

学位論文要旨	
氏名	榎元 廣文
題目	乾燥加熱を利用した糖リン酸化による食品タンパク質の機能特性の改善に関する研究 (Studies on Improvement of Functional Properties of Food Proteins through Glycation and Phosphorylation by Dry-Heating)
<p>ホエータンパク質や卵白タンパク質(EWP)は食品素材として利用されているが、更なる用途拡大のためにはホエータンパク質の高付加価値化が不可欠である。リン酸化は食品タンパク質の機能特性の改善に有効な方法である。これまでに化学的および酵素的リン酸化法が開発されてきたが、それぞれ欠点があり実用化は難しい。Li <i>et al.</i> (2003)はピロリン酸塩存在下でEWPとホエータンパク質分離物(WPI)を乾燥加熱すると、EWPと比較してWPIのリン酸化の程度は著しく低かったと報告しているが、その原因としてWPI中のタンパク質成分には糖鎖が無いことが考えられた。そこで、メイラード反応を利用してWPIにマルトペンタオース(MP)糖化後、ピロリン酸塩存在下での乾燥加熱によるリン酸化を試みた。</p> <p>WPIをMP糖化後、ピロリン酸塩存在下、pH 4.0、85°Cで乾燥加熱するとWPIは効果的にリン酸化され、そのリン含量は1日間の乾燥加熱で0.6%、5日間の乾燥加熱で1.04%まで増加した。Native-PAGEからリン酸基の導入によるマイナスチャージの増大が確認された。SDS-PAGEから乾燥加熱中に分子間SS結合が形成されることが分った。WPIの加熱凝集に対する安定性(熱安定性)は糖化によって改善され、糖リン酸化によって著しく改善され、糖リン酸化WPIの溶液は100°Cで加熱処理後もほぼ完全に可溶化していた。また、WPIの乳化安定性も著しく向上した。WPI溶液の加熱ゲルの破断強度、弾性率、保水性は糖化によって有意に改善され、糖リン酸化によってさらに改善され、しかも、糖リン酸化WPIのゲルは透明になった。糖リン酸化によってWPIにリン酸カルシウム可溶化能が付与された。</p> <p>EWPもリン酸化のみのものよりもMP糖化後のリン酸化によってさらにリン酸化され、その熱安定性もさらに改善された。</p> <p>糖リン酸化によるWPIの機能特性の改善とタンパク質構造の変化との関連性を調べるため、WPI中の構成タンパク質成分であるβ-ラクトグロブリン(β-Lg)、α-ラクトアルブミン(α-La)、牛血清アルブミン(BSA)を糖リン酸化し、その構造変化を調べた。CDスペクトルの測定結果から糖リン酸化によるこれらのタンパク質の二次構造の変化は小さかった。また、Trp蛍光スペクトル、示差走査熱量計による変性温度の変化はβ-Lgとα-Laでは小さかったが、BSAではやや大きかった。これらのことから、糖リン酸化によるβ-Lgとα-La分子の構造変化は穏やかであるが、BSA分子のそれはやや大きいことが示唆された。</p> <p>糖リン酸化によりβ-Lgのレチノール結合活性は低下したが、リン酸カルシウム可溶化能が付与され、抗原性が有意に低減化した。</p> <p>α-Laのアポトーシス活性は、未処理のものと比較してMP糖化では2/3に、糖リン酸化では1/2に低下したが、抗炎症作用の指標となるTNF-αとIL-6の産生抑制作用はα-Laの糖化によって有意に強化され、糖リン酸化によってさらに強化された。</p> <p>BSAの熱安定性やゲル形成性はリン酸化によって改善され、糖リン酸化によってさらに改善され、リン酸カルシウム可溶化能も付与された。</p> <p>これらの結果から、乾燥加熱を利用した糖リン酸化は食品タンパク質の機能特性の改善に有効な方法であることが明らかにされた。</p>	

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Hirofumi Enomoto
題 目	Studies on Improvement of Functional Properties of Food Proteins through Glycation and Phosphorylation by Dry-Heating (乾燥加熱を利用した糖リン酸化による食品タンパク質の機能特性の改善に関する研究)
<p>Whey protein and egg white protein (EWP) are extensively utilized as a functional food ingredient in the food industry. It is need for further uses to make them a value-added product. Phosphorylation has been proven to be a useful method for improving the functional properties of food proteins. Li <i>et al.</i> (2003) phosphorylated whey protein isolate (WPI) and EWP by dry-heating in the presence of pyrophosphate. However, WPI showed a lower phosphorylation level than EWP under the same conditions, presumably due to a lower sugar content of WPI. Then, I attempted to prepare phosphorylated WPI by glycation with maltopentaose (MP) through the Maillard reaction and subsequent dry-heating in the presence of pyrophosphate (PP).</p> <p>The phosphorus content of WPI was increased to 1.05% by glycation with MP and subsequent dry-heating at pH 4.0 and 85 °C for 5 days in the presence of PP. The increase of negative charge by introduction of phosphate group was confirmed by Native-PAGE. The stability against heat-induced insolubility of WPI was improved by glycation, and further improved by phosphorylation after glycation. When the solution of WPI phosphorylated after glycation was heated at 95 °C for 10 min, most of protein remained soluble. The emulsifying stability was improved by phosphorylation after glycation. The gelling properties of WPI such as hardness, resiliency, and water-holding capacity were remarkably improved by phosphorylation after glycation: a transparent and firmer heat-induced gel was obtained. The calcium phosphate-solubilizing ability of WPI was enhanced by phosphorylation. The phosphorous content of EWP was effectively increased by phosphorylation, and further increased by phosphorylation after glycation. The heat stability of EWP was improved by phosphorylation, and further improved by phosphorylation after glycation.</p> <p>To elucidate the relationship between the improvement of functional properties of WPI and structural change of proteins by phosphorylation, β-lactoglobulin (β-Lg), α-lactalbumin (α-La), and bovine serum albumin (BSA), components in WPI, was glycated and subsequently phosphorylated, and then the structural properties of glycated and phosphorylated them were investigated. The circular dichroism spectra showed that the change of the secondary structure in these protein molecules by glycation and subsequent phosphorylation was small. The tryptophan fluorescence spectra and differential scanning calorimetry thermograms showed that denaturation temperature (T_d) of β-Lg and α-La was only slightly affected, whereas the T_d of BSA was somewhat changed by phosphorylation after glycation. These results indicated that the conformational changes of the β-Lg and α-La molecules were mild by phosphorylation after glycation, whereas the conformation of BSA was somewhat changed by phosphorylation after glycation.</p> <p>Although the retinol-binding activity of β-Lg was somewhat reduced by phosphorylation after glycation, the calcium phosphate-solubilizing ability of β-Lg was enhanced and the anti-β-Lg antibody response was significantly reduced by phosphorylation after glycation. The apoptotic activity of the complex of oleic acid and α-La was reduced by glycation, and further reduced by phosphorylation after glycation: this activity was 2/3 for glycation and 1/2 for phosphorylation after glycation. The anti-inflammatory effect of α-La samples were evaluated by the production of IL-6 and TNF-α, and this activity was significantly enhanced by glycation, and further enhanced by phosphorylation after glycation. The heat stability and gel-forming properties of BSA were improved by phosphorylation, and further improved by phosphorylation after glycation. The calcium phosphate-solubilizing ability of BSA was enhanced by phosphorylation.</p> <p>These results showed that phosphorylation after glycation is useful method for improving the functional properties of whey protein.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	榎元 廣文
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 青木 孝良
	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 鹿児島大学 教授 田中 淑人
	副査 鹿児島大学 教授 杉元 康志
	副査 佐賀大学 教授 藤田 修二
審査協力者	
題 目	乾燥加熱を利用した糖リン酸化による食品タンパク質の機能特性の改善に関する研究 (Studies on Improvement of Functional Properties of Food Proteins through Glycation and Phosphorylation by Dry-Heating)
<p>ホエータンパク質や卵白タンパク質は食品加工素材として広く用いられているが、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が求められている。さらに、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きている。</p> <p>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。さらに、リン酸化によりカルシウム吸収促進機能を持つタンパク質の創製も期待できる。また、最近食品タンパク質やペプチドのリン酸基についての免疫調節機能等の生理的な役割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付与も期待できる。食品タンパク質のリン酸化の方法としては化学的方法と酵素的 method があるが、化学的リン酸化は化学薬品を使うので、消費者に受け入れ難いという問題がある。酵素的リン酸化は導入されるリン酸基数が極めて少なく、ATPを必要とするので、コスト高となる。これまでの研究で、タンパク質をピロリン酸塩存在下で乾燥加熱するとリン酸化されることが明らかにされている。</p> <p>申請者はホエータンパク質と卵白タンパク質を、メイラード反応を利用してマルトペンタオース(MP)糖化後、ピロリン酸塩存在下での乾燥加熱によるリン酸化を行い、以下の結果を得た。</p>	

1. ホエータンパク質分離物(WPI)をMP糖化後、ピロリン酸塩存在下、pH 4.0、85°Cで乾燥加熱するとWPIは効果的にリン酸化され、そのリン含量は1日間の乾燥加熱で0.6%、5日間の乾燥加熱で1.04%まで増加した。Native-PAGEからリン酸基の導入によるマイナスチャージの増大が確認された。SDS-PAGEから乾燥加熱中に分子間SS結合が形成されることが分かった。WPIの加熱凝集に対する安定性(熱安定性)は糖化によって改善され、糖リン酸化によって更に改善された。糖リン酸化WPIの溶液は100°Cで加熱処理後もほぼ完全に可溶化していた。また、糖リン酸化によりWPIの乳化安定性が著しく向上した。WPI溶液の加熱ゲルの破断強度、弾性率、保水性はMP糖化によって有意に改善され、糖リン酸化によってさらに改善され、しかも、糖リン酸化WPIのゲルは透明になった。糖リン酸化によってWPIにリン酸カルシウム可溶化能が付与された。
2. 卵白タンパク質もリン酸化のみのもものよりもMP糖化後のリン酸化によってさらにリン酸化され、その熱安定性もさらに改善され、リン酸カルシウム可溶化能が付与された。
3. 糖リン酸化によるWPIの機能特性の改善とタンパク質構造の変化との関連性を調べるため、WPI中の構成タンパク質成分である β -ラクトグロブリン(β -Lg)、 α -ラクトアルブミン(α -La)、牛血清アルブミン(BSA)を糖リン酸化し、その構造変化を調べた。CDスペクトルの測定結果から糖リン酸化によるこれらのタンパク質の二次構造の変化は小さいことが分った。また、蛍光スペクトルと示差走査熱量計分析結果から、糖リン酸化による β -Lgと α -Laの三次構造変化は小さく、BSAのそれはやや大きいことを示唆された。
4. 糖リン酸化により β -Lgのレチノール結合活性は低下したが、リン酸カルシウム可溶化能が付与され、抗体との反応性が有意に低減化した。
5. α -Laのアポトーシス誘導活性は、未処理のものと比較してMP糖化では2/3に、糖リン酸化では1/2に低下したが、TNF- α とIL-6の産生を指標として調べた α -Laの抗炎症作用は糖化によって有意に強化され、糖リン酸化によってさらに強化された。
6. BSAの熱安定性やゲル形成性はリン酸化によって改善され、糖リン酸化によってさらに改善され、リン酸カルシウム可溶化能も付与された。

以上本研究は、ホエータンパク質および卵白タンパク質を、メイラード反応を利用してMP糖化後、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その機能特性が向上することを示した。また、糖リン酸化によるタンパク質の構造変化も明らかにしている。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	榎元 廣文
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 青木 孝良
	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 鹿児島大学 教授 田中 淑人
	副査 鹿児島大学 教授 杉元 康志
	副査 佐賀 大学 教授 藤田 修二
審査協力者	
実施年月日	平成21年1月13日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、平成21年1月13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応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</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ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者

氏名

榎元 廣文

[質問 1] 糖リン酸化後の β -Lg の CD スペクトルの変化から糖リン酸化による β -Lg の二次構造の変化は小さいと述べたが、どの程度の変化で小さいとしているのか？何か基準はあるのか？

[回答 1] 以前のリン酸化オボアルブミンの CD スペクトルの測定結果から判断して、糖リン酸化による β -Lg の変化はそれほど大きくは無いと考えられる。可能であれば、二次構造の含量を算出できる解析ソフトを用いて α -ヘリックス、 β -シートおよび β -ターンが具体的にどの程度変化したか調べたいと思う。

[質問 2] 糖リン酸化によりトリプトファン蛍光強度が減少しているが、このことから三次構造の変化は若干であるといえるか？

[回答 2] β -Lg 分子中にはトリプトファン残基は β -バレル構造の内部と、 β -バレル構造の上のループとの計二つある。DSC 分析の結果、糖リン酸化による β -Lg の β -バレル構造の変性温度の変化は小さかった。さらに、 β -Lg のレチノール結合部位は β -バレル構造の内部にあるが、糖リン酸化後もレチノール結合活性は 82%残っていたので、糖リン酸化によるトリプトファン蛍光強度の変化の多くはループ部分のトリプトファン残基の変化によるものと考えられる。したがって、 β -Lg の立体構造の大部分を占める β -バレルの構造変化は小さな変化であると考えている。

[質問 3] MP の糖化によって β -Lg のレチノール結合活性が減少しているが、その原因は MP の結合によるレチノール結合部位の構造が変化したためか？あるいは、MP に立体障害のためレチノールの結合が阻害されているのか？

[回答 3] メイラード反応によって糖化しているのでマルトペンタオースは β -Lg のリジン残基に結合していると考えられる。リジン残基はタンパク質分子の表面に位置しているので MP 結合による立体障害がレチノール結合活性の減少の原因とはあまり考えられない。DSC 分析の結果から、レチノール結合部位を構成するドメインの変性温度が糖化によって少し変化していることから、糖化によるレチノール結合活性の低下は、MP 糖化によってレチノール結合部位の構造が若干変化したためであると考えられる。

[質問 4] 糖化や続いてのリン酸化によって単位あたりのタンパク質含量は減っていると思われるが、タンパク質濃度の調製はどうしているのか？

[回答 4] ゲル化特性の実験はケルダール法でタンパク質量を調製している。それ以外の実験はローリー法によりタンパク質量を調整している。

[質問 5] 糖化や糖リン酸化によって BAMLET のアポトーシス活性は減少しているが、糖化や糖リン酸化 α -La で調製した BAMLET 中のオレイン酸含量はどうなっているのか？

[回答 5] オレイン酸の含量は測定していない。オレイン酸の結合量が少ないことがアポトーシス活性の減少の原因である可能性もあるので、機会があれば調べてみたいと思う。

[質問 6] 糖リン酸化 WPI での Native-PAGE から BSA はあまりリン酸化されてないのではないか？

[回答 6] 糖リン酸化 BSA の移動度は MP 糖化のものより大きくなっているのに、リン酸化されていることは確認できる。リン酸化の程度と移動度との関係については、BSA は分子量約 66000 と比較的大きなタンパク質なので、ゲル濃度を下げて泳動するとリン含量の差が移動度により明白にできると思われる。Chen らの方法により測定したリン含量はリン酸化のみで 0.46%、糖リン酸化したもので 0.91%であったので、リン酸化の程度の割には BSA の移動度の変化は小さいものと思われる。

[質問 7] BAMLET の調製法は？

[回答 7] Svensson らの方法に基づいて、NaCl グラジエントによりオレイン酸を分散させた DEAE-トリスアクリル M 樹脂へ、EDTA によって Ca を除去したそれぞれの α -La サンプルを添加後、NaCl グラジエントをかけ、高塩濃度で溶出してきた画分を回収して調製した。

[質問 8] 糖リン酸化によって WPI のゲルが透明になったが、その理由としてどのようなことが考えられるか？

[回答 8] ゲルが透明になるためにはタンパク質分子間の反発力と凝集力のバランスが必要である。糖リン酸化によってタンパク質分子間の反発力が強まり、糖リン酸化 WPI では加熱によって直線状のポリマーができ、これらのポリマーが均一な網目構造を形成したため、そのゲルは透明になったと考えられる。

[質問 9] ゲルは通常透明になるとその物性は低下するが、本研究では透明なゲルの物性の方が高かった。それはなぜか？

[回答 9] ゲルの物性において、タンパク質分子間の凝集力と反発力のバランスが重要である。透明でなかったゲルが透明になるということは反発力が強まったためであり、反発力が強すぎる場合はゲルの物性が低下することもある。本実験はタンパク質濃度 10%、食塩濃度 75mM という条件で行ったが、この条件は 0.6%程度のリンが結合している PP-MP-WPI-1d では凝集と反発のバランスが良かったため、物性が改善されたものと考えられる。

[質問 10] 糖リン酸化によって等電点はどの程度変化するか？リン酸化によるマイナスチャージの増大によって溶解度低下するのでは？

[回答 10] 糖リン酸化によりタンパク質の等電点は酸性側に変化すると考えられる。どの程度変化するかは等電点電気泳動をすれば明らかになると思う。溶解度は pH 7.0 で測定している。WPI 中の主要タンパク質成分である β -Lg、 α -La、および BSA は酸性タンパク質なので、糖リン酸化による中性付近の溶解性の減少はほとんど無いものと思われる。

[質問 11] 糖リン酸化によって糖が結合するので、吸湿性が高くなるのではないか？

[回答 11] 凍結乾燥した糖リン酸化 WPI の水分含量は、低く吸湿性は低いと思われる。