

穀類蛋白質の構成ポリペプチド並びに 穀類汚染細菌による栄養評価

宅見賢二¹⁾・三木和香子²⁾・宇高順子²⁾

¹⁾ (愛媛大学教育学部食品栄養学研究室)

²⁾ (同 調理学研究室)

(平成6年4月28日受理)

SDS-PAGE Profiles of Major Protein Fractions from Cereal Grains and Nutritional Assessment for the Cereal Albumins by Grain-Contaminant Bacterial Growth Curve

Kenji TAKUMI¹⁾, Wakako MIKI²⁾ and Junko UDAKA²⁾

*Laboratory of Food and Nutrition¹⁾, and Cooking²⁾, Faculty of Education,
Ehime University, Matsuyama, Ehime, 790 Japan*

(Received April 28, 1994)

Major protein fractions from cereal grains were extracted by the Osborne method and compared by SDS-PAGE analysis. Correlation of amino acid compositions in the individual albumin fractions with the growth curves of the grain-contaminant bacteria which were cultured in the medium containing the albumin as only one nitrogen source was discussed.

Wheat, buckwheat and rice proteins displayed their individual major marker protein subunits which have been generally known as the HMW for wheat glutelins, the 25 kDa and 32 kDa for buckwheat globulins and for rice glutelins.

In millets, however, significantly similar SDS-PAGE patterns of polypeptide components were seen among their individual fractions, especially proso and Italian millets contained almost identical polypeptide subunits in their albumin, globulin and prolamin fractions.

Although the grain-contaminant bacterial growth curves were found to be variable depending on the each cereal albumins, some correlations between the bacterial growth and nutritional quality of cereal proteins were observed, suggesting that bacterial growth curves by means of cereal proteins may be an useful tool for nutritional assessment of cereal proteins.

はじめに

穀類蛋白質は、通常、オズボーン法¹⁻²⁾に従い、水溶性のアルブミン、希薄中性塩溶液可溶性のグロブリン、70%エタノールまたは50%プロパノール³⁾可溶性のプロラミン及び希薄なアルカリ⁴⁾あるいは酸⁴⁾に可溶性なグルテリン、の4画分に分画される。コメ、アワ、キビ、ヒエはいうまでもなく日本古来の穀類であり、それ故これらの食品学的、栄養学的調査研究に関する膨大な蓄積がある⁵⁻⁷⁾。しかしながら、上記の穀類のうちコメ以外、特にキビ、ヒエについては、オズボーン分画の蛋白質画分についての報告は少なく、従ってこれらのポリペプチドやアミノ酸組成など蛋白質の化学的性質に関する基礎的知見も乏しいようである⁸⁾。この研究では、上記の穀類についてのオズボーン法により主要蛋白質を分画し、それらのポリペプチド組成を SDS-PAGE により分析比較することで、各穀類蛋白質の特徴をサブユニットのレベルで明らかにした。

一方、穀類の細胞汚染は、従来から食品衛生学上極めて重要な問題のひとつである。近時の外国米輸入については過去の黄変米事件⁹⁾の再現を伴う危険性を否定できない。したがって、いわゆる環境汚染細菌と称される大腸菌、枯草菌、セレウス菌などによる穀類汚染については、食中毒の予防範囲を越えて、ペスト、コレラなど検疫伝染病との関連において、その食品衛生学的意義が再検討されねばならない。穀類成分のなかで汚染細菌の増殖との関係が考えられるオズボーンの蛋白質成分としては、水溶性アルブミンと低濃度食塩可溶性グロブリンの2種類の蛋白質が考えられる。本研究では、水に可溶性アルブミンを各穀類から分画し、それらが穀類汚染細菌の増殖に及ぼす影響をアミノ酸組成と菌の増殖曲線の関連から検討し、穀類アルブミンの栄養評価を試みた。

実験材料と方法

1. 穀物

小麦、大麦、ライ麦、コーン、ソバ、ウルチ米、モチ米は市販の粉末製品を用いた。アワ、ヒエ、キビは市販粗挽きしたものを小型製粉機で粉末にし、常法¹⁰⁾に従いアセトン脱脂乾燥粉末にして用いた。

2. 蛋白質の抽出

- 1) アルブミンとグロブリン： ソバ脱脂粉末10 g を100ml の 5 S-PB (5%食塩加生理的リン酸緩衝液, pH7.2) に浮遊させ、マグネチックスターラーで室温で2時間攪拌した後、遠心分離 (18,000×G, 20分間) した。得られ上清を一晩水に透析した後、再び遠心分離し、上清 (アルブミン) と沈殿 (グロブリン) に分けた。各蛋白質画分は凍結乾燥して、-20℃又は4℃に保存した。他の穀類についても、同様な手順でアルブミンとグロブリンを分画した。
- 2) プロラミン： 1) で得られた 5 S-PB 不溶残渣 5 g (乾燥物) を50% n-プロパノール100ml に加え、2時間攪拌した後遠心分離し、上清を水に一夜透析後、生じる沈殿物を遠心分離して集め凍結乾燥した。
- 3) グルテリン： 2) で得られたプロパノール不溶残渣 3 g (乾燥物) に50ml の0.2% NaOH を加え、室温で2時間攪拌した。遠心上清を採り、2 N HCl を加えて酸性

(pH 4.5) にし、生じる沈殿物をグルテリンとした。グルテリンは水洗後凍結乾燥した。

3. 使用菌株と培養

大腸菌 (*Escherichia coli* K-12, wild type), 枯草菌 (*Bacillus subtilis* H, IAM1521), セレウス菌 (*Bacillus cereus* No. 3131) は徳島大学医学部細菌学講座 (徳島市蔵本町 3, 770 徳島) 木内武美博士より分与された。各菌株は普通寒天培地に 37°C で培養した。

4. 細菌増殖曲線の作成

各穀類から 5 S-PB で抽出したアルブミンを PBS に溶解 (蛋白質量として 3~4 mg/ml) し、濾過殺菌後その 1 ml を、オートクレーブした PBS 9 ml 入り枝つき三角フラスコ (100ml 容量) に無菌的に加えた。普通寒天培地で一夜培養した菌を一白金耳あて、均等に浮遊 (この時 660nm の吸光度, O.D., は通常 0.03~0.05 の範囲) させてから 30°C で震盪培養し、経時的に 660nm の吸光度を測定して増殖曲線を作成した。

5. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

SDS-PAGE は Laemmli¹¹⁾ の方法に従った。試料をエッペンンドルフ遠心管に採り、1% 濃度に試料用緩衝液を加えて溶解し、100°C 5 分間煮沸後遠心分離し、その上清を泳動試料溶液とした。試料を 10~15 µl あて 15% ポリアクリルアミドゲルの試料溝に注入し、20mA で約 1 時間泳動した。蛋白質は 0.1% Commsie Brilliant Blue-10% メタノール 10% 酢酸混液で染色した。脱色はメタノール酢酸混液で行った。

6. 化学分析

固形試料の蛋白質量は、キエルダール法で得た N 量に各穀物の N 係数を乗じて算出した。液体試料の場合は Lowry 法¹²⁾ により牛血清アルブミンを標準蛋白質として定量した。

結果と考察

1. 穀類蛋白質の構成ポリペプチド (図-1, 図-2)

各穀類 (コメ, 小麦, ヒエ, アワ, キビ, ソバ) からオズボーン蛋白質を分画し, SDS-PAGE で分離展開した結果を図-1 (A~F) に示した。オズボーンの蛋白質分画の原理は, 溶媒に対する各蛋白質の溶解性の相違に基づくので, 化学的性質の差による分画とは異なり各画分間に重なり合う成分が共存するのはやむをえない。しかし, 各穀物は比較的それ独自のパターンを示す傾向が強く, 単子葉植物と双子葉植物では種子蛋白質の相違は明らかで, 例えば, ソバと小麦蛋白質では各画分に各々の特異性がかなり顕著である。即ち, 小麦アルブミン (パネル A) は, 主要なポリペプチドは分子量 18 kDa 以下のものが多いが, ソバ (パネル B) では, むしろ 18~30 kDa の範囲のものが多い。小麦グロブリンの構成ポリペプチドは低分子から高分子の領域 (10~50 kDa) に広く分布するが, ソバでは蛋白質の主画分は食塩水可溶グロブリンで, 主要なポリペプチドは此の画分に集中的に現れ, 分子量 25 kDa および 32 kDa のペプチドバンドが顕著である。一方, 小麦蛋白質の主成分であるプロラミン (全蛋白質の 80% を含む¹³⁾) では, 主要なポリペプチドは分子量が 27 kDa ~ 40 kDa の領域に分布する。一方, ソバプロラミンは前者とは逆にマイナー (全蛋白質の数%¹⁴⁾) である。小麦グルテリンの主成

分は分子量90 kDa以上のHMW（高分子量ポリペプチド）を含む¹³⁾。

コメ蛋白質の特徴はグルテリン画分が全胚乳蛋白質の約70%を占めていることである¹⁵⁾。図-1, パネルCにみるように, グルテリン画分では見かけのMWが約32 kDaと23 kDaの2つのバンドが目立つ。これらはコメグルテリン

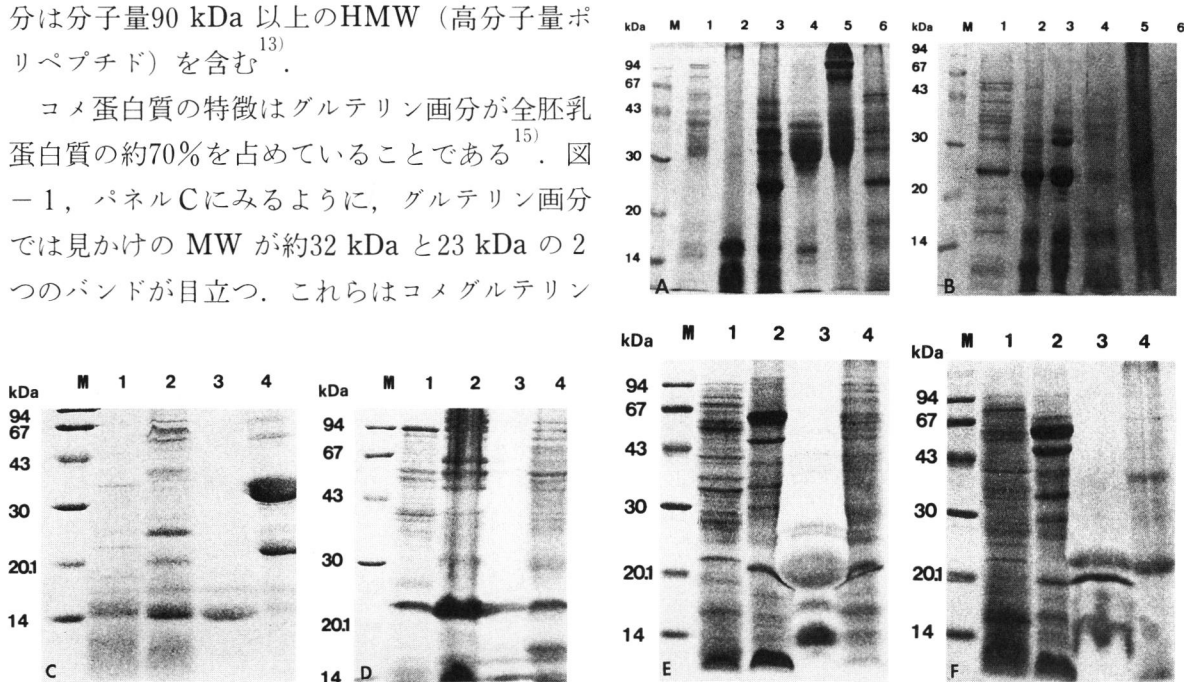


Fig. 1. Comparison with SDS-PAGE patterns of protein fractions extracted from various grains. Panel A (wheat) and B (buckwheat) : Lanes 1 to 6 contain total flour, albumins, globulins, prolamins, glutelins and the insoluble residue at concentrations of about 40 to 50 μ g of protein, respectively. Lane M contains low molecular weight standard proteins (see the materials and methods). The same shall apply hereinafter. Panel C (rice) and D (sawa millet) : Lanes 1 to 4 contain albumins, globulins, prolamins and glutelins, respectively. Panel E (Italian millet) and F (proso millet) : The lanes contain the fractions corresponding to those in the panel C or D.

固有のサブユニット55 kDaの亜サブユニットに相当する。他の画分で特定すべきポリペプチドバンドはMWが16 kDaで, アルブミン, グロブリンおよびプロラミンに共通している。この16 kDaサブユニットはコメアレルゲンと特定されており¹⁵⁻¹⁶⁾, 現在これを含まないコメの開発が遺伝子工学的手法で進みつつある¹⁵⁻¹⁷⁾。

ヒエ（パネルD）では, みかけのMWが23 kDaのバンドが全画分にそれぞれの主要サブユニットとして検出された。他の穀物のそれに比して際立った特徴である。

アワとキビ（パネルEとF）のポリペプチド構成は, グルテリン画分を除く3画分では極めて高い類似性が見られる。アワ, キビ, ヒエ3種（いずれもイネ科キビ亜科キビ族）間相同性は, 特にアワ, キビ間にその傾向が強い。

各蛋白質画分のデンシドメータースキャニングパターンで比較すると, 蛋白質相互の相同性または非相同性がより明確に示された（図-2, パネルA~D; 比較の目的で小麦蛋白質の各画分を並記した）。先ず, アルブミン（パネルA）では低分子量（10 kDa）から高分子量域（96 kDa）全体に多数のマイナーなペプチドバンドが連続的に分布し, キビとアワでかなりの類似性がみられた。グロブリン（パネルB）ではアルブミン同様にマイナーバンドが広範囲にみられたが, 11 kDa付近と57 kDaの近傍に出現したバンドはおおむね両蛋白質に共通である（小麦以外）。プロラミン（パネルC）では他にみられない高い相同性が示された。MW 20~23 kDaの範囲に出現した主要なバンドは多少のばらつきはあるものの, コメ, 小麦を除

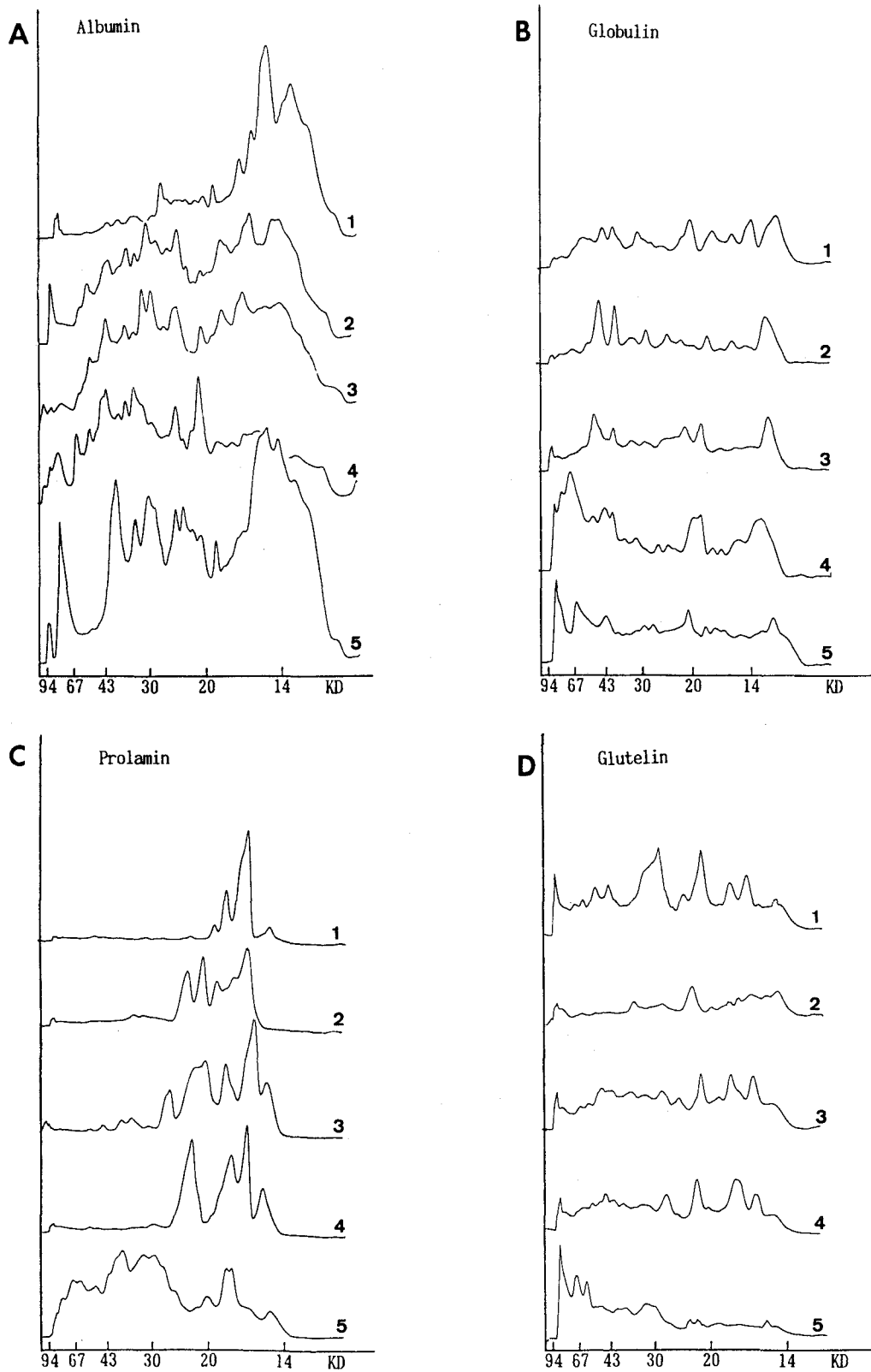


Fig. 2. Comparison of SDS-PAGE profiles of the individual protein fractions from cereal grains. Scanning of the stained gels was carried out by a densitometer.

Panels A to D are to be correspond to albumins, globulins, prolamins and glutelins, respectively.

Line 1 to 5 denote uruchi-rice, proso millet, Italian millet, sawa millet and wheat, respectively.

くキビ、アワ、ヒエではその近傍の MW を持つバンドパターンの特異性が著しい。グルテリン (パネル D) ではコメ以外の穀物では特に目立つバンドは指摘されなかった。以上の穀類蛋白質間の構成ポリペプチドの同質性は、遺伝学的同源性つまり系統発生的起源の同一性に起因する¹⁸⁾。

2. アルブミン蛋白質の栄養価と穀類汚染細菌増殖曲線の相関性 (表-1, 表-2, 図-3)

穀類またはその調理品あるいは加工食品由来細菌は、通常いわゆる穀類汚染細菌が主であ

Table 1. Amino Acid Compositions of Albumin Fractions from Cereal Grains (mol%)

Amino acid	Albumin fractions ^a from						
	Rice		Barley	Wheat	Rye	Corn	P. Millet
	Uruchi ^b	Mochi ^b					
Asp	10.8	8.9	4.8	7.8	6.8	13.0	4.6
The	4.7	4.3	2.8	3.9	3.3	4.0	4.6
Ser	5.2	4.5	3.2	4.6	4.1	4.2	4.5
Glu	12.5	11.0	30.0	27.2	30.5	13.2	21.5
Pro	6.6	6.3	14.0	11.4	15.3	8.9	4.9
Gly	6.9	6.1	2.9	4.9	3.8	6.1	6.3
Ala	8.7	8.0	3.2	5.4	4.1	6.7	6.9
Cys	2.9	2.2	1.2	5.7	2.7	3.7	2.4
Val	8.7	6.3	5.0	5.8	5.2	3.9	5.1
Met	2.5	2.8	2.9	1.9	2.2	1.1	1.7
Ile	4.1	3.0	3.7	3.8	4.2	2.6	3.1
Leu	7.9	7.5	6.7	8.5	6.7	3.8	6.0
Tyr	3.9	4.8	2.6	3.9	2.2	2.5	3.1
Phe	3.0	4.0	5.4	6.0	5.2	2.1	3.3
Lys	4.9	5.7	2.8	4.7	3.4	6.0	6.4
His	2.6	2.2	2.0	2.3	2.1	2.3	2.6
Arg	8.4	8.0	3.9	5.2	4.6	7.2	9.1

^aShukla, T. P. (2).

^b岩崎哲也 他, 1975, 日食工誌, 22: 113-118.

Table 2. Essential amino acid composition of cereal albumins

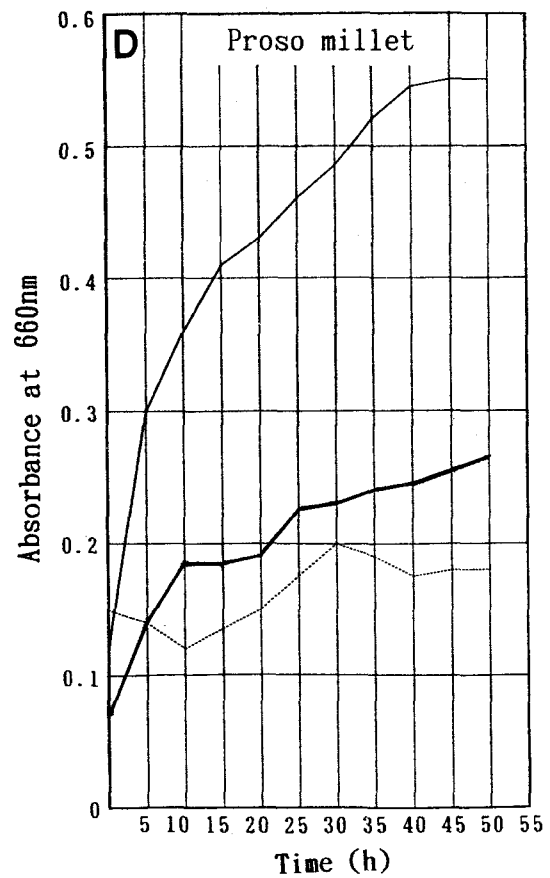
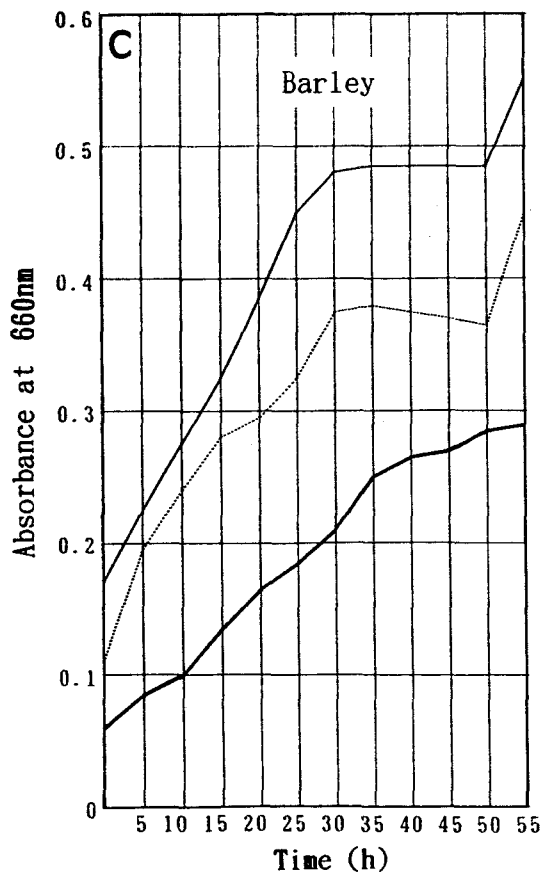
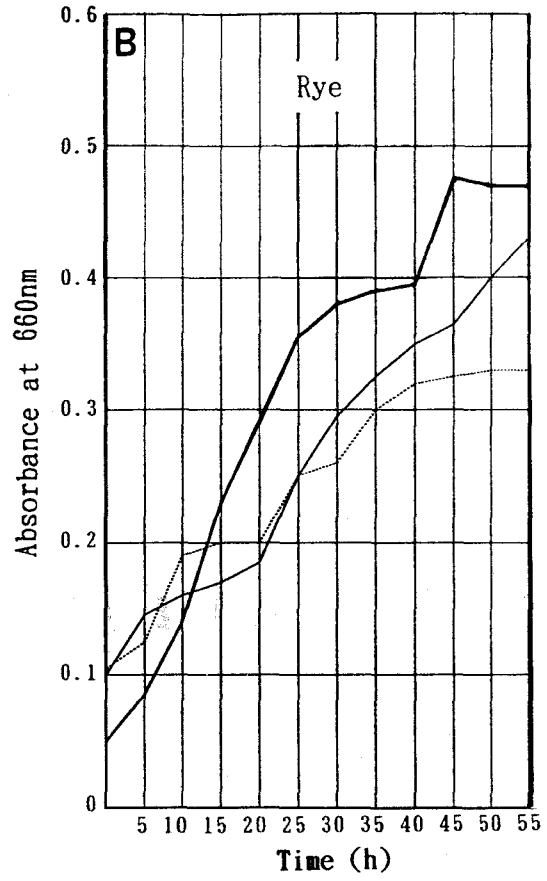
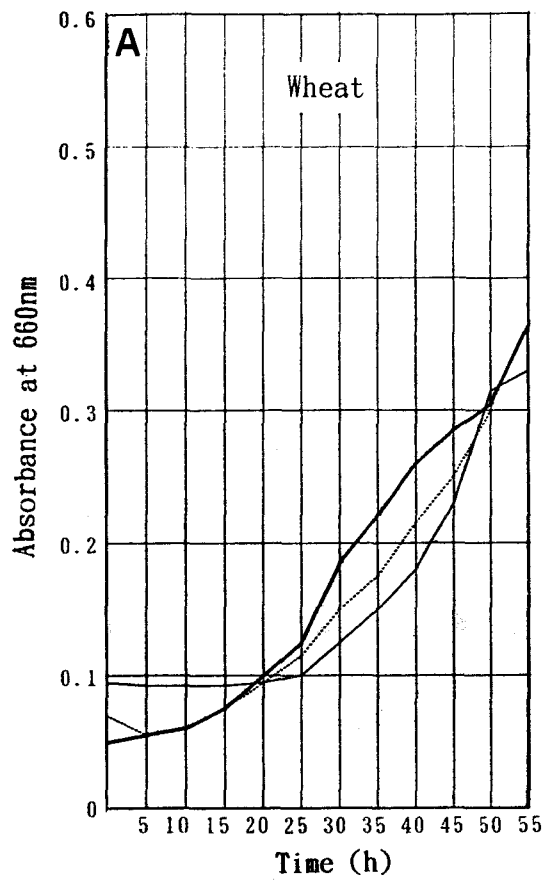
Essential Amino acid	Proso				Rice		
	Wheat	Rye	Barlery	Millet	Uruchi	Mochi	Corn
Ile	3.8	4.2	3.7	3.1	4.1	3.0	2.6
Leu	8.5	6.7	6.7	6.0	7.9	7.5	3.8
Lys	4.7	3.4	2.8	6.5	4.9	5.7	6.0
Cys+Met	7.7	4.9	4.1	4.1	5.4	5.0	4.9
Phe	6.0	5.2	5.4	3.3	3.0	4.0	4.9
The	3.9	3.3	2.8	4.6	4.7	4.3	4.0
Val	5.8	5.2	5.0	5.1	8.7	6.3	6.0
EA ^a	40.4	32.9	30.5	32.7	38.7	35.8	32.2
TA ^b	112.2	106.4	97.1	96.2	96.0	93.1	91.3
EA/TTA ^c	36.0	30.9	31.4	34.0	40.3	38.5	35.3
Types of BGC ^d	小麦型		大麦型		コメ型		コーン型

^aTotal amounts of essential amino acids.

^bTotal amounts of amino acids from Table 1.

^cNutritional values.

^dAbbreviation of the type of bacterial growth curves.



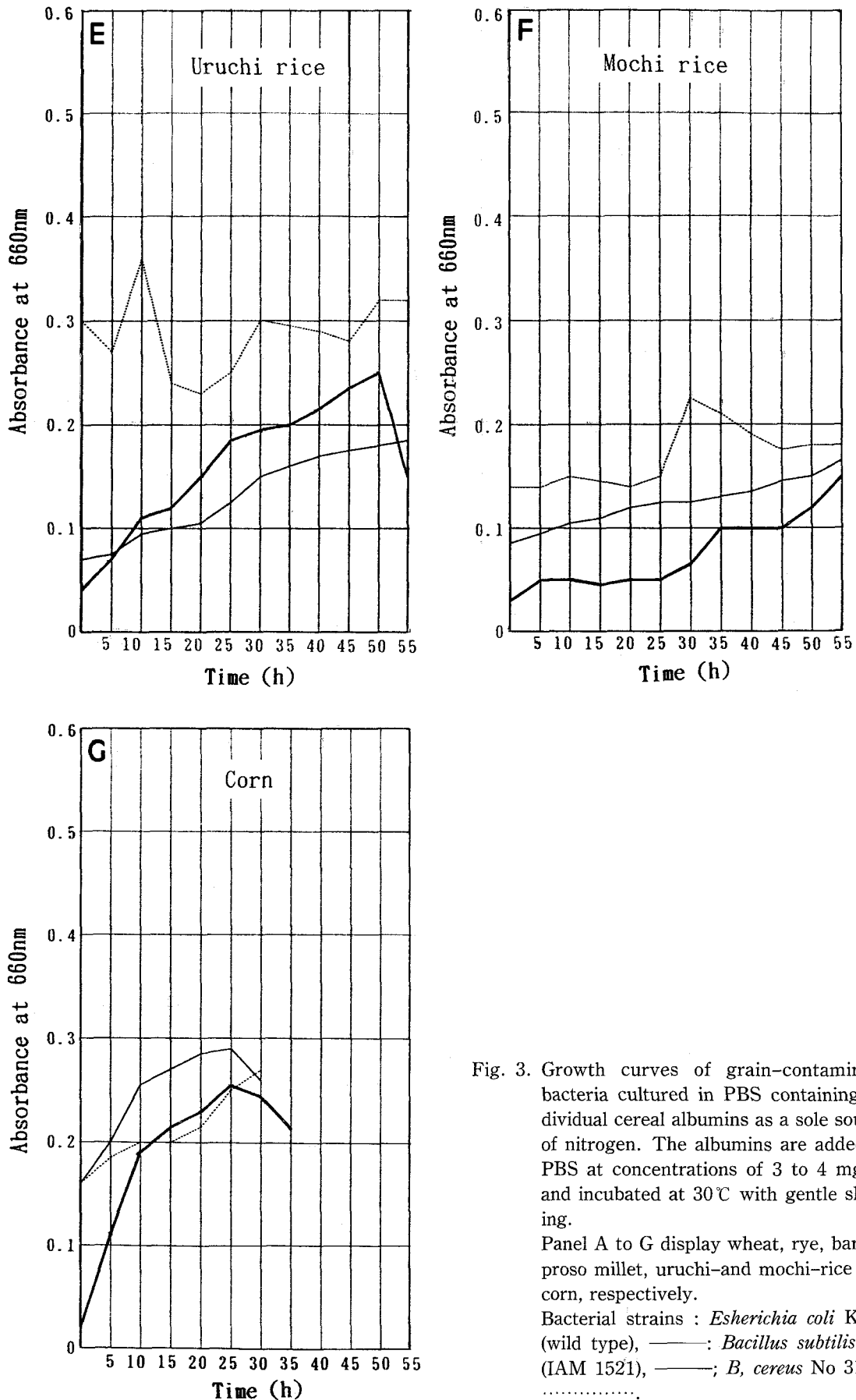


Fig. 3. Growth curves of grain-contaminant bacteria cultured in PBS containing individual cereal albumins as a sole source of nitrogen. The albumins are added in PBS at concentrations of 3 to 4 mg/ml and incubated at 30°C with gentle shaking.

Panel A to G display wheat, rye, barley, proso millet, uruchi- and mochi-rice and corn, respectively.

Bacterial strains : *E. coli* K 12 (wild type), ———: *B. subtilis* H (IAM 1521), ———; *B. cereus* No 3131,

る¹⁹⁾。実験では代表的汚染細菌として大腸菌、枯草菌およびセレウス菌を選び、菌の増殖に穀類アルブミンの栄養価（アミノ酸価）が如何なる影響を及ぼすかについて検討するために、あわせて個々の試料アルブミンのアミノ酸組成も文献より整理した（表-1）。

1) 穀類アルブミンのアミノ酸組成： 穀物アルブミンのアミノ酸組成で目につくことは、アスパラギン酸、グルタミン酸およびプロリン含量が他のアミノ酸に比して高いことである。プロリンは大麦やライ麦に比較的高い。その他のアミノ酸では、アラニン、リジンおよびアルギニンが大麦とライ麦以外では優勢なアミノ酸である。小麦などでは一般にリジン量の不足が言及されることが多いが、これはオズボーン法の4種類の蛋白質のなかで最も高い含有量を示す蛋白質画分であるプロラミンのアミノ酸組成に全体のそれが支配されるからである。

上記の各穀類アルブミンの栄養価は、ここでは便宜的に、表-1で得られた全アミノ酸量（TA）に対する全必須アミノ酸量（EA）の比率（EA/TA）で表示した（表-2）。細菌とヒトの必須アミノ酸およびその適正バランスは勿論異なるであろうが、ここではヒトでの栄養価の表示が細菌の増殖と比例するか否かをみた。これで見ると栄養価はコメ、小麦が高く、ライ麦と大麦が低い。このアルブミンの栄養価が穀類汚染細菌の増殖に如何なる影響を及ぼすかを見たのが次の実験である。

2) 細菌増殖曲線と栄養価： アルブミンを唯一の栄養源として含むPBSに、小麦、ライ麦、大麦、キビ、コーン、ウルチ米およびモチ米のアルブミンを溶解後、660nmのO.D.が0.05付近になるように大腸菌、枯草菌およびセレウス菌の一夜培養菌を接種し、30℃で震盪培養し、菌の増殖に比例する濁度（O.D.）の変化を測定した。増殖曲線のパターンから、7種の穀類は小麦型、大麦型、コメ型およびコーン型の四型に型別された（図-3）。小麦とライ麦（パネルAとB）では、3菌種とも比較的同調的に増殖し、約5時間培養後、ほぼ同程度のO.D.値（0.3~0.45）に達した。大麦とキビ（パネルCとD）ではともに大腸菌が優先的に増殖し、そのO.D.値は0.5を越えた。コメ型（パネルEとF）では3菌種の増殖は55時間後でもO.D.は0.2または0.3の低値であった。コーン（パネルG）では約25~30時間後増殖曲線はいずれも自己融解を生じ下降した。以上に見るように、各菌の増殖はアルブミン由来の穀物種に依存してかなり特異的ともいえるパターンを示した。

栄養価と増殖曲線の相関性については、図-3（パネルCとD）や表-2に示したように、大麦やライ麦など相対的に低栄養アルブミンのほうが高栄養のもの（コメ、コーン）より曲線の立ち上がりの角度やO.D.の値が高い（ともに細菌増殖性が高い、つまり栄養効果が高いことを示す）という一見矛盾した結果が得られた。もちろんアルブミンの栄養価が直接汚染細菌の栄養源に相当しないことはいうまでもない。しかし、アルブミンと共存するであろう無機質や微量金属のみの影響とは考え難い未確認物質（例えば糖脂質など）の影響を、図-3の各パネルは暗示している。動物実験の併用などによる詳細な研究が必要なようである。

ま と め

1) コメ、小麦、アワ、キビ、ヒエ及びソバの主要な蛋白質（アルブミン、グロブリン、プロラミン及びグルテリン）をオズボーン法で分画し、それぞれの構成ポリペプチドをSDS-PAGEで解析した。その結果、小麦では、グルテリンの高分子領域ポリペプチドいわゆるHMWが、ソバではアルブミンやグロブリンの25 kDa および32 kDa サブユニットが、それ

ぞれ主要な構成ポリペプチド成分であること、コメではグルテリンの23 kDa と32 kDa が主な蛋白質サブユニット成分であること、ヒエでは23 kDa が全蛋白質画分に分布すること、アワとキビの構成ポリペプチドは極めて相同性が高い分布パターンを有すること、などが明らかになった。またアワ、キビ及びヒエの各プロラミンポリペプチドは、ほぼ等しい分子量23 kDa をほとんど唯一のサブユニットとして有することが示された。

2) 小麦、大麦、ウルチ米、モチ米、ライ麦、コーンの各アルブミンを唯一の窒素源として、穀物汚染細菌として大腸菌、枯草菌およびセレウス菌を培養し、それらの増殖曲線と各アルブミンの化学的栄養価（全必須アミノ酸量/全アミノ酸量×100）の比較をした。その結果、栄養価とは直接的な関連こそみられなかったが、各穀物アルブミンと汚染菌の増殖性とのあいだにはそれぞれ固有な対応関係が成立する可能性が指摘された。

文 献

- 1) Osborne, T. B., 1924, in *The Vegetable Proteins*. Longmans, Green & Co. : London. pp 154.
- 2) Shukla, T. P., 1975, *CRC Critical Rev. Food Sci. Nut.*, 6 : 1-75.
- 3) Byer, M., Miflin, B. J. and Smith, S. J., 1983, *J. Sci. Food Aric.*, 34 : 447-462.
- 4) Skoch, L. V., Deyoe, C. W., Shoup, F. K., Bothyrst, J. and Liang, D., 1970, *Cereal Chem.*, 47 : 472-481.
- 5) Rost. T. L., 1972, *Amer. J. bot.*, 59 : 607-611.
- 6) Tanaka. T, Sugimoto. T, Ogawa. M and Kasai. Z, 1980, *Agric. Biol. Chem.* 4 : 1633-1638.
- 7) Juliano, B. D., 1985, in *Rice Chemistry and Technology*, (ed.), B. D. Juliano, Am. Assoc. Cereal Chemist, pp 16-23.
- 8) 山田一恵, 宇理須保栄雄, 駒田英勝, 1991, *アレルギー*, 40 : 1485-1492.
- 9) 荒木峻, 沼田真, 和田攻 編集, 1991, *環境科学辞典*, 東京化学同人, p.100.
- 10) Matsuda, T., Nomura, R. and Sugiyama, M. 1991, *Agric. Biol. Chem.* 55 : 509-513.
- 11) Laemmli, U. K., 1970, *Nature*, 227 : 681-684.
- 12) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., 1951, *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275.
- 13) Shewry, P. R. and Miflin, B. J., 1985, *Adv. Cereal Sci. Technol.*, 7 : 1-84.
- 14) Javornik, B. et al., 1981. *Genetika*, 31, 115-121.
- 15) 西村いくこ, 1987, *蛋白質 核酸 酵素 別冊30* : 61-72.
- 16) Masuda, T., Sugiyama, M., Nakamura, R. and Torii, S., 1988, *Agric. Biol. Chem.*, 52 : 1465-1470.
- 17) Higuchi, M., 1987, *Gene*, 55 : 245-253.
- 18) 塚本洋太郎 総監修, 青葉高 他編集, 1988, *園芸植物大辞典*, 小学館, p. 229.
- 19) Jay, J. M., 1986, *Modern Food Microbiology*, Van Nostrand Reinhold, New York, pp5-6.