小麦粉生地形成における内在性酸化還元酵素の役割

野 口 智 弘

東京農業大学応用生物科学部食品加工技術センター

The Role of Endogenous Oxidoreductase in Dough Formation

Tomohiro Noguchi

Food Processing Center, Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo University of Agriculture,
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya, Tokyo 156-8502

Wheat flour is added to and mixed with water to hydrate and associate gliadin and glutenin to form gluten. In addition to various minor interactions such as hydrogen bonding and hydrophobic interaction for proper gluten formation, it is acknowledged that disulfide bonds (SS bonds) between cysteine residues are important. Further, in terms of breeding, genes encoding proteins having excellent SS bond-forming ability, represented by *Glu-D1d*, are critical. There has been much research on endogenous redox substances and enzymes in the mechanism of SS bond formation in the manufacturing process; however, consensus regarding the relationship has not been obtained. Protein disulfide isomerase (PDI, EC 5.3.4.1) is present in the endoplasmic reticulum, and is a molecular chaperone that forms intramolecular (interstitial) SS bonds during protein expression. When PDI forms SS bonds in gluten, it is reduced (PDIred) and loses its oxidizing ability. It is known that oxidative regeneration to oxidized PDI (PDIoxi) by endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 (ERO1) occurs in vivo, and ascorbic acid (AA) as a dough-improving agent is involved in this regeneration in wheat flour dough. AA is converted to dehydroascorbic acid (DHA) by ascorbate oxidase in the dough. When examining the effect of DHA on PDIred, conversion to PDIoxi progresses efficiently, and since it catalyzes SS bond formation in substrate protein, it is inferred that the dough-improving effect by AA is brought about in cooperation with PDI.

(Accepted Dec. 14, 2020)

Keywords : Bread, Dough, PDI, Ascorbic acid, Disulfide bond

キーワード : パン, グルテン, PDI, ジスルフィド結合, アスコルビン酸

1. はじめに

小麦粉に水を加え混捏すると独特の粘弾性を示す生地(ドウ)が形成される。この生地形成能は他の穀類にはみられない小麦特有のものである。また、「パン」や「うどん」などに代表される小麦粉加工品の製造に深く関わり、小麦粉はその生地の粘性や弾性の強度により強力粉、中力粉、薄力粉などに分類される。小麦粉の生地形成とその独特の物性は、小麦貯蔵タンパク質であるグリアジンとグルテニンが水和して形成される複合タンパク質・グルテンの性質によるものである。グルテンの形成には様々な結合や分子間相互作用が関与すると考えられているが、ジスルフィド結合(SS)形成を阻害すると、特に生地の物性が大きく低下することから、グルテンの形成に対しSS結合によるタンパク質の架橋結合が重要な働きを示すとされている。一般に製パンに適した小麦粉はタンパク質含量が高いとされ

ているが、タンパク質の量だけではなく、その質も加工特性に大きな影響を及ぼす。*Glu-D1d* 遺伝型は、高分子量グルテニンのサブユニット5とサブユニット10をコードし、生地物性に関与することが知られている¹⁾。サブユニット5は、他のサブユニットでは2個のシステインで分子間SS結合を形成し直鎖状になるのに対して、3個のシステインで分子間SS結合を形成することで、密なグルテン構造が形成されて生地物性が向上する。このことから、育種の面ではSS結合形成能の高いタンパク質に着目した研究が進められている。一方で、加工過程におけるSS結合形成メカニズムについては、内在性の酸化還元物質の影響や臭素酸カリウムおよびアスコルビン酸などの酸化剤、グルコースオキシダーゼ等の酵素に関する多くの研究報告があるが、それらの関係性について統一した理解は得られていない。筆者らは生地物性に対する酸化還元酵素に着目し検討を行っており、本稿ではプロテインジスルフィドイソメ

ラーゼ (PDI, EC 5.3.4.1) と製パン性について解説する。

2. 小麦内在 PDI

PDI は小胞体中に存在し、タンパク質発現時に分子内 (間) に SS 結合を形成させる分子シャペロンである²⁾。生物に広く分布し、植物においてもトウモロコシ³⁾ や大豆⁴⁾、小麦⁵⁾ など様々な種に存在することが報告されている。これら PDI は、登熟過程に機能し各貯蔵タンパク質の発現に大きく関わっている。小麦において登熟過程における PDI の発現量は、開花後 10 日目ごろより増加し 15~20 日ごろにピークを迎え (Fig. 1), PDI 活性は登熟後期に最大となる⁸⁾ (Fig. 2)。その後、発現量は低下するがこの期間に発現された PDI が小麦粉中に残存し、生地混捏時の SS 結合形成に関与すると推察された。

3. 小麦内在 PDI と酸化剤との関係

製パン現場では酸化的製パン改良剤としてアスコルビン酸 (AA) が用いられている。一般的に AA は還元作用を

Fig. 1 Changes in wheat PDI amount during ripening process⁸⁾

Wheat PDI was detected by Western blotting analyses with anti-wheat recombinant PDI (TaPDI1-1) mouse polyclonal antibody⁸⁾.

有することから抗酸化剤として用いられているが、小麦生地中では生地中の酸素や酵素によってデヒドロアスコルビン酸 (DHA) に変換され、酸化剤として機能する⁹⁾。小麦粉タンパク質のポリペプチド鎖間 SS 結合は、製パン過程で還元型グルタチオン (GSH) によるスルフヒドリル/ジスルフィド (SH/SS) 交換反応により切断されるが¹⁰⁾、DHA は GSH を酸化型グルタチオン (GSSG) へと酸化することで、SS 結合の還元を防止する¹¹⁾。また、DHA がグルテンの SH 基を直接酸化し誌スルフィド結合を形成するとの報告¹²⁾ もみられるが、現在の主流の考えは前者である。

一方、小麦粉中に存在する PDI も酸化的条件下ではグルテン中に SS 結合を形成する。PDI は、基質タンパク質に SS 結合を形成させると自らは還元型 PDI (PDIred) となり酸化能を失う。生体内ではエンドプラズミックレティキュラムオキシドレダクターゼ 1 (ERO1) により、酸化型 PDI (PDIoxi) に酸化再生され、酸化能が回復し SS 結合形

Fig. 2 PDI activity in wheat grains of different cultivars during ripening stage⁸⁾

The PDI activity was measured using the insulin reducing activity measurement method^{6,7)}. ○, Norin No.61; ●, Satonosora; ■, Yumekaori; ▲, Hanamanten

Fig. 3 SS bond formation mechanism by PDI and ERO1

-oxi, Oxidized form; -red, Reduced form

Fig. 4 SS bond formation of wheat protein mediated by wheat endogenous PDI was stimulated by ERO1

The amount of SS bond formed was calculated from the decrease in SH groups measured by the NBD-CL method¹³⁾. A, protein sample extracted from wheat flour (Haruyutaka) with an extraction buffer (0.1M phosphate buffer (pH 7.5) containing 5 mM EDTA, 2 mM PMSF and 1 % Triton X-100); B, sample A supplemented with ERO1 (10 times molar ratio to PDI) and FAD (100 times molar ratio to PDI). Extracted wheat flour proteins were fractionated by ammonium sulfate precipitation and dialyzed against 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) before the enzymatic reaction (3 h, 37 °C).

Fig. 5 Specific volume of baked bread supplemented with TaPDI and TaERO1

A, Strong flour (200 g, Camellia); B, Medium flour (200 g, Suzume); C, B + TaPDI (50 U; 8 nmol); D, B + TaPDI (50 U; 8 nmol) + TaERO1 (8 nmol) + FAD (8 μmol); E, D + 10 times more TaERO1 (80 nmol); F, D + 20 times (160 nmol) TaERO1. Vertical bars show the SD of each value ($n=3$). Bars labelled with different letters are significantly different at $p<0.01$.

成が滞りなく進む (Fig. 3). 小麦においても, 小麦粉抽出液を 37 °C にて 3 時間加温すると小麦タンパク質中に SS 結合形成が確認され, さらに, リコンビナント ERO1 (TaERO1) および FAD を添加し, PDI の酸化再生を促すことで, SS 結合形成量は著しく増加する (Fig. 4). また,

Fig. 6 Effect of DHA on SS bond formation of wheat protein by TaPDI

The substrate proteins were extracted with 0.1 M acetic acid from hard wheat flour. The amount of SS bond formed was calculated from the amount of decrease in SH groups measured by the NBD-CL method¹²⁾. A, DHA (2 nmol); B, TaPDI (5 U, 0.8 nmol); C, B + AA (2 nmol); D, B + DHA (2 nmol). Enzymatic reaction conditions, for 3 hours at 37 °C. Vertical bars show the SD of each value ($n=3$). Bars labelled with different letters are significantly different ($p<0.05$).

Table 1 Reactivity between reduced PDI (PDIred) and DHA

Amount of PDIred (nmol)	Amount of DHA (nmol)	Amount of AA (nmol)
0	356.3±3.1 ^a	N.D.
25	322.8±19.1 ^{a,b}	33.0±2.6 ^a
50	284.0±22.0 ^b	48.7±8.3 ^b
100	266.4±30.1 ^c	126.8±4.4 ^c

The amount of DHA was measured by the hydrazine method. Mean values were shown with the SD of each value ($n=3$). Values labelled with different letters are significantly different ($p<0.05$). N.D., not detected

リコンビナント PDI (TaPDI) を用いた製パン試験においても TaPDI のみでは中力粉を用いたパンの比容積向上は認められなかったが, TaERO1 および FAD を併用することにより, 比容積の増加が確認された (Fig. 5). さらに, ERO1 の添加量を増加させると強力粉並みの比容積を示すことから, 製パンにおいて PDI の酸化再生機構の存在が必要不可欠であることが解る. 一方で TaPDI のみの添加における製パン改良効果が低いことは, 小麦粉内在 ERO1 が PDI の酸化再生能を十分に発揮できていない可能性がある. ERO1 は小胞体膜結合タンパク質であるため, 製パン時において PDI との会合性が低いことが要因であると推察される. 製パン性に対し小麦粉内因性の酸化還元酵素と AA との関係性を検討した研究において, PDI のみに AA 併用による製パン性改良効果が示されたとの報告がある¹⁴⁾. そこで, 筆者らが AA および DHA を TaPDI と組み

合わせ、小麦生地中のSS結合形成量を測定したところ、PDI添加のみとAA併用の間に有意なSS結合形成量の増加はみられなかった (Fig. 6)。一方で、PDIとDHAとの併用において、SS結合形成量に有意な増加を認めた。また、PDiredにDHAを作用させると、PDired濃度依存的にDHA量が減少し、AA量の増加がみられることから (Table 1)、AAは生地中でDHAに変換後、タンパク質へのSS結合形成によって還元型となったPDIを酸化型へ再生するものと考えられた。これらのことから、AAの製パン改良効果は、先述のGSHによるSS結合切断抑制機構に加え、小麦粉中で酸化型へと変換されたDHAが、PDIの酸化再生を促進することでもたらされる機構の存在も示唆された。

4. 終わりに

製パンには酸化還元に関わる様々な酵素や製剤が用いられているが、これらの作用に対しても小麦内在PDIがどのように関与しているかは興味のあるところである。SH基の酸化による生地改良効果は、単にSS結合形成によるグルテン骨格の強化のみならず、グルテン形成におけるタンパク質の分子間相互作用にも大きな影響を与える。今後、これら酵素によるグルテニンおよびグリアジンへのSS結合形成による構造や性状変化の解析が進み、小麦粉加工品における生地形成メカニズムの解明が進展することを期待する。

文 献

- 1) Noviva, R. and Lennarz, W.J. (1992). Protein disulfide isomerase: a multifunctional protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **267**, 3553-3556.
- 2) Payne, P.I., Corfield, K.G., Holt, L.M., and Blackman, J.A. (1981). Correlations between the inheritance of certain highmolecular-weight subunits of glutenin and bread-making quality in progenies of six crosses of bread wheat. *J. Sci. Food Agric.*, **32**, 51-60.
- 3) Li, C.P. and Larkins, B.A. (1996). Expression of protein disulfide isomerase is elevated in the endosperm of the maize floury-2 mutant. *Plant Mol. Biol.*, **30**, 873-882.
- 4) Kainuma, K., Ookura, T., Kitta, K., and Kawamura, Y. (1995). Purification and characterization of protein disulfide isomerase from soybean. *J. Biochem.*, **117**, 208-215.
- 5) Shimoni, Y., Zhu, X., Levanoy, H., Segal, G., Zhu, X., and Galili, G. (1995). Purification, characterization, and intracellular localization of glycosylated protein disulfide isomerase from wheat grains. *Plant Physiol.*, **108**, 327-335.
- 6) Holmgren, A. (1979). Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J. Bio. Chem.*, **254**, 9627-9632.
- 7) Lundström, J. and Holmgren, A. (1990). Protein disulfide-isomerase is a substrate for thioredoxin reductase and has thioredoxin-like activity. *J. Bio. Chem.*, **265**, 9114-9120.
- 8) 加藤 亮, 風見真千子, 徳本 脩, 野口智弘, 高野克己 (2016). 登熟過程における小麦粒中のプロテインジスルフィドイソメラーゼ発現量とその活性がジスルフィド結合形成に及ぼす影響. 日食保科誌, **42**, 207-211.
- 9) Lillard, D.W., Seib, P.A., and Hoseney, R.C. (1982). Isomeric ascorbic acids and derivatives of L-ascorbic acid: Their effect on the flow of dough. *Cereal Chem.*, **59**, 291-296.
- 10) Kuninori, T. and Matsumoto, H. (1963). L-Ascorbic acid oxidizing system in dough and dough improvement. *Cereal Chem.*, **40**, 647-657.
- 11) Sarwin, R., Laskawy, G., and Grosch, W. (1993). Changes in the levels of glutathione and cysteine during the mixing of doughs with L-threo- and D-erythro-ascorbic acid. *Cereal Chem.*, **70**, 553-557.
- 12) Tsen, C.C. (1965). The improving mechanism of ascorbic acid. *Cereal Chem.*, **42**, 86-97.
- 13) Andrews, D. C., Caldwell, R. A., and Quail, K. J. (1995). Sulfhydryl analysis. I. Determination of free sulfhydryls in wheat flour doughs. *Cereal Chem.*, **72**, 326-329.
- 14) Every, D., Simmons, L., and Ross, M.P. (2006). Distribution of redox enzymes in millstreams and relationships to chemical and baking properties of flour. *Cereal Chem.*, **83**, 62-68.

(令和2年12月14日受理)