Mem. Fac. Educ. Ehime Univ.,Nat. Sci., Vol. 15, No. 1 111～117 (1994)

# イモ類蛋白質のサブユニット解析とナス科野菜間の抗原相同性

宅 見 賢 二[1)]・森 永 倫 代[1)]・宇 高 順 子[2)]
[1)]（愛媛大学教育学部食品栄養学研究室）
[2)]（ 同 調理学研究室）
（平成6年4月28日受理）

# Comparison with Subunit Structures of Storage Proteins from *Tuber* and *Solanaceous Vegetables,* and their Antigenic Homology

Kenji TAKUMI[1)], Michiyo MORINAGA[1)] and Junko UDAKA[2)]
*Laboratory of Food and Nutrition[1)], and Cooking[2)], Faculty of Education,*
*Ehime University, Matsuyama, Ehime, 790 Japan*
(Received April 28, 1994)

Vegetable proteins of *Tuber* and *Solanaceous Vegetable* were analyzed by SDS-PAGE, and their antigenic crossreactivities were assayed by immunodiffusion tests using a rabbit antiserum raised against eggplant protein. Whereas proteins of eggplant, tomato and morning glory displayed a number of minor subunits which were broadly distributed on areas with molecular weights ranging from 8 to 90 kDa, those of white and sweet potatoes gave a simple SDS-PAGE profiles in which the former contained 26 and 56 kDa and the latter 40 kDa as major subunit components.

Immunodiffusion tests showed that the vegetable proteins including tomato, morning glory, white and sweet potatoes revealed precipitin lines against the eggplant protein antiserum. Conversely, no fine positive reactions were observed for the proteins of taro, Chinese yam and elephant foot.

## は じ め に

イモ類のなかで，蛋白質の品質改善を目的とする分子遺伝学的レベルの研究が進められているのは，サツマイモ（*Japonica batatas*）とジャガイモ（*Salanum tuberosum*）である．一般に，

植物の塊根や塊茎といった体細胞貯蔵器官には，他の器官にはほとんど存在しない蛋白質が多量に含まれている．ジャガイモでは分子量40,000（40 kDa）の蛋白質サブユニット，patatinが全体の蛋白質の70～80％を占めており，生化学的マーカー蛋白質としてその構造と機能がよく研究されている[1-3]．一方，サツマイモでは全可溶性蛋白質の約80％が分子量20 kDaのスポラミンである[3-4]．これらの主要蛋白質はイモからの萌芽や発根に際して分解されることなどから，いわゆる貯蔵蛋白質の一種と考えられるが，穀物種子などの貯蔵蛋白質とは物理化学的，生化学的性状と機能において明らかに異なる蛋白質である[5-7]．食品学の分野で言うイモ類には，サトイモやヤマノイモも含まれるが[8]，これらの貯蔵蛋白質の生化学的性質に関する報告は少ないようである[9]．一方，イモ類を植物分類学的にみると，ジャガイモはナスやトマトと同じナス科に，サツマイモはヒルガオ科にそれぞれ属する[10]．穀物蛋白質の分野では，遺伝学的近縁種間の抗原交差性の有無に関する研究は，単に免疫化学的興味ばかりではなく，良質な蛋白質の創製と当該産業の活性化を目的として広く行われている[11-13]．

本研究では，イモ類蛋白質の主要ポリペチドをSDS-電気泳動法（PAGE）により解析し，各品種間の同質性と異質性を明らかにするとともに，ナス蛋白質に対するウサギ抗体を用いて，近縁野菜類蛋白質間の免疫化学的関連性を調べた．

## 実験材料と方法

### 1．ナス科野菜類とイモ類

ジャガイモ，サツマイモ，サトイモ，ヤマノイモ，ナガイモ，コンニャクのイモ類およびナスとトマトの果実，アサガオの種子は，いずれも市販品を用いた．

### 2．蛋白質の抽出

イモ類およびナス科の果実は皮を除き，約1 cm角に細切りした後，約1.5倍量の5 S-PB（5％食塩加リン酸緩衝液，pH7.2）を加えてミキサーで約10秒間磨細した．磨細物はビーカーに採り，室温で1時間攪拌後，21,000× gで20分間遠心して，上清と沈澱に分けた．上清に硫酸アンモニウムを飽和に加え，一晩4℃に置いてから沈澱を集め，水に透析した．透析物は再び遠心し，得られる上清をアルブミン，沈澱をグロブリンとし凍結乾燥した．アサガオの種子蛋白質は，種子を乳鉢に採り，少量の5 S-PBを加えて磨細し，その遠心上清を凍結乾燥した．

### 3．抗血清の作成

既報の方法[14]に準拠して行った．ナスの5 S-PB抽出物を2～3 mg／mℓの濃度でPBSに加え，60℃で30分間インキュベイトして溶解後，等量のフロインドの完全アジュバンドを加えて乳化したものを，ウサギの背面十数箇所の皮内に分散して接種した．追加免疫の3週間後，免疫ウサギを全採血し，抗血清を得た．抗血清は0.05％にアジ化ナトリウムを加えて4℃又は－20℃に保存した．

### 4．ゲル内沈降反応[14]

バルビタール緩衝液（イオン強度0.5，pH8.6）で1％寒天ゲル（Noble Agar, Difco）を作り，ガラス板（5×5 cm）に流し固め，抗原穴（径2 mm）と抗体穴（径4 mm）をパンチ

で抜き，湿箱にいれて，各穴に試料抗原と抗血清を加えて室温に一夜静置し，生じる沈降線を写真撮影した．抗原試料は2～3 mg／mℓの濃度でPBSに加え，60℃で30分間インキュベイトして可溶化し，遠心後その上清を抗原試料として用いた．

### 5．SDS-PAGE

**Laemmli**[15] の方法に準拠して行った．

1）試料の調整： 100μl 又は数 mg の試料に，等量又は1 mg／10μl になるように2倍濃度の試料用緩衝液（4％SDS，10％ 2-メルカプトエタノール，125mM トリス緩衝液（pH 6.8）を加え，さらに（20％グリセロール，0.01％ブロモフェノールブルー（BPB）を同量加え，100℃で5分間加熱したものを試料とした．

2）ゲル濃度： 濃縮用ゲルは5％，分離用ゲルは15％とした．泳動用緩衝液（0.1％SDS，2.8％グリシン，0.6％トリス）を用い，10mA で約60分，20mA で約90分間泳動後，ゲルを染色液（10％メタノール，10％酢酸，0.1％コマシーブリリアントブルー）で1時間以上染色後，10％酢酸-10％メタノール混液で脱色した．

3）分子量マーカー： 小分子量マーカーキット（Pharmacia）を用いた：ホスホリラーゼb（MW96,000）；ウシ血清アルブミン（MW67,000）；オボアルブミン（MW43,000）；カルボニックアンヒドラーゼ（MW30,000）；トリプシンインヒビター（MW20,100）及びα-ラクトアルブミン（MW14,400）．

### 6．ゲルスキャンニング

SDS-PAGE で泳動したゲルを，島津二波長フライングスポットスキャンニングデンシトメーター（島津，CS9000）により測定した．

## 結 果 と 考 察

### 1．ナス科近縁野菜類蛋白質のポリペプチド組成（図-1）

ナス科近縁野菜類の可食部又は種子をミキサーで破砕したのち，5 S-PB で抽出し，SDS-PAGE を行った（図-1，パネルA）．ナスとアサガオは全体としては極めて類似性の高いペリペプチドパターンを示した．両者ともにゲル泳動面全体にわたってマイナーバンドが分散したが，みかけの分子量（MW）が30～32 kDa 付近と，22～23 kDa とに，一本ずつ二本の接近した主要なポリペプチドバンドがみられた．サツマイモとジャガイモではナスやアサガオのパターンとは大きく異なり，マイナーバンドは少なく，少数のメジャーバンドが目立った．即ち，前者ではみかけの MW が26 kDa のス

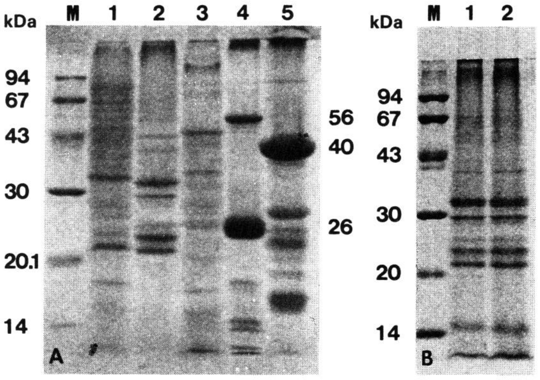



Fig. 1. SDS-PAGE of 5S-PB soluble proteins from *Solanasceous Vegetables.* Panel A: Lanes 1, eggplant; 2, morning glory; 3, tomato; 4, sweet potato; 5, white potato. 5S-PB is abbreviation of 5% salt in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.2. Panel B: lanes 1 and 2, morning glory -1 and -2, respectively. Lane M, standard marker proteins (see Materials and Methods).

ポラミンとその２量体（56 kDa），後者では MW が40 kDa の patatin である． 図-1，パネルBに品種が異なるアサガオ種子蛋白質の SDS-PAGE パターンを示した．これらのほとんど区別し難い極めて等質なサブユニットパターンは，関連遺伝子の保存性の高さを示唆している．

## 2．イモ類蛋白質のポリペプチドユニット（図-2，表-1，図-3）

イモ類蛋白質の５S-PB 抽出物を水に透析してアルブミンとグロブミンに分け，凍結乾燥後

Table 1. Major polypeptide subunits of storage proteins in potatoes

| | Fractions[a] | |
|---|---|---|
| *Tuber V.* | Albumin | Globulin |
| White | 40[b] | 40 |
| Sweet | 56, 17, 26 | |
| Taro | 11, 23 | 21, 23 |
| Yam (Var.) | 31 (31) | |
| E. foot | 11, 23 | 11, 23 |

[a]They were prepared from 5S-PB soluble extracts by dialysis against water.
[b]kDa of subunits judged by SDS-PAGE.

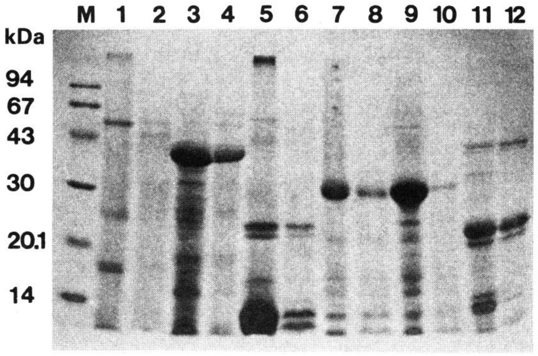
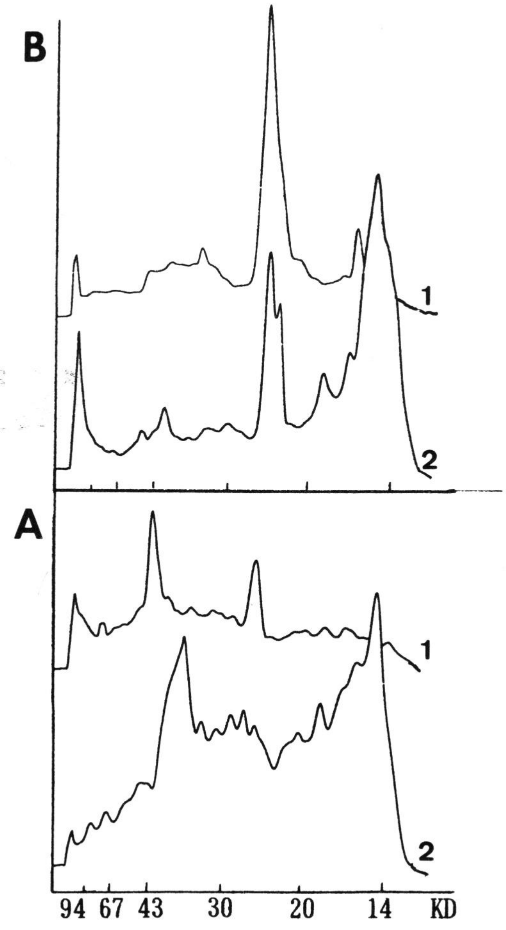



Fig. 2. SDS-PAGE of albumin and globulin fractions extracted from *Tuber Vegetables.* Odd and even numbers of the lanes denote the albumins and globulins, respectively. Lanes 1 and 2, sweet potato; 3 and 4, white potato; 5 and 6, taro; 7 and 8, yam; 9 and 10, yam variant (nagaimo) ; 11 and 12, elephant foot.



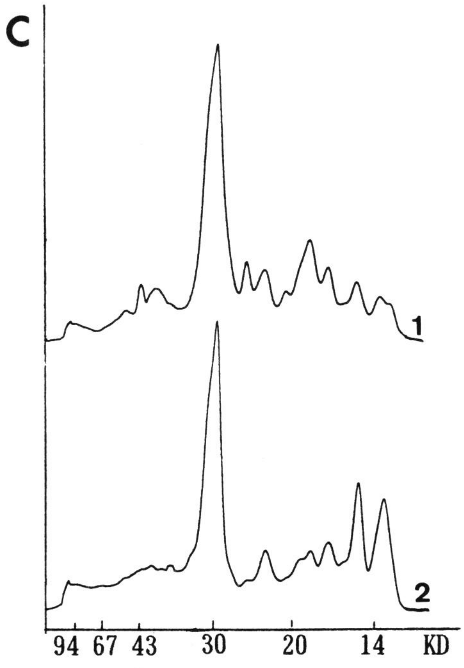




Fig. 3. Densitometergraphs of polypeptide subunits of 5S-PB soluble proteins from *Solanaceous Vegetables.* Panel A: 1, sweet potato; 2, white potato. Panel B: 1, elephant foot; 2, taro. Panel C: 1, yam; 2, yam var. (nagaimo).

PBS に溶解（1 mg／10μl）し，SDS-PAGE で展開した（図-2）．イモ類の蛋白質サブユニットはその品種により水に対する溶解度が異なり，アルブミン画分に偏るもの（サツマイモ，ヤマノイモおよびナガイモ）と両画分に分布するもの（ジャガイモ，サトイモおよびコンニャクイモ）に分かれた．

各サブユニットを kDa で示し画分別にまとめた（表-1）．表にみるように，ジャガイモの patatin（40 kDa）はアルブミンとグルブリンの両画分に現れたが，サツマイモでは26 kDa と56 kDa の二つのサブユニットはどちらもアルブミン画分に出現した．図-1で見たスポラミンの23 kDa がここでは17と25 kDa に二分されているが，これは単なる人工産物ではなくスポラミン固有の物性によるらしい[4]．服部と中村[16]によると，非還元状態での SDS-PAGE で，スポラミンは22 kDa と31 kDa の2つのサブユニットに分かれる．したがってここに得られた56 kDa のバンドは26 kDa サブユニットの2量体と考えられる．

サトイモとコンニャクイモの主なポリペプチドパターンの類似性は高く，みかけの MW が22～24 kDa 付近に分布する両バンドの2層構造はほとんど区別しがたい．後者がサトイモ科であることの証拠である。

ヤマノイモとナガイモのサブユニットに見られる極端な等質性は，後者が前者の栽培種として育成された経緯から納得がゆく．その遺伝形質は強固に保存されていると見るべきであろう．

Patatin は，上述のように40 kDa の位置にジャガイモの主要な蛋白質バンドとして出現した．したがって，この実験で検出されたイモ類蛋白質のサブユニットは人工産物又はそれの類似物ではなく，各品種に固有の構成サブユニットを示すものと考えてよい．そこで図-2の SDS-PAGE パターンをデンシドメーターで測定し，各蛋白質バンドを半定量的に比較した（図-3）．

サツマイモとジャガイモ（パネル4）の異質性に比べて，サトイモとコンニャクイモ（パネルB）並びにヤマノイモとナガイモ（パネルC）の同質性はそれらの遺伝形質の保守性の強固さを示している．

### 3．イモ類と近縁野菜蛋白質間の抗原交差反応（図-4，図-5）

ナス科とヒルガオ科に属する野菜間の植物学的近縁関係を，ナスの抽出蛋白質に対するウサギ抗血清を用いて，ゲル内沈降反応で調べた（図-4）．中央穴に抗体を，周囲穴に各種の野菜抽出蛋白質を入れ，一夜室温に静置後，生ずる沈降線を観察した（パネルA）．抗体作製に用いたナス抽出蛋白質では，近接した数本の沈降線が現れ，他の野菜蛋白質ではそれらと融合する弱い数本の沈降線が出現した．ジャガイモ蛋白質でもはっきりした1本の沈降線が出現し，これはナスの数本のうちの1本と，さらにアサガオ蛋白質の2本のうちの1本と完全に融合した．即ち，抗原的に相同である．野菜の植物学的分類は蛋白質の抗原性と比例するようである．

ナスとサツマイモ（パネルB）の比較では，少なくとも互いに融合する2本の沈降線が出現し，サツマイモの2本の沈降線のうち，抗原性の強い沈降線（抗原穴に近いもの）がナス沈降線の抗体穴に近い線と融合し，ナス沈降線の強いものがサツマイモの弱い沈降線と結合した．SDS-PAGE で示された26 kDa と56 kDa の2つのサブユニットとこの2つの沈降線の対応は，イムノブロットで現在解明中である．以上の知見は，ナス科の野菜類が共通抗原性を有することを明らかにした．

次にサツマイモ蛋白質をアルブミンとグロブリンに分画し，ナス蛋白質抗体に対する抗原性

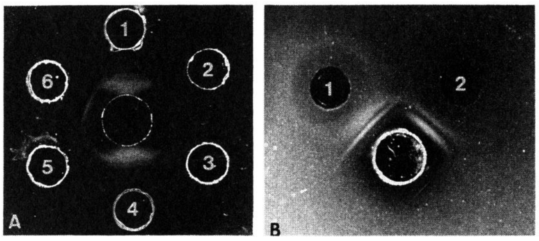



Fig. 4. Antigenic crossreactions among edible proteins from *Solanaceous Vegetables.*
Panel A: Peripheral wells 1 and 4, eggplant; 2, tomato; 3, white potato; 5, morning glory; 6, sweet potato. Center well, anti–eggplant protein serum.
Panel B: well 1, eggplant; well 2, sweet potato. Center well, anti–eggplant protein serum.

Table 2. Amino acid composition of various potato proteins

| Amino acid[a] | Sweet potato | Taro | White potato | Chinese yam |
|---|---|---|---|---|
| Aspartic acid | 21.3 | 15.1 | 22.1 | 10.0 |
| Threonine | 6.1 | 4.6 | 4.1 | 3.7 |
| Serine | 5.9 | 6.3 | 3.5 | 10.0 |
| Glutamic acid | 11.4 | 11.3 | 17.0 | 22.0 |
| Proline | 4.0 | 4.2 | 4.1 | 2.8 |
| Glycine | 4.5 | 5.5 | 3.5 | 3.6 |
| Alanine | 6.1 | 5.5 | 3.5 | 6.9 |
| Cystine | 1.4 | 3.3 | 1.8 | 1.3 |
| Valine | 6.1 | 5.9 | 6.4 | 4.8 |
| Methionine | 1.6 | 1.4 | 1.8 | 1.4 |
| Isoleucine | 4.4 | 3.7 | 3.5 | 3.4 |
| Leucine | 6.6 | 8.8 | 5.8 | 5.1 |
| Tyrosine | 2.2 | 4.6 | 3.5 | 2.2 |
| Phenylalanine | 5.9 | 5.5 | 6.4 | 4.0 |
| Lysine | 5.0 | 5.5 | 6.4 | 4.0 |
| Histidine | 2.3 | 2.6 | 2.3 | 2.4 |
| Arginine | 3.6 | 6.3 | 5.8 | 11.9 |

[a]From standard tables of food composition in Japan (ref. 8).

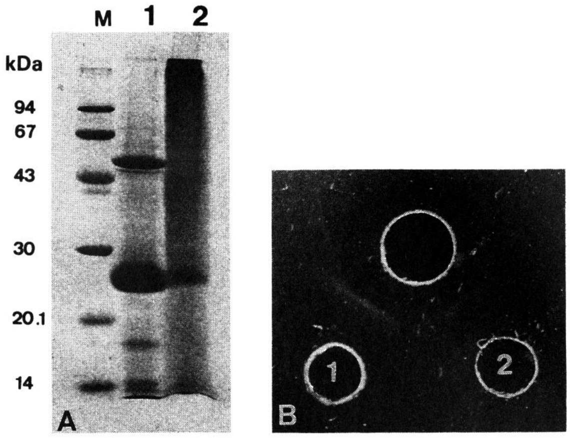



Fig. 5. SDS–PAGE of sweet potato proteins and antigenic crossreactions between eggplant and sweet potato proteins. Panel A: sweet potato albumin (lane 1) and globulin (lane 2) fractions. Panel B: wells 1 and 2, corresponding to the lanes 1 and 2, respectively. Center well, anti–eggplant protein serum.

の有無をゲル内沈降反応で調べた（図−5，パネルB）．上記（表−1）に示したように，サツマイモ蛋白質はアルブミン分画に回収されるので（パネルA，1），アルブミン画分に1本のはっきりした沈降線が出現した．グロブリン分画にもかすかな沈降線が見られるが，これはアルブミンの残存（パネル，A，2）が原因と思われる．これらの結果は，ナス抗体と反応するサツマイモ抗原がスポラミンであることを示す．スポラミン遺伝子の一部はすでに構造が明らかにされている[4]．今後のヒルガオ科植物における遺伝進化学的領域の解明が期待される．

今日の野菜類は，明治以来の近代育種の成果として各々その頂点にあるとはいうものの，現在の我が国における食生活様式の変化と多様性に適応しうるだけの高レベルの品質と栄養学的価値を問うときに問題なしとは言いがたい．野菜類の本来的意義は，イモ類は別として，ビタミン，無機塩類および植物繊維の供給源にあって，蛋白質のそれにあるのではないとされてきた．しかし，野菜蛋白質の良質なことはそのアミノ酸組成から容易に理解できる（表−2）．主食のコメや小麦に不足しがちな必須アミノ酸（例えばリジン）の供給源としての意義のみでなく，現代食生活の多様性に応える役割が要求されているとするなら，野菜蛋白質のもつ食的内容の拡大は重要である．

イモ類の貯蔵蛋白質については，その消化性と食味および加工特性の改善が急務である．これらの課題に対する即物的応答の最たるものは，これら蛋白質の量と質に関する遺伝子資源の収集と開発であろう．それが，自然界に蓄積されて来たであろう突然変異の探索であっても，

遺伝子工学的作出であっても，その重要性において変わりはない．

# ま　と　め

イモ類と野菜類の蛋白質をSDS-PAGEで解析し，それらの構成サブユニットの種類と特徴を明らかにした．またジャガイモの近縁野菜であるナス蛋白質に対するウサギ抗血清を用いて，ゲル内沈降反応により抗原相同性の有無を調べた．

1）蛋白質サブユニットの解析

ナス，トマトおよびアサガオでは低分子量（10 kDa）から高分子量（90 kDa）の広い範囲にマイナーバンドが分布するサブユニットパターンが共通していた．しかし，イモ類蛋白質は品種により固有の分子量を有し，水に対する溶解性を異にする．主要なサブユニット数個から構成されていた．

2）抗原交差反応

ナス抗血清に対してトマト，アサガオ，ジャガイモ，サツマイモは沈降線を形成した．サトイモ，ヤマノイモ，ナガイモおよびコンニャクでは明確な反応は観察されなかった．

# 文　献


1）Osborne, T.B. and Campbell, G., 1896, J. Am. Chem. Soc., 18 : 575.

2）Rexen, B., 1976, Potato Res., 19 : 189-192.

3）Park, W. D., 1983, Plant Mol. Biol. Reporter, 1: 61-66.

4）Maesima, M., Sasaki, T., Asahi, T., 1985, Phytochemistry, 24 : 1899-1903.

5）Shewry, P. R. and Miflin, B. J., 1985, Adv. Cereal Sci. Technol., 7 : 1-84.

6）Shukla, T. P. 1975, CRC Critical Rev. Food Sci. Nut., 6 : 1-75.

7）Kent, N. L. 1969, Proceedings of the 16th Easter School in Agricultural Science, University of Nottingham, Buffer Worths, pp 280-288.

8）香川綾監修，1993，四訂食品成分表，女子栄養大学出版部，東京，pp 40－44.

9）Mansour, E. H, Dworchak, E., Lugasi, A., Barna, E. and Gergely, A., 1993, J. Sci. Food Agric., 61 : 73-78.

10）本田正次，林弥栄，古里和夫編集，1988，原色園芸植物学辞典Ｉ，北隆館，東京，pp 171－206.

11）Ewart, J. A. D., 1977, Immunological Aspect of Foods, N. Catsimpools, (ed.), Avipull. Co., Westport, CT. pp 87-116.

12）Festenstein, G. N. and Hay, F. C., 1982, Plant Science Letters, 26 : 199-209.

13）Skerritt, J. H., 1989, Adv. Cereal Sci. Technol. 9 : 263-338.

14）Takumi, K., et al., 1991, J. Gem. Appl. Microbiol., 37, 455-465.

15）Leammli, U. K., 1970, Nature, 227 : 681-684.

19）服部束穂，中村研三，1987，蛋白質　核酸　酵素　別冊　30：261－276.