

氏 名	李 得 植 ^{リ トク ショク}
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 920 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 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 Mechanism of Polymerization of Food Proteins by Transglutaminases from Mammalian and Microbial Origins (哺乳動物及び微生物由来トランスグルタミナーゼによる食品タンパク質の重合化メカニズムに関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 森 友 彦 教 授 佐々木隆造 教 授 廣 瀬 正 明

論 文 内 容 の 要 旨

トランスグルタミナーゼ (TGase) は様々な生物中に広く分布しているが、起源が異なれば反応においても違いのあることが予想される。本論文は、モルモット肝臓由来で Ca^{2+} 依存性である TGase (GTGase) と *Streptovorticillium* sp. 由来で Ca^{2+} 非依存性である TGase (MTGase) を用い、食品タンパク質を基質としてその2次構造と TGase による重合化反応の受けやすさとの関連性、重合物の分子サイズの定量的な比較、架橋部位の同定について検討を加えたものである。その内容の主な点は次の通りである。

第1章ではダイズグリシニン、ウシ血清アルブミン (BSA)、オボアルブミン (OVA)、 α -ラクトアルブミン (α -LA)、 β -ラクトグロブリンのタンパク質に対して予備加熱処理、 Ca^{2+} と還元剤ジチオスレイトール (以下は $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{DTT}$ と表示) 添加等の処理を行い、2次構造変化と TGase による反応性との関連性を検討した。その結果、予備加熱処理によって、BSA と OVA では β -sheet 構造の含量が増加し、GTGase、MTGase による重合化反応を受けやすくなった。また、 $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{DTT}$ 存在下で BSA では turn 構造、 α -LA では β -sheet 構造の含量が増加すると同時に両酵素による反応性も上昇していることを示した。

第2章では α -LA と BSA を基質とし、GTGase、MTGase を作用させた場合に形成される重合体のサイズを、SDS・DTT 存在下、多角度レーザー光散乱法を用いて測定した。その結果、 α -LA の場合、GTGase により形成される重合体のサイズが5分後において既に1000kDaであったが、MTGase は70kDa にすぎなかった。しかし、60分経過後での比較においては、GTGase により生成した重合物の最大の分子サイズは2800kDaであったのに対し、MTGase を用いた場合には9000kDa の分子サイズの重合物が生成していた。また、BSA については、GTGase を用いた場合には、15分で最大1300kDa、45分で4000kDa の重合体が形成されていたのに対し、MTGase では15分で500kDa、45分で5500kDa の重合体

の形成が示された。これらの結果は反応初期には GTGase により形成される重合体のサイズが大きいものの、時間が経過するにつれて、MTGase を作用させた場合の方が、より大きなサイズの重合体が形成されることを示している。

第3章では Ca^{2+} 非存在下、DTT 存在下における GTGase, MTGase の α -LA に対する反応性を電気泳動法と多角度レーザー光散乱法を用いて検討した。その結果、MTGase のみならず Ca^{2+} 依存性である GTGase を作用させた場合にも重合体の形成が認められた。このことより、GTGase は α -LA の分子内部に結合されている Ca^{2+} を反応に利用できることが示された。また、 Ca^{2+} 非存在下で反応を行うことにより、凝集体を生じることなく TGase 反応を長時間行うことが可能となり、その結果、両酵素とも 180分で重合化反応がプラトーに達することを明らかにした。

第4章では α -LA に対する GTGase, MTGase の反応性が異なっている原因を明らかにするために、それぞれの TGase による α -LA 中の ϵ -(γ -glutamyl)lysine 架橋部位の同定を試みた。その結果、リジン残基については、GTGase の場合、K16, K13, K122 の3ヶ所が、MTGase の場合には K5 の1ヶ所のみが架橋部位として利用されていることが示された。また、両酵素は共通してただ1つのグルタミン残基(Q54)を認識して作用していることを明らかにした。

第5章では TGase 非存在下でダイズタンパク質の主要成分の1つであるグリシニンについて品種によるゲル物性の差異、ゲルの微細構造、サブユニット組成ならびにそれらの相互関連性を検討した。圧縮試験器による破断時の物性測定を行った結果、ゲルの物性は品種によって異なり、かたさについては最大3倍の差がみられ、脆さ・弾力性・弾性体近似性の物性特性は A4 サブユニットの有無により品種間でかなり特徴的に異なっていることを示した。ゲルの微細構造は品種によって大きくストランドネットワークと凝集体ネットワークの2つのタイプに分かれることを示した。また、これらとサブユニット組成との相互関連性を調べたところ、A4 サブユニットの有無はゲルネットワークと物性、A3 はゲルネットワーク中の小孔サイズ、規則性と物性、A2+A3 は小孔サイズ、構成単位の凝集度と物性にそれぞれ関連していることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

トランスグルタミナーゼ (TGase) による架橋化反応を利用し、タンパク質を重合化することによって、様々な食品の物性制御が可能になるものと考えられる。本論文は、モルモット肝臓由来の TGase (GTGase) と *Streptoverticillium* sp. 由来の TGase (MTGase) を用い、食品タンパク質を基質としてその2次構造と TGase による重合化反応の受けやすさとの関連性、重合物の分子サイズの定量的な比較及び架橋部位について研究を行ったものである。また、ダイズタンパク質の主要成分であるグリシニンを用い、加熱ゲルの物性制御要因に関する研究を行っている。

その内容のうち特に評価すべき点は以下の通りである。

1. 食品タンパク質の2次構造変化と TGase による反応性との関連性を検討し、予備加熱処理ではウシ血清アルブミン (BSA) とオボアルブミンにおいて、 Ca^{2+} と還元剤ジチオスレイトール (DTT) 処理では BSA と α -ラクトアルブミン (α -LA) の場合において、それぞれ2次構造と TGase 反応性との間に

関連性があることを明らかにした。

2. α -LA と BSA を基質とし、GTGase, MTGase を作用させた場合に形成される重合体のサイズを測定し、反応初期には GTGase により形成される重合体のサイズが大きいものの、時間が経過するにつれて、MTGase を作用させた場合の方が、より大きなサイズの重合体が形成されることを明らかにした。

3. Ca^{2+} 非存在下、DTT 存在下で α -LA を基質とすると、MTGase のみならず Ca^{2+} 依存性である GTGase を作用させた場合にも重合体の形成が認められ、分子内部に結合されている Ca^{2+} を反応に利用でき、両酵素とも 180 分で重合化反応がプラトーに達することを明らかにした。

4. TGase により重合化された α -LA 中の ϵ -(γ -glutamyl)lysine 架橋部位の同定を行い、リシン残基については、GTGase は 3 ヶ所 (K16, K93, K122), MTGase はそれらとは異なる 1 ヶ所 (K5) のみを架橋部位として利用すること、また、両酵素は共通してただ 1 つのグルタミン残基 (Q54) を認識して作用していることを明らかにした。

5. ダイズタンパク質の主要成分の 1 つであるグリシニンについて品種による加熱ゲル物性の差異、ゲルの微細構造、サブユニット組成ならびにそれらの相互関連性を検討し、酸性サブユニット中の A4 サブユニットの有無と微細構造とが、また、A3, A2+A3 の含量と微細構造及び物性とが関連していることを明らかにした。

以上のように、本論文は食品タンパク質のゲル化およびゲル物性の制御要因について詳細な解明を行ったもので、食品化学、食品物性学、食品加工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 9 年 2 月 17 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。