

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450182

研究課題名(和文) 製パンにおけるSS結合形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of SS bond formation mechanism in bread making

研究代表者

野口 智弘 (NOGUCHI, TOMOHIRO)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：80297598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,300,000円

研究成果の概要(和文)：各種小麦粉中のPDI活性は、超強力粉、強力粉、中力粉間で差異がみられ、強力粉が高い活性を示した。また、これら小麦粉中のPDI活性は、小麦粒登熟後期である、開花後20～25日目にピークを迎え、その後低下する傾向を示した。また、このPDIが小麦粉中に残存し生地中でS-S結合形成に関与することが推察された。そこで小麦生地中におけるS-S結合形成性を解析したところ、30-40kDaのタンパク質に分子間S-S結合を形成し、高分子量化することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The PDI activity was different between super strong flour, strong flour and medium flour, and strong flour showed high activity. In addition, the PDI activity in the wheat flour reached a peak at 20 to 25 days after anthesis at the late stage of wheat grain ripening and then showed a tendency to decrease. It was inferred that the PDI expressed at this time remained in the wheat flour and was involved in S - S bond formation in the dough. Analysis of the S - S bond formation state in the wheat dough suggested that intermolecular S - S bonds were formed in the 30 - 40 kDa protein and the molecular weight was increased.

研究分野：食品化学

キーワード：製パン PDI

1. 研究開始当初の背景

製パンに於いて、グルテンの形成はその品質に大きな影響を及ぼすことから、古くから様々な研究が行われてきた。これらの研究の成果から、混捏時の物理的作用によりグルテニンとグリアジン間に形成される分子間のイオン結合、水素結合、ジスルフィド結合、疎水結合などが関与することが示されて来た。また、近年の遺伝子解析技術の発達から、製パン性の優れている小麦系統は、特異的な遺伝子を有しており、高分子量のグルテニン・サブユニットには様々な遺伝子型がある中で、どのサブユニットが生地を強める効果が高いかが明らかになりつつある。具体的には、分子間結合をするシステインの数によりポリマーの形状が異なり、その結果、弾性の低い直鎖状か、あるいは弾性の高い網目状の形状を持ったポリマーが作られる。一方、低分子量のサブユニットの遺伝子型が生地特性に与える効果については、システイン数の違いは関係せず、サブユニットの数や量、立体構造の違いなどが影響していると考えられている。この様なことからジスルフィド結合によるタンパク質側鎖間の共有結合はその他の結合に比べてグルテン形成に大きく関与し、製パンにおいて最も重要であると考えられる。

しかしながら、ジスルフィド結合の形成には、熱エネルギーのような高いエネルギーが必要であり、生地混捏、発酵時のような温度帯にて形成されることは考えに難い。このため、これまでにアスコルビン酸や、臭素酸カリウムといった酸化剤の添加によってこれら SS 結合形成の解析が行われてきたが、これら SS 結合形成の詳細な解明には至っておらず、また内在性の酸化剤の影響解析は十分行われていない。

本研究では製パン時における SS 結合形成に対し、酵素学的な視点より注目し、生物がタンパク質を生合成する際タンパク質を効率よく貯蔵するため、またその機能性を発現させるため、タンパク質の折りたたみに関与する分子シャペロンが必ず存在する。この機能を担う分子シャペロンとしてプロテインジスルフィドイソメラーゼ(以下 PDI; EC. 5.3.4.1)が知られている¹⁾。PDI は酸化状態においてタンパク質分子間あるいは分子内にジスルフィド結合形成を触媒する酵素である。PDI は生物の代謝において非常に重要な酵素でありながら、その研究の歴史は浅く、詳細な研究が活発となったのは、1990 年代であり、特にヒトのアルツハイマー病などの原因酵素として医学の分野での研究成果が主である。一方、植物体においては研究例が少なく、イネやダイズでの詳細な報告があるにとどまっている。小麦においては、その活性が報告され、また遺伝子情報が明らかとなっているが、何れも植物生理としての研究であり、製パン性と関連性は説いていない。我々は、これまで得られていなかった小麦

PDI を国内産小麦「ハルユタカ」より分離精製に成功し、ハルユタカ PDI は、63kDa のタンパク質であることを明らかにし、さらに大腸菌を用いた大量発現系を用い、小麦ギリコンビナント PDI の取得に成功している。

また、PDI による SS 結合形成において、もう一点重要な問題がある。それは、タンパク質に SS 結合を形成した後、PDI は還元型となりその酸化能を失う。SS 結合形成を滞りなく行うためには還元型 PDI の酸化再生機構が必要不可欠である。この機能を負うものとしてエンドプラズミックレティカムオキシドレダクターゼ 1 (以下 Ero1) が関与することが近年解明されてきた(図 1)。

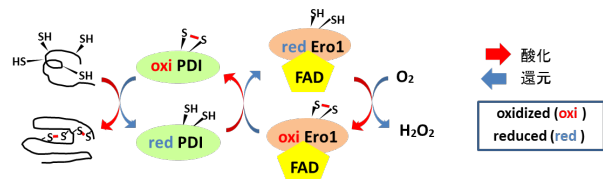


図 1 PDI、Ero1 によるタンパク質ジスルフィド形成サイクル

Ero1 においてもヒトにおける研究は盛んであるが、植物においてはイネで詳細な研究があるものの²⁾、小麦ではその報告はなく遺伝情報の登録もみられなかった。我々はヒトの Ero1 遺伝子情報を基に大腸菌を用いた大量発現系にて小麦ギリコンビナント ERO1 の取得に成功している³⁾。

2. 研究の目的

以上、述べたように、SS 結合形成システムは生物として必須のものであり、小麦においてもその存在は確認されており、申請者によって小麦粉中においてもその活性は確認されている。このようなことから、製パン過程における、生地混捏、発酵、焼成といった酵素反応として最適な温度条件において、内在の PDI、Ero1 が SS 結合形成に関与することは容易に推定される。

従来、小麦粉の製パン性はそのグルテン量、すなわちタンパク質量によって決まるとされているが、その中においても例外的な小麦粉が存在してきた。このような小麦粉には、タンパク質の質が関与するとされてきたが、小麦粉中の PDI、Ero1 の活性量も製パン性に対し、大きな影響を及ぼすことが考えられ、これまでタンパク質の質といった曖昧な表現にて表わされていた部分に、これら酵素活性も何らかの影響を与えているものと推察する。

そこで本研究では様々な品種の小麦粒を用い、小麦登熟過程における小麦粒内在 PDI の活性や ERO1 の存在の確認を測定するとともに、PDI 活性と登熟過程におけるグリジン、グルテニンの S-S 結合状態の解析や、生地物性ならびに製パン性との関係性検討した。さらに、発現取得したギリコンビナント PDI、Ero1 を用い、製パン性すなわちグルテ

ン形成性に対する両酵素の影響を解析するため、小麦特有のタンパク質であるグリアジンおよびグルテニンに対する PDI の作用機序を解明しこれまで不明であったグルテン形成機序の解明を目的とし検討した。

3. 研究の方法

(1) 試料

試料には超強力品種「ハナマンテン」、強力品種「ゆめかおり」、中力品種「農林 61 号」、「さとのそら」を用い、出穂開花日を 0 日目とし、穂を 0~30 日間、5 日間隔で採取し、液体窒素にて凍結した小麦を試験に用いた。また、上記品種の市販小麦粉を試験に用いた。

(2) PDI 活性測定

PDI 活性の測定にはインスリンを基質に用い、インスリンの還元による濁度上昇を 650nm の吸収を測定して求めた。

(3) 小麦粉の性状解析および製パン試験

各小麦粉の性状比較は、ファリノグラフ（プラベンダー社製）を用い解析した。また、製パン試験は、ストレート法にてパンを焼成し、パンの比容積 (cm³/g) を測定した。

(4) ウェスタンブロット法

電気泳動ゲルから PVDF 膜へタンパク質を転写後、小麦中で最も発現量の高い PDI1-1 および PDI4-1、さらに ERO1 抗体を一次抗体として作用させた。二次抗体は Mouse IgG, Horseradish Peroxidase Linked Whole antibody from sheep (GE Healthcare 社製) を用いた。シグナルの検出は二次抗体反応後の PVDF 膜に Amersham ECL Plus Western blotting reagent pack (GE Healthcare 社製) を滴下し、化学蛍光検出機 (BIO-RAD UNIVERSAL HOOD II, Bio Rad laboratories 社製 Bio Rad 社製) にて検出した。なお、一次抗体は小麦リコンビナント PDI1-1、4-1 および ERO1 を抗原としポリクローナル抗体 (アプロサイエンス社製) を委託製造した。

(5) 小麦タンパク質の HPLC 分析

市販強力粉 1g に対し PDI1-1 を 0.25U および 20 倍量の ERO1 を添加し、水を加え生地を調製後、25 にて 3 時間静置し、0.1M 酢酸溶液に溶解したタンパク質を、HPLC に供した。カラムは、TSKgel G-5000 と G-3000 (東ソー社) を連結して試験した。

4. 研究成果

(1) 各種小麦粉中の PDI 活性

各小麦粉中の PDI 活性 (U/粉 1g) は、強力粉の「ゆめかおり」が最も高い活性を示し、「農林 61 号」が最も低い値を示した (表 1)。超強力粉の「ハナマンテン」は中力粉に近い活性であった。

表 1 各種小麦粉中の PDI 活性

	ハナマンテン (超強力品種)	ゆめかおり (強力品種)	さとのそら (中力品種)	農林61号 (中力品種)
PDI活性 (Units/ flour 1g)	2.18 (±0.28) ^a	3.51 (±0.35) ^b	2.32 (±0.79) ^a	1.84 (±0.61) ^a

(2) 小麦粉の性状と製パン性

ファリノグラフの結果、生地安定性および吸水は「ハナマンテン」および「ゆめかおり」が高く、「さとのそら」および「農林 61 号」は低い傾向を示した (表 2)。一方、製パン試験における比容積は、強力粉である「ゆめかおり」が高く、中力粉である「さとのそら」は低い結果となり、一般に得られる結果と同様の結果を示した。

表 2 小麦粉の性状試験と製パン試験

	ハナマンテン (超強力品種)	ゆめかおり (強力品種)	さとのそら (中力品種)	農林61号 (中力品種)
ファリノグラフ試験				
生地安定性 (min)	18.2	16.4	3.9	6.9
吸水 (%)	58.5	63.0	51.8	52.0
製パン試験				
比容積 (cm ³ /g)	5.43	5.88	5.24	5.61
パングラム画像				

(3) 登熟過程における PDI 活性の変化

何れの品種においても登熟が進むにつれ PDI 活性が増加する挙動を示し、25 日目が最も高い活性を示した。また、収穫直前期である 30 日目の品種間における活性 (U/1 粒) は「ゆめかおり」が 2.24 と最も高く、「農林 61 号」が 1.05 と最も低い値であった (図 2)

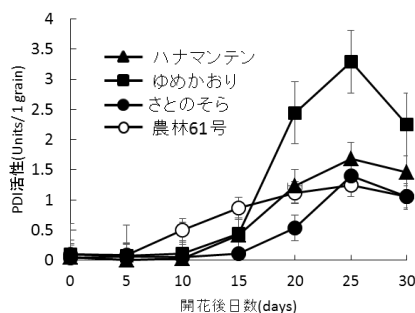


図 2 小麦登熟過程中の PDI 活性変化

(4) 登熟過程における PDI および ERO1 の発現量変化

PDI および ERO1 の発現量の挙動を測定するため、PDI1-1 および PDI4-1、さらに ERO1 をウェスタンブロット法に供した結果、PDI1-1 ではすべての品種において、登熟に伴い増加する傾向を示し、遺伝子発現量が低下した 20~30 日目においても多くの存在が確認された。また、PDI 4-1 においても同様の傾向がみられた。一方、ERO1 では何れの品種においてもその発現が確認され、発現量は最大値を示した 20~25 日目以降に減少した (図 3)。

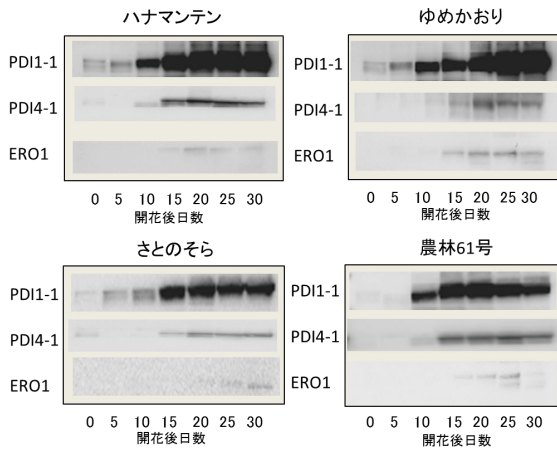


図3 登熟過程におけるPDIおよびERO1の発現量変化

(5) 登熟過程における種子タンパク質の様相

PDI 活性が高かった登熟後期（20～30日目）の小麦種子の SDS 可溶性タンパク質を SDS-PAGE に供した（図 4）。S-S 結合非還元状態、Me（-）では 4 品種ともにゲル上部の 150kDa 以上の高分子量域にグルテニンの重合タンパク質バンドが確認され、50-75kDa 付近では α -グリアジン、30kDa 付近では β -グリアジンが確認された。何れも経日的に染色強度は増加したが、「ゆめかおり」、「農林 61 号」では 25 日においては、グリアジンが強く検出されたのに対し、「ハナマンテン」、「さとのそら」ではこれらの強度は小さく 30 日目で増加した。また、S-S 結合を還元処理した結果（図 4, Me（+））、高分子量バンドが消失し、高分子量グルテニンサブユニット（HMW-GS）と共に、非還元処理 [Me（-）] ではみられなかった低分子量グルテニンサブユニット（LMW-GS）の新たなバンドが検出された。HMW-GS および LMW-GS が S-S 結合によって高分子量バンドを形成していたことが推察されたが、これらグルテニンの発現挙動もグリアジン同様、「ゆめかおり」、「農林 61 号」で 25 日目、「ハナマンテン」、「さとのそら」で 30 日目に急激な増加が観察された。さらに強力品種の「ゆめかおり」では、25 日目に比べ 30 日目の高分子量バンドの強度が低下し、「ゆめかおり」では、PDI の発現量および活性値が他の品種に比べ高かったことから、登熟過程において HMW-GS および LMW-GS が PDI の作用によって S-S 結合を形成することでさらに高分子量化し、SDS 不溶性画分へ移行することが推察された。

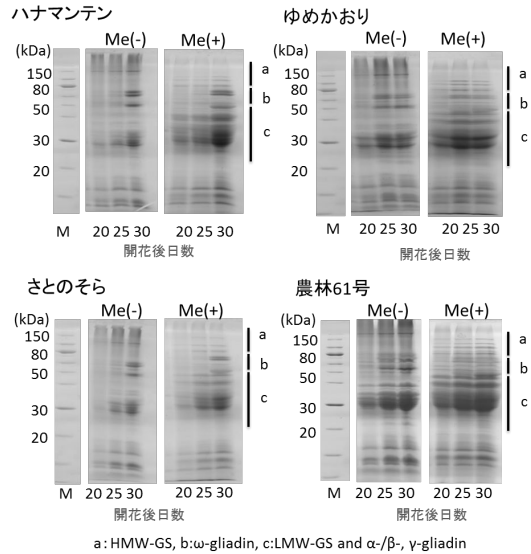


図4 登熟過程におけるタンパク質の S-S 結合形成状態の解析

(6) PDI による小麦タンパク質重合試験

小麦粉に PDI1-1 および ERO1 を添加し生地を調製したところ、0.1M 酢酸可溶性タンパク質の HPLC の溶出パターンは無添加生地に比べ高分子側にシフトが観察された（図 5）。そこで、本ピークを S-S 結合を還元後、SDS-PAGE にて解析したところ、30-40kDa 付近のタンパク質バンドが検出された。このことから、30kDa 付近の LMW-GS が分子間結合にて重合し、高分子化する事が明らかとなった。なお、本試験では、0.1M 酢酸溶液に不溶性タンパク質は解析が困難である事から、さらに検討を続け、HMW-GS の解析を試みたい。

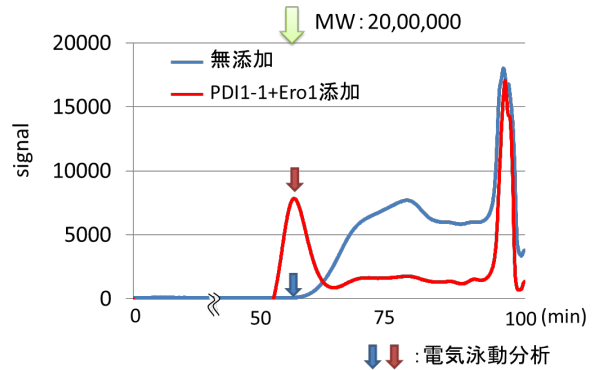


図5 PDI-ERO1 添加生地の HPLC 分析

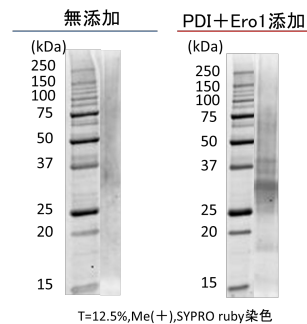


図6 PDI-ERO1 添加による高分子量化タンパク質の SDS-PAGE 解析

<引用文献>

- 1) David A. Hillson, Nigel Lambert, Robert B. Freedman,.: Formation and isomerization of disulfide bonds in proteins: Protein disulfide-isomerase. Methods in Enzymology, 107, 281-294 (1984)
- 2) Yayoi Onda, Toshihiro Kumamaru and Yasushi Kawagoe: ER membrane-localized oxidoreductase Ero1 is required for disulfide bond formation in the rice endosperm. Proc Natl Acad Sci USA; 106:14156-14161 (2009)
- 3) 野口智弘、田村良太、新井智美、野口治子、内野昌孝、高野克己、小麦 Ero1 遺伝子のクローニングと発現. 日食保科誌 37, 283-287, 2011-11-30

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)

加藤亮、風見真知子、徳本 脩、野口智弘、高野克己、登熟過程における小麦粒中のプロテインジスルフィドイソメラーゼ発現量とその活性がジスルフィド結合形成に及ぼす影響、日食保科誌, 査読有, 42, 207-211 (2016)

[学会発表](計3件)

加藤 亮・野口智弘他、小麦登熟過程における貯蔵タンパク質の SS 結合形成とプロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) 活性との関係性、食科工、2016/8/26、名城大学(愛知県名古屋市)
山田大地・野口智弘他、プロテインジスルフィドイソメラーゼファミリーの作用機作の比較検討、食科工、2016/8/26、名城大学(愛知県名古屋市)
徳本 脩・野口智弘他、小麦粒登熟過程における PDI 発現量解析、日農化、2015/03/29、岡山大学(岡山県岡山市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

野口 智弘 (Tomohiro Noguchi)

東京農業大学・応用生物科学部食品加工技術センター・教授

研究者番号：80297598