

酵素反応によるアミロースの分岐反応過程の観察 Branching Process of Amylose during Enzymatically Reaction

蔭山 茜^a, 柳瀬 美千代^b, 鷹羽 武史^b, 湯口 宜明^a
Akane Kageyama^a, Michiyo Yanase^b, Takeshi Takaha^b, Yoshiaki Yuguchi^a

^a大阪電気通信大学, ^b江崎グリコ株式会社 健康科学研究所

^aOsaka Electro-Communication University, ^bInstitute of Health Sciences, Ezaki Glico Co., Ltd.

高度分岐構造をもつグリコーゲン様多糖(グルカンデンドリマー)の酵素合成が可能となってきた。酵素合成によるグルカンデンドリマーはサイズを制御して合成することができる。これまでサイズの異なるグルカンデンドリマー水溶液中からの小角 X 線散乱及び超小角 X 線散乱測定を行い、慣性半径を評価することができた。本研究では線状アミロースを基質として得られるグルカンデンドリマーの形成過程を追跡するために時分割小角 X 線散乱法を行った。散乱曲線の反応による経時変化を観測することができた。

キーワード： アミロース、グリコーゲン、グルカンデンドリマー、酵素反応、小角 X 線散乱

背景と研究目的：

植物が作り出す澱粉は、アミロースとアミロペクチンの混合物である。これらはグルコースを構成単位とする高分子であり、アミロースはグルコースが α -1,4 結合によって直鎖状につながった構造で、アミロペクチンはアミロース鎖に対し α -1,6 結合により分岐した構造をとっている。動物の肝臓や筋肉に多く存在するグリコーゲンはアミロペクチンより高度な分岐鎖を有している。グリコーゲンはエネルギー貯蔵物質としての機能があり、食品では牡蠣やレバーなどに含まれ、免疫賦活などの効果が期待されている。これらの機能はグリコーゲンが高度に分岐した構造に由来していることが予想されるが、その相関は未解明である。これまで粒子の形態などは電子顕微鏡や光散乱法[1]などによって検討され、球状の形状をしており、その径も 10–60 nm 程度の定量的な結果が報告されている。江崎グリコ株式会社の多糖酵素合成技術により粒子径を制御して製造したグリコーゲン様多糖(グルカンデンドリマー)に対し、小角 X 線散乱法を用いて、粒子全体を観察することに成功した。本実験では、酵素反応させながらグルカンデンドリマーの形成過程を時分割小角 X 線散乱法により追跡した結果を報告する。

実験：

小角 X 線散乱測定はビームライン 19B2 で行った。X 線ビームのエネルギーは 24 keV で、カメラ距離は約 3 m とし、検出器には PILATUS を用いた。カメラ長の較正はベヘン酸銀の周期構造からの回折を利用した。セルホルダーは真鍮製の温度制御可能なものを用いた。セルは光路長 3 mm の平面型のもを使用し、窓剤には石英ガラスを使用した。

酵素反応には分子量が約 20 万の直鎖のアミロースを基質とした。これにブランチングエンザイム (BE) を作用させることで反応を開始し、溶液をセルに注入し時分割小角 X 線散乱により反応を追跡した。時分割測定は露光時間を 300 s、インターバルを 300 s とし測定を行った。

結果および考察：

図 1 はアミロースに BE を作用させて時分割小角 X 線散乱測定した結果を Kratky plot で表した図である。ここで $I(q)$ は散乱強度、 q は散乱ベクトルの大きさであり、散乱角を 2θ 、照射 X 線の波長を λ としたとき、 $(4\pi/\lambda)\sin\theta$ で定義される。酵素作用前の溶液からの散乱をみると、アミロースの鎖状構造に起因するプロファイルが得られている。反応が進行するにつれて、 q の小さい領域においてピークを示し始め、さらに反応が進むとピークが成長する様子が見られた。これは BE による糖転移反応によって α -1, 4 鎖が α -1, 6 の分岐構造を形成し、グルカンデンドリマーの粒子形成を観測していることを示している。

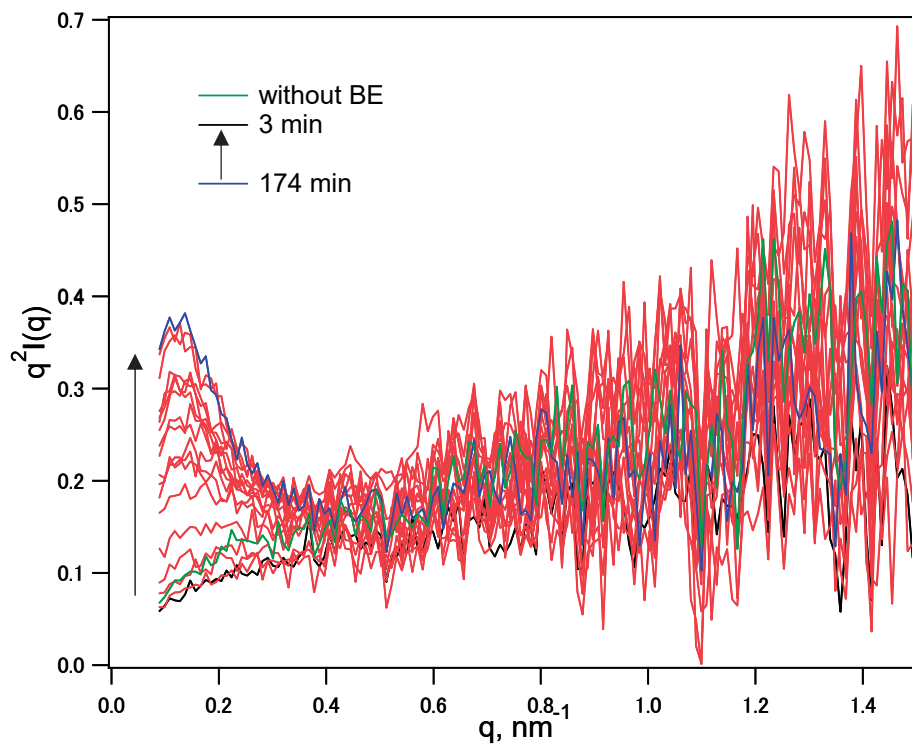


図 1. アミロースに BE を作用させて得られるグルカンデンドリマー形成過程における小角 X 線散乱の経時変化.

今後の課題：

グルカンデンドリマーの形成過程をより詳細に検討するために分子モデリングや分岐鎖の理論式を適用した解析を進めていく必要がある。

参考文献：

[1] C. E. Ioan, T. Aberle, W. Burchard, *Macromolecules*, **32**, 7444 (1999).