

卵白の加熱凝固に対するマイタケ中の プロテアーゼの影響

木元 幸一*, 林 あつみ*, 草間 正夫*

菅原 龍幸**, 青柳 康夫***

* 東京家政大学栄養学科

** 女子栄養大学食品化学研究室

*** 女子栄養短期大学食品化学研究室

Effect of Proteinases from *Grifola frondosa* on Gelling of Egg White

Koichi KIMOTO,* Atsumi HAYASHI,* Masao KUSAMA,*

Tatsuyuki SUGAWARA** and Yasuo AOYAGI***

* Department of Nutrition, Tokyo Kasei University, Itabashi-ku, Tokyo 173

** Department of Food Chemistry, Women's University of Nutrition, Sakado 350-02

*** Department of Food Chemistry, Women's College of Nutrition, Toshima-ku, Tokyo 170

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.) 47, 43~48 (1994)

Mushrooms have occasionally been used for cooking pot-steamed hotchpotch (tyawanmushi), but solidification has not been possible following the addition of *Grifola frondosa*. Therefore, proteinases in *Grifola frondosa* may degrade egg white protein. Ovalbumin (OVA) was digested with an extract of *G. frondosa* at acid, neutral or slightly alkaline pH, judging from SDS-PAGE patterns. After DEAE-cellulose column chromatography and gel filtration on Sephadex G-75, three proteinases and an acid proteinase from *G. frondosa* were identified. The molecular weight of proteinase A was about 18,000 and its enzymatic properties were essentially the same as those of alkaline metal proteinase, reported by Hashimoto *et al.* However, proteinase B appeared to be a new proteinase because of its high molecular weight of about 44,000, and neutral optimum pH. Proteinase C was present in the smallest amount and could only be poorly characterized. Acid proteinase was a carboxyl proteinase inhibited by pepstatin. Each proteinase digested OVA, but the SDS-PAGE patterns of the digestion products indicated hydrolytic specificity towards OVA. No proteinase alone could prevent OVA and egg white gelling, but a mixture of the three proteinases prevented gelling. Proteinases present in *G. frondosa* would thus appear to degrade egg white protein and prevent its gelling.

Key Words *Grifola frondosa*, proteinases, ovalbumin, egg white, gelling.

(Received June 30, 1993)

卵白は、牛乳とともに栄養価が高く、日常よく摂取する食物である。チーズ、バター、ヨーグルトなど多くの乳製品が加工食品として利用されている。それに比べると、タマゴの加工利用は、マヨネーズ、プリンなど原材料としての利用に限られているようである。その理由は、いくつかあると思われるが、一つには、卵白が加熱により凝固してしまう点にある。そこで卵白を加熱しても凝固しないようにする試みや¹⁾²⁾、ゲル化のメカニズムの解

明など³⁾⁴⁾が行われている。それらは、固まらない卵白を作ることにより食品加工素材としての新たな利用範囲の開発のみならず、発酵、微生物工業での利用の可能性も考慮したものであった。

茶碗蒸し等のタマゴのゲル化を利用した食べ物は多いが、その中には、シイタケなどの茸を入れることが多い。われわれは、このときにマイタケを入れると茶碗蒸しが固まらないことを見出した。さらに、あらかじめ加熱処理したマイタケを入れると普通に固まることから、マイタケ中のプロテアーゼが、卵白中の凝固タンパク質を分解してしまうことにより固まらなくなるのであろうと予

* 〒173 東京都板橋区加賀 1-18-1

** 〒350-02 坂戸市千代田 3-9-21

*** 〒170 東京都豊島区駒込 3-24-3

想された。

マイタケ中のプロテアーゼについては、アルカリ域に至適 pH を有するメタルプロテアーゼについての詳細な報告が橋本ら⁵⁾によって成されているが、それ以外にどのようなプロテアーゼが存在しているかについては未だ報告はない。そこで今回われわれはマイタケ中にいかなるプロテアーゼが存在するかを同定し、それらの酵素的性質を調べるとともに、卵白やオボアルブミンに対する分解活性とゲル形成への影響を調べたので報告する。

実験方法

1. 材料および試薬

マイタケは、栃木県鹿沼市農協加蘇舞茸生産組合で栽培されたものを購入した。トリプシン、キモトリプシン、パパイン、プロナーゼ、オボアルブミンは、Sigma 社より、Sephadex G-75 は Pharmacia 社より購入した。

2. マイタケより酵素溶液の抽出

マイタケの 10 倍量の蒸留水中で電気ミキサー（東芝 MX-K10GR）で粉碎し、30 分スターラーで攪拌抽出を行った。10,000×g 30 分の遠心分離により上澄液を得、酵素抽出液とした。抽出操作は氷水中又は 4°C 下で行った。ゲル形成への影響やオボアルブミン分解を調べるときには、反応系の 10 分の 1 量となるように加え、37°C、1~2 時間反応させた。部分精製を行うときには、蒸留水の代わりに pH 6 の 0.02 M リン酸ナトリウム緩衝液を用いて同様に抽出をした。

3. 加熱凝固

卵白は、0.10 M NaCl で溶解し、最終濃度 5% で 80°C 15 分の加熱により凝固させた。オボアルブミンは、0.10 M リン酸緩衝液で 1.6% 濃度として同様にを行った。

4. プロテアーゼ活性⁶⁾

基質として、pH 7 の 0.10 M リン酸ナトリウム緩衝液に溶かした 1% カゼインと pH 3 の 0.10 M グリシン塩酸緩衝液に溶かした 1% ヘモグロビンを使用した。基質溶液 1 ml に酵素液 0.1 ml を加え 37°C で一定時間反応の後 10% TCA 1 ml を加え、タンパクを沈澱させ、その上澄液を濾過により得、280 nm の吸光度を測定した。

5. タンパク質量の測定

280 nm の吸光度測定と Biorad 社の protein assay キットを使用して行った。

6. SDS-PAGE

SDS 電気泳動は、Weber ら⁷⁾の方法に準じて 7.5% ゲルにより行った。分子量マーカーとして、Biorad 社の LMW マーカーを使用した。

7. Sephadex G-75 によるゲル濾過

Sephadex G-75 を 0.10 M NaCl を含む 0.02 M リン酸ナトリウム緩衝液中で膨潤させ、直径 3.6 cm、長さ 95

cm のカラムに詰め、同様の緩衝液で平衡化の後、試料をのせた。分子量マーカーとして、ブルーデキストラン、オボアルブミン、キモトリプシノーゲン、ミオグロビンを用いた。

8. 至適 pH と pH 安定性の測定

0.20 M グリシン、酢酸、リン酸、トリス緩衝液を用いて水酸化ナトリウムと塩酸で種々の pH を設定した。至適 pH は、基質と酵素を入れた反応液の pH を変化させて活性を測定した。pH 安定性は、酵素を種々の pH で 4°C 一晚放置した後、pH 7 でカゼインを基質として、または、pH 3 でヘモグロビンを基質として残存活性を測定した。

9. 至適温度と熱安定性の測定

至適反応温度は、種々の反応温度を設定し、活性測定を行った。熱安定性については、酵素液を種々の温度で 15 分インキュベーションの後、基質を加え、37°C で酵素反応を行い残存活性を測定した。

10. 酵素活性に及ぼす阻害剤の影響

酵素液に 10 分の 1 量の阻害剤を加え、10 分間のプレインキュベーションの後、基質を加え酵素反応を行い、残存活性を測定した。

結果および考察

1. 加熱凝固への影響

卵白もオボアルブミンも加熱凝固した。しかし卵白とオボアルブミンに、同程度のカゼイン分解活性を持つ酵素液を 10 分の 1 量加えて 2 時間インキュベーションすると、後の加熱凝固に変化が見られた。Fig. 1 に示したようにトリプシンやキモトリプシンでは卵白の凝固阻止は見られなかったが、マイタケ水抽出液、パパイン、プロナーゼを加えたものでは凝固が妨げられた。また、卵白の主なタンパク質成分であり加熱凝固の主体であると思われるオボアルブミンに対しても同様の結果を示し (Fig. 1(b))、マイタケ水抽出液による凝固阻止が観察された。また結果には示さなかったが、加熱処理したマイタケではこの凝固阻止が失われることと併せて、マイタケ中のプロテアーゼが作用していることが示唆された。しかし、プロテアーゼの中でもトリプシンやキモトリプシンでは凝固阻止が起こらなかった。そこでさらに検討するために、オボアルブミンに対する種々プロテアーゼによる分解活性を SDS 電気泳動 (SDS-PAGE) により調べた。同様にして、オボアルブミンを種々の酵素とともに 37°C 2 時間反応させると Fig. 2 に見られるように、オボアルブミンがインヒビターとして働くトリプシンでは明らかに分解は起こっていなかった。凝固を妨げるパパインやプロナーゼと同様にマイタケ水抽出液は、オボアルブミンを強く分解している。しかし、キモトリプシン

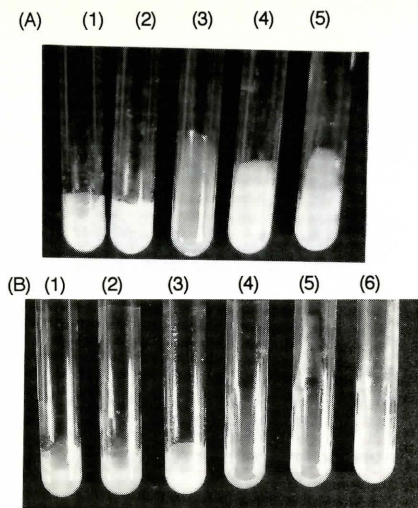


Fig. 1. Effects of proteinases on gelling of egg white and ovalbumin.

(A) Egg white solutions were incubated with various proteinases for 2 h at 37°C. The heating and gelling was done at over 80°C for 20 min. (1) chymotrypsin, (2) trypsin, (3) extract from *G. frondosa*, (4) papain, (5) pronase.

(B) Ovalbumin was incubated with various proteinases and then, heated for gelling as the same manner. (1) ovalbumin, (2) chymotrypsin, (3) trypsin, (4) extract from *G. frondosa*, (5) papain, (6) pronase.

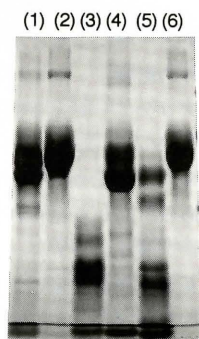


Fig. 2. SDS-PAGE patterns of hydrolysis products of ovalbumin by various proteinases.

Each enzyme concentration was determined by the equal ability of hydrolysis towards casein. Ovalbumin solutions were incubated with various proteinases at 37°C for 2 h and SDS-PAGE was done and stained with Coomassie Brilliant Blue. (1) extract from *G. frondosa*, (2) trypsin, (3) chymotrypsin, (4) papain, (5) pronase, (6) ovalbumin without proteinases.

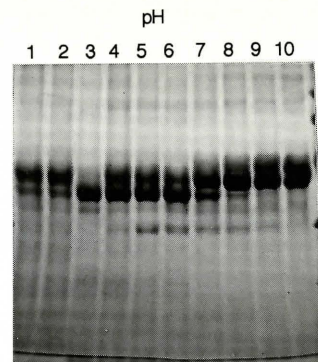


Fig. 3. SDS-PAGE patterns of ovalbumin after digested with extract from *G. frondosa* at various pHs.

Ovalbumin solutions were incubated with the extracts from *G. frondosa* at various pHs adjusted with the mixtures of glycine, acetate, phosphate, tris buffer and reaction mixtures were applied on SDS-PAGE.

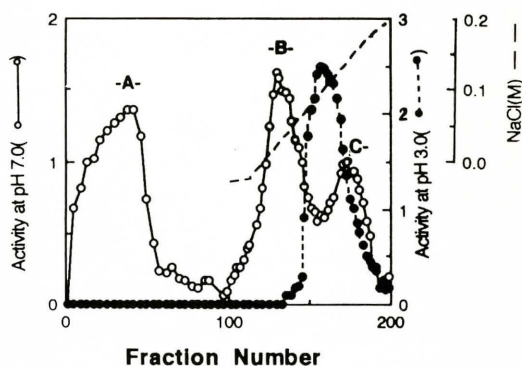


Fig. 4. DEAE-cellulose chromatography of the extract from *G. frondosa*.

Grifola frondosa was homogenized in 10 volumes of 0.02 M sodium phosphate buffer, pH 6.0 and centrifuged at $12,000 \times g$ for 1 h and the supernatant was obtained as the extract solution from *G. frondosa*. The extract solution was applied on a DEAE-cellulose column chromatography preliminarily equilibrated with the same buffer. ○: Proteinase activity was assayed by using casein as substrate at pH 7.0. ●: Proteinase activity was assayed by using hemoglobin as substrate at pH 3.0. Casein hydrolytic activities at pH 7.0 were separated into three peaks and designated them as proteinases A, B and C.

では、凝固は阻止されないにも拘らずかなり分解している。このことは、プロテアーゼによるタンパク質の分解が、卵白やオボアルブミンの凝固への影響に対して一様

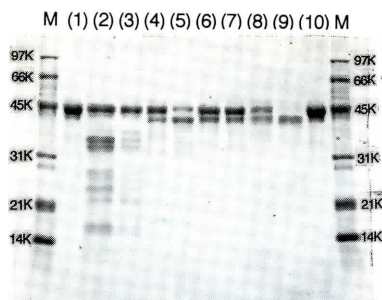


Fig. 5. SDS-PAGE patterns of hydrolysis products of ovalbumin by proteinases A, B and C.

Ovalbumin solution was incubated with proteinases A, B and C and the reaction mixture was applied on SDS-PAGE. (1) and (10) : ovalbumin without proteinases. (2)-(9) : incubated with proteinase A for 2 h (2), or for 15 h (3), with proteinase B for 2 h (4) or for 15 h (5), with proteinase C for 2 h (6) or for 15 h (7), and with the mixture of three proteinases A, B and C for 2 h (8) or for 15 h (9).

ではないことを示唆している。そこで次に、マイタケによるオボアルブミンの分解をさらに詳しく調べることとした。マイタケ水抽出液による、オボアルブミンに対する各 pH における分解パターンを SDS 電気泳動により調べた。Fig. 3 に見られるように、マイタケ抽出液は、pH 3 付近および pH 5~8 付近の間で強くオボアルブミンを分解していることが確認された。このことより、マイタケ中には、数種のプロテアーゼの存在が確認されたので次にそれらを同定し、その性質を決定することとした。

2. 部分精製によるマイタケ中のプロテアーゼの同定

マイタケを pH 6.0 の 0.02 M リン酸ナトリウム緩衝液中で粉碎し、遠心分離により粗抽出液を得た。同様の緩衝液で平衡化した DEAE-cellulose によりカラムクロマトグラフィーを行い、4 種のプロテアーゼ活性画分を得た。Fig. 4 に示したように pH 7 でカゼインを分解するプロテアーゼ A, B, C と pH 3 でヘモグロビンを分解する酸性プロテアーゼが得られた。次に Sephadex G-75 によるゲル濾過で分子量による分画を行うとともに、各々の分子量を推定した。また、ゲル濾過により得られたプロテアーゼの活性画分について、酵素的性質を決定した。Table 1 に示したように、プロテアーゼ A は、分子量約 20,000、プロテアーゼ B, C は分子量約 45,000、酸性プロテアーゼは分子量約 44,000 と推定された。プロテアーゼ A は、至適 pH が 8、至適温度は 60°C であった。プロテアーゼ B は、至適 pH が 7、至適温度は 50°C であ

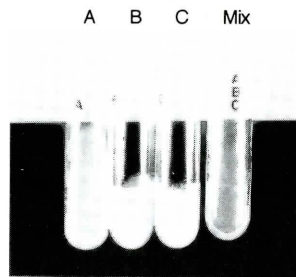


Fig. 6. Effect of proteinases A, B and C on gelling of ovalbumin.

Ovalbumin solution was digested by proteinases A, B and C and heated to form the gel. (1) proteinase A, (2) proteinase B, (3) proteinase C, (4) the mixture of proteinases A, B and C.

った。プロテアーゼ C は、至適 pH が 6 付近であった。酸性プロテアーゼは、至適 pH が 3、至適温度は、65°C と高かった。Table 2 よりプロテアーゼ A は、EDTA で阻害される典型的なメタルプロテアーゼであり、橋本ら⁵⁾が報告しているものと分子量も酵素的性質もよく一致していた。プロテアーゼ B については、EDTA で阻害されることは同じであるが、分子量が橋本らの報告していたものよりも大きく、他の酵素的性質も違っていた。プロテアーゼ C も、新たなプロテアーゼと思われるが、量も少なく強い阻害剤が特定できなかったのさらに検討の必要がある。酸性プロテアーゼは、ペプスタチンで阻害される典型的な、カルボキシルプロテアーゼであると示唆された。

3. 各々のプロテアーゼによるオボアルブミンの分解と加熱凝固への影響

単離された酸性プロテアーゼと 3 種のプロテアーゼについて、そのオボアルブミンに対する分解活性を調べた。Fig. 5 は、オボアルブミン分解の SDS 電気泳動パターンを示したものである。図から見られるように、プロテアーゼ A, B, C および酸性プロテアーゼは異なった分解パターンを示し、基質特異性に違いがあることが示唆された。卵白などの加熱凝固は、とくに酸性条件下で行うことはないで、酸性プロテアーゼ以外の 3 種のプロテアーゼについて、さらにその加熱凝固への影響を調べた。Fig. 6 に示されたようにプロテアーゼ A については、少しばかり凝固に影響し、白濁しながらもわずかに流動化していた。プロテアーゼ B, C では凝固阻止されなかった。しかし、プロテアーゼ A, B, C を 3 種とも混ぜると、加熱後、不透明な流動化が起こるが、凝固がほぼ完全に阻止された。このことより、卵白などの加熱凝固形成の際のマイタケによる加熱凝固阻止の要因は、この 3 種のプロテアーゼが相互に関わっていることが明らかとなっ

Table 1. Enzymatic natures of proteinases obtained by gel filtration on Sephadex G-75.

	Proteinase A	Proteinase B	Proteinase C	Acid proteinase
Molecular weight	about 20,000	about 45,000	about 45,000	about 44,000
Optimum pH	about pH 8.0	about pH 7.0	about pH 6.0	about pH 3.0
pH-stability	between 5-9	between 5-9	between 4-8	between 2.5-6
Optimum temp.	about 60°C	about 50°C	about 50°C	about 65°C
Thermo-stability	to 60°C	to 45°C	to 35°C	to 45°C

Experimental procedures were described in the Method and the Results.

Table 2. Effect of inhibitors on proteinase activities.

	Concentration	Remaining Activity (%)			
		Proteinase A	Proteinase B	Proteinase C	Acid Proteinase
PMSF	1 mM	100	100	100	100
TPCK	1 mM	100	100	100	100
TLCK	1 mM	100	100	100	100
Leupeptin	0.1 mM	90	95	100	100
Antipain	0.1 mM	100	100	100	100
Pepstatin	0.1 mM	100	100	28	12
Chymostatin	0.1 mM	90	100	85	92
Phosphoramidon	0.1 mM	74	25	60	100
Monoiodoacetate	1 mM	85	90	100	100
Dithiothreitol	1 mM	92	75	100	100
PCMB	1 mM	100	61	100	100
EDTA	1 mM	20	3	60	100
SBTI	2 mg/ml	60	90	66	100

Experimental procedures were described in the Method.

た。電気泳動のパターンからは、プロテアーゼ A が最も重要であると思われるが、あとの二つの関わり方については、分解パターンやゲル形成阻止の具合や程度などの判定に微妙なところもあり、さらに詳細な検討が必要と思われるので今後の検討課題としたい。

卵白は加水分解され、極端な低分子化が起こればもちろんゲル形成はなくなる。しかし、今回データには示さなかったが、マイタケプロテアーゼによるオボアルブミンの加水分解において、TCA 可溶物は、カゼインを基質としたときほど大きな上昇はなかった。SDS 電気泳動による分解産物の泳動パターンからも、それほど小さくない分解物が生成している可能性が示唆されているが、さらに詳しいデータの検討を今後行いたい。

卵白の加熱凝固については、これまで凝固の性質や機作についての報告⁸⁾⁹⁾がある。加熱凝固を低下させたり、喪失させるためには、pH や塩濃度の選択、またオートクレーブによる加熱などが指摘されている²⁾¹⁰⁾。卵白アルブミンは、卵白タンパク質の 50% 以上を占めている。卵白のゲル化と同じように、卵白アルブミンも白濁したゲルを生じることが知られている。卵白アルブミンはタンパク質の変性温度よりも低いところで凝集沈澱が起こって

いることが見出され、いわゆる、変性から不溶化という一般のタンパク質の性質とは違うことが明らかになった¹¹⁾¹²⁾。加熱により、まず、オボアルブミン分子の立体構造の変化があり、その後、繊維状ポリマーの形成が基本となって凝集体形成という 2 段階進行が推定されている。また、ゲルの形成が変性温度と同じか、あるいは高い温度で生じることが観察され、凝集沈澱と非凝集沈澱の中間体としてゲル形成が起こっていると報告されている。ゲルの形成は、静電的反発力に支配されており、オボアルブミンの濃度、pH、イオン強度を適当に選ぶことにより、透明なゲルだったり、白濁したゲルだったり、けん濁液に近いものになったりするといわれている¹³⁾¹⁴⁾。オボアルブミン分子は加熱によって変性するが、球状は保っており、疎水性側鎖の一部が分子外側に露出してくる。これにより、疎水性相互作用（引力）とそれに対抗する静電的反発力とのバランスによりゲル化や凝集沈澱が起こるとされている。白濁ゲルは、塊状凝集体であり、透明ゲルは、線状凝集からなるといわれている。本実験においても、オボアルブミンを、トリプシンやマイタケプロテアーゼ B、C で処理してもゲル形成には影響がなく、キモトリプシンや、マイタケのプロテアー

ゼ A で処理すると、塊状凝集が見られ、パバインやプロテアーゼまたはマイタケのプロテアーゼを混合すると不透明な流動化が起こり、ゲル形成が妨げられるなどそれぞれの変化が見られた。それは、プロテアーゼ処理によって、タンパク質のある程度の低分子化が起こるとともに、疎水性領域の露出具合や線状ポリマーの形成へ影響していると思われる。今後、プロテアーゼの基質特異性を明らかにし、オボアルブミン分子の切断箇所を推定したり、高次構造の変化を予測し、分解産物によるゲル形成能を検討することが必要であると思われる。そして、マイタケによる、卵白の加熱凝固阻止が、卵白やタマゴの新しい利用に繋がることを期待したい。また、今回新しく見つかったマイタケのプロテアーゼについても現在さらにその酵素学的性質と、きのこの成長における生化学的役割の検討を行っている。村尾ら¹⁵⁾は、シメジの人工栽培において、酸性プロテアーゼの特異的インヒビター(SP-I)を培地に添加することにより、子実体形成の顕著な促進が観察されることを報告している。今回報告したこれらプロテアーゼの詳細な性質と働きが明らかになれば、村尾らがシメジに対して試みたような効果的な処置が、マイタケ栽培にも示唆される可能性がある。

要 約

茶碗蒸しを作るときにキノコなどを入れる場合が多いが、そのときにマイタケを入れた場合、茶碗蒸しが固まらなくなってしまうことにより、マイタケ中に存在するプロテアーゼに着目した。マイタケ中より数種のプロテアーゼを同定し、卵白の加熱凝固阻止や、卵白アルブミンの加熱分解への作用を調べ、酵素的性質も明らかにした。

オボアルブミンは、卵白中に 50 % 以上を占める加熱凝固に関わるタンパク質である。SDS-電気泳動により、オボアルブミンの分解パターンを調べたところ、中性域と酸性域でよく分解されることが観察され、中性プロテアーゼと酸性プロテアーゼの存在が示唆された。マイタケ抽出液の DEAE-セルロースと Sephadex-G75 によるゲル濾過によりプロテアーゼ A, B, C と酸性プロテアーゼが同定された。プロテアーゼ A は分子量約 20,000 と推定され、すでに橋本らに報告されているメタルプロテ

アーゼと良く似た性質を示した。プロテアーゼ B については、分子量がプロテアーゼ A のおよそ 2 倍の約 45,000 と推定された。この点は、橋本らが報告したものとは異なっており、至適 pH も 7 と中性的であったが、やはりメタルプロテアーゼと思われる。プロテアーゼ C については、B と同じ分子量であったが、至適 pH は 6 付近であった。酸性プロテアーゼはペプスタチンで阻害される典型的なカルボキシルプロテアーゼで、分子量は約 45,000 と推定された。

プロテアーゼ A, B, C は、いずれもオボアルブミンを分解したが、卵白に対しては単独では凝固阻止は見られなかった。しかし、三種のプロテアーゼを混合すると、凝固が妨げられた。以上、マイタケ中に未知の新たなプロテアーゼが存在することを見出し、また、卵白の加熱凝固阻止作用についてはマイタケ中のプロテアーゼが共同で関わっていることが明らかにされた。

本研究の実験遂行にあたり、惜しめないご助力をいただきました東京家政大学栄養第二研究室卒論生小幡恵子、佐藤和枝、姫野妙子、荒井千穂子、岡本千恵、関根弘美の各氏に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 西川善之, 河合文雄, 満田久輝: 栄食誌, 37, 129 (1984)
- 2) 西川善之, 河合文雄, 満田久輝: 栄食誌, 38, 191 (1985)
- 3) 佐藤 泰, 渡辺乾二: 蛋白質 核酸 酵素, 23, 54 (1978)
- 4) Kato, A., Nakamura, R. and Sato, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 35, 351 (1978)
- 5) 橋本洋一: 蛋白質 核酸 酵素, 28, 1220 (1983)
- 6) Anson, M.L.: *J. Gen. Physiol.*, 22, 79 (1938)
- 7) Weber, K. and Osborn, M.: *J. Biol. Chem.*, 244, 4406 (1969)
- 8) 広瀬正明: 食糧科学研究所報告, 53, 14 (1990)
- 9) 北畠直文: 食糧科学研究所報告, 53, 1 (1990)
- 10) 西川善之, 河合文雄, 満田久輝: 栄食誌, 37, 457 (1984)
- 11) 土井悦四郎: 農化, 62, 886 (1988)
- 12) 中村 良: 農化, 62, 879 (1988)
- 13) Shimizu, A., Kitabatake, N., Higasa, T. and Doi, E.: *Nippon Syokuhin Kogyo Gakkaishi*, 38, 1050 (1991)
- 14) 早川 茂, 中村 良: 農化, 62, 879 (1988)
- 15) 村尾沢夫: 発酵と工業, 43, 43 (1985)

(1993 年 6 月 30 日受理)