

甲州ブドウ果汁中の可溶性および不溶性タンパク質の分離と性質

誌名	山梨大学醗酵研究所研究報告
ISSN	05131863
著者	中西, 載慶 植杉, 岳彦 佐藤, 武
巻/号	24号
掲載ページ	p. 7-14
発行年月	1989年12月

[J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 24 7~14 1989]

甲州ブドウ果汁中の可溶性および 不溶性タンパク質の分離と性質

中西載慶・植杉岳彦・佐藤 武・横塚弘毅

Isolation and Characterization of Soluble and Insoluble Proteins in Koshu grape Juice.

KOTOYOSHI NAKANISHI, TAKEHIKO UESUGI, TAKESHI SATO*,
and KOKI YOKOTSUKA

Laboratory of Wine Chemistry, Institute of Enology and Viticulture, Yamanashi University, Kofu 400
** Nippi Inc., Senjumidoricho, Adachiku, Tokyo 120*

Abstract

Koshu grape juices were separated into soluble and insoluble (precipitate) fractions by centrifugation. The proteins present in the precipitate were solubilized with 0.1M carbonate buffer (pH 10.0) containing 0.1% sodium dodecyl sulfate and the recovery of the solubilized proteins was about 40%. The soluble and solubilized proteins obtained as lyophilizates were further separated by SDS polyacryl amide slab gel electrophoresis. The soluble proteins contained at least 5 protein fractions with molecular weight in the range of 13,000 to 68,000. The solubilized proteins contained at least 14 protein fractions with molecular weight in the range of 13,000 to 100,000. Although the number and relative proportions of the protein fractions separated from soluble and solubilized proteins were very different, these proteins had relatively similar amino acid compositions. They were rich in aspartic acid, glutamic acid, glycine, alanine, and serine.

ブドウ果実中に存在するタンパク質成分は、ブドウの品種特性や生理学的特性を知るうえで重要な成分であり、またワイン醸造においては、特にワインの混濁形成と密接に関係する重要な因子である。

一般にブドウ果実中に存在するタンパク質の多くは、その破砕・搾汁時に主に果実中に存在するフェノール化合物との相互作用により不溶化し、沈殿を形成する。また果実中に残存している可溶性タンパ

ク質の一部は、ワインの発酵中や熟成中においてもまた同様に不溶化し、ワイン混濁を引き起こすことなどがよく知られている。このタイプのブドウタンパク質の不溶化は、果実中に存在するタンパク質やフェノール化合物の含量や種類およびそれらの性質に大きく依存していると考えられているが、果汁やワインのpH、温度、金属イオン含量、この他アルコール濃度、およびその他の種々の共存物質等も大きな

影響を与えていると考えられている¹⁻⁵⁾。それ故、ブドウタンパク質の不溶化や沈殿形成の機構はかなり複雑である。一方、ブドウタンパク質の分離と性質に関する検討は、これまで種々の品種を対象に数多くなされている⁶⁻⁹⁾。しかし、それらの研究のほとんどは果汁中の可溶性タンパク質成分について調べたものであり、果汁中に共存する不溶性タンパク質成分については、これまでほとんど調べられていない。しかし、上述のように、ブドウ果汁中のタンパク質の多くは不溶性であることを考慮すれば、この不溶性タンパク質を可溶化、分離し、その性質を明らかにすることは、極めて重要でかつ興味あることと考えられる。そこで本報では、日本の代表的品種である甲州ブドウを対象に、果汁中の不溶性タンパク質の可溶化について検討した。また同時に果汁中の可溶性タンパク質画分と不溶性タンパク質より可溶化したタンパク質画分より種々のタンパク質を分離し、その分子量やアミノ酸組成について比較検討した。

実験方法

供試ブドウ 1985年10月に当研究施設付属育成種試験地において収穫した甲州種ブドウを用いた。なお糖度は16°Brix、酸度は0.65% (酒石酸換算)であった。

果汁の調製 上記ブドウ (75kg) を一粒ずつ手で果皮を除き、得られた果汁および果肉を種子を粉砕しないようにワーリングブレンダーを用いて、6000 rpm以下で1分間ホモジナイズした。次いで金網により種子を取り除き果汁 (38, 4 l) を得た。この果汁液を-20℃で凍結保存し、使用時に冷水で解凍し用いた。

果汁タンパク質の調製 果汁500mlを遠心分離(25000 x g, 30分)し、上清液と沈殿物に分けた。沈殿物は酒石酸緩衝液(pH 3.0)50mlを加えPotter-Elvehjem型ガラスホモジナイザーで1~3分間ホモジナイズした後、同様に遠心分離し、上清液 (洗浄液) と沈殿物 (洗浄沈殿) とに分けた。この操作を3回行い得られた洗浄沈殿を不溶性タンパク質画分とした。一方洗浄液は、前述の果汁上清に加え、4℃の冷水中で充分透析し、その透析内液をろ過 (東洋ろ紙No.5C) 後凍結乾燥し、可溶性タンパク質画分とした。なお、洗浄沈殿からのタンパク質の可溶化については後述とする。

タンパク質量の測定 可溶性、不溶性および可溶化タンパク質画分のタンパク質量は、ケルダール法¹⁰⁾により総窒素量を測定し、係数6.25を乗じ求めた。また、ゲル電気泳動法により分離された各タンパク質の含量は、染色された各タンパク質のバンドをデ

ンシトメーター (東洋DUM-33C) により測定し、相対値 (%) として表示した。

電気泳動 SDSポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動は、Laemmli¹¹⁾らの方法に従い、15×14cmのガラス板を用い、ゲルの厚さ2mmで行った。タンパク質の検出には、アミドブラック10B、クマシーブリリアントブルーR250、および銀染色法¹²⁾を用いた。試料タンパク質の添加量および染色剤の選択等についての詳細は結果の項に記述する。また分子量の測定にあたっては、標準タンパク質としてチトクロムC (MW.12500)、キモトリプシンノーゲン (25000)、人血清アルブミン (45000)、および牛血清アルブミン (68000) を用いた。

アミノ酸分析 可溶性あるいは可溶化タンパク質を1枚のゲルに対しタンパク質量として10mgに相当する量を添加し、上述の方法に従いSDSポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動を行った。泳動後、ゲルの両端より1スロットずつを切り取り、アミドブラック10Bにより各タンパク質バンドを染色、検出した。一方残りのゲル (10スロット相当) は、10%酢酸を含む50%メタノール溶液中で1hr保持した後、5%メタノールと7%酢酸溶液 (1:1) に浸し、4℃にて保存した。次に、これらのゲル片を元の1枚のゲルとなるよう並べて置き、未染色のゲルより、染色された各タンパク質バンドに相当する部分を横に細長く切り取り、分子量の異なる各タンパク質画分を分離した。切り取ったゲルはナイフにより細かく切り10mlの0.1M炭酸緩衝液 (pH 10.0) を加え、ガラスホモジナイザーでホモジナイズした後、1晩振とうした。次いで、この懸濁液を遠心分離 (25000 x g, 30分) し、得られた上清液をメンブランフィルター (0.80 μm) でろ過した後、そのろ液を蒸留水に対し透析した。各透析液を試験管に採り、エバポレーターにより蒸発乾固した後、6NHCl 1mlを加え、脱気封管し110℃、24hr加水分解した。得られた分解物中のアミノ酸組成はアミノ酸自動分析機 (協和精密K-101) により求めた。

結果および考察

果汁沈殿物からのタンパク質の可溶化 不溶性タンパク質の可溶化については、これまで種々の方法が報告されている¹³⁾。またブドウ果汁沈殿物中に存在する不溶性タンパク質は、界面活性剤の添加や試料液のpHをアルカリ性に変化させることにより、その一部が可溶化することが既に知られている^{14,15)}。そこで本報では、果汁沈殿物からのタンパク質の抽出に及ぼすpHの影響と界面活性剤の添加効果について調べた。実験方法の記載に従って調製した洗浄沈殿

2 g (湿重量) に対し、100mlの緩衝液 (pH 3.0 ; 0.1M 酒石酸-酒石酸ナトリウム, pH 5.0 ; 0.1M 酢酸-酢酸ナトリウム, pH 7.0 ; 0.1M 第一リン酸カリウム-第二リン酸ナトリウム, pH 9.0 ; 10.0, 11.0 ; 0.05M 炭酸ナトリウム-0.1M 重炭酸ナトリウム) を加え、ガラスホモジナイザーでホモジナイズ後、水水中で攪拌しながら1時間放置した。次いでこの懸濁液を遠心分離し、その上清液を透析後抽出されたタンパク質量を求めた。その結果をFig.1に示す。タンパク質は緩衝液のpHが高い程多く抽出される傾向にあり、pH 10とpH 11で最も高い値を示した。なお、洗浄沈殿1 g 中のタンパク質量は15mgであり、pH 10とpH 11での抽出量は、それぞれ2.3mgおよび2.4mgであったことから、不溶性タンパク質の可溶化率は約15%であった。次に界面活性剤の添加効果について調べた。さきに横塚らは甲州ブドウのポリフェノールオキシダーゼの可溶化においてBrij35, Tween20, tween80, Triton X-100, および SDS 等種々の界面活性剤を用いて、甲州果汁沈殿物よりタンパク質 (ポリフェノールオキシダーゼを含む) の可溶化について検討し、SDS

の添加が最も有効であることを報告した¹⁶⁾。そこで本報では、この結果と以後の実験への影響 (SDS ゲル電気泳動法によるタンパク質の分離) を考慮し、界面活性剤として SDS を選択した。上記の結果を基に、各濃度 (0~5, 0%) の SDS を含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) および 0.1M 炭酸緩衝液 (pH 10.0) を用いて、上述と同様の方法により可溶化されたタンパク質量について調べた。その結果をFig.2に示す。いずれの緩衝液においても可溶化されたタンパク質量は、SDS 濃度に依存し、0.1%濃度の時最大となり、それ以上の濃度では一定値を示した。上述した既報¹⁶⁾の結果と比較すると、可溶化に及ぼす緩衝液のpHやSDS濃度の影響については、よく類似した傾向がみられたが、可溶化率はいずれも低い値を示した。この結果は、本報での洗浄沈殿の調製法が既報¹⁶⁾の場合と若干異なっていることに起因しているかもしれない。以上の結果より、果汁沈殿物からのタンパク質の可溶化は、0.1% SDS を含む炭酸緩衝液 (pH 10.0) で行い、該液を透析後、凍結乾燥し可溶化タンパク質画分とした。

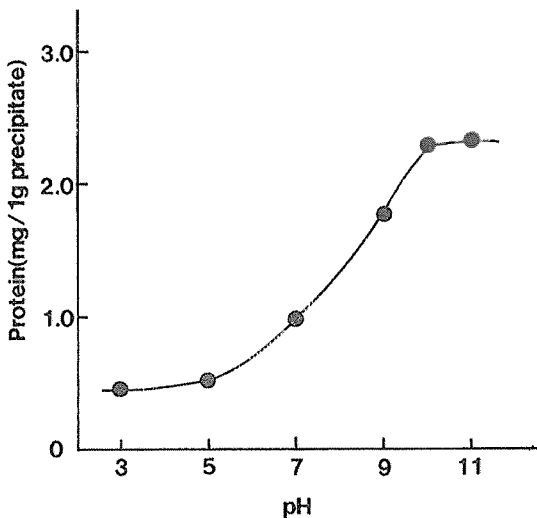


Fig. 1. Effect of pH on solubilization of insoluble proteins from juice precipitate.

The washed precipitate (2g) was homogenized in 100 ml buffer (pH 3.0: 0.1M tartrate buffer, pH 5.0: 0.1M acetate buffer, pH 7.0: 0.1M phosphate buffer, pH 9,10,11: 0.1M carbonate buffer). After stirring in an ice bath for 1 hour, the homogenate was centrifuged at 15,000 rpm for 30 min. The supernatant obtained was dialyzed against water and the amount of solubilized proteins was determined.

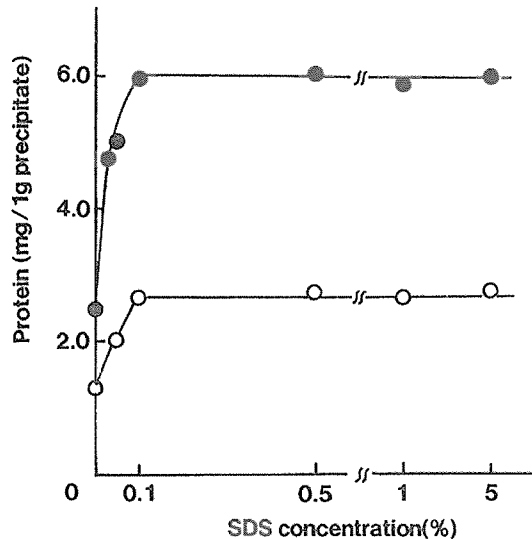


Fig. 2. Effect of sodium dodecyl sulfate (SDS) on solubilization of insoluble proteins from juice precipitate.

Various concentrations of SDS were added to the pH 7.0 or pH 10.0 buffer solution. Other experimental conditions were the same as in the footnote of Fig. 1.

○, 0.1M phosphate buffer (pH 7.0). ●, 0.1M carbonate buffer (pH 10.0)

ゲル電気泳動法によるタンパク質の分離と検出

実験方法の記載に従って調製した可溶性タンパク質画分と上記のように調製した可溶化タンパク質画分について、SDSポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動法により、両画分中のタンパク質の分子量分布について調べた。種々の濃度のタンパク質試料液を泳動後、アミドブラック10B、クマシーブリリアントブルーR250および銀染色法により、各タンパク質の検出を行った結果、両試料とも銀染色法が最も少量のサンプルで感度よく各タンパク質が検出されることがわかった。また本方法では、試料タンパク質は全量として10 μ g程度を泳動させたときが最も分離がよく、各タンパク質画分のデンストグラムもシャープなピークとして得られることがわかった。そこで、ブドウタンパク質の検出には銀染色法を用いることとした。しかしながら、泳動後のゲルよりタンパク質画分を抽出するために多量の試料を泳動する場合には、銀染色法では感度が高すぎるために、かえって不都合であることがわかった。一方、アミドブラック10BやクマシーブリリアントブルーR250の場合には、先の検討結果より各タンパク質が染色されにくい傾向が認められた。そこで泳動後のゲルのトリクロロ酢酸(TCA)による処理条件について若干の検討を行った。即ち、種々の濃度のタンパク質試料液を泳動後、ゲルを種々の濃度(0~30%)のTCA溶液に浸し、沸騰水溶液中で種々の時間保持した(熱処理)後、アミドブラック10Bによりそれぞれのゲル中の各タンパク質バンドを染色し、デンストメーターによりピーク面積を求め比較検討した。その結果、試料タンパク質は全量として300~500 μ gを泳動し、泳動後のゲルは、10%TCA溶液で25分間熱処理した時が最も各タンパク質画分の分離と染色度が良いことがわかった。またこの時、各タンパク質のデンストグラム上のピーク面積は、TCA無処理の時の約2倍であった。一方クマシーブリリアントブルーR250は、アミドブラック10Bより若干染色度が低い傾向にあった。またTCAに代えて過塩素酸処理についても検討したが、その効果はTCAより低いものであった。なお検出されたタンパク質の種類(バンドの本数)は銀染色の場合と同様であった。以上の結果より、ブドウタンパク質の分子量とその含量を調べるにあたっては銀染色法を用い、各タンパク質画分をゲルより抽出し、そのアミノ酸組成を調べるにあたってはアミドブラック10Bによる染色法を用いることとした。

ブドウ果汁タンパク質の分子量分布 まず4種の標準タンパク質を用い、SDSゲル電気泳動を行い、タンパク質量と銀染色法により検出した各タンパク

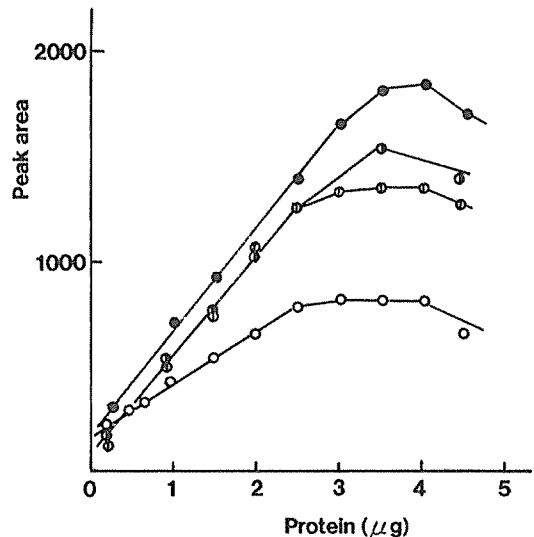


Fig. 3. Relationship between the protein concentration and the peak area.

Various amounts of standard proteins were applied to a polyacrylamide slab gel and the electrophoresis was run as described in the text. After silver staining, each of the protein bands in the gel was scanned with a densitometer and the peak areas of the bands were determined.

○, cytochrom C. ○, chymotrypsinogen A. ○, human serum albumin. ●, bovine serum albumin.

質バンドのデンストグラム上のピーク面積との関係について調べた。その結果はFig.3に示すように、いずれのタンパク質も3 μ g程度までデンストグラムのピーク面積と比例関係にあることがわかった。そこで可溶性および可溶化タンパク質試料を上述の方法に従ってSDSゲル電気泳動を行い、両画分に含まれる種々のタンパク質を銀染色法により検出し、それらのタンパク質の分子量と相対含量を調べた。それらの結果をFig.4とTable1に示す。可溶性タンパク質中では、分子量13000から68000までの5種のタンパク質画分が検出され、可溶化タンパク質では13000から100000までの14種が検出された。可溶性タンパク質においては、分子量20000と25000の画分が最も多く、相対量として全体の約22%および52%を占めていた。可溶化タンパク質では、可溶性タンパク質の約3倍にあたる分子量の異なるタンパク質画分が検出され、それぞれの相対含量は約2%から12%までの範囲にあり、可溶性タンパク質の場合とかなり異なっていた。また、可溶性タンパク質での分子量が30000を越える画分の含量は約10%であったが、可溶化タ

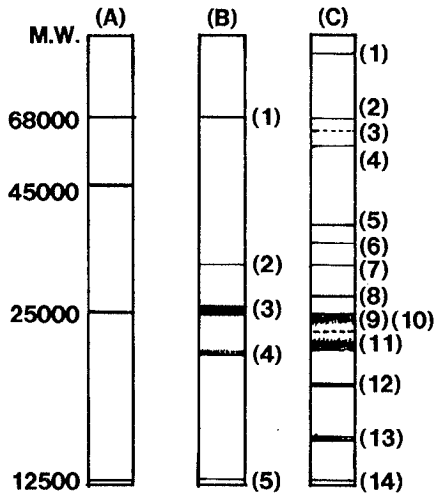


Fig. 4. SDS polyacrylamide slab gel electrophoresis of soluble and solubilized proteins.

Ten μg of proteins was used for the electrophoresis. Other experimental conditions were the same as in Fig. 3

A. Marker proteins (see Fig.3). B. Soluble proteins. C. Solubilized proteins.

Table 1. Relative proportions and molecular weights of various protein fractions (bands) on SDS gel electrophoresis.

Protein No. ¹⁾	Soluble protein fractions		Solubilized protein fractions	
	M.W. ²⁾	% of total	M.W.	% of total
1	68,000	10.3	100,000	5.9
2	30,000	6.4	68,000	6.1
3	25,000	52.1	62,000	2.3
4	20,000	21.5	60,000	6.5
5	13,000	9.7	43,000	10.4
6			36,000	6.4
7			30,000	6.6
8			27,000	6.2
9			24,000	10.3
10			23,000	1.9
11			22,000	10.1
12			19,000	7.6
13			15,000	11.7
14			13,000	8.0

1) See Fig.3.

2) Molecular weight (daltons).

ンパク質では約40%であり、可溶化タンパク質中には可溶性タンパク質に比べより高分子のタンパク質画分が多く含まれていることがわかった。ブドウ果汁中の可溶性タンパク質の分子量分布については、これまで種々の品種を対象に調べられているが、多くのブドウ品種においてそのタンパク質のほとんどは分子量30000以下であると報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾。本実験における甲州ブドウの場合もそれらの結果とよく類似していた。なお、可溶化タンパク質の分子量分布については、これまでほとんど報告されていないので、他のブドウ品種との比較はできないが、可溶性タンパク質に比べかなり広い範囲に平均的に分布していることは興味あるものと思われる。また、本実験において可溶化されたタンパク質量は、不溶性タンパク質の約40%であるので、本実験の抽出条件で可溶化することのできない不溶性タンパク質をさらに可溶化し、調べることが必要と思われる。

甲州ブドウタンパク質のアミノ酸組成 可溶性および可溶化タンパク質中に含まれる分子量の異なる各タンパク質画分のアミノ酸組成を比較するために、実験方法の記載に従って両試料をSDSゲル電気泳動を行い、ゲルより各タンパク質画分を抽出した。可溶性タンパク質においては、Fig.4に示されるように5種のタンパク質画分(5本の染色バンド)の移動距離が明確に異なっていたので、そのタンパク質に相当する部分のゲルからの切り取りは比較的容易であった。そこでこの5種のタンパク質画分について、そのアミノ酸組成を調べた。可溶化タンパク質においては、Fig.4に示されるように各タンパク質画分のいくつかは、その移動距離が接近しているために、14種の各画分をそれぞれゲルより切り取ることが難しかったので、ゲルを9つの区分(No.1~No.9)に分けて切り取った。即ちNo.1画分には分子量100000のタンパク質画分が含まれ、以下No.2は68000、No.3は62000と60000、No.4は43000、No.5は36000と30000、No.6は27000、No.7は24000、23000および20000、No.8は15000、No.9は13000のタンパク質画分を含んでいた。これらの各タンパク質画分のアミノ酸分析の結果をまとめてTable 3とTable 4に示す。可溶性タンパク質においては5種のタンパク質ともアスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、セリンおよびアラニンが多く含まれ、いずれの画分もよく類似していた。ブドウ果汁中の可溶性タンパク質のアミノ酸組成について、Anelliら¹⁹⁾は、カベルネソービニオン、リースリング、セミヨン種等14品種のブドウについて調べ、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、スレオニンおよび α -アラニン等が多く含まれていると報告しており、また横塚ら¹⁷⁾は、甲州、リースリング、マスカットベリー

Table 2. Amino acid compositions of various protein fractions separated from soluble proteins.

Amino acids	Protein fractions (Molecular weights)				
	68,000	30,000	25,000 (mol %)	20,000	13,000
Asp	15.7	19.6	18.1	18.8	13.3
Thr	4.2	4.6	5.0	5.3	4.7
Ser	10.9	11.3	10.5	9.0	12.8
Glu	17.9	15.7	14.9	14.6	16.5
Pro	3.7	3.0	3.3	4.1	4.6
Gly	19.0	20.6	16.8	17.1	18.2
Ala	8.4	8.3	8.2	8.2	8.8
Cys-Cys	t ¹⁾	t	t	t	t
Val	3.5	3.0	3.3	3.9	3.5
Met	0.4	0.5	0.6	0.5	0.6
Ile	2.1	2.0	2.5	2.6	2.3
Leu	3.2	1.8	3.9	4.2	3.6
Tyr	1.1	1.6	2.0	2.1	1.7
Phe	1.5	1.8	2.3	2.6	2.0
Lys	3.2	2.7	2.9	2.8	3.0
His	3.4	2.3	4.5	2.2	2.2
Arg	1.9	1.2	1.3	1.7	2.2

1) Trace.

Table 3. Amino acid compositions of various protein fractions separated from solubilized proteins.

Amino acids	Protein fractions (Molecular weights)								
	100,000	68,000	60,000 ~62,000	43,000	36,000 ~30,000	27,000	24,000 ~19,000	15,000	13,000
Asp	16.8	19.0	18.0	16.7	15.7	16.5	18.5	16.1	15.3
Thr	4.6	4.4	4.0	4.4	4.4	4.2	4.2	4.4	3.8
Ser	13.0	11.5	9.9	12.4	14.5	13.7	9.8	12.3	10.2
Glu	18.7	19.0	19.6	20.8	20.5	20.5	18.8	19.7	23.8
Pro	2.7	1.8	3.7	2.4	2.5	2.9	5.5	4.3	3.1
Gly	18.8	19.9	20.7	18.6	19.8	18.5	18.0	18.2	18.3
Cys-Cys	t ¹⁾	t	t	t	t	t	t	t	t
Ala	8.5	8.4	8.9	8.5	9.7	8.5	9.1	8.4	9.2
Val	1.4	1.5	2.4	2.7	2.1	2.8	2.3	2.5	3.2
Met	t	t	t	t	t	t	t	t	t
Ile	2.2	1.9	1.8	1.9	1.9	1.7	1.7	1.9	1.9
Leu	3.4	2.9	2.5	2.8	2.4	2.4	2.4	2.7	2.5
Tyr	1.4	1.2	0.9	1.3	1.1	1.3	0.8	1.6	1.5
Phe	1.6	1.3	1.2	1.4	1.0	1.3	1.1	1.5	1.4
Lys	3.3	2.9	2.4	2.6	2.2	2.4	2.3	2.4	2.1
His	2.6	2.8	2.7	2.6	2.2	2.5	2.4	2.6	2.8
Arg	1.1	1.5	1.4	1.0	t	1.0	3.2	1.7	1.1

1) Trace.

Aについて調べ、アスパラギン酸、グリシン、アラニン、スレオニン、セリンおよびグルタミン酸が多く含まれていると報告した。本報では、可溶性タンパク質を分子量の異なる5種の画分に分離し、それぞれの画分のアミノ酸組成について調べたが、それらのアミノ酸組成を上記の文献値と比較すると、個々のアミノ酸の含量は多少異なる場合もあるものの、全体的に顕著な差はないものと考えられた。一方可溶性タンパク質より分離した分子量の異なる9種のタンパク質画分のアミノ酸組成については、いずれもアスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、セリンおよびアラニンが多く含まれ、かなりよく類似していた。これら可溶性タンパク質のアミノ酸組成については、これまでほとんど報告されていないので、他の文献値との比較論議はできないが、上記の可溶性タンパク質の場合と比較すると、グルタミン酸の含量が、可溶性タンパク質の各画分に比べ、いずれも若干高い値を示し、またバリンは若干低い値を示していたが、全体的にはよく類似したアミノ酸組成を示していた。この結果は、ブドウタンパク質の不溶化の要因を知る上で極めて興味ある事実と思われる。即ち、果汁中に存在するタンパク質の存在形態（可溶性または不溶性）や不溶化の要因は、そのタンパク質のアミノ酸組成とは密接な関係はなく、むしろその他の因子が、その要因と深く関係しているものと推察される。しかし本実験で可溶化されたタンパク質は不溶性タンパク質の約40%であることから、これらの結果は不溶性タンパク質全体の性質を反映するものではなく、また不溶化し易いタンパク質ほど、むしろ可溶化することが難しい可能性も考えられるので今後さらに詳しい検討が必要と思われる。一方可溶性タンパク質画分は、可溶性タンパク質画分に比べ、分子量の大きい数種のタンパク質画分を含んでいた。この結果はブドウタンパク質のアミノ酸組成よりもむしろ分子量の差異が、そのタンパク質の不溶化の程度となんらかの関連性があるものとも予想され、興味ある実験事実と思われる。しかし、ブドウタンパク質の不溶化の要因は前述の如くかなり複雑であるので、本報で分離されたタンパク質画分についても、その性質をさらに詳しく調べることが必要とされる。また最近、Hsuら¹⁸⁾および我々²⁰⁾は、果汁やワイン中に存在する可溶性タンパク質の多くは糖タンパク質であることを報告しており、ブドウタンパク質の不溶化におよぼす糖鎖の影響に関する検討も興味あるものと思われる。

要 約

甲州ブドウ果汁の遠心分離上清中に存在する可溶

性タンパク質および同沈殿物（洗浄沈殿）中に存在する不溶性タンパク質について検討し、以下の結果を得た。

1 不溶性タンパク質は、0.1M炭酸緩衝液（pH 10又は11）により、その約15%が可溶化され、又0.1% SDSを含む同緩衝液によっては、約40%が可溶化された。

2 可溶性および可溶化タンパク質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により、分子量の相違に基いて分離した結果、可溶性タンパク質中には分子量13000から68000までの計5種のタンパク質画分が含まれ、特に20000および25000の2つの画分が全体の74%を占めていた。一方、可溶性タンパク質では、13000から100000までの計14種の画分が含まれ、それら各画分の含量は約2%から12%の範囲にあった。

3 可溶性および可溶化タンパク質より分離された分子量の異なる各タンパク質のアミノ酸組成について調べた結果、いずれの画分ともアスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、セリン、およびアラニンが多く含まれ、そのアミノ酸組成はかなり類似していることがわかった。

文 献

- 1) Yokotsuka, K., Nozaki, K., Kushida, T. : *J. Ferment. Technol.*, **61**, 413 (1983).
- 2) Joslyn, M. A. : *Proc. Am. Soc. Enol.*, **4**, 39 (1953).
- 3) Singleton, V. L. : *Wines & Vines*, **48**, 23 (1967).
- 4) Lamikanra, O., Inyang, I. D. : *Am. J. Enol. Vitic.*, **39**, 133 (1988).
- 5) Pilone, B. F., Berg, H. W. : *Am. J. Enol. Vitic.*, **16**, 195 (1965).
- 6) Yokotsuka, K., Yoshii, M., Aihara, T., Kushida, T. : *J. Ferment. Technol.*, **55**, 510 (1977).
- 7) Bayly, F., Berg, H. W. : *Am. J. Enol. Vitic.*, **24**, 18 (1967).
- 8) Ough, C. S., Anelli, G. : *Am. J. Enol. Vitic.*, **30**, 8 (1979).
- 9) Hsu, J. C., Heatherbell, D. A. : *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 6 (1987).
- 10) Amerin, M. A., Ough, C. S. : *Methods for Analysis of Must and Wines*. John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane and Toronto (1980).
- 11) Laemmli, V. K. : *Nature*, **227**, 680 (1970).
- 12) Oakley, B. R., Kirsch, D. R., Morris, N. R. : *Anal. Biochem.*, **105**, 361 (1980).
- 13) 日本生化学会編：生化学実験講座（タンパク質の化学 I）P24, 東京化学同人（1979）.
- 14) Yokotsuka, K., Makino, S., Singleton, V.

- L. : *Am. J. Enol. Vitic.*, **39**, 293 (1988).
- 15) Arnold, W. N. : *Biochim. Biophys. acta.*, **128**, 124 (1966).
- 16) Bayly, F. C., Berg, H. W. : *Am. J. Enol. Vitic.*, **24**, 18 (1967).
- 17) Yokotsuka, K., Yoshii, M., Aihara, T., Kushida, T. : *J. Ferment. Technol.*, **55**, 510 (1977).
- 18) Hsu, J., Heathrbell, D, A. : *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 6 (1987).
- 19) Anelli, G. : *Am. J. Enol. Vitic.*, **28**, 200 (1977).
- 20) 中西載慶, 佐藤武, 横塚弘毅: ブドウ・ワイン学アメリカ学会日本部会大会, 要旨集P19(1989).

(1989・9・20 受理)