

## 9750 蛋白質の多糖修飾による耐塩性乳化剤の開発

助成研究者：加藤 昭夫 (山口大学 農学部)

共同研究者：阿座上 弘行 (山口大学 農学部)

これまでに我々は、蛋白質と多糖類を制御した乾燥下でのメイラード反応により結合させると、市販の乳化剤に匹敵する乳化能力を有する高分子系乳化剤が調製できることを明らかにしている。本研究では、高塩濃度下 (0.2M NaCl) での乳化性をメイラード型の蛋白質-多糖複合体と市販の乳化剤との間で比較検討した。市販の乳化剤は高い塩濃度下では乳化性が著しく低下するが、蛋白質-多糖複合体では高い乳化性を保つことが示された。こうして蛋白質に多糖を結合させると耐塩性の乳化剤が開発できることが明らかにされた。

さらに、この蛋白質-多糖複合体の高乳化性、耐塩性の分子機構を明らかにするために遺伝子工学的的手法により検討した。一般にメイラード反応のような化学反応により蛋白質に多糖を結合する場合には多糖の長さや結合する部位を指定することは出来ないが遺伝子工学的な手法を用いることにより、これらが可能となる。本研究者は卵白リゾチームを酵母発現系でグリコシル化することに成功している。今回はリゾチームの49位のグリシンをアスパラギンに変換することにより、N-結合型糖鎖認識シグナルAsn<sup>49</sup>-Ser<sup>50</sup>-Thr<sup>51</sup>を作成した変異リゾチームを酵母で分泌させたポリマンノシル化およびオリゴマンノシル化リゾチームの乳化性を調べた。オリゴマンノシル化リゾチームの乳化性の改変はほとんど認められないが、ポリマンノシル化リゾチームは著しく高い乳化性を示した。市販の乳化剤も比較のために示したが、多糖化リゾチームは市販の乳化剤よりも優れた乳化性を示した。ポリマンノシル化リゾチームは塩の影響を受けずに高い乳化性を示した。またポリマンノシル化リゾチームは酸性pHでも高い乳化性を示した。これらの結果から蛋白質に小糖類ではなく多糖を結合すると高塩濃度下でも高い乳化性が得られることが分子レベルで明らかにされた。



## 9750 蛋白質の多糖修飾による耐塩性乳化剤の開発

助成研究者：加藤 昭夫 (山口大学 農学部)

共同研究者：阿座上 弘行 (山口大学 農学部)

## 1. 研究目的

現在使用されている食用乳化剤は酸性下や塩の存在下で乳化能力を著しく低下するため、これらの影響を受けない乳化剤の開発が望まれている。本研究者は、蛋白質と多糖類を制御した乾燥下でのメイラード反応により結合させると、市販の乳化剤に匹敵する乳化能力を有する高分子系乳化剤が調製できることを明らかにしている。また、市販の乳化剤の乳化能力が酸性下や塩濃度が高い場合には著しく低下するのに対して、蛋白質-多糖複合体はこれらの影響を受けずに安定な乳化能力を示すことを明らかにしている。さらに、酵母発現系を用いた遺伝子工学的手法により、異種蛋白質(リゾチーム)を多糖化することに成功し、分子レベルで蛋白質の多糖化が物性に及ぼす影響を調べることが可能となっている。本研究では蛋白質-多糖複合体の耐塩性乳化能の機構を明らかにすること、また、蛋白質と多糖類の組み合わせを検討し、さらに強力な耐塩性乳化剤を開発することを目的とする。

## 2. 研究方法

**蛋白質-多糖複合体の作製：**メイラード型の蛋白質-多糖複合体は相対湿度65%に制御したデシケータ中で両者の混合粉末を60℃で数日間貯蔵することにより作製する。蛋白質としては乾燥卵白、リゾチーム、カゼイン、大豆蛋白質を用い、多糖類としてはガラクトマンナン(豆種皮由来の多糖でマンナーゼで分子量1.5-2.0万の可溶性成分)を用い、蛋白質と多糖がモル比で1:4になるように混合し、蒸留水に可溶化する。混合溶液を凍結乾燥した粉末を上記の条件で乾燥加熱し、複合体を作製する<sup>1)</sup>。

**乳化性の測定：**こうして得られたメイラード型の蛋白質-多糖複合体の乳化能はPearce and Kinsellaの濁度法により測定した<sup>2)</sup>。市販乳化剤として、サンソフトSE-11(蔗糖-脂肪酸エステル系)、サンソフトQ-18S(ポリグリセリン-脂肪酸エステル系)を用いた。コーンオイル(1ml)を0.1%試料溶液(3ml)に加え、ポリトロンホモゲナイザーで12,000rpm/minで1分間回転することにより、油液系エマルジョンを作成する。0、1、2、3、5、10分後に作成したエマルジョンの最下層より、0.1mlを分取し、0.1%SDS溶液(5ml)に懸濁しその濁度を500nmで測定する。

多糖化リゾチームの酵母での発現：酵母発現系により、異種蛋白質（リゾチーム）に糖鎖結合配列Asn-X-thr/Serを挿入するとグリコシル化し、ポリマンノシル化リゾチームが分泌することを我々はすでに報告している<sup>3)</sup>。この多糖化リゾチームを用いて、糖鎖の乳化能に及ぼす影響、ならびに耐塩性に及ぼす影響を分子レベルで明らかにする。

これらの実験より、最適の耐塩性の乳化能力を示す蛋白質-多糖複合体を作製、開発するための基礎的知見を得る。

### 3. 研究結果

蛋白質と多糖類を乾燥下で自発的に生じるメイラード反応により、蛋白質のε-アミノ基と多糖の還元末端のカルボニル基の間で共有結合を生じ、複合体を形成することをすでに報告している<sup>1)</sup>。この蛋白質-多糖複合体は図1に示すように、著しく高い乳化性を示し、特に卵白リゾチームは多糖との混合物では全く乳化性を示さないが、複合体形成により、ドラマティックに乳化性が高くなる。ミルクカゼインは蛋白質の中でも高い乳化性を示すものの一つであるが、多糖との複合体形成により、一層優れた乳化性を示すようになる。図の縦軸は0.1%の試料3mlとコーンオイル1mlをホモゲナイズしエマルジョンを形成した後にそのエマルジョンの最下層部より0.1mlを横軸に示した時間毎に採取し、5mlの0.1% SDS溶液に懸濁した液の濁度を示しており、時間の経過にもかかわらず高い濁度を示すものは乳化性が優れていることを示すものである。図2は高塩濃度下（0.2M NaCl）での乳化性を蛋白質-多糖複合体と市販の乳化剤との間で比較検討した結果を示している。市販の乳化剤は高い塩濃度下では乳化性が著しく低下するが、蛋白質-多糖複合体では高い乳化性を保つことが出来る。こうして蛋白質に多糖を結合させると耐塩性の乳化剤が開発できることが明らかにされた。

さらに、この蛋白質-多糖複合体の高乳化性、耐塩性の分子機構を明らかにするために遺伝子工学的的手法により検討した。一般にメイラード反応のような化学反応により蛋白質に多糖を結合する場合には多糖の長さや結合する部位を指定することは出来ないが遺伝子工学的な手法を用いることにより、これらが可能となる。本研究者は卵白リゾチームを酵母発現系で分泌させる研究を行ってきた。酵母は真核生物であり、小胞体において蛋白質に糖鎖を付加するシステムを備えている。したがって、リゾチームの分子表面に糖鎖結合シグナルAsn-X-Thr/Ser配列をコードするように部位指定変異を行うと19位、49位にN-グリコシル型糖鎖を結合出来ることを明らかにしてきた<sup>3,4)</sup>。酵母は他の真核生物と異なりゴルジ体にポリマンノシルトランスフェラーゼが存在しており、酵母の糖蛋白質インベルターゼは100残基程度のマンノースが結合している。異種蛋白質であるリゾチームの場合には驚くことに約300残基にマンノースが結合したポリマンノシルリゾチームが得られる。また、培養pHをコントロールするとマンノースが10数個からなるオリゴマンノシルリゾチームが得られる。こうして、糖鎖の異なるリゾチームの性質を比較するこ

とができ、また部位を指定して一カ所だけに糖鎖を結合したグリコシル化リゾチームが得られる。図3は遺伝子工学的手法により、リゾチームの49位のグリシンをアスパラギンに変換することにより、N-結合型糖鎖認識シグナルAsn<sup>49</sup>-Ser<sup>50</sup>-Thr<sup>51</sup>を作成した変異リゾチームを酵母で分泌させたポリマンノシル化およびオリゴマンノシル化リゾチームの乳化性を示している。オリゴマンノシル化リゾチームの乳化性の改変はほとんど認められないが、ポリマンノシル化リゾチームは著しく高い乳化性を示した。市販の乳化剤も比較のために示したが、多糖化リゾチームは市販の乳化剤よりも優れた乳化性を示している。データは示していないが、49位に加えて19位にも多糖化させた二カ所を多糖化したリゾチームはさらに高い乳化性を示すことも明らかにしている<sup>5)</sup>。また、グリコシダーゼ（EndoH）で糖鎖を蛋白質部分から切り離すと乳化性は元のリゾチームと同じ程度の低い値を示すことも報告しており、蛋白質と多糖鎖が結合したものが乳化性に必須であることが明らかにされている<sup>6)</sup>。こうして、多糖化による蛋白質の高機能化の分子機構が遺伝子工学的手法の導入により明らかにされた。次に、こうして作成した多糖化リゾチームの乳化性におよぼす高塩濃度の影響が調べられた。図4に示すように、市販の乳化剤は塩濃度が高いと乳化性が著しく低下するが、ポリマンノシル化リゾチームは塩の影響を受けずに高い乳化性を示した。図5にはポリマンノシル化リゾチームの酸性pH3.0での乳化性を示した。図に示すように市販の乳化剤は酸性下で乳化性を著しく低下させるが、多糖化リゾチームは酸性pHの影響を受けずに、優れた性質を示すことが明らかにされた。

#### 4. 考察

蛋白質に多糖を結合させると高い乳化性を示すことが化学的、遺伝子工学的手法により作成した蛋白質-多糖複合体で証明された。これはエマルジョンの油滴表面に蛋白質の疎水領域がアンカーとして結合し、多糖鎖は油滴表面の水分子を結合し、油滴の合一を防ぎエマルジョンを安定化するために、極めて安定な乳化性が得られると考えられる。高濃度の塩の存在や低pH下でも乳化性が影響を受けないのはこうしたモデルをよく説明できる。ここでは乳化性について述べたが、蛋白質は多糖化により、著しく耐熱性になり、100℃で加熱しても安定であることも明らかにしている。さらに、動物実験により、蛋白質-多糖複合体の安全性を確認しており、産業的に利用できると思われる。

#### 5. 今後の課題

以上の結果から、蛋白質に多糖を結合させると高い乳化性を示すようになり、その効果は市販の蔗糖-脂肪酸エステルやポリグリセリン-脂肪酸エステルよりも優れており、特に高塩濃度や低pH下でも乳化性が影響を受けずに優れた性質を示すことが明らかになった。今後、メイラード型の蛋白質-多糖複合体形成の効率化が検討されるべきである。ま

た、酵母発現系で蛋白質-多糖複合体を作成する場合には、10 mg/リットルの収量をさらに引き上げることが今後の課題である。本研究が、安全性の高い蛋白質-多糖複合体タイプの乳化剤の開発に寄与できることを期待する。

## 6. 文献

- 1) A.Kato and K., Kobayashi: Excellent Emulsifying Properties of Protein-Dextran Conjugates; "Microemulsions and Emulsions in Foods", ed. by M.El-Nokaly and D.Cornell, American Chemical Society, p.213-229 (1991)
- 2) Pearce, K.M. and Kinsella, J.E.: *J. Agric. Food Chem.*, 26, 716-723 (1978).
- 3) S.Nakamura, H.Takasaki, K.Kobayashi, A.Kato: Hyperglycosylation of hen egg white lysozyme in yeast. *J. Biol. Chem.*, 268(17), 12706-12712 (1993)
- 4) A.Kato, H.Takasaki and M.Ban: Polymannosylation to asparagine-19 in hen egg white lysozyme in yeast. *FEBS Letters*, 355, 76-80 (1994).
- 5) A. Kato et al. Macromolecular Interactions in Food Technology (Parris, N., Kato, A. Creamer, L.K. and Pearce, J. ed.), p.243-256, American Chemical Society (1996)
- 6) Y.W. Shu, S. Nakamura and A. Kato: Double glycosylated lysozyme at positiona 19 and 49 constructed by genetic modification and its surface functional properties. . *J. Agric. Food Chem.*, in press (1998).

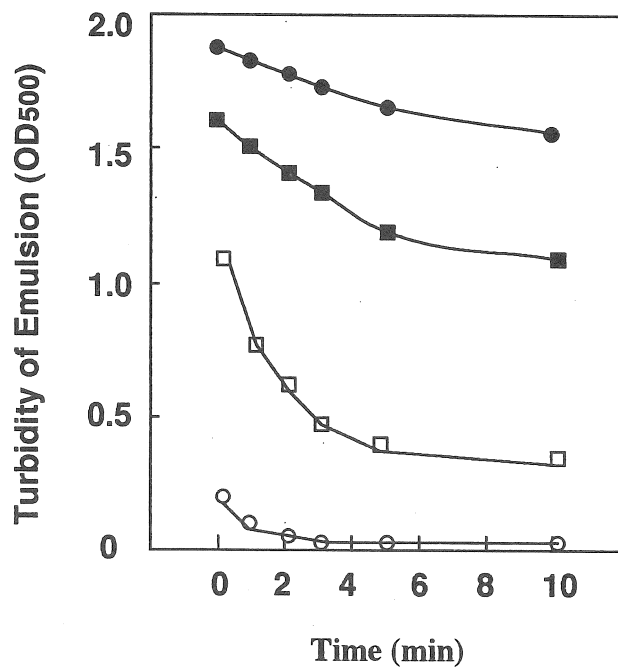


Fig.1. Emulsifying properties of protein-galactomannan conjugates.

- , Lysozyme-galactomannan mixture ( without dry-heating)
- , Lysozyme-galactomannan conjugate (prepared with dry-heating at 60 C and 65 % relative humidity for 2 weeks)
- ,  $\alpha$ s-casein-galactomannan mixture (without dry-heating)
- ,  $\alpha$ s-casein-galactomannan conjugate (prepared with dry-heating at 60 C and 65 % relative humidity for 24 hrs)

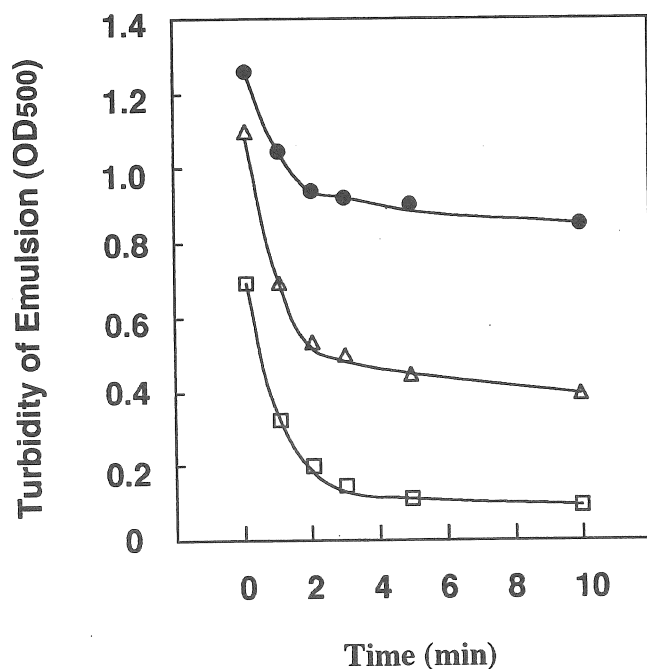


Fig.2. Comparison of emulsifying properties between protein-galactomannan conjugate and commercial emulsifiers in the high-salt concentration.

- , 0.1% egg white protein-galactomannan conjugate (prepared with dry-heating at 60 C and 65 % relative humidity for 2 weeks)
- Δ , Commercial emulsifier (Sonsoft Q18S, decaglyceryl monoesterate)
- , Commercial emulsifier (Sonsoft SE-11, sucrose fatty acid ester)



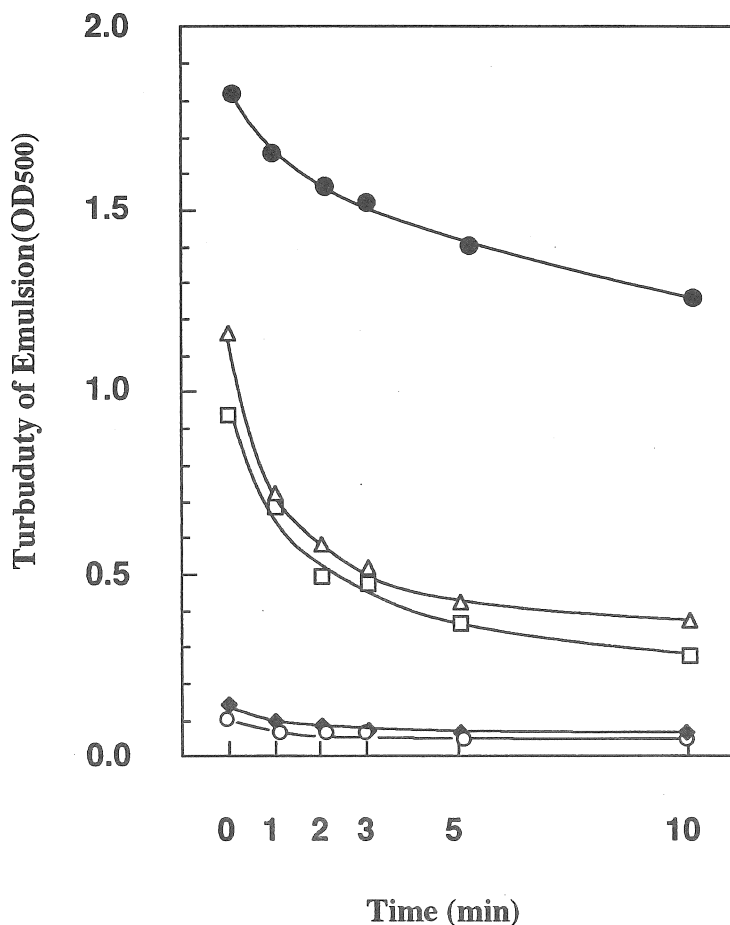


Fig.3. Emulsifying properties of polymannosyl lysozyme, oligomannosyl lysozyme, wild-type lysozyme and commercial emulsifiers in neutral pH system (1/15M sodium phosphate buffer, pH7.4). (●), polymannosyl lysozyme; (◆), oligomannosyl lysozyme; (○), wild-type lysozyme; (Δ), commercial emulsifier, Sunsoft Q-18S, decaglyceryl monoesterate; (□), commercial emulsifier, Sunsoft SE11, sucrose fatty ester. Data are from a representative experiment repeated two times with similar results.

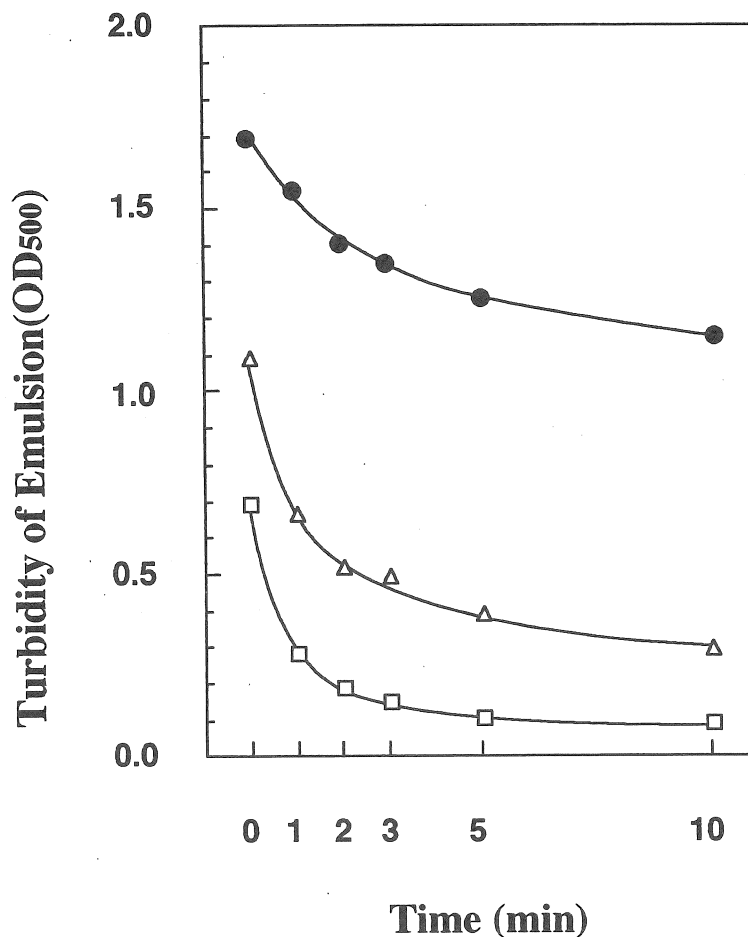


Fig.4. Comparison of emulsifying properties between polymannosyl lysozyme and commercial emulsifiers in a high-salt solution system (1/15M sodium phosphate buffer, pH7.4, containing 0.2M NaCl). (●), polymannosyl lysozyme; (△), commercial emulsifier, Sunsoft Q-18S, decaglyceryl monoesterate; (□), commercial emulsifier, Sunsoft SE11, sucrose fatty ester. Data are from a representative experiment repeated two times with similar results.

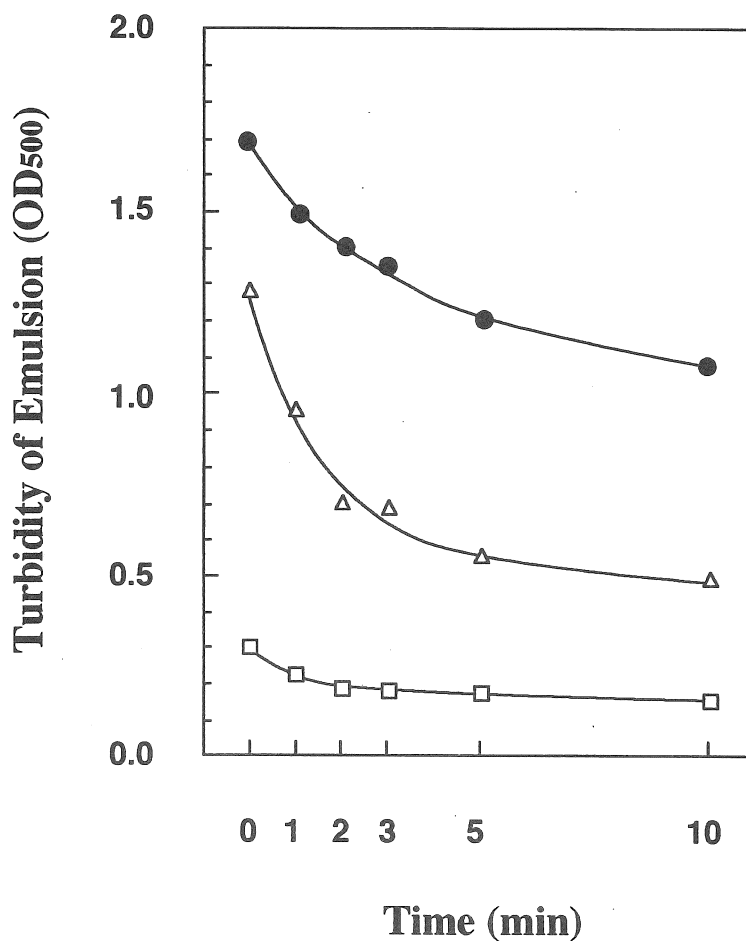


Fig.5. Comparison of emulsifying properties between polymannosyl lysozyme and commercial emulsifiers in an acidic solution system (1/15M sodium citrate buffer, pH3.0). (●), polymannosyl lysozyme; (△), commercial emulsifier, Sunsoft Q-18S, decaglyceryl monoesterate; (□), commercial emulsifier, Sunsoft SE11, sucrose fatty ester. Data shown are from a representative experiment repeated twice with similar results.

## Novel Salt-Resistant Emulsifier Constructed by Protein-Polysaccharide Conjugation

Akio Kato and Hiroyuki Azakami

Department of Biological Chemistry, Yamaguchi University, Yamaguchi 753, Japan

We reported that protein-polysaccharide conjugates prepared by spontaneous Maillard reaction in a controlled dry state revealed dramatic improvements of the functional properties of proteins, such as solubility, heat stability and emulsifying properties. The emulsifying properties of the Maillard-type protein-polysaccharide conjugate was remarkably salt-resistant. In order to evaluate the effect of glycosylation on the salt-resistant functional properties of protein on the molecular basis, we constructed two types of glycosylated lysozymes, a small oligomannose chain-linked form and a large polymannose-linked form, by using genetic engineering. cDNA encoding hen egg white lysozyme was subjected to site-directed mutagenesis to obtain the Asn-X-Thr/Ser sequence that is the signal for asparagine-linked glycosylation at the positions 19 and 49. The oligomannosyl and polymannosyl lysozymes were secreted in the yeast carrying cDNAs of G49N and R21T mutants. The polymannosyl lysozymes showed remarkable salt-resistant emulsifying property. As expected, the emulsifying property of polymannosyl lysozyme was much higher than that of oligomannosyl lysozyme. This result suggests that the attachment of polysaccharide is much more effective for the improvements of emulsifying property of proteins than that of oligosaccharide. Both protein-polysaccharide conjugates constructed by Maillard reaction and by genetic engineering showed much more salt-resistant emulsifying properties than commercial emulsifiers.