[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi* Vol.60, No. 12, pp. 1009~1015, 1986]

タンパク質のアルカリ処理によるリジノアラニンの 生成に対するアンモニアの影響

向井加織*, 清水容子, 村田理恵,

的場輝佳, 長谷川喜代三

(奈良女子大学家政学部食物学科, *現在, 広島女子大学家政学部食物栄養学科)

昭和 61 年 5 月 8 日 受 理

Effect of Ammonia on Lysinoalanine Formation in Proteins by Alkali Treatment

Kaori MUKAI, Yoko SHIMIZU, Rie MURATA,

Teruyoshi MATOBA and Kiyozo HASEGAWA

Department of Food Science and Nutrition, Nara Women's University, Nara 630

Alkali treatment of protein in the presence of ammonia formed β -aminoalanine (β -AA). Quantitative determination of β -AA was performed by mass chromatography. When α -lactalbumin or phosvitin was heated in the presence of ammonia under alkali condition, lysinoalanine (LAL) formation was suppressed. Its suppression was due to formation of β -AA. This significant suppression of both proteins by ammonia was observed at 55°C and 95°C, but not at 30°C.

(Received May 8, 1986)

緒 言

リジノアラニン (N^{ϵ} -(DL-2-アミノ-2-カルボキシエチル)-L-リジン; LAL) は, タンパク質のアルカリ処理によって生成される非通常の架橋構造アミノ酸の一つで^(1,2), アルカリ処理を行った食品のみならず, 家庭で調理された食品にもその存在が報告されている⁽³⁻⁵⁾. これまでに, LAL の生成によるタンパク質の消化性^(6,7)や栄養価の低下⁽⁸⁾, およびラットへの腎毒性^(9,10)のほか, LAL が金属をキレートすることにより金属酵素を不活性化させる作用を持つことも知られている⁽¹¹⁾. このため, 現在, LAL の生成機構を解明し, さらにその生成を抑制する条件を探ることは重要な課題となっている.

従来の研究で, LAL の生成機構は次のようであると報告されている. すなわち, タンパク質中のシスチン残基または OH 置換セリン残基が, アルカリ溶液中で β -脱離反応を起こして生じたデヒドロアラニン (DHA) 残基 ($-NHC(CO-)=CH_2$) の二重結合に, リジン残基の ϵ -アミノ基が求核的に付加して LAL 残基 ($-NHCH(CO-)-CH_2NH(CH_2)_4CH(NH-)-CO-$) が生成する^(12,13).

これとは別に, この DHA 残基に対してアンモニアが同様に求核的に付加すると β -アミノアラニン (β -AA) 残基 ($-NHCH(CO-)-CH_2NH_2$) を生成することが報告されている^(14,15).

本研究では, アンモニアのこの効果に注目し, タンパク質のアルカリ処理時においてアンモニアを共存させた場合に LAL の生成が抑制されるかどうか, またその場合の β -AA の生成量との関係はどうかについて調べた. β -AA の定量は, ガスクロマトグラフィー・質量分析計 (GC-MS) を用いたマスクロマトグラフ法を開発して行った. 試料タンパク質としては, シスチン残基を含む球状タンパク質である α -ラクトアルブミンと, シスチン残基を含まず, O-ホスホセリン残基を含むリンタンパク質であるホスピチンを用い, LAL 生成に関与する残基の分子内, および分子間の反応性についても考察を行った.

実験材料および方法

1. 材料 α -ラクトアルブミンおよびホスピチンは, Sigma 社から購入した. LAL, β -AA, ベヘン酸

よびノロイシン (NL) は、それぞれ Miles-Yeda, 東京化成, Nutritional Biochemicals および半井化学から購入した。

2. タンパク質のアルカリ処理 アルカリ溶液として、0.2 M KCl を含む 0~4 M アンモニア溶液 (pH 13) を用いた。pH の調整は、1 N NaOH または 1 N HCl で行った。このアルカリ溶液に、1% 濃度となるようにタンパク質を溶解し、95, 55, 30°C のそれぞれの温度で一定時間インキュベートした。反応は、水中で急冷後、塩酸で中和することにより停止させた。

3. アルカリ処理タンパク質の加水分解と誘導体合成 アルカリ処理タンパク質を真空加水分解チューブ (Pierce Chem.) 内で 6 N HCl とともに常法どおり脱気後、110°C で 24 時間加熱して加水分解した。得られたアミノ酸を既報⁽¹⁶⁾の方法で、*N*-トリフルオロアセチル-*O*-ブチル (BTFA) 誘導体とした。

4. LAL の定量 BTFA 誘導体を既報⁽¹⁶⁾の方法に従って島津 GC-6 AM ガスクロマトグラフ (GLC) で分析した。すなわち、ガラスカラム (1.5 m × 3 mm I. D.) に 2% OV-17/1% OV-210 (100/120 メッシュ Supelcoport, スペルコ社) を充填し、分離用カラムとした。カラム、注入口、検出器の温度をそれぞれ 230, 250, 250°C に設定した。キャリアガスには N₂ を用い、流量は 40 ml/min とし、検出は水素イオン化検出器を用いて行った。また、内部標準にはブチルベヘネートを用いた。

5. β -AA の定量 BTFA 誘導体を日立 M-80 二重収束 GC-MS に導入し、以下の条件で分析した。カラムは GLC と同じものを用い、初期温度を 104°C に設定し、3°C/min で 5 分間、5°C/min で 4 分間、10°C/min で 2 分間、順次昇温し、その後は 230°C まで 20°C/min で昇温した。注入口とインターフェースの温度は 250°C とし、キャリアガスには He を用い、流量は 40 ml/min とし、検出はトータルイオンコレクターを用いて行った。イオン化電圧を 20 eV, イオンソースヒーターを 1.2 A, イオンソース温度を 200°C, エミッション電流を low にそれぞれ設定し、 m/z 0~800 の範囲を 8 秒間に 1 度の速さで繰返し走査した。このデータを日立 M-003 コンピュータに取込み、マスクロマトグラムから β -AA を定量した。また、内部標準には BTFA-NL を用いた。

実験結果

1. β -AA の定量

合成 β -AA と標準アミノ酸 (17 種) を BTFA 誘導体にし、GLC に導入して得られたクロマトグラムを Fig. 1 に示す。BTFA- β -AA および BTFA-NL は、それぞれ約 10 分後および約 5 分後に検出された。

さらに、BTFA- β -AA および BTFA-NL を GC-MS で分析し、Fig. 2(a, c) に示すマスペクトルを得た。BTFA- β -AA は、 m/z 251, 227, 171, 153, 139, 126 に主なフラグメントイオンを持ち、また BTFA-NL は、 m/z 182 および 126 に主なフラグメントイオンを持っていた。両者の主なフラグメントイオンの構造を Fig. 2(b, d) に示す。

BTFA- β -AA の基準ピークは m/z 227 であるが、 m/z 227 は、BTFA- β -AA の直前に保持時間を持つ BTFA-メチオニンにも存在するため、 β -AA の定量的ためのフラグメントとして選ぶには不適当であった。そこで、このようなことのないものとして、比較的大きく、かつ特徴的な m/z 251 を β -AA の定量的ためのマスフラグメントとして選んだ。一方、内部標準物質である BTFA-NL の基準ピークである m/z 182 は、直前に保持時間を持つ BTFA-イソロイシンおよび BTFA-ロイシンにも存在するが、これらのピークと BTFA-NL のピークは今回の分析条件下では完全に分離したため、定量的ための内部標準としてこのマスフラグメントを選んだ。

検量曲線作成のため、20~70 μ g の β -AA, 40 μ g の NL および 1 mg のタンパク質を混合し、塩酸加水分解

Fig. 1. Gas-Liquid Chromatogram of BTFA-Amino Acids. Column: 2% OV-17/1% OV-210 on 100/120 Supelcoport, 1.5 m × 3 mm I. D., glass. Initial temperature, 104°C; program rate, 3°C/min for 5 min, 5°C/min for 4 min, 10°C/min for 2 min, then 20°C/min until 230°C. ----: temp.

Fig. 2. Mass Spectrum and Fragmentation of BTFA- β -Aminoalanine and BTFA-Norleucine. (a, b) BTFA- β -aminoalanine, (c, d) BTFA-norleucine.

Fig. 3. Computerized Mass Chromatogram of BTFA- β -Aminoalanine and BTFA-Norleucine.

Fig. 4. Relationship of Response Ratio against Weight Ratio of BTFA- β -Aminoalanine(β -AA) to BTFA-Norleucine (NL).

後 BTFA 誘導体にし、GC-MS に導入して分析した。BTFA- β -AA および BTFA-NL にそれぞれ特有なマスフラグメントとして選んだ m/z 251 と 182 のマス chromatogram の一例を Fig. 3 に示す。前のピーク(走査番号 7)が BTFA-NL, 後のピーク(同 44)が BTFA- β -AA にそれぞれ相当する。これら両者の面積比 $A_{\beta-AA}/A_{NL}$ と重量比 $W_{\beta-AA}/W_{NL}$ の間には Fig. 4 に示すよう

Fig. 5. Effect of NH_3 on the Lysinoalanine and β -Aminoalanine Formation in 1% α -Lactalbumin. Temp.: 95°C , time: 30 min. $\bullet$, Lysinoalanine; $\circ$, β -aminoalanine.

に直線関係が得られたので、これをもとに β -AA の定量を行った。

2. α -ラクトアルブミンのアルカリ処理における LAL 生成に対するアンモニアの影響

α -ラクトアルブミンは、分子量 14,400 の球状タンパク質で、総アミノ酸残基数 233 個中、SS 結合(システイン残基) 4 個とリジン残基 12 個を含んでいる^(17,18)。

(1) アンモニア濃度の効果

アルカリ溶液中のアンモニア濃度を 0~2 M の範囲で変化させ、それぞれの溶液中で α -ラクトアルブミンを 95°C で 30 分間インキュベートした。そのときの LAL と β -AA の生成量を Fig. 5 に示す。アンモニア濃度 1 M までは、アンモニアの濃度が高くなるにつれて LAL 生成の抑制の程度は増大し、しかも、その抑制量にはほぼ等しい量の β -AA が生成した。アンモニアの濃度 1 M 以上では、その変化量は約 1 モル/モルタンパク質(以下モル/モル)となり一定となった。添加するアンモニ

Fig. 6. Time Course of Formation of Lysinoalanine and β -Aminoalanine in 1% α -Lactalbumin. (a) 95°C, (b) 55°C, (c) 30°C. ●—●, Lysinoalanine formation by alkali treatment with NH_3 ; ●---●, lysinoalanine formation by alkali treatment without NH_3 ; ○—○, β -aminoalanine formation by alkali treatment with NH_3 .

アは 2 M で LAL の生成を十分に抑制することができると考えられたため、以下の実験でのアンモニア濃度は 2 M とした。

(2) 温度の効果

β -AA の生成には温度の効果が著しく、アルカリ処理時の温度が高いほどその生成量は増加した。

95°C でのアルカリ処理の結果を Fig. 6(a) に示す。LAL の生成量は最大約 4 モル/モルであった。30 分までは、LAL の生成と β -AA の生成とが競合し、アンモニアの添加によって LAL の生成は約 70% になり、 β -AA は LAL 生成の抑制量にほぼ等しい量が生成した。30 分以後は、LAL は分解を受けるためにみかけ上生成量が減少したが、 β -AA には分解は起こらず、増加し続け、2 時間以後約 2 モル/モルの生成量で一定となった。なお、合成 LAL をアンモニア共存下でアルカリ処理しても、 β -AA の生成はみられないので、分解した LAL から β -AA が生成することはないといえる。

55°C における実験結果を Fig. 6(b) に示す。LAL の生成量は最大約 5 モル/モルであった。10 時間以内の反応で、LAL の生成はアンモニアの添加によって約 20

Fig. 7. Effect of NH_3 on the Lysinoalanine and β -Aminoalanine Formation in 1% Phosvitin. Temp: 95°C, time: 30 min. ●, Lysinoalanine; ○, β -aminoalanine.

% 抑制された。アンモニア非添加の場合、LAL の一部の分解が観察された (10 時間後 5 モルが 24 時間後 4 モルとなった) が、アンモニア添加の場合には観察されなかった。一方、 β -AA の生成量は、1 モル/モルで、アンモニア添加による LAL 生成の抑制量とほぼ一致した。

30°C における実験結果を Fig. 6(c) に示す。LAL の生成量は最大約 3 モル/モルで、アンモニアの添加による LAL の生成抑制は観察されなかった。また、 β -AA の生成量は 0.2 モル/モル程度にとどまった。

3. ホスピチンのアルカリ処理における LAL 生成に対するアンモニアの影響

ホスピチンは、分子量 35,500 のリンタンパク質で、総アミノ酸残基数 224 個中、O-ホスホセリン残基 119 個とリジン残基 17 個を含み、シスチン残基を含まない⁽¹⁹⁾。

(1) アンモニア濃度の効果

アルカリ溶液中のアンモニア濃度を 0~4 M の範囲で変化させ、それぞれの溶液中でホスピチンを 95°C で 30 分間インキュベートしたときの LAL と β -AA の生成量を Fig. 7 に示す。 β -AA の生成量はアンモニア濃度が高くなるにつれ直線的に増加し、4 M では約 40 モル/モルに達した。一方 LAL の生成量は減少したが、その減少の程度は β -AA の生成量の増加の程度ほどには大きくなかった。以下の実験では、 α -ラクトアルブミンの場合の結果と比較できるようにアンモニア濃度を 2 M とした。

(2) 温度の効果

95°C でホスピチンをアルカリ処理した場合の結果を Fig. 8(a) に示す。アンモニア非添加の場合、LAL の生

成量は 30 分後に最大値約 9 モル/モルに達した後、2.5 モル/モルまで減少した。アンモニアの添加によって LAL の生成は 10~30% 抑制された。一方、 β -AA の生成量は、アンモニアを添加した場合、時間とともに増加を続け、6 時間後には 74 モル/モルに達した。アンモニアを添加しない場合に β -AA が約 3 モル/モル生成した。後述の 55°C の実験でも同様であったが、これらの場合のアンモニアの給源はホスピチン中のグルタミンやアスパラギンであると考えられる。

55°C における実験結果を Fig. 8(b) に示す。アンモニアを添加しない場合 LAL の生成量は 2 時間で最大値約 12 モル/モルに達した後、3 時間以降 11 モル/モルで一定になったのに対し、アンモニアを添加した場合は LAL は継続的に増加して 10 時間以降 7 モル/モルで一定になった。アンモニアの添加によって LAL の生成は、反応時間が短い段階では約 70%，反応時間が長くなると約 35% 抑制された。一方、 β -AA の生成量は時間とともに増加し、48 時間では約 55 モル/モルに達した。

30°C における実験結果を Fig. 8(c) に示す。LAL の生成量は最大約 4 モル/モルであった。アンモニアの添

加によって、8 時間以内の反応では LAL の生成はある程度抑えられたが、24 時間の反応では抑えられなかった。またアンモニアを添加した場合の β -AA の生成量は時間とともに増加し、72 時間で 14 モル/モルに達した。

考 察

LAL や β -AA の前駆体である DHA の供与体になりうるアミノ酸は、シスチン⁽²⁰⁾や OH 基に置換基を持つセリン⁽²¹⁾などであると考えられている。本実験で用いた α -ラクトアルブミンでは 4 個のシスチン残基が、ホスピチンでは 119 個の O-ホスホセリン残基がそれぞれ DHA 残基の供与体になりうると思われる。

本実験では、 α -ラクトアルブミンとホスピチンにおいて、アンモニアを加えることにより、DHA 残基との反応に対するリジン残基の ϵ -アミノ基とアンモニアの競合が認められた。すなわち、両タンパク質において、アルカリ処理時にアンモニアを加えると LAL の生成が抑えられ、DHA 残基にアンモニアが付加してできる β -AA が生成した。しかし、その LAL 生成の抑制や β -AA 生成の様子は、両タンパク質間で異なっていた。

α -ラクトアルブミンの場合、アンモニア濃度 1 M 以下では、LAL 生成の抑制量と β -AA の生成量はアンモニア濃度が高くなるにつれて増加したが、アンモニア濃度が 1 M 以上になると、アンモニア濃度に関係なく両者の量は一定となった。また、95°C および 55°C 処理では、いずれの時間においても LAL 生成の抑制量と β -AA の生成量はほぼ等しく、その量は、タンパク質 1 モル当り 95°C で 2 モル、55°C で 1 モルが最高であった。

一方、ホスピチンの場合、アンモニアの濃度を高くするほど LAL 生成の抑制量も β -AA の生成量も増加し、とくに β -AA の生成量の増加は直線的で大きかった。LAL 生成の抑制量は、タンパク質 1 モル当り 95°C で 2 モル、55°C で 5 モルが最高であったが、 β -AA の生成量は、処理温度が高いほど、また処理時間が長いほど大きくなり、本実験の時間範囲ではプラトーに達する点を観察することはできなかった。

このような違いは、 α -ラクトアルブミンは球状構造をとるがホスピチンはとらないこと、および両タンパク質間の DHA 供与体数の差によると考えられる⁽¹⁷⁻¹⁹⁾。Hasegawa らは、 α -ラクトアルブミンは球状構造を持つため、LAL 生成において一次構造上のリジン残基と

Fig. 8. Time Course of Formation of Lysinoalanine and β -Aminoalanine in 1% Phosvitin. (a) 95°C, (b) 55°C, (c) 30°C. ●—●, Lysinoalanine formation by alkali treatment with NH_3 ; ●---●, lysinoalanine formation by alkali treatment without NH_3 ; ○—○, β -aminoalanine formation by alkali treatment with NH_3 ; ○---○, β -aminoalanine formation by alkali treatment without NH_3 .

DHA 残基 (シスチン由来) の近傍関係が大きい影響を有することを見出した⁽²²⁾。一方、ホスピチンは溶液中で比較的自由な形状で存在しており、DHA 残基 (O-ホスホセリン由来) へのリジン残基の求核反応時に α -ラクトアルブミンほど構造的制限を受けず、一次構造上離れた位置にあるリジン残基も反応して LAL を生成するが、このことは DHA 残基に対するアンモニアの反応もその機会が多いことを意味し、そのため、 α -ラクトアルブミンの場合よりもホスピチンの場合に、より大きくアンモニアによる LAL 生成の抑制を受けるようになったのであろうと考えられる。

また、DHA 供与体は、先にも述べたとおり、 α -ラクトアルブミンでは 1 分子当り 6 個のシスチン残基である⁽²²⁾のに対し、ホスピチンでは 119 個の O-ホスホセリン残基と数が多い。そのため、 β -AA の生成量は α -ラクトアルブミンではそれぞれの温度で上限があった (95°C で 2 モル/モル, 55°C で 1 モル/モル, 30°C で 0.2 モル/モル) のに対し、ホスピチンではいずれの温度でも直線的な増加をし続けた。おそらく、存在する O-ホスホセリン残基からできた DHA 残基がすべて β -AA になるまで β -AA の生成量は増加し続けると考えられる。

温度の効果についていえば、高温処理ほどラセミ化が起りやすいことが知られている⁽²³⁾が、これはすなわち β -脱離も起りやすいと考えられ、そのため、 β -AA の生成量が両タンパク質で高温処理ほど増加したといえる。また、30°C 処理では、両タンパク質において、今回はアンモニアによる LAL 生成の抑制は認められなかった。LAL 生成のアンモニアによる抑制は、30°C のような低温処理の場合には効果がないと思われる。

また、95°C でアルカリ処理をした場合、アンモニアの存在の有無にかかわらず両タンパク質ともに一度生成した LAL が加熱時間の経過とともに分解することが観察された (Fig. 6(a), Fig. 8(a))。55°C でも、アンモニアが存在しない場合に軽度の分解が起こるが、アンモニアの存在する場合には生成した LAL の分解は観察されなかった (Fig. 6(b), Fig. 8(b))。アンモニアの存在しない場合に LAL の分解が起こることは、リゾチームと α -ラクトアルブミンでは 80°C と 55°C、また α_{s1} -カゼインの場合には 95°C と 50°C で、それぞれ一度生成した LAL の分解が観察されている⁽²²⁾ことと一致する。Fig. 6(b), Fig. 8(b) にみられたアンモニアの存在する場合に 55°C

で LAL の生成が一部抑制され、同時に一度生成した LAL の分解が起こらないことは本報において初めて見出されたことであり、その理由はおそらく生成した LAL の分子内の位置に関係するものと思われるが、その詳細については今後の研究にまたねばならない。

今回の実験でアンモニアを加えることで中温度以上のアルカリ処理では LAL の生成をある程度抑えることが可能であることがわかったが、新たに生成する β -AA についてその人体に及ぼす影響などをさらに研究する必要があるものと考えられる。

要 約

アルカリ処理時にアンモニアが存在すると、リジノアラニンの生成の場合と同様の反応機構で β -アミノアラニンが生成する。このことを用いて種々の実験を行い、以下のような結果を得た。

(1) β -アミノアラニンを *N*-トリフルオロアセチル-O-ブチル誘導体にし、GC-MS に導入するマスキングマトグラフ法により、その定量を可能にした。

(2) α -ラクトアルブミンおよびホスピチンをアンモニアの存在下でアルカリ処理すると、95°C, 55°C の場合、リジノアラニンの生成が抑制されたが、30°C では抑制されなかった。

(3) β -アミノアラニンは、両タンパク質でアンモニア存在下でのアルカリ処理によって生成され、その生成量は、処理温度が高いほど大きかった。

(4) アンモニアの存在下でのアルカリ処理によるリジノアラニンの生成抑制の程度と、 β -アミノアラニンの生成の程度は、両タンパク質間で異なっており、タンパク質の構造に大きく影響を受けると考えられた。

本研究は、昭和 59 年度文部省科学研究費 (一般研究 (B)) によった。記して謝意を表す。

- (1) Z. Bohak : *J. Biol. Chem.*, **239**, 2878 (1964).
- (2) J. C. Woodard and D. D. Short : *J. Nutr.*, **103**, 569 (1973).
- (3) M. Sternberg, C. Y. Kim and F. J. Schwenke : *Science*, **190**, 992 (1975).
- (4) 岡本敬子, 北島章子, 小沢春美, 長谷川喜代三 : 家政学研究 **26**, 103 (1980).
- (5) 岡本敬子, 長谷川喜代三 : 家政学雑誌, **36**, 17 (1982).
- (6) M. Friedman, J. Zahnley and P. M. Masters : *J. Food Sci.*, **46**, 127 (1981).

- (7) K. Abe, S. Homma, M. Fujimaki and S. Arai : *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 573 (1984).
- (8) L. V. Beek, V. J. Feron and A. P. DeGroot : *J. Nutr.*, **104**, 1630 (1974).
- (9) D. H. Gould and J. T. MacGregor : "Protein Cross-Linking 2," ed. by M. Friedman, Plenum Press, New York and London, 1977, p. 29.
- (10) B. J. Struthers, R. R. Dahlgren, D. T. Hopkins and M. L. Raymond : "Soy Protein and Human Nutrition," Academic Press, New York, 1979, p. 235.
- (11) R. Hayashi : *J. Biol. Chem.*, **257**, 13896 (1982).
- (12) M. Friedman : "Nutritional Improvement of Food and Food Proteins," Plenum Press, New York and London, 1978, p. 613.
- (13) J. R. Whitaker and R. E. Feeney : *CRC Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, **19**, 173 (1983).
- (14) R. S. Asquith and J. D. Skinner : *Textilveredlung*, **5**, 5406 (1970).
- (15) A. S. Nashef, D. T. Osuga, H. S. Lee, A. I. Ahmed, J. R. Whitaker and R. E. Feeney : *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 245 (1977).
- (16) K. Hasegawa and N. Okamoto : *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 649 (1980).
- (17) K. Brew, F. J. Castellino, T. C. Vanaman and R. L. Hill : *J. Biol. Chem.*, **245**, 4570 (1970).
- (18) T. C. Vanaman, K. Brew and R. L. Hill : *J. Biol. Chem.*, **245**, 4583 (1970).
- (19) G. Taborsky : *Adv. Protein Chem.*, **28**, 50 (1974).
- (20) R. S. Asquith and P. Carthew : *Biochim. Biophys. Acta*, **278**, 8 (1972).
- (21) J. R. Whitaker and R. E. Feeney : "Protein Cross-Linking 2," ed. by M. Friedman, Plenum Press, New York and London, 1977, p. 155.
- (22) K. Hasegawa, N. Okamoto, H. Ozawa, S. Kitajima and Y. Takado : *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1645 (1981).
- (23) D. E. Schwass and J. W. Finley : *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 1377 (1984).