

氏名	なが い こう へい 永 井 宏 平
学位の種類	博士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1388 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科食品生物科学専攻
学位論文題目	Physicochemical Analysis, Reaction Mechanism, and Biochemical Application of the Coagulation of Soy Proteins Induced by Proteases (プロテアーゼにより引き起こされるダイズタンパク質の凝固に関する物理化学的解析, 反応機構, および生化学的応用)
論文調査委員	(主 査) 教授 井上國世 教授 小川 正 教授 安達修二

### 論 文 内 容 の 要 旨

現在生産されている大豆のほとんどは食用油の原料として使用されており、油を搾った後の大豆粕は、良質のタンパク質を豊富に含んでいるにもかかわらず、ほとんどが家畜飼料に供せられている。このような点を考慮して、大豆タンパク質の食品産業における有用性の向上が求められている。

大豆タンパク質をプロテアーゼ処理すると、分解物が凝集を起こしてゲル化したり、凝集物が沈殿したりすることがある。この凝集は、溶解度の高い分解物の収量を下げる原因として問題視されてきたが、その一方で、凝集物自体を新しい食感や加工特性をもつ食品素材として利用できる可能性がある。本論文は、プロテアーゼによる分離大豆タンパク質 (SPI) の凝集反応を、濁度測定、SDS-PAGE、蛍光測定、反応速度論などの物理化学および生化学的方法で解析し、反応の諸性質や反応機構に関する知見を示したものであり、4章から成っている。その主な内容は以下のとおりである。

1. SPIをpH8.0, 37℃の条件において、ズブチリシン・カールスベルグで処理したときに生じる凝集反応を、SDS-PAGEと反応溶液の濁度測定により追跡した。溶液の濁度は、SPIの速やかな分解により減少し、最低値に達した後 (第1相)、分子量16,000以下の低分子断片の凝集により増加した (第2相)。最大値に達したのち、凝集物の分解により再び減少した (第3相)。この濁度変化は遠心分離による沈殿物の重量変化とよく一致したことから、凝集の進行を正確に反映していることが示された。濁度の最大値と最低値の差 ([OD2-OD1]) は、基質濃度が増加するにしたがって比例的に増加し、生成する凝集物の量が増加することが示された。濁度が最低値に達する時間 (T1) と最大値に達する時間 (T2) は基質濃度によらず一定の値をとった。酸可溶性ペプチドの増加速度から、凝集が起こる基質濃度はミカエリス定数 ( $K_m$ ) よりも十分に大きいことが示され、T1が基質濃度に依存しないのは、SPI分解速度がT1付近まで、基質濃度によらず一定となるためであると考えられた。

2. ズブチリシン・カールスベルグによるSPIの凝集反応 (pH8.0, 37℃) の酵素濃度依存性を調べたところ、[OD2-OD1] は、酵素濃度によらず一定の値をとり、凝集物の収率に変化は見られなかった。その一方で、濁度増加速度の最大値 ( $V_c$ ) は、酵素濃度に依存して大きく増加した。また、T1の時点で反応溶液にプロテアーゼ阻害剤を添加し、酵素活性を阻害すると、濁度増加速度は著しく減少した。これらの結果から、第2相における分解によって生じた分解物が凝集に関与することが示された。SPI自身、および反応溶液に加えた 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS) の蛍光スペクトルから、プロテアーゼ分解によって引き起こされるSPIの構造変化は、第1相よりも第2相において顕著であることが示され、この構造変化によってSPI内部の疎水性領域が外部に露出し、疎水の相互作用によって凝集すると考えられた。

3. 8種類のプロテアーゼ (フィシン, プロメライン, トリプシン, キモトリプシン, ズブチリシン・BPN', ズブチリシン・カールスベルグ, サーモライシン, プロナーゼ) のpH8.0, 37℃におけるSPI凝集活性を、濁度測定によって比較した。[OD2-OD1] 値は、酵素の種類によらず、凝集物の濃度と高い相関を示し、異なるプロテアーゼ間のSPI凝集活性を比較するのに濁度測定が有用であることが示された。使用した8種の酵素のうち、フィシンが最も高い [OD2-OD1] 値を示し、

凝集物の収率を最も高くすることが示された。また、 $V_0/[OD2-OD1]$  の値は、ズブチリシン・カールスベルグの場合が最も高いことから、本酵素によって生じた分解物が最も凝集しやすい性質を有していることが示唆された。

4. 一般にプロテアーゼ活性は、タンパク質の酵素加水分解物における酸可溶性画分の増加速度から決定される。第1相における濁度減少の初速度は、使用した7種類のプロテアーゼ（フィシン、プロメライン、キモトリプシン、ズブチリシン・BPN<sup>1</sup>、ズブチリシン・カールスベルグ、サーモライシン、プロナーゼ）全てにおいて、ミカエリス・メンテン型の酵素濃度依存性と基質濃度依存性を示し、各酵素について見かけの分子活性 ( $K_{cat}$  値) と  $K_m$  値が求められた。この  $K_{cat}$  値は、酸可溶性画分の増加速度から求められたSPI分解活性と高い相関を示したことから、第1相の濁度変化測定が、酸を用いることなく実施できる簡便で新規なプロテアーゼ活性測定法として使用できることが示された。

## 論文審査の結果の要旨

大豆タンパク質は、栄養価や加工特性に優れるだけでなく、健康維持に有効な生理活性を有した良質のタンパク質である。しかし、大豆タンパク質を豊富に含む搾油後の大豆粕は、ほとんどが家畜飼料に供せられており、大豆タンパク質の食品素材としての有効利用が求められている。

大豆タンパク質をプロテアーゼ処理すると、分解物が凝集することがある。この凝集反応は溶解度の高い分解物の収率を下げるために問題視されているが、一方で、凝集物を新規な食品素材として使用できる可能性がある。本論文は、プロテアーゼ処理によって生じる分離大豆タンパク質 (SPI) の凝集反応を物理化学および生化学的手法を用いて詳細に解析し、反応の諸性質や反応機構に関する知見を得たものであり、成果として評価すべき点は以下のとおりである。

1. プロテアーゼ処理によって生じるSPIの凝集反応を、酵素反応溶液の濁度を測定することにより、連続的に追跡できる簡便な方法を確立し、凝集反応を詳細に解析するための基盤を築いた。

2. ズブチリシン・カールスベルグによるSPIの凝集反応をモデルケースとした解析から、SPIが反応初期に速やかに低分子化された(第1相)のちに、分子量16,000以下の低分子断片が凝集する(第2相)こと、および第2相において生じた分解物が凝集に関与することなど、凝集反応の反応機構に関する多くの重要な知見を得た。また、蛍光測定により、SPIの構造変化が凝集の進行と相関することを示し、構造変化によって溶媒側に露出したSPI内部の疎水性領域が疎水の相互作用によって凝集することを示唆した。

3. 濁度測定により、異なるプロテアーゼのSPI凝集活性を比較する方法を開発した。本方法より、基質特異性の異なる8種のプロテアーゼのSPI凝集活性を比較した。凝集物の収率はフィシンの場合に最も高いこと、および生成した分解物はズブチリシン・カールスベルグの場合に最も凝集しやすいことを明らかにした。

4. 凝集反応の第1相で見られる濁度減少の初速度が、ミカエリス・メンテン型の酵素濃度と基質濃度依存性を示すこと、また、本方法によって決定された各種プロテアーゼの活性が、従来法であるタンパク質加水分解物中の酸可溶性画分の増加速度から求められた活性と高い相関を示すことを明らかにし、濁度測定法が、従来法に替わりうる簡便なプロテアーゼ活性評価法として使用できることを明らかにした。

以上のように本論文は、プロテアーゼ処理によって生じる大豆タンパク質の凝集反応に関する多くの重要な知見を得たものであり、酵素化学、食品分子機能学、および農産製造学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成16年1月9日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。