

氏名	和田 律子
学位(専攻分野)	博士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1211 号
学位授与の日付	平成 13 年 7 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 応用生命科学専攻
学位論文題目	Studies on Thermal Denaturation and Molecular Aggregation of $\beta$ -Lactoglobulin ( $\beta$ -ラクトグロブリンの熱変性と分子凝集に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教授 北 畠 直 文    教授 森    友 彦    教授 吉 川 正 明

### 論 文 内 容 の 要 旨

牛乳乳清タンパク質はチーズやカゼイン製造後の残渣として大量に得られ、食品素材として利用されている。乳清タンパク質を低イオン強度下、中性 pH 域で加熱すると通常の熱処理乳清タンパク質とは異なる特性を有する可溶性凝集体を形成することが既に知られている。しかしゲル化能等の食品機能発現機構、すなわちタンパク質分子の加熱による分子凝集体形成機構の詳細は未だ明らかにされていない。そこで乳清中に最も多く存在するタンパク質、 $\beta$ -ラクトグロブリン ( $\beta$ LG) を用いて機構解析のための基礎的研究を行った。 $\beta$ LG は分子量約 18400、分子内に遊離のチオール (SH) 基を 1 個 (Cys<sup>121</sup>)、ジスルフィド (S-S) 結合を 2 個 (Cys<sup>66</sup>-Cys<sup>160</sup>, Cys<sup>106</sup>-Cys<sup>119</sup>) 持つ球状タンパク質である。 $\beta$ LG A を用いて Cys<sup>121</sup> の SH 基を *N*-エチルマレイミド (NEM) によって修飾した  $\beta$ LG A (NEM- $\beta$ LG A) を調製し、加熱冷却に伴う構造変化と分子凝集体形成について未修飾  $\beta$ LG A との違いを検討した結果、 $\beta$ LG A は濃度上昇に伴って S-S 結合を介した凝集体を形成したのに対し、NEM- $\beta$ LG A は全く凝集体を形成しなかった。よって加熱凝集体形成には遊離の SH 基が必要であることが示された。また加熱前後の UV 差スペクトル、蛍光スペクトル、ペプシンによる消化作用の測定結果から、 $\beta$ LG A の加熱冷却に伴う可逆的、不可逆的な変化は SH 基の反応性に起因すること、加熱 NEM- $\beta$ LG A は未加熱のものと同様の構造をとること、NEM- $\beta$ LG A は加熱後も未加熱の  $\beta$ LG A と同様の性質を有していることが示唆された。

Cys<sup>121</sup> 以外の SH 基においても Cys<sup>121</sup> の SH 基と同様な役割を果たすのか否か、すなわち Cys<sup>121</sup> の SH 基以外の SH 基が  $\beta$ LG A 分子間の SH/S-S 交換反応を引き起こし、分子間 S-S 結合を介した凝集体が形成されるのか否かを調べた。NEM- $\beta$ LG A をジチオスレイトール (DTT) と共に加熱した後、SDS-PAGE によって凝集体形成の様子を調べた。その結果、低濃度の DTT が分子間 S-S 結合の組み換えを誘発し、重合体形成に有効に働くと考えられ、Cys<sup>121</sup> 以外の Cys であっても分子間 SH/S-S 交換反応を引き起こしうること、 $\beta$ LG A の加熱に伴う重合体形成は分子間 S-S 結合が生じて引き起こされることが示された。

タンパク質の SH 基の反応性は pH に依存し、酸性条件下では反応性は低下する。そこで酸性、中性各条件下での  $\beta$ LG A と NEM- $\beta$ LG A の変性状態と加熱構造変化について検討した。示差走査熱量計 (DSC) を用いて熱分析を行った結果、pH7.5 の  $\beta$ LG A では吸熱が約 75°C に見られ、NEM- $\beta$ LG A (pH7.5) では低い吸熱反応を示した。pH3.0 の  $\beta$ LG A の場合は吸熱が約 90°C に見られ、95°C で加熱して電気泳動を行うと僅かながらも凝集体の形成が認められた。よって SH 基の反応性が低い酸性条件下 (pH3.0) では凝集体形成にはより高い温度が必要であることが示された。pH7.5 の  $\beta$ LG A と NEM- $\beta$ LG A, pH3.0 の  $\beta$ LG A は加熱前後の構造に違いがあると考えられた。

$\beta$ LG の凝集体形成の詳細について明らかにするためには個々のアミノ酸残基の役割を明らかにすることが重要である。そこでアミノ酸残基を置換した  $\beta$ LG を作成する前段階として、牛の  $\beta$ LG 遺伝子を大腸菌とメタノール資化性酵母菌に組み込み、 $\beta$ LG の発現系構築を試みた。SDS-PAGE, ウエスタンブロッティングの結果、両者ともに  $\beta$ LG の発現が認められ、分子量も標準  $\beta$ LG と同等の値を示した。未変性の  $\beta$ LG はペプシンの作用を極めて受けにくいことから、分解される

か否かを調べることによって、発現 $\beta$ LGが本来の $\beta$ LGと同様の構造を有するの否かについて検討した。その結果、いずれの $\beta$ LGもペプシンによる消化を受けなかったが、標準 $\beta$ LG以外の分子量を示すバンドも僅かながら残り、 $\beta$ LGと同等のコンフォメーションを有しないものも僅かに発現したと考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

牛乳乳清タンパク質は食品素材として広く利用されているが、ゲル化能等の食品機能発現機構、すなわちタンパク質分子の加熱による分子凝集体形成機構の詳細は未だ明らかにされていない。本研究では乳清タンパク質の熱変性と分子凝集体形成機構を明らかにすることを目的として、乳清中に最も多く含まれているタンパク質、 $\beta$ LGを用いて熱変性と分子凝集体形成に関する基礎研究を行った。成果として評価できる点は以下の通りである。

- (1) $\beta$ LGは分子内に2つのS-S結合とCys<sup>121</sup>に1つの遊離のSH基を持っている。 $\beta$ LGの加熱による凝集体形成にはCys<sup>121</sup>の遊離のSH基の関与が指摘されているが、詳細は知られていない。そこでNEMでCys<sup>121</sup>を修飾した $\beta$ LG(NEM- $\beta$ LG)を作成し、加熱冷却に伴う構造変化と分子凝集体形成について検討した。その結果、 $\beta$ LGは低イオン強度下、中性pH域で加熱すると分子間S-S結合を介した可溶性の凝集体を形成し、NaCl添加によってさらに大きな凝集体を形成したが、NEM- $\beta$ LGは加熱を行っても凝集体を形成せず、可逆的に変化して加熱前とは僅かに異なる構造を取ることを示した。
- (2)NEM- $\beta$ LGにSH基還元試薬DTTを添加して加熱を行うと、低濃度のDTT添加時に分子間のSH/S-S交換反応による分子間S-S結合を介した凝集体を形成した。従ってCys<sup>121</sup>のSH基でなくとも遊離のSH基が存在すれば、 $\beta$ LGは分子間S-S結合を介した凝集体を形成することを示した。
- (3) $\beta$ LGのpHと遊離のSH基の修飾の有無による熱変性挙動について検討した。その結果、 $\beta$ LGが酸性条件下において凝集体を形成するためには、中性条件下よりも高い温度が必要であることを示した。
- (4)分子凝集体形成における個々のアミノ酸残基の役割を明らかにするための前段階として、大腸菌とメタノール資化性酵母菌を用いて $\beta$ LGの発現系構築を試み、その発現を確認した。

以上のように本論文は $\beta$ LGの加熱変性と分子凝集体形成に関し、詳細な検討を行うと共に新たな知見を見出している。これらの成果は食品機能調節学、食品感覚特性学、機能食糧学の分野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13年6月25日、論文並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。