中性子非弾性散乱による食品タンパク質の水和とガラス転移の解析

中川 洋^{1*}, 片岡幹雄^{1,2}

¹ 独立行政法人日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究センター

² 奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科

Investigation of Hydration and Glass Transition of Food Protein by Inelastic Neutron Scattering

Hiroshi Nakagawa^{1*} and Mikio Kataoka^{1,2}

¹ Japan Atomic Energy Agency, Quantum Beam Science Center,
2-4 Shirakata, Shirane, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki 319-1195

² Nara Institute of Science and Technology, Graduate School of Materials Science,
8916-5 Takayama-cho, Ikoma, Nara 630-0192

Low water activity and the glass state in dried foods restrict the growth of microorganisms and increase food stability. Vitrification of foods is related to the texture. Thus, hydration and vitrification are essential factors determining the physical properties and quality of foods. Inelastic neutron scattering (INS) is a promising research method for the analysis of water mobility and glass transition of food materials. Neutrons easily penetrate materials, and can be used to non-destructively investigate the molecular dynamics of food materials. INS generates information about the vibrational density of states, relaxation and diffusion processes, and mean-square displacement. Molecular dynamics (MD) simulation provides information regarding molecular structure and dynamics on an atomic scale, and is thus complementary to INS. It was found that the hydration level dependence of the onset of protein glass transition is correlated with the percolation transition of hydration water. In addition, the hydration water dynamics changed significantly at the transition temperature. The percolation of hydration water induces protein glass transition.

(Accepted Jan. 21, 2014)

Keywords : inelastic neutron scattering, protein hydration, water mobility, glass transition

キーワード : 中性子非弾性散乱, 蛋白質の水和, 水の運動性, ガラス転移

1. はじめに

中性子非弾性散乱は分子の運動性を解析できる分光法のひとつであり, 水分子の動的挙動やガラス転移における分子運動の解析に有効な実験手法である。食品中の水は食品の保存性に関係し, 食品の品質劣化の原因となる一方で, 水分は食品にソフトで口当たりの良い食感を与える。また食品のガラス化は食感とも関わり, 食品の品質を決める重要な要因である。水の物理化学的状態やガラス化による物理化学的状態の変化を理解することは, 食品の物性研究の重要なテーマであり, 中性子非弾性散乱は有効な分析手段となると考えられる。食品における水研究は, (1) 水分子の運動性, (2) 水分子・水分子集合の存在状態, (3) 食品中における水の分布に関する研究, に分類できる¹⁾。中性子非弾性散乱は, この中で (1) について直接的な情報を与え

る。また分子シミュレーションを組み合わせることで, (2) についての知見も得られる。中性子の特性を活かすことで, 水が食品と相互作用することで発現する食品機能特性の分子論的基礎を解明できれば, これまでにないユニークな知見が期待できる。

本稿では, 中性子非弾性散乱がどのような実験手法なのか, そしてこの手法でどのような情報が得られるかについて解説する。そして, 筆者らがこれまで研究してきた蛋白質の水和とガラス転移についての研究例を紹介する。

2. 中性子非弾性散乱

2.1 中性子散乱の基礎

中性子散乱の原理は, 基本的には X 線散乱と同じである。異なるのは, 何によって散乱されるかである。すなわち, X 線は電子との相互作用によって散乱されるのに対

¹ 〒319-1195 茨城県那珂郡東海村白方白根 2-4, ² 〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5

*連絡先 (Corresponding author), nakagawa.hiroshi@jaea.go.jp

表 1 中性子の散乱断面積 (干渉性散乱断面積 σ_{coh} , 非干渉性散乱断面積 σ_{inc} , 全散乱断面積 σ_{tot})

元素	$\sigma_{coh}(10^{-24} \text{ cm}^2)$	$\sigma_{inc}(10^{-24} \text{ cm}^2)$	$\sigma_{tot}(10^{-24} \text{ cm}^2)$
H	1.76	80.27	82.03
D	5.59	2.05	7.64
C	5.55	0.001	5.55
N	11.01	0.50	11.51
O	4.23	0.00	4.23

し、中性子は原子核との相互作用によって散乱される。これにより、中性子で“見えるもの”は、X線とは異なる。表 1 は、中性子が原子によってどれだけ散乱しやすいかを表す、中性子散乱断面積である。数値が大きいほどよく散乱するため、よく見えることを示す。X線は電子によって散乱するため散乱能は原子番号におよそ比例するが、中性子の場合そのような規則性はない。水素原子がよく見えることは、中性子で最も特徴的な性質のひとつである。

この解説では、弾性散乱・非弾性散乱と干渉性散乱・非干渉性散乱という用語を多用する。これらについて簡単に説明を加えておく。散乱を粒子の性質としてとらえるとき、入射粒子と散乱粒子のエネルギーが変わらない場合を弾性散乱、エネルギーが増減する場合を非弾性散乱という。一方、散乱を波の性質で考えたとき、入射波と散乱波の位相関係が一定に保たれる場合を干渉性散乱であり、散乱波は強めあったり弱めあったり（干渉）する。位相関係が保たれていない場合が非干渉性散乱であり、散乱波が干渉しあうことはない。これらの組み合わせにより、4通りの散乱が可能である。結晶構造解析に用いられるのは、干渉性弾性散乱である。この解説では主に非干渉性弾性散乱、非干渉性非弾性散乱を取り扱う。中性子も散乱体の原子核もスピンをもっていることから、中性子では非干渉性散乱が起きる。水素原子はスピン 1、重水素原子はスピン 0 であることから、中性子非干渉性散乱は、水素原子によるものが圧倒的であり、重水素では非干渉性散乱は起きない（表 1）。したがって、分子を部分重水素化させることで特定部位からの散乱を小さくして、見たい部分だけを際立たせて観測することも可能となる。例えば、図 1 のように軽水水と重水水との蛋白質からの散乱の差を取ることで、水和水からの散乱が得られる。蛋白質のガラス転移に対する水和水効果を調べるときに、このように蛋白質と水和水の動的挙動を分離して観測できるのは便利である。

非干渉性散乱における 2 重微分散乱断面積は、試料での散乱の前後における中性子の運動量ベクトルの大きさ k_i , k_f を用いて下記のように書ける。

$$\frac{d^2\sigma}{d\Omega dE} = \frac{k_f}{k_i} \frac{\sigma_{inc}}{4\pi} S_{inc}(Q, \omega) \quad (1)$$

$$S_{inc}(Q, \omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} dt \exp(-i\omega t) \sum_{\alpha} \langle \exp(-i\vec{Q} \cdot \vec{R}_{\alpha}(0)) \exp(i\vec{Q} \cdot \vec{R}_{\alpha}(t)) \rangle \quad (2)$$

ここで、 Q は散乱ベクトル、 Ω は立体角、 $S_{inc}(Q, \omega)$ は非干渉性動的構造因子、 σ_{inc} は非干渉性散乱断面積、 $R_{\alpha}(t)$ は時間 t における原子 α の位置を表す。また、 E は中性子のエネルギーを表し、 $E = \hbar\omega$ の関係にある。

非干渉性散乱関数は、式 (2) のように自己相関（原子 α の時間 0 と t との間の位置相関）の項のみで記述される。そのため、分子構造は中性子非弾性散乱スペクトルに影響しない。また、測定では中性子ビームの入射方向に対して試料の向きをそろえる必要がなく、粉末、溶液、ゲルなどどのような状態でも測定対象となる。更に、中性子の高い透過性のために、食品内部の分子運動をその場観測できる。実験試料の形状や状態を問わないという点は、様々な形状が想定される食品分析でメリットのひとつであるといえるだろう。実験で用いられる中性子は室温と同程度のエネルギーを持つため、測定分子とのエネルギーのやり取りを観測しやすい。Å オーダーの波長・meV オーダーのエネルギーを持つ中性子をプローブとする中性子非弾性散乱は、Å 空間スケール・ピコ秒時間スケールの分子運動の検出に最適な実験手法である。

2.2 中性子非弾性散乱スペクトルから得られる分子運動の情報

図 2 に蛋白質の中性子非弾性散乱スペクトルの模式図を示す²⁾。熱揺らぎのない 0 K では、弾性散乱ピークのみが観測される。温度上昇に伴い分子振動が生じると、非弾性散乱スペクトルが観測され、数 100 meV までの広いエネルギー領域での揺らぎの振動数分布がわかる³⁾。このエネルギー領域では、赤外分光やラマン散乱と同じく C-H の伸縮振動などの局所的な分子振動の情報が得られる。分解能が低くピークの分離が悪いのが欠点ではあるが、中性子スペクトルは禁制則がなく、全ての運動モードが観測できる。ガラス状態でみられる多数の原子の集団的な揺らぎは、数 meV の振動スペクトルに現れる。この領域を精度よくしかも定量的に測定できることは中性子の特長の一つである⁴⁾。中性子スペクトルからは分子の振動状態密度を求めることができる⁵⁾。物質の熱容量は振動状態密度のエネルギーで積分した量であるため、中性子非弾性散乱は熱測定と相関性が高い。

更に温度を上げていくと、ガラス転移で現れる構造緩和運動や拡散的な運動由来の準弾性散乱が現れる。非弾性散乱が振動周波数に対応するピークとして観測されるのに対し、準弾性散乱は弾性散乱ピークの広がりとして観測され、この広がりとは緩和時間の逆数や拡散定数に比例する。

弾性散乱ピーク強度 $I_{el}(Q)$ は、ガウス近似により、

図 1 軽水と重水の同位体コントラストによる蛋白質と水和水の分離観測法

図 2 蛋白質の中性子非弾性散乱スペクトルの温度変化の模式図

T_g はガラス転移温度を表す。

$$\frac{I_{el}(Q)}{I_{el}(Q=0)} = \exp\left(-\frac{1}{3}Q^2\langle u^2 \rangle\right) \quad (3)$$

と書ける⁶⁾。この式を用いて、弾性散乱強度の Q 依存性から原子の平均自乗変位 $\langle u^2 \rangle$ を求めることができる。

水の中性子非弾性散乱スペクトルには、O-H 伸縮振動や稗動運動の振動ピークが現れる⁷⁾。また数 10 meV 付近のエネルギー領域には、水の並進運動に帰属されるピークが見られる⁸⁾。水の拡散運動は、ローレンツ関数

$$L(\Gamma, \omega) = \frac{1}{\pi} \frac{\Gamma(Q)}{\Gamma(Q)^2 + \omega^2} \quad (4)$$

で記述できる構造因子が準弾性散乱として現れる。ここで $\Gamma(Q)$ はローレンツ関数の半値幅である。小さい Q 領域では、

$$\Gamma(Q) = D_T Q^2 \quad (5)$$

より、並進拡散係数 D_T を求めることができる。 Q が大きいほど観測する相関距離が短くなり、およそ $1 \text{ \AA}^{-1}$ 以上の Q 領域になると、ジャンプ拡散の振る舞いが見えてくる。そのため半値幅の Q 依存性は、以下のようになる。

$$\Gamma(Q) = \frac{D_T Q^2}{1 + D_T Q^2 \tau} \quad (6)$$

ここで τ はジャンプ前の水の滞在時間を表し、半値幅は大きい Q 領域で $\tau = 1/\Gamma(Q)$ に漸近する⁹⁾。

2.3 分子シミュレーションを組み合わせた解析

前述のように、非干渉性散乱では原子の自己相関を見ているために、構造に関する情報は得られない。食品物性はミクロな分子構造や水和構造とも密接に関わるため、構造

情報を与える他の手法を併用して分子運動を解析することは有効である。中性子非弾性散乱と組み合わせよく利用されているのが、原子の動きや分子構造をコンピュータ上で追跡できる分子シミュレーションである²⁾¹⁰⁾。分子シミュレーションでは、時々刻々と変化する原子の位置座標の時間変化から動的構造因子を容易に計算できる。すなわち、式 (2) の $R_a(t)$ に、蛋白質や水和水の水素原子の位置座標を入力すれば、実験データを定量的に再現できる。食品の場合、まるごとコンピュータの中で再現するのは必ずしも可能なわけではないが、研究目的に合わせて本質的な部分を切り出し、比較的単純な系で計算することはできる。実験とシミュレーションを組み合わせ、互いの解析結果を比較することで、分子の構造と運動性を合わせて議論できるようになる。

近年の飛躍的な計算機性能の発展によって、多成分系など大規模なシミュレーションも可能になってきている。分子シミュレーションを利用した生体物質の構造や分子運動の研究は盛んに行われており、中性に限らず様々な実験手法の開発や実験データの解析にも積極的に取り入れられている¹¹⁾。中性子非弾性散乱に分子シミュレーションを援用した解析手法は、相補的・相乗的に実験データをサポートするため、食品物性の研究でも有効となるであろう¹²⁾。

本稿では、中性子非弾性散乱実験による研究の解説が主目的であるため、シミュレーションによる解析結果は、実験データを補完するための最小限にとどめて紹介する。

3. 蛋白質のガラス転移と水和水の分子運動性

伝統的な乾燥食品や最新の技術による冷凍食品などは、ガラス化によって保存性を高めている¹³⁾¹⁴⁾。ガラス転移は

図 3 蛋白質の中性子非弾性散乱スペクトルの温度変化の模式図

(C) には分子動力学の結果も併せて示す (後述)。

食品自体が持つ物性だけでなく、そこに含まれる水分の影響も強く受け、乾燥食品では水分量を減らすことでガラス化が実現している。また水分量や温度の低下に伴う水分活性の低下は、食品中の微生物の生育を抑制する。したがって、水和や分子運動というミクロな現象は、食品の保存性や食感といったマクロな食品の品質に大きく関わる。

ガラス転移は、通常、特定の分子構造を取らない非晶質の物性として議論されるため、 α ヘリックスなどの規則的な構造を持つ蛋白質の物性としては違和感を覚える読者もおられるかもしれない。実際、蛋白質のガラス転移は、動力学転移 (dynamical transition) とよび、一般のガラス転移と区別する場合もある¹⁵⁾。しかし、興味深いことに、蛋白質の物性は、ガラスや高分子などの非晶質と共通する点が多く、実験で得られる分子運動や熱的特性は類似している。ガラス転移は多くの蛋白質で普遍的に観測され、蛋白質の共通の物性である。転移温度以下では蛋白質の酵素活性が失われるといった実験報告もあり¹⁶⁾、転移温度以上で現れる分子運動が蛋白質の機能に重要であると考えられている。

この章では、水和研究のモデル蛋白質である、黄色ブドウ球菌の核酸分解酵素 (Staphylococcal nuclease 略して SNase) を用いた、筆者らの研究成果を紹介する¹⁰⁾。この蛋白質は食品蛋白質とはいえないが、分子量約 16800 の水溶性球状蛋白質であり、リゾチームや BSA などの蛋白質と共通して持つであろう性質を議論している。

3.1 ガラス転移の水分量依存性

蛋白質のガラス転移は、水和することで顕著になることはこれまでの研究で良く知られている¹⁵⁾。しかし、水分量の増加に伴って変化する水和状態が、ガラス転移とどのように連動しているかはよく分かっていなかった。そこで筆者らは、このことを明らかにするために、まず、どのくらいの水分量でガラス転移が現れるのかを調べることにした。

凍結乾燥した蛋白質粉末を塩類の飽和溶液で相対湿度を制御した密封容器内で 27℃ に保存することで、様々な水分量の蛋白質を調製した。最終的な水分量は熱天秤で決定し

た。ここでは、重水で水和させることで水を見えなくして蛋白質のみを観測した。図 3A は、様々な温度での非干渉性中性子弾性散乱の Q 依存性である。この散乱データから、式 (3) を用いて求めた平均自乗変位の温度依存性が図 3B である。水和によって約 240 K で揺らぎの振幅の増大が観測されるが、これはガラス転移によるものである。転移温度以上での平均自乗変位の温度依存性の傾きを、様々な水分量で計算した結果が図 3C である。この図から、ガラス転移の存在には水分量に閾値 ($h=0.37$ g 重水 / g 蛋白質) が存在することがわかった。この水分量の閾値がどういう意味を持つのか、またなぜ閾値以上の水和量でガラス転移が生じるのかを明らかにするために、水和構造とそのダイナミクスを調べることにした。蛋白質と水和水の動的挙動がカップルしているとすれば、 $h=0.37$ の閾値を境に水和構造やその動的特性などが変化すると推察される。

3.2 水和構造～分子シミュレーションによる解析～

中性子非弾性散乱では水和構造を調べることはできない。ここでは、様々な水分量の蛋白質を計算機の中で再現し、分子シミュレーションによって閾値を境に水和構造がどのように変化するのかを調べた。蛋白質の水和構造において、水和水は互いに水素結合によってつながり、クラスターを形成していることが知られている¹⁷⁾。図 4 は、分子シミュレーションによって調べた水和水クラスターを可視化したものである。低い水分量の時は、多くの水和水は蛋白質表面に孤立した状態、あるいは蛋白質表面の一部を覆う小さな水和水のクラスターとして存在する。しかし水分量が多くなると、それぞれのクラスターが合体し、一つの大きな水和水のネットワークが蛋白質全体を覆うようになる。蛋白質表面を覆う最大の水和水クラスターのサイズを計算したところ、 $h=0.37$ 以上で水和水のネットワークが蛋白質表面全体を覆うようになることを見出した。この値は、ガラス転移が生じる水分量と一致する。図 3C を見れば、蛋白質の動力学転移と蛋白質を覆う水和水のネットワーク形成により相関があることがわかる。ネットワークサイズの変化は水和水のパールコレーション確率の変化と対

図 4 水和構造の水分量依存性と水和水ネットワーク

応しており、水和量の増加に伴う水和構造のパーコレーション転移がガラス転移と関連していることを見出した¹⁰⁾。

3.3 水和水の分子運動～同位体コントラストによる蛋白質と水和水の分離観測～

以上の結果から、蛋白質のガラス転移が水和水のネットワーク形成と関係していることが分かった。もしガラス転移が水和水のネットワークの形成によって誘起されるのであれば、転移温度で変化する水和水の集団的な分子運動の特徴を明らかにすることが、ガラス転移の理解に本質的であると考えられる。ではネットワークを形成したときに、水和水の分子運動はどのように変化するであろうか。

図 1 で示した方法を活用して、パーコレーション転移に伴い水和水の分子運動がどのように変化するかを中性子非弾性散乱によって調べた。図 5 は、中水分量 (非パーコレート) と高水分量 (パーコレート) での、蛋白質と水和水の平均自乗変位の温度変化である。高水分量では約 240 K にガラス転移が観測された。ガラス転移温度以下では、水和量に関わらず水和水と蛋白質の平均自乗変位はほとんど同じで、水和水が蛋白質表面の水和水サイトに強く吸着していることが示唆される。また、中水分量では室温付近でも蛋白質と水和水の揺らぎの大きさはほぼ同じであった。一方、高水分量では、約 240 K 以上で水和水の揺らぎは蛋白質に比べて大きな振幅を持つ。このことから、蛋白質と水和水の分子運動はガラス転移において連動していることが分かる。水和水の揺らぎは、蛋白質との水素結合の解離・生成の揺らぎを介して、ガラス転移を引き起こしていると推察される。分子シミュレーションで示したように、水和構造は水和量変化に対してパーコレーション転移する。蛋

図 5 ガラス転移における蛋白質と水和水の分子運動

○は蛋白質, ●は水和水を示している。

白質表面全体に張り巡らされた集団的な水和水のネットワーク構造の揺らぎが、蛋白質のガラス転移が生じる原因であるといえる。最近の筆者らの解析で、水和水はバルク水に比べて一桁程度拡散係数が小さくなり、また水のネットワーク構造が崩れることでさらに数分の一にまで小さく

なることが分かってきた。高水分量での水は、自由水あるいは多分子層収着水といった食品との相互作用が比較的弱い水として分類されてきたが¹⁸⁾、この結果からは高水分量であっても水はある程度束縛を受けていることが示唆される。

これらの結果は、水を食品の物性を制御する重要な分子ととらえ、食品との相互作用をあらわに議論することが重要であることを示している。水和は蛋白質構造の安定性や機能発現に重要であると考えられてきたが、水和水を観測する実験手法は限られていたためその実態に迫ることは難しかった。蛋白質と水界面のダイナミックな相互作用の解析には、蛋白質と水和水を選択的に観測できる中性子非弾性散乱が有効な手法のひとつになるであろう。

4. おわりに

物理的に見ると、ガラスは分子運動が抑制された非平衡状態といえ、またガラス転移温度を境に粘性や比熱が急激に変化することがよく知られている。ガラス転移は、凝縮系の物理学でも重要な研究テーマであり、蛋白質はそのモデル系として捕らえられる場合もある¹⁹⁾。また最近の研究では、砂漠などに棲息する生物が、極限環境下で生き延びる手段としてガラス化を利用していることがわかってきた²⁰⁾。生体物質のガラス化や分子運動が、生命活動をどのように支えているかを解き明かすことは、生命科学でも重要な課題の1つとなっている。またガラス化は、食品だけでなく生体組織や臓器の保存技術としても重要である。非平衡物理学における基礎的なガラス研究や、様々な応用的分野で意義が解明されつつあるガラス特性と状態に関する知見は、食品の品質を特徴付けるパラメーターがどのような分子メカニズムで決まっているのかの研究でも役に立つであろう。本稿で説明した蛋白質の水和研究は、糖や炭水化物などであっても基本的には同じように解析が可能である。また水の収着等温線において各水和の段階で、食品と水の分子運動がどのようなになっているかを詳細に調べることが興味深いであろう。

中性子非弾性散乱実験は、現在のところ研究用原子炉や加速器といった大型施設でしか行うことができない。中性子散乱実験をするためには、実験申請をして採択される必要がある。しかし、研究内容に中性子を利用する根拠があれば、中性子の利用は決して敷居の高いものではないと思う。また実験の実施には、たいていの場合、装置担当者のサポートがあり、ユーザーは必ずしも中性子の専門家である必要はない。中性子施設は学術界・産業界ともに広く開かれている。食品を分析する実験手法のひとつとして、中性子非弾性散乱実験は大きな可能性を秘めているのではないだろうか。

文 献

- 1) 村勢則郎, 研究小集会「食品と水」開催の趣旨, 日本食品科学工学会誌, **58**, 505 (2011).
- 2) Smith, J.C., Protein dynamics : comparison of simulations with inelastic neutron scattering experiments. *Q. Rev. Biophys.*, **24**, 227-291 (1991).
- 3) Goupil-Lamy, A.V., Smith, J.C., Yunoki, J., Parker, S.F. and Kataoka, M., High-Resolution Vibrational Inelastic Neutron Scattering : A New Spectroscopic Tool for Globular Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 9268-9273 (1997).
- 4) Nakagawa, H., Joti, Y., Kitao, A. and Kataoka, M., Hydration Affects Both Harmonic and Anharmonic Nature of Protein Dynamics. *Biophys. J.*, **95**, 2916-2923 (2008).
- 5) Yamamuro, O., Matsuo T., Takeda, K., Kanaya, T., Kawaguchi, T. and Kaji, K., Inelastic neutron scattering study of low energy excitations in glassy 1-butene. *J. Chem. Phys.*, **105**, 732-737 (1996).
- 6) Doster, W., The dynamical transition of proteins, concepts and misconceptions. *Eur. Biophys. J.*, **37**, 591-602 (2008).
- 7) Beta, I.A., Michalarias, I., Ford, R.C., Li, J.C. and Bellissent-Funel, M.-C., Quasi-elastic neutron scattering study of hydrated DNA. *Chem. Phys.*, **292**, 451-454 (2003).
- 8) Settle, M. and Doster, W., Anomalous diffusion adsorbed water : A neutron scattering study of hydrated myoglobin. *Faraday Discuss.*, **103**, 269-279 (1996).
- 9) M. Bee, Quasielastic neutron scattering : Principles and applications in solid state chemistry, biology and materials science. Adam Hilger, Bristol and Philadelphia (1988).
- 10) Nakagawa, H. and Kataoka, M., Percolation of hydration water as a control of protein dynamics. *J. Phys. Soc. Jpn.*, **79**, 083801 (2010).
- 11) Oroguchi, T., Hashimoto, H., Shimizu, T., Sato, M. and Ikeguchi, M., Intrinsic dynamics of restriction endonuclease *ecoO109I* studied by molecular dynamics simulations and X-ray scattering data analysis. *Biophys. J.*, **96**, 2808-2822 (2009).
- 12) 鈴木哲夫, 糖ガラスによるタンパク質の熱安定化に関する分子動力学シミュレーション, 日本食品工学会誌, **11**, 117-123 (2010).
- 13) 食品とガラス化・結晶化技術, 編集 村勢則郎, 佐藤清隆.
- 14) 熊谷 仁, 熊谷日登美, 高田昌子, 食品工学入門 食品製造・保存の考え方.
- 15) Doster, W., Cusack, S. and Petry, W., Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron scattering. *Nature*, **337**, 754-756 (1989).
- 16) Rasmussen, B.F., Stock, A.M., Ringe, D. and Petsko, G.A., Crystalline ribonuclease A loses function below the dynamical transition at 220 K. *Nature*, **357**, 423-424 (1992).
- 17) M. Nakasako, Water-protein interactions from high-resolution protein crystallography. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **359**, 1191 (2004).
- 18) 水産学シリーズ 3 食品と水—水分活性と水の挙動, 編集 日本水産学会.
- 19) Green, J.L., Fan, J. and Angell, C.A., The protein-glass analogy : Some insights from homopeptide comparisons. *J. Phys. Chem.*, **98**, 13780-13790 (1994).
- 20) Sakurai, M., Furuki, T., Akao, K., Tanaka, D., Nakahara, Y., Kikawada, T., Watanabe, M. and Okuda, T., Vitriification is essential for anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedium vanderplanki*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **105**, 5093-5098 (2008).

(平成 26 年 1 月 21 日受理)