

氏 名(本籍)            <sup>もと</sup>本        <sup>き</sup>木        <sup>まさ</sup>正        <sup>お</sup>雄

学位の種類            農        学        博        士

学位記番号            農        第        319        号

学位授与年月日        昭和 62 年 3 月 12 日

学位授与の要件        学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目            トランスグルタミナーゼによる食品タン  
パク質の改質に関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 山内 文男            教授 目黒 熙

教授 木村 修一

# 論文内容要旨

## 第一章 序論

タンパク質は、夫々の生体の遺伝子によって生体が合目的に機能するように生合成されている。このタンパク質を *in vitro* で全く異質の目的で利用しようとした場合、機能的また構造的にも適合しない場合が多い。近年、農産物の副生物等からタンパク質を分離し、食品等の工業原料とするタンパク質工業が成立しているが、更にその用途を拡大し、付加価値を高めるために、新機能の意図的付加、従来機能の格段の向上を目指したタンパク質修飾の研究が進められている。修飾方法としては化学修飾の適用も考えられるが、その用途が食品あるいは化粧品素材の様な場合、酵素触媒のほうが、特異的かつ穏和な条件での反応性などの利点があり、アクセプタビリティが高いと考えられる。タンパク質の酵素修飾に関する報告は、各種プロテアーゼによる加水分解反応及び逆合成反応を利用し、栄養性や機能特性を改良するといった報告が主であったが、最近では、プロテアーゼ以外の酵素の特異性を利用してタンパク質に特定の官能基や架橋結合を導入することによっても機能特性や栄養価を改良しうると考えられてきている。その様な働きをする酵素の一つであるトランスグルタミナーゼ (Transglutaminase, 以下TGaseと略す) に注目し、本研究を進めた。

TGaseは、哺乳類の各種器官、臓器に広く分布しており、タンパク質及びペプチド中のグルタミン残基の $\gamma$ -カルボキシアミド基から各種一級アミンへのアシル転移反応を触媒するカルシウム依存性酵素である (Fig.1-1)。仮にアシル受容体として、タンパク質中のリジン残基の $\epsilon$ -アミノ基が作用すれば、分子内分子間に $\epsilon$ -( $\gamma$ -グルタミル)リジン架橋が形成される (Fig.1-2)。また系内に一級アミンが存在しない時は、グルタミン残基の $\gamma$ -カルボキシアミド基が脱アミド化され、グルタミン酸残基に変換される (Fig.1-3)。

本研究では、本酵素を工業上重要なタンパク質であるカゼイン、大豆タンパクに作用させ、物性、機能性にどのような影響を与えるか、また、更にその応用性について検討した。

## 第二章 同種タンパク質間架橋形成、及びその機能性

大豆タンパク質各成分(11S,7S)、カゼイン各成分( $\alpha_{s1}$ -、 $\kappa$ -)等を単離し、新鮮モルモット肝より調製したTGaseを作用させ架橋高分子化物を得た。この架橋高分子化物を脱塩、凍結乾燥後、溶解性、乳化性、水和特性などの機能特性を測定した。各pHにおける溶解性、乳化性は一般に減少する傾向にあるが、 $\alpha_{s1}$ -カゼインは逆に増加した。また水和特性を広幅NMRによる不凍水量の測定によって検討した結果、不凍水量が、TGaseで架橋されると著しく増大する傾向、すなわち、水和水が高度に束縛された状態になることを示した(Table 1)。

## 第三章 異種タンパク質間架橋化とその特性

### 1) 異種間タンパク質間架橋形成の証明

TGaseによる架橋反応は、異種タンパク質分子間でも進行するはずである。実際に一方のタンパク質の $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>基を予めアシル化によって、同種タンパク質間の架橋形成を抑制した後、他方のタンパク質を混合し、TGaseを反応させると、反応性の異なる異種タンパク質間でも架橋反応が進行することが確認された。すなわちアセチル化 $\alpha_{s1}$ -カゼインが、異種タンパク質間との反応の進行によって、そのピークが消失し、高分子側に移行しヘテロポリマーを生成していることが、Fig.2に示される。

### 2) 異種タンパク質間架橋化物(ヘテロポリマー)の特性

アセチル化 $\alpha_{s1}$ -カゼインと大豆11SグロブリンをTGaseで異種タンパク質間架橋高分子化物を生成させ、種々の機能特性を調べた。このヘテロポリマーの溶解性と乳化特性は、 $\alpha_{s1}$ -カゼインのホモポリマー(TGaseによる同種間架橋化物)の挙動に類似していた(Fig.3,4)。しかし広幅NMRによる不凍水量及びDSC(示差熱分析)の測定結果からは、このヘテロポリマーは、11Sグロブリンのホモポリマーの挙動と近似していた。これらの機能特性のデータ等から、このヘテロポリマーは、TGaseで同時に高分子化する11Sグロ

ブリンのリジン残基とアセチル化 $\alpha_{s1}$ -カゼインのグルタミン残基が、高分子化11Sグロブリンの表面領域で $\epsilon$ -( $\gamma$ -グルタミル)リジン架橋を形成したような構造を有していると推察された。

#### 第四章 脱アミド化タンパク質の調製とその特性

TGaseは、基質タンパク質のグルタミン残基のアシル転移反応と脱アミド化反応を同時に触媒する (Fig.1)。そこで前者の反応をアミノ基のシトラコニル化により抑え、後者の反応をTGaseで優先的に進行させたのち、脱シトラコニル化し、脱アミド化 $\alpha_{s1}$ -カゼインを得るのに成功した。本脱アミド化法により、 $\alpha_{s1}$ -カゼインの全Gln残基中の約80%が脱アミド化され、分子間架橋形成による高分子量の集合体の形成は抑えられていた (Fig.5)。脱アミド化 $\alpha_{s1}$ -カゼインの機能特性を調べたところ、タンパク質の高次構造に大きな変化は認められなかった (Fig.6) が、酸性領域 (特にpH5) における溶解度が増加し (Fig.7)、更に $Ca^{2+}$ 感受性が低下した (Fig.8)。このような変化は、脱アミド化による、酸性カルボキシル基の増加によるものと推察された。

#### 第五章 架橋化タンパク質膜の調製

共同研究者である丹尾らは、基質タンパク質濃度を5-10%にし、還元剤でS-S結合が生じない条件でTGaseを作用させると、系全体が速やかに固化し、試験管を倒置しても流れ落ちないゲルの形成されることを発見した。

そこでこのゲル化反応を応用して、強靱で、耐熱性のあるフィルムを形成させることに成功した (Fig.9)。この膜は、耐水性が有り (Fig.10)、かつ、キモトリプシンによる消化性を抑制することができた (Fig.11)。

#### 第六章 架橋化タンパク質膜の固定化酵素への応用

TGaseを用いて、 $\alpha_{s1}$ -カゼイン膜を調製する際、供試酵素を混合し、固定化を試みた。即ち、酵素を、5% $\alpha_{s1}$ -カゼイン溶液に加え、更にTGaseを添

加後、直ちに混合溶液をポリメタアクリレート製プレート上にキャストイングした。40°Cで風乾させることによって、TGaseによる架橋化反応と同時に、供試酵素をタンパク膜中に包括せしめた。β-グルコシダーゼ、α-マンノシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼの4種類の酵素について固定化を試みたところ、繰り返しの使用によっても、活性が低下せず、固定化が可能であった (Fig.12, Table 2)。固定化様式を調べたところ、酵素がα<sub>s1</sub>-カゼイン膜の格子内に包括されている包括法であることが明らかであった。種々の酵素特性を調べた結果、本固定化法で、従来法とほぼ同じ性能を持つ固定化酵素の調製が可能であった。

## 第七章 要約

本研究の結果、明らかにされたことを要約すると次のようになる。

1. TGaseが大豆タンパク質各成分 (11S,7S)、及びカゼイン各成分 (α<sub>s1</sub>, κ) 等をそれぞれ架橋高分子化することを確認した。その高分子化物の機能特性を調べたところ、特に、水和水が高度に束縛された状態になることが明らかになった。
2. 一方のタンパク質を予め、アシル化した後、他方のタンパク質を共存させて、TGaseを反応させると、異種タンパク質間架橋したヘテロポリマーが生成されることを見いだした。またその機能特性の測定結果、単純混合物では得られない新しい物性機能を有することがわかった。
3. タンパク質を可逆的保護法であるシトラコニル化で処理した後、TGaseを作用させると、グルタミン残基が脱アミド化されることを明らかにした。α<sub>s1</sub>-カゼインの場合、脱アミド化で高次構造に大きな変化を伴わずに、微酸性域での溶解性の増大、またCa<sup>2+</sup>感受性の抑制効果が認められた。
4. TGaseによるタンパク質のゲル化現象を、フィルム形成に応用し、強靱で、耐熱性、耐水性、耐プロテアーゼ消化性のあるフィルムの調製に成功した。
5. この膜を調製する際、供試酵素を共存させ、TGase反応させると、酵素を

包括法で、固定化できることを明らかにした。

以上のように、TGaseを用いた意図的、選択的修飾が食品タンパク質の分子レベルでの大幅な改質を可能にすることを示した。

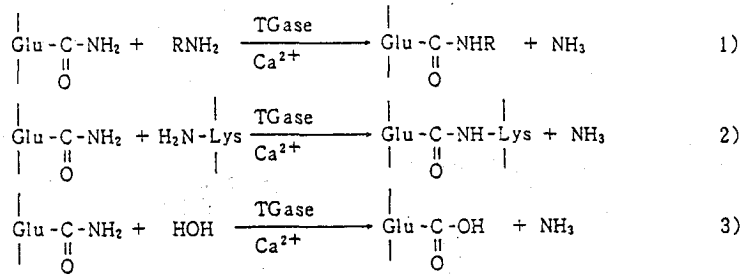
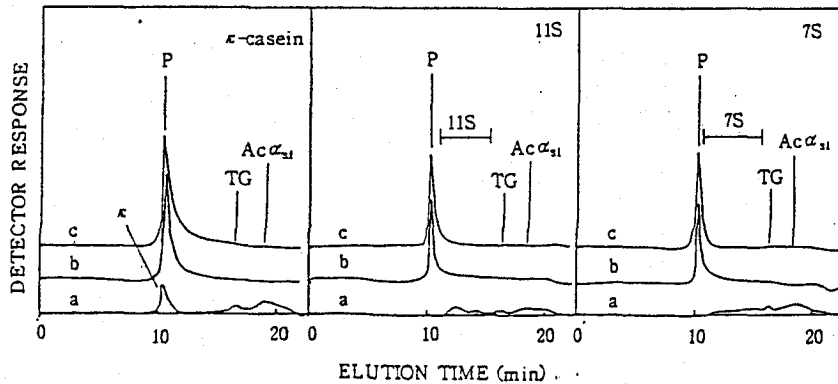


Fig.1 TGaseが触媒するアシル転移反応

TABLE I. UNFROZEN WATER CONTENT AND SIGNAL VANISHING TEMPERATURE OF NATIVE AND POLYMERIZED PROTEINS

Protein	UFW (g-H <sub>2</sub> O/g-D.M.)	SVT (°C)	Hysteresis	
$\alpha_{11}$ -Casein	{ Native	0.414	-72	medium
	{ Polymer	0.401	-52	none
$\kappa$ -Casein	{ Native	0.384	-70	small
	{ Polymer	0.561	-63	none
11S Globulin	{ Native	0.239	-68	small
	{ Polymer	0.561	-63	none
7S Globulin	{ Native	0.427	-68	small
	{ Polymer	0.457	-55	none
Gelatin	Native	0.600	-77	large

UFW, unfrozen water content (g-H<sub>2</sub>O/g-dry matter) at -30°C. SVT, signal vanishing temperature, the temperature at which the apparent unfrozen water content becomes lower than 0.01 g-H<sub>2</sub>O/g-dry matter. The values for native proteins ( $\alpha_{11}$ -casein, 11S globulin and gelatin) were same as reported previously.<sup>14)</sup>



TG = transglutaminase      P = polymers  
 curves a, b and c are for samples incubated for 0, 60 and 120 min, respectively.

Fig.2 HPLC analysis of the crosslinking reaction between acetylated  $\alpha_{31}$ -casein (Ac $\alpha_{31}$ ) and various food proteins.

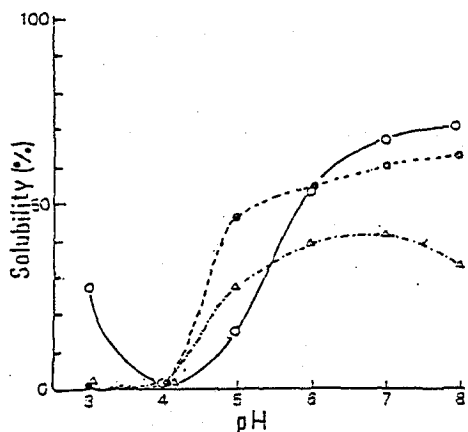


Fig. 3

pH-Solubility Profiles of Heterologous Polymer

(—○—) the equivalent mixture of acetylated  $\alpha_{s1}$ -casein and IIS globulin; (---○---) the heterologous polymer between acetylated  $\alpha_{s1}$ -casein and IIS globulin; (---△---) acetylated  $\alpha_{s1}$ -casein.

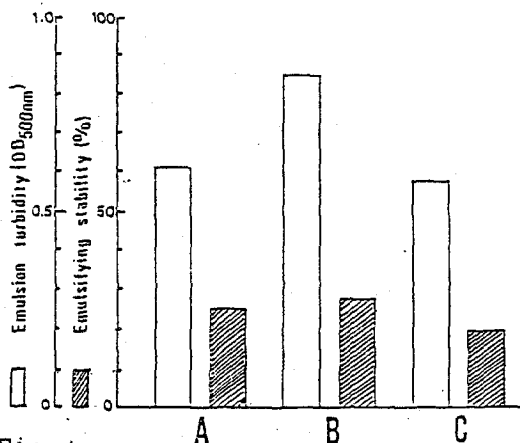


Fig. 4

Emulsifying Properties of Heterologous polymer.

(□) emulsion turbidity; (▨) emulsifying stability. A, the equivalent mixture of acetylated  $\alpha_{s1}$ -casein and IIS globulin; B, the heterologous polymer between acetylated  $\alpha_{s1}$ -casein and IIS globulin; C, acetylated  $\alpha_{s1}$ -casein.

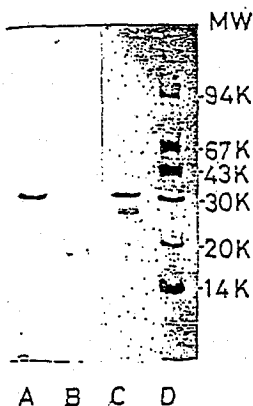


Fig. 5 SDS PAGE of Native and Modified  $\alpha_{s1}$ -Caseins

A: native, B: citraconylated, and C: deamidated  $\alpha_{s1}$ -caseins.  $\alpha_{s1}$ -Casein

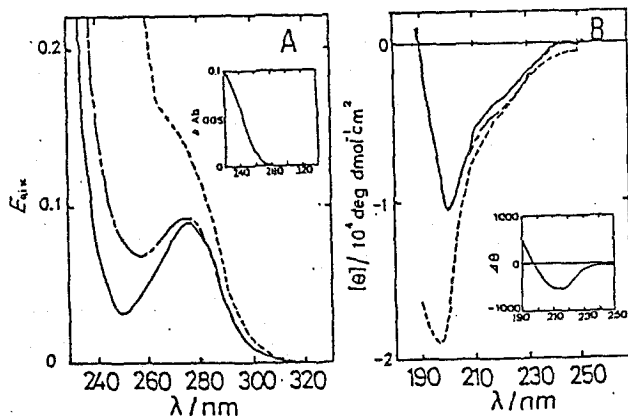


Fig. 6 Spectrometric Properties of Native and Modified  $\alpha_{s1}$ -Casein

A: UV spectra, B: CD spectra. Insets in each figure represent the differential spectra between the native and the deamidated  $\alpha_{s1}$ -caseins. Line (—) represents the native one, (---) the citraconylated one and (-·-·-) the deamidated one.



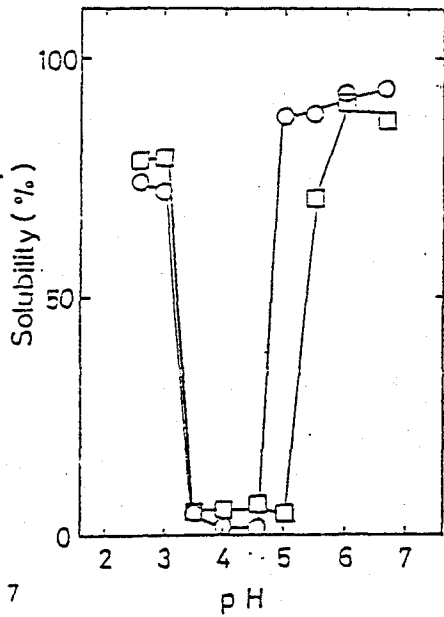


Fig. 7

Solubility profile of Native and Deamidated  $\alpha_{S1}$ -Caseins

□, native  $\alpha_{S1}$ -casein; ○, deamidated  $\alpha_{S1}$ -casein.

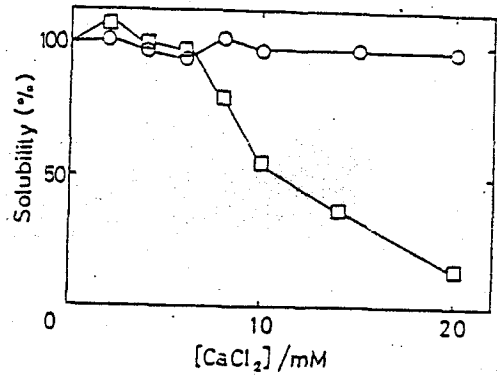


Fig. 8

$\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivity profile of Native and Deamidated  $\alpha_{S1}$ -Casein

□, native  $\alpha_{S1}$ -casein; ○, deamidated  $\alpha_{S1}$ -casein.

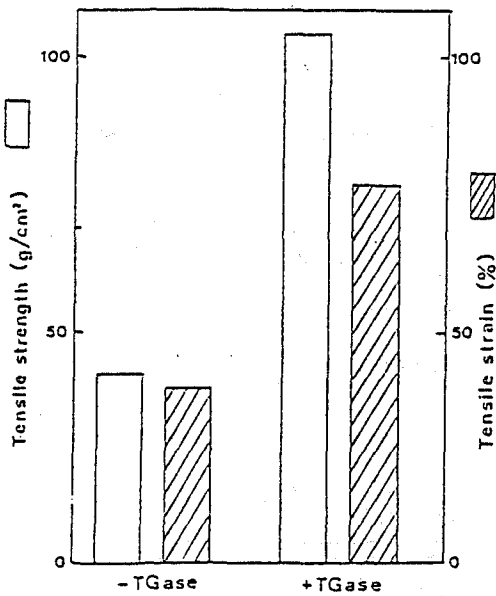


Fig. 9 Strength of  $\alpha_{S1}$ -Casein Films

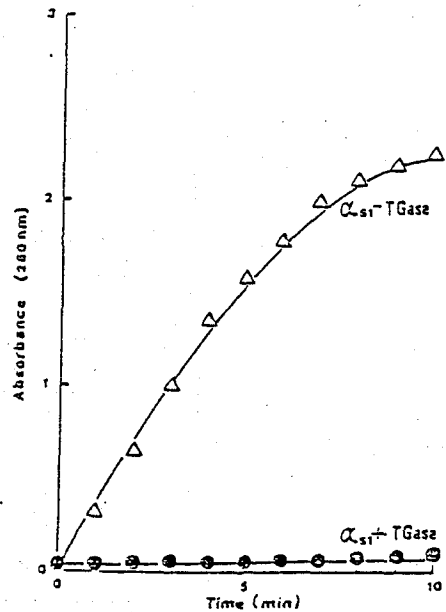


Fig. 10 Solubilities of  $\alpha_{S1}$ -Casein Films

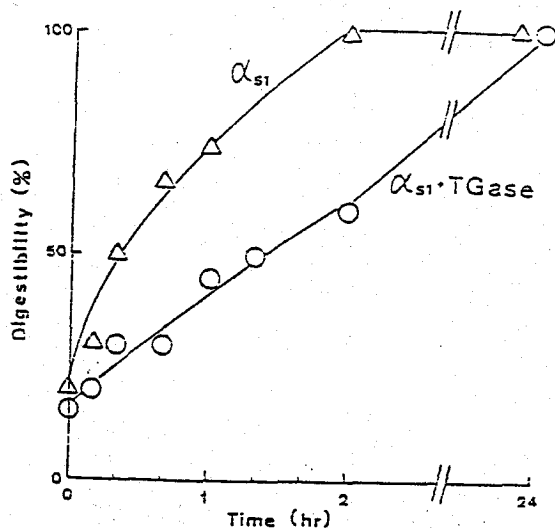


Fig. 11 Digestibilities of  $\alpha_{s1}$ -Casein Films

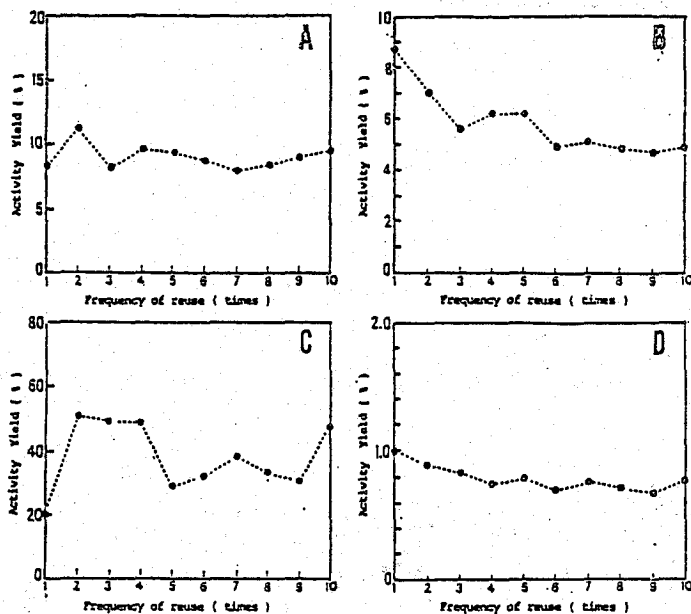


Fig. 12. The effect of repeated measurements on activity yield of each immobilized enzyme.

A:  $\beta$ -Glucosidase, B:  $\alpha$ -Mannosidase, C:  $\beta$ -Galactosidase, D: Glucose oxidase.

Table 2 The amounts of enzymes leaked from the immobilized enzyme films

Enzyme	The amounts of leakage (%)
$\beta$ -glucosidase	1.1
$\alpha$ -mannosidase	0.3
$\beta$ -galactosidase	0.3
glucose oxidase	4.3

## 審査結果の要旨

タンパク質の酵素修飾に関する報告は、各種プロテアーゼによる加水分解反応及び逆合成反応を利用し、栄養性や機能特性を改良するといった報告が主であったが、最近では、プロテアーゼ以外の酵素の特異性を利用してタンパク質に特定の官能基や架橋結合を導入することによっても機能特性や栄養価を改良しようと考えられてきている。その様な働きをする酵素の一つであるトランスグルタミナーゼに注目した。本研究では、本酵素を、工業上重要なタンパク質であるカゼイン、大豆タンパクに作用させ、物性、機能性にどのような影響を与えるか、また、更にその応用性について検討した。

まず、トランスグルタミナーゼが大豆タンパク質各成分 (11S, 7S), 及びカゼイン各成分 ( $\alpha_{s1}$ ,  $\kappa$ ) 等をそれぞれ架橋高分子化することを確認した。その高分子化物の機能特性を調べたところ、特に、水和水が高度に束縛された状態になることが明らかになった。

次に一方のタンパク質を予め、アシル化した後、他方のタンパク質を共存させて、トランスグルタミナーゼ反応させると、異種タンパク質間架橋したヘテロポリマーが生成されることを見いだした。またその機能特性の測定結果、単純混合物では得られない新しい物性機能を有することがわかった。

また、タンパク質を可逆的保護法であるシトロコニル化で処理した後、トランスグルタミナーゼを作用させると、グルタミン残基が脱アミド化されることを明らかにした。 $\alpha_{s1}$ カゼインの場合、脱アミド化で高次構造に大きな変化を伴わずに、微酸性域での溶解性の増大、また  $Ca^{2+}$  感受性の抑制効果が認められた。トランスグルタミナーゼによるタンパク質のゲル化現象を、フィルム形成に応用し、強靱で、耐熱性、耐水性、耐プロテアーゼ消化性のあるフィルムの調製に成功した。

以上、本論文は、トランスグルタミナーゼによる食品タンパク質の改質に関して新しい知見を与えるものであり、審査員一同、著者は、農学博士の学位を授与される資格を有するものと判定した。