

新規機能性食品の開発に向けた超小角 X 線散乱法による
食品タンパク質水和集合体のナノ構造解析
Nanostructural Analysis of Hydrated Food Protein Assembly
by Ultra-Small-Angle X-ray Scattering
towards Development of Novel Functional Foods

佐藤 信浩^a, 裏出 令子^b, 東野 ゆうき^b, 北尾 悠樹^b, 岩村 紗希^b, 岡田 ひかり^b, 大場 洋次郎^a
Nobuhiro Sato^a, Reiko Urade^b, Yuki Higashino^b, Yuki Kitao^b, Saki Iwamura^b, Hikari Okada^b, Yojiro Oba^a

^a京都大学原子炉実験所, ^b京都大学大学院農学研究科

^aResearch Reactor Institute, Kyoto University, ^bGraduate School of Agriculture, Kyoto University

大豆の主要タンパク質であるグリシニンと β -コングリシニンについて、加熱に伴うゲル化前後のナノ構造の変化を超小角 X 線散乱により調べ、他の放射光施設で測定した中広角領域の小角 X 線散乱の結果と併せてナノメートルからサブマイクロメートルに及ぶ空間スケールの変化を追跡した。その結果、両者のタンパク質とも加熱によって全体的な凝集構造は大きく変化しないが、サブユニット周辺の構造に再構成を生じていることが明らかとなった。

キーワード： 大豆タンパク質、グリシニン、 β -コングリシニン、超小角 X 線散乱

背景と研究目的：

小麦や大豆などは種子中にタンパク質を多く含むことから、植物性タンパク質源として古くから麩や豆腐など様々な食品に用いられてきた。一方、直接的な食品としての利用だけではなく、抽出したタンパク質を他の食品に加え、結着性や保水性など食品物性を改善するための補助物質として利用される機会も近年増加している。したがって、これらのタンパク質の示す物性とそれをもたらすタンパク質の構造との関連を解明することは、植物性タンパク質を含む食品そのものの食感や加工性の改善だけではなく、より優れた性能を持つ補助物質の開発という観点からも不可欠であり、食品工業的にも必要性が高い。食品中のタンパク質は、不透明な濃厚ゾルやゲル状態で存在しており、かつ、結晶のような周期的な構造を示さないことが多い。このような物質の構造解析においてナノスケールでの構造評価が可能な小角 X 線散乱(SAXS)や、より大きいサブマイクロスケールでの構造を測定するために用いられる超小角 X 線散乱(USAXS)による測定法は非常に有効な手法となりうる。我々は SAXS を用いて広範囲の濃度にわたって小麦タンパク質グリアンの水溶液または水和凝集体の凝集構造の変化を追跡し、それぞれの濃度域におけるグリアンの孤立分子や集合構造の特徴を明らかにしてきた[1]。

一方、大豆タンパク質については、その主要な成分であるグリシニンと β -コングリシニンについて、各々のタンパク質やその混合物における凝集構造を明らかにするとともに、未処理状態の構造と加熱や凝固剤添加によって引き起こされる構造の差異を解明することによって、大豆食品の加工において重要なプロセスであるゲル化の機構を詳らかにする必要がある。そこで本課題においては、SPring-8 BL19B2の極小角 X 線散乱装置を用いた USAXS 測定により、加熱に伴う sub- μm の空間スケールでの構造変化を明らかにすることを目的に実験を行った。他放射光施設における中広角領域の SAXS 測定の結果と併せて、nm から sub- μm 領域の構造変化を統一的に解析し、広範囲の空間スケールでの階層的な構造変化について調べた。

実験：

試料となるグリシニン(11S)および β -コングリシニン(7S)は以下のように調整した。乾燥大豆(エンレイ)をミルで粉碎し、得られた粉末を 40°C でヘキサンにより脱脂した。その後、膜タンパク質を變成凝集させることで除去するために 70°C で 30 分間加熱処理し、水に分散させ可溶性のタンパク質を抽出した。抽出液を pH5.8 に調節して 11S を沈殿させ回収した。この上清をさらに pH4.5 に調節し 7S を分離回収した。回収した 11S と 7S は高圧蒸気処理を行った。これを 0.4 M の NaCl

を含む 35 mM リン酸緩衝液(pH7.5)に溶解し、一部の試料を 30 分間煮沸処理した後、測定に用いた。

試料は膜厚 7.5 μm の Kapton フィルムを窓として持つテフロン製のセル、または、120 μm のガラス窓を持つ真鍮セルに充填して USAXS の測定を行った。このとき、試料厚さは 1 mm(テフロンセル)または 3 mm(真鍮セル)であった。

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た。検出器として PILATUS 2M を使い、入射 X 線のエネルギー 18 keV、カメラ長 41.61 m(カラーゲンにより校正)、露光時間は主に 600 s で測定を行った。

結果および考察：

7S および 11S の 10%溶液について、未加熱状態および煮沸処理後の USAXS プロファイルを図 1 に示す。高エネルギー加速器研究機構(KEK)Photon Factory の小角散乱ビームライン BL-10C で測定した中広角領域の SAXS プロファイルを破線で同時に示す。未加熱試料については、11S では 0.2 nm^{-1} 付近に、7S では 0.25 nm^{-1} 付近に、それぞれショルダーが現れ、それより小角領域では $I \propto q^{-4}$ にしたがう立ち上がりが見られる。このショルダーは 2530 nm の実サイズに対応している。加熱に伴いこのピークの周辺に変化が見られるが、これより小角領域および広角領域の変化はほとんど見られない。このことは、加熱によって、それぞれの大豆タンパク質の sub- μm 程度の凝集構造に大きな差異を生じないまま、サブユニット周辺の構造が変化することを示している。7S については、ショルダーがよりシャープになりつつ増大しており、サブユニット間の配列がより秩序だった構造へと変化していることが示唆される。一方、11S については、加熱後はよりブロードなピークへと変化しており、こちらはサブユニット間の構造に乱れを生じていることが示唆された。水中に分散した大豆タンパク質は、加熱によってゲル化し固体状に変化する。このとき、タンパク質は熱変性を受けるとともに、新たな分子間結合が生成することによって架橋され構造の固定化が生じることから、11S の変化はこの変化を反映したものと考えられる。一方、7S の変化はより秩序化した方向への変化であり、11S とは異なることが明らかとなった。今回使用したタンパク質試料の生成に際しては高圧蒸気処理を行っていることから、部分的なタンパク質の変性が生じている可能性がある。今後は、Native な状態のタンパク質を用いるとともに、還元処理によりサブユニット間のジスルフィド結合を切断した試料を用いて、煮沸処理によるゲル化過程の詳細な構造変化の調査が必要である。

参考文献：

[1] N. Sato et al., *J. Agric. Food Chem.*, **63**, 8715 (2015).

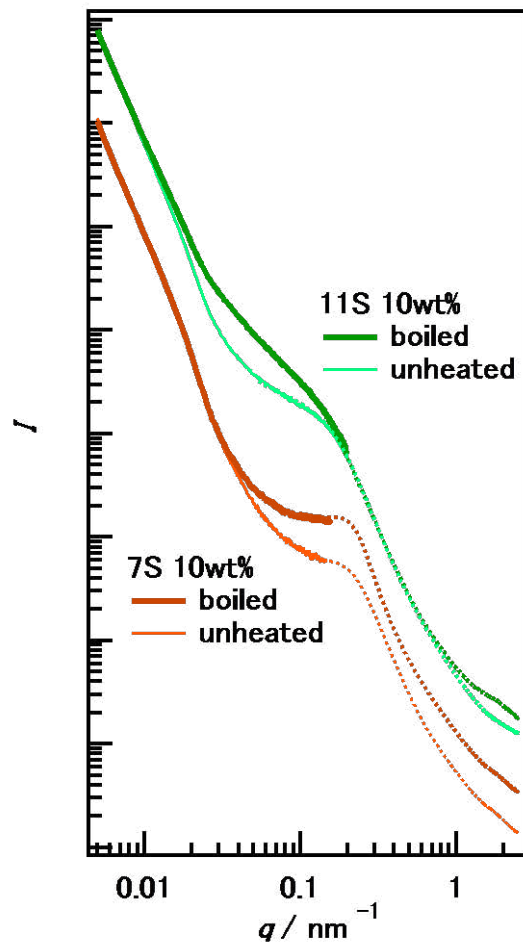


図 1. グリシニン(11S) および β -コングリシニン(7S)の USAXS プロファイル。KEK Photon Factory における中広角領域の結果を破線で同時に示す。各プロファイルは、縦方向にシフトして表示している。