◇◇◇◇ 原著論文 ◇◇◇◇

生体物質相互作用解析装置を用いた大豆 7S グロブリンと
カルボキシル基との相互作用の解析
ーカルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂を用いた
タンパク質の脱アミド化の機構解明のためにー

伊地知南¹, 清水詩織¹, 中西良博¹, 佐藤典子¹, 池田真理子¹, 中野一輝¹,
赤尾 真¹, 熊谷 仁^{2,†}, 熊谷日登美¹

¹ 日本大学生物資源科学部生命化学科, ² 共立女子大学家政学部食物栄養学科

Use of Surface Plasmon Resonance (SPR) for Analysis of Interaction between
Soybean 7S Globulin and Carboxyl Group of Cation-exchange Resins
-Technology with Relevance to Deamidation by Cation-exchange Resins of the Carboxylate Type-

Minami IJICHI¹, Shiori SHIMIZU¹, Yoshihiro NAKANISHI¹, Noriko SATO¹, Mariko IKEDA¹,
Kazuki NAKANO¹, Makoto AKAO¹, Hitoshi KUMAGAI^{2,†}, and Hitomi KUMAGAI¹

¹Department of Chemistry and Life Science, Nihon University, 1866 Kameino, Fujisawa-shi, Kanagawa 252-0880

²Department of Food Science and Nutrition, Kyoritsu Women's University,
2-6-1 Hitotsubashi, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0003

The interaction between soybean 7S globulin and the carboxyl groups of cation-exchange resins of the carboxylate type was analyzed by using a surface plasmon resonance (SPR) technology with relevance to deamidation of the globulin. This interaction and the degree of deamidation were measured under conditions of buffered solutions of different salt, sodium ion concentration, and pH. Soybean 7S globulin was dissolved in various solutions and mixed with cation-exchange resins of the carboxylate type. After removal of the resins, the degree of deamidation of the soybean 7S globulin was measured. The affinity of soybean 7S globulin dissolved in various solutions for the carboxyl group was analyzed with a SPR biosensor (Biacore) by using a chip with carboxylates on a dextran matrix. The deamidation level of soybean 7S globulin and the affinity of soybean 7S globulin for the polymer-supported carboxylates were well correlated. Both of them became higher at lower sodium concentrations and were highest at pH 6.0. Among the buffers examined, the phosphate buffer was the most effective for deamidation of soybean 7S globulin; and the affinity of soybean 7S globulin in this buffer for the carboxylate groups on the SPR chips was the highest in the phosphate buffer. Therefore, deamidation of 7S globulin protein would effectively occur when the amide groups of glutamine and asparagine residues of the protein interact with the carboxylates on resins.

Keywords: soy 7S globulin, deamidation, cation-exchange resins, carboxyl group, surface plasmon resonance

1. 緒 言

タンパク質の脱アミド化とは、タンパク質中のグルタミン残基やアスパラギン残基の側鎖にあるアミド基

をカルボキシル基に変換する操作である。脱アミド化により、グルタミン残基はグルタミン酸残基に、アスパラギン残基はアスパラギン酸残基に変換され、生成するカルボキシル基はアミド基に比べて親水性が高いため、脱アミド化により溶解性、乳化性、気泡性など様々な食品タンパク質の機能改善が可能である[1-10]。

タンパク質の脱アミド化には、一般に、酸やアルカ

(受付 2012 年 4 月 19 日, 受理 2012 年 9 月 24 日)

1 〒252-0880 神奈川県藤沢市亀井野 1866

2 〒101-0003 東京都千代田区一ツ橋 2-6-1

FAX: +81-466-84-3946, E-mail: kumagai@kyoritsu-wu.ac.jp

リによりアミド基を加水分解する方法 [1-6] やグルタミナーゼあるいはプロテアーゼなどの酵素を用いる方法 [7-14] が用いられている。しかしながら、酸による方法やアルカリ条件下でプロテアーゼを用いる方法では脱アミド化ばかりではなく、ペプチド結合の加水分解も起こるため [1-3,11], タンパク質が低分子化し、その加工特性の低下や苦味ペプチドの生成なども起こり得る [14]。

Shih は、スルホン酸基を有するドデシル硫酸ナトリウム (SDS) が塩酸による脱アミド化反応を促進することから [15], スルホン酸基を有する陽イオン交換樹脂が同様の触媒効果をもつか否か、大豆タンパク質を用いて検討した [16]。その結果、塩酸酸性下で約 60℃ 以上で熱した場合、脱アミド化反応が促進されることを明らかにした。しかしながら、この報告でも、酸性条件下かつ加熱によりペプチド結合の加水分解が引き起こされることが問題点として挙げられている。

我々は、カルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂を用いることにより、中性付近の pH の溶液 [17] やエタノール溶液 [18] 中において、ペプチド結合の加水分解を起こさずに、タンパク質が脱アミド化されることを示してきた。本法による脱アミド化に影響を与える要因としては、樹脂量、反応時間、反応温度の検討を行ってきた [17,18]。樹脂の量の増加および、反応時間の長さに伴い、脱アミド化度は増加したものの、ある一定の量で脱アミド化度は飽和した。反応温度による脱アミド化度については、4~50℃ 間で有意な差はみられなかった。また、我々は、本法で脱アミド化を行うことにより、小麦グルテン、グリアジンに関しては水や塩溶液に対する溶解性や起泡性が向上すること [19], 脱アミド化小麦グリアジンに関しては胃における消化性が向上し、アレルギー性が低下することを報告した [20]。大豆タンパク質については、陰イオン交換樹脂を用いてフィチン酸除去後に脱アミド化することにより、カルシウム結合特性が改善され [17], このフィチン酸除去・脱アミド化大豆タンパク質は、ラット小腸内においてカルシウム吸収促進効果を示した [21,22]。また、大豆タンパク質の脱アミド化により、水との親和性が向上し、ゲルの保形性が未処理の大豆タンパク質より改善された [23]。

このように、カルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂を用いた脱アミド化により、食品タンパク質に新たな機能を付与できることを示してきたが、弱酸のカルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂でタンパク質の脱アミド化が起こる機構は明らかではない。本法によるタンパク質の脱アミド化の最適な操作条件決定のためにも脱アミド化の機構解明は重要である。

カルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂により脱アミド化が起こる理由として、樹脂上のカルボキシル

基とタンパク質が相互作用をしていると推察できる。本研究では、カルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂による脱アミド化の機構解明および最適条件確立の研究の一環として、カルボキシル基とタンパク質の相互作用と脱アミド化度との関係について検討した。タンパク質とカルボキシル基との相互作用の評価は、カルボキシル基を有するフローセルを装着した生体物質相互作用解析装置を用いて行った。タンパク質としてはこれまでに我々が脱アミド化による機能改善について報告している大豆 7S グロブリンを選定し、脱アミド化の操作条件として、実用上も重要な操作因子であり、かつ、樹脂上のカルボキシル基やタンパク質の荷電状態に影響を与える溶媒の種類、溶媒中の Na イオン濃度、pH の脱アミド化への影響について検討した。

2. 方 法

2.1 試料・試薬

2.1.1 大豆 7S グロブリンの調製

市販大豆を脱脂後、脱脂大豆の 20 倍量の Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に混合し、メルカプトエタノールを 0.01 M 溶液となるように加えて 1 時間抽出した。抽出液を 4℃, 18,000×g で 20 分間遠心分離してタンパク質抽出溶液を得た。タンパク質抽出溶液を pH 6.4 に調整し、4℃, 18,000×g で 20 分間遠心分離して得られた上清を pH 4.8 に調整後、さらに遠心分離 (18,000×g, 20 min, 4℃) を行った。得られた沈殿画分を 0.03 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し、2 N 水酸化ナトリウムで pH を 10.0 付近まで上昇させ、沈殿を溶解させた。さらに、2 N 塩酸で pH 6.2 に調整し、大豆 7S グロブリン以外のタンパク質を遠心分離 (18,000×g, 20 min, 4℃) により沈殿させた。得られた上清を 2 N 水酸化ナトリウムで pH 7.8 に調整し、この溶液を超純水に対して透析後、凍結乾燥し、大豆 7S グロブリンを得た。

2.1.2 イオン交換樹脂

大豆タンパク質に含まれ、小腸でのカルシウムの吸収性を阻害するフィチン酸の除去処理には、陰イオン交換樹脂 IRA910CT (オルガノ社株式会社, 東京) を用いた。陰イオン交換樹脂は、樹脂量に対して 2 倍量の 1 M HCl, 蒸留水, 1 M NaOH, 蒸留水, 1 M HCl, 蒸留水の順で洗浄を行い、H 型にして実験に供した。

脱アミド化に用いる陽イオン交換樹脂に関しては、オルガノ株式会社 (東京) のアンバーライト FPC3500, IRC50, IRC76 の 3 種を用いて脱アミド化度の差異の検討を行った。FPC3500 および IRC76 は、いずれもアクリル酸・ジビニルベンゼン共重合体の母体構造にカルボン酸を官能基として有する MR 形弱酸性陽イオン交換樹脂であるが、FPC3500 (平均粒径 450~650 μm) の方が IRC76 (平均粒径 500~750 μm) よりも粒径が細か

い。IRC50は、メタクリル酸・ジビニルベンゼン共重合体の母体構造にカルボン酸を官能基として有するMR形弱酸性陽イオン交換樹脂で、平均粒径500~750 μ mである。以後、FPC3500はCE(COO⁻)-1、IRC50はCE(COO⁻)-2、IRC76はCE(COO⁻)-3と表記する。いずれの樹脂についても、陽イオン交換樹脂は、樹脂量に対して2倍量の1 M NaOH、蒸留水、1 M HCl、蒸留水、1 M NaOH、蒸留水の順で洗浄を行い、Na型にして実験に供した。

予備実験を行ったところ、CE(COO⁻)-1、CE(COO⁻)-2、CE(COO⁻)-3を用いた場合の大豆7Sグロブリンの脱アミド化度は、それぞれ5.67 $\pm$ 1.54%、9.25 $\pm$ 1.74%、11.66 $\pm$ 1.68%であった。これは、3種のカルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂のうち、CE(COO⁻)-3の総交換容量が最も高いためであると考えられる。また、CE(COO⁻)-3は、3種のカルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂のうち、最も膨潤率が低いので、カラムに使用する際にも適していると考えられる。そこで、大豆7Sグロブリンの脱アミド化には、CE(COO⁻)-3を用いた。

2.1.3 試薬

その他の試薬は和光純薬(株)の特級品を用いた。

2.2 カルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂による脱アミド化

2.2.1 大豆7Sグロブリンからのフィチン酸除去

大豆7Sグロブリン濃度が0.2%になるように0.05 M Tris-HCl緩衝液(pH 7.4)を加え、1時間攪拌した後、陰イオン交換樹脂IRA910CTを0.05 g/mLになるように添加し、25 $^{\circ}$ Cで30分間振とうした。振とう後、ガーゼでろ過することにより、陰イオン交換樹脂を除去した。ろ液を超純水に対して透析後、凍結乾燥し、フィチン酸除去大豆7Sグロブリン(以下、PrS)を得た。

2.2.2 脱アミド化法

PrS濃度が0.2%となるように各溶媒を加え、1時間攪拌・溶解後、陽イオン交換樹脂を1.0 g/mLになるように添加し、25 $^{\circ}$ C下で6時間振とう攪拌した。振とう後、ガーゼでろ過することにより陽イオン交換樹脂を除去した。ろ液を超純水に対して透析後、凍結乾燥し、フィチン酸除去・脱アミド化大豆7Sグロブリン(PrDS)を得た。

以下の因子が、PrSの脱アミド化に及ぼす影響について検討を行った。

(1) 溶媒の種類の影響

カルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂による脱アミド化が、カルボキシル基とタンパク質間の相互作用によって起こるのであれば、用いる溶媒(主に緩衝液)中の電解質も脱アミド化に影響を与えられる。そこで、0.05 M リン酸緩衝液(pH 7.4)、0.05 M 炭酸

緩衝液(pH 7.4)、0.05 M tricine 緩衝液(pH 7.4)、0.05 M HEPES 緩衝液(pH 7.4)を溶媒として用い、陽イオン交換樹脂CE(COO⁻)-3の有無による脱アミド化度の差異について検討を行った。

(2) 溶媒 pH の影響

溶媒として、0.05 M リン酸緩衝液(pH 3.0, 6.0, 7.4, 8.0, 10.0)を用いて、pHがPrSの脱アミド化に及ぼす影響について検討を行った。

(3) 溶媒中のNaイオン濃度の影響

NaOHとNaClによりNaイオン濃度を0.01, 0.1, 1 Mとし、HClでpH 10.0に調整したものを用い、pHがPrSの脱アミド化に及ぼす影響について検討を行った。

2.2.3 脱アミド化度の測定

脱アミド化量は、PrSおよびPrDSをHClにより完全に脱アミド化し、生成したアンモニア量の差から算出した。アンモニア量はKumagaiら[17]と同様の方法で測定した。得られた脱アミド化量を大豆7Sグロブリンの全アミド量(1290 μ mol/g-protein)で除して脱アミド化度を求めた。

2.2.4 SDS-PAGEによる加水分解の有無の確認

脱アミド化処理による大豆7Sグロブリンの加水分解の有無を確認するために、16%分離ゲル、4%濃縮ゲルを用いてSDS-PAGEにより、分子量の測定を行った。

2.3 生体物質相互作用解析装置による大豆7Sグロブリンのカルボキシル基に対する結合特性のリアルタイム解析

生体物質相互作用解析装置は、表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance; SPR)を測定原理としており、分子間の相互作用を標識なしでリアルタイムに検出することが可能である[24]。本実験で用いた装置には、カルボキシル基を有するフローセル(以下、カルボキシル基セル)が装着されており、カルボキシル基をブロッキングしたフローセルをリファレンスセルとして用いる。本研究では、大豆7Sグロブリンのカルボキシル基セルに対する結合量からリファレンスセル(エタノールアミンでブロッキング)に対する結合量を差し引くことにより、大豆7Sグロブリンのカルボキシル基への結合量を求めた。

2.3.1 装置

生体物質相互作用解析装置(BiacoreX, GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社、東京; 以下、Biacore)を用い、センサーチップとしてはデキストラン表面にカルボキシメチル基(-CH₂COOH)が結合しているCM5(Research Grade, GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社、東京)を装着して実験を行った。カップリング試薬であるAmine Coupling Kit(BR-1000-50)はGEヘルスケアバイオサイエンス株式会社(東京)から購入した。Amine Coupling Kitには、400 mM 1-ethyl-3-

(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (以下, EDC), 100 mM *N*-hydroxysuccinimide (以下, NHS) が含まれている。

2.3.2 リファレンスセルの作製

ランニング緩衝液には 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用い, 流速 10 μ L/min, 25°C で流した。100 mM NHS と 400 mM EDC を等量に混合したもの (以下, NHS-EDC 混合溶液) を, 70 μ L アプライし, カルボキシル基を活性化した後, 1 M エタノールアミンを 70 μ L アプライすることでカルボキシル基のブロッキングを行った。NHS-EDC 混合溶液では, カルボキシル基は 4 割しか活性化されないため, この操作を 7 回繰り返してリファレンスセルを作製した。

2.3.3 測定方法

PrS を 0.4% となるように MilliQ 水に溶解した。アプライ直前に 0.4% タンパク質溶液と移動相の 2 倍の濃度の各溶媒をそれぞれ 1:1 の割合で溶解し, 0.2% タンパク質溶液となったものをアナライトとした。これらのタンパク質溶液は親水性の Cellulose Acetate 膜フィルター (孔径 0.45 μ m) を用いてろ過してから用いた。カルボキシル基を有するフローセルおよびカルボキシル基をエタノールアミンにてブロッキングしたリファレンスのフローセルに対して以下の条件でアプライし, 各アナライトのカルボキシル基への結合量を測定した。測定の際には, アナライトがフローセル内に送液される際に移動相との接触による希釈・拡散を防ぐため, エアセグメントを挟んでアナライトを送液した。測定後, 0.05 M 水酸化ナトリウム溶液を用いて, センサーチップ表面に残存しているアナライトを洗浄し, センサーチップを再生した。

タンパク質の結合量は, 得られたセンサーグラムから BIAevaluation 解析ソフトを用いて, カルボキシル基セルに対する結合量からリファレンスセルに対する結合量の値を差し引くことにより求めた。

カルボキシル基セルのセンサーグラムは, サンプルの静電的な結合, デキストラン層に対する物理的吸着およびバルクという溶媒効果の合計値を表し, リファレンスセルのセンサーグラムは, タンパク質のデキストラン層に対する物理的吸着およびバルク効果による値を表している。したがって, カルボキシル基セルで得られた結合量からリファレンスセルで得られた結合量を差し引くことで, センサーチップのカルボキシル基に静電的に結合したサンプル量が求められる。

2.3.4 Biacore 測定条件および検討項目

センサーチップは CM5 を用いた。フローセル温度 25°C, 移動相 (各緩衝液) 流速を 20 μ L/min とし, アナライトアプライ量 100 μ L で測定を行った。解離時間は 100 sec とした。再生溶液としては, 0.05 M 水酸化ナトリウム溶液を用い, 再生溶液アプライ量は 20 μ L

とした。

検討は, カルボキシル基とタンパク質の相互作用に影響を与える以下の因子について行った。

(1) 溶媒の種類の影響

0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.4), 0.05 M 炭酸緩衝液 (pH 7.4), 0.05 M tricine 緩衝液 (pH 7.4), 0.05 M HEPES 緩衝液 (pH 7.4) を溶媒として用い, サンプルのセンサーチップに対する結合量を比較した。

(2) 溶媒中の Na イオン濃度の影響

NaOH と NaCl により Na イオン濃度を 0.01, 0.1, 1 M とし, HCl で pH 10.0 に調整したものを用い, サンプルのセンサーチップに対する結合量を比較した。

(3) 溶媒 pH の影響

0.05 M リン酸緩衝液 (pH 3.0, 6.0, 7.4, 8.0, 10.0) を移動相として用い, サンプルのセンサーチップに対する結合量を比較した。

3. 結 果

3.1 溶媒の種類

Fig. 1 に, 溶媒の種類を変えて脱アミド化反応を行った結果を示す。陽イオン交換樹脂無添加の場合には, いずれの溶媒でも, 脱アミド化はほとんど起こらず, 脱アミド化度は約 5% であった。一方, 陽イオン交換樹脂を添加した場合には, 脱アミド化度は高くなり, 溶媒に 0.05 M リン酸緩衝液を用いた場合には, 脱アミド化度が 25.41% と 5 種の溶媒中で最も高くなった。他の溶媒を用いた場合の脱アミド化度は約 10% であった。このことから, 陽イオン交換樹脂による脱アミド化には, 陽イオン交換樹脂そのものの存在が重要であり, そこに溶媒の影響が多少関与することが確認された。

Fig. 1 Effect of buffers on the deamidation of PrS with and without cation-exchange resins.

Open bar: without cation-exchange resins; closed bar: with cation-exchange resins.

A: 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4), B: 0.05 M bicarbonate buffer (pH 7.4), C: 0.05 M tricine buffer (pH 7.4), D: 0.05 M HEPES buffer (pH 7.4).

Fig. 2 に, Fig. 1 と同様の溶媒を用いた場合の, Biacore のセンサーグラムを示す. 時間の経過と共に PrS の結合量 (RU) は増加し, その増加率は次第に緩やかになった. センサーチップ上のカルボキシル基に対する PrS の結合量はセンサーグラムの最大値から求めた. PrS の結合量は, リン酸緩衝液を用いた場合が最も高く, HEPES 緩衝液ではその約半分, tricine 緩衝液, 炭酸水素ナトリウム緩衝液を用いた場合には, その約 3 分の 1 であった. このように, Fig. 2 に示した 4 種の緩衝液に関しては, 陽イオン交換樹脂による脱アミド化度とタンパク質のアミド基とセンサーチップ上のカルボキシル基との結合量の間にはある程度の相関が示された. また, 最も PrS の結合量の高かったリン酸緩衝液を用い, PrDS の結合量を測定したところ, ほとんど結合が見られなかった.

3.2 溶媒中の Na イオン濃度の影響

Na イオン濃度が異なる溶媒中で脱アミド化を行った結果を Fig. 3 に示す. 0.01 M Na 溶液で脱アミド化度は 27.5% であり, Na イオン濃度が高くなるほど脱アミド化度が低下し, 1 M Na 溶液ではほとんど脱アミド化が起こらなかった.

Fig. 4 に SDS-PAGE の結果を示す. どの溶媒を用いた場合も, アルカリ溶液中における陽イオン交換樹脂処理に伴うタンパク質の加水分解は見られなかった.

Fig. 5 に, 溶媒の Na イオン濃度を変化させた際のセンサーチップ上のカルボキシル基に対する PrS のセンサーグラムを示す. 結合量は 0.01 M Na 溶液で最も高く, Na イオン濃度の上昇に伴い, 結合量は減少し, 0.1 M および 1 M Na 溶液では, 0.01 M Na 溶液の時の結合

Fig. 3 Degree of deamidation of PrS treated in solutions of different Na concentrations at pH 10.0 by cation-exchange resins.

Fig. 4 SDS-PAGE of PrS and PrDS treated in solutions of different Na concentrations at pH 10 by cation-exchange resins.

Lane 1: molecular weight markers; lane 2: PrS; lane 3: PrDS treated in 0.01 M Na solution; lane 4: PrDS treated in 0.1 M Na solution; lane 5: PrDS treated in 1 M Na solution.

Fig. 2 Binding of PrS in various buffers and PrDS in a phosphate buffer of pH 7.4 to carboxyl groups.

Fig. 5 Binding of PrS in solutions of different sodium concentrations to carboxyl groups.

量の約 10 分の 1 になった. このように, Na イオン濃度に関しても, センサーチップ上のカルボキシル基へのタンパク質の結合量が大きいほど脱アミド化度が大きい傾向が見られた.

3.3 溶媒 pH の影響

Fig. 6 に, 0.05 M リン酸緩衝液を用い, 種々の pH (pH 3.0, 6.0, 7.4, 8.0, 10.0) で大豆 7S グロブリンの脱アミド化を行った結果を示す. 陽イオン交換樹脂無添加の場合には, 脱アミド化はほとんど起こらず, pH 8.0 以上でも脱アミド化度は 7~8% 程度であった. 一方, 陽イオン交換樹脂を添加した場合には, いずれの pH でも, 24% 以上のアミドが脱アミド化された. 脱アミド化度が最も高かった pH は 6.0 で, 大豆 7S グロブリン中のアミドの 53.49% が脱アミド化された.

Fig. 7 に種々の pH で脱アミド化処理を行った大豆 7S グロブリンの SDS-PAGE の結果を示す. どの pH においても, 陽イオン交換樹脂処理に伴うタンパク質の加水分解は見られなかった.

溶媒の pH を変化させた際のセンサーチップ上のカルボキシル基に対する大豆 7S グロブリンの結合量を Fig. 8 に示す. 大豆 7S グロブリンは pH 6.0 で最も高い結合が見られた. pH 3.0 でカルボキシル基に対する結合量がマイナスの値になったのは, タンパク質の吸着量がカルボキシル基セルに対してよりもリファレンスセルの方が大きかったためと考えられる. これは, pH 3.0 では, センサーグラムのカルボキシル基は解離しておらず, タンパク質とリファレンスセルの $-NH_2$ や $-OH$ との水素結合や $-(CH_2)_2-$ との疎水的相互作用が強くなったためと推察される. pH 6.0 で最も高い結合量となったという結果は, 脱アミド化度の結果と相関して

いる.

Fig. 9 に, Figs. 1-3, Fig. 5, Fig. 6 および Fig. 8 のデータを用いて, 大豆 7S グロブリンの脱アミド化度およびセンサーチップ上のカルボキシル基に対する結合量の関係をまとめて示す. ただし, タンパク質結合量が見かけ上マイナスになったデータは除いてある. 全体的に, 脱アミド化度とセンサーチップ上のカルボキシル基へのタンパク質の結合量との間には比較的高い相関 (相関係数 $R \approx 0.83$) がみられた.

Fig. 7 SDS-PAGE of PrS and PrDS treated in 0.05 M phosphate buffers of various pH with cation-exchange resins.

Lane 1: molecular weight markers; lane 2: PrS; lane 3: PrDS treated at pH 3.0; lane 4: PrDS treated at pH 6.0; lane 5: PrDS treated at pH 7.4; lane 6: PrDS treated at pH 8.0; lane 7: PrDS treated at pH 10.0.

Fig. 6 Degree of deamidation of PrS treated in 0.05 M phosphate buffers of various pH with and without cation-exchange resins.

Open bar: without cation-exchange resins; closed bar: with cation-exchange resins.

Fig. 8 Binding of PrS in 0.05 M phosphate buffers of various pH to carboxyl groups.

Fig. 9 Correlation between the amount of protein bound to carboxyl groups and the degree of deamidation. ○, Influence of buffered solution; △, Influence of Na concentration, □, Influence of pH.
Solid line: regression analysis (R , regression coefficient)

4. 考 察

Shih [25,26] は、大豆タンパク質が、リン酸イオンや炭酸水素イオンなどの陰イオンによって脱アミド化することを報告している。このことから、Fig. 1において、0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いた場合に、脱アミド化度が最も高くなったのは、陽イオン交換樹脂中のカルボキシル基のみならず、溶媒中の陰イオンも触媒として働き、相乗効果により脱アミド化反応がより促進されたためと考えられる。しかし、本研究では、溶媒のみでの脱アミド化度は低かった。これは、本研究で用いた塩濃度 (0.05 M) が、Shih の論文 (0.2 M) に比べて低かったためと推察される。

Fig. 2 に示したように、リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中における Biacore のセンサーチップに対する結合量は、PrS と PrDS とで大きく異なった。Biacore では、タンパク質分子とセンサーチップとの相互作用の程度を測定しているため、アミノ基などのアミド基以外の官能基とセンサーチップ上のカルボキシル基との結合も考えられる。しかし、PrS では高い結合量を示したにも関わらず、PrDS ではほとんど結合が見られなくなったことから、リン酸緩衝液 (pH 7.4) においては、PrS 中のグルタミンやアスパラギン残基側鎖のアミド基とセンサーチップ上のカルボキシル基が強く相互作用をしていたと考えられる。

Fig. 3 に示したように、Na イオン濃度の増加に伴っ

て、脱アミド化度は減少した。これは、正電荷を有する Na イオンは、陽イオン交換樹脂のカルボキシル基に対してイオン結合するため、グルタミンやアスパラギン残基側鎖のアミド基と陽イオン交換樹脂上のカルボキシル基との相互作用が Na イオンにより妨害されたものと推察される。したがって、溶液中の Na イオン濃度は、カルボキシレートタイプの陽イオン交換樹脂によるタンパク質の脱アミド化に影響を与えられられる。

PrS の等電点 pI は pH 4.8 であるため、pH 10.0 の溶液中では分子全体としては負に荷電しているはずである。しかし、0.01 M Na 溶液を溶媒に用いた場合には、Fig. 5 に示すように、PrS はセンサーチップ上のカルボキシル基に結合した。Paynter と Russell [27] は、pH 4.0 から 10.0 においてリジンの ϵ -アミノ基が静電相互作用することを示している。このことから、PrS は pI 以上の pH においても正に荷電する部位を有しており、この部分がセンサーチップ上のカルボキシル基と結合したと考えられる。

Fig. 5 で示したように、Na イオン濃度が高い程、Biacore のセンサーチップに対する PrS の結合量は低下した。これは、高濃度の Na イオンがカルボキシル基と静電的な結合をすることにより、PrS とカルボキシル基との結合が妨害されたためと推察され、カルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂を用いた脱アミド化においても、同様の現象により、Na イオン濃度が高い程、脱アミド化度が低くなったと考えられる。

Fig. 6 および Fig. 8 で示したように、pH 6.0 において、PrS は最も脱アミド化され、また、Biacore のセンサーチップ上のカルボキシル基との結合量も最も高くなった。センサーチップ上のカルボキシル基も、タンパク質中のカルボキシル基も、酸性側になるにつれて $-\text{COO}^-$ から $-\text{COOH}$ となり、また、タンパク質中のアミノ基は $-\text{NH}_3^+$ となる。したがって、センサーチップ上のカルボキシル基が $-\text{COO}^-$ で、タンパク質中のアミノ基が $-\text{NH}_3^+$ となっている割合が高いときに、タンパク質はセンサーチップ上のカルボキシル基と最も結合しやすくなると考えられる。PrS は、pH 6 付近では、比較的 $-\text{NH}_3^+$ の割合が高く、かつ、センサーチップ上のカルボキシル基も $-\text{COO}^-$ に解離していたと推察される。

Fig. 6 の結果から、陽イオン交換樹脂無添加では、酸性およびアルカリ性下でも脱アミド化はほとんど起こらなかった。また、酸やアルカリによる脱アミド化では、ペプチド結合の加水分解も同時に起こる場合が多いが、Fig. 7 の SDS-PAGE の結果からわかるように、pH 3.0 でも pH 10.0 でも、ペプチド結合の加水分解は見られなかった。これらの結果から、いずれの pH においても、陽イオン交換樹脂の作用により脱アミド化が起こったと考えられる。酸やアルカリ処理で脱アミド化する際は、通常、60℃ 以上の温度をかけて行うか、数日間に

渡る処理を行う。本研究では、室温で6時間の処理であったため、酸やアルカリによる脱アミド化はほとんど起こらなかったと考えられる。

Fig. 9に見られるように、タンパク質の脱アミド化度とセンサーチップ上のカルボキシル基へのタンパク質の結合量との間にはかなり高い相関が見られた。このことは、陽イオン交換樹脂上のカルボキシル基とタンパク質との相互作用の程度が脱アミド化度を決定することを支持している。陽イオン交換樹脂によるPrSの脱アミド化では、タンパク質の構造中にカルボキシル基に対して静電的に結合する部位が存在し、かつ、溶媒中にこの結合を阻害する陽イオンが少ないことが重要であると考えられる。また、カルボキシレートタイプの陽イオン交換樹脂によりタンパク質の脱アミド化を行う際の溶媒選定などの条件設定において、Biacoreにより得られる結合量が重要な指針を与えうることを示唆している。

5. 結 論

脱アミド化度とセンサーチップ上のカルボキシル基へのタンパク質の結合量との間には、ある程度の相関が見られた。このことから、陽イオン交換樹脂上のカルボキシル基とタンパク質との相互作用の程度が脱アミド化度を決定することが示された。また、カルボキシレートタイプの陽イオン交換樹脂によりタンパク質の脱アミド化を行う際の溶媒選定などの条件設定において、Biacoreにより得られる結合量が重要な指針を与えうることを示唆された。

引 用 文 献

- 1) V. Cabra, R. Arreguin, R. Vazquez-Duhalt, A. Farres; Effect of alkaline deamidation on the structure, surface hydrophobicity, and emulsifying properties of the Z19 α -zein, J. Agric. Food Chem., **55**, 439-445 (2007).
- 2) L. Mirmoghtadaie, M. Kadivar, M. Shahedi; Effects of succinylation and deamidation on functional properties of oat protein isolate, Food Chem., **114**, 127-131 (2009).
- 3) N. Matsudomi, T. Sakai, A. Kato, K. Kobayashi; Conformational changes and functional properties of acid-modified soy protein, Agric. Biol. Chem., **49**, 1251-1256 (1985).
- 4) N. Matsudomi, A. Kato, K. Kobayashi; Conformation and surface properties of deamidated gluten, Agric. Biol. Chem., **46**, 1583-1586 (1982).
- 5) J. R. Wagner, J. Guéguen; Surface functional properties of native, acid-treated, and reduced soy glycinin. 1. foaming properties, J. Agric. Food Chem., **47**, 2173-2180 (1999).
- 6) W. -M. Chan, C. -Y. Ma; Acid modification of proteins from soymilk residue (okara), Food Res. Int., **32**, 119-127 (1999).
- 7) Y. H. Yong, S. Yamaguchi, Y. S. Gu, T. Mori, Y. Matsumura; Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of α -zein, J. Agric. Food Chem., **52**, 7094-7100 (2004).
- 8) Y. H. Yong, S. Yamaguchi, Y., Y. Matsumura; Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of wheat gluten, J. Agric. Food Chem., **54**, 6034-6040 (2006).
- 9) I. Suppavorasatit, E. G. De Mejia, K. R. Cadwallader; Optimization of the enzymatic deamidation of soy protein by protein-glutaminase and its effect on the functional properties of the protein, J. Agric. Food Chem., **59**, 11621-11628 (2011).
- 10) A. Kato, A. Tanaka, Y. Lee, N. Matsudomi, K. Kobayashi, Effects of deamidation with chymotrypsin at pH 10 on the functional properties of protein, J. Agric. Food Chem., **35**, 285-288 (1987).
- 11) A. Kato, A. Tanaka, N. Matsudomi, K. Kobayashi, Deamidation of food proteins by protease in alkaline pH, J. Agric. Food Chem., **35**, 224-227 (1987).
- 12) C. Marco, C. M. Rosell; Effect of different protein isolates and transglutaminase on rice flour properties, J. Food Eng., **84**, 132-139 (2008).
- 13) M. Motoki, K. Seguro, N. Nio, K. Takinami; Glutamine-specific deamidation of α_{s1} -casein by transglutaminase, Agric. Biol. Chem., **50**, 3025-3030 (1986).
- 14) J. S. Hamada, W. Marshall; Enhancement of peptidoglutaminase deamidation of soy protein by heat treatment and/or proteolysis, J. Food Sci., **53**, 1132-1149 (1988).
- 15) F. F. Shih, A. D. Kalmar; SDS-catalyzed deamidation of oil-seed proteins, J. Agric. Food Chem., **35**, 672-675 (1987).
- 16) F. F. Shih; Deamidation of protein in a soy extract by ion exchange resin catalysis, J. Food Sci., **52**, 1529-1531 (1987).
- 17) H. Kumagai, S. Ishida, A. Koizumi, H. Sakurai, H. Kumagai; Preparation of phytate-removed deamidated soybean globulins by ion exchangers and characterization of their calcium-binding ability, J. Agric. Food Chem., **50**, 172-176 (2002).
- 18) H. Kumagai, Y. Norimatsu, N. Hashizume, H. Sakurai, H. Kumagai; "Deamidation of wheat-flour gliadin with ion-exchange resin" (in Japanese), Nippon Syokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, **48**, 884-890 (2001).
- 19) Y. Norimatsu, H. Kumagai, R. Nagai, H. Sakurai, H. Kumagai; "Deamidation of wheat-flour gluten with ion-exchange resin and its functional properties" (in Japanese), Nippon Syokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, **49**, 639-645 (2002).
- 20) H. Kumagai, A. Suda, H. Sakurai, H. Kumagai, S. Arai, N. Inomata, Z. Ikezawa; Improvement of digestibility, reduc-

- tion in allergenicity, and induction of oral tolerance of wheat gliadin by deamidation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 977-985 (2007).
- 21) H. Kumagai, A. Koizumi, A. Suda, N. Sato, H. Sakurai, H. Kumagai; Enhanced calcium absorption in the small intestine by a phytate-removed deamidated soybean globulin preparation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1598-1600 (2004).
- 22) H. Kumagai, N. Sato, M. Ikeda, H. Sakurai, H. Kumagai; Increase in solubility and function to promote calcium absorption of soybean β -conglycinin by deamidation, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **43**, 240-242 (2008).
- 23) E. Shimazaki, Y. Sano, H. Kumagai, H. Sakurai, H. Kumagai; "Enhancement of hydrophilicity of Soybean Globulins by Deamidation and Change in Their Gelation Properties" (in Japanese), *Japan J. Food Eng.*, **9**, 67-73 (2008).
- 24) P. S. Katsamba, S. Park, I. A. Laird-Offringa; Kinetic studies of RNA-protein interactions using surface plasmon resonance, *Methods*, **26**, 95-104 (2002).
- 25) F. F. Shih ; Deamidation during treatment of soy protein with protease, *J. Food Sci.*, **55**, 127-129&132 (1990).
- 26) F. F. Shih ; Effect of anions on the deamidation of soy protein, *J. Food Sci.*, **56**, 452-454 (1991).
- 27) S. Paynter, D. A. Russell; Surface Plasmon resonance mea-

surement of pH-induced responses of immobilized biomolecules: Conformational change or electrostatic interaction effect?, *Analyt. Biochem.*, **309**, 85-95 (2002).

要 旨

カルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂によるタンパク質の脱アミド化の機構を解明するために、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いて大豆 7S グロブリンとカルボキシル基の相互作用の解析を行った。脱アミド化に用いる溶媒として、緩衝溶液の種類、溶液の Na イオン濃度、pH を変えて検討を行った。大豆 7S グロブリンとカルボキシル基との相互作用の程度は、デキストランマトリックス上にカルボキシル基を有するセンサーチップを装着した SPR バイオセンサー (Biacore) により評価した。大豆 7S グロブリンのポリマー上のカルボキシル基との親和性、大豆 7S グロブリンの脱アミド化のレベルともに、Na イオン濃度が低いほど高く、pH については 6.0 で最大だった。また、緩衝液としては、検討した中ではリン酸緩衝液が脱アミド化に最も適していた。全体的に、大豆 7S グロブリンの脱アミド化度とセンサーチップ上のカルボキシル基との親和性には、高い相関がみられた。