

酵素反応によるアミロペクチンの鎖長伸長と構造解析

湯口宜明¹⁾、橋本健司¹⁾、山本郷湖¹⁾、鈴木志保²⁾、北村進一²⁾

要約: アミロースはプライマーとしてマルトオリゴ糖を用い、基質としてグルコース1リン酸を用いることによって酵素であるホスホリラーゼにより触媒され合成することができる。本研究ではプライマーとしてアミロペクチンを用いて酵素反応を行い、新規なデンプンを合成できないかを検討した。得られたデンプンは動的光散乱法、小角 X 線散乱法、X 線回折によりキャラクタリゼーションを行った。いずれの結果も鎖長伸長が示唆される結果となり、新規なデンプンが創製できたと考えられた。

1. はじめに

デンプンは直鎖構造を有するアミロースと分岐構造を有するアミロペクチンの混合物である。アミロースはグルコースが α -1,4結合によって重合した構造をもち、アミロース鎖に対して α -1,6結合で分岐構造を有するのがアミロペクチンである(図1参照)。デンプンの物性は御飯の食感やおいしさなどに影響を与えており、それはアミロースとアミロペクチンの組成比やそれぞれの分子構造に大きく依存していると考えられる。そのため食品分野では活発に研究されてきた。

グルコースが β -1,4結合したものはセルロースであり、その結合様式から分子鎖は伸びた構造をとりやすく、さらに分子間の高度な水素結合により結晶構造をとる。一方アミロース鎖は α -1,4結合鎖であり、ヘリックス構造をとりやすい。アミロペクチンは分岐鎖どうしが2重らせんを形成し、それらが結晶構造をとる。結晶構造には主としてA型とB型が存在し、天然において穀類はA型、根茎類はB型をとる。結晶構造は2重らせんがパッキングされており、それがクラスターとなり分子全体ではラメラ構造をとる。さらに大きなスケールではデンプン粒があり、デンプンは様々なスケールで特徴的な構造を有する階層性を示す^{1,2)}。

またデンプンは生物の食糧となっている。植物内でもエネルギーとして機能しているが、このデンプンは組織の中で、様々な酵素によって生合成されている。これらの酵素を使うことによって自在にデンプン分子を設計できる可能性がある。これまで酵素反応を用いた研究報告は多数ある。たとえば脂質の存在下での酵素合成アミロースの生成がある³⁾。脂質の炭素鎖にアミロースがらせん状に巻きついて複合体をつくると考えられており、脂質の炭素鎖長のよって得られるアミロース鎖の長さも変化する。またグリコーゲンをプライマーとして鎖長伸長をさせて、デンドリマー状の分子を合成している例もある⁴⁾。

¹⁾ 大阪電気通信大学大学院 工学研究科

²⁾ 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科

本研究ではプライマーとしてアミロペクチンを用いて酵素反応を行い、新規なデンプンを合成できないかを検討した。得られたデンプンは動的光散乱法、小角 X 線散乱法、X 線回折によりキャラクタリゼーションを行った。

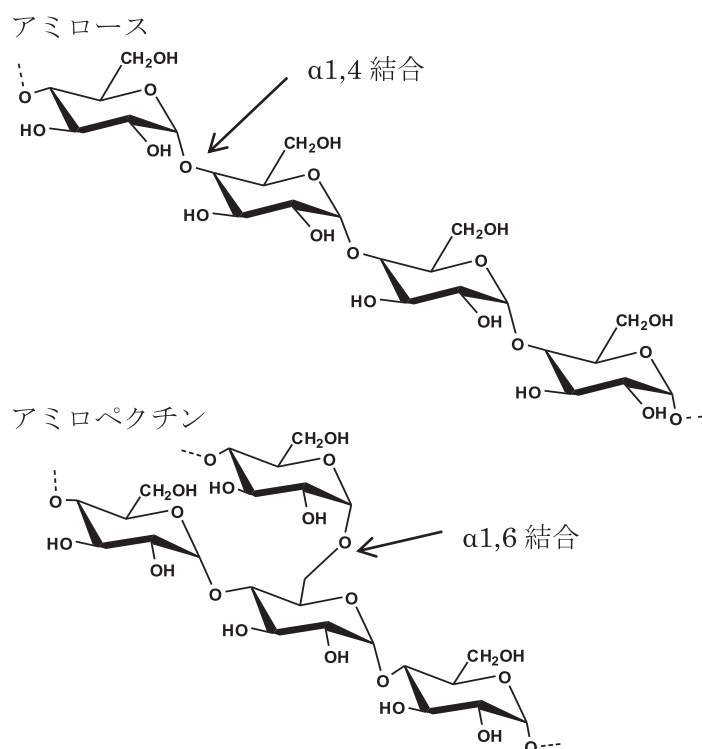


図 1. アミロース及びアミロペクチンの化学構造.

2. 実験

2-1 ホスホリラーゼの抽出⁵⁾

ホスホリラーゼはジャガイモ由来のものを用いた。まずジャガイモ 100g をすりおろし、布でろ過して、ろ液を遠心分離 (4000r.p.m. 20 分) にかけた。上澄み液に DEAE セファデックス A50 を 0.5g 加えて 30 分放置した。次に塩化ナトリウムを 1.5% となるようにゲル溶液に加えた。ゲルをろ過して回収し、純水に再分散させた。塩化ナトリウム 3.5% となるようにして、さらに 20 分放置した。ゲルをろ過し、ホスホリラーゼを含むろ液を回収し、使用するまで冷蔵庫に保存した。ホスホリラーゼの活性試験を行い、29U/mL であることを調べた。

2-2 酵素反応

プライマーとして用いたマルトペンタオース及びリントナー溶性デンプンは林原社製のものを用いた。グルコース 1 リン酸 (G1P) は和光純薬工業株式会社製を用いた。

プライマーと G1P の混合液を 0.2M 酢酸緩衝液 (pH=5.9) に溶かして、そこにホスホ

リラーゼ溶液が 10v/v%になるように加えて反応を開始した。反応は 50°Cで行い、42 時間で熱湯に浸すことで、酵素を失活させて反応を停止した。生成物はエタノールにより沈殿分離し、乾燥させて固体試料を得た。試料はプライマーと G1P の組成比を変えたものをいくつか準備した。

2-3 動的光散乱

動的光散乱はマルバーン社製のオートサイザー4700C を用いて測定した。ヘリウムネオンレーザーを用い、散乱角 90 度の位置で散乱光を光電子増倍管によって検出し解析した。試料溶液は 0.4%の 1M KOH 水溶液で調製した。

2-4 小角 X 線散乱

小角 X 線散乱は兵庫県にある大型放射光施設 SPring-8 の BL40B2 で行った。波長 0.1nm の入射 X 線を試料にあて、約 1m のカメラ長をとおってイメージングプレートにより散乱 X 線を検出した。得られた 2 次元の等方的なデータは円平均化を行い、1 次元化した。

2-5 X 線回折

X 線回折パターンはリガク社製 RINT Ultima+を用いて行った。入射 X 線の波長は 0.154nm で、0.020° ステップで各 1 秒の積算時間で測定した。

3. 結果と考察

酵素反応のプライマーとして、マルトペンタオースとリントナー溶性デンプンを用いた。リントナー溶性デンプンはワキシコーンスターチを酸で分解して低分子量化したものである。G1P に対するプライマーの重量分率を変えたいくつかの条件（表 1 参照）で酵素合成反応を行った。ここで試料 code も示している。表 1 に示されている分子量は多角度光散乱検出器を有するサイズ排除体積クロマトグラフィーで評価したものである。酵素はプライマーを認識して反応を開始し進めるので、プライマーの割合の多い条件では、得られる分子量は小さくなることが予想される。結果をみるとマルトペンタオースをプライマーとする MP シリーズ、リントナー溶性デンプン（アミロペクチン）をプライマーとする AP シリーズともに予想された傾向を示した。

表 1. 各試料の酵素反応条件と分子量の値.

プライマー	試料 code	G1P に対する プライマーの 重量分率	分子量(M_w)* 10^{-5}	M_w/M_n
マルトペンタオース	MP0.01	0.01	0.17	1.02
	MP 0.02	0.02	0.11	1.01
	MP 0.1	0.10	0.05	1.02
リントナー溶性デンプン (アミロペクチン)	未処理	0	1.63	4.78
	AP0.01	0.01	2.45	3.81
	AP 0.02	0.02	2.45	4.55
	AP 0.1	0.10	2.31	3.30
	AP 0.2	0.20	2.17	2.99

溶液中における分子の広がりを調べるために試料を 1M KOH 溶液に溶かし、動的光散乱法によってサイズ分布を調べた。結果を図 2 に示す。やはり表 1 に示されている分子量と同様に鎖の広がりについてもプライマーの割合の多い条件で得られた試料については小さくなる傾向を示した。また直鎖のアミロースに比べて分岐構造をもつアミロペクチンの方がサイズはずっとコンパクトであった。

次に得られた試料の局所構造を調べるために小角 X 線散乱法による測定を行った。図 3 は各試料の 1M KOH 水溶液中での小角 X 線散乱に対するクラットキープロット ($q^2 I(q)$ vs q) である³⁾。ここで $I(q)$ は散乱強度で q は散乱ベクトルの大きさを、 $(4\pi/\lambda) \sin\theta$ である。ただし λ は入射 X 線の波長、 2θ は散乱角である。プライマーであるマルトペンタオースからの散乱をみると特に極大は見られなかったが、鎖長伸長によって得られているアミロースは q が約 2nm^{-1} 付近に極大が現れた。また q が大きくなると裾が立ち上がり、2 つめの極大を示した。これはおそらくアミロース鎖が溶液中においても平均的にらせん構造をとっていると考えられる。さらにリントナー溶性デンプンとそれをプライマーとして鎖長伸長させた試料からの散乱をみると、アミロースの場合に加えて、 q が約 0.5nm^{-1} 付近にピークが観測された。これは分岐構造に由来するものと考えられ^{7),8)}、そのピーク位置は分子量が大きくなるにつれて小角側にシフトした。これは分岐鎖の鎖長が伸長することによって生じたと考えられる。

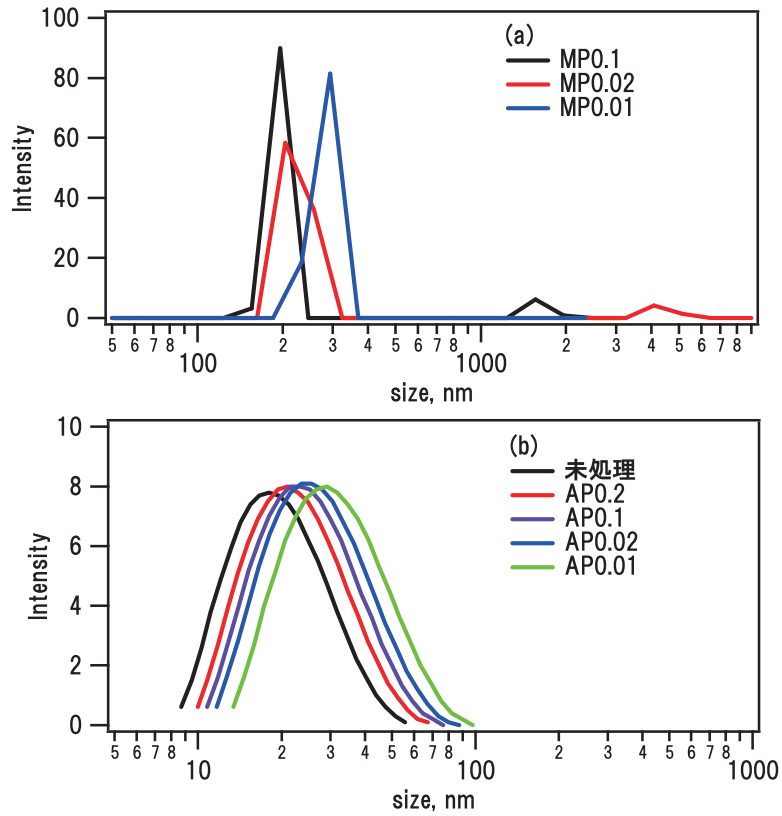


図2. 動的光散乱法により評価した各酵素反応デンプン試料 1M KOH 溶液中のサイズ分布.
(a)は MP シリーズ、(b)は AP シリーズ.

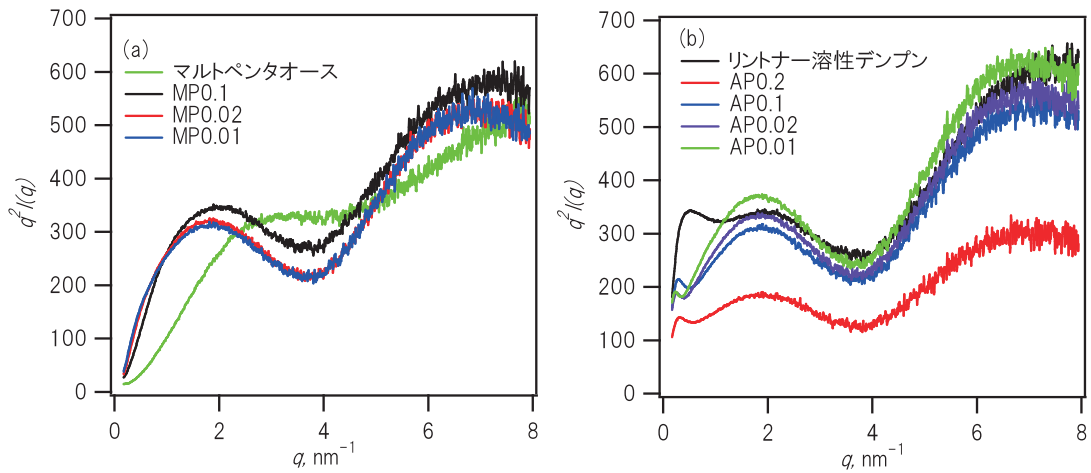


図3. プライマー及び酵素反応によって得られた各酵素反応デンプン試料 1M KOH 溶液からの小角 X 線散乱に対するクラットキープロット. (a)は MP シリーズ、(b)は AP シリーズ.

最後にリントナー溶性デンプンとそれをプライマーとして鎖長伸長させた固体試料からのX線回折パターンを測定した。結果を図4に示す。穀類由来であるリントナー溶性デンプン（コーンスターチ）はA型結晶であるが、酵素反応による鎖長伸長によって結晶型がB型に転移した。分岐鎖が長くなるとB型になりやすい傾向があると考えられた。

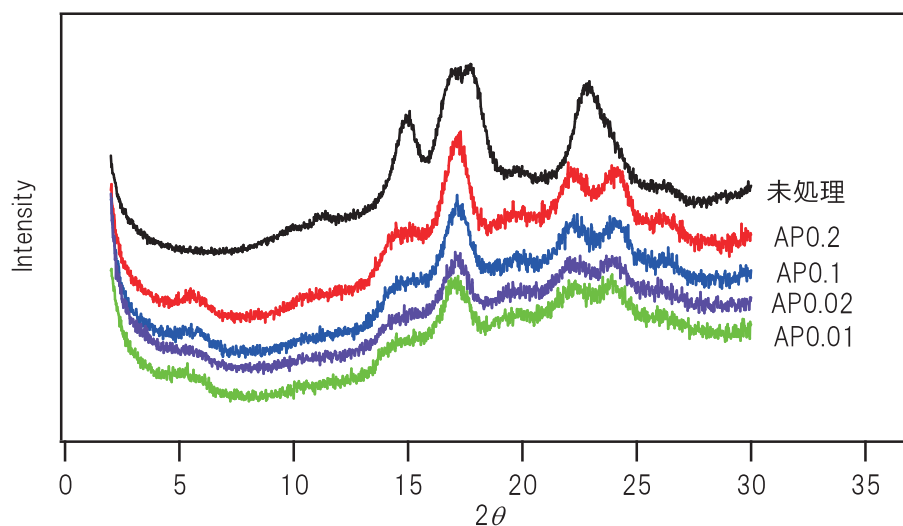


図4. リントナー溶性デンプンと AP シリーズからの X 線回折パターン.

参考文献

- 1)例えば、「澱粉科学の事典」、不破英次ら編集、朝倉書店（2003）
- 2) A. Imberty, A. Buléon, *Starch – Stärke*, **43**, 375-384 (1991)
- 3) G. G. Gelders, H. Goesaert, and J. A. Delcour, *Biomacromol.*, **6**, 2622-2629 (2005)
- 4) J. L. Putaux, G. P. Véronèse, M. R. Simeon, and A. Buleon, *Biomacromol.*, **7**, 1720-1728 (2006)
- 5) A. Kamogawa, T. Fukui and Z. Nikuni, *J. Biochem.*, **63**, 361-369 (1968)
- 6) O. Kratky, *Small angle X-ray scattering*, O. Glatter and O. Kratky eds., Academic Press, London, pp. 361-386 (1982)
- 7) W. Burchard, *Macromol.*, **7**, 841-846 (1974)
- 8) W. Burchard, *Macromol.*, **10**, 919-927 (1977)

謝辞

本研究は平成21年度から平成22年度の共同研究費Aによって支援を受けた研究である。ここに感謝の意を表す。