

小麦粉食品の物性改善に向けた
超小角 X 線散乱法による小麦タンパク質集合体のナノ構造解析
**Nanostructural Analysis on Wheat Protein Assembly
by Ultra-Small-Angle X-ray Scattering
towards Improvement of Physical Properties of Wheat Food Products**

佐藤 信浩, 裏出 令子, 杉山 正明
Nobuhiro Sato, Reiko Urade, Masaaki Sugiyama

京都大学 複合原子力科学研究所
Institute for Integrated Radiation and Nuclear Science, Kyoto University

純水による抽出法を用いて分画された小麦タンパク質グルテニンの濃厚水和凝集体について超小角 X 線散乱 (USAXS) 測定を行い、添加する食塩水の食塩濃度変化に伴うナノサブマイクロメートルスケールでの構造変化を追跡した。小麦のもう一方の主要タンパク質であるグリアジンにおいては、添加する食塩濃度の変化に依存して凝集体中の疎密構造に基づく密度ゆらぎの顕著な変化が見られたが、グルテニンにおいては食塩濃度の変化による散乱曲線の大きな相違は観察されず、グルテニンの凝集構造に対する食塩の影響はグリアジンと比較して小さいことが明らかとなった。

キーワード： 超小角 X 線散乱、小麦タンパク質、グルテニン

背景と研究目的：

小麦粉生地は小麦粉を利用した食品の食感や加工性に大きく影響を及ぼすが、物性を支配する要因はタンパク質の複合体グルテンによるものである。グルテンは、弾性に寄与する重合体タンパク質グルテニンと粘性に寄与する単量体タンパク質グリアジンの複合体であり、個々のタンパク質やそれらの複合体の構造を解析し物性との関連を明らかにすることによって、小麦粉食品の加工性の改善や食感の向上をもたらすことが可能となる。

グリアジンはこれまでエタノール水溶液や希酸にのみ溶解するとされてきたが、近年、裏出らによって純水中への抽出法が見出され[1]、実際の小麦粉生地により類似した環境中での構造や物性解析に貢献することが期待されている。我々は、この手法を用いて抽出したグリアジンの水溶液および水和凝集体について、広範囲の濃度域にわたって X 線小角散乱法 (SAXS) によるナノ構造解析を行い、グリアジン孤立分子およびグリアジン集合体の濃度変化に伴う構造変化を明らかにしてきた[2]。その結果、希薄水溶液中ではグリアジンはほぼ単量体として存在しているが、濃度増加とともに会合し始め粒子間干渉を示す凝集ドメインを形成すること、また、さらなる濃度増加によって干渉ピークが消失し内部に密度ゆらぎの存在する、より大きな凝集構造を形成することを明らかにした。また、食塩の添加によって誘起される構造変化を解明するため、SAXS および超小角 X 線散乱法 (USAXS) を用いて添加塩濃度の変化に伴うグリアジン凝集構造の変化を調べ、食塩濃度の増加とともに、グリアジン凝集体の疎密構造が凝縮するとともに、2 次的な疎密構造が新たに生じ、これらが強く凝縮して疎密構造が消失していく過程を明らかにした。

一方、グルテニンについては濃度増加や食塩添加に伴う凝集構造の変化は解明されていないため、グルテンの構造や物性を明らかにする上で、グリアジンと複合体を形成するグルテニンの構造変化を明らかにすることは不可欠である。そこで、本研究では、USAXS を用いて、食塩添加に伴うグルテニンのサブマイクロメートルスケールでの構造変化を追跡するとともに、高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory (KEK PF) において $q = 0.06 \text{ nm}^{-1}$ 以上の中広角領域について行った測定結果と合わせて、グルテニンのナノサブマイクロメートルスケールでの構造変化を調べた。

実験：

試料となるグルテニンは、小麦粉生地から裏出らの抽出法[1]によりグリアジンを抽出分離した

後、残存したタンパク質を回収することにより得た。グリアジンの抽出は以下の方法により実施した。小麦粉（日清製粉 SuperKing™）100 g に 0.5 M 食塩水を 67 mL 添加し 20 分間機械混捏することにより小麦粉生地を得た。500 mL 純水中で洗液を交換しながらこの生地を繰り返し揉み洗い、3-6 回目の洗液を回収した後、食塩を添加しグリアジンを沈殿させた。遠心沈降により回収したグリアジンを純水中で透析した後、凍結乾燥して粉末状のグリアジンを得た。一方、揉み洗いにより残存した試料を回収し凍結乾燥することによって粉末状のグルテニンを得た。測定に用いる試料は、うどん生地等で用いられるのと同程度の濃度である 35% 前後の濃度となるようにタンパク質と純水と混和した後、4 日経過したものを測定に用いた。また、うどん生地に用いられる食塩濃度と同程度の 1-3 M の濃度の塩化ナトリウムを添加した場合の変化についても調べた。

USAXS 測定は、SPring-8 の産業利用ビームライン I BL19B2 の極小角 X 線小角散乱装置を利用して行った。試料は膜厚 7 μm のポリイミドフィルムを窓材とした PTFE 製のセルに充填し、試料厚さは 0.5 mm とした。入射 X 線のエネルギー 18 keV、カメラ長 42 m（コラーゲン試料の回折ピークを基準に校正）で測定を行い、2 次元検出器 PILATUS 2M (DECTRIS) を用いて散乱パターンを取得した。露光時間は主に 300 秒とし、室温で測定を実施した。測定された 2 次元散乱パターンについて円環平均による 1 次元化処理を行って得られた散乱プロファイルをもとに解析を行った。

結果および考察：

グリアジン（濃度 35%）およびグルテニン（濃度 38%）の水和凝集体について測定した USAXS-SAXS プロファイルを図 1 に示す。グリアジンは、 0.2 nm^{-1} 付近にブロードなピークを示すとともに、 0.03 nm^{-1} 以下の領域において、 q^{-4} に比例するいわゆる Porod 則[3]に従う急峻な立ち上がりが見られる。Porod 則に従う立ち上がりは大きな凝集構造の形成を意味する一方、 0.2 nm^{-1} 付近のピークは密度揺らぎの相関の存在を示すことから、グリアジン分子が一定の相関距離を持つ疎密構造を内部に有する凝集体を形成していることがわかる（図 2 左）。一方、グルテニンについては、 1 nm^{-1} 付近にわずかなピークが見られるものの、全体として単調な立ち上がりを示す曲線であり、 0.1 nm^{-1} 以下において Porod 則に従うことがわかった。このことは、グルテニンについては、グリアジンのような一定の相関距離を示すような疎密構造をとらず、全体として大きな凝集構造を形成していることを示している。両者の違いは、それぞれのタンパク質自身の持つ構造の違いを反映している。グリアジンは単量体タンパク質の集合体であり、疎水性相互作用などの分子間相互作用によって凝集している。この際、タンパク質分子の形状や水と分子間相互作用のバランスなどによって、特定の距離を持つ疎密構造を形成しやすいのに対し、グルテニンは分子間ジスルフィド結合によって多量体化した高分子量のタンパク質であり、共有結合により局所的に固定化された構造を有するため特徴的な距離相関を持つ疎密構造を形成しづらいものと考えられる（図 2 右）。このようなグリアジンとグルテニンの構造の相違は小麦粉生地の粘弾性的な挙動と関連している。グリアジンは主に分子間の疎水性相互作用で凝集しているため、応力に対して滑りを生じ粘性的な挙動を示す一方、グルテニンは共有結合で架橋されているため、応力が失われた際に分子間の相互の位置が回復し弾性的な挙動を示す。

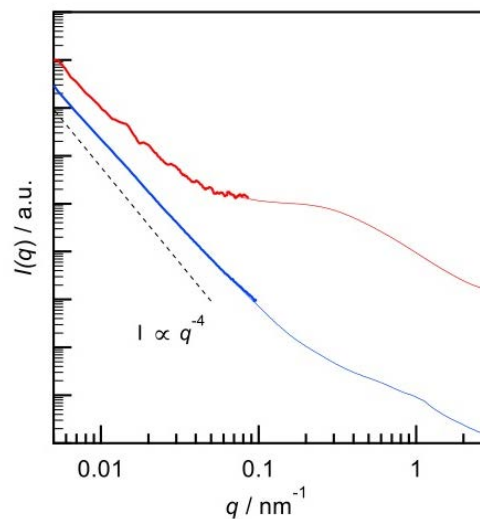


図 1. グリアジン（赤）およびグルテニン（青）水和凝集体の USAXS-SAXS プロファイル。SPring-8 において測定したデータ（太線）と Photon Factory において測定したデータ（細線）を合一して示す。見やすくするため、各プロファイルを縦方向にシフトして表示している。

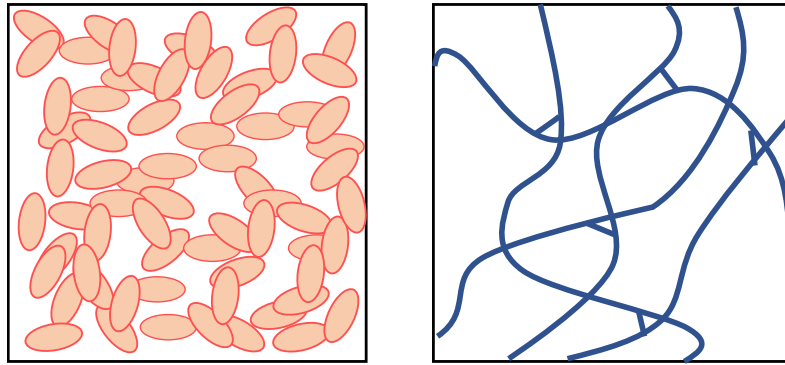


図2 グリアジン(左)およびグルテニン(右)の集合構造の概念図。グリアジンは一定の相関距離を持つ疎密構造を内部に有する単量体の凝集体である一方、グルテニンは共有結合により架橋された高分子量のネットワーク構造を形成する。

次に、食塩を添加した際のグルテニンの構造変化について調べた結果を図3に示す。グリアジンにおいては、食塩添加に伴い 0.2 nm^{-1} より高角側に観測されるブロードなピークがさらに高角側にシフトするとともに次第に小さくなっていく変化が観察された[4]が、グルテニンでは、食塩濃度の違いに応じてそのような顕著な変化は観察されなかった。これは前述の通り、グリアジン凝集体が分子間相互作用の影響を受けて疎密構造を形成するため、塩の添加によって分子間相互作用が変化することで疎密構造も変化するのに対し、グルテニンは共有結合で局所的に固定化された凝集体であるため、分子間相互作用の影響による構造変化を受けにくいことを反映している。一方、詳細に観察すると、 $0.05\text{--}0.1 \text{ nm}^{-1}$ の領域において、食塩を添加しない状態では直線的な立ち上がりだったものが、食塩濃度 1 M ではブロードな小さいピークが生じるとともに、 3 M ではそのピークが高角側にシフトしている。このことは、食塩添加によって 100 nm 程度のスケールにおいて密度ゆらぎが生じていることを示しており、より大きいスケールにおいては、食塩添加によって疎密構造が誘起されることが明らかとなった。

今後の課題：

小麦粉食品中に含まれるグルテンの挙動を明らかにするためには、グリアジンとグルテニンの複合体としての構造や物性を明らかにする必要がある。今後、両者を混合した状態での小角散乱測定を通じて、個々のタンパク質と複合体の構造の相違を明らかにし、グルテンの構造と物性との関連について理解を深めることが重要となる。

参考文献：

- [1] T. Ukai *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 1122 (2008).
- [2] N. Sato *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 8715 (2015).
- [3] D. I. Svergun and M. H. J. Koch, *Rep. Prog. Phys.*, **66**, 1735 (2003).
- [4] 佐藤信浩 他, SPring-8/SACLA 利用研究成果集, **7(2)**, 254 (2015).

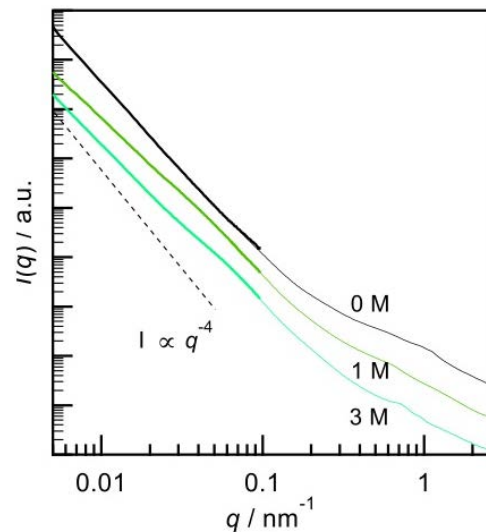


図3. グルテニン濃度38%の水和凝集体について異なる濃度の食塩を添加した際のUSAXS-SAXS プロファイル。SPring-8において測定したデータ(太線)とPhoton Factoryにおいて測定したデータ(細線)を合一して示す。図中の数字は食塩濃度を示し、見やすくするため、各プロファイルを縦方向にシフトして表示している。