

大豆たん白質の低温変性機構の解析と応用

林 力丸*

京都大学大学院農学研究科

Research and Application of Cold Denaturation of Soy Protein

Rikimaru HAYASHI

Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502

ABSTRACT

Protein coagulates or gelatinizes by high pressure-treatment as well as by heat-treatment. Pressure-denaturation of protein could be brought about by pressurization even at low temperature. To elucidate the cold denaturation process under high pressure and to apply the process to food protein gelation, we studied the possibility of cold-denaturation with approximately 30 proteins stocked in our laboratory by treating them at 60 ~ -30°C under 400 MPa. As a result, we found that carboxypeptidase Y denatured at -20°C under 200 MPa. The denaturation process was studied by means of fluorescence and absorption spectroscopy and circular dichroism under high pressure (*in situ* observation) and after high-pressure treatment (*ex situ* observation) in reference to its heat-denaturation process. Soy proteins caused pressure-induced coagulation depending on the temperature, but further studies are required to apply the cold denaturation process to forming soy protein gel of high quality. *Soy Protein Research, Japan* **3**, 18-21, 2000.

Key words : soy protein, cold denaturation, pressure denaturation, carboxypeptidase Y

高圧力はたん白質の二次および三次構造を壊す(変性)のための“試薬でない変性剤”として次第に便利に用いられている。これはたん白質の真の姿を理解するには、温度因子(T)と圧力因子(P)の両者が必要という根本的な理由のほかに、圧力は瞬時に除去できるという操作上の利点もあるからである。

たん白質変性は、従来、2状態遷移として多くは観

察されたが、圧力による変性は3段階以上の多状態遷移としてしばしば観察される。この中間の変性状態はモルテングロビュール様状態と呼ばれることが多い。圧力を変性因子とするには、温度を指定しないと状態記述として十分ではない。圧力変性は室温加圧でも観察されるが、氷点下を含む低温での加圧で容易に観察されている。水の氷点下で見られる低温変性の観察には不凍結溶媒や過冷却水の使用など特別な方法論が必要という技術的な理由で、従来は広く研究されてい

*〒 606-8502 京都市左京区北白川追分町

い。

たん白質の圧力変性の多くは可逆的であり、しかも、pH、熱、化学試薬による変性とは異なることが明らかになってきた。加熱変性と圧力変性の大きな違いは、前者が2状態遷移であるのに対し、後者はモルテングロビュール様の中間的変性状態を経由する多状態遷移である点である。

たん白質の圧力変性は、圧力下で測定 (*in situ* の測定) するのと圧力処理を一定時間行ない圧力解除後に測定 (*ex situ* の測定) するのとではしばしば異なる。最近になり、圧力をかけたまま紫外・可視領域の吸収や蛍光を容易に測定する小型圧力容器が入手しやすくなっている。

本報告では、たん白質の圧力変性に関する最近の研究を紹介し、圧力変性により変性中間体が観察されやすいこと、圧力変性は低温での加圧で起こりやすいことなどを指摘する。さらに、T 因子に加うるに P 因子を低温食品加工に応用する可能性について述べてみたい。

方 法

圧力処理は *in situ* と *ex situ* とともに主としてテラメックス社製の装置を用いたが、500 MPa 以上の圧力処理はフランス国立保健研究所の Dr. Balny 研究室の高圧装置を用いた。 *In situ* の分光分析にはサファイア製の窓付き高圧容器を使用した。カルボキシペプチダーゼ Y (CPY) および無糖鎖 CPY は研究室所蔵のものを用いた。なお、後者は糖鎖結合部位のアスパラギンをアラニンに置換して作製したものである。

結果と考察

CPY の低温・高圧力変性

CPY¹⁾ は *Saccharomyces cerevisiae* 由来の 61 kDa の糖たん白質であり、セリンプロテアーゼに分類される。糖鎖は分子量の約 16% を占め、およそ同サイズの 4 本の鎖からなる。本酵素は常圧では数回凍結融解を繰り返しても失活しない。この高い抵抗力は必ずしも糖鎖に起因しているわけではない²⁾。

CPY の低温変性に果たす糖鎖の役割を検討するため、野生型 CPY (WtCPY) と部位特異的変異により得られた無糖鎖型 CPY (Δ glyCPY) の低温・高圧変性を比較し、糖鎖の役割を調べた^{3,5)}。天然型 CPY の変性は *in situ* (圧力下) で測定し、不可逆的変性は *ex situ* (圧力解除後) で測定した。

***In situ*での観察** CPY に対する低温下での高圧力の影響を調べるため、固有の蛍光変化、ANS 結合の蛍光変化、活性変化を *in situ* で測定した。構造変化は高圧電気泳動により追跡した。その結果、野生型 CPY の圧力変性は少なくとも 3 状態遷移であることが明らかとなった。ここで遷移の半分の圧力を P_{m1} , P_{m2} , P_{m3} とした (Fig. 1)。

150 MPa 以下の圧力は蛍光の最大波長をわずかに青色移動させるだけで、結合した ANS の蛍光は増加せず、活性はわずかに減少するにとどまった。これは速度論的現象に高圧力が影響を与えたものである。この結果から、この圧力下では WtCPY の構造変化は少なく、天然状態に近い構造をしていると考えられた。

200~500 MPa の圧力では、ANS 蛍光の増加と活性の

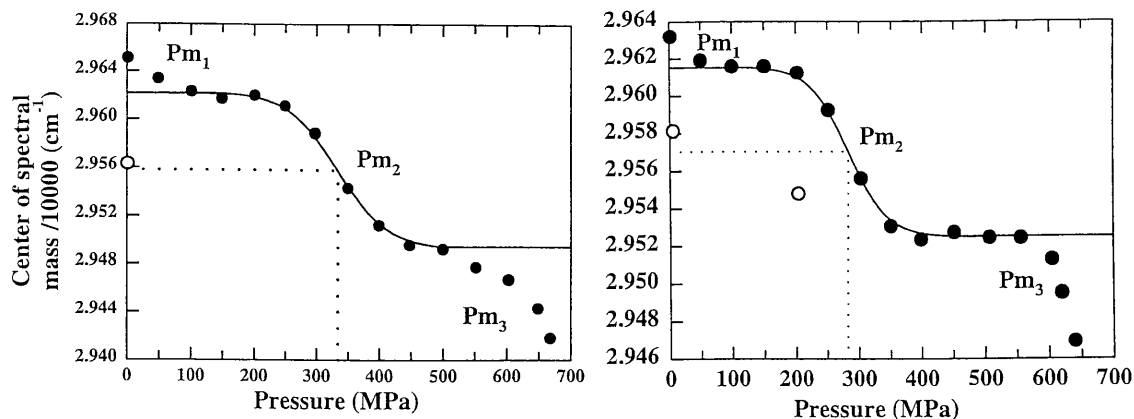


Fig. 1. Pressure-induced changes at 25°C of wild type (left) and deglycosylated (right) carboxypeptidase Y in the intrinsic fluorescence upon the stepwise pressure increase (●) and the stepwise decrease from the highest pressure reached (○).

減少に伴い、蛍光の最大波長は大きく青色移動した。これは、この圧力下では芳香族残基や疎水性コアは圧力変性により溶媒に露出することを示す。

550 MPa 以上の圧力は蛍光の最大波長を大きく青色移動させ、ANS 結合の蛍光を増加させた。これから、さらに大きな構造変化がおこることが分かる。

ANS の結合による蛍光はモルテングロビュールの特性であるから、圧力により誘発された第 2, 3 番目の状態はモルテングロビュール様状態といえる。

野生型酵素の 3 状態遷移によく似たプロセスは Δ glyCPY でも観察できた。興味深いことは両酵素の第 2 遷移の中間圧力 P_{m2} は WtCPY と Δ glyCPY の構造的感受性を比較するためのパラメータとなっている。すなわち、 $-22 \sim 25^\circ\text{C}$ において、 Δ glyCPY の P_{m2} が WtCPY のそれよりも約 50 MPa 低い。これらの結果は、圧力に誘発される低温変性を糖鎖が保護することを示唆している。高圧力下での活性測定や電気泳動もこの推定を支持した。

Ex situ での観察 低温・高圧処理の不可逆的効果を研究するために、圧力 (0.1~400 MPa) と温度 ($-22 \sim 25^\circ\text{C}$) を変化させ、30 分間処理した後除圧し、大気圧下で活性を測定した³⁾。

その結果、*in situ* の測定では 400 MPa、 25°C で処理すると WtCPY は完全に失活したが、*ex situ* の測定では処理前の 75% も残存活性があった。これは、圧力失活は圧力を解除すると即座に部分的に戻ることを示している。部分的な不可逆変性はたん白質の凝集が原因でないことは SDS なしのポリアクリルアミドゲル電気泳動により確認できた。また、失活した CPY はより高い分子量として観察された。この構造を固有の蛍光や ANS 結合蛍光、円偏光二色性により調べたところ、ANS も結合せず、二次構造が半分残った状態であり、また、活性もないので、モルテングロビュール状態の特徴を備えていると結論した。

200 MPa、 -10°C で行った実験を除いて、WtCPY と Δ glyCPY の残存活性に大きな違いはなく、両者の違い

Table 1. Cohesiveness and gumminess of heat- and pressure-induced gels of ovalbumin and soy protein¹

Temp ² °C	Pressure ³ MPa	Gels of ovalbumin 15% w/w, pH 4.4		Gels of soy protein 17% w/w, pH 6.8	
		Cohesiveness	Gumminess	Cohesiveness	Gumminess
		T. U. ⁴	T. U. ⁴	T. U. ⁴	T. U. ⁴
		Avg $\pm$ S. D.	Avg $\pm$ S. D.	Avg $\pm$ S. D.	Avg $\pm$ S. D.
50	500	0.804 $\pm$ 0.039	520.77 $\pm$ 55.55	0.820 $\pm$ 0.016	139.98 $\pm$ 9.89
50	400	0.745 $\pm$ 0.016	204.93 $\pm$ 14.42	0.896 $\pm$ 0.023	122.07 $\pm$ 7.93
50	300	0.380 $\pm$ 0.072	32.06 $\pm$ 6.10	0.913 $\pm$ 0.029	104.18 $\pm$ 7.13
50	210	no gel formed	no gel formed	no gel formed	no gel formed
25	500	0.771 $\pm$ 0.048	222.36 $\pm$ 38.21	0.950 $\pm$ 0.031	107.77 $\pm$ 9.83
25	400	0.746 $\pm$ 0.037	117.85 $\pm$ 8.03	0.943 $\pm$ 0.069	102.09 $\pm$ 11.68
25	300	no gel formed	no gel formed	0.925 $\pm$ 0.015	72.66 $\pm$ 5.48
25	210	no gel formed	no gel formed	no gel formed	no gel formed
10	500	0.746 $\pm$ 0.039	282.42 $\pm$ 44.02	0.930 $\pm$ 0.034	78.27 $\pm$ 6.33
10	400	0.753 $\pm$ 0.032	321.83 $\pm$ 20.67	0.870 $\pm$ 0.005	61.26 $\pm$ 1.75
10	300	0.637 $\pm$ 0.033	62.87 $\pm$ 15.16	0.850 $\pm$ 0.005	56.00 $\pm$ 1.90
10	210	no gel formed	no gel formed	no gel formed	no gel formed
-5	500	0.694 $\pm$ 0.012	336.99 $\pm$ 22.38	0.887 $\pm$ 0.054	69.58 $\pm$ 7.00
-5	400	0.738 $\pm$ 0.059	367.18 $\pm$ 33.36	0.829 $\pm$ 0.038	49.37 $\pm$ 2.27
-5	300	0.752 $\pm$ 0.026	348.38 $\pm$ 16.62	0.873 $\pm$ 0.049	55.83 $\pm$ 1.25
-5	210	no gel formed	no gel formed	no gel formed	no gel formed
-20	500	0.727 $\pm$ 0.024	49.23 $\pm$ 5.54	no gel formed	no gel formed
-20	400	0.752 $\pm$ 0.038	76.76 $\pm$ 0.54	no gel formed	no gel formed
-20	300	0.700 ⁵	72.8 ⁵	no gel formed	no gel formed
-20	210	0.695 $\pm$ 0.069	254.11 $\pm$ 16.88	0.802 $\pm$ 0.007	10.95 $\pm$ 0.20
100 ^b	0.1	0.800 $\pm$ 0.012	464.30 $\pm$ 39.76	0.912 $\pm$ 0.007	289.26 $\pm$ 16.32

¹Discs of gels prepared as described in text.

²Heated for 10 min in a boiling water bath.

³Pressurized for 30 min.

⁴Texture unit.

⁵only one measurement was done.

は特別な条件下でのみ見られるものである。

以上の結果、2状態遷移の熱変性に対し、CPYの低温変性は少なくとも2つのモルテングロビュール様状態を経由する複数の遷移プロセスをとることが明らかとなった。この多段階遷移プロセスはCPYの構造ドメインの連続した変性によるものと思われる。このプロセスの可逆性は-22℃から25℃までの圧力処理で減少するから、ここで観察したモルテングロビュール様状態は部分的に不可逆的な変性状態と言える。さらに、糖鎖は多少とも安定性に影響を与え、ネイティブ状態のCPYを保護している。

大豆たん白質などの圧力変性

たん白質をゲル化するためには、何らかの変性プロセスを必要とする。その場合、低温処理は食品の処理としては望ましいし、高圧処理によりモルテングロビュール状態ができれば、それは新しいゲル物性の創製につながる。このため、低温・高圧力処理は食品加

工のユニットプロセスとして期待できる。

オボアルブミン、卵黄、大豆たん白質に-20℃から50℃のもとで500 MPaまでの高圧をかけて、生成するゲルの性質を加熱ゲルの性質と比較した結果、低温での高圧処理によりゲル化に必要な圧力は低くなった⁴⁾。特に、卵黄と大豆たん白質では、温度が低いほどゲル化効果が大きかった (Table 1)。

食品の劣化を抑え、新しいテクスチャーをもたらす「高圧低温食品加工法」は、実用化の近い生ハム、ハム状鮭肉、スリミ加工に生かされている^{5,6)}。本報告ではたん白質を中心に述べたが、デンプンの構造変化も低温・高圧力処理が効果的らしい⁷⁾。

温度 (T) に加うるに圧力 (P) という因子を食品の加工・貯蔵に導入しようとする開発研究や実用化試験が盛んになるにつれ、応用を支える高圧バイオサイエンスあるいは高圧バイオテクノロジーともいべき基礎研究の進展が不可欠になっている。

要 約

たん白質は熱処理と同様に圧力処理により凝固したりあるいはゲル化する。圧力凝固は中程度あるいは高温での高圧力処理だけでなく低温での高圧力処理で凝固する。本研究では、低温・圧力失活を調べるため、研究室に保存されている約30種のたん白質を60～-30℃の下で400 MPaまでの圧力処理することにより調べた。その結果、カルボキシペプチダーゼYが-20℃における200 MPaの圧力処理で活性を失うことを見出した。そこでこの酵素の活性と構造の変化を圧力下での「その場観察法」と圧力処理後の観察法により、主として分光学的に観察した。その結果、本酵素は圧力下で少なくとも3段階の遷移をすること、低温での圧力処理では高温での圧力処理と同様に変化しやすいことを明らかにした。また、大豆たん白質のゲル化も低温・高圧処理で起こりやすいことを明らかにした。

文 献

- 1) Hayashi R (1976): Carboxypeptidase Y. *Methods Enzymol*, **45**, 568-587.
- 2) Shimizu H, Ueno H and Hayashi R (1999): Role of carbohydrate moiety in carboxypeptidase Y: Structural study of mutant enzyme lacking carbohydrate moiety. *Biosci Biotechnol Biochem*, **63**, 1045-1050.
- 3) Dumoulin M, Ueno H, Hayashi R and Balny C (1999): Contribution of the carbohydrate moiety to conformational stability of the carboxypeptidase Y: High pressure study. *Eur J Biochem*, **262**, 475-483.
- 4) Dumoulin M, Ozawa S and Hayashi R (1998): Textural properties of pressure-induced gels of food proteins obtained under different temperatures including subzero. *J Food Sci*, **63**, 92-95.
- 5) Dumoulin M and Hayashi R (1998): High pressure, a unique tool for food texturization. *Food Sci Technol Int Tokyo*, **4**, 99-113.
- 6) Kato M and Hayashi R (1999): Effects of high pressure on lipids and biomembranes for understanding high-pressure-induced biological phenomena. *Biosci Biotechnol Biochem*, **63**, 1321-1328.
- 7) Douzals JP, Perrier-Cornet JM, Grrais P and Coquille JC (1999): Hydration and pressure-temperature phase diagrams of wheat starch. In: *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology*. Ludwig H, ed., Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 333-336.