

## N 末端アミノ酸分析からみた小麦グルテンのポリペプチド構成

田中 弘\*, 金沢宏和, 米沢大造

(大阪府立大学農学部農芸化学科)

昭和 43 年 4 月 26 日 受 理

Studies on Polypeptide Composition of Wheat Gluten  
by N-Terminal Amino Acid Analysis

By Hiromu TANAKA, Hirokazu KANAZAWA and Daizo YONEZAWA

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of  
Agriculture, University of Osaka Prefecture*

N-Terminal amino acids of wheat gluten proteins were determined by a modified DNP-method. Eleven kinds of amino acids were detected; valine, aspartic acid, serine, glutamic acid, glycine, leucine, alanine, threonine, methionine, phenylalanine and lysine. Gliadin and glutenin gave the same amino acids, among which valine, aspartic acid, serine and glutamic acid were the main N-terminal amino acids for both of the proteins. Difference between these proteins was in the amounts of the detected amino acids; glutenin was rich in N-terminal glutamic acid and serine, while valine was predominant in gliadin together with a smaller amount of aspartic acid.

The total amounts of detected N-terminal amino acids were about 0.4 moles per mole polypeptide, if average molecular weight 25,000 was assumed for gluten polypeptides. A possible existence of "masked" N-terminal residues were examined but conclusive evidence was not obtained.

(Received April 26, 1968)

グルテンたんぱく質のN-末端アミノ酸分析に関しては今までに多くの報告<sup>(1,2)</sup>があるが、その内容はN末端基をただ1個検出したというものから11種類におよぶN末端基を検出したというものまであって、研究者によりかなり相違している。しかも、これらの結果はすべて定性的にどのような末端基が検出されたかということにとどまっており、末端アミノ酸の量的な関係は明らかにされていない。著者らはグルテンたんぱく質に適用するために若干の改良を加えたDNP法を用い、グルテン、グリアジンならびにグルテニンのN末端アミノ酸を分析した。その結果について次に報告する。

## 実 験 方 法

1. 小麦粉 原料として用いた小麦は次の6種である。

Western White (アメリカ産, 軟質, 1963 年産)

Manitoba No. 2 (カナダ産, 硬質, 1963 年産)

農林 26 号 (軟質, 1964 年産)

農林 43 号 (軟質, 1964 年産)

新 中 長 (軟質, 1964 年産)

Durum (カナダ産, 1963 年産)

いずれも日清製粉株式会社神戸工場に依頼して製粉した未漂白 60% テストミル粉である。

2. グルテンの調製 Jones ら<sup>(3)</sup>の方法に従って調製した。すなわち、*n*-ブタノールで脱脂した小麦粉を水で混捏して、0.1% 塩化ナトリウム溶液ででんぷんをのみ出してグルテンを得た。これを 0.01 N 酢酸に分散し、20,000×*g* で遠心分離して不溶性たんぱく質を沈でんとして除去した。この上清を 100°C に加熱しプロテアーゼを失活させた後、凍結乾燥してグルテンの粉末を得た。

3. グリアジンとグルテニンの調製 グルテンより Nielsen ら<sup>(4)</sup>の方法に従って調製した。すなわちグルテン粉末を 0.1 N 酢酸に分散させ、これに酢酸ナトリウムを加えてイオン強度 0.05, pH 4.41 としてグルテニンを

\* 現在, 京都教育大学

沈でんとして分離した。上清に塩化ナトリウムを加えて、1 M とし溶液の pH を水酸化ナトリウムで中性としてグリアジンを沈でんさせた。この沈でんを 0.1 N 酢酸に分散して水に対し透析した後凍結乾燥してグリアジン粉末を得た。一方、グルテニン区分の沈でんをさらに溶解再沈でんした後、美和ら<sup>(6)</sup>の方法によって混入しているグリアジンを除去した。すなわち、この沈でんを 0.01 N 酢酸に分散してたんぱく濃度約 1% の溶液とし、これにあらかじめ 0.01 N 酢酸で膨潤させておいたカルボキシメチルセファデックス C50 をたんぱく量の 1/2 量添加した。攪拌後これを遠心分離してセファデックスを除き上清を凍結乾燥してグルテニン粉末を得た。

4. たんぱく質の DNP 化 DNP 化は Sanger<sup>(6)</sup>の方法に準拠して行なったが、グルテンたんぱく質に適合させるために一部改良を加えた。すなわち、グルテンたんぱく質は通常の DNP 化の溶媒 (66% エタノール) には分散し難いので、分散をよくするために反応液にジメチルホルムアミドを 2 M の濃度に含ませた。また反応液のエタノール濃度は 50% とした。DNP 化の反応時間は常法の 2 時間では不充分であるので 20 時間とした。

5. N末端アミノ酸の同定と定量 DNP 化されたたんぱく質を常法により定沸点塩酸で加水分解し、分解液を直接エーテルで抽出し (加水分解液 5 ml に対しエーテル 10 ml 5 回抽出)、抽出液よりエーテルを除去してクロマトグラフ分析の試料とした。クロマトグラフィーにはシリカゲル G の 0.25 mm の厚さの薄層を用いた。これにメタノールに溶解した試料 (グルテン 5~15 mg 相当量) をスポットし暗所で室温で展開した。展開剤としては一次元に 5% 酢酸飽和イソアミルアルコール、二次元にクロロホルム:ベンジルアルコール:酢酸 (70:30:3, v/v) を用いた。検出された DNP-アミノ酸の種類は  $R_f$  値<sup>(7)</sup>ならびに混合試験によって確認した。エーテル抽出後に残留する水溶性部分については、塩酸を除去した後、上記と同じ薄層を用い、*n*-ブタノール-酢酸-水 (4:1:5, v/v) で一次元クロマトグラフィーを実施した。

定量は次のようにして実施した。すなわち薄層より所定の DNP-アミノ酸のスポットの部分进行りとり、栓付試験管に入れ、これに 1% 炭酸水素ナトリウム溶液 5 ml を加え、50°C の湯浴中で 20 分間時々振とうしながら抽出した。静置放冷後東洋濾紙 No.5 C で濾過し、濾液の吸光度を 360 m $\mu$  で測定した。別にスポットのない部分

を、スポットとはほぼ同量削りとして同様に処理し盲検とした。測定された吸光度から盲検値を差引いて、これに回収試験\*によりあらかじめ求めておいた各 DNP-アミノ酸についての回収率を乗じて、加水分解中におこる破壊とクロマトグラフィーの際の損失との両方に起因する損失を補正した。各 DNP-アミノ酸の分子吸光係数は文献 (8) 記載のものをそのまま用いた。

6. クロマトグラムの複写 シリカゲルの薄層はこわれやすく、そのままクロマトグラムを保存することは困難である。そのため保存、記録する必要のあるときは、次のようにしてクロマトグラムを複写した。すなわち複写用ネガ用紙 (ヒシラコピー、三菱製紙製) の上にクロマトグラムの薄層面を密着させて置き、その約 50 cm 上方から 3650 Å の紫外線 (マナスライト) を 10~30 秒間照射して感光させた後ポジ用紙に転写した。

## 実験結果

### 1. グルテンの N末端アミノ酸

農林 26 号小麦グルテンの N末端アミノ酸の薄層クロマトグラムを Fig.1 に示す。図中に破線で示したスポットは複写図 (方法 6 参照) にはあらわれないが、紫外線下では存在がみとめられるものである。このクロマトグラムには DNP-アスパラギン酸、(以下 DNP-を略す) セリン、スレオニン、グルタミン酸、グリシン、アラニン、リジン (ジ DNP-リジン)、メチオニン、フェニルアラニン、バリンおよびロイシンの各スポットがみられる。水溶性部分からはアルギニン、ヒスチジンを検出しなかった。Western White, Manitoba No. 2, 農林 43 号, 新中長および Durum 小麦についても、まったく同じ種類の N末端アミノ酸が検出された。これらの N末端アミノ酸の定量値を Table I に示した。これによればグルテンの主な N末端アミノ酸は、バリン、アスパラギン酸、セリンでグルタミン酸、グリシン、ロイシンなどがこれについている。小麦の種類によって多少の相違が認められるが、大体において各種類とも一致した傾向を示し

\* DNP グルテンに既知量の標準 DNP アミノ酸を加えて、上記の方法で加水分解、抽出、クロマトグラフィー、比色定量を実施して、添加 DNP アミノ酸の回収率を求めた。この実験は 1 つの DNP アミノ酸について少なくとも 10 回以上繰りかえして行ない、その平均値をとった。DNP-グルテンは農林 26 号小麦のグルテンより調製したものである。ここに得られた回収率を供試小麦すべてのグルテン、グリアジン、グルテニンに適用した。

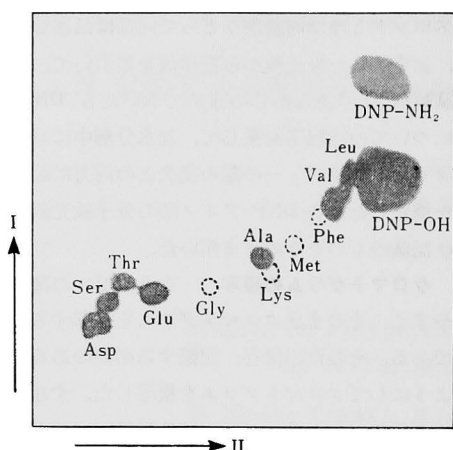


Fig. 1. Chromatogram of N-Terminal Amino Acids of Wheat Gluten.

Sample : Norin No. 26

Thin-layer : Silica gel G, 0.25 mm.

Solvent I : Isoamyl alcohol satd. with 5% acetic acid

Solvent II : Chloroform : benzyl alcohol : acetic acid (70 : 30 : 3)

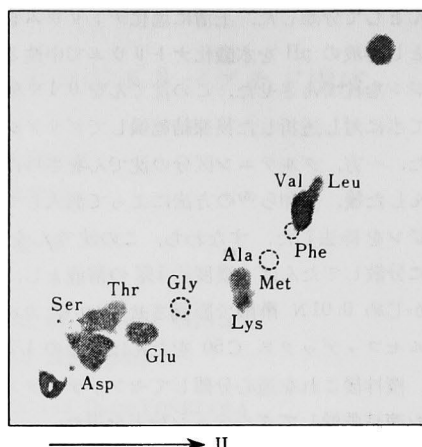


Fig. 2. Chromatogram of N-Terminal Amino Acids of Wheat Gliadin.

Sample : Manitoba No. 2

Thin-layer : Silica gel G, 0.25 mm.

Solvent I : Isoamyl alcohol satd. with 5% acetic acid

Solvent II : Chloroform : benzyl alcohol : acetic acid (70 : 30 : 3)

Table I Occurrence of N-Terminal Amino Acids in Wheat Glutens (mole/10<sup>5</sup>g)

Terminal amino acid	Wheat variety					
	Western White	Manitoba No. 2	Norin No. 26	Norin No. 43	Shin-chunaga	Durum
Asp	0.31	0.31	0.31	0.34	0.36	0.25
Ser	0.24	0.21	0.23	0.18	0.27	0.23
Thr	0.07	0.06	0.10	0.07	0.08	0.06
Glu	0.10	0.10	0.12	0.20	0.13	0.07
Gly	0.23	0.14	0.16	+	0.07	0.09
Ala	0.08	0.09	0.08	0.09	0.07	0.07
Lys	0.08	0.06	0.04	0.05	0.03	0.03
Met	+	+	+	+	+	+
Phe	+	+	+			
Val	0.43	0.31	0.31	0.35	0.32	0.43
Leu	0.05	0.07	0.13	0.11	0.13	0.14
Total	1.59	1.35	1.48	1.39	1.47	1.37

Each DNP-amino acids was extracted by 5 ml of 1% NaHCO<sub>3</sub> from thin-layer of silica gel. Optical density of the extract was measured at 360 mμ. Molar extinction coefficients of DNP-amino acids according to the reference (8) were used for calculation.

た。ことに Durum は電気泳動図は他の小麦に比してかなり顕著に相違するにもかかわらず、N末端分析の結果ではさほど大きい相違を示さなかったことは注目に値する。

## 2. グリアジンのN末端アミノ酸

Manitoba No.2のグリアジンのN末端アミノ酸の薄層

Table II. Occurrence of N-Terminal Amino Acids in Wheat Gliadins (mole/10<sup>5</sup>g)

Terminal amino acid	Wheat variety		
	Western White	Manitoba No. 2	Norin No. 26
Asp	0.41	0.48	0.47
Ser	0.33	0.19	0.24
Thr	0.03	0.03	0.04
Glu	0.08	0.07	0.04
Gly	+	+	+
Ala	0.05	0.08	0.03
Lys	0.04	0.04	0.04
Met	0.06	+	+
Phe	+	+	+
Val	0.68	0.56	0.67
Leu	0.05	0.06	0.17
Total	1.73	1.51	1.70

クロマトグラムを Fig. 2 に示す。検出されたN末端アミノ酸の種類はグルテンの場合と同じである。

農林 26 号および Western White 小麦のグリアジンについてもほぼ同じクロマトグラムを得た。検出されたN末端アミノ酸の定量値を Table II に示した。これによれば、グリアジンではバリンがもっとも多くアスパラギン酸、セリンがこれについている。水溶性部分の分析では末端アルギニン、ヒスチジンを検出しなかった。

### 3. グルテニンのN末端アミノ酸

Manitoba No. 2 のグルテニンの N 末端アミノ酸の薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示す. 検出された N 末端アミノ酸の種類はグルテンやグリアジンと同じであった. 農林 26 号および Western White グルテニンについてもほぼ同様のクロマトグラムを得た. 検出された N 末端アミノ酸の定量値を Table III に示した. これによればグルテニンの主な N 末端アミノ酸としてはグルタミン酸, セリンがもっとも多く, アスパラギン酸, バリンがこれ

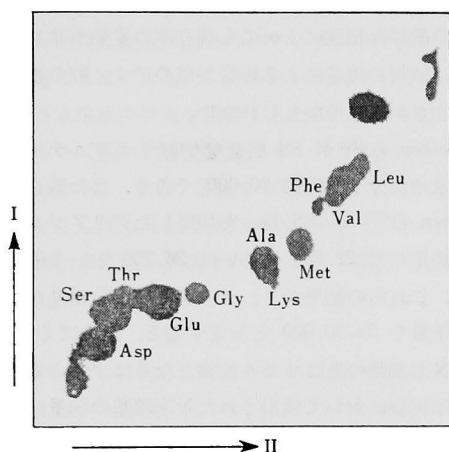


Fig. 3. Chromatogram of N-Terminal Amino Acids of Wheat Glutenin.

Sample : Manitoba No. 2.  
Thin-layer : Silica gel G, 0.25 mm.  
Solvent I : Isoamyl alcohol satd. with 5% acetic acid.  
Solvent II : Chloroform : benzyl alcohol : acetic acid (70 : 30 : 3)

Table III. Occurrence of N-Terminal Amino Acids in Wheat Glutenins (mole/10<sup>5</sup>g)

Terminal amino acid	Wheat variety		
	Western White	Manitoba No. 2	Norin No. 26
Asp	0.18	0.24	0.17
Ser	0.35	0.29	0.34
Thr	0.08	0.01	0.04
Glu	0.33	0.32	0.27
Gly	+	+	0.02
Ala	0.03	0.07	0.10
Lys	0.05	0.02	0.03
Met	0.06	0.06	0.08
Phe	+	+	0.03
Val	0.24	0.21	0.05
Leu	0.21	0.17	0.09
Total	1.53	1.39	1.22

についている. 水溶性部分からはアルギニン, ヒスチジンを検出しなかった.

### 4. グルテンたんぱく質酢酸溶液の加熱処理前後におけるN末端アミノ酸検出量の比較

グルテンたんぱく質は多量のグルタミンを含むが, このグルタミンが N 末端に存在するときには酸性における加熱によって容易に閉環してピログルタミン酸の形となり, DNP 法で検出されなくなる. グルテンたんぱく質を調製する際にその酢酸溶液を 100°C で加熱する処理を施すが, この際大量の N 末端グルタミンが消失するおそれがあるので, この点をたずねるために次の実験を行った. すなわち, 農林 26 号から分離したグルテンを低温で 0.01 N 酢酸に分散し, この液を 2 分して一方は直ちに中和, 微アルカリ性として DNP 化を行ない, 他方は 100°C で 10 分間加熱した後中和, 微アルカリ性として DNP 化を行なった. この両者について N 末端アミノ酸を定量した結果を Table IV に示す. N 末端グルタミン酸 (本法では N 末端グルタミンもグルタミン酸として検出定量される) の量は両者の間で大差はなく, 加熱前に多量のグルタミン末端が存在していて, これが加熱によりマスクされたというような事実は認められなかった. また, その他の末端アミノ酸についてもその変化は誤差の範囲を出なかった.

### 考 察

小麦グルテンたんぱく質の N 末端基を分析して 11 種

Table IV. Influence of Heating at Preparation of Wheat Gluten on Detection of N-Terminal Residues by DNP-Method (mole/10<sup>5</sup>g)

N-Terminal amino acid	Preparation	
	Unheated	Heated
Asp	0.48	0.49
Ser	0.31	0.25
Thr	0.11	0.08
Glu	0.27	0.30
Gly	0.03	0.08
Ala	0.05	0.07
Lys	0.02	0.04
Met	+	+
Phe	+	+
Val	0.60	0.42
Leu	0.33	0.24
Total	2.20	1.97

Gluten was heated at 100°C for 10 min in 0.01 N acetic acid.

の N 末端アミノ酸の存在を確認した。このうち 10 種は Winzor ら<sup>(1)</sup>がグルテンより検出したものとまったく一致した。しかし、彼らが微量の N 末端ヒスチジンを検出したのに対し本実験ではその存在を確認するに至らなかった。一方、本実験において N 末端リジンを検出したが、Winzor らの報告では検出されていない。ジ DNP リジンとジ DNP ヒスチジンとはクロマトグラムの上ではかなり離れた位置にスポットが現われる<sup>(7)</sup>ので両者を混同するおそれはない。Woychik<sup>(2)</sup>も最近 Ponca 小麦グルテンたんぱく質の N 末端アミノ酸について報告し、その主要 N 末端アミノ酸としてアスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、スレオニンおよびアラニンの 5 種類をあげており、本報の結果と一致している。ところが、本実験において主要な N 末端基として検出されたバリンについてはまったくふれていない。著者らの結果では、バリンは実験に用いた小麦にも多量に認められるので品種の相違によってバリン N 末端が欠除するということは考え難いように思われる。

Woychik ら<sup>(3)</sup>はメルカプトエタノールで SS 結合を還元切断したグルテニンのグリアジンとについて、でんぶんゲル電気泳動分析を行ない、成分ポリペプチドを示すたんぱく帯のほとんどのものが両者相対応する位置に現われることを認めて、グルテニンとグリアジンとは共通のポリペプチドから成立していると考えた。しかし、その後、Beckwith ら<sup>(10)</sup>は還元再酸化の実験において、再酸化したグルテニンのゲル電気泳動図にはグリアジンでは認められない位置に強いたんぱく帯が現われることを認めて、両グルテンたんぱく質を構成するポリペプチドは、はじめに考えられていたほど共通したものではないとの見解に達した。本報におけるグリアジンとグルテニンの N 末端アミノ酸分析の結果 (Table II と III) では、検出された主要 N 末端基の種類は両者について同一であって、それはバリン、グルタミン酸、アスパラギン酸、セリンである。しかしこれらの N 末端アミノ酸のうち N 末端グルタミン酸はグルテニンに大量見出されるのに対しグリアジンでは少ない。一方、N 末端バリン、アスパラギン酸はグリアジンに多くグルテニンには少ない。Beckwith ら<sup>(10)</sup>が指摘したように、グルテニンまたはグリアジンのどちらか一方に大量に含まれるポリペプチドがあるとすれば、それはグリアジンではバリン、アスパラギン酸、グルテニンではグルタミン酸を N 末端としたポリペプチドであろうと考えられる。

本実験はグルテンたんぱく質の N 末端基の種類とともにそれらの量的関係をも明らかにしようと企図したものであるが、一部のアミノ酸、ことにグリシンについては明確な結果を得なかった。すなわち、グルテンにおいて N 末端グリシンをかなり多く検出した品種でも、これから調製したグリアジン、グルテニンではきわめて少量しか検出できなかった。定量結果の算出に用いた回収率は農林 26 号 DNP-グルテンについて算定したもので、これを DNP-グリアジン、DNP-グルテニンの両者にも適用したのである。DNP-グリシンのように酸加水分解の条件の微妙な相違によっても残存率の変動が激しいものでは、試料の相違による影響が他のアミノ酸の場合に比べて大きかったのかもしれない。

Nielsen ら<sup>(11)</sup>が SS 結合を切断したグルテニンについて求めた分子量は約 20,000 である。また最近同じく Nielsen ら<sup>(12)</sup>が SS 結合を切断したグリアジンの分子量を測定して 22,300 あるいは 26,200 という値を得ている。これらの結果から、グルテンの成分ポリペプチドの分子量を 2~30,000 と仮定すると、たんぱく質 10<sup>5</sup>g 当り N 末端基の量は 4 モル前後となるはずである。ところが本実験において検出された N 末端基の総量はグルテン、グリアジン、グルテニンについて、いずれも 1.5 モル前後であった。本実験での N 末端基の測定はできるだけ定量的に行なわれるよう種々検討の上実施したのであるが、得られた値は意外に低かった。単一のポリペプチドでも、その種類によっては定量的に N 末端基を検出することが困難な場合があるが、グルテンたんぱく質のように多様なポリペプチドを含む系では一層困難となるであろうから、N 末端基総量が低くあらわれることは避け得られないであろう。しかし、このことを考慮しても 4 モルと 1.5 モルとの開きは大きすぎるように思われる。

N 末端基総量が低く現われた別の理由として、N 末端基が DNP 法で検出できないようにマスクされていることが考えられる。最近 Huebner ら<sup>(13)</sup>は  $\gamma$ -グリアジンが 3 種類の成分ポリペプチドから成ることを明らかにして、そのうちの 1 つは N 末端基が検出されないことを報告した。また沢井ら<sup>(14)</sup>は米胚乳グルテリンの約 4/5 を占める主成分ポリペプチドの N 末端基が DNP 法で検出されなかったと報告している。これらの報告によれば、グルテン中に N 末端基のマスクされたポリペプチドが相当量存在することも当然考慮しなければならない。

マスクされた N 末端基の存在をしらべるために、著者

らはグリアジンのプロナーゼ加水分解物中より酸性ペプチドを分離することを試みて、ペーパークロマトグラフィーで DNP 化されない 4 つのスポットを与える酸性ペプチドを分離し、これが N 末端ピログルタミン酸をもつことを推定した。しかしながらグルテンたんぱく質はグルタミンを多量に含有するのでプロナーゼ水解物中には N 末端グルタミンをもつペプチドが多量存在し、これが酸性ペプチド分離操作中に N 末端ピログルタミン酸に変化する可能性が大きい。したがって、このような酸性ペプチドがグリアジン水解物より得られたことを以て、マスクされた N 末端基がもとのグリアジン中に存在する証明とすることはできない。グルテンたんぱく質のマスクされた N 末端基の存在を確認するためには個々のポリペプチドを単一に近い状態で分離して、その N 末端基を調べる必要があろう。なお、結果 4 の実験に示されたように、グルテンたんぱく質を調製する際の加熱処理によってマスクされた N 末端が多量に生じたという事実は認められなかった。

#### 要 約

小麦グルテン、ならびにこれより分離調製したグリアジンおよびグルテニンについて、それぞれの N 末端アミノ酸を DNP 法により、シリカゲル G の薄層クロマトグラフィーを用いて定量した。その結果、小麦グルテン、グリアジンおよびグリアジンの N 末端基として検出されたものは、それぞれについて、まったく同一であって、それらはアスパラギン酸、セリン、スレオニン、グルタミン酸、アラニン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、パリンおよびロイシンの 11 種であった。しかし、これらの N 末端基相互の量的関係はグリアジン、グルテニン両者においてかなり異なっていた。すなわち、グリアジンの主な N 末端アミノ酸はパリン、ついでアスパラギン酸であるのに対し、グルテニンのそれは、グルタミ

ン酸およびセリンであった。なおグルテンを構成するポリペプチドの相当量が N 末端をマスクされていることを示唆する結果を得たが、このことを確証するに至らなかった。

終りに臨み、試料小麦を御提供いただいた I. Hlynka 博士、日清製粉株式会社、大阪農林技術センター、兵庫農事試験場、ならびに実験に協力された小川和夫、岩橋志津子の両氏に厚く御礼申し上げます。

なお本報告の要旨は昭和 41 年度日本農芸化学会大会において講演した。

- (1) D. J. Winzor and H. Zentner : *J. Sci. Food Agric.*, **13**, 428 (1962).
- (2) J. H. Woychik : *Proc. Seed Protein Conference*, 27 (1963).
- (3) R. W. Jones, N. W. Taylor and F. R. Senti : *Arch. Biochem. Biophys.*, **84**, 363 (1959).
- (4) H. C. Nielsen, G. E. Babcock and F. R. Senti : *ibid.*, **96**, 252 (1962).
- (5) 美和紀男, 米沢大造 : 未発表.
- (6) F. Sanger : *Biochem. J.*, **39**, 507 (1945).
- (7) 田中 弘, 好川 清, 下村 弘 : 農化, **42**, 735 (1968).
- (8) 日本化学会編 : 実験化学講座, 23 巻, 生物化学 I, 丸善, 1966, p. 169.
- (9) J. H. Woychik, F. R. Hubner and R. J. Dimler : *Arch. Biochem. Biophys.*, **105**, 151 (1964).
- (10) A. C. Beckwith and J. S. Wall : *Biochim. Biophys. Acta*, **130**, 155 (1966).
- (11) H. C. Nielsen, G. E. Babcock and F. R. Senti : *Arch. Biochem. Biophys.*, **96**, 252 (1962).
- (12) H. C. Nielsen, A. C. Beckwith and J. S. Wall : *Cereal Chem.*, **45**, 37 (1968).
- (13) F. R. Huebner, J. A. Rothfus and J. S. Wall : *ibid.*, **44**, 221 (1967).
- (14) H. Sawai and Y. Morita : *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 76 (1968).