

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：10106

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500949

研究課題名(和文)疎水性アミノ酸の分子構造と疎水性水和効果の解析

研究課題名(英文) Analysis of relationship between molecular structure and hydrophobic hydration for amino acids in water.

研究代表者

佐藤 之紀 (Sato, Yukinori)

北見工業大学・工学部・教授

研究者番号：50226015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：疎水性アミノ酸の分子構造と水和の関係を解析し、溶媒-溶質間分子間相互作用を示すパラメータと酵素活性制御の関係を明らかにしようと試みた。Glyダイマーの水和量は、Glyよりも急に水和量が増加した。さらに、Glyトリマーは、Glyがダイマーとなったときほど水和量は増加しなかった。すなわち、Glyオリゴマーの水和は、単純なGly分子の水和の合計ではないと考えられた。さらに、疎水性アミノ酸のD型とL型の立体構造の違いは水和量の違いにはほとんど反映されなかった。一方、リンゴの褐変変化には、パラメータで示される微細な溶媒-溶質分子間相互作用の違いは反映されない可能性が高かった。

研究成果の概要(英文)：Analysis of the relationship between the molecular structure and hydration of amino acids in water was carried out with the aim of clarifying the solvent-solute interaction, as represented by the parameter, and inhibition of enzyme activity. The hydration of Gly-Gly, which is a dimer of glycine, in water increased to a greater extent than expected. Further, hydration of the Gly-trimer increased to a greater degree than that of the Gly-dimer, but the rate of increase was variable. Thus, the hydration of these Gly-oligomers is not simply the sum of the hydration of their constituent Gly residues. Furthermore, the differences in hydration of several D- or L-type hydrophobic amino acids may be not due to differences in their stereostructure. The solvent-solute interaction, represented by the parameter, does not inhibit the enzyme responsible for browning of apples, due to its limited contribution.

研究分野：食品工学

キーワード：アミノ酸 水和 リンゴ 酵素的褐変

1. 研究開始当初の背景

食物の力学物性は、人間の成長にきわめて重要な意味をもっている。人間が食物を摂取できるようになるには、まずは液状食品から徐々にゲル状食品や固形状食品へと段階を追ってトレーニングしていかなければならない。人間が生まれてきて、呼吸の次に重要な動作であろう。食物の形態を問わず、食物の力学物性には食品中の水が大きく関わっていることが容易に想像できるので、まずは、液状食品中の代表的な疎水性アミノ酸の水和の解析を行った。

2. 研究の目的

グリシン、アラニン、バリンなどアミノ酸の疎水基が長くなると、部分モル体積と粘度から算出した水和数は増える（佐藤ら、2011年度日本食品工学会大会要旨集、5-2A-9、p.85）。疎水性が増すのに水和数が増える現象を見出し、スマートボールに似た現象が生じているという理論で説明した。さらに、この科研費研究では、グリシンをはじめとしたアミノ酸の水和機構について、疎水性アミノ酸の立体構造L型とD型の違い、アミノ酸のペプチド結合による水和状態の変化を考察する。さらに、今までモデル食品系に用いられてきた水和パラメータの食品科学的意義を模索し、実用的なパラメータであることを証明する。すなわち、ポリフェノールオキシダーゼ活性によるリンゴの褐変を水の構造を変化させることによって、その酵素活性の制御機構を水和パラメータとの対応から考察しようとするものである。

3. 研究の方法

この申請による研究課題では、20世紀の大きな発見であるアインシュタインの粘度に関する関係式とのずれを解析することにより糖の分子構造を解明し、水和機構を明らかにすることに焦点をあてている。この申請課題による研究は、(1) 正確にモル体積を測定し、(2) 粘度のB係数を求め、(3) 分子形状を決定するという手順で行った。

国内外の研究状況は、Einstein (1906) による溶媒の粘度 (k) と溶液の粘度 (k') の関係式 ($k'/k = 1 + 2.5$) からはじまる。ただし、 V_2 は溶質のモル体積である。この研

究で示すずれとは、 B の係数 2.5 の数値のずれを判定することにある。また、Guifu and Timasheff (1997) は、 B が溶液の密度と溶質の密度の差などによって求められることを示している。したがって、精度の高い密度計が必要となっている。

次に、粘度B係数に関する国内外での研究進行状況を述べる。粘度B係数は、溶媒と溶質の相互作用を反映し、溶質分子の大きさや形、および溶質と溶媒との相互作用による溶媒の構造変化により影響される (Miyajima et al, 1983) ことが論じられている。Miyajimaらは、グルコース、マルトース、マルトトリオースの見かけのモル体積を精密な密度測定から求めて、それらの糖が水と相互作用することによる水構造の変化による寄与を分離している。また、粘度B係数の温度依存性で正の水または負の水和が判断されている (Wang et al., 2000; Bai and Yan, 2003) ため、粘度B係数と温度との関係を調べることは実現可能である。

(1) パラメータの算出方法の改良

パラメータの算出方法は、Miyawakiら (1997)をはじめとして、申請者ら (2008) の文献に掲載済みである。概要を以下に示す。Kozakら (1968) により、水分活性 (A_w) は、溶質のモル分率 (X_s) と以下のような関係にあることが知られている。

$$A_w = (1 - X_s) \exp(-X_s^2) \quad (\text{式1})$$

A_w は、氷の融解温度から算出する方法をMiyawakiら (1997) が提唱し、申請者ら (2008) でもその方法を用いて理論を展開してきている。この式中の B が水和パラメータである。この値は、氷の融解温度からラウルの法則で予想された理想状態の A_w よりもどの程度低くなっているかの指標と考えられる。すなわち、実在状態が理想状態からどの程度ずれているかの指標である。

しかし、予備実験の結果、グリシン水溶液では、1.5 mol/kg を超える高濃度の場合、 -20 に一度凍結させるため、溶質-溶媒に変化が生じ、白濁して溶質が析出してしまふ。このような場合には、氷の融解温度が測定不能となる。その結果、適用できる濃度範囲が狭まり、その狭くなった濃度間でのパラメー

タの算出となるため、凍結して氷の融解温度を求めてから A_w を算出する方法に改良が必要と思われた。グリシン以外にも溶解度の低い疎水性アミノ酸に対しては、氷の融解点を求める方法以外に鋭敏な方法が望まれる。そのため、それをブレークするには、発想として、精密 A_w 計(たとえば、Vaikousiら(2008)によっても用いられているが、彼らのこの A_w 計の用途はパラメータの算出は行わずに A_w 測定に留まっている。)を用いて氷の凍結温度測定に代わる簡易方法としての適用性を検討するか、 A_w の算出の原点に戻り、食品の蒸気圧を直接測定する方法のどちらかである。この申請では、ガソリンの蒸気圧測定などに用いられている蒸気圧測定器を食品の蒸気圧測定に応用する。蒸留水の蒸気圧を分母にとり、食品(たとえば、グリシン水溶液)の蒸気圧測定値を分子にとって、 A_w を算出することを試みる。これにより、(式1)の左辺が求まり、 X_s と A_w の関係プロットを近似して、パラメータを求める。まずは、 A_w 既知のスクロース水溶液でこの方法の有効性を確かめた後に、グリシンや疎水性アミノ酸水溶液のパラメータ算出を試みる。

(2)アミノ酸どうしのペプチド結合による水和数変化への影響

Gly-Gly, Gly-Gly-Glyをそれぞれ水溶液にして、Herkovits and Kelly (1973)に従って、水溶液の密度と粘度から水和数(水和パラメータ h)を求めた。すでに、その方法については口頭発表(たとえば、日本食品工学会年次大会要旨集)で提示済みであり、方法論として確立している。この結果により、water-structure breakerとして知られているGlyがペプチド結合すると、それらの水和にどのような変化が生じるかを明らかにでき、今後の食品保存に関わる分子設計に大いに貢献することが期待される。

(3)アミノ酸の立体異性体による水和数の変化

L型アミノ酸とD型アミノ酸のそれぞれの水和数を前項目にしたがって求め、アルキル基鎖の延長とLとD型の水和数への影響を調べた。

(4)酵素活性の迅速測定法の検討および褐変阻害の指標としての水和パラメータの有効性

色差計を用いて、青森県産リンゴを剥皮し、円筒状にくりぬいて、パラメータ既知のア

ミノ酸の水溶液に2時間浸漬させて、溶液を吸引後、5で保持して、色L*a*b'を経時的に調べた。

4. 研究成果

(1)パラメータの算出方法の改良

食品の蒸気圧を調べる測定装置を自作したところ、測定値が不安定であり、精密 A_w 計を用いる方法でパラメータを求める方法を試みた。その結果、グルコース水溶液を従来の氷の融解温度から求めた A_w と精密 A_w との比較をしたところ、精密 A_w での値の方が氷の融解温度から求めた A_w よりも高かった。したがって、精密 A_w 計で求めた水分活性値を用いる場合には、精密 A_w 計の値を氷の融解温度で求めた A_w への補正式に代入して、補正する工程が必要と考えられた。

(2)アミノ酸どうしのペプチド結合による水和数変化への影響

25でのGly水溶液の粘度B係数(-)は0.1程度であり、Gly-GlyやGly-Gly-Glyに比べると小さかった。また、Gly-Gly-Glyの粘度B係数はGly-Glyのそれよりも大きな値を示し、Glyとそのオリゴマーの無限希釈状態での粘度上昇はペプチド結合の形成による水和量の上昇を意味する。また、種々の濃度の見かけのモル比容(v)を濃度0に外挿して無限希釈状態の V_2 を求めたところ、Gly-Gly-Gly>Gly-Gly>Glyとなり、オリゴマーの重合度と V_2 は対応していた。さらに、粘度B係数と V_2 から水和パラメータ h を求めて水和量を比較したところ、GlyがダイマーとなったGly-Glyの水和量の変化とGly-GlyにGlyがペプチド結合した

Gly-Gly-Glyの水和量変化は、双方ともGly1残基分が分子量を大きくする点で共通しているが、水和状態は単純にGlyの和で示すことができず、Glyがダイマーになると急激に水和量が増加するが、ダイマーにさらにGlyが結合してトリマーになっても、GlyがGly-Glyとなった場合ほど水和量は増加しなかった。すなわち、Glyを重合させたGlyオリゴマーは、単純なGly分子の延長ではなく、水和量の変化をとまなっていると考えられた。

(3)アミノ酸の立体異性体による水和数の変化

L型アミノ酸とD型アミノ酸のそれぞれの

水和数を前項目にしたがって求め、アルキル基鎖の延長とLとD型の水和数の違いを調べようとした。グリシン、アラニン、バリンといった疎水性アミノ酸では、アルキル基鎖が長くなると、水和パラメータも大きくなっていった。すなわち、疎水性残基が増えると、水和数が減少すると予想していたが、逆に水和数が増えた。ただし、疎水性残基が増えた分子種の溶媒である水への溶解度は減少した。また、LとD型の水和数への影響は、極めて小さいと考えられた。

これまで、アミノ酸のパラメータとアミノ酸のパラメータ h を追跡してきた。パラメータ

を求める工程の改良には感度の問題が生じ、アミノ酸の水和パラメータ h を求める際にはアミノ酸が両性電解質であるために水溶液構造に不安定さが生じてデータのばらつきが問題化された。さらに、リンゴの褐変制御とパラメータの関係は、分子の大きさが影響するため、分子種のカテゴリーを単糖間や2糖間といったように分けて検討する必要性が出てきた。そこで、本課題の世界的な研究動向をもう一度精査することとし、基礎データが比較的揃っている点や分子の形態で水和しているためデータの不安定さが少ないと推定される糖に焦点を絞って、パラメータと水和パラメータ h の関係をまずは明らかにすることが先決であるとの結論に至った。その結果、パラメータと水和パラメータ h は、高い相関係数で近似できることが判明した。糖の構造と水の構造の類似点から、まずはエカトリアルOH基数とパラメータ h の関係を調べた結果、高い相関係数で示された。さらに、パラメータ h の温度変化から、 dh/dT をパラメータの指標とすると、尿素は正の dh/dT を示し、糖類では負の dh/dT を示した。これらのことは、尿素がWater-structure breakerで、糖類がWater-structure makerであることを示していると考えられた。一方、温度とパラメータ h の活性化エネルギーをアレニウス型プロットにより求めたところ、2糖類のほうが単糖類と比べて安定性が高いことが判明した。

(4) 酵素活性の迅速測定法の検討および褐変阻害の指標としての水和パラメータの有効性

褐変を防止する最適アミノ酸濃度を検討した結果、同一リンゴのサンプリングする位置や

個体ごとのバラツキはあるものの、少なくとも0.4 mol/kgでは添加1時間以内に(30%),明らかに褐変を抑制した。添加するアミノ酸濃度を0.1 mol/kgにすると褐変抑制はやや明確ではなくなり、0.01 mol/kgでは蒸留水を添加した群とほとんど差がなくなった。色差計のパラメータとしては、 L^* や b^* にはほとんど変化が見られなかったが、 a^* の変化が顕著であり、リンゴを保存するうちに赤色に変化する目視での変化と一致していた。さらに、現時点では、パラメータと a^* の変化との間には一貫した関係は明らかにできなかったことから、水の構造化が酵素活性に影響を与えるものの、パラメータで示される溶質-溶質分子間相互作用が存在する状況の中での微細な溶質-溶媒間分子間相互作用の違いは褐変現象の差を可視化させるまでには至っていない可能性が考えられた。

引用文献

- Einstein, A. (1906). Eine neue Bestimmung der Molekul-dimensionen. *Annalen der Physik*, 19, 230-247.
- Bai, T.-C., and Yan, G.-B. (2003). Viscosity B-coefficients and activation parameters for viscous flow of a solution of heptanedioic acid in aqueous sucrose solution. *Carbohydr. Res.*, 338, 2921-2927.
- Guifu, X. and Timasheff, S. N. (1997). The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose. *Biophys. Chem.*, 64, 25-43.
- Herskovits, T. T., and Kelly, T. M. (1973). Viscosity studies of aqueous solutions of alcohols, ureas, and amides. *J. Phys. Chem.*, 77, 381-388.
- Kozak, J. J., Knight, W. S., and Kauzmann, W. (1968). Solute-solute interactions in aqueous solutions. *J. Phys. Chem.*, 48, 675-690.
- Miyajima, K., Sawada, M., and Nakagaki, M. (1983). Viscosity B-coefficients, apparent molar volumes, and activity coefficients for α - and β -cyclodextrins

in aqueous solutions. Bull. Chem. Soc. Jpn., 56, 3556-3560.

Miyawaki, O., Saito, A., Matsuo, T., and Nakamura, K. (1997). Activity and activity coefficient of water in aqueous solutions and their relationships with solution structure parameters. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 466-469.

Sato, Y., and Miyawaki, O. (2008). Analysis of intermolecular interaction among pectin molecules in aqueous sugar solutions. *Food Sci. Technol. Res.*, 14, 232-238.

Vaikousi, H., Koutsoumanis, K., and Biliadeis, C. G. (2008). Kinetic modeling of non-enzymatic browning of apple juice concentrates differing in water activity under isothermal and dynamic heating conditions. *Food Chemistry*, 107, 785-796.

Wang, J., Yan, Z., Zhang, H., and Lu, J. (2000). Effect of temperature on viscosity properties of some α -amino acids in aqueous urea solutions. *Biophys. Chem.*, 86, 71-78.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1) Yukinori SATO and Osato MIYAWAKI
Analysis of hydration parameter for sugars determined from viscosity and its relationship with solution parameters. *Food Chemistry*, 査読あり, Vol. 190, p.594-598(2016).
- 2) 佐藤之紀. 粘度測定による糖やアミノ酸の水和および高分子間相互作用の解析. *日食科工誌*, 査読あり, 61, 316-322(2014).

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) 佐藤之紀, 關藤祐加, 花垣恵, 岩切恵梨奈, 平澤毬子, 宮脇長人. 粘度 B 係数と部分モル比容から求めた水和パラメータ h と分子間相互作用. 日本農芸化学会大会 2014 年度 (平成 26 年度) 大会, 2014 年 3 月 27 - 30 日, 明治大学生田キャンパス (神奈川県川崎市).
- 2) 相本香織, 宮脇長人, 佐藤之紀. 氷の融解温度を用いて算出した糖の水溶液構造パラメータとエクアトリアル OH 基数の関係. 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部

日本ビタミン学会近畿・中国四国・九州沖縄地区 2013 年度合同広島大会, 2013 年 9 月 5 - 6 日 県立広島大学(広島県広島市).

- 3) 佐藤之紀. 粘度測定を駆使した糖やアミノ酸の水和の解析と疎水性残基の分子間相互作用への寄与. 日本食品科学工学会第 60 回記念大会, 2013 年 8 月 29-31 日, 実践女子大学(東京都日野市).
- 4) 佐藤之紀, 岩切恵梨奈, 花垣恵, 宮脇長人. 水溶液中のグリシンオリゴマーの粘度 B 係数と部分モル比容の温度変化と水和数の解析. 日本農芸化学会 2013 年度 (平成 25 年度) 大会, 2013 年 3 月 24-27 日, 東北大学(宮城県仙台市).
- 5) 佐藤之紀, 岩切恵梨奈, 福山紗由実, 宮脇長人. 粘度 B 係数と部分モル比容から求めた水溶液中のアミノ酸とそのオリゴマーの水和数. 日本食品工学会第 13 回(2012 年度) 年次大会, 2012 年 8 月 9-10 日, 北海道大学(北海道札幌市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 之紀 (SATO YUKINORI)
北見工業大学・工学部・教授
研究者番号: 50226015

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

宮脇 長人(MIYAWAKI OSATO)
石川県立大学・生物資源環境学部・教授
研究者番号: 80012053

以上