

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16266

研究課題名(和文)未利用資源大豆ホエー由来デハイドリンの食品物性改善効果に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Effects of soybean whey-derived dehydrin on improvement of the physical properties of foods

研究代表者

風見 真千子 (Kazami, Machiko)

東京農業大学・応用生物科学部・助手

研究者番号：60761046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：未利用資源である大豆ホエーがタンパク質系食品の物性改善効果に寄与するメカニズムを明らかにすることを目的として本研究を実施した。大豆ホエーに含有される成分の中でも、乾燥や低温ストレスにより発現が誘導されるタンパク質であるデハイドリンに着目し解析を行った結果、大豆ホエーには、26 kDaおよび31 kDaのデハイドリンが含有されていることが明らかとなり、26 kDaのものに比べ31 kDaのデハイドリンは高い耐熱性を示すことが明らかとなった。また、31 kDaのデハイドリンは、タンパク質系食品に対する凍結障害防止効果を示すことに加え、他のタンパク質を賦活することを見出した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the mechanism by which soybean whey improves the physical properties of protein-rich foods. In particular, we focused on dehydrin, a protein that is known to be expressed following drought and/or chilling stress. As a result, two kinds of dehydrin (26 and 31 kDa in size, respectively) were found in soybean whey. Interestingly, the 31 kDa dehydrin had higher thermostability than its 26 kDa counterpart. Furthermore, the 31 kDa dehydrin protected protein-rich foods against denaturation by freezing. In addition, we found that the 31 kDa dehydrin had an activating effect on other proteins.

研究分野：食品化学

キーワード：未利用資源 大豆 デハイドリン 物性改善効果

1. 研究開始当初の背景

近年になって進行の一途をたどる地球温暖化をはじめとした異常気象による農作物の不作、世界人口の増加による慢性的な食料不足が懸念される中、食品加工の工程で副産される未利用資源の新たな活用法を考えることは、我々にとって大きな課題のひとつである。そのような未利用資源のひとつである大豆ホエーは、脱脂豆乳から分離大豆タンパク質を製造する際の副産物で、タンパク質、多糖類、ミネラルなどが含有されている。しかし、大豆ホエーは未だに有効利用されていないのが現状である。そこで、我々は大豆ホエーの有効利用を目指し、その中でも特に加熱収縮低減効果と保水性効果に着目し、それらの効果のメカニズムを明らかにすべく研究を行ってきた。

これまでに、魚肉練り製品の物性改善効果について研究を行った結果、大豆ホエー中のトリプシンインヒビター(TI)によって魚介類すり身中のタンパク質分解が阻害されること、大豆ホエー添加によってすり身の加熱ゲル中のジスルフィド(SS)結合量が増加すること、100 で 10 分間加熱処理をした大豆ホエー溶液の TI 活性および SS 結合形成能が残存していることを見出した。これらの結果から、物性改善効果には、大豆ホエー中の耐熱性成分が深く関与していることが推察された。

実際に、エビや鶏肉などのタンパク質系食品を大豆ホエーに浸漬し、加熱前後の変性度合(歩留まり率)を比較したところ、大豆ホエー添加により変性が抑制されていること、さらに、透析処理(MWCO: 3500)をした場合においても加熱収縮低減効果が維持されることが確認された。これらの結果から、大豆ホエー中の加熱収縮を抑制する成分は、耐熱性であり、分子量が 3,500 以上のタンパク質であることが推察された。

デハイドリン(LEA タンパク質ファミリー)は分子量 25,000、耐熱性かつ親水性のタンパク質で、リジンリッチモチーフと poly-Ser 配列がリジンリッチモチーフのすぐ上流に存在している特徴的な配列を持っていることが明らかとなっている [Close, T.J., *et al.*, *Plant Mol. Biol.* **23** 279-286, 1993]。さらに、ハウレンソウから精製した LEA タンパク質を用いた乳酸脱水素酵素の保護活性実験より、脱水状況下でのタンパク質の活性保護に LEA タンパク質が関与することが報告されている [Kazuoka, T., *et al.*, *Plant Cell. Physiol.* **35** 601-611, 1994]。

以上のことから、大豆ホエー中のデハイドリンが、その機能の一つである保護機能付与能を発揮することで、魚介類や肉類の加熱収縮低減効果および保水性に深く関与していることが推察されたため、その可能性について検証することとした。

2. 研究の目的

研究目的は、未利用資源である大豆ホエーが魚介類および肉類の物性を改善させるメカニズムを解明することである。現在では、加熱収縮改善策として、保水性効果の高いリン酸塩が主に使用されているが、食品がアルカリ性になることで、その加工時に弊害となることや、食した際に、血圧上昇の原因となることが指摘されている。そこで、分離大豆タンパク質を製造する際に副産され、その大部分が廃棄処分されている大豆ホエーの加熱収縮低減効果および保水性に着目し、大豆ホエーの中でも、耐熱性タンパク質であるデハイドリンがその効果に大きく寄与していると仮説を立て、そのメカニズムを明らかにすることとした。

3. 研究の方法

デハイドリンは、未だにその機能解析が十分になされておらず、不明な点が数多く存在する。そこで、本研究ではまずはじめに、デハイドリンの特性を明らかにし、次いで、デハイドリンと他のタンパク質との相互作用メカニズムとその効果について解析を行った。

(1) 大豆ホエーに存在するデハイドリンの特性解析

日清オイリオグループ株式会社より分与された脱脂大豆粉を用いて大豆ホエーを作製した。これを固定化金属アフィニティークロマトグラフィーに供し、デハイドリン画分を得た。このデハイドリン画分を、SDS-PAGE、Western Blotting 法にて解析し、大豆ホエーに存在するデハイドリンを検出した。

さらに、上記の方法で検出されたデハイドリンの特性を評価する目的で、加熱処理したデハイドリン画分を SDS-PAGE ならびに Western Blotting 法にて解析した。これにより耐熱性が確認できたシグナルを LC-MS/MS にて解析した。

(2) デハイドリン組み換えタンパク質の作製および機能性評価

大豆ホエー作製に使用している脱脂大豆粉の原料である大豆と同品種の大豆を栽培し、冷却ストレスを負荷することでデハイドリンを発現させた根から mRNA を抽出した。逆転写により生成した cDNA を鋳型とし、LC-MS/MS により同定されたデハイドリンの塩基配列情報をもとにデハイドリン遺伝子を PCR 法により増幅した。このデハイドリン遺伝子を、His タグ融合組み換えタンパク質発現用プラスミドに挿入し、これを組み換えタンパク質発現用大腸菌に導入することで大量発現を行った。固定化金属アフィニティークロマトグラフィーにより精製したデハイドリン組み換えタンパク質の発現確認は、Western Blotting 法にて行った。

さらに、デハイドリンは乳酸脱水素酵素

(LDH)に対する凍結変性防止効果を有していることが報告されていることから、精製したデハイドリン組み換えタンパク質の機能性を、LDHの残存活性を求めることで評価した。機能性の高さについては、既に凍結変性防止効果を有していることが報告されている牛血清アルブミン(BSA)と比較検討することで行った。

また、デハイドリンがLDHの加熱変性を防止するのにかついても同様に検証を行った。

(3) デハイドリンが他のタンパク質機能に与える影響の解析

当研究室のこれまでの結果から、デハイドリンと相互作用することが推測されたTIおよびプロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI:SS結合形成に参与する酵素)を用いて、デハイドリンが他のタンパク質に与える影響を解析した。

TIに対する影響

デハイドリン組み換えタンパク質とTIを混合し、凍結または加熱処理をした後、トリプシンと基質であるBAPAを加え、残存するTI活性を測定することで、TIの凍結変性をデハイドリンが抑制するのかが検証した。

PDIに対する影響

デハイドリンとPDI(当研究室にて大量発現精製法を確立済みの小麦由来PDI)を混合し、凍結または加熱処理をした後、還元変性オボムコイドに対するSS結合形成量をNBD-Cl法にて測定することでPDIの凍結変性をデハイドリンが抑制するのかが検証した。

(4) デハイドリンがタンパク質系食品に与える影響の解析

エビおよびマグロに対する歩留り試験

生エビおよびマグロに対するデハイドリンの凍結障害防止効果を評価するために、生のバナメイエビおよびマグロ(冊切りの切り身)をデハイドリン組み換えタンパク質溶液に浸漬後凍結し、常温にて解凍した。その際の凍結前と解凍後の重量を比較し、凍結による歩留り率を算出した。また、生エビおよびマグロに対するデハイドリン組み換えタンパク質の加熱収縮低減効果を評価するために、解凍後、沸騰水浴にて加熱した。その際の浸漬前と加熱後の重量を比較し、加熱による歩留り率を算出した。

乾燥卵白加熱ゲルに及ぼす影響

デハイドリンの保水性とゲル物性に及ぼす影響を解析するために、キユーピータマゴ株式会社より分与された乾燥卵白に純水、BSA溶液またはデハイドリン組み換えタンパク質溶液を加えた。各々の混合液をケーシングに充填し、加熱した後、ゲルを1cm幅にカットし、凍結前後の離水率およびインストロン万能試験機による物性測定を行った。

4. 研究成果

(1) 大豆ホエーに存在するデハイドリンの特性解析

デハイドリン画分を、抗デハイドリン抗体を用いたWestern Blotting法にて解析した結果、26 kDaおよび31 kDaにシグナルが検出された。

次に、デハイドリンの特性解析を行う目的で、100 またはオートクレーブ処理によるデハイドリン画分の加熱試験を行ったところ、31 kDaのデハイドリンは26 kDaのデハイドリンに比べ、非常に高い耐熱性を有していることが明らかになった。

一方で、デハイドリン画分をSDS-PAGE後、CBB染色を行った結果、26 kDaおよび31 kDaのデハイドリンに加え、他の夾雑タンパク質が存在していることが確認されたため、これらの影響を除去することが、デハイドリンの効果を評価する上で必要と判断した。そこで、高い耐熱性が確認された31 kDaのデハイドリンをクローニングする目的で、LC-MS/MSを用いてタンパク質同定をしたところ、デハイドリンと100%の相同性を示し、BLAST検索の結果、デハイドリン(Accession:CAE47768)であることが確認された。

(2) デハイドリン組み換えタンパク質の作製および機能性評価

デハイドリン(Accession:CAE47768)の塩基配列情報をもとに発現・精製したデハイドリン組み換えタンパク質をSDS-PAGEにて解析したところ、31 kDa付近に単一のシグナルが確認された。さらに、Western Blottingの結果、デハイドリン抗体、ヒスチジン抗体いずれの抗体を用いた場合においても31 kDa付近にシグナルが確認されたことからデハイドリン組み換えタンパク質の発現を確認した。

次に、デハイドリン組み換えタンパク質の機能性を評価したところ、純水と混合したLDHの活性残存率が凍結融解により25.5%まで減少した一方で、デハイドリン組み換えタンパク質では活性残存率が90.0%とLDHに対する高い凍結変性防止効果を示した。また、BSAの活性残存率は65.5%であったことから、デハイドリン組み換えタンパク質はBSAよりも高い凍結変性防止効果を有していることが示唆された。一方で、加熱処理では純水、デハイドリン組み換えタンパク質共に酵素活性が著しく低下したことより、デハイドリンには、LDHの熱変性を抑制する効果はないことが示唆された。

(3) デハイドリンが他のタンパク質機能に与える影響の解析

TIに対する影響

デハイドリンがTIの機能に与える影響を解析した結果、凍結前ではデハイドリンの添加濃度依存的にTI活性が上昇したことから、デハイドリンはTIを賦活することが示唆さ

れた。また、凍結前後の活性残存率を算出したところ、デハイドリン添加濃度が低い条件では活性残存率が低下する一方で、デハイドリン添加濃度が高濃度の条件では、TI 活性が維持されたことから、デハイドリン組み換えタンパク質は、TI に対する凍結変性防止効果を有していることが示唆された。

PDI に対する影響

デハイドリンが PDI の機能に与える影響を解析した結果、凍結前ではデハイドリンを添加することで PDI 活性が上昇したことから、デハイドリンは PDI を賦活することが示唆された。また、凍結前後の活性残存率を算出したところ、いずれのデハイドリン添加濃度条件下においても、残存率が 100%以上を示したことから、PDI 自体に冷凍耐性があることが示唆され、デハイドリンの PDI に対する凍結変性防止効果を評価するには至らなかった。

(4) デハイドリンがタンパク質系食品に与える影響の解析

エビおよびマグロに対する歩留り試験

エビおよびマグロに対する凍結障害防止効果について解析した結果、純水に比べデハイドリン組み換えタンパク質溶液に浸漬させたエビおよびマグロにおいて有意な歩留まり向上効果が見られた。一方で、加熱収縮低減効果について検討した結果、エビおよびマグロのいずれにおいても、純水とデハイドリン組み換えタンパク質溶液浸漬間での歩留り率に有意な差は見られなかった。

乾燥卵白加熱ゲルに及ぼす影響

デハイドリンが乾燥卵白加熱ゲルの保水性に与える影響を解析した。凍結前の卵白ゲル重量を比較すると、離水率に大きな差異は認められなかったが、凍結後はデハイドリン添加ゲルにおいて、無添加および BSA 添加ゲルに比べ離水率が減少する傾向が見られた。次に、ゲルの硬さについて解析を行った結果、凍結前では BSA 添加ゲルに比べ、デハイドリン添加ゲルでは硬さが有意に上昇する結果が得られた。さらに凍結後の硬さは、無添加、BSA 添加、デハイドリン添加のいずれにおいても凍結前に比べ低下したが、その低下率は、無添加および BSA 添加に比べ、デハイドリン添加で最も小さかった。これらの結果から、デハイドリンは乾燥卵白加熱ゲルの凍結による物性低下を抑制する効果を示すことが示唆された。

以上の結果より、デハイドリンには、当初予想していた保水性付与効果、他のタンパク質を加熱変性から保護する効果およびタンパク質系食品に対する加熱収縮低減効果は見られなかった。しかし、他タンパク質を賦活する効果、さらに、タンパク質系食品に対する凍結障害防止効果を示すことを本研究により新たに見出した。今後、タンパク質系食

品中のデハイドリン局在と食感との関連性について検討を行うことで、凍結障害防止効果の詳細な作用メカニズムを解明する必要があるものとする。

また、加熱収縮低減効果については、大豆ホエーに存在する糖・ミネラルによるものであることを示唆する結果が得られている。今後、その作用メカニズムについても明らかにする必要がある。

大豆ホエーが示す効果の詳細なメカニズムが明らかになれば、大豆ホエーを利用するにあたり、周知の安全性に加え、その機能性が学術的に証明できることになり、食品の加熱変性や冷凍変性を抑制する新たなツールとして広く用いることが可能になるものとする。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 7 件)

平田芳信、風見真千子、野口治子、岡大貴、高野克己：大豆由来デハイドリンによる酵素タンパク質の冷凍解凍による活性への影響の確認：日本食品科学工学会 第 65 回大会 宮城、2018 年 8 月

平田芳信、風見真千子、野口治子、高野克己：大豆由来デハイドリンが加熱卵白ゲルの凍結に及ぼす影響の検証：日本食品保蔵科学会 第 67 回大会 山梨、2018 年 6 月

平田芳信、風見真千子、野口治子、高野克己：タンパク質系食品の冷凍変性防止に対する大豆デハイドリンの効果検証：日本食品科学工学会 平成 30 年度関東支部大会 埼玉、2018 年 3 月

風見真千子、野口治子、高野克己：大豆デハイドリンの精製と凍結障害保護効果に対する加熱処理の影響：日本食品科学工学会 第 64 回大会 神奈川、2017 年 8 月

三井悠河、風見真千子、野口治子、高野克己：大豆デハイドリン精製工程における加熱処理の影響：日本食品保蔵科学会 第 66 回大会 高知、2017 年 6 月

三井悠河、風見真千子、野口治子、高野克己：大豆ホエーによるタンパク質系食品への物性改良効果：日本食品科学工学会 平成 29 年度関東支部大会 山梨、2017 年 3 月

風見真千子、野口治子、高野克己：食品加工利用を視点とした大豆ホエー内在酵素の活性評価：日本食品科学工学会 第 63 回大会 愛知、2016 年 8 月

〔その他〕

受賞（ポスター発表企業賞）

平成 30 年度関東支部大会 埼玉、2018 年 3
月：平田芳信、風見真千子、野口治子、高野
克己：タンパク質系食品の冷凍変性防止に対
する大豆デハイドリンの効果検証

6．研究組織

(1)研究代表者

風見 真千子 (KAZAMI Machiko)
東京農業大学・応用生物科学部・助手
研究者番号：60761046

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし