

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19580134

研究課題名（和文）

可食性バイオハイブリッド創出による食品タンパク質の高機能化

研究課題名（英文）

Functional Improvements of food proteins by preparing edible bio-conjugates.

研究代表者

服部 誠 (HATTORI MAKOTO)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・准教授

研究者番号：40221501

研究成果の概要：

牛乳中の主要な乳清タンパク質である β -ラクトグロブリン (β -LG) は、必須アミノ酸を豊富に含む良質のタンパク質であり、乳化性、ゲル化性、気泡性といった機能特性に優れ、有用な疎水性のリガンド結合能を有しており、優れた食品素材となる可能性を有している。しかしながら、塩存在下、酸性条件下で乳化性が低下すること、さらに強力なアレルギー性を有することから、その利用には請願がある。そこで、本研究では、 β -LG の機能改変を目的として、塩基性糖質とのバイオハイブリッドを作出した。

塩基性糖質としては、ポリリシン-デキストラン(β -PL-Dex)ハイブリッドを調製し用いた。

β -PL-Dex ハイブリッドの調製は、相対湿度 79% の条件でメイラード反応させることにより行った。陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製 β -PL-Dex を得た。その組成を、フェノール-硫酸法ならびにトリニトロベンゼンスルホン酸法(TNBS 法)により調べた結果、 β -PL:Dex = 1:1 であった。

次に、微生物由来トランスグルタミナーゼ(MTGase)(アクティバ TG-K (味の素株式会社製))を用い、37℃ で酵素反応を行い、 β -LG-PL-Dex ハイブリッドを作出した。ハイブリッドは陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製を行った。 β -LG:PL-Dex = 1:1 のハイブリッドが得られた。

得られた β -LG-PL-Dex ハイブリッドの機能として、乳化性を濁度法により行った。その結果、酸性条件下、塩存在下といった β -LG の乳化に不利な条件で、乳化性を改善することができた。

次に、免疫原性の評価を行った。免疫は、BALB/c マウスを用い、Freund のアジュバントとともに腹腔内投与により行った。その結果、PL-Dex との複合体化により、新たな免疫原性を生ずることなく、 β -LG の免疫原性を効果的に低減化できることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
平成 20 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品タンパク質、バイオハイブリッド、機能改変、乳化性、免疫原性

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は、生命に直接関与するだけでなく、重要な食品素材として幅広く利用されてきた。しかし、近年、食品素材としてのタンパク質に求められる特性は、高度化、多様化してきており、新たな機能の開発、改変、高機能化が強く望まれている。このような食品タンパク質の高機能化あるいは機能改変のためには、天然には存在しない、新規の糖質結合型バイオハイブリッドの創出が有効な方策となると考えられる。本研究においては、メイラード反応とトランスグルタミナーゼを用いた酵素反応により、実際の食品に应用可能な、糖鎖を導入した高機能化バイオハイブリッドを創製し、乳化性などの機能特性の向上を達成するとともに、低アレルゲン化を同時に達成すること、これら多面的な機能改変の根源となるバイオハイブリッド分子の構造機能相関を明らかにすることを目的としている。

本研究においては、食品タンパク質として、牛乳中の主要な乳清タンパク質である β -ラクトグロブリン (β -LG) を機能改変のターゲットとして用いる。 β -LG は、栄養学的には必須アミノ酸をバランスよく含む良質のタンパク質であり、また、レチノール、脂肪酸などの有用な疎水性生理活性物質の結合機能、優れた機能特性 (乳化性、気泡性、ゲル化性)、抗酸化性を有することから、優れた食品素材となる可能性を有している。しかしながら、 β -LG は最も強力なアレルゲンの1つであり、その利用には大きな制限がある。近年、アレルギー症状に苦しむ人の数は急増中であり、症状の軽いアレルギーまで含めると日本人の3人に1人がアレルギー症状を示す、と発表されるような重大な問題となっており、その解決策の確立が、社会的にも強く望まれている。したがって、 β -LG を人為的に機能改変し、機能特性の改善を図るとともに、低アレルゲン化を達成することには重大な意義があると考えられる。

2. 研究の目的

我々は、従来の研究において、 β -LG に糖質をハイブリッド化することにより、タンパク質のネイティブ構造を維持した状態で、レチノール結合能の維持、熱安定性の向上、乳化性の改善、免疫原性の低減化といった多面的な機能改変を同時に達成することができ

ることを実証してきた。また、特に免疫学的性質については、 β -LG のエピトープ部位に関する詳細な情報を得ることができ、エピトープの遮蔽効果を高めるような糖質とのハイブリッド化が低アレルゲン化に有効であること、多糖のみならず、重合度4程度のオリゴ糖を用いたハイブリッド化においても低アレルゲン化が可能であることを明らかにすることができた。さらに、ハイブリッド中の糖鎖結合部位を明らかにしたことにより、いかなる部位に糖鎖を導入すれば、効果的な機能改変が達成できるのか、ということについての基盤を構築することができた。これまでの研究を通じて、新たに得られたバイオハイブリッドの構造、機能に関する評価方法についても様々な手法を確立することができた。本研究においては、実際の食品に应用可能なバイオハイブリッドの創出を目指す。

3. 研究の方法

1) β -LG の調製

本研究で用いた β -LG は遺伝変異体 A のみを含む固乳より Armstrong らの方法により調製した粗 β -LG を使用した。粗 β -LG は、DEAE-Sepharose Fast Flow (3.0 ID X 40 cm, Amersham Biosciences) を用いたイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。すなわち、0.05 N イミダゾール緩衝液 (pH 6.7) で平衡化したカラムに、粗 β -LG 500 mg/10 ml を負荷し、0.05 N イミダゾール緩衝液 (pH 6.7) で 0~0.5 M NaCl リニアグラジエント溶出により行った。流速は 3 ml/min、検出は 280 nm の吸光度で行った。 β -LG の純度検出はポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE; ゲル濃度 7.5 %, CBB 染色) により行った。

2) メイラード反応を用いたポリリシン - 多糖ハイブリッドの創出:

トランスグルタミナーゼ反応のアシル受容体である塩基性多糖として、ポリリシン (PL, 分子量 12,000) とデキストラン (Dex, 分子量 10,000) を Dex:PL (重量比) = 10:1 で、60 °C でメイラード反応させ、PL-Dex ハイブリッドを調製した。精製は陽イオン交換クロマトグラフィーにより行った。Toyopearl CM-650S (2.5 ID X 20 cm, Tosoh) を 0.1 M リン酸緩衝

液(pH7.0)で平衡化した後、粗 PL-T10 (500 mg / 10 ml)を負荷し、カラムの3倍量の0.1 M リン酸緩衝液(pH7.0)でカラムに未吸着の未反応 T10 を溶出した。その後、0.1 M リン酸緩衝液(pH7.0)で 0 - 2.5 M NaCl リニアグラジエント溶出によりカラムに吸着した PL-T10 および未反応 PL の溶出を行った。流速は 3 ml / min、検出は T10 をフェノール-硫酸法により 490 nm の吸光度で、PL を 230 nm の吸光度で行った。回収した精製 PL-T10 は、蒸留水に対して透析後、凍結乾燥した。

3) トランスグルタミナーゼの反応を用いた可食性 -LG-塩基性多糖ハイブリッドの創出：
微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTGase; microbial transglutaminase; EC 2. 3. 2. 13)は微生物由来のアクティバ TG-K (Ajinomoto Co.)を用いた。アクティバ TG-K はトランスグルタミナーゼを 1%、乳酸カルシウム 75%、デキストリン他を 24% 含むトランスグルタミナーゼ製剤である。2 g のアクティバ TG-K を 10 ml の 0.1 M Tris/HCl 緩衝液(pH 7.5)に溶解し、18,000 rpm、30 分、4 で遠心分離し、上清を 0.1 M Tris/HCl 緩衝液(pH 7.5)に対し、4 、一晚透析し TGase 製剤より乳酸カルシウムなどの不純物を除去し、得られた溶液を 0.2 %MTGase 溶液として酵素反応に用いた。2) で調製した精製 PL-Dex をトランスグルタミナーゼ反応のアシル受容体、-LG をアシル供与体として、酵素反応に供した。0.1 M Tris/HCl 緩衝液(pH 7.5) 1 ml 中に、 LG 5 mg と、PL-T10 複合体は LG の Gln 残基 : PL-T10 のアミノ基(モル比) = 1 : 25 となるように 17.5 mg を溶解した。MTGase は 2,000 units/g protein となるよう加え、酵素反応を開始した。酵素反応は、37 で 5 日間行った。

反応性生物中には、未反応の -LG、未反応の PL-T10、MTGase および -LG-PL-T10 複合体が含まれていると考えられた。そのため、未反応の -LG、未反応の PL-T10 および MTGase を除去するために、Toyopearl HW-55 Fine カラム(2.5 ID X 50 cm、Tosoh)を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより精製を行った。0.2 M NaCl を含む 33 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)で平衡化したカラムに、反応性生物を負荷し、流速 1 ml/min で溶出させた。5 ml ずつフラクションコレクターで分取し、タンパク質、ペプチドの測定を 230 nm の吸光度、糖の測定をフェノール硫酸法により 490 nm の吸光度で検出した。回収した精製 -LG-PL-T10 は、蒸留水に対して透析後、凍結乾燥した。

複合体の精製確認は、SDS-PAGE により行った。SDS-PAGE は Laemmli の方法に従い、分離ゲル 15%、濃縮ゲル 4%で行った。泳動

はゲル 1 枚あたり 10 mA の定電流で行い、タンパク質は CBB 染色により、糖は PAS 染色により検出した。

3) 可食性 -LG-塩基性多糖ハイブリッドの構造の解析

可食性 -LG-塩基性多糖ハイブリッド中のタンパク質と糖の組成については、化学分析により明らかにした。タンパク質部分の全体的な構造についての知見を得るため、自然蛍光の測定)による解析を行った。また、タンパク質の局所的な微細高次構造について、-LG 特異的モノクローナル抗体(mAb)を用いた酵素免疫測定法 (ELISA 法) により解析した。

4) 可食性 -LG-塩基性多糖ハイブリッドのレチノール結合能の解析

可食性 -LG-塩基性多糖ハイブリッドの機能のうち、レチノール結合能の測定については、蛍光滴定法により行った。レチノールは -LG と結合すると蛍光を発することが知られている。

試料を PBS で希釈し、タンパク質濃度として 0.1 mg/mL 溶液を 2 mL 以上用意した。

レチノール(Sigma) はエタノールに溶解した。試料溶液 2 mL を蛍光測定用セルに入れ、1 回の測定につき 1.56×10^{-4} M のレチノールのエタノール溶液を 5 μ L 添加し、10 秒間混合し、50 秒静置の後、分光蛍光光度計 (RF-5300PC, Shimadzu)を用いて 330 nm で励起の後 470 nm の蛍光を測定し、その 10 秒後に再びレチノールを添加し、蛍光強度が低下するところで終了した。他の試料は -LG と同じ回数レチノール添加と測定を繰り返した。

5) 可食性 -LG-塩基性多糖ハイブリッドの乳化性の解析

可食性 -LG-塩基性多糖ハイブリッドの乳化性に対する pH の影響を調べた。まず、試料をタンパク質濃度が 0.1%(w/v)となるように、McIlvaine 緩衝液(pH 3.0~7.0)にそれぞれ溶解した。この溶液 2 mL を水相とし、コーン油 0.5 mL を油相としてねじ口試験管 (18 ID X 85 mm)に分取した。また、乳化性に対する塩濃度の影響は一般的に中性の食品が多いため、pH 6.0 の緩衝液の塩濃度 0.1、0.2、0.5%の条件で乳化性を測定し、他の条件は pH の影響を測定した場合と同様に行った。乳化は、径 7 mm のジェネレーターシャフトを取り付けたポリトロンを使用し、24,000 rpm で 1 分間ホモジナイズして水中油滴型(O/W)エマルジョンを調整した。

乳化性の評価は濁度法(83)により行った。すなわち、調製したエマルジョンの水相の底部からサンプルを 50 μ L ずつ経時的にサン

ブリッド(乳化後0分、10分、30分、60分、120分)し、0.1% SDS 溶液で100倍希釈した溶液の500 nmの吸光度を測定した。乳化安定性については、乳化後30分の A_{500} を算出して評価し、乳化直後の乳化活性(emulsifying activity index; EAI)は以下の式に従って求めた。

$$EAI = 2T / \Phi C$$

$T = 2.3 A / L$ ($A = A_{500}$, $L = 10^{-2}$ m (Light path))

$\Phi = 0.2$ (oil phase volume fraction)

$C =$ concentration of soluble protein (0.1% = 10^3 g/m³)

5) 糖鎖結合型 -LG ハイブリッドの免疫原性の解析

可食性 -LG-塩基性多糖ハイブリッドの免疫原性を解析するため、BALB/c マウスを用い、以下の方法で免疫した。

まず、1群6頭のマウスを周囲の環境に順応させるため、1週間予備飼育した。免疫応答を非特異的に刺激し、長時間にわたり抗原を注入部位に局在させ少しずつ漏出させ、また結核死菌体によりマクロファージなどの細胞を効果的に注入部位に引き付けるために、初回免疫は、タンパク質として100 μ gの抗原/PBS 溶液を同量のフロイント完全アジュバント(Freund's complete adjuvant (FCA), Difco Laboratories)とともに乳化したエマルジョンを、1頭あたり100 μ lを腹腔内注射した。初回免疫より14日後、同一抗原溶液をフロイントの不完全アジュバント(Freund's incomplete adjuvant (FIA), Difco Laboratories)とともに乳化したエマルジョンを、追加免疫として1頭あたり100 μ l腹腔内注射した。追加免疫より7日後、心臓より採血を行った。

得られた抗血清中の特異抗体量を非競合法 ELISA により測定し、ハイブリッド化による免疫原性の低減化を解析した。

4. 研究成果

-LGにハイブリッド化させる塩基性糖質としては、ポリリシン デキストラン(-PL-Dex)ハイブリッドを調製し用いた。-PL-Dex ハイブリッドの調製は、相対湿度79%の条件でメイラード反応させることにより行った。陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製 -PL-Dex を得た。その組成を、フェノール-硫酸法ならびにトリニトロベンゼンスルホン酸法(TNBS 法)により調べた結果、-PL:Dex = 1:1であった。

次に、微生物由来トランスグルタミナーゼ(MTGase)(アクティバ TG-K (Ajinomoto Co.))を用い、37 °Cで酵素反応を行い、-LG-PL-Dex ハイブリッドを作出した。ハイ

ブリッドは陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製を行った(Fig. 1)。

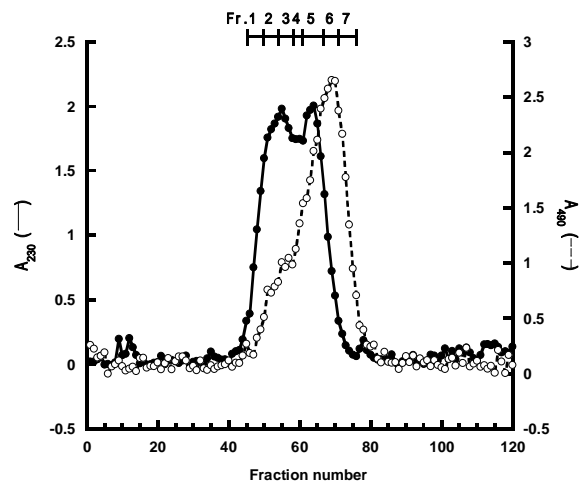


Fig. 1. Size-exclusion chromatographic Patterns of the -LG-PL-Dex Conjugate. Column, Toyopearl HW-55 Fine (2.5 ID x 50 cm); eluent, 33 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.2 M NaCl; flow rate, 1 ml/min, detection; absorbance at 230 nm and 490 nm after phenol-sulfuric acid method.

-LG:PL-Dex = 1:1 のハイブリッドが得られた。

次に、得られた -LG-PL-T10 ハイブリッドの化学分析を行った。複合体の -LG:糖の構成をアミノ酸分析とフェノール硫酸法によって測定し、水分含量を差し引いた値をPL含量とした。その結果、-LG:PL:T10 = 1:1:1であった。

さらに、自然蛍光の測定、レチノール結合能の測定、モノクローナル抗体(mAb)を用いた競合法 ELISA により、ハイブリッドの構造について詳細に検討を行った。自然蛍光測定の結果、ハイブリッド中の Trp 残基周辺に構造変化は認められなかった。また、糖鎖によって Trp 残基周辺が覆われていることが明らかとなった。レチノール結合能を蛍光滴定法により測定した結果、ハイブリッドは -LG の約 60%のレチノール結合能を維持していた。また、 K_d 値に関しては、複合体は -LG と同程度であった。このことから、ハイブリッドにおいてはレチノールが結合しやすいが離れやすいという、レチノールを保持する能力が低下したものの、レチノール結合に関与する領域の構造には大きな変化がないと考えられた。mAb を用いた競合法 ELISA により、ハイブリッドの局所構造変化を調べた結果、mAb 61B4 が認識する

125Thr-135Lys (α -helix)周辺の構造はネイティブな構造を維持していたが、mAb21B3と31A4が認識する15Val-29Ile (β -sheet, random coil)および8Lys-19Trp (random coil, α -helix)周辺の構造は若干変化しており、糖鎖が結合して構造変化が起こったと考えられた。

以上の構造解析の結果から、-LG-PL-T10ハイブリッドは、ネイティブ-LGの高次構造をほぼ維持したまま、分子表面がPL-T10複合体によって覆われた構造になっていると考えられた。

次に、得られた-LG-PL-Dexハイブリッドの機能として、乳化性を濁度法により行った(Fig. 2, Fig. 3)。

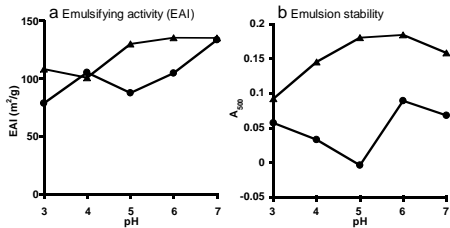


Fig. 2. Effect of pH Value on the Emulsifying Ability of the -LG-PL-Dex Conjugate.

The emulsifying ability was evaluated by the turbidity of the diluted emulsion 0 min after emulsification (a) and 30 min after emulsification (b) according to the method of Pearce and Kinsella. , -LG; , -LG-PL-Dex.

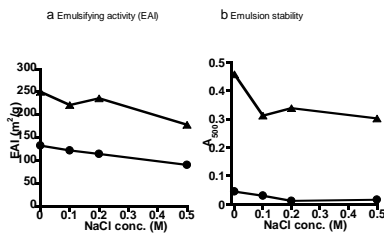


Fig. 3. Effect of Salt Concentration on the Emulsifying Ability of the -LG-PL-Dex Conjugate.

The emulsifying ability was evaluated by the turbidity of the diluted emulsion 0 min after emulsification (a) and 30 min after emulsification (b) according to the method of Pearce and Kinsella. Emulsification was carried out at pH 3.0. , -LG; , -LG-PL-Dex.

その結果、-LGの乳化に不利な酸性条件下(Fig. 2)、ならびに、塩存在下(Fig. 3)で、

乳化性を改善することができた。

次に、免疫原性の評価を行った。免疫は、BALB/cマウスを用い、Freundのアジュバントとともに腹腔内投与により行った。得られた抗血清中の抗体量を非競合法ELISAにより定量した。その結果、-LG-PL-T10ハイブリッドで免疫した場合、-LGで免疫した場合に比較して、特異抗体量が85.7%に低下した。PL-Dexとの複合体化により、-LGの免疫原性を効果的に低減化できることが明らかとなった。

本研究では、架橋剤を用いずに、穏やかな反応である、メイラード反応とトランスグルタミナーゼを用いた酵素反応によるハイブリッド化法を確立した。本研究の成果は、実際の食品への応用が可能なバイオハイブリッドの調製法の確立に貢献するものであると考えられる。

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)

Ikeuchi, T.; Aoki, T.; Yoshida, T.; Takahashi, K.; Hattori, M., Functional improvements to b-lactoglobulin by preparing an edible conjugate with cationic saccharide using microbial transglutaminase (MTGase). Biosci. Biotechnol. Biochem. 2008, 72 (5), 1227-1234. (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 誠 (HATTORI MAKOTO)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・准教授

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

