

食品生体高分子の溶液特性評価技術の開発

技術の特徴

- ・食品に関連するタンパク質や多糖などの生体高分子は、結晶化の困難なものやNMR解析には適さない巨大分子である場合が少なくない。また、溶液中の生体高分子は溶媒条件により多様な形状や分子集合状態であるため、これらを分離と同時に溶液構造を評価する方法の開発が必要である。
- ・本研究では、クロマトグラフィーと溶液X線散乱法を組み合わせた「溶液X線散乱クロマトグラフィー法」を構築し、食品に関連する生体高分子をクロマトグラフィーで分離すると同時にその溶出位置での「分子サイズ」、「分子量」および「分子構造」が評価できることを明らかにした。

研究の内容:「溶液X線散乱クロマトグラフィー法 (HPLC combined with small-angle X-ray scattering: HPLC-SAXS法)」の紹介

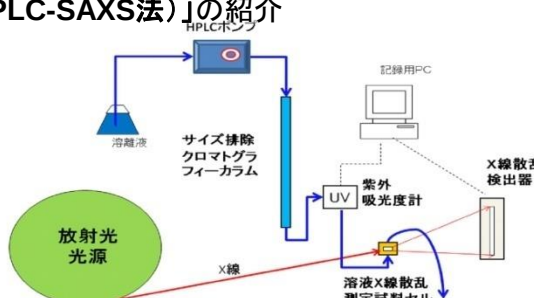


図1 測定システムの構成
分離直後の分子サイズ、分子量、分子構造の評価が可能である。

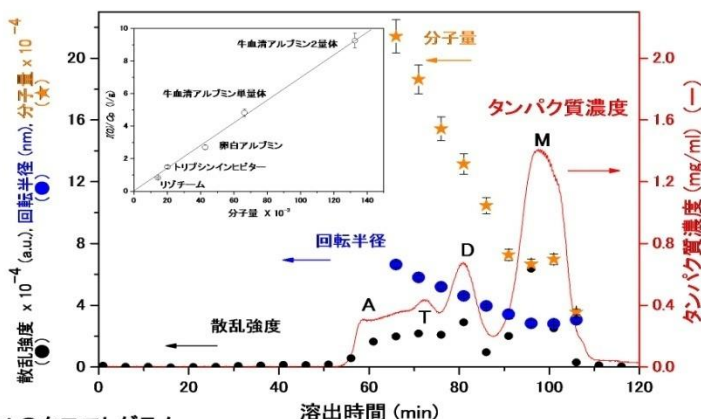


図3 BSAのクロマトグラム

BSAについて得られた散乱データ(図2)を解析することにより、溶液中のBSAは少なくとも4種(高次会合体(A)、3量体(T)、2量体(D)、単量体(M))の構造を示す。分子量既知の食品蛋白質試料について本手法を利用した際、分子量と角度ゼロにおける散乱強度 $I(0)$ を溶出試料濃度 C_p で除した値とは優れた相関を示す(挿入図)。

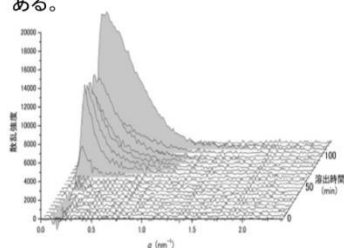


図2 アレルゲン性蛋白質ウシ血清アルブミン(BSA)の散乱パターン

BSA(10 mg)をHPLCゲル濾過カラムに供し、5分毎の溶液X線散乱時分割測定散乱パターン(散乱ベクトルの絶対値 $q = (4\pi/\lambda) \sin \theta$ 、 λ はX線波長、 2θ は散乱角)に対する散乱強度 I のプロットの変化を示す。

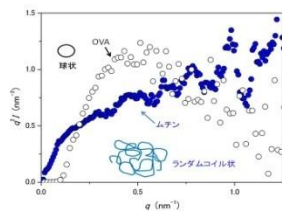


図4 粘性糖蛋白質ムチンと卵白アルブミンの溶出散乱データの比較

構造特性の定性的な差が観察できる。

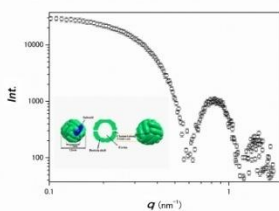


図5 アポフェリチンの中空球殻複合体の構造解析

試料溶液中の超凝集体の分離と同時に得られた24個のサブユニット(分子量約2万)集合体の溶出散乱パターンを示している。

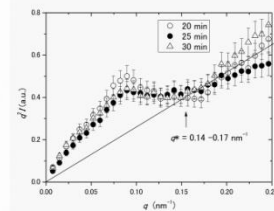


図6 巨大糖蛋白質プロテオグリカンの持続長解析

溶出分子の鎖の硬さの指標である持続長は13-16nmと評価された。たとえば、ある棒状ウイルスについては約880nmとの報告がある。

今後の展開

本手法については、イオン交換クロマトグラフィーの利用の可能性を検討する予定である。科学的基盤の明確な評価技術を食品関連生体高分子の機能構造の解明や構造制御技術の開発などに活用することにより、高品質の食品開発に役立つ知見が得られることが期待できる。

参考: Y. Watanabe and Y. Inoko: Characterization of a large glycoprotein proteoglycan by size-exclusion chromatography combined with light and X-ray scattering methods, J. Chromatogr A, 1303 (2013)/Y. Watanabe and Y. Inoko: An assessment study on two-dimensional X-ray scattering data for protein solutions, 食品総合研究所研究報告, 76(2012)/Y. Watanabe and Y. Inoko: Further application of size-exclusion chromatography combined with small-angle X-ray scattering optics for characterization of biological macromolecules, Anal. Bioanal. Chem., 399 (2011)/渡邊康: 溶液X線散乱クロマトグラフィー法による食品に関連するタンパク質の特性解析, 平成21年度食品試験研究成果情報, 22 (2010)/Y. Watanabe and Y. Inoko: Size-exclusion chromatography combined with small-angle X-ray scattering optics, J. Chromatogr A, 1216 (2009)

謝辞: 本研究の一部はJSPS科研費24550111の助成を受けたものです。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として行いました。