

水産食品におけるトランスグルタミナーゼの開発利用

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
巻/号	685
掲載ページ	p. 633-636
発行年月	2002年9月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



受賞者総説

水産食品におけるトランスグルタミナーゼの開発利用

(平成 13 年度日本水産学会技術賞受賞)

熊澤 義之*

味の素株式会社商品開発センター

Development and application of transglutaminase for seafood products

YOSHIYUKI KUMAZAWA*

Ajinomoto Co., Inc. Food Products Development Center, Kawasaki, Kanagawa 210-8681, Japan

はじめに

トランスグルタミナーゼ (EC2.3.2.13, 以下 TG) は、タンパク質あるいはポリペプチド鎖中のグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基と各種 1 級アミン間のアシル基交換反応を触媒する酵素である。¹⁾ アシル受容体として、ポリペプチド中のリジン残基の ϵ -アミノ基が寄与した場合、分子内/間に ϵ -(γ -グルタミル) リジン結合 (以下 GL 結合) を形成する。その結果、タンパク質の立体構造が変化し、タンパク質の機能特性を大きく改質することが可能である。1983 年に味の素株式会社と天野製薬 (現天野エンザイム) との共同研究により、TG を生産する微生物が発見された。²⁾ タンパク質の機能改質が可能である本酵素の食品産業への応用可能性は、それまで主にモルモット肝臓起源のものにより強く示唆され続けていたが、供給起源の希少性が最大の課題であった。微生物 TG の発見により、この課題を解決した後の次なる課題は、本酵素をいかにして食品市場へ導入するかという点であった。食品への酵素の応用は、古くからなされてきたものの、そのほとんど全ては、プロテアーゼ、リパーゼ、アミラーゼ等基質の低分子化を特徴とするものであり、TG のような架橋結合による意図的な基質の高分子化の例は、まったく新規なものと考えられた。

近年、食品に対する消費者の関心・感度は確実に上昇しており、新規な物質を食品市場に導入するには、「安全」の観点から完璧な安全性試験はもちろんのこと、「安心」の観点からいかに食品としては自然なものであるかということを保証することは非常に重要な課題であり、かつそれは食品産業に従事する研究者としての責務であると考えられる。安全性試験については、既に急性毒性、亜急性毒性、変異原性、菌の病原性など数多くの試

験をクリアしており、ここでは述べない。本研究は、上記、「安心」をいかに訴求できるかを、以下の点を証明することにより明らかにしたものである。

1. 天然物中の TG 反応生成物の存在
2. 食品加工と TG の関わり
3. TG 利用タンパク質の栄養的有効性

また、酵素を産業的に市場に導入するにあたり、特に水産物製品への応用から必要であった課題とその解決についても併せて述べる。

1. 一般食品における GL 結合の分布

タンパク質に TG が作用することにより、分子間/内に GL 結合が形成されるが、この結合は、いわゆる α -ペプチド結合とは異なるイソペプチド結合と呼ばれる結合である。GL 結合以外には、リジン側鎖の ϵ -アミノ基とアスパルギン側鎖の β -カルボキシアミド基間が架橋した ϵ -(β -アスパルギル) リジン結合が存在するが、TG は、この結合を生成しない。タンパク質中の GL 結合については、フィブリン (16-20)、ケラチン (15)、ヒト白内障水晶体 (4-5)、マウス骨格筋 (0.65-0.78)、モルモット凝固精子 (370) 等の生体成分中における存在が報告されていた (単位: $\mu\text{moles}/10\text{ g}$ タンパク質) が、³⁾ 一般食品について広くその分布を定量した報告はなかった。そこでまず、TG を利用しない一般食品中に、はたしてどの程度の GL 結合が存在するのか、そして TG を利用した食品においては、一般食品中の GL 結合量と比較してどの程度になるのかを検討した。

GL 結合の分析方法については、イオン交換クロマトによる方法³⁾が知られていたが、感度的に優れることからオルトフタルアルデヒド (OPA) によるプレカラム

誘導体を逆相 HPLC により分離、定量する Griffin らの方法⁴⁾を利用した。イソペプチド結合は、通常のプロテアーゼでは消化を受けないため、分析に際しては、試料タンパク質を数種のプロテアーゼで分解し、アミノ酸と遊離型 GL の混合物を調製する。この際、総アミノ酸量に比べて、GL 量は非常に小さいため、OPA 誘導体化の前に逆相 HPLC による分取を取り入れることで、夾雑物を除き、精度よく分析可能なシステムを構築した。本システムにより、国内外の畜肉製品、水産製品、乳製品、穀類製品、大豆製品、野菜類など主要な市販一般食品約 400 品目の分析を行った。その結果、平均値で評価した場合、存在量の多い順に、水産製品 (43)、畜肉製品 (38)、大豆製品 (15)、穀類製品 (3)、乳製品 (0.6) という傾向が認められた (単位: $\mu\text{moles}/100\text{ g}$ タンパク質)。このうち存在量の最も多かった食品は、ホヤ塩辛 (433) であった。また、カラスミやキャビアなど魚卵製品には多量に GL 結合が存在する傾向が認められた。数多くのサンプルの分析を続けていくうちに、水産製品において、生あるいは加熱を経ない素材よりも加熱や乾燥などの加熱加工を経た食品の方が GL の含有量が多い傾向が明らかに認められた。一方、意図的に TG を添加して調製した蒲鉾やソーセージなどの食品における GL 結合の存在量は、一般食品の範囲に存在することを確認した。

1990 年に関ら⁵⁾によってスケトウダラ筋肉中に TG 活性が存在し、坐りにおけるミオシン重鎖の架橋重合への TG の関与が示唆された。前述したように水産製品の GL 分布の傾向から、加熱工程において、素材中にもともと存在する TG が反応し、GL 結合の形成をもたらしている可能性が考えられた。この仮説を検証するために、モデル的にスケトウダラ冷凍すり身から蒲鉾を、マジ、マガキ、マボヤから塩漬乾燥品を製造し、その製造工程時の GL 結合の変化を検討した。その結果、30°C 以上の加熱工程において、明らかに GL 結合の増加が認められること、その増加が 5°C 以下の低温では起きにくいこと、また TG 活性の抑制条件下ではまったく起きないことを確認した。^{6,7)} GL 結合は、タンパク質を長時間加熱することによっても形成することが知られている⁸⁾が、この場合、長時間の加熱が必要である (121°C, 27 時間)。したがってここで観察された GL 結合の増加は、水産動物の筋肉中にもともと存在する TG が加熱加工工程において反応したことによるものと考えられる。また、増加した GL 結合は、最終製品の品質に何らかの影響を及ぼしていると思われる。

一般食品における GL 結合の分布および加工工程での TG 反応の進行を検討した上述の結果は、食品と TG の関わりはまったく新規なものではなく、人類の食文化に古くから関与していたことを物語るものと考えている。

2. 海産動物由来 TG

これまで多くの海産動物に TG 活性の存在が報告されており、⁹⁻¹¹⁾ 実際には水産加工品の生鮮素材中には TG 活性を豊富に有するものがあることは間違いないと思われる。しかしながら、魚類由来の単離精製された酵素の特性を詳細に検討した例はなかった。そこで海産動物の TG は、どのような特性を有しているかを検討した。試料としてスケトウダラ肝臓、マダイ肝臓、マガキ各部位およびマボヤ筋膜より TG の精製を試みた。いずれの TG も各種クロマトグラフィーで精製が可能であった¹²⁻¹⁴⁾が、特にヘパリンをリガンドとするアフィニティークロマトが効果的であった。分子量的にはスケトウダラ、マダイとも 77 kDa 程度で哺乳類組織型 TG と近似していた。マダイ TG とモルモット肝臓 TG 間のアミノ酸配列の相同性は、その後 43.3% であることが報告された。¹⁵⁾ 一方、マガキには鰓に豊富に活性が存在し、84 kDa と 90 kDa の少なくとも 2 種類の TG が存在した。¹⁴⁾ また、マボヤ TG は、血液中の TG である Factor XIII と同様に 90 kDa のモノマーが 4 量体として存在していることがわかった。これら海産動物 TG は、いずれもカルシウム依存性の SH 酵素であり、モルモット肝臓 TG あるいは微生物起源 TG と同様に GL 結合によるタンパク質のゲル化が起こることを確認した。海産動物 TG の生理的意義に関しては、近年研究が進んでおり、生体防御や創傷治癒への役割が考察されている。^{10,16)}

3. GL 結合の分解と TG 処理タンパク質の栄養性

産業的に利用可能な TG は、微生物起源 TG であることを既に述べたが、TG を添加して製造した食品には GL 結合量の増加が起こる。この現象は、上述のように TG を添加しない水産加工品の製造工程においても起こることが推定されるが、微生物 TG による食品の改質という新規な手法で製造された場合、食品としての栄養性に变化があるかどうかを検討することは、食品メーカーとしては重要な課題である。

遊離の GL 結合は、哺乳動物の持つ γ -グルタミルアミンサイクロトランスフェラーゼによって、遊離のリジンと側鎖の環化したピログルタミン酸とに分解されることが報告されている。¹⁷⁾ 我々は、生体内に他にも遊離の GL 結合を切断する酵素がないかどうかを探索した。その結果、哺乳類の小腸絨毛、腎臓、血液などに存在する γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (EC2.3.2.2 γ -GTP) によって、遊離の GL 結合を遊離のリジンとグルタミン酸とに分解することを見出した。¹⁸⁾ しかしながら、タンパク質結合型の GL 結合の切断は認められなかった。本酵素は、生体内において γ -グルタミル結合の生成・分解に関与している酵素であり、グルタチオン (γ -グルタミルシステイニルグリシン) やその中間体 (γ -グルタミ

ルシステイン)の生成・分解に関与すると言われている。タンパク質結合型のGL結合を切断しないことから、TG処理をしたタンパク質は、胃、小腸などの消化器官で分解され、ある程度低分子化した後、血中から腎臓あるいは小腸で分解を受けるものと考察された。

次に実際にTG処理を行ったタンパク質を用いてラットの成長試験を行い、タンパク質価(protein efficiency ratio, PER)および生物価(biological value, BV)を求めた。市販ビタミンフリーカゼイン(オリエンタル酵母製)を12.5%溶液(w/w)とし、10 u/gカゼインのTGを添加し、37°Cで2時間および24時間反応させ、加熱失活後、凍結乾燥してTG処理カゼインを調製した。得られたカゼインには、2時間および24時間反応のもので、それぞれ13.6および21.5 μmol/gカゼインのGL結合を含む。これらのカゼインを飼料用小麦タンパク質(オリエンタル酵母製)を基本タンパク質として、リジンを制限アミノ酸となるように配合し、Wister系雄ラットにより成長試験を行った。その結果、いずれの試験区においてもPERおよびBVに有意な差は認められず、剖検所見にもまったく異常は認められなかった。¹⁹⁾したがって、GL結合分解酵素の存在および実際の成長試験の結果から、TG処理を行ったタンパク質中のGL結合は、生体内において遊離のリジンとグルタミン酸に分解され、何ら栄養的に問題のないことを確認した。

4. 微生物TGのアプリケーション開発

微生物TGの産業への導入に向け、GL結合の分析や酵素基礎特性、タンパク質との反応性等の基盤技術の構築とともに、利用研究も進行していった。最も基本的なアプリケーションは、水産練製品への利用である。この分野への応用をさきがけとしたのは、魚肉内在TGの存在⁵⁾が発表されたことの影響が大きかった。すなわち、魚類筋肉にもともと存在するTGが、蒲鉾など水産練り製品の製造工程の一つである坐りにおいて、反応し、ミオシン重鎖の架橋に関与しているという仮説は、微生物起源TGのすり身製品への応用実現への大きな動機づけになった。

既に我々は、魚類タンパク質以外にも、畜肉、大豆、乳、ゼラチンなど主要な食品タンパク質が微生物TGによりゲル化することを確認していた。実際に微生物TGをすり身に添加し、常法に従って製造した場合、明確な物性値の向上が可能であることも確認していた。本TGを酵素製剤として最終製品にする場合、酵素の添加がどの程度であれば、どの程度の物性値を発揮し得るものなのか、またその際、反応生成物であるGLと物性値の関係はいかなるものなのかを検討する必要があった。また、単なる物性改良剤のみではなく、すり身製品への応用例(アプリケーション例)を作成する必要も存在し

た。

スケトウダラ冷凍すり身を用いた高温坐り(40°C坐り、3%食塩、60%加水)系において、微生物TG(1,000 u/g)添加量と物性値との関係を詳細に検討したところ、²⁰⁾破断応力および凹みとも対すり身0.03%程度(0.3 u/gすり身)まではほぼ直線的に増加したが、それ以上の添加量では、プラトーもしくは低下する傾向が認められた。この傾向は、低温坐り(10°C)でも同様に認められた。形成されるGL量との関係を調べたところ、TG添加量および物性値との間に正の相関が認められた。また、物性値の極大以降では負の相関が認められた。GL量的には3 μmole/100 gすり身がその分岐点であることを明らかにした。これらのことから、我々はTGの最大添加量は、0.3 u/gすり身であり、GL量としては、3 μmole/100 gすり身程度であることを把握した。これらの知見も併せ、実際にすり身製品を製造するオペレーション上、適当な副剤と組み合わせられ、適当な活性に調製されて、水産練り製品用酵素製剤(商品名アクティバTG-K)が誕生した。

物性向上効果を基本にして、他のアプリケーション開発もまた進められた。一つは低級すり身の品質向上であり、もう一つは加水量の増加である。すなわち、前者では、いわゆるSA級あるいはFA級と呼ばれる洋上すり身に、陸上2級すり身を混合しても、TGによって得られる物性値は、洋上すり身のみで製造されたすり身製品と同等なものを得ることができるというものである。また、後者は、すり身への加水量を増加させることによる物性値の低下をTGによって補うことができるというものである。すなわち、同量のすり身原料から、より多くの最終製品を得ることができるというもの、コストダウンが可能になるというものである。これら水産練り製品へのTGの利用は、TGのアプリケーションの一部である。現在、畜肉加工、食品の接着、麺、豆腐など多くの食品加工分野において、TG製剤が利用されている²¹⁾が、それぞれの食品加工用途において、ベストの機能を発揮できるように設計された様々なTG製剤が存在している。

おわりに

微生物TGを含む酵素製剤が味の素株式会社より発売され始めて、はや10年が経過しようとしている。本酵素は、冒頭述べたようにこれまでにないまったく新規な産業用酵素であるといえる。10年を経た現在、本酵素は完全に市場に浸透し、食品用酵素の一つとして世に認知された。今後、本酵素のもつ潜在的可能性をさらに他の産業分野へと応用展開していくことが望まれる。

謝 辞

本研究は、味の素株式会社において遂行されたものである。ご指導・ご鞭撻を頂きました本木正雄博士、脊黒勝也博士、上田要一博士そして川尻秀雄氏をはじめとする同社先輩並びに多くの同僚の皆様に深く感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Folk JE, Chung SI. Molecular and catalytic properties of transglutaminase. *Adv. Enzymol.* 1973; **38**: 109-191.
- 2) Ando H, Adachi M, Umeda K, Matsuura A, Nonaka M, Uchio R, Tanaka H, Motoki M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* 1989; **53**: 2613-2617.
- 3) Griffin M, Wilson J. Detection of ϵ -(γ -glutamyl) lysine. *Mol. Vell Biochem.* 1984; **58**: 37-49.
- 4) Griffin M, Wilson J, Lorand A. High pressure liquid chromatographic procedure for the determination of ϵ -(γ -glutamyl) lysine in proteins. *Anal. Biochem.* 1982; **124**: 406-413.
- 5) Seki N, Uno H, Lee NH, Kimura I, Toyoda K, Fujita T, Arai K. Transglutaminase activity in Alaska Pollack muscle and surimi, and its reaction with myosin B. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1990; **56**: 125-132.
- 6) Kumazawa Y, Seguro K, Takamura M, Motoki M. Formation of ϵ -(γ -glutamyl) lysine cross-link in cured Horse mackerel meat induced by drying. *J. Food Sci.* 1993; **58**: 1086-1089.
- 7) 熊澤義之, 脊黒勝也, 丹尾式希, 本木正雄. 食品中の ϵ -(γ -Glu) Lys の定量と内在トランスグルタミナーゼ反応の検討. 日本農芸化学会講演要旨, 1996; pp203.
- 8) Asquith RS, Otterburn MS. Self-crosslinking in keratin under the influence of dry heat. *Appl. Polym. Symp.* 1971; **18**: 277-287.
- 9) Myhrman R, Bruner-Lorand J. Lobster muscle transpeptidase. *Methods Enzymol.* 1970; **19**: 765-770.
- 10) Tokunaga F, Yamada M, Miyata T, Ding YL, Hiranaga M, Muta T, Iwanaga S. Limulus hemocyte transglutaminase. *J. Biol. Chem.* 1993; **268**: 252-261.
- 11) Araki H, Seki N. Comparison of reactivity of transglutaminase to various fish actomyosins. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1993; **59**: 711-716.
- 12) Kumazawa Y, Nakanishi K, Yasueda H, Motoki M. Purification and characterization of transglutaminase from Walleye Pollack liver. *Fish. Sci.* 1996; **62**: 959-964.
- 13) Yasueda H, Kumazawa Y, Motoki M. Purification and characterization of a tissue-type transglutaminase from Red Sea Bream (*Pagrus major*). *Biosci. Biotech. Biochem.* 1994; **58**: 2041-2045.
- 14) Kumazawa Y, Sano K, Seguro K, Yasueda H, Nio N, Motoki M. Purification and characterization from Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *J. Agric. Food Chem.* 1997; **45**: 604-610.
- 15) Yasueda H, Nakanishi K, Kumazawa Y, Nagase K, Motoki M, Matsui H. Tissue-type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus major*) sequence analysis of the cDNA and functional expression in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 1995; **232**: 411-419.
- 16) Nozawa H, Mori T, Seki N. Different effects of NaCl on activities of transglutaminase from marine and fresh water shellfish muscles. *Fish. Sci.* 2001; **67**: 383-385.
- 17) Fink ML, Chung SI, Folk JE. γ -Glutamylamine cyclotransferase: specificity toward ϵ -(L- γ -glutamyl)-L-lysine and related compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1980; **77**: 4564-4568.
- 18) Seguro K, Kumazawa Y, Ohtsuka T, Ide H, Nio N, Motoki M, Kubota K. ϵ -(γ -Glutamyl) lysine: Hydrolysis by γ -Glutamyltransferase of different origins, when free or protein bound. *J. Agric. Food Chem.* 1995; **43**: 1977-1981.
- 19) Seguro K, Kumazawa Y, Kuraishi C, Sakamoto H, Motoki M. The ϵ -(γ -Glutamyl) lysine moiety in crosslinked casein is an available source of lysine for rats. *J. Nutr.* 1996; **126**: 2257-2562.
- 20) Seguro K, Kumazawa Y, Ohtsuka T, Toiguchi S, Motoki M. Microbial transglutaminase and ϵ -(γ -glutamyl) lysine crosslink effects on elastic properties of Kamaboko gels. *J. Food Sci.* 1995; **60**: 305-311.
- 21) Kuraishi C, Yamazaki K, Susa Y. Transglutaminase: Its utilization in the food industry. *Food Rev. Intl.* 2001; **17**: 221-246.