

## キノア種子グロブリンの物理化学的性質

菊田 千景\*、小西 洋太郎

大阪市立大学大学院生活科学研究科

\*現所属：近畿大学農学部

### Physicochemical Properties of Quinoa Seed Globulin

Chikage KIKUTA and Yotaro KONISHI

*Graduate School of Human Life Science, Osaka City University*

#### Summary

Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), originating from the Andes region of South America, has attracted attention to a new food resource with high nutritional value. The seeds contain globulin as a storage protein. The purpose of this study was to characterize globulins from two different ecological types, Altiplano and Sea-level. Globulin was extracted with salt-solution and precipitated at pH 5. On Sepharose CL-6B gel filtration, it was found that the molecular weights of the globulin from Altiplano and Sea-level types were 340,000 and 380,000, respectively, and contained 0.5% and 0.08% of phosphate, respectively. SDS-PAGE analysis showed that the globulin from Altiplano type was composed of 4 subunits (22, 23, 32, and 36 kDa), whereas the globulin from Sea-level type consisted of 7 subunits (22, 23, 28, 32, 38, 43, and 50 kDa). These subunits could be separated into acidic and basic subunits on a chromatofocusing of the carboxymethylated globulins. Emulsifying activities of the quinoa globulins were about 50% lower than those of soybean and amaranth globulins, in spite of having higher surface hydrophobicity.

**Keywords** : キノア、グロブリン、物理化学的性質

*Chenopodium quinoa* Willd., Globulin, Physicochemical properties

#### I. 緒言

キノア (*Chenopodium quinoa* Willd.) は南米アンデス地方原産、双子葉類アカザ科アカザ属の1年性植物である。キノアの種子は、かつてトウモロコシとともにインカ帝国の主要な食糧源であった<sup>1)</sup>。最近のデータによると、主要生産国はペルーとポリビア (海拔2,000m ~ 4,000m) であり、栽培面積は80,000ha、年間生産高は55,000トンであるという<sup>2)</sup>。

キノア種子は粉にしてパンやパスタを作ったり、粒のまま粥にしたり、スープ、シチュー、サラダに使われる

他、パフ菓子や焙煎茶などさまざまな調理加工法が知られている<sup>2,3)</sup>。

キノアの種子は、直径2 ~ 3mmの楕円形で、澱粉質に富む外胚乳組織の周りを胚芽が帯状に取りまく構造をしており、ヒユ科アマランス (*Amaranthus* spp.) 種子と類似している<sup>4,5)</sup>。コメや小麦などの穀類に比べてタンパク質 (14%)、脂質 (9.7%)、灰分 (3.4%) 含量が多く、さらにCa、Mg、Fe、Znなどのミネラルも豊富に含まれていることなど、優れた栄養価を有している<sup>1,2,6)</sup>。このため、アメリカ科学アカデミーやNASAに

よって、新規食材として注目されている<sup>7)</sup>。

さて、キノアの品種は、生態系の違いをもとに4つに分類される<sup>8)</sup>。ボリビア、ペルーの国境地域の標高4,000m付近に分布するAltiplano type、ペルー中部の標高2,000～4,000m付近に分布するValley type、ボリビア南西部の標高4,000m付近に分布するSalar type、チリ中南部の標高の低い地域を起源とするSea-level typeの4品種である。現在国内で市販されているのは、主にボリビア産のAltiplano typeである。一方、日本大学および山梨県総合農業試験場は、新規需要作物としてSea-level typeを日本へ導入し、国産キノアの開発を目指し、栽培試験を行っている<sup>9)</sup>。

キノア種子のタンパク質は、量的にはグロブリンとアルブミンが多い<sup>10)</sup>。しかし、キノアの貯蔵タンパク質は、ソバ (*Fagopyrum esculentum* Moench) やアマランス (*Amaranthus* spp.) と同様に11Sタイプのグロブリンであり、Chenopodinとよばれる<sup>11)</sup>。貯蔵タンパク質はプロテインボディに貯蔵され、発芽時や生長に必要な窒素源となる。本研究は、キノア種子の貯蔵タンパク質であるグロブリンに着目し、食品開発にむけての基礎的知見を得ることを目的とした。すなわち、これまで情報の少ないキノアグロブリンの物理化学的性質、食品タンパク質の機能性の一つである乳化特性をAltiplano typeおよびSea-level typeの2品種について調べた。また乳化特性については、アマランス種子グロブリンおよび大豆グロブリンと比較した。

## II. 実験方法

### 1 グロブリンの抽出

Altiplano type (ボリビア産) およびSea-level type (日本産、NL 6 系統) のキノア種子は、それぞれ大日本明治製糖(株)、山梨県総合農業試験場より恵与された。実験には種子玄穀(殻付き)を乳鉢ですりつぶし60 meshのふるいに通したものをを用いた。

試料粉末1gに10mlの蒸留水を加え、マグネチックスターラーを用いて、室温で30分間攪拌した後、3,000 rpmで遠心分離して、上清(水溶性のアルブミン画分)を除去した。同様の操作を2回繰り返した(攪拌時間15分)。次に、沈殿に0.5 M 塩化ナトリウム溶液を10 ml加え、上記と同様の操作で、3回(攪拌時間30分、15分、15分)グロブリンを抽出した。抽出液を集め、1 Nの酢酸でpH5.0に調整した後、5℃で24時間静置した。生じた沈殿は遠心分離(10,000 rpm、15分間)で回収し、粗グロブリンとした。以下、ボリビア産キノア、日本産キノアのそれぞれから抽出した粗グロブリンを

BQG、NQGと略す。比較実験のため、アマランス種子(*A.hypochondriacus* K343)からも上述と同じ方法で粗グロブリンを調製した。また、分離大豆タンパク質(SPI)は不二製油(株)から恵与された。

### 2 ゲル濾過法によるグロブリンの精製

あらかじめ0.5 M 塩化ナトリウム・50mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)で平衡化した、Sephacrose CL-6B(2.5×75cm)カラムに、BQG、NQGを供し、同緩衝液で溶出(流速23 ml/h)し、5mlずつ集めた。分子量の測定は、既知分子量のタンパク質[チログロブリン(分子量669,000)、フェリチン(440,000)、カタラーゼ(232,000)、アルドラーゼ(158,000)]のKavと分子量との関係を表す検量曲線を作成し、算出した。タンパク質の定量は色素結合法<sup>12)</sup>に従った。リン酸はモリブデン酸アンモニウム法で測定した。

### 3 グロブリンサブユニットの還元アルキル化とクロマトフォーカシングによる分画

キノアグロブリンのサブユニットを分別するために、還元アルキル化を行った<sup>13)</sup>。すなわちサブユニット間のS-S結合を切断(還元)した後、S-Sへの再結合を防ぐため、-SH基にアルキル基を導入した。BQG、NQG(約40mg)を5mlの緩衝液A[6 M 尿素-25mM イミダゾール-塩酸緩衝液(pH 7.4)]に溶解し、さらに、尿素濃度を上げて8 Mとし、1 mM EDTA、10mM ジチオスレイトールの濃度になるように各試薬を加えた。室温で2時間静置後、0.2Mヨード酢酸の濃度になるように試薬を加えて、暗所、室温で30分間静置した。その後、緩衝液Aに対して、5℃で24時間透析を行い、還元アルキル化試料とした。

あらかじめ緩衝液Aで平衡化したPBE94ゲル(Pharmacia Biotech.)を充填したカラム(1×12cm)に、還元アルキル化したBQG、NQGを供した。溶離液には6 M尿素を含むPolybuffer74(pH4.6)を用い、pH 7.4～4.6の勾配下でタンパク質を溶出させた。

### 4 SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

SDS-PAGEに供したタンパク質試料はすべて、2% SDSと5%メルカプトエタノールの存在下、100℃、3分間加熱処理した。SDS-PAGEは15.5%の分離用ゲルおよび5.5%の濃縮ゲルを用いるLaemmliの方法に準じて行った<sup>14)</sup>。ゲルの染色にはクマシーブリヤントブルーR-250を使用した。

## 5 乳化活性 (EA) および乳化安定性 (ES) の測定

試料には、本研究で抽出したキノアグロブリン (BQG、NQG)、アマランスグロブリン (AG)、分離大豆タンパク質 (SPI, フジプロ、不二製油) を用いた。

0.4M 塩化ナトリウム10mMクエン酸リン酸緩衝液 (pH7.5) を用いて0～0.4%に調整した各種タンパク質溶液3mlに、コーン油1mlを加え、超音波ホモゲナイザー (Kontes VC-50, New Jersey) を用いて40秒間ホモゲナイズし、エマルジョンを調製した。ただちにエマルジョン10 $\mu$ lを採取し、1% SDS溶液2mlで希釈して、492nmにおける吸光度を測定し、その値を乳化活性 (EA) とした。また、乳化後24時間後の全試料体積に占めるエマルジョン体積の割合から、乳化安定性 (ES) を求めた<sup>15)</sup>。

## 6 表面疎水性の測定

0～0.005%のタンパク質溶液1.5mlに0.16mM ANS (8-Anilino-1-naphthalenesulfonic acid) を1.5ml加えて攪拌し、島津蛍光光度計RF-540を用いて、励起波長365nm、蛍光波長460nm、High sensitivity、Ordinate scale (×16) で蛍光強度を測定した<sup>15)</sup>。この条件においてタンパク質1%あたりの蛍光強度をタンパク質の表面疎水性 (So) と定義した。

## III. 結果

### 1 キノアグロブリンの精製と分子量

Fig. 1と2は、それぞれBQGとNQGのゲル濾過の結果を示す。いずれの試料にも Void volume 付近に波長280nmの吸収ピークがみられたが、色素結合法の値が小さいことから、非タンパク性の高分子化合物であると考

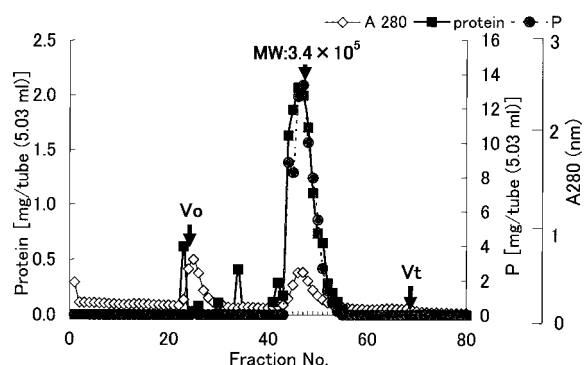


Fig. 1 Gel filtration of Bolivian quinoa globulin (BQG) Crude globulin (8.3 mg) was put on a Sepharose CL-6 B gel column (2.5 × 75 cm) and eluted with 0.5 M NaCl 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) at a flow rate of 23 ml/h and fractions were collected 5 ml/tube.

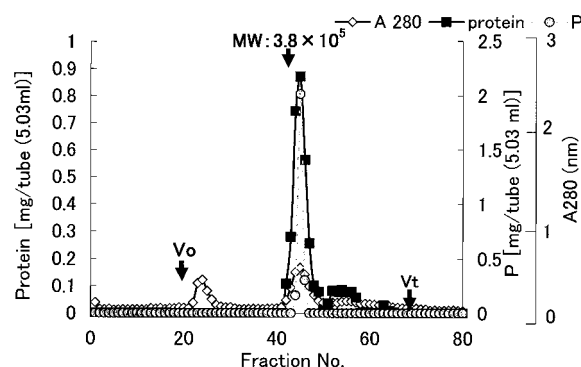


Fig. 2 Gel filtration of Japanese quinoa globulin (NQG) Crude globulin (5.9mg) was put on a Sepharose CL-6 B column. Chromatography was similarly done, as described in the legend of Fig. 1.

えられる。2つめの280nmの吸収ピークは色素結合法試薬にも反応することから、タンパク質によるものであり、その分子量はBQGが約34万、NQGが約38万であった。これらの数値はBrinegarらがキノア (Ancient Harvest 品種) から精製した11Sグロブリン (Chenopodin) の分子量 (32万) と同程度であった<sup>11)</sup>。さらに、BQGとNQGのゲルろ過において、タンパク質のピークとリン酸のピークとが一致していることから、キノアグロブリンはリンタンパク質であることが示唆された。ただし、タンパク質1gあたりのリン含量には差がみられ、BQG 5 mg (0.5%)、NQG 0.8mg (0.08%) であった。

### 2 キノアグロブリンのサブユニット構造

Fig. 3に、粗グロブリンおよびゲル濾過法で得た精製グロブリンのSDS-PAGEパターンを示す。ゲル濾過

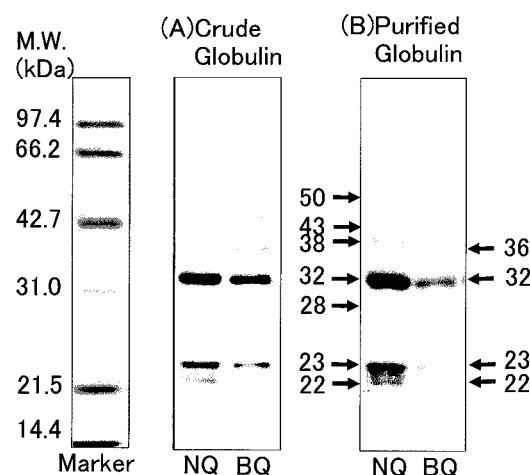


Fig. 3 Comparison of globulin subunits between Bolivian quinoa (BQ) and Japanese quinoa (NQ) on SDS-PAGE

(A), Crude globulin precipitated at pH 5.0; (B), Purified globulin by Sepharose CL-6 B gel chromatography.

法で精製したBQGは、22、23、32、36 kDaの4種のサブユニットから構成されていた。しかし、NQGはBQGと共通する22、23、32 kDa以外に、28、38、43、50 kDaの計7種類のサブユニットを有していた。

次に、BQGおよびNQGのそれぞれのサブユニットを分画するため、還元アルキル化を行い、クロマトフォーカシングで分画した。Fig. 4、5は、それぞれBQGおよびNQGの結果を示す。便宜上、みかけの等電点 6.0を境に、塩基性領域（フラクションIとII）と酸性領域（フラクションIIIとIV）に分けた。

フラクションI～IVについてSDS-PAGE分析を行った結果、BQG (Fig. 4)、NQG (Fig. 5) のいずれの場合も、フラクションIとIIに含まれるタンパク質 [塩基性サブユニット (basic subunit)] は、分子量が10～20万台であった。一方、フラクションIIIとIVに含まれるタンパク質 [酸性サブユニット (acidic subunit)] は、分子量が30万台のものが中心であった。これらの結果は、Brinegarらが得た結果<sup>11)</sup> を支持している。

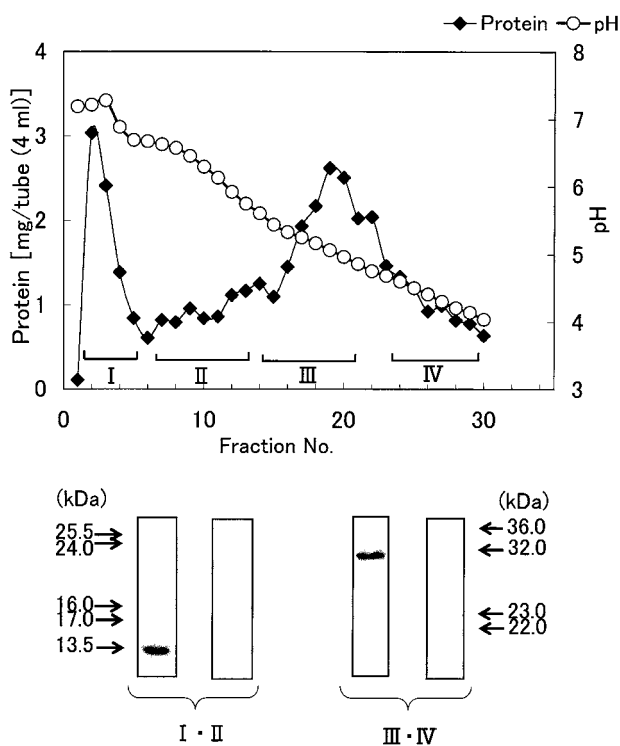


Fig. 4 Chromatofocusing of the carboxymethylated Bolivian quinoa globulin (BQG)

BQG (30-40 mg) was reduced and carboxymethylated with iodoacetic acid, as described in Materials and Methods. The carboxymethylated protein was put on a PBE 94 column (1 × 2 cm) and eluted with Polybuffer 74 (pH 4.6) containing 6 M urea. Fractions (4 ml each) were collected at a flow rate of 12 ml / h. After chromatofocusing, pH and protein content were measured. Fractions I-IV were collected and reduced with 2-mercaptoethanol for analysis on SDS-PAGE.

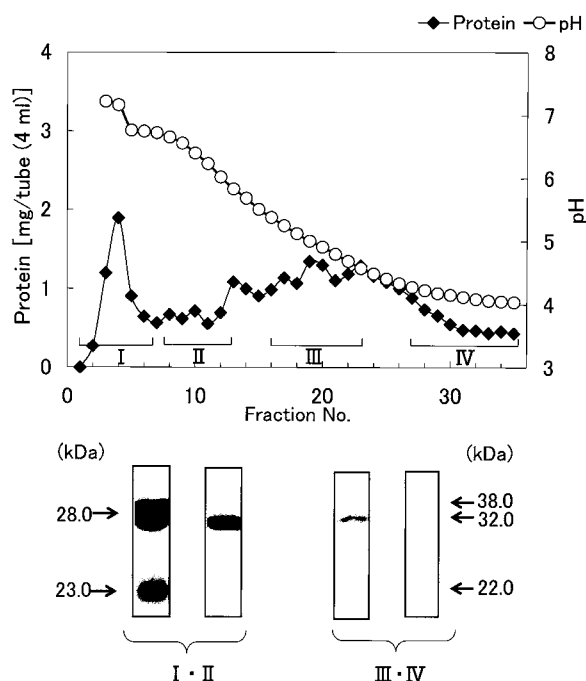


Fig. 5 Chromatofocusing of the carboxymethylated Japanese quinoa globulin (NQG)

NQG (30-40mg) was reduced and carboxymethylated with iodoacetic acid, as described in Materials and Methods. After chromatofocusing, fractions I-IV were analyzed on SDS-PAGE, as described in the legend of Fig. 4.

### 3 グロブリンの乳化活性と乳化安定性

Fig. 6 に、植物起源の異なる4種のグロブリンにおける乳化活性 (EA) を示す。NQGとBQGはタンパク質濃度0.1%以下では乳化活性を示さなかった。AGとSPIは、低濃度領域であっても、タンパク質濃度に比例してEAは増加した。0.4%の濃度においてはアマランスグロブリン (AG) が最も高い値を示し、分離大豆タンパク質 (SPI) がこれに続き、NQG、BQGはAGのEAの約半分であった。

4種のグロブリンの乳化安定性 (ES) を調べた結果、すべてほぼ同じような挙動を示した。すなわち、タンパク質濃度約0.2%まで濃度依存的に上昇した。0.2%以降ではほぼ横ばいになり、一定値を示した (Fig. 7)。以上より、キノアグロブリンのEAは低い、優れたESを持つことが示唆された。

### 4 グロブリンの表面疎水性

表面疎水性 (So) は、タンパク質1%あたりの蛍光強度 (任意の数値) で表される。従って横軸にタンパク質濃度、縦軸に蛍光強度 (Fluorescence) をプロットした場合、タンパク質のSoは、そのInitial Slopeに相当する。4種のグロブリンのSoは、NQG (47,600) が最も高く、

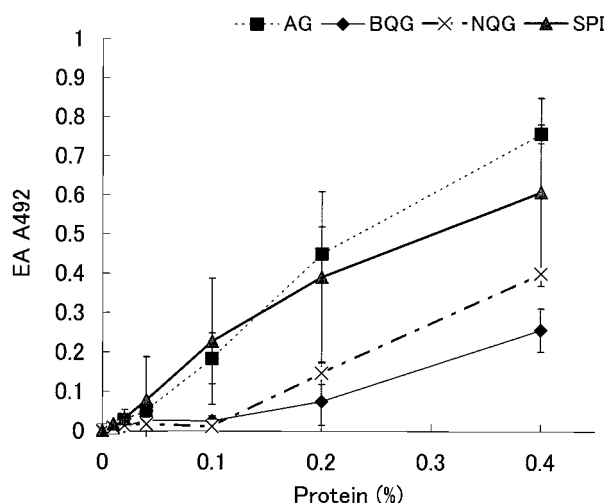


Fig. 6 Emulsifying activities (EA) of globulins

Each protein was dissolved in 10 mM citrate-phosphate buffer (pH7.5) containing 0.4 M NaCl. An emulsion was prepared by sonication with a ultrasonic homogenizer at room temperature for 40 sec with a mixture of protein solution (3 ml) and corn oil (1 ml). It was then diluted 1:200 with 1% SDS solution before measuring the turbidity at 492 nm. The samples of protein used in this experiment were Bolivian quinoa globulin (BQG), Japanese quinoa globulin (NQG), amaranth globulin (AG), soy protein isolate (SPI).

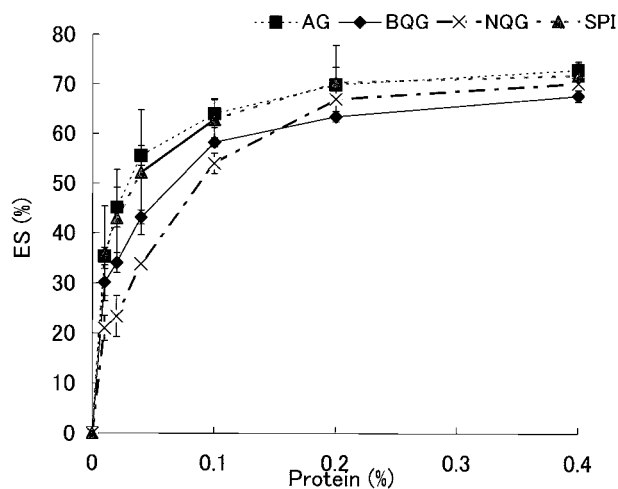


Fig. 7 Emulsion stabilities (ES) of globulins

After globulin was emulsified with corn oil by ultra-sonication, the emulsion was stood for 24 h at room temperature and calculated ES by the following equation:  $ES (\%) = [\text{Emulsion Volume (ml)} / \text{Total Volume (ml)}] \times 100$ .

続いてBQG (32,500)、AG (15,400)、SPI (11,000)の順となった (Fig. 8)。

#### IV. 考察

##### キノアグロブリンの物理化学的性質

キノア種子の貯蔵タンパク質であるグロブリンにおけ

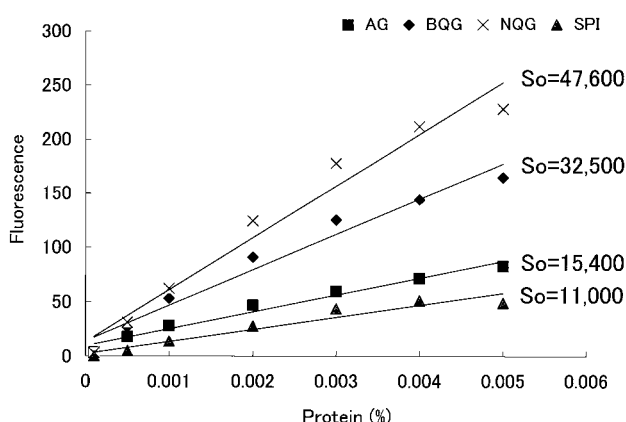


Fig. 8 Measurements of surface hydrophobicities (So) of globulins

Globulins (0-0.005%) were dissolved in 1.5 ml of 10mM citrate-phosphate buffer (pH7.5) and 1.5 ml of 0.16mM 1-anilino-8-naphthalenesulfonate (ANS) as a fluorescence probe was added. Fluorescence was measured at excitation (Ex) wavelength of 365 nm and emission (Em) wavelength of 460 nm, and at high sensitivity and ordinate scale of  $\times 16$ , using a Shimadzu RF-540 spectrophotometer. Protein So was calculated as the initial slope of curve plotted by fluorescence intensity vs protein concentration (1%).

る物理化学的性質については、Brinegarら<sup>11)</sup>の先駆的な報告がある。彼らが精製したグロブリンは分子量32万の11Sタイプであり、平均分子量35.5kDaの酸性サブユニットと平均分子量22.5kDaの塩基性サブユニットがそれぞれ6個ずつからなることが示唆されている。彼らが提唱した酸性および塩基性サブユニットの定義は、pH7.0で正に荷電しているタンパク質を塩基性サブユニット、負に荷電しているものを酸性サブユニットとし、それぞれを陰イオン交換カラムで分離している。

本研究で精製した、Altiplano typeのキノアのグロブリンの分子量は34万であり、サブユニットの構成もBrinegarら<sup>11)</sup>の結果と類似していた。さらに、クロマトフォーカシングで分画した酸性および塩基性サブユニットの分子量も彼らの結果と類似していた。しかし、Sea-level typeのキノアのグロブリンは、分子量(38万)と少し大きく、また構成するサブユニットの数も多く、明らかにAltiplano typeと異なる結果であった。

これらの違いの説明と解明には、遺伝子レベルあるいはタンパク質合成・修飾レベルでの解析を待たないと分からないが、グロブリンのSDS-PAGE法は少なくとも簡便な品種の同定に利用できるかもしれない。すなわち、Firbanksら<sup>16)</sup>は、キノアグロブリンの3種のポリペプチド(34.4, 35.6, 36.2 kDa)は少なくとも異なった2つの遺伝子座で読みとられると結論しており、キノアの生殖質(germplasm)の同定や分類の有用なマーカーとして使えるであろうと述べている。

### キノアグロブリンの機能性

Katoら<sup>17)</sup>は、種々の食品タンパク質についてSoとEAとの間に正の相関があることを報告している。そこで、4種のグロブリンについて、Soとタンパク質濃度0.4%でのEAとの関係をプロットすると、キノアグロブリンのSoは、AGやSPIよりも大きいにも関わらず、逆にEAは低い結果となった (Fig. 9)。

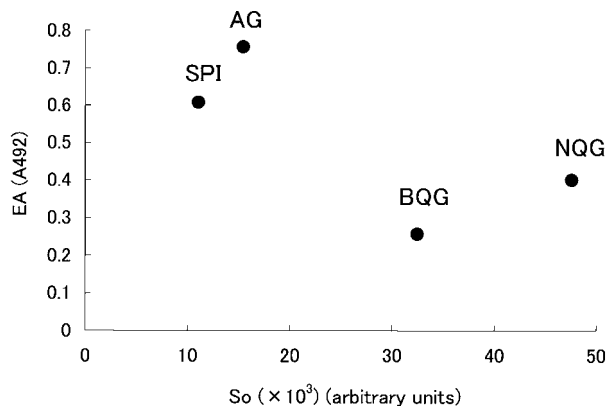


Fig. 9 Relationships between the emulsifying activity (EA) and surface hydrophobicity (So) of globulins

EA at the protein concentration of 0.4% and So values are quoted from Fig. 6 and Fig. 8, respectively.

これは上述の経験則<sup>17)</sup>に反する結果である。しかし、キノア同士で比較すると、BQGに比べてSoの大きいNQGは、EAも高いことがわかる。現時点では、これらの現象を説明するためのデータは得られていない。

いずれにしても、タンパク質の乳化特性は以下の4つの要因で決まるとされている<sup>18)</sup>。すなわち、(1)液層中で油滴を取り巻くための動きやすさ(溶解性)、(2)変性後の油滴表面への再配列のしやすさ(構造の柔軟性)、(3)再配列時に油滴との接触面に存在する疎水性の量(疎水性)、(4)油滴表面でタンパク質分子を支え、安定性を保つ堅い構造、である。優れた乳化性を示すためには、(1)と(3)、あるいは(2)と(4)のように相反する性質をバランスよく備えていることが必要である。

結論として、現段階では起源の異なる4種のグロブリン間で乳化性に優劣をつけることは無理がある。今後、さらに多種のグロブリンについて実験を行い、包括的に評価する必要がある。また、前述したような4つの要因を踏まえたうえで詳細な検討を行う必要がある。

### 謝辞

本研究は、平成16年度生活科学研究助成の一部を受けて行われた。この場を借りてお礼申し上げます。また、

キノア種子を提供して下さった大日本明治製糖(株)、山梨県総合農業試験場に感謝します。

### 引用文献

- (1) National Research Council, *Lost Crops of the Incas*. National Academy Press, Washington, DC., pp. 149-161 (1989).
- (2) Taylor, J. R. N. and Parker, M. L., Quinoa. In *Pseudocereals and Less Common Cereals*. Ed. by Belton, P. S. and Taylor. J. R. N., Springer, pp. 93-122, (2002).
- (3) Wood, R., *Quinoa, the Supergrain*, Japan Publications, Inc., (1989).
- (4) Varriano-Marston, E., and DeFrancisco, A., Ultrastructure of quinoa fruit (*Chenopodium quinoa* Willd.), *Food Microstruct.*, 3, 165-173 (1984).
- (5) Prego, I., Maldonado, S., and Otegui, M., Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. *Ann. Bot.*, 82, 481-488 (1989).
- (6) Koziol, M. J., Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), *J. Food. Comp. Anal.*, 5, 35-68 (1992).
- (7) Schlick, G. and Bubenheim, D. L., Quinoa: candidate crop for NASA's controlled ecological life support systems. In "Progress in new crops", ed. by Janick, J., ASHS Press, Arlington VA, pp. 632-640 (1996).
- (8) Fleming, J. E. and Galway, N. W., Quinoa (*Chenopodium quinoa*). In: *Cereals and Pseudocereals*. Ed. By Williams, J. T., Chapman & Hall, London, pp. 3-83 (1995).
- (9) 氏家 和広, 日本におけるキノアの栽培に関する研究, *雑穀研究*, No.18, 7-10 (2003).
- (10) 渡辺 克美, キノアの食品特性, *Foods Food Ingredients J. Jpn.*, 208, 13-17 (2003).
- (11) Brinegar, C. and Goundan, S., Isolation and characterization of chenopodin, the 11S seed storage protein of quinoa (*Chenopodium quinoa*). *J. Agric. Food Chem.*, 41, 182-185 (1993).
- (12) Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.*

- Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- (13) Brinegar, A. C., and Peterson, D. M., Separation and characterization of oat globulin polypeptides, *Arch. Biochem. Biophys.*, **219**, 71-79 (1982).
- (14) Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **221**, 680-685 (1970).
- (15) Konishi, Y. and Yoshimoto, N., Amaranth globulin as a heat-stable emulsifying agent. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 3327-3328 (1989).
- (16) Fairbanks, D. J., Burgener, K. W., Robinson, L. R., Andersen, W. R., Ballou, E. R., Electrophoretic characterization of quinoa seed proteins, *Plant Breed*, **104**, 190-195 (1990).
- (17) Kato, A. and Nakai, S., Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Biochim. Acta*, **624**, 13-20 (1983).
- (18) 山内文男、植物蛋白質の構造と機能特性、『食品ハイドロコロイドの科学』（西成勝好・矢野俊正編）、朝倉書店, pp.172-182 (1990).

---

## キノア種子グロブリンの物理化学的性質

菊田 千景、小西 洋太郎

**要旨：**キノアは南米アンデス原産の高栄養価の食糧源として注目されている。キノア種子は貯蔵タンパク質としてグロブリンを含む。本研究の目的は、生態型の異なる2種類のキノア種子からグロブリンを精製・単離し、物理化学的性質を調べた。

ボリビア産Altiplano タイプおよび日本産Sea-level タイプのキノア種子から、塩溶液でグロブリンを抽出し、pH 5で凝集沈殿させた。ゲルろ過法で求めたグロブリンの分子量はAltiplano タイプで34万、Sea-level タイプのものは38万であり、それぞれ0.5%、0.08%のリン酸を含むタンパク質であった。SDS-PAGEでAltiplano タイプは4つのサブユニット (22, 23, 32, 36 kDa) からなり、Sea-level タイプは7つのサブユニット (22, 23, 28, 32, 38, 43, 50 kDa) から構成されていた。これらのサブユニットは、カルボキシメチル化されたグロブリンをクロマトフォーカシングによって、分別することができた。キノアグロブリンは、表面疎水性が高いにも関わらず、乳化活性はアマランスグロブリンおよび大豆グロブリンの約1/2であった。

