

[成果情報名] ムチンとプロテオグリカンの溶液中の分子量分布と分子鎖構造評価

[要 約] 食品に関連するタンパク質には、不定形で結晶化のできないものやNMR解析には適さない巨大分子である場合が少なくない。このような対象の一例であるムチンやプロテオグリカンの溶液中の分子量分布と分子鎖構造評価には、光・X線・中性子溶液散乱法が有効である。

[部 署] 食品総合研究所・食品素材部・タンパク質素材研究室

[連絡先] 029-838-8115 yasuw@affrc.go.jp

[成果区分] 参考

[キーワード] 巨大タンパク質多糖複合体、分子量分布、分子鎖構造、溶液散乱法

[背景・ねらい]

溶液中のタンパク質の分子量や分子サイズ・形状は、それを素材とした食品（構成物）の粘性やゲル化性などの物理特性に影響を与える主要な因子の一つである。また、これらの物性値はその素材の機能や食品の品質に関連するものが少なくない。食品に関連するタンパク質は、不定形で結晶化のできないものや、分子量が大きいためNMR解析が不可能である場合も多く、基本的な構造解析手法の開発・改良も必要である。本研究では結晶化の成功していないムチンとプロテオグリカンを対象に、光散乱測定による分子量分布の評価とX線および中性子溶液散乱測定による分子鎖構造の解析を行い、同種の生体高分子の解析に資する知見の提供を目的とした。

[成果の内容・特徴]

1. ゲル電気泳動法では解析が困難なムチン（消化管粘膜などでの食品成分との相互作用の可能性のある成分）の溶液中の分子量分布の評価には低角レーザー光散乱法が、比較的簡便な手法として有効である（図1）。また、プロテオグリカン（軟骨の主要機能成分）やタンパク質の構造形成中間体にも適用可能である（データ省略、文献2,5）。
2. 分子量4万以上のタンパク質の構造解析はNMR測定ではきわめて困難な条件なので、結晶化の成功していないNMR測定に適さないムチンの溶液中の構造解析にはX線溶液散乱法は有効である。さらに、溶液中のタンパク質の構造解析を目的としたX線溶液散乱測定システムの開発・改良も重要である（文献3）。試料のX線吸収を散乱と同時測定するシステムの開発から、1Mまでの塩化ナトリウム中でムチンの散乱パターンに変化がない結果が得られ、ムチンは生理的な条件での塩による構造変化は示さないことがわかった（図2；文献4）。
3. プロテオグリカンの様なタンパク質多糖複合体の分子鎖構造解析には中性子溶液散乱法が有効である。重水濃度を变化させたコントラスト変調法を利用した中性子散乱測定から、プロテオグリカンはタンパク質コアに糖鎖が無数に分布して、溶液中で細長い分子形態であることが示唆された（図3；文献1）。

[成果の活用面・留意点]

光散乱測定装置は市販品があるので、目的にあった装置が利用できる。物理定数未知な試料については、分子量評価のためには個々において工夫が必要である。放射光X線溶液散乱測定装置は、高エネルギー加速器研究機構やSPRING8などにおいて、中性子溶液散乱測定装置は、日本原子力研究所や東大物性研の共同利用施設などにおいて、研究課題審査を経て、広範囲な基礎的および産業分野の研究者に利用が可能である。より高機能のタンパク質酵素デザインあるいは高品質の食品開発などに資する知見が得られることが期待できる。

[具体的データ]

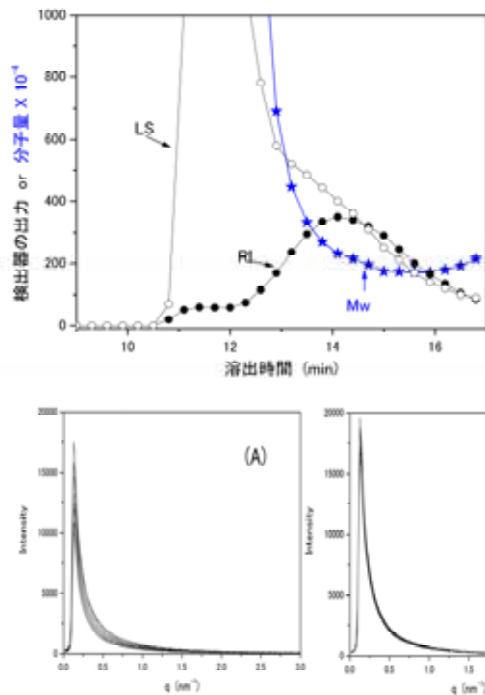


図2 ムチンのX線溶液散乱パターンの一例

溶媒中の塩化ナトリウムの濃度を変えたときの透過率補正前 (A) と補正後 (B) のパターンを示す。横軸は散乱ベクトル q ($= (4 / \lambda) \sin(\theta)$); λ は波長、 2θ は散乱角)、縦軸は散乱強度である。各塩濃度表示は省略した。

図1 光散乱測定により得られた溶液中のムチンの分子量分布とクロマトグラムの一例

光散乱 (LS;) と示差屈折率 (RI;) および各溶出時間における分子量 (Mw;) を示す。50mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8) においては、溶出時間が約11分の少量成分の分子量は1千万以上で、約14分の主成分の分子量は約200万であった。



図3 中性子溶液散乱測定実験から得られた多糖タンパク質複合体プロテオグリカンの分子形状と内部構造モデル

[その他]

研究課題名：タンパク質多糖複合体の溶存状態と共存分子との相互作用解析 (食品総合)
溶液中のタンパク質分子集合状態の特性評価 (形態生理)

予算区分：農水省食品総合および形態生理プロジェクト

研究期間：2001 ~ 2006 年度 (2004 年度)

研究担当者：渡邊 康

発表論文等：

- 1) Y. Watanabe *et al.*: Small-angle neutron scattering study on a proteoglycan in solution, *Journal of Physical Society of Japan*, **70**, 414-416(2001)
- 2) Y. Watanabe: Characterization of the refolding and reassembly of an integral membrane protein OmpF porin by low-angle laser light scattering photometry coupled with high-performance gel chromatography, *Journal of Chromatography*, **A 961**, 137-146(2002)
- 3) 渡邊康: 生体高分子の構造解析のための放射光小角X線散乱測定装置、食総研ニュース **8**、4-5 (2003)
- 4) 渡邊康、猪子洋二、小林克己: タンパク質の放射光溶液X線散乱測定におけるX線透過率の同時評価、食品総合研究所報告 **69**、17-20(2005)
- 5) Y. Watanabe and Y. Inoko: Physicochemical characterization of the reassembled dimer of an integral membrane protein OmpF porin, *The Protein Journal*, (2005) in press