小麦グルテンに及ぼす γ 線照射の影響 (第 6 報)*

蛋白分解酵素に対する感受性, およびトリクロル
酢酸濃度変化による分別蛋白の検討

道 口 正 雄 (東京都立衛生研究所)

昭和 39 年 7 月 31 日 受理

I. 緒 言

著者はかつて“小麦グルテンに及ぼす γ 線照射の影響”について一連の研究⁽¹⁻⁵⁾を行い, 小麦グルテンは 100×10^4 rep 以下の照射量では, 水素結合の変化によって蛋白分子の高次構造の一部に変化をきたし, 300×10^4 rep 以上ではさらに分子内の -SS- 結合が開裂し, 蛋白の一部が種々の分子量の sub-unit に細断されることを明らかにした。

このことはまた当然照射グルテンの蛋白分解酵素による分解され易さに変化を生じることを予想させるので, 小麦グルテンの全ペプチド結合の 80% を分解する強力な分解力をもった蛋白分解酵素「プロナーゼ⁽⁶⁾」を作用させ, 照射による酵素感受性の変化を観察した。

また既報^(4,5)の研究においては, 主としてグルテンの酢酸不溶性蛋白部分の照射による変化について研究を行い, 酢酸可溶性部分の変化については, いまだ明確な所見をえていなかったもので, グルテンの酢酸懸濁液についてトリクロル酢酸濃度 0.01~0.2 M にわたる範囲の沈でん濾液を調製し, それらの Cu-Folin 呈色度および混濁度を測定することによって酢酸可溶性蛋白部分の変化について検討をこころみた。その結果, これまでの研究にさらに若干の新しい知見をえたのでここに報告する。

実 験 方 法

I) 試料: 市販バイタルグルテン (商標ハイプロ, 水分 4.5%, 灰分 1.79%, 蛋白質 72.8%) にそれぞれ 100×10^4 , 300×10^4 , 600×10^4 , 1000×10^4 rep ^{60}Co γ 線

を照射し実験に供した。これらの試料は前報⁽⁵⁾の供試試料の一部を密栓し氷室に保存したものである。

II) 蛋白分解酵素「プロナーゼ」による分解度の測定: 試料グルテン 0.4 g を精秤し, 反応槽**に移し, 0.1 M 酢酸 50 ml を加え電磁攪拌器を使用し 10 分間攪拌し, 試料を十分分散懸濁させた後 0.1 M 酢酸ナトリウム 50 ml を加え, さらに 5 分間攪拌を継続し懸濁液の液温を 40° に保った後, その 5 ml を 0.2 M トリクロル酢酸 (以下 TCA と略記) 5 ml を含む試験管に分取し, その濾液をもって盲検とした。

次いで 15 P. U. K./ml の活力に調製したプロナーゼ溶液*** (0.05 M 塩化カルシウム溶液に溶解, 試験直前に調製し 5 分間 40° に加温したもの) 2 ml を試料懸濁液に加え, 5, 10, 20, 30, 45, 60 分の 6 回, この反応混液 5 ml をとり 0.2 M TCA 5 ml に合した。また 60 分後の混液の一部を総窒素量測定用に供した。試料懸濁液の pH は 4.7, 反応温度は 40°, また全反応時間中常に電磁攪拌器による攪拌を行った。

反応液は 3 時間静置後, 東洋濾紙 No. 5 C を用いて濾過し, 濾液について Folin 比色法によって 660 m μ の吸光度を, またマイクロケルダール法によって窒素量を測定した。

III) TCA 濃度変化による分別濾液の Cu-Folin 呈色度および混濁度の測定: 試料 0.2 g を精秤し, 0.05 M 酢酸 50 ml を加え, 室温で 10 分間電磁攪拌器で攪拌し試料を十分分散させた後, 攪拌を継続しながら, 蒸留

* The Effects of Gamma Irradiation on Wheat Gluten. Part VI. Studies on the Susceptibility to Pronase, and on Some Fraction of Gluten Protein Fractionated by Various TCA Concentration.

By Masao DOGUCHI (Tokyo Metropolitan Hygienic Research Laboratory)

** 反応槽は容量約 100 ml の有底円筒に外とう管を付し, 恒温槽より一定の温度の水をじゅん環するようにしたもので, 上部はすり合せガラスでふたをする。

*** 「プロナーゼ」-P⁽⁶⁾ (科研化学 KK 製 45,000 P. U. K/g) を用いた。当酵素は細菌性蛋白分解酵素であって極めて広範囲な基質特異性を有し, グルテンでは全ペプチド結合の 80% を切断するといわれる。

水, 0.02 M, 0.04 M, 0.06 M, 0.08 M, 0.1 M, 0.2 M, 0.4 M TCA 各 5 ml を含む試験管に上記懸濁液各 5 ml を加え 3 時間静置した. ついで東洋濾紙 No. 5 C で濾過し, 各濾液について Cu-Folin 比色法での 750 m μ の吸光度を測定した. この場合, 蛋白濃度の高いものは適当な稀釈液について測定し, 原液の吸光度に換算した. また濾液の 420 m μ の吸光度を測定し, それをもって濾液の混濁度の指標とした.

結果及び考察

I) 照射によるプロナーゼ分解度の変化

i) 盲検用濾液の変化: 照射試料の盲検用濾液の Folin 呈色度は線量の増加につれて増加した (第 1 表). しかし注意すべきことには, これら盲検の窒素量を測定すると, 窒素量も線量の増加につれて増加するが, その増加の度合が Folin 呈色度におよばなかったことである. すなわち照射試料呈色度/照射試料窒素量, および照射試料窒素量/照射試料窒素量を比較すると前者の値が高かったことである (第 1 図). 1 例を示せば 1000 $\times 10^4$ rep の盲検の Folin 呈色度は対照のそれの約 3.6 倍であるのに, 窒素量では約 2.1 倍であった. そのため照射試料の盲検の単位窒素当りの Folin 呈色度は対照のそれより高くなった (第 1 図参照). これらのことから, 小麦グル

第 2 図 γ 線照射による小麦グルテンのプロナーゼ分解度の変化 (Folin 比色法による)

○—○ 対 照 △.....△ 100 $\times 10^4$ rep
+----+ 300 $\times 10^4$ rep ●-----● 600 "
●——● 1000 "

図中の値は 2 回測定の前平均値である.

テンに γ 線を照射するときは, 主として低ペプチドからなると考えられる非蛋白性物質を生ずることは明らかであり, それらは対照試料に認められる非蛋白性物質とは勿論のこと, また線量の差異によっても質的にそれぞれ異った物質であろうことが察知された.

ii) プロナーゼによる分解度の変化: 第 2

図に照射小麦グルテンのプロナーゼによる分解度の変化を示した. Folin 比色法を用いて, 各反応時間における呈色度より盲検のそれを減じた値をもって分解度を表わした場合は, グルテンのプロナーゼに対する感受性は線量の増加につれて低下するという結果をえた.

しかし試料グルテンは照射によって変性し, 基質としては質的に異った物質となっているとみなすべきであり, Folin 比色法は蛋白の種類, また未変性と変性によっても呈色度に差異⁽⁷⁾のあることが指摘されており, この方法での結果からだけで判定を下すことは不適當である.

そこで各反応時間ごとに窒素量を測定し, 反応混液中の総窒素量に対する百分率を求めた (第 3 図). 図に示されるように反応時間 30 分で全試料の窒素量がほぼ等しくなり, それ以上の反応時間では線量の増加につれて窒素量の減少をきたした. そして各反応時間における窒素量より盲検のそれを減じて作図すれば第 1 図と同傾向のグラフがえられる. この結果は照射によって小麦グルテ

第 1 表 照射による盲検用濾液の Folin 呈色度の変化

照射量 (rep)	0	100 $\times 10^4$	300 $\times 10^4$	600 $\times 10^4$	1000 $\times 10^4$
呈色度	0.064 ± 0.002	0.078 ± 0.004	0.107 ± 0.001	0.154 ± 0	0.226 ± 0.004

2 回測定の前平均値

第 1 図 照射によるプロナーゼ分解盲検用濾液の Folin 呈色度及び窒素量の変化

●——● 対照 Folin 呈色度に対する照射試料呈色度
○——○ 対照窒素量に対する照射試料窒素量
○.....○ Folin 呈色度/mg 窒素

第3図 照射によるプロナーゼ分解濾液中の窒素量の変化

図中の値は2回測定の実値。

○—○ 対 照 △·····△ 100×10⁴ rep
+---+ 300×10⁴ rep ●·····● 600 "
●—● 1000 "

ンの蛋白分解酵素プロナーゼに対する感受性が低下することを確証するものと考えられる。

小麦グルテン蛋白は照射によって構造変化をおこし、高線量照射試料ではその上さらに分子の細断を生ずることはすでに前報⁽⁵⁾において報告したが、それらの結果からグルテンは線量の増加につれて酵素による分解を受けやすいものになることが予想されたが、事実は逆に線量の増加につれて分解度の減少をきたした。この現象はグルテン照射変性機構を検討する上にたいへん興味ある問題と考えられる。

II) TCA 濃度変化によるグルテン蛋白分別濾液の Cu-Folin 呈色度及び混濁度の変化

試料グルテンの蛋白を TCA 濃度を変化させることによって分別し、それぞれの濾液中の蛋白濃度の変化を Cu-Folin 比色法によって、またそれらの混濁度の変化を 420 mμ の吸光度を測定することによって検討した。

Cu-Folin 法⁽⁷⁾は Folin 法にピウレット法の長所をとり入れた比色法で蛋白質をアルカリ性銅溶液で処理した後、Folin-Ciocalteu のフェノール試薬を加えるもので、蛋白質の種類による発色率の不ぞろいが相当程度改良されている。

グルテンの酢酸抽出液の Cu-Folin 呈色度は照射によってほとんど変化⁽²⁾しないことを認めており、TCA 分

第4図 TCA 濃度変化による照射グルテン分別濾液の Cu-Folin 呈色度の変化

図中の値は 3~4 回測定の実値である。

○—○ 対 照 △·····△ 100×10⁴ rep
+---+ 300×10⁴ rep ●·····● 600 "
●—● 1000 "

別濾液中の蛋白の変化の検討に当法を適用しようと考えられる。

第4図に示したように、0.02 M TCA 濃度以外のすべての濃度においては、濾液の呈色度は線量の増加につれて増加した。しかし 0.02 M 濃度における結果は特異的で、300×10⁴ rep までは線量の増加につれて呈色度の増加をみたが、600×10⁴ rep の呈色度は 100×10⁴ rep より高いが 300×10⁴ rep より低く、1000×10⁴ rep では対照の呈色度を下まわる値を示した。

また照射試料の 0.03~0.1 M TCA 濃度の呈色度より対照試料のそれぞれの濃度における呈色度を減じた値は、TCA 濃度に関係なくほぼ等しい値となった。すなわち 0.03~0.05 M 濃度範囲においては、照射試料の呈色度の増加は 0.1 M 濃度における呈色度の増加に等しい、換言すれば照射試料の呈色度の増加は、0.1 M でも沈でない非蛋白性物質の増加が主要因となっていることを示唆するものである。また 300×10⁴ rep までは 0.02 M 濃度においても上記の現象が認められたが、600×10⁴ rep 以上では認められなかった。

600×10⁴ rep 以上の試料の 0.02 M 濃度における挙動は、このような高線量では酢酸可溶性蛋白フラクション(主としてグリアジンとみなされる)にもまた強い変化を生ずることを明示するものと解釈される。

第 5 図 照射グルテン TCA 分別
濾液の混濁度の変化

図中の値は 3 回測定の前平均値である。

- 対 照
- ⊙—⊙ 100×10⁴ rep
- ⊕—⊕ 300 "
- 600 "
- 1000 "

の試料では、TCA 濃度零においてもすでに混濁していた。0.01 M 濃度でも変りはなかったが、0.02 M および 0.03 M 濃度では特異的な変化を示した。すなわち 0.02 M 濃度では 300×10⁴ rep までは線量の増加につれて吸光度は増加したが、600×10⁴ rep では 100×10⁴ rep のそれより低く、1000×10⁴ rep では対照よりさらに低い値を示した。0.03 M 濃度では線量の増加につれて吸光度は減少し、1000×10⁴ rep では透明であった。また 0.04 M 以上の濃度では全試料とも無色透明となった。

0.02 M TCA 濃度では、第 4 図から 600×10⁴ rep 以下の線量では液中の蛋白量はほぼ等しいと考えられるにもかかわらず、混濁度に変化を生ずることから、グルテンの酢酸可溶性フラクションは 100×10⁴ rep 以下の線量ですでに変化していると認められた。しかし 300×10⁴ rep 以下の線量では 0.02 M TCA 濃度の分別濾液を水で 2 倍に稀釈すると、著しく混濁していた液が透明にもどることから、その変化は激しいものでないと推定された。

前報において照射試料の酢酸可溶性蛋白フラクション中には 105,400 ×g の遠心力でも沈でんしないもののあることを認めたが、当実験の結果からその一部は主として低ペプチドよりなる非蛋白性物質であると認めることができた。

試料グルテンの各 TCA 濃度における分別濾液の 420 mμ における吸光度を示すと第 5 図の如くなる。

600×10⁴ rep 以上

当実験の結果から可溶性蛋白フラクションも照射変性を生じていることが明らかであり、特に 600×10⁴ 以上の高線量においてはその変性が著しいことを確認した。

要 約

照射小麦グルテンについて、蛋白分解酵素「プロナーゼ」による分解度の変化、また試料の酢酸懸濁液中の蛋白を TCA 濃度を变化させることによって分別し、それらの濾液について Cu-Folin 呈色度および混濁度 (420 mμ の吸光度で表わす) の変化を測定し、グルテン蛋白の照射変性を検討した。

(1) 小麦グルテンは照射線量の増加につれて「プロナーゼ」によって明らかに分解され難くなることを認めた。

(2) 照射線量の増加につれて、グルテン蛋白中に非蛋白性物質の増加を認めた。そしてこの物質の窒素単位量当りの Folin 呈色度は線量の増加につれて増加することを認め、これらの物質は照射線量によって質的に異なるものであると結論した。

(3) 0.02 M の濃度において、照射試料の TCA 分別液の Cu-Folin 呈色度および混濁度は、他の濃度における分別液の挙動とは著しく異っており、これらの結果からグルテンの酢酸可溶性蛋白部分 (主としてグリアジンと考えられる) も照射によって変化し、特に 600×10⁴ rep 以上の高線量で著しいことを確認した。

本実験の御指導賜った京都大学秦 忠夫教授、日本製粉青山監査役、御助力、御鞭撻いただいた東京水産大学岡田郁之助教授に深く感謝の意を表します。

- (1) 道口正雄, 横山義春, 岡田郁之助 : 工化誌, 62, 1883 (1959).
- (2) 道口正雄, 岡田郁之助 : 同上, 65, 1837 (1962).
- (3) 道口正雄, 横山義春, 岡田郁之助 : 同上, 66, 718 (1963).
- (4) 道口正雄 : 本誌, 38, 100 (1964).
- (5) 道口正雄 : 本誌, 38, 328 (1964).
- (6) 「プロナーゼ」: 科研化学株式会社.
- (7) 日本化学会編 : 実験化学講座, 23, 丸善, p. 37 (1961).