

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

2017 年

塩野 弘二

| | |
|--|--------|
| 緒言..... | - 1 - |
| I. 各種デンプンの熱的および粘度挙動に与える要因の探索 | |
| 1. 試料および実験方法 | |
| 1.1. 試料..... | - 7 - |
| 1.2. ラピッドビスコアナライザー(RVA)による各種デンプンの熱的 および粘度挙動の解析..... | - 7 - |
| 1.3. 光学顕微鏡による各種デンプン粒の観察..... | - 7 - |
| 1.4. アミロース含量測定..... | - 8 - |
| 1.5. アミロペクチン側鎖長の測定..... | - 8 - |
| 1.6. デンプン粒に存在するタンパク質量の測定..... | - 8 - |
| 1.7. デンプン粒に存在する脂質量の測定..... | - 8 - |
| 2. 結果および考察 | |
| 2.1. 各種デンプンの成分分析..... | - 10 - |
| 2.2. 各種デンプンの熱的および粘度挙動の解析..... | - 12 - |
| 2.3. デンプンの成分と熱的および粘度挙動との相関解析..... | - 15 - |
| 3. 要約..... | - 17 - |
| II. デンプンに存在するタンパク質および脂質がデンプンの熱的 および粘度挙動に与える影響について | |
| 1. 試料および実験方法 | |
| 1.1. 試料..... | - 18 - |
| 1.2. デンプンからのタンパク質除去(除タンパク質処理)..... | - 18 - |
| 1.3. デンプンからの脂質除去(脱脂処理)..... | - 18 - |
| 1.4. 各処理デンプンのクマシーブリリアントブルー(CBB)による タンパク質染色..... | - 19 - |
| 1.5. 各処理デンプンのタンパク質量測定..... | - 19 - |
| 1.6. デンプンに存在するタンパク質および脂質がデンプンの膨潤力 および溶解率に与える影響..... | - 19 - |
| 1.7. RVAによる熱的および粘度挙動の解析..... | - 19 - |
| 1.8. デンプンゲルの性状解析..... | - 19 - |
| 1.8.1. 走査型電子顕微鏡(SEM)によるデンプンゲルの 内部構造観察..... | - 20 - |
| 2. 結果および考察 | |
| 2.1. デンプンからのタンパク質除去..... | - 21 - |
| 2.2. デンプンからの脂質除去..... | - 21 - |
| 2.3. デンプンに存在するタンパク質および脂質がデンプンの熱的 および粘度挙動に与える影響..... | - 23 - |

| | |
|---|--------|
| 3. 要約..... | - 30 - |
| III. デンプンに存在するタンパク質および脂質の解析 | |
| 1. 試料および実験方法 | |
| 1.1. 試料..... | - 31 - |
| 1.2. デンプンからのタンパク質抽出..... | - 31 - |
| 1.3. デンプンのタンパク質量測定..... | - 31 - |
| 1.4. ポリアクリルゲル電気泳動(SDS-PAGE)による解析..... | - 31 - |
| 1.5. LC/MS/MSによるデンプンに存在するタンパク質の同定..... | - 31 - |
| 1.6. デンプンからの脂質の抽出..... | - 32 - |
| 1.7. 薄層クロマトグラフィー(TLC)によるデンプンに存在する 脂質の定性..... | - 32 - |
| 2. 結果および考察 | |
| 2.1. デンプンに存在するタンパク質の解析..... | - 33 - |
| 2.2. デンプンに存在する脂質の解析..... | - 37 - |
| 3. 要約..... | - 40 - |
| IV. デンプン粒膜の探索とその性状 | |
| 1. 試料および実験方法 | |
| 1.1. 試料..... | - 41 - |
| 1.2. デンプン粒膜の調製..... | - 41 - |
| 1.3. SEMによるデンプン粒膜の観察..... | - 41 - |
| 1.4. デンプン粒膜におけるタンパク質および脂質の挙動..... | - 41 - |
| 1.5. デンプン粒膜に存在するタンパク質の解析..... | - 42 - |
| 1.6. デンプン粒におけるタンパク質および脂質の挙動..... | - 42 - |
| 1.7. デンプン粒膜がデンプンの性状に与える影響..... | - 42 - |
| 2. 結果および考察 | |
| 2.1. デンプン粒膜の観察と性状..... | - 43 - |
| 2.2. デンプン粒の観察..... | - 50 - |
| 2.3. デンプン粒膜がデンプンの性状に与える影響..... | - 55 - |
| 3. 要約..... | - 58 - |
| V. 植物起源アミラーゼによるデンプン吸着メカニズムの解析 | |
| 1. 試料および実験方法 | |
| 1.1. 試料..... | - 59 - |
| 1.2. <i>Bacillus</i> 由来 α アミラーゼを用いた各起源植物デンプンの 生デンプン分解性試験..... | - 59 - |
| 1.3. 大麦由来 β アミラーゼを用いた各起源植物デンプンの 生デンプン分解性試験..... | - 59 - |

| | |
|--|--------|
| 1. 4. 米デンプン粒膜タンパク質とアミラーゼの相互作用性試験 . | - 60 - |
| 1. 4. 1. 抗原抗体反応を用いた米デンプン粒膜タンパク質と アミラーゼの相互作用試験 | - 60 - |
| 1. 4. 2. 米デンプン粒膜タンパク質がアミラーゼによる 生デンプンの被分解性に与える影響 | - 61 - |
| 1. 5. 各起源デンプンのアミラーゼインヒビターファミリータンパク質 のアライメント解析 | - 61 - |
| 2. 結果および考察 | |
| 2. 1. 各アミラーゼによる生デンプン分解性試験 | - 62 - |
| 2. 2. 米デンプン粒膜タンパク質とアミラーゼの相互作用性試験 . | - 62 - |
| 2. 2. 1. 抗原抗体反応を用いた米デンプン粒膜タンパク質と アミラーゼの相互作用試験 | - 62 - |
| 2. 2. 2. 米デンプン粒膜タンパク質がアミラーゼによる生デンプンの 被分解性に与える影響 | - 65 - |
| 2. 3. 各起源デンプンのアミラーゼインヒビターファミリータンパク質 のアライメント解析 | - 65 - |
| 3. 要約 | - 68 - |
| 総括 | - 69 - |
| 参考文献 | - 74 - |
| 謝辞 | - 78 - |

緒言

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(Fig. 1)。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(Fig. 2)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。

Meyer は、グルコースが $\alpha 1,4$ 結合で重合し、らせん構造をとっているアミロースの存在を報告し¹⁾、その後 Schoch は $\alpha 1,6$ 結合で枝分かれしたアミロペクチンの分離に成功し²⁾⁻³⁾、その後 Peat がアミロペクチンは長さの異なる側鎖が存在することを報告し⁴⁾⁻⁵⁾、デンプンの主成分がアミロースとアミロペクチンからなることを提唱した。更にその報告を基に二国はデンプンのモデル図を提唱し⁶⁾、アミロペクチン側鎖が房状構造(クラスター構想)をとっていることを示唆し、Hizukuri がアミロペクチンのクラスター構造を証明した⁷⁾。更にこれら報告を基に、アミロペクチンは側鎖の最外殻側鎖で結晶構造をとることを Nakamura らが報告している⁸⁾(Fig. 3)。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を Whistler および Takahashi らが報告している⁹⁾⁻¹⁰⁾。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。

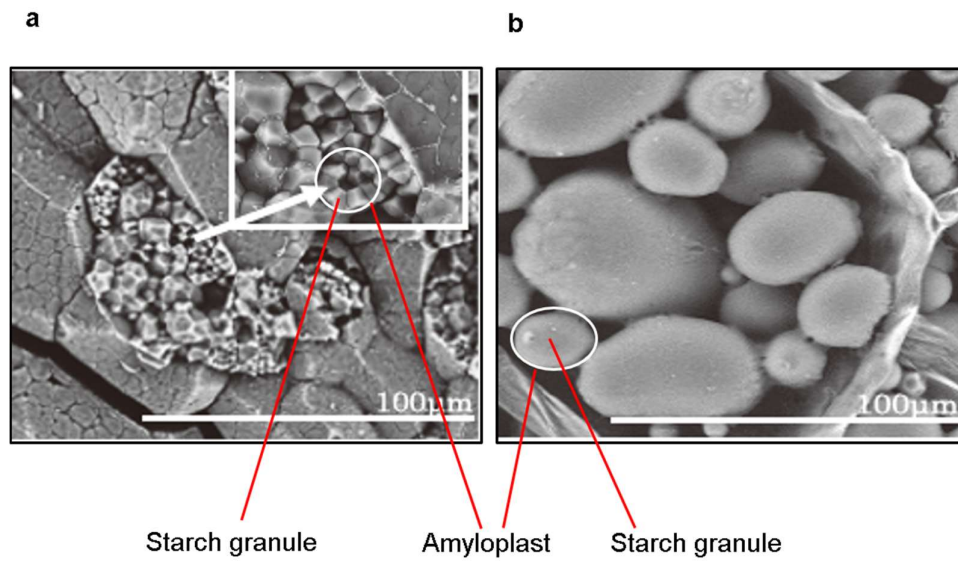


Fig.1 Observation of various amyloplasts and starch granules by scanning electron microscope
a: rice amyloplast and starch granule and b: potato amyloplast and starch granule.

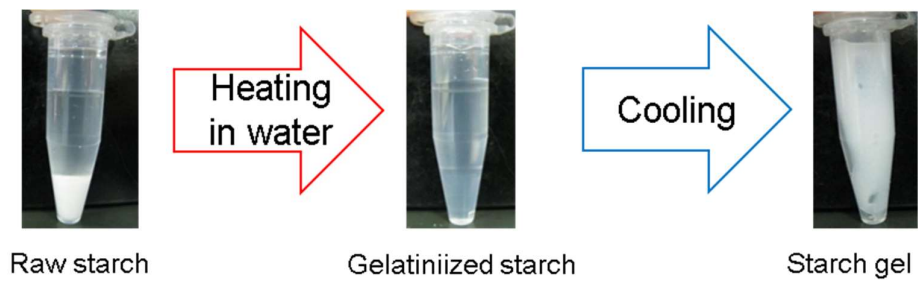


Fig.2 Thermal behavior of starch

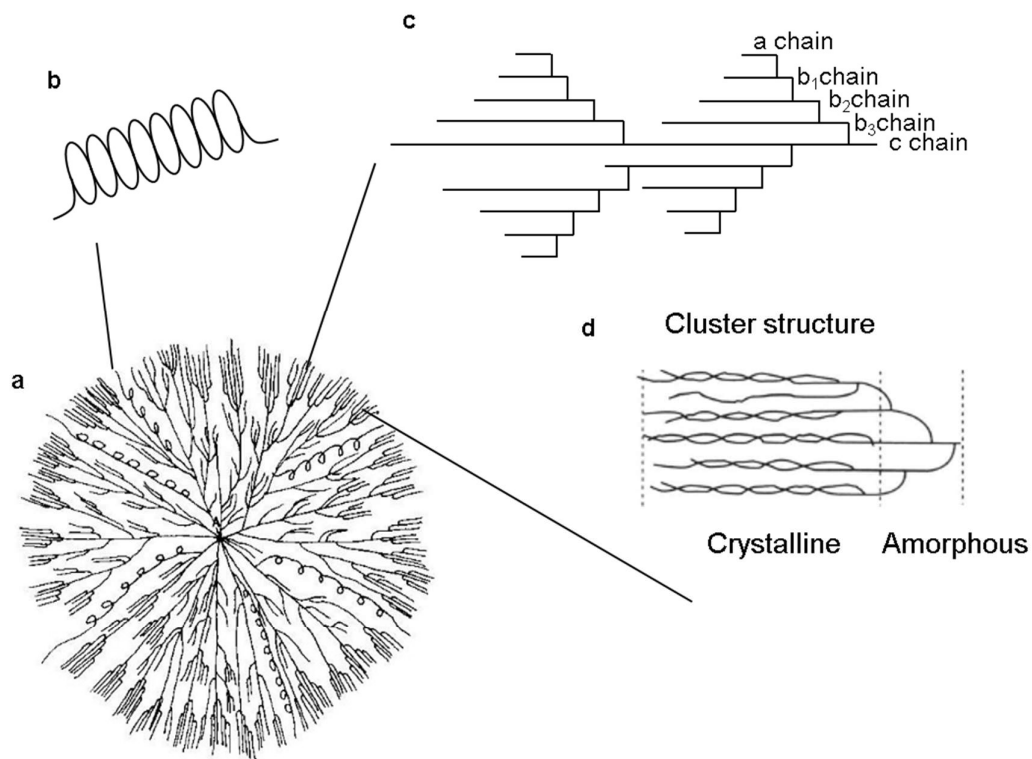


Fig.3 Starch, amylose and amylopectin model

a: Starch model of Nikuni, b: amylose model of schoch, c: amylopectin model of Hizukuri and d amylopectin cluser model of Nakamura.

従来報告されている^{11)~15)} 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 点のアミロース組成値と熱的および粘度挙動の相関を解析したところ、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 倍以上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り、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 (Fig. 4)。

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、デンプン粒にアミロースやアミロペクチンとは異なる成分からなる膜の存在を示唆した¹⁶⁾。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。

Skerritt らはデンプンにはアミロースやアミロペクチンの他にタンパク質を含むことを報告し¹⁷⁾、Swinkels らはタンパク質の他に脂質を含むことを報告した¹⁸⁾。Suurs らはジャガイモからタンパク質と脂質を定量し¹⁹⁾、Vasanthan らは植物起源によってタンパク質と脂質の含有量が異なることを報告している²⁰⁾。

野口らは、トウモロコシデンプンにおいてタンパク質を除去することにより、アミラーゼによる生デンプンの分解性が低下することを報告しており²¹⁾、デンプンに含まれる微量成分が糊化時の挙動、冷却しゲル化した際の物性およびアミラーゼによる生デンプンの分解性といったデンプンの性状に関与することが考えられる。

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、これらの特性に関与する要因の探索を行うとともに、これまでその存在が結論付けられていなかったデンプン粒膜の存在を検討し、デンプンの性状への関与を解析することとした。

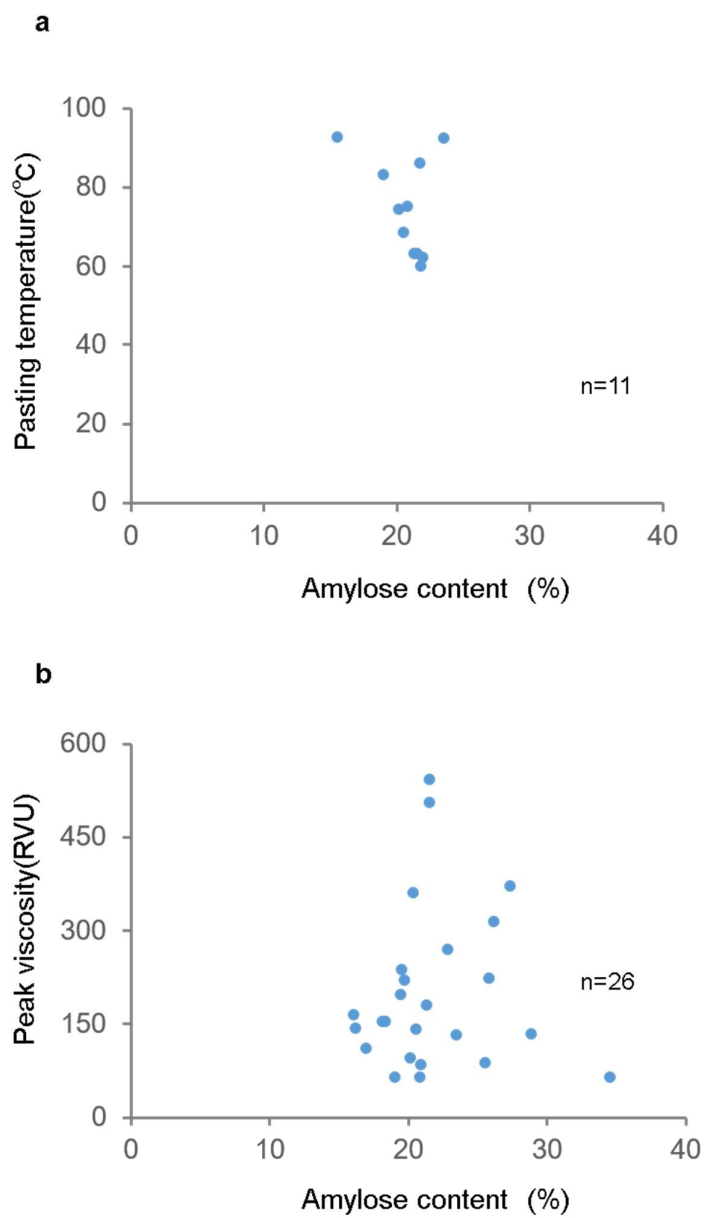


Fig. 4-1. Relationship between amylose content and thermal and viscosity behavior of various starches.

a: pasting temperature and b: peak viscosity

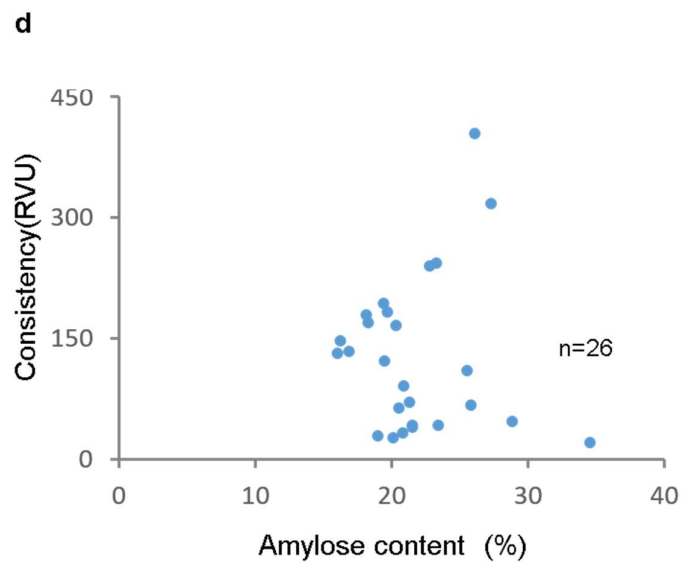
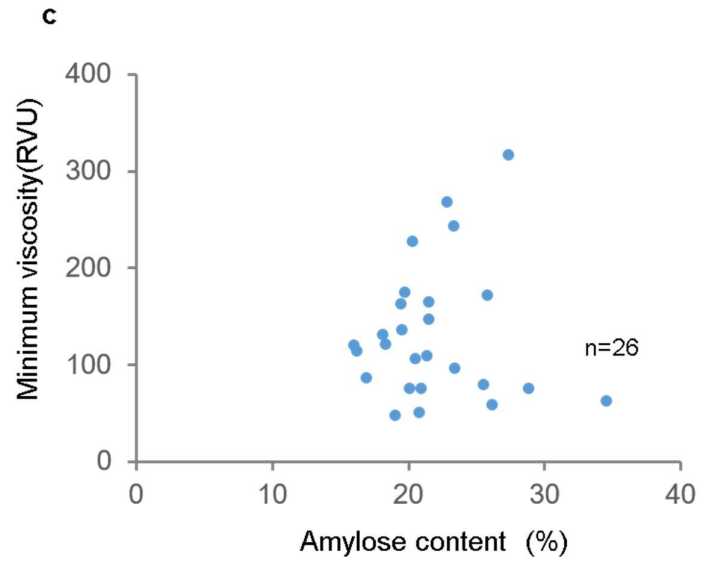


Fig. 4-2. Relationship between amylose content and thermal and viscosity behavior of various starches.

c: minimum viscosity and d: consistency

I. 各種デンプンの熱的および粘度挙動に与える要因の探索

今回用いる試料とこれまでデンプンの性状に影響があると言われているアミロース含量や粒子径、アミロペクチン側鎖長の構成比率を解析し、デンプンの熱的および粘度挙動との関係性を解析した。

1. 試料および実験方法

1.1. 試料

デンプンは米(SIGMA Aldrich 社)、トウモロコシ、小麦、サツマイモ(和光純薬社)およびジャガイモデンプン(ナカライテスク社)を用いた。全ての試料は 5 倍量の純水を加え、4℃下で 1 時間振盪後、遠心分離(9,000×g、5 分、4℃)後得られたデンプンに再び 5 倍量の純水を加え同様の操作を繰り返し、得られたデンプンを凍結乾燥機(VD-800R 型、タイテック社)にて乾燥し、以降の試験に供した。

1.2. ラピッドビスコアナライザー(RVA)による各種デンプンの熱的および粘度挙動の解析

デンプンの糊化粘度挙動の解析は、Pablo らの方法²²⁾を一部改良しラピッドビスコアナライザー(RVA: RVA-TecMaster Perten 社製)を用いて行った。デンプンに乾物重量換算で 8%(w/v)になるように純水を加え、試験に供した。測定プログラムは開始温度 50℃から毎分 6℃ずつ昇温させて 95℃にし、5 分間保温、最後に 50℃になるまで毎分 6℃ずつ降温させる温度プログラムで行った。パドルの回転速度は、開始から 10 秒まで 960rpm、その後 160rpm で測定した。得られた解析図より糊化開始温度、最高粘度、最低粘度および最終粘度をもとめ、最終粘度と最低粘度の差から老化の指標となるコンシステンシーを算出した。

1.3. 光学顕微鏡による各種デンプン粒の観察

各試料 10mg を量り取り、100 倍量の純水を加えた後、0.01%ヨウ素-0.1%ヨウ化カリウム溶液を 100 μ l 混合した。その後懸濁液をスライドガラスに滴下し、プレパラートにて封入後、光学顕微鏡(BZ-8100, KEYENCE 社製)を用いて各試料の形状および大きさを観察した。

1.4. アミロース含量測定

アミロース含量の測定は Williams らの方法²³⁾にて行った。すなわち各試料 10mg と 95%エタノール 100 μ l、1N 水酸化ナトリウム水溶液 700 μ l を加え、沸騰水浴中で 10 分加熱し試料を溶解させた。その後純水を 800 μ l 加えた。この溶液 50 μ l を分注し、1N 酢酸 50 μ l、純水 600 μ l、0.01%ヨウ素-0.1%ヨウ化カリウム溶液 100 μ l を加え、混合液の波長 620nm における吸光度をマイクロプレートリーダー(SH-1000, 日立ハイテック社製)にて測定し、アミロース含量を算出した。

1.5. アミロペクチン側鎖長の測定

Koizumi ら²⁴⁾の方法にて行った。すなわち各試料 2mg に純水 813 μ l と 0.625M 水酸化ナトリウム水溶液 37 μ l を加え、沸騰水浴中で 10 分加熱し試料を溶解させた。その後、100 μ l を分注し、0.625M 酢酸 10 μ l を加え、0.5M クエン酸緩衝液(pH3.5)を 25 μ l、イソアミラーゼ(*Pseudomonas* sp. 15284 由来, SIGMA-Aldrich 社)を 2 μ l 加え、酵素反応(170rpm、40℃、一晚)を行った。反応停止(100℃、5min)後、遠心分離(16,100 \times g、25℃、10min)を行い、上澄液を Φ 0.45 μ m フィルターにてろ過した。得られたろ液 20 μ l を High Performance Anion Exchange Chromatography・Pulsed Amperometric Detection(HPAEC-PAD 法)にて鎖長分析を行った。分析装置には、CarboPac PA1 Colum(Dionex 社)を使用し、検出器にはパルスドアンペロメトリック検出器(ED-703 pulse、GL SCIENCE 社)を用いた。溶媒 A:0.1M 水酸化ナトリウム、溶媒 B: 0.1M 水酸化ナトリウム(0.6M 酢酸ナトリウム・三水和物を含む)を用いて、流速 1ml/分でグラジエント条件は 10 分まで B 液 0%、その後 20 分までに B 液 30%、26 分までに 40%、37 分までに 50%、65 分までに 100%となるリニアグラジエント溶出にて分析を行った。

1.6. デンプン粒に存在するタンパク質量の測定

得られたデンプン粒に残存するタンパク質量は CN コーダーによって測定した。デンプン粒 500mg(乾重量)を CN コーダー MT-700Mark2 (ヤナコテクニカルサイエンス社、日本)に供し窒素含量を測定した。得られた窒素含量にタンパク質係数(米:N \times 5.95、トウモロコシ:6.25、小麦:5.70、サツマイモ、ジャガイモ:6.25)を乗し、デンプン 100g 当たりのタンパク質量に換算した。

1.7. デンプン粒に存在する脂質量の測定

試料 10g をスクリーキャップ付き遠心管に秤量し、クロロホルム：メタノール=2:1 (v/v) 混液を 30ml 加え、90℃で 1 時間加温したのち、遠心分離 (9,000×g、30℃、10 分) し、上澄液を回収した。この操作を 2 回繰り返す、得られた上澄液をろ過 (No. 5C、アドバンテック社) し、ろ液を分液ロートに移した。ろ液は Bligh らの方法²⁵⁾にて脂質を分画した。すなわち、ろ液にクロロホルム：メタノール：水=1:1:0.9 (v/v/v) になるようクロロホルムと水を加え、振とうした。静置後、下層 (クロロホルム) を回収した。この操作を再度行い、水溶性成分を除去し脂質抽出液とした。得られた脂質抽出液を遠心エバポレーター (CVE-3100、東京理化学器械社) にて減圧留去し、その重量を秤量し、全脂質量としてデンプン 100g あたりの脂質量に換算した。

2. 結果および考察

2.1. 各種デンプンの熱的および粘度挙動の解析

各起源のデンプンを RVA に供した結果、その熱的および粘度挙動はデンプンの起源によって大きく異なっていた (Fig. 5)。糊化開始温度 (°C) はトウモロコシおよび小麦はそれぞれ 85.1 および 92.4 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 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。また、液状化したデンプンが構造化 (老化) する挙動を反映するコンシステンシー (RVU) は米が 75.1 と最も高く、サツマイモ、小麦およびトウモロコシが続き、最も低かったジャガイモは 37.3 と米の半分程度であり、デンプンの熱的および粘度挙動はその起源によって大きく異なることが示された (Table 1)。

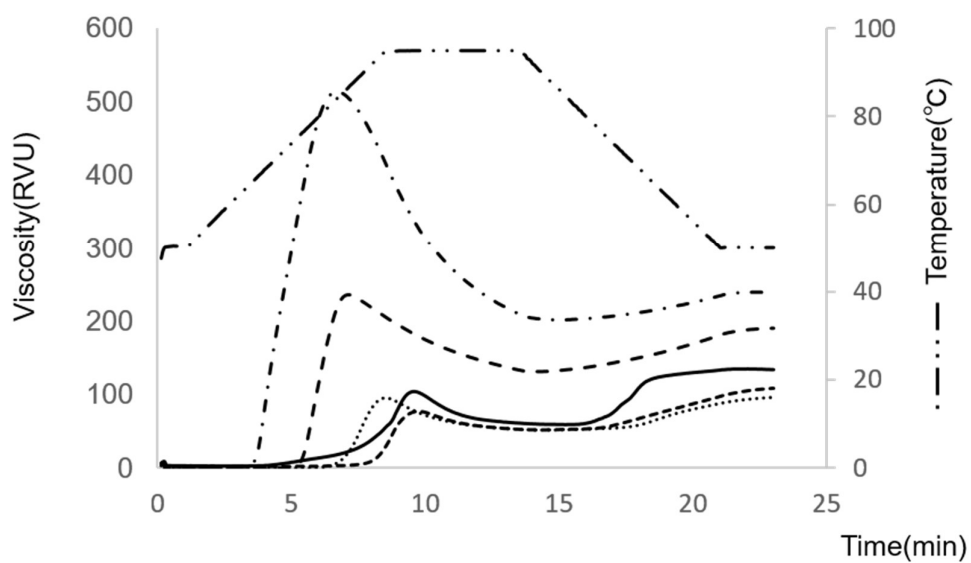


Fig. 5 Viscosity profile of various starch granules

— rice, maize, ----- wheat, ----- sweet potato and - · - · - potato.

Table 1 RVA parameters of various starches

| | Pasting temperature (°C) | Peak viscosity (RVU) | Minimum viscosity (RVU) | Consistency (RVU) |
|--------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|----------------------|
| Rice | 77.1 | 103.8 | 58.7 | 75.1 |
| Maize | 85.1 | 94.6 | 51.3 | 44.0 |
| Wheat | 92.4 | 77.5 | 52.0 | 57.0 |
| Sweet potato | 76.4 | 236.7 | 131.6 | 59.3 |
| Potato | 66.3 | 513.8 | 201.8 | 37.3 |

2.2. 各種デンプン粒の観察およびデンプンの成分分析

各種デンプンを光学顕微鏡観察した結果、デンプンの起源によってその形状や大きさが異なっており、形状は米、トウモロコシおよびサツマイモが多角形構造をとっており、小麦およびジャガイモは球形構造をとっていた (Fig. 6)。大きさは米が最も小さく、ジャガイモが最も大きく、トウモロコシ、小麦およびサツマイモはその中間程度であり、Lineback、Jane らおよび高橋と類似した結果^{26)~28)}となった。

各起源デンプンのアミロース含量(%)は小麦が 22%と最も高い値を示していた一方、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、起源間で大きな差異は見られなかった。アミロペクチン側鎖の構成割合は、起源ごとに違いが見られたが、米と小麦は最も側鎖の短い a 鎖の割合が高く、次に側鎖の短い b₁ 鎖の割合が低いといった傾向が見られ、米および小麦とトウモロコシ、サツマイモおよびジャガイモといった 2 つのグループに分類された (Table 2)。

デンプンに含まれるタンパク質 (mg/デンプン 100g) は起源によって異なり米が 67.3 と最も多く、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。デンプンに存在する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 100 g 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 (Table 3)。

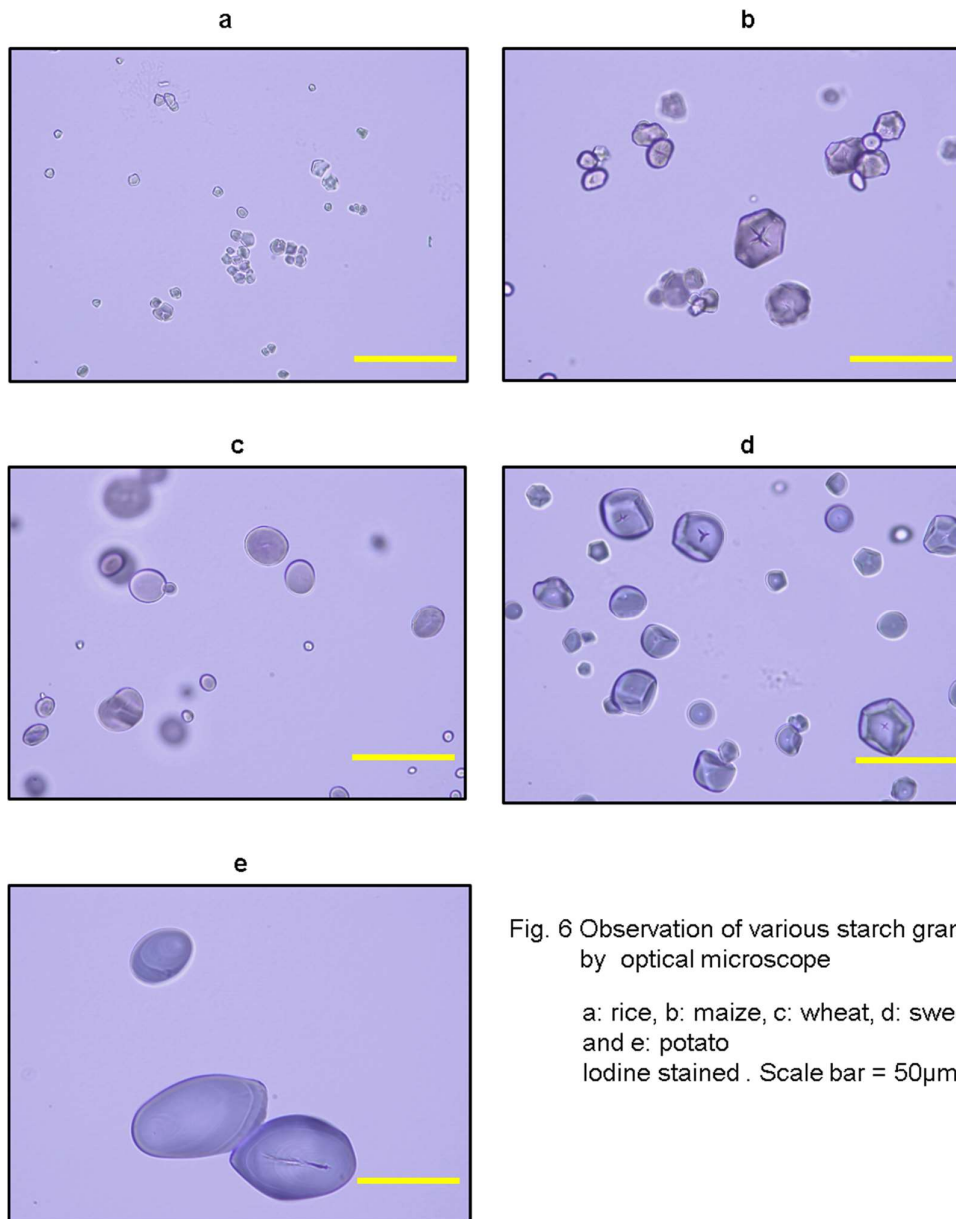


Fig. 6 Observation of various starch granules by optical microscope

a: rice, b: maize, c: wheat, d: sweet potato and e: potato
Iodine stained . Scale bar = 50 μ m

Table 2 Amylose content, particle size and content of amylopectin chain length of various starches

| | Amylose content (%) | Particle size (μm) | Content of amylopectin chain length (%) | | | |
|--------------|---------------------|---------------------------------|---|----------------|----------------|----------------|
| | | | a | b ₁ | b ₂ | b ₃ |
| Rice | 20 | 5 | 37.2 | 46.6 | 10.5 | 5.5 |
| Maize | 20 | 15 | 22.0 | 61.3 | 13.0 | 3.4 |
| Wheat | 22 | 24 | 34.0 | 52.1 | 10.9 | 2.9 |
| Sweet potato | 19 | 20 | 22.3 | 59.1 | 13.9 | 3.9 |
| Potato | 19 | 40 | 24.5 | 58.9 | 11.9 | 3.9 |

Table 3 Protein and lipid content in various starches

| | Protein content (mg/starch100g) | Lipid content (mg/starch 100g) |
|--------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Rice | 67.3 \pm 2.5 ^a | 371.3 \pm 43.2 ^a |
| Maize | 57.3 \pm 2.1 ^b | 218.7 \pm 21.4 ^b |
| Wheat | 37.0 \pm 1.0 ^c | 330.0 \pm 23.4 ^a |
| Sweet potato | 14.7 \pm 1.2 ^d | 99.7 \pm 5.0 ^c |
| Potato | 10.0 \pm 1.0 ^e | 101.7 \pm 38.4 ^c |

Results are the means calculated from three experimental replicates. Data marked with the same superscript letter within a column are not significantly different based on the results of Fisher's PLSD test ($p < 0.05$).

2.3. デンプンの成分と熱的および粘度挙動との相関解析

I 章 2.1. で得られたデンプンの熱的および粘度挙動と I 章 2.2. で解析したデンプンの成分との相関をピアソンの相関係数を用いて解析を行った結果、糊化開始温度はアミロース含量と関係性がみられたが、その他の項目と関係性はみられなかった。最高粘度はアミロース含量、粒子径、アミロペクチン側鎖長の最も短い a 鎖、タンパク質量および脂質量と関係性がみられた。最低粘度はアミロース含量、粒子径、アミロペクチンの a、b₂ 鎖、タンパク質量および脂質量と関係性がみられた。コンシステンシーでは粒子径、アミロペクチン a 鎖、タンパク質量および脂質量と関係性がみられた (Table 4)。最高粘度および最低粘度において、タンパク質と脂質は非常に強い負の相関を示したことから、デンプンが加熱により吸水・膨潤し、崩壊する挙動にタンパク質や脂質といったデンプンに微量に存在する成分が影響することが推察された。

Table 4 Correlation coefficients between viscosity parameter and physicochemical properties of starch

| | Amylose content | Particle size | a chain | b ₁ chain | b ₂ chain | b ₃ chain | Protein content | Lipid content |
|---------------------|--------------------|------------------|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|------------------|
| Pasting temperature | 0.88 | -0.42 | 0.32 | -0.21 | -0.19 | -0.49 | 0.48 | 0.45 |
| Peak viscosity | -0.77 | 0.73 | -0.53 | 0.47 | 0.39 | 0.06 | -0.84* | -0.82* |
| Minimum viscosity | -0.76 | 0.59 | -0.55 | 0.46 | 0.54 | 0.05 | -0.87* | -0.87* |
| Consistency | 0.33 | -0.86 | 0.64 | -0.72 | -0.28 | 0.48 | 0.59 | 0.53 |

* indicates significance at $p < 0.1$

3. 要約

起源の異なるデンプンを用いて熱的および粘度挙動を解析した結果、デンプンの起源によって糊化開始温度、最高粘度、最低粘度およびコンシステンシーといった熱的および粘度挙動は大きく異なっていた。そこで各起源デンプンの熱的および粘度挙動の糊化開始温度、最高粘度、最低粘度およびコンシステンシーと従来デンプンの性状に關与すると言われているアミロース含量、粒子径およびアミロペクチン側鎖長の構成比率との相関性を解析した結果、これら項目だけではデンプンの性状の差異を決定づけることは困難であり、他の要因が存在することを示唆した。デンプンに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ことから各起源デンプンのタンパク質および脂質量を測定した結果、米、トウモロコシおよび小麦デンプンはタンパク質量、脂質量共に多く、サツマイモおよびジャガイモデンプンは少ない結果が得られた。そこで各起源デンプンの熱的および粘度挙動との相関を解析したところ、デンプンに存在するタンパク質量や脂質量は最高粘度および最低粘度と非常に強い負の相関を示した。以上より、従来デンプンの性状の際はアミロース含量、粒子径、アミロペクチン側鎖長の構成比率といった微細構造が大きく關与すると言われているが、新たにデンプンに存在するタンパク質や脂質がデンプンの性状に關与することが示唆された。

II. デンプンに存在するタンパク質および脂質がデンプンの熱的および粘度挙動に与える影響について

先にてデンプンに存在するタンパク質および脂質がデンプンの熱的および粘度挙動に関与することが推察されたため、これら成分がデンプンの性状に与える影響を解析することとした。なお、本章ではデンプンに存在するタンパク質および脂質量が多かった米デンプンをモデルとして用いた。

1. 試料および実験方法

1.1. 試料

I 章 1.1. にて調製した米デンプンを用いて以降の試験に供した。

1.2. デンプンからのタンパク質除去(除タンパク質処理)

Shujun らの方法²⁹⁾を一部改良した。すなわち米デンプンに 0.1%水酸化ナトリウム溶液を 100ml 加え、180rpm、4℃の条件で一晩振とうしたのち、遠心分離(9,000×g、20℃、10 分)し沈殿と上澄液に分離した。得られたデンプンに純水 100ml を加え 180rpm、4℃で 1 時間振とう後、遠心分離(9,000×g、20℃、10 分)し、デンプンを回収した。この操作を上澄液の pH が中性になるまで繰り返し行った。得られたデンプンを凍結乾燥機(タイテック社)にて乾燥し、除タンパク質米デンプンとした。

1.3. デンプンからの脂質除去(脱脂処理)

米デンプン 10g をスクリーキャップ付き遠心管に秤量し、クロロホルム：メタノール：水=2:1 (v/v) 混液を 30ml 加え、30℃で 1 時間振とうしたのち、遠心分離(9,000×g、30℃、10 分)し、上澄液を回収した。この操作を 2 回繰り返し、得られた上澄液をろ過(No. 5C、アドバンテック社)し、ろ液を分液ロートに移し、さらにクロロホルム：メタノール：水=1:1:0.9 (v/v/v) になるようクロロホルムと水を加え、振とうした。静置後、下層(クロロホルム)を回収した。この操作を再度行い、水溶性成分を除去し脂質抽出液とした。得られた脂質抽出液を遠心エバポレーター(CVE-3100、東京理化器械社)にて減圧留去し、秤量した。

脱脂したデンプンは風乾後、減圧乾燥を行い脱脂米デンプンとした。

1. 4. 各処理デンプンのクマシーブリリアントブルー (CBB) による タンパク質染色

各処理デンプン 100mg に 0. 25% CBB-R を含む 50% メタノール-10% 酢酸溶液を 1ml 添加し、30 分静置した。その後遠心分離 (16, 000×g、4℃、1 分) を行い上澄液を破棄した。得られた沈殿に 50% メタノール-10% 酢酸溶液を 1ml 添加し、攪拌後、遠心分離 (16, 000×g、4℃、1 分) を行い上澄液を破棄した。この操作を 5 回繰り返し、過剰な CBB を除去した。得られた沈殿は 1ml の純水に懸濁し、色調を観察した。

1. 5. 各処理デンプンのタンパク質量測定

得られたデンプンに残存するタンパク質量は I 章 1. 6. に準じ、CN コーダーによって測定した。

1. 6. デンプンに存在するタンパク質および脂質がデンプンの膨潤力および 溶解率に与える影響

デンプンの膨潤力、溶解率の測定は Min らの方法³⁰⁾を一部改良して行った。デンプン 500mg (乾物重量) を 50ml 容遠心チューブに秤量し、純水 25ml を加え、アルミブロック恒温層 (DTU-2CN、タイテック社) を用いて 60、70、80℃ で 30 分攪拌しながら加温した。懸濁液を遠心分離 (9, 000×g、30℃、30 分) し上澄液と沈殿物に分離し、沈殿物の重量を「Wa」、凍結乾燥機 VD-800R 型 (タイテック社) による乾燥後の重量を「Wb」、上澄液の凍結乾燥後の重量を「Wc」とした。次式 (1) および (2) にてそれぞれ吸水力および溶解率を算出した。

$$(1) \text{吸水力 (g/g)} = W_a / W_b \quad (2) \text{溶解率 (\%)} = W_c / 0. 5 \times 100$$

1. 7. RVA による熱的および粘度挙動の解析

各処理デンプンの熱的および粘度挙動は I 章 1. 5. に準じ、解析した。

1. 8. デンプンゲルの性状解析

各処理デンプンゲルの色調および物性測定は風見らの方法³¹⁾を一部改変して行った。各処理デンプンの糊化粘度挙動の解析にて得られた糊液をプラスチック

クシャーレ(Φ3.5cm、高さ1cm)に流し込み放冷(25℃、20分)後、ふたをし、4℃にて24時間静置してゲルを作製した。ゲルの透明度は、分光測色計CM-5(コニカミノルタ社)にて不透明度を測定した後、透明度を算出した。

1.8.1. 走査型電子顕微鏡(SEM)によるデンプンゲルの内部構造観察

デンプンゲルの内部構造観察は風見らの方法³¹⁾を一部改変して行った。Ⅱ章1.6.1にて作製したゲルを5mm角に裁断し、2%(v/v)グルタルアルデヒド溶液に1晩浸漬させ、試料を前固定した。前固定後の試料は0.2Mリン酸緩衝液(pH7.2)に15分浸漬させた。この操作を3回繰り返し、余分なグルタルアルデヒドを除去した。その後、試料を2%(v/v)四酸化オスミウム溶液に1晩浸漬し、後固定した。後固定後の試料を50、70、80、90、95%(v/v)エタノール溶液に15分ずつ浸漬後、無水エタノールに15分、2回浸漬させ脱水操作を行った。脱水後の試料はt-ブチルアルコールに30分、2回浸漬させ、-4℃にて急冷凝固させたのち凍結乾燥機E2030(日立社)にて乾燥処理を行った。乾燥試料を割断し、割断面をイオンスパッターE101(日立社)にて白金パラジウムを蒸着後、走査型電子顕微鏡S-4800(日立社)を使用し加速電圧1.0kVの条件にてゲルの内部構造観察を行った。

2. 結果および考察

2.1. デンプンからのタンパク質除去

各処理デンプンを CBB にて染色したところ、未処理と比較し脱脂処理では染色度合いに大きな差異は見られなかったが、除タンパク質処理を行うことで CBB によるデンプンの染色度合いが大きく低下した (Fig. 7)。そこで CN コーダーを用いてデンプンに存在するタンパク質量 (mg) を測定したところ、未処理デンプンはデンプン 100g あたり 67.3 であったが除タンパク質処理では 19.4 となり除タンパク質処理によっておよそ 70% のタンパク質が可溶化したことが明らかとなった。一方脱脂処理したデンプンのタンパク質量は 64.7 とタンパク質の可溶化量はおよそ 3.9% とわずかであった (Table 5)。

2.2. デンプンからの脂質除去

クロロホルム:メタノール混液によるデンプン 100g あたりの脂質抽出量 (mg) は 191.0 となりデンプンに存在する全脂質のおよそ 50% が除去された。また 0.1% NaOH 溶液による脂質の抽出量は 10.7 となり、0.1% NaOH 溶液による脂質の抽出量は 10.7 と全脂質のおよそ 2.9% と少なかった (Table 5)。

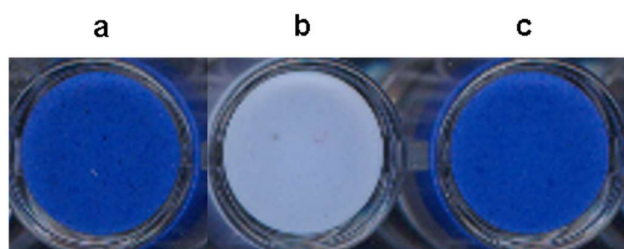


Fig. 7 Observation CBB stained each treated rice starch granules

a: control (untreated rice starch), b: deproteinated rice starch and
c: defatted rice starch

Table 5 Protein and Lipid contents in each treated rice starch granule

| | Protein content (mg/starch 100g) | Lipid content (mg/starch 100g) |
|---------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Control | 67.3 ± 2.5^a | 371.3 ± 43.2^a |
| Deproteinized | 19.0 ± 1.0^b | 360.0 ± 3.2^a |
| Defatted | 64.7 ± 1.0^a | 180.3 ± 16.1^b |

Results are the means calculated from three experimental replicates.
Data marked with the same superscript letter within a column are not significantly different based on the results of Fisher's PLSD test ($p < 0.05$).

2.3. デンプンに存在するタンパク質および脂質がデンプンの熱的および粘度挙動に与える影響

各処理デンプンの各温度による膨潤力(g/g)は、コントロールにて温度の上昇に伴って膨潤度の上昇が確認された。また、除タンパク質デンプンおよび脱脂デンプンでは、60℃ではコントロールと差異はみられなかったが、70 および 80℃で有意に高い膨潤力を示し、80℃においては、除タンパク質デンプンは 15.1 と約 1.8 倍、脱脂デンプンは 10.3 とコントロールの約 1.2 倍高い膨潤力を示した。80℃における両処理デンプン粒ともにコントロールに比べ高い膨潤力を示したことから、デンプンに存在するタンパク質および脂質はデンプン粒の膨潤を抑制する機能を持ち、特にタンパク質が強い影響を示すことが推察された。また、溶解性(%)においても両処理デンプン粒は高い溶解性を示し、80℃において、コントロールの 2.7 に対し、タンパク質除去デンプンは 7.8 と約 2.9 倍、脱脂デンプンは 5.8 で約 2 倍高い値となり膨潤力と同様の傾向となった (Fig. 8)。Kim らは、デンプン粒の表層を覆うように脂質が存在することで、デンプン粒の疎水性度が高まり、デンプン粒の膨潤力が妨げられることを推察している³²⁾。本報告の脱脂による米デンプン粒の膨潤力、溶解性の上昇はデンプン粒の疎水性度が低下することに起因するものと考えられた。このことからデンプン粒には疎水性の高いタンパク質表層に存在していることが推察され、この疎水性タンパク質が除去されることでデンプン粒の膨潤力や溶解性が上昇したものと推察した。以上のことから、米デンプンに存在するタンパク質および脂質は加熱による膨潤を抑制する機能を持つことが推察され、その影響はタンパク質の影響が大きいことが明らかとなった。

各処理デンプンを RVA に供した結果を Fig. 9 および Table 6 に示した。除タンパク質処理によって糊化開始温度は 4.0℃低下し、糊化開始およびデンプンが膨潤する昇温過程において除タンパク質処理によって米デンプンの粘度波形が大きく変化した。脱脂処理では糊化開始温度は 1.6℃低下し、昇温時の粘度上昇もやや低温側にシフトし、これらの変化は除タンパク質処理に比べ小さかったが、最高粘度(RVU)は除タンパク質処理によって未処理デンプンの 1.1 倍と増加し、脱脂処理によって 0.9 倍に低下した。また、最高粘度時の温度は未処理デンプンおよび脱脂処理デンプンでは 95℃であったが、除タンパク質処理デンプンでは 92.7℃と低下した。最高粘度に達するまでの熱量を未処理を 1 とした相対値で算出した結果、除タンパク質処理デンプンは 0.65 と 35%の低下が見られた。一方脱脂処理ではその値は 0.95 と未処理と大きな差異は見られなかった。デンプン粒のタンパク質がデンプンの膨潤を抑制する要因であること、膨潤量と膨潤温度の変化からデンプンの固相から液相への熱的挙動に大きな影響を及

ぼすことが明らかになった。脱脂処理によって膨潤の挙動が未処理デンプンに比べやや低温域に移行したが、その変化は少なく、また最高粘度時の温度に影響がみられなかった。また、脱脂処理より、除タンパク処理した米デンプンの方が、吸水が促進、糊化開始温度および最高粘度時の温度が低下したことから、脂質よりもタンパク質が糊化および粘度挙動に与える影響が大きいことが明らかとなった。

糊化したデンプンの液相状態を反映する最低粘度(RVU)は、未処理デンプンが58.6、両処理デンプンは約50とやや低下したが大きな差異はみられなかった。タンパク質および脂質はデンプンの糊化状態の粘度に大きな影響を及ぼさないことが明らかになった。

いずれのデンプンも、RVAの冷却過程において85℃付近から粘度上昇がみられ、未処理デンプンでは66℃付近まで急激に増加した。一方、除タンパク質および脱脂処理によってその後の粘度増加は緩慢になり、特に脱脂処理では粘度上昇が小さく、その最終粘度(RVU)は未処理デンプンに比べ23%低下した。RVAの冷却による粘度の増加は、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。Ohashiらは糊化した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を報告しており³³⁾、脱脂処理で粘度増加が大きく減少したことは、デンプン粒の脂質が糊化したデンプンの老化に影響を及ぼしていることを示唆するものである。一方、除タンパク質処理での脂質減少は約5%と僅かであり、同処理デンプンの冷却過程での粘度増加の大きな減少の要因が脂質のみでないことが推察された。米デンプンにおける液状の糊化デンプンの老化にデンプン粒に存在するタンパク質が大きく関与することが推察され、デンプンは老化によって疎水性が高くなり不溶化することから、デンプンに存在するタンパク質の疎水的な相互作用がデンプンの老化を促進することが推察された。

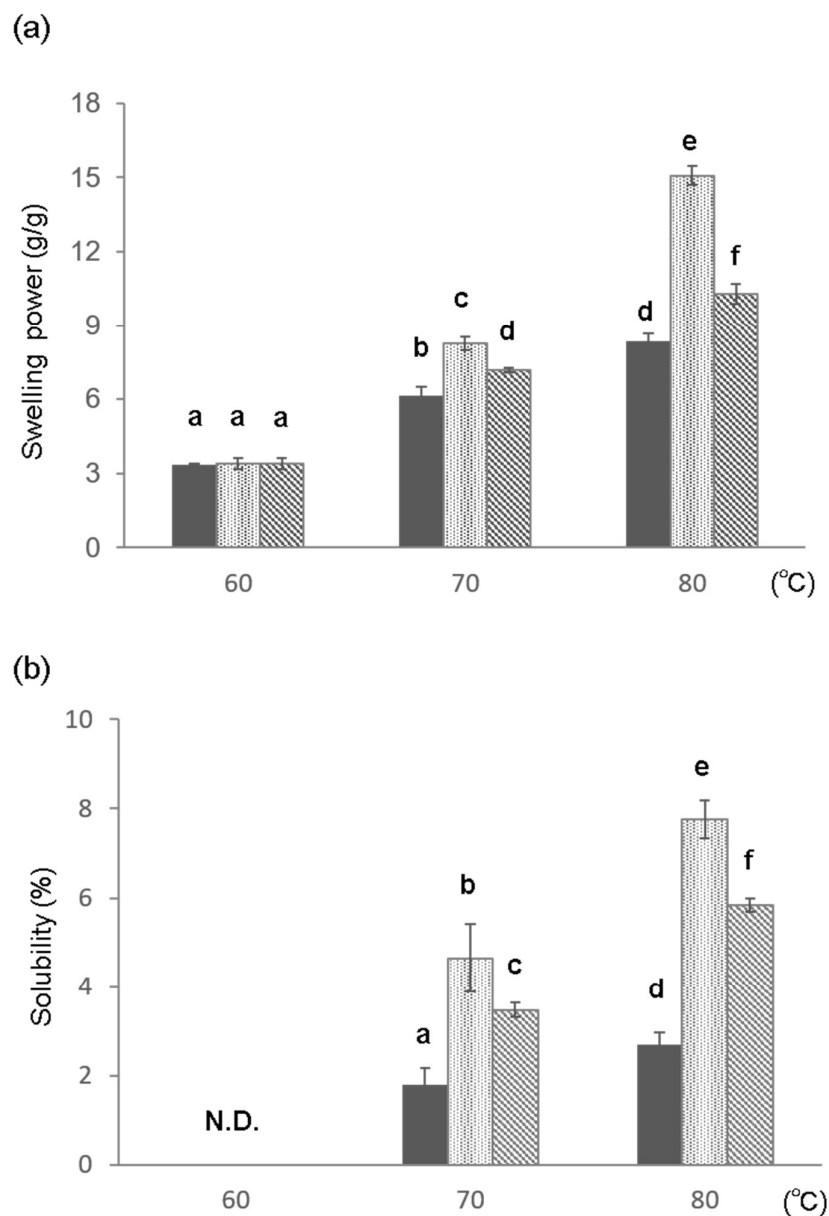


Fig. 8 Swelling power(a) and solubility(b) of Various treatment rice starch

■ : control, ▨ : deproteinized and ▩ : defatted rice starch

N.D. means Not Detected.

Results are the means calculated from three experimental replicates. Data marked with the same superscript letter within a column are not significantly different based on the results of Fisher's PLSD test ($p < 0.05$).

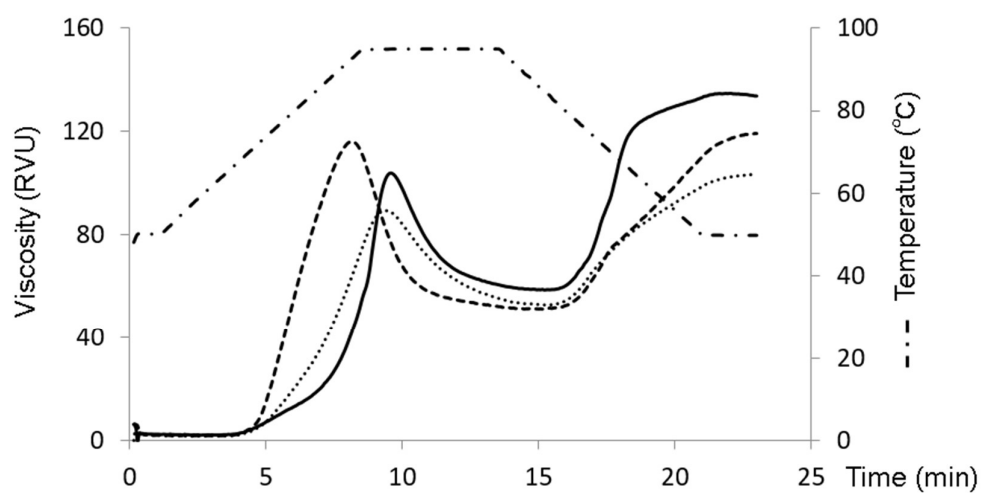


Fig. 9 RVA profile of various treatment rice starch

— Control - - - - - Deproteinized rice Defatted rice

Table 6 RVA parameters of various treatment rice starch

| | Pasting temperature (°C) | Peak viscosity | | | Minimum viscosity (RVU) | Consistency (RVU) |
|---------------|--------------------------|----------------|------|-----------------|-------------------------|-------------------|
| | | (RVU) | (°C) | Relative joule* | | |
| Control | 77.1 | 103.4 | 95.0 | 1.00 | 58.6 | 75.1 |
| Deproteinized | 73.1 | 115.9 | 92.7 | 0.69 | 51.2 | 67.9 |
| Defatted | 75.5 | 89.3 | 95.0 | 0.95 | 52.8 | 50.3 |

*Calculate calorie as control is 1

ゲルの性状について、透明度(%)はコントロール、脂質除去、タンパク質除去でそれぞれ 39.7、80.6、36.9 となり、タンパク質除去ではゲルの透明度は上昇し、脂質除去では低下した。また、硬さ(gw/cm²)においては 6.9、5.3、9.8、となりタンパク質を除去したゲルは硬さが低下し、脂質除去では上昇することが明らかとなった(Fig. 10、Table 7)。タンパク質を除去することでゲルが軟化する機構は報告されていないが、デンプン中のタンパク質の除去により膨潤力が上昇し、糊化が促進されたことで軟らかいゲルを形成する要因ではないかと推察した。脱脂処理において、膨潤力はタンパク質除去と同様に未処理と比べ上昇していたことから、ゲルの性状に関しても類似した結果になると考えられたが、予想に反する結果となった。このようなゲルの性状の差異はデンプンゲルの内部構造の差異に起因するものと推察した。

そこでデンプンゲルの割断面を作成し、その内部構造を観察した。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(Fig. 11)。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。

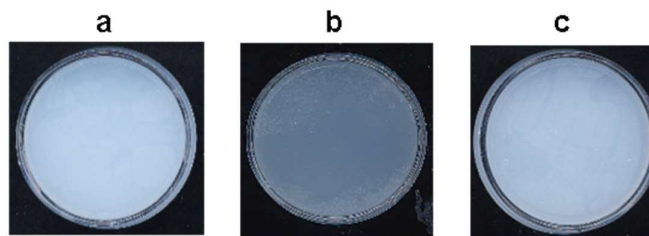


Fig. 10 Observation of various treated rice starch gel

Each rice starch gels were prepared RVA, and then were stored at 4°C for 1day.

a: control, b: deproteinized rice starch gel and c: defatted rice starch gel

Table 7 Comparison of gel characteristic

| | Transparency (%) | Hardness (gw/cm ²) |
|---------------|------------------|--------------------------------|
| Control | 40.6 | 7.2 ± 0.2 ^a |
| Deproteinized | 80.1 | 5.3 ± 0.1 ^b |
| Defatted | 37.3 | 9.8 ± 0.2 ^c |

Measurement of hardness condition was one bite measurement.

Results are the means calculated from three experimental replicates. Data marked with the same superscript letter within a column are not significantly different based on the results of Fisher's PLSD test ($p < 0.05$).

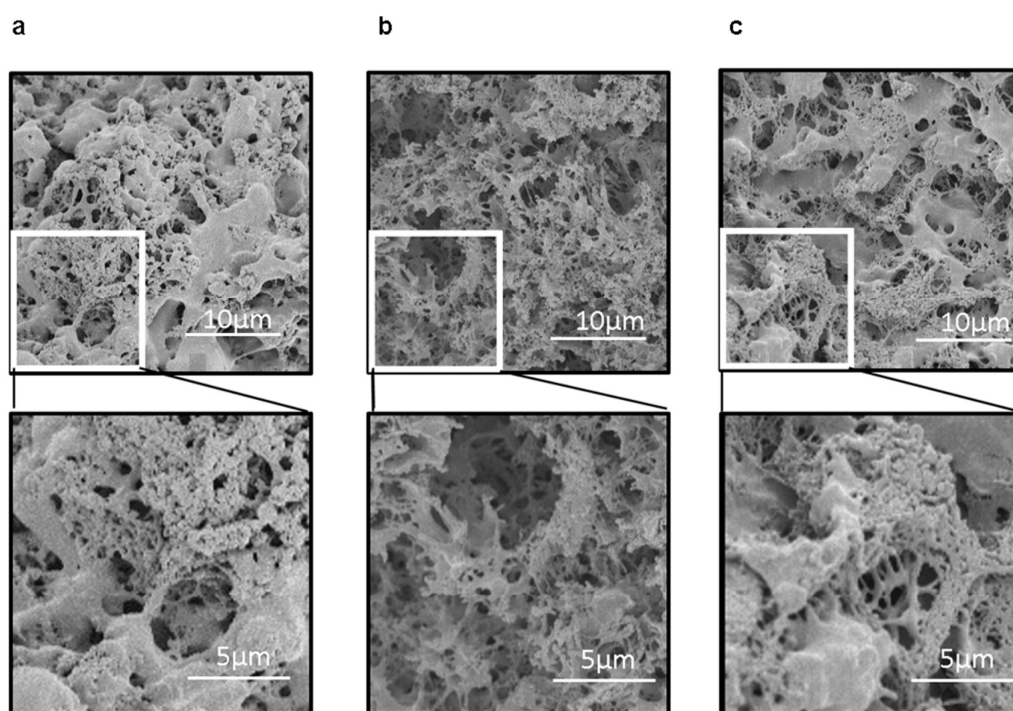


Fig. 11 Observation of gel internal structure of various treated rice starch
by scanning electron microscope

a: control, b: deproteinized and c: defatted starch

3. 要約

デンプンに存在するタンパク質および脂質がデンプンの熱的および粘度挙動に与える影響を米デンプンを用いて解析した。0.1%NaOH 溶液処理を行うことで米デンプンのタンパク質は70%が除去された。またクロロホルム:メタノール=2:1 (v/v) 混液によって50%の脂質がデンプンから除去された。除タンパク質および脱脂処理した米デンプンは加熱による膨潤力および溶解性が上昇し、デンプンに存在するタンパク質や脂質がデンプンの性状に影響を与えることが明らかとなり、デンプンの加熱による膨潤や溶解性を抑制する機能を有していることが推察された。

次に、熱的および粘度挙動を解析するため各処理デンプンをRVAに供し解析した。未処理と比較し各処理を行った米デンプンはRVAの波形が大きく変化した。糊化開始温度は両処理により低下し、温度上昇に伴う粘度の上昇も低温側にシフトした。最高粘度は除タンパク質処理により上昇、脱脂処理によって低下した。最低粘度および最終粘度は両処理により低下し米デンプンの熱的および粘度挙動にタンパク質や脂質が大きく関与することが明らかとなった。

次にデンプン糊液からゲルを調製し、その性状を解析した。未処理と比較し、除タンパク質処理した米デンプンゲルは透明感のあるゲルを形成し、その透明度は未処理の約二倍の値を示した。一方脱脂処理した米デンプンゲルの透明度は未処理と差異はなかった。硬さを測定したところ、未処理と比較し、除タンパク質処理では柔らかくなり脱脂処理では固くなる傾向を示した。このような米デンプンゲルの性状変化はゲルの内部構造に変化が生じていることに起因すると推察し、デンプンゲルの内部構造を観察した。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。除タンパク質処理した米デンプンは他の処理と比較し、タンパク質が大きく減少していることから、この平滑面はタンパク質を含んだ構造物であることが推察され、タンパク質がデンプンゲルのネットワークを覆うように存在することで、デンプンゲルの透明度や物性に影響を与えていることが示唆された。

Ⅲ. デンプンに存在するタンパク質および脂質の解析

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の関与が明らかとなったため、デンプンに存在するタンパク質および脂質の解析を行うこととした。

1. 試料および実験方法

1.1. 試料

I 章 1.1. にて調製した各起源デンプンを用いて以降の試験に供した。

1.2. デンプンからのタンパク質抽出

II 章 1.2. の方法に準じて各起源デンプンからタンパク質を抽出した。得られた上澄液は 3,500 カットの透析膜を用いて純水にて一昼夜透析を行った。透析後の液は凍結乾燥を行い、抽出タンパク質とした。

1.3. デンプンのタンパク質量測定

デンプン粒に残存するタンパク質量は I 章 1.6. に準じ、CN コーダーによって測定した。

1.4. ポリアクリルゲル電気泳動(SDS-PAGE)による解析

SDS-PAGE は Laemmli の方法³⁵⁾に従って行った。III 章 1.2. にて得られた試料にサンプル処理液(0.1%(w/v) ブロモフェノールブルー、3%(w/v) ドデシル硫酸ナトリウム、60% glycerol、3%(v/v) 2-メルカプトエタノールを含む 30mM Tris-HCl (pH6.8) 緩衝液を 2:1 の混合比になるように添加し、100℃で 5 分間加熱後、氷中にて冷却し、冷却したサンプルをアプライした。アクリルアミド濃度 5~20% (w/v) アクリルアミドゲル(ATTO 社)を使用し、20mA/枚で電気泳動した。なお、分子量マーカーには XL-Ladder Broad range(アプロサイエンス社製)を用いた。泳動後のゲルは 0.25%CBB-R を含む 50%メタノール-10%酢酸溶液で染色し、50%メタノール-10%酢酸溶液にて脱色した。

1.5. LC/MS/MS によるデンプンに存在するタンパク質の同定

Ⅲ章 1.4. にて得られた各タンパク質バンドを切り出し、30%アセトニトリルを含む 25mM 重炭酸アンモニウム溶液にて脱色後、10mM DTT を含む 25mM 重炭酸アンモニウム溶液による還元、55mM ヨードアセトアミドを含む 25mM 重炭酸アンモニウム溶液による SH 基のアルキル化を行った後、Sequencing Grade Modified Trypsin(Promega 社) 2 μ g/ml 20 μ l にて 37°C、12 時間インキュベートした。その後 0.5% トリフルオロ酢酸を含む 50%アセトニトリル溶液にて酵素反応停止後、遠心濃縮機にて濃縮操作を行い、0.45 μ m フィルター濾過後 HPLC

Agilent 1260 Infinity series-MS/MS 6563 Accurate-MASS Q-TOF LC/MS(Agilent Technologies 社)にて分析した。分析カラムは InertSustain®C18 3 μ m 1.0×100mm(GL sciences 社)を使用し、インジェクション量 5 μ l、流速 70 μ l/min、カラム温度 40°Cの条件で行った。溶離液は A 液:0.1%ギ酸 B 液:0.1%ギ酸を含むアセトニトリルを使用し 0-3.00 分 A 98%、3.00-33.00 分 A 10%、33.00-38.00 分 A 10%、38.00-38.01 分 A 98%のグラジエント条件で分析した。得られたマスペクトルは MASCOT による検索を行いタンパク質の同定を行った。なお、データベースは NCBI nr を使用した。

1.6. デンプンからの脂質の抽出

各起源デンプンからの脂質の抽出はⅡ章 1.6. と同様の操作にて抽出した。

1.7. 薄層クロマトグラフィー(TLC)によるデンプンに存在する脂質の定性

Ⅲ章 1.6. にて得られた脂質をクロロホルムで 5% (w/v) になるように溶解させ、遠心分離にて得られた上澄み 2 μ l (脂質量として 100 μ g) を TLC プレート Silica gel 60(メルク社)にアプライした。単純脂質はヘキサン:エーテル:酢酸=80:30:1、複合脂質はクロロホルム:メタノール:水=62:25:4 を展開溶媒に用いて展開した。展開後のプレートに 50%硫酸を噴霧し、160°Cで 10 分加熱後、脂質のスポットを検出した。

2. 結果および考察

2.1. デンプンに存在するタンパク質の解析

0.1%NaOH にてタンパク質を抽出したデンプンに残存するタンパク質量を測定した結果、未処理デンプンと比較し全てのデンプンでタンパク質の減少が見られ、デンプンからタンパク質が抽出されていることが分かった。また、その減少率(%)はデンプンの起源によって異なり、米が約 70%と最も多く、次いでサツマイモ、ジャガイモとなり、トウモロコシおよび小麦は少なかった(Table 8)。抽出したタンパク質を SDS-PAGE に供した結果、各起源のデンプンより抽出したタンパク質は全て 80kDa~10kDa の範囲で複数のタンパク質バンドに分離された(Fig. 12)。次に各タンパク質バンドを LC/MS/MS に供し、タンパク質同定を試みた結果、米で 4 つ、トウモロコシ、小麦、サツマイモおよびジャガイモで 3 つずつのタンパク質の同定に成功し、米では Granule-bound starch synthase(b and R1)、Glutelin(R2、R3)、Prolamin(R4)、トウモロコシでは Granule-bound starch synthase precursor(M1)、Gamma zein(band 2)、Prolamin (band 3)、小麦では Granule-bound starch synthase precursor(W1)、Globulin 3(W2)、Alpha-amylase inhibitor(W3)、サツマイモでは Granule-bound starch synthase precursor(SP1)、Sporamin B (SP2)、Sporamin (SP3)、ジャガイモでは Granule-bound starch synthase isoform X2(P1)、Kunitz type inhibitor A (P2)、Cysteine protease inhibitor 1(P3)が同定された。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。また、得られた同定結果から Uniprot(<http://www.uniprot.org/>) を使用し、タンパク質のアノテーションを行った結果、米の Prolamin、トウモロコシの Prolamin および Gamma zein は小麦の Alpha-amylase inhibitor と同様のアミラーゼインヒビターファミリーに、サツマイモの Sporamin およびジャガイモの Cysteine protease inhibitor 1 はジャガイモの Kunitz type inhibitor と同様の貯蔵タンパク質に分類される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。デンプンに存在するタンパク質は貯蔵タンパク質および酵素インヒビターを主として構成され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。

Table 8 Amount of protein remaining on various starch granules after deproteinized treatment

| | Control | Deproteinaized |
|--------------|-------------------------|-------------------------|
| Rice | 67.3 ± 2.5 ^a | 19.0 ± 1.0 ^f |
| Maize | 57.3 ± 2.1 ^b | 40.3 ± 0.6 ^g |
| Wheat | 37.0 ± 1.0 ^c | 29.0 ± 2.0 ^h |
| Sweet potato | 14.7 ± 1.2 ^d | 6.0 ± 1.0 ⁱ |
| Potato | 10.0 ± 1.0 ^e | 5.7 ± 0.6 ⁱ |

Results are the means calculated from three experimental replicates. Data marked with the same superscript letter within a column are not significantly different based on the results of Fisher's PLSD test ($p < 0.05$).

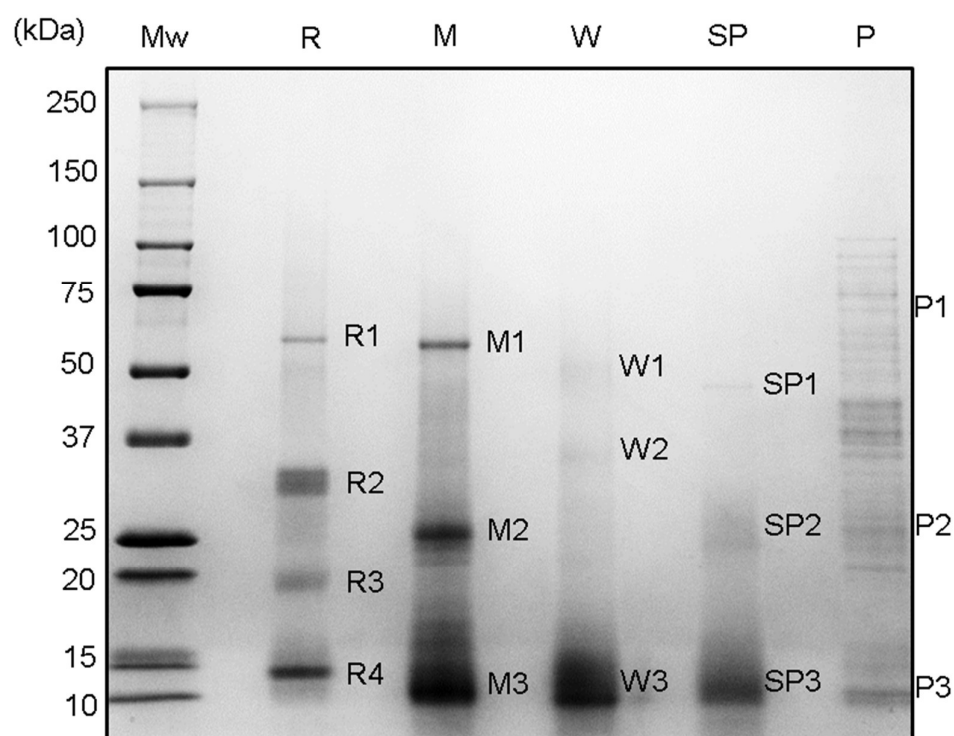


Fig. 12 Analysis of existed protein on various starch by SDS-PAGE.

R: rice, M: maize, W: wheat, SP: sweet potato and P: potato were resolved on a 5-20 % gradient polyacrylamide gel and visualized with coomassie brilliant blue dye. Molecular weight markers were loaded for reference (Mw), and their sizes are indicated along the left edge of the gel (kDa). Numbers indicate individual protein bands that were excised for further analysis.

Table 9 Identification of existed protein on various starch with LC/MS/MS. Individual protein bands identified following SDS-PAGE were excised and digested with trypsin before analysis. The proteins were identified by comparing their resulting mass spectra to NCBInr database using a MASCOT search engine.

| | Band | Identified protein | Mass | Data base accession number | Matched peptides | MASCOT score |
|--------------|------|-------------------------------|-------|----------------------------|------------------|--------------|
| Rice | R1: | Granule-bound starch synthase | 66928 | gi 7798551 | 99 | 154 |
| | R2: | Glutelin | 56410 | gi 119395188 | 73 | 63 |
| | R3: | Glutelin | 56727 | gi 225710 | 79 | 284 |
| | R4: | Prolamin | 16690 | gi 1842176 | 20 | 356 |
| Maize | M1: | Granule-bound starch synthase | 67252 | gi 33321047 | 173 | 420 |
| | M2: | Gamma zein | 23080 | gi 168695 | 16 | 56 |
| | M3: | Prolamin | 16740 | gi 195658073 | 16 | 56 |
| Wheat | W1: | Granule-bound starch synthase | 67044 | gi 4760582 | 37 | 105 |
| | W2: | Globulin | 66652 | gi 215398470 | 32 | 88 |
| | W3: | Alpha-amylase inhibitor | 15688 | gi 65993781 | 8 | 52 |
| Sweet potato | SP1: | Granule-bound starch synthase | 67044 | gi 291461608 | 5 | 43 |
| | SP2: | Sporamin B | 24220 | gi 109156192 | 21 | 43 |
| | SP3: | Sporamin | 20130 | gi 604324 | 5 | 27 |
| Potato | P1: | Granule-bound starch synthase | 67160 | gi 565353704 | 20 | 586 |
| | P2: | Kunitz type inhibitor A | 24925 | gi 696196777 | 23 | 105 |
| | P3: | Cysteine protease inhibitor 1 | 16596 | gi 20141344 | 7 | 34 |

2.2. デンプンに存在する脂質の解析

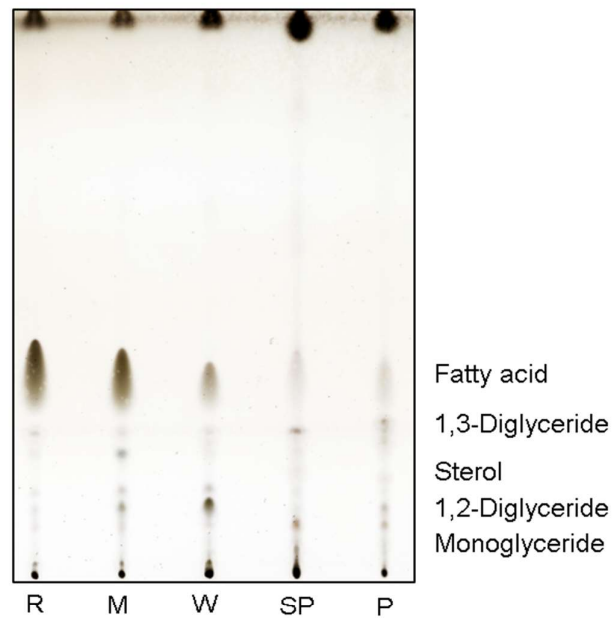
各起源デンプンからクロロホルム:メタノール=2:1 混液を用いて脂質を抽出した結果、いずれのデンプンにおいて脂質の減少が見られた。脂質の減少率は起源によって異なっており、最も多かった小麦は約 70%であり、その他のデンプンは 50%前後であった (Table 10)。次に抽出した脂質を TLC を用いて展開した結果、中性脂質、極性脂質共に全てのデンプンにおいて複数のスポットが検出された。中性脂質は脂肪酸、モノグリセリド、ジグリセリドおよびステロールが定性され、中でも脂肪酸が主体であった。極性脂質は糖脂質、リン脂質が定性され、米、トウモロコシおよび小麦はリン脂質を、サツマイモおよびジャガイモは糖脂質を主体に構成されており (Fig. 13)、間野らの報告^{36)、37)}と類似した結果になった。

Table 10 Amount of lipid remaining on various starch granules after defatted treatment

| | Control | Defatted |
|--------------|---------------------------|---------------------------|
| Rice | 371.3 ± 43.2 ^a | 180.3 ± 37.8 ^d |
| Maize | 218.7 ± 21.4 ^b | 103.3 ± 16.0 ^c |
| Wheat | 330.0 ± 23.4 ^a | 100.0 ± 5.3 ^c |
| Sweet potato | 99.7 ± 5.0 ^c | 55.3 ± 7.0 ^e |
| Potato | 101.7 ± 38.4 ^c | 51.3 ± 23.1 ^e |

Results are the means calculated from three experimental replicates. Data marked with the same superscript letter within a column are not significantly different based on the results of Fisher's PLSD test ($p < 0.05$).

a



b

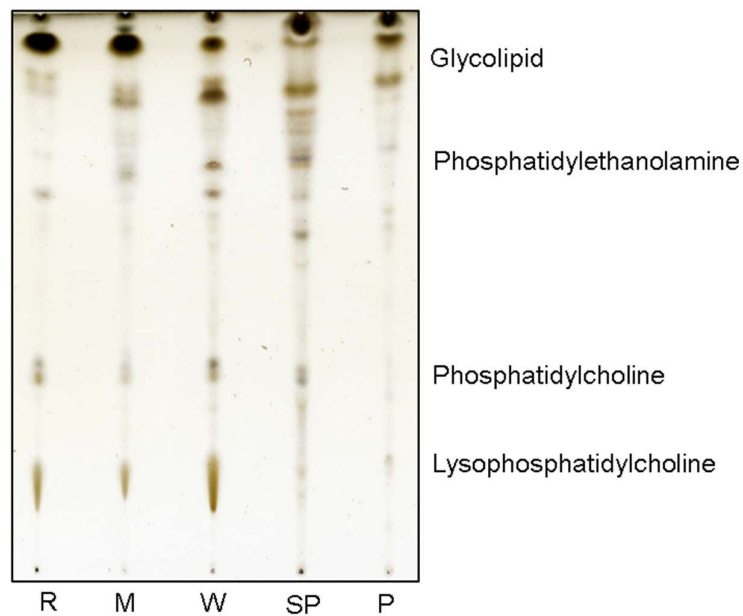


Fig. 14 Qualitative analysis of lipid existed starch by thin layer chromatography

a: neutral lipid and b: polar lipid

Developing solvent of neutral lipid: hexane: ether: acetic acid= 80: 30: 1

polar lipid: chloroform: methanol: water= 62: 25: 4

R: rice, M: maize, W: wheat, sp: sweet potato and P: potato

3. 要約

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。

IV. デンプン粒膜の探索とその性状

II 章 2. 3. にてデンプンを加熱糊化させた際のゲルにタンパク質を含む構造物の存在が確認され、デンプン粒の膜の存在を示唆したことから、各起源のデンプンを用いてデンプン粒膜の探索を行った。

1. 試料および実験方法

1. 1. 試料

I 章 1. 1. にて調製した各起源デンプンを用いて以降の試験に供した。

1. 2. デンプン粒膜の調製

各デンプン 100mg(乾重量)に純水 20ml を加え、100℃で 30 分加温しデンプンを糊化させた。その後遠心分離(2,000×g、30℃、15 分)を行い上澄液は破棄した。この操作を 2 回繰り返し、デンプン粒の内部成分を除去した。遠心分離後の沈殿物は無水アルコールにて乾燥させ、デンプン粒膜を調製した。また、調製した膜の重量を測定し、各デンプン粒からの存在率を算出した。

1. 3. SEM によるデンプン粒膜の観察

IV 章 1. 2. にて調製したデンプン粒膜を両面テープを張り付けた試料台に乗せ、イオンスパッター(日立社)にて白金パラジウムを蒸着させた。その後、走査型電子顕微鏡 S-4800(日立社)を用いて加速電圧 1.0kV の条件でデンプン粒膜を観察した。

1. 4. デンプン粒膜におけるタンパク質および脂質の挙動

デンプン粒膜 10mg を純水 200μl に懸濁させ、そこに一級アミノ基染色試薬である 2mg/ml フルオレセインイソチオシアネート溶液(FITC:同仁化学研究所社)および中性脂質染色試薬である 2mg/ml ナイルレッド溶液(和光純薬社)をそれぞれ 20μl 添加し、暗所で 12 時間染色した。その後、遠心分離(9,000×g、25℃、1 分)を行い上澄液は破棄した。得られた沈殿物は純水にて洗浄を行い、余分な染色試薬を除いた。その後、沈殿物を純水中に分散させ、スライドガラスに滴下し、カバーガラスにて封入後、共焦点レーザー顕微鏡 FV1200(オリンパス社)

を用いて励起波長 488 および 559nm にて観察した。

1. 5. 米デンプン粒膜に存在するタンパク質の解析

IV 章 1. 2. にて調製した米デンプン粒膜 100mg に 25mM DTT を含む 2%(w/v) SDS 溶液 200 μ l 添加し 100℃で 30 分攪拌しながら加熱した。その後、遠心分離(16,000×g、30℃、1 分)を行い、上澄液を回収した。沈殿には同様の操作を行い再び上澄液を回収した。得られた上澄液は 3,500 カットの透析膜を用いて純水にて一昼夜透析を行った。透析後の液は凍結乾燥を行い、抽出タンパク質とした。抽出したタンパク質はIII 章 1. 4. の方法に準じ SDS-PAGE (Me+)にてタンパク質を分離し、得られたタンパク質バンドはIII 章 1. 5. の方法に準じてタンパク質の同定を行った。

1. 6. デンプン粒におけるタンパク質および脂質の挙動

I 章 1. 2. にて調製した各デンプン 10mg を用いてIV 章 1. 4. の方法に準じデンプン粒におけるタンパク質および脂質の挙動を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

1. 7. デンプン粒膜がデンプンの性状に与える影響

II 章 1. 2. および II 章 1. 3. にて調製した除タンパク質および脱脂米デンプンを用いてデンプン粒膜がデンプンの性状に与える影響を解析した。各処理デンプン 10mg に純水 1ml を加え、100℃で 30 分加熱した。その後遠心分離(16,000×g、30℃、1 分)を行い熱水可溶性画分と不溶性画分に分離した。可溶性画分を回収し、不溶性画分は同様の操作を行った。得られた各画分は凍結乾燥を行った。凍結乾燥後の試料は 8M の尿素溶液を加え 100℃で 30 分加熱し完全溶解させたのち、溶液中の全糖量をフェノール硫酸法にて算出した。また、各画分はゲル濾過クロマトグラフィーにて分画し糖組成を解析した。分析カラムは TSKgel GMPW_{XL}- TSKgel G5000PW_{XL} 連結カラムにて分画した。溶離液には 8M 尿素溶液を使用し流速 0.1ml/min にて溶出した。分取条件は 60 分溶出後、0.4ml/tube の条件で 40 本分画した。回収した画分の全糖量をフェノール硫酸法にて定量し、アミロペクチンとアミロースの溶出挙動を確認した。また、分子量マーカーとして、Dextran(average mol 2,000,000、500,000、124,000 SIGMA-ALDRICH 社)を用いた。

2. 結果および考察

2.1. デンプン粒膜の観察と性状

いずれのデンプン粒においても加熱糊化させた際に熱水に溶解しなかった残渣が得られた。この残渣を SEM にて観察した結果、いずれの起源にデンプンにおいても、デンプン粒の一部が破裂し、内容物が流出した挙動のみられる膜状の構造物が観察された (Fig. 14)。Tao らおよび Junrong らはトウモロコシ、ジャガイモデンプンにおいてデンプン粒に熱水に不溶性の物体の存在を明らかにし^{38), 39)}、膜の存在が示唆されているが、本報告で新たにコメ、コムギ、サツマイモデンプンにおいてもデンプン粒の膜の存在を明らかにし、デンプン粒は起源に関わらずその表層に膜を有していることが推察された。

Ⅲ章 2.1. にてデンプン粒には不溶性のタンパク質が存在していることを明らかにし、デンプン粒膜にこれらタンパク質が存在していることが推察されたため共焦点レーザー顕微鏡によるタンパク質と脂質の挙動を解析した。すると、いずれのデンプン粒膜においても明視野で観察できるデンプン粒膜の形に沿って FITC の陽性反応が確認され、ナイルレッドは陰性反応を示した (Fig. 15-1、15-2)。このことからデンプン粒の膜にはタンパク質が存在し、デンプン粒の表面構造を維持しているものと推察した。一方脂質は、デンプン粒膜の調製過程において溶脱したためナイルレッドで陰性反応を示したものと推察し、タンパク質と脂質ではデンプン粒膜における存在様相が異なることが示唆された。

調製したデンプン粒膜は加熱によって内部が溶出しているため、デンプン粒膜に存在するタンパク質はデンプン粒の表層由来のタンパク質であると推察し、デンプンに存在するタンパク質量が最も多かった米デンプンをモデルとし、デンプン粒膜を調製後、タンパク質を抽出、解析した。米デンプン粒膜から抽出したタンパク質を SDS-PAGE (Me+) に供した結果、4 つのタンパク質バンドに分離され、そのバンドパターンはⅢ章 2.1. にて明らかにした米デンプンから抽出したタンパク質と同様のバンドパターンを示した (Fig. 16)。次に分離されたタンパク質バンドを切り出し、タンパク質同定を行った結果、Granule-bound starch synthase (R1)、Glutelin (R2、R3)、Prolamin (R4) が同定され、デンプン粒から抽出したタンパク質と同様のタンパク質が同定された (Table 11)。以上のことから、これまでその存在が結論付けられていなかったデンプン粒膜について、タンパク質を含む膜状の構造物がデンプン粒に存在することを見出し、米デンプンにおいて、このデンプン粒膜に存在するタンパク質はデンプン粒の表層に局在するタンパク質から構成されていることを見出した。更に、これらタンパク質がデンプン粒を覆うように存在することで、デンプン粒の性状に影響を与

えるものと推察した。

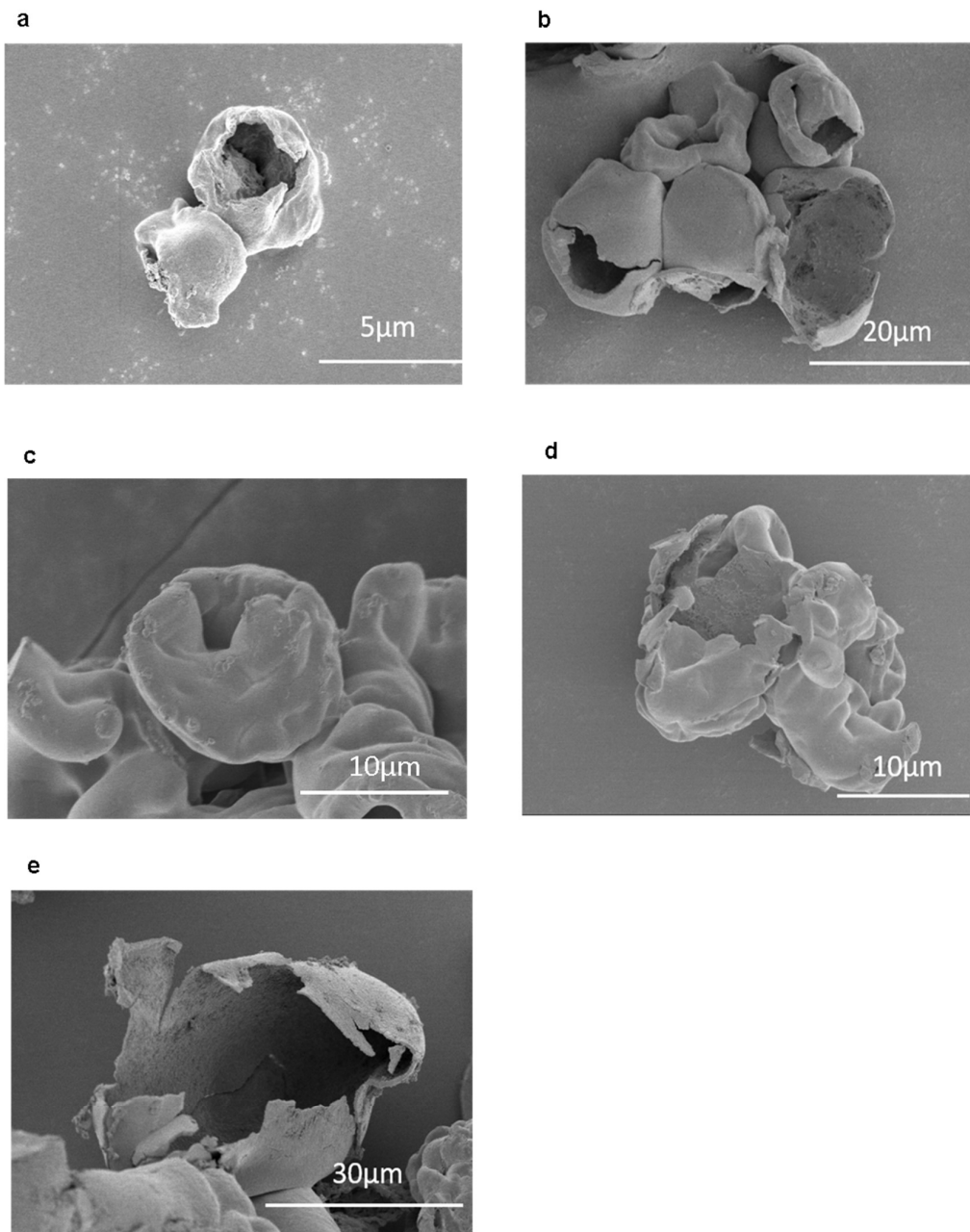


Fig. 14 Observation of various starch granule membranes by scanning electron microscope
 a: rice, b: maize, c: wheat, d: sweet potato and e: potato.

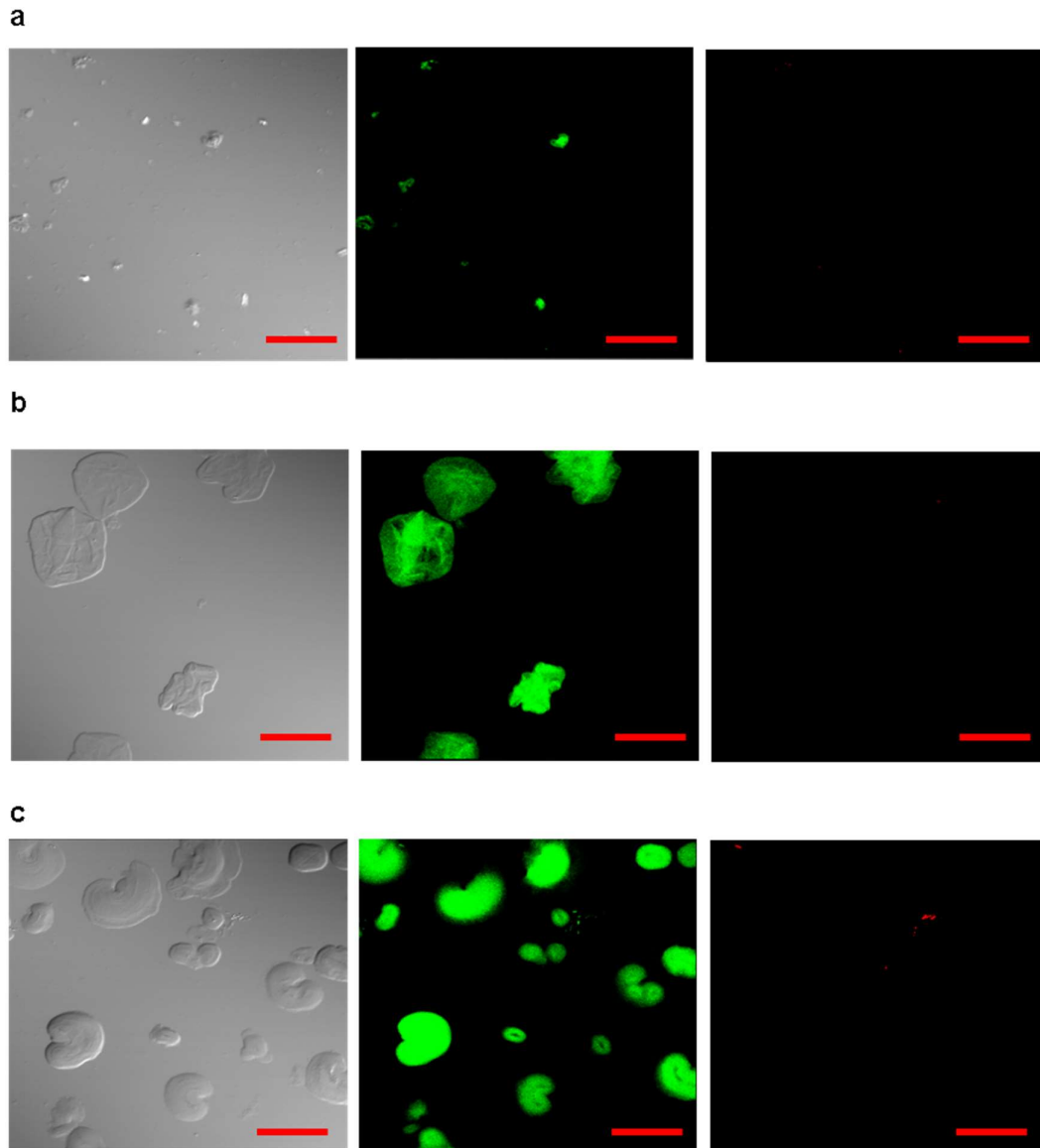


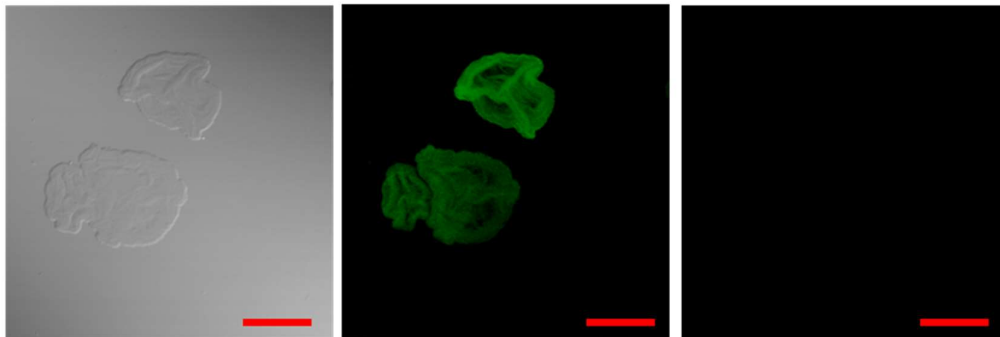
Fig. 15-1 Observation of various starch granule membranes by confocal laser scanning microscopy.

a: Rice, b: Maize and c: Wheat. Various starch granule membranes were dyed with 0.2% fluorescein isothiocyanate (FITC) and 0.2% Nile red solutions. Left: light field, center: FITC stained, right: Nile red stained.

FITC was primary amine stained dye and Nile red was neutral lipid stained dye.

Scale bar = 50 μm

d



e

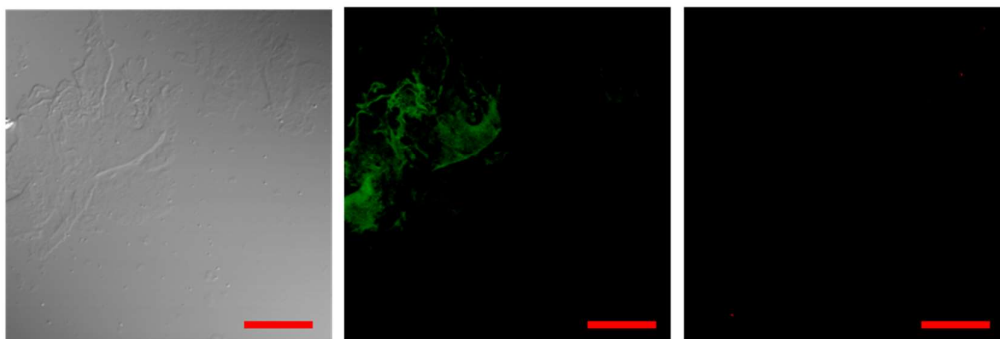


Fig. 15-2 Observation of various starch granule membranes by confocal laser scanning microscopy.
d: sweet potato and e: potato. Various starch granule membranes were dyed with 0.2% fluorescein isothiocyanate (FITC) and 0.2% Nile red solutions. Left: light field, center: FITC stained, right: Nile red stained.
FITC was primary amine stained dye and Nile red was neutral lipid stained dye.
Scale bar = 50 μ m

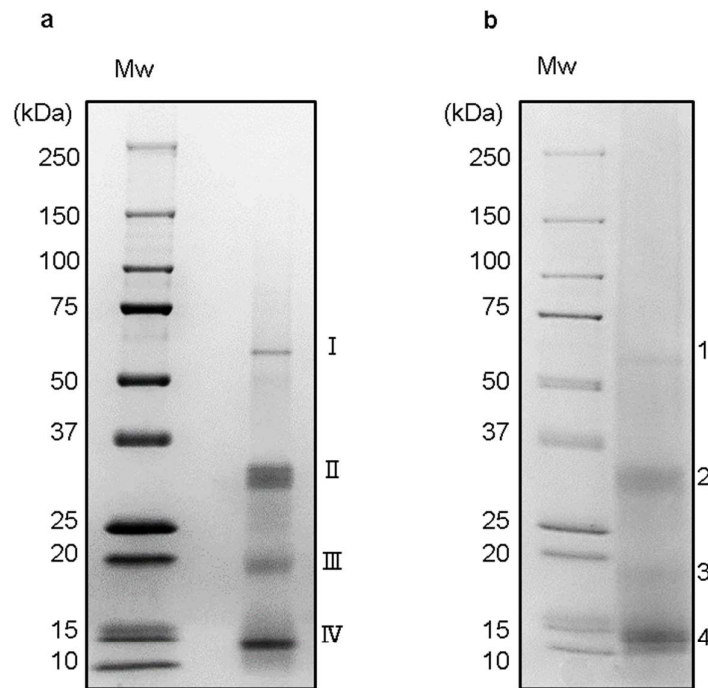


Fig. 16 Analysis of existed protein on rice starch granule membrane by SDS-PAGE.

a: rice starch protein and b: rice starch granule membrane protein were resolved on a 5-20 % gradient polyacrylamide gel and visualized with coomassie brilliant blue dye. Molecular weight markers were loaded for reference (Mw), and their sizes are indicated along the left edge of the gel (kDa). Numbers indicate individual protein bands that were excised for further analysis.

Table 11 Identification and comparison of existed protein on rice starch and rice starch granule membrane with LC/MS/MS. Individual protein bands identified following SDS-PAGE were excised and digested with trypsin before analysis. The proteins were identified by comparing their resulting mass spectra to NCBI database using a MASCOT search engine.

| Samples | Band | Identified protein | Data base accession number | Matched peptides | MASCOT score |
|-------------------------|------|--|----------------------------|------------------|--------------|
| Starch granule | I | Granule-bound starch synthase[<i>Oryza sativa japonica</i> Group] | gil7798551 | 99 | 154 |
| | II | Glutelin [Oryza sativa japonica Group] | gil119395188 | 73 | 63 |
| | III | Glutelin [Oryza sativa japonica Group] | gil225710 | 79 | 284 |
| | IV | prolamin [Oryza sativa japonica Group] | gil1842176 | 20 | 356 |
| Starch granule membrane | 1 | Granule-bound starch synthase[Oryza sativa japonica Group] | gil7798551 | 11 | 34 |
| | 2 | Glutelin [Oryza sativa japonica Group] | gil119395188 | 45 | 79 |
| | 3 | Glutelin [Oryza sativa japonica Group] | gil225710 | 20 | 31 |
| | 4 | Prolamin [Oryza sativa japonica Group] | gil1842176 | 22 | 46 |

2.2. デンプン粒の観察

IV章 2.1. にてデンプンに存在するタンパク質がデンプン粒の表層に局在していることが推察されたため、各起源デンプン粒に FITC およびナイルレッドによる蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いてタンパク質と脂質の存在状態を観察した結果、いずれのデンプン粒においても名視野で観察できるデンプン粒子の形に沿って FITC とナイルレッドの陽性反応が観察された (Fig. 17-1、17-2)。また、タンパク質の挙動に関して、焦点深度を変えて観察を行った結果、デンプン粒子の輪郭に沿うように FITC の陽性反応が観察される挙動が観察された (Fig. 18)。このことから、デンプンに存在するタンパク質はその表層に存在していることが明らかとなり、この表層に存在するタンパク質がIV章 2.1. にて明らかにしたデンプン粒膜の構成成分の一部となっていることを明らかにした。また、脂質の挙動は視野を拡大して観察したところ、デンプン粒上にドット状にナイルレッドの染色が確認された (Fig. 19) ことからデンプンに存在する脂質は微細な油滴として存在していることが推察された。

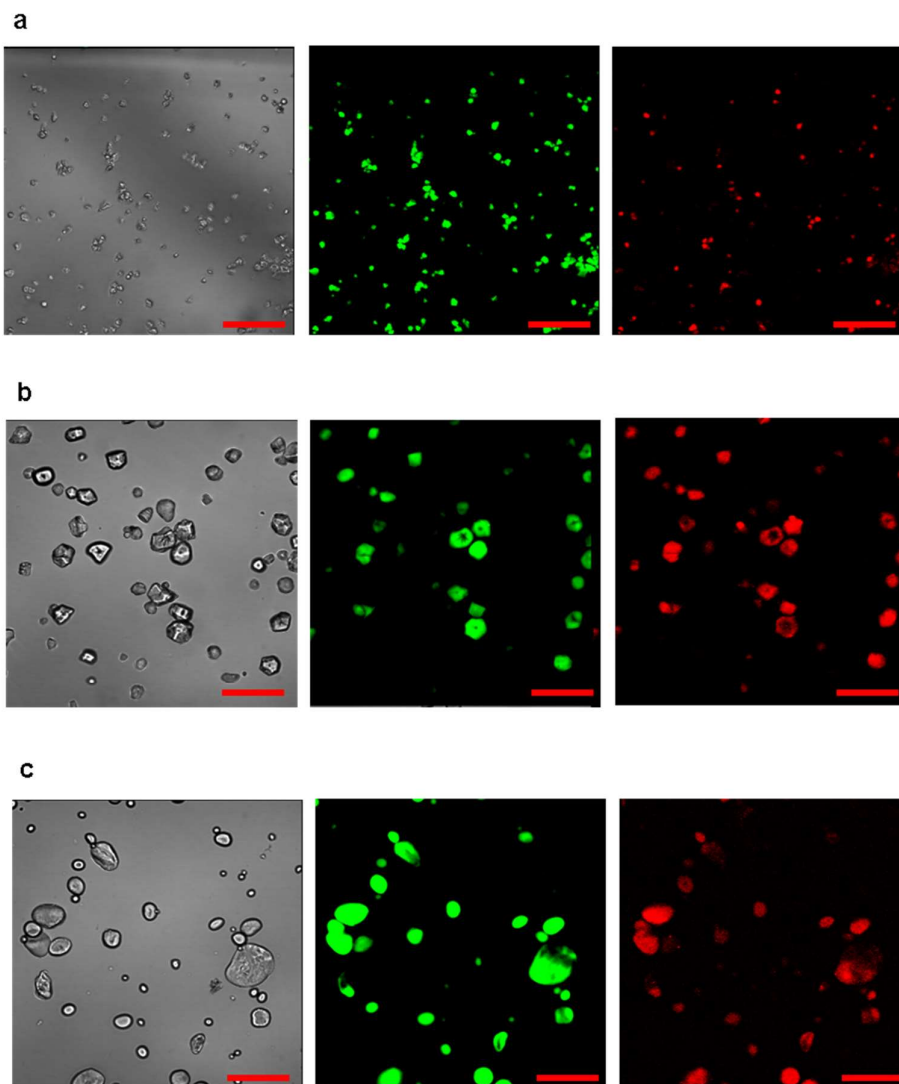


Fig. 17-1 Observation of various starch granules by confocal laser scanning microscopy. a: rice, b: maize and c: wheat. Various starch granules were dyed with 0.2% fluorescein isothiocyanate (FITC) and 0.2% Nile red solutions. Left: light field, center: FITC stained, right: Nile red stained. FITC was primary amine stained dye and Nile red was neutral lipid stained dye. Scale bar = 50 μ m

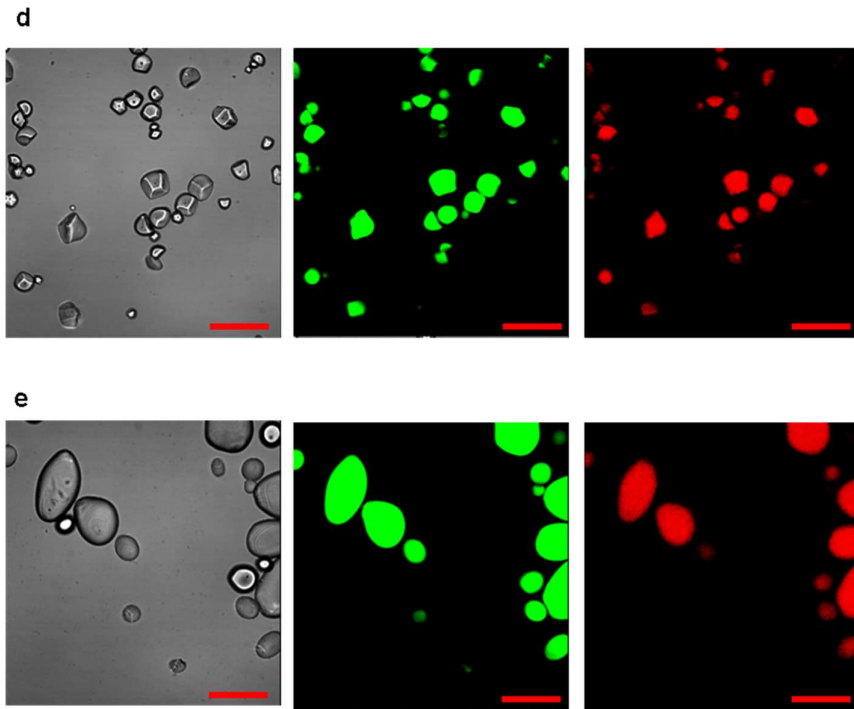


Fig. 17-2 Observation of various starch granules by confocal laser scanning microscopy.
 d: sweet potato and e: potato. Various starch granules were dyed
 with 0.2% fluorescein isothiocyanate (FITC) and 0.2% Nile red solutions.
 Left: light field, center: FITC stained, right: Nile red stained.
 FITC was primary amine stained dye and Nile red was neutral lipid stained dye.
 Scale bar = 50 μ m

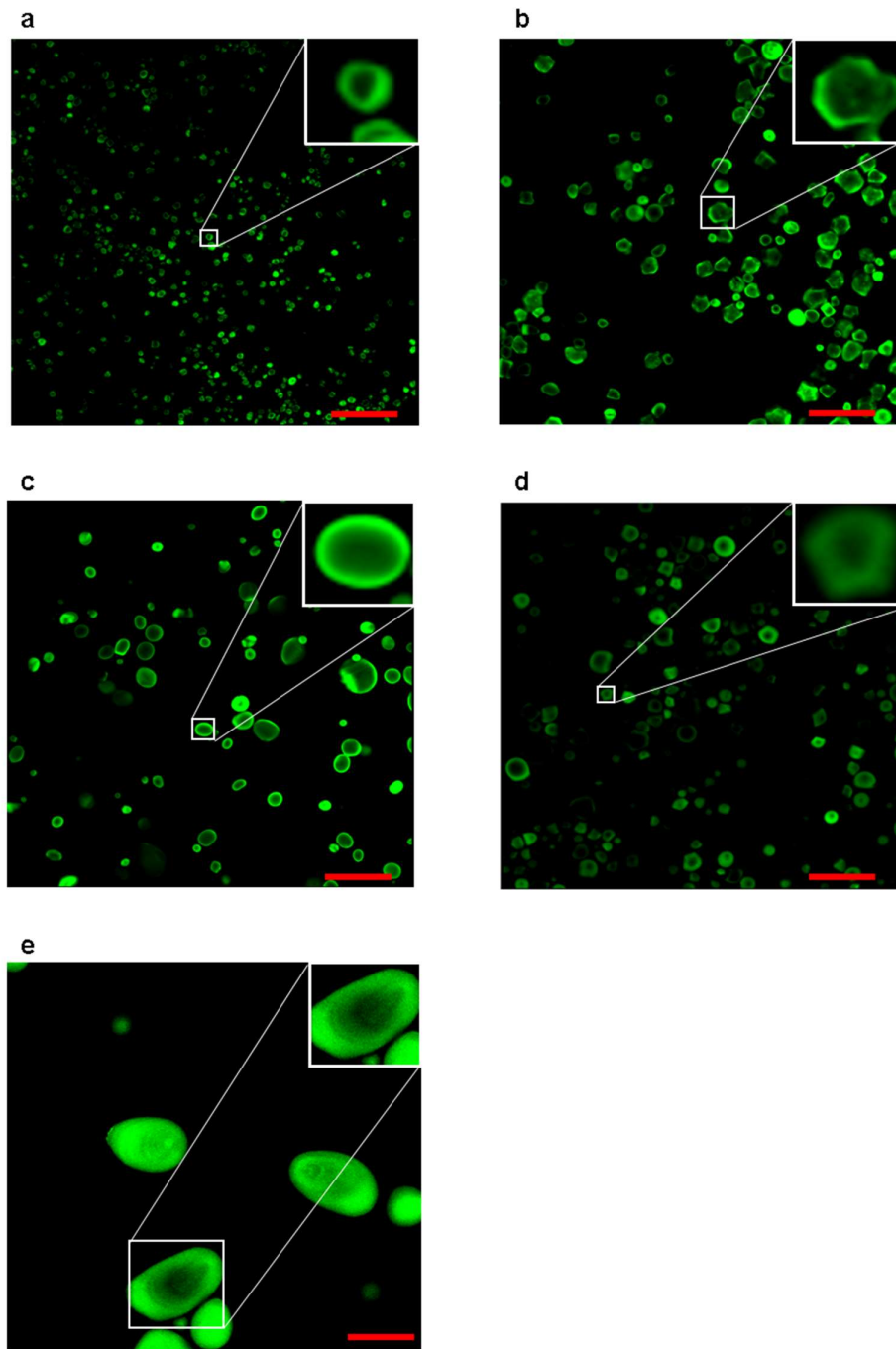


Fig.18 Observation of FITC stained various starch granules by confocal laser scanning microscopy

a: rice, b: maize, c: wheat, d: sweet potato and e: potato.
 Various starch granules were dyed with 0.2% fluorescein isothiocyanate (FITC) solutions.
 FITC was primary amine stained dye.
 Scale bar = 50 μ m

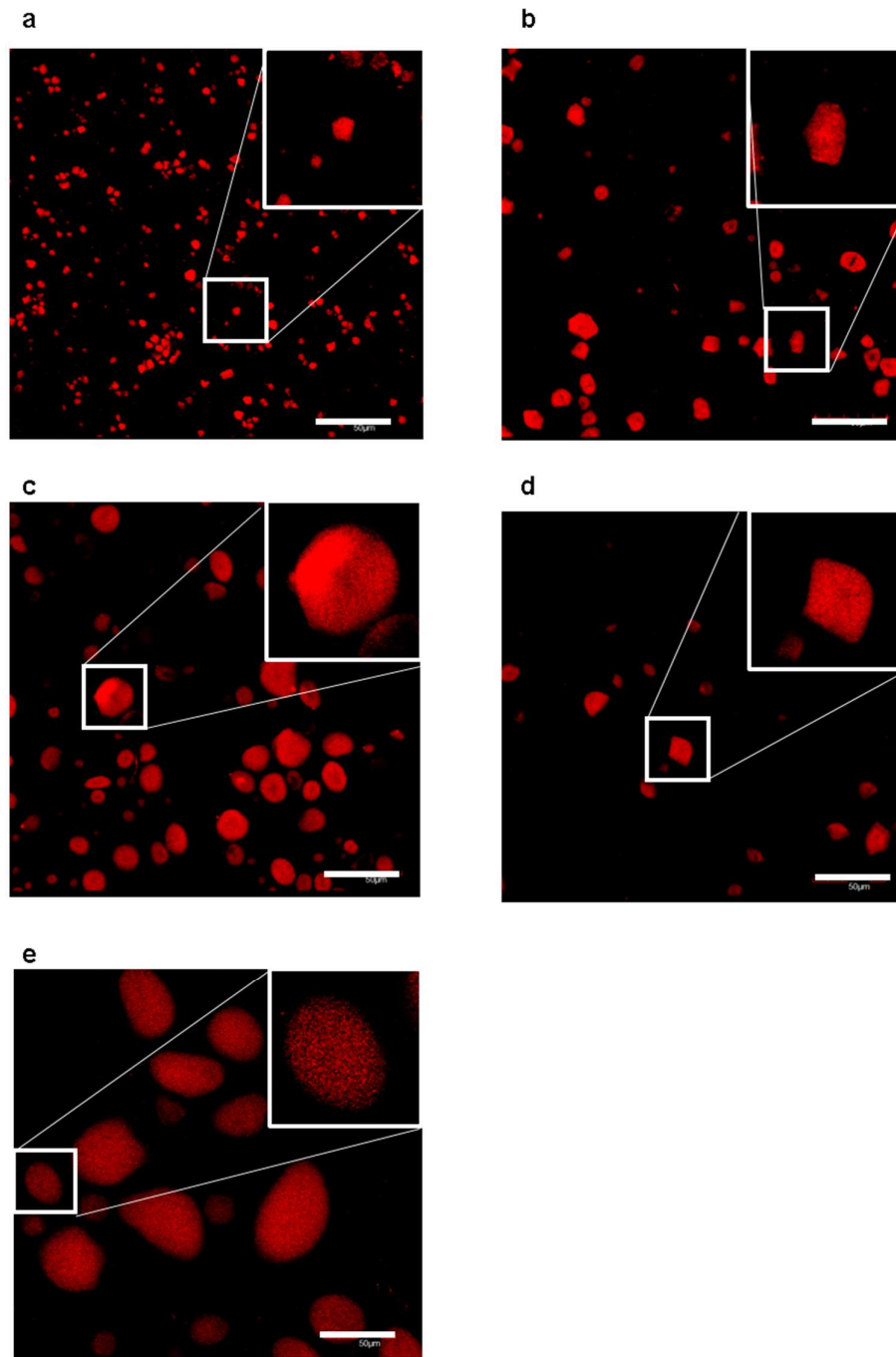


Fig. 19 Observation of Nile red stained various starch granules by confocal laser scanning microscopy

a: rice, b: maize, c: wheat, d: sweet potato and e: potato.
 Various starch granules were dyed with 0.2% Nile red solutions.
 Nile red was neutral lipid stained dye.
 Scale bar = 50 μm

2.3. デンプン粒膜がデンプンの性状に与える影響

各処理を施した米デンプンを加熱処理し、熱水可溶画分および不溶画分の全糖量を測定した。未処理および脱脂デンプンは熱水に可溶化したデンプンの量に差異は見られなかったが、除タンパク質処理することで可溶化量が増加した (Table 12)。

次に、熱水に可溶および不溶画分をゲル濾過クロマトグラフィーに供し分画を行った。第二ピークに相当する三者のアミロースの溶出挙動は可溶性および不溶性画分で差異は見られず、熱水可溶性画分に全てのアミロースが溶出していた。一方、可溶性画分において、第一ピークに相当するアミロペクチンの溶出挙動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 (Fig. 20)。三者のアミロースの挙動が同一であることから、米デンプン粒膜タンパク質は熱水によるアミロペクチンの溶解を阻害させる機能を持つことが推察された。

Table 12 Amount of total sugar of soluble and insoluble starch in hot water

| | Amount of total sugar (mg/starch 10mg) | |
|---------------|---|------------------------|
| | Soluble fraction | Insoluble fraction |
| Control | 3.8 ± 0.3 ^a | 6.0 ± 0.3 ^b |
| Deproteinized | 5.6 ± 1.2 ^b | 4.4 ± 1.2 ^a |
| Defatted | 3.1 ± 0 ^a | 6.8 ± 0.1 ^b |

Results are the means calculated from five experimental replicates. Data marked with the same superscript letter within a column are not significantly different based on the results of Fisher's PLSD test ($p < 0.05$).

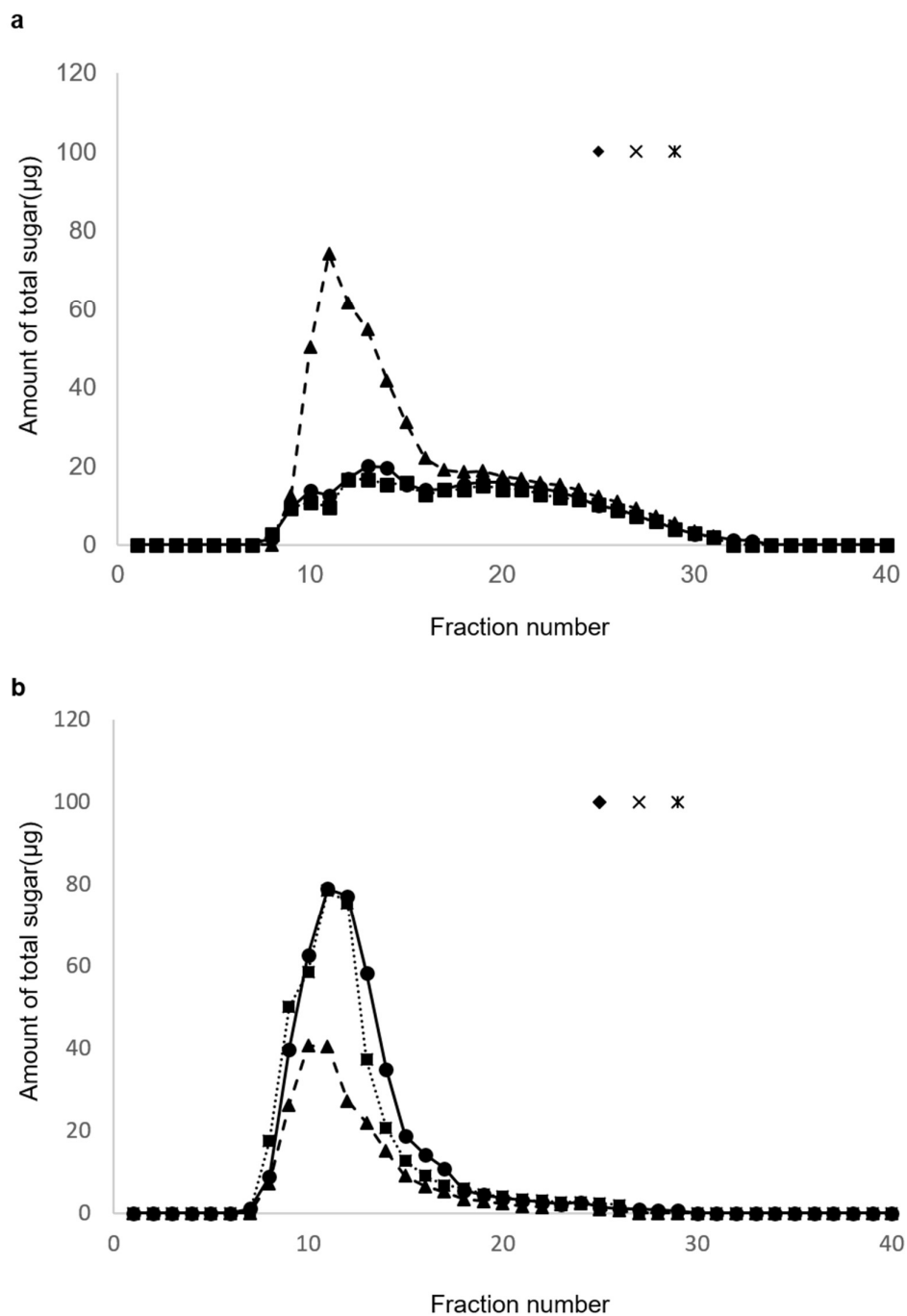


Fig. 20 Size exclusion chromatography of hot water soluble and insoluble starch fraction

a: soluble and b: insoluble fraction.

Various chromatograms were —●—: control, -▲-:deproteinized and
■.....:defatted rice starch.

Molecular weight markers were ◆ : 2,000,000, × : 500,000 and * : 124,000.

3. 要約

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、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。

V. 植物起源アミラーゼによるデンプン吸着メカニズムの解析

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)の分解性の関係を杉田らが報告している⁴⁰⁾。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。III 章にてデンプンに含まれるタンパク質にアミラーゼインヒビターファミリーに属するタンパク質が存在することを見出し、SBD を持たないアミラーゼの吸着メカニズムにこれらタンパク質が関与すると推察し、検討した。

1. 試料および実験方法

1.1. 試料

I 章 1.1. にて調製した各起源デンプンを用いて以降の試験に供した。

1.2. *Bacillus* 由来 α アミラーゼを用いた各起源植物デンプンの生デンプン分解性試験

各起源デンプン 100mg を秤量し、そこに SBD の領域が小さく、生デンプン分解性に乏しい α -アミラーゼ(*Bacillus* sp. A-6380, Sigma-Aldrich 社)を添加した。 α -アミラーゼは 10mM MES-NaOH(pH6.0)緩衝液に溶解させ、遠心分離(16,100 \times g, 4°C, 5 分)後の上澄液を回収し、2.5 Unit/ml に調製したものを 1ml 添加した。その後、酵素反応(180rpm, 37°C, 1 時間)を行い、酵素反応後の液体は遠心分離(16,100 \times g, 4°C, 5 分)後、上澄液を回収した。その後、100°C にて 10 分間加熱し酵素反応を停止させた。生デンプンの被分解性は、上澄液中に含まれる全糖量をフェノール・硫酸法にて測定した値から算出した。

また酵素活性確認には基質に可溶性デンプンを用いて、ソモギーネルソン法にて行った。なお、酵素単位は pH6.0、37°C の条件で 1 分間に 1 μ mol の還元糖(グルコース換算)を遊離する力価を 1 unit とした。

1.3. 大麦由来 β アミラーゼを用いた各起源植物デンプンの生デンプン分解性試験

各起源デンプン 100mg を秤量し、 β -アミラーゼ(Barley, Sigma-Aldrich 社)を添加した。 β -アミラーゼは 10mM MES-NaOH(pH6.0)緩衝液に溶解させ、遠心分離(16,100 \times g, 4°C, 5 分)後の上澄液を回収し、2.5 Unit/ml に調製したものを

1ml 添加した。以降の操作はV章 1.2.の方法に準じて行った。

1.4. 米デンプン粒膜タンパク質とアミラーゼの相互作用性試験

1.4.1. 抗原抗体反応を用いた米デンプン粒膜タンパク質とアミラーゼの相互作用試験

デンプン粒膜タンパク質とアミラーゼの相互作用性の解析はデンプンに存在するタンパク質量が多かった米デンプンを用いて Edmondson らが報告しているファウエスタンプロット法にて解析した⁴¹⁾。

電気泳動はIII章 1.4.の SDS-PAGE に準じて行った。なおマーカーには Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards (BIO-RAD 社)を用いた。

電気泳動後のゲルから PVDF (Polyvinylidene fluoride)膜へのタンパク質の転写は、Hirano と Watanabe のセミドライブロットティング法⁴²⁾を一部改良して行った。PVDF 膜 (ATTO 社製)をメタノールで 30 秒間浸水処理後、0.01%(w/v) SDS を含む 40mM 6-アミノヘキサン酸溶液に浸し 5 分以上浸透し、平衡化した。また、電気泳動後のゲルは上記緩衝液にて 5 分間振とうを 2 回行い、平衡化した。セミドライブロットティング装置 (Nippon Eido 社製)の陽極側から、0.3M トリス溶液、25mM トリス溶液に浸したろ紙を 2 枚ずつ重ね、次に平衡化した PVDF 膜、ゲル、0.01%(w/v) SDS を含む 40mM 6-アミノヘキサン酸溶液に浸したろ紙 2 枚を重ね、最後に陰極側の電極を重ねた。転写には 50V、120mA、90 分間通電した。タンパク質をブロットティングし、PBS-T で洗浄した PVDF 膜を 5% Bovine Serum Albumin (BSA、Wako 社)を含む PBS-T 10ml で 1 時間振盪した。振とう後、PBS-T にて 5 分間 3 回振とうし、余分な BSA を洗い流した。

ブロッキング、洗浄後の PVDF 膜は α -アミラーゼ (*Bacillus* sp.) もしくは β -アミラーゼ (Barley) 20 μ g/ml 10 μ l を PBS-T 10ml に添加 (1,000 倍希釈) したもので 1 時間振盪した。 α -アミラーゼ 1 次抗体 (Alpha Amylase Antibody、ROCKLAND 社) もしくは β -アミラーゼ 1 次抗体 (Anti β Amylase、コスモバイオ社) 0.5 μ l を PBS-T 10ml に添加 (20,000 倍希釈) したもので 1 時間振盪した。振とう後、PBS-T にて 5 分間 3 回振盪し、余分な 1 次抗体を洗い流した。次に、2 次抗体 (Anti-rabbit IgG、Horseradish Peroxidase Linked Whole antibody from Donkey GE Healthcare 社) 0.5 μ l と Streptactin-Peroxidase from Streptomyces tactivus (Bio-Rad 社製) 0.5 μ l を PBS-T 10ml に添加 (20,000 倍希釈) したもので 1 時間振盪した。振盪後の PVDF 膜は、PBS-T にて 5 分間 3 回振盪し、余分な 2 次抗体を洗い流した。

検出試薬には Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE

Healthcare 社)を用いた。Solution A 500 μ l に Solution B 500 μ l を混合した検出試薬を調製し、2 次抗体反応後、洗浄した PVDF 膜の余分な水分をキムワイプにしみこませ、ラップの上に置き、検出試薬をピペットで PVDF 膜に滴下し、PVDF 膜上でのアミラーゼのシグナルを化学蛍光検出機(Gel-Doc、Bio Rad 社)にて検出した。

1. 4. 2. 米デンプン粒膜タンパク質がアミラーゼによる生デンプンの被分解性に与える影響

未処理、および除タンパク質処理した米デンプン 100mg に β -アミラーゼ 2.5Units を添加し、V 章 1. 3. の方法に準じて生デンプンの被分解性を算出した。

1. 5. 各起源デンプンのアミラーゼインヒビターファミリータンパク質のアライメント解析

Ⅲ章 2. 1. にて明らかにしたアミラーゼインヒビターファミリーに属する米のプロラミン、トウモロコシのプロラミンおよび γ -ゼイン、小麦の α -アミラーゼインヒビターの一次構造配列を Clustal W(<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>)を用いて各タンパク質の配列を比較した。

2. 結果および考察

2.1. 各起源デンプンのアミラーゼによる生デンプンの被分解性

各起源デンプンに SBD の機能が弱く、生デンプンの分解性に乏しい *Bacillus* 由来の α -アミラーゼを作用させた結果、デンプンの起源によって被分解性に差異が見られ、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かった。デンプンのタンパク質量と被分解性を比較したところ正の相関が認められた。また、SBD をもたない大麦由来の 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 (Table 13)。以上のことからデンプンに存在するタンパク質がアミラーゼによる生デンプンの被分解性に関与することが示唆された。

2.2. 米デンプン粒膜タンパク質とアミラーゼの相互作用性試験

2.2.1. 抗原抗体反応を用いた米デンプン粒膜タンパク質とアミラーゼの相互作用試験

デンプンに存在するタンパク質がアミラーゼによる生デンプンの被分解性に関与することが考えられたため、タンパク質量が多かった米デンプンを用いて、米デンプン粒膜タンパク質とアミラーゼとの相互作用性を解析した。

PVDF 膜に米デンプンから抽出したタンパク質を転写し、アミラーゼとの相互作用性を抗原抗体反応にて解析したところ、米デンプン粒膜タンパク質の 13kDa 付近のタンパク質において α および β -アミラーゼのシグナルが確認され、米デンプン粒膜タンパク質とアミラーゼが吸着することが明らかとなった (Fig. 21)。Ⅲ章 2.1. にてこのタンパク質はプロラミンであることを見出している。プロラミンは、アミラーゼインヒビターファミリーに属することを明らかにしており、同タンパク質がアミラーゼと相互作用することで、生デンプンの被分解性に影響を与えることが推察された。

Table 13 Relationship between protein content and amyololysis of various raw starches

| | Protein content (μ g/starch100mg) | Amylolysis with(mg/starch 100mg) | |
|--------------|---|----------------------------------|------------------|
| | | α -amylase | β -amylase |
| Rice | 67.3 | 19.7 | 6.0 |
| Maize | 57.3 | 3.3 | — |
| Wheat | 37.0 | 7.9 | — |
| Sweet potato | 14.7 | 1.6 | 0.8 |
| Potato | 10.0 | 0.7 | 0.6 |

— : No data

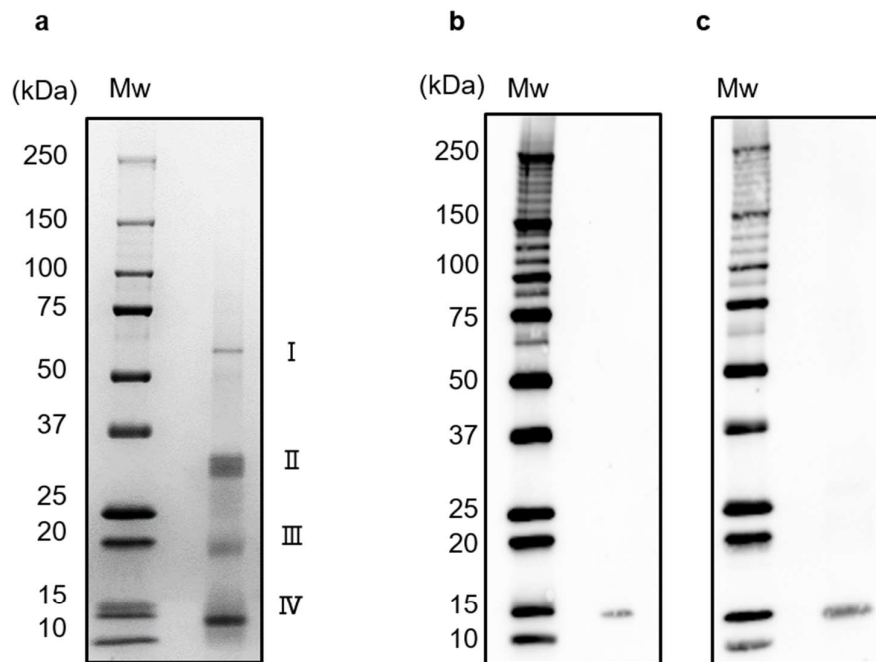


Fig. 21 Analysis of existed protein on rice starch granule membrane by SDS-PAGE.

a: SDS-PAGE of rice starch protein, b: far western blot between rice starch protein and α -amylase from *Bacillus* sp. and c: far western blot between rice starch protein and β -amylase from barley.

Separated protein using SDS-PAGE (T= 5-20 % gradient polyacrylamide gel) was absorbed to PVDF membrane by instillation, and was analyzed by antigen-antibody. Primary antibody of α -amylase (a), Alpha Amylase antibody (ROCKLAAND Lab.) and (b), Anti β Amylase (Cosmo Bio Co.). Secondary antibody, ECL Anti-rabbit IgG, Horesradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody from donkey (GE Healthcare).

Separated protein were visualized with coomassie brilliant blue dye. Molecular weight markers were loaded for reference (Mw), and their sizes are indicated along the left edge of the gel (kDa). Numbers indicate individual protein bands that were excised for further analysis.

2.2.2. 米デンプン粒膜タンパク質がアミラーゼによる生デンプンの被分解性に与える影響

米デンプン粒膜タンパク質とアミラーゼの相互作用がみられ、SBD を持たないアミラーゼによる生デンプンの被分解性への影響が推察されたため、除タンパク質処理した米デンプンを用いて生デンプンの分解性を解析した。

未処理デンプンの被分解性デンプン 100mg あたりは 6.0 ± 0.5 mg であった。米デンプンからタンパク質を除去することでその被分解性は 5.0 ± 0.5 と被分解性が約 16%低下した (Fig. 22)。インヒビタータンパク質であるプロラミンが除去されることで被分解性が上昇すると考えていたが、予想とは異なる結果となり、タンパク質の減少による生デンプンの被分解性の減少は、アミラーゼインヒビターによるアミラーゼの活性阻害とは別の機構が存在することが示唆された。

2.3. 各起源デンプンのアミラーゼインヒビターファミリータンパク質のアライメント解析

各起源デンプンに存在するアミラーゼインヒビターに属する米のプロラミン、トウモロコシのプロラミンおよびγ-ゼインのアミノ酸配列をアライメントした結果、これらタンパク質で類似性の高い領域が保存されていた (Fig. 23)。このことからこれらタンパク質は立体構造が近いことを示唆し、V章 2.1. にて明らかにした米のプロラミンとアミラーゼの相互作用は、アミラーゼインヒビターに類似する構造を持つことに起因することが推察された。また、小麦のアミラーゼインヒビターが持つ酵素の阻害活性中心はその他のアミラーゼインヒビターファミリータンパク質には存在していなかった。このことから米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となり、アミラーゼと生デンプンの距離を縮めることで、生デンプンの被分解性に関与するものと推察した。

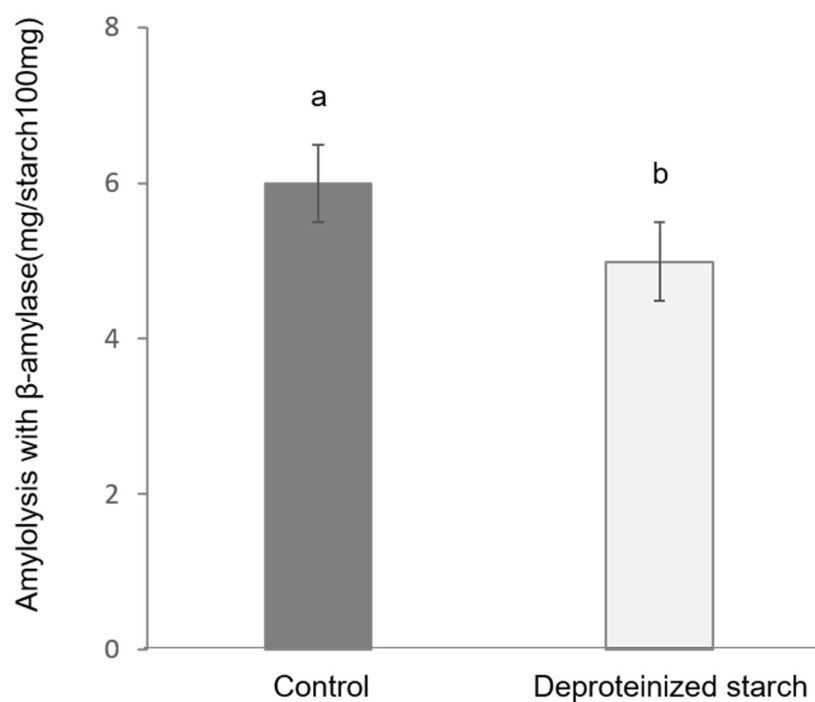


Fig. 22 Amylolysis of raw rice starch with β -amylase from barely
Results are the means calculated from three experimental replicates. Data marked with the same superscript letter within a column are not significantly different based on the results of Fisher's PLSD test ($p < 0.05$).

```

a  -----MCRRRFICRR----- 10
b  ASATSTHTSGGCGCQPPPPVHLPPPVLPPPVLPPPVLPPPVLPPPVLPPPVLPPP 50
c  -----
d  -----

HHATTLLNRGLSLIP-----SHTHARAN-----KPHPSPCQLQ 44
HLPPPVLHPPPVLPPPCHYPTQPPRPQHPQHPQPCPCQQHPSPCQLQ 100
--MKIIFVFALLAIVA-----CNRSARFDP---LSQSYRQYQLQ 34
-----MLVATPIAAEY-----DAWSGNSGP-----WMC 23
      :   :                               .   :

GTCGVGSTPILGQCVEFLRHQCSPTATPYCSP-----QQQSLRQCCQQ 88
GTCGVGSTPILGQCVEFLRHQCSPTATPYCSP-----QQQSLRQCCQQ 144
SHL-LLQQQMLSPCSEFVRQQYSIVATPFWQPATFQLINNQVMQQCCQQ 83
YPGQAFQVPALPACRPLLRLQCNGSQVP-----EAVLRDCCQQ 61
      .   *   *   : * *   .   . *
      :   :   : * * * *

LRQVEPQHRYQAIFGLVLQSLQQQPQS-----GQVAGLLAAQIAQQ 130
LRQVEPQHRYQAIFGLVLQSLQQQPQS-----GQVAGLLAAQIAQQ 186
LRLVAQQSHYQAIS--IVQAIVQQQLLQQFSGV-YFDQTQAQAQTLLTFN 130
LAHISEWCRCGALYSMLDSMYKEHGAQEGQAGTGAFPRCRREVVKLTAAS 111
*   :   :   *   :   :   :   :   :   :   :   :   :

LTAMCGLQQ---PTPCPYAAAGGVPH---- 153
LTAMCGLQQ---PTPCPYAAAGGVPH---- 209
LPSICGIIYPNYYSAPRSIATVGGVWY---- 156
ITAVCRLLPIVVDASGDGAYVCKDVAAYPDA 141
::: * :   . :   .   . *

```

Fig. 23 Alignment of primary structure of various amylase inhibitor family protein

a: prolamin (maize), b: γ -zein (maize), c: prolamin (rice) and d: amylase inhibitor (wheat)

 conserved region . weak similarity : robust similarity and * agreement

— : active site of amylase inhibitor

3. 要約

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 13 kDa 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Ⅲ章 2.1. 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。

総括

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 $\alpha 1,4$ 結合で重合したアミロースと $\alpha 1,6$ 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構造、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。各デンプンのアミロース含量や粒子径、アミロペクチン側鎖の構成比率と熱的および粘度挙動との関係性を解析した結果、これら要因だけでは起源間におけるデンプンの性状の差異を説明することはできなかった。デンプンに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といった微量成分を含んでいることに着目し、その量を測定した。デンプンに存在するタンパク質や脂質は起源によりその量が異なっており、デンプンの糊化時の最高粘度および最低粘度と強い負の相関を示し、デンプンの性状にこれら微量成分が関与することが推察された。

デンプンに含まれるタンパク質、脂質量が多かった米デンプンをモデルとし、両成分がデンプンの熱的および粘度挙動に与える影響を解析した。タンパク質

および脂質を除去することで米デンプンは加熱による膨潤力および溶解率が上昇することを見出し、その影響はタンパク質が大きかった。タンパク質および脂質がデンプンの膨潤を抑制する機能を有していることが明らかとなった。さらにビスコグラフィによる解析では、タンパク質および脂質はデンプンが糊化を開始する際の温度を上昇させる要因となっており、タンパク質の影響が大きかった。デンプンの微量成分のタンパク質や脂質が大きな影響を与えることを見出した。次に、デンプンゲルの性状を解析した結果、タンパク質を除去することでデンプンゲルの透明度が大きく上昇し、物性は軟らかくなる傾向を示し、脂質は透明度に影響は見られず、物性は硬くなる傾向を示した。このような性状の差異はデンプンゲルの内部構造の違いに起因すると推察し、デンプンゲルの内部構造観察を行った。タンパク質を除去することで未処理や脱脂デンプンから調製したゲルに見られていた平滑面が減少し、微細なネットワーク構造が多く見られた。このことからタンパク質がこの平滑面構造に関与するものと考えられ、ゲルの性状に影響することが推察された。

デンプンに存在するタンパク質および脂質の解析を行った結果、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。また脂質は、脂肪酸、リン脂質および糖脂質が主体であり、貯蔵タンパク質のような不溶性の高い成分と共に、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関与すると推察した。

また、デンプン粒の膜について検討した結果、加熱処理後に熱水に不溶の残渣が残ることに着目し、構造観察を行った結果、膜状の構造物が観察され、デンプン粒に膜上の構造物が存在することを見出した。次にこのデンプン粒の膜とデンプンに存在するタンパク質や脂質の存在状態について検証した結果、デンプン粒膜上にタンパク質が存在することを明らかにした。続いて、米デンプンを用いてデンプン粒膜のタンパク質解析を行った。その結果、米デンプン粒膜上タンパク質は米デンプンから抽出したタンパク質と一致した。このことからデンプン粒膜のタンパク質はデンプン粒表層に由来するタンパク質から構成されていると推察し、デンプン粒のタンパク質と脂質の存在状態について検討した。その結果、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を明らかにし、この膜に存在するタンパク質がデンプンの性状に大きく関与することを明らかにした。

デンプンに存在するタンパク質がアミラーゼインヒビターに属することに着目し、生デンプンを認識、吸着できる 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の分解機構について検討を行った。SBD の

機能が弱く生デンプンの分解性に乏しい *Bacillus* 由来の α -アミラーゼでは、生デンプンの分解性とデンプンに存在するタンパク質量は正の相関を示し、この関係は SBD を持たない大麦由来の β -アミラーゼと同様であった。そこで米デンプンを用いてアミラーゼとデンプンに存在するタンパク質の相互作用性を解析した結果、アミラーゼインヒビターに属する米のプロラミンがアミラーゼと特異的に相互作用することを見出した。アミラーゼインヒビターに分類されたプロラミンとアミラーゼによる生デンプンの分解性への影響を解析した結果、米デンプンからタンパク質を除去することで大麦由来 β -アミラーゼによる生デンプンの被分解性が低下した。アミラーゼインヒビターを除去したことで、生デンプンの被分解性が低下したことに疑問を持ち、米、トウモロコシデンプンに存在するアミラーゼインヒビターファミリータンパク質と、小麦デンプンに存在するアミラーゼインヒビターのアミノ酸配列を比較した。その結果、米およびトウモロコシデンプンに存在するアミラーゼインヒビタータンパク質は、小麦のアミラーゼインヒビターと類似した配列を持つものの、アミラーゼの阻害活性中心に相当する配列を有していないことが明らかとなった。このことから、米デンプンに存在するプロラミンはアミラーゼの活性中心に影響を及ぼすことなく特異的に吸着し、デンプン粒とアミラーゼの距離を縮めることで生デンプンの被分解性に関与することが推察され、SBD を持たないアミラーゼによる生デンプン吸着機構の一端を明らかにした。

以上、熱的および粘度挙動、ゲルの性状および生デンプンの被分解性といったデンプンの特性に従来言われているアミロース含量やアミロペクチンのクラスター構造といった要因に加え、タンパク質や脂質といったデンプンに微量に存在する成分がデンプンの性状に大きく関与することを明らかとし、デンプン科学における新たな知見を得ることが出来た。

Summary

Study of effect of starch granule membrane and component on physical property of starch

Starch is existed in a seed, the root tuber, a tuber and immature flesh by one of storage form of glucose in a plant. It exists in amyloplast of these organs as a particle (starch granule) and is different in its shape and structure depending on the plant origins. Starch granules become viscous and gelatinize by adding water and heating. After cooling, starch paste is gelled (retrogradation), and then gelatinization and retrogradation behavior are difference depending on plant origins. So, starch is used for various purposes such as food, paper making, printing and medicine, and it is produced 38 million tons from rice, maize, wheat, potato and cassava of annually in the world. Starch is composed amylose in which glucose is polymerized by α 1,4 bond and amylopectin in which glucose is polymerized by α 1,6 bond. Amylose and amylopectin are water insoluble so there are high molecular. It has been reported that the amylose content and branched structure of amylopectin greatly affect to the viscosity of geratinized starch, and gel hardness. However, there are unclear points such as the gelatinization and viscosity of starch, hardness of gel greatly changes due to the difference in amylose content, slight numerical value of microstructure of amylopectin. In reported data, relationship between amylose content and viscosity behavior were analyzed however it was difficult to determine properties of starch from amylose content, and then is suggested other factors determined properties of starch are exist.

In this study, factors affecting the properties of starch searched were researched and analyzed using rice, maize, wheat, sweet potato and potato starch.

Protein and lipid that were minor components of the starch granule affected on thermal and viscosity behavior. There was a membrane mainly composed of protein to the starch granule surface, and lipid existed as a minute oil drop. The protein affected behavior of gelatinization and retrogradation, lipid influenced behavior of retrogradation.

The main protein of the starch granule membrane was demonstrated that it was the storage protein of each plant origin, and the protein having structure of the amylase inhibitor. The protein similar to amylase inhibitor affected binding mechanism of the starch granule of amylase in the plant origin when the details were unidentified and got a new finding about starch.

参考文献

- 1) Meyer, K. H., Brenfeid, P., Boissonnas, R. A., Gurtlerand, P. and Noelting, G. 1949. *J. Phys. Colloid. Chem.*, **53**, 319-334.
- 2) Schoch, T. J. 1942. *J. Am. Chem. Soc.*, **64**, 2954.
- 3) Schoch, T. J. 1945. *Carbohydr. Chem.*, **1**, 247-277.
- 4) Peat, P., Whelan, W. J., Thomas, G. J., 1952. *Chem. Soc.*, 4546-4578.
- 5) Peat, P., Whelan, W. J., Thomas, G. J., 1956. *Chem. Soc.*, 3025-3030.
- 6) 二國二郎, 1969. 調理科学, **2**, 6-14.
- 7) Hizukuri, S. 1986. Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins and its significance. *Carbohydrate Research*, **147**, 342-347.
- 8) Nakamura, Y. 2003. Starch Biosynthesis and Its Manipulation. *J. Appl. Glycosci.*, **50**, 511-512.
- 9) Whistler, 1953. *Starch and its Derivatives (3rd ed.)*, 213.
- 10) Takahashi, S., et al., 1988. Paste and gel properties of corn and wheat starches with and without native lipids. *Cereal Chem.*, **65**, 6, 474.
- 11) 阿久澤さゆり, 1997. デンプンの物性制御に関する基礎的研究. 東京農業大学博士論文. 17.
- 12) 石井靖子, 2000. キャッサバ澱粉の高分子特性に関する基礎的研究. 東京農業大学博士論文. 25, 107.
- 13) 時村金愛, 下園英俊, 池田健一郎, 田之上隼雄, 2002. 品種の異なるサツマイモ澱粉の澱粉ゲルの老化と澱粉の特性. *J. Appl. Glycosci.*, **49**, 3, 305-312.
- 14) Zaidul, I. S. M., Nik Norulaini, N. A., Mohd Omar, A. K., Yamauchi, H., Noda, T. 2007. RVA analysis of mixtures of wheat flour and potato, sweet potato, yam, and cassava starches. *Carbohydrate Polymers*, **69**, 784-791.
- 15) Wang, Shujun, Copeland, Les, 2012. Effect of alkali treatment on

- structure and function of pea starch granules. *Food Chemistry*, **135**, 1635-1642.
- 16) Tabara Aya, Onda Hiroshi, Murayama Ryuji, Matsui Yuko, Hirano Akira and Seguchi Masaharu, 2014. Determination of hydrophobicity of dry-heated wheat starch granules using sucrose fatty acid esters (SFAE). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **78**, 9, 1572-1576.
 - 17) Skerritt, J. H., Frend, A. J., Robson, L. G. and Greenwell, P., 1990, Immunological homologies between wheat gluten and starch granule proteins. *J. Cereal Sci.*, **12**, 123-126.
 - 18) Swinkels, J. J. M., 1985, Composition and properties of commercial native starches. *Starch/Stärke*, **37**, 1-5.
 - 19) Suurs, L., Readts, M., 1993, Isolation of proteins from potato-starch granules using a composite gel on the model 230A micropreparative electrophoresis system, in Biosystems Reporter 18, Applied Biosystems. Warrington, UK, 6-7.
 - 20) Vasanthan, T., Hoover, R., 1992, A comparative study of the composition of lipids associated with starch granules from various botanical sources. *Food Chem.* **43**, 19-27.
 - 21) 野口智弘, 金子昌史, 岡 大貴, 高野克己, 2012. トウモロコシデンプン粒におけるアミラーゼ結合タンパク質の存在と性状について. 日本食品保蔵科学学会誌, **38**, 2, 67-71.
 - 22) Pablo D. R. and Cristina M. R., 2010. Effects of enzymatic modification of soybean protein on the pasting and rheological profile of starch-protein systems. *Starch/Stärke*, **62**, 373-383.
 - 23) Williams, P. C., Kuzina, F. D., & Hlynka, I., 1970. A rapid calorimetric procedure for estimating the amylose content of starches

- and flours. *Cereal Chemistry*, **47**, 4, 411-420.
- 24) Koizumi, K., Fukuda, M., Hizukuri, S., 1991. Estimation of the distributions of chain length of amylopectins by high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr.*, **585**, 2, 233-238.
 - 25) Bligh E., Dyer W., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917.
 - 26) Lineback, D. R., 1984. The starch granule - organization and properties. *Bakers Dig.*, **58**, 16-21.
 - 27) Jane, J. L., Kasemsuwan, T., Leas, S., Zobel, H., Robyt, J. F., 1994. Anthology of starch granule morphology by scanning electron microscopy. *Starch/Stärke*, **46**, 121-129.
 - 28) 高橋禮治, 1996. デンプン製品の知識. 50, 幸書房.
 - 29) Shujun W., Heyang L., Jian Z., Zhongghu H., Shuo W., 2014. Alkali-induced Changes in Functional properties and in Vitro Digestibility of Wheat Starch: The Role of Surface Proteins and Lipids. *J. Agric Food Chem.*, **62**, 3636-3643.
 - 30) Min C., Ling F., Hongxian Z., Hong Y., 2014. Effects of amino acids on the physiochemical properties of potato starch. *Food Chemistry*, **151**, 162-167.
 - 31) 風見真千子, 野口治子, 丸山慶輔, 本橋慶一, 矢口行雄, 入澤友啓, 高野克己, 2016. 発酵小麦デンプンを原料とする久寿餅の特性. 日本食品保蔵科学学会誌, **42**, 4, 149~153.
 - 32) Kim, C. S., and Walker, C. E., 1992. Changes in starch pasting properties due to sugars and emulsifiers as determined by viscosity measurements. *Journal of Food Science*, **57**, 1009-1013.
 - 33) Ohashi K., Goshima G., Kusuda H. and Tsuge H., 1980. Effect of embraced lipid on the gelatinization of rice starch. *Staerke*, **32**, 2, 54-58.

- 34) Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 36) 間野康男, 藤野康彦, 1975. 米澱粉中の結合脂質, 澱粉科学, **22**, 1, 1-5.
- 37) 間野康男, 和田好充, 藤野康彦, 1975. バレイショ澱粉の脂質の分析, 澱粉科学, **22**, 4, 111-113.
- 38) Tao, F., Qiang, S., Haining, Z., Ran, Y., Zhengbiao, G., Zhengyu, J., 2014. Ghost structures, pasting, rheological and textural properties between mesona blumes gum and various starches. *Journal of Food Quality*, **37**, 73-82.
- 39) Junrong, H., Ningguo, W., Hongliang, L., Shuxing, L., Daqing Y., 2014. Outer shell, inner blocklets, and granule architecture of potato starch. *Carbohydrate Polymers*, **103**, 355-358.
- 40) 杉田亜希子, 岡田正通, 谷 明代, 箕田正史, 山口庄太郎, 2011. *Bacillus fiexus*由来の耐熱性 β -アミラーゼについて, 応用糖質科学. **1**, 2, 194-200.
- 41) Edmondson, D.G., and Dent, S.Y.R., 2001. Identification of protein interactions by far western analysis. *Current Protocols in Protein Science*, **19**, 7, 1-19, 7, 10.
- 42) Hirano, H., Watanabe, T. 1990. Microsequencing of proteins electrotransferred onto immobilizing matrices from polyacrylamide gel electrophoresis: Application to an insoluble protein. *Electrophoresis*, **11**, 573-580.

謝辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり御懇篤なるご指導を賜りました東京農業大学 応用生物科学部 生物応用化学科 食料資源理化学研究室 高野克己教授、内野昌孝教授、辻井良政准教授、風見真千子助手、野口治子非常勤講師、食品加工技術センター野口智弘教授、岡大貴助教、菊池修平非常勤講師に厚く御礼申し上げます。さらに、本研究遂行にあたり、終始御助言くださいました東京農業大学 応用生物科学部 生物応用化学科 栄養生化学研究室 山本祐司教授、食品安全健康学科 食品利用安全研究室 阿久澤さゆり教授、東京農業大学 生物産業学部 食品香粧学科 佐藤広顕教授に厚く御礼申し上げます。

そして、実験に御協力下さいました東京農業大学 応用生物科学部 生物応用化学科 食料資源理科学研究室の卒業生に心より感謝の意を表します。

最後に私事となりますが、私が学位を修めるまでの研究生生活を支援し、応援してくれた両親、兄に心より感謝致します。

2017 年 3 月