

氏名	塩野弘二
学位(専攻分野の名称)	博士(農芸化学)
学位記番号	甲第738号
学位授与の日付	平成29年3月20日
学位論文題目	デンプン粒膜および構成成分がデンプンの理化学特性に与える影響の解明
論文審査委員	主査 教授・農学博士 高野克己 教授・農学博士 山本祐司 教授・博士(農芸化学) 阿久澤 さゆり 教授・農学博士 佐藤広顕

論文内容の要旨

デンプンは植物においてグルコースの貯蔵形態のひとつで、種子、塊根、塊茎および未熟な果肉などに多く含まれている。これらの器官のアミロプラスト中に粒子(デンプン粒)として存在し、その形状や性質は植物種によって大きく異なる。デンプン粒は水を加えて加熱すると糊化して粘性を帯び、また冷却によってゲル化することから、糊料、増粘剤、ゲル化剤および安定化剤などとして食品、製紙、捺染、医薬品などの分野で使われ、米、トウモロコシ、小麦、ジャガイモおよびキャッサバなどを原料に世界で年間約3800万トン生産されている。

デンプンはグルコースが α 1,4結合で重合したアミロースと α 1,6結合で枝分かれした構造のアミロペクチンを主成分とする。両者とも高分子量のため、デンプンは水に対し不溶である。また、デンプンは粒の形状、大きさも異なり、構造と性状との関係については現象論的な解析に留まっているのが現状である。デンプンの糊化時の粘度、ゲルの硬さなどについてはアミロース組成値やアミロペクチンの分岐構造(クラスター)が大きく関与することが報告されている。しかし、アミロース組成値、アミロペクチンの微細構造の僅かな数値の違いで、デンプンの糊化および粘度、ゲルの状態が大きく変化するなど不明な点が多い。瀬口らは、小麦デンプンを塩素ガスおよび乾熱処理すると同デンプンの乳化性や油保持性が大きくなることを報告し、デンプン粒に膜の存在を示唆した。しかし、デンプン粒における膜の存在については否定的な見解が多く、結論に至っていない。

本研究ではデンプンが粒子であることに着目し、米、トウモロコシ、小麦、サツマイモおよびジャガイモの各デンプンについて、粒的挙動の膨潤、液的挙動の粘度特性を比較し、これらの特性と粒の大きさ、アミロースの組成値、アミロペクチンのクラスター、デンプン中の微

量成分であるタンパク質および脂質含量の関係について検討した。その結果、デンプン中の微量成分のタンパク質や脂質がデンプンの熱的、液的挙動に大きな影響を与えることを見出した。さらに、デンプン中のタンパク質や脂質を分析すると共にそれらの存在状態について検証し、タンパク質はデンプン粒表層に、脂質は一部が同表層に微細油滴として存在すること、タンパク質はデンプン合成酵素の他、各起源植物の貯蔵タンパク質であること、同貯蔵タンパク質がアミラーゼインヒビターおよびプロテアーゼインヒビターファミリーに属することなどを明らかにした。また、アミラーゼインヒビターがデンプン粒とアミラーゼの結合に関与することを見出すと共に、Starch Binding Domain (SBD)を持たない植物起源アミラーゼによる生デンプン分解について新たな知見を得ることができた。以下、本研究の成果の概要を述べる。

I デンプンに関する既知データの解析

既報のトウモロコシ、サツマイモ、ジャガイモ、キャッサバ、サゴ、ヤムイモなど12種のデンプン計26点の理化学特性値を比較したところ、アミロース組成値が同様にも拘わらず糊化開始温度に6℃、最高粘度および老化性に2倍の差がみられるものがあった。また、最高粘度が同様でも同組成値が8%以上異なるなど、アミロース組成値のみでは各デンプンの特性を評価することは困難であった。従来、デンプンの理化学特性にはアミロース組成値が大きく影響すると言われてきたが、他の要因が関与することが示唆された。

II デンプンの熱的挙動に及ぼす要因について

上記の解析結果を基に、デンプンの熱的挙動に影響を

及ぼす要因について検討を行った。

1. 各種デンプンの膨潤および粘度挙動の比較

まず、米、トウモロコシ、小麦、サツマイモおよびジャガイモの各デンプンの熱的および粘度挙動を比較した。糊化開始温度はトウモロコシおよび小麦はそれぞれ 85.1 および 92.4°C を示し、これに比べ米、サツマイモおよびジャガイモはそれぞれ 77.1, 76.4 および 66.3°C と低かった。ジャガイモおよびサツマイモデンプンの最高粘度 (RVU) はそれぞれ 321 および 237 と高く、米、トウモロコシおよび小麦は、それぞれ 104, 95 および 78 と低かった。糊化デンプンの液相状態を反映する最低粘度 (RVU) は、ジャガイモおよびサツマイモでそれぞれ 126 および 132 と高く、米、トウモロコシおよび小麦ではそれぞれ 59, 51 および 52 と低くなり、ジャガイモおよびサツマイモと、米、トウモロコシおよび小麦デンプン間で差異がみられた。

2. 各種デンプンの形状、アミロース組成値、アミロペクチンの構造

植物起源によるデンプンの熱的および粘度挙動の差異の要因を検索するため各種デンプン粒の形状を観察し、アミロース組成値および、アミロペクチン側鎖の構成比率を求めた。形状は小麦およびジャガイモでは球状であったのに対し、米、トウモロコシおよびサツマイモは多角形構造であった。また、アミロース組成値は小麦が 22% と高く、米およびトウモロコシは 20%、サツマイモおよびジャガイモは 19% と大きな違いはみられなかった。さらに、アミロペクチン側鎖の構成比率は、サツマイモ、ジャガイモおよびトウモロコシと米および小麦の 2 つの傾向を示すグループに分かれた。

3. 各種デンプンのタンパク質および脂質について

デンプンはアミロースやアミロペクチンの他に、タンパク質や脂質を微量に含むことが知られている。そこで、デンプン中のタンパク質量を測定した。その結果、デンプンの起源によってその含有量が異なり、最も多かった米は 67.3mg/デンプン 100g であり、次いでトウモロコシおよび小麦が多く、サツマイモおよびジャガイモは少なく、最も少なかったジャガイモは 10mg であった。脂質は熱クロロホルム：メタノール=2:1 (v/v) 混液を用いて抽出した。脂質量はタンパク質と同様にデンプンの起源によって異なり、最も多かった米が 371mg/デンプン 100g であり、次いで小麦、トウモロコシが多く、ジャガイモ、サツマイモは少なく 100mg 程度であった。

4. デンプンの成分と熱的および粘度挙動との相関解析 従来、デンプンの熱的および粘度挙動に影響を与える

とされているアミロペクチンの側鎖長比率および粒子径に加え、デンプンに存在するタンパク質および脂質とデンプンの最高粘度および最低粘度との相関係数を算出した。最高粘度と粒子径との間に正の傾向 ($r=0.73$, $p<0.14$) が得られ、アミロペクチン側鎖長の項目とは傾向が得られなかった。一方、デンプンに存在するタンパク質量および脂質量との間に負の相関 ($r=-0.84$ および $r=-0.82$, $p<0.10$) が得られ、この相関は最低粘度でも同様の傾向を示し、これら成分がデンプンの性状に影響する可能性が示唆された。

III デンプンの熱的および粘度挙動に及ぼすタンパク質および脂質の影響

1. 除タンパク質処理がデンプンの熱的および粘度挙動に与える影響

デンプンの熱的および粘度挙動にタンパク質および脂質が関与することが推察されたため、これら成分を除去した際のデンプンの熱的および粘度挙動の変化を解析した。なお、デンプンはタンパク質および脂質量が共に高かった米デンプンをモデルとして用いた。

米デンプンの除タンパク質処理には 0.1%NaOH 溶液を使用した。脱脂処理はクロロホルム：メタノール (2:1, v/v) 混液を用いた。除タンパク質によって CBB による染色度合いが低下し、タンパク質量は約 70% 減少した。脱脂処理によって脂質は約 50% 減少した。加熱吸水性試験では、除タンパク質処理は未処理に比べ、80°C における膨潤力および溶解度はそれぞれ約 1.8 倍および約 2.5 倍に増加し、脱脂処理ではそれぞれ約 1.2 倍および約 2 倍に増加した。このことから、デンプンに存在するタンパク質および脂質はデンプンの吸水や溶解を抑制する機能を持つことが明らかになった。また、糊化開始温度は除タンパク質処理および脱脂処理でそれぞれ 4.0 および 1.6°C 低下した。最高粘度は除タンパク質処理によって約 10% 増加し、脱脂によって約 10% 低下した。さらに、冷却過程の粘度上昇はこれらの処理によって小さくなり、最終粘度は未処理デンプンに比べ除タンパク質処理によって約 0.9 倍、脱脂処理では約 0.7 倍を示した。冷却によるデンプン糊液における粘度の増加は、糊化によって液状化したデンプンが水素結合により構造化 (老化) する様相を反映している。また、糊化デンプンの螺旋構造に脂質が取り込まれると老化が促進されることから、脱脂処理による最終粘度の低下は螺旋構造に取り込まれる脂質の減少に起因するものと推察した。

以上、従来それらの機能が解明されていなかったデン

ブン中のタンパク質と脂質が、デンプンの熱的および粘度挙動に影響を及ぼすことを明らかにした。

2. 除タンパク質および脱脂処理がデンプンゲルの性状に与える影響

各デンプンからそれぞれゲルを作製し、ゲルの透明性および硬さを測定した。除タンパク質デンプンゲルは未処理に比べ約2倍の透明度を示し、除タンパク質処理によって透明感のあるゲルを形成したが、脱脂デンプンゲルでは未処理と大きな差異はみられなかった。また、ゲルの硬さは未処理の7.2gw/cm²に対して除タンパク質処理で5.3gw/cm²と減少したが、脱脂処理では9.8gw/cm²と硬くなる傾向を示した。

このようなゲルの性状変化は、内部構造の差異に起因するものと推察し、ゲルの断面を走査型電子顕微鏡にて観察した。除タンパク質処理したデンプンでは、微細なネットワーク構造が観察され、糊化したデンプンの分子が冷却時に構造化し空隙の多い組織が形成されたものと推察した。一方、未処理および脱脂処理デンプンでは平滑面が多く、このような微細なネットワークの領域が少なかった。除タンパク質処理デンプンは、タンパク質量が未処理および脱脂処理デンプンに比べ大きく減少している。このことから、未処理および脱脂処理デンプンではタンパク質が微細なネットワーク構造を覆うことにより、平滑面が多く観察されたものと考えられ、ゲルの構造から各処理デンプンのゲルの透明性と硬さの相違を理解することができた。

以上より、デンプン粒に存在するタンパク質および脂質はデンプンの熱的および粘度挙動に影響を与えることが明らかとなった。また、タンパク質の存在がデンプンゲルの構造に大きく関与することが明らかとなった。

IV デンプンに存在するタンパク質および脂質の解析

各デンプンから0.1%NaOH溶液にてタンパク質を可溶化し、SDS-PAGE (Me+) に供したところ、複数のタンパク質バンドが検出された。各タンパク質バンドを切り出し、LC/MS/MSによる解析の結果、いずれのデンプンにおいてもデンプン合成酵素が存在し、その他貯蔵タンパク質や酵素インヒビターが同定された。これら貯蔵タンパク質の内、米のプロラミン、トウモロコシのプロラミンおよび γ -ゼインはアミラーゼインヒビターファミリーに、サツマイモのスポラミンはプロテアーゼインヒビターファミリーに属していることが明らかとなった。貯蔵タンパク質は水に不溶性であり、同じく高疎水性物質である脂質がデンプンに存在することで、デンプンの熱的および粘度挙動に影響を与える要因となる

のではないかと推察した。

また、各デンプンから抽出した脂質の定性を行った結果、単純脂質では脂肪酸、複合脂質では米、トウモロコシおよび小麦はリン脂質を主体に、サツマイモおよびジャガイモは糖脂質が主体で、従来報告されているデンプンに存在する脂質と類似する結果となった。

V デンプン粒膜の存在およびその性状

デンプン中のタンパク質および脂質の存在状態について検討を行った。デンプン中のタンパク質は不溶性であることから、各デンプンを可溶化し、不溶画分を回収し、電子顕微鏡による観察を行った。いずれの試料も膜状の構造物が観察され、内部のデンプンが溶出された状態であった。そこで、フルオロセインイソチオシアネート (FITC) およびナイルレッドにて染色し共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。これらの試料はFITCに対し陽性反応を、ナイルレッドには陰性を示したことから、これらの膜はタンパク質で構成されていることが確認された。また、膜タンパク質をSDS-PAGE (Me+) に供し、LC/MS/MSにて同定を行ったところ、米デンプン中のタンパク質と同様の貯蔵タンパク質から構成されていた。

次に、各デンプンについてFITCおよびナイルレッドにて染色し共焦点レーザー顕微鏡にて観察したところ、デンプン粒子の表層にタンパク質および脂質が存在することが観察された。また、脂質は同表層に微細油滴として存在していた。先の膜の観察で脂質が検出されなかったのは、調製時の加熱によって脂質が溶解したためと推察した。デンプン粒の表層にタンパク質と脂質から構成される膜が存在することを初めて明らかにした。

デンプン粒膜の影響を確認するため、除タンパク質および脱脂処理した米デンプンを加熱処理し、溶解および不溶性のデンプン成分を分析した。その結果、三者のアミロースの溶解量には差異がみられなかったが、溶解画分のアミロペクチンでは除タンパク質デンプンの溶解量が他に比べ著しく大きかった。三者のアミロースの熱挙動が同一であることから、除タンパク質処理によってデンプン粒膜が脆弱化し、アミロペクチンの膨潤力への抗張力が低下し、このため膜の崩壊が促進されアミロペクチンの溶出量が大きくなったものと推察した。

以上、デンプン粒表層にタンパク質と脂質から構成される膜が存在することを初めて明らかにすると共に、同膜がデンプンの熱的および粘度挙動に大きく関与することを見出した。

VI デンプン粒に対する植物起源アミラーゼの認識機序の解析

微生物起源のアミラーゼではデンプンを認識・吸着する Starch Binding Domain (SBD) が存在し、SBD の構造と未糊化デンプン (生デンプン) の分解性の関係が知られている。しかし、植物起源アミラーゼでは SBD がなく、デンプンへの吸着についてその詳細が不明である。そこで、デンプン粒表層に検出されたアミラーゼインヒビター相同タンパク質の関与について検討を行った。まず、SBD の機能が弱く生デンプン分解性の小さい *Bacillus* 由来の α -アミラーゼを用い、各デンプンの分解性を比較したところ、米デンプンの分解性が最も大きく、ジャガイモデンプンが最も小さく、デンプンのタンパク質量と分解性は正の相関が認められた。また、大麦由来の β -アミラーゼを用いて米、サツマイモおよびジャガイモデンプンに作用させたところ同様の傾向を示した。次にデンプン粒膜タンパク質とアミラーゼの相互作用性について、アミラーゼ抗体を用いた抗原抗体反応にて解析した結果、*Bacillus* 由来、大麦由来のアミラーゼはアミラーゼインヒビターファミリータンパク質の 13kDa のプロラミンとの相互作用が確認された。そこで、米デンプンを除タンパク質処理し、同デンプンに大麦由来 β -アミラーゼを作用させた結果、分解性は除タンパク質処理によって約 16% 低下した。インヒビタータンパク質であるプロラミンを除去したデンプンの分解性が低下したことに疑問を持ち、次に先 (IV) にて同定したアミラーゼインヒビターファミリーに属する貯蔵タンパク質である米のプロラミン、トウモロコシの γ -ゼインおよびプロラミンと小麦の α -アミラーゼインヒビターとのアミノ酸配列をアライメントした結果、類似したアミノ酸配列を持つ領域が保存されていたが、阻

害活性中心は確認されなかった。このことからデンプン粒膜に存在するプロラミンは、アミラーゼと特異的な結合性を示すものの活性には影響を与えないことが明らかになった。これまで明らかにされてなかった SBD を持たない植物起源アミラーゼとの結合機序の一端を初めて明らかにした。

VII 総括

本研究の成果を以下に要約した。

デンプンはグルコースが重合した天然高分子化合物で、その特性から糊料、増粘剤、安定化剤およびゲル化剤などとして食品分野で広く用いられている。植物種によってデンプンの粒子形状や大きさをはじめ熱的および粘度 (糊化および老化) 挙動が異なり、これらの挙動についてはアミロース含量やアミロペクチンの微細構造 (分岐状態) の観点から論じられてきた。しかし、これらの指標の僅かな差で熱的および粘度挙動が大きく異なることに疑問を持ち、本論文では他の要因が関与することを推論し研究を進めた。その結果、デンプン粒の微量成分であるタンパク質および脂質が、熱的および粘度挙動に大きな影響を与えることを見出した。デンプン粒表層にはタンパク質を主体とする膜が存在し、脂質は微細油滴として存在することを実証した。タンパク質はデンプン粒の膨潤および糊化したデンプンの老化挙動に、脂質は後者の挙動に大きな影響を与えること明らかにした。デンプン粒膜タンパク質の主体が各植物の貯蔵タンパク質であることを見出し、さらに同タンパク質がアミラーゼインヒビターと類似の構造を持つことに着目し、詳細が不明であった植物起源アミラーゼのデンプン粒の結合機序の一端を明かにするなど、デンプンについて新見を得た。

審査報告概要

デンプンはグルコースが重合した天然高分子化合物で、その特性から糊料、増粘剤、安定化剤およびゲル化剤などとして食品分野で広く用いられている。植物種によりデンプンの粒子形状や大きさをはじめ熱的および粘度 (糊化および老化) 挙動が異なり、これらの挙動はアミロース含量やアミロペクチンの微細構造 (分岐状態) の観点から論じられてきた。しかし、これらの指標の僅かな差で熱的および粘度挙動が大きく異なることに疑問を持ち、本論文では他の要因が関与することを推論し研究を進めた。その結果、デンプン粒の微量成分であるタ

ンパク質および脂質が、熱的および粘度挙動に大きな影響を及ぼすことを見出した。デンプン粒の表層にタンパク質が膜として、脂質は微細油滴として存在すること、デンプン粒にタンパク質を主体とする膜が存在することを実証した。タンパク質はデンプン粒の膨潤および糊化したデンプンの老化挙動に、脂質は後者の挙動に大きな影響を与えること明らかにした。デンプン粒膜タンパク質の主体が各植物の貯蔵タンパク質であることを見出し、同タンパク質がアミラーゼインヒビターと類似の構造を持つことに着目し、詳細が不明であった植物起源アミ

ラーゼのデンプン粒の結合機序の一端を明らかにするなど、デンプンについて新知見を得た。以上は現場に即した実践的な研究であり、学術的にも評価が高い。よって

審査員一同は博士（農芸化学）の学位を授与する価値があると判断した。