

氏 名	小 山 翔 大		
学位 (専攻分野の名称)	博 士 (農芸化学)		
学 位 記 番 号	甲 第 810 号		
学位授与の日付	令和 3 年 3 月 20 日		
学位論文題目	卵白タンパク質分子の加熱による高次構造変化およびゲル形成機序に関する研究		
論文審査委員	主査 教 授・博士 (農芸化学)	野 口 智 弘	
		農 学 博 士 高 野 克 己*	
	教 授・博士 (農芸化学)	辻 井 良 政	
	教 授・博士 (農芸化学)	阿久澤 さゆり	
	博 士 (農学)	半 田 明 弘**	

論文内容の要旨

鶏卵は全世界で年間約 6,500 万トン、日本においても約 260 万トン生産され、家庭での調理のほか、各種の加工品として広く利用されている。卵白はタンパク質が 9.7~12.0%を占めその優れた加熱ゲル化性、起泡性および乳化性などの加工機能から畜肉製品、水産練り製品、製菓製パンなどにおいて物性発現を目的として、液状や粉末状の製品が幅広く使用されている。

卵白タンパク質の主成分は 54%を占めるオボアルブミン (OVA)、次いでオボトランスフェリン (OVT, 12%) およびリゾチーム (LYZ, 3.4%) で、変性温度はそれぞれ 84, 61 および 75°Cである。これらのタンパク質の熱変性に続く凝集により、加熱ゲルのネットワークが形成されるが、これらのタンパク質分子のゲル物性発現への寄与に関しては十分な検討がなされていない。

卵白の加熱ゲルは、加熱変性により露出したタンパク質の反応領域を介した分子間疎水結合ならびにジスルフィド (SS) 結合による凝集体形成、およびその重合により形成するとされているが、卵白ゲルを疎水および SS 結合切断剤により処理しても完全に可溶化しないとの報告もある。したがって、SS 結合以外の共有結合が卵白ゲル形成に関与する可能性が推察されるが、十分に検討されていない。

乾燥卵白は液卵白の噴霧乾燥および乾熱処理により製造され、その溶液の加熱ゲルは液卵白に比べて極めて硬く弾力に富んだ物性を示すため、畜肉・すり身加工品および中華麺などの物性制御に重用される。したがって、乾燥卵白と液卵白はゲル形成機序も異なるものと推定され、様々な研究がなされてきたが、その詳細は未だに不明である。

本研究では、各卵白タンパク質の加熱変性および分子間挙動を解析し、ゲル物性発現への

*東京農業大学 学長・元教授

**キューピー (株) 研究開発本部プリンシパル・コーポレート・サイエンティスト

寄与, ゲル形成における化学結合の影響を解明すると共に, 乾燥卵白ゲルが高硬度化する機序を解明した。

液卵白の OVA はゲルの弾力性発現に寄与し, OVT および LYZ は OVA とともにゲル化する際, ゲル硬度の増加および弾力の低下に寄与することを明らかにした。また, SS 結合に加えてランチオニン (LAN) 結合もゲル形成に寄与することを明らかにした。さらに, 乾燥卵白は乾熱処理によるタンパク質の部分変性, リジノアラニン (LAL) 結合の形成, および OVA の N 末端側の疎水領域の切断により, 加熱ゲル形成時にタンパク質の凝集制限が生じ, 緻密で均質なネットワークが形成されることが明らかとなった。

以下に, 研究成果の概要を示した。

I 液卵白の加熱ゲル形成機序

ゲルの物性発現に及ぼす OVA およびその他タンパク質の役割

液卵白 (LW) のゲル形成に及ぼす OVA の役割を解明するためには, OVA を精製して LW とゲル化特性を比較する必要があると考えた。適切な精製方法選抜のために, 主要な方法にて調製した OVA ゲルの物性を比較した結果, 硬度および弾力に差異が認められた。これらの差異は各処理による OVA の変性や試薬の残留によるものと推定され, LW との比較対象として不適切であった。以上より, まず LW より未変性の OVA の分離方法を検討した。加熱した卵白を非還元ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にて分析した結果より, OVT および LYZ はそれぞれ 64°C にて凝集し, OVA は 75°C で凝集することを確認した。この結果を踏まえて, LW の加熱処理 (64°C, 10 min) および遠心分離により凝集物を除去した溶液 (rOVA) を調製し, 還元 SDS-PAGE により, OVT および LYZ が除去され, LW と等量の OVA を含有することを確認した。さらに, LW と rOVA に含まれる OVA は, 示差走査熱量分析および表面疎水性の測定値に差異はなかった。以上より, 未変性の OVA を分離できたと判断した。

次に LW と rOVA を加熱処理 (90°C, 30 min) し, ゲルを調製した。厚さ 7.0 mm に切り出し後, Tensipresser MyBoy II にて平板型プランジャーでゲルの全体を高さの 50% で 2 回連続圧縮し, Bourne (1982) の方法に従い, 硬さ (hardness), 弾力性 (resilience), および凝集性 (cohesiveness) を比較した。rOVA ゲルは有意に軟らかく, 弾力性および凝集性が高くなった。以上の結果より, OVA は弾力性, 凝集性の発現に寄与することが示唆された。一方, OVT および LYZ はゲルの硬さを増強させるが, 弾力性および凝集性を低下させることが示唆された。走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察の結果, LW ゲルは構成する粒子のサイズが比較的均質で, 空隙の面積が小さく密に配置された像が観察された。一方, rOVA ゲルは空隙の面積が大きく疎な構造で, LW にはみられない細い繊維状の構造が多数観察された。以上の結果より, OVA は細く繊維状のネットワーク形成に寄与し, OVT

および LYZ は OVA の形成する繊維状ネットワークの形成を阻害することが示唆された。

加熱ゲル形成に寄与する共有結合について

卵白タンパク質の分子間結合は各タンパク質の加熱変性により誘起され、その程度には加熱温度が大いに影響する。そこで、ゲルの特性と分子間結合との関係について明らかにするために、加熱温度とゲル物性および分子間結合の関係について評価した。LW を採卵後 3 日程度の卵白に相当する pH 9.0, タンパク質量 110 mg/mL に調整し、加熱処理 (50°C~100°C, 30 min) した結果、目視にて 60~70°C でゾル形成、75°C 以上ではゲル形成を確認した。Tensipresser MyBoy II を用いて、貫入試験にて測定したゲルの硬度は、加熱温度依存的に増加した。加熱した LW をマルチビーズショッカーにて破碎後、SDS や尿素、ジチオトレイトールを含む Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) にて処理し、ゲルの形成に寄与する結合を比較したところ、80°C 以下では SS 結合の寄与が大きく、85°C 以上では高温ほど SS 以外の共有結合の寄与が大きくなると推定された。そこで、システインまたはセリン残基からデヒドロアラニンを経て形成される LAN 結合または LAL 結合に注目した。凍結乾燥した試料を塩酸加水分解し、LC-Q-TOF にてこれらを定量した結果、卵白の加熱ゲル化時にも LAN および LAL 結合が形成され、その主体は LAN 結合で、主にシステイン残基より生成することを明らかにした。LAN 結合の生成量は、ゲルの硬度との間に強い正の相関 ($r=0.990$, $p<0.01$) を示し、100°C 加熱試料にて LAN 結合は卵白中の総システイン残基量の 41.0% 相当生成した。さらに還元 SDS-PAGE の結果、LAN 結合は OVT, LYZ および OVA のいずれにおいても形成され、中でも OVT の分子間にて最も形成されやすいことが明らかとなった。以上の結果より、卵白加熱ゲルの形成には、SS 結合に加えて、LAN 結合も寄与することを明らかとした。同結合は OVT を主体にいずれのタンパク質分子間にも形成され、ゲルの硬度増強に寄与すると推察した。

II 乾燥卵白のゲル形成機序

乾燥卵白は LW の脱糖処理後、噴霧乾燥に続く乾熱処理により製造される。LW, 噴霧乾燥卵白 (DW) および乾熱処理乾燥卵白 (HDW) の水溶液を加熱すると LW と DW のゲル硬度は同等である一方、HDW は極めて硬く弾力に富んだゲルを形成する。従来の研究により、乾熱処理はゲルの硬度向上に寄与し、同処理によりタンパク質の変性および可溶性凝集体の形成が進行するほど、そのゲルは硬く弾力に富むことが明らかとされたが、その機構は分子レベルで十分に解明されていない。そこで、乾熱処理がタンパク質の性状にどのような影響を与え、ゲル化性を改質するのか分子の視点で検討した。

乾熱処理卵白のゲル化および凝集特性

試料には、DW および HDW を使用した。はじめに、SEM にてゲルのネットワークを比較した。ゲルネットワーク構成単位の平均粒子半径は DW の 223.6 ± 18.2 nm と比較して、

HDW では 18.2 ± 2.6 nm と有意に小さかった。0.01% (w/w) 溶液を未加熱または 80°C にて加熱し、動的光散乱計にて求めた平均粒子半径は、未加熱における粒子半径は HDW で 17.8 ± 1.2 nm であり、ゲル構成単位と粒子半径は同等であった。溶液中の粒子半径は加熱により DW では増加したが、HDW では顕著な変化が認められなかった。以上の結果より、HDW タンパク質では加熱による分子間の凝集が抑制されることが明らかとなり、その結果 LW のような大きなゲル構成単位の形成を経ずに、可溶性凝集体がそのままゲル構成単位になった緻密で均質なゲルが形成されると示唆された。

乾熱処理卵白の加熱挙動解析

凝集抑制要因を明らかにすべく、各試料の加熱挙動を解析した。各試料を各温度 ($40\sim 90^{\circ}\text{C}$) で加熱した結果、DW では 60°C を境に急激に濁度が増加し、HDW 溶液では濁度は徐々に増加することを目視にて確認した。ゲル形成温度は DW では 75°C 、HDW ではそれよりも低温の 60°C であった。HDW を 70°C 以上で加熱した際のゲルの硬度は 90°C で加熱した DW よりも高かった。Blue-native-PAGE の結果、DW では OVT は 60°C 、OVA は 75°C でバンド強度が急激に減衰した。一方、HDW において、OVA および OVT のバンドはより低温から減衰した。以上より、乾熱処理によりタンパク質の変性温度が低温にシフトし、ゲルの形成開始温度が低下したが、昇温による構造変化は緩やかであることが示唆された。次に、各試料の希薄溶液にてタンパク質の三次構造の加熱挙動を解析した。表面疎水性は未加熱において HDW は DW の 5.9 倍高かった。また、表面疎水性の増加開始温度は HDW が DW に比べ低く、その変化は緩やかで変化率も小さかった。タンパク質の表面電荷を表す電位は未加熱において HDW は DW よりも 13.7 mV 低く、強く負に帯電していることが認められた。DW は加熱温度に従い負電荷が増加したが、HDW では顕著な変動は認められなかった。以上の結果より、HDW タンパク質は加熱による構造変化の抑制により結合部位に相当する疎水領域の露出が制限されること、何れの温度においても静電反発力が強いことが明らかとなった。

乾熱処理卵白タンパク質の性状解析

両タンパク質の性状を把握するために、SDS-PAGE のバンドを比較した結果、HDW タンパク質の可溶性凝集体のバンドは非還元および還元条件の両方で確認されたことから、HDW の可溶性凝集体の形成には SS 結合以外の共有結合が寄与すると示唆された。さらに、HDW タンパク質には、OVA および LYZ よりも低分子の領域に DW には見られないバンドが観察されたことから、タンパク質の部分切断が推定された。DW および HDW について SS 以外の共有結合を LC-Q-TOF にて分析した結果、HDW において LAN および LAL 結合が形成されることを明らかとした。乾熱処理においては LAL 結合の形成量は LAN 結合より優勢で、LW のゲル化とは異なる傾向であった。

次に、部分切断されたタンパク質を Tricine-SDS-PAGE に供し、OVA よりも低分子側に

フラグメント A (40.0 kDa) およびフラグメント B (5.8 kDa) を確認した。これらのフラグメントが何れのタンパク質に由来するか特定するために、Trypsin にて断片化し、LC-Q-TOF にて分析後、Mascot (Matrix Science) にてデータ解析した。その結果より、各フラグメントは OVA に由来し、フラグメント B は N 末端側の約 53~55 残基に相当することが示唆された。OVA は主要な疎水領域を 7 か所、チオール (SH) 基を 4 つ持つことが報告されており、フラグメント B は疎水領域 2 か所および SH 基を 2 つ含む。したがって、フラグメント B が切り離されたフラグメント A は分子当たりの反応領域数が OVA と比べ減少するため、凝集するタンパク質の数が減少し、巨大なゲル構成単位の形成が抑制されることで、緻密なゲル構造の形成に寄与するものと推察した。

以上の解析より、HDW タンパク質は乾熱処理にて変性し、LAL 結合による可溶性凝集体の形成、負電荷の増強、変性温度の低下、および OVA の N 末端側の疎水および SS 結合領域の切断が生じ、加熱ゲル化過程において分子構造の変化抑制に伴う疎水および SS 結合領域の露出制限、強い静電反発力が生じることを明らかにした。これらの作用により、1 分子に凝集するタンパク質の数が制限され、構成単位が小さい緻密なゲルネットワークが形成されることが示唆された。

総 括

鶏卵は世界中で広く利用される食品のひとつである。卵白は、加熱ゲル化性、起泡性および乳化性などの加工機能に優れている。食品加工の現場では、液卵白、およびその乾燥品が利用されており、畜肉加工品および中華麺などの食感改善に重用される。しかし、卵白加熱ゲルの物性発現および形成機序に関しては未だ不明な点が存在し、分子レベルで十分な解明が行われていない。そこで、本研究では、分子レベルでの卵白タンパク質の加熱ゲル形成機序に関して検討した。LW の加熱 (64°C, 10 min) および遠心分離により、未変性の OVA を主成分とする rOVA を精製した。両者の加熱ゲルの物性測定結果より、OVA は、弾力に富んだゲルを形成するが、OVT および LYZ が共存することで硬度が増加、弾力が低下することを明らかにした。したがって、固ゆで卵の卵白部の適度な硬さと歯切れの良さを両立した食感は OVA, OVT および LYZ の相互作用により形成されると推察した。卵白の加熱ゲル化において、SS 結合がゲル形成に寄与することが定説とされてきたが、それに加えて 85°C 以上の高い温度では LAN 結合も寄与することを明らかにした。同結合は OVT にて最も形成されやすく、ゲル硬度と強い正の相関を示した。

DW と比べて、HDW の加熱ゲルは、より緻密なゲルネットワークを形成し、硬さや弾力性が増加した。HDW タンパク質は乾熱処理にて変性し、LAL 結合による可溶性凝集体の形成、負電荷の増強、変性温度の低下、および OVA の N 末端側の疎水および SS 結合領域の切断が生じ、加熱ゲル化過程において分子構造の変化抑制に伴う疎水および SS 結合領域

の露出制限, および強い静電反発力が生じ, 構成単位が小さい緻密なゲルネットワークが形成されることを明らかにした。

本研究で得られた知見をもとに, 卵白タンパク質の組成調整による多彩なゲル化性の創出, 共有結合を効率よく導入する方法の検討, および生産コストの高い乾熱処理の効率化や代替法の検討など社会実装に向けた検討が期待される。

審査報告概要

卵白はその優れた加熱ゲル化性から液状および乾燥粉末が様々な食品の物性改良の目的で広く利用されている。この優れた加熱ゲル形成能は主要タンパク質のオボアルブミン (OVA), オボトランスフェリン (OVT) およびリゾチーム (LYZ) が関与するとされているが, 加熱によるこれらの分子間挙動とゲル形成との詳細は不明である。また, 乾燥卵白を乾熱処理 (80°C, 3 週間程度) するとゲル硬度が大幅に増加するがそのメカニズムは解明されていない。本研究では, 各卵白タンパク質の加熱変性および分子間挙動を解析し, OVA はゲルの弾力性発現に寄与し, OVT および LYZ はゲル硬度の増加および弾力の低下に寄与することを明らかにした。また, 卵白の加熱ゲル形成にはジスルフィド (SS) 結合と共に分子内のランチオニン (LAN) 結合が関与することを明らかにした。さらに, 乾熱処理乾燥卵白ではタンパク質の部分変性および OVA の N 末端側の疎水領域の 5.8 KDa の切断によって加熱凝集体の巨大化が抑制され緻密なネットワークが形成されること, さらにリジノアラニン (LAL) 結合の形成によって高硬度化する機序を解明した。これらの研究成果は従来現象論的な解析に留まっていた卵白タンパク質のゲル化機序および乾熱処理による高硬度ゲル形成能の発現を分子レベルから解明するなど, 食品科学領域における新知見を得ている。審査員一同はこれらの学術上の成果に対し博士 (農芸化学) の学位を授与する価値があると判断した。