

## クロロホルム-メタノール混合溶媒に溶解する小麦グリアジンの性質

団 野 源 一\*

大阪青山大学健康科学部健康栄養学科<sup>1)</sup>

### Properties of gliadin in chloroform-methanol extracts of wheat flour

Genichi DANNO

Department of Health and Nutrition, Faculty of Helth Science, Osaka Aoyama University

**Summary** Proteins from wheat flour were extracted with a chloroform-methanol mixture, 70% ethanol, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 1% SDS containing mercaptoethanol sequentially.. About 29% of the total amount of flour protein was extracted with the chloroform-methanol (2:1).mixture. The proteins in the extract were confirmed to be mainly gliadin by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. When freeze-dried gliadin was suspended in the chloroform-methanol mixture, about 63% of the gliadin was dissolved in this solvent. High hydrophobicity of gliadin suggests that this property may contribute to the bread-making properties of flour.

**Key word :** gliadin, wheat protein, chloroform-methanol

グリアジン, 小麦タンパク質, クロロホルム-メタノール混合溶媒

### 緒 言

クロロホルム-メタノール混液は動物組織の脂質抽出剤として用いられる溶媒である。小麦粉中にクロロホルム-メタノール (2:1) に溶解する疎水性の高いタンパク質が存在することが報告されている。小麦粉タンパク質の約 1% に相当する低分子のタンパク質でプロテオリピドであるとされてきた。その後、これらのタンパク質は CM タンパク質という名称で呼ばれ、CM-1、CM-2、CM-3 の性質について報告されている<sup>1-3)</sup>。N-末端部のアミノ酸配列の結果から、CM-1、CM-2 とトリブシン/ $\alpha$ -アミラーゼ・インヒビターとの間にホモロジーのあることが報告されている<sup>4)</sup>。デュラム小麦のグルテニン画分から分離された DSG-1、DSG-2 (durum wheat sulfur-rich glutenin) は、分子量、アミノ酸組成、cDNA クローンにおいて CM タンパク質 (CM-1、CM-2) との類似性が報告されている<sup>5-7)</sup>。CM タンパク質、DSG はいずれもアルブミン様のアミノ酸組成を持ち分子量 11,000 から 17,000 の低分子タンパク質である。今回、小麦粉の主要タンパク質であるグリアジンが、クロロホルム-メタノール (2:1) 混合溶媒に溶解することを見出したので報告する。

### 実験方法

#### 1. 小麦粉

カナダ・ウエスタンレッド・スプリング小麦 (Columbus) のテストミル粉 (60% extraction) を n-ブタノールで数回抽出、続いて n-ヘキサンで洗浄した後風乾して調製したものを脱脂小麦粉として本実験に用いた。クロロホルム (特級試薬)、メタノール (特級試薬)、ラウリル硫酸ナトリウム (SDS、99%) は、ナカライテスク (株) より購入した。

#### 2. タンパク質の抽出

共栓ガラス製遠心管 (50 ml 容) を用いて、クロロホルム-メタノール混液 (2:1、v/v) 30 ml に脱脂小麦粉 1g を懸濁し、室温で時々振とうして 2 時間タンパク質を抽出した。3000 rpm で遠心分離し、上澄液をスポイトで集めた。残渣にクロロホルム-メタノール混液を加え同様に処理して上澄液を得た。上澄液をまとめ、ろ紙 (東洋ろ紙 5C) でろ過したものをクロロホルム-メタノール可溶性画分 (Fraction A) とした。(Fig. 1 は遠心管 2 本をまとめたものとして記載している)。抽出残渣から、70% エタノール、1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、ついで

\* E-mail: g-danno@osaka-aoyama.ac.jp

1) 〒562-8580 箕面市新稲 2-11-1

1%メルカプトエタノールを含む 1%SDS を用いて同様の操作で順次タンパク質を抽出した。

### 3. グリアジンの調製

脱脂小麦粉から、Jones らの方法<sup>8)</sup>に従ってグルテンを分離した。グリアジンをグルテンから 70%エタノール (v/v) で抽出した。抽出液の pH を 6.5 に調整し、冷蔵庫に一夜保つことにより、共雑物を沈殿除去した。上澄み液を 0.01 M 酢酸に対して透析し、パーバポレーション法<sup>9)</sup>により濃縮した後、凍結乾燥した。

### 4. たんぱく質の定量

たんぱく質は、マイクロケルダール法で定量した (N×5.7)。

### 5. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は、10%ポリアクリルアミドゲル (0.75 mm 厚スラブ) を使用し、Laemmli の不連続緩衝液系<sup>10)</sup>を用いて行った。ゲルは、0.04%コマジー・ブリリアント・ブルー R250 (10%三塩化酢酸に溶解) に、35°C 20 時間浸漬して染色した。7%酢酸で脱染色したゲルを 565 nm

でスキャンして泳動パターンを記録した。

## 実験結果及び考察

### 1. クロロホルム-メタノール混液による小麦粉タンパク質の抽出

Fig. 1 及び Table 1 に小麦粉からタンパク質の溶媒による分別抽出の結果を、Fig. 2 に抽出タンパク質の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) の泳動結果を示している。小麦粉タンパク質の 29%がクロロホルム-メタノール (2:1) によって抽出された (Fig. 1 Fraction A)。次の 70%エタノールによる抽出で 22%のタンパク質が抽出された (Fraction B)。70%エタノールに可溶性タンパク質はグリアジンと分類されているので、Fraction B はグリアジンと見なすことができる。Fig. 2 a 及び b の泳動結果の示すように、Fraction A の泳動パターンは Fraction B と類似している。このことから、クロロホルム-メタノールにより抽出されたタンパク質はグリアジンであることを示唆している。1%SDS 抽出画分 (Fraction C) は、泳動パターンからアルブミン、グロブリン及び可溶性のグルテニンと推察され、グリアジンはほとんど

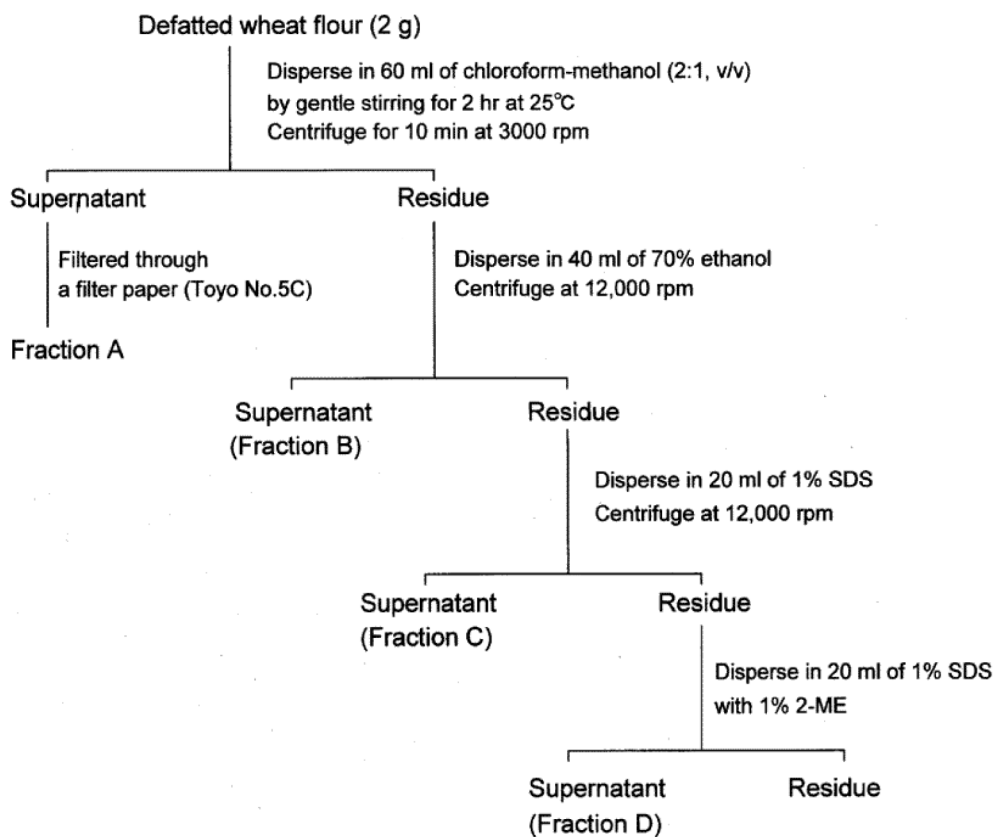


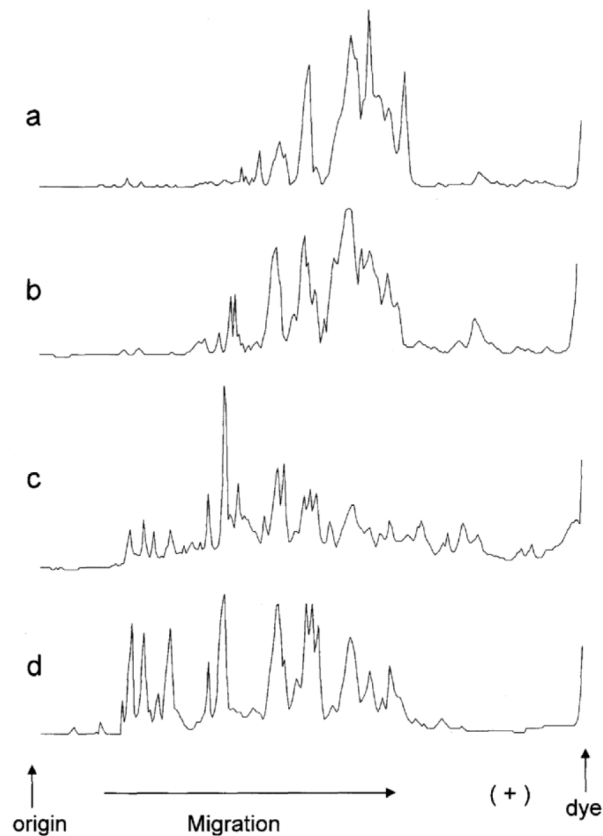
Fig. 1 Summary of extraction procedure from wheat flour.

含まれていないことが示された。1%メルカプトエタノールを含む1%SDS抽出画分 (Fraction D) の泳動パターン (Fig. 2 d) はグルテニンのサブユニットパターン<sup>11)</sup>と一致し、グルテニンを含む画分であることを示している。

**Table 1** Percentage of nitrogen fractionated from wheat flour.

Fraction	Yield (%)
Wheat flour	(100)
Fraction A	28.9
Fraction B	23.6
Fraction C	25.9
Fraction D	21.8

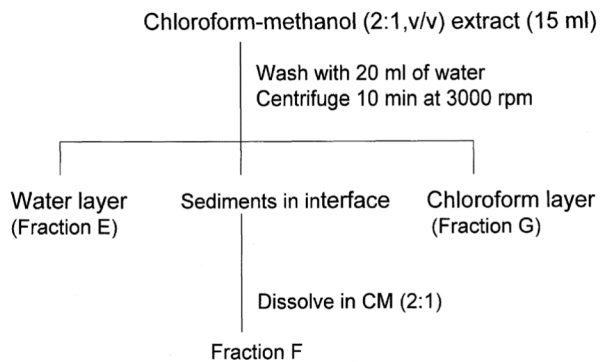
Fraction A, B, C and D correspond to fraction in Fig. 1.



**Fig. 2** SDS-PAGE patterns of the extracted proteins. a: Fraction A, b: Fraction B, c: Fraction C, d: Fraction D

**2. クロロホルム-メタノール可溶タンパク質の溶解性**

クロロホルム-メタノール抽出液に、等量の水を加え振とうして後遠心分離した。水層とクロロホルム層の界面に凝集したタンパク質の層が認められた。界面に凝集したタンパク質は、クロロホルム-メタノール (2:1) を加えると速やかに溶解し、透明な溶液となった (Fraction F)。水層 (Fraction E) に31%、クロロホルム層 (Fraction G) に12%、界面の凝縮物に54%のタンパク質が分配された (Fig. 3、Table 2)。これら画分のSDS-PAGE泳動パターンを Fig. 4 に示す。クロロホルム層 (Fraction G) と Fraction F はまったく同一の泳動パターンを示したので、両画分のタンパク質はほぼ同じで、クロロホルムに対する溶解度があまり高くないため界面に沈殿したものと考えられる。また、両タンパク質の泳動パターンはクロロホルム-メタノール抽出液の泳動パターン (Fig. 4 a) と類似している。他方、水層タンパク質の泳動パターン (Fig. 4 c) は、Fraction A の泳動パターン (Fig. 4 a) と異なることが認められた。

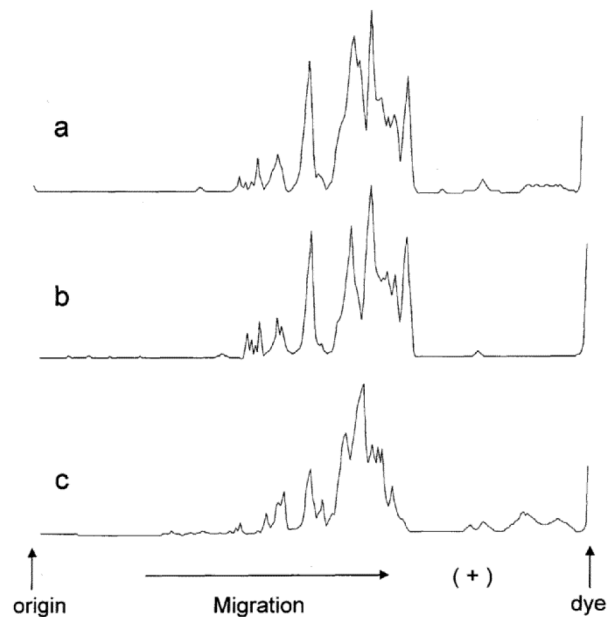


**Fig. 3** Summary of fractionation of chloroform-methanol (2:1) soluble proteins from wheat flour.

**Table 2** Percentage of nitrogen fractionated from chloroform-methanol extract

Fraction	Yield (%)
Chloroform-methanol extract	(100)
Fraction E	31
Fraction F	54
Fraction G	12

Fraction E, F and G correspond to fractions in Fig. 3.



**Fig. 4** SDS-PAGE patterns of the fractions from the chloroform-methanol (2:1) soluble proteins.  
a: Fraction A, b: Fraction F or G, c: Fraction E

### 3. クロロホルム-メタノール混液によるグリアジンの溶解性

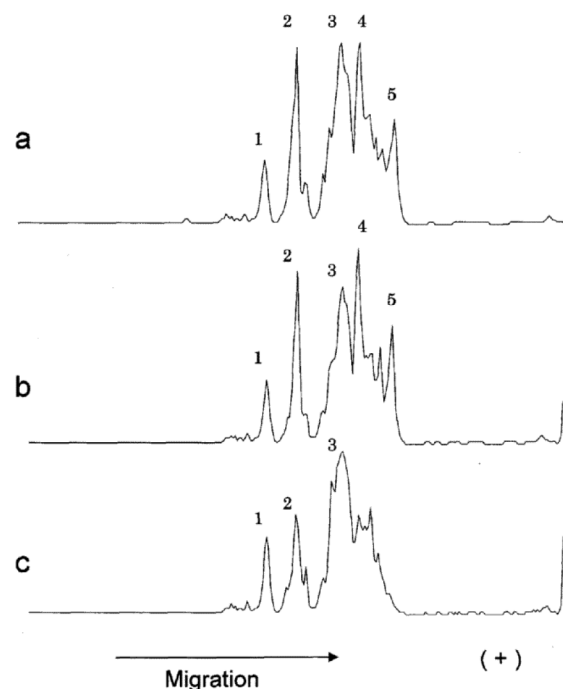
凍結乾燥したグリアジン標品を、比率を異にしたクロロホルム-メタノール混液に懸濁してグリアジンの溶解性を調べた。Table 3 に示すように、クロロホルム：メタノール比 1 : 2 では 25% が溶解するに過ぎないが、1 : 1 では 66%、2 : 1 では 63% が溶解した。クロロホルム-メタノール (2 : 1) 混液に可溶及び不溶グルテニンの泳動パターンを Fig. 5 に示す。クロロホルム-メタノール (2 : 1) に溶解する画分の泳動パターンはグリアジン標品の泳動パターンと一致し、グリアジン標品に認められるすべてのピークが含まれている。他方、この溶媒に不溶な画分にはピーク 2、ピーク 4 及びピーク 5 の消失が認められた。

グリアジンは、小麦粉タンパク質の約 50% を占める主要タンパク質で、グルテニンと共にグルテン形成の本体となり、小麦粉の製パン製等の加工適性と関わりが深い。一方、CM タンパク質は、アミノ酸組成から分子量 11,000 から 17,000 のアルブミンに分類されている。小麦粉の主要タンパク質であるグリアジンは、70% エタノールに溶解する疎水性の高いタンパク質であるが、グリアジンの一部がクロロホルム-メタノールに可溶であるというより強い疎水性を示した。グリアジンの強い疎水性が小麦粉タンパク質の特性特にグルテン形成能に関わっているものと推察される。

**Table 3** Solubility of gliadin in chloroform/methanol mixture.

Chloroform : methanol	Soluble fraction
1 : 2	25%
1 : 1	66
2 : 1	63

Gliadin (50 mg) was suspended in 30 ml of chloroform-methanol mixture at 20°C for 1 hour, and centrifuged.



**Fig. 5** SDS-PAGE patterns of the soluble and insoluble gliadin in chloroform-methanol (2:1) mixture.  
a: gliadin, b: chloroform-methanol (2:1) soluble gliadin, c: chloroform-methanol (2:1) insoluble gliadin

文 献

- 1) Redman, D. G. and Ewart, J. A. D., Characterisation of three wheat proteins found in chloroform-methanol extracts of flour, *J. Sci Fd Agric.*, 1973, 24, 629-636.
- 2) Rodoriguez-Loperena, M. A., Aragoncillo, C., Carbonero, P. and Garcia-Olmedo, F., Heterogeneity of wheat endosperm proteolipids (CM proteins), *Phytochemistry*, 1975, 14, 1219-1223.
- 3) Salcedo, G., Rodriguez-Loperena, M. A. and Aragoncillo, C., Relationships among low MW hydrophobic proteins from wheat endosperm, *Phytochemistry*, 1978, 17, 1491-1494.
- 4) Barber, D., Sancheze-Moner, R., Garcia-Olmedo, F., Salcedo, G. and Mendez, E., Evolutionary implications of sequential homologies among members of the trypsin /  $\alpha$ -amylase inhibitor family (CM-proteins) in wheat and barley, *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, 873, 147-151.
- 5) Kobrehel, K., Reymond, C. and Alary, R., Low molecular weight durum wheat glutenin fractions rich in sulfhydryl plus disulfide groups, *Cereal Chem.*, 1988, 65, 65-691.
- 6) Gautier, M. -F., Alary, R., Kobrehel, K. and Joudrier, P., Chloroform/ Methanol-soluble proteins are the main components of *Triticum durum* sulfur-rich glutenins fractions, *Cereal Chem.*, 1989, 66, 535.
- 7) Kobrehel, K., Bois, J. and Falmet Y., A comparative analysis of the sulfur-rich proteins of durum and bread wheat – their possible functional properties, *Cereal Chem.*, 1991, 68, 1-6.
- 8) Jones, R. W., Babcock, G. E. and Senti, R. R., Electrophoresis and fractionation of wheat gluten, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, 84, 363-376.
- 9) 岩永貞昭, 山下仁平, 佐野 朗, 笹川 滋, タンパク質の抽出, 溶解度を利用した分別法: 生化学実験講座 1, タンパク質の化学 I – 分離生成 –, 日本生化学会編, 東京化学同人, 1976, p11-98.
- 10) Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 1970, 227, 684.
- 11) Danno, G., Extraction of unreduced glutenin from wheat flour with sodium dodecyl sulfate, *Cereal Chem.*, 1981, 58, 311-313.