

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

第2報 Achromobacter Protease I によるグルテン加水分解生成物へのリジンの縮合

甲田公良・江又比呂志・正木武治・副島正美

緒 言

前報¹⁾で述べたように、本研究はグルテンへのリジンの導入をAchromobacter Protease I (API) による加水分解反応と縮合反応を利用して達成することを目的にしている。まず、グルテンおよびその構成成分であるグリアジンならびにグルテニンをAPIにより十分に加水分解する条件を検討し、5M尿素の共存が非常に有効であることを明らかにした。各試料についてその結果を利用して、C-端にリジンを有するペプチド区分 (M.W.10KD以上) を、APIによる縮合反応の基質としてそれぞれ調製した。

水および希薄塩類溶液に難溶性な小麦グルテンについては、その取り扱いに種々な困難を伴うために、従来藤巻等によって、市販グルテンを0.01N水酸化ナトリウム溶液に分散させて、Aspergillus産生のアルカリプロテアーゼで加水分解した分子量500以上のグルテン水解物とLys-OEtとを基質として、パパインを用いてリジンを導入する方法²⁾が報告されている程度で縮合反応の応用例はほとんどない。

前述のグルテン等のAPIによる水解生成物とリジンメチルエステルなどリジン誘導体との縮合条件を次の手順で検討した。すなわち、C-端にリジンをもつペプチドのモデルとしてベンゾイルリジン (Bz-Lys-OH) を用い、これとリジン誘導体とのAPIによる縮合反応条件をまず追究した。反応の解析のために生成物を直接分離定量できる高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を採用した。この結果を参考として、グルテン、グリアジンおよびグルテニンのAPIによる水解生成物とリジン誘導体との縮合条件を検討し、モデルの場合とは異なり、4M尿

素を共存させると分解生成物へのリジンの導入が効果的に進行することを明らかにした。リジン誘導体としては著者等の実験の範囲内では、ジリジンメチルエステル (Lys-Lys-OMe) が最大の導入率を示した。以上について報告する。

材料および方法

(1) 酵素：前報¹⁾と同じAchromobacter Protease I を使用した。酵素濃度も同じ方法で測定した。

(2) 基質：ベンゾイルリジン (Bz-Lys-OH) 国産化学製、グルテン、グリアジンおよびグルテニンのAPIによる加水分解生成物 前報により調製、リジンメチルエステル (Lys-OMe)、ヂリジン (Lys-Lys)、チリジンメチルエステル (Lys-Lys-OMe) 国産化学製

(3) HPLCでのBz-Lys-OHと各リジン誘導体との縮合反応生成物の分離と定量：生成物の分離は、TSK gel ODS-80tmカラム (0.46×25cm, C18) を装備した日立638-50型高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で行った。生成物は220nmの吸収で検出した。定量は、反応後HPLCより得た生成物のピークをそれぞれ分取し、乾固した後6N塩酸200 μ l 加え、110°C、24時間加水分解し、アミノ酸自動分析計を用いてリジン量を定量した。導入率 (%) は次式により算出した。

導入率 (%) = (増加したリジン量 / 反応前のリジン量) × 100

(4) カルボキシペプチダーゼ (CPase) - Y法³⁾によるリジン導入率の測定

グルテン、グリアジンおよびグルテニンのそれぞれのAPIによる水解生成物とそれらのリジン誘導体との縮合を試料として、それぞれの10mgに1.0N水酸化ナトリ

ウム溶液550 μ l を加え25°Cで1時間攪拌後1.0N塩酸で中和し凍結乾燥した。

前報と同様にCP-ase Yを作用させて各リジン量を定量した。反応前のリジン量に対する反応後のリジン増加量の比から導入率を算出した。

$$\text{導入率 (\%)} = \frac{\text{リジン増加量}}{\text{反応前の全リジン量}} \times 100$$

反応前後の試料を6N塩酸で加水分解しアミノ酸分析計で定量したリジンの相対的な増加量は、このCPase Y法で得た値とほぼ一致した。

結 果

(1) Bz-Lys-OHとリジン誘導体との最適縮合条件

リジン誘導体としては、Lys-OMe, Lys-Lys-OHおよびLys-Lys-OMeを検討したが、後述のようにLys-Lys-OMeが最も導入率が高かったため、その検討結果を中心に報告する。

Fig. 1はBz-Lys-OHとLys-OMeとの縮合反応後のHPLCでのクロマトグラムである。反応混液は1 ml中に10mM Bz-Lys-OH, 100mM Lys-OMeおよび溶剤(ジメチルフォルムアミド (DMF) : エタノール : 0.2Mリン酸緩衝液 (pH7.0) = 1:1:2) を含み、これに10 μ MのAPIを30°Cで24時間反応させた。1.0M酢酸で反応を停止し、乾固したものをHPLCの試料とした。

Fig. 2はLys-OMeの代りにLys-Lys-OMeを使用し同じ条件で反応させたもののHPLCでのクロマトグラムである。Fig. 1の場合と異なる点は、生成物のピークが2本に分れていることである。Lys-Lys-OHを使用した場合はFig. 2と類似の2本のピークが観察された。この2本のピークは互に接近して居り重複した部分が存在するので正確に分取することが困難であった。そこでBz-Lys-OHと生成物のピークをそれぞれ集め、アミノ酸分析計でリジンを定量し、次式によって導入率 (%) を算出した。

$$\text{導入率 (\%)} = \frac{\text{増加したリジン量}}{\text{反応前のBz-Lys-OHのリジン量}} \times 100$$

Fig. 3はBz-Lys-OHとLys-Lys-OMeとの縮合反応で、上記の条件の下に、酵素濃度およびpHをそれぞれ変化さ

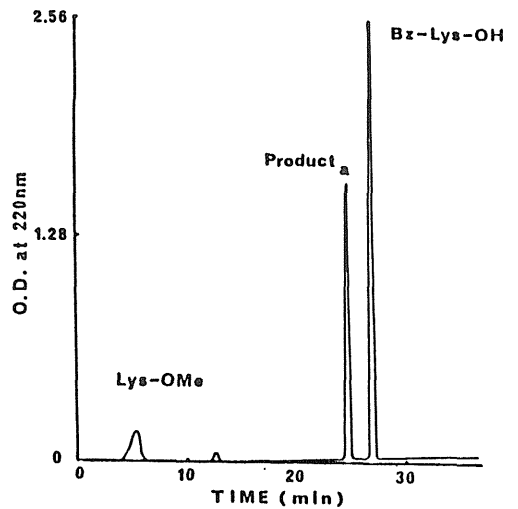


Fig. 1 Reversed phase high performance liquid chromatography separation of Lys-OMe, Bz-Lys-OH and the product using TSKgel-ODS80TM column(C18 4.6mm \times 25cm). Chromatograms were scaled equally to 10mV full scale.

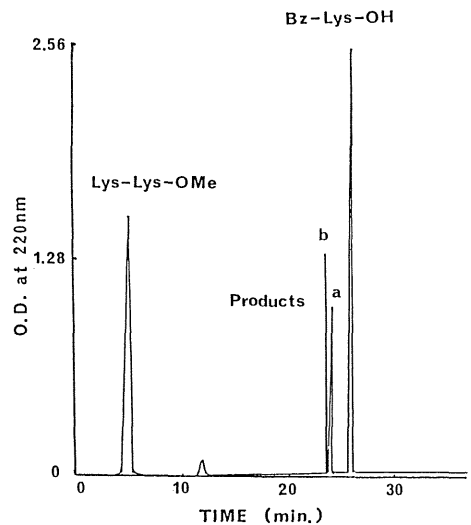


Fig 2 Reversed phase high performance liquid chromatography separation of Lys-Lys-OMe, Bz-Lys-OH and the products using TSKgel-ODS80TM column(C18 4.6mm \times 25cm). Chromatograms were scaled equally to 10mV full scale.

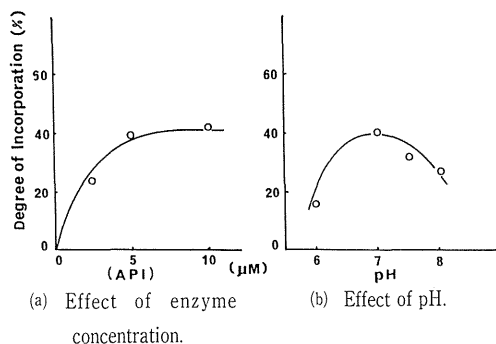


Fig. 3 Effect of enzyme concentration and pH on the incorporation.

The reaction mixture contains 0.1M phosphate buffer (pH 7.0), 100mM Lys-Lys-HCl and 50% DMF: EtOH(1:1) mixture at 30°C.

せてそれらの最適条件を検討した結果である。前者は10 μMで、後者はpH7.0であった。APIの加水分解作用の場合8.5以上が最適である^{1,9)}のと比較すると、明らかに中性側に移動した。

Fig. 4はBz-Lys-OHとそれぞれLys-Lys-OMeまたはLys-Lys-OHとの縮合反応の時間的経過を示した。Lys-Lys-OMeの方が導入率が高く、この条件では約24時間で平衡に達することが認められた。

(2) APIによるグルテン水解物とリジン誘導体との最適縮合条件

モデル実験としてのBz-Lys-OHとリジン誘導体との縮合反応条件を参考として、まず次の実験条件で行った。150mgのAPIによるグルテン水解物と100mMのLys-OHを4M尿素を含む溶剤(0.2Mリン酸緩衝液:DMF:EtOH=2:1:1, pH7.0)2.5mlに分散し、さらにAPIを20 μMになるように加え30°Cで24時間反応させた。1.0M酢酸を2.5ml加えて反応を停止し、セロファンチューブに入れて純水に対して72時間透析を行い、チューブ内容物を凍結乾燥して導入率を測定した。以上の条件を基準として最適縮合条件を追究した。

(a) 有機溶媒の濃度

有機溶媒としては、森原等によって行われたインシュリン半合成をAPIにより成功した例⁹⁾を参考として、

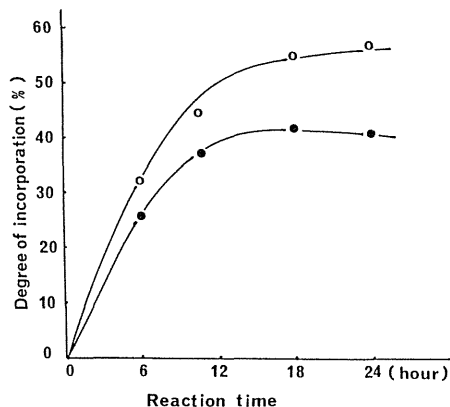


Fig. 4 Time course of the incorporation of Lysine.

The reaction mixture contained 0.2M phosphate buffer (pH 7.0), 10 μM API, 0.1M Lys-OMe and 50%(v/v) DMF: EtOH(1:1) mixture.

The reaction was carried out at 30°C.

-○- 100mM Lys-Lys-OMe
-●- 100mM Lys-Lys-OH

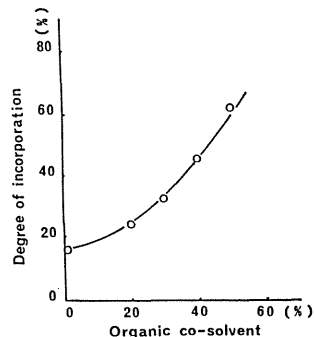


Fig. 5 Effect of the concentration of organic co-solvent (DMF: EtOH = 1:1)

The reaction mixture contained 0.1M phosphate buffer (pH 7.0), 20 μM API, and 5M urea.

The reaction was carried out at 30°C.

DMFとエタノールの当量混合液を使用した。Fig. 5はグルテン水解物とLys-OMeの縮合反応に於て、有機溶媒の濃度について検討した結果である。濃度を50%で打切った理由は、それ以上の濃度では尿素が溶解できなくなる

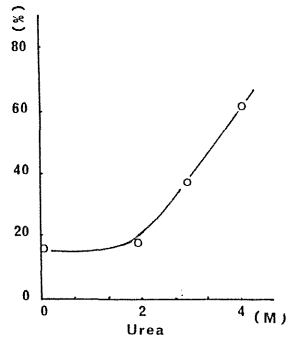


Fig. 6 Effect of urea concentration.

The reaction mixture contained 0.1M phosphate buffer(PH 7.0), 20 μ M API, and 50%(v/v) DMF: EtOH(1:1).

The reaction was carried out at 30°C.

からである。30%以上で導入率に急激な上昇が認められた。

(b) 尿素濃度等

すでにAPIが5M尿素で全く変性失活されぬことを述べた⁴⁾。加水分解の場合に尿素の存在により著しく促進されたが、Fig. 6に見られるように縮合の場合も2M以上で急激な導入率の増加が明らかとなった。また4M尿素の存在下と非存在下で、導入率の時間的経過を検討した結果がFig. 7である。4M尿素の共存下では、24時間で導入率が62.6%となりほぼ平衡化しているのに対して、非共存下では72時間反応を続けても27.3%と低い値であった。Lys-Lys-OMeを用いた場合も、ほとんど同じ様な傾向であった。また、SDS等の共存は尿素の場合より劣った。

Lys-OMeの濃度を変えた検討結果では、100mMで導入率は62.6%となり、それ以上は変化が認められなかった。

(3) APIによるグルテン、グリアジンおよびグルテニン各加水分解生成物へのリジンの縮合反応とケミカルスコアの改善

Table 1は(2)の最適条件で、グルテン水解物と同様にグリアジンおよびグルテニン水解物についても縮合反応を行ったときの導入率とケミカルスコア(蛋白質価)をまとめたものである。

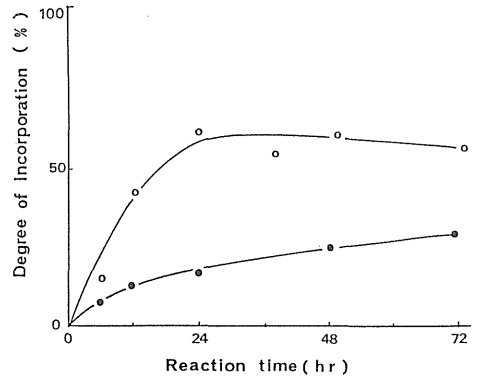


Fig. 7 Time course of the incorporation of Lysine in the presence and the absence of urea

The reaction mixture contained 0.2M phosphate buffer(PH 7.0), 20 μ M API, 0.1M Lys-OMe and 50%(v/v) DMF: EtOH(1:1) mixture.

The reaction was carried out at 30°C.

The urea concentration were as follows;

○) 4M, ●) OM

Table 1 Degree of incorporation(%) and chemical scores of the gluten, gliadin and glutenin.

a) Lys-OMe(100mM)

	Degree of incorporation(%)	chemical scores	
		Control	Product
Gluten	62.5	44	71
Gliadin	54.3	20	31
Glutenin	62.2	51	82

b) Lys-Lys-OMe(100mM)

Gluten	80.3	44	79
Gliadin	65.4	20	33
Glutenin	81.2	51	92

The reaction mixture contained 0.2M phosphate buffer(pH7.0)

20 μ M API, 4M urea and DMF/EtOH(1/1) mixture.

The reaction was carried out at 30°C.

ケミカルスコアは日本食品成分表⁹⁾の標準タンパク質のリジン含量を100として算出した。グルテンのケミカルスコアは44で一般的な小麦タンパク質のそれと大差がなかったが、リジンを導入後は70台にまで上昇した。一方グリアジンのケミカルスコアは20で、縮合反応後の導入率も低くケミカルスコアも30台に止まった。逆にグリシニンでは、反応前が51であったのに対して反応後は80台にまで改善された。さらにLys-Lys-OMeを用いると、導入率もケミカルスコアもLys-OMeを上廻った。

Table 2は3種類のリジン誘導体とグルテン水解物との縮合反応前後におけるケミカルスコアと導入率をまとめ比較した。Lys-OMeとLys-Lys-OHとのリジン導入率はほぼ同程度であったが、Lys-Lys-OMeでの導入率は80.3%と最高値を示した。

考 察

リジールペプチド結合に特異的なAP1が尿素変性に抵抗性を有する点を利用し、水に難溶性なグルテンに対するリジンの導入を意図し一定の成果を得た。しかし、方法および試薬の種類を変えることによって、より優れた結果が得られる可能性はある。

縮合反応の機作が求核反応であることを考えれば、アルカリ性プロテアーゼであるAP I の至適pHがpH 7付近に移動したことも矛盾なく説明される。

予備実験として用いたBz-Lys-OHがC-端にリジンを有する「AP I によるグルテン水解生成ペプチド群」のモデルとして適当であったことは、縮合反応の最適条件が尿素を除いて近似していたことから明らかである。

Bz-Lys-OH と Lys-Lys-OMe(-OH)との縮合反応でHPLCのクロマトグラムに2つのピークを生じ2種類の生成物が考えられた。後れて溶出するピークは、保持時間がBz-Lys-Lys-OMeと同一であるためリジン1残基のみが導入されたものであろう。先に溶出するピークは親水性が増せば保持時間が短くなる⁷⁾ことから考えてBz-(Lys)₃-OH(OMe)であろう。従って著者等は、2種類の生成物を生ずる反応の原因には、加水分解反応が関係して

Table 2 Comparison of degree of incorporation and chemical score for the gluten hydrolysate reacted with lye-OMe Lys-Lys-OH and Lys-Lys-OMe.

	Degree of incorporation(%)	chemical scores	
		Control	Product
Lys-OMe	62.5	44	71
Lys-Lys-OH	63.6	44	72
Lys-Lys-OMe	80.3	44	79

The reaction mixture contained 0.2M phosphate buffer(pH7.0)

20 μ M API, 150mg hydrolysate, 4M urea and DMF/EtOH(1/1) mixture.

The reaction was carried out at 30°C.

いると考えて、縮合率と呼ばず導入率と呼んだ。

AP I は加水分解反応の場合、強いエンドペプチダーゼ作用と弱いオリゴペプチダーゼ(含テペプチダーゼ)作用を有する¹⁰⁾。pHの中性側への移動や有機溶媒の共存はこの加水分解作用を防止する意味も持つ。

縮合反応がLys-Lys-OMe \gg Lys-Lys-OH \approx Lys-OMeこの順で進行したことは、リジン含量と求核反応であることを考慮すればむしろ当然である。

高濃度(4M)の尿素の共存によって、モデル実験とは異なり、加水分解の場合と同様に、水素結合の切断によって基質であるグルテン水解物の分散性が増大し、酵素反応が非常に促進されたのではないかと考えられる。

さらに、グリアジン水解物の導入率がグルテンまたはグルテニン水解物の導入率により低かった理由は、このもののリジン含量が他の2者よりも少ないことが分散性の悪さとも関係して原因となっているのではなからうか。

リジンが導入されてグルテンのケミカルスコアが、44から80近くに上昇した。この値は栄養的に優れているとされる他の食品タンパク質である大豆タンパク質の72、牛乳タンパク質の78のレベルに改善されたことを示している。また小麦タンパク質の第2制限アミノ酸は、トリプトファンでそのケミカルスコアは約75⁹⁾である。このことは、リジンを導入したグルテン水解物においては、

もはやりジンが第一制限アミノ酸ではなくなったことを示している。

要 約

前報でAPIを利用して調製したグルテン・グリアジンおよびグルテニン水解物に、再びAPIを利用してリジン誘導体と縮合させることにより、リジンを導入しケミカルスコアを改善することを目的として実験を行った。

予備実験として、ベンゾイルリジン (Bz-Lys-OH) とリジンメチルエステル (Lys-OH) またはジリジン (Lys-Lys-OH) またはジリジンメチルエステル (Lys-Lys-OMe) との縮合反応の最適条件を追究した。この条件を参考として、上記グルテン等の水解物とリジン誘導体との縮合最適条件を追究した。例えば150mgの水解物 (M.W.10KD以上) 100mM Lys-Lys-OMe, 4.0M尿素を2.5mℓの溶媒 (0.2M磷酸緩衝液 (pH7.0) : DMF : Et-OH = 2:1:1) に分散し、20μMAP I で24時間反応させた。この場合、リジンの導入率は80.3%となり、グルテン(水解物)のケミカルスコアは44から79まで上昇した。この値は大豆タンパク質 (72) および牛乳タンパク質 (78) をし

のぎ、栄養的に改善されたと云える。

謝 辞

本研究に際して、昭和62年度茨城大学教育研究学内特

別経費ならびに昭和63年度食品科学振興財団学術研究助成金の援助を受けた⁹⁾¹⁰⁾。また研究には高村義親教授の忠言や吉井忠氏の協力をいただいた。記して衷心より感謝の意を表する。

文 献

- 1) 副島正美・甲田公良・正木武治：茨大農学術報告，37，(1989)
- 2) Fujimaki M., K. Mori, M. Yamashita and S. Arai: 農化大会要旨, p. 388 (1976)
- 3) Lorand L.: Method in Engymology, 45, 48(1976)
- 4) 正木武治, 藤橋俊之, 副島正美：農化, 58, 865(1984)
- 5) Morihara, K., Y Ueno and K. Sakina: Biochem. J., 240, 803(1986)
- 6) 日本食品成分表, 4版, p. 316 (1982)
- 7) Sasagawa T. and T. Okuyama: J. Chromatography, 240, 329(1982)
- 8) 副島正美, 正木武治：蛋白質・核酸・酵素, 29, 74(1984)
- 9) 副島正美等：茨城大学学報, 99, 6(1988)
- 10) 副島正美, 正木武治：食品科学振興財団昭和62年度年報p. 181 (1989)

Improvement of Nutritional Properties of Wheat Gluten Using *Achromobacter* Protease I

II. Condensation of lysine derivatives and the gluten hydrolyzate by *Achromobacter* Protease I

KIMIYOSHI KOHDA, HIROSHI EMATA, TAKEHARU MASAKI and MASAMI SOEJIMA

Using the strict substrate specificity of *Achromobacter* protease I (API, EC3. 4.21.50), condensation of the gluten hydrolyzates by API which had lysine as C-terminal amino acid, and a lysine derivative was carried out.

As preliminary experiment, the optimum condition of condensation of bezoyl lysine and lysine derivatives by API was determined. 150mg gluten hydrolysate by API and 100mg dilysine methyl ester were dissolved in 2.5ml solution containing 4M urea (0.2M phosphate buffer (pH7.0): dimethyl formamide: ethanol=2:1:1), and 10 μ M API was added to the mixture. The reaction was carried out for 24 hours at 30°C.

Degree of incorporation of lysine to the gluten hydrolyzate was 80.3%. Urea and organic solvent promoted the condensation. Nutritional chemical score of the product was elevated to 79 from 44.