

小麦グルテニン・サブユニットの疎水性相互作用

団 野 源 一 *

大阪青山大学健康科学部健康栄養学科¹⁾

Hydrophobic properties of wheat glutenin subunits

Genichi DANNO

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

Summary Glutenin subunits of wheat flour were isolated by hydrophobic interaction chromatography using butyl-Toyopearl 650M column. The high molecular weight (HMW) subunits were eluted with 5–25% 2-propanol containing 0.01 M acetic acid. The low molecular weight (LMW) subunits were eluted with 25–50% 2-propanol containing 0.01 M acetic acid. HMW subunit 3 (S3) had lower surface hydrophobicity than HMW subunits 1 and 2 (S1 and S2). Emulsions were performed by sonication together corn oil and aqueous solution containing glutenin subunits. LMW subunits were absorbed tightly surface of droplet of oil than HMW subunits. (accepted. Oct. 25, 2008)

Keywords: wheat glutenin, glutenin subunits, HMW-subunits, hydrophobic properties
小麦グルテニン, グルテニン・サブユニット, 高分子量サブユニット

小麦粉に水を加えて混捏すると、小麦粉に含まれている2種類のタンパク質、グリアジンとグルテニンが水和し、相互作用してグルテンを形成する。このグルテン形成は、他の穀物粉には認められない小麦粉特有の性質であり、製パン性や製麺性など小麦粉のもつ二次加工適正の本体である¹⁾。

グリアジンは小麦粉の70%エタノール可溶性タンパク質に与えられた名称で、比較的分子量の単量体からなる多種類のタンパク質の混合物である。グルテニンは分子量3万から10万の多種類のポリペプチドがジスルフィド結合で連結した巨大分子である。グリアジンはグルテニンに粘性を与え、グルテニンはグルテンに弾性を与えている。小麦粉の製パン性の良否がタンパク質含量およびグリアジンとグルテニンの量と質に関係のあることが報告されている^{2,3)}。なかでも小麦粉の製パン性の良否にはグルテニンが特に大きく関わっていることが知られている^{4,5)}。

グルテニンは多種類のポリペプチド鎖(サブユニット)がジスルフィド結合によって結合した巨大分子タンパク質である。グルテニンの構成ポリペプチドは高分子量(HMW)サブユニット、低分子量(LMW)サブユニッ

トおよびアルブミン様ペプチドの3種類のグループに分類できる⁶⁻⁸⁾。Payneら⁹⁾は、HMWサブユニット群に属するサブユニットの有無と小麦粉の製パン特性との間に高い相関があることを報告している。小麦粉の製パン性など小麦粉の加工適性の良否にグルテニンの分子量とその疎水性相互作用が関与していることが知られている。今回、ブチルトヨパール 650Mカラムを用いた疎水性クロマトグラフィーによってグルテニンのサブユニットの分画と疎水的性質の検討を試みた結果を報告する。

実験方法

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。酢酸、2-プロパノール(クロマトグラフィー級試薬)、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。

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

1) 〒562-8580 箕面市新稲2-11-1

グルテニンの調製

脱脂小麦粉(50 g)をN-エチルマレイミド 40 mg, EDTA 350 mg, 塩化ナトリウム 10 gを含む 0.05 Mリン酸ナトリウム (pH 6.8) 1000 mlに懸濁し, 穏やかに 30 分間攪拌した。遠心分離により水溶性成分を除去した残渣に少量の 0.1 M酢酸を加え, ワーリングブレンダーで激しく攪拌することによってグルテンを分散させた。遠心分離により得たグルテン分散液を 95°Cに 2 分間加熱し, 含まれているプロテアーゼを失活させた。グルテンの酢酸分散液にエタノールを 70%となるように添加し, 1 M水酸化ナトリウムでpH 6.5 に調節しすることによりグルテニンを沈殿として分離した。グルテニンを 0.1 M酢酸に再度分散し, 70%エタノール沈殿操作を 2 回繰り返した後, 0.01 M酢酸に分散させ, 0.01 M酢酸に対して透析した。

グルテニンの還元

尿素の存在下でグルテニンのジスルフィド結合の切断を行った。2%グルテン分散液 (0.01 M酢酸に分散) 10 mlに尿素 9.4 g, 1.5 Mトリス塩酸 (pH 7.5) 2 mlを加え, 水を加えて 20 mlとした。2-メルカプトエタノール 1 mlを添加し, 窒素ガスの雰囲気中で 2 時間 35°Cに 2 時間保ち還元した後, 氷酢酸 0.5 mlを加え反応液のpHを 3.5 に調節した後 0.01 M酢酸に対して透析したものを還元グルテンとして, 修飾することなしに, クロマトグラフィーに供した。

グルテンの高分子量サブユニットの調製に用いる還元グルテンは 4-ビニルピリジンで修飾した。グルテニンを 6 M尿素を含む 0.1 Mトリス緩衝液 (pH 8.1) に分散し, ジチオトレイトールを加えてジスルフィド結合を還元した後, 生じたチオール基をFriedmanら¹⁰⁾の方法に従って 4-ビニルピリジンで修飾保護した。

ブチルトヨパールによるクロマトグラフィー

ブチルトヨパール 650M (東ソー) を 0.01 M酢酸で洗浄し平衡化した後カラムに充填した (16×150 mm)。還元グルテン (15 mg/ml) 5 mlをカラムに注入し, 0.01 M酢酸 100 mlでカラムを洗浄した後, 2-プロパノール濃度を 5%から 50%にステップワイズに上昇させてカラムからサブユニットを溶出させた。各濃度のプロパノール酢酸溶液は, あらかじめ超音波処理により脱気し, さらにデガッサーを通して含まれている気体を十分に除去したものを溶出液として使用した。クロマトグラフィーは, 流速は 40 ml/hr, 室温で行った。カラムの再生は, ゲルをカラムから抜き出し, 60% 2-プロパノール, 0.5 M水

酸化ナトリウム, 脱塩水で順次洗浄し, 0.01 M酢酸で平衡化したものをカラムに再充填した。

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¹¹⁾を用いて行った。泳動ゲルは 0.04%コマジー・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。

還元グルテニンの油滴への吸着

還元グルテン 3 ml (90 mg) とサラダ油 (コーンサラダ油) 4 ml, 0.2 Mリン酸緩衝液 (pH 6.8) 1 mlおよび 2-メルカプトエタノール 0.1 mlを 15 ml容サンプル瓶に入れ, 径 8 mmのチップをセットした超音波装置で 150 W, 3 分間の処理を行い乳化させた。この乳化物を 50 ml容ガラス製遠心管に移し, 水 (1%メルカプトエタノール) 30 mlを加えよくかきまぜた後 3,000 rpm遠心分離して水層を分離して水抽出区分とした。同様に 0.1 M酢酸, 6 M 尿素を含む 0.1 M酢酸, 1% SDS (pH 6.8) で順次抽出し, 油滴に吸着しているグルテニンのサブユニットの油滴への吸着の強さを調べた。

実験結果

1. グルテニンのサブユニットのブチルトヨパール 650Mカラムクロマトグラフィー

還元グルテン (0.01 M酢酸に分散) を 0.01 M酢酸で平衡化させたブチルトヨパール 650Mカラム (16 × 150 mm) に注入し, 0.01 M酢酸でカラムを洗浄後, 2-プロパノールの濃度を 5%から 35%までステップワイズに上昇させてカラムに吸着したサブユニットを溶出させた。クロマトグラフィーの結果をFig. 1 に, 各ピークの SDS-PAGEのデンストグラムをFig. 2 に示す。Fig. 2 において, Sはグルテンサブユニットのスタンダードとして用いた還元グルテンの泳動パターンである。S1, S2 およびS3 はグルテンのHMWサブユニット, S5~S8 は LMWサブユニット, S4 はアルブミン様ペプチドに相当する⁶⁾。Fig. 2-1 (Fig. 1 のピーク 1) はカラムに吸着されなかった画分で, アルブミン様ペプチドのほぼ全てがこの画分に集まった。Fig. 2-2 (ピーク 2) にはHMWサブユニット 3 (S3), Fig. 2-3~5 (ピーク 3~5) にはHMWサブユニット 1~3 (S1~S3) が認められた。ピーク 3 はS3 が主成分で, ピーク 4 はS2 が主成分, ピーク 5 はS1 が

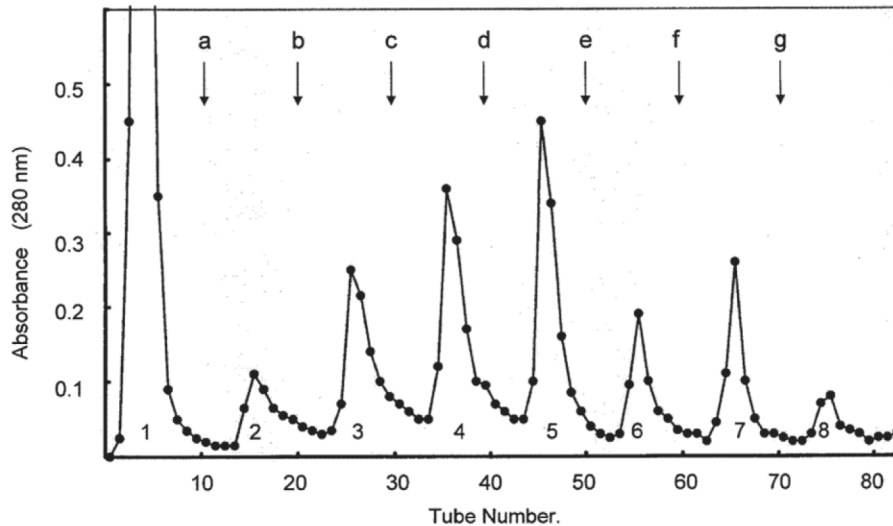


Fig. 1 Elution profile of glutenin subunits 1-6 separated by hydrophobic interaction chromatography on butyl Toyopearl 650M. Elution performed by increasing hydrophobicity of eluent. a~g, acetic acid (0.01 M) with 2-propanol at 5% (a), 10%(b), 15% (c), 20% (d), 25%(e), 30%(e), 40%(f) and 50% (g).

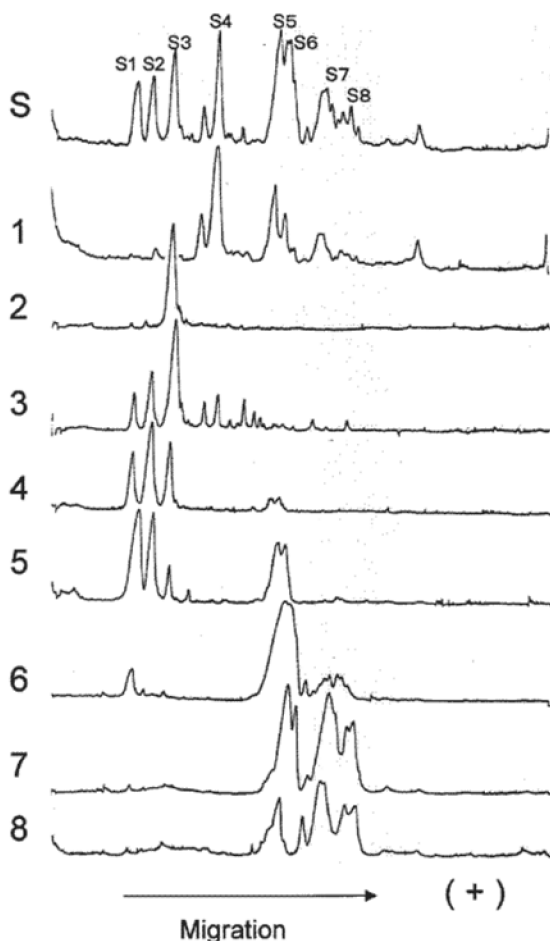


Fig. 2 Densitometer tracings of sodium dodecyl sulfate gel electrophoretic patterns from the fraction obtained from Fig. 1. 1 through 8 correspond to fractions in Fig. 1. S, reduced glutenin.

主成分であることから、HMWサブユニットの疎水性は、S1 が最も大きく、S2, S3 の順で小さくなることを示している。

Fig 2-6~8 (ピーク 6~8) には高分子量サブユニットは認められずLMWサブユニットが溶出された。ピーク 6 はS5, S6 が主成分であるが、S7, S8 はほとんど含まれていない。S7とS8はピーク7 (35%2-プロパノール溶出画分) およびピーク 8 (50%2-プロパノール溶出画分) に認められることから、LMWサブユニットの中で分子量のより小さなS7, S8の方がS5よりも疎水性が高いことが示された。カラムからのグルテニン・サブユニットの回収率は約95%で比較的良好であった。

2. グルテニン・サブユニットの油滴への吸着

還元グルテニン 3 ml (90 mg) にサラダ油 (コーンサラダ油) 4 ml, 0.2 Mリン酸緩衝液 (pH 6.8) 1 mlおよび2-メルカプトエタノール 0.1 mlを加え、超音波 (150 W), 3分間の処理を行い乳化させた。この乳化物を水 (1%メルカプトエタノール), 0.1 N酢酸, 6 M 尿素を含む 0.1 M 酢酸, 1%SDS (pH 6.8) で順次洗浄し、油滴に吸着しているグルテニンのサブユニットの油滴への吸着の強さを調べた。Fig. 3 に各溶媒で洗浄したとき遊離されるサブユニットのSDS-PAGEを示す。乳化に用いた還元グルテニンの全窒素量の約13%が水洗浄液中にあり、そのサブユニット組成はSDS-PAGEの結果アルブミン様ペプチドであった。アルブミン様ペプチドは油滴との親和力は弱く、乳化にはほとんど関与していないものと考えられる。約9%の窒素が0.1 M酢酸による洗浄液中に認められた。

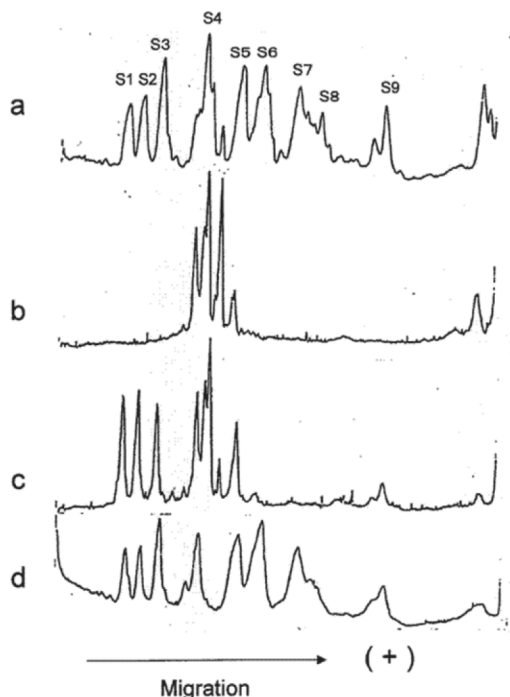


Fig. 3 Densitometer tracings of sodium dodecyl sulfate gel electrophoretic patterns from the fraction extracted from emulsion prepared with corn oil and glutenin subunits. a, reduced glutenin; b, extract with water from emulsion; c, extract with 0.1N acetic acid; d, extract with 1% sodium dodecyl sulfate.

SDS-PAGEの結果、グルテニンのHMWサブユニットは検出されるが、LMWサブユニットは検出されなかった。グルテニンのLMWサブユニットはHMWサブユニットよりも強く油滴に吸着し、疎水性が高いことを示している。このことはブチルトヨパールによる溶出順序と一致する結果となった。

3. グルテニンの高分子サブユニットの分離・調製

ブチルトヨパール 650M カラムクロマトグラフィーを応用してグルテニンの高分子サブユニットの調製を試みた。チオール基を4-ビニルピリジンで修飾保護した還元グルテニンを0.01 M酢酸に分散し、エタノールを70%となるように加え、1 M水酸化ナトリウムでpH 6.5に調節することによりHMWサブユニットを沈殿として分離した。この沈殿を0.01 M酢酸に分散させて、0.01 M酢酸に対して透析したものをブチルトヨパール 650Mカラム (φ50 × 80 mm) に供した。クロマトグラフィーと溶出ピークのSDS-PAGEの結果をFig 4およびFig. 5に示す。HMWサブユニット 3 を単一な成分として分離することができた。HMWサブユニット 1 はピーク 2 として溶出されたがHMWサブユニット 2 の混在が認められた。

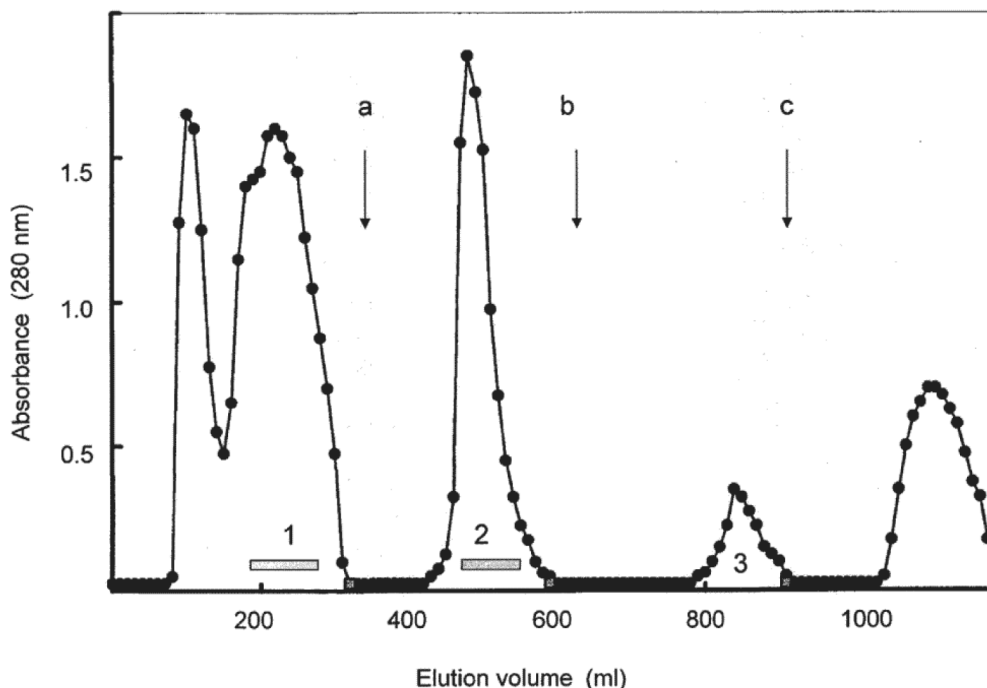


Fig. 4 Elution profile of high molecular glutenin subunits separated by preparative hydrophobic interaction chromatography on butyl Toyoparl 650M column (50 x 100 mm). Elution performed by increasing hydrophobicity of eluent. a ~c, acetic acid (0.01 M) with 1-propanol at 15% (a), 20% (b), 30% (c).

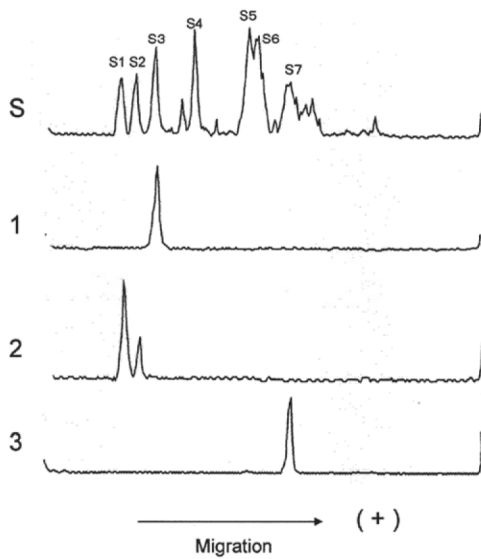


Fig. 5 Densitometer tracings of sodium dodecyl sulfate gel electrophoretic patterns from the fraction obtained from Fig. 4. 1 through 3 correspond to fractions in Fig. 4. S, reduced glutenin.

Tabel I Amino Acid Composition* of Glutenin Subunits

Amino acid	HMW subunit 1	HMW subunit 3
Aspartic acid	0. 53	1. 27
Threonine	2. 91	3. 58
Serine	5. 77	6. 26
Glutamic acid	40. 8	37. 0
Proline	13. 4	11. 2
Glycine	17. 6	16. 4
Alanine	2. 74	3. 82
Half cystine	—	—
Valine	1. 46	2. 78
Methionine	0. 20	0. 47
Isoleucine	0. 78	1. 38
Leucine	4. 09	4. 44
Tyrosine	5. 78	4. 80
Phenylalanine	0. 89	0. 91
Lysine	0. 77	1. 50
Histidine	0. 56	1. 77
Arginine	1. 70	2. 42

* Number of residues per 100 total residues.

4. HMWサブユニット1および3のアミノ酸組成

HMWサブユニット1および3のアミノ酸組成をTable 1に示す。両サブユニットの疎水性アミノ酸の比率はほぼ同じで差はほとんど認められなかった。他方、塩基性アミノ酸の比率に差が認められた。HMWサブユニット3の塩基性アミノ酸（リジン、ヒスチジン、アルギニン）はHMWサブユニット1の約2倍であった。ブチルトヨパール 650M クロマトグラフィーは溶媒として0.01 M 酢酸を用いているので、高分子サブユニットは陽イオン物質としての挙動を示している。この電荷の違い、すなわち親水性の違いがクロマトグラフィーにおけるサブユニット3がサブユニット1よりも低濃度のアルコールで溶出されるものと推察した。

考 察

グルテニンは、小麦粉中の70%エタノール不溶性のタンパク質画分で、多種類のポリペプチド鎖（サブユニット）がジスルフィド結合によって高分子化した巨大タンパク質である。製パン性など小麦粉の加工特性の良否はグルテニン分子の大きさと疎水性相互作用が関与しているとされている。ジスルフィド結合を還元して生成するサブユニットは、SDS-PAGEおよびアミノ酸組成の結果から、HMWサブユニット、LMWサブユニットおよびアルブミン様ペプチドの3種類のグループに分類できる⁶⁻⁸⁾。0.01 M酢酸で緩衝化したブチルトヨパール 650Mカ

ラムにアルブミン様ペプチドは吸着しなかった。HMWサブユニットは低濃度の2-プロパノールで溶出したが、LMWサブユニットの溶出2はより高濃度のアルコールを必要とした（Fig. 1, 2）。エマルジョンの油滴へのグルテニン・サブユニットの吸着性においても同様の結果が得られた。コーンサラダ油と還元グルテニンからなるエマルジョンを水洗すると洗浄液にアルブミン様ペプチドのみが認められた。グルテニンのアルブミン様ペプチドの表面疎水性は小さく、グルテニンの疎水性相互作用には関与していないことを示している。ついで0.1 M酢酸で洗浄するとHMWサブユニットが洗浄液中にみられるが、LMWサブユニットは強く油滴に結合している結果となった（Fig. 3）。Danno¹²⁾は、疎水領域探索試薬、TNSを用いた実験で、グルテニンの疎水性はグリアジンよりも大きいこと、グルテニンの疎水性はLMWサブユニットに依存していることを報告している。HMWサブユニットはグリシンとチロシンに富むが、LMWサブユニットはバリン、イソロイシン、フェニルアラニンに富み両サブユニットの間にはアミノ酸組成に特徴を持っている⁶⁾。これらアミノ酸組成がHMWサブユニットとLMWサブユニットの表面疎水性に反映しているものと推察できる。HMWサブユニットはほぼ同じアミノ酸組成をもっている⁶⁾。しかし、ブチルトヨパールを用いてクロマトグラフィーにおいて、溶出の順序はHMWサブユニット3、サブユニット2、サブユニット1の順で、HMWサブユニット3が最も表面疎水性が低い結果となった。HMW

サブユニット 3 の塩基性アミノ酸の比率はHMWサブユニット 1 の約 2 倍であり、酸性pHではHMWサブユニットは陽イオン物質としての挙動を示しているので、HMWサブユニット 3 とHMWサブユニット 1 の表面疎水性の挙動はこの電荷の違いによるものと推察した。疎水探索試薬を用いた実験で、LMWサブユニットの疎水領域付近にある陽電荷が疎水探索試薬 (TNS) との相互作用に大きく影響することが報告されている¹²⁾。グルテニン・サブユニットの疎水領域と親水領域が近接していることが小麦粉の製パン製の複雑な挙動の原因の一つと推察される。さらに、ブチルトヨパール 650M カラムクロマトグラフィーを応用して、HMWサブユニットを精製・調製することができた。

文 献

- 1) 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 —化学性質と食品特性—” 山内文男編著, (株)食品資材研究会, 1984, p71.
- 2) Shogren, M. D. Finey, K. F. and Hosney, R. C. Functional (breadmaking) and biochemical properties of wheat flour components. I. solubilizing gluten and flour proteins, *Cereal Chem.*, 46, 93 (1969).
- 3) MacRitchie, F. Evaluation of contributions from wheat protein fractions to dough mixing and breadmaking, *J. Cereal Sci.*, 6, 259 (1987).
- 4) Orth, R. A. and Bushuk, W. A comparative study of the proteins of diverse baking qualities, *Cereal Chem.*, 49, 268 (1972).
- 5) Huebner, F. R. and Wall, J. S. Fractionation and quantitative differences of glutenin from wheat varieties varying in baking quality, *Cereal Chem.*, 53, 258 (1976).
- 6) Danno, G. Kanazawa, K. and Natake, M. Identity of SDS-insoluble proteins with purified glutenin from wheat flour, *Agric. Biol. Chem.*, 40, 739 (1976).
- 7) Huebner, F. R. and Wall, J. S. Wheat glutenin subunits. I. Preparative separation by gel-filtration and ion-exchange chromatography, *Cereal Chem.*, 51, 228 (1974).
- 8) Payne, P. I. and Corfield, K. G. Subunit composition of wheat glutenin proteins, isolation by gel filtration in a dissociating medium, *Planta*, 145, 83 (1979).
- 9) Payne, P. I. Corfield, K. G. and Blackman, J. A. Identification of a high-molecular-weight subunit of glutenin whose presence correlates with bread-making quality in wheats of related pedigree, *Theor. Appl. Genet.* 55, 153 (1979).
- 10) Friedman, M. Krull, L. H. and Cavins, J. The chromatographic determination of cystein in proteins as S-(4-pyridylethyl)cystein, *J. Biol. Chem.*, 245, 3868 (1970).
- 11) Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 681 (1970).
- 12) Danno, G. Function of wheat proteins during dough mixing, *Internat. Symp. on Adv. In Baking Sci. and Tech.* k1 (1989).