

発表番号 51 (0345)

ダイズおよびコムギタンパク質のプロテアーゼを用いる加水分解反応の 塩類添加による高度効率化と新規食品素材の開発

助成研究者:井上 國世(京都大学農学研究科)

共同研究者:小根田洋史(京都大学農学研究科)、久保 幹(立命館大学理工学部)

森本康一(近畿大学生物理工学部)、永井宏平(京都大学農学研究科)

【目的】未利用タンパク質の有効性の拡大を目的として、プロテアーゼによる効率的加水分解法を検討している。他方、加水分解過程において凝集物を生成することがあり、これが加水分解を妨げている。分離ダイズタンパク質SPIに対して、ズブチリシン・カールスベルグ(SC)で処理すると、分解に伴う凝集物の生成をみだし、凝集物生成挙動について報告した^{1,2)}。本研究では、凝集物特性と凝集物形成反応機構の解析を目的とした。コムギタンパク質ではアミラーゼ阻害剤の反応解析に展開できた³⁾。

【方法】SPI(10 mg/mL)にSC(1 μ M)をpH 8, 37°Cで添加し、濁度変化(OD₆₆₀)を経時的に測定した。60分間反応で得られる凝集物を集め、アミノ酸組成分析、溶解度に対するNaClとエタノールの添加効果、およびpH 2.2-10.5の効果を観測した。SCの他にフィシン、プロメライン、プロナーゼ、BPN'により調製した凝集物についてもアミノ酸組成を分析した。SPIのSCによる凝集反応に対するCaSO₄, CaCl₂, MgCl₂, NaCl, Na₂SO₄の添加効果を調べた。

【結果と考察】SCおよびいずれのプロテアーゼで調製した凝集物でも、SPIに比べて荷電性アミノ酸(Glu, Asp, Lys, Arg)の割合が減少し、疎水性アミノ酸(Leu, Phe, Ile, Val)の割合が増大した。凝集物では全体的には非極性基の存在割合が高く、このことが凝集を引き起こしている可能性がある。一方、0-4 M NaClや0-40%エタノールの添加により凝集物の溶解度は変化が見られなかった。凝集物の溶解度は、pH 3-8で最低(0.2-0.5 mg/mL)であるが、SPIではpH 4-5で最低(1-2 mg/mL)となる。このことは、凝集物が静電的や疎水的な複合的で強固な相互作用に起因していることを示唆している。100 mM NaClの添加により、凝集物形成時間は60分から30分に短縮され、凝集物形成速度は5倍増大した。NaClとNa₂SO₄の効果を比較すると、凝集物形成にはCl⁻とCO₄²⁻の効果に差がない。MgCl₂とCaCl₂の効果に差は無いが、効果は極めて強く、2 mM MgCl₂, CaCl₂; 50 mM Na₂SO₄; 100 mM NaClが同程度の効果を示す。SCのペプチダーゼ活性はこれらの塩の影響を受けないため、SCにより生成したペプチドは、これらの条件下で、最も凝集しやすいことが示唆される。今後は、これらの塩類が凝集物を形成する機構についてより詳細に検討する予定である。

1. K. Inouye, K. Nagai, and T. Takita (2002) *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1237-1242.
2. K. Nagai and K. Inouye (2004) *J. Agric. Food Chem.*, in press.
3. H. Oneda, S. Lee, and K. Inouye (2004) *J. Biochem.* **135**, 421-427.

19

助成番号 0345

ダイズおよびコムギタンパク質のプロテアーゼを用いる加水分解反応の塩類添加による高度効率化と新規食品素材の開発

助成研究者: 井上 國世 (京都大学農学研究科)
 共同研究者: 小根田洋史 (京都大学農学研究科)
 久保 幹 (立命館大学理工学部)
 森本 康一 (近畿大学生物理工学部)
 永井 宏平 (京都大学農学研究科)

1. 研究目的

1.1 本研究の目的

われわれは、未利用の各種タンパク質の有効性の拡大を目的として、これらタンパク質をプロテアーゼで加水分解し、調味液や食品添加物として用途開発することを目指して研究を進めて来た。最終的には、脱脂ダイズタンパク質やコムギタンパク質、屠畜血由来グロビン、コラーゲンなどを対象タンパク質としてプロテアーゼにより徹底的に加水分解することを目的としている。

ダイズは世界中で年間1.5億トン生産されており、その主たる用途は食用油の生産である。そのとき副生する脱脂ダイズは良質なタンパク質を豊富に含むにも関わらず、ほとんどが飼料に利用されている。近年、ダイズタンパク質には、血圧降下作用、コレステロール低下作用、体脂肪蓄積抑制作用、エネルギー代謝促進作用などの種々の生理活性機能が示され、それらが特定のタンパク質画分やプロテアーゼで切り出されたペプチド断片に起因することが認められている。一方、ダイズは食品アレルギーの原因食品のひとつでもあり、アレルゲンタンパク質も同定されている。アレルゲンの低減はプロテアーゼ消化あるいは選択的除去によるしか方法がない。以上のことを考えると、ダイズタンパク質は、アミノ酸にまで完全に加水分解することによりアミノ酸として回収し、調味料などへ利用する利点は十分あるものの、生理活性なペプチド断片を残したまま利用する道もあることが示唆される。

1.2 本研究の背景と従来の研究経過

脱脂ダイズタンパク質やコムギホエイタンパク質は、タンパク質加水分解過程において、ときとして凝集物を生成することがあり、これが加水分解を徹底的に進めることを妨げている。われわれは、分離ダイズタンパク質(以下SPIと略称する)に対して、各種プロテイナーゼを添加すると、分解に伴い凝集物を生成することをみだし、とくに微生物のセリンプロテイナーゼであるズブチリシン・カールスベルグ (Subtilisin Carlsberg) による凝集物生成挙動について報告した¹⁾。SPI懸濁液(10 mg/mL)は、実際には希薄懸濁液

であり、多くの実験条件では透明液を呈しているため、本実験では、便宜上、これをSPI溶液とよぶ。ただし、厳密な意味では、実際は濁度を持ち、懸濁液である。

具体的には、反応初期に濁度が低下し、透明度が増大する。濁度は、10-20分で最小値を示し、その後、20-60分にわたって、逆に濁度は増大し、凝集物が形成される。その後、凝集物は、沈殿物となり反応容器の底に蓄積される。凝集物の物性と凝集の機構を理解しなければ、酵素的に加水分解反応を進めることが困難であると考えられる。われわれは、この反応を目視で行なうのみならず、660 nmでの光学密度(Optical density, OD)を追跡することにより観測できる濁度変化と、遠心分離(10,000 x g; 30分)で反応容器中に形成された沈殿物量とが極めて高い相関性を有することを示し、OD₆₆₀をもって、SPIのプロテアーゼ消化に伴う反応を効率よく連続測定できることが示された。

OD₆₆₀の経時変化から、反応は3相に分離された。第1相は、反応開始からOD₆₆₀が最小値(10-20分)にいたるまでの相; 第2相はOD₆₆₀が最小値(10-20分)から最大値(60分)に達するまでの相; 第3相はOD₆₆₀が最大値に達してから徐々に凝集物が沈殿し始めるためOD₆₆₀が減少する相(通常数十時間を要する)。一方、SPIのプロテアーゼ処理溶液をSDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)に供すると、第1相でSPIタンパク質の大半は分子量10,000以下にまで分解されること、しかし、第1相には凝集物は生じないことが示された。第2相では、凝集物が生じることから、凝集物は第1相で生じた分子量10,000以下のペプチド断片が集合して形成される可能性があること、また、凝集をおこす原因はこれらの低分子化したペプチド断片に内在する可能性が示唆された。OD₆₆₀が最小値(OD_{min})に達するに要する時間をT₁とよび、OD₆₆₀が最大値(OD_{max})に達するに要する時間をT₂とよび、反応時間T=0-T₁が第1相、T=T₁-T₂が第2相となる。

一方、SPIのスプチリシン・カールスベルグによる加水分解反応と凝集物形成反応を、酵素阻害剤を利用して、詳細に調べたところ、第1相で生じたペプチド断片だけでは凝集は起こらないこと、第2相では凝集のみならずペプチド断片のさらなる低分子化も起こっていること、第2相で生じる低分子ペプチド断片が凝集を引き起こす原因物質であることが明らかになった²⁾。

2. 研究方法

2.1 実験材料

2.1.1 SPI溶液:

フジプロR(不二製油社製)に標準緩衝液(0.05%アジ化ナトリウムを含む20mMリン酸緩衝液、pH 8.0、37℃)を40mg/mLになるように加え、25℃で3時間攪拌した後、ワットマン社製No.41濾紙で濾過したものをSPI溶液とした。濃度はウシ血清アルブミンをスタンダードタンパク質としてロウリー法で求めた。

2.1.2 プロテイナーゼ類:

ブロメライン(パイナップル茎由来); フィシン(イチジク果実由来); プロナーゼ(微生物酵素、混合物); スプチリシン・カールスベルグ(微生物セリンプロテアーゼ); スプチリシン BPN'(微生物セリンプ

ロテアーゼ)。酵素はそれぞれ標準緩衝液に溶解した。酵素濃度は、10 mg/mL 溶液の 280 nm での吸光係数 (A_{280}) から決定した。プロメライン、フィシン、ズブチリシン・カールスベルグ、ズブチリシン BPN' の A_{280} は、それぞれ 20, 21, 9, 12 である。プロナーゼの濃度は、精密天秤による秤量から求めた。また、それぞれのプロテアーゼの活性は、pH 8.0、37 におけるカゼイン分解活性より求めた。この条件下において、1分間に1 μ mole のチロシンを遊離するカゼイン分解活性を1ユニットとした。

2.1.3 凝集物のサンプル調製:

最終酵素濃度が60ユニット/mL、最終SPI濃度が10 mg/mLとなるように調整し、pH 8.0、37 において、酵素反応をおこなった。反応に伴う濁度変化を 660 nm (OD_{660}) で連続的に追跡し、濁度が最大になった時点でエッペンドルフチューブに反応溶液を 1 mL 分取し、遠心分離(10,000 x g, 1分間)により、凝集物を回収した。回収した凝集物は標準緩衝液で洗浄し、乾燥エバポレータで乾燥させた。乾燥させた凝集物は乾燥重量を計り、以下の溶解度の実験とアミノ酸組成分析に用いた。

2.1.4 緩衝液

NaCl含有緩衝液: 40 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0, 37°C) にNaClを 0, 0.1, 0.3, 0.5, 2.0, 4.0 M 溶解させた。

エタノール含有緩衝液: 20 mM リン酸緩衝液(pH 8.0, 37°C) にエタノールを 0, 5, 10, 20, 30% 溶解させた。

pH依存性検討用緩衝液: 20 mM グリシン - HCl緩衝液 (pH 2.2-3.5); 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0-5.0); 20 mM マレイン酸 - NaOH緩衝液 (pH 5.5-6.0); 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0-8.0); 20 mM ホウ酸 - HCl緩衝液 (pH 8.0-9.0); 20 mM ホウ酸 - NaOH緩衝液 (pH 9.5-10.5)。それぞれの緩衝液のpHは37°C での値である。

2.2 凝集物のアミノ酸組成分析

5種類のプロテアーゼ(プロメライン、フィシン、プロナーゼ、ズブチリシン・カールスベルグ、ズブチリシン BPN')によるSPI消化により生じた凝集物の性質を検討するため、凝集物のアミノ酸組成分析をおこなった。

従来、タンパク質分解物の凝集が疎水性相互作用にもとづく可能性が高いと考えられており、疎水性にとくに着目して凝集過程を検討した。

ここで用いた5種類のプロテアーゼは、660 nm での濁度(OD_{660}) の時間変化では、比較的類似の挙動を示し、これらの凝集反応性は類似していると判断できるが、凝集物のアミノ酸組成分析からより詳細に検討した。

SPIとSPI凝集物(5種類の酵素を加えて調製したもの)、それぞれ2 mg に 6 N HCl を 2 mL 加え、105 °C で 24 時間加熱し、加水分解した。加水分解終了後、エバポレータでHClを除去した。得られたアミノ酸混合物を 20mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.2) に溶解させた。これを日立 L-8500A 高速

アミノ酸分析計でアミノ酸を定量した。さらに、このアミノ酸組成をもとにして、アミノ酸のハイドロパシー・パラメータを用いて、それぞれのアミノ酸の $[(\text{ハイドロパシー・インデックス} \times \text{mol}\%) \div 100]$ を求め、これを 20 種類のアミノ酸について総和した。これをサンプル全体における「疎水性度の期待値」と定義し、サンプルの平均疎水性度とした。

2.3 凝集物の溶解度に対する塩、アルコール、pH、および温度の効果

タンパク質やペプチドに対する塩の効果には 2 面性がある。すなわち、低濃度(0-1 M)では静電的相互作用やイオン結合を弱める³⁾。一方、高濃度(1-4 M)では、疎水的相互作用を強める。静電的相互作用やイオン結合は温度の上昇に連れて弱くなるが、疎水的相互作用は強くなる。アルコールは、反応系の誘電率を低下させ、疎水的相互作用を弱める。静電的相互作用やイオン結合は、クーロンの法則に従い、溶媒の誘電率に反比例するため、アルコールの添加により反応系の誘電率を低下させることにより、静電的相互作用やイオン結合は増強される。pHの効果は、ペプチドやタンパク質の静電的状态やイオンの状態を変化させることにより、ペプチド・タンパク質間の相互作用の強さを変化させうるし、局所的な電荷を変動させることができる。また、SPIと凝集物の等電点(pI)を比較し、等電点沈殿と凝集物形成能の関係について解析する。

凝集物のサンプルを所定の緩衝液(37°C)に、凝集物濃度が 4 mg/mL となるように加え、1分間ボルテックスで振とうした。その後、室温で遠心分離(6,500 x g, 3 分間)し、凝集物を回収し乾燥させた。凝集物に対するエタノールの添加効果とpHの効果を検討する実験では、乾燥後のサンプル重量から溶解度(mg/mL)を求めた。凝集物に対する塩の添加効果の検討では、サンプル中のタンパク質量はウシ血清アルブミン(BSA)を標準とするロウリー法により決定した。また、それぞれの凝集物サンプルはロウリー法のA液(2% Na₂CO₃ 含有 1 M NaOH)に溶解させ、ロウリー法に供した。

2.4 プロテアーゼによるSPIの加水分解と凝集反応に対する塩の添加効果

豆腐製造においては、CaSO₄、CaCl₂、MgCl₂などの塩類が凝固剤として用いられてきた。CaCl₂とMgCl₂は即効性凝固剤、CaSO₄は遅効性凝固剤とされている。この差は、Cl⁻とSO₄²⁻の差にあると考えられる。この点を解明すべく、Na₂SO₄とNaClの凝固性における効果を比較した。本来は、CaSO₄とCaCl₂について比較すべきであるが、溶解度が低く取り扱いと解析の困難さのため、Na₂SO₄とNaClを用いた。標準緩衝液中で、SPI溶液(10 mg/mL)をズブチリシン・カールスベルグ(1.0 μM)により処理し、上記1.2に記載の方法で、OD₆₆₀の経時的変化を観測した。ここに0, 8, 24, 48, 72, 100 mM NaClを添加し、経時的変化に対する効果を連続的に観測した。また、NaClの代わりに、0-2 M MgCl₂およびCaCl₂の添加効果についても検討した。

3. 研究結果および考察

3.1 凝集物のアミノ酸組成の特徴

SPIをズブチリン・カールスベルグで処理したとき生じる凝集物とSPIのアミノ酸組成を比較したところ、両者には大きい差異は認められなかった。すなわち、凝集物はSPIのうちの「特別にアミノ酸組成が片寄せた部位だけが切り出されたペプチド断片」から成り立っているのではないことが示された。

しかしながら、凝集物とSPIのアミノ酸組成を詳細に比較すると、それぞれのアミノ酸で、SPIと凝集物で興味深い差異が認められた。グルタミン酸(これにはサンプル中のグルタミンも含まれる)やアスパラギン酸(これにはアスパラギンも含まれる)、アルギニン、リジンの存在量比は、凝集物ではSPIに比べて、減少していた。とくにグルタミン酸は、SPIでは19%存在するが、凝集物中では15%まで低下していた(減少率は20%)。その他のアミノ酸では、5-10%の減少率を示した。一方、ロイシン、フェニルアラニン、イソロイシン、バリン、アラニン、グリシン、スレオニン、セリンの存在量比は、凝集物ではSPIに比べて、増大していた。とくに、ロイシン、フェニルアラニン、イソロイシン、バリンにおける増大率が、他のものに比べて顕著であり、ロイシンでは、SPI中の存在比が8%であるのに対し、凝集物中では10%であり、20%強の増大率を示した。ヒスチジンやプロリン、メチオニンはSPIと凝集物とでほとんど差異が無かった。以上の結果は、プラス荷電あるいはマイナス荷電によらずSPI中の荷電性アミノ酸は凝集物に移行しにくい傾向があること、他方、疎水性アミノ酸は逆に凝集物に移行しにくい傾向があることを明解に示している。すなわち、凝集物は、SPIに比べてアミノ酸組成の親水性は低下し、疎水性は増加している。このことは、SPI中でタンパク質内部の疎水性領域にあったポリペプチド鎖がプロテアーゼにより切り出され、疎水的相互作用により凝集するという可能性を強く示唆する。

SPIと5種類のプロテアーゼにより調製された凝集物の平均疎水性度を比較すると、SPIの平均疎水性度は-1.0であるのに対し、プロナーゼによる凝集物では-0.4、ズブチリン・カールスベルグ、ズブチリン BPN[®]、およびフィシンによる凝集物では-0.3、プロメラインによる凝集物では-0.2と求められた。程度の差はあるが、いずれの凝集物も負の値を示し、親水的傾向を示している。しかし、SPIのもつ親水性に比べれば、いずれの凝集物でもかなりの程度、疎水性度は増大していることが分かる。

3.2 凝集物の溶解度に対する塩、アルコール、pH、および温度の効果

3.2.1 SPIの溶解度は、pH 4-5 で最小値を示す

SPIの水および0.5 M NaCl 溶液における溶解度は、既に報告されている⁴⁾。水中での溶解度は、pH 4.5 付近で最小値を示し、1-2 mg/mL である。pH がより酸性側およびアルカリ性側に変化するにつれて、溶解度は急速に増大し、pH 3 および pH 6 では400 mg/mL に達する。より酸性側およびアルカリ性側では、溶解度はさらに増大する。pH 2 では、700 mg/mL、pH 12 では、900 mg/mL に達する。0.5 M NaCl 溶液中では、pH 4-5 付近で最小値を与えるが、その値は200 mg/mL であり、水中に比べて、圧倒的に大きい。より酸性側およびアルカリ性側で、溶解度は増大するが、pH 3 で極大値(400 mg/mL)を与え、より酸性側では、むしろ低下する。一方、アルカリ性側では、pH 6 で400 mg/mL となるが、さらに増大し、pH 12 では、900 mg/mL となる。すなわち、水中、0.5 M NaCl 溶液中にかかわらず、SPIの溶解度は、pH 4-5 付近で最小値を与えること、しかし、この最小値は水中では極めて小さい(1-2 mg/mL)が、0.5 M NaCl 溶液中ではかなり大きい(200 mg/mL)。溶解度の最大値と最小値の間を与える pH (みかけの

pK_a と考えても良い)は、pH 3 および pH 6 であることが示された。SPIには種々のタンパク質から構成されているにもかかわらず、比較的狭い pH 域で溶解度の最小値を与えたことから、すべての構成タンパク質の電気化学的挙動が比較的に似かよっていることを示唆している。SPIの見かけの等電点 (pI) は 4.5 と判断した。

3.2.2 凝集物の溶解度は広範な pH 域 (pH 3-8) で最小値を示す

SPIのズブチリン・カールスベルグ処理により調製された凝集物 (4 mg/mL) の pH 2.2-10.5 における溶解度は、SPIの溶解度に比べて全体的に極めて小さい。pH 3-8 の比較的広い pH 域で最小値を示し、0.2-0.5 mg/mL であった。微視的に見ると、この pH 域でも、溶解度は上下の変動があるが、基本的に極めて溶解度が低い。しかし、より酸性側およびアルカリ性側では、溶解度は急速に増大し、pH 2 および pH 9 では、3.0-3.5 mg/mL となった。溶解度の最大値と最小値の間を与える pH (みかけの pK_a) は、pH 2.5 および pH 8.5 であることが示された。すなわち、SPIでは pH 4-5 の狭い pH 域で最小の溶解度を与えたのに対して、凝集物では pH 3-8 の広い pH 域で最小値を与えた。凝集物の溶解度最小値が、このような広範な pH 域にわたることから、電気化学的性質の異なる種々のペプチド断片が混在して存在している可能性が考えられる。凝集物の等電点を一義的に決定することは困難であり、構成するすべてのペプチド断片の集合体が見かけの等電点は pH 3-8 に存在すると考えられる。pH 3 以下の酸性領域では、凝集物中のカルボキシル基とアミノ基はプロトン化して、それぞれ $-COOH$ および $-NH_3^+$ で存在する。正電荷が優勢となる。pH 3-8 では、カルボキシル基はプロトン脱離して、それぞれは $-COO^-$ および $-NH_3^+$ で存在する。すなわち、正電荷と負電荷が混在し、結果的には両者が打ち消し合い、電荷数が少ない状況にある。一方、pH 8 以上のアルカリ性では、アミノ基がプロトン脱離し、 $-COO^-$ および $-NH_2$ が存在する。負電荷が優勢となる。

凝集物中の全タンパク質のうち、pH 3-8 では 5-12 % が溶解するにすぎない。しかし、pH 2 および pH 9 では、80-90% が溶解し、より酸性側あるいはよりアルカリ性側では、溶解度がほぼ 100%に達することは、注目に値する。すなわち、凝集物は、pHを選択することでほぼ完全に溶解させることが可能である。

3.3.3 凝集物の溶解度は塩の添加により変化しない

SPIのズブチリン・カールスベルグ処理により調製された凝集物 (4 mg/mL) の pH 8.0 における溶解度に対する NaCl添加効果を検討した。NaCl濃度が、0.10, 0.25, 0.50, 1.0, 2.0, 4.0 M のときの溶解度は、いずれも 0.4-0.5 mg/mL であり、NaClが存在していないときの溶解度と同じであった。すなわち、NaCl 0-4.0 M において、凝集物の溶解度は増大も減少もしないことが示された。正電荷と負電荷の間の静電的相互作用により引き起こされる結果、凝集物の形成が促進されると考えると、低塩濃度下、pH 3-8 で凝集物がほとんど溶解度を示さず、凝集物として存在することが理解される。このときには、塩をイオン強度が 0.5 M 以上になるように加えると、静電的相互作用は遮へいされ、減弱されることが期待される。しかし、pH 8.0 において凝集物に NaCl を 4 M まで添加しても、凝集物の溶解度は全く増大する傾向を示さ

なかった。このことは、凝集が静電的相互作用のみで引き起こされているのではないことを強く示唆している。

3.3.4 凝集物の溶解度はアルコール添加により変化しない

SPIのズブチリシン・カールスベルグ処理により調製された凝集物 (4 mg/mL) のpH 8.0 における溶解度に対するエタノール添加効果を検討した。エタノール濃度が、5, 10, 20, 30% (v/v) のときの溶解度は、いずれも 0.4-0.5 mg/mL であり、エタノールが存在していないときの溶解度と同じであった。すなわち、エタノール 0-30% (v/v) において、凝集物の溶解度は増大も減少もしないことが示された。エタノールの添加により、反応液の誘電率は低下し、静電的相互作用は増強されるが、疎水的相互作用は減弱される。ここで得られた結果は、疎水的相互作用を減弱しても、溶解度は全く増大しないことを示しており、疎水的相互作用のみが凝集物形成に関与しているのではないことを示唆している。一方、静電的相互作用がエタノール添加により増強されているが、溶解度の低下は観測されなかったことから、静電的相互作用のみが凝集物形成に関与しているのではないことが示唆される。

以上の結果を総合すると、SPIのズブチリシン・カールスベルグ処理により調製された凝集物の形成には、静電的相互作用や疎水的相互作用、水素結合、イオン結合などの種々の非共有結合的相互作用が関与している可能性がある。

3.4 プロテアーゼによるSPIの加水分解と凝集反応に対する塩およびアルコールの添加効果

3.4.1 塩の添加により凝集反応は促進される

OD₆₆₀の経時変化から、OD₆₆₀が最小値(OD_{min})に達するに要する時間を T₁ とよび、OD₆₆₀が最大値(OD_{max})に達するに要する時間を T₂ とよぶ。反応時間 T = 0 - T₁ が第1相、T = T₁ - T₂ が第2相となる。SPI溶液 (10 mg/mL) をズブチリシン・カールスベルグ (1.0 μM) により標準緩衝液中で処理し、上記1.2に記載の方法で、OD₆₆₀の経時的変化を観測した。ここに 0, 8, 24, 48, 72, 100 mM NaCl を添加し、経時変化に対する効果を連続的に観測した。また、NaClの代わりに、0-2 M MgCl₂ および CaCl₂ の添加効果についても同様に検討した。

反応液中の NaCl 濃度の増大につれ、T₁と T₂は減少し、同時に OD_{min} と OD_{max} は増大した。すなわち、反応時間 T = 0 のとき、OD₆₆₀ = 0.6 であり、この値は、100 mM NaCl の添加の有無に関わらず変化しなかった。一方、0 M NaCl のときには、T₁ = 10 min, OD_{min} = 0.3; T₂ = 60 min, OD_{max} = 0.9; 100 mM NaCl のときには、T₁ = 2 min, OD_{min} = 0.5; T₂ = 30 min, OD_{max} = 1.5 となった。第2相における OD₆₆₀の増大速度を、凝集物形成速度 V_{max} とみなして、速度解析を行なった。すなわち、100 mM NaCl の添加により、SPI 自体の凝集性には影響を与えないが、凝集物収量(OD_{max} - OD_{min})を2倍に増大させ、凝集物形成反応速度 V_{max} を5倍に加速した。

NaCl と Na₂SO₄ の凝集反応に対する効果を比較した。Na⁺ 濃度に対する T₁, T₂, OD_{min}, OD_{max} の変化を比較すると、NaCl と Na₂SO₄ のいずれの場合もまったく同じ結果を与え、Cl⁻ と SO₄²⁻ とでは凝集性に対する差が見られなかった。V_{max} は、100 mM Na⁺ 存在下に、5倍増大した。CaCl₂ と MgCl₂ につい

ても凝集物形成反応に対する効果を検討した。両者の効果は、ほぼ同等であり、 Ca^{2+} と Mg^{2+} の差は見られなかった。すなわち、2 mM CaCl_2 または MgCl_2 のとき、 $\text{OD}_{\min} = 0.5$; $T_2 = 60 \text{ min}$, $\text{OD}_{\max} = 1.5$ であった。しかし、これらの凝集反応に対する効果は Na^+ に比べて、極めて大きく、100 mM NaCl , 50 mM Na_2SO_4 , 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 がほぼ同程度の凝集効果を示した。このことは、100 mM Na^+ と 2 mM Ca^{2+} または Mg^{2+} の効果が、ほぼ同程度であることを示している。

3.4.2 アルコールの添加によっても凝集反応は促進される

エタノールを 0, 4, 8, 16, 24, 32, 40 % (v/v) 存在下に、ズブチリシン・カールスベルグによる SPI 溶液の処理を行なった。NaCl などの塩の添加効果と同様に、凝集反応がエタノール添加にともない促進された。40% エタノール存在下において、 $T_1 = 1 \text{ min}$, $\text{OD}_{\min} = 0.2$; $T_2 = 10 \text{ min}$, $\text{OD}_{\max} = 1.2$ となった。エタノール非添加では、 $T_1 = 10 \text{ min}$, $\text{OD}_{\min} = 0.3$; $T_2 = 60 \text{ min}$, $\text{OD}_{\max} = 0.9$ であったことから、40% エタノールの添加により、5倍程度活性化された。凝集物形成反応速度 V_{\max} は5倍の増大が観測された。さらに、2-メルカプトエタノールの添加効果を検討したところ、12% 2-メルカプトエタノールは40% エタノールと同程度の凝集反応に対する効果をもたらした。すなわち、2-メルカプトエタノールの凝集反応促進効果はエタノールに比べて、3倍以上強いことになる。

エタノールで凝集反応が促進される理由として、SPI が変性して疎水性領域が露出し、さらにプロテアーゼによる攻撃を受けやすくなったことが考えられる。2-メルカプトエタノールは SPI 中のジスルフィド結合を切断する上に、エタノールと同様の効果で SPI を変性させるため、エタノール単独に比べて、SPI は、なお一層、プロテアーゼの攻撃を受けやすくなると考えられる。このことが、2-メルカプトエタノールによる効果がエタノールより3倍も大きいことに起因すると考えられる。

4. 本研究に付随して派生した研究成果の概略

本研究では、脱脂ダイズタンパク質とコムギのタンパク質を対象として、プロテアーゼを用いてアミノ酸にまで加水分解するための効率的加水分解における塩類の効果を検討しようとした。本研究では、とりわけ研究の開始に当たり、本研究の内包する問題点の掘り起こしと解決法の提示に努めた。本研究の企画・立案の段階ではコムギタンパク質も研究の射程に入れていたが、実質的には、ダイズタンパク質のみに専念し、コムギタンパク質に対する検討はほとんどできなかった。ただ、本研究期間中に、コムギ穀粒に存在するアルブミン・タンパク質画分から、哺乳類(ヒト、ブタ)の α -アミラーゼに対するタンパク質性阻害物質(0.19AI)の効率的な調製法を確立し、そのタンパク質化学的性質、安定性、変性、および阻害作用について検討した⁵⁾。0.19AIは13.3 kDa の均等なサブユニット2個からなる26.6 kDa の単純タンパク質である。ブタすい臓 α -アミラーゼ(PPA)に対する阻害様式は拮抗型であり、PPAとの結合の化学量論を調べたところ、0.19AI 1分子(2量体)で1分子のPPAを結合することが明らかとなった。このことは、(a) 1分子の酵素を阻害するためには均等なインヒビターの2個のサブユニットが必要であること、(b) 1分子の酵素と1個のサブユニットが結合すると、別のサブユニットは失活させられてしまうこと、あるいは、(c) 1分子の酵素と1個のサブユニットが結合すると、別のサブユニットは立体障害的に2個目の酵素を

結合することが抑制される可能性が示唆された。0.19 AIは熱や塩類、アルコール、変性剤に対して極めて安定であり、例えば、30分熱処理で50%失活する温度は88.1°Cであることが示された。0.19 AIは高濃度の塩類において、明確な変性を示さず、高い耐塩性を有することが認められた。0.19 AIに対する塩の効果については、今後の研究課題である。

5. 謝辞

本研究を遂行するに当たり、実験の一部を担当いただいた中野幹生氏(京都大学農学研究科・大学院生)、アレルギー性の実験でご協力いただいた小川正教授と森山達哉博士(京都大学農学研究科)に感謝申しあげる。

6. 文献

1. K. Inouye, K. Nagai, and T. Takita (2002) Coagulation of soy protein isolates induced by subtilisin Carlsberg. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1237-1242.
2. K. Nagai and K. Inouye (2004) Insights into reaction mechanism of the coagulation of soy protein isolates by subtilisin Carlsberg. *J. Agric. Food Chem.*, in press.
3. K. Inouye (1991) Chromatographic behaviors of proteins and amino acids on a gel filtration matrix, TSK-gel Toyopearl. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 2129-2139.
4. J. L. Shen (1976) Solubility profile, intrinsic viscosity, and optical rotation studies of acid precipitated soy protein and of commercial soy isolate. *J. Agric. Food Chem.* **24**, 784-788.
5. H. Oneda, S. Lee, and K. Inouye (2004) Inhibitory effect of 0.19 α -amylase inhibitor from wheat kernel on the activity of porcine pancreas α -amylase and its thermal stability. *J. Biochem.* **135**, 421-427.

Effective Proteolysis of Soy and Wheat Proteins with Addition of Salts and Development of New Food Materials

Kuniyo Inouye (Kyoto University, Graduate School of Agriculture)

Hiroshi Oneda (Kyoto University), Motoki Kubo (Ritsumeikan University),

Koichi Morimoto (Kinki University), and Kouhei Nagai (Kyoto University)

We have examined effective procedures for proteolysis of un-utilized proteins for expanding the proteins for foods. Coagulation is observed often in the proteolysis of soy and wheat proteins, and prevents the complete proteolysis. We have studied the coagulation process observed when soy protein isolates (SPI) are treated by subtilisin Carlsberg (SC)^{1,2)}. We describe here the characteristics of the coagula formed in SPI-digestion by SC, and the effects of salts, alcohol, and pH on the coagulation of SPI by SC. Regarding wheat proteins, we have isolated an amylase-inhibitor, and examined its inhibition mechanism against amylase³⁾.

MATERIALS AND METHODS. SPI (10 mg/mL) and SC (1 μ M) were mixed at pH 8 and 37°C, and the turbidity (OD₆₆₀) change was measured continuously. Coagula formed for 60-min reaction were collected, and amino acid composition, effects of NaCl and ethanol, and pH (pH 2.2-10.5) on the solubility were examined. Coagula formed by other proteases (ficin, bromelain, pronase, and subtilisin BPN') were also analyzed. Effects of salts on the coagulation of the SC-treated SPI were examined.

RESULTS AND DISCUSSION. Coagula contained higher content of charged amino acids (AA) and lower content of hydrophobic AA than SPI, suggesting that high content of non-polar groups may be a key clue for the coagulation. The solubility of coagula was not changed by adding 0-4 M NaCl or 0-40% ethanol, but it was lowest at pH 3-8, while that of SPI was lowest at pH 4-5. Coagula may be formed by complex interaction including electrostatic, hydrophobic interactions. Coagulation was enhanced 5 times by adding 100 mM NaCl, but there are no difference between NaCl and Na₂SO₄ on the basis of [Na⁺]. The effects of MgCl₂ and CaCl₂ were the same, and much stronger than those of other salts; 2 mM MgCl₂ or CaCl₂ has the same potential as 50 mM Na₂SO₄ or 100 mM NaCl. As SC activity was not affected by the salts used, the salts effects described above must be on the interaction between peptides formed during the SPI proteolysis.

1. K. Inouye, K. Nagai, and T. Takita (2002) *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1237-1242.
2. K. Nagai and K. Inouye (2004) *J. Agric. Food Chem.*, in press.
3. H. Oneda, S. Lee, and K. Inouye (2004) *J. Biochem.* **135**, 421-427.