

# 米粒の新規透明化手法の開発による タンパク質の3次元分布の解析と水の移動機構の解明

京都大学大学院 農学研究科  
小川 剛伸

## 【研究の目的と背景】

日本人の代表的な主食である米や麺は、炊飯時や茹で時の水の移動挙動により、喫食時の品質が大きく変わる。我々は、麺内部の水の移動機構を調べ、食感等の品質との関係を明らかにしてきた<sup>1)</sup>。一方で、米は麺と異なり、タンパク質が外表面付近に不均一に分布している。例えば、タンパク質高含有米の炊飯性が低いのは、この外表面付近のタンパク質が水の移動を妨げているためであると考えられているが、米粒内部での水の移動機構は十分に理解されていない。このような水の移動機構の解明を困難にしている原因の一つとして、米粒内部でのタンパク質の分布を3次元的に計測できないことが挙げられる。そこで本研究では、米粒内部での水の移動機構の解明に向けた第一段階として、内部のタンパク質の分布を3次元的に計測する手法を開発し、米粒内部のタンパク質分布を測定することを目的とした。

## 【研究の方法】

### 1. 材料

市販の精米されたコシヒカリ(京都府京丹後市大宮町産)を使用した。

### 2. 固定と酵素消化

米粒試料を固定液(3%パラホルムアルデヒドおよび0.3% Triton X-100を含む緩衝液)に浸漬し固定した。固定後、試料を4℃で10分間緩衝液を用いて2回洗浄した。その後、0.3% Triton X-100を含む緩衝液に溶解した1%セルラーゼ Onozuka RS(ヤクルト製薬工業, 東京)および0.5% ペクトリアーゼ Y-23(Seishin Pharmaceuticals, Tokyo, Japan)混合液に浸漬した。次に、試料を37℃で30~60分間インキュベートし、4℃の緩衝液中で10分間それぞれ2回洗浄した。

### 3. 透明化

試料の透明化は、これまでに開発したSoROCS溶液に浸漬し、振盪しながらインキュベートした。

### 4. 蛍光観察

蛍光顕微鏡および二光子励起蛍光顕微鏡を用いて、試料を観察した。

## 【研究内容】

これまでに麺などの食品を透明化できる新たなSoROCS溶液を開発し、この溶液を用いて試料をまるごと透明化後、二光子励起蛍光顕微鏡を用いることで、麺内部のグルテンタンパク質のネットワーク構造を高い空間分解能で3次元的に計測する手法を開発した。脳や植物等の生体組織を透明化する溶液は多く開発されているが、SoROCS溶液は澱粉-タンパク質を多く含む食品試料の透明化を図ることができるという特徴を有する。SoROCS溶液を用いることで、米粒をある程度は透明にできるが、米粒は麺等に比べて浸水性が悪く、米粒をまるごと3次元計測するのに必要な透明度を得るのは困難である。そこで、本研究では、米粒をより透明にする手法を検討した。すなわち、米粒のさらなる透明化を達成するために、透明化溶液の米粒内部への浸透を促進させる過程の追加、ならびに米粒内部のタンパク質を標識する最適な試薬の選定を実施した。その後、二光子励起蛍光顕微鏡を用いて、米粒内部のタンパク質の分布を計測した。

## 【研究の実施経過】

### 1. 酵素処理が透明化溶液の浸漬に及ぼす影響

透明化溶液の米粒内部への浸透を促進させるために、透明化溶液に浸漬する前の処理として、固定化と酵素処理の過程を追加することを検討した。この固定化と酵素処理の過程は、植物を透明化する手法一つであるePro-ClearSee法で提案されたものである<sup>2)</sup>。水(腐敗防止のためにアジ化ナトリウムを0.5%添加)、SoROCS溶液、および固定した試料を酵素消化した後にSoROCS溶液に浸漬した米粒の透明化過程を図1に示す。水に浸漬した米粒は、4日後についても不透明であった。一方で、SoROCS溶液および固定した試料を酵素消化した後にSoROCS溶液に浸漬した米粒は、双方とも米粒外表面から透明化し、1日後では中心部に不透明領域が残っているものの、4日後にはほぼ透明となった。

次に、カメラで撮影した米粒画像の輝度値より、簡易的に米粒内部の透明度を数値化した(図2)。水に浸漬した米粒は、1日後までに大きく透明度が低下し、4日後まで徐々に低下した。一方、SoROCS溶液および固定した試料を酵素消化した後にSoROCS溶液に浸漬した米粒は、双方とも4日後には、比較的透明であることを示す透明度

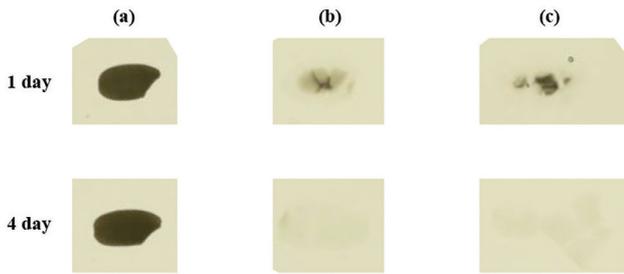


図1 米粒の透明化過程

(a) 水（腐敗防止のためにアジ化ナトリウムを0.5%添加）、(b) SoROCS 溶液、(c) 固定した試料を酵素消化した後に SoROCS 溶液に浸漬した米粒。上段は1日後、下段は4日後を示す

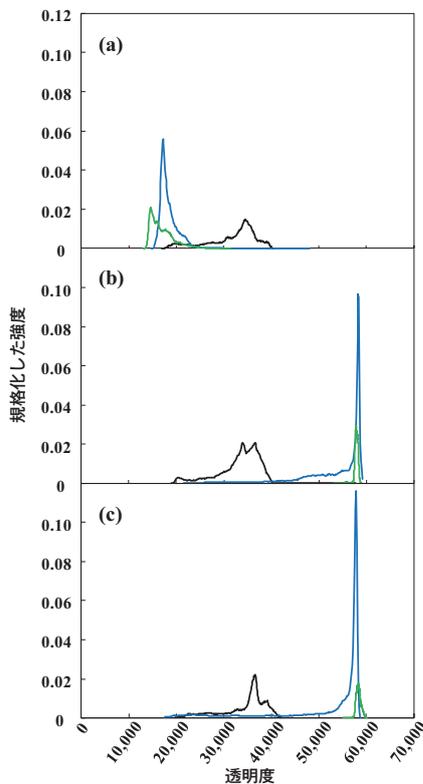


図2 米粒の透明度の比較

(a) 水（腐敗防止のためにアジ化ナトリウムを0.5%添加）、(b) SoROCS 溶液、(c) 固定した試料を酵素消化した後に SoROCS 溶液に浸漬した米粒。黒線はもとの状態、青線は1日後、緑線は4日後を示す。透明度の数値が大きいほど、より透明な領域を米粒が有することを示す。

60,000 付近に一つのピークとなって表れた。ただし、はじめから SoROCS 溶液に浸漬した米粒は、1 日後には、米粒の不透明な中心領域に対応する透明度 45,000 ~ 57,000 付近に平坦な分布（ピークのショルダー）が見られた。これに対し、固定した試料を酵素消化した後に SoROCS 溶液に浸漬した米粒は、透明度が約 52,000 以下にほぼピークが見られず、若干ではあるが、より透明であることを示す高い値に分布が偏っていた。

さらに、米粒内部のタンパク質を標識する最適な試薬を

選定するために、複数の蛍光物質を探索した結果、チオール反応性を有する蛍光物質の一つに、米粒内部のタンパク質を明瞭に標識できるものを見出した。米粒の切片をその蛍光物質で染色し、蛍光顕微鏡で観察した画像を図3に示す。

最後に、透明化した米粒試料を二光子励起蛍光顕微鏡で観察した3次元画像の一部を図4に示す。



図3 米粒の切片画像

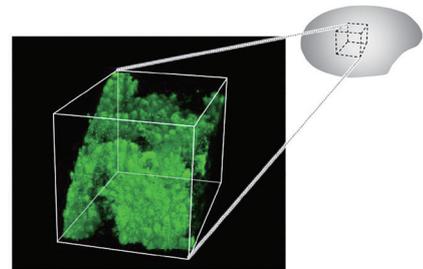


図4 米粒の3次元画像

### 【研究から得た結論・考察】

固定した試料を酵素消化する過程を透明化過程の前に追加することで、透明化溶液の米粒内部への浸透速度を高める可能性があることがわかった。透明化溶液の米粒内部への浸透の促進は、透明化過程の時間短縮に寄与するだけでなく、試料の膨潤や内部構造の破壊を抑制することが可能となる。また、米粒内部のタンパク質の標識に適する蛍光物質を見出すことができた。さらに、米粒をまるごと3次元計測するには至らなかったが、非常に短い時間で透明化できるようになったことで、オリジナルな状態に近い試料について、ある程度の深部まで内部の構造を計測できるようになった。

### 【残された問題、今後の課題】

米粒を溶液に浸漬することで、米粒に胴割れが生じてしまった。特に、米粒を固定する際の胴割れの発生は顕著であった。そのため、固定した試料を酵素消化した後に SoROCS 溶液に浸漬し、透明化を図ると、胴割れにより米粒が複数に分割してしまった。このような分割は、米粒内部のタンパク質の分布を3次元的に計測する際には不都合である。固定した試料を酵素消化する過程を透明化過程の

前に追加することで、オリジナルに近い状態で透明化を図れる可能性という利点を見出した一方で、米粒が分割されてしまうという非常に大きな問題が残された。米粒の含水率および浸漬する溶液の温度をうまく制御することで、米粒の胴割れを抑制するなどの対策が必要である。また、炊飯時における米粒内部の含水率の分布は、例えば核磁気共鳴画像法等により3次元的に計測できる。そこで、このような計測手法を本法と併用することで、含水率分布とタンパク質分布を同時に把握し、米粒内部での水の移動機構の解明を大きく前進させることが今後の課題である。

### 謝辞

本研究を実施するにあたり、ご援助賜りました公益財団法人 東洋食品研究所に厚く御礼申し上げます。また、本研究の一部は、京都大学大学院医学研究科医学研究支援センターのご支援を賜りました。

### 引用文献

- 1) T. Ogawa and S. Adachi (2017) Drying and rehydration of pasta. *Drying Technol.*, 35: 1919–1949.
- 2) K. Nagaki, N. Yamaji, and M. Murata (2017) ePro-ClearSee: a simple immunohistochemical method that does not require sectioning of plant samples. *Sci. Rep.*, 7: 42203.