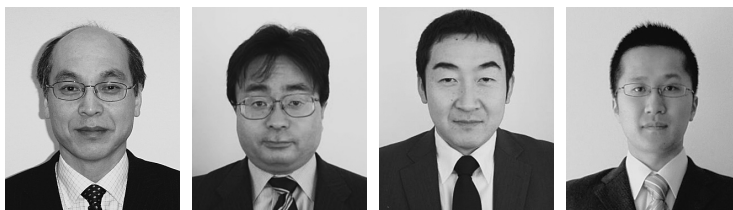


《農芸化学技術賞》

新奇蛋白質修飾酵素プロテイングルタミナーゼの発見と食品加工用酵素としての開発



①

②

③

④

天野エンザイム(株)産業用酵素開発部

部長 山口 庄太郎①

天野エンザイム(株)マーケティング推進室 チームリーダー

天 野 仁②

天野エンザイム(株)産業用酵素開発部

研究員 佐藤 公彦③

天野エンザイム(株)フロンティア研究部

研究員 松原 寛敬④

はじめに

ヒトは古くから発酵食品の製造過程で酵素の恩恵を受けてきた。古代メソポタミアの麦酒製造における麦芽の利用，古代中央アジアでのチーズ製造における子牛の胃液の利用などから始まり，日本にも酒，味噌，醤油，納豆などの伝統的発酵食品がある。近代工業においても酵素の利用は盛んであり，副反応を伴わず温和な条件で行える酵素反応は，洗剤や繊維加工などの工業利用より食品加工に最も適していると言える。また，複合系である食品加工において酵素反応による微妙な変化を活かす技は日本人の得意とするところであろう。実際，世界で広く利用されている食品用酵素の開発とその応用開発はほとんどが日本発の技術である。

食品用酵素市場において，蛋白質加工・修飾分野は，今後の成長が見込まれる領域である。この分野においては，近年まで専らプロテアーゼが用いられてきた。プロテアーゼは，機能性ペプチドの製造やアミノ酸系調味液製造用のほかに，ペプチド結合の限定分解による蛋白質の溶解性，乳化特性，泡沫特性，凝固性などの機能性の向上にも用いられている。チーズ製造におけるキモシン（レンネット）の利用も，カゼインの限定分解による凝固性付与であり，その例と言える。一方，プロテアーゼ以外の蛋白質修飾酵素としては，近年わが国において微生物から初めて見いだされた蛋白質架橋重合酵素トランスグルタミナーゼが，世界の食品産業に大きなインパクトを与えているのは周知のとおりである。

1. スクリーニングと発見

筆者らは，食品加工分野において社会に貢献できる新たな酵素の提供を目指し，一連の蛋白質修飾酵素のスクリーニングに取りかかった。まず，蛋白質に作用する酵素をリストアップし，その中から反応がシンプルである，安全性の面から生体内での反応が知られているなどの観点からいくつかの酵素ターゲットを選び，並行してスクリーニングを行った。その中から以下のようにして，蛋白質を脱アミドする酵素を見いだした。

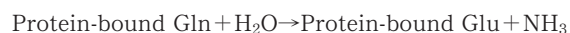
Z-Gln-Gly およびカゼインからアンモニアを遊離する活性を指標にして，天野エンザイム社のタイプカルチャーおよび土壌分離菌の培養液に対してスクリーニングした。土壌に対してはZ-Gln-Gly を唯一の N 源とする集積培養を行った。陽性株の培養液中の蛋白質を，適当なクロマトグラフィーにより分析し，蛋白質分解活性と蛋白質脱アミド活性画分が分離されることを確認して，蛋白質脱アミド酵素生産株を土壌由来菌株から見だし，本酵素をプロテイングルタミナーゼ（以後 PG と呼ぶ）と命名した。生産菌は，*Chryseobacterium* に属する新菌種と同

定され，*C. proteolyticum* と命名した。

蛋白質中の Gln 残基を脱アミドする酵素は，それまで小麦の発芽種子中に存在する可能性が指摘されていたのみであった。また *Bacillus circulans* の菌体内にはペプチド中の Gln 残基に作用する酵素（ペプチドグルタミナーゼ）が報告されていたが，この酵素は低分子ペプチドにしか作用せず，高分子蛋白質には作用しないことが知られていた。PG は，以下に記述するように高分子蛋白質に作用する世界で初めての微生物由来蛋白質脱アミド酵素である。

2. 性質と構造

本酵素は蛋白質中の Gln 残基を脱アミドして Glu 残基に変換する。



短鎖ペプチドより蛋白質や長鎖ペプチドによく作用する。蛋白質の中ではカゼイン，小麦グルテンが良い基質であり，血清アルブミン，オパルブミンなどには反応性が低い。蛋白質中の Asn 残基や他のアミド化合物には作用しない。トランスグルタミナーゼは一級アミン非存在下では脱アミド活性を示すが，本酵素は，カゼインへのモノダンシルカダベリンの取り込み活性は見られず，蛋白質架橋活性は有していなかった。本酵素は，分子量 20 kDa，等電点 10 の単量体の酵素であり，305 アミノ酸からなるプレプロ体として合成され 185 アミノ酸からなる成熟体として分泌される。

一次構造上，既知のデータベース中にホモロジーのあるものは見いだされず，X 線結晶構造解析からも新しい折りたたみを有する蛋白質であることが判明した（図 1）。プロ体の構造解析にも成功し，Cys42 を活性中心とする活性部位がプロ領域によって覆われていること，またプロ領域の変異体の構造解析から基質 Gln の側鎖が基質結合ポケットに結合する様子を明らかにし，反応中間体の観察にも成功した。

3. 作用と効果

一般に，脱アミド化された蛋白質は，生じたカルボキシル基の増加により等電点が低下し，より酸性域での溶解性が向上する。これは，弱酸性域で不溶性である多くの食品蛋白質の，食品中（多くが弱酸性域）での溶解性を向上させることを意味し，用途拡大が期待できる。また，生じたカルボキシル基同士の分子内静電反撥力のため，蛋白質の高次構造がほぐれ，その結果分子内に埋もれていた疎水性領域が分子表面へ暴露されると考えられる（図 2）。これによって，その蛋白質に優れた乳化剤，起泡剤としての機能が付与される。これらのことを各種の食品蛋白質を用いて実証した。

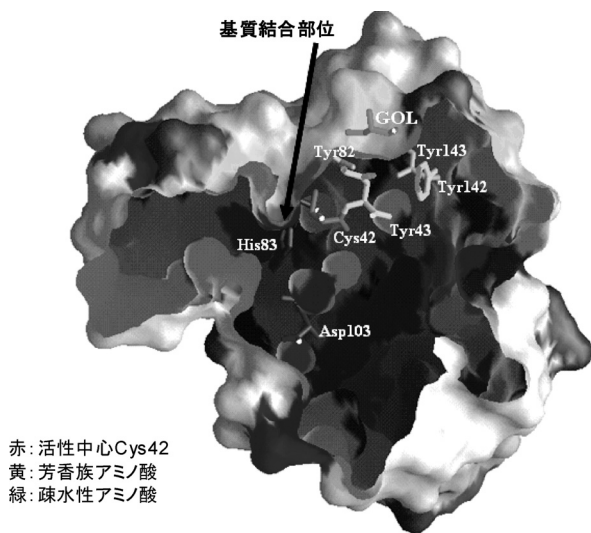


図1 プロテイングルタミナーゼの高次構造—断面図—

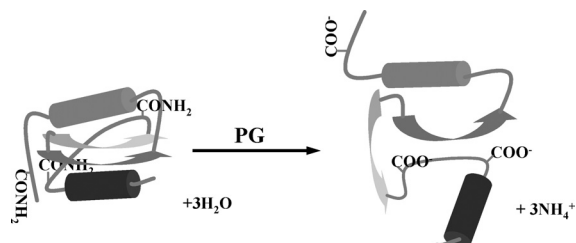


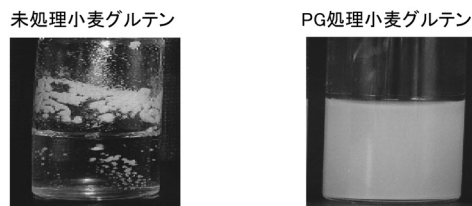
図2 プロテイングルタミナーゼの蛋白質に対する作用イメージ

また、本酵素はトランスグルタミナーゼと同じ Gln 残基をターゲットとするが、それぞれの速度定数を比較すると、基質との親和性、触媒速度いずれも PG のほうが高かった。このことは、両者が共存した場合、PG 反応が優先して起こることを示す。実際、トランスグルタミナーゼによるカゼインの架橋反応中に本酵素を添加すると架橋反応が停止した。この性質は、トランスグルタミナーゼによるゲル形成において、その反応を制御して望ましい物性のゲルを形成させることができることを示す。

4. 応用開発

食品工業において、蛋白質の脱アミド化は、その機能性を向上させる方法として期待され、種々の物理化学的手法あるいはプロテアーゼなどにより試みられてきたが、副反応の問題や高分子蛋白質には適用できなかった。PG によって、副反応の伴わない蛋白質の酵素的脱アミド化法が実現した。乳カゼイン、乳清蛋白、大豆蛋白、小麦グルテン、卵白などの代表的な食品蛋白質の機能性を向上させることができるが、ここではその代表的な例を示す。図3Aは、PG 処理による小麦グルテンの溶解性の向上を示す。蛋白質の溶解性は、乳化特性、泡沫特性を司る基本的な性質である。得られた PG 処理グルテンとコーン油を用いて調製した乳化液は、均一できれいなエマルジョンを形成し、8日間放置しても崩れることなく非常に安定である(図3B)。小麦グルテンは、通常 pH では不溶性の蛋白質であり用途が限られている蛋白質の代表的なものであるが、このように PG 処理により飲料を含めたさまざまな食品への応用が可能になる。乳蛋白質についても、PG により脱アミド化されたカゼインが、通常は沈殿を生ずる pH 5 付近でも十分な溶解性

A. 溶解性の向上



B. 乳化特性の向上

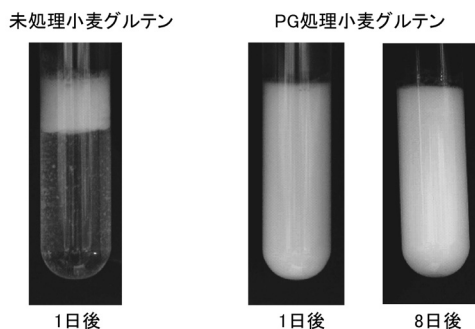


図3 プロテイングルタミナーゼ処理による小麦グルテンの機能性向上

表1 プロテイングルタミナーゼの食品への応用

- 蛋白質の機能性の向上
- グルテン・ドウの軟化
- 酵素的 HAP/HVP
- Ca/蛋白質溶解性の向上
- 蛋白質抽出効率の向上
- 蛋白質の低アレルギー化
- トランスグルタミナーゼの反応制御
- 蛋白質中のグルタミン残基の定量

を示すこと、また同じく沈殿が生じやすい数十 mM のカルシウム存在下でも良好な溶解性を示すことなどを示した。PG の食品への応用の可能性を表1にまとめた。

5. 工業化と安全性評価

次に、食品加工用酵素としての開発を目指し工業的製造法の確立を行った。生産性向上のための育種、培養・発酵条件の最適化、ダウンストリームプロセスの効率化に多大な労力を注ぐとともに、用途にあった酵素製剤としての品質を達成するため、特に夾雑プロテアーゼ活性の除去のため、産業用酵素としては最高レベルの純度の酵素原体を、実用レベルのコストで製造する方法を確立し、製品化を実現した。

食品用として新しい酵素を提供するためには安全性の証明が不可欠である。生産菌について、ラットを用いた病原性試験およびトキシン生産性試験を行い安全性を確認した。酵素剤については、3種類の変異原性試験およびラット 90 日反復投与試験を実施し、最大無毒性量と推定一日摂取量との比較から十分な安全マージンが得られることを示した。また、蛋白質としてのアレルギー誘発性評価を行い、そのリスクの低いことも証明した。2009年7月には、米国 FDA から GRAS Notice を得ることができた。日本の規制においては、食品用酵素は他の天然由来物質とともに「既存添加物」の位置づけであり、本既存添加物制度の導入以後に開発された新しい酵素は、他の化学物質添加物と同様に指定添加物のガイドラインに沿った審査

を受ける必要がある。PGは、この新規指定要請を実施し審査を受けている最初の酵素であるばかりでなく、最初の天然物でもあり、食品業界に先駆的な役割を担っている。

6. おわりに

本開発により、これまでになしえなかった蛋白質の特異的な脱アミド化法を社会に提供することができた。その過程で行っている新規指定添加物申請は、今後の新しい酵素や天然物の実用化に道を開くものであろう。一方、新奇な酵素蛋白質であるPGの構造解析、触媒機構の解明を通じて、学術的にも貢献できたと思われる。今後も産業界、農芸化学会の発展に貢献できる新しい酵素の提供に微力を尽くしていきたい。

最後に、本研究開発を進めるに当たり、ご指導、ご支援いただきました諸先生方、共同開発先の皆様方に厚く御礼申し上げます。特に、本酵素発見当時からご理解いただき、食品蛋白質に対する作用の基礎的研究においてご指導いただきました京都大学大学院農学研究科農学専攻・松村康生教授には深く感謝いたします。また、高次構造解析と作用機序の解明は同じく京都大学大学院農学研究科応用生命専攻・三上文三教授の下で行われたものであり、感謝いたします。

また、本研究開発の基礎研究、工業化から商品開発まで、ご協力いただいた当社の多くの皆様に御礼申し上げます。