

氏名	張 国 艶
学位(専攻分野)	博士 (農学)
学位記番号	農博第1131号
学位授与の日付	平成12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	農学研究科食品工学専攻
学位論文題目	Studies on Enzymatic Cross-Linking of Soybean Glycinins by Mammalian and Microbial Transglutaminases (動物および微生物のトランスグルタミナーゼによるダイズグリシニンの酵素的架橋化に関する研究)

論文調査委員 (主査) 教授 森 友彦 教授 井上國世 教授 内海 成

### 論文内容の要旨

トランスグルタミナーゼ (TGase) は、タンパク質分子中のグルタミン残基とリジン残基の間にイソペプチド結合を形成する反応を触媒することが知られており、食品加工においてテクスチャーの改質への応用が進められている。本研究は、ダイズタンパク質の加工における TGase の高度利用の観点から、本酵素反応による架橋化とポリマー形成の機作を明らかにすることを目的として行ったものである。その内容の主な点は次の通りである。

第1章では、各種ダイズ品種におけるグリシニンの分子種分析を行った。グリシニンは6コのサブユニットからなる6量体構造をとっており、サブユニットは酸性ポリペプチド (A鎖) と塩基性ポリペプチド (B鎖) からなる。これまでに、サブユニット種として  $A_{1a}B_{1b}$ 、 $A_{1b}B_2$ 、 $A_2B_{1a}$ 、 $A_3B_4$ 、 $A_5A_4B_3$  が見い出されている。これらのサブユニット種の組合せによって複数のグリシニン分子種を生じる可能性がある。 $A_5A_4B_3$  サブユニットを含まないダイズ品種 (Raiden, Suzuyutaka) についての分析から、 $A_3B_4$  サブユニットを含まないグリシニン分子種の存在、さらに  $A_3B_4$  サブユニット含量が比較的少ないグリシニン分子種の存在を示した。 $A_5A_4B_3$  サブユニットを含むダイズ品種 (Shirotsurunoko, York) においては  $A_3B_4$  サブユニット欠のグリシニン分子種が微量存在することを示した。TGase 反応系の基質に用いるダイズタンパク質の主要成分であるグリシニンについて、サブユニット組成の異なる複数の分子種が天然に存在することを見出すとともに、分子種混在標品および個別分子種標品の調製を可能にした。

第2章では、単離サブユニット種からの再構成による単一グリシニン分子種の形成を行った。Shirotsurunoko 品種からグリシニン画分の精製、精製グリシニン標品から構成サブユニット種の分画を行うことにより、 $A_3B_4$  サブユニットの分離精製に成功した。単離した  $A_3B_4$  サブユニット標品から透析法によりグリシニンの再構成を行った。再構成産物はサイズ、サブユニット構造、高次構造の点から天然のグリシニンと同等であることを示した。

第3章では、TGase によるグリシニンの酵素的架橋化の反応機作を解析した。微生物由来の TGase (MTGase) および動物由来の TGase (GTGase) による天然のグリシニンの架橋化反応における  $Ca^{2+}$  および SH 還元剤のジチオスレイトール (DTT) の役割について、基質および酵素への作用の両側面から検討を行った。基質グリシニンの高次構造への  $Ca^{2+}$ 、DTT の影響に関して、1 mM-10 mM DTT では2次構造に変化を生じないこと、10 mM DTT では3次構造が変化することを示した。 $Ca^{2+}$  については、2.5 mM では2次構造に変化を生じないこと、5 mM 以上では白濁化が始まることが観察され基質として大きな構造変化が起ることを示した。TGase によるグリシニンの架橋化反応において、低濃度の  $Ca^{2+}$  は MTGase の場合には反応速度に影響を与えないが、GTGase の場合には必須であり、2.5 mM で反応速度が最大であることを示した。高濃度の  $Ca^{2+}$  は両 TGase で架橋化を抑制し、一方 DTT は両 TGase で反応速度を促進した。低濃度の  $Ca^{2+}$ 、DTT の反応生成物ポリマーのサイズへの影響に関して、TGase 反応により形成されるポリマーのサイズは DTT では差が見られない

が、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下ではポリマーのサイズが大きくなることを示した。以上の結果から、TGase によるグリシニンの架橋化反応において、低濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  および DTT は主に TGase の活性に関与し、高濃度になると基質への影響が顕著になることを考察した。 $\text{A}_3\text{B}_4$  サブユニットから再構成した単一グリシニン分子種を基質に用いて TGase による架橋化反応を調べ、MTGase の方が GTGase よりも架橋化が早く進行することを示した。この反応性の違いは天然のグリシニンを基質に用いた場合と同様の結果であることを示し、再構成単一グリシニン分子種は TGase 反応機構の詳細な解析に有用な基質になることを提示した。

## 論文審査の結果の要旨

未・低利用のタンパク質資源を食料として活用するためには、それらタンパク質の加工機能特性を望ましいものに改質する必要がある。その有力な手段の一つとしてトランスグルタミナーゼ (TGase) による架橋化反応の利用が考えられている。本論文は、モルモット肝臓由来で  $\text{Ca}^{2+}$  依存性である TGase (GTGase) と *Streptovorticillum* sp. 由来で  $\text{Ca}^{2+}$  非依存性である TGase (MTGase) を用い、ダイズグリシニンを基質として架橋化反応の基本的性質を詳細に調べたものである。評価される主な点は次の通りである。

1. TGase 反応の基質としてグリシニンを用いる場合、グリシニンの分子種多様性により架橋反応メカニズムの解析が困難なことが予想される。各種のダイズ品種についてグリシニンの分子種分析を行った結果、Shirotsurunoko および York の品種においては多様性の巾が比較的狭いことを見出し、これら品種から調製したグリシニン標品は基質としてある程度の適性を備えていることを示した。Raiden および Suzuyutaka の品種からは  $\text{A}_3\text{B}_4$  サブユニット欠のグリシニン分子種を見出し、TGase 反応の基質として有用であることを示唆した。

2. Shirotsurunoko 品種のグリシニン標品を用いて、構成サブユニットの分離・精製、単離サブユニットからの再構成の操作により、 $\text{A}_3\text{B}_4$  サブユニットのみからなるグリシニンの作製に成功した。この単一グリシニン分子種はタンパク質構造の点から天然のグリシニンと同等であることを明らかにしており、TGase 反応の適切な基質の調製手段を見出した。

3. GTGase および MTGase によるグリシニン (天然型) の架橋化反応における  $\text{Ca}^{2+}$  および DTT の役割を詳細に調べ、酵素および基質の両者にそれらが作用し、反応速度ならびに反応生成物の変動要因になることを明らかにした。TGase によるタンパク質のポリマー化において反応条件下での基質自身の解離・会合の程度が反応生成物の性質に大きく寄与することを見出し、加工機能特性の改質の応用面に有用な知見を提示している。天然型グリシニンおよび再構成単一グリシニン分子種を用いて TGase による架橋化を調べ、MTGase は GTGase よりも  $\text{A}_3\text{B}_4$  サブユニットに対する反応性が高いことを見出した。これは、TGase の起源の違いにより反応特異性に差異があることを明確に示す新たな知見として注目される。

以上のように、本論文は TGase によるダイズグリシニンの架橋化について詳細に調べるとともに加工機能特性の改質への道筋をつけたもので、食品加工学ならびに食品物性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 12 年 2 月 14 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。