

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660111

研究課題名(和文)植物性食品タンパク質のナノ構造形成に関する研究

研究課題名(英文)Formation of nanostructure of food plant proteins

研究代表者

裏出 令子 (URADE, REIKO)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90167289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：コムギグリアジンの水中での凝集体構造をSAXS, USAXS, SANSで解析し、濃度に依存してナノスケールからメソスケールに至る階層構造が形成されることを明らかにした。NaCl存在下では、グリアジンのナノスケール凝集体ドメイン間の距離が短縮し、その結果、動的粘弾性が増加することを示した。グルテニンのナノ構造及び動的粘弾性に対するNaClの影響はグリアジンに比較して小さく、NaClによるグルテンの物性への影響は、主にグリアジンの凝集体構造の変化を介してもたらされていることを明らかにした。
SAXS: X線小角散乱解析, USAXS: X線超小角散乱解析, SANS: 中性子線小角散乱解析

研究成果の概要(英文)：In this study, nanoscale structures of hydrated gliadins were investigated primarily by SAXS, USAXS and SANS over a wide range of concentrations. Gliadins are soluble in distilled water below 10 wt %. Guinier analyses of SAXS profiles indicate that gliadins are present as monomers together with small amounts of dimers and oligomers in a very dilute solution. Above 15 wt %, gliadins form gel-like hydrated solids. At greater concentrations, a steep upturn appears in the low-q region owing to the formation of large aggregates, and a broad shoulder appears in the middle-q region showing density fluctuation inside. NaCl shortens the distance between nanometer-scale aggregates and causes the formation of larger aggregates. These changes in nanostructure are well correlated with changes in dynamic viscoelasticity of hydrated gliadins.

研究分野：食品科学

キーワード：SAXS SANS gliadin glutenin beta-conglycinin glycinin rheological properties nanostructure

1. 研究開始当初の背景

一般にタンパク質のような高分子化合物が特徴的な物性や機能をもつのは、分子間相互作用によりナノスケールの構造体(ナノ構造)を形成し、その構造に依存した動的性質を発揮することによる。したがって、植物性食品タンパク質のナノ構造の分子間相互作用さらには形成メカニズムを解明することにより、食品物性の発現機構を明らかにすることができる。しかし、食品タンパク質のナノ構造の研究はほとんど行われていない。一方、高分子材料科学の分野では、物性をもつ柔らかい材料のナノ構造の解明に量子ビーム(X線、中性子線)を用いる溶液散乱法の有効性が認められ研究に用いられている。そこで、申請者は溶液散乱法を食品科学分野で用いられている手法と組み合わせて研究することにより、食品タンパク質の食品物性の発現機構をナノ構造との関係で解明することが可能であるとの着想を得た。コムギタンパク質グリアジンとグルテニンはタンパク質の中で最も古い研究の歴史を持ち、特徴的な食品物性をもつ代表的な植物性食品タンパク質である。しかし、通常のタンパク質研究で用いられる緩衝液などに不溶性であるため研究が遅れてきた。研究代表者は食塩がコムギ粉生地中でのタンパク質間相互作用を変化させることを発見し、この現象を利用して食塩と純水だけを用いてコムギ粉生地からグリアジンを特異的に抽出する方法を開発した(Ukai, T. et al. (2008) J. Agric. Food Chem. 56, 1122)。この方法で取り出したグリアジンはコムギ粉生地中での状態を維持したまま抽出され、且つ水溶性であるためグリアジンのナノ構造の研究に最適である。また、申請者は豆腐のような弾力性のあるゲルを形成するダイズタンパク質の主成分であるグリシニンと β -コングリシニンがダイズ種子中で会合し、超高次構造体として存在していることを見いだした(Wadahama, H. et al. (2012) Plant Physiol. 158, 1395)。従来の研究に汎用されてきた方法では超高次構造体が破壊されるため、そのような方法で取り出したダイズタンパク質を用いた解析では真の性質を見逃す可能性がある。本研究では、申請者が考案した方法で超高次構造体を維持した状態でダイズタンパク質を取り出し、食品物性とその発現機構の解明を目指す。

2. 研究の目的

穀類や豆類に含まれる植物性タンパク質は、単に栄養源としてだけでなく多彩な食品物性・機能を具備している。食品加工においては、同一または異種タンパク質が特徴的な食品物性をもつ集合体を形成する。その物性の源は運動に伴う分子間相互作用であり、ナノ構造が分子間相互作用の場となっている。本研究では、代表的な植物性食品タンパク質を研究対象として、ナノ構造とナノ構造形成のメカニズムを解明し食品物性の発現との

関係を明らかにする。具体的な研究目的を以下に示す。

(A) コムギタンパク質凝集体のナノ構造と食品物性との関係の解明。

(B) 超高次構造体を含むダイズタンパク質凝集体のナノ構造と食品物性との関係の解明。

3. 研究の方法

1) グリアジンおよびグルテニンの調製

グリアジンは、純水抽出法で調製した。すなわち、0.5M NaCl 溶液を用いて市販小麦粉(日清製粉社製スーパーキング)100 g から作製した生地を500 mlの純水中で15分間揉み洗いする操作を繰り返すことでグリアジンを溶出させた。グリアジンのみが溶出してくる3~5回目の洗液を集め終濃度が0.5 MになるようにNaClを添加してグリアジンを沈殿させ、沈殿を純水に懸濁して純水に透析した後、凍結乾燥した。グリアジン抽出後のグルテンをさらに純水中で5回洗浄し、残ったタンパク質をグルテニン画分とした。グルテニンモノマーは既報に従って調製した。

2) 抗グリアジン及び抗グリアジン血清の作製

小麦(春よ恋)の開花後10日前後の胚乳から抽出したmRNAを鋳型として、RT-PCRによりグリアジンのcDNAをクローニングした。グリアジンのcDNAはATCCより購入した。クローニングしたグリアジン遺伝子のうち最もクローン数が多かった遺伝子(Q15E)とグリアジン遺伝子のcDNAからN末端シグナルペプチドとそれに続く繰り返し配列をコードする塩基配列を除いたORF領域を、pClodあるいはpET46-LICにサブクローニングした。リコンビナントQ15Eとリコンビナントグリアジンは大腸菌Rosetta-gamiを用い、15で発現させた。発現処理後の大腸菌は超音波処理により破碎し、遠心処理により不溶性画分を分離し、30 mM dithiothreitolと33 mM Tris / HCl 緩衝液(pH 8.5)を含む70%エタノールによりリコンビナントグリアジンを抽出した。抽出したリコンビナントグリアジンは凍結乾燥した。これらのリコンビナントグリアジンをモルモット(雄性)に免疫し、抗グリアジン血清及び抗グリアジン血清を作製した。

3) グリアジン、グリアジン、グリアジンの分画

前述の小麦粉から抽出し凍結乾燥したグリアジンを2 M 尿素 / 0.04 M Methylendiamine / 0.08 M HCl (pH 3.1) 溶液に溶解し、SP Sephadex™ C-50 を充填したカラムに供し同溶液で溶出させ分画した。各フラクションに含まれるグリアジンを0'Farrellの2次元電気泳動あるいはSDS-PAGEで分離し、抗グリアジン血清及び抗グリアジン血清を用いたウエスタンブロット分析で解析した。グリアジン、グリアジン、グリアジンだけが含まれているフラクションを併せ、さらにSPS-C50を用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより精製した。溶出には2 M 尿

素 / 0.05 M NaCl (pH 3.1)を用いた。

4) グリアジン会合体の解析

タンパク質架橋剤 3,3' - dithiobis (sulfosuccinimidyl propionate) (DTSSP)を用いて水溶液中で会合しているグリアジンを10分間室温で架橋した後、N-ethyl-meleimide で処理することによりチオール基をブロックした。架橋されたグリアジンは、1次元目が還元条件の、2次元目が還元条件の2次元 SDS-PAGE で分離し解析した。

5) グリシニンと β -コングリシニンの調製

ダイズ種子(エンレイ)の子葉をミルを用いて粉碎し40℃でヘキサン処理により脱脂後乾燥させた。純水あるいは還元剤含有純水でタンパク質を抽出し、pH 5.8でグリシニンを等電点沈殿させた。 β -コングリシニンはpH 4.5で等電点沈殿させた。沈殿させた各タンパク質は純水に透析し凍結乾燥した。

6) 沈降速度分析

沈降速度測定はAn50Ti rotorを用いて、Optima XL-I unit 装置(Beckman Coulter, Inc.)で20℃で解析した。c(s)はSEDFITプログラムを用いて算出した。グリアジンの偏比容は0.73とし、Svedberg式を用いて分子量を計算した。

7) X線小角散乱解析とX線超小角散乱解析

X線小角散乱解析(SAXS)あるいはX線超小角散乱解析(USAXS)は、高エネルギー加速器研究機構のPhoton FactoryリングBL-10CあるいはSPring-8産業利用ビームライン1BL19B2にて行った。凝集体ドメイン相関距離は、散乱プロファイルの屈曲点の散乱ベクトルq値からBraggの式により算出した。

8) 中性子小角散乱解析

オーストラリア核科学研究機構のBragg Instituteに設置されたQUAKKAでグリアジンの中性子小角散乱解析(SANS)を行った。グリアジンは重水に10wt%の濃度で懸濁し凍結乾燥することを3回繰り返して軽水を除き、重水で40wt%になるように水和させ、SANS解析に供した。

9) 動的粘弾性測定

グルテニンあるいはグリアジンとグルテニンの等量混合物(グルテン)を純水あるいはNaCl溶液で38wt%で水和させた。これらの試料について、レオゾル-G3000(UBM製)を用いて動的粘弾性を解析した。

10) 保水容量の分析

NaCl溶液で水和した20wt%グルテニンあるいはグルテンの水和物から遠心処理により、水和グルテニンあるいはグルテンに吸水されていない溶液を分離し、重量を測定した。分離した溶液を乾燥し、乾燥後の固形物重量を元の溶液重量から差し引いた値を吸水されなかった水重量とし、水和物作製に用いた水の重量から差し引いた値を保水容量とした。

4. 研究成果

1) グリアジンの凝集体構造形成

水中でのグリアジン分子の存在様式

グリアジンの純水中での大きさ形態を、0.025 wt%グリアジンのSAXSデータをGuinier近似で解析した。その結果、純水中でのグリアジン孤立分子は、慣性半径 R_g が4.17 nm、断面慣性半径 R_c が2.65 nm、桿長が10.8 nmの桿状分子として存在していることを明らかとなった。超遠心分析でも、大部分のグリアジンがこの濃度では平均分子量が25.7 kDaのモノマーとして存在し、摩擦係数比が1.52であったことから球状ではなく桿状に近い形であることが示唆された。

グリアジン会合体形成における分子種特異性

グリアジン水溶液の濃度が高くなるにつれて得られる、一部の分子が濃度に依存して会合体を形成することがSAXSプロファイルのGuinier近似解析から明らかとなった。グリアジン水溶液の架橋実験により、純水中では30-33 kDaのグリアジン分子種同士、36 kDaの分子種同士、及び40 kDaの分子種同士が会合し2量体や4量体が形成されていることが明らかとなり、会合する分子種に特異性があることが示唆された。グリアジンの会合体形成における分子種特異性の有無を、

に分けて検討し、グリアジンは60 kDaの分子サイズのものが特に凝集性が高く1 wt%で純水に懸濁するとほとんどが凝集して不溶化することを見いだした。また、40 kDaや44 kDaのグリアジンも一部が不溶性の凝集物となることを見いだした。さらに、純水に溶けていたグリアジンは、500 kDa以上の会合体として存在すること明らかにした。約35 kDaと40 kDaのサイズの分子種から構成されていたグリアジンは1 wt%では一部の

グリアジンはモノマーあるいはダイマーであるが、大部分が純水に可溶性の大きな会合体として存在していることを明らかにした。グリアジンダイマーは同じサイズ同士が会合しており、会合に特異性があることが示唆された。グリアジンは1 wt%ではほとんどすべてが純水に可溶性であった。可溶性のグリアジンは大部分が大きな複合体として存在していたが、一部はモノマー及びダイマーとしても存在していた。ダイマーは大きさの異なる分子種がランダムに会合したものであり、分子種間の会合特異性は認められなかった。

グリアジン凝集体の階層構造

水分含量とグリアジン凝集体構造との関係を明らかにするために、20、40、70 wt%グリアジン凝集体の小角領域の散乱プロファイルを高エネルギー加速器研究機構 Photon Factoryで、超小角領域の散乱プロファイルをSPring-8のUSAXS装置で解析した。20 wt%においては、凝集したグリアジンが形成するドメイン間の干渉ピークが $q = 0.13 \text{ nm}^{-1}$ 付近に観測され、さらに $q < 0.04 \text{ nm}^{-1}$ の領域で立ち上がりが見られた。立ち上がりの傾きは-4より小さく、フラクタル的な構造を有する大きな凝集体が存在していることが示さ

れ、グリアジンが階層構造を形成していることが示された。40 wt%の散乱曲線ではピークは $q = 0.4 \text{ nm}^{-1}$ 付近にまでシフトし、 q が 0.1 nm^{-1} 以下の領域において、立ち上がりが大きく成長して行くことが観測された。このことから、20 wt%で干渉しうる距離に分散していたグリアジンドメイン間の干渉距離が40 wt%では短縮し、これらが集合して数百 nm以上の大きな凝集体を形成していくことが明らかとなった。超小角領域の立ち上がりの直線部分の傾きはほぼ-4であり、フラクタル的な構造からより明瞭に境界の分かれた凝集構造へと移行していることが明らかとなった。Bragg Instituteで行ったSANS解析でも40 wt%グリアジン水和物では $q = 0.4 \text{ nm}^{-1}$ 付近の干渉ピークと q が 0.1 nm^{-1} 以下の領域での立ち上がりが見られ、SAXSとUSAXSの計測結果の正当性が再確認された。70 wt%グリアジン水和物の散乱曲線においては、もはやピークは観測されず、 $q = 0.2 \text{ nm}^{-1}$ から 0.005 nm^{-1} の領域にかけて傾き-4の直線的な立ち上がりが見られた。すなわち、70 wt%では保水量の減少にともなって凝集体内部の密度ゆらぎをもたらず空間が減少し、系全体が緻密な数百 nm以上(メソスケール)のサイズの大きな凝集体となっていることが示された。

グリアジンの凝集体構造へのNaClの影響

グリアジン水和物の動的粘弾性がNaClの濃度に依存して G' 、 G'' とも増加すること、また保水容量が減少することを明らかにした。グリアジン40 wt%の水和凝集体に0.5 M NaClあるいは3M NaClが共存した場合のSAXSおよびUSAXSの散乱プロファイル解析し、食塩を添加することによりグリアジン濃度が上昇したときに見られるような緻密な構造が形成されることを明らかにした。また、超小角領域においては0.5 M NaClの添加によりわずかな膨らみが出現し、SANS解析においても0.5 M NaCl存在下で同様のプロファイルが得られたことから、ナノスケールの凝集体ドメインに加えてメソスケールの凝集体ドメインが形成されることが示唆された。以上のように、グリアジン濃度やNaCl濃度といったパラメーターがナノスケールからメソスケールの凝集体構造を大きく変化させることが明らかとなった。これらの成果はNaCl添加による凝集体構造の変化と物性との相関を初めて示すものであり、望ましい物性の小麦粉生地を得るのに必要なパラメーター制御の基礎的な知見となるものである。

2) グルテニンの物性と凝集体構造

グルテニン及びグルテンの動的粘弾性とグルテニンの凝集体構造に対するNaClの影響

グルテニン水和物の動的粘弾性は、NaCl濃度が0.5 Mまでは G' と G'' が僅かに減少し、2Mまでは、ほとんど変化せず、3Mで G' と G'' がともにわずかに増加した。また、グルテニン水和物のSAXS散乱プロファイルは、2M NaClまではほとんど変化が見られず、3Mで

小角側の立ち上がりが見られより大きな構造の形成が示唆された。一方、グルテンではNaCl濃度が0.5 Mまでは G' と G'' が緩やかに上昇し、1M、2M、3Mで急激に上昇した。このグルテンのNaClによる G' 及び G'' の影響は、グリアジン水和物で見られた変化と極めて類似していた。以上の結果から、グルテンの動的粘弾性に対するNaClの影響は主にグリアジンを介して発揮されることが明らかとなった。

グルテニン及びグルテンの保水容量に対するNaClの影響

グルテニンの保水容量は低濃度のNaClを添加すると上昇し0.5 M NaCl添加で最大となり、それ以上の濃度では逆に濃度に依存して減少した。グルテンのNaCl添加による変化はグルテニンと類似しており、0.5 M NaCl添加で最大となり、その後濃度に依存して減少した。一方、グリアジンの保水容量はグルテンやグルテニンの保水容量とは異なり、1 M NaClまでは濃度に依存して急激に低下し、これ以上の濃度では保水容量は横ばいとなった。したがって、グルテンの保水容量に対するNaClの影響はグルテニンの変化を反映していると考えられる。還元剤処理により分子間ジスルフィド結合を切断しモノマーとしたグルテニン保水容量に対するNaClの影響はグルテニンポリマーと同様であり、グルテンの保水容量へのNaClの効果はポリマー構造には依存していないことが明らかとなった。さらに、0.5 M NaCl存在下では無添加と比較してグルテニンの2次構造が変化することをFT-IR分析により確認した。以上の結果から、NaClは特にグリアジンの凝集体構造を大きく変化させ、その変化がグルテン全体の物性に大きく反映されることが示唆された。古くから知られているNaClによる小麦粉生地の引き締め効果は、グリアジンに対する効果が主要なものであり、NaClによる伸展性の増大はグリアジン分子間の相互作用が強められることが示唆された。

3) コングリシニンとグリシニンのナノスケール構造

コングリシニンの加熱ゲル形成に伴う構造変化

加熱前の精製 コングリシニンのSAXSは $q = 1.0 \text{ nm}^{-1}$ と $q = 0.4 \text{ nm}^{-1}$ にピークを有する特徴的なプロファイルを与えたが、100の加熱によるゲル化によって、 $q = 1.0 \text{ nm}^{-1}$ のピークは消失し、 $q = 0.4 \text{ nm}^{-1}$ のピークはより小角側にシフトし、アンフォールディングしたポリペプチド鎖がより大きな凝集体構造を形成することが示された。非還元条件で調製した超分子構造を持つ コングリシニンのSAXSプロファイルは還元条件で調製した超分子構造を持たないものとは異なり、小角領域に立ち上がりがあり100nm以上の構造が存在していることが示された。

グリシニンの加熱ゲル形成に伴う構造変化

加熱前の精製グリシニンの SAXS は天然構造の存在によると考えられる $q = 1.2\text{nm}^{-1}$ と $q = 0.6\text{nm}^{-1}$ にピークを有するプロファイルを与えたが、100 の加熱によるゲル化によって、 $q = 1.2\text{nm}^{-1}$ のピークは消失し、 $q = 0.4\text{nm}^{-1}$ のピークは $q = 0.15\text{nm}^{-1}$ にシフトし、アンフォールディングしたポリペプチド鎖がより大きな凝集体構造を形成することが示された。NaCl の存在によって加熱前、加熱後ともにプロファイルに差異があり NaCl の存否によって形成されるゲルの基本構造は異なることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Sato, N., Matsumiya, A., Higashino, Y., Funaki, S., Kitao, Y., Oba, Y., Inoue, R., Arisaka, F., Sugiyama, M., Urade, R.: Molecular assembly of wheat gliadins into nanostructures: A small-angle X-ray scattering study of gliadins in distilled water over a wide concentration range. J. Agric. Food Chem., 査読あり, 63 (39), 2015, 8715-8721
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.5b02902>
DOI:10.1021/acs.jafc.5b02902

[学会発表](計 3 件)

2015 年日本農芸化学会年次大会 (2015/03/28)
グルテニンの物性とナノ構造にたいする塩化ナトリウムの影響
東野 ゆうき、船木 智史、佐藤 信浩、杉山 正明、大場 洋次郎、井上 倫太郎、北尾 悠樹、裏出 令子
2016 年日本農芸化学会年次大会 (2016/03/29)
分画グリアジンをを用いたグリアジン分子種間相互作用の解析
北尾 悠樹、東野 ゆうき、岩村 紗季、裏出 令子
2016 年日本農芸化学会年次大会 (2016/03/30)
超小角 X 線散乱法による小麦タンパク質グリアジン水和凝集体の構造解析
佐藤 信浩、東野 ゆうき、北尾 悠樹、岩村 紗季、岡田 ひかり、奥田 綾、松崎 元紀、大場 洋次郎、井上 倫太郎、杉山 正明、裏出 令子

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

裏出 令子 (URADE, Reiko)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 90167289

(2) 研究分担者

杉山 正明 (SUGIYAMA, Masaaki)
京都大学・原子炉実験所・教授
研究者番号: 10253395

(3) 研究分担者

佐藤 信浩 (SATO, Nobuhiro)
京都大学・原子炉実験所・助教
研究者番号: 10303918

(4) 連携研究者

大場 洋次郎 (OBA, Yojiro)
京都大学・原子炉実験所・助教
研究者番号: 60566793