

小麦発芽種子からの新規なたん白質脱アミド化酵素による 大豆たん白質の機能改変

加藤昭夫*¹・ラナジット クマール シャハ²・松富直利¹

¹山口大学農学部 ²ラジャヒ大学生化学科

Improvement of the Functional Properties of Soy Protein by the Treatment with Protein Deamidase from Germinating Wheat Seed

Akio KATO¹, Ranajit Kumar SHAHA² and Naotoshi MATSUDOMI¹

¹Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753

²Department of Biochemistry, Rajshahi University, Bangladesh

ABSTRACT

An enzyme catalyzing the deamidation of seed storage proteins was found in germinating wheat grains and was partially purified by salting out, DEAE-cellulose column chromatography and gel filtration on a Sephadex G-50 column. Wheat seeds were soaked in water for 6 h and then germinated in the dark at 25°C for 5 days. The deamidase activity was reached to maximum with the germination for 48 h and then the activity was greatly decreased with subsequent germination. The functional properties of wheat gluten were improved by the crude protein deamidase, while those of soy protein were not. This suggests that the deamidase derived from wheat seed acts on only wheat gluten, indicating the specificity for substrate. Further purification and the construction of cDNA library are in progress. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* 17, 40-44, 1996.

Key words: protein deamidase, wheat gluten, emulsifying properties, foaming properties

小麦や大豆等の植物性たん白質はグルタミン、アスパラギンのアミド型のアミノ酸含量が高く、小麦グルテンは全アミノ酸あたり32～38%、大豆グリシニンは約20%になる。このアミド型アミノ酸の高含量により植物性たん白質が不溶化しやすく、また凍結変性を受けやすい。したがって、温和な条件でこれらの植物性たん白質のアミド型のグルタミン、アスパラギンをグルタミン酸、アスパラギン酸に変換することができ

ば、小麦や大豆たん白質の溶解性、乳化性、起泡性、耐凍性などの機能特性が改変され、植物性たん白質の高度利用に貢献することが期待される。

こうした視点から、世界中の研究者がたん白質のグルタミンのアミドを解裂、除去するたん白質脱アミド酵素を検索してきたが、最近になって、発芽小麦種子中にプロテインデアミダーゼが存在することが Shaha ら¹⁾により明らかにされ、本研究者らもその存在を確認し、Shaha と共同研究を行っている。本研究ではこのプロテインデアミダーゼを分離精製し、プ

*〒753 山口市吉田1677-1

ロテインデアミダーゼの cDNA ライブラリーを作製し、遺伝子工学的手法による大量発現系を確立することを目的とする。

これまで本研究者は小麦グルテン、大豆グロブリンを酸性下 (pH 2) での加熱処理、あるいはアルカリ側 pH でのプロテアーゼ処理により、脱アミド化できることを明かにし、これらの脱アミド化によりたん白質の溶解性、乳化性、起泡性等の機能性が著しく改善されることを報告してきた²⁻⁴⁾。しかしながら、これらの処理により、たん白質のペプチド結合が切れたり、加熱による他成分の劣化がともなう等の問題点があった。こうした問題点を解決するために、たん白質脱アミド化酵素 (プロテインデアミダーゼ) は極めて有効であると考え、種々の植物の種子をスクリーニングし、小麦種子の発芽段階で本酵素が多量に誘導され発現することが明らかとなり、小麦種子中から本酵素の分離精製を試みた。

実験方法

小麦種子からのプロテインデアミダーゼ抽出液の調製

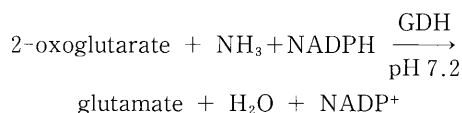
小麦種子 (ダイチノミノリ) 40 g を蒸留水に 6 時間浸した後、暗所で 25°C で 48 時間発芽させたものを蒸留水中で低温下 (4°C 以下) で磨砕し、遠心分離により、上澄液部分を集めた。

酵素抽出液からのプロテインデアミダーゼの分離精製

酵素抽出液にリン酸一ナトリウムとリン酸二カリウムのモル比が 83:17 になるよう添加し、最終的に 3.7 mol/L まで濃度をあげ、塩析した。得られた上澄液を蒸留水に対して透析した。透析内液を濃縮後、10 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.8) で平衡化した DEAE-イオン交換クロマトにより分離精製を行った。さらに Sephadex G-50 カラムクロマトグラフィーにより、ゲルろ過を行なった。

プロテインデアミダーゼ活性の測定

イオン交換カラムクロマトにより分画したフラクションを基質として可溶性グルテン (150 µg/mL) を 10 mmol/L クエン酸緩衝液 (pH 7.1) に溶かし、20 分間の酵素作用によりグルタミンから遊離する微量のアンモニアを定量するために、次の反応に関わる酵素グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) を用いて行った。



アンモニアが反応液中にあれば NADPH が消費され、340 nm の吸収が低下する。1 分間の OD₃₄₀ の減少量から遊離アンモニア量を求め、1 nmol/L アンモニア/min を 1 unit と定義した。

反応試薬の組成：

0.1 mol/L 2-oxoglutarate	
(10 mmol/L リン酸緩衝液, pH 7)	2.85 mL
0.01 mol/L NADPH	
(10 mmol/L リン酸緩衝液, pH 7)	0.15 mL
5 U/mL GDH (オリエンタル, yeast)	0.02 mL
検査試料液 (脱アミド化反応液)	1.00 mL

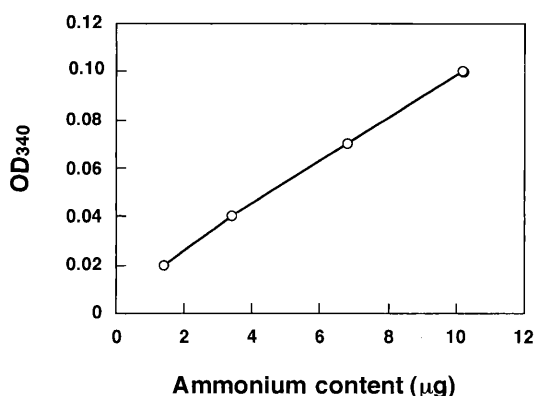


Fig. 1. Determination of ammonium content by the glutamate dehydrogenase method. The ammonium content was determined from the amount of the NADPH consumption which was estimated from the decrease in the absorbance at 340 nm.

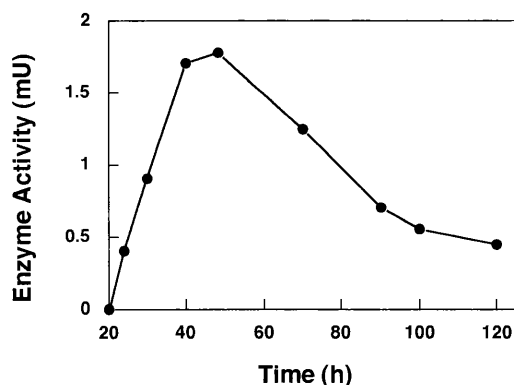


Fig. 2. Changes in the deamidase activity of wheat seed during germination. The wheat grains were homogenized immediately after a given time and then the supernatants were isolated by salting out. The crude activity was shown here.

アンモニア含量の検量線作成のために NH_4Cl を 1.4~14 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で計量し、検量カーブを作成した。

粗酵素液によるグルテン、大豆たん白質の機能特性改変

小麦グルテン、プロテアーゼ処理グルテン、大豆酸沈澱たん白質を各々 10 mmol/L クエン酸緩衝液 (pH 7.1) に 0.2% の濃度で可溶化し、粗デアミダーゼ (塩析処理後透析、凍結乾燥) を 0.04% になるように加え、30 分間、30°C で酵素作用させた。得られた反応液の乳化性、起泡性を測定した。コントロールおよび反応物の乳化性は Pearce と Kinsella の濁度法⁵⁾で、起泡性は加藤らの導電率法⁶⁾で測定した。

結果と考察

これまで、たん白質脱アミド化酵素活性の測定において、遊離するアンモニアを分析する信頼性のある手法がなく、このことが本酵素の発見および精製を遅らせてきた。したがって、本研究では、微量 (数 μg)

のアンモニアを迅速に定量できる信頼性のある方法を開発することからスタートした。Fig. 1 に示すように、GDH により極めて微量のアンモニアが定量できることが示され、この手法により、以下の脱アミド化酵素による遊離アンモニアの量を調べた。

たん白質脱アミド化酵素 (プロテインデアミダーゼ) を検索するために、種々の植物の種子をスクリーニングしたところ、小麦種子の発芽段階で本酵素が多量に誘導され発現することを確認しており、分離精製を行った。粗精製段階の酵素での実験では、本酵素は植物性たん白質を基質としたときに脱アミド率が高いことが明らかになっているので、グルタミンやアスパラギン含量の高い小麦グルテンを予めプロテアーゼ処理により可溶化したものを基質として用いた。小麦種子を 25°C で数十時間発芽させたものを塩析後、透析した粗酵素液を用いて、脱アミド活性の経時変化を調べた。Fig. 2 に示すように 48 時間後に最大活性を示し、以後急速に活性が低下した。したがって、本実験では発芽 48 時間後に酵素たん白質を抽出し、塩析し、DEAE-セルロースおよび Sephadex G-50 カラムクロマトグラフィーで分離精製した。

Table 1 に示すように、各精製段階で純度は上がり、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーでは比活性が低下し、このステップは精製のためには効果がなく、Sephadex G-50 によるゲルろ過により 145 倍に精製された。

Fig. 3 は DEAE-セルロースカラムクロマト、Fig. 4 は Sephadex G-50 によるゲルろ過パターンを示している。脱アミド活性の認められるピークを分画し、SDS-PAGE パターンを調べたが、数本のバンドからなり、さらに種々の分離精製を試みているが、現在のところまだ完全に精製できていない。

Table 2 に粗酵素による小麦グルテン、大豆たん白質の機能特性に及ぼす影響を調べた結果を示した。小麦グルテンは脱アミド化により著しく乳化性、起泡性が改善されたが、大豆たん白質はこれに比べ改変の程度が低い。これは酵素が小麦由来であることによるも

Table 1. Improvements of functional properties of soy protein and gluten by crude deamidase in germinated wheat

	Emulsifying activity (OD ₅₀₀)	Foaming power ($\mu\text{mohm/cm}$)
Soy protein (APP)		
control	0.669	458
deamidase-treated	0.696	448
Gluten		
control	0.106	-
deamidase-treated	0.136	-
Protease-digested gluten		
control	0.546	387
deamidase-treated	0.725	405

Table 2. Purification steps of protein deamidase from germinated wheat seed

Step	Protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification (-fold)
Water extraction	1,860	101,500	55	100	1
Salting out	17.5	61,800	2,908	61	53
DEAE-cellulose	9.79	20,000	2,043	20	37
Gel filtration	2.24	17,882	7,983	17	145

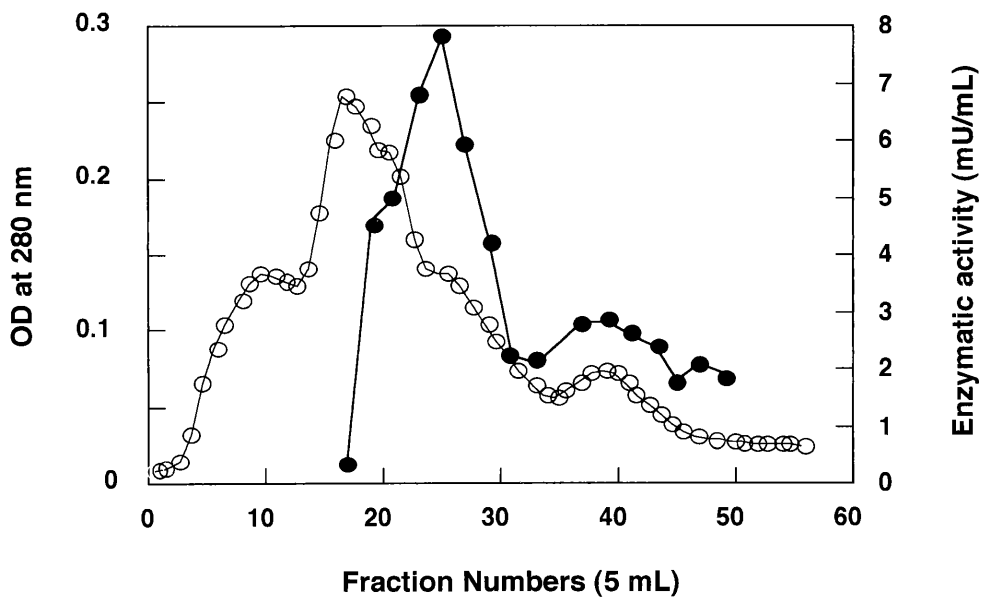


Fig. 3. Elution patterns of crude deamidase in wheat seed.
○, protein absorbance at 280 nm; ●, deamidase activity

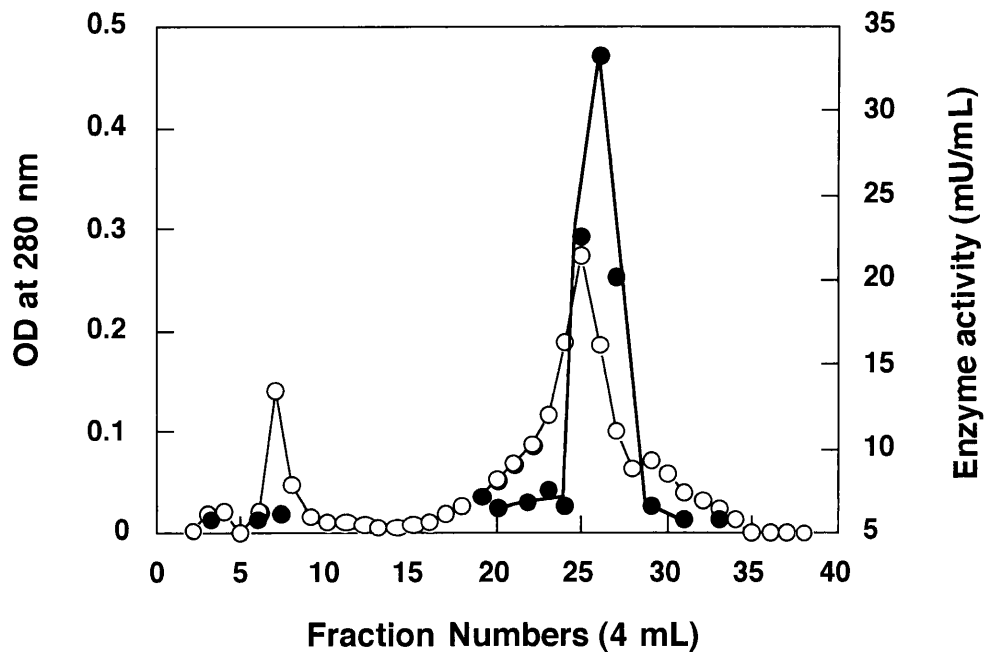


Fig. 4. Gel filtration patterns of crude deamidase in wheat seed.
○, protein absorbance at 280 nm; ●, deamidase activity

のと考えられ、大豆由来のデアミダーゼによる影響を検討する必要がある。

本研究では未だデアミダーゼを精製できていないが、小麦種子の発芽時に脱アミド化酵素活性が発現するこ

とが示された。この現象は種子の発芽時に栄養源として貯蔵たん白質であるグルテン、大豆グロブリンを利用するためのプログラムの一環であり、たん白質の脱アミド化により、立体構造が不安定化し、プロテアー

ゼによる加水分解を受けやすくするのであろう。

このたん白質脱アミド化酵素が単一に精製され、アミノ酸配列が明らかにされれば、mRNA をつくり上げ、cDNA を作製できる。この点については今後研究を進めてゆく予定である。

謝辞

本研究を行うにあたり、助成金のご援助を頂き、深く感謝いたします。また、同時に日本学術振興会に対して本研究を効率的に推進できるように Dr. Shaha を特別研究員として招聘するように許可して頂いたことに感謝いたします。

要 約

発芽小麦種子からプロテインデアミダーゼの精製が塩析、DEAE-セルロースカラムクロマト、ゲルろ過により行われた。小麦種子の発芽時間に伴いデアミダーゼ活性が増加し、48時間で最大に達したが、それ以後は減少した。粗デアミダーゼ溶液による植物性たん白質の機能特性の改変を検討したところ、小麦グルテンの乳化性、起泡性は改変されたが、大豆たん白質は改変の程度が少なかった。このことは、本酵素の基質特異性によるものと考えられ、大豆種子からのデアミダーゼの精製が望まれる。さらに、本酵素の精製と cDNA ライブラリーの作成を試みている。

文 献

- 1) Vaintraub IA, Kotova LV and Shaha RK(1992): Protein deamidase from germinating wheat grains. *FEBS Lett*, **302**, 169-171.
- 2) Matsudomi N, Tanaka A, Kato A and Kobayashi K(1986): Functional properties of deamidated gluten obtained by treating with chymotrypsin at alkaline pH. *Agric Biol Chem*, **50**, 1989-1994.
- 3) Kato A, Tanaka A, Matsudomi N and Kobayashi K(1987): Effects of deamidation with chymotrypsin at pH 10 on the functional properties of proteins. *J Agric Food Chem*, **35**, 285- 288.
- 4) Kato A, Lee Y and Kobayashi K(1989): Deamidation and functional properties of food proteins by the treatment with immobilized chymotrypsin at alkaline pH. *J Food Sci*, **54**, 1345-1347.
- 5) Pearce KM and Kinsella JE(1978): Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *J Agric Food Chem*, **26**, 716-723.
- 6) Kato A, Takahashi A, Matsudomi N and Kobayashi K(1983): Determination of foaming properties of proteins by conductivity measurements. *J Food Sci*, **48**, 62-65.