

研究ノート

食品関連タンパク質の熱処理可溶性分子の溶液X線散乱測定による特性解析

渡邊 康*

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門
〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12

Characterization of the heat-treated water-soluble molecules of a food-related protein by using solution X-ray scattering measurement

Yasushi Watanabe*

Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization (NARO),
2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

Abstract

The heat-treated water-soluble molecules of a food-related protein, bovine serum albumin, were characterized by using size-exclusion chromatography combined with small-angle X-ray scattering measurement. Fractal analysis of the scattering data revealed that the heat-treated water-soluble species have a rod-like structural character (fractal dimension is 1). The scattering data also showed that the radius of gyration and the molecular weight of the heat-treated water-soluble aggregates are 14~15 nm and 0.98~2.3 million, respectively. Characterization of food-related biopolymers using the scattering method will be useful for the development of food processing technologies.

Keywords: protein solution property, heat-treatment, solution X-ray scattering measurement

タンパク質は重要な食品構成成分であるため、食品科学および食品産業におけるタンパク質の特性解析およびその手法の開発は基盤的な重要な課題の一つである。特に、タンパク質の熱処理後の特性解析の知見は、熱に係わる食品加工技術の開発において役立つことが

期待される。一方、溶液X線散乱測定法は低分解能ではあるが溶液中のタンパク質の構造情報を得られる手法である^{1) 2)}。放射光技術の発展より比較的低濃度の試料に対して散乱測定が可能となり³⁾、我々は、タンパク質のクロマトグラフィーの検出手段として溶液X

* 連絡先 (Corresponding author), yasuw@affrc.go.jp

線散乱測定を利用した研究を進展させてきた^{4)~8)}。

本研究では、食品の重要成分であるタンパク質のモデルとしてウシ血清アルブミンを対象とした。ウシ血清アルブミンは583個のアミノ酸残基より成り、分子量が66,411の1本鎖のタンパク質であり⁹⁾、牛乳にも総タンパク質の1%程度含まれる。その機能は血液中の脂肪酸の輸送や種々の薬剤分子との結合に関連した生理作用に関係している¹⁰⁾。また、熱処理による本タンパク質の沈殿現象^{11) 12)}、変性の可逆性¹³⁾、あるいはゲルの構造解析^{14) 15)}の報告はあるが、熱処理後の可溶性成分の構造については報告を見出せない。本研究では、そのタンパク質溶液の熱処理後の水可溶性分子の溶液X線散乱クロマトグラフィーによる特性解析について報告する。本研究は溶液散乱法によるタンパク質の構造解析を通して食品関連生体高分子素材を含んだ食品の加工技術の開発に資する研究手法の提示も目的とした。

実験方法

ウシ血清アルブミンは千葉畜産工業(株)から購入した。試料溶液は50 mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.8、を溶媒とし、濃度は280 nmにおける吸光係数 $0.678 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{mL} \cdot \text{cm}^{-1}$ を利用して決定した¹⁶⁾。試料溶液中のタンパク質濃度は8.3 mg/mLとし、熱処理する場合はその溶液をキャップ付きガラス試験管に入れ、80℃の湯中に10分間投入し、室温に冷ましてから直ちに解析に供した。

分子構造、分子サイズおよび分子量は溶液X線散乱クロマトグラフィー法により評価した^{4)~8)}。本システムは、200 μL のサンプルループを備えた高性能ゲルクロマトグラフィーシステムであり、HPLCカラムと示差屈折計(日本分光(株), RI-2031)の後流にオンラインで接続した溶液X線散乱測定装置で構成されている。上記測定システムは室温を24℃に制御された放射光実験ハッチ内に設置した。HPLCカラムは、SB-G ガードカラム(50 mm×内径6 mm, 昭和電工(株))とSB-806M HQ HPLC主カラム(300 mm×内径8 mm, 昭和電工(株))を接続して使用した。溶出液は50 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.8)を使用し、流速は0.3 mL/minとした。

放射光溶液X線散乱測定は、高エネルギー加速器研究機構放射光施設ビームライン10Cに設置された小角溶液X線散乱測定装置(酵素回折計)を使用した^{4)~8)}。検出器は一次元位置敏感比例係数装置(リガク(株))

を用い、X線の波長は0.1488 nm、試料検出器間距離は1980 mmに設定した。試料セルはステンレス製で、厚み1 mm、縦3 mm、横15 mmの穴の両面に石英板(厚み20 μm 、縦6 mm、横20 mm)を窓材として貼ったものを使用した。試料溶液(200 μL)の添加開始から、測定時間3分(測定間隔10秒を含む)毎の時分割測定により溶出液のX線散乱データを取得した。試料セルホルダーを恒温水循環装置に接続することにより測定試料セルの温度を24℃に保持した。得られた散乱データは、試料直前のイオンチェンバーの出力により入射X線強度の補正をした。溶質の散乱データは溶液の散乱強度から溶媒の散乱強度を差し引いた値とした。鶏の腱から取り出したコラーゲン繊維束を標準物質として、検出器のチャンネルを散乱ベクトル $q (= (4\pi/\lambda) \sin \theta)$ 、 λ はX線波長、 2θ は散乱角)に変換した。

実験結果と考察

本研究においては食品タンパク質のモデルタンパク質としてウシ血清アルブミンを対象とし、その熱処理(80℃、10分)後に生成される水に可溶性の成分の分子構造についての特性を溶液X線散乱クロマトグラフィーにより解析した。図1に熱処理前後のウシ血清アルブミンの室温(24℃)で得られたクロマトグラムを示した。室温で溶解したウシ血清アルブミンについての点線で示したクロマトグラムにおいては、35分付近に頂点をもつシングルピークが認められた。一方、

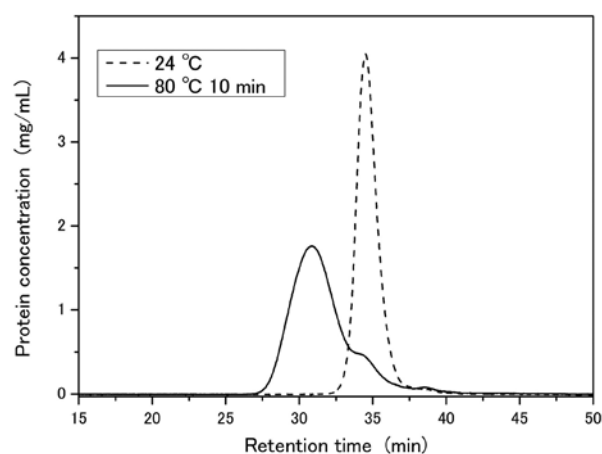


図1 ウシ血清アルブミンの熱処理前後のクロマトグラム

熱処理前後での室温(24℃)の分離測定結果である。実線は熱処理後、点線は熱処理をしていない試料の結果である。

同溶出条件で、熱処理後の試料を添加した実線で示したクロマトグラムにおいては31分付近に頂点をもつピークが検出され、熱処理前のピークより広がった形であった。さらにこのピークの後流に未変性状態単量体分子の溶出位置にショルダーが認められた。図2に熱処理後試料についての時分割溶液X線散乱パターン（各溶出液の散乱ベクトルの大きさ q に対する散乱強度 $I(q)$ のプロット）を示した。明らかに図1に示されたタンパク質の溶出時間において散乱強度の顕著な増大が認められた。

図3には q と $I(q)$ の両対数プロットを示した。 q の一部の領域において、次の(1)式のように $I(q)$ が q の

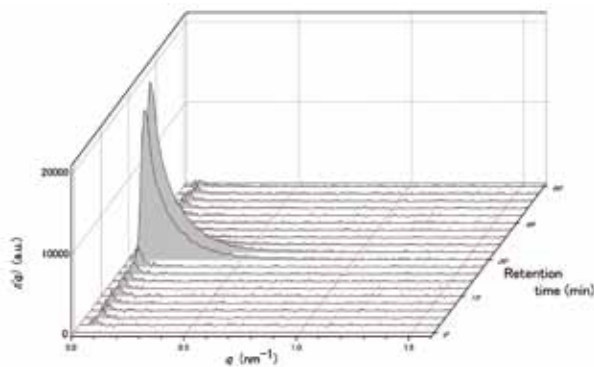


図2 ウシ血清アルブミンの熱処理後の時分割X線散乱パターン

測定条件は図1と同じである。

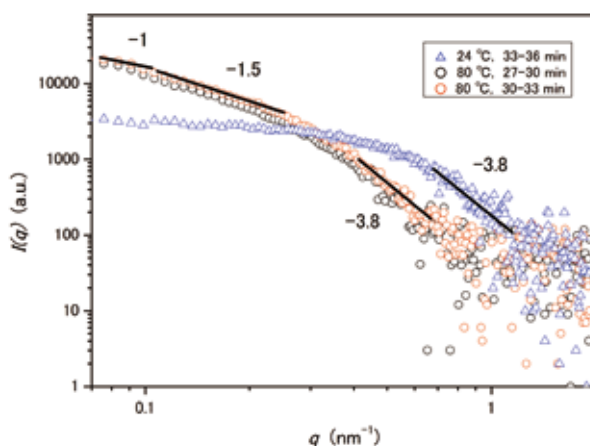


図3 ウシ血清アルブミンの溶出ピーク位置における散乱パターンの両対数プロット

各記号について処理温度とデータを収集した溶出時間帯を図中に示した。参考のため、対応する q の範囲に熱処理後の試料について傾き-1, -1.5, -3.8, 熱処理前の試料について-3.8の直線を記した。

べき乗に比例する領域が散乱測定から得られる¹⁷⁾。

$$I(q) \sim q^{-D} \quad (1)$$

ここで D はフラクタル次元である。すなわち、図3の両対数プロットで得られる直線部分の傾きから、溶質構造体のフラクタル次元が得られる。溶液X線散乱測定では、ある体積中にどれくらいの物質が詰まっているかを表す質量フラクタル次元を評価することにより高分子やコロイド凝集体の構造を議論する場合と、表面の粗さを表す表面フラクタル次元を評価し分子の表面構造を議論する場合がある。熱処理前の試料は未変性状態のウシ血清アルブミン単量体であり、 q が 0.7 nm^{-1} から 1 nm^{-1} 付近の傾きは-3.8である。この領域はデータのばらつきが大きいため厳密な議論はできないもののフラクタル次元が3以上4以下であれば表面構造の状態を示す表面フラクタル次元 D_s は $6-D$ と表現できる¹⁸⁾。つまり、表面フラクタル次元は2.2と計算でき、未変性状態のタンパク質分子の表面フラクタル次元は2.1から2.4である報告¹⁷⁾があり、本研究の評価値はこの値と矛盾しなかった。

一方、図3に示した熱処理後の試料については溶出時間が27～30分および30～33分の双方において q が 0.07 nm^{-1} から 0.1 nm^{-1} の領域では傾きが-1となり、質量フラクタル次元が1の棒状形態の散乱挙動が出現するため、熱処理により棒状分子の構造形態の出現が示唆された。さらに q が大きい領域では傾きが-1.5であり、質量フラクタル次元は1.5と評価された。ヒトトランスフェリンの凍結乾燥時の会合体の研究で質量フラクタル次元が1.13から1.38と報告されているものの、この値の構造形態の解釈は明確にされていない¹⁶⁾。さらに、 q が 0.4 nm^{-1} から 0.6 nm^{-1} の領域では傾きが-3.8となり、上述した表面フラクタル次元が2.2であり、未変性状態のデータと同値であった。表面フラクタル次元が2の場合はポロッド則¹⁹⁾と知られており、粒子表面が平滑であることを意味する。表面が平滑でない場合は、表面フラクタル次元は2と3の間に値をとる。この結果は未変性状態と熱処理後の分子の表面状態は類似したなめらかさであることが推定できた。しかしながら、本測定においてこの q 領域およびそれ以上 q の大きい領域のデータ精度が十分でないためこれ以上の議論はしない。今後、タンパク質の熱処理特性をさらに解明するためにはタンパク質の2次構造などの微細構造の特性解析が重要であり、より広角 q 領域の精度の高い散乱実験ができる測定システムの構築が必要である。

さらに、 q の小さい領域の散乱データは粒子全体の平均としての大きさを反映しており、小角散乱領域で

は、溶質分子の形状と関係なく $I(q)$ は(2)式のように表現できる。

$$I(q) = I(0) \exp((-q^2 \cdot Rg)/3) \quad (2)$$

ここで、 Rg は回転半径、 $I(0)$ は角度ゼロにおける散乱強度である。(2)式の関係から q の2乗に対する $I(q)$ の対数のプロット(ギニエプロット)の小角領域の直線の傾きと切片から、 Rg と $I(0)$ が評価できる¹⁾。図4に示した熱処理後の試料についてのギニエプロットにおいて、 q^2 が 0.004 nm^{-2} から 0.009 nm^{-2} の範囲の小角領域の直線近似から、 Rg は溶出の早い順に $15 \pm 6 \text{ nm}$ および $14 \pm 6 \text{ nm}$ と評価できた。さらに、各解析の切片の値は $I(0)$ であり、 $I(0)$ を溶出タンパク質濃度で除した値はその溶出分子の分子量に比例する。本タンパク質の単量体の分子量(66,411)を基準として、測定で得られた $I(0)$ を溶出タンパク質濃度で除した値から熱処理後の可溶性分子の分子量を評価した。その結果、溶出の早い方から約230万と約98万と評価され、それぞれ単量体単位が約35個と約15個会合している計算となった。

ウシ血清アルブミンのゲルの構造は数珠状の細長い構造が報告されている^{14) 15)}ので、本研究で観察された熱処理による水に可溶性の会合体が棒状の構造特性を持つことはゲル化初期過程の構造としては矛盾しない結果であった。今後はさらに大きな会合体構造の特性評価のために、試料位置と検出器間距離を大きくするなどのより小角分解能の高い測定システムの構築も重

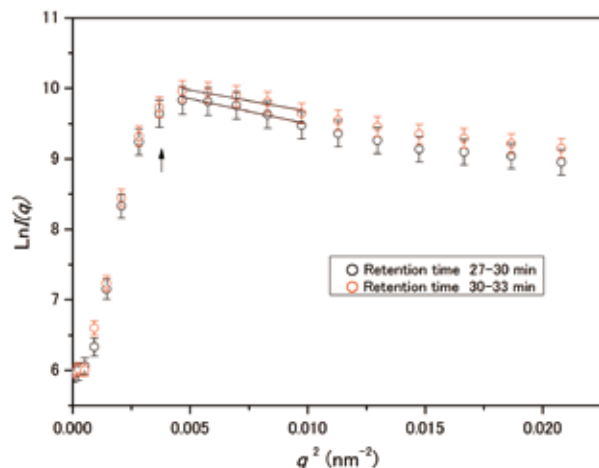


図4 ウシ血清アルブミンの溶液X線散乱データのギニエプロット

各記号について溶出時間帯を図中に示した。図中の直線は回転半径と分子量の計算に使用した領域を示す。 q^2 が 0.0036 nm^{-2} (矢印)以下のデータの急激な落ち込みはX線ビームストッパーのためである。

要である。NMRはタンパク質の溶液構造を原子レベルで解析できる手法である²⁰⁾。しかし、タンパク質の分子量が大きくても数万、通常は2万以下のものが主な対象となる。分子量数十万以上のタンパク質分子会合体の溶液構造解析は、食品分野のタンパク質の有効利用のためには不可欠な課題である。溶液散乱の長所は、生理的な条件ばかりでなく種々の溶媒条件での測定が可能である点である^{4)~8)}。従って、溶液散乱法は、タンパク質の会合状態やゲル化初期過程あるいは分子間相互作用により形成された超分子構造の解明に効果的に利用されることが期待される。さらに、タンパク質ばかりでなく多糖などの生体高分子についても溶液散乱法を適用することにより、食品関連生体高分子を含んだ食品の加工技術の開発などの食品関連分野における生体分子素材の特性解明への貢献が期待できる。

謝辞

本研究の一部はJSPS科研費24550111の助成を受けた。小角X線散乱測定は高エネルギー加速器研究機構放射光共同利用実験課題(2011G098および2013G099)として行った。

要約

食品関連タンパク質であるウシ血清アルブミンの熱処理後の水溶性分子の溶液構造特性を解明するために、溶液X線散乱クロマトグラフィーによる分子構造解析を行った。その結果、溶液中の熱処理後の可溶性分子は、棒状の構造特性を持つ分子形状であることが示唆された。また、熱処理後の可溶性分子の回転半径と分子量は、 $14 \sim 15 \text{ nm}$ および $98 \text{万} \sim 230 \text{万}$ と評価された。これら溶液X線散乱クロマトグラフィーによる会合タンパク質の構造解析を通して、溶液散乱法が食品に関連するタンパク質などの生体高分子成分素材を含む食品の加工技術の開発に役立つことが期待できる。

文献

- 1) Pilz, I., Proteins. In "Small angle X-ray scattering", eds. Glatter, O. and Kratky, O., Academic Press, pp239-293 (1982).
- 2) Kratky, O., Natural high polymers in the dissolved and solid state. In "Small angle X-ray scattering", eds.

- Glatter, O. and Kratky, O., Academic Press, pp361-386 (1982).
- 3) 菊田惺志, 放射光光源, 「X線回折・散乱技術 (上)」, 初版 (東京大学出版会, 東京), pp 176-200 (1997).
 - 4) 渡邊 康, 猪子洋二, タンパク質のクロマトグラフィー検出手段としての溶液X線散乱測定, 食品総合研究所研究報告, 70, 1-5 (2006).
 - 5) 渡邊 康, タンパク質の相互作用解析技術, 食品技術総合辞典 (朝倉書店), pp 559-563 (2008).
 - 6) Watanabe, Y. and Inoko, Y., Size-exclusion chromatography combined with small-angle X-ray scattering optics, *J. Chromatogr A*, **1216**, 7461-7465 (2009).
 - 7) Watanabe, Y. and Inoko, Y., Further application of size-exclusion chromatography combined with small-angle X-ray scattering optics for characterization of biological macromolecules, *Anal. Bioanal. Chem.*, **399**, 1449-1453 (2011).
 - 8) Watanabe, Y. and Inoko, Y., Characterization of a large glycoprotein proteoglycan by size-exclusion chromatography combined with light and X-ray scattering methods, *J. Chromatogr A*, **1303**, 100-104 (2013).
 - 9) Holowachuk, E.W., cDNA sequence of bovine prealbumin, GeneBank Database Accession # M73993 (1991).
 - 10) 戸部 敏, 血漿タンパク質と免疫グロブリン, 「ハーパー・生化学」, 上代淑人 (監訳), 第27版 (丸善, 東京), pp 622-640 (2007).
 - 11) Gallier, J., Rivet, P. and de Certaines, J., 1H-and 2H-NMR study of bovine serum albumin solutions, *Biocim. Biophys. Acta* **915**, 1-18 (1987).
 - 12) Alexander, P. and Hamilton, L.D.G., Changes in the reactivity of disulfide bonds in bovine serum albumin on denaturation, *Arch. Biochem. Biophys.* **88**, 128-135 (1968).
 - 13) Takeda, K., Wada, A., Yamamoto, K., Moriyama, Y. and Aoki, K., Conformational change of bovine serum albumin by heat treatment, *J. Protein Chem.* **8**, 653-659 (1989).
 - 14) Clark, A.H. and Tuffnall, C.D., Small-angle X-ray scattering studies of thermally-induced globular protein gels, *Int. J. Pept. Protein Res.* **16**, 339-351 (1980).
 - 15) Clark, A.H., Judge, F.J., Richards, J.B., Stubbs, J.M. and Suggett, A., Electron microscopy of network structures in thermally-induced globular protein gels, *Int. J. Pept. Protein Res.* **17**, 380-392 (1981).
 - 16) Fasman, G.D., Handbook of biochemistry and molecular biology, Vol.2, CRC Press, Cleveland, OH, (1976).
 - 17) Dewey, T.G., Fractals in Molecular Biophysics, Oxford Univ. Press (1997).
 - 18) Higgins, J.S. and Benoît, H.C., Polymer and Neutron Scattering, Oxford Univ. Press (1996).
 - 19) Porod, G., Die Röntgenkleinwinkelstreuung von dichtgepackten kolloiden Systemen, *Kolloid-Z.*, **124**, 83-114 (1951).
 - 20) Wüthrich, K., NMR of proteins and nucleic acids, John Wiley & Sons (1986).