

氏 名	ヤン イー フイ Yong Yie Hui
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1569 号
学位授与の日付	平 成 18 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 農 学 専 攻
学位論文題目	Effects of Protein Glutaminase Treatments on Structure and Functional Properties of Cereal Proteins (穀類タンパク質の構造と機能特性に及ぼすプロテイングルタミナーゼ処理の効果)
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

タンパク質資源の中には、食品として有効利用されにくいものがあり、その機能特性を酵素反応によって改変する試みが多くなされている。近年、タンパク質のグルタミン残基をグルタミン酸に変換する新規な酵素、プロテイングルタミナーゼ (PG) が発見された。PG は水田土壌から分離された *Chryseobacterium* 属の、新種の菌由来の酵素である。PG 反応によって、タンパク質の負電荷が増加する結果、等電点の低下、静電的な反発力の増大および水和状態の変化が引き起こされる。

本論文では、難溶性の穀類タンパク質であるトウモロコシのゼインおよび小麦のグルテン、グリアジンを研究対象とし、PG の反応性を検討した。また、これらのタンパク質の構造と機能特性が、脱アミド化によってどのような影響を受けるのかを解析した。

第1章では、ゼインの PG による脱アミド化を行い、それに伴う構造と機能特性の変化を明らかにした。ゼイン溶液 (リン酸緩衝液 (pH8)+11.7%エタノール) に PG を 2 回に分けて添加し 40°C で反応させたところ、脱アミド化反応が徐々に進行し、137時間で脱アミド化率 (DD) 62%に達した。SDS-PAGE で分析したところ、脱アミド化ゼインのバンドは、未修飾のものに比べ移動度が僅かに低くなり、ゲルの上方にシフトしていた。なおペプチドへの断片化は生じていなかった。このことは脱アミド化により、ゼインのコンパクトな構造が、より伸長した構造に変化したことを示唆している。溶液状態におけるゼインの二次構造を検討するため円二色性 (CD) 測定を行ったところ、脱アミド化により、ゼインの α ヘリックス含量は減少していることが確かめられた。一方、凍結乾燥で調製した粉末状態における二次構造含量を求めるため、フーリエ変換赤外分光 (FT-IR) 測定を行った。その結果、脱アミド化により、 α ヘリックス含量の減少およびランダムコイル含量の増加が確かめられた。また、分子間 β シート含量の減少が観察されたことから、脱アミド化によって、分子間相互作用、即ち凝集力が弱められることが示唆された。機能特性については、溶解性および乳化性を検討した。脱アミド化されたゼインは、特に pH7 の緩衝液中で、優れた溶解性および乳化性を示した。ゼインの粉末系における抗酸化能を確認するために、ゼイン粉末と混合したエイコサペンタエン酸エチルエステルの残存量および過酸化価を経時的に測定した。その結果、脱アミド化処理はゼインの抗酸化能を低下させることが明らかとなった。

第2章では、小麦グルテンの構造と機能特性が PG 反応によりどのように変化するのか解析を行った。グルテンをリン酸緩衝液 (pH7) 中に分散させ、40°C で PG 反応を行った。グルテンの脱アミド化は、ゼインより速やかに進行し、30時間で DD 約72%に達した。SDS-PAGE 分析の結果、1.5-2.0時間の反応時間 (DD35-45%) で、グルテンサブユニットの大部分が未修飾のものに比べ上方にシフトしていることが確認された。DD72%のグルテン粉末に対して FT-IR 測定を行ったところ、分子間 β シートの含量が脱アミド化によって減少していることが明らかとなった。このことより、脱アミド化によって、グルテンの凝集力が弱められることが示唆された。グルテンの溶解性および乳化性は、脱アミド化によって pH7 では著しく改善されたものの、pH3 では低下する傾向を示した。Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法を用いて、グルテンのアレルゲン性 (IgE との反応性) に及ぼす脱アミド化の影響を検討した。その結果、DD の上昇に伴っ

てグルテンのアレルゲン性は大きく低下した。ただ、患者の血清により、その効果は異なっており、中程度の DD レベル (60%) で反応性を示さない血清もあれば、反応性の完全な消失には、より高い DD レベル (72%) を必要とする場合もあった。

第3章では、第2章のグルテンの結果に基づき、その主要な構成成分であるグリアジンを分離し、その構造と機能特性が、PG 反応によりどのように変化するのか解析を行った。グリアジンをリン酸緩衝液 (pH7) に分散させ、40°C で PG 反応を行った。その結果、最初の4時間で、反応は速やかに進行し、DD 約70%にまで達した。その後、48時間まで反応はゆっくりと進行し、DD 約90%に達した。電気泳動の結果、脱アミド化されたグリアジンのサブユニットは、未修飾のものに比べ上方にシフトすることが確認された。また、2次元電気泳動 (2D-PAGE) 分析により、脱アミド化による等電点の低下を観察した。特に DD47%の時点で、全てのグリアジンサブユニットの酸性側へのシフトが完了していた。次に、CD 分析により、DD のレベルが二次構造に及ぼす影響について詳細に検討した。未修飾グリアジンに比べ DD47%の場合、 α ヘリックスおよびランダムコイルの含量は最も高かったが、 β シートの含量は最小値になった。このことより、DD47%の時に未変性のものと大きく異なる構造をとることが明らかとなった。しかし、さらに脱アミド化が進行すると、むしろ未修飾に近い構造をとることが示された。脱アミド化によって、グリアジンの溶解性は大きく変化した。特に中性の pH 領域では、DD が23%に達した時点で、著しい改善が認められた。一方 pH3 では DD47%から溶解性が急激に低下した。グリアジンのアレルゲン性の評価について、ELISA 法 (IgE との反応性) およびウェスタンブロット法 (IgG との反応性) による抗原性の検出を行った。その結果、DD 約70%の脱アミド化によってグリアジンの抗原性は大きく低下することが判明した。また、2D-PAGE ウェスタンブロットで酸性側にシフトした脱アミド化グリアジンサブユニットについては、その抗原性が大幅に低下していることを確認した。

論文審査の結果の要旨

タンパク質資源の中には、そのままでは食品に利用しにくいものがあるため、酵素を用い、タンパク質の特性を改変する試みが多く行われている。例えば、穀類タンパク質であるトウモロコシのゼインおよび小麦のグルテンは大量に得られるが、難溶性であるため食品系への幅広い応用が妨げられている。タンパク質の酵素的改変では、これまで主としてプロテアーゼが使用されていたが、近年トランスグルタミナーゼの利用も拡大してきている。しかし、これらの酵素反応では、タンパク質を分解あるいは架橋するため、タンパク質のオリジナルなサイズをほとんど変化させることなく、その性質を改変する酵素の出現が待たれていた。最近、タンパク質のグルタミン残基をグルタミン酸に変換する新規な酵素 PG が発見された。本論文は PG を用い、グルタミン残基に富んでいるトウモロコシのゼインおよび小麦のグルテン、グリアジンに対する反応性を検討するとともに、これらのタンパク質の構造と機能特性が脱アミド化によってどのような影響を受けるのか、解析を行ったものである。評価すべき主な点は以下の通りである。

1. ゼイン、グルテンおよびグリアジン溶液に PG を添加し、40°C で脱アミド化反応を行った。その結果、これらのタンパク質は難溶性であるにもかかわらず、PG が作用し得ることが確認された。また、その反応性はタンパク質毎に異なっていることを明らかにした。
2. 脱アミド化による構造変化については、電気泳動および分光学的手法を用いて解析を行った。SDS-PAGE で分析したところ、脱アミド化されたゼイン、グルテンおよびグリアジンのサブユニットは、未修飾のものに比べてゲルの上方にシフトすることが認められた。グリアジンについては 2D-PAGE を行い、脱アミド化による等電点の低下を観察した。また、これらのタンパク質は、粉末状態においても、溶液中でも、脱アミド化により、二次構造が変化することが確認された。特に分子間 β シート構造の減少が共通して認められた。このことより、脱アミド化によって、分子間相互作用、即ち凝集能が弱められていることが示唆された。
3. 脱アミド化反応によって、これらのタンパク質の溶解度は上昇した。また、ゼインおよびグルテンの乳化性を分析したところ、脱アミド化により改善されることが確かめられた。特に、中性 pH 領域で溶解度も乳化性も著しく改善されたことから、様々な食品への用途拡大の可能性が示唆された。
4. グルテンおよびグリアジンのアレルゲン性に関して、脱アミド化の影響を検討した。その結果、脱アミド化率の上昇

に伴って、グルテンおよびグリアジンのアレルゲン性は低下した。また、グリアジンについては、2D-PAGE とウェスタンブロットを組み合わせた分析結果より、脱アミド化グリアジンサブユニットの酸性側へのシフトと抗原性の低下がリンクしていることを明らかにした。

以上のように、本論文は、PG 処理が穀類タンパク質の構造を大きく変化させ、その溶解性や乳化性などの機能特性およびアレルゲン性を著しく改善することを明らかにしたものであり、食品加工学、品質評価学、食品健康科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18年2月16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。