

卵白リボフラビン結合蛋白質の苦味抑制作用

東京農業大学応用生物科学部醸造科学科・准教授 前橋 健二

■ 背景・目的

苦味は多くの毒物が呈する味であり本能的に忌避される感覚である。しかし苦味物質が必ずしも毒物とはいえず、栄養物質や機能性物質等はしばしばその苦味により著しく摂取量が制限されることから、効果的な苦味抑制手段の開発は製薬及び食品業にとって重要な課題である。我々はこれまでの研究でニワトリ卵白から精製したリボフラビン結合蛋白質(RBP)が様々な食品苦味物質に対して苦味抑制作用を示すことを報告している。本研究ではRBPの苦味抑制作用について構造-活性相関を明らかにすることを目的としてRBPの苦味抑制作用とその一次構造、二次構造及び三次構造との関連について検討した。また、詳細な構造-活性相関検討および効率的な大量生産を可能にするために組換えニワトリRBP発現系の構築も行った。

■ 方法

ニワトリ及びウズラRBPは卵白及び卵黄より硫酸沈殿、DEAE-及びCM-Sepharoseにより精製した。苦味物質としてキニーネ塩酸塩及びカフェインを用いた。苦味阻害活性としてはラベルドマグニチュード法により苦味物質単独の苦味強度に及ぼすRBPの影響を測定した。組換えRBPの調製のためには、ニワトリRBP遺伝子を*Brevibacillus*-大腸菌シャトルベクターpNCMO2の分泌シグナル配列下流に組み込んだ後*B. choshinensis* HPD31をエレクトロポレーション法にて形質転換した。得られたRBP発現株を5YC培地にて30°Cで2日間振とう培養し、培地上清に生産された組換えRBPをDEAE-Sepharose及びSephacryl S-200カラムにより精製した。

■ 結果および考察

ニワトリRBPの苦味抑制作用に及ぼす加熱処理の影響を調べた結果、0.4mM RBP(pH7)は80°Cにおいては60分間の処理で苦味抑制活性に変化はなかったが、100°C以上では一部変性沈殿を生じ処理温度または時間につれて苦味抑制活性は低下した。これは110°C処理後のRBP溶液のCDスペクトル解析から二次構造変化の影響によると推定された。ウズラRBPの遺伝子をクローニングし一次構造を調べたところ、アミノ酸配列でニワトリRBPと88.2%の相同性を有していた。ウズラRBPを卵白から精製しニワトリRBPと苦味抑制を比較した結果ほぼ同程度の活性を示した。ニワトリ及びウズラRBPはリジルエンドペプチダーゼ消化によって異なる断片化パターンを示したが、いずれも苦味抑制活性を失ったことから、RBP分子のポリペプチド鎖構造が苦味抑制活性に必要であることが示唆された。*B. choshinensis* HPD31をpNCMO2-RBPで形質転換して得られたRBP発現株は培養上清に0.8g/Lの可溶性の組換えRBP(rRBP)を発現した。このrRBPを培養上清から精製し苦味抑制活性を調べた結果、ネイティブRBP(nRBP)より若干弱いながらキニーネ及びカフェインに対する苦味抑制効果が認められた。rRBPはnRBPとは異なり糖鎖付加が見られなかったことから糖鎖は苦味抑制活性に必須でないことが示唆された。また、リボフラビン結合能がほとんど検出されなかったことからRBPの苦味抑制活性がリボフラビン結合と関連していないことも示唆された。

■ 結語

RBPの糖鎖及びリボフラビン結合能は苦味抑制活性に重要でないが、ポリペプチド鎖の構造は重要であると考えられた。今後は遺伝子工学的手法によりRBPの苦味抑制活性に関わる領域の特定を行うことで、苦味抑制の構造に関する有用な知見が得られることが期待される。