

助成番号 0149

食品の高塩濃度下でのプロテアーゼ加工をモジュレートする

シスタチンの効果の検証

助成研究者：阿部啓子（東京大学大学院農学生命科学研究科）

共同研究者：舟木淳子（福岡女子大学人間環境学部）

松本一朗（東京大学大学院農学生命科学研究科）

食品とくに食肉・魚肉に含まれるタンパク質を酵素によって分解し、物性や呈味性を改良する加工法は古くからしばしば用いられている。しかもその多くは、食塩を添加した状態で行われる。その場合、関与する酵素の主要なものはシステインプロテアーゼ（CP）であり、このCPの作用と停止のコントロールが製品の良し悪しを決定する要因でもある。我々はCPの阻害剤であるシスタチンを、コメ、コムギ、トウモロコシ、ダイズから見出し、食品のプロテアーゼ加工のモジュレーターとしてのその用途を研究した。

本研究では塩辛製造過程におけるオリザシスタチンのモジュレーター効果をしらべた。イカを5cm（長さ）・1cm（広さ）の広さに切断後、10%（約1.5M）NaCl存在下でイカ内臓あるいはパパインを添加し4℃でインキュベーションした。5時間後、イカ肉は軟化し弱い粘性がみられた。さらに72時間後には、過度に軟化が進みイカ肉の形態が崩れ粘度が上昇した。そこで浸漬5時間後にオリザシスタチンを添加しCP活性の抑制を検討した。オリザシスタチンはコメぬかから水抽出し、80℃30分処理した上清液を凍結乾燥した粗精製画分を使用した。SDS-PAGEの結果、オリザシスタチンを添加した場合イカ肉の分解を抑制しうることを認めた。

我々のグループは、オリザシスタチンの三次元溶液構造をHSQ (heteronuclear signal quantum-coherence) およびNOE (nuclear Overhauser effect) 解析した。オリザシスタチンは1つの α ヘリックスと5つの逆平行 β シートから成っており、CP阻害に第1結合ループ（53Q-G57）と第2結合ループ（83P-W84）を含む主部（13E-D97）が関与していることを明らかにしている。高塩濃度下（0.5-1.5Mの塩）のオリザシスタチンのCD解析は低塩濃度下のそれとほぼ同様であった。したがって、塩辛製造における高塩濃度下でもオリザシスタチンの三次元立体構造に大きな変化はないものと推定された。以上の結果から、塩辛のような高塩濃度でのCPのモジュレーターとしてオリザシスタチンが有効であることが明らかになった。

13

助成番号 0149

食品の高塩濃度下でのプロテアーゼ加工をモジュレートする
シスタチンの効果の検証

助成研究者：阿部 啓子 (東京大学大学院 農学生命科学研究科)

共同研究者：舟木 淳子 (福岡女子大学 人間環境学部)

松本 一朗 (東京大学大学院 農学生命科学研究科)

1. 研究目的

タンパク質分解酵素プロテアーゼは食品加工過程でしばしば利用される。軟化や粘性などの物性を制御したり、呈味性などの風味の改良といったメリットを与える。一方、デメリットとして添加したプロテアーゼの過熟が挙げられる。我々は、食品タンパク質分解に食用可能な種実プロテアーゼ、例えばコメ、トウモロコシ、ダイズなどのシステインプロテアーゼ (CP)²⁾を用いた研究を行ってきた。しかも、そのCPの活性制御に、やはり種実由来のシスタチン^{3,4)}を活用してきた。このようなCP-シスタチンの組み合わせのモデル実験として肉の軟化、フルーツゼラチン、パン生地などを対象とした研究を行ってきた我々は、いずれもシスタチン添加によりプロテアーゼ活性を自由に制御しうることを示した^{5,6)}。ところが、わが国の食品加工の多くは高塩濃度の状態で処理する場合が多い。

本研究では、高塩濃度下でもプロテアーゼ・プロテアーゼインヒビターの制御系が活用できるかどうかについて検討した。高塩濃度下でCPを作用させるモデルとしてイカの塩辛を選択した。塩辛はイカ・肝臓・塩を原料として作製されるが、肝臓中の主要なプロテアーゼとしてCPが含まれる。さらに塩辛は長期間の賞味期間を持つ食材であることから、軟化と風味を制御し両者がバランスのとれた最も良い状態 (時点) でプロテアーゼ活性を抑制することが必要と思われる。このような制御にシスタチンを活用しうる可能性について検討した。また、高塩濃度下におけるオリザシスタチンの立体構造を予測し、CP阻害活性との関連性についても検討した。

2. 実験材料および方法

2.1 実験材料

スルメイカ (山陰地方近海産) を使用した。食塩は (財) 塩事業センターから供与していただいた。コメぬかは国産米から分離したものを使用した。

2.2 実験方法

2.2.1オリザシスタチン (OC) の粗精製

ヘキサンで脱脂した米糠50gを500mlの蒸留水に加え、4℃で5時間攪拌し、遠心分離を行った。得られた上清は80℃、30分加熱後遠心分離し、その上清を凍結乾燥し約5gの粗精製OCを得た。

2.2.2 イカ塩辛・塩漬の作製

イカ塩辛はイカ、食塩（イカの重量の10%（約1.5M））、肝臓（イカの重量の5%）で作製し、イカ塩漬は対照としてイカの肝臓を用いず、イカ、食塩（イカの重量の10%（約1.5M））で作製した。イカの胴肉は剥皮し、1 cm×5 cmに切断して、肝臓は薄皮を剥ぎ、乳鉢で潰して使用した。具体的にはイカの胴肉に10%の食塩を加えて攪拌し10分間放置後、肝臓を5%加え攪拌した。保存は密閉容器に入れ4℃で行い1日2回攪拌した。なお、粗精製OC添加塩辛は上記と同様に作製した塩辛の5時間熟成後、あるいは肝臓を添加する前に各々粗精製OCを塩辛の出来上がり量の8%加えた。塩漬の場合はイカの身に10%の食塩を加えて攪拌し4℃で保存した。

2.2.3 電気泳動

加工工程のサンプルは常法に従い、10-20%のグラジュントゲルによるSDS-PAGEを行った。

2.2.4 官能検査

生イカ、イカ塩辛（浸漬期間0日間、5時間、72時間）、シスタチン添加イカ塩辛（5時間後にOCを添加し浸漬期間72時間）、およびイカ塩漬（浸漬期間72時間）のサンプルはパネラーを用いて官能検査を行った。

3. 結果および考察

3.1 粗精製オリザシスタチンの作製

脱脂米ぬかを水抽出し、80℃で30分処理した画分をSDS-PAGEに供した。その結果、50KDa-10KDaにわたる複数のバンドが検出されたが、OCと思われる10-12KDaのバンドが検出された。次にシスタチン活性を測定した結果、粗精製粉末は強いパパイン阻害活性を有していることが明らかになった。したがって粗精製OCを以下の実験に供した。

3.2 イカ塩辛加工のモジュレーターとしてのOCの検討

イカ塩辛加工工程におけるイカ胴肉部分のタンパク質の変化をSDS-PAGEで観察した。肝臓を加えないイカ塩漬けでは72時間後も未処理と同様のパターンを示した。これに対し、イカ塩辛では、5時間後に30KDa以下の低分子量のバンドが現れはじめた。さら

に72時間ではほとんどのバンドが消失していた。一方、浸漬5時間後にOCを添加し、その後72時間浸漬したサンプルは、5時間のサンプルとほぼ同様にイカ肉のタンパク質分解が制御されていることが判明した。

官能検査を行ったところ、浸漬5時間の塩辛は生あるいは塩漬けに比べ軟化していたが、その程度は塩辛製品の品質としては不十分であった。これは図1に示されるように、5時間までではイカ肉の分解が進んでいないことから裏付けられた。72時間浸漬の塩辛では軟化がより進み、それに伴い形状が崩れた状態であった。しかし、72時間のものは5時間のものに比べ塩辛らしい風味を呈していた。塩辛は作製後長い場合は約1ヶ月程度賞味される。したがって、イカ肝臓プロテアーゼによる熟成を5時間～72時間の間で停止することにより軟化性・風味といった総合的なテクスチャーを最適化し、良好な品質を保持することが可能と考えられる。

3.3 高塩濃度下におけるOCの立体構造の推定

OCは図2に示すような1つの α ヘリックスと5つの逆平行 β シートから成っている²⁹⁾。大腸菌組み換えOCの0.5Mあるいは1.5M NaCl存在下におけるCDスペクトルを観察した。そのパターンは塩の非存在下とほぼ同じであったことから、0.5-1.5M NaCl存在下ではOCの α ヘリックス構造に大きな変化がないと考えられた。したがって、シスタチン活性に関与する第1結合グループ(53Q-G57)と第2結合グループ(83P-W84)を含む主部(13E-D97)の立体構造が保持され、その結果、シスタチン活性を示していると考察された。

以上の結果、食用種実シスタチンは通常の食品加工に用いられる高塩濃度下においてもCP活性を制御しうることを示され、今後の活用が期待される。

4. 引用文献

- 1) Kuroda, M., Kiyosaki, T., Arai, S., and Abe, K. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 732-734 (1997)
- 2) Misaka, T., Kuroda, M., Iwabuchi, K., Abe, K., and Arai, S. *Eur. J. Biochem.* **240**, 609-614 (1996)
- 3) Abe, M., Domoto, C., Watanabe, H., Abe, K., and Arai, S. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 1173-1175 (1996)
- 4) Kuroda, M., Kiyosaki, T., Matsumoto, I., Misaka, T., Arai, S., and Abe, K. *Biosci. Biotech. Biochem.* **65**, 22-28 (2001)
- 5) Funaki, J., Yano, M., Abe, K., and Arai, S. *J. Food Biochem.* **19**, 355-365 (1996)
- 6) Funaki, J., Yano, M., Misaka, T., Abe, K., and Arai, S. *J. Food Biochem.* **21**, 191-202 (1997)

- 7) Kudo, N., Nishiyama, M., Sasaki, H., Abe, K., Arai, S., and Tanokura, M. *J. Biochem.* **123**, 568-570 (1998)
- 8) Nagata, K., Kudo, N., Abe, K., Arai, S., and Tanokura, M. *Biochemistry* **39**, 14753-14760 (2000)

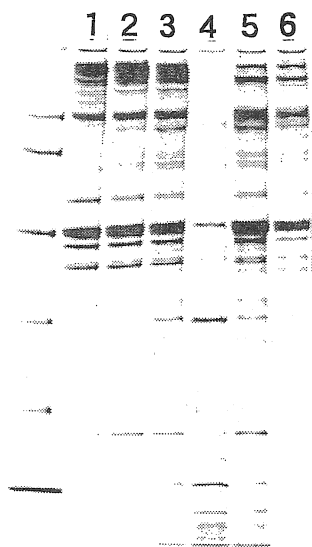


図1 塩辛加工過程におけるオリザスタチン(OC)の効果

切断した生イカ胴肉 (レーン1)、塩辛イカ・浸漬 0h (レーン2)、塩辛イカ・浸漬 5h (レーン3)、塩辛イカ・浸漬 72h (レーン4)、塩辛イカ・浸漬 5hにOC 粗精製粉末を加えその後浸漬 72h (レーン5) およびイカ塩漬 72h (レーン6) のSDS-PAGE。左側は分子量マーカーで上から97、66、42、30、20および14kDaを示す。

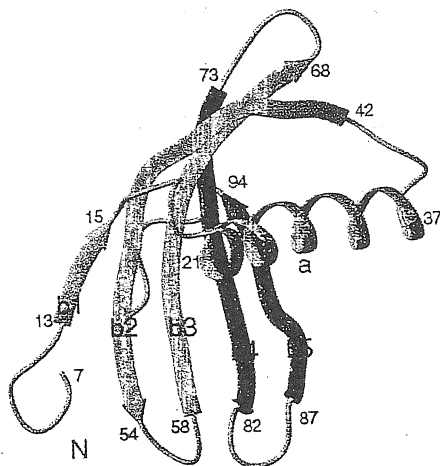


図2 オリザシスタチン(OC)のNMRによる立体構造解析
OCは1本の α ヘリックスと1枚の逆平行 β シート(4本の β ストランドを含む)からなる二次構造を有した。しかし、他の動物シスタチンにみられるN末端部の β ストランドは欠失していた。

Verification of Modulator Effects of Cystatins in Food Processing Using Proteases at High Salt Concentrations

Keiko Abe¹, Junko Funaki², Ichiro Matsumoto¹

¹ Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

² Faculty of Human Environmental Science, Fukuoka Women's University

Summary

It has long been practiced to hydrolyze food proteins with endogenous and/or exogenous proteases for the purpose of improving physical and sensory protein qualities. This enzymatic process has also been carried out often in the presence of added salt. When animal and fish materials undergoes the process, involved enzymes are primarily cysteine proteinases (CP). Thus, how to modulate CP reactions determines the quality of the resulting products. Meanwhile, our group has found proteinaceous CP inhibitors, *i. e.*, cystatins, in rice, wheat, corn and soybean as common foods and investigated them as factors for use in modulating the CP reactions. In this context, the present study was undertaken to evaluate the modulator effect of cystatins, with special reference to rice oryzacystatin (OC) as the first well-defined phytocystatins.

A raw squid was cut into slices, each being 5 cm in length and 1 cm in width. Slices were dipped in 1.5M NaCl and incubated at 4 °C in the presence of the internal organs having an endogenous CP activity. About 5 hr after the start of incubation, the squid muscle got tendered, with formation of a weakly viscous texture. Over-tenderization occurred 72 hr after the start, and the muscle structure was degraded, with an excessive viscosity increase. To stop the enzymatic reaction at the incubation time of 5 hr, we tried to add OC which had been prepared from rice. In detail, rice bran was treated with water and the resulting extract was heated at 80 °C for 30 min. The supernatant obtained by filtration was freeze-dried into a powder to be used as an OC preparation. It was found that the addition of this preparation to the squid during incubation could control the muscle degradation; it was possible to modulate the quality of the incubation product by adding it at the time of 5 hr.

In the meantime, our group was engaged in analysis of a three-dimensional solution structure of purified OC in terms of the heteronuclear signal quantum-coherence and the nuclear Overhauser effect. As a result, OC was found to be constituted with an α -helix region and five anti-parallel β -sheet regions. It was also found that the CP-inhibitory activity of OC involved its main structure, 13E-D97, comprising the first (53Q-G57) and second (83P-W84) binding loops.

In the present study, we observed that the addition of final concentrations (0.5-1.5M) of NaCl to an OC solution did not affect the circular dichroism of OC. Though speculative at present, no critical conformational change may take place with OC, even when this is treated under a condition that simulates the practical "shiokara" production in which NaCl is used normally at 3M. We will evaluate the effectiveness of added OC as a CP modulator in the actual processes for salting fish.