

Achromobacter Protease Iを利用する小麦グルテンの 栄養機能の改善

第3報 小麦グルテン修飾物の消化性

米倉政実・中谷哲郎

緒 言

現在、小麦は食品素材として広く利用されているが、小麦を原料とするタンパク食品は、小麦の主要タンパク質であるグルテンを出発物質として用いているので、その栄養価はグルテンによって支配されると考えられる。グルテンの第1制限アミノ酸はリジンで、その生物価は58、アミノ酸スコアは25ではなほ低い¹⁾²⁾。したがって、食品素材としてグルテンを用いる場合、この制限必須アミノ酸であるリジンの強化が重要となる。

従来、この目的のためには、タンパク質への制限アミノ酸（グルテンの場合はリジン）の添加や相補的なアミノ酸組成をもつ異種タンパク質の混合などが行われてきた³⁾。さらに最近では、食品タンパク質への制限必須アミノ酸の共有結合による付加が試みられている³⁾。この手法として、化学的方法と酵素的方法が用いられているが、後者においてはトランスグルタミナーゼ（EC 2.3.2.13）が利用されている⁴⁾。

副島⁵⁾及び甲田ら⁶⁾は、正木ら⁷⁾⁸⁾によって発見されたリジールペプチド結合にのみ特異的に作用するリジールエンドペプチダーゼの1種である *Achromobacter* Protease I（以下、APIと略す、EC 3.4.21.50）を利用して、まず、APIを小麦グルテン（以下、未修飾グルテンという）に作用させて加水分解させたのち、その分解生成物（以下、グルテン水解物と略す）のC末端にリジンメチルエステル（以下、Lys-OMeと略す）を結合させることにより、グルテンのリジン含量を約1.6倍に増加させたグルテン修飾物を調製することに成功した。

ところで、タンパク質を食品素材として利用するにあたって、その栄養評価は必要不可欠なことである。そこ

で、本研究では、このAPIによって機能の改善されたグルテン修飾物の栄養機能特性の評価の1つとして、プロテアーゼを用いる *in vitro* 消化試験を行った。

材料及び方法

1. 試料及び試薬

未修飾グルテン、グルテン水解物及びグルテン修飾物は、茨城大学農学部教授副島正美博士より提供されたものを使用した。ペプシン（ブタ胃粘膜、2,850Units/mgタンパク質）、トリプシン（ウシ膵臓、10,200Units/mgタンパク質）及びパンクレアチン（ウシ膵臓、グレードIII）は、いずれもシグマ社製のものを用いた。2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム（特級、以下、TNBSと略す）はナカライテスク社製のものを使用した。その他の試薬は、和光純薬工業製の特級及び液体クロマトグラフ用試薬を用いた。

2. *In vitro* 消化試験

ペプシン、トリプシン及びパンクレアチンによる消化試験は、稲川ら⁹⁾の方法を一部改変して、以下のようにして行った。すなわち、ペプシンによる場合は、0.1M塩化カリウム-塩酸緩衝液（pH1.9）19mlを用いて、トリプシン及びパンクレアチンによる場合は、0.2Mトリス-塩酸緩衝液（pH7.5）19mlを用いて、それぞれ試料タンパク質100mgを溶解し、基質溶液とした。次に、この基質溶液を37°C、10分間保持したのち、ペプシン、トリプシンまたはパンクレアチン溶液1ml（いずれも酵素1mgを含有）を添加し、60分間酵素消化を行った。消化後、反応液1mlに20%（W/V）トリクロロ酢酸水溶液を同容添加し、遠心分離（16,000×g、5分、4°C）して得られた上清0.2mlについて、遊離アミノ基を、TNBSを用いる

McKellar¹⁰⁾の方法により定量した。

試料タンパク質の消化性は、タンパク質分解度、すなわち、反応液 1 ml あたりに生成された遊離アミノ基の μmol 数で表した。

3. 高速液体クロマトグラフィー

高速液体クロマトグラフ (L-6000型, 日立製作所製) を用い、消化生成ペプチドの分子量測定及びペプチドマッピングを行った。

試料の調製は以下のようにして行った。すなわち、前述の反応液 1 ml について沸騰水中で10分間加熱して消化反応を停止させたのち、HVフィルター (0.45 μm , 日本ミリポア工業製) を用いて濾過し、この濾液をそのまま試料として用いた。

高速ゲル濾過によるペプチドの分子量の測定には、昭和電工製Shodex WS-802.5F (8 \times 300mm) カラムを用いた。移動相としては0.1%トリフルオロ酢酸を含む45%アセトニトリルを用い、流速0.5ml/minで溶出を行い、ペプチドの検出は紫外検出器を用いて220nmで行った。

消化生成ペプチドのマッピングは、センシユー科学製 VP-318-1251 (4.6 \times 250mm) カラムを用い、逆相分配クロ

マトグラフィーにより行った。溶媒として、移動相 A (0.1%トリフルオロ酢酸) 及び移動相 B (0.1%トリフルオロ酢酸を含む100%アセトニトリル) を用い、溶出は流速1.0ml/minで、まず35分間にわたって、移動相 B の割合を 0% から 40% に、さらに15分間にわたって移動相 B の割合を40%から100%に、それぞれ直線的に変化させて行った。また、ペプチドは220nmの紫外吸収により検出した。

結果及び考察

1. グルテン修飾物の消化性

未修飾グルテン、グルテン水解物及びグルテン修飾物の *in vitro* 消化試験の結果を、表 1 にまとめて示した。

ペプシンによる消化性は、未修飾グルテンに比し、グルテン水解物では94%の値を示し、わずかな低下しかみられなかったが、グルテン修飾物では85%となり、さらに低下した。

トリプシンによる消化性は、未修飾グルテンに比べ、グルテン水解物では97%となり、ほとんど変化はみられなかったが、グルテン修飾物では66%と大きく低下する

Table 1. Digestibilities of native, hydrolyzed and modified wheat glutens with pepsin, trypsin and pancreatin.

Protease	Wheat gluten	Digestibility (Amino group $\mu\text{mol}/\text{ml}$)	Relative digestibility (%)
Pepsin	Native	0.905	100
	Hydrolyzed	0.852	94
	Modified	0.764	85
Trypsin	Native	0.349	100
	Hydrolyzed	0.338	97
	Modified	0.230	66
Pancreatin	Native	0.383	100
	Hydrolyzed	0.907	237
	Modified	0.710	186

ことがわかった。また、トリプシンによる消化性はペプシンによるそれよりもいずれのグルテンにおいても低く、ペプシンによるタンパク質分解度の約25~39%の値であった。

これに対して、パンクレアチンによる消化性は、未修飾グルテンに比べ、グルテン水解物では約2.4倍、グルテン修飾物では約1.9倍にそれぞれ増大し、ペプシンによる消化性とほぼ同じレベルに達することがわかった。

ペプシンによる消化性が、APIにより部分的に加水分解されたグルテン水解物及び、これにLys-OMeを結合させたグルテン修飾物で、それぞれ6%及び15%低下した原因は明らかではないが、ペプシンが疎水性アミノ酸部位を比較的よく切断する¹¹⁾ことから考えると、ペプシンの基質特異性が主因であるとは考えにくい。それよりも基質の分子量（ペプチドの大きさ）の変化による影響がその1つとして考えられる。すなわちAPIによる部分的加水分解により基質分子のサイズが小さくなったために、ペプシンが作用しにくくなった可能性が推察される。また、基質分子のC末端側にLys-OMeが結合したことによる基質分子の疎水性度の変化が考えられるので、この変化による影響もありうるであろう。

トリプシンによる消化性が、グルテン水解物では未修飾グルテンとほとんど変わらなかったのに対して、グルテン修飾物では34%の低下を示した原因は、おそらく、Lys-OMeという修飾されたリジン残基がペプチドのC末端に結合したことにより、リジン及びアルギニン残基に基質特異性をもつトリプシンによる加水分解を受けにくくなったものであろう。

これらに対して、パンクレアチンによる消化性が、グルテン水解物及びグルテン修飾物で、いずれもほぼ2倍前後の値に増加したのは、APIによりグルテンが部分的に加水分解を受けた結果、パンクレアチンに含まれているトリプシン、キモトリプシン、エラスターゼ、カルボキシペプチダーゼなどによる分解を受けやすくなったためと推察される。また、トリプシンによる消化性とパンクレアチンによる消化性の違いは、パンクレアチンに含まれている種々のプロテアーゼの相乗的な作用によるもの

のと考えられる。

以上の結果から、グルテン修飾物の消化性は、ペプシンまたはトリプシンによる場合は低下するが、パンクレアチンでは増大することが明らかになった。

一般にタンパク質の人工消化試験において、ペプシンによる消化（37°C、3時間）後、さらにパンクレアチンにより消化（37°C、24時間）して、消化率を求める方法がよく用いられる¹²⁾。本実験は、3種のプロテアーゼによる消化性の違いならびに初期の消化反応の違いを明らかにする目的で行ったので、このペプシン-パンクレアチンによる方法は用いなかった。したがって、ヒトや動物の消化管内での消化性について、本実験の結果のみからは結論づけることはできないけれども、グルテン修飾物のペプシンによる消化性の低下はそれほど大きくないことと、パンクレアチンによる消化性の増大を考えあわせると、総合的には、グルテン修飾物の消化性は未修飾グルテンに比べ、同等以上であるものと推察される。

2. 消化生成ペプチドの分子量分布

高速ゲル濾過によるペプチドの分子量測定に先立って、分子量既知のタンパク質及びペプチドを用いて、標準曲線の作製を行った。その結果を図1に示す。オボアルブミン（分子量43,000）からブラジキニン（分子量1,060）の間で、直線関係（回帰式 $y = -0.240x + 7.94$ 、相関係数 $r = -0.992$ ）が成り立つことが確かめられたので、この標準線より、消化生成ペプチドの分子量を算出した。

ペプシン消化による生成物のゲル濾過の溶出パターンを図2に示す。未修飾グルテンでは、分子量9,200のペプチドが最も多く、ついで分子量25,000、4,700、3,100及び2,200のペプチドが検出された。これに対して、グルテン水解物及びグルテン修飾物では、分子量9,900と4,600のペプチドが多く、ついで分子量22,000、3,000及び2,000のペプチドが見いだされた。また、これら3種のグルテンでは、生成ペプチドの分布が、全般的に類似していることがわかった。

本実験で使用した未修飾グルテンの成分タンパク質の分子量を同様の方法で測定した結果、分子量40,000の成分が最も多く、ついで分子量70,000と60,000の成分が含

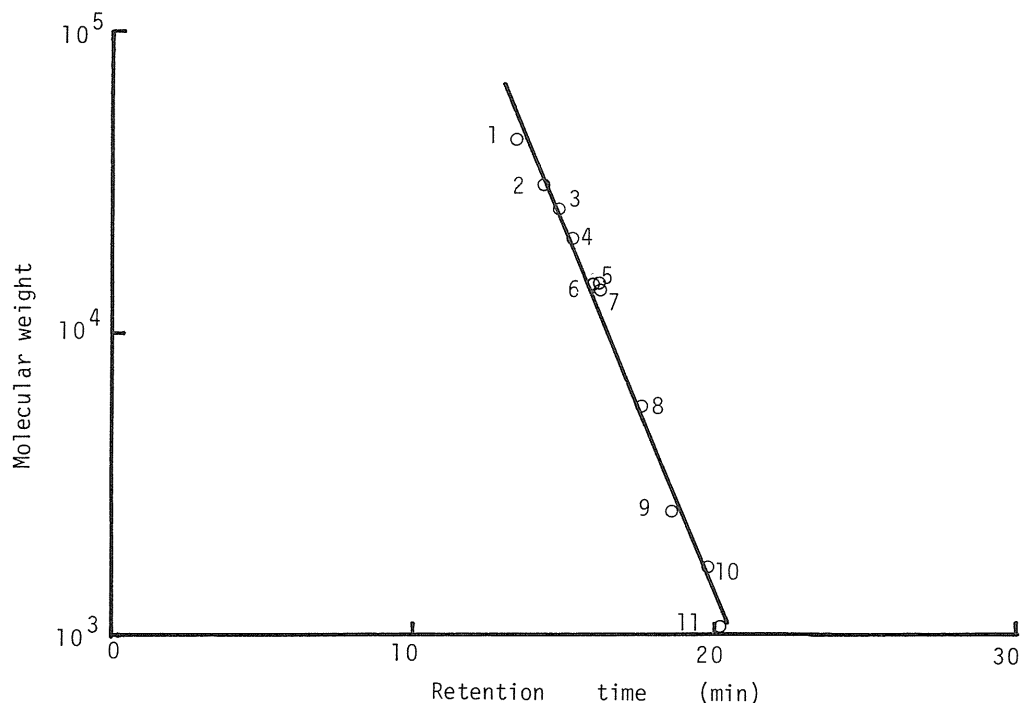


Fig. 1. Calibration curve for the molecular weight determination of peptides by high-performance gel filtration.

The proteins used (and their molecular weights) were: 1=ovalbumin (43,000), 2=carbonic anhydrase (30,000), 3=chymotrypsinogen A (25,000), 4=trypsin inhibitor (20,000), 5=myoglobin (17,200), 6= α -lactalbumin (14,400), 7=ribonuclease A (13,700), 8=insulin (5,730), 9=myoglobin III (2,556), 10=myoglobin (1~14) (1,695), 11=bradykinin (1,060).

まれていることが判明した。したがって、ペプシン消化では、いずれのグルテンも消化により成分タンパク質は分子量が半分以下のペプチドに分解されていることが明らかに became。

次に、トリプシン消化生成物のゲル濾過の溶出パターンを図3に示す。未修飾グルテンでは、分子量38,000の成分が最も多く、ついで分子量21,000, 8,400, 3,200, 2,100及び1,700のペプチドが見いだされた。一方、グルテン水解物とグルテン修飾物の場合は、分子量3,800のペプチドが最も多く、ついで分子量32,000, 20,000, 8,400及び1,700のペプチドが検出され、これら両グルテンで、そのペプチドのパターンは極めて類似していた。未修飾グルテンとグルテン修飾物(またはグルテン水解物)との間で、ゲル濾過の溶出パターンがかなり異なることと、

後二者ではより小さなペプチドにまで速やかに分解されているのは、グルテン修飾物及び水解物がAPIによる部分的加水分解をあらかじめ受けているためと考えられる。

さらに、パンクレアチンによる消化生成物のゲル濾過の溶出パターンを図4に示す。未修飾グルテンでは、分子量20,000の成分が最も多く、ついで分子量8,800, 3,700及び1,600のペプチドが生成されていることがわかった。一方、グルテン水解物及びグルテン修飾物では、いずれも分子量3,700のペプチドが主要生成物であり、ついで、分子量13,000, 8,700, 6,700及び1,700のペプチドが生成されており、また、両グルテンでそのパターンは類似していた。トリプシン消化の場合と同じく、グルテン水解物及びグルテン修飾物のほうが、未修飾グルテンよりも低分子化されやすかったことは、APIによる前処理のた

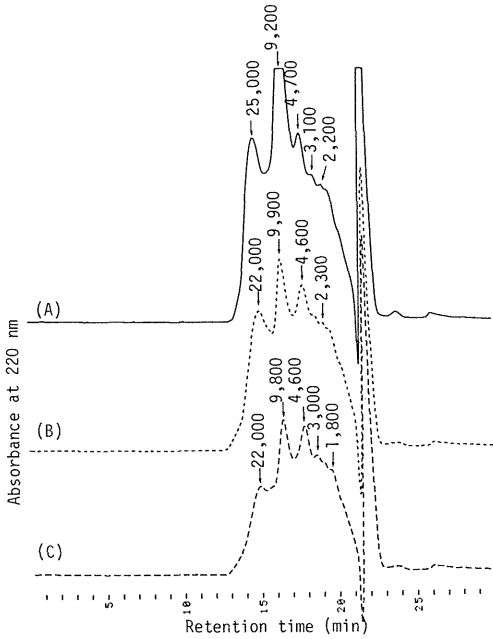


Fig. 2. High-performance gel filtration of peptic digests of native (A), hydrolyzed (B) and modified (C) gluteins on Shodex WS-802.5 F column.

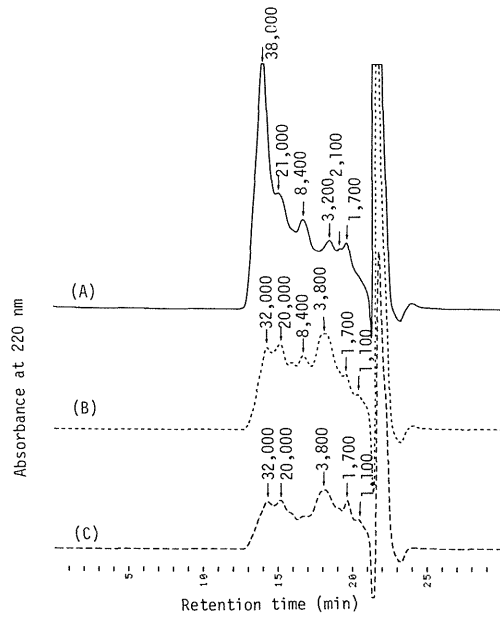


Fig. 3. High-performance gel filtration of tryptic digests of native (A), hydrolyzed (B) and modified (C) gluteins on Shodex WS-802.5 F column.

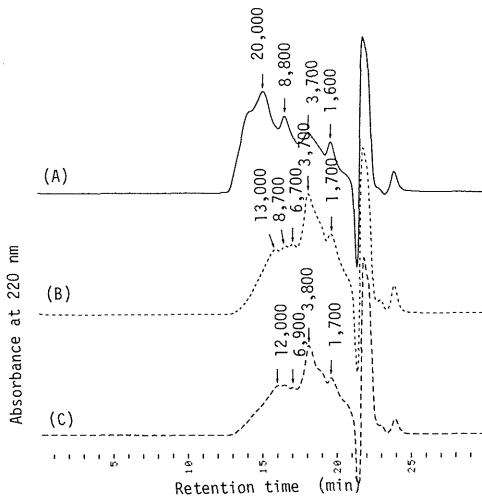


Fig. 4. High-performance gel filtration of pancreatic digests of native (A), hydrolyzed (B) and modified (C) gluteins on Shodex WS-802.5 F column.

めと考えられる。

以上のことから、ペプシンによる消化の場合は3種のグルテンで、生成ペプチドの分子量とその分布はほぼ類似しており、分解の様相には大差なかったと考えられるが、トリプシン及びパンクレアチン消化では、未修飾グルテンよりもグルテン水解物及びグルテン修飾物のほうが速やかに低分子化されやすいことが明らかになった。この原因として、第1に、APIによる前処理(部分的加水分解)が考えられるが、ペプシン消化では同様の影響は強くあらわれなかったことを考慮すると、これ以外にも、たとえばプロテアーゼの基質特異性の違いなどの原因があると思われる。

また、表1に示したように、グルテン修飾物のトリプシンによる消化性、すなわち、単位時間あたりのタンパク質分解度は、未修飾グルテンに比べ、低下したが、前述のように、グルテン修飾物は未修飾のものより、トリプシンにより低分子化されやすいと考えられるので、ト

リブシンによる質的な消化性はグルテン修飾物で劣っているとは言えないと考えてよいであろう。

3. 消化生成ペプチドのマッピング

逆相分配クロマトグラフィーによる消化生成ペプチドのマッピングを行った結果を、図5～7に示す。

ペプシン消化生成物のペプチドマップ(図5)は、3種のグルテンで類似していた。アセトニトリル濃度40%以下で、大部分のペプチドが溶出された。したがって、これらのペプチドの疎水性度はそれほど強くないものと推察される。なお、保持時間48分以降に溶出されているピークは、種々検討した結果、いずれも溶媒中の未知物質によるもので、ペプチドではないことが判明した。

トリプシンによる消化生成物のペプチドマップ(図6)は、グルテン水解物とグルテン修飾物とは類似していたが、この両者と未修飾グルテンの間ではかなり異なっていた。また、未修飾グルテンでは、アセトニトリル濃度40%以上で溶出されるペプチドがかなり見いだされたのに対して、グルテン水解物とグルテン修飾物ではこれ

らのペプチドはほとんど認められなかった。したがって、未修飾グルテンでは比較的疎水性の高いペプチドが存在することが示唆され、未修飾グルテンとグルテン水解物(またはグルテン修飾物)の間では、生成ペプチドがかなり異なることが推察された。

パンクレアチンによる消化生成物のペプチドマップを図7に示す。アセトニトリル濃度40%以下で溶出されるペプチドのパターンは、3種のグルテンでほぼ類似していた。他方、アセトニトリル濃度40%以上で溶出されるペプチドは、未修飾グルテンでは多量認められたのに対して、グルテン水解物及びグルテン修飾物ではごくわずかな量しか認められず、未修飾グルテンでは疎水性の強いペプチドが多量含まれていることが推察された。

以上の結果から、ペプシンによる消化生成物の逆相分配クロマトグラフィーにおけるペプチドマップは、3種のグルテンで類似しており、また、ゲル濾過の溶出パターンも同様であったことと合わせると、生成ペプチドも3種のグルテンで類似しているものと推察される。他方、

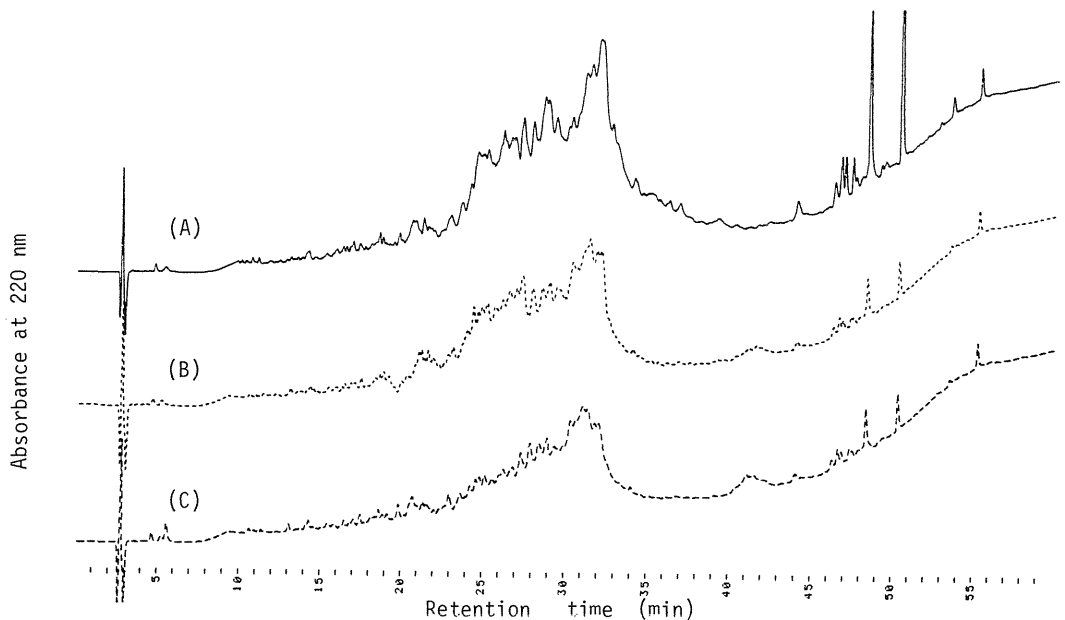


Fig. 5. Elution profiles of peptic digests of native (A), hydrolyzed (B) and modified (C) glutens from Senshu Pak VP-318-1251 column.

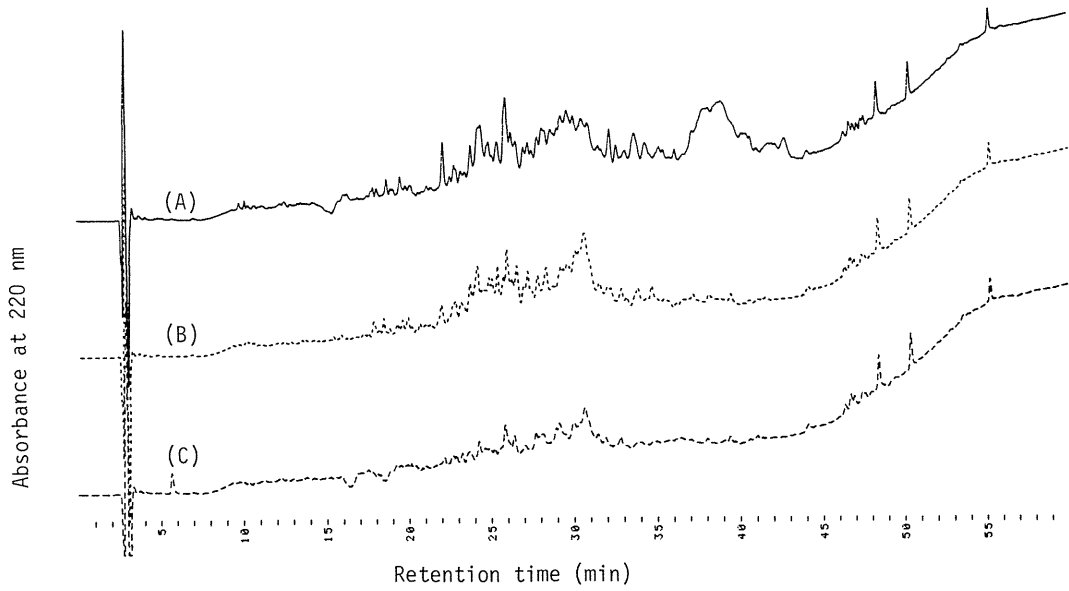


Fig. 6. Elution profiles of tryptic digests of native (A), hydrolyzed (B) and modified (C) glutes from Senshu Pak VP-318-1251 column.

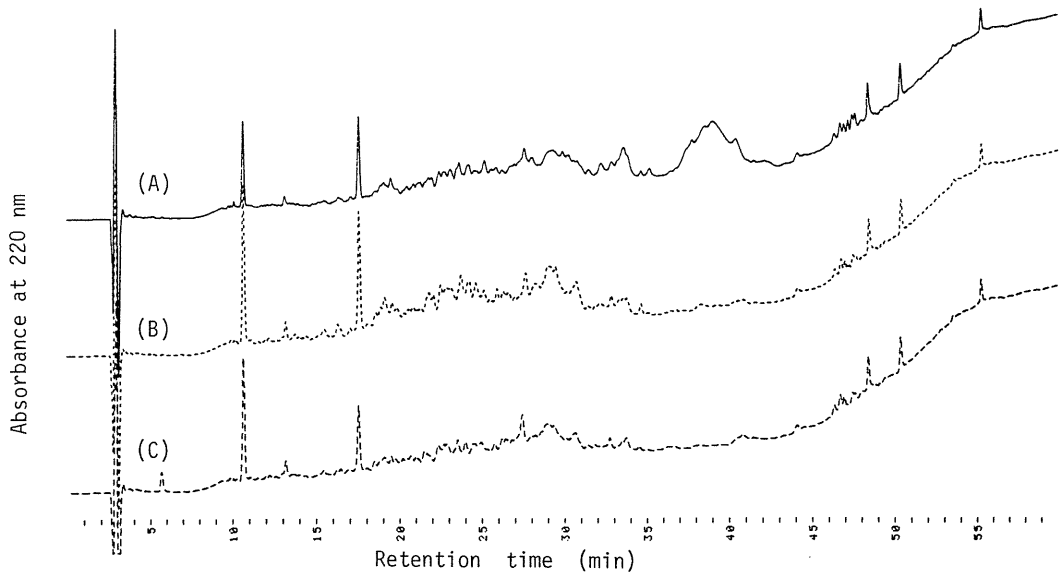


Fig. 7. Elution profiles of pancreatic digests of native (A), hydrolyzed (B) and modified (C) glutes from Senshu Pak VP-318-1251 column.

トリプシン及びパンクレアチン消化による生成ペプチドのマップは、ゲル濾過の溶出パターンと同様に、未修飾グルテンの場合とグルテン修飾物（またはグルテン水解物）の場合とではかなり異なっており、生成ペプチドにも差異があるものと推察される。

これらのことを総合すると、未修飾グルテンと比較して、グルテン修飾物及びグルテン水解物の消化性は、ヒトに摂取された場合にも同等以上であるものと判断してよいであろう。また、トリプシン及びパンクレアチンによる消化生成物が、未修飾グルテンとグルテン修飾物（またはグルテン水解物）とで異なっていることは、生体内での栄養機能特性も異なる可能性を示唆するものである。なお、グルテン修飾物では、Lys-OMe残基を含めてリジン含量が約1.6倍に高められており⁹⁾、小麦グルテンの栄養価が著しく改善されたと言えるが、最終的な判断には次のような検討が必要である。第1に、動物を用いた *in vivo*での消化試験や栄養試験が必須であり、第2に、Lys-OMe残基が栄養機能上、リジン残基と同等であるかどうか、第3に、Lys-OMe残基が、消化吸収後、生体に悪影響を及ぼす可能性はないかどうかについても検討されなければならない。

要 約

Achromobacter Protease Iを利用し、リジンメチルエステルを共有結合させた小麦グルテン修飾物の栄養機能特性を評価するため、プロテアーゼを用いる *in vitro*消化試験を行った。

ペプシン及びトリプシンによる消化性は、グルテン修飾物では未修飾グルテンに比べ、それぞれ、85%及び66%に低下したが、パンクレアチンによる消化性は約1.9倍に増大した。

消化生成ペプチドの分子量及びその分布を高速ゲル濾過法により調べた結果、ペプシンによる消化の場合は、グルテン修飾物と未修飾グルテンとの間で、生成ペプチドの分子量とその分布はほぼ類似していたが、トリプシン及びパンクレアチン消化の場合は、未修飾グルテンよりもグルテン修飾物のほうが、速やかに低分子化されや

すく、また、両グルテンで生成ペプチドの分子量及びその分布はかなり異なっていた。

消化生成ペプチドのマッピングを逆相分配クロマトグラフィーにより行った結果、ペプシン消化生成物のペプチドマップは未修飾グルテンとグルテン修飾物との間で類似していたが、トリプシン及びパンクレアチンによる消化生成物のペプチドマップは、両グルテンでかなり異なることがわかった。

以上の結果から、グルテン修飾物の消化性は、ヒトに摂取された場合にも、未修飾グルテンと比べて、同等またはそれ以上であり、また、消化生成ペプチドが両グルテンで異なることから、生体内での栄養機能特性も両グルテンで異なる可能性が示唆された。

謝 辞

本研究の実施にあたり、試料（未修飾グルテン、グルテン水解物及びグルテン修飾物）を提供された茨城大学農学部教授副島正美博士、同助教授正木武治博士及び甲田公良氏に感謝いたします。また、本研究について、有益なご助言をいただいた同農学部教授堤 将和博士に謝意を表します。

本研究は、昭和62年度茨城大学教育研究学内特別経費及び財団法人食品科学振興財団昭和62年度学術研究助成金により実施された研究プロジェクト（代表者副島正美博士）の一部であり、研究助成に対して厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 勝部幸輝・京極好正・崎山文夫・高木俊夫・中川八郎編：タンパク質 III. 生物編, p. 283 (1987) 東京化学同人
- 2) 渡辺篤二監修：新たんぱく食品の知識, p. 267 (1983) 幸書房
- 3) R.E. フィーニー・J.R.ウィテーカー編：食品・医薬品分野における蛋白質テーラリング, p. 31 (1988) 学会出版センター
- 4) Ikura, K., M. Yoshikawa, R. Sasaki and H. Chiba: