

# SDS-PAGE 電気泳動法のギョウジャニンニク およびニンニク製品への応用

山本敬男 望月恵美子

Application of SDS-PAGE for the Protein Analysis of Allium Products

Takao YAMAMOTO and Emiko MOCHIZUKI

ねぎ属植物のうち、ニンニクやたまねぎは古代エジプト時代より食用として、また民間薬として常用されてきた。ニンニクの示す種々の薬理作用のうち、抗菌性成分については揮発性硫黄化合物のアリシンであることが、1944年 Cavallitoら<sup>1)</sup>によって報告された。その後、分析手段としてのガスクロマトグラフィーの発達とともに、ニンニク中の揮発性硫黄化合物の解明は急速に進められ、最近では、血小板凝集抑制作用<sup>2-4)</sup>、動脈硬化、がん予防効果もこれらの揮発性硫黄化合物が関与していることが明らかにされた<sup>5-6)</sup>。

一方ギョウジャニンニクは、ねぎ属植物には珍しく長楕円形の葉をもち、若い葉と地下の鱗茎が古くから山菜として食されてきた。県内には、ニンニクよりも稀少価値のあるギョウジャニンニクを栽培し、その葉茎製品を販売して地域おこしをはかろうとしているところもある。

ニンニクおよびその製品に対する関心は高く、今日、品質管理、販売上からも、これら製品の品質評価法および判別法の確立が求められている。

我々はこれまでに、遊離アミノ酸や、アリイン、アリシンといったニンニクに特有な成分に着目して、ギョウジャニンニクおよびニンニク製品の判別法を検討してきた<sup>7-9)</sup>。植物体を構成する蛋白の組成は、それぞれの植物に固有のものである。蛋白の定性分析法としての電気泳動法には、デンブングル電気泳動法、ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動法、薄層等電点電気泳動法、およびセルロースアセテート膜等電点電気泳動法などがあり、公定法として魚種判別などに用いられている<sup>10)</sup>。また、Laemmliの不連続緩衝液<sup>11)</sup>によるドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) は、難溶性蛋白の分離に汎用されているが、この SDS-PAGE 法がギョウジャニンニクおよびニンニク製品の品質評価および判別に適用可能であるかどうか検討したので報告する。なお、分析方

法の詳細については、AOACに報告した<sup>12)</sup>。

## 実験方法

### 1. 装置および器具

- (1) ホモジナイザー：ヤマト科学(株) ウルトラディスペーサー LK-21
- (2) pH計：堀場製作所(株) F8E型
- (3) 遠心分離機：日立工機(株) PR-20
- (4) 電気泳動装置：(株)アトー製電源装置 Crosspower 51000 に(株)マリソル製マイクロスラブ電気泳動装置 KS-8010 を接続し使用した。

### 2. 試料および試薬

- (1) 試料：ギョウジャニンニク (*Allium victorialis* L.) およびニンニク (*A. sativum* L.)、対照試料としてのたまねぎ (*A. cepa* L.)、らっきょう (*A. chinense* G. don) は、生産農家 (山梨県、下部町、中富町) より入手した。製品は、製造元、薬店、スーパーマーケット等小売店より入手した。
- (2) 試薬：尿素、NaCl、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、グリセロール、2-メルカプトエタノール、グリシン、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Tris)、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン-HCl (Tris-HCl)、メタノール、酢酸 (和光純薬(株))。
- (3) 市販ポリアクリルアミドゲルプレート：  
4-20% グラジエントゲルプレート  
84 (W) x90 (H) x1.0mm (第一化学薬品(株))
- (4) 分子量マーカー：第一化学薬品(株)
- (5) 泳動用サンプル調製液：グリセロール/10% SDS / 2-メルカプトエタノール/0.13M Tris-HCl (2.5 : 2 : 1 : 4.5 BTB 数滴)

- (6) 泳動用緩衝液 (pH 8.5) : Tris 6.0g, グリシン 28.8g, SDS 1.0g を 1 L の水に溶かした。
- (7) 銀染色液 : 2 D-銀染色試薬・II「第一」キット (第一化学薬品 (株))。染色液は、添付された説明書に従って調製した<sup>13)</sup>。
- (8) ろ紙 : 東洋ろ紙 No.5C (アドバンテック東洋)

### 3. 試料溶液の調製

ギョウジャニンニク, ニンニク, らっきょうは 1~3g を, たまねぎは, 8g を細切し, 6M尿素 5ml を加え, 氷冷下ホモジナイズした後, 遠心分離 (4℃, 12,000 rpm, 10 分間) し, 上清を試料溶液とした。粉末製品は, 0.5~2g に 6M尿素 5ml を加えホモジナイズ後, 遠心分離 (4℃, 12,000 rpm, 10 分間) し, 上清を試料溶液とした。錠剤製品は, 乳鉢ですりつぶして粉末とし, 粉末製品と同様に操作した。ギョウジャニンニク製品の味噌漬, たまり漬も, ニンニク粉末製品と同様に操作した。ギョウジャニンニク清涼飲料水は, そのまま使用した。

### 4. 電気泳動

調製した試料溶液 100 μl に, 泳動用サンプル調製液 100 μl を加えてふりませ, 100℃, 2 分間加熱し, 電気泳動用試料溶液とした。

ゲルプレートに電気泳動装置にセットし, 泳動用緩衝液を液槽に満たした後, 電気泳動用試料溶液 5 μl, 分子量マーカー溶液 5 μl をゲルのウェルに負荷した。泳動は室温 25℃, 20 mA の定電流で 2 時間行った。染色は, ゲルをゲルカセットから取り外し, 銀染色用固定液に浸し, 以下, 銀染色キットに添付されていた染色操作法<sup>13)</sup>に従った。

## 結果および考察

### 1. ねぎ属植物の蛋白パターン

ねぎ属植物のなかでもとりわけ, たまねぎ, らっきょうは, 頻りに食される植物である。ギョウジャニンニクは, 前二者に比較すると知名度は低いが, 山菜として利用されており, 近年では, 栽培化も試みられるなど消費量も拡大している。Akashi ら<sup>14)</sup>によると, ギョウジャニンニクの主要な揮発性香気成分は, メチルアリルジスルフィド, ジアリルジスルフィド, メチルアリルトリスルフィドと報告されており, ニンニクの香気成分と重複している成分も多いため, 臭いはニンニクと酷似している。電気泳動像は, それぞれの植物に特徴的な蛋白パターンが示された (図 1)。ニンニクおよびギョウジャニンニク両者に共通な特徴的なバンドが 5 本 (b, e, d, f, および g) 観察された。また, たまねぎ, らっきょう, ギョウジャニンニクに共通するバンドは 3 本 (a,

c, h) 観察され, 蛋白パターンの違いを利用して, ねぎ属植物を判別できる可能性が示された。

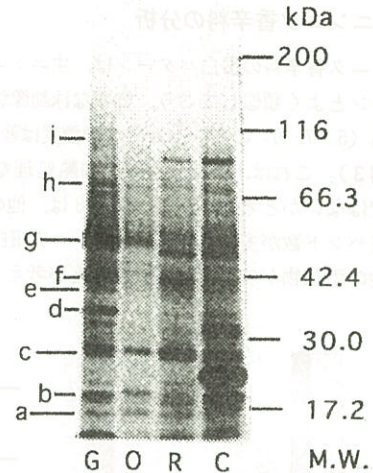


図 1 ねぎ属植物の SDS-PAGE パターン  
G : ニンニク, O : たまねぎ, R : らっきょう,  
C : ギョウジャニンニク, M.W. : 分子量  
(試料は 1% SDS で抽出。)

### 2. ギョウジャニンニク製品の分析

ギョウジャニンニクの部位別および, ギョウジャニンニク製品の SDS-PAGE パターンを図 2 に示した。葉, 茎, およびりん茎の蛋白パターンは, わずかに異なっていた。味噌漬けとたまり漬けの 2 製品は, 主に葉と茎を用いていると考えられた。清涼飲料水 2 製品は, ギョウジャニンニクの水抽出エキスを主原料としているため, 蛋白パターンはほとんど検出されなかった。従って, こ

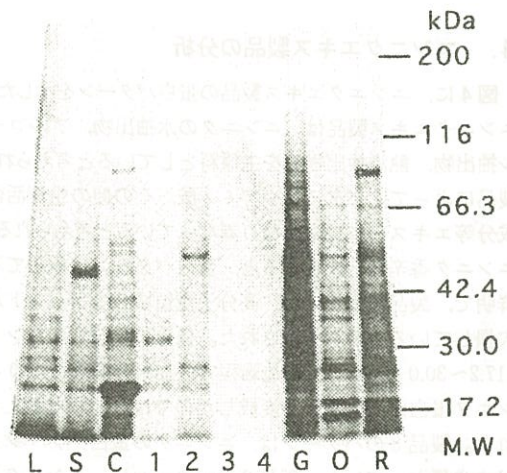


図 2 ギョウジャニンニクとギョウジャニンニク製品の SDS-PAGE パターン

L : 葉, S : 茎, C : りん茎, 1 : たまり漬け, 2 : 味噌漬け,  
3, 4 : 清涼飲料水, G : ニンニク, O : たまねぎ, R : らっきょう,  
M.W. : 分子量 (試料は 6M尿素で抽出。)



のような製品は判別法として、他の何らかの方法を適用する必要があると考えられる。

### 3. ニンニク香辛料の分析

ニンニク香辛料の蛋白パターンは、生ニンニクの蛋白パターンとよく類似しており、鮮明な泳動像が得られた。3製品(5, 7, 9)のバンドd, gの濃度は著しく薄かった(図3)。これは、製造工程中の加熱処理などによる影響ではないかと考えられた。製品3は、他の製品と比較してバンド数が多いことから、ニンニク蛋白に重ねて、蛋白性の添加物が加えられていることが考えられた。

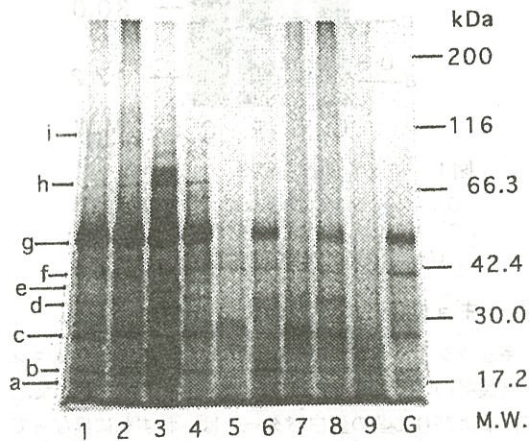


図3 ニンニク香辛料のSDS-PAGEパターン

1:乾燥スライス, 2:乾燥ミンス, 3:粉末, 4:ピューレ,  
5,6,8,9:すりおろし, 7:スライス, G:ニンニク,  
M.W.:分子量(試料は1% SDSで抽出。)

### 4. ニンニクエキス製品の分析

図4に、ニンニクエキス製品の蛋白パターンを示した。ニンニクエキス製品は、ニンニクの水抽出物、アルコール抽出物、熱湯抽出物等を主原料としていと考えられ、製品によって、ビタミンやアミノ酸、その他の生理活性成分等エキスの成分もかなり異なっていると考えられる。ニンニク香辛料と比較すると、蛋白パターンは概して不鮮明で、製品によっては、高分子量領域の蛋白バンドが欠損しているものも観察された。低分子量領域のバンド(17.2~30.0 kDa)は、製造過程で、加水分解等によりニンニク蛋白が低分子化、変成したのではないかと考えられた。製品8のパターンは、ニンニクの蛋白パターンとはやや異なっていた。製品9のパターンは、ニンニクに比較的良く類似しており、他のエキス製品と比較すると、植物体の蛋白がより多く残存していることが窺われた。

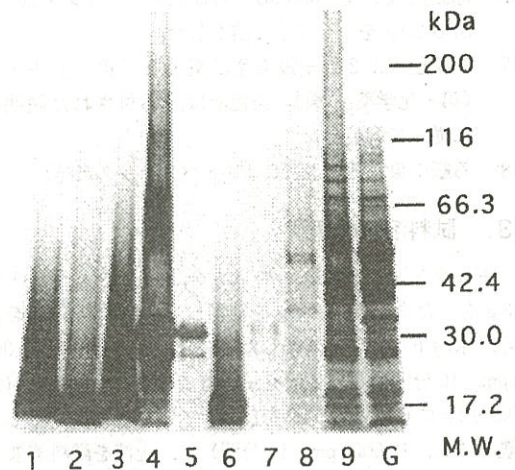


図4 ニンニクエキス製品のSDS-PAGEパターン

1:顆粒, 2:液体, 3:粉末, 錠剤, 5,8:無臭粉末,  
6,9:無臭錠剤, 7:無臭液体, G:ニンニク,  
M.W.:分子量(試料は1% SDSで抽出。)

### 5. その他のニンニク製品の分析

図5に、その他のニンニク製品の蛋白パターンを示した。製品2のように、全くバンドが見られない製品もいくつかあったが、ニンニクエキス製品と比較すると、総じて蛋白パターンは明瞭であり判別しやすかった。なお、熱によるニンニク蛋白パターンの消失について検討したところ、ニンニク蛋白パターンは70℃, 15分間以上の加熱で全く消失した。また、細切したニンニクをエタノールでホモジナイズ(3分間)したところ、エタノール濃度40%以上でニンニク蛋白は変成され、蛋白パターンは全く見られなかった。このことから、熱処理等の加工により蛋白が変成し、蛋白パターンが消失することが示唆された。また、製品に含有されるアルコールなどによっても蛋白は変成を受けることがわかった。

無臭ニンニク製品6, 7の蛋白パターンは、ニンニクの蛋白パターンと類似していたが、ニンニクのe, fのバンドが欠損していた。無臭ニンニク製品8, 9のパターンは、ニンニクの蛋白パターンとはやや異なっており、ニンニク類似植物が使用されたのではないかと考えられた。

ニンニクは、その特有な臭気のために忌避されることが多く、無臭、低臭化を謳ったニンニク製品が販売されている。無臭ニンニクとしては、揮発性成分量が少ない天然のものと、通常ニンニクを処理して低臭化されたものがあり、後者はさらに酵素活性を低減化したものと、基質を除去あるいは分解したものに分類される<sup>15)</sup>。無臭のねぎ属植物については、現在吉川らにより調査が進められている<sup>16)</sup>。また、購入したニンニク製品の中で、オ

イルカプセル状のニンニク抽出油製品、卵黄などの蛋白、また、濃色の着色料といった添加物を含有する製品は、SDS-PAGEによる分析は不可能であった。

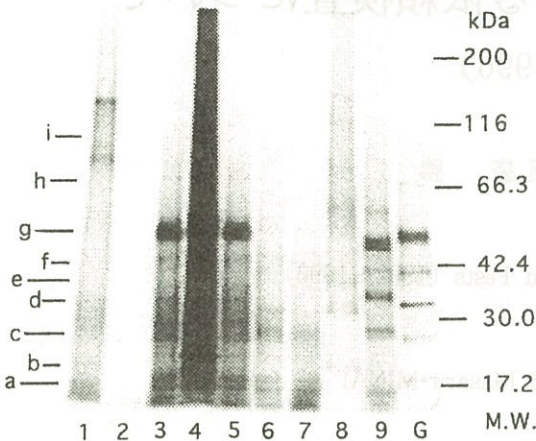


図5 その他のニンニク製品のSDS-PAGEパターン  
 1, 3, 4: 錠剤, 2: 粉末, 5, 6, 8, 9: 無臭錠剤,  
 7: 無臭粉末, G: ニンニク, M.W.: 分子量  
 (試料は1% SDSで抽出。)

以上、SDS-PAGE電気泳動法をギョウジャニンニクおよびニンニク製品の蛋白分析に応用し、品質評価法および判別法としての可能性を検討した。それぞれのねぎ属植物は水を抽出溶媒として、蛋白を抽出し分析を行ったところ、それぞれの植物に特徴的な蛋白パターンを得ることができた。ニンニク製品の分析には、尿素、SDSなどの蛋白可溶化剤を使用して分析したところ、ニンニク香辛料といったニンニクそのものを多量に使用した製品では、特徴的なニンニクの蛋白パターンが明瞭に観察された。ニンニクエキス製品の分析結果からは、製品によっては、低分子量の蛋白のみを含むものが見られ、製造加工過程においてニンニク蛋白が変成されたことが示唆され、製造工程等における品質管理に適用可能ではないかと考えられた。ギョウジャニンニク製品および、その他のニンニク製品の蛋白パターンからは、香辛料製品

の蛋白パターンほど鮮明ではないが、それぞれの植物に類似した蛋白パターンが得られた試料もいくつかあり、製品の品質評価あるいは判別をする上でSDS-PAGE法が有用であることが示された。また、全く蛋白パターンが得られなかった製品については、臭いを指標とする方法等、さらに検討を重ねる必要があると考える。

## 文 献

- 1) Cavallito, C. J. & Baily, J. H. : J. Am. Chem. Soc., **66**, 1950 (1944)
- 2) Ariga, T., Oshiba, S. & Tamada, T. : Lancet, **1**, 150~151 (1981)
- 3) Block, E., et al. : J. Am. Chem. Soc., **106**, 8295~8296 (1984)
- 4) Lawson, L. D., Ransom, D. K. & Hughes, B. G. : Thromb. Res., **65**, 141~156 (1992)
- 5) Dausch, J. D. & Nixon, D. W. : Prev. Medicine, **19**, 346~361 (1990)
- 6) Dorant, E., et al. : Br. J. Cancer, **67**, 424~429 (1993)
- 7) 望月恵美子ら : 山梨衛公研年報, **38**, 12~19 (1994)
- 8) 山本敬男ら : 山梨衛公研年報, **39**, 11~14 (1995)
- 9) 望月恵美子, 山本敬男, 小宮山美弘 : 山梨衛公研報, **39**, 15~20 (1995)
- 10) Official Methods of Analysis 16th Ed. : AOAC INTERNATIONAL, Arlington, VA, secs **35. 1. 40~35. 1. 43** (1995)
- 11) Laemmli, U. K. : Nature, **227**, 680~685 (1970)
- 12) Mochizuki, E., et al. : AOAC, **79**, 1466~1470 (1996)
- 13) 電気泳動用2D-銀染色試薬・II「第一」使用説明書, (1989), 第一化学薬品(株)
- 14) Akashi, K., Nishimura, H. & Mizutani, J. : Agric. Biol. Chem., **39**, 1507~1508 (1975)
- 15) 熊谷日登美ら : 日本農芸化学会誌, **67**, 353 (1993)
- 16) 吉川雅清ら : 日本香辛料研究会講演要旨集, **9**, 14 (1994)