

食品科学における原子間力顕微鏡の利用 ―タンパク質ゲル研究の新展開―

岩崎 智仁^{a)} 山本 克博^{a)} 中村 邦男^{b)}

Tomohito Iwasaki

Katsuhiko Yamamoto

Kunio Nakamura

^{a)} 酪農学園大学酪農学部食品科学科

Department of Food Science, Faculty of Dairy Science, Rakuno Gakuen University

^{b)} 酪農学園大学大学院酪農学研究科

Graduate School of Dairy Science, Rakuno Gakuen University

北海道江別市文京台緑町582

582, Bunkyo-daimidori-machi, Ebetsu-shi, Hokkaido 069-8501, Japan

Summary

Heat-induced morphological and rheological changes in myosin filaments and its subfragments, S1 and rod, were observed using atomic force microscope (AFM) in 0.1 M NaCl. When myosin filaments were heated at 40°C, several neighboring myosin heads on the surface aggregated, so that spiral lumps were observed. The spiral corresponded with the arrangement of myosin molecules in the filament. Heat-induced aggregation of myosin heads also took place among nearby filaments with increasing temperature; therefore, side-by-side

connection of the filaments occurred to form the strands. Changes in the elasticities of strands corresponded to those of the whole myosin filamentous gel. Furthermore, the changes in the elasticity of the whole gel accorded with those of heat-denatured myosin tail filaments. It is concluded that the degree of denaturation of myosin tails determines the rheological properties of the filamentous gel of myosin. AFM is a powerful tool for study of the gelation of protein in the food science.

1. はじめに

原子間力顕微鏡 (AFM) は、極小の探針で試料表面に触れることで形状を観察するだけでなく微小領域での物性解析装置としても利用され、現在までに多くの生物試料の形態や物性が観察あるいは測定されている¹⁻⁴⁾。我々は、この原子間力顕微鏡を食品科学分野、特にゲル化過程でのタンパク質の変性に伴う構造や物性変化の解析に利用している。

ソーセージ、かまぼこや豆腐等は、タンパク質のゲル化に由来した食品である。その品質はそれぞれの主要タンパク質成分のゲル形成能に左右されるために、タンパク質のゲル化のメカニズムと形成されるゲルの物性に関する研究が多く行われている。しかしながら、タンパク質のゲルの物性を左右する要因については、タンパク質濃度やpH等の要因が複雑に関わっているために、未だによく理解されていない。タンパク質のゲル化のメカニ

ズムは、個々のタンパク質ごとに異なるが、基本的にはタンパク質の変性に伴う凝集体形成の延長線上にあると考えられている。

家畜の骨格筋ミオシンの加熱ゲル化は、エマルションタイプソーセージのような食肉加工品の結着性や保水性の基本となっており製品の品質を左右することから、これまでも多く研究されている。ミオシンの物性も多くのタンパク質と同様に、塩濃度やpH等の溶媒条件によって大きく変化し、ゲルの物性を決定する要因については未だに解明されていない。さらにミオシンは溶媒条件によって圧力処理することでゲルを形成するが、筆者らはこのミオシンの加圧ゲルが加熱処理で得られたゲルとは異なる物性を示すことを明らかにしている。本稿では筋肉タンパク質ミオシンの加熱ゲル化について、著者らが原子間力顕微鏡を用いて行った研究の一例を紹介する。

2. 筋肉タンパク質ミオシンの変性とゲル物性について

骨格筋ミオシンは筋線維中の筋原線維に存在し、太いフィラメントの主要成分であるとともに細いフィラメントの主成分であるアクチンと相互作用することで筋肉の収縮・弛緩を生ずる運動タンパク質である。ミオシン分子は、アクチン結合能ならびにATPase活性をもつ球状の2つの頭部 (S1) と、それに続くほぼ100%のヘリックス構造をもつ長い尾部 (rod) から成る。家畜の骨格筋ミオシンは食品科学的にも重要であり、太いフィラメントとして存在しているミオシンは、0.3 M以上の塩の添加でモノマーとして抽出され、この加熱ゲル化が結着性発現要因と考えられている。また、ミオシンモノマーは生理的イオン強度下では、自己集合して再びフィラメントを形成し、このフィラメントも加熱によってゲルを形成する。近年の健康志向ブームから食肉製品も減塩化される傾向があり、このようなことから低塩濃度下でのミオシンフィラメントの加熱ゲル化を詳細に検討する必要がある。

加熱処理に伴うミオシン分子の高次構造の変化はすでに報告されており^{5,6)}、ミオシン頭部のATPase活性は処理温度の上昇に伴い低下して40°Cで完全に失活する。尾部の α -ヘリックス含量は40°Cから低下し始めて70°C以上では本来の25%程度しか残存していないことが明らかになっている。また、ミオシゲルのかたさ (剛性率) は、タンパク質濃度が高くなるにつれ、高塩濃度よりも低塩濃度で、pHが弱酸性の場合で増加することが示されている⁷⁾。示差走査型熱量計 (DSC) を用いた研究⁸⁾によると、モノマーであればミオシン頭部の相転移温度 (融解温度) は45°C、尾部のそれは55°C程度であり、フィラメントではいずれの部位も55°Cであることが報告されている。剛性率は55~60°Cで最も高くなり、それ以上の温度で処理しても一定の値である⁹⁾。

これらの報告から、ミオシンモノマーは、ミオシン頭部の凝集反応とそれに続く尾部のヘリックス-ランダムコイル転移反応によって凝集タイプのゲルを形成し、フィラメントはその表面に存在する頭部同士の凝集反応と軸を構成する尾部のランダムコイル化によって三次元的な網目構造をもつ線維 (ストランド) タイプのゲルを形成すると考えられている。

3. 原子間力顕微鏡による形態観察

ミオシンフィラメントやその変性体およびゲルの形態観察は、これまでに透過型電子顕微鏡や走査型電子顕微鏡を用いて行われていた。しかしながら、電子顕微鏡での試料調製時には乾燥や重金属の蒸着による試料形状の変形が生じたり、使用加速電圧が高いために得られた画像情報は試料の最表面の形状を正確に反映しているとは限らない場合がある。一方、AFMでは生物試料を化学固定処理なしで溶液中において観察が可能であるために、これまでは見過ごしていた形状情報を得ることが可能である¹⁰⁾。

図1には、AFMで観察した溶液中でのミオシンフィラメントの形態を示した。ミオシンフィラメントの表面にミオシン頭部が突出した構造が観察された。

40~70°Cで加熱した後では、フィラメント同士が会合している様子やその表面に粒子状の構造物の存在が確認できた。図2は、40°Cで処理したミオシンフィラメントを示しているが、フィラメント表面に突出する近傍の頭部間で凝集体が形成され、その凝集体が螺旋状に存在している様子を観察することが可能であった (図2c)。このような形態は電子顕微鏡では観察されていない。また55°Cでは1本のストランドが数本のフィラメントから形成されている明確な像が得られ (図3)、70°Cでは、そのフィラメント間の境界が不明瞭になることも明らかにな

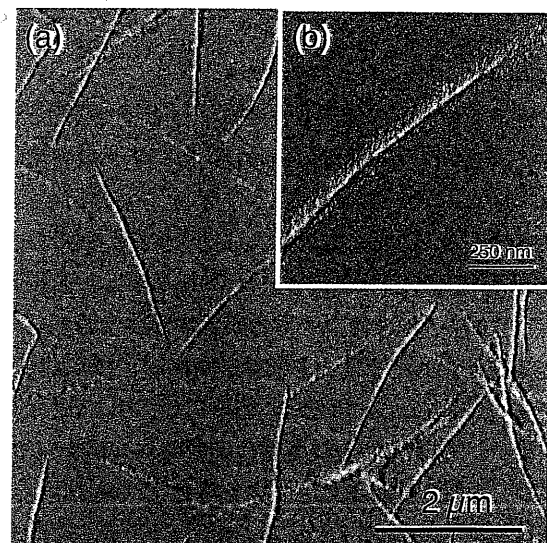


図1. ミオシンフィラメントのAFM像
(a) AFM位相像 (10×10 μm)、(b) 位相像 (1×1 μm)。軸表面のフレア状構造はミオシン頭部である。

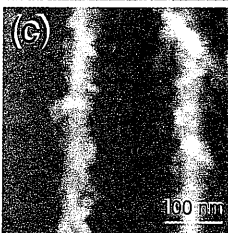
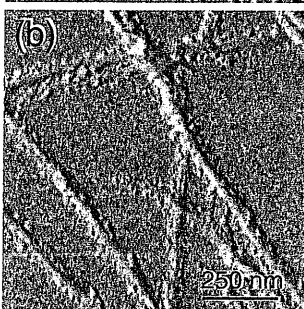
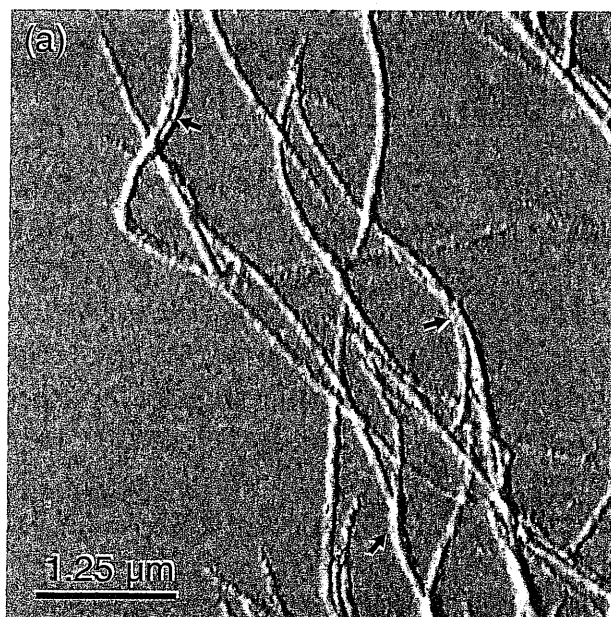


図2. 40°Cで処理したミオシンフィラメントのAFM像
(a) 位相像 (5×5 μm)、(b) 位相像 (1×1 μm)、(c) 形状像 (500×500 nm)。矢印はフィラメント間のSide-by-side型会合部位を示している。

った (図4)。

骨格筋ミオシンの加熱変性が頭部と尾部で異なることをすでに説明したが、その形態変化の様子はAFM観察されていない。そこでミオシンフィラメントと同様の手法でミオシンのサブフラグメント (頭部ならびに尾部) の加熱変性体を観察した。ミオシン頭部はおおよそ20 nm程度の粒子状の構造であるが、加熱により頭部間で凝集反応が生じてより大きな粒子が形成され、加熱温度の増加に伴い粒子のサイズが大きくなっていく様子が観察された (図5)。一方、尾部は図6に示したように生理的イオン強度下ではフィラメントとして存在するが、40°Cで処理することでそのフィラメント構造が壊れていく様子が観察された。55°C以上になると不定形の凝集体が観察され、これらはフィラメントから解離した尾部同

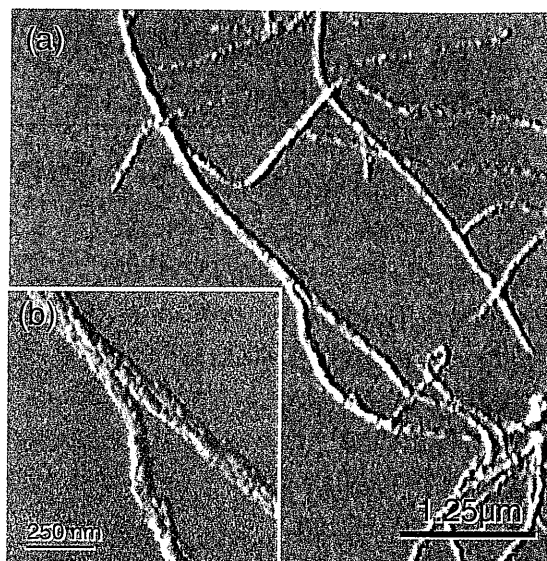


図3. 55°Cで処理したミオシンフィラメントのAFM像
(a) 位相像 (5×5 μm)、(b) 位相像 (1×1 μm)。

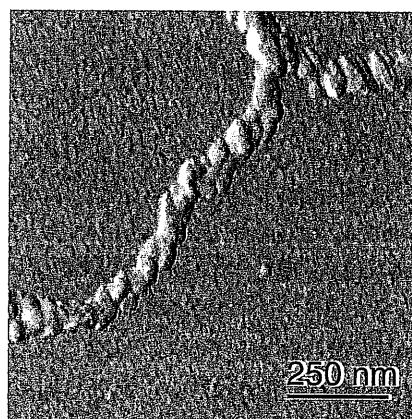


図4. 70°Cで処理したミオシンフィラメントのAFM位相像 (1×1 μm)

士が凝集して形成されたのであろうと推察された。

このような形態観察の結果から、ミオシンフィラメント懸濁液を加熱するとフィラメント表面に存在する頭部間の凝集反応によってフィラメントからのミオシン分子の解離が抑制されるとともにフィラメント間のSide-by-side型会合を介した線維状の構造物 (ストランド) が形成され、これらのストランド同士の交叉的な結合によって三次元的網目構造をもつゲルになると考えられた。

4. 原子間力顕微鏡による物性解析

AFMを用いた押し込み試験による物性解析において重要な点はカンチレバーのバネ定数、探針の形状ならび

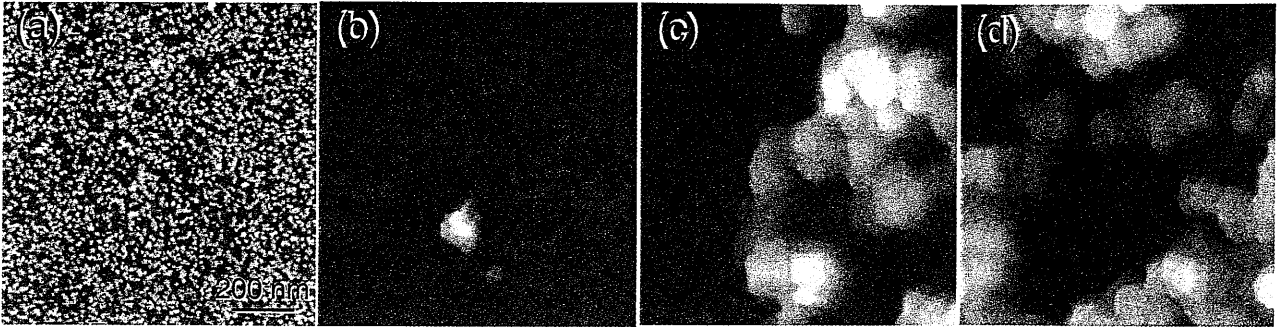


図5. 加熱処理に伴うミオシン頭部の形態変化 (AFM形状像)
(a) 未処理、(b) 40°C、(c) 55°C、(d) 70°C。

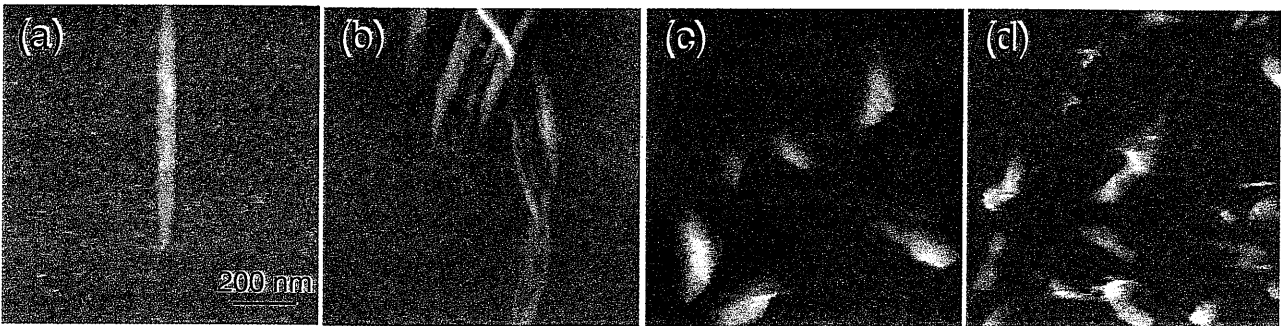


図6. 加熱処理に伴うミオシン尾部フィラメントの形態変化 (AFM形状像)
(a) 未処理、(b) 40°C、(c) 55°C、(d) 70°C。

に探針と試料形状の関係の3点であると考えられている。我々が行ったミオシン変性物の物性解析の結果を紹介する前に、その3点について少し記述する。

カンチレバーのバネ定数は板バネとしての固さを表す量でありN/mで示される。現在販売されているカンチレバーのすべてに公称値として記述があるが、ロットや供給メーカーによっては公称値から20~40%程度異なる場合がある。したがって、研究者の多くは、各自でバネ定数の補正を行っている。探針の形状に関しては、究めていくといずれの探針も先端は球形である。この球の半径(曲率半径)が物性解析時において重要な要因となるのが、数十ナノメートル以下の構造物の物性を測定する場合である、筆者が知るかぎり、この探針形状を正確に補正して物性解析した報告は見当たらないが、厳密に物性値を測定するためには、ここまでこだわる必要がある。探針と試料形状の関係については、試料がカンチレバーの先端サイズと同程度であり試料の厚みもそれほどない場合には、探針を球として、一方、試料が探針先端サイズよりも無限に広くまた厚みもある場合には、探針を円錐状として物性値を算出することができる。いずれの事柄においても多くの成書^{11, 12)}が存在するので、詳細に関してはそちらを参考にさせていただきたい。ただし、これらのパラメータを測定ごとに正確に補正することは非常

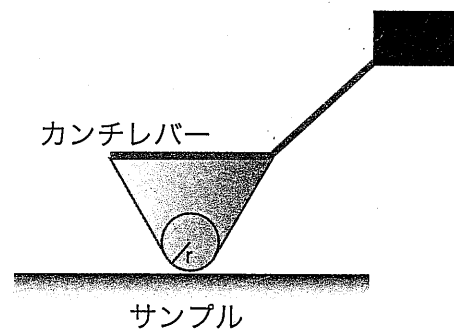


図7. カンチレバーと試料の関係の模式図
 r は先端の半径を示す。

に煩雑な作業を要すること、また正確に補正しても物性値の絶対値を算出することは現在ではまだ難しいということを考えると、筆者らはここまで補正したという事実が重要であるとの認識で良いのではないかと考えている。以上のことをふまえ、我々はミオシンフィラメントの形状と測定の煩雑さを考慮し、探針形状を球としたモデル(図7)を用いて弾性率の算出を行った。

AFMを用いた弾性率の算出は、カンチレバーの変位量(反り、 m)から、そのレバーに加わった力(N)をバネ定数を基に計算し、ピエゾスキャナーの移動距離(m)とレバーに加わった力の関係式であるフォースカーブを得ることから始まる。得られたフォースカーブか

ら、Hertzの理論に基づく関係式¹³⁾を用いて弾性率を算出するのだが、弾性率を算出するフォースカーブ領域についても注意が必要である。本研究で測定したミオシンフィラメント変性体の厚みはおおよそ30-50 nm程度である。カンチレバーの先端径がおおよそ20 nmであることから、試料深部まで探針を侵入させた領域で解析することは好ましくない。本研究では試料と探針が接触してから10 nmの範囲内で、解析にはそのうちの5 nm領域を用いた¹⁴⁾。

実際に加熱処理後のミオシンフィラメント変性体（ストランド）のフォースカーブ解析の結果を図8に示した。図中にはストランドのフォースカーブのほかに、基盤として用いたマイカのフォースカーブも比較対象として記載した。固いマイカに探針が接触するとレバーに大きな力が生じて、レバーが大きく反る。しかし、ストランドでは探針が押し込まれる側も変形していくことから、レバーにかかる力は急には増加しない。これらのフォースカーブから、各処理温度で形成されたストランドの弾性率を算出して図9aに示した。未変性のミオシンフィラメントは532±58 KPaの弾性率であったが、40°Cで1.19±0.06 MPa、55°Cで最大の10.24±1.16 MPaを示し、70°Cでは3.09±0.25 MPaと低下した。バルクゲルの弾性率は球状プランジャーの押し込み試験から求めて図9bに示したが、ストランドの弾性率変化と非常によく似た傾向を示している。ミオシンフィラメントの変性体であるストランドがミオシンフィラメントゲルの網目構造を形成していることから、ストランドの物性が、ミオシンフィラメントゲルの物性に大きく影響を及ぼしていることは間違いないであろう。

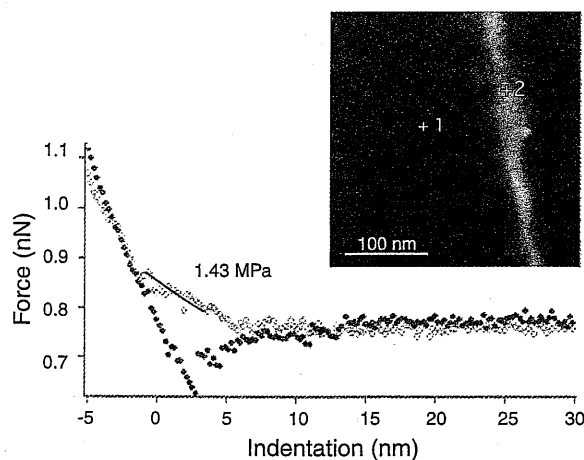


図8. 変性ミオシンフィラメントのフォースカーブ
●; マイカ, ○; 40°Cで処理したミオシンフィラメント。挿入図は測定時のAFM像であり、+1がマイカ、+2が試料の押し込んだ位置を示している。実線は弾性率の算出に使用した領域。

これまでの結果から、ミオシンフィラメントの変性体であるストランドの物性がバルクゲルの物性に大きく影響を及ぼしていることが示唆されたが、ミオシン分子のどの部位の変性がバルクゲルの物性に寄与しているのかは明らかではない。そこで頭部と尾部の各フラグメントを調製して同様の物性解析を行い、図10に示した。加熱処理したミオシン頭部の変性体の弾性率は、処理温度に依存して増加する傾向にあり、70°Cでは42.1±7.1 MPaを示した。一方の尾部では、55°Cで最も高く12.8±1.4 MPaを示したが、70°Cで処理すると0.6±0.2 MPaまで低下した。生理的イオン強度下でのミオシンやそのサブフラグメントの転移温度は、いずれも55°C付近であることから、尾部は転移温度付近で最も弾性率が高くなり、それ以上の温度で処理すると低くなった。一方の頭部は転移温度を超えてから弾性率が増加する結果となった。この弾性率の変化の差異はそれぞれのフラグメントの構造に原因があると考えられるが、詳細はわからない。しかし、ミオシンフィラメントゲルの弾性率の変化と尾部の弾性率の変化はよく一致しており、また、ゲルを構成するストランドがミオシンフィラメント変性体から構成されていることから、フィラメント構造の軸となっている

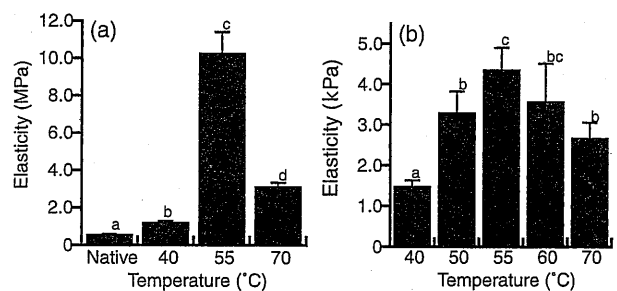


図9. 変性したミオシンフィラメントストランドとミオシンフィラメントゲルの弾性率
(a) ストランドの弾性率、(b) ゲルの弾性率。異なる記号は $p < 0.05$ で統計的有意差があることを示す。

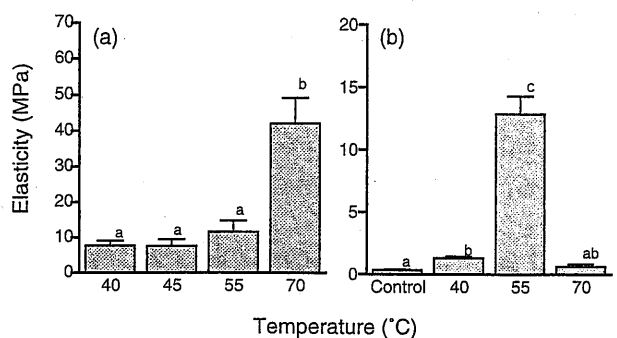


図10. 加熱に伴うミオシンサブフラグメント変性体の弾性率変化
(a) ミオシン頭部、(b) 尾部。controlは未処理の尾部フィラメントを、また異なる記号は $p < 0.05$ で有意差があることを示す。

ミオシン尾部の変性がゲルの物性に大きく寄与している可能性が考えられた。

5. おわりに

本稿では骨格筋ミオシンのゲル形成の研究において、AFMを用いて得られた結果を紹介したが、ミオシン以外のタンパク質や多糖類のゲル研究において、AFMを用いることでこれまでの研究手法ではわからなかった新規な知見が得られると考えている。また、加熱によるタンパク質の変性においては、円偏光二色性測定 (CD) やDSCといった測定で2次構造変化の観察や相転移温度の計測は可能であるが、それらがゲルの物性にどのような影響を及ぼしているのかは推測の域を出なかった。AFMを用いて変性したタンパク質のかたさを知ること、タンパク質変性の理解を進展させられるであろう。AFMを用いたこのような食品科学研究はあまり行われていないが、本稿がそのきっかけになれば幸いである。

本研究を行うにあたりSII-NTの繁野雅次氏にはAFMの使い方や研究手法のアドバイス等多岐にわたり有益なご助言をいただいた。この場をお借りしてお礼申し上げます。

引用文献

- 1) P. Hallett, G. Offer and M. J. Miles, Atomic force microscopy of the myosin molecule, *Biophys. J.*, **68**, 1604-1606 (1995).
- 2) E. Henderson, P. G. Haydon and D. S. Sakaguchi, Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy, *Science*, **257**, 1944-1946 (1992).
- 3) C. Rotsch and M. Radmacher, Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study, *Biophys. J.*, **78**, 520-535 (2000).
- 4) H. Haga, S. Sasaki, K. Kawabata, E. Ito, T. Ushiki and T. Sambongi, Elasticity mapping of living fibroblasts by AFM and immunofluorescence observation of the cytoskeleton, *Ultramicroscopy*, **82**, 253-258 (2000).
- 5) 安井勉, 石下真人, 鮫島邦彦, 食肉加工特性の決定因子—ミオシンの加熱ゲル化反応をめぐって—, *化学と生物*, **19**, 337-344 (1981).
- 6) 安井勉, 鮫島邦彦, 筋肉タンパク質の加熱ゲル形成 (3), *New Food Industry*, **27** (7), 82-88 (1985).
- 7) 安井勉, 鮫島邦彦, 筋肉タンパク質の加熱ゲル形成 (4), *New Food Industry*, **27** (8), 54-65 (1985).
- 8) K. Samejima, M. Ishioroshi and T. Yasui, Scanning calorimetric studies on thermal denaturation of myosin and its subfragments, *Agric. Biol. Chem.*, **10**, 2373-2380 (1983).
- 9) K. Samejima, M. Ishioroshi and T. Yasui, Relative roles of the head and the tail portions of the molecules in heat-induced gelation of myosin, *J. Food Sci.*, **46**, 1412-1418 (1981).
- 10) T. Iwasaki, M. Washio and K. Yamamoto, Atomic force microscopy of thermally treated myosin filaments, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4589-4592 (2005).
- 11) M. Radmacher, Measuring the elastic properties of living cells by atomic force microscopy, "Atomic force microscopy in cell biology", B. P. Jena and J. K. H. Hörber ed., Academic press, 2002, pp. 67-90.
- 12) A. Ikai, Cell mechanics, "The World of Nano-Biomechanics: Mechanical Imaging and Measurements by Atomic Force Microscopy", Elsevier, 2007, pp. 185-205.
- 13) I. N. Seneddon, The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile, *Int. J. Eng. Sci.*, **3**, 47-57 (1965).
- 14) T. Iwasaki, M. Washio, K. Yamamoto and K. Nakamura, Rheological and morphological comparison of thermal and hydrostatic pressure-induced filamentous myosin gels, *J. Food Sci.*, **70**, E432-E436 (2005).

PROFILE



岩崎 智仁

酪農学園大学酪農学部食品科学科
講師
農学博士

1998年酪農学園大学酪農学研究科修士課程修了、同年同大学に勤務、現在に至る。



山本 克博

酪農学園大学酪農学部食品科学科
教授
農学博士

1973年北海道大学農学研究科修士課程修了、同年酪農学園大学に勤務、1979～1981年ニューヨーク州立大学Stony Brook校研究員、1981年酪農学園大学に復職、現在に至る。



中村 邦男

酪農学園大学大学院酪農学研究科
特任教授
理学博士

1966年北海道大学大学院理学研究科修了、同年同大学理学部助手、1996年から2007年酪農学園大学酪農学部教授、2008年同大学大学院酪農学研究科特任教授。