プロテアーゼの特殊反応によるタンパク質状界面活性剤の作成

渡 辺 道 子

(東京大学農学部)

はじめに

数ある食用タンパク質のなかでごく限られたものだけが頻用され、多くのものは加工性の低さのために用途が制限されている現状をみると、このような低利用タンパク質を有効利用する技術基盤を確立することこそ最も今日の重要な課題であるように思える。その方途として、低利用タンパク質の化学構造の意図的修飾がある。これによって、タンパク質の付加価値をより高いものへと改変しうるからである。

近年、タンパク質の重要な機能特性の1つとして界面活性が注目されてきた⁽¹⁾。高い界面活性を示すタンパク質は明確に局在した親水部と疎水部から成るという一般則がある⁽²⁾。親水性タンパク質に長鎖アルキル基のような疎水基を付加したり、疎水性タンパク質に糖などの親水基を付加したりすれば、明確に親水部と疎水部が局在した修飾タンパク質が得られるはずである。たいていのタンパク質は未変性の状態では疎水部を内部に埋め込んで親水部を露出した高次構造をとっていて、変性すると親水部と疎水部が入り乱れた面が外界と接するようになる。このような状態のタンパク質は、明確に親水部と疎水部が局在したタンパク質より乳化性や起泡性で代表される界面特性は劣るであろう。

著者の研究グループは、酵素修飾法を用いて親水部と疎水部が明確に局在したタンパク質状界面活性剤を作成する方法を提出した⁽³⁾。本稿ではこの酵素修飾法の考え方と、実際に作成された界面活性タンパク質の性質について述べる。

1. 酵素修飾法の考え方

プラスチック反応はプロテアーゼ触媒でタンパク質水解物からタンパク質状物質を得る反応である。この反応を応用すれば、エステル型のアミノ酸をペプチドの主としてC末端側に、共有結合状に導入するこれができる⁽⁴⁾。タンパク質水解物の代わりにタンパク質そのものを使っ

てもアミノ酸の導入ができる⁽⁵⁾。この反応にはパパインが最も有効な触媒であり、パパインによる加水分解反応の条件とは異なった pH 8~10 という微アルカリ性と高基質濃度が要求される。この反応は下記のような加水分解とアミノ分解の拮抗で説明されるので、アセトンなどの有機溶媒を加えて水の濃度を下げると有効にアミノ酸エステルが導入された生成物を得ることができる⁽⁵⁾。

ここでEは酵素（パパイン）、Sは基質タンパク質、ESはミカエリス複合体、ES'はアシル酵素、Nは親核試薬（アミノ酸エステル）、P₁とP₂は水解反応生成物、P₃はアミノ分解生成物である。アミノ分解を受けた生成物（P₃）はアミノ酸エステル（N）をC末端に共有結合状に付加することになる。

高度親水性タンパク質に、高度疎水性アミノ酸エステルをアミノ分解によって付加すれば、界面特性にすぐれた修飾タンパク質が得られる、という理論的背景のもとに、著者らは基礎的および応用的研究を進めた。以下にその成果のいくつかを述べる。

2. 基礎研究——サクシニル α_{s1}-カゼインへのロイシンドデシルエステルの導入

一次構造既知の α_{s1}-カゼインをサクシニル化して親水性を高め、これに疎水基としてロイシンドデシルエステルを導入した^(6,7)。酵素反応条件は、溶媒、20% アセトンと 10 mM L-システインを含有する 1 M 炭酸緩衝液 (pH 9)；サクシニル α_{s1}-カゼイン濃度、20%；L-ロイシンドデシルエステル濃度、0.25 M；パパイン（再結晶標品）濃度、0.02%；反応温度、37℃；反応時間、60 分以内である。反応初期過程で 25,000 ダルトンのサクシ

ニル α_{s1} -カゼインの Phe¹⁴⁵ と Tyr¹⁴⁶ の間のペプチド結合の解裂が起こって 20,000 ダルトンの成分が生成し、生成物の C 末端にロイシンドデシルエステルが導入され、図 1 に示すような両親媒構造ができあがった。この両親媒構造が生成物の界面活性に寄与すると考えられる。

3. 応用研究——酵素修飾ゼラチン

A. 調製法 ゼラチンはコラーゲンから酸性あるいはアルカリ性条件下で水溶化されたタンパク質であってコラーゲン由来の X-Y-Gly 構造のために疎水領域を持たないという特徴がある。著者ら⁽⁸⁾はアルカリゼラチンを原料とし、これにパバイン触媒で L-ロイシンドデシルエステルを導入して両親媒構造を意図的に作りあ

図 1 パバイン触媒によるサクシニル α_{s1} -カゼインへの L-ロイシンドデシルエステルの共有付加とそれによって作られた両親媒構造を持つマクロペプチドの模式図

一次構造上の縦線は親水性アミノ酸残基の位置を示す。

げた。酵素反応条件は前述と同様であるが、この場合には基質タンパク質濃度を 33% にまで高めることが技術的に可能であった。塩酸で pH を 1 に下げることによって反応を停止し、流水透析後凍結乾燥して粉末の酵素修飾ゼラチン (EMG-12) が得られた。残存するロイシンドデシルエステルを除くには粉末をジクロロメタンか温アセトンで洗浄すればよい。

B. 一般的性質 著者らによって明らかにされた EMG-12 の性質を表 1 に要約する。EMG-12 の分子量は 2000~40,000 に分布し、平均分子量は 7500 である。ロイシンドデシルエステルの含量は EMG-12 7500 g 当り 1 mol である⁽⁸⁾。EMG-12 の疎水性度がゼラチンよりはるかに高いのはこのためと考えられる⁽⁹⁾。EMG-12 の臨界ミセル濃度 (cmc) は 0.02~0.04% であり⁽¹⁰⁾、cmc 以上の EMG-12 を純水に分散させると水の表面張力を 72.75 dyn/cm から 35 dyn/cm にまで下げることができる。高濃度 (30~60%) の EMG-12 分散液は部分的に液晶構造が観察される⁽¹¹⁾。おそらく空気と水あるいは油と水の界面で EMG-12 は液晶構造をとっているのだろう。

乳化力および乳化安定性から評価される EMG-12 の乳化特性は Tween-80 などの市販乳化剤より概して優れている^(12~14)。図 2 は EMG-12 で乳化した水中油滴型 (o/w 型) エマルションと Tween-80 のそれを比較したものであるが、前者のほうが油滴が小さくて均質である。表 1 の測定値を通覧すると、EMG-12 がゼラチンやゼラ

表 1 ゼラチンおよびゼラチン水解物との比較における EMG-12 の物理化学的性質および機能特性

項 目	ゼラチン	ゼラチン水解物	EMG-12
一般的性質			
分子量	30,000 以上	7500 (平均)	7500 (平均)
ドデシル基含量	—	—	約 1 モル/7500 g
有効疎水性度	33	11	240
分散液の性質			
臨界ミセル濃度	ミセル形成しない	ミセル形成しない	0.02~0.04%
表面張力低下	60 dyn/cm まで	60 dyn/cm まで	35 dyn/cm まで
相特性	相変化しない	相変化しない	部分的に液晶形成
乳化特性			
乳化活性	低い	低い	高い
乳化安定性	低い	低い	高い
分子占有面積	—	—	48 Å ²
低温物理学的性質			
o/w エマルションの過冷却	—	—	-10°C で安定
水分散液の過冷却	不安定	不安定	-7°C で安定
ヨウ化銀結晶への吸着	ない	ない	表面に吸着して氷晶核としての機能をなくす

図 2 EMG-12 (A) および Tween-80 (B) で乳化したエマルジョンの顕微鏡写真

チン水解物と機能特性を大きく異にすることがわかる。

C 特殊機能 最近になって EMG-12 で乳化した o/w 型エマルジョンに不凍性が見出された⁽¹⁵⁾。一般に、物質が結晶するためには結晶核の存在が必須である。水の凍結でも例外ではない。氷晶核が存在しないと水は永点下の温度で過冷却状態となる。氷晶核の働き方には 2 通りの場合が知られており、その 1 つは水分子自体がクラスターを作る均一核生成であり、もう 1 つは水以外の物質が核となる不均一核生成である。ヨウ化銀は不均一核として作用し、水の過冷却を抑制する。著者らはヨウ化銀を加えて EMG-12 の o/w 型エマルジョンを調製し、このエマルジョンの不凍機構を調べた。

冷凍保蔵中に o/w 型エマルジョンの水が凍ると乳化状態がこわれるので、氷晶核を不活性化して凍結を防ぐことは意味あることである。現行の不凍剤としては束一的氷点降下を期待して低分子量のものが用いられているが、浸透圧の問題が伴わないという利点のために高分子量物質のほうが望ましい。この意味で EMG-12 の不凍効果には関心が寄せられている。図 3 はヨウ化銀存在下で EMG-12 または Tween-80 を用いてリノール酸（融点は -12°C ）と水を乳化させたものの凍結-融解曲線である。パルス NMR でエマルジョンの水の存在状態を観測すると、Tween-80 を含むエマルジョンは -4°C 付近で水の凍結が起こるのに対して、EMG-12 を含むエマルジョンの水は -10°C 付近まで過冷却する^(15,16)。乳化物にあとからヨウ化銀を加えたのでは -7°C までしか過冷却しない⁽¹⁷⁾ あらかじめヨウ化銀を加えておいてから

図 3 EMG-12 (A) および Tween-80 (B) で乳化したエマルジョンの凍結-融解曲線
A では約 -10°C までのバルク水の過冷却現象が観察される。

図 4 EMG-12 およびゼラチン水解物水分散液にヨウ化銀を混合したときの発熱反応の示差熱分析による観察
A, 0.1% EMG-12; B, 0.01% EMG-12, C; ゼラチン水解物。

乳化したものの走査型電子顕微鏡写真から、ヨウ化銀は油滴の表面に固定されていることがわかった⁽¹⁷⁾。前述のように、エマルジョンの油滴を囲んだ EMG-12 は液晶構造をとると予想されることから、油滴表面に固定されたヨウ化銀はバルク水との接触が断たれ、氷晶核としての機能を失ってしまうらしい。

ヨウ化銀存在下の EMG-12 水分散液でも水は過冷却する。エマルジョンの場合とちがって水分散液では -7°C 付近で水は凍る。上述のように乳化してからヨウ化銀を加えた系で -7°C で水が凍ったのは、ヨウ化銀を水分散液に加えたのと同じ状態になったからである。過

図5 水分散液の EMG-12 濃度と過冷却の関係

冷却状態を安定に保つには、不均一氷晶核の表面に分散質を吸着させることによって氷晶核としての機能を失わせればよいという作業仮説に基づいて、EMG-12 のヨウ化銀への吸着の生起を調べた。0.1% EMG-12 水分散液の中にヨウ化銀水懸濁液を混合すると、図4に示すような発熱が観察された⁽¹⁷⁾。0.01% EMG-12 水分散液や0.1% ゼラチン水解物ではこのような発熱現象は認められなかった。このことは、EMG-12 がある濃度以上になってはじめて水の過冷却が起こるという事実(図5)と一致している。興味深いことに、この濃度は EMG-12 の cmc に近かった⁽¹⁰⁾。

最近、著者らは民間企業と共同で、アラニンミリスチンエステルを付加した酵素修飾ゼラチンを開発した。この物質はすでに工業的に製造され、製品化されている。酵素修飾タンパク質のうち、加水分解以外の反応を施すことによって実用化されたものとしては、おそらくこの物質が初めての例であろう。

おわりに

食品工業で関心がもたれるのはおもに *in vitro* 修飾、すなわち人為的な修飾である。この方法は、加工・貯蔵中のタンパク質の劣化の防止と品質の改良を目的として行われるので、意図的修飾とよばれる。タンパク質は、その物理・化学的性質の多様化と変幻性のため、さまざまな目的を指向した意図的修飾の対象とされ、いろいろな種類の化学的・酵素的修飾が試みられている。その代表的な一例が、本稿で述べたアミノ酸の共有付加を伴う酵素的修飾法であるといえよう。この知見が、食品タンパク質の改質を目指した基礎研究および応用研究の両面に少なからず参考となることを期待している。

- (1) J. E. Kinsella and K. J. Shetty: in "Functionality and Protein Structure," (ACS Symposium Series No. 92), ed. by A. Pour-El, American Chemical Society, Washington, D. C., 1979, p. 37.
- (2) D. Attwood and A. T. Florence: in "Surfactant Systems: Their Chemistry, Pharmacy and Biology," Chapman and Hall, London, 1983, p. 1.
- (3) M. Yamashita, S. Arai, Y. Imaizumi, Y. Amano and M. Fujimaki: *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 52 (1979).
- (4) M. Fujimaki, S. Arai and M. Yamashita: in "Food Proteins: Improvement through Chemical and Enzymatic Modification," (Advances in Chemistry Series No. 160), ed. by R. E. Feeney and J. E. Whitaker, American Chemical Society, Washington, D. C., 1977, p. 156.
- (5) S. Arai, M. Yamashita and M. Fujimaki: in "Water Activity: Influences on Food Quality," ed. by L. B. Rockland and G. E. Stewart, Academic Press, New York, 1981, p. 489.
- (6) S. Arai, M. Watanabe and S. Toiguchi: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 3085 (1982).
- (7) S. Toiguchi, S. Maeda, M. Watanabe and S. Arai: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2945 (1982).
- (8) M. Watanabe, H. Toyokawa, A. Shimada and S. Arai: *J. Food Sci.*, **46**, 1467 (1981).
- (9) A. Shimada, E. Yazawa and S. Arai: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 173 (1982).
- (10) A. Shimada, I. Yamamoto, H. Sase, Y. Yamazaki, M. Watanabe and S. Arai: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2681 (1984).
- (11) I. Yamamoto, K. Kusuhashi, M. Matsumoto, A. Shimada, M. Watanabe and S. Arai: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2689 (1984).
- (12) M. Watanabe, A. Shimada and S. Arai: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1621 (1981).
- (13) M. Watanabe, N. Fujii and S. Arai: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1587 (1982).
- (14) S. Arai, M. Watanabe and N. Fujii: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1861 (1984).
- (15) S. Arai, M. Watanabe and R. F. Tsuji: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2173 (1984).
- (16) M. Watanabe, R. F. Tsuji, N. Hirao and S. Arai: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3291 (1985).
- (17) 未発表