そば、ごまの抽出液に硫酸を加え、生じた沈でんを集め、透析した後、DEAE-セファデックス A-25カラムによるクロマトグラフィーを行った結果、活性画分はタンパク質であることが示された。その結果の1つは図4に示すごとくである。このクロマトグラムで、NaCl濃度0.3Mに溶出する画分に結合能が認められた。この画分のポリアクリルアミドゲル電気泳動像は数本のバンドを示し、タンパク質の混合物であったが、結合物質はタンパク質であることを確認した。

4. 植物種子のチアミン結合タンパク質の分布と性質

種々の植物性食品材料中にチアミンと特異的に結合する物質の存在が認められた。この結合物質の中で、そば、ばれいしょなど12種類の植物の種子的性質をもつ部位に含まれる物質はタンパク質であることが示された。しかし大豆など一部の種子には存在が認められなかった。そこで穀類、豆類、種実類など25種類の植物種子についてチアミン結合タンパク質の分布と性質について調べた。

4.1 チアミン結合タンパク質の分布¹⁴⁾

まず各種植物種子についてチアミン結合能の有無と熱処理による活性の変化を調べた。各試料10gに対して100mlの0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0, 1% NaCl含有)を加え、ポリトロンホモゲナイザーで混合磨砕した。この混合液を4°Cで2時間放置した後、遠心分離した。得られた上清を抽出緩衝液に対して途析、遠心分離して、試料液を調製した。各試料液はそのまま前述の方法でチアミン結合能を測定した。その結果は表1に示すごとくである。用いた全試料に結合能が認められ、その活性は熱処理によって50~100%の失活を示した。先のタンパク質濃度を4mg/lに調整して測定した場合に活性の存在が認められなかった大豆など一部の種子にもすべて結合物質の存在が示された。この結果植物種子にはタンパク質が7~40%含まれているが、このタンパク質の濃度には関係なく、チアミン結合タンパク質と推察される物質の存在することが明らかになった。

さらに結合能が種子組織のどの部位に分布しているかを小麦種子について調べてみると、表2に示すような結果を得た。小麦種子全体では10g当り13.1μgのチアミンと結合する活性を有していた。この結合能を小麦種子の部位別に測定すると、胚芽部では10g当りに結合するチアミン量は87.6μgと最も高い値を示し、次に麦皮部18.3μgであり、胚乳部(小麦粉)では8.3μgと最も低く、胚芽部の1/10以下の結合能しか認められなかった。また各部位の活性とも熱処理によって80%以上失活した。このように種子の部位による結合能の極在は米種子においてさらに顕著に示された。表3に示すように、玄米10g当り44.5μgのチアミン結合能に有するのに対して精白米では4.6μgという値を示し、玄米は精白米の10倍の結合能を有していた。この結果は米種子の表層部にチアミン結合物質が多く存在していることを示している。表層部を胚芽、赤糠、白糠について結合能を比較すると、胚芽は678.7μgと最も高い値を示し、精白米の140倍、赤糠の7.5倍、白糠の34倍と、小麦以上に結合能の極在が認められた。このように植物の種子の部位により極端なチアミン結合能の分布の差異があることはこのチアミン結合タンパク質が植物にとって重要な働きをしていることが予想される。

4.2 植物の発芽にともなうチアミン結合能の変化

タンパク性チアミン結合物質が主として種子に存在し、種子の胚芽部に極在していることより、種子の発芽にともなうチアミン結合能の変化について調べた。種子としてはあわ、小麦、大豆を選んだ。各種子の発

表1 各種植物種子のチアミン結合活性

Samples		Thiamine bound ($\mu\text{g}/\text{sample } 10\text{g}$)	Thiamine bound after heat-treatment ($\mu\text{g}/\text{sample } 10\text{g}$)
Scientific name	Common name		
<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench.	Buckwheat	104.1	0
<i>Panicum crus-galli</i> L. var. <i>frumentacern</i> Trin	Barnyard millet	22.6	0
<i>Oryza sativa</i> L.	Rice		
	Brown rice	44.5	5.3
	Well-milled rice	16.9	3.9
	Rice bran	147.7	10.3
<i>Setaria italica</i> Beauv.	Foxtail millet	22.8	0
<i>Triticum aestivum</i> L.	Wheat		
	Whole wheat	13.1	0
	Wheat flour	8.3	0
	Wheat germ	87.6	10.2
	Wheat bran	18.3	3.2
<i>Zea mays</i> L.	Maize	20.5	4.5
<i>Glycine max.</i> Merrill	Soybean	34.8	7.2
<i>Glycine max.</i> Merrill forma <i>Kuromame</i> Kakino	Kuromame bean	24.7	0
<i>Phaseolus angularis</i> W. F. Wight	Azuki bean	24.5	10.3
<i>Phaseolus coccineus</i> L. var. <i>albus</i> Bailey	Shirobana bean	64.5	0
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. <i>cultiva</i> Aschers	Toramame bean	61.9	5.0
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. <i>cultiva</i> Kintoki	Kintoki bean	57.9	28.5
<i>Pisum sativum</i> L.	Pea	52.2	0
<i>Vicia faba</i> L.	Broad bean	26.7	4.7
<i>Vigna sinensis</i> L.	Uzura bean	46.4	22.1
<i>Cannabis sativa</i> L.	Hemp seed	25.2	0
<i>Heliantbus annuus</i> L.	Sunflower seed	288.5	14.1
<i>Seamum indicum</i> L.	Sesame seed	675.0	32.4

Values presented are means from 2 experiments and each experiment represents duplicate determinations.

表2 小麦種子各部位のチアミン結合能

	Thiamine bound ($\mu\text{g}/\text{sample } 10\text{g}$)	Thiamine bound after heat-treatment ($\mu\text{g}/\text{sample } 10\text{g}$)
Whole wheat	13.1	0
Flour	8.3	0
Germ	87.6	10.2
Bran	18.3	3.2

表3 米種子各部位のチアミン結合能

	Thiamine bound ($\mu\text{g}/\text{sample } 10\text{g}$)	Thiamine bound after heat-treatment ($\mu\text{g}/\text{sample } 10\text{g}$)
Brown rice	44.5	5.3
Well-milled rice	4.6	0
Germ	1314.6	30.2
Red bran	92.7	10.8
White bran	19.4	4.3

芽率は75~90%であった。各 10.0 g の各種子を蒸留水に12時間浸漬した後、ガーゼをしいたバット内で24~28°C で適宜水を補給しながら発芽させた。対照として 10.0 g の各種子をバット内で水に浸し、空気を遮断した状態で放置した。各試料について5日間のチアミン結合能の変化を調べた。チアミン結合能の測定は各段階の発芽種子全体に 10 g の海砂を加えて乳鉢

中で磨砕し、次に少量の 0.05 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0, 1%NaCl 含有) を加えてペースト状にし、さらに混合磨砕後 50 ml の同緩衝液を加えて混合した。これを 4°C で2時間放置した後、遠心分離し、得られた上清についてチアミン結合能を測定した。結果は図5に示すように、発芽にとまって各種子のチ

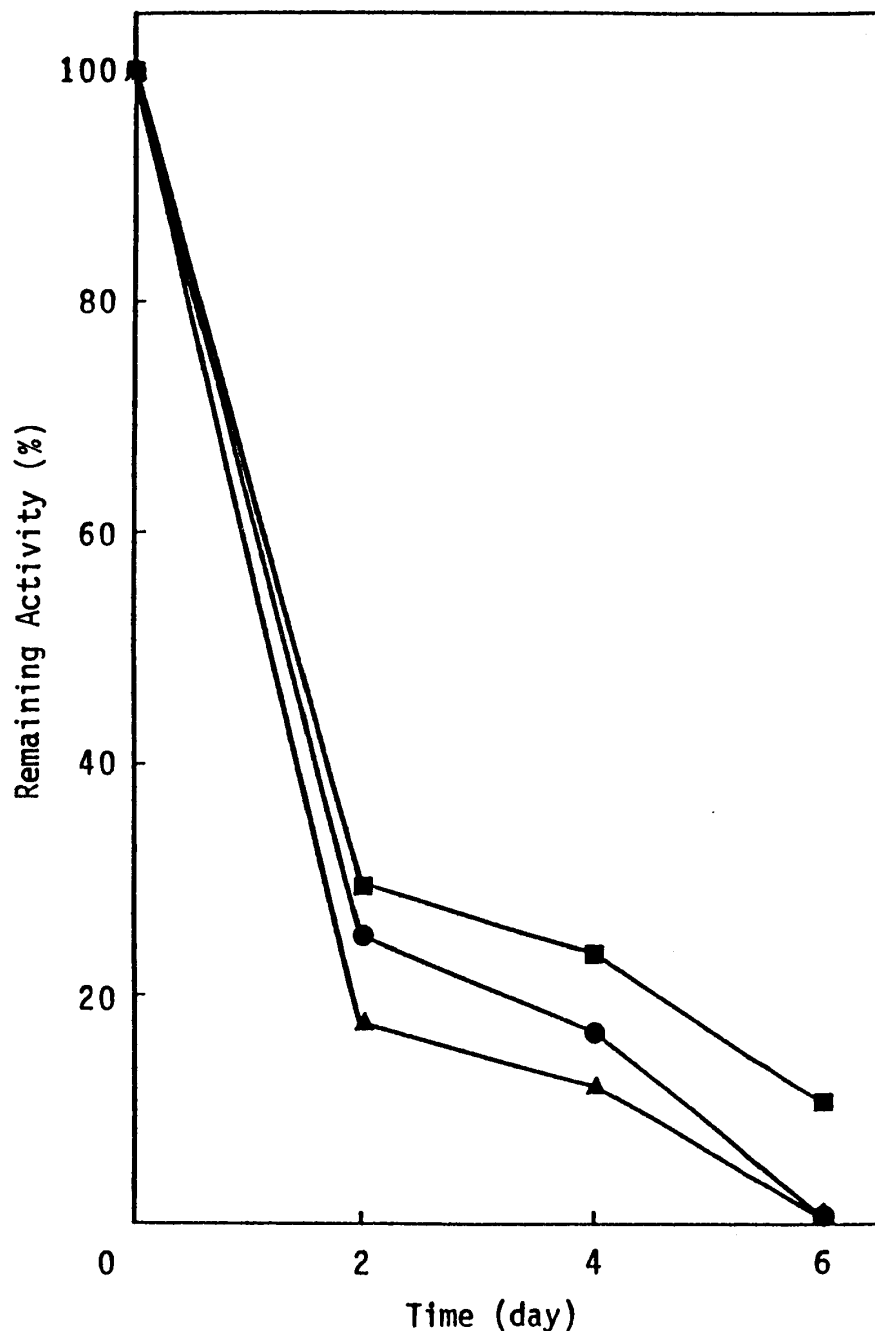


図5 発芽にともなう植物種子のチアミン結合能の変化

The remaining activity was expressed with ratio against the binding capacity of ungerminated seeds. ●, foxtail millet; ▲, wheat; ■, soybean.

アミン結合能は消失していった。大豆では発芽2日目で未発芽種子の70%の活性が失われ、6日目では90%が消失した。さらに小麦、あわは2日目で80~85%の失活が認められ、6日目では完全に活性が消失した。これに対して各対称の水中に浸した種子は発芽せず、結合能の消失は全く認められなかった。これらの結果よりチアミンの遊離をともなうチアミン結合タンパク質の動態が、種子の発芽になんらかの関連をもつと推測された。

4.3 チアミン結合タンパク質によるチアミン結合反応について¹⁵⁾

チアミン結合タンパク質に対してのチアミン結合反応の特異性を調べるために、そば、あわ、玄米、小麦、小麦胚芽、大豆、うずら豆、あさの実、ひまわりの種子の各チアミン結合タンパク質を選び、チアミンに対してモル比で50倍量のチアミンモノリン酸、チアミンピロリン酸、オキシチアミン、ピリチアミンの共存する各緩衝液中で平衡透析を行い、これらタンパク質の

表4 植物種子のチアミン結合タンパク質のチアミンとの結合に対するチアミン誘導体の影響

Samples	Thiamine-binding (%)				
	None	Thiamine monophosphate	Thiamine pyrophosphate	Oxythiamine	Pyriothiamine
Buckwheat	100	100	98.2	95.6	99.3
Foxtail millet	100	100	100	100	88.7
Brown rice	100	100	100	97.5	96.2
Whole wheat	100	100	100	98.3	99.1
Wheat germ	100	100	102.5	98.7	97.5
Soybean	100	100	94.8	87.4	90.7
Uzura bean	100	85.7	100	98.6	94.5
Hemp seed	100	100	89.3	85.4	95.9
Sunflower seed	100	89.9	92.7	89.2	91.8

Each thiamine derivatives was added to the dialyzing buffer simultaneously with thiamine at molar ratio thiamine: the derivatives=1:50, the thiamine-binding activity then being assayed to equilibrium dialysis. Values are means from 2 experiments. Each experiment represents duplicate determination.

チアミンおよびその誘導体に対する結合特異性を検討した。その結果は表4に示すごとくである。それぞれのタンパク質がチアミンのみを含む緩衝液中で平衡透析をした際の結合量を100として、各誘導体共存下でのチアミン結合量を測定したが、チアミン結合量には有意な変化が認められずチアミン結合反応のこれら誘導体による阻害は観察されなかった。このことは植物種子に含まれるチアミン結合タンパク質のチアミンに対する高い結合特異性を示唆するものと考えられる。

このように植物種子25種類すべてにチアミン結合能が認められ、これら結合物質はすべて熱処理により失活すること、プロナーゼ処理で結合能が消失することによりタンパク性物質であると推定された。さらにこのタンパク質が植物種子に含まれているとともに、米、小麦において種子の胚芽部に極端に多く含まれていることより種子の発芽との関係をあわ、小麦、大豆について調べると発芽にともなってチアミン結合タンパク質の結合活性が減少し、発芽6日目ではほとんど失活することがわかった。

すでに報告されている微生物や動物組織のチアミン結合タンパク質のチアミンとの結合がチアミンリン酸エステルやチアミン誘導体により強く阻害されるのに対して、植物性のチアミン結合タンパク質のチアミンとの結合がこれらの誘導体の影響を受けず、チアミンに対する結合特異性が高いことを示した。種子を含め一般に植物組織中のチアミンは遊離型が多いこと、さらに先の発芽にともなうチアミン結合活性の消失とあわせ考えると、このタンパク質は種子の発芽の際に必要なチアミンの貯蔵に関与していることが推察される。

5. 米種子のチアミン結合タンパク質について

米はわが国においてもっとも主要な植物性食品であり、年間約1,000万トン生産されている。玄米の75%以上は炭水化物からなりその大部分はデンプンである。タンパク質含量も約6~8%ある。日本人1日1人当たりの米の消費量は約210gであり、米より約750Kcalのエネルギーと12~18gのタンパク質を摂取してエネルギー源としても、タンパク質源としても重要な食品である。

米種子にはすでにチアミン結合タンパク質の存在が認められているので、このタンパク質について詳しく検討した。

5.1 米種子タンパク質の種類と分布¹⁶⁾

植物種子タンパク質は溶解性によってアルブミン(水に可溶)、グロブリン(水に不溶、塩溶液に可溶)、プロラミン(水、塩溶液に不溶、60%アルコールに可溶)、グルテリン(酸、アルカリに可溶)に大別されている。これらのタンパク質の米種子中における分布を調べた。1984年産日本晴の玄米を佐竹式小型搗精機により精白し、生成する粉末を表層部により順に重量%で0~5、5~10、10~15、15~20、20~25、25~30、30~35、35~40、40~45、45~50、50~100の11画分にわけて試料とした。

ケルダール法により米種子の層別のタンパク質の分布を調べた。図6に示すごとくタンパク質は米種子の最外部層よりも5~10%の次の層に最も多く17.5%も含まれていた。この量は試料玄米のタンパク質の2.1倍量に相当した。さらに内部層にはいると約25%までは大きくタンパク質含量の減少が認められた。それよ

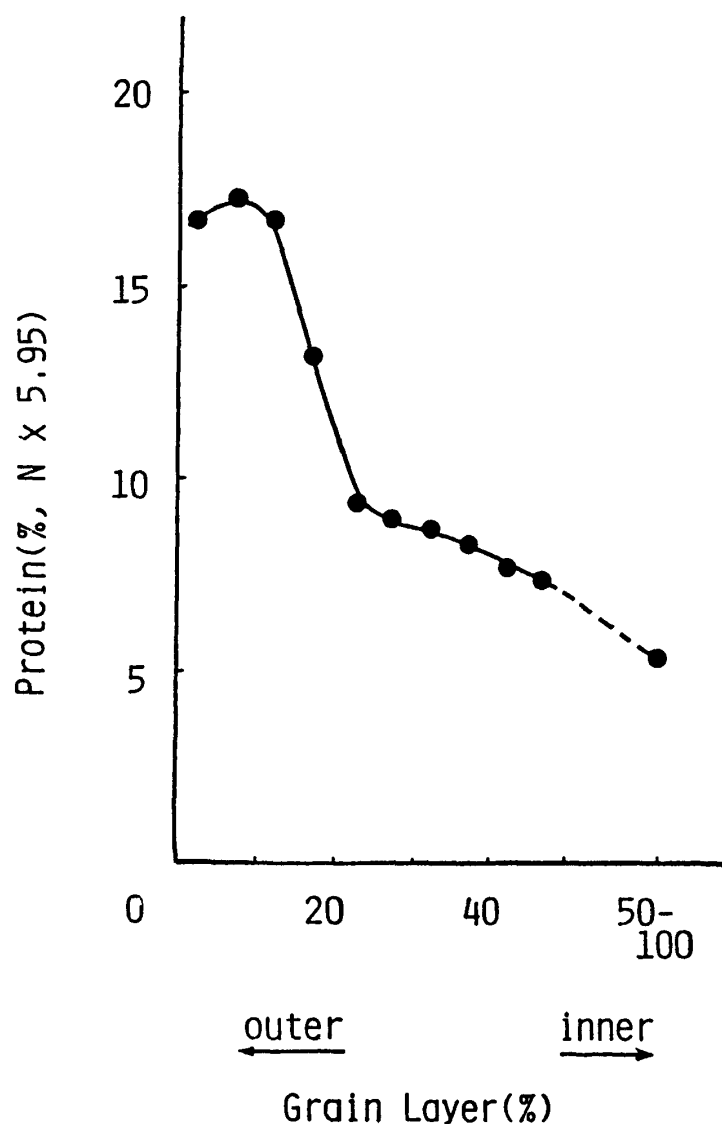


図6 米種子中のタンパク質の分布

り内部層ではわずかにタンパク質の減少が認められるだけであり、50%層より中心部までは5.2%のタンパク質を含み、表層部(0~25%層)は中心層の2~3倍のタンパク質が含まれていた。

この米種子の層別のタンパク質について溶解性による分布を調べると図7のごとくになりました。アルブミン、グロブリン画分は表層部に多く、中心部に近づくにつれて減少の傾向を示した。とくにこの傾向はアルブミン画分に顕著に認められた。グルテリンは表層部ではアルブミン画分とほぼ同じ程度含まれていたが、中心部に近づくにつれて増加し、中心部のタンパク質はほとんどグルテリン画分であった。プロラミン画分は米種子のどの部位でもほぼ同じで2~4%しか含まれていない。小麦、大麦ではプロラミンはグルテリンとともに主タンパク質であるが、米では著しく少なく、

小麦などと顕著な差異を示している。

5.2 米種子のチアミン結合タンパク質とチアミンの分布¹⁷⁾

米種子のチアミン結合能の分布は表5に示すごとくである。玄米 100.0 g には 445.2 μg のチアミンと結合する活性が存在した。その約65%は胚芽に含まれていた。次に米種子の最外層部の0~5%の部分に多く17%も含んでおり、米種子のチアミン結合能の90%以上が表層部に分布していた。

総チアミンの分布も結合能とほぼ同じ傾向を示した(表6)。米種子の総チアミンの46.4%が胚芽に含まれ、次に種子の最外層部に多く、内層部ほど含量は少なかった。しかもほとんどが遊離チアミンの型で存在し、わずかにチアミンリン酸エステルが含まれているにすぎなかった。

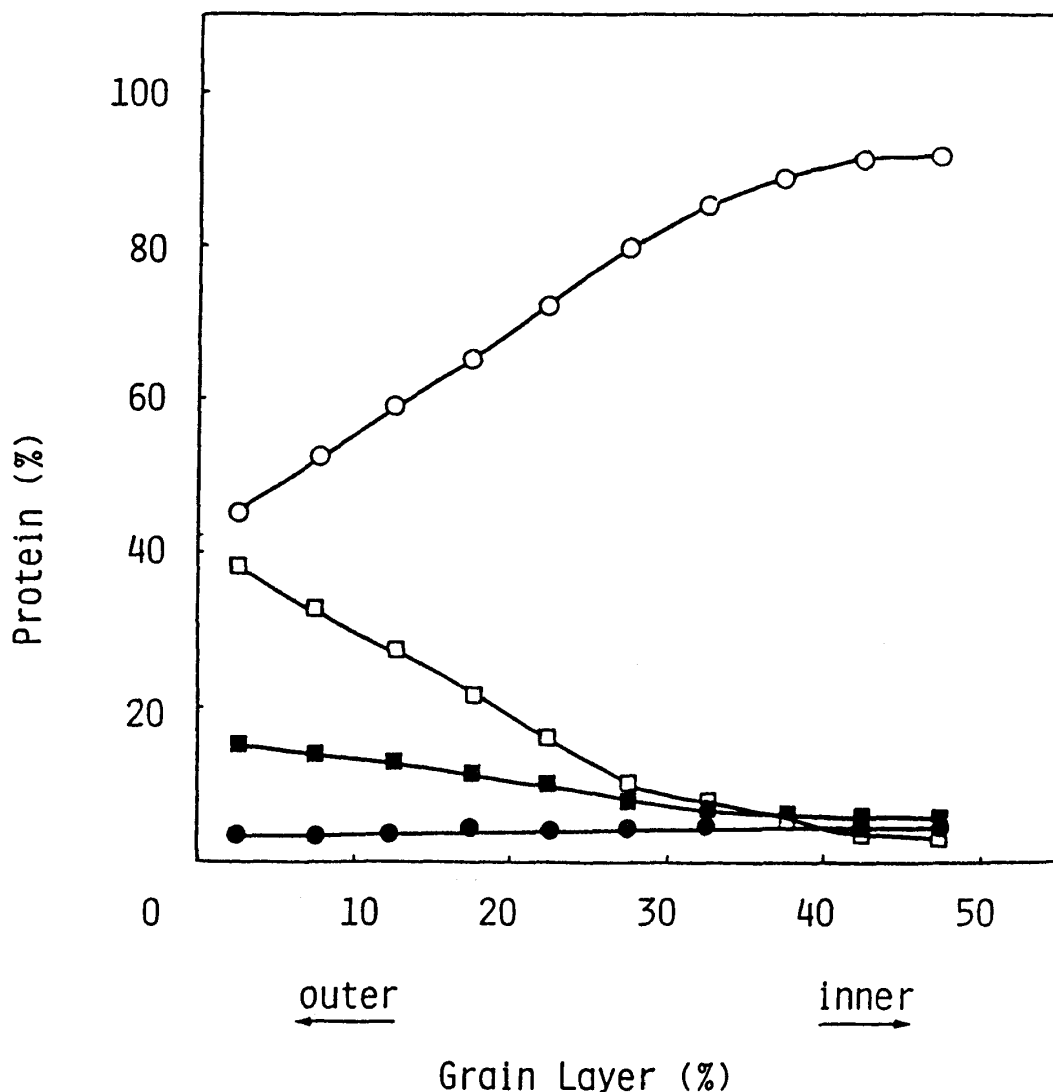


図7 米種子中の各種タンパク質の分布

□: glutelin, ○: albumin, ■: globulin ●: prolamine

表5 米種子中のチアミン結合能の分布

	Globulin (mg)	Thiamine-binding Activity (μg of bound thiamine)	Ratio (%)
Brown Rice	1130.0	445.2	100.0
Germ	198.5	289.5	65.0
Bran-1	334.2	75.3	16.9
2	118.3	29.7	6.7
3	88.0	22.1	5.0
4	36.3	14.0	3.1
5	24.4	7.2	1.6

(in 100.0g grain)

表6 米種子中のチアミンの分布

	Total Thiamine (μg)	Thiamine (ratio, %)	Thiamine (μg)	Thiamine Phosphates (μg)
Brown Rice	414.5	100.0	408.5	6.0
Germ	192.1	46.4	188.3	3.8
Bran-1	90.7	21.9	89.9	0.8
2	75.8	18.3	75.2	0.6
3	37.9	9.1	37.4	0.5
4	15.4	3.7	15.2	0.2
5	2.6	0.6	2.5	0.1

(in 100.0g Grain)

5.3 米種子の発芽ともなう、タンパク質、チアミン結合能およびチアミンの変化¹⁷⁾
米種子にチアミン結合能およびチアミンが極在する

ことと結合能とチアミンの分布がほぼ一致することより、このタンパク質が発芽に重要な役割をしていることが予測されるので、発芽ともなう種子タンパク質の変化とチアミン結合能とチアミンの挙動を調べた。

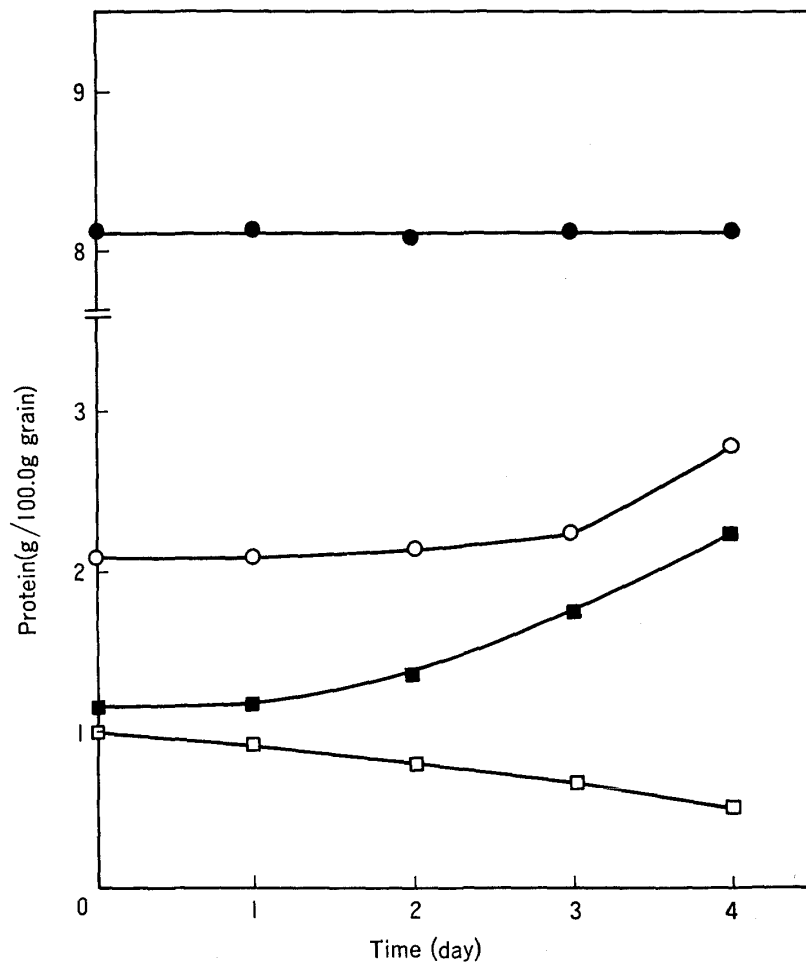


図8 発芽にともなう米種子のタンパク線の変化

●: Total protein, ○: Total soluble protein, □: water-soluble protein, ●: salt-soluble protein

米種子を正確に秤取し、23~27°Cで水栽培した。一定時間経過後、発芽種子全部位まとめて採取して、ケルダール法で総窒素量の変化を測定した。また発芽種子に同重量の海砂を加えて乳鉢で磨砕した後、これに5倍量の0.1M食塩溶液を加えて混合し、4°Cで2時間放置した。次に遠心分離して得られた上清を可溶性窒素およびチアミン結合能測定試料液とした。さらにこの試料液を水に対して48時間透析した。この透析液を遠心分離し、得られた上清をアルブミン画分、沈殿をグロブリン画分として窒素の定量を行った。

米種子の発芽にともなう窒素の変化は図8に示すごとくである。総窒素量は発芽4日間では変化が見られなかった。これに対して総可溶性窒素は時間経過にともなって増加し、未発芽種子(発芽0日目)に比較して4日目では40%増加した。可溶性窒素のうち水可溶性窒素(アルブミン画分)は時間経過とともに増加し4日目では未発芽種子の約2倍の値を示したのに対して、水不溶性窒素(グロブリン画分)は発芽とともに

減少の傾向を示した。

次に発芽にともなうチアミン結合能の変化をみると図9に示される結果を得た。水中に浸漬して空気を遮断して発芽できない状態にした試料ではチアミン結合能の変化はほとんど認められないが、発芽種子は時間経過にともなって活性の変化が認められた。1日目では未発芽種子の50%も活性が消失し、4日目ではほとんど失活した。この結果は先のあわ、小麦、大豆と同じ結果を示している。

さらに発芽にともなうチアミンおよびチアミンピロホスホキナーゼの変化を調べた。未発芽種子のチアミンのほとんどは遊離チアミンであり、わずかにチアミンリン酸エステルの存在が認められた。これに対して、発芽にともなう総チアミン量の変化は図10に示すごとく、発芽4日間では認められなかったが、チアミンは発芽にともなって減少し、チアミンリン酸エステルは増加した。発芽にともなってチアミンの減少、チアミンリン酸エステルの増加よりチアミンピロホスホ

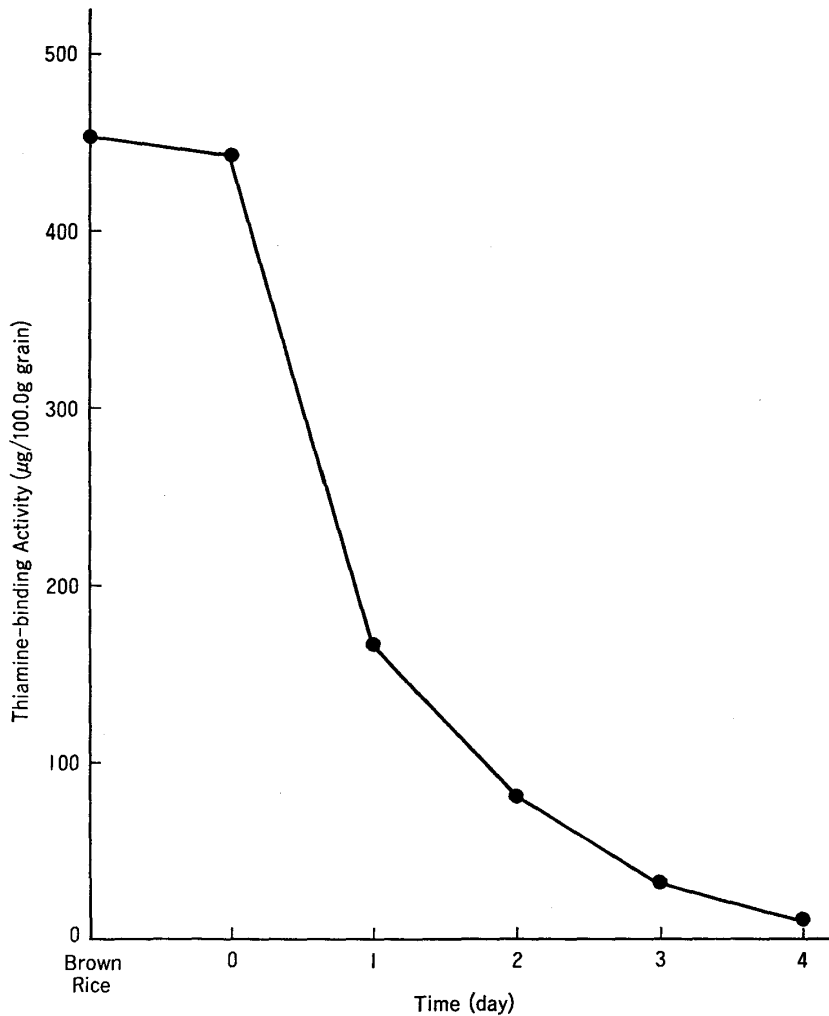


図9 発芽にともなうチアミン結合能の変化

●: ungermed seed ○: germed seed

キナーゼ活性の変化を調べた。発芽種子の抽出液のタンパク質濃度を 1.3~1.7 mg/ml に調整して試料液とした。試料液 (0.43~0.56 mg タンパク質), 20 µmol リン酸カリウム緩衝液, 5 nmol [チアゾール-2-¹⁴C]チアミン塩酸塩 (5.35×10⁷ dpm/µmol) 20 µmol ATP, 20 µmol MgCl₂ を含む溶液 (0.5 ml) を 37°C で 1 時間反応させた後 90°C で 5 分間熱処理した。この処理液をアンバーライト CG-50 カラム (H⁺ 型, 0.5×4 cm) に加え, さらに水 4.5 ml で洗浄して 5 ml の溶出液を得た。この溶出液 1 ml をとり, その放射能を測定し, チアミルピロホスホキナーゼ活性を求めた。その結果は図 11 に示すごとくである。未発芽種子には 164.3 pmol TPP/mg/hr の活性が認められたが発芽にともなって増加し, 3~4 日目で最大値を示し, 未発芽種子の 2 倍に達した。この結果は先の発芽にともなうチアミンの減少, チアミン二リン酸の増加と一致した。

以上, 米種子の発芽にともなうチアミン結合能の消

失, チアミンの減少とチアミン二リン酸の増加, およびチアミルピロホスホキナーゼ活性の増加という結果はチアミン結合タンパク質は発芽に必要なチアミン二リン酸の出発物質であるチアミンの貯蔵のために存在するであろうという考えをより明らかにした。

5.4 米ぬかのチアミン結合タンパク質の単離

アセトンで脱脂した米ぬか 100 g に 0.05 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) 1 l を加えて 4°C で 3 時間攪拌した。この懸濁液を 11,000×g で 15 分遠心分離した後, 上清に 5 M 酢酸を加えて pH 6.0 に調整した。生じた沈殿を遠心分離して集め, 0.05 M リン酸カリウム緩衝液 pH 7.0, 330 ml に溶解させた。次に同じ緩衝液で平衡にした 15 g の DEAE-セファデックス A-50 を加えて, 0°C 1 時間攪拌した。この混合物をカラム (3.7×50 cm) に入れた後, 0.05 M リン酸カリウム緩衝液 500 ml で洗浄し, 塩化カリウム濃度 0-0.3 M の直線濃度勾配によって活性成分を溶出し

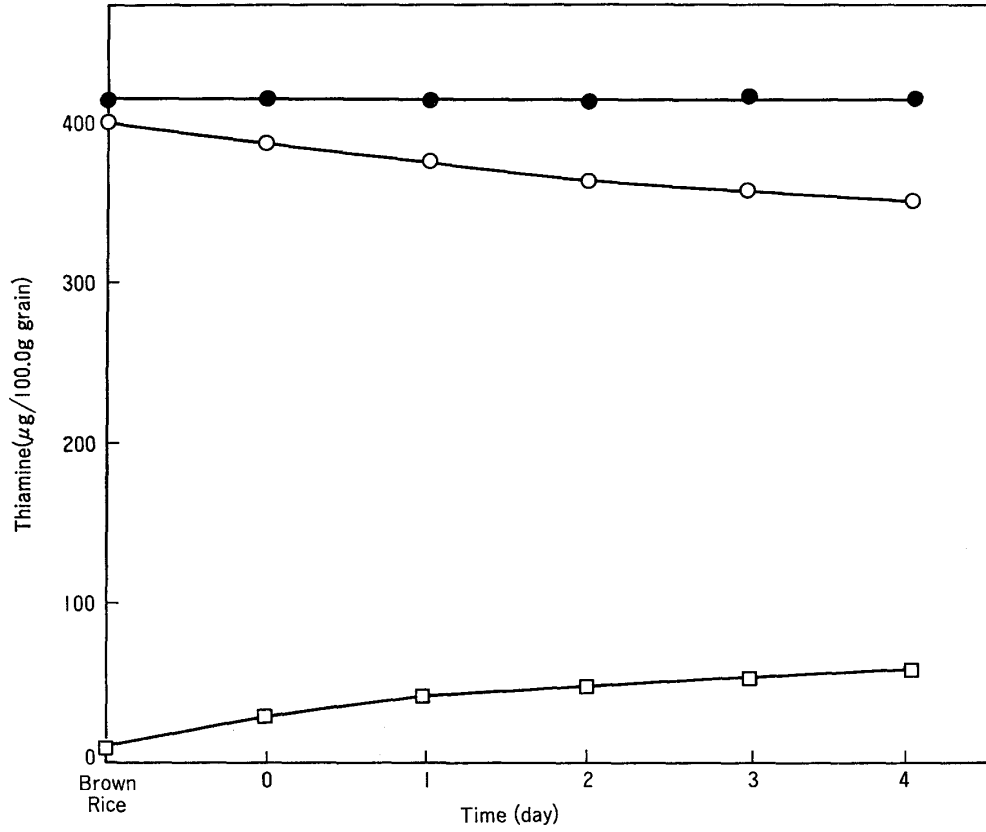


図10 発芽ともなうチアミンの変化

●: Total thiamine, ○: Free thiamine, □: Thiamine phosphates

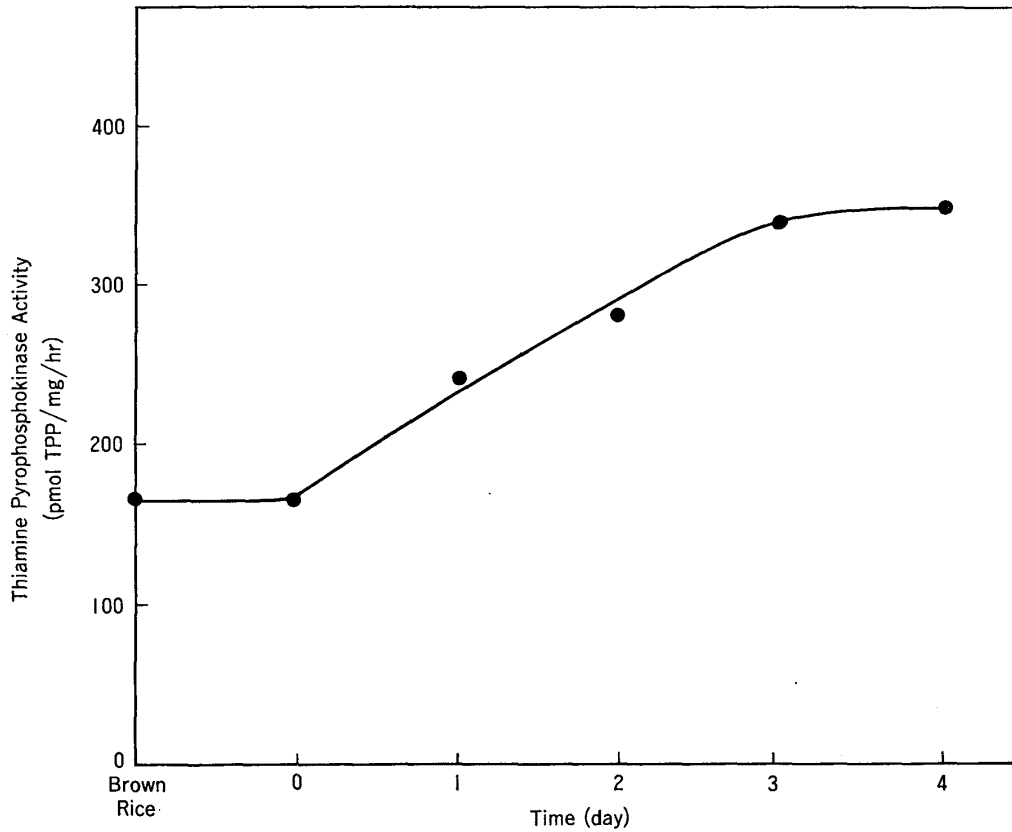


図11 発芽ともなうチアミンピロホスホキナーゼ活性の変化

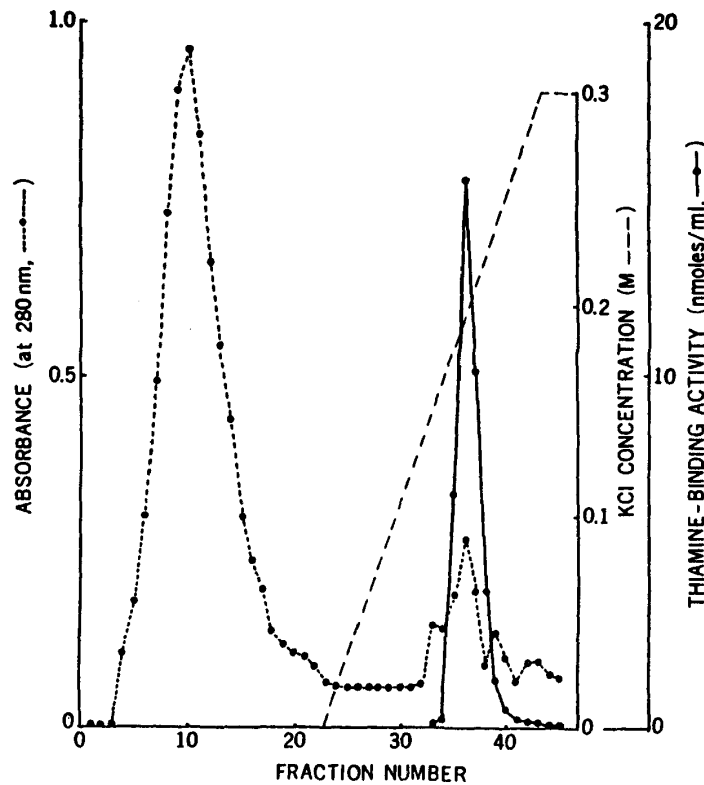


図12 DEAE-セルロースカラムによる米ぬかチアミン結合タンパク質画分のクロマトグラム
吸光度 (280 nm), —チアミン結合能, ---食塩濃度

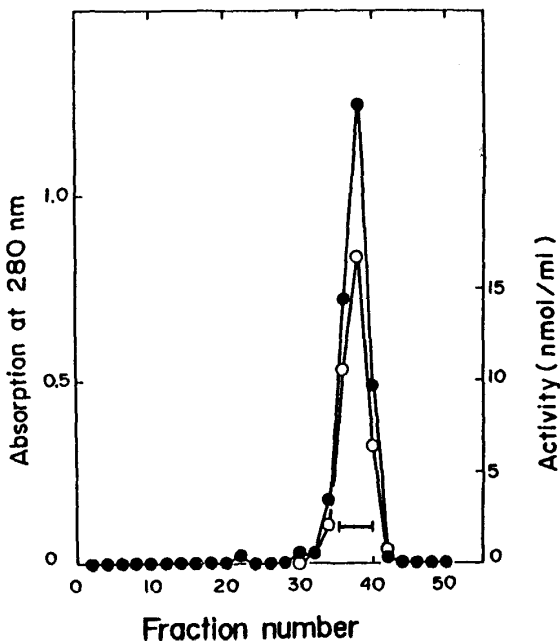


図13 セファデックス G-200 カラムによる米ぬかチアミン結合タンパク質のクロマトグラム

○, thiamine-binding activity; ●, absorbance at 280 nm. The horizontal bar represents the fractions pooled.

た。その結果は図12に示すごとくである。塩化カリウム濃度約 0.2 M で溶出する画分に活性が認められた。この活性画分をアミコン限外濾過機を用いて濃縮した。この濃縮液を 0.05 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5, 0.1 MKcl 含有) で平衡にしたセファデックス G-200 カラム (20×90 cm) でゲル濾過して分画した。その結果は図13に示すごとくである。得られた精製画分は電気泳動的にほぼ均一なタンパク質であり、PAS 反応は陰性で、ポリペプチドのみよりなるタンパク質であることがわかった。米ぬかよりチアミン結合タンパク質を精製した結果は表7に示すごとくで、本精製法により、米ぬかのチアミン結合タンパク質は抽出液より比活性度にして約41倍精製され、その収率は13%であった。

5.5 米ぬかチアミン結合タンパク質の性質^{12,13)}

このタンパク質はゲル濾過法で分子量は約94,000と推定された。また SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分子量約50,000のタンパク質のバンドを生じるので同一のサブユニット2ヶからなる dimer 構造をもつと考えられる。平衡透析法で調べたこのタンパク質と ¹⁴C-チアミンの結合反応の至適 pH は8.5附近にあり、また結合反応の Hughes-Klotz プロットからはチアミンに対する見かけの K_d 値が 0.44 μM, 最

表7 米ぬかのチアミン結合タンパク質の分離, 精製まとめ

Step	Total protein (mg)	Total activity (nmol thiamine-binding)	Specific activity (nmol thiamine bound/mg of protein)	Yield (%)
1. Crude extract	6,843	1,740	0.26	100
2. Acid precipitation	1,863	1,630	0.88	94
3. DEAE-Sephadex A-50	102	660	6.46	38
4. DEAE-cellulose	45	410	9.05	24
5. Gel filtration on Sephadex G-200	21	220	10.62	13

表8 米ぬかチアミン結合タンパク質とチアミンとの結合に対するチアミン誘導体の影響

Addition	Molar ratio to [¹⁴ C]thiamine	[¹⁴ C]Thiamine binding (%)	
		Expt. 1	Expt. 2
None	0	100	100
Thiamine	10	15.5	13.4
Chloroethylthiamine	10	14.1	—
Dimethialium	10	60.5	—
Hydroxyethylthiamine	10	98.5	—
Pyriothiamine	10	78.1	—
Oxythiamine	10	—	70.7
Northiamine	10	—	50.6
2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine	10	—	93.5
5-(2-Hydroxyethyl-4-methyl)-thiazole	10	—	94.9

²⁾ Each value is the average of duplicate determinations.

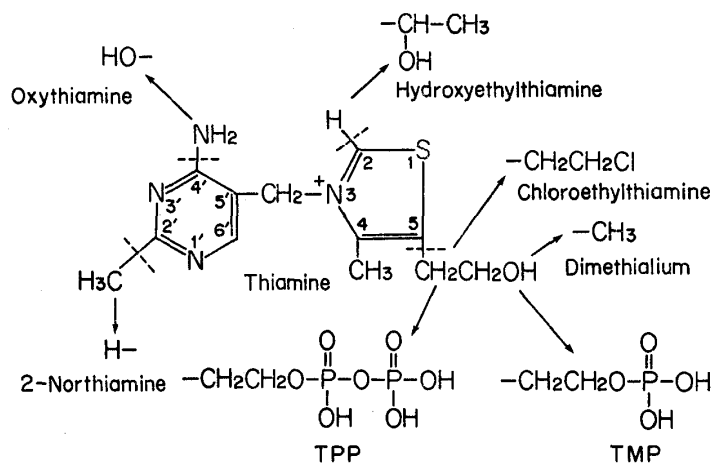


図14 チアミンおよびその誘導体の構造式

大結合量が 17.2 nmol/mg と測定された。この値から計算するとチアミン結合タンパク質 1 モル当りほぼ 2 モルのチアミンが結合することになり、従ってチアミン結合タンパク質のサブユニット当り 1 モルのチアミンが結合することが推定された。

次にチアミン結合タンパク質の ¹⁴C-チアミンとの結合に対する種々のチアミン誘導体や構造類似体の影響

を調べると、クロロエチルチアミンが10倍量の添加でチアミンの結合を85.9%阻害して最も強く、同じ条件下で2-ノルチアミン、ジメチアリウム、オキシチアミン、ピリチアミンの順に49.4~21.9%の阻害を示したが、ヒドロキシエチルチアミン、0-ベンゾイルチアミンジスルフィドおよび2-メチル-4-アミノ-5-ヒドロキシメチルピリミジンにはほとんど阻害作用が認めら

表9 DCCD 処理による米ぬかチアミン結合タンパク質の不活性化に対するのチアミンおよびその誘導体の影響

Addition during pretreatment	DCCD treatment	Thiamine-binding activity (dpm/μg)	(%)
None	—	273.9±7.1	(100)
None	+	108.6±7.5	(40)
Thiamine	+	222.1±5.8	(81)
Chloroethylthiamine	+	268.5±6.5	(98)
Thiamine monophosphate	+	129.9±6.4	(47)
Thiamine pyrophosphate	+	91.1±3.4	(27)

^{a)} Thiamine-binding protein (80 μg/ml) was preincubated with 0.5 mM each of thiamine, chloroethylthiamine, thiamine monophosphate or thiamine pyrophosphate at 25°C for 30 min and then reacted with 0.5 mM DCCD at 25°C for 30 min in 0.05 M potassium phosphate buffer, pH 7.5, and then reacted with 0.5 mM DCCD at 25°C for 30 min. Each value is the mean ± SE of triplicate determinations.

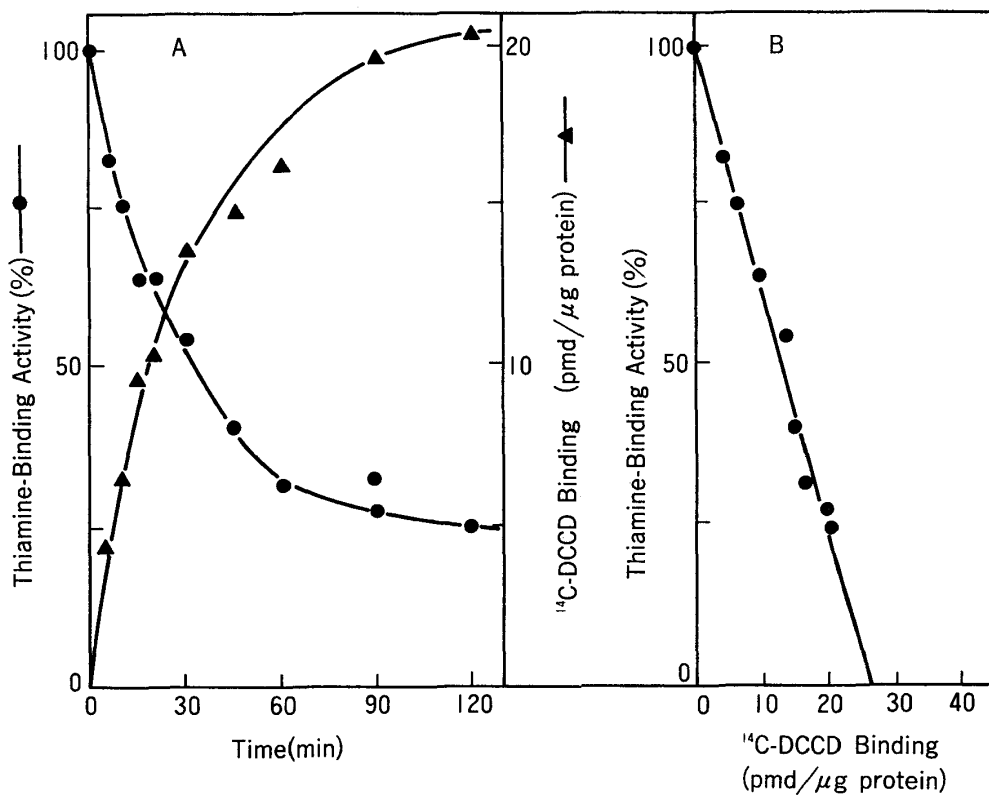


図15 米ぬかチアミン結合タンパク質の ¹⁴C]DCCD の結合とチアミン結合能阻害との相関関係

Thiamine-binding protein (800 μg/ml) was incubated with 0.1 mM ¹⁴C]DCCD. Aliquots were removed at indicate times, freed from unreacted ¹⁴C]DCCD by elution-centrifugation and assayed for thiamine-binding activity and ¹⁴C]DCCD binding. The value of ¹⁴C]thiamine binding was obtained by subtracting the counts of ¹⁴C]DCCD bound to thiamine-binding protein from the total count of thiamine-binding assay. Each value is the mean of duplicate determinations.

*³⁾ DCCD=N, N'-dicyclohexylcarbodiimide

れなかった(表8)。更に TMP や TPP はそれぞれ 5.1%および2.1%阻害するに過ぎず、米ぬかのチアミン結合タンパク質は微生物のチアミン結合タンパク質に比して、チアミンの化学構造に対する特異性がより高いことを示した。これらのチアミンリン酸エステルに対する結合性については ¹⁴C-チアミンより ¹⁴C-

TMP と ¹⁴C-TMP を化学的に合成して、平衡透析によりチアミン結合タンパク質との結合性を直接調べてみたが ¹⁴C-チアミン (100%) に対して、¹⁴C-TMP は 4.9%結合するに過ぎず、¹⁴C-TPP では全く結合が認められなかった⁹⁾。これらの結果とは対照的に、酵母のチアミン結合タンパク質はそれぞれ 94.0%および

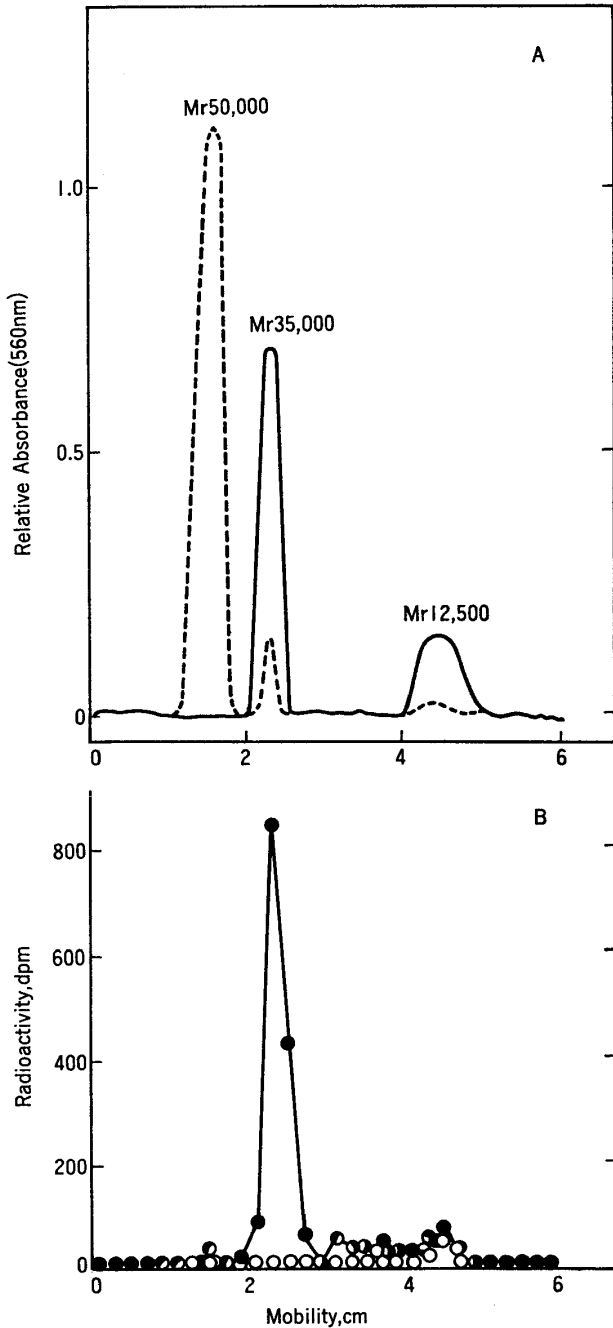


図16 $[^{14}\text{C}]\text{DCCD}$ 処理後の米ぬかチアミン結合タンパク質をトリプシン処理したものの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気作動像

(A) Optical density at 560nm. (—), trypsin-treated protein. (.....), native protein. (B) ^{14}C -radioactivity of trypsin-treated protein. Trypsin-treated thiamine-binding protein (90 μg) was incubated for 1h with 0.1 mM $[^{14}\text{C}]\text{DCCD}$. Free $[^{14}\text{C}]\text{DCCD}$ was removed by elution-centrifugation method. A sample containing approximately 30 μg of the binding-protein was analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. After staining and destaining, the gel was scanned at 560 nm and subsequently sliced in 2.0mm sections. Slices were digested by overnight incubation with 1ml of 15% H_2O_2 at 55~60°C and counted in 10ml of a scintillation fluid.

114.5%の結合率を示し、チアミンと同様にチアミンリン酸エステルともよく結合した。用いたチアミンおよび誘導体の構造との関連は図14に示すごとくである。

一方、米ぬかのチアミン結合タンパク質もカルボキシル基の修飾試薬である DCCD (0.5 mM) で処理すると、そのチアミン結合活性が著しく低下することがゲルろ過-遠心法¹⁹⁾により証明されたが、この場合もチアミンやクロロエチルチアミンのようなチアミン結合タンパク質との親和性の高いチアミン化合物でこのタンパク質を前処理すると、DCCD による不活性化が有意に阻止された (表9)。実際に DCCD がチアミン結合タンパク質と共有結合していることは ^{14}C -DCCD を用いての結合実験により確認され²⁰⁾、同時にチアミン結合タンパク質 1モルの完全失活が約2.5モルの DCCD の結合によりもたらされることが明らかとなった (図15)。したがって米ぬかのチアミン結合タンパク質も2個の同一サブユニットに存在する特定のカルボキシル基とチアミンのチアゾール環の4級の窒素原子の間のイオニックな相互作用が結合反応に関与していることが推定された。興味あることは、米ぬかのチアミン結合タンパク質はトリプシンなどのプロテアーゼにより短時間で限定分解を受け、サブユニットがさらに分子量約33,000と12,500のポリペプチドに分かれるが (図16A)、チアミンに対する結合活性はそのまま保持される。この場合、トリプシン処理したチアミン結合タンパク質も DCCD による不活性化を受けるが、 ^{14}C -DCCD の結合は分子量33,000のポリペプチドのみに起こるので、本ペプチド鎖中に DCCD により特異的に阻害されるチアミン結合部位が存在することが強く示唆された (図16B)。

以上の実験結果から、米ぬかのチアミン結合タンパク質の種々の性質は、すでに報告されている微生物のチアミン結合タンパク質とはチアミンに対する K_d 値、結合反応の至適 pH、基質特異性などいくつかの点で異なることが明らかとなった。

6. そば種子のチアミン結合タンパク質について

そばは北モンゴル、アムールおよびバイカル湖地方の原産といわれているタデ科の一年生草本である。種実の性質および用途が穀類と似ているため食品学では穀類 (そば以外すべてのイネ科) の中に入れられている。そばのタンパク質は小麦タンパク質に匹敵し、チアミン (ビタミン B_1) に富み、ビタミン B_2 や A も含まれているので、食糧としての価値が高い。チアミン

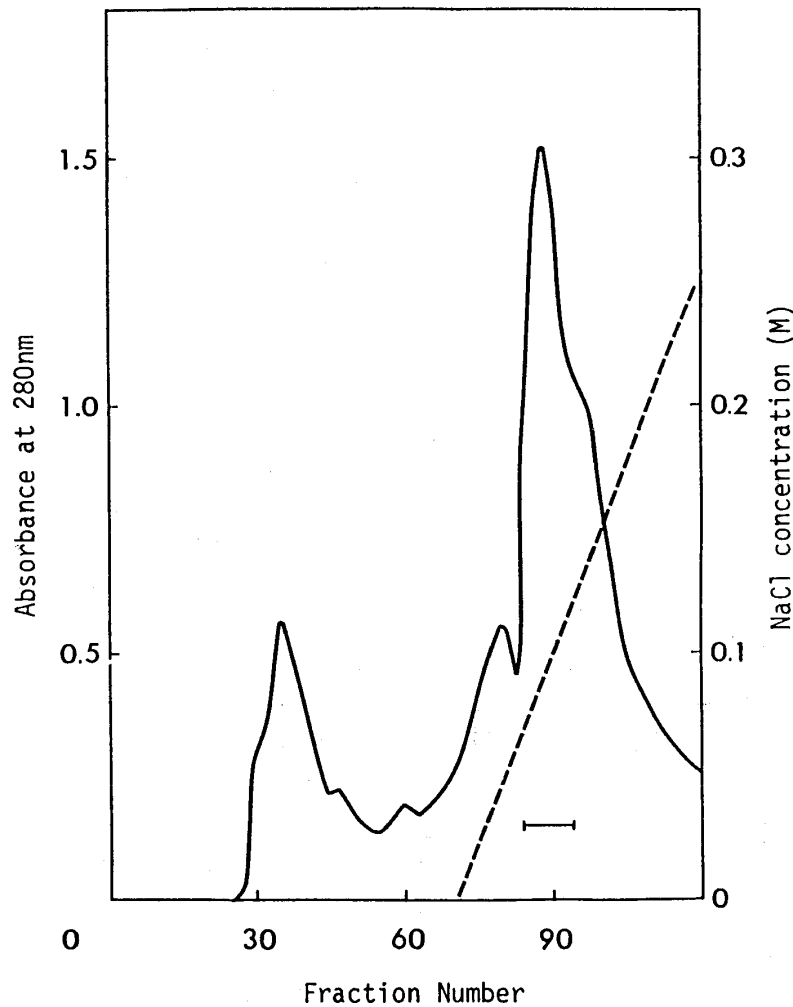


図17 DEAE-セファデックスA-25カラムによるそば種子チアミン結合タンパク質画分のクロマトグラム

Bound material was eluted with a linear NaCl gradient. Active fractions used for further studies are indicated by a bar (—).

含量とともにチアミン結合能も高いので、チアミン結合タンパク質について調べた。

6.1 そばのチアミン結合タンパク質の単離²¹⁾

まず、そば種子よりチアミン結合タンパク質の単離法について検討した。

試料としては昭和57年度北海道旭川産のそば粉を購入して用いた。試料 100 g に同量の海砂を加えて磨砕した後10倍量の 0.05 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0, 1% NaCl 含有) を加えて、混合した。この混合液を 4°C で3時間放置した後、遠心分離した。得られた上清に硫酸アンモニウムを加えて0.5~1.0飽和の沈でん画分を、0.05 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0, 1% NaCl 含有) に対して透析した。この活性画分を 0.05 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0, 1% NaCl 含有) で平衡にした DEAE-セファデックス A-25 カラムを用いて精製した。そのクロマトグラムは

図17に示す。食塩濃度 0.08 M から 0.15 M で溶出する画分にチアミン結合能が認められた。この画分についてポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ったが、複数のバンドが認められ、電気泳動的に不均一であった。そこでこの画分をさらにセファアクリル S-300 カラムによるゲル濾過を行い精製した。その結果は図18に示すごとくで、Tube No. 22 から26に溶出する画分に活性が認められた。この画分について pH 4.0 と 9.4 でポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。図19に示すごとく、ともに単一のバンドを示し電気泳動的に均一であった。

以上の分離、精製過程をまとめると表10に示すごとくであった。そば抽出液に対して比活性で5倍に精製され、収率は23%であった。

6.2 そば種子のチアミン結合タンパク質の性質²¹⁾

このタンパク質の分子量はスーパーローズ 12 HR

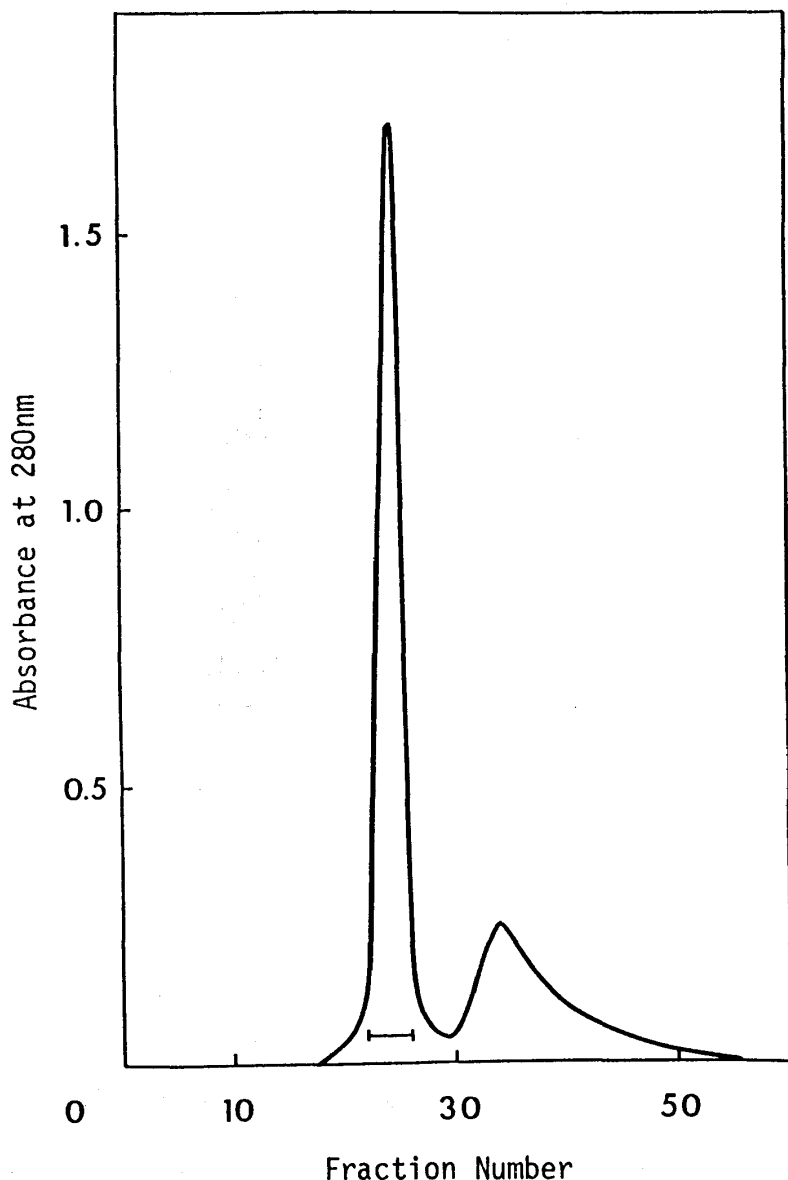


図18 セファアクリルS-300 カラムによるそば種子チアミン結合タンパク質のクロマトグラム

表10 そば種子のチアミン結合タンパク質の分離, 精製のまとめ

	Total Protein (mg)	Total Activity (μg thiamine bound)	Specific Activity (μg thiamine bound/mg)	Yield (%)
Extract	9,135	4,524	0.5	100
Ammonium Sulfate	2,923	2,331	0.8	52
DEAE-Sephadex A-25	1,635	1,842	1.2	41
Sephacryl S-300	408	1,042	2.5	23

(from 100 g Buckwheat Seed)

10/30カラムを用いてゲル透過により約140,000と推定された。この値はすでに報告されている酵母のチアミン結合タンパク質と同じであった。しかし大腸菌のチアミン結合タンパク質 (分子量39,000) や卵白のチアミン結合タンパク質 (分子量38,000) とは異なっていた。また PAS 染色およびフェノール-硫酸法で糖の

存在は認められなかった。アミノ酸組成は表11に示すごとくで、グルタミン酸、アスパラギン酸の酸性アミノ酸の含量が多く、システイン、メチオニンの含硫アミノ酸の少ない、アミノ酸のみからなるタンパク質であった。

このタンパク質がチアミンと反応する際の至適 pH

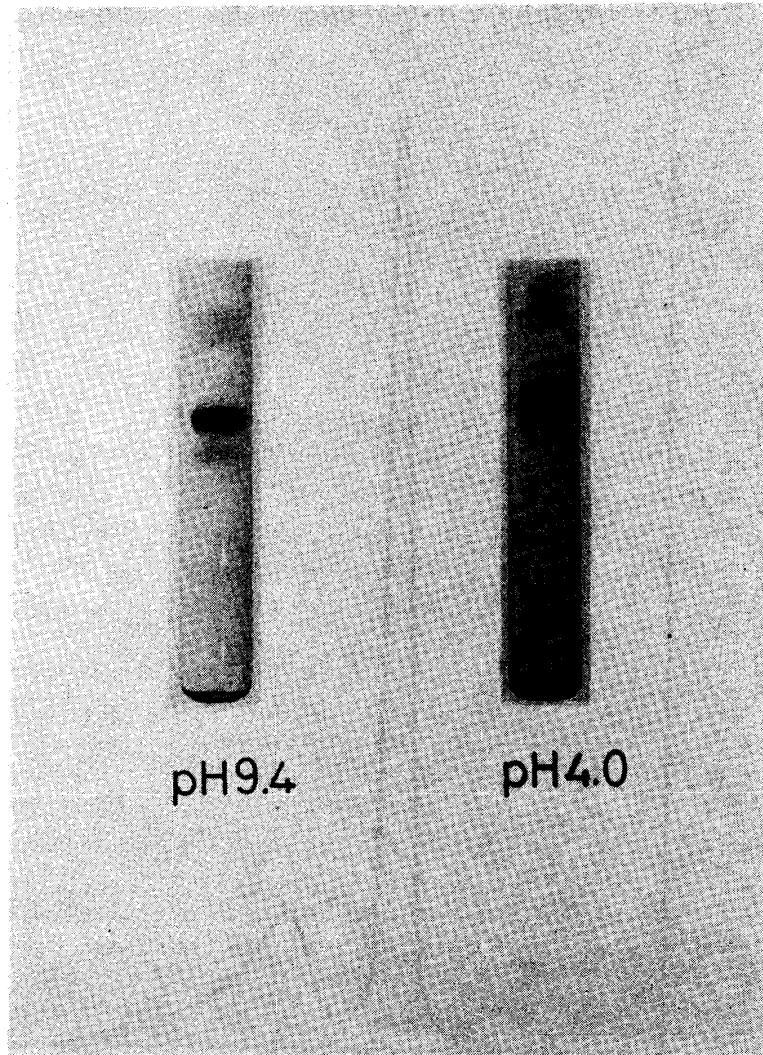


図19 そば種子チアミン結合タンパク質のポリアクリルミドゲル電気泳動像

表11 米ぬかチアミン結合タンパク質のアミノ酸組成

Amino Acid	Molar %
Aspartic Acid	11.8
Threonine	3.4
Serine	7.0
Glutamic Acid	17.8
Glycine	8.6
Alanine	5.5
Half-Cystine	0.5
Valine	7.4
Methionine	0.6
Isoleucine	4.2
Leucine	6.9
Tyrosine	1.9
Phenylalanine	4.8
Lysine	3.4
Histidine	1.9
Arginine	9.8
Proline	4.5
Total	100.0

は図20に示すごとく8.5であり、米ぬかのチアミン結合タンパク質と同じであった。

次にこのタンパク質のチアミンの結合に対する見かけの K_d 値と最大結合量を求めるため $0.1 \sim 2.0 \mu\text{M}$, ^{14}C -チアミンを含む 0.05 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.5) 中でチアミン結合タンパク質を平衡透析して測定した。その結果は図21に示すごとくである。見かけの K_d 値は $1.1 \mu\text{M}$, 最大結合量は 6.94 nM であった。この K_d 値は大腸菌, 酵母, 乳酸菌などのチアミン結合タンパク質の K_d 値と比較すると著しく高かった。しかし米ぬかチアミン結合タンパク質の値とほぼ同じであった。また B_{max} 値と先のゲル透過でのこのタンパク質の分子量約 $140,000$ よりそばのチアミン結合タンパク質 1 モルは 1 モルのチアミンと結合することがわかった。

そばのチアミン結合タンパク質とチアミンとの結合におけるチアミン誘導体の影響を調べた²²⁾。 $0.5 \mu\text{g}/$

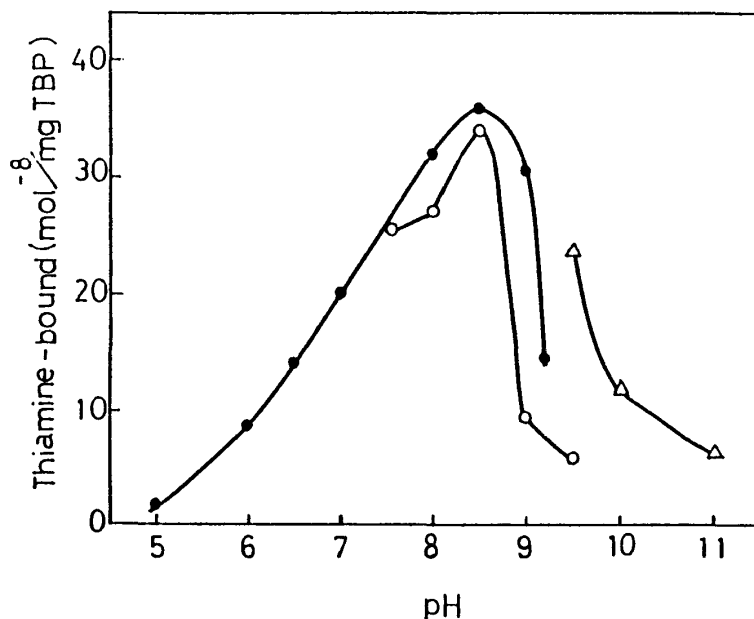


図20 そば種子チアミン結合タンパク質の結合活性に対する pH の影響

●, 0.05 M potassium phosphate buffer; ○, 0.05 M Tris-HCl buffer; △, 0.05 M NaHCO₃-Na₂CO₃ buffer. Each value is the average of duplicate determinations

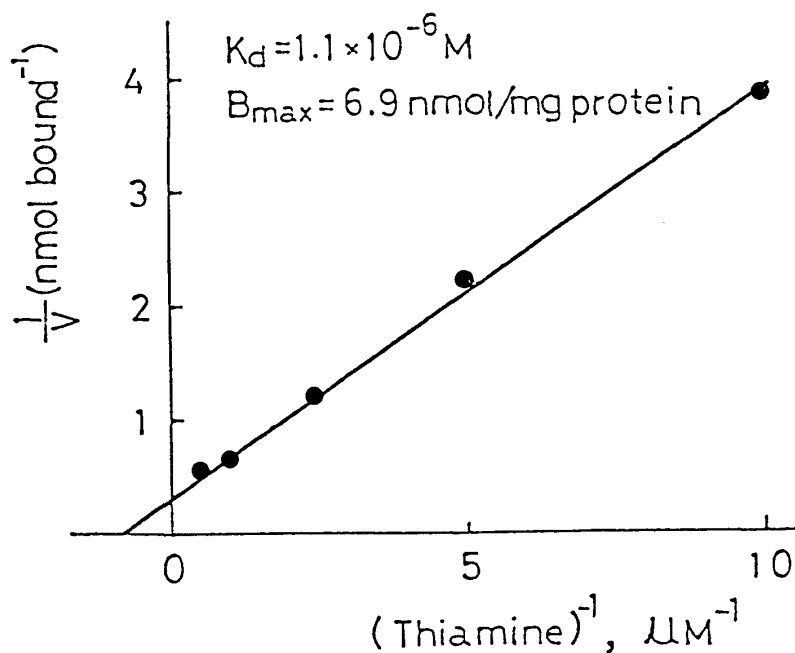


図21 チアミン結合タンパク質の結合活性に対するチアミン濃度の影響

Kinetic parameter K_d and B_{max} were determined using Lineweaver-Burk plots of the binding as a function of [¹⁴C]thiamine concentration.

ml のチアミンを含む 0.05 M リン酸カリウム緩衝液を透析外液として平衡透析を行ったときのチアミンの結合量を100として、この透析外液にチアミンに対してモル比で50倍量の TMP, TPP, オキシチアミン、もしくはピリチアミンのいずれかを加えて、同様に平衡透析を行い、チアミン結合量を測定し、チアミンとその

誘導体とのチアミン結合タンパク質に対する競合実験を行った。その結果は表12に示すごとくで、チアミンとこのタンパク質との結合にはほとんどこれら誘導体により影響されなかった。

さらにこのタンパク質とチアミン誘導体との結合性を調べた。その結果は表13に示されるごとくで、

表12 そば種子チアミン結合タンパク質とチアミンとの結合に対するチアミン誘導体の影響

Addition	Molar ratio to thiamine	Thiamine-binding (%)
None	0	100.0
TMP	50	89.5
TPP	50	98.2
Oxythiamine	50	95.6
Pyriothiamine	50	99.3

表13 そば種子チアミン結合タンパク質とチアミン誘導体の結合

Compounds	Binding (nmol/mg)
Thiamine	2.13
TMP	0
TPP	0
Oxythiamine	0
Chloroethylthiamine	0
2-Northiamine	2.18
Dimethylthiamine	0

TMP, TPP, オキシチアミン, クロロエチルチアミンおよびジメチアリウムとの結合性は全く認められず, 2-ノルチアミンとのみチアミンと同程度の反応性を示した。

7. ごま種子のチアミン結合タンパク質について²³⁾

ごまは原産地では熱帯アフリカまたはインドといわれているゴマ科の1年生草本である。種子の水分は5%前後と少ない。主成分は脂質で50%以上含まれている。ついでタンパク質で約20%と多い。無機成分も約5%と多く, とくにカルシウム含量が100g当り1,200mgと豊富に含まれている。チアミン含量も多く, チアミン結合能も高いので, ごま種子を試料としてチアミン結合タンパク質について検討した。

7.1 ごま種子のチアミン結合タンパク質の単離

試料として1983年ガテマラ産のごま種子を石油エーテルで脱脂後粉碎して用いた。試料100gに同量の海砂を加えて磨砕した後, 10倍量の0.05Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0, 1%NaCl含有)を加えて混合した。この混合液を4°Cで3時間放置した後, 遠心分離した。得られた上清に硫酸を加えて100%飽和し, 生じた沈でん画分を, 0.05Mリン酸カリウム緩衝液に対して透析した。この活性画分をDEAE-セファセルカラムでイオン交換クロマトグラフィーを行った。そのクロマトグラムは図22に示すごとくである。7タンパク質画分にわけられたが, 食塩濃度0.20Mから0.25Mで溶出する画分にチアミン結合能が認められた。この活性画分をさらにセファアクリルS-300カラムによるゲル濾過を行い, 精製画分を得た。この精製画分

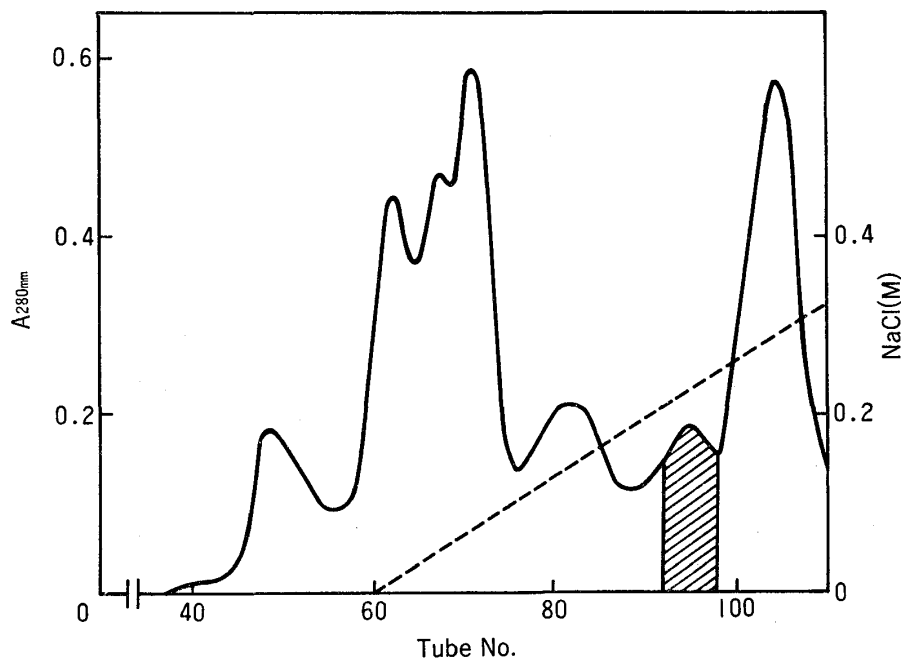


図22 DEAE-セファセルカラムによるごま種子チアミン結合タンパク質画分のクロマトグラム
 — 吸光度 (280 nm), ----- 食塩濃度

表14 ごま種子のチアミン結合タンパク質の分離は、精製のまとめ

	Total Protein (mg)	Total Activity (unit)	Specific Activity (unit/mg protein)	Yield (%)
Extract	10,560	2,880	0.27	100
Crude Active Fraction	9,288	2,765	0.30	96
1st Chromatography	338	642	1.90	22
2nd Chromatography	48	421	8.76	14

*

はポリアクリルアミドゲル電気泳動で均一のバンドを示し電気泳動的に均一であった。分離、精製の結果をまとめると表14に示すごとくである。抽出液に対して精製画分は比活性度で32倍に精製され収率は14%であった。

7.2 ごま種子チアミン結合タンパク質の性質

ごま種子チアミン結合タンパク質の分子量をスーパーコース12カラムを用いて、ゲル透過を行って推定した結果約30,000という値を得た。米ぬかやそばのチアミン結合タンパク質の分子量は約94,000と140,000と報告されているが、ごま種子チアミン結合タンパク質は大腸菌、乳酸菌などの微生物や卵黄、卵白など動物のチアミン結合タンパク質の分子量に近い値を示した。ごま種子チアミン結合タンパク質のチアミンとの反応における至適 pH は8.5であった。この値は米ぬか、そばのチアミン結合タンパク質と同じである。

チアミンとその誘導体との共存下における競合実験でこの結合タンパク質とチアミンとの反応性を調べた。その結果は表15に示す通りであり、チアミンに対してモル比で50倍量の TMP, TPP, オキシチアミン、もしくはピリチアミンのいずれかが共存してもチアミンとこのタンパク質との反応には影響されなかった。この結果は米ぬか、そばのチアミン結合タンパク質と全く同じであり、植物性チアミン結合タンパク質は微生物、動物のチアミン結合タンパク質と異なったチアミンに対する反応特異性を示した。さらにチアミン誘導体とこのタンパク質との反応性について調べたが、表16に示すごとく TMP, TPP, オキシチアミン、クロロエチルチアミン、2-ノルチアミンとは全く反応性を示さず、ジメチアリウムとのみ結合した。またその結合比はチアミンと同じであった。

植物性チアミン結合タンパク質は微生物、動物チアミン結合タンパク質とはチアミンに対する反応性は全く異なるが、米ぬか、そば、ごまの3種類の植物性チアミン結合タンパク質の間では、それぞれクロロエチルチアミン、2-ノルチアミン、ジメチアリウムに対する反応性が異なり、お互いに構造、反応性に少しずつ

表15 ごま種子チアミン結合タンパク質とチアミンとの結合に対するチアミン誘導体の影響

Addition	Molar Ratio to Thiamine	Thiamine-binding (%)
None	0	100
TMP	50	100
TPP	50	100
Oxythiamine	50	100
Pyriothiamine	50	91

表16 ごま種子チアミン結合タンパク質とチアミン誘導体との結合

Compounds	Binding (nmol/mg)
Thiamine	4.47
TMP	0
TPP	0
Oxythiamine	0
Chloroethylthiamine	0
2-Northiamine	0
Dimethylalium	4.36

異なった性質を有することが示された。

8. おわりに

植物性食品材料中にはチアミンと特異的に結合する物質の存在が認められた。これらのチアミン結合物質には熱に対して安定な物質と不安定な物質の2種類が存在した。前者は植物の葉、茎、根などの各部位に存在していたが、後者は植物の種子的性質をもつ部位にしか存在しなかった。これら活性成分をプロテアーゼ処理や分画して性質を調べた結果、耐熱性の活性物質は糖もしくは色素であり、熱に不安定な活性物質はタンパク質であることがわかった。

このチアミン結合タンパク質はすでに大腸菌や酵母などの微生物や動物組織中に存在することが明らかにされており、タンパク化学的な性質について詳しく研究されているものも少なくない。こうした研究の中から

それぞれのチアミン結合タンパク質に独自の性質も見い出されている。そこでこれら微生物、動物のチアミン結合タンパク質と植物のチアミン結合タンパク質について、比較するために米、そば、ごま種子のチアミン結合タンパク質を単離して、その性質を調べた。その結果微生物、動物チアミン結合タンパク質と植物種子のチアミン結合タンパク質とでは多くの点で異なった性質を示した。例えばチアミンやチアミンリン酸エステルに対して共通の結合性を示す微生物のチアミン結合タンパク質とは対照的に、植物種子に存在するチアミン結合タンパク質はチアミンのみ高い親和性を持ち、チアミンリン酸エステルに対しては結合性をもちないことが明らかになった。一方動物の脳や肝臓に見い出されたチアミン結合タンパク質はチアミン二リン酸とチアミン三リン酸に結合する性質を示すことが報告されているなど結合性についても多様であった。これらの特異性はまたそれぞれの生理機能とも密接な関係をもつものと考えられる。

さらに微生物のチアミン結合タンパク質のチアミン結合部位に関する検討においても、種々のタンパク質の化学修飾試薬の中でカルボキシル基を修飾する 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide (EDC) による酵母のチアミン結合タンパク質の前処理は、そのチアミン結合能を著しく低下させた。そしてこの不活性化反応はチアミンの存在下で有意に抑制された。またヒスチジン残基の修飾試薬である diethyl pyrocarbonate も濃度および時間依存的にチアミン結合タンパク質を不活性化することより図23に示すごとき結合様式が考えられている²⁴⁾。酵母のチアミン結合タンパク質の特定のカルボキシル基とヒスチジン残基がチアミンとの結合に関与していることが推察され、同時

にこれらの荷電したアミノ酸残基とチアミンのチアゾール環の第4級の窒素原子およびピリミジン環の1位の塩基性窒素原子との間のイオンの相互作用が結合反応に重要な役割を演じていることが推測されている。これに対して、植物種子のチアミン結合タンパク質は EDC によるカルボキシル基の修飾では酵母のチアミン結合タンパク質と同じ挙動を示したが、diethylpyrocarbonate に対しては影響されず、結合反応にヒスチジン残基はかかわりなく、特定のカルボキシル基が関与することが示されている。

また微生物のチアミン結合タンパク質と植物種子のチアミン結合タンパク質とではチアミンに対する Kd 値、結合反応の至適 pH などいくつかの点で異なっていた。

これら動物、植物、微生物のチアミン結合タンパク質それぞれのチアミンに対する種々の結合特異性のうち、とくに植物種子のチアミン結合タンパク質がチアミンそのものの化学構造に対して高い特異性を示すことは、植物種子中に高濃度に存在するチアミンが微生物や動物組織における場合と異なり、主として遊離型チアミンの型で認められる存在様式と関連していると考えられる。

植物種子のアルブミン画分には種々の生理活性物質の存在が認められている。例えば小麦種子にはプロテアーゼ²⁵⁾、プロテアーゼインヒビター²⁶⁾がアルブミン画分に存在するが、これら生理活性物質は種子の胚乳²⁷⁾、胚芽²⁸⁾、表皮²⁹⁾、果皮部に分布している。また植物体の発芽、生育、開花、結実といった過程で消費が認められている³⁰⁾。これに対して植物種子のチアミン結合タンパク質はグロブリン画分に存在しており、種子の胚芽部を中心に極在している。また種子の発芽にともなって急速に失活し、発芽4～6日目で消失する。

これらの結果より考えて、植物種子のチアミン結合タンパク質は種子の発芽時に必要なチアミンを貯蔵するために存在するタンパク質であり、またこのタンパク質も貯蔵タンパク質として発芽とともに消失するのではないかと推察される³¹⁾。

以上現在までに植物性食品材料中に存在するチアミン結合物質に関して明らかにされていることは、ごく一部であり、さらに研究されるべき多くの問題、不明な点が残されている。これらの問題点は生化学、植物生理学、食品学など多くの研究分野にとって興味ある研究課題の1つであり、今後の研究の展開に期待したいところである。

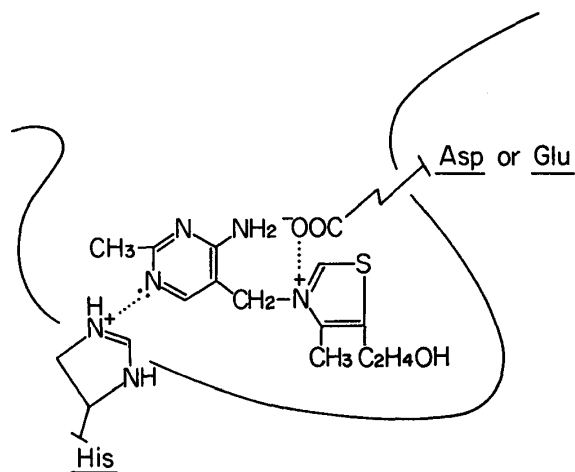


図23 酵母のチアミン結合タンパク質とチアミンとの結合様式予想図

われわれがおこなったこの一連の研究費用の一部は昭和60, 61年度文部省科学研究費補助金および昭和61年度本学研究所助成金の援助によるものである。

引用文献

- 1) Nishimune, T. and Hayashi, R.: *Biochem. Biophys. Acta*, **244**, 573-583 (1971).
- 2) Nishimune, T. and Hayashi, R.: *Biochem. Biophys. Acta*, **328**, 124-132 (1973).
- 3) Iwashima, A., Matsuura, A. and Nose, Y.: *J. Bacteriol.*, **108**, 1419/1421 (1971).
- 4) Matsuura, A., Iwashima, A. and Nose, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**, 241-246 (1973).
- 5) Griffith, T. W. and Leach, F. R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **153**, 658-663 (1973).
- 6) Henderson, G. G., Zevely, E. M. and Huennekens, F. M.: *J. Bacteriol.*, **137**, 1308-1314 (1979).
- 7) Iwashima, A. and Nishimura, H.: *Biochem. Biophys. Acta*, **577**, 217-220 (1979).
- 8) Muniyappa, K. and Adiga, P. R.: *Biochem. J.* **177**, 887-894 (1979).
- 9) Muniyappa, K. and Adiga, P. R.: *Biochem. J.* **193**, 679-685 (1981).
- 10) Kimura, M. and Itokawa, Y.: *J. Chromatog.* **211**, 290-294 (1981)
- 11) Nishino, K., Itokawa, Y., Nishino, N., Piroos, K. and Cooper, J. R.: *J. Biol. Chem.*, **258**, 11871-11878 (1983).
- 12) Nishino, A., Nishino, H. and Iwashima, A.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **26**, 415-418 (1980).
- 13) 光永俊郎, 菴田良子, 井上淳子, 清水まゆみ, 岩島昭夫: *日本栄養・食糧学会誌*, **37**, 139-143 (1984).
- 14) Mitsunaga, T., Shimizu, M. and Iwashima, A.: *J. Plant Physiol.* **124**, 179-182 (1986).
- 15) 光永俊郎, 宮本万美, 清水まゆみ, 岩島昭夫: *日本農芸化学会昭和61年度大会講演要旨集* p. 559 (1986).
- 16) 光永俊郎, 内田協子, 清水まゆみ: *日本調理科学会昭和61年度研究発表要旨集* p. 44 (1986).
- 17) Mitsunaga, T., Shimizu, M. and Iwashima, A.: *J. Plant Physiol.* in press.
- 18) Nishimura, H., Uehara, Y., Sempuku, K. and Iwashima, A.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **30**, 1-10 (1984).
- 19) Nishimura, H., Yoshioka, K. and Iwashima, A.: *Anal. Biochem.*, **139**, 373-376 (1984).
- 20) Nishimura, H., Sempuku, K., Nosaka, K. and Iwashima, A.: *J. Biochem.*, **96**, 1289-1293 (1984).
- 21) Mitsunaga, T., Matsuda, M., Shimizu, M. and Iwashima, A.: *Cereal Chem.* **63**, 332-335 (1986).
- 22) 光永俊郎, 片倉真紀, 清水まゆみ, 岩島昭夫: *第39回日本栄養・食糧学会話会講演要旨集* p. 32 (1985).
- 23) 光永俊郎, 田中伸子, 清水まゆみ, 岩島昭夫: *第40回日本栄養・食糧学会総会講演要旨集* (1986).
- 24) Nishimura, H., Sempuku, K. and Iwashima, A.: *Biochem. Biophys. Acta*, **668**, 333-338 (1981).
- 25) 光永俊郎: *京都女子大学食物学会誌* **40**, 12-26 (1985).
- 26) Mitsunaga, T.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **20**, 153-159 (1974).
- 27) Mitsunaga, T., Kimura, Y. and Shimizu, M.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **28**, 419-429 (1982).
- 28) 光永俊郎, 清水まゆみ: *日本農芸化学会誌*, **56**, 7-12 (1982).
- 29) 光永俊郎, 朝倉直子, 清水まゆみ: *日本農芸化学会誌* **57**, 857-86 (1983).
- 30) 光永俊郎: *New Food Industry* **28** (9), 71-77 (1986), **28** (10), 51-60 (1986).