

## ゲルろ過クロマトグラフィーによって認められる 低分子量グリアジンの解離・会合

団 野 源 一 \*

大阪青山大学健康科学部健康栄養学科

### Association of low molecular weight gliadins detected by gel filtration chromatography

Genichi DANNO

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

**Summary** Whole gliadins were separated on a Sephadex G-100 column with 0.1 M acetic acid or 0.01 M aluminum lactate buffer (pH 3.1) as an elution solvent. When a sample of about 95 mg protein was loaded on the column and eluted with 0.1 M acetic acid, the fraction eluted at the void volume of the column was shown to be high molecular weight gliadin by analysis of their electrophoretic patterns on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel. The main peak eluted at the near-column volume was low molecular weight gliadins ( $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\omega$ -gliadins, MW about 30,000). A similar elution profile had been reported by Hebner and Wall. In contrast, when 0.01 M aluminum lactate buffer (pH 3.1) was used as an elution solvent, the main peak was eluted at the position of the molecular weight of about 60,000. From these results, we consider that the low molecular weight gliadins associate to form dimers in 0.01 M aluminum lactate buffer (pH 3.1).

## 緒 論

グリアジンは、70%エタノール可溶性の小麦タンパク質である。小麦粉に水を加えて混捏すると、小麦粉中のグリアジンとグルテニンが相互作用して粘弾性を示すグルテンを形成する。グルテンの示す性質のうち、その粘性の部分にグリアジンが寄与していることが知られている<sup>1,2)</sup>。

グリアジンは、70%エタノールに溶解する小麦粉のたんぱく質であり、分子量やアミノ酸組成の似かよった多種類のたんぱく質の混合物である。電気泳動における移動度にもとづいて、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\omega$ -グリアジンに分類されている<sup>3,4)</sup>。グリアジンは、セファデックス G-100 カラムを用いたゲルろ過法で3つのグループに分けられている<sup>5,6)</sup>。分子量約 30,000 の低分子量グリアジン ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -グリアジン) と分

子量約 100,000 の高分子量グリアジン及びその分子量約 70,000 の $\omega$ -グリアジンである。 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\omega$ -グリアジンは何れも一本のペプチド鎖からなるたんぱく質である。高分子量グリアジンは複数のペプチド鎖が鎖間ジスルフィド結合 (S-S 結合) で連結したたんぱく質である<sup>7)</sup>。本研究では、セファデックス G-100 カラムによるグリアジンのゲルろ過クロマトグラフィーの結果が、用いた溶媒によって著しく変化することから、低分子量グリアジンの会合を見出したので報告する。

\*E-mail: g-danno@osaka-aoyama.ac.jp  
〒562-8580 箕面市新稲2-11-1

## 実験方法

### 1. 試料

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。酢酸 (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。乳酸アルミニウム (一級試薬) は和光純薬から購入した。

### 2. 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。グルテンを 30 倍量の 70% エタノール (v/v) に分散し、数時間攪拌してグリアジンを抽出した。遠心分離法により不溶物を除去して得たエタノール抽出液に 1 M 水酸化ナトリウムを加えて pH を 6.5 に調整したのち、冷蔵庫に一夜放置し、生じた沈殿物を遠心分離法により除去した。上澄み液をヴィスキングチューブ (透析用セルロースチューブ) に入れ、0.01 M 酢酸に対して透析して含まれているエタノールを除去した透析内液を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。

### 3. ゲルろ過クロマトグラフィー

ゲルろ過クロマトグラフィーは、0.1 M 酢酸または 0.01 M 乳酸アルミニウム緩衝液 (pH 3.1) の二種類の溶出用溶媒を用いて行った。セファデックス G-100 カラム (ゲルサイズ 2.6 × 48 cm) を溶出用溶媒で平衡化した。溶出用溶媒に溶解した試料グリアジンの 8 ml (総たんぱく質 15 ~ 100 mg) をカラムに注入した。流速は 20 ml/hr となるようにペリスタポンプで制御し、溶出液はフローセルを用いた連続吸収記録計をもちいて 280 nm での吸光度をモニターした。なお、溶出用溶媒はオンライン脱気装置 (Erma ERC 3312) を用いて脱気し、試料溶液は Millipore filter (0.45 nm) で予めろ過したものをカラムに注入した。

### 4. 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% コマジエ・ブリリアント・ブルー R 250 (10% 三塩化酢酸に溶解) に、35°C 20 時間浸漬して染色し、7% 酢酸で脱染色した。

## 実験結果及び考察

### 1. ゲルろ過クロマトグラフィー

セファデックス G-100 カラム (2.6 × 48 cm) を用いたグリアジンのゲルろ過クロマトグラフィーの結果を Fig. 1 に、その溶出フラクションの SDS-PAGE を Fig. 2 に示している。溶出用溶媒に 0.1 M 酢酸を用いて、95 mg のグリアジンをカラムに注入したときの溶出曲線を Fig. 1B に示す。排除容積 (V<sub>0</sub>) において溶出されるピークとカラム容積 (V<sub>t</sub>) 近くで溶出される主ピークが検出された。Bietz と Wall<sup>7)</sup> はセファデックス G-100 を用いたゲルろ過クロマトグラフィーで同様な結果を報告している。溶出用溶媒に 0.1 M 酢酸を用いて、15 mg のグリアジンをカラムに注入したときの溶出曲線は、95 mg 注入したときの溶出曲線と著しく異なった (Fig. 1A)。95 mg のグリアジンを注入したときの主ピークの溶出容積 (195 ml) が、15 mg の注入では 140 ml 付近で溶出された。同様な結果は、Fig. 1B の主ピークの再クロマトグラフィーでも認められた (データ非掲載)。

溶出用溶媒に 0.01 M 乳酸アルミニウム緩衝液 (pH 3.1) を用いて、100 mg のグリアジンをカラムに注入したときの溶出曲線を Fig. 1C に示す。グリアジンの注入量が多いにも関わらず、Fig. 1A と同様の溶出曲線が得られた。

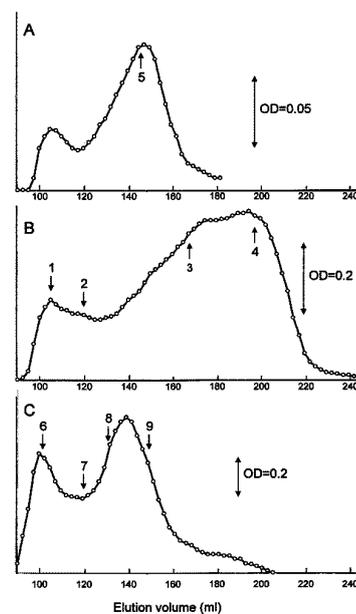


Fig. 1. Gel filtration chromatography on a Sephadex G-100 column (2.6 × 48 cm) of whole gliadin.

A: A protein of 15 mg in a volume of 8 ml was applied to the column and eluted with 0.1 M acetic acid. B: A protein of 95 mg in a volume of 8 ml was applied to the column and eluted with 0.1 M acetic acid. C: A protein of 100 mg in a volume of 8 ml was applied to the column and eluted with 0.01 M aluminum lactate buffer (pH 3.1). The arrows 1 to 9 correspond to the sample taken in Fig. 2.

カラムから溶出されるフラクションのたんぱく質組成を SDS-PAGE により検討した。Fig. 2 の左の図は還元していない試料の結果であり、右の図はメルカプトエタノールによってたんぱく質のジスルフィド結合を切断した試料の結果である。排除容積 ( $V_0$ ) において溶出されるピーク (Fig. 1B-1) は、SDS-PAGE から分子間ジスルフィド結合をもつ高分子量グリアジンと見なすことができる。Fig. 1B-3、4 はメルカプトエタノールの存在の有無にかかわらず泳動パターンは変わらず、鎖間ジスルフィド結合をもたないことを示している。カラム容積 ( $V_t$ ) 近くで溶出される主ピーク (Fig. 1B-4) は、単一鎖のポリペプチドからなるタンパク質である低分子量グリアジンと見なすことができる。Fig. 1A-5 及び Fig. 1C- 8、9 も鎖間ジスルフィド結合は認められず、低分子量グリアジンと同じ泳動パターンを示した。

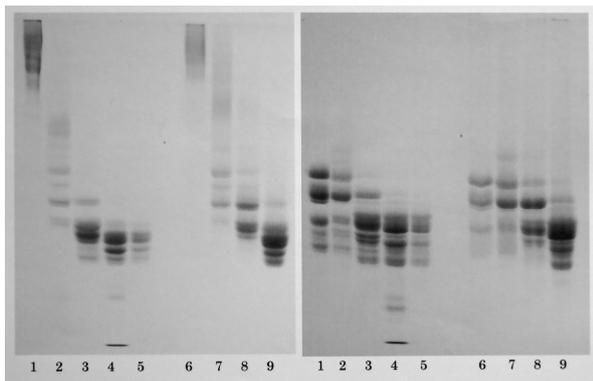


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis for samples from the fractions obtained in Fig. 1. Left: without mercaptoethanol (2ME). Right: with 2ME. Numbers 1 through 9 correspond to the fractions in Fig. 1.

## 2. 分子量

たんぱく質の注入量が少ないとき、または溶出用溶媒として乳酸アルミニウムを用いたとき、ゲルろ過の溶出曲線において主ピークの溶出位置が大きくシフトすることが認められた。Fig. 1A の主ピークの分子量をゲルろ過法によって推定した。Fig. 1B-1、1B-2 および 1B-4 を、Bietz and Wall<sup>7)</sup> のデータに準じて、それぞれ高分子量グリアジン、 $\omega$ -グリアジン、及び低分子量グリアジンとみなした。Fig. 1B-1 の分子量を 100,000、Fig. 1B-2 の分子量を 70,000、Fig. 1B-4 の分子量を 30,000 としてプロットした結果を Fig. 3 に示す。15 mg の注入では 140 ml 付近で溶出された主ピーク (Fig. 1A-5) の分子量は約 60,000 と推定さ

れた。Fig. 1A 及び Fig. 1C の主ピークは、先に示したように鎖間ジスルフィド結合の存在を示さないので、分子量 30,000 の低分子量グリアジンが 2 分子会合したダイマーとなっていることを示唆している。

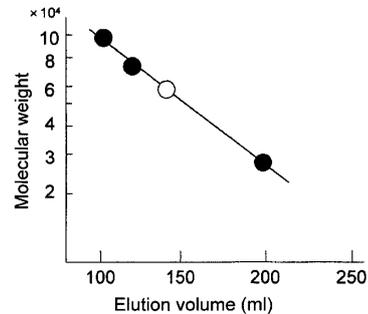


Fig. 3. Relationship between elution volume and molecular weight.

● : High molecular weight gliadin (MW 100,000),  $\omega$ -gliadin (MW 70,000) and low molecular weight gliadin (MW 30,000) obtained in Fig. 1B. ○ : The peak obtained in Fig. 1A and 1C.

## 3. グリアジンの注入量と溶出容積

カラムに注入するたんぱく質量と低分子量グリアジンの溶出容積の関係を Fig. 4 に示す。0.1 M 酢酸を溶出用溶媒として用いたとき、低分子量グリアジンの溶出容積は注入したタンパク質量の増加に伴いほぼ直線的に増加することが認められた。注入タンパク質 15 mg では低分子量グリアジン ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -グリアジン) は二量体として、95 mg では単量体となっていることを示している。低分子グリアジンは、0.1 酢酸中で単量体と二量体が平衡状態を保ち、タンパク質量が少ないときは二量体の方に、タンパク質量が多くなると単量体の方にシフトするものと推察される。他方、0.01 M 乳酸アルミニウム緩衝液 (pH 3.1) を溶出用溶媒としたときは、タンパク質量の影響が認められず、主として低分子グリアジンは二量体として存在することを示している。グリアジンの主要成分である低分子グリアジンが環境条件によって解離・会合をおこなうことは、小麦粉からグルテンの形成に、またグルテンの加工適性に何らかの影響を与えているものと推察した。

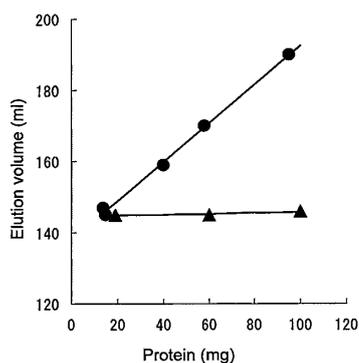


Fig. 4. Relationship between amount of protein applied on a column and elution volume of low molecular weight gliadin.

● : 0.1 M acetic acid used as an elution solvent, ▲ : 0.01 M aluminum lactate buffer (pH 3.1) use as an elution solvent.

## 文 献

- 1) Kasarda DD, Nimmo CC, Kohler GO, Proteins and the amino acid composition of wheat fractions, in *Wheat chemistry and technology*, 2nd ed. Y. Pomeranz. Ed. Am. Assoc. Cereal Chem., St Paul. MN, 1971, 227-99.
- 2) 団野源一, 小麦タンパク質の構造と物性、食品タンパク質の科学—科学性質と食品物性。山内文男編 (株) 食品資材研究会。1983, p71-103.
- 3) Joones, R. W., Taylor, N. W. and Senti, F. R. Electrophoresis and wheat gluten, *Arch Biochem Biophys.* 1959, 84, 363-76.
- 4) Woychik JH, Boundy JA, Dimler RJ, Starach gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea, *Arch. Biochem. Biophys.* 1961, 94, 477-82.
- 5) Mecham DK, Kasarda DD, Qualset CO, Genetic aspects of wheat gliadin proteins, *Biochem Genet.* 1978, 16, 831-53.
- 6) Bietz JA, Wall JS, Wheat gluten subunits: molecular weights determined by sodium dodecyl sulfate-polyacryl amide gel electrophoresis, *Cereal Chem.* 1972, 49, 416-30.
- 7) Bietz JA, Wall JS, Identity of high molecular weight gliadin and ethanol-soluble glutenin subunits fo wheat: relation to gluten structure, *Cereal Chem.* 1980, 57, 415-21.
- 8) Jones RW. Babcock GE, Senti RR, Electrophoresis and fractionation of wheat gluten, *Arch Biochem Biophys.* 1959, 84, 363-76.

- 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, 11-98
- 10) Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly o f the head baacteriophage T4, *Nature.* 1970, 227, 684.