

氏 名	かた 片 やま 山 ひろ 弘 かず 一
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1441 号
学位授与の日付	平 成 16 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 農 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Studies on ovalbumin and β -lactoglobulin aggregates induced by urea and their functionalities (尿素により誘起されるオボアルブミンと β -ラクトグロブリンのアグリゲートとその機能性に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 松 村 康 生 教 授 内 海 成 教 授 北 畠 直 文

論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質の機能を改変する試みとして、これまで種々の化学修飾、酵素処理が行われてきている。その中で、近年、食品タンパク質についてその集合体化がある種の機能特性の向上に有効であることが示されている。分子中にシステイン残基を有するタンパク質は、高濃度尿素溶液中で変性し、SH/SS 交換反応により分子間ジスルフィド結合を介した凝集体（アグリゲート）、さらにはゲルを形成することが知られている。しかし、これまで生成したアグリゲートに関して詳細に研究した報告例はなく、尿素誘起アグリゲートがどのような生理的あるいは加工上の機能性を有しているかは不明である。

卵白タンパク質のオボアルブミン（OVA）、牛乳タンパク質の β -ラクトグロブリン（ β -LG）は、それぞれ複数のシステイン残基を分子中に有し、尿素によりアグリゲート及びゲルを形成することが知られている。OVA、 β -LG はともに優れたゲル形成性を有しているが、乳化性などの他の機能特性に関して改善の余地がある。また OVA、 β -LG はともに食物アレルギーを引き起こすことが知られている。尿素によるアグリゲーションは、機能特性の向上とともにアレルゲン性などのネガティブな性質の低減化にも有効であると期待される。本論文では OVA、 β -LG を対象とし、尿素処理によるアグリゲート及びゲルの生成機構を解析するとともに、これら生成物の機能特性及びアレルゲン性、消化性の検討を行った。その主な内容は以下のとおりである。

第一章では、OVA と β -LG の混合系において、尿素処理によりヘテロアグリゲートが形成されるのか確認を行った。ヘテロアグリゲートとは OVA と β -LG の 2 成分から構成されるアグリゲートである。アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、質量分析、SDS-PAGE 等の手法によりヘテロアグリゲートの形成が確認された。反応条件により、OVA と β -LG の組成比の異なるヘテロアグリゲートが形成されることが推察された。また、アフィニティークロマトグラフィー、イムノプロットの手法により、ヘテロアグリゲートは極めて初期から OVA と β -LG がランダムに組み合わせられて生成することが示唆された。

第二章では、尿素により誘起される OVA、 β -LG アグリゲートの消化性及び抗原性の検討を行った。OVA はトリプシンに、 β -LG はペプシンに消化抵抗性を示したが、調製したアグリゲートはいずれも両酵素や人工消化液により速やかに消化された。OVA と β -LG のホモアグリゲート混合物（MIX. A）と混合系アグリゲート（COM. A）では、消化速度とペプチドフラグメントパターンにわずかに違いが生じた。消化性と高次構造の関連を調べるため、モノマー及びアグリゲートの高次構造を CD 測定により解析した。いずれのアグリゲートもモノマーとは異なるスペクトルを示し、アグリゲートとモノマーでは異なった高次構造を有していることが示唆された。アグリゲート形成による抗原性（免疫反応性）の変化を検討した。抗原性の強さを競合 ELISA 法により調べたところ、生成したアグリゲートの一部はモノマーより弱い抗原性を示したが、一部のアグリゲートはモノマーより強い抗原性を示した。またオクタロニー法によりアグリゲートの一部のエピトープが消失していることが示唆された。

第三章では、尿素により誘起される OVA、 β -LG アグリゲートの機能特性について検討した。各 pH に対する溶解性を

調べたところ、アグリゲートはモノマーとは異なる溶解性を示した。すなわち、いずれのアグリゲートも pH5.5-6.5 の範囲でモノマーより高い溶解性を示したが、pH4 以下ではほとんど溶解しなかった。またアグリゲートサイズが増加するにつれ、溶解性は低下したが、アグリゲートの中では COM. A が最も高い溶解性を示した。各 pH に対する乳化性を調べたところ、アグリゲートはモノマーとは異なる乳化性を示した。各アグリゲートは pH5 で最大の乳化能、及び乳化安定性を示したが、pH4 以下でいずれも急激に低下した。またアグリゲートサイズが増加するにつれ乳化能が低下した。アグリゲートの中では COM. A が最も高い乳化性を示した。尿素処理によってゲルを形成させ、その破断特性を調べた。8M 尿素存在下では OVA、 β -LG それぞれの単独系ゲルより混合系ゲルの方が全体的に硬いゲルを形成した。また混合系のゲルは OVA の割合が大きいほど荷重と圧縮変形率が大きくなった。ゲルを透析して尿素を除去した場合、全体的にゲルの破断特性が変化した。

論文審査の結果の要旨

タンパク質の集合体形成がある種の性質の向上に有効であることが示されている。これまでオボアルブミン (OVA) と β -ラクトグロブリン (β -LG) は尿素中で SH/SS 交換反応によりゲルを形成することが知られているが、そのゲル化の過程で形成される凝集体 (アグリゲート) についてはほとんど研究されていない。本論文は尿素処理により誘起されるアグリゲート及びゲルの生成機構を解析するとともに、これら生成物の機能特性及びアレルゲン性、消化性の検討を行ったものである。評価される主な点は以下のとおりである。

1. OVA と β -LG の混合系において尿素によりヘテロアグリゲートが形成されることを示した。ヘテロアグリゲートは OVA と β -LG が混成した構造であることが示唆された。また反応条件により OVA と β -LG の組成比の異なるヘテロアグリゲートが形成されることが推察された。これらの知見から、システイン残基を有する他の異種タンパク質間同士においても、尿素中で分子間ジスルフィド結合を介したヘテロアグリゲートを調製できる可能性が示唆された。
2. モノマーは消化酵素の種類によっては分解を受けない場合もあったが、調製したアグリゲートは、用いたいずれの消化酵素によっても容易に分解を受けた。これはアグリゲート形成により構成するタンパク質の高次構造が変化し、消化酵素の作用を受けやすくなったためと推察される。この結果により、尿素により形成されたアグリゲートが優れた消化性を有する食品素材となりうる可能性が示された。またアグリゲート形成により、抗原性の低減化が一部認められ、低アレルゲン食品の開発に本手法が貢献できる可能性を示した。
3. アグリゲートとモノマーでは、各 pH における溶解性が異なることを見出した。アグリゲートは特に弱酸性から中性で高い溶解性を示した。OVA と β -LG のホモアグリゲート、あるいはそれらの混合物と比較して、混合系アグリゲート (COM. A) の方が、高い溶解性を示した。また乳化性に関してアグリゲートとモノマーとでは相違が見られた。すなわち、モノマーと異なり、各アグリゲートは弱酸性で最大の乳化性を示した。アグリゲートの中では COM. A が最も高い乳化性を示した。また、尿素誘起ゲルについては、OVA、 β -LG それぞれの単独系ゲルより混合系ゲルの方が硬いゲルを形成した。これらの知見により、本手法が新規食品素材の開発に有効である可能性が示された。

以上のように本論文は、尿素中でのタンパク質アグリゲートの形成が種々の機能特性の改善、アレルゲン性の低下及び消化性の向上に有効であることを明らかにしたものであり、その成果は未・低利用タンパク質資源の有効利用に際して活用が期待される。したがって、食品科学、健康科学、品質評価学などに寄与するところが多い。

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4月22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。