

学 位 論 文 題 名

食品タンパク質の酵素的修飾並びに
挙動解析手法に関する研究

学位論文内容の要旨

食品タンパク質は単に栄養的に重要なばかりでなく、加工食品を形成する素材としても重要な役割を果たしている。各種タンパク質素材の機能特性はその素材の一次構造から四次構造に基づいて様々な化学結合や相互作用を介して発現している。安価なタンパク質素材の機能特性を高める、或いは新たな機能特性を付与する目的でその構造の改変を行うことは食品産業の発展に寄与するものと思われる。真に有効な食品タンパク質素材の構造改変を行う為に重要なのは食品加工の観点から許容性が高い修飾手法を確立することと食品タンパク質の挙動を機能特性発現の場で直接的に観察し重要な構造因子を把握する方法を備えることにある。そこで本研究では食品タンパク質の酵素的改変手段として *Streptoverticillium* 属の微生物が菌体外に生産する新規アシル転移反応触媒酵素のタンパク質修飾における有用性、並びに食品タンパク質の挙動解析手法としてのラマン分光法の可能性を検討した。

第1章緒論に続き、第2章では新規アシル転移反応触媒酵素がトランスグルタミナーゼ (R-glutaminy-peptide:amine γ -glutamyl transferase; EC 2.3.2.13) と呼ばれる酵素であることを確認する為にタンパク質基質に対して ϵ -(γ -Glu)Lys 架橋結合形成能があることを明らかにし、本酵素がトランスグルタミナーゼであることを証明した。この微生物トランスグルタミナーゼ (以下MTGaseと略) はカゼイン類、大豆グロブリン類、ミオシンなどを架橋重合化することができた。またウシ血清アルブミン等はネイティブな状態では架橋重合化されなかったが、還元剤の存在下では架橋重合化することが

できることを発見した。また、MTGaseをタンパク質分散液に作用させるとゲル化がおきることやゼラチンゲルに耐熱性を付与できることも確認した。

次に第3章ではMTGaseを用いて食品タンパク質ヘリジン及びリジンを介して任意のアミノ酸を導入する可能性についてモルモット肝臓由来トランスグルタミナーゼ（以下GTGase）を用いた場合と比較しながら検討を行った。MTGaseはGTGaseを用いる場合よりも効率良くシトラコニル化 α s1-カゼイン（モデル基質）にリジン及びリジン含有ジペプチドを導入できることが判明した。またMTGaseはスクシニル化粗大豆7Sグロブリンに対してもリジン含有ジペプチドの導入が可能であった。導入できるアミノ酸は荷電を有するもの、疎水性のもの、親水性のもの、栄養上必須なもの等多岐にわたりMTGaseを用いて目的とする機能特性付与の為に種々のアミノ酸を標的タンパク質に導入できる可能性が示された。

第4章ではMTGaseを用いた脱アミド化について検討し、MTGaseはGTGaseと比べて低い率ではあるがシトラコニル化併用のもと α s1-カゼインを脱アミド化できることが確認された。得られた脱アミド化カゼインは対照に比較して有意にpH溶解性やカルシウム感受性が改善されていることがGTGase使用の場合と同様に確認された。また、MTGaseを固定化し立体障害を利用してシトラコニル化を用いずに架橋重合化を抑制しながら脱アミドを行うことも検討した。MTGaseはグルタルアルデヒド法でハイドロキサメート形成活性（CBZ-Gln-Glyが基質）を有して固定化することが可能であり、遊離酵素に比較して架橋重合化も抑制されたが脱アミド化能も抑制されていた。これは過剰な立体障害によりMTGaseがタンパク質基質によりアクセスされにくくなっていることを示唆するものと考えた。今後はこの点を解決できるような位置選択性の高い固定化手法を検討する必要性が示された。

第5章では第2章でもふれたウシ血清アルブミン（以下BSA）などに代表される難反応性の基質タンパク質の修飾を化学試薬を用いずに可能とするべく基質変性的手段として超高压を併用したMTGaseによるタンパク質修飾を検討した。MTGaseは超高压下でもハイドロキサメート形成活性を発揮することが可能であり、ジメチルカゼインへのモノダンシルカダベリン導入系では大気圧下よりも導入が速く進行することを発見した。また、400MPaまで

の超高压処理ではM T G a s eは殆ど失活していないことも確認された。B S A、オボアルブミン、ガンマグロブリン、リゾチーム、ヒト血清アルブミンなどの難反応性タンパク質は超高压下でM T G a s eとともに処理することでモノダンシルカダベリンの導入や架橋重合化反応を受けるようになることも見い出され、さらに超高压で予め前処理したB S Aとオボアルブミンについてはその後の大気圧下でのM T G a s e反応においてモノダンシルカダベリンの導入を受けるように変化することも判明した。

第6章では優れた機能特性を有しながらも酸性下での溶解性が悪いカゼインについて、全く異なる等電点や性質を有する酸ゼラチンをM T G a s eを用いて結合させてハイブリッドポリマーを形成させることでその性質が改良できることを示した。カゼイン-ゼラチンハイブリッドポリマーは単独素材系や単純混合系に比較して優れた溶解性を酸性下で示し、乳化特性も改良されていた。このように全く性質（構造）の異なるタンパク質同士をM T G a s eを用いて結合させることで優れた機能特性の発現が図れる可能性が示唆された。

第7章ではタンパク質素材が実際に機能特性を発現する場においてどのような挙動をとっているか直接観察できる手法の一例として、乳ホエータンパク質の加熱ゲル化における構造変化について振動分光法の手法であるラマン分光法を用いてその可能性を検討した。ラマン分光法は広範な試料形態に応ずることができることがその長所として挙げられてきたが、実際に本研究においても加熱前の濃厚タンパク質分散液、加熱は受けているがゲルは形成していない分散液、加熱によりゲル化した分散液についていずれもラマンスペクトルの測定が可能であった。これらのスペクトルの比較解析の結果、加熱・冷却後のゲル化に伴い以下の構造変化が示された。

- ① α -ラクトアルブミンでは主として α -ヘリックスの、 β -ラクトグロブリンでは主としてターン構造の β -シート構造への変化
- ② ジスルフィド結合のゴーシュ-ゴーシュ-ゴーシュコンフォーマーの減少
- ③ トリプトファン残基の分子表面（溶媒側）への露出
- ④ チロシン残基の関与する水素結合の強化
- ⑤ ヒスチジン残基のイオン化状態の変化（イミダゾリウム環からイミダゾール環への変化）

以上によりラマン分光法が食品タンパク質の機能発現の場における構造変化を直接的に観察する手法として有用であることが示された。

タンパク質は20種類の基本的なアミノ酸、及び糖質や脂質などとも複合化して多岐・複雑な構造を呈しており、その有効な機能特性改変を考えていく上で構造－活性相関的アプローチは必須と思われる。その際に重要な点は冒頭に述べたように有効な構造因子を導入する方法とその挙動を的確に把握する方法の確立にある。本研究により当該研究分野発展の為の基礎知見として、構造因子の導入手段としての新規微生物起源トランスグルタミナーゼの有用性と挙動解析手段としてのラマン分光法の可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 市 原 耿 民

副 査 教 授 仁 木 良 哉

副 査 教 授 本 間 守

学 位 論 文 題 名

食品タンパク質の酵素的修飾並びに

挙動解析手法に関する研究

本論文は、和文104頁、図42、表13、引用文献81、8章からなり、ほかに参考論文11編から付されている。

食品タンパク質は単に栄養的に重要なばかりでなく、加工食品を形成する素材としても重要な役割を果たしている。安価なタンパク質素材の機能特性を高める、或いは新たな機能特性を付与する目的でその構造の改変を行うことは食品産業上極めて重要な課題である。本論文は食品タンパク質の酵素的改変手段として*Streptoverticillium*属の微生物が菌体外に生産する新規アシル転移反応触媒酵素のタンパク質修飾における有用性を豊富な実験例で示し、食品タンパク質の挙動解析手法としてのラマン分光法の可能性を述べたものである。

第1章緒論に続き、第2章では新規アシル転移反応触媒酵素がトランスグルタミナーゼであることを確認するためにタンパク質基質に対して ϵ -(γ -Glu)Lys架橋結合形成能があることを明らかにしている。この微生物トランスグルタミナーゼ(MTGase)はカゼイン類、大豆グロブリン類、ミオシン等の食品タンパク質を架橋重合化すること、またウシ血清アルブミン等は還元剤存在下で架橋重合化できることを発見している。

第3章ではMTGaseを用いて食品タンパク質ヘリジンやリジンを介して任意のアミノ酸を導入する可能性についてモルモット肝臓由来トランスグルタミナーゼ(GTGase)を用いた場合と比較しながら検討を行った。MTGaseはGTGaseよりも効率良くシトラコニル化 α s1-カゼインにリジン及びリジン含有ジペプチドが導入できることを示した。また、MTGaseはスクシニル化大豆グロブリンに対してもリジン含有ジペプチドの導入が可能であり、この手法により機能特性付与の為に種々のアミノ酸を標的タンパク質に導入できる可能性が示されている。

第4章ではMTGaseによる脱アミド化について検討、MTGaseがGTGaseに比較して低

率ではあるがシトラコニル化併用のもと α s1-カゼインを脱アミド化できることを確認しており、得られた脱アミド化 α s1-カゼインは対照に比べて有意にpH溶解性やカルシウム感受性が改善されていることを確認している。

第5章ではウシ血清アルブミン(BSA)に代表される難反応性の基質タンパク質の修飾を化学試薬等を用いずに可能とするべく、基質変性的手段として超高压を併用したMTGaseによるタンパク質修飾を検討した。MTGaseは超高压下でも触媒活性の発現が可能であることも判明した。また、BSA等の難反応性基質は超高压下でMTGaseとともに処理することでモノダシルカダペリンの導入や架橋重合化反応を受けることも発見している。

第6章では優れた機能特性を有しながらも酸性下での溶解性が悪いカゼインについて、全く異なる等電点や性質を有する酸ゼラチンをMTGaseを用いて結合させてハイブリッドポリマーを形成させることでその性質が改良できることを示した。カゼイン-ゼラチンハイブリッドポリマーは単独素材系や単純混合系に比較して優れた溶解性を酸性下で示し、乳化特性も改良されていることを確認している。

第7章ではタンパク質素材が実際に機能特性を発現する場においてどのような挙動をとっているか直接観察できる手法の一例として、乳ホエータンパク質の加熱ゲル化における構造変化について振動分光法の手法であるラマン分光法を用いてその可能性を検討し、加熱・冷却後のゲル形成に伴い以下の構造変化を観察している。

① α -ラクトアルブミンでは主として α -ヘリックスの、 β -ラクトグロブリンでは主としてターン構造の β -シート構造への変化 ②ジスルフィド結合のゴーシュ-ゴーシュコンフォーマーの減少 ③トリプトファン残基の分子表面への露出 ④チロシン残基の関与する水素結合の強化 ⑤ヒスチジン残基のイオン化状態の変化

これらの結果はラマン分光法が食品タンパク質の機能特性発現の場における構造変化の直接的観察手法として有用であることを示したものである。

以上のように、本研究は微生物由来の新規酵素が食品タンパク質の機能特性改変に極めて有効なことを明らかにしたもので、食品産業上のみならず、学術的にも重要な基礎的知見を提供している。よって審査員一同は、別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者 野中雅彦 は博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。