

小麦粉生地および製パン性に対するタンパク質架橋酵素の作用解析

誌名	日本食品保蔵科学会誌
ISSN	13441213
著者名	野口, 智弘
発行元	日本食品保蔵科学会
巻/号	39巻1号
巻号補足	
掲載ページ	p. 31-36
発行年月	2013年1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



小麦粉生地および製パン性に対する タンパク質架橋酵素の作用解析

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

Studies on the Action of the Enzyme Protein Cross-linking on the Formation of Wheat-flour Dough and Bread Making

NOGUCHI Tomohiro*§

* Food Processing Center, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture,
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

Key words : wheat, PDI, Ero1, SS bond, Bread
小麦, PDI, Ero1, SS結合, パン

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。この生地形成能は「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かわかり、小麦粉はその生地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結合)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最も重要であるとされている。また、生地に臭素酸カリウムや酸化アスコルビン酸などの酸化剤を加えると生地強度が大きくなり、これらの作用によりSS結合が増加すると考えられている。

一般に、タンパク質のSS結合形成は、80℃程度の加熱処理が必要とされ、ハム・ソーセージ、カマボコなど水産練り製品、豆腐、湯葉、チーズおよび卵加工品など、タンパク質がゲル化した食品ではいずれも80℃以上の加熱工程が存在する。

しかし、小麦粉生地の形成は25~35℃で行われるため、前述の加熱によるSS結合形成は困難であり、何らかのSS結合形成機序が存在すると推論される。

筆者は、小麦粉の加工特性に大きな影響を及ぼすと言われながらも、その形成の詳細が不明である小麦粉生地

中におけるSS結合形成機序を明らかにすることを目的とし、SS結合を導入するProtein Disulfide Isomerase (EC 5.3.4.1; 以下PDI) と小麦粉生地形成性との関連性の検討を行った。その結果、小麦粒中にPDI活性を検出すると共に、そのタンパク質体を初めて精製し、小麦粉の生地物性とPDI活性量との間に相関性を確認した。さらに、小麦リコンビナントPDIを発現させ、同PDIの機能を明らかにするとともにEndoplasmic Reticulum Oxidoreductase 1 (Ero1) によるPDIの酸化再生メカニズムを明らかにし、小麦粉生地形成の機序の一端を明らかにすることができた。本総説は、本学会を中心に報告してきた小麦粉生地形成に対するPDI-Ero1, SS結合形成系の作用に関する一連の研究成果を取りまとめたものである。

1. 各種小麦粒中のPDI活性量および国産 パン用小麦粒 (*Triticum aestivum* cv Haruyutaka) からのPDI分離精製¹⁾

北海道産ハルユタカ (*Triticum aestivum* cv Haruyutaka) を用い、小麦PDIの分離精製を試みた。小麦粒より粗酵素液を調製し、DEAE-Sepharose Fast Flowカラム (φ 20×160mm, GEヘルスケア社製) およびPDIポリクローナル抗体 (Mouse Antiserum to PDI) を用いたアフィニティークロマトグラフィー (Hi Trap NHS-activated HP, 5 ml, GEヘルスケア社製) にて精製した (図1)。得られた精製PDIの比活性は74.8U/mgを示し粗酵素に比べ約340倍に上昇した (表1)。SDS-PAGEおよびウエス

* 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

§ E-mail: tomo@nodai.ac.jp

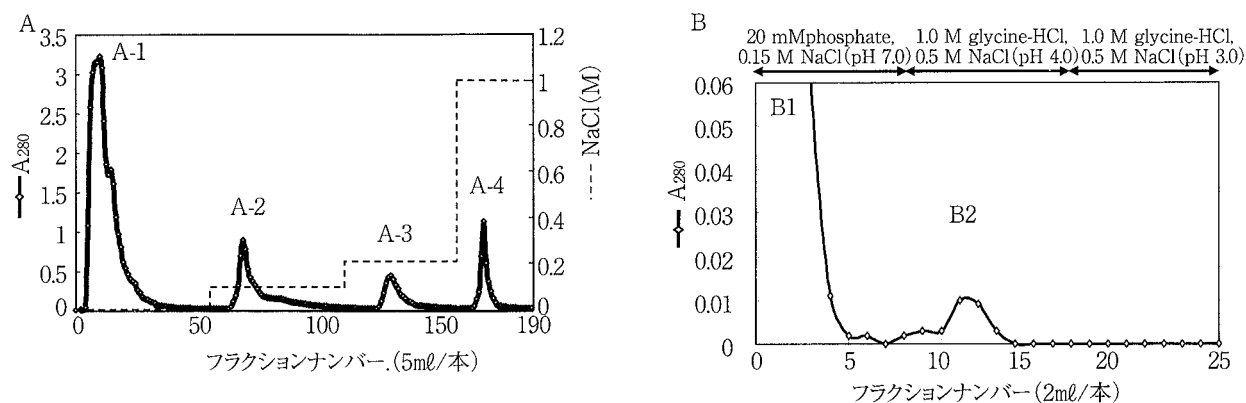


図1 小麦粒（ハルユタカ）PDIの分離精製

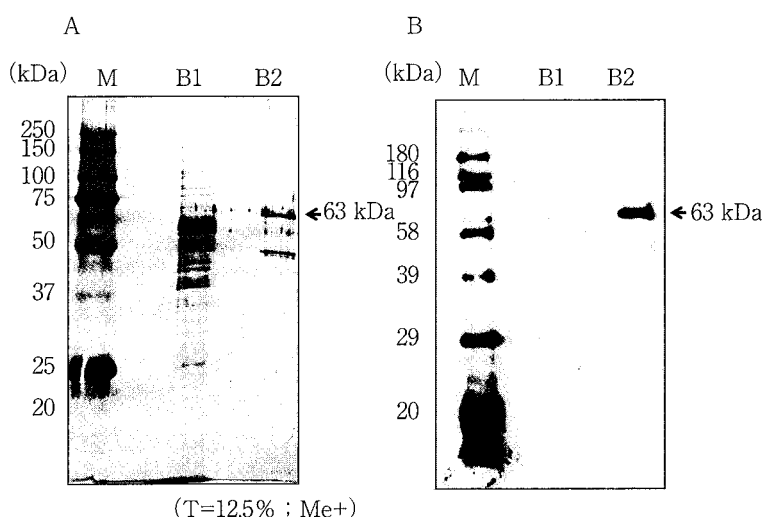
A: DEAE-セファロースクロマトグラフィー (pH8.0)

B: DEAE-セファロースクロマトグラフィーにて得られた A-3 画分のアフィニティークロマトグラフィー

表1 小麦粒（ハルユタカ）PDIの分離精製

	PDI活性 (U)	タンパク質 (mg)	非活性 (U/mg)	精製度	回収率 (%)
F 1	642.2	2948.8	0.22	1	100
F 2	323.9	1565.4	0.21	0.95	50.4
A 1	N.D.	714.8	—	—	—
A 2	59.1	259.8	0.23	1.04	9.2
A 3	156.6	150.6	1.04	4.77	24.4
A 4	N.D.	21.1	—	—	—
B 1	N.D.	8.5	—	—	—
B 2	30.7	0.4	74.8	341	4.8

(小麦粒100 gあたり)



(T=12.5% ; Me+)

図2 アフィニティークロマトグラフィーにて分離した画分の SDS-PAGE (A) およびウエスタンブロット (B)

1次抗体：小麦PDIポリクローナル抗体

タンブロットによる解析の結果、63kDaのタンパク質バンドがPDI抗体に反応した（図2）。同タンパク質のN末端アミノ酸配列は、小麦PDI（Chinese Spring_CAI 30632）遺伝子情報のアミノ酸配列と79%の相同性を示

した。以上のことから、従来遺伝子情報のみでその存在が確認されていたPDIが小麦粒中においてタンパク質体として存在することを初めて明らかにした。

2. 小麦リコンビナントPDI (rPDI)の 発現と性状について²⁾

小麦PDIの小麦粉生地形成に対する影響を検討したが、小麦粒から解析に十分な必要量のPDIを調製することが困難であった。そこで、小麦PDI遺伝子情報を用い小麦rPDIの取得を試みた。

DDBJより、2種の小麦PDI遺伝子情報を検索、取得

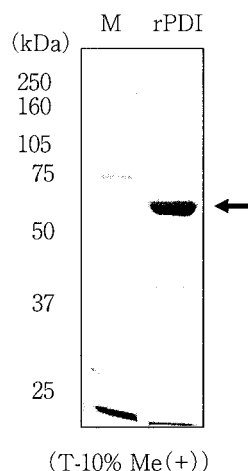


図3 小麦リコンビナントPDIのSDS-PAGE

してプライマーを作製した。小麦根total RNAよりcDNAを調製し、PCRにてPDI遺伝子を増幅した。増幅断片を発現ベクターpET21aに挿入した後、発現宿主大腸菌BL21 (DE 3) を形質転換し、His-Tag融合タンパク質として発現させ、溶菌抽出後、コバルトカラムにて精製した (図3)。得られた精製rPDIは63kDaで比活性は632.2U/mg、最適反応温度およびpHはそれぞれ35℃および8.5であり、同活性は40℃以下およびpH 6～9で安定であり、前述の小麦粒から精製したPDIと同様であった (図4)。また、SS結合を還元した変性オボアルブミンにrPDIを作用させたところ、そのCDスペクトルは未変性オボアルブミンのスペクトルに回復したことから、rPDIがSS結合を形成することを確認した (図5)。

さらに、取得したrPDIのアミノ酸配列は、植物の主要なPDIファミリーと同様のドメイン構造を示し、N末端に小胞体輸送シグナル配列、活性中心であるチオレドキシンモチーフ (CGHC) を2か所、およびC末端に小胞体局在シグナル配列のKDELモチーフを有していた。以上、小麦rPDIを初めて発現し、その一般性状が小麦PDIと同様であることを確認すると共に、同rPDIがSS結合形成能力を有すること、活性中心が他の植物起源PDI同様に2か所チオレドキシンモチーフであることを明らかにした (図6)。

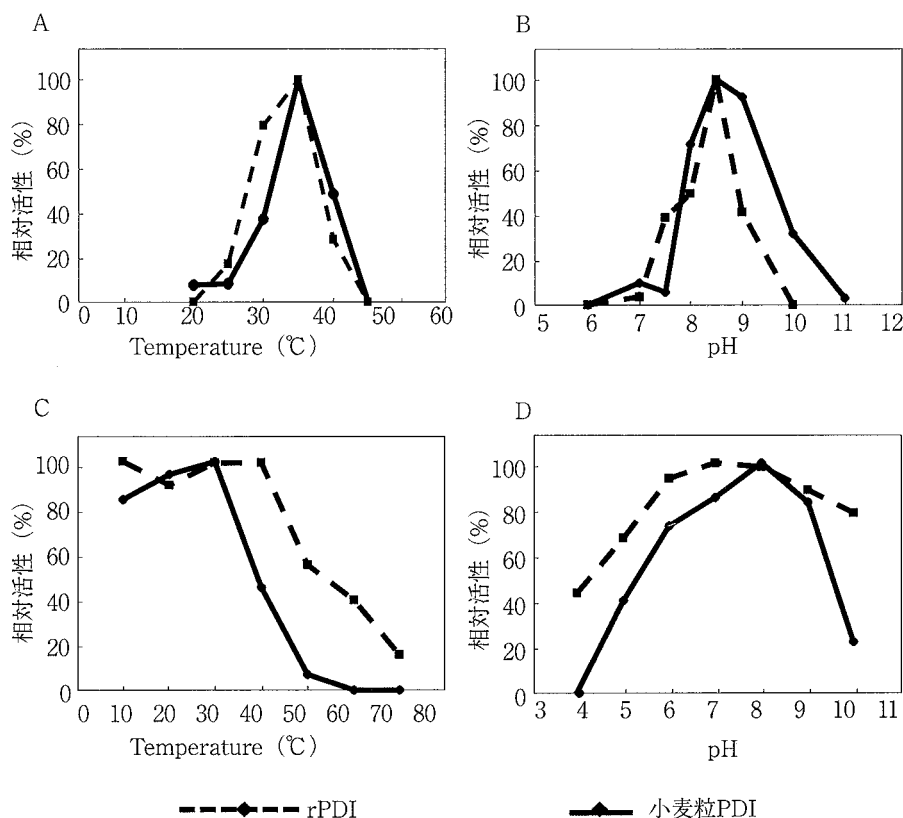


図4 小麦粒PDIおよびrPDIの酵素性状

A: 至適温度 B: 至適pH C: 温度安定性 D: pH安定性

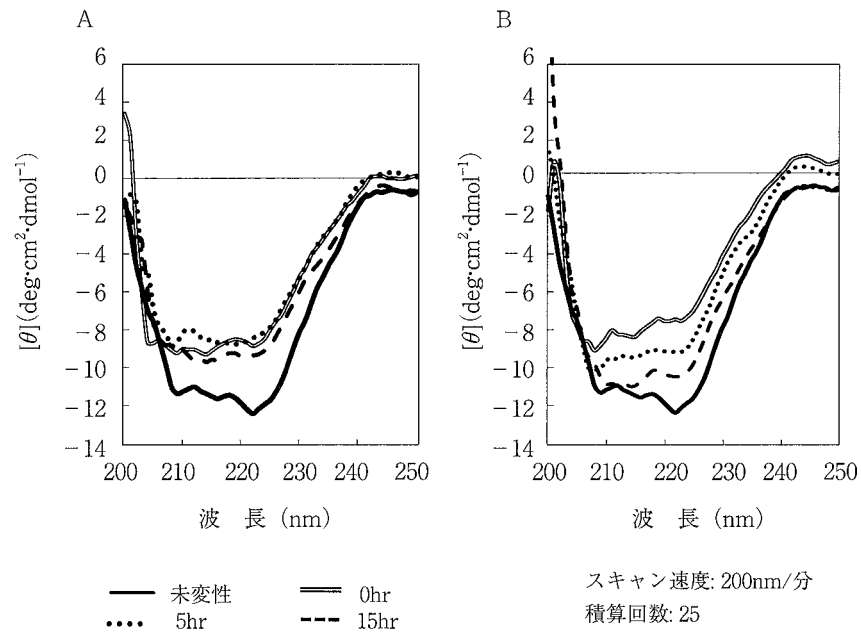


図5 還元変性オボアルブミンのPDI添加によるCDスペクトル変化

A: 無添加 B: PDI添加

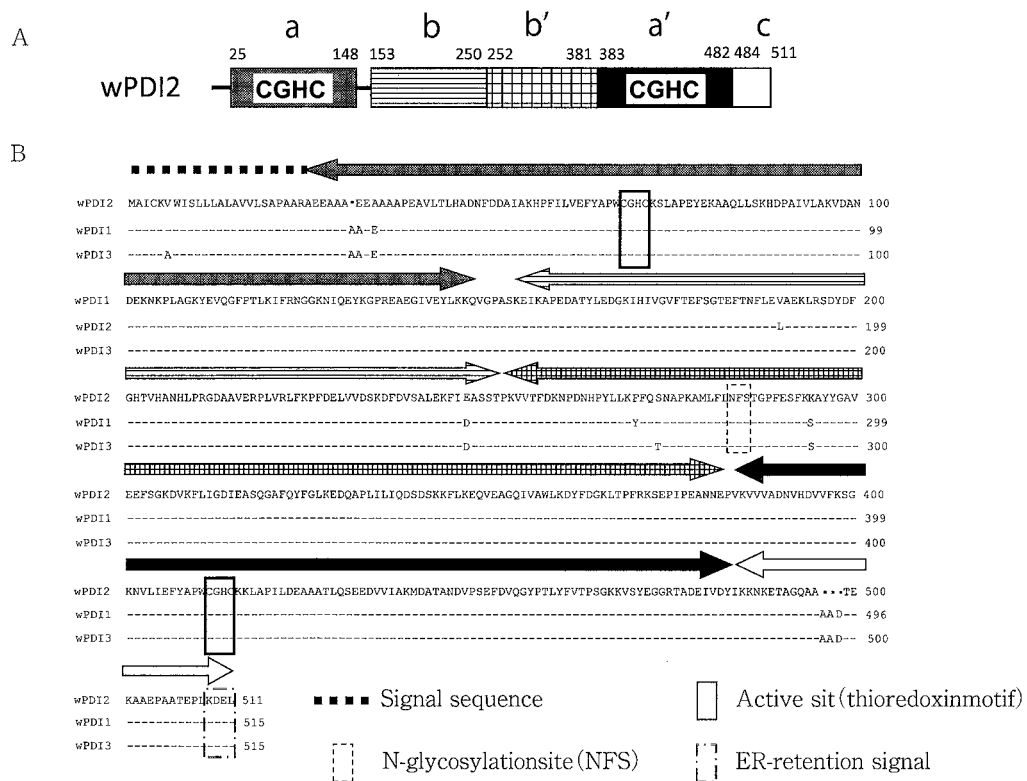


図6 小麦PDIの一次構造

A: wPDI2のドメイン構造 B: wPDIの一次構造比較

3. 製パン性に及ぼすPDIの作用の影響について

製パン性に対するPDI作用の影響を解析するため、強力粉に比べ製パン性の劣る中力粉（雀、日清製粉）を用い、rPDI添加による製パン性向上効果を検討した。rPDIを強力粉と中力粉の活性量差の約2倍である350U/小麦粉100g添加したところ、パンの比容積が $4.17 \pm 0.1 \text{ cm}^3/\text{g}$ から $4.40 \pm 0.14 \text{ cm}^3/\text{g}$ と5.5%増加し、PDIの添加により中力粉の製パン性が改善された（表2）。このことから、PDIの作用によって、製パン適性の劣る中力粉の製パン性改善が示唆されたが、強力粉のパンの比容積と比べ小さく、当初の予想に反しその効果が小さかった。

表2 製パン性に及ぼすrPDIの影響

	中力粉	中力粉 + rPDI添加	強力粉
PDI活性 (U/小麦粉100g)	314	314 + 350添加	493
非容積 (cm^3/g)	4.17 ± 0.1^a	4.40 ± 0.14^b	4.95 ± 0.14^c
硬さ (N)	1.08 ± 0.1^a	0.98 ± 0.05^a	0.75 ± 0.10^b

※A.V. $\pm$ S.D., $P < 0.05$

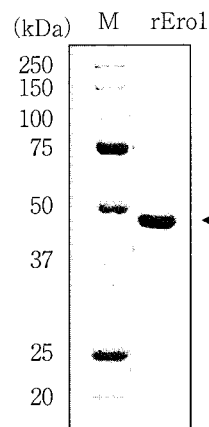
4. 小麦リコンビナント Endoplasmic Reticulum Oxidoreductase 1 (Ero 1) の発現および性状と製パン性への影響³⁾

PDIは、タンパク質にSS結合を形成させると還元型となり、その機能を失う。このため、生地中にてSS結合形成が進行するためには、PDIの酸化再生機構の存在が必要である。前述の中力粉におけるrPDIの添加効果が小さかったのは、PDIの酸化再生が不十分であったためと推論した。

真核生物において、PDIの酸化を担うEro 1が知られている⁴⁾。しかしながら、小麦Ero 1の報告はこれまでになく、遺伝情報の登録もされていない。そこで、小麦リコンビナントEro 1 (rEro 1) の発現取得のため、DDBJ

より検索取得したヒトおよび酵母Ero 1の遺伝子情報を基に共通配列からプライマーを作製し、3'-RACEおよび5'-RACEによりEro 1の両末端の配列を決定した。小麦根total RNAよりcDNAを調製し、Ero 1遺伝子をPCRにて増幅後、発現ベクターpET21aに挿入した。発現宿主大腸菌BL21 codon Plus (DE3)-RILを形質転換し、49 kDaのrEro 1の発現、取得に成功した（図7、8）。また、Ero 1活性をFlavin Adenine Dinucleotide (FAD) 退色法⁵⁾および O_2 消費量にて確認したところ、rEro 1によるFADの退色および O_2 消費量が増大し、rEro 1のFADに対する電子供与活性が確認された（図9）。

そこで、PDIおよびEro 1、FADの製パン性への影響を解析するため、中力粉（雀、日清製粉）を用い、rPDIおよびrEro 1、FADの添加による製パン試験を行った。PDIのみを350U（小麦粉100g）添加した場合、前述のように比容積は5.5%しか増加しなかったが、PDI25U、Ero 1（PDI25Uのモル比で20倍量）およびFAD（4 μmol ）を併用し試験したところ、比容積は約11%増加した（図10）。このことから、Ero 1およびFADが共存することでPDIの酸化再生機構が補完され、小麦粉生地中のSS結合形成が進行し、製パン性が向上したものと推察された。



【T-12.5% Me(+)】

図7 小麦リコンビナントEro 1のSDS-PAGE

Ero1-1	MSEGPFPADGAVRRRRRRAAAGALLVALLAVALSSRGFPSSISLSRGGGCGCPGARKYTGMDCCCDYETVDAINEEVLNPLQDLVALPFFRYFK	100
Ero1-2	MSEGPFPADGAVRRRRRRAAAGALLVALLAVALSSRGFPSSISLSRGGGCGCPGARKYTGMDCCCDYETVDAINEEVLNPLQDLVALPFFRYFK	100
Ero1-3	MSEGPFPADGAVRRRRRRAAAGALLVALLAVALSYRGFPSSISLSRGGGCGCPGARKYTGMDCCCDYETVDAINEEVLNPLQDLVALPFFRYFK	100
Ero1-1	VKLWCDPFWDDGMCRLRDCSVCECPDNEFPFPPKPYSGLSPENMICQEGKPEATVDRLDTKVFKGWVETDNPWTSDDDETNAEMTYVNLQNLPERY	200
Ero1-2	VKLWCDPFWDDGMCRLRDCSVCECPDNEFPFPPKPYSGLSPENMICQEGKPEATVDRLDTKVFKGWVETDNPWTSDDDETNAEMTYVNLQNLPERY	200
Ero1-3	VKLWCDPFWDDGMCRLRDCSVCECPDNEFPFPPKPYSGLSPENMICQEGKPEATVDRLDTKVFKGWVETDNPWTSDDDETNAEMTYVNLQNLPERY	200
Ero1-1	TGYTGDSARRIWDIAIKENCPKYPSEDQCQEKALYKLISGLHSSI SVHIAIDYLLDESANLWGHNLSSLHDLRVLYKPERVENLYFTYFLVRAVTKAAD	300
Ero1-2	TGYTGDSARRIWDIAIKENCPKYPSEDQCQEKALYKLISGLHSSI SVHIAIDYLLDESANLWGHNLSSLHDLRVLYKPERVENLYFTYFLVRAVTKAAD	300
Ero1-3	TGYTGDSARRIWDIAIKENCPKYPSEDQCQEKALYKLISGLHSSI SVHIAIDYLLDESANLWGHNLSSLHDLRVLYKPERVENLYFTYFLVRAVTKAAD	300
Ero1-1	YLEQAEYNTGNPEEDLKTQSLVRQLLYNHKLRSACPLPFDEAKLWQENGPELKQEIQKQFRNISAIMDCVGCCKQLWGLKLVGLGLTALKILFSDVGE	400
Ero1-2	YLEQAEYNTGNPEEDLKTQSLVRQLLYNHKLRSACPLPFDEAKLWQENGPELKQEIQKQFRNISAIMDCVGCCKQLWGLKLVGLGLTALKILFSDVGE	400
Ero1-3	YLEQAEYNTGNPEEDLKTQSLVRQLLYNHKLRSACPLPFDEAKLWQENGPELKQEIQKQFRNISAIMDCVGCCKQLWGLKLVGLGLTALKILFSDVGE	400
Ero1-1	NNLNQFQLQRNEVIALVNLNRLSESVKFVHETGSSSQEIIKQSFSTLQKGA5	455
Ero1-2	NNLNQFQLQRNEVIALVNLNRLSESVKFVHETGSSSQEIIKQSFSTLQKGA5	455
Ero1-3	NNLNQFQLQRNEVIALVNLNRLSESVKFVHETGSSSQEIIKQSFSTLQKGA5	455

図8 小麦Ero 1の一次構造

下線：膜貫通領域 太字：活性中心
(CXXCXXC motif)

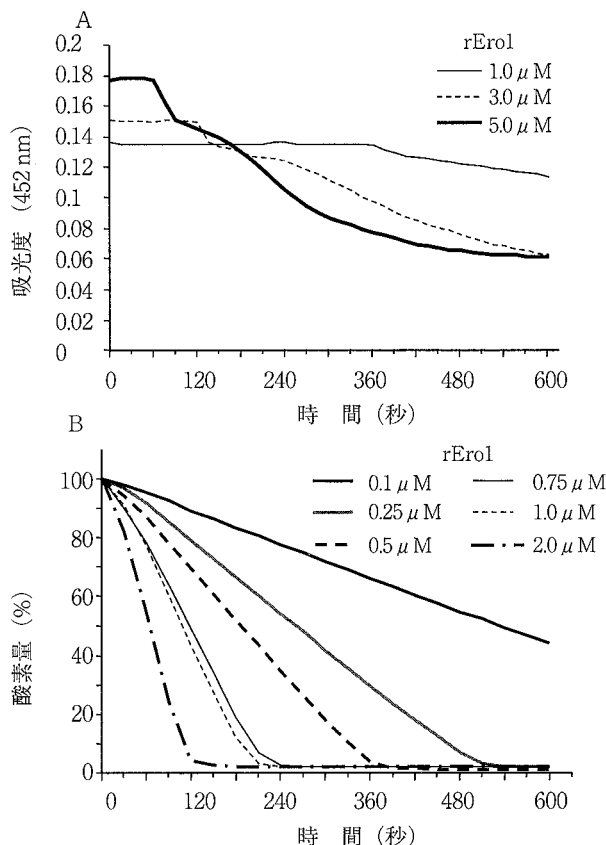


図9 rEro1の活性測定

A: FADの退色試験 B: 酸素消費量試験

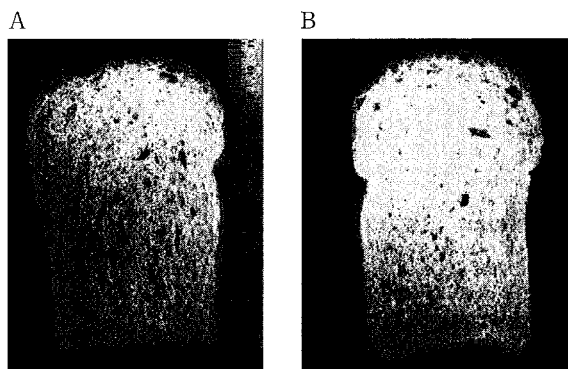


図10 製パン性に与えるrPDIおよびrEro1の影響

A: 中力粉のみ B: 中力粉100gに対し, rPDI25U, rEro1 (PDI25Uのモル比で20倍), FAD 4 μmol

まとめ

タンパク質にジスルフィド (SS) 結合を形成する Protein Disulfide Isomerase (PDI) 活性を小麦粉中に検出した。さらにハルユタカ粒より63kDaのPDIタンパク質を精製取得し、小麦粒中にタンパク質としてPDIが存在することを初めて明らかにした。また、小麦rPDIを初めて発現し、その一般性状が小麦PDIと同様であることを確認すると共に、同rPDIがSS結合形成能力を有すること、活性中心が他の植物起源PDI同様に2か所のチオレドキシシンモチーフであることを明らかにした。

PDIの作用によって主にグリアジンにSS結合が形成され、グリアジンの疎水性が増加することで、製パン性が改善されることを明らかにした。さらにPDIの酸化再生化の機構について検討を行い、PDIの酸化再生に必要な小麦 Endoplasmic Reticulum Oxidoreductase 1 のリコンビナント体 (rEro1) を初めて発現取得した。また、Ero1がFlavin Adenine Dinucleotide (FAD) と共役してPDIを酸化再生することによって、タンパク質中のSS結合の形成が著しく促進されることを明らかにし、同作用によって製パン性が向上した。

本研究は、小麦粉生地形成におけるタンパク質架橋化に対して、酵素学的な観点から解析した初めての成果であり、小麦PDIおよびEro1によるSS結合形成が小麦粉の加工特性に大きな影響を及ぼすこと、従来詳細が不明であった小麦粉生地形成中のタンパク質架橋化反応の一端を明らかにした。今後は、さらにPDI-Ero1, SS結合形成系による製パン性改善機構についてより詳細な解析を行い、小麦粉生地の加工性改善および製品の品質改善に寄与する技術の開発を目指したい。

謝 辞 このたびの平成24年度日本食品保蔵科学会奨励賞の受賞に際して、ご高配を賜りました学会関係者の皆様に謹んでお礼申し上げます。本研究は東京農業大学応用生物科学部食品加工技術センターおよび同生物応用化学科食料資源理化学研究室にて遂行されたものであり、ご指導いただきました東京農業大学松本信二名誉教授、高野克己教授に厚く御礼と感謝を申し上げます。また、日々の弛まぬ努力により研究を推し進めて頂きました、学生の方々にこの場を借りて感謝を申し上げます。

文 献

- 1) 野口智弘・新井智美・野口治子・内野昌孝・高野克己: 小麦 (ハルユタカ) 粒中のプロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) の分離精製, 日本食品保蔵科学会誌, **37**, 245~248 (2011)
- 2) ARAI, S., NOGUCHI, T., UCHINO, M. and TAKANO, K.: Purification and characterization of protein disulfide isomerase from wheat expressed in *Escherichia coli*., *Jpn. Food Pres. Sci.*, **37**, 173~183 (2011)
- 3) 野口智弘・田村良太・新井智美・野口治子・内野昌孝・高野克己: 小麦Ero1遺伝子のクローニングと発現, 日食保蔵誌, **37**, 283~287 (2011)
- 4) FRAND, A. R., CUOZZO, J. W. and KAISER, C. A.: Pathway for protein disulfide bond formation, *Trends Cell Biol.*, **10**, 203~210 (2000)
- 5) GROSS, E., KASTNER, D. B., KAISER, C. A. and FASS, D.: Structure of Ero1 p, Source of Disulfide Bonds for Oxidative Protein Folding in the Cell, *Cell*, **117**, 601~610 (2004)