

[成果情報名] 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

[要約] ゲル濾過クロマトグラフィーと溶液 X 線散乱法を組み合わせた測定法は、溶液中でタンパク質を分離すると同時に当該タンパク質の溶液中における構造情報をリアルタイムで獲得できる。

[キーワード] 生体高分子の溶液構造物性、溶液 X 線散乱法、クロマトグラフィー

[担当] 食総研・食品バイオテクノロジー研究領域・生物機能制御ユニット

[代表連絡先] 電話 029-838-8115

[区分] 食品

[分類] 研究・普及

[背景・ねらい]

アレルギー性タンパク質や動物の消化管粘液糖タンパク質などの食品に関連するタンパク質の構造に関する情報は、食品の機能解析や農作物や食品中の機能性高分子物質の探索等に有用で、食品産業・農業における様々な分野での活用が期待される。これらのタンパク質は、会合体や複合体あるいは不定形で結晶化の困難なもの、または NMR 解析には適さない巨大分子であるものが多く、これらの構造解析手法として溶液散乱法の有効性が注目されている。しかし、溶液中のタンパク質は溶媒条件により多様な形状あるいは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待たれている。本研究は、ゲル濾過クロマトグラフィーと溶液 X 線散乱法を組み合わせることにより、食品に関連するタンパク質をクロマトグラフィーで分離すると同時に溶液中の分子サイズ、分子量および分子鎖構造が評価可能であることを明らかにする。

[成果の内容・特徴]

1. タンパク質をゲル濾過クロマトグラフィーにより分離溶出後、溶出液を濃度決定のための紫外吸光度計（あるいは示差屈折計）および構造評価のための放射光溶液 X 線散乱測定システムでオンラインモニターする（図 1）。
2. アレルギー性を有する会合性タンパク質である牛血清アルブミン（BSA）の本測定法の適用において、クロマト溶出液の溶液 X 線散乱時分割測定により得られた試料溶出時の散乱データの小角領域の解析より、単量体および各会合体の分子サイズ（回転半径）と分子量が評価できることがわかる（図 2）。
3. また、食品タンパク質である卵白アルブミン、大豆トリプシンインヒビターおよび卵白リゾチームについて、分子量と本測定法で得られた溶出時の散乱角ゼロの散乱強度 $I(0)$ を溶出試料濃度 C_p で除した値の直線的相関関係から（図 2 挿入図）、新規生体高分子物質の溶液中の分子量を溶出時間と関係なく評価できることが示唆される。
4. さらに、特定溶出位置の散乱データの解析から分離直後の分子鎖構造の評価が可能であり、消化管粘液糖タンパク質ムチン（分子量約 200 万）は、球状タンパク質である卵白アルブミンとは異なり、ランダムコイル構造を取っていることが明らかである（図 3）。

[成果の活用面・留意点]

1. この測定法を利用して、食品関連生体高分子の混合物を分離と同時に分子サイズ、分子量および分子鎖構造を評価することにより、溶媒条件や加工条件の変化にとまなう食品関連生体高分子の会合や解離あるいは複合体形成などの相互作用解析への応用が可能である。
2. 放射光溶液 X 線散乱測定装置は、高エネルギー加速器研究機構などの放射光施設において利用が可能である。また、本手法の適用可能性を広げるために、生体高分子を対象とした溶液 X 線散乱測定装置の高度化を進める予定である。

[具体的データ]

図1 溶液X線散乱クロマトグラフィー測定システムの構成

サンプルをHPLCゲル濾過カラムに注入し、紫外吸光度計およびX線散乱測定装置でモニターする。

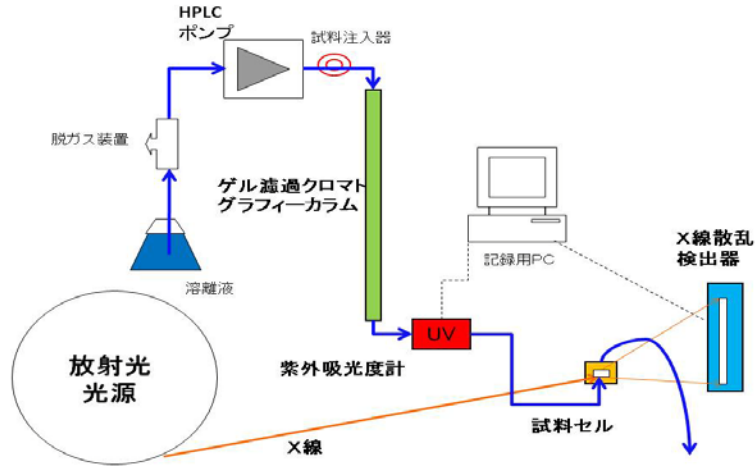


図2 アレルゲン性タンパク質牛血清アルブミン(BSA)のクロマトグラム

BSA(10mg)をHPLCゲル濾過カラム(Superdex 200, 600 X 16mm)に供した。溶液(50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7)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。

分子量既知の食品タンパク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)。

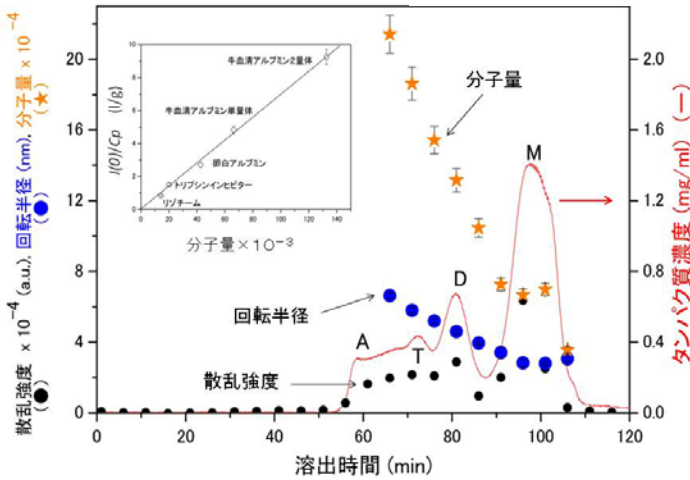
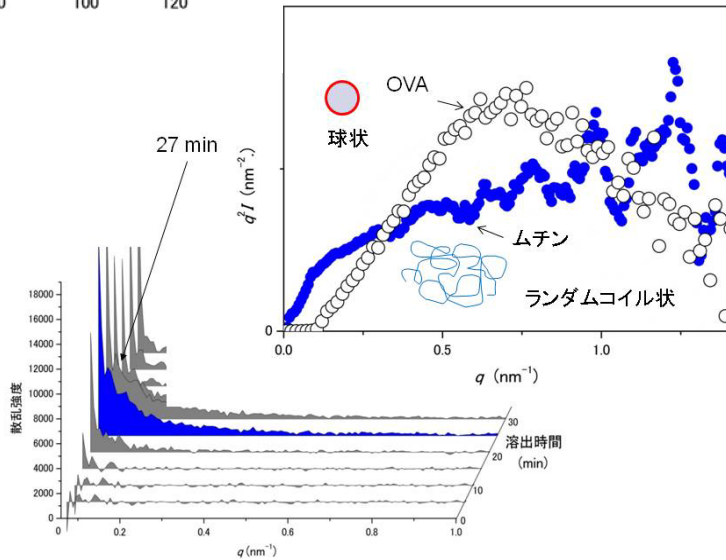


図3 消化管粘液糖タンパク質ムチンの散乱パターン

ムチン(5mg)をHPLCゲル濾過カラム(GF7MHQ, 300 X 7.5mm)に供した。

特定の溶出位置(27分)の散乱データ(青色部分)を、散乱ベクトル $q = (4\pi/\lambda)\sin\theta$, λ はX線波長、 2θ は散乱角) に対する q の2乗と散乱強度の積 ($q^2 I$) のプロット(●)から、溶液(50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7)中のムチンの構造はランダムコイル状であり、卵白アルブミン(OVA; ○)の構造についての同様の解析からは球状であることを示す。



[その他]

研究課題名：溶液散乱法によるタンパク質系素材から成る超分子形成の特性解明とその解析手法の開発

中課題整理番号：313e

予算区分：基盤

研究期間：2006年度～2009年度

研究担当者：渡邊康

発表論文等：Watanabe, Inoko (2009) J.Chromatogr.A 1216(44):7461-7465