

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月17日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580220

研究課題名（和文） オボアルブミンのプロテアーゼインヒビター効果に関する研究

研究課題名（英文） The study on the ovalbumin as a protease inhibitor

研究代表者 大迫 一史 （ ）

東京海洋大学大学院・海洋科学技術研究科・准教授

研究者番号：00452045

研究成果の概要（和文）：

卵白から高純度のオボアルブミンを大量に精製する方法を開発した。得られたアルブミン（N型）をS型アルブミンとI型アルブミンに誘導した。これらを魚肉に添加してゲルを調製したところ、I型アルブミンを添加したゲルが最も高い破断強度を示した。また、カゼインを基質としてトリプシンに対するこれら3種アルブミンの阻害効果を調べたところ、I型アルブミンのみならず、N型およびS型アルブミンもトリプシンの活性阻害効果があることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The purification method for large scale production of ovalbumin from egg white was developed. The obtained ovalbumin (N-type) was derivatized to S-type ovalbumin and I-type ovalbumin, respectively. The heat-induced fish meat gel containing I-type ovalbumin showed the high breaking strength compared with those containing the other two types. Evaluation of trypsin-inhibitory activity by using casein as a substrate showed that all three types of ovalbumin had the inhibitory activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：食品科学

科研費の分科・細目：水産化学

キーワード：オボアルブミン、卵白、プロテアーゼインヒビター

1. 研究開始当初の背景

従来から、プロテアーゼによる食品の劣化は食品産業上大きな問題であり、魚肉中のプロテアーゼに関する研究は国内・外で広く行われている。中性及びアルカリ性下で活性のある筋肉プロテアーゼには、大きくセリン型プロテアーゼ、システイン型プロテアーゼおよ

びメタロ型プロテアーゼが含まれる。また、酸性下で活性が高いアスパラギン酸プロテアーゼを主とする酸性プロテアーゼと言われるものも存在する。これら酵素は魚の死後分解に寄与し、魚の部位、生育度、活性化剤や阻害剤、pH、温度に依存することが知られている。

プロテアーゼはとくに魚肉を原料とする加工食品の製造において大きな問題となっている。具体的には、水産ねり製品製造においての「戻り」の問題である。一般に水産ねり製品は塩ずり肉を加熱して製造されるが、加熱の段階で 60℃付近においてタンパク質がプロテアーゼにより激しい分解を受け、かまぼこ等、水産ねり製品の独特の食感が失われてしまう。また、ねり製品に関わらず加熱時の魚肉のプロテアーゼによる分解は国内外での大きな問題である。逆にこの問題が解決された場合、これまでプロテアーゼ活性が高く原料とならなかった魚肉も原料とすることが可能となり、食糧難問題における解決策の一つにもなり得る。

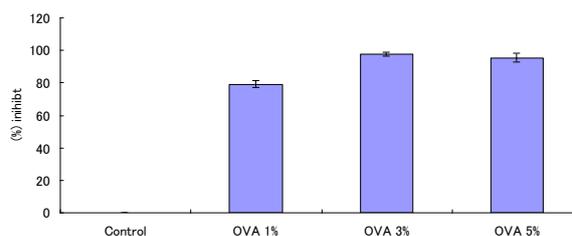
これら、魚類筋肉が有するプロテアーゼを不活化する方策として、従来から天然由来のインヒビターを使用することが行われて来た。食品に添加可能な天然由来のインヒビターとして、とくに、プロテアーゼの問題が大きい水産加工業界においては、卵白が用いられている。卵白が有するプロテアーゼインヒビター効果に関する研究は多く、Benjakulらは、エソすり身(2004)およびバナメイエビすり身(2008)に卵白を添加し、これが最もプロテアーゼが活性化する条件において強いインヒビター効果を示すことを明らかにしている。また、山下らは(1995)スケトウダラすり身に卵白を添加したところ物性の向上が見られたことについて述べている。これのことは、卵白がプロテアーゼインヒビターを含有し、水産物由来のプロテアーゼを効果的に抑制することを示唆している。

卵白に含まれる既知のプロテアーゼインヒビターとして、オボムコイド、オボインヒビター、オボマクログロブリン、シスタチンが挙げられる。これらはそれぞれ、ターゲットとなるプロテアーゼが異なり、オボムコイドおよびオボインヒビターは、セリンプロテアーゼを、オボマクログロブリンは自らの分子内に取り込むようにして多くのプロテアーゼを、シスタチンはシステインプロテアーゼを阻害する。一方で、卵白の主成分であるオボアルブミンは構造的にはセルピン(セリンプロテアーゼ)に非常に類似しているが、プロテアーゼとしての効果は無いものとされている。

これまでの申請者の研究からも、先述の研究と同様に卵白がエビ加熱ゲル(雨宮ら、2009)やスケトウダラ酢じめゲル(阿部ら、2009)を調製する場合、各種プロテアーゼを効果的に抑制することが明らかになっている。申請者は、既存の研究から、卵白が有するインヒビター効果は、先述のオボムコイド、オボインヒビター、オボマクログロブリン、シスタチンであると考えていた。

ところが研究を進めていくに従い、これまで

プロテアーゼインヒビターとして効果が無いとされてきたオボアルブミンにプロテアーゼインヒビターとしての効果があることがわかってきた。すなわち一般にプロテアーゼ活性が非常に高いとされるエビ(ホッコクアカエビ)肉において、システイン型、セリン型プロテアーゼ活性が最も高かった 60℃で標品のオボアルブミンを添加したところ、これらのプロテアーゼ活性が効果的に抑制された。加えて、酢酸酸性下(pH3)において活性が高い、スケトウダラ肉中に含まれる酸性プロテアーゼも市販のオボアルブミンにより抑制された。



ホッコクアカエビのプロテアーゼに対する市販アルブミンの活性阻害率

先に述べたようにオボアルブミンはプロテアーゼとしての効果が無いとされている。一方で、オボアルブミンはそもそもセリンプロテアーゼインヒビターと構造が非常に近いセルピン類とされている。セルピン類のプロテアーゼインヒビターとしての発現メカニズムは、ターゲットのプロテアーゼによって、切断されるC末端の reactive center loop (RCL) がプロテアーゼ内に挿入され、強固な複合体を形成するため、プロテアーゼがその働きを失うことにあるとされている。オボアルブミンが構造的にはセルピン類でありながら、インヒビターとしての活性を示さないのは、切断されたC末端がプロテアーゼとの複合体を形成しないからだとされている。

一方、杉元ら(2001)は、N型(ネイティブなアルブミン)、S型(貯蔵中にN型から変化したもの)およびHS型オボアルブミン(胚発生中に作り出されるもの)のうち、HS型オボアルブミンを80℃で加熱するとトリプシンやキモトリプシンに対して阻害活性を示すようになることを明らかにしている。HS型オボアルブミンは、その大部分の構造は他のN型およびS型のオボアルブミンと大差無いが、RCLの部位のみ他のアルブミンと異なる。これらことは、N型オボアルブミンに物理的、あるいは化学的な影響を与えた場合その構造が変化し、プロテアーゼ活性を有する可能性を示唆しているものと考えている。

2. 研究の目的

本研究においては、卵白中の主成分であるオボアルブミンのインヒビターとしての効果を確認し、発現機作の一端を明らかにしようとするものである。国内外において、卵白に関する研究は多く存在するものの、オボアルブミンについてはこれまでインヒビターとしての効果が無いとされて来ており、水産食品への利用面からのアプローチは皆無である。加えて、食品製造過程（加熱や pH の変化など）におけるプロテアーゼインヒビターの発現についての研究は皆無であり、これが明らかになれば、プロテアーゼおよびこのインヒビターの研究が盛んな水産化学分野を含む食品産業に関する研究の進展において大きな貢献となる。また、オボアルブミンは液卵製造過程において、卵黄との需要のアンバランスから生産過多のため産業界から利用法の開発が求められているが、本研究の結果如何ではこれへの対応策となり得る。

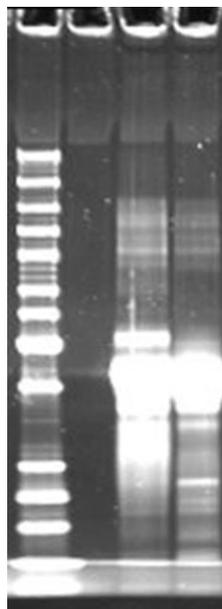
3. 研究の方法

オボアルブミンは、様々なグレードの市販品が多数存在する。本研究では、試料として大量のオボアルブミンが必要であるが、精製度の高いオボアルブミンは非常に高価である。そのため、精製度の高いオボアルブミンを大量に精製する必要があった。そこで、硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィーを組み合わせる方法によって、オボアルブミンの精製を行った。

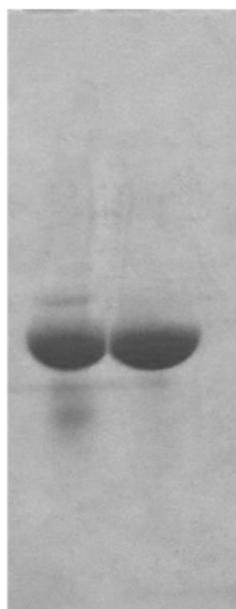
得られたオボアルブミン（N 型）を強アルカリ下で加温して S 型アルブミンを得た。さらにこれを加熱して I 型アルブミンを得た。また、誘導体化が行われているかの確認のために、示差走査熱量計を用いて変性温度を測定した。

得られた 3 種のオボアルブミンを魚肉に添加して、加熱ゲルを調製し、物性測定を行った。また、トリプシンを用いて、これら 3 種のアルブミンにプロテアーゼインヒビター効果があるかをインビトロで確認した。

4. 研究成果



M 市販品 N N



市販品 N N

(1) オボアルブミンの新規精製法の開発

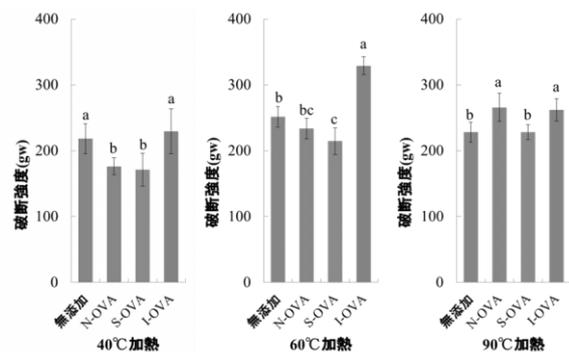
既存の研究では、卵白からのオボアルブミン
図 1. 市販オボアルブミンと新規方法で調製したアルブミンの比較。左は蛍光染色、右は通常の SDS-PAGE

の精製は、硫酸分画ののち陽イオン交換カラムおよび陰イオン交換カラムの両者を用いて行うが、陰イオン交換カラムのみを用いて大量に精製する方法を開発した。得られたオボアルブミンの純度を SDS-PAGE, またこれを蛍光染色処理したもの、および抗原抗体染色を行い確認したところ、市販のオボアルブミン（シグマ社 グレードVII）よりも高かった。

(2) オボアルブミンが魚肉の加熱ゲル形成に与える影響

図 2. 3 種オボアルブミンが魚肉ゲルの破断強度に与える影響

図 2 に見られるように、40℃では、N 型および S 型のアルブミンを添加した魚肉ゲルは、対照に比較してむしろ低い値を示し、魚魚肉



ゲル形成を阻害していることが推定された。一方、60℃での加熱においては、I 型のアルブミンを添加した魚肉ゲルは他のゲルに比較して有意に高い値を示し、一般に 60℃において生じる戻りを抑制していることが想定された。60℃での戻りは、魚肉に含まれる内在性のプロテアーゼが関与することが知られており、I 型のアルブミンはこれを抑制していることが示唆された。90℃においては、破断強度において、60℃で見られるような大きな違いは無いものの、N 型と I 型のアルブミンを添加して魚肉ゲルは他に比較して高い値を示した。

(3) オボアルブミンがトリプシンの活性に与える影響

図 3 に、トリプシンとカゼインを溶解した水溶液に 3 種オボアルブミンを溶解し、一定時間経過後の上澄みペプチド量を示した。値が高いほどトリプシンの活性が高いことを示している。コントロールに比較して、いずれのオボアルブミンもトリプシンに対して阻

害活性を示した。I 型のアルブミンは既存の知見においてトリプシンを抑制することが知られていたが、今回の研究では N 型も S 型も同様に阻害活性を示すことが示唆された。

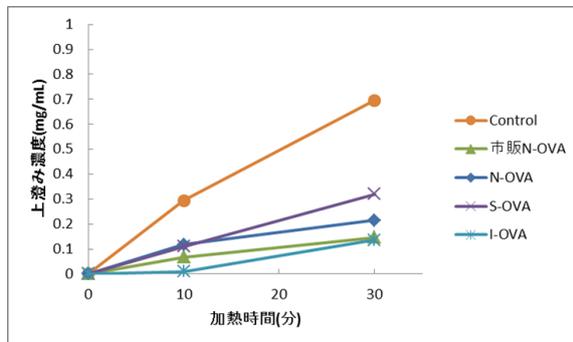


図 3. 3 種オボアルブミンがトリプシンの活性に与える影響

また、実際にトリプシンによるカゼインの分解が、オボアルブミンにより阻害されているのかを確認するために、SDS-PAGE により確認した。(図 4)

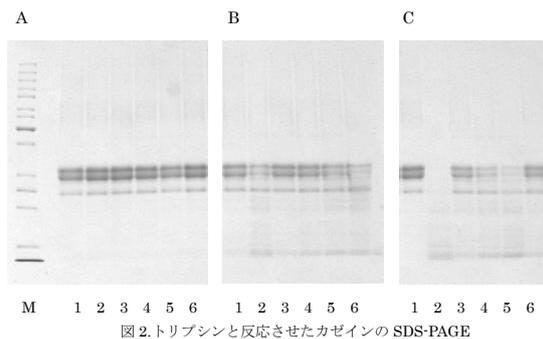


図 2. トリプシンと反応させたカゼインの SDS-PAGE

A: 0 分加熱 B: 10 分加熱 C: 30 分加熱
1: カゼインのみ (トリプシン無添加) 2: Control 3: 市販 N-OVA 4: N-OVA
5: S-OVA 6: I-OVA

図 3. 3 種オボアルブミンがトリプシンの活性に与える影響

その結果、カゼインの分解は確かにオボアルブミンにより抑制され、中でも S 型と I 型のアルブミンがこの効果が高いことが確認できた。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

① B. Techaratanakrai・岡崎恵美子・大迫一史、Effect of organic salts on setting gels and their corresponding acids on kamaboko gels prepared from squid *Todarodes pacificus* mantle muscle、*Fisheries Science*、78 巻、707-715 頁、2012 年、

査読有

[学会発表] (計 1 件)

① 雨宮弘和・田中宗彦・S. Klomklao・大迫一史：The effects of egg white on the aptitude of pink shrimp as a raw material for kamaboko product、5th International conference on innovations in Food and Bioprocess Technology、平成 22 年 10 月 20 日、Bangkok, Thailand (タイ、バンコク)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大迫一史 (Kazufumi Osako)

東京海洋大学海洋科学技術研究科・准教授

研究者番号：0 0 4 5 2 0 4 5

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者