

# 令和 5 年度仙台市既存放射光施設活用事例創出事業（トライアルユース） 事例報告書

## 1 課題名

難消化性澱粉の澱粉粒子の内部構造解析

## 2 測定にあたっての体制（社外委託先を含め記載）

受注者：

スターテック株式会社

中村 保典（サンプル提供、社会実装への検討）

国立大学法人山形大学 大学院有機材料システム研究科 教授

松葉 豪（研究総括、サンプル測定、解析・分析）

実験実施場所

SPring-8（マイクロビーム X 線回折）

## 3 背景と測定目的

### 《背景》

米は多くのアジア人にとって主食であり、日本人を含めて人類のエネルギーを支える炭水化物の一つである。米は炭水化物やタンパク質、脂質からなっているが、炭水化物の多くは澱粉である。澱粉はグルコースが直鎖状に重合したアミロースと分岐を有しているアミロペクチンから構成されている。そして、我々の体内ではアミロペクチンを分解してエネルギー源としている。ただ、現在のダイエット志向・健康志向の高まりから難消化性澱粉（Resistant Starch, RS）の開発が進められている。中でも、枝作り酵素である BEIIb の機能欠損体（*be2b* 変異体）は人間が消化しづらい澱粉を多く含んでいることが知られている。枝作り酵素である BEIIb の活性を制御することで、RS の内部構造、結晶構造を制御できる。一方で、RS は熱的物性が異なっており、実際の調理・加工に応用するに当たり、まだ多くの課題がある。また、RS 食品の健康への貢献は、単にカロリーフリー効果にとどまらず、血糖量上昇抑制効果、免疫賦活化、大腸内細菌環境の改善など、多様な効果が期待されている。RS 澱粉素材は、RS の量だけでなく、澱粉の構造的かつ質的な変化により、一層多様な効果が期待される。本研究により、澱粉の結晶性の制御、内部構造の制御が可能になれば、さらに重要な知見が得られ、応用面での大きな効果か期待される。

これまで、山形大学大学院有機材料システム研究科の松葉研究室との共同研究で、野生種である Kinmaze と高 RS の *be2b* 変異体株である EM10 から取り出した澱粉粒を比較したところ、図 1 に示すとおり、結晶構造が大きく変化していることを示した。一般的に野生型イネの消化しやすい澱粉は A 形結晶を取っている一方、RS は

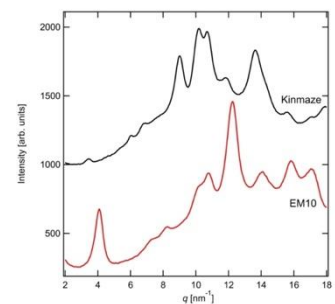


図 1 Kinmaze と EM10 の XRD プロファイル

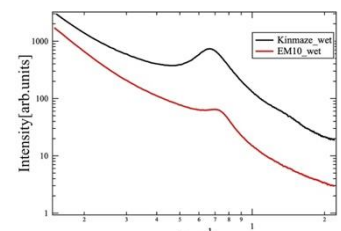


図 2 Kinmaze と EM10 の SAXS プロファイル

B形結晶となっていることを示した。また、図2に示すように小角X線散乱測定も同様に行っており、A形結晶となる Kinmaze がいわゆる長周期構造がより大きく明瞭に見えているのに対して、EM10の高RSは長周期構造が弱く、やや長周期の大きさが小さく（広角側にシフト）していることがわかった。しかしながらこれらは澱粉粒（数10ミクロン程度）の平均値を捉えているものであり、粒の内部構造については評価できていない。

スターチテック社では、枝作り酵素である BEIIb の活性を制御し、種々の難消化性澱粉 RS を含有する米澱粉の製品（麺類、パン類、発酵製品など）を開発している。東北放射光を利用することで酵素活性を変化させた澱粉のより詳細な理解ができるとともに、高 RS を使用した商品の性能との関連が解明されると期待される。

### 《目的》

マイクロビーム X 線を用いた広角・小角 X 線散乱測定で種々の *be2b* 変異体シリーズの澱粉粒サンプルの内部の結晶構造の分布を評価することを目指す。これまでの研究では、澱粉粒の平均構造については、評価に成功しているが内部の結晶および結晶高次構造がどのような分布をしているかが明らかにされていない。澱粉粒の内部の分布を評価できれば澱粉および澱粉内のアミロペクチン分子が中心部からどのように成長しているのかを明らかにできる。これは、新たな難消化性澱粉の開発につながる。また、いくつかの酵素活性が異なる澱粉についても同様の評価を行い、酵素活性が澱粉粒の内部構造に及ぼす影響を評価する。さらに、馬鈴薯など他の植物由来の澱粉についても比較を行う。このようにして、澱粉内部構造と物性との関係を明らかにする。さらに、それらを使用した商品の品質との関連を解明することを通じて、さまざまな澱粉製品の評価法を確立し、新商品を開発する。

## 4 測定方法（測定手法、測定セットアップ、使用ビームラインなど）

### 《分析に使用した試料》

下記の6種類の米試料を用いた。各資料の特徴は以下のとおりである。

系統（品種）名	遺伝子型*	RS	アミロース含有量
・秋田63号（野生系統）	<i>SSIIIa/BEIIb/gbss1</i>	低	約19%
・A2:あきたさらり	<i>ss3a/BEIIb/gbss1</i>	弱	約29
・A6:まんぶくすらり	<i>ss3a/be2b/gbss1</i>	高	約39
・A30:白すらり	<i>SSIIIa/be2b/GBSS1</i>	極高	約38
・A34:赤すらり	<i>SSIIIa/be2b/GBSS1</i>	極高	約38
・EM10:ae変異体	<i>SSIIIa/be2b/gbss1</i>	極高	約23

(\*小文字は、遺伝子(酵素)機能が欠損したもの)



図3 サンプルおよび固定の様子

それぞれのサンプルおよび PEEK フィルムに包んでセルにセッティングした時の様子を図3に示す。それぞれのサンプルは、セルにテープで固定し測定した。なお、測定は常温・常圧下で行った。

### 《放射光測定条件》

測定は SPring-8 の BL40XU を利用した。測定条件は、波長  $1\text{ \AA}$  で、露光時間  $1\text{ s}$  である。ビームサイズは縦  $0.5\text{ \mu m}$  x 横  $1.0\text{ \mu m}$  である。また、サンプルをビデオカメラで撮影しながら米粒の種々の箇所をスキャンしながらマッピング測定を行った。また、ディテクタには PILATUS3M を用いた。

### 《データ解析》

得られた二次元広角 X 線回折像を Image J ソフトウェアで評価し、さらにプロファイルを精密に解析するため、Fit 2D ソフトウェアと Igor Pro ソフトウェアで解析を行った。

5 結果及び考察 (代表的なグラフや図を用いて分かりやすく説明すること)

まず、図 4 に秋田 63 号および EM10 の米粒の中央 2 次元広角 X 線散乱像 (WAXS 像) を示す。現状、確認したところ 2 次元像からは大きな異方性がある構造は観測されておらず、ビームに含まれるアミロペクチンおよびその他の成分は等方的に存在していることを表している。それぞれの結晶系は大きく異なっており、EM10 では中央部 (矢印) 付近に非常に明瞭なリングが観測される。これは、B 形結晶に特有のピークである。一方で、秋田 63 号は A 形結晶 (もしくは C 形結晶) であると考えられる。さらに、それぞれの試料について円環平均を行い、それぞれのプロファイルと比較した。その結果を図 5 に示す。図 5 においては、A6、A30、A34 および EM10 には  $q = 4 \text{ nm}^{-1}$  付近に比較的強いピークが観測されており、B 形結晶もしくは C 形結晶であることがわかる。一方で、A6・A30・A34 は  $q = 16 \text{ nm}^{-1}$  付近にショルダーが存在しており、A 型結晶の存在も示された。これらのことから、秋田 63 号、A2 は A 形結晶、A6・A30・A34 は A 形結晶と B 形結晶が混じった C 形結晶、EM10 は B 形結晶であることが示された。そこで、位置による変化を評価することを試みた。ここでは、米粒を縦方向にスキャンしたときの構造変化について議論する。例として、秋田 63 号について評価した結果を図 6 に示す。胚芽部分に近い部分 (緑) については、約 5~10 ミクロン程度の非晶および脂質、タンパク質からなる層が観測された。一方で、頭部側 (青) においては約 20 ミクロン程度の非晶構造が存在することが示された。同様の構造が他の米でも観測されており、表面部分と内部で結晶化度が異なっていることがわかった。一方で、内部については、大きな変化は見られなかった。しかしながら、散乱曲線のピークの大きさの相対値が変化している部分が見られており、詳細な解析により、内部構造のさらなる情報が明らかにできると期待される。

以上、観察結果をまとめる。

1. 種々の米の種子内部の結晶構造を推測することができた。高 RS 澱粉を含み、かつ農業形質が優れている A6、A30、A34 系統は、C 型澱粉を含んでいた。高 RS を含むが、農業形質が劣っている EM10 の澱粉が B 型であるのとは対照的だった。
2. 種子の部位により、澱粉構造には大きな差異が観察された。
3. 種子表面部分は非晶層がみられ、中には油脂・タンパク質由来の散乱が観測された。
4. 種子の中央部においては、品種ごとに異なる結晶構造が見られた。
5. これらの結果から、種子内には部位ごとに性質の異なる澱粉が含まれていることが初めて明

図 6 秋田 63 号の測定位置を変えた際の X 線散乱プロファイル

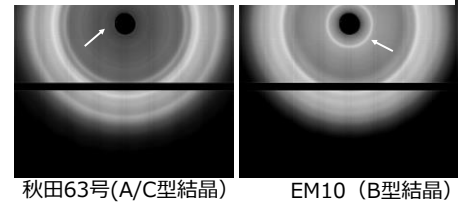


図 4 秋田 63 号および EM10 の 2 次元広角 X 線散乱プロファイル

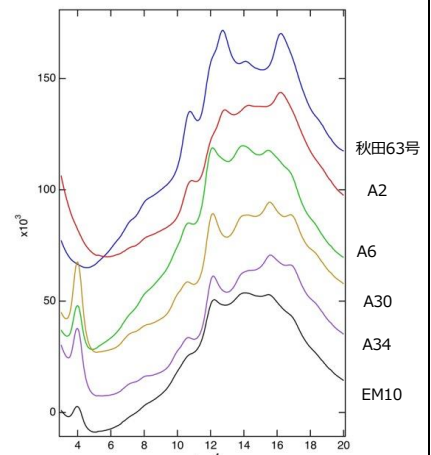


図 5 それぞれの米の X 線散乱プロファイル

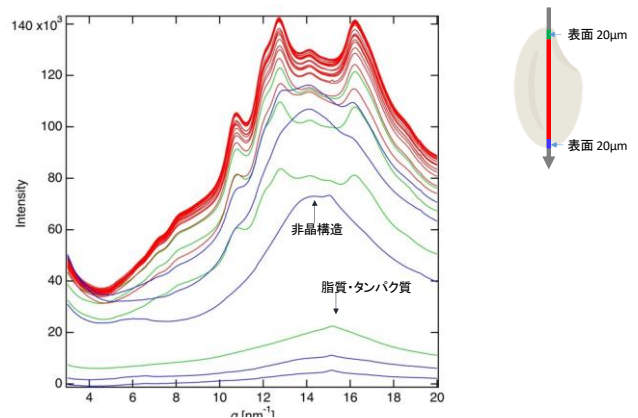


図 6 秋田 63 号の測定位置を変えた際の X 線散乱プロファイル

らかになった。本分析の特筆すべき成果である。

## 6 今後の課題

1. 今回の分析で、種子の部位別に、澱粉の結晶タイプや含有量などに大きな差異があることが明らかにされた。今回の分析では、イネの種子を丸ごと用いてスキャンしたが、種子のスライスサンプルを用いることができれば、部位別の特徴が正確でより鮮明になると思われる。適切なサンプル調製に取り組みたい。
2. 高RS澱粉といっても、系統ごとに異なるタイプの澱粉があることが明らかになった。食品の健康への貢献など、機能性への期待が大きい高RSであるが、その性質やタイプなどは、現在はまだ明確ではない。今後、澱粉構造と高RS性の関連性を深めることにより、高RS米の素材としての価値を高めることができると期待される。
3. これらの目的を達成するためには、高エネルギーX線ビームを有する放射光施設の利用は欠かせない。これらの試みにより、放射光施設の食品産業分野への貢献が顕著になる。

## 7 参考文献

1. 貝沼圭二、八田珠郎. (2003) 結晶構造. 「澱粉科学の事典」. 朝倉書店. pp. 40-49.
2. Nakamura Y, Yashiro K, Matsuba G, Wang Y, Mizutani G, Ono M, Bao J. (2023) The relationship between the fine structure of amylopectin and the type of crystalline allomorph of starch granules in rice endosperm. *Cereal Chemistry* 100, 721-733.