

機関番号：32415

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19580314

研究課題名(和文) ダチョウ卵および鶏卵・卵白タンパク質の構造と特性に関する比較研究

研究課題名(英文) Comparative study on the structure and properties of egg white proteins from ostrich and chicken

研究代表者

栗崎 純一 (KURISAKI JUN-ICHI)

十文字学園女子大学・人間生活学部・教授

研究者番号：60111481

研究成果の概要(和文): 鶏卵オボアルブミンおよびオボムコイドと共通の祖先をもつタンパク質をダチョウ卵から精製し、免疫学的に同定した。ダチョウオボアルブミンはニワトリより分子量が約3万余り大きく、ニワトリタンパク質特異的抗体の反応性も低かった。アミノ酸配列では、ニワトリと限定的な相同部分を認めた。一方、ダチョウオボムコイドの分子量はニワトリとほぼ同様であったがニワトリより不均一であった。アミノ酸配列ではニワトリと60%以上の相同性が示唆された。その他、両たんぱく質の消化性も比較した。

研究成果の概要(英文): The ostrich proteins orthologous to chicken ovalbumin and ovomucoid were purified and immunologically identified. The estimated molecular weight of ostrich ovalbumin was 30 kD higher than that of chicken ortholog. Only limited similarities were found between the amino acid sequences of ostrich and chicken ovalbumins. The estimated molecular weight of ostrich ovomucoid was similar to that of chicken ortholog but much more heterogeneous in size. The sequence similarity in amino acids was suggested to be more than 60% between chicken and ostrich ovomucoids. The digestibility of the proteins was also compared.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：食品生化学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・畜産学・草地学

キーワード：卵白タンパク質、ダチョウ、ニワトリ、オボアルブミン、オボムコイド、アミノ酸配列、免疫学的交差性

1. 研究開始当初の背景

(1)ダチョウは家畜としての歴史は長くないが、繁殖率、肥育効率や粗飼料利用率にすぐれるほか、環境適応性がよく、畜産環境問題も起こしにくいいため、自給飼料による、環境負荷が少ない新畜産食料資源として注目されている。従来の食肉や皮革のみではなく、

最近ではダチョウ卵も食品素材として一部では利用されてきている。

(2)同じ鳥卵として、ダチョウ卵も鶏卵もほぼ同様な利用特性をもつと考えられているが、加熱凝固性ではダチョウ卵白の方が若干凝固温度は高い、泡立ち性は低いなど、マク

口的な特性は報告されている。しかし、ニワトリとダチョウとは系統的に遠いことから、構成タンパク質それぞれの構造も異なり、必然的にその差異が利用特性に反映しているものと考えられるが、その詳細は不明である。

(3) 鶏卵・卵白タンパク質主要成分であるオボアルブミンについては、アミノ酸配列は既知、リン酸化、糖鎖などの翻訳後修飾の詳細が明らかにされている。最近、オボアルブミンの胚発生での役割や、加熱安定性に関わるタンパク質微細構造に関する研究が進展しているが、ダチョウに関してはオボアルブミンの利用学的性質、タンパク質科学的性質に関する研究はまったくない。

(4) 鶏卵卵白オボムコイドについては、アミノ酸配列が既知、約 20-25%の糖を含むこと、トリプシンインヒビター活性、アレルギー活性をもつこと、構造上は3個の相同ドメインがタンデムに連なり、各ドメイン内は3つのS-S結合で架橋されていることなどが明らかにされている。一方、ダチョウ卵オボムコイドについては、C末端側54残基のアミノ酸配列が明らかにされ、鶏卵のオボムコイドと比較して約4分の1に置換があることがわかっているが、それ以外のオボムコイド分子の性状についての報告はない。

(5) 以上のように、家畜遺伝子資源の多様性を畜産食品に活用するという観点からは、ダチョウ卵オボアルブミン、オボムコイドの利用特性およびタンパク質科学的性質に関する研究はきわめて限定されており、鶏卵との比較研究が必須となっている。

2. 研究の目的

(1) ダチョウ卵からオボアルブミン様タンパク質およびオボムコイド様タンパク質を鶏卵の対応するタンパク質の調製法に準じて精製し、鶏卵タンパク質に特異的な抗体を利用して鶏卵オボアルブミンおよびオボムコイドとの免疫学的交差性を調べ、その結果に基づいて、それぞれがオーソログであることを同定する。

(2) 精製ダチョウ卵オボアルブミンおよびオボムコイドの利用特性として加熱変性・凝固性、泡立ち性およびアレルギー性を明らかにし、鶏卵の対応するタンパク質とそれらの特性について比較する。

(3) 精製ダチョウ卵オボアルブミンおよびオボムコイドのポリペプチド組成における不均一性の有無および糖鎖修飾やリン酸化など翻訳後修飾を明らかにし、鶏卵オボアルブミン、オボムコイドと比較する。

(4) 精製ダチョウ卵オボアルブミンおよびオボムコイドのペプチドマッピング分析を行い、一部については精製ペプチドを得、アレルギー性部位や一部アミノ酸配列を明らかにし、それぞれの鶏卵たんぱく質のアミノ酸配列と比較する。

3. 研究の方法

(1) ダチョウ卵からオボアルブミン様タンパク質を硫酸沈殿法により粗分画し、さらに DEAE イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。オボムコイド様タンパク質は、トリクロロ酢酸・アセトン沈殿法により粗分画し、さらに DEAE イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。免疫学的交差性は、市販の抗鶏卵オボアルブミン・ポリクローナル抗体 2 種、供与を受けた 8 種の抗鶏卵オボアルブミン・モノクローナル抗体および自作の抗鶏卵オボムコイド・モノクローナル抗体 8 種を用い、ドットプロット法および非競合 ELISA により調べた。

(2) 電気泳動分析では、変性剤を添加しない native-PAGE および還元剤・SDS 存在下での SDS-PAGE を行った。電気泳動後の膜転写には、セミドライプロットング装置を使用し、PVDF 膜を用いた。

(3) PVDF 膜上のダチョウ卵オボアルブミンに相当するバンドについて、還元ピリジルエチル化後にトリプシン分解を行い、さらに溶出分解物を逆相 HPLC 分取し、得られた主要ピークについて気相シーケンサーで配列分析を行った。PVDF 膜上のダチョウ卵オボムコイドに相当するバンドについては、還元アルキル化後、トリプシン消化を行い、得られた消化断片について質量分析した。

(4) ダチョウ卵オボムコイドに陽性の抗鶏卵オボムコイド・モノクローナル抗体を用いたウェスタンプロットングおよび競合的 ELISA は常法に従って行った。

(5) オボアルブミンの断片化に適切な酵素の検索では、至適 pH や分解特性の異なる市販の食品用プロテアーゼ 9 種を使用し、反応産物を経時的に SDS-PAGE 分析した。鶏卵オボアルブミンについても同様に分析し比較した。

(6) ダチョウ卵オボアルブミンおよびダチョウ卵オボムコイドの糖鎖による翻訳後修飾を解析するためレクチン結合性を調べた。レクチンとしてはビオチン化された ConA、WGA はじめ 14 種のレクチンを使用した。PVDF 膜上の両タンパク質それぞれとビオチン化

レクチンを反応させたのち、アビジン-HRP 酵素，基質の順に加えレクチン反応性を膜上で可視化した。

(7) 鶏卵アレルゲン検出には、抗鶏卵卵白タンパク質ポリクローナル抗体を用いたイムノクロマト法によるキット（A社製）およびモノクローナル抗体を利用したB社製のものを利用し、検出限界まで希釈した卵白を試料とした。

(8) シフォンケーキは、卵白濃度および卵黄濃度の調整は行わず、卵黄，卵白の比率を一定とした。その他の材料の量的な比も鶏卵，ダチョウ卵とも同一としてミックスを調製した。市販の紙型を利用して鶏卵では170、ダチョウ卵では180、共に25分焼成した。

4. 研究成果

(1) 鶏卵オボアルブミンおよびオボムコイドの調製法に準じてダチョウ（ダチョウ卵）卵白から相同のタンパク質を得た。ダチョウ卵オボアルブミン様タンパク質は、卵白タンパク質の大半を占め、抗鶏卵オボアルブミン・モノクローナル抗体の一つと陽性反応を示したことから、ダチョウ卵オボアルブミンと同定した。ただし、市販の抗鶏卵オボアルブミン・ポリクローナル抗体2種および7種の抗鶏卵オボアルブミン・モノクローナル抗体とは反応が見られず、両オボアルブミン間の免疫学的交差性は低いと推察された。一方、オボムコイド様タンパク質も抗鶏卵オボムコイド・モノクローナル抗体と陽性反応を示したため、ダチョウ卵オボムコイドと同定した。

(2) 鶏卵オボアルブミンが、結合リン酸基が2、1および0のA1、A2およびA3から構成され、電気泳動(native-PAGE)で三成分が認められたのに対し、ダチョウ卵オボアルブミンは、二成分が認められた。一方、ダチョウ卵オボムコイドは、鶏卵と同様、電気的性質に幅のある不均一性の高いタンパク質であった。SDS-電気泳動分析では、鶏卵オボアルブミンが分子量約45,000であるのに対し、ダチョウ卵オボアルブミンは約79,000と算出され、顕著な差が認められた。一方、鶏卵オボムコイドでは、結合糖鎖の不均一性に起因して、分子量約32,000から38,000に分布する幅のあるバンドとしてSDS-電気泳動で検出されるが、ダチョウ卵オボムコイドでは、分子量約30,000から38,000の間に明確に分離される三成分（大きい順にダチョウ卵オボムコイド1、ダチョウ卵オボムコイド2、ダチョウ卵オボムコイド3）が認められ、その量比は約3:2:1程度であった。

(3) 膜転写したダチョウ卵オボアルブミンから得たトリプシン消化物のHPLC分画では、7つの主要ペプチド断片を得た。そのうち5断片についてアミノ酸配列を決定したところ、1断片は、全く解析できなかった。鶏卵オボアルブミンではN末端グリシンがアセチル化されており、この断片がN末端の可能性が示唆された。残る4断片については4から8残基の配列を明らかにした。ニワトリオボアルブミンの配列(1-385残基)に基づきアラインメントを行ったところ、判明28残基中23残基が同一であった。いずれもニワトリの185残基以降のC末端側に位置していた。以上のように、鶏卵オボアルブミンのN末端側半分の領域に相当すると思われる断片が全く得られなかったことから、鶏卵オボアルブミンに比べて数万も分子量が大きい構造的な理由については現在なお不明のままである。今後、トリプシン以外の断片化酵素により得たペプチドについて配列決定を進める必要がある。これまで得た内部配列を利用して、塩基配列からのシーケンシングも検討している。

(4) ダチョウ卵オボムコイドのSDS-電気泳動で明確に分離される3成分を、膜転写により分離後、それぞれのトリプシン分解フラグメントの質量分析を行った結果、ダチョウ卵オボムコイド2、ダチョウ卵オボムコイド3とともに、塩基配列に基づくダチョウ卵オボムコイドのアミノ酸配列(本課題の成果外・協力研究者の未発表データ)の90%以上をカバーする配列をもつことが明らかになった。すなわち、ダチョウ卵オボムコイド2とダチョウ卵オボムコイド3はポリペプチドレベルでは相同であり、翻訳後修飾により大きな分子量の差が生まれるものと推察された。しかし、最も分子量の大きいダチョウ卵オボムコイド1は、60%程の相同性しかなく、ダチョウ卵オボムコイド2、ダチョウ卵オボムコイド3との差異についての原因は不明のままとなった。なお、ダチョウ卵オボムコイドに陽性の抗鶏卵オボムコイド・モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングでは、3画分とも抗体染色され、競合的酵素免疫測定法の結果においても、鶏卵とダチョウ卵のオボムコイドには構造的差異が少ないことが示唆された。なお、これらダチョウ卵オボムコイド三成分の分離に、各種クロマトグラフィーを駆使したが単離精製はできなかった。今後の検討が必要である。

(5) ダチョウ卵オボアルブミンのアミノ酸配列分析過程でダチョウ卵オボアルブミンが未変性・未修飾だと、鶏卵オボアルブミンに比較して顕著にトリプシン抵抗性であることが分かった。今後、機能性ペプチドを得る

上で障害となることが予測されたため、トリプシンインヒビター活性の測定および適度な断片化に適したプロテアーゼの検索を行った。その結果、トリプシンインヒビター活性はなかったが、特異性の異なる9種のプロテアーゼにも抵抗性が認められた。しかし、希薄な界面活性剤存在下では、消化が著しく促進されたことから、今後、ダチョウ卵オボアルブミン由来の機能性ペプチドを得るためにはプロテアーゼ処理前に何らかの変性処理を行う必要があると思われる。

(6)ダチョウ卵オボアルブミンおよびダチョウ卵オボムコイドに対するレクチン結合性(14種)を調べた結果、ダチョウ卵オボアルブミンはGal/GalNAcに特異性をもつ数種のレクチンと反応したが、ダチョウ卵オボムコイドでは、GlcNAc/Neu5Acに特異性のあるWGAレクチンのみが陽性であった。鶏卵の場合と同様、わずかな電気的性質の差に起因するダチョウ卵オボアルブミンへのダチョウ卵オボムコイドのわずかな混入、逆にダチョウ卵オボムコイドへのオボアルブミンのわずかな混入は、精密な熱安定性、アレルギー性の測定に従来の大きな障害となっていたが、これらレクチン利用による混入防止が期待できた。

(7)ダチョウ卵白のアレルゲン性に関する検討を始めるにあたり、まず鶏卵タンパク質用市販アレルゲン検出キット(A、Bの2種)を用いて実験を行った。ポリクローナル抗体を使用したAキットでは、鶏卵卵白との免疫学的交差性が示され、ダチョウ卵白の抗原性は約1/2500と算出された。本研究で示されたダチョウ卵と鶏卵のオボムコイドにおける免疫学的相同性およびオボアルブミンでの免疫学的交差性の低さを考慮し、また、本キットの抗体が、抗鶏卵オボアルブミン抗体や抗オボムコイド抗体等の混合物であることを考慮すると、得られた交差性は、オボムコイドの寄与によるものと考えられた。一方、モノクローナル抗体を用いたBキットでは抗原性は認められなかった。当キットには鶏卵、ダチョウ卵に共通したエピトープに特異性をもつ抗体が含まれないためと思われる。

(8)ダチョウ卵タンパク質の利用特性を鶏卵のものと比較するため、シフォンケーキを作った。卵白・卵黄の比率、タンパク質濃度、粘度等が異なり、同一条件での比較は困難であったが、各種検討して適正な条件をほぼ確立した。ただし、焼成温度だけは、鶏卵より10℃高めに設定する必要がある。ダチョウ卵タンパク質の加熱安定性が大きく影響していることが確かめられた。得られたケーキの官能評価結果では、大きな差は認められて

いない。物性についてはなお解析方法を検討中である。

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)

[雑誌論文](計1件)
水町功子、青木玲二、栗崎純一、ダチョウ卵に関する食品科学的研究の現状と展望、日本ダチョウ・走鳥類研究会誌、査読無、10号、2009、1-11

[学会発表](計0件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

栗崎 純一 (KURISAKI JUN-ICHI)
十字学園女子大学・人間生活学部・教授
研究者番号：60111481

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：