

博士論文審査報告書

申請者氏名	神垣 隆道 (かみがき たかみち)
学位の種類	博士 (理学)
学位記番号	論博理第24号
学位記授与報告番号	乙第70号
学位授与年月日	令和元年12月20日
学位授与の要件	学位規則第4条2項
論文題目	電子顕微鏡法を用いた乳・乳製品の微細構造解析
論文審査委員	(主査) 教授 宮澤 淳夫 (副査) 教授 峰雪 芳宣 (副査) 教授 久保 稔 (副査) 教授 光岡 薫 (大阪大学超高压電子顕微鏡センター)

1. 論文内容の要旨

乳および乳製品の微細構造は、それら自体の物理化学的な性質はもとより、食品としての風味にも、直接、関係している。本論文ではクライオ電子顕微鏡法を駆使し、乳および乳製品の微細構造の解析を行った。まず、乳に含まれる主要なタンパク質であるカゼインの解析を行った。乳中においてカゼインはリン酸カルシウムと架橋し、複合体となりミセルを形成していると考えられている。このミセル構造は、これまで徐々に明らかになってきているが、カゼインミセル内の CCP (Colloidal Calcium Phosphate) の分布や、CCP とカゼインとの架橋構造については未だ解明されていない。そこでクライオ電子顕微鏡法の1つである CEMOVIS (Cryo-electron Microscopy of Vitreous Sections) によりカゼインミセルの内部構造を観察した。その結果、カゼインミセルの平均直径は約 140 nm であり、CCP の直径は約 2~3 nm (平均 2.3 nm) であることを確認した。また、カゼインミセル内での CCP 間の距離 (平均間隔 5.4 nm) は均一ではなく、カゼインと CCP を含まない領域が存在し、そこは水で満たされた空洞であると推察された。

チーズなどの乳製品の多くは乳脂肪分が含まれているため、電子顕微鏡観察のための試料調製として一般的なオスミウム酸固定が用いられている。一方、オスミウム酸による抗原性失活のため、免疫電子顕微鏡法においてはタンパク質分子の局在解析が課題となっていた。そこで、オスミウム酸固定を用いず凍結超薄切片法により免疫標識して観察する徳安法により、パニールチーズにおける主要な乳清タンパク質である β -ラクトグロブリンの局在解析を試みた。その結果、試料中に脂肪球と乳タンパク質の連続相が保持され、 β -ラクトグロブリンに対する免疫標識が、脂肪球と乳タンパク質の凝集体、および空洞部に存在する脂肪球の界面に分布していることを明らかにした。

また、ホイップクリームについては、その気泡界面における油脂結晶の状態や機能に関して不明な点が多く残されている。そこで、クライオ電子顕微鏡法の1つである氷包埋法を用いて、ホイップに伴うクリームの水相および気泡界面の変化を油脂結晶に着目して観察した。その結果、ホイップ前のクリームでは、脂肪球界面に沿って油脂結晶がラメラ層

を形成し、脂肪球の中心に液状脂が存在していた。その後のホイップにより、脂肪球から解離した油脂結晶は小さな破片となって気泡界面に吸着し、気泡中に占める油脂結晶の面積が徐々に増加していた。この時、脂肪球から放出された液状脂は、水相だけでなく、脂肪球と脂肪球の隙間にも存在していた。ここで明らかとなった油脂結晶の挙動が、ホイップクリーム中の気泡安定性に寄与していると考えられる。

本研究は、乳および乳製品の主要な構成成分に関する微細構造解析において、CEMOVISを用いた乳中のカゼインミセルの観察と、徳安法を用いたパニールチーズ中の β -ラクトグロブリンの観察を行った。得られた基礎的知見は、牛乳、チーズ、発酵乳などのより良い品質や風味の開発に寄与する。また、氷包埋法によりホイップクリームの油脂結晶を観察して得られた知見は、クリームにおけるホイップメカニズムの解明だけでなく、氷包埋法による油脂結晶の観察手法を他の乳製品（生クリーム、バター）やマーガリン等にも応用することにより、それらの製品設計に役立てることができる。このように本研究で行った乳および乳製品の電子顕微鏡法による解析は、他の様々な乳製品にも応用することができ、今後、それらの開発や品質の向上に貢献していくことが示された。

2. 論文審査結果

本論文は、食品分野での活用例がほとんどないクライオ電子顕微鏡法を用いて、乳および乳製品を対象に、それらの主要成分の微細構造解析を行った。まず、CEMOVISを用いた乳のカゼインミセルの内部構造観察では、従来の化学固定による電子顕微鏡法では捉えられないカゼインミセルの自然な状態に近い構造の解析に成功した。カゼインミセルの表面の凹凸のある形状や、ミセル内部のCCPのサイズや分布状態、さらに水で満たされた空洞の存在を明らかにすることにより、カゼインミセルの新たな構造モデルを提唱した。また、パニールチーズの観察では、一般的なオスミウム酸固定をあえて行わず、徳安法による β -ラクトグロブリンの免疫電子顕微鏡法により、これまで観察が困難であった脂肪球界面の微細構造解析に成功した。本論文で、加熱により β -ラクトグロブリンが脂肪球界面に吸着する現象を可視化できたことは、乳脂肪分を含む多くの乳製品の特性評価に、技術的な進展をもたらした。さらに、ホイップクリームの観察では、これまで慣用的に行われた凍結レプリカ法では観察が困難であった水相や気泡に存在する油脂結晶の状態を、氷包埋法を用いることによりホイップのステップ毎に試料調製し、クライオ電子顕微鏡法で観察した。その結果、ホイップ前のクリームと、各ホイップのステップにおける油脂結晶ならびに脂肪球から放出された液状脂の状態を、詳細に比較・検討することが可能となり、ホイップクリーム中の気泡安定性に関与する油脂結晶の挙動を明らかにすることができた。

本論文は、乳ならびに乳製品の主要成分であるタンパク質および脂肪分に着目して、それらの微細構造をクライオ電子顕微鏡法により分子レベルで解析することにより、従来法では得ることができなかった新しい知見を見出した。本論文で確立された新たな観察法と解析結果は、今後、様々な乳製品の開発と品質向上に有益な情報をもたらすことが期待される。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、令和元年10月28日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

博士論文審査報告書

論文題目：電子顕微鏡法を用いた乳・乳製品の微細構造解析

申請者：神垣 隆道

1. 論文内容の要旨

乳および乳製品の微細構造は、それら自体の物理化学的な性質はもとより、食品としての風味にも、直接、関係している。本論文ではクライオ電子顕微鏡法を駆使し、乳および乳製品の微細構造の解析を行った。まず、乳に含まれる主要なタンパク質であるカゼインの解析を行った。乳中においてカゼインはリン酸カルシウムと架橋し、複合体となりミセルを形成していると考えられている。このミセル構造は、これまで徐々に明らかになってきているが、カゼインミセル内の CCP (Colloidal Calcium Phosphate) の分布や、CCP とカゼインとの架橋構造については未だ解明されていない。そこでクライオ電子顕微鏡法の 1 つである CEMOVIS (Cryo-electron Microscopy of Vitreous Sections) によりカゼインミセルの内部構造を観察した。その結果、カゼインミセルの平均直径は約 140 nm であり、CCP の直径は約 2~3 nm (平均 2.3 nm) であることを確認した。また、カゼインミセル内での CCP 間の距離 (平均間隔 5.4 nm) は均一ではなく、カゼインと CCP を含まない領域が存在し、そこは水で満たされた空洞であると推察された。

チーズなどの乳製品の多くは乳脂肪分が含まれているため、電子顕微鏡観察のための試料調製として一般的なオスミウム酸固定が用いられている。一方、オスミウム酸による抗原性失活のため、免疫電子顕微鏡法においてはタンパク質分子の局在解析が課題となっていた。そこで、オスミウム酸固定を用いず凍結超薄切片法により免疫標識して観察する徳安法により、パニールチーズにおける主要な乳清タンパク質である β -ラクトグロブリンの局在解析を試みた。その結果、試料中に脂肪球と乳タンパク質の連続相が保持され、 β -ラクトグロブリンに対する免疫標識が、脂肪球と乳タンパク質の凝集体、および空洞部に存在する脂肪球の界面に分布していることを明らかにした。

また、ホイップクリームについては、その気泡界面における油脂結晶の状態や機能に関して不明な点が多く残されている。そこで、クライオ電子顕微鏡法の 1 つである氷包埋法を用いて、ホイップに伴うクリームの水相および気泡界面の変化を油脂結晶に着目して観察した。その結果、ホイップ前のクリームでは、脂肪球界面に沿って油脂結晶がラメラ層を形成し、脂肪球の中心に液状脂が存在していた。その後のホイップにより、脂肪球から解離した油脂結晶は小さな破片となって気泡界面に吸着し、気泡中に占める油脂結晶の面積が徐々に増加していた。この時、脂肪球から放出された液状脂は、水相だけでなく、脂肪球と脂肪球の隙間にも存在していた。ここで明らかとなった油脂結晶の挙動が、ホイップクリーム中の気泡安定性に寄与していると考えられる。

本研究は、乳および乳製品の主要な構成成分に関する微細構造解析において、CEMOVIS を用いた乳中のカゼインミセルの観察と、徳安法を用いたパニールチーズ中の β -ラクトグロブリンの観察を行った。得られた基礎的知見は、牛乳、チーズ、発酵乳などのより良い

品質や風味の開発に寄与する。また、氷包埋法によりホイップクリーム of 油脂結晶を観察して得られた知見は、クリームにおけるホイップメカニズムの解明だけでなく、氷包埋法による油脂結晶の観察手法を他の乳製品（生クリーム、バター）やマーガリン等にも応用することにより、それらの製品設計に役立てることができる。このように本研究で行った乳および乳製品の電子顕微鏡法による解析は、他の様々な乳製品にも応用することができ、今後、それらの開発や品質の向上に貢献していくことが示された。

2. 論文審査結果

本論文は、食品分野での活用例がほとんどないクライオ電子顕微鏡法を用いて、乳および乳製品を対象に、それらの主要成分の微細構造解析を行った。まず、CEMOVIS を用いた乳のカゼインミセルの内部構造観察では、従来の化学固定による電子顕微鏡法では捉えられないカゼインミセルの自然な状態に近い構造の解析に成功した。カゼインミセルの表面の凹凸のある形状や、ミセル内部の CCP のサイズや分布状態、さらに水で満たされた空洞の存在を明らかにすることにより、カゼインミセルの新たな構造モデルを提唱した。また、パニールチーズの観察では、一般的なオスミウム酸固定をあえて行わず、徳安法による β -ラクトグロブリンの免疫電子顕微鏡法により、これまで観察が困難であった脂肪球界面の微細構造解析に成功した。本論文で、加熱により β -ラクトグロブリンが脂肪球界面に吸着する現象を可視化できたことは、乳脂肪分を含む多くの乳製品の特性評価に、技術的な進展をもたらした。さらに、ホイップクリームの観察では、これまで慣用的に行われた凍結レプリカ法では観察が困難であった水相や気泡に存在する油脂結晶の状態を、氷包埋法を用いることによりホイップのステップ毎に試料調製し、クライオ電子顕微鏡法で観察した。その結果、ホイップ前のクリームと、各ホイップのステップにおける油脂結晶ならびに脂肪球から放出された液状脂の状態を、詳細に比較・検討することが可能となり、ホイップクリーム中の気泡安定性に関与する油脂結晶の挙動を明らかにすることができた。

本論文は、乳ならびに乳製品の主要成分であるタンパク質および脂肪分に着目して、それらの微細構造をクライオ電子顕微鏡法により分子レベルで解析することにより、従来法では得ることができなかった新しい知見を見出した。本論文で確立された新たな観察法と解析結果は、今後、様々な乳製品の開発と品質向上に有益な情報をもたらすことが期待される。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、令和元年10月28日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

主査：宮澤 淳夫

副査：峰雪 芳宣

：久保 稔

：光岡 薫



(大阪大学超高压電子顕微鏡センター、教授)