

論文の内容の要旨

論文題名 苦味低減効果を有するアミノペプチダーゼに関する研究

氏名 元島英雅

チェダーチーズ、ゴダチーズ、あるいはカマンベールチーズなどの産業的に極めて重要なチーズにおいて、しばしば苦みの欠陥が見られ、熟成後、製品で苦みが発生すると、食品としての価値を低下させ、経済的にも大きな損失につながる。これは、チーズ中に蓄積される苦みペプチドが主要原因であることがすでに解明されている。それ故、これを解決することは、産業的にも重要な課題である。本論文は、カゼインの加水分解物の苦味を効率的に低減する効果のあるアミノペプチダーゼ、特に、高度好熱性細菌 *Thermus aquaticus* YT-1 株(ATCC25104)のアミノペプチダーゼ T (以降 AP-T と略称することがある) と乳酸菌 *Streptococcus thermophilus* YRC 001 株 (よつ葉乳業保存菌株) のリシルアミノペプチダーゼ (アミノペプチダーゼ N、以降 AP-YRC と略称することがある) に関して研究を行ったものである。AP-T に関しては、その遺伝子の塩基配列の解明、他のアミノペプチダーゼとの相同性、苦味の低減効果、AP-T 処理によるカゼイン加水分解物の低アレルギー化について研究した。また、リシルアミノペプチダーゼに関しては、その精製酵素の性質、遺伝子の塩基配列の解明、苦味低減効果の確認、乳業用乳酸菌株での発現系の構築について研究した。

1) アミノペプチダーゼ T

皆川らは 70℃以上の温度でも増殖可能な高度高熱性細菌である *T. aquaticus* YT-1 から新規のアミノペプチダーゼを精製し、アミノペプチダーゼ T と命名した (AP-T) [Minagawa *et al.*, *Agric. Biol. Cem.* 52,1755-1763(1988)]。皆川はその性質を詳細に決定し、本酵素は耐熱性の極めて高い分子量 48,000 の同一のサブユニットからなる 2 量体酵素で、金属依存性であることを見いだした。皆川は AP-T がカゼインのエンドペプチダーゼ特にトリプシン分解物の苦みを効果的に低減することを発見し、それが苦味ペプチドを分解するためであることを明らかにしている [Minagawa *et al.*, *J. Food Sci.*, 54,1225-1229 (1989)]。しかし、AP-T は全くの新規の酵素で他の酵素との類縁関係が分からなかった。

第 1 章と第 2 章では、それぞれ AP-T の精製と遺伝子のクローニングについて述べた。AP-T の N-末端側のアミノ酸配列からプローブを合成し、AP-T 遺伝子を含む約 5.0kb の *Hind*III 断片をクローニングし、AP-T 遺伝子の全配列を初めて決定した (DDBJ/EMBL/GenBank 登録番号: D00814)。AP-T 遺伝子は 408 アミノ酸をコードしており、GTG が開始コドンであった。サブユニットの推定分子量は 44,820 であった。また、*Bacillus stearothermophilus* NCIB8924 で報告されていたアミノペプチダーゼ II (APII) と N-末端アミノ酸配列 15 残基のうち、7 残基が一致し、相同性があることが明らかとなった。その他の既知のタンパクとの相同性は無かった。

第 3 章では AP-T の大腸菌での発現について述べた。部位特異的変位法を用いて開始メチオニンをコードする GTG を ATG に置換し、AP-T 遺伝子上流部分を削除し、pKK223-3 由来の *tac* プロモーターの S/D 配列の下流に開始コドンを連結した。IPTG で誘導し、発現させたところ、大腸菌でタンパクとして約 5% 程度の生産に成功した。以上については Motoshima *et al.*, *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2385-2392 (1990) で報告した。第 4 章では *T. thermophilus* HB8 株 (NCIB11244) から AP-T と相同のタンパク質 (AP-Th) の遺伝子 (D13386) と、*B. stearothermophilus* NCIB8924 株の APII 遺伝子 (D13385) の配列を決定した。AP-Th 遺伝子は AP-T 遺伝子と同様に 408 アミノ酸をコードしており、AP-T と 86% の相同性があった。一方、APII 遺伝子は 413 アミノ酸をコードしており、AP-T と 43% の相同性があった。これらの酵素の 1 次構造は他の既存のアミノペプチダーゼとは相同性がなく、孤立したファミリーをなしていることが明らかとなった。現在では世界的にアミノペプチダーゼ T ファミリーとして認知されており、MEROPS データベースにおいてもクラン MX、ファミリー M29 として独立して扱われている。以上については Motoshima

et al., *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 1710-1717 (1997)で報告した。

2) リシルアミノペプチダーゼ

皆川らの報告から Leu-MCA に対する高い活性を有する菌は、苦味ペプチドに由来する食品の苦みを低減する可能性が高いことが明らかである。しかし、高度好熱性細菌の AP-T は食経験がないという点で、チーズ製造等に直接用いるには障害がある。それ故、同じ発想に立って、チーズスターターに用いられている乳酸菌株 280 株から、アミノペプチダーゼ活性が高い株をスクリーニングした。その結果、よつ葉乳業保存菌株 *S. thermophilus* YRC001 が非常に高い蛍光基質 Leu-MCA (L-Leucine 4-Methyl-Coumaryl-7-Amide) に対する分解活性を有していることが明らかとなり、苦味低減効果が期待された。そこで、YRC001 株から本活性を指標にアミノペプチダーゼを精製した。本酵素(AP-YRC)はモノマーの酵素で、SDS-PAGE で約 9 万、ゲル濾過で約 10 万であった。広い基質特異性を有し、特にリシルペプチド、あるいはロイシルペプチドを良く分解した。活性に対する至適温度と pH は 35℃で pH6.5 であった。EDTA、*o*-phenanthroline 及び、PCMB が活性を阻害し、メタロペプチダーゼであった。AP-YRC は、トリプシン処理した還元脱脂乳の加水分解物に作用させると有意に苦味を低減した。そこで、精製した酵素の N-末端配列と内部アミノ酸配列を利用して全遺伝子を含む 2,940bp の *Xba*I 断片をクローニングした。遺伝子は 849 アミノ酸をコードしており、推定分子量は 96,434 であった。AP-YRC のアミノ酸配列は、既知のリシルアミノペプチダーゼ (アミノペプチダーゼ N) と高い相同性を有しており本酵素はリシルアミノペプチダーゼであることが分かった(DDBJ/EMBL/GenBank:D38040)。以上については、*Biosci. Biotech. Biochem.*に掲載予定である。第 6 章において、AP-YRC に苦味低減効果があることが明らかになったので、AP-YRC 遺伝子をチーズ用乳酸菌に組み込んでチーズを製造することを目標に乳酸菌での発現系の構築を行った。乳酸菌の一種 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* には、一般に広くクエン酸プラスミド(citrate plasmid)と呼ばれるプラスミドが存在している。このプラスミドは何代にも渡る植え継ぎにもかかわらず、安定に維持されている。それ故、クエン酸プラスミドをベースに構築したベクターを用いて、アミノペプチダーゼ遺伝子発現ベクターを作製し、乳酸菌で発現すれば、安全で、食品として利用できる高アミノペプチダーゼ生産乳酸菌が得られると考えた。まず、*L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* NCIMB10484 株からクエン酸プラスミド pCT484 を分離し、 λ ZAPII ファージベクターでクローン化した後、*Streptococcus sanguis* 由来のエリスロマイ

シン耐性遺伝子を導入して乳酸菌-大腸菌シャトルベクターpSS7を構築した。pSS7にAP-YRC遺伝子を導入して、大腸菌由来の配列を除去したpSLAP6を構築した。pSLAP6で乳業用の*L. lactis* subsp. *lactis*及び*L. lactis* subsp. *cremoris*株を形質転換し、エリスロマイシンの選択圧下で形質転換体を得た。どの株も不和合性の問題なく形質転換でき、選択圧がなくてもプラスミドは比較的安定であった。形質転換体はYRC001株に比べて強いもので約4倍のアミノペプチダーゼ活性があった。以上の結果から、*S. thermophilus*のAP-YRC遺伝子は*Lactococcus*属で容易に高発現し、実用性が示唆された。しかし、エリスロマイシンの選択圧なしで、citP（クエン酸透過能）あるいはAP-YRC（アミノペプチダーゼ活性）を指標として形質転換体を選別しようと試みたが形質転換体を得ることはできなかった。

3) AP-Tを用いたカゼイン加水分解物の呈味性の改善と低アレルゲン化

第7章において、全カゼインのエンドペプチダーゼ分解物をAP-Tでさらに処理した場合の、苦味の低減とその免疫学的性質について詳細に検討した。サチライシン、サーモリシン、あるいはトリプシンで調製した全カゼイン加水分解物では、特にトリプシン分解物が極めて苦味が高かった。これらの加水分解物を、AP-Tで分解し、官能評価したところ、苦味は有意に低減した。サチライシン加水分解物とサーモリシン分解物は低い抗原性を有していたが、トリプシン分解物は抗原性が高かった。トリプシン分解物をAP-Tで処理すると、抗原性が効果的に低下した。AP-Tで処理すると免疫原性も顕著に減少することが示された。AP-Tで処理すると牛乳アレルギー患者の血清中に存在する特異的IgE抗体に結合する抗原の量が減少した。それ故、AP-T処理は、苦味を低減して風味を改善すると同時に、カゼインのアレルゲン性を低減できることが示された。

以上のとおり、苦味低減効果のあるアミノペプチダーゼという観点で、高度好熱性細菌のアミノペプチダーゼTおよび乳酸菌のリシルアミノペプチダーゼの研究を行った。本研究の結果、アミノペプチダーゼTファミリーという新しい酵素ファミリーとして世界的に認知されるに至った。また、乳酸菌のリシルアミノペプチダーゼの精製とクローニングを行いその構造を決定した。本遺伝子は、乳酸菌の食品用ベクターの開発に最も利用しやすいもので、実用化が期待される。また、プロテアーゼ処理によるタンパクの低アレルゲン化は知られているが、特にアミノペプチダーゼによる苦味低減と低アレルゲン化という新しい手法に関して予備的な知見を得ることができた。今後の研究の発展が期待される。