

技術解説

グルテンタンパク質のネットワーク形成における食塩の役割

裏出 令子

1. はじめに

パンやうどんなどの小麦粉生地を用いる食品の加工において、食塩（塩化ナトリウム）は欠かすことの出来ない副材料である。例えばパンの場合、食塩によって塩味がととのえられ、酵母などの微生物の増殖速度が抑制されることにより発酵調節が容易になる。しかし、最も重要な食塩の効用は生地の物性の改善である。食塩を入れずに作ったパン生地は腰が弱く、用具や手にべたべたとくっついて綺麗に成形することが困難である。すなわち、食塩を添加することにより生地が引き締まって弾性（伸展性と抗張力）が増し、粘着性が減少するのである¹⁾。食塩の効果は生地の微細構造にも影響しており、透過型電子顕微鏡で生地を観察すると食塩の有無により大きな差異が見られる（図1）。食塩のこのような

効果は、生地中のグルテンを形成するタンパク質間の相互作用への影響によるものと推定されている。すなわち、小麦粉に水を加えてミキシングすることにより小麦粉の主要タンパク質であるグルテニンとグリアジンなどが複雑に相互作用してグルテンが形成されるが、食塩はこれらのタンパク質間相互作用に影響すると考えられている。しかし、食塩がグルテンタンパク質の相互作用に与えている影響の実態や作用機構は殆ど明らかになっていない。近年、食事からのナトリウムの摂取を減らすと高血圧症や心臓血管性疾患発症のリスクが減少することが明らかにされ、ヨー

ロッパではパンに添加する食塩を減らす努力が始まっている²⁾。食塩を減らした生地に適度な物性をもたせる技術を開発するためには、食塩の物性改善効果のメカニズムの解明が

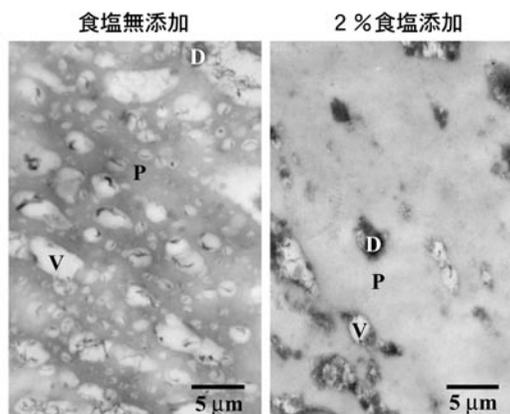


図1 食塩添加あるいは無添加生地の透過型電子顕微鏡写真

P, タンパク質ネットワーク; V, 液胞; D, オルガネラや生体膜の残遺物。

重要であると考えられる。最近、著者らは食塩がグルテン中のグリアジンの性質を変化させるとともに、グルテンタンパク質間の相互作用を強め分子間距離を接近させるという2つの異なる作用を有することを見いだした³⁾。本技術解説では、これらの研究成果を中心にグルテンタンパク質と食塩との関係について紹介する。

2. グルテンを構成する主要タンパク質の特徴

小麦粉に含まれる主要タンパク質をOsborne分画で分類すると、アルブミン、グロブリン及び小麦プロラミンであるグリアジン、そして小麦グルテリンであるグルテニンとなる。これらのうち、グルテン形成及びその物性に中心的な役割を果たしているのはグリアジンとグルテニンで全タンパク質の約70~80%を占める。グルテニンはさらに高分子量(HMW)グルテニンと低分子量(LMW)グルテニンに分類されている。HMWグルテニンには、遺伝子的に異なる5種類のx-type subunitと5種類のy-type subunitが見出されており、品種によって遺伝子発現パターンに違いがある。HMWグルテニンのC末端とN末端には α ヘリックスに富んだ球状のドメインがありこれらは、480から680個のアミノ酸残基からなる β -スパイラル構造で連結されている^{4, 5)}。HMWグルテニンのC末端とN末端に存在するシステイン残基は分子間ジスルフィド結合を形成しており、これによりHMWグルテニンはポリマーとして存在している。LMWグルテニンは電気泳動による泳動距離の違いから、B-, C-, D-type subunitの3グループに分類されている⁶⁾。LMWグルテニンもHMWグルテニンと分子間ジスルフィド結合を形成し巨大なグルテニンポリマーとなっている。そのため、グルテニンは水、塩溶液及びアルコール溶液にほとんど不溶性である。グルテニンはグルテンの弾性に寄与しており、ポリマーのサイズと量がグルテンの強さと相関関係にある。一方、

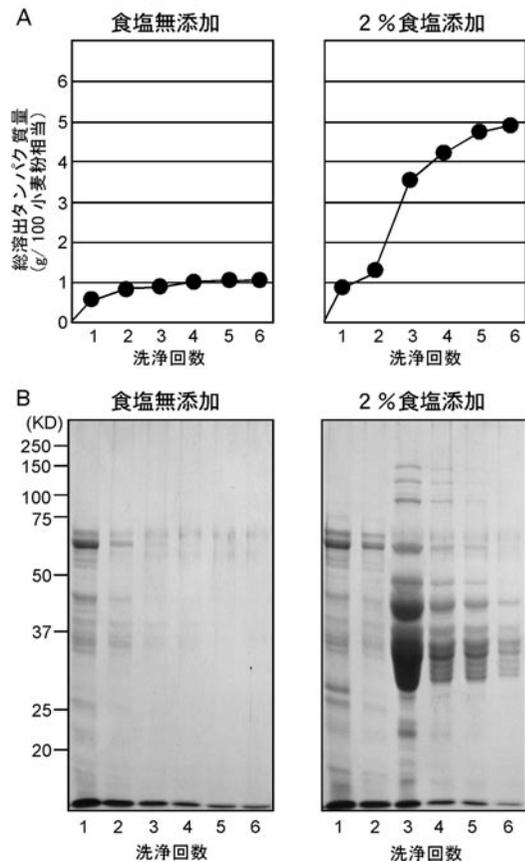


図2 純水洗浄による食塩無添加あるいは食塩添加生地からのタンパク質の溶出量 (A) と溶出したタンパク質のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (B)

グリアジンには α/β -、 γ -、 ω -グリアジンがあり、 α/β -グリアジン及び γ -グリアジンはシステイン残基を有しているが、これらのシステイン残基は基本的には分子内ジスルフィド結合を形成している⁷⁾。従って、いずれのグリアジンもモノマータンパク質として存在している。プロラミンであるグリアジンは水や塩溶液には殆ど溶けず70%エタノールに溶けるタンパク質であるとされ、グルテンに粘性を与えている。小麦粉に水を加えて捏ねると、小麦粉の構成成分が混ざり合い様々な化学反応が生じるとともに、タンパク質間の非共有結合による相互作用にも大きな変化がもたらされる。グルテニンもグリアジンもグルタミンに富んだ繰り返し配列を有する特異な構造をもっているため⁸⁾、グルテニンポリマーを骨格として、これにグリアジンなどのモノマータンパク質が多数の水素結合を形成して会合すると考えられている。さらに、疎水性相互作用なども介在してグルテンの巨大なネットワーク構造が形づくられるとされている。グルテンは食塩の存否にかかわらず形成されるが、食塩が存在している時と存在していない時ではグルテンのタンパク質間相互作用に違いがあると考えられる。

3. 食塩はグリアジンを水溶性にする

グリアジンは代表的なプロラミンで、前述したように水には殆ど溶けないタンパク質であると教科書には記載されている。しかし、食塩によってグリアジンは水溶性になることを筆者らは見出した。この現象は、パン生地のグルテンの性質を調べる目的で食塩を添加した生地を蒸留水で洗ってグルテンを調製する際に発見した。すなわち、食塩入りの生地を純水で繰り返し洗浄すると、グルテン塊から泡が出現し軟化してバラバラになり、最終的なグルテンの収量が食塩を添加しない生地から調製した場合に比して著しく低くなったのである。そこで、標準的な食パンのレシピに従った配合割合の食塩（小麦粉100gに対して2g）を含む生地（小麦粉100g相当）を純水で洗浄し、水へ溶出してくるタンパク質を定量してみると、最初の2回の洗浄ではデンプンの大部分が流出すると同時にアルブミンなどの水溶性のタンパク質が1.2g溶出したが、さらに洗浄を繰り返すと3回目の洗浄液にあらたにタンパク質が大量に溶出し、3～6回目までの洗浄液中に合わせて3.7gのタンパク質が溶出した（図2A）。用いた強力小麦粉のタンパク質含量は小麦粉100g当たり14gであったから、約26%のタンパク質が溶出したことになる。一方、食塩を添加していない生地の場合、3回目以降の洗浄液へのタンパク質の溶出は殆どみられなかった。食塩添加生地から3～6回目の洗浄液中に溶出したタンパク質を、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析すると、主として30～45キロダルトンのタンパク質が溶出したことが明らかとなった（図2B）。これらのタンパク質はN末端アミノ酸配列分析により、すべて α/β -グリアジンあるいは γ -グリアジンであることが明ら

かとなった。さらに溶出液を超遠心処理しても、タンパク質は全く沈殿せず、沈降平衡法により分子質量を測定すると、30,000~35,000の質量値が得られた。これらの結果は、溶出したグリアジンは水溶性で且つモノマーとして存在していることを示している。一方、純水ではなく食塩水で生地を洗浄した場合にはグリアジンは全く溶出しなかった。すなわち、食塩存在下で作製した生地中のグリアジンは水に溶けるタンパク質となっているが、食塩水には不溶性であることが示された。

グリアジンを水溶性にする効果（水溶性化効果）は食塩以外の塩にもあり、塩の種類によって効果が異なっている。いろいろな塩を用いて生地を調製し、生地から水洗浄で溶出するグリアジンの量を調べてみるとナトリウム塩の場合はホフマイスター系列の逆順に、すなわちカオトロピックな陰イオンほど効果が高いことが明らかとなった（図3A）。一方、塩化塩の場合は、リチウムイオンを除いてやはりカオトロピックな陽イオンほど生地からのタンパク質の溶出量が増加する傾向があった（図3B）。調べた塩の中では特にヨウ化ナトリウムの効果が大きく、食塩の半分の濃度でもグリアジンが大量に水溶性化してくる。いずれにしても、塩を作用させるとグルテン中でのグリアジンの存在状態あるいは高次構造が変化し、これがグルテンのタンパク質間相互作用に対する食塩の影響の一つの要因になっていると考えられる。

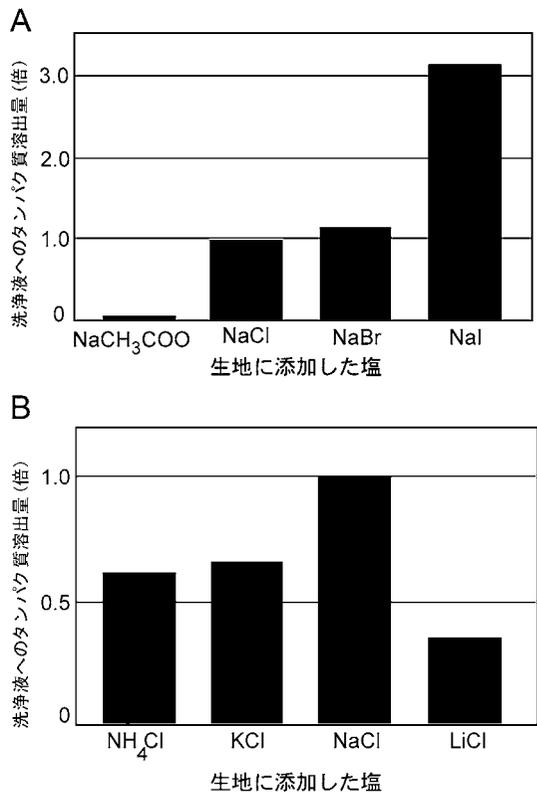


図3 食塩以外のナトリウム塩 (A) あるいは塩化塩 (B) のグリアジン水溶性化効果

4. 水溶性グリアジンは食塩で凝集する

食塩入りの生地から水に溶け出したグリアジンは、少なくとも10%前後の濃度まで水溶液にすることが出来る。乾燥させてから再び水に溶かすことも可能である。しかし、僅かに食塩が存在するだけで瞬時に凝集する性質がある。これが、食塩のグルテンタンパク質間相互作用に対するもう一つの効果である。凝集は食塩の濃度が5~10mMで始まり40mM以上ですべてのグリアジンが凝集する（図4、黒丸印）。凝集効果は他の塩にもあるが、

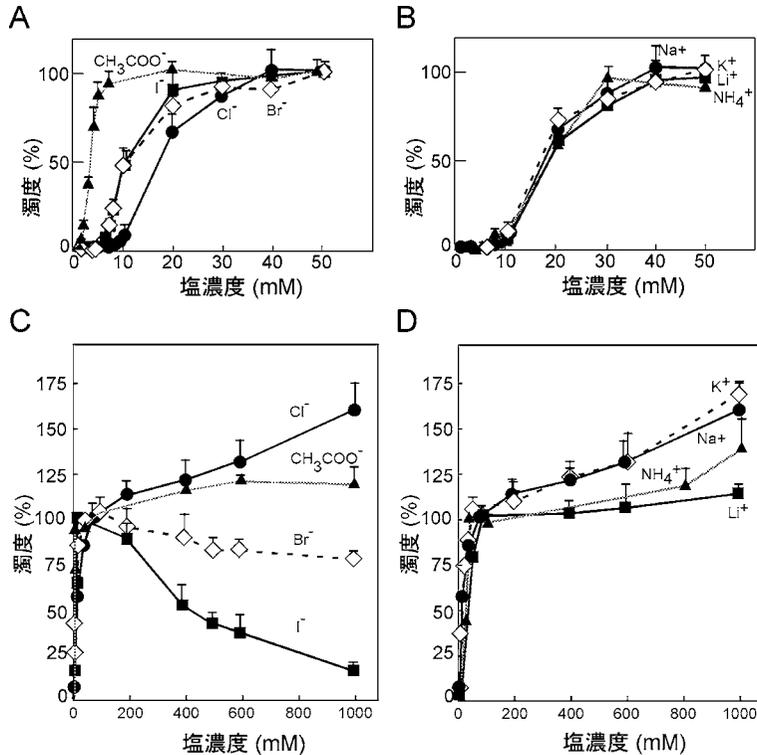


図4 食塩及びナトリウム塩 (A, C) あるいは塩化塩 (B, D) のグリアジン凝集効果
グリアジン水溶液の濁度 (600nmでの吸光度) の上昇で凝集を測定した。

塩の種類によって効果が異なる。重要な点はグリアジンの水溶性化効果とグリアジンを凝集させる効果は塩の種類によって必ずしも一致しないことである。高いグリアジン水溶性化効果を示したヨウ化ナトリウムは食塩よりも低濃度で強い凝集効果を示したが、グリアジンの水溶性化には全く効果のない酢酸ナトリウムも非常に強い凝集効果を示した (図4 A)。また、グリアジンの水溶性化効果では食塩より効果が低かった塩化カリウム、塩化リチウム、塩化アンモニウムなどの塩化塩は食塩と同じような濃度依存性で凝集効果を示した (図4 B)。すなわち、グリアジンに対する塩の2つの効果は異なる分子機構によるものであり、凝集効果は主に塩の陰イオンが担っていると推定されるが、水溶性化効果は陰イオンだけによるものではないと考えられる。もう一つの重要な点は、これらの塩効果の濃度依存性に違いがあることである。グリアジンの水溶性化が数百mMの塩濃度で見られる現象であるのに対し、凝集効果はより低い濃度で発揮される。さらに、塩によっては高濃度では逆に凝集効果が低下する場合がある。ヨウ化ナトリウムは300mM以上の濃度では急激に凝集効果が減少し、臭化ナトリウムも300mM以上で緩やかに凝集効果が減少する (図4 C)。一方、食塩の場合は高濃度領域でも凝集効果の低下は見られない。パン

の場合、生地作製に使用する食塩水の濃度は約500mMであるから、グリアジンの水溶性化効果と凝集効果の両方が機能していることになる。

5. グルテンタンパク質の分子間距離に対する食塩の影響

食塩の添加により、上記のような変化がグルテンタンパク質に生じていることが明らかとなった。しかし、小麦粉生地中でのタンパク質の状態を把握するには別のアプローチが必要である。一般に、食塩の効果は“生地を引き締め、強める”と表現される。これは物性的には伸展に対する抵抗性（抗張力）の増加であり、古典的にはブラベンダーエクステンシグラフなどの装置で測定することにより明らかにされてきた⁹⁾。抗張性の増加は、生地を構成する分子、特にグルテンタンパク質分子間の非共有結合や共有結合が増加することを意味する。食塩の場合は、主に疎水性相互作用や水素結合などの非共有結合を増加させると推定されている。このような変化はタンパク質の構造変化を伴っている可能性があり、この点を明らかにする試みの一つとして、生地中のグルテンの二次構造のフーリエ転換赤外分光スペクトルによる解析を行った。食塩を添加した生地と無添加の生地ですペクトルから得られる様々な二次構造の量を比較検討してみると、食塩添加生地で β ターン構造がわずかに増加していることが明らかとなったが、食塩添加によって生じる物性の変化を明確に説明するような大きな二次構造の変化は認められなかった。すなわち、食塩添加によってタンパク質の大きな構造変化を伴わずに分子間相互作用の変化のみが引き起こされていると考えられるのである。そこで、著者は生地中で生じているタンパク質分子間相互作用の変化を検出するために、生化学研究でタンパク質の会合を解析するのによく用いられているタンパク質架橋剤を用いる方法を考案した。タンパク質架橋剤は数オングストローム～数十オングストロームのスペーサーアームで隔てられた分子の両端にアミノ基、チオール基及びカルボキシル基などと反応する官能基や、光反応により非選択的にペプチド鎖と反応するアリルアザイドなどの官能基を有する分子である（様々な官能基とスペーサーアームを有する架橋剤がPierce社などから市販されている）。会合あるいは凝集しているタンパク質同士をタンパク質間の距離に応じて、相当する長さのスペーサーアームを有する架橋剤により架橋することができる。従って、スペーサーアームの長さを変えることによって架橋されるかどうかを調べることにより、タンパク質間の会合状態をある程度知ることが出来る。グルテンタンパク質のように多数の分子がネットワーク状に会合しているタンパク質が架橋されると巨大なポリマーになるため、ジスルフィド結合の還元剤入りのSDSにすら溶けにくくなり、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供してもゲル内に入らなくなる。従って、架橋剤処理後のタンパク質をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した後、ゲル内に入って分離されたタンパク質のバンドの濃さを比較す

ることにより、架橋の程度を知ることが出来る。図5はスペーサーアーム長が6.4Åのdisuccinimidyl tartrate (DST) という架橋剤を用いて行った実験結果である。食塩を添加しなかった生地の場合にはDST処理を行っても殆どタンパク質が架橋されないため、架橋剤処理を行っていない生地のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動のタンパク質バンドパターンとほとんど差がみられない(図5, レーン1, 2)。一方、食塩を添加した生地ではDST処理を行うことによりかなりの数のタンパク質が架橋されるため、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で検出されるタンパク質バンドの強度が低下している(図5, レーン3, 4)。さらに、DSTで架橋されSDSに不溶性となったタンパク質を

検出することも可能である。まず、架橋剤処理を行った生地から還元剤入りSDS溶液で抽出されずに沈殿に残っているタンパク質を分離する。分離したタンパク質をメタ過ヨウ素酸ナトリウムで処理すると、DSTのスペーサーアームが酸化されることにより架橋が切断されタンパク質が可溶性となる。これをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析すると架橋されていたタンパク質を検出することができる。食塩無添加生地では不溶性画分にはこのような処理でタンパク質が全く検出されないが(図5, レーン5)、食塩を添加した生地の不溶性画分からはグルテニンとグリアジンのバンドが検出された(レーン6)。これらの結果は、食塩を添加しない場合はグルテニン及びグリアジンの分子間距離が6.4Åよりも長く離れているが、食塩の添加によって分子間距離が6.4Åよりも接近する領域が増加したことを示している。スペーサーアーム長がもっと長い架橋剤、例えば7.7Åのアームを持つdisuccinimidyl glutarateを用いた場合には、食塩無添加の生地でもグリアジンやグルテニンのかなりの部分が架橋されることから、食塩無添加でもタンパク質の会合が生じているがその分子間距離が食塩添加生地の場合に比べて長いということが示唆される。超遠心分析により食塩添加によって生地中のグルテンの容積が減少することも示されており¹⁰⁾、食塩は文字通り生地を“引き締める”のである。タンパク質の分子間距離の短縮は、

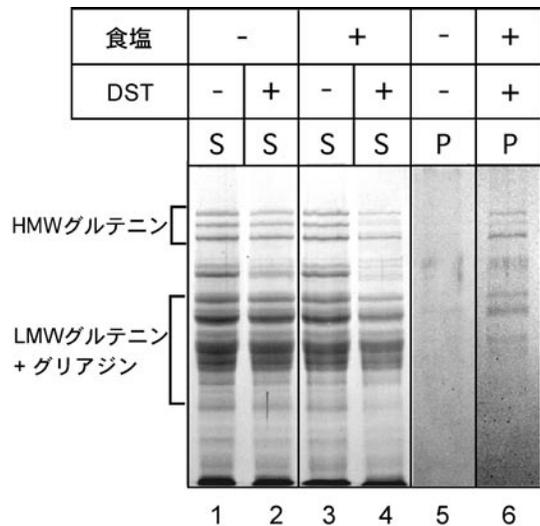


図5 DSTによる架橋効率に食塩添加が及ぼす影響

食塩添加あるいは無添加生地をDSTで処理した後、βメルカプトエタノール入りSDS溶液でタンパク質を可溶化した。可溶化液を超遠心し、可溶性画分(S)と不溶性画分(P)に分けた。不溶性画分はメタ過ヨウ素酸ナトリウムで処理した。それぞれの試料は、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離したタンパク質を染色した。

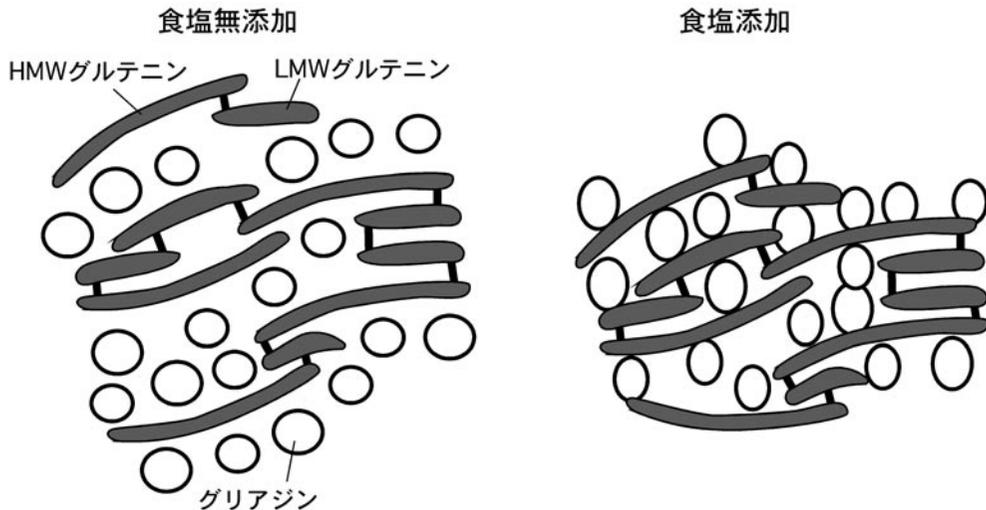


図6 食塩がグルテンネットワークに及ぼす影響のモデル

食塩添加によりグリアジンの配置や高次構造が変化するとともに、タンパク質間の距離が短縮し全体の容積が減少する。

グリアジンの水溶性化の原因となっているグリアジンとグルテニンのタンパク質間相互作用の再編成あるいは高次構造変化をもたらすこととなるのであろう（図6）。タンパク質の凝集は食塩によりポリペプチド鎖の極性側鎖がマスクされ分子間の反発力が低下することによると推定されている。その結果、分子間距離が縮まり新たな水素結合や疎水性相互作用が形成され、抗張力が増加すると考えられる。食塩の添加により生地へのべたつき（粘着性）がなくなるのも、粘性のあるグリアジンを凝集させグルテニンとの相互作用を強めていることによるものと考えられる。

6. おわりに

パンのみならずうどんや素麺などの食品においては、小麦粉と食塩は切っても切れない関係にあり、小麦粉の質や、小麦粉以外の食品素材、さらには気温及び湿度などに合わせて生地の状態を最適に保つために食塩の配合量を調節することが古くから行われてきた。最近では、腎臓疾患などの病人食だけでなく健康的な食生活のための減塩を目的として、パンなどに添加する食塩量を減らしながら食品としての品質を保つ方法の開発が求められている。食塩にはグリアジンの存在状態を変化させる水溶性化作用と、グルテンタンパク質を凝集させ分子間相互作用を強める2種類の作用があることが明らかとなったが、これらの作用が相補的に機能してグルテン形成における食塩効果が発揮されていると考えられる。従って、使用する食塩の適量を定める基準としても、また食塩を減らして他の物質で

代替しようとする場合にも候補となる物質を検証し、それらの使用量を定めるためには、今回明らかとなった食塩の作用は有効な指標となるであろう。

食品中のタンパク質の相互作用を調べる手段の一つとして、著者はタンパク質架橋剤を用いる方法を考案した。この方法は、小麦粉生地に限らず様々な食品への応用が可能ではないかと考えている。食品の多くはタンパク質同士があるいはタンパク質と他の分子とが相互作用した複雑な組織となっており、その性質が食品のテクスチャー、保水性、乳化性、風味などと密接に関係していると考えられる。今後、どのような分子の複合体形成が食品中で生じているかを検討する手段の一つとして架橋剤を用いて解析する方法の有効性を検証して行きたいと考えている。

参考文献

- 1) 松本博： 製パンの科学（Ⅱ）製パン材料の科学. 東京, 光琳, 1992
- 2) Cook, N.R., Cutler, J.A., Obarzanek, E., Buring, J.E., Rexrode, K.M., Kumanyika, S.K., Appel, L.J., and Whelton, P.K. : Br.Med.J. **334**, 885-892 (2007)
- 3) Ukai, T., Matsumura, Y. and Urade, R.: J. Agric. Food Chem. **56**, 1122-1130 (2008)
- 4) Shewy, P.R., Halford, N.G. and Tatham, A.S.: Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology. Vol. 6., Oxford, Oxford University Press, 1989
- 5) Reddy, P. and Appels, R.: Theor. Appl. Genet. **85**, 616-624 (1993)
- 6) Shewy, P.R. and Tatham, A.S.: J. Cereal Sci. **25**, 207-227 (1997)
- 7) Payne, P.I., Holt, M.N., Jarvis, M.G. and Jackson, E.A.: Cereal Chem. **62**, 319-326 (1985)
- 8) Shewy, P.R., Tatham, A.S. and Halford, N.G.: Seed Proteins, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1999
- 9) 藤山諭吉, 宇野浩平, 善本修二, 神原邦子 : Pain, **2**, 16 (1955)
- 10) Larsson, H.: Cereal Chem. **79**, 544-545 (2002)