

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 林 葉子

題 目

乾燥加熱を用いた卵白タンパク質のリン酸化とその利用  
に関する研究  
(Studies on Phosphorylation of Egg White Protein by Dry-Heating  
and Its Application)

卵白タンパク質(EWP)は食品加工素材として、広範囲に利用されている。更なる利用のために、その機能特性の改善が望まれている。リン酸化はEWPの機能特性を著しく向上させることが知られている。さらに、タンパク質のリン酸基はリン酸カルシウムを可溶化することができるので、リン酸化によってカルシウム吸収促進効果が期待できる。これまでの研究で、EWPやその主要成分であるオボアルブミン(OVA)をピロリン酸塩存在下での乾燥加熱によりリン酸化すると、いくつかの機能特性が改善されることが明らかになっている。本研究では、先ずリン酸化により導入されたリン酸基とタンパク質との結合様式を明らかにすると共に、リン酸化によるEWPの更なる機能特性の改善について追求し、以下の結果を得た。

1. 種々のタンパク質をリン酸化し、そのリン酸結合の特徴を明らかにした。塩基性タンパク質は酸性タンパク質よりリン酸化されやすく、その中でもポリL-リジン(PLy)とリゾチーム(Lz)は高度にリン酸化され、リン酸化PLyのリン含量は10.2%に達し、N-P結合の存在が示唆された。ホスファターゼや酸・アルカリによる脱リンは、リン酸化タンパク質の種類によって異なっていた。<sup>31</sup>P NMRの結果から、リン酸基の結合様式はタンパク質の種類により異なることがわかった。導入されたリン酸基は熱に安定で、120°Cで加熱しても脱リンしなかった。リン酸化OVA(PP-OVA)とリン酸化Lzのトリプシン分解物の質量分析によりリン酸化ペプチドを同定し、リン酸化されたアミノ酸残基を推定した。
2. EWPの第二の主要成分であるオボトランスフェリン(OTf)をリン酸化し、その機能特性を調べた。OTfもOVAやEWPと同程度にリン酸化され、熱安定性が改善されたが、70°C以上の加熱ではリン酸化OTf(PP-OTf)も不溶化が著しかった。しかし、PP-OTfにPP-OVAを混合して加熱すると、OTfの不溶化が抑制された。また、OTfのリン酸カルシウム可溶化能はリン酸化により向上したが、乳化性の向上は僅かであった。
3. EWPの泡立ち性に及ぼすリン酸化や砂糖添加の影響について調べた。通気法によって調製した泡の電気伝導度から評価したEWPの起泡力と泡の安定性は、リン酸化によって有意に高くなった。攪拌法によって調製した泡の比重、オーバーラン、顕微鏡写真、および離水量の比較から、リン酸化によって起泡力や泡の安定性が高まり、リン酸化はEWPの泡立ち性を著しく向上させることが明らかになった。砂糖の添加は、オーバーランを低下させたものの、より細かい泡粒子を形成し、泡からの離水量を減少させた。また、砂糖を添加したPP-EWPの泡は泡立て15分後においても離水は認められず、泡の安定性をさらに高める効果があった。

以上の結果から、ピロリン酸塩存在下における乾燥加熱によるリン酸化は、EWPの機能特性を著しく高めることが明らかとなり、実用化の可能性が示唆された。

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	Yoko Hayashi
題 目	<b>Studies on Phosphorylation of Egg White Protein by Dry-Heating and Its Application</b> (乾燥加熱を用いた卵白タンパク質のリン酸化とその利用に関する研究)

Egg white protein (EWP) is extensively utilized as a food ingredient in the food industry. For further industrial uses, it is needed to improve its functional properties. One of useful methods for improving the functional properties of food proteins is phosphorylation. It is well known that solubility, emulsifying property, water solubility, gelling property, and heat stability of EWP are markedly improved by phosphorylation. Furthermore, phosphate groups may participate in enhancement of calcium absorption in small intestine because phosphate groups have been proven to solubilize calcium phosphate. It has been already reported that EWP and ovalbumin (OVA) were phosphorylated by dry-heating in the presence of pyrophosphate and that their functional properties were markedly improved. In the present study, the phosphate bonds introduced to various proteins by dry-heating in the presence of pyrophosphate were characterized, and further studies on the improvement of functional properties of EWP by phosphorylation were carried out. The results are follows.

1. Various proteins were phosphorylated by dry-heating in the presence of pyrophosphate, and phosphate bonds were characterized. The basic proteins were more highly phosphorylated than acidic proteins. The phosphorus content of phosphorylated poly-L-lysine was 10.2%, suggesting the introduction of the N-P bond. The degrees of dephosphorylation by phosphatase, acid or alkali were different among protein samples. The phosphate bonds in all phosphorylated samples were stable during heating at 120 °C. The <sup>31</sup>P NMR spectral data suggested that different types of phosphate bonds were introduced. Some phosphorylated typtic peptides from phosphorylated OVA (PP-OVA) and lysozyme were detected by MALDI-TOF mass spectrometry.
2. OTf, the second major constituent of EWP, was phosphorylated by dry-heating in the presence of pyrophosphate (PP-OTf), and some functional properties were examined. The stability against heat-induced insolubilization of OTf was somewhat improved by phosphorylation, PP-OTf was insolubilized when it was heated at 70 °C. However, heat-induced insolubilization of PP-OTf was reduced when it was heated with PP-OVA. The calcium phosphate-solubilizing ability of PP-OTf was enhanced by phosphorylation. The emulsifying property of OTf was also somewhat improved.
3. The effects of phosphorylation on the foaming property of EWP were examined. The foaming power and stability of phosphorylated EWP (PP-EWP) estimated from the conductivity of the foams prepared by the bubbling method was significantly than that of native EWP (N-EWP). The data of the specific gravity, overrun, drainage volume and the microscopic observation of the foams prepared by the whipping method also demonstrated that phosphorylation of EWP markedly improved its foaming properties. The sugar addition made the foams from both N- and PP-EWP fine and uniform in their size, and it was more effective in N-EWP than in PP-EWP, although sugar addition lowered overrun of N- and PP-EWP. The drainage volume was more lowered in the foams from PP-EWP than in those from N-EWP by sugar addition. There were no drainage from the foams of PP-EWP even 15 min after foaming.

These results demonstrated that phosphorylation by dry-heating in the presence of pyrophosphate markedly improved the functional properties of EWP, and suggested a possibility of practical use of this method in the food industry.

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	林 葉 子
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 杉元 康志
	副査 鹿児島大学 准教授 イブラヒム ヒッサム ラドワン
	副査 佐賀大学 教授 藤田 修二
	副査 佐賀大学 教授 光富 勝
	副査 鹿児島大学 教授 八木 史郎
審査協力者	鹿児島大学 名誉教授 青木 孝良
題 目	乾燥加熱を用いた卵白タンパク質のリン酸化とその利用に関する研究 (Studies on Phosphorylation of Egg White Protein by Dry-Heating and Its Application)

卵白タンパク質（EWP）は機能性に富んでおり、食品加工素材としての用途は広く、更なる用途拡大のためには乳化性、泡立ち性、ゲル形成性等の機能特性の向上を図る必要がある。一方、最近では、食品に生体調節機能（第三次機能）を付与することも重要な課題になっており、EWPにも機能付与が期待されている。

EWPをはじめ食品タンパク質をリン酸化すると、乳化性、ゲル形成性、熱安定性等の機能特性が著しく向上することが知られている。また、リン酸化したタンパク質はカルシウム吸収促進効果が期待できる。最近の研究により、食品タンパク質やペプチドのリン酸基は免疫調節機能等の関与が明らかにされているので、リン酸化によりこれらの機能向上が図られる可能性がある。食品タンパク質のリン酸化は化学修飾法および酵素法による方法で行われているが、いずれの方法も安全性やコスト面で問題を抱えており、安全性が高く、安価な方法の開発が望まれる。ピロリン酸を使った乾燥加熱法はこの問題を解決する方法として期待されている。

これまでの研究において EWP はピロリン酸塩存在下での乾燥加熱により効果的にリン酸化され、乳化性、ゲル形成特性などの食品加工特性が向上することが報告されている。本研究では、ピロリン酸塩を用いた乾燥加熱法による EWP の機能特性の向上とその利用を図る目的で研究を進め、以下の点を明らかにした。

1. 卵白タンパク質を含むいくつかのタンパク質のリン酸化を試み、そのリン酸化結合の様式を検討した。塩基性タンパク質は酸性タンパク質よりリン酸化されやすく、ポリ L-リジン (PLy) と リゾチーム (Lz) は高度にリン酸化され、リン酸化 PLy のリン含量は 10.2% に達し、N-P 結合の存在が示唆された。ホスファターゼや酸、アルカリによる脱リン化の程度は、リン酸化したタンパク質の種類によって異なっており、<sup>31</sup>P NMR の解析から、リン酸基の結合様式はタンパク質の種類によって異なることが推察された。導入されたリン酸基は 120°C 加熱でも安定であった。リン酸化したオボアルブミン (OVA) と Lz のトリプシン分解物からリン酸化ペプチドを同定した。
2. EWP の第二の主要成分であるオボトランスフェリン (OTf) をリン酸化し、その機能特性を調べた。OTf も OVA や EWP と同程度にリン酸化され、熱安定性はやや改善されたが、70°C 以上の加熱で不溶化が著しかった。また、リン酸化 OTf のリン酸カルシウム可溶化能はやや向上したが、乳化性の向上は僅かであったことを認めた。
3. EWP の泡立ち性の向上におけるリン酸化およびスクロース添加の効果について調べた。リン酸化 EWP の起泡力と泡沫安定性は、泡沫の比重、オーバーラン、形態観察、および離水量の解析から、リン酸化により泡の起泡性や安定性が高まり、泡立ち性を著しく向上させることを明らかにした。スクロースの添加は、泡からの離水を抑制する効果を示し、さらにスクロースを添加したリン酸化 EWP は、泡の安定性をより高める効果を認めた。

以上のように、本論文は卵白タンパク質にピロリン酸塩を用いてリン酸化による機能特性改善を追究し、導入されたリン酸基の結合様式の一端を明らかにした。また、オボトランスフェリンのリン酸化による機能特性の向上を確認した。さらに、EWP の泡立ち性がリン酸化によって著しく向上することが明らかになり、リン酸塩存在下での乾燥加熱処理が食品タンパク質の機能特性改善に有効な方法であり、リン酸化タンパク質の利用への可能性を示す知見となった。したがって、本論文は学位論文として十分に価値のあるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	林 葉 子
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 杉元 康志
	副査 鹿児島大学 准教授 イブラヒム ヒッサム ラドワン
	副査 佐賀大学 教授 藤田 修二
	副査 佐賀大学 教授 光富 勝
	副査 鹿児島大学 教授 八木 史郎
審査協力者	鹿児島大学 名誉教授 青木 孝良
実施年月日	平成22年 1月 21日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <span style="float: right;"><input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答</span>	
<p>主査及び副査は、平成22年1月21日の公開審査会において学位申請者に対して学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑がなされ、いずれも満足できる回答を得ることが出来た。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は、申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力および識見を有するものと認めた。</p>	

学位申請者  
氏名

林 葉 子

[質問1] この研究では乾燥状態で85℃、1日から5日間まで乾燥加熱を行っているが、加熱時間を延ばした時にもっと高いリン含量の試料が得られるか？

[回答1] この条件より乾燥加熱の時間を延ばしても、リン含量はそれほど高くない。加熱時間を長くすると、タンパク質の変性が進み過ぎて試料が不溶化するので望ましくない。

[質問2] 卵白タンパク質をリン酸化する場合、どの程度のリン酸化が望ましいと考えるのか？

[回答2] リン酸化してどういう機能性を改善するのかによって異なるが、熱安定性については、本研究で使用した条件でリン含量1%程度のリン酸化卵白タンパク質はその溶液を95℃で加熱してもほとんど不溶化しないので、1%で十分であるとあると考えられる。また、このリン酸化タンパク質のゲルは透明で、未処理のものに比べてゲル強度が高く、保水性も高かった。

[質問3] 卵白タンパク質全体を乾燥加熱によりリン酸化するより、その成分を分離した方がリン酸化されやすいのか？

[回答3] 同じ条件でリン酸化した場合、卵白タンパク質をリン酸化した方が、卵白の主要タンパクであるオボアルブミンやオボトランスフェリンをリン酸化したものより、リン含量が少し高かった。

[質問4] 卵白タンパク質をリン酸化すると泡立ち性が良くなっており、その中で起泡性より特に泡の安定性が良くなっている。タンパク質溶液の泡立ち性における起泡性と安定性にはどのような要因が関係しているか？

[回答4] タンパク質の乳化活性も起泡性もタンパク質の表面疎水性との相関が高い。これに加えて起泡性はタンパク質の被消化性とも正の相関がある。泡の安定性には、皮膜におけるタンパク質の会合性や皮膜の粘性も関係している。

[質問5] リン酸化した場合は凝固性や結着性はどのように改善されるのか？

[回答5] タンパク質の種類によって異なるが、オボアルブミンの熱変性温度は下がるが、

逆に凝固温度は上がり、85℃加熱でも90%以上が可溶化している。リン酸基の導入により分子間の相互作用に変化が起こったものと解釈される。結着性については検討してない。

[質問6] ゲル特性は？弾力性はどうか？

[回答6] リン酸化によりゲル特性や弾力性は向上すると思われる。よって、多くの食品に活用できると考えられる。

[質問7] リン酸化ペプチドの濃縮に固定化金属アフィニティークロマトグラフィー使っているが、どのように行ったか？

[回答7] 固定化金属アフィニティークロマトグラフィーは、金属イオンへの親和性を利用したアフィニティークロマトグラフィーの1種であり、この場合はリン酸基をターゲットとして結合させ、濃縮した。

[質問8] リン酸化したOVAのトリプシン消化物のTOF-MSの理論値と実測値が若干違っているが、その原因は？

[回答8] 実測値は分子量測定用マーカを基準に算出したが、装置によるものかサンプルの状態が原因なのか分からないが、誤差の範囲と考える。

[質問9] リン酸化OVAとリン酸化したOTfをco-heatしたとき、OTfの熱凝固をリン酸化OVAが阻止するような結果を得ているが、リン酸化してないOVA自体でもそのようなことが起こるのか？

[回答9] その実験はやってはいないが、OVAにはシャペロン効果があるという報告もあることから、リン酸化OVAもそのような効果と思われる。

[質問10] そもそも分子シャペロンとはアンフォールドしたタンパク質やミスフォールドしたタンパク質を巻き戻したり、変性したタンパク質を天然状態に戻す効果を言われているので、OVAの効果は単に共存させればOTfが凝固しにくくなったのではないか？

[回答10] OVAの効果は分子シャペロンとは言い難いが、そのメカニズムは分からないが、共存すると熱凝固し難くなるのは事実である。それがOVAの特徴である。