

学 位 論 文 題 名

水産物中の  $\epsilon$ -( $\gamma$ -グルタミル)リジンの存在とトランス  
グルタミナーゼに関する研究

学位論文内容の要旨

トランスグルタミナーゼ（以下TGase）は、グルタミンの  $\gamma$ -カルボキシアミド基とリジンの  $\epsilon$ -アミノ基とのアシル基転移反応を触媒するタンパク質架橋酵素である。反応によってタンパク質分子中には、 $\epsilon$ -( $\gamma$ -グルタミル)リジン（以下  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys）結合が形成される。TGaseは、魚類も含め動物組織中に広く分布していることが知られており、 $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysもまた様々な生体組織にその存在が報告されている。本研究は、海産動物に存在するTGase及びその反応によって生成する  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysに関して、食品学的見地から考察することを目的として行ったものである。すなわち、水産食品を中心として一般食品における  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysの分布について調べることで、またその生成要因である海産動物由来TGaseの単離精製と性状の解明、並びに生成した  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysの消化代謝と栄養学的評価について研究したものである。

まず、第1章において一般食品における  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysの分布を調べたところ、その分布の傾向は、畜肉あるいは魚介類の加工製品などの動物由来の高タンパク質食品に多いことが認められた。魚介類中の  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysの存在は、生の筋肉には少ないが、くん製品、缶詰、ねり製品等の加工製品に明らかに多い傾向が認められた。また、魚卵には  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysが特に多い傾向も認められた。続いて  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)LysがTGaseによる架橋形成物であることから、加工食品の原料である生鮮魚介類、畜肉そして野菜類中のTGase活性レベルを調べたところ、魚介類、特にサケやマス等に高い活性が存在することが認められた。一方、畜肉中のTGase活性は魚介類と比較すると低く、野菜ではまったく検出されなかった。この結果から魚介類に  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysが多く存在することは、もともと存在するTGase活性と何らかの関係があり、それは魚介類特有の傾向ではないかと推定した。

第2章前半では、実験室的に蒲鉾（スケトウダラ冷凍すり身）や干物（マアジ）、サケおよびサケのくん製等の水産加工品を調製し、加工工程中の  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys量の变化を分析することにより素材中に内在するTGaseの関与について検討した。

その結果、蒲鉾製造においては、坐り過程で、また干物では乾燥(加熱)過程で明らかに  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysの増加が認められた。また、くん製においても同様であった。 $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysの増加は、原料にTGase阻害剤を添加することでその生成が抑制された。したがってこれらの水産加工品の製造工程において内在するTGaseが作用し、タンパク質中に  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys架橋を形成、増加させることが明らかになった。ただし、実際の生産スケールにおけるTGaseの関与は今後の検討課題である。第2章後半では水産加工品製造時に意図的にTGaseを添加した場合の検討を行った。すなわち、坐りを起こさないことが知られているシロウメ肉に微生物起源TGase(MTGase)を添加し、その効果を検討した。シロウメにはすでに報告されているように低分子量のTGase阻害物質が存在しているので、ウメ肉を水晒し肉として大部分の阻害物質を除去し、MTGaseを添加することにより坐りを導入でき、蒲鉾様ゲルが形成されることが確認された。また、この際にはタンパク質内に  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysが生成したことから、坐りを起こさないウメでもMTGaseのタンパク質架橋反応により蒲鉾等の練り製品化が可能であることを示した。以上、第2章の検討結果から、水産加工においてMTGaseも含めてTGaseは、非常に有用な酵素であることが示された。

魚介類TGaseの酵素としての知見はそれほど多くないため、第3章では数種海産動物よりTGaseを単離精製してその性質を検討した。魚類としてスケトウダラおよびマダイの肝臓、そしてウナギからTGaseを精製した。その結果、魚類TGaseは分子量約77,000~78,000、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性の単純タンパク質であり、活性中心にはSH基が関与していることが認められた。ウナギでは分子量の異なる2種のTGaseが存在し、両TGaseには反応至適温度や活性に受けるNaClの影響において異なる性質が存在した。しかし、両TGaseとも反応至適pHが7.0~7.5の弱アルカリ性域にあることや $\text{Ca}^{2+}$ 依存性のSH酵素であることが魚類TGaseと共通していた。一方、ウナギのTGaseは分子量約90,000のサブユニットの4量体として存在しており、他の海産動物TGaseとは明かな違いが認められた。ただし、基本的な $\text{Ca}^{2+}$ 依存性酵素であることやSH酵素であることは一致していた。これらのTGaseは、いずれも $\text{Ca}^{2+}$ 依存的にミオシン重鎖の架橋高分子量化能を有し、 $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys結合によるタンパク質のゲル形成が可能であった。

最後に第4章において、TGase反応によりタンパク質中に形成される  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysが、生体内に摂取された場合、消化されLysとして再利用され得るのかどうかを検討した。 $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysは、通常の消化酵素であるペプシンやトリプシンでは消化を受けないことが知られているが、腎臓に存在する $\gamma$ -グルタミルミシクロトランスフェラーゼによって $\gamma$ -グルタミル酸と遊離のLysに分解されることが報告されている。そこで第4章前半では、Glnの $\gamma$ -グルタミル結合の生合成に関与する $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ( $\gamma$ -GTP)をペプチド態の $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysと反応させて、その分解反応の有無を検討した。その結果、 $\gamma$ -GTPはペプチド態の $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysを遊離のGluとLysに分解することを見いだした。しかし、タンパク

質態の  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys 結合には作用せず、切断反応が進行するには  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys 結合までタンパク質が分解される必要が考えられた。尚、この活性は他のアミノ酸が混在してもほとんど阻害を受けないことから、タンパク質中に形成された  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys は、生体内ではタンパク質が消化管に存在する酵素によってアミノ酸と  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys の混合状態となった後、 $\gamma$ -GTP あるいは  $\gamma$ -グルタミルアミノシクロリンスフェラーゼによって分解されることが推定された。尚、 $\gamma$ -GTP は、哺乳動物血液、各種臓器特に腎臓に多く存在することが知られている。続いて第4章後半では、実際にタンパク質を MTGase で処理して、高度に  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys を含有させた飼料を調製しラットの発育試験を行い、その栄養価の評価から  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys の分解性の評価を試みた。その結果、 $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys 含有飼料と非含有飼料との間の栄養性には有為差は認められず、タンパク質態の  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys 中の Lys が有効に利用され得ることを確認した。ただし、高度に MTGase で処理したタンパク質を含む飼料は、ラットの嗜好性から若干飼料摂取量が劣ることが分かった。

以上、本研究で得られた結果をまとめると次のように記すことができる。すなわち、一般食品中には  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys が広く分布しているが、特に水産加工品に多い傾向がある(第1章)。その原因として水産加工原料にもともと存在している TGase が製造工程で作用している可能性が分かった(第2章)。水産物由来の TGase を精製して、酵素としての性状を調べたところ、種により分子量や反応至適条件に若干差が認められたが、いずれも  $\text{Ca}^{2+}$  依存性や SH 酵素であることは共通しており、タンパク質を  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys 結合により高分子量化させる性質が認められた(第3章)。食品として  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys の栄養価を評価したところ、栄養価としては遊離のリシンと同じであり、 $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys は生体内で代謝されリシンとして有効利用されることを確認した(第4章)。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 関 伸 夫  
副 査 教 授 猪 上 徳 雄  
副 査 助 教 授 今 野 久 仁 彦

## 学 位 論 文 題 名

### 水産物中の $\epsilon$ -( $\gamma$ -グルタミル)リジンの存在とトランス グルタミナーゼに関する研究

特殊なジペプチドである  $\epsilon$ -( $\gamma$ -グルタミル)リジン（以下  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys）の分布を水産、畜肉、農産食品について調べたところ、水産加工品に多く含まれていることを明らかにし、その生成が内因性のトランスグルタミナーゼによって酵素的に加工処理中に起きること、さらに酵素の精製を行いその性状を明らかにした。また食品中の本ペプチドの消化代謝と栄養学的評価について検討を行っている。本研究によって得られた結果は以下のように要約される。

1) 魚介類、畜肉、農産物などの64種類におよぶ食品中の  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysの分布を調べたところ、水産加工食品（ねり製品、干物、くん製品、魚卵製品）に多く含まれている傾向が認められた。これらの食品では生鮮物からはこのジペプチドがほとんど検出されなかったが、トランスグルタミナーゼ活性のレベルは高いことから加工処理中に本酵素反応で生成することを推定した。

2) 上記の推定を確かめるために、実験的にスケトウダラのかまぼこ、アジの干物、カキとホヤの薫製を製造し、いずれの場合も加工中に  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysが増大することを確認した。一方、酵素の阻害剤であるNH<sub>4</sub>ClおよびEDTAを共存させて加工処理を行うと、このジペプチドの生成は著しく抑制された。スケトウダラ肉糊ではトランスグルタミナーゼの作用でミオシン重鎖の架橋重合が進行し、弾力の強いかまぼこゲルが形成された。この結果を応用して、かまぼこ形成能が低いサケ肉糊に外部からトランスグルタミナーゼを加え、タンパク質間に  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys架橋を導入すると、弾力性の強いかまぼこが製造できることを示した。この結果はゲル化食品の製造に本酵素が有用であることを示すと同時に、本酵素の使用によって、食品中に  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysが多量に生成することを示している。

アジの干物およびカキとホヤの場合は、塩漬後の乾燥過程で  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysの増大が認められた。

3) 魚介類組織中のトランスグルタミナーゼの酵素学的知見が少ないことから、ス

ケトウダラとマダイの肝臓、カキとホヤからそれぞれ酵素を精製単離し、性状を調べて相互の比較を行った。精製はゲルろ過、種々のクロマトグラフィーなどの方法を組み合わせて行った。魚類組織由来の酵素は分子量77,000-78,000, カルシウムに依存性のSH酵素であることを認めた。カキには2種類の酵素が存在し、それらは至適pHと塩に対する活性化の度合いが多少異っていた。一方、ホヤの酵素は90kDaのサブユニット4つからなる分子量36万のタンパク質で他の動物由来の酵素とは明らかに異なっていた。しかし、カルシウム依存性のSH酵素である点は類似していた。さらに、これらの酵素はいずれも筋肉タンパク質、特にミオシン重鎖に $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lys架橋を導入し、高分子量化させる能力を有していた。

4) トランスグルタミナーゼにより食品タンパク質中に形成された $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysが生体に摂取された場合の消化代謝について検討した。 $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysのグルタミンとリジンの間のイソペプチド結合はペプシンやトリプシンなどの通常の消化酵素では消化されない。そこでこの結合を分解する酵素を探したところ、腎臓に多く存在する $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼが $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysを遊離のグルタミン酸とリジンに分解することを見いだした。しかし、この酵素はタンパク質中に存在する $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysには作用しなかった。したがって、タンパク質中のこの結合は通常の消化酵素によって、ジペプチドにまで分解されてから $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼによって消化されることを推定した。続いて、タンパク質をトランスグルタミナーゼで処理して、高度に $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysを含有する飼料を調製して、ラットの発育試験を行ったが、対照飼料で飼育したものとの間に有意の差は認められなかった。したがって、 $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysは生体内で消化代謝され、遊離のリジンとして有効に利用されることが推定された。

以上のように本研究は $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)Lysの存在と、生成に関与する酵素の性状を明らかにし、さらに消化代謝に関するまでの一連の研究を行った点はこれまでにない新たなものであり、極めて高く評価される。したがって、審査員一同は本論文が博士（水産学）の学位を受けるのに十分な内容を有するものと認定した。