

氏 名	ます 榎 だ てつ や 哉
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2590 号
学位授与の日付	平 成 18 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Studies on structure-sweetness relationship in egg white lysozyme (卵白リゾチームの甘味と構造に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 北 畠 直 文 教 授 吉 川 正 明 教 授 河 田 照 雄

論 文 内 容 の 要 旨

リゾチーム (EC 3. 2. 1. 17) は広く動植物界に存在し、食品領域では、品質の保持や特性の改良などの目的で利用されている酵素である。本論文では鶏卵卵白リゾチームが溶菌活性のみならず、甘味を呈する甘味タンパク質であることを新たに見出し、その詳細を明らかにしている。

第1章では、リゾチームの溶菌活性と甘味特性の関連について考究している。リゾチームは溶菌活性を有するため、基質分解物である糖質による甘味特性への影響が考えられる。溶菌活性に関わる触媒残基は E35, D52 であるので、その側鎖のカルボキシル基の特異的修飾を行い、溶菌活性を消失させた修飾リゾチームを作製し、溶菌活性ならびに甘味特性を官能検査により検討したところ、溶菌活性を消失した修飾リゾチームが甘味を呈したことから、リゾチームの甘味特性は溶菌活性とは対応せず、触媒残基は甘味発現には寄与しないことを明らかにした。リゾチーム1分子にはジスルフィド結合が4つ存在するがこれらを還元した場合、甘味が消失したことから、リゾチームの立体構造の維持が甘味発現に重要な役割を果たしていることが示された。次に鶏卵リゾチームとは基質特異性、アミノ酸配列、立体構造が大きく異なるガチョウ、ダチョウリゾチームの甘味性について検討したところ、これらのリゾチームも鶏卵リゾチーム同様甘味を呈することがわかった。鶏卵リゾチームやこれらのリゾチームとは立体構造が異なるが、双方等電点が11以上の塩基性タンパク質であることから、リゾチームの甘味発現には塩基性度が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

第2章ではリゾチームの塩基性度と甘味特性の関連についてリジン残基の修飾を行い、甘味活性に与える影響を調べている。リゾチームは分子内に塩基性アミノ酸リジン6残基を有する。そこで、結晶化法により精製したリゾチームをリジン残基側鎖の正電荷を維持するグアニジル化、側鎖の正電荷を中和するアセチル化、側鎖の正電荷を負電荷に変換するホスホビリドキサル化を行った。 α -メチルイソウレア溶液と反応させ、グアニジル化の結果、グアニジル化リゾチームの甘味閾値が未修飾リゾチームとその甘味閾値が同等であったことより、リジン残基側鎖の正電荷を維持するグアニジル化では甘味に影響を与えないことが明らかとなった。次に、アセチル化を行った。その結果、4残基以上アセチル化されたリゾチームは有意にその甘味閾値が上昇した。ホスホビリドキサル (PLP) 化の結果、リゾチームの甘味閾値はリジン残基が3残基 PLP で修飾された場合、顕著に上昇した。4残基以上修飾されたものは甘味を呈さなかった。閾値の上昇した PLP 化リゾチームについて脱リン酸化を行い、リジン残基側鎖の電荷状況を負電荷から元の正電荷に戻した場合、未修飾リゾチームと同等の甘味閾値を示した。これらの結果から、リゾチームの甘味発現にはリジン残基側鎖の塩基性度が重要であることが明らかになった。

第3章では、酵母 *Pichia pastoris* でのリゾチーム大量発現系の構築を行い、卵白リゾチームと同じ N 末端アミノ酸配列を持つ組換え体リゾチームの発現に成功した。この組換え体リゾチームは、卵白リゾチームと同等の溶菌活性、甘味閾値を有していた。発現量は培地上清1リットル当たり約400 mg であり、ヒトによる官能検査に十分量であった。また、他の甘味タンパク質であるソーマチンⅡを同様に酵母 *Pichia pastoris* で発現することにも成功している。

第4章では、酵母による発現系を用い部位特異変異体を作製し、分子表面に存在しているリジン残基、アルギニン残基の

甘味に与える影響を精査している。リジン6残基のうち、K13A, K96Aの甘味閾値が顕著に上昇したが、これら以外の4つのリジン残基の変異体は甘味閾値に影響を与えなかった。次にアルギニン残基をアラニン残基に変える変異を行ったところ、R14A, R21A, R73Aの変異により顕著に甘味閾値が上昇した。これら3つのアルギニン残基は、甘味に影響を与えるリジン残基(K13, K96)と同じ分子面に局在していた。一方、この面に存在しないアルギニン残基の変異体(R45A, R68A)は甘味に影響を与えなかった。これらの結果から、立体構造上同一分子面に存在する5つの塩基性アミノ酸残基(K13, K96, R14, R21, R73)がリゾチームの甘味発現に重要な役割を果たすことが明らかになった。さらに甘味発現に関わる5つの塩基性アミノ酸残基の2および3アミノ酸変異体を作製し甘味閾値に与える影響を検討した。その結果、K13-R14およびR21-R73で形成される塩基性領域が甘味発現に重要であることが明らかとなった。この知見をもとにソーマチンと比較を行ったところ、ソーマチンの甘味発現部位はリゾチームの甘味発現部位に比べてかなり広く、なお且つクレフト部位という特異的な構造を有していた。この差異が甘味タンパク質の甘味特性の違いをもたらしているものと結論した。

論文審査の結果の要旨

リゾチーム(EC 3. 2. 1. 17)は、細菌細胞壁に存在するN-アセチルムラミン酸とN-アセチルグルコサミン間の β 1→4結合を加水分解する溶菌酵素であり、食品領域では、品質の保持や特性の改良などの目的で利用されている。本研究では溶菌酵素であるリゾチームが甘味を呈することを見出し、化学修飾法、部位特異的変異法によるタンパク質工学的解析により、リゾチームの甘味発現機構を明らかにしている。評価すべき主要な点は以下の通りである。

- 1) リゾチームの甘味発現は溶菌活性とは対応しないことを化学修飾法により証明した。鶏卵以外にもガチョウ、ダチョウリゾチームも甘味を呈することを明らかにした。
- 2) リゾチームのリジン残基の化学修飾により、リゾチームの甘味発現にはリジン残基側鎖の塩基性度が重要であることを明らかにした。
- 3) 酵母 *Pichia pastoris*でのリゾチーム大量発現系の構築を行い、培地1リットル当たり約400 mgの組換え体リゾチームの分泌生産に成功した。また甘味タンパク質ソーマチンの分泌発現に成功した。
- 4) 部位特異的変異によりリゾチームの甘味発現に係わる塩基性残基(リジン, アルギニン)を検討し、K13, K96, R14, R21, R73で形成される領域の塩基性度が甘味発現に対し重要であることを明らかにした。

以上のように、本論文はリゾチームの甘味活性発現機構を明らかにしたものであり、食品タンパク質の機能に新たな視点を与え、食品生理機能学、食品分子機能学、食品化学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17年12月21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。