

<平成 29 年度助成>

## 食品タンパク質の熱安定化技術の開発

村岡 貴博

(東京農工大学 グローバルイノベーション研究院)

### 緒言

タンパク質を熱に対して安定化する技術は、タンパク質が有する様々な高付加価値機能を活かした応用展開の幅を広げる上で重要である。例えば、これまでに卵白タンパク質であるリゾチームを熱安定化する添加物質として、アルギニンエチルエステルなどが用いられている。これに対して申請者は、独自に開発した三角形型 PEG が、アルギニンエチルエステルの 8 分の 1 の量で、アルギニンエチルエステルを上回る高い安定化効率を示すことを見いだしている。ここで、ポリエチレングリコールは、タンパク質に対する沈殿剤、結晶化剤として用いられる。つまりポリエチレングリコールは、タンパク質分子の会合を促進する。これに対して申請者は、ポリエチレングリコールの分子形状を変えることで、その性質が変わることを見いだした。通常鎖状であるポリエチレングリコールを三角形や十字形に変えたところ、確かにその性質が大きく変わり、特に三角形型 PEG がリゾチームに対し、高い凝集抑制効果を示すことを明らかにした。この知見を踏まえ本研究では、さらに構造修飾を施したポリエチレングリコールを合成し、食品タンパク質に対して有効な熱安定化剤の開発を行うこととした。

### 実験結果と考察

変性タンパク質では、疎水性アミノ酸残基が表面に露出し、分子間で形成される疎水性相互作用によって凝集が形成されると考えられる。ポリエチレングリコールと変性タンパク質間で疎水性相互作用

が働くことが、タンパク質分子間での凝集を抑制する上で有効であると考えた。そこで、より効果的に疎水性相互作用の形成を期待し、疎水的な芳香族性部位を導入したポリエチレングリコール誘導体を開発することとした。ポリエチレングリコール部位として、長さの異なるテトラエチレングリコールとオクタエチレングリコールを用いることとした。ウィリアムソンエーテル合成反応などの有機合成反応を行うことによって、目的物を得た。目的分子の構造決定は、核磁気共鳴スペクトル、質量分析スペクトルにて行った。安定化効果を検討するターゲットタンパク質として、代表的な食品タンパク質である鶏卵白リゾチームを用いた。

合成したテトラエチレングリコール型分子とオクタエチレングリコール型分子は、いずれも室温で水に分散した。水中で 10 nm から 1000 nm にわたるブロードな粒子径分布を有する分子集合体が形成されていることが、動的光散乱測定の結果、示された。ここで、70 度に加熱すると、100 nm スケールの大きさを有する分子集合体を示す、単分散性の高い光散乱プロファイルへと変化したことから、温度変化にตอบสนองした分子集合体変化が見られた。ここで、両化合物の臨界ミセル濃度は、両親媒性テトラエチレングリコールが 0.80 mM、両親媒性オクタエチレングリコールが 1.3 mM であった。両親媒性テトラエチレングリコールの方が小さい臨界ミセル濃度を示したことは、ポリエチレングリコール鎖の長さが短いことによる疎水性の高さに起因するものと考えられる。

両親媒性テトラエチレングリコールおよび両親媒性オクタエチレングリコールの温度変化に伴うコン

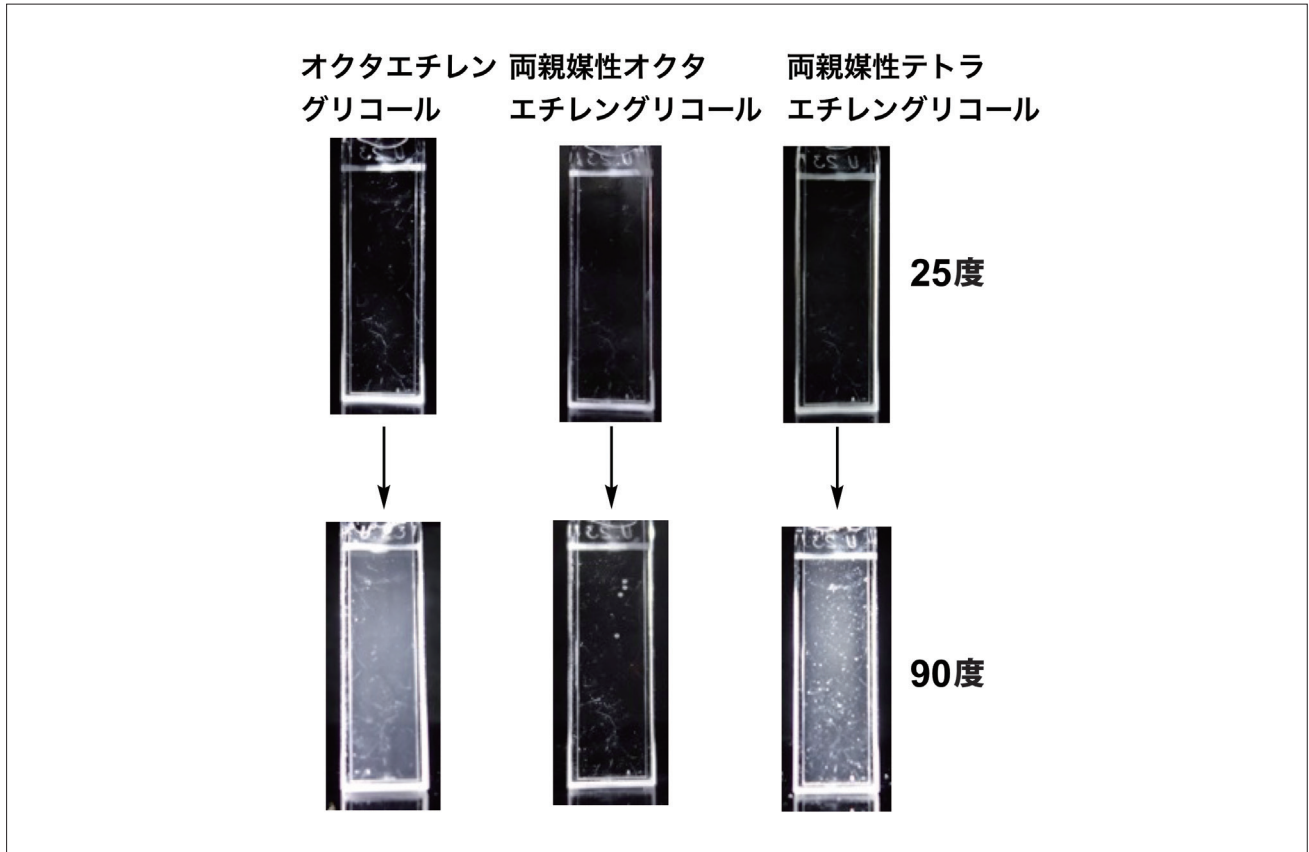


図1 添加物入りリゾチーム水溶液の25度と90度での観察

フォメーション変化について、温度可変赤外吸収スペクトル、温度可変核磁気共鳴スペクトル測定を用いて検討した。両親媒性オクタエチレングリコールは、30度において、ゴーシュ形のエチレンオキシドに由来する赤外吸収を示した。100度に加熱すると、アンチ形のエチレンオキシドに由来する赤外吸収強度が増加した。また、重水中における $^{13}\text{C}$ 核磁気共鳴スペクトル測定の結果、エチレン部の炭素に帰属されるシグナルが、温度上昇に伴い低磁場シフトした。これらのスペクトル変化から、両親媒性オクタエチレングリコールのエチレンオキシド部分が、温度上昇に伴いゴーシュからアンチ形へコンフォメーション変化することが示唆された。両親媒性テトラエチレングリコールも同様のスペクトル変化を示した。

合成したポリエチレングリコール誘導体のタンパク質安定化効果について調べるために、リゾチームを溶解させたリン酸緩衝生理食塩水に、両親媒性テトラエチレングリコール、両親媒性オクタエチレン

グリコールを混合し、加熱した(図1)。加熱前はどれも溶液を与えたが、両親媒性テトラエチレングリコールを混合したサンプルの場合、90度への加熱後白色の沈殿物を与えた。これは、添加剤を加えていないリゾチーム水溶液を加熱した場合に見られる現象と同様であり、リゾチームが凝集したことを示す結果である。一方、両親媒性オクタエチレングリコールを混合したサンプルでは、90度で30分加熱した後も、一切白濁は見られなかった。従って、マクロスコピックなタンパク質凝集は抑制されることが示された。リゾチーム分子の立体構造についての情報を得るために、温度可変円偏光二色性(CD)スペクトル測定を行った。添加剤を加えていない場合、加熱によりCDシグナル強度は連続的に減少し、さらに冷却後も強度は減少する。これは加熱によりリゾチームの高次構造が崩れて変性し、冷却過程において凝集したことを示す。同様のスペクトル変化が両親媒性テトラエチレングリコールで観察されたことから、確かに両親媒性テトラエチレングリコー

ルはタンパク質凝集抑制効果を有していないことが示された。一方、両親媒性オクタエチレングリコールでは、温度上昇に伴い CD シグナル強度は減少したものの、90 度における残存シグナル強度は、両親媒性テトラエチレングリコールを加えたものよりも大きかった。さらに冷却後、元のスペクトルがほぼ回復したことから、大部分のリゾチーム分子の凝集が抑制され、かつ冷却過程でリフォールディングが進行していることが示された。実際に、リゾチームの酵素活性であるバクテリアの溶菌活性を調べてみたところ、両親媒性テトラエチレングリコールを添加したリゾチームの場合、冷却後もほとんど活性が見られなかったのに対し、両親媒性オクタエチレングリコールを添加したものについては活性が見られ、部分的ではあるが、確実にリフォールディングが起きていることが確認された。なお、芳香族性基を持たないオクタエチレングリコールの場合、加熱によりリゾチームのマクロスコピックな凝集形成が見られ、かつ溶菌活性の回復は全く見られなかった。従って、芳香族性基を導入したことによる両親媒性構造が、タンパク質凝集抑制効果において重要な働きをしていることが示された。また、両親媒性オクタエチレングリコールと両親媒性テトラエチレングリコールを比較したところ、より疎水性の高い両親媒性テトラエチレングリコールでは、安定化効果がほとんど見られなかったことから、ポリエチレングリコール部分の鎖長、つまり親水部と疎水部のバランスも、重要なパラメーターであることが分かった。

## 結 言

両親媒性構造を有する新たなポリエチレングリコール誘導体として、芳香族性基を片末端に導入したテトラエチレングリコール、およびオクタエチレングリコールを合成することに成功した。両者は、水中で温度上昇に伴いゴーシュ形からアンチ形へのコンフォメーションを示し、疎水性を増す性質を有することが明らかとなった。また、臨界ミセル濃度測定の結果、より短いポリエチレングリコール鎖か

ら成る両親媒性テトラエチレングリコールの方が、両親媒性オクタエチレングリコールよりも疎水性が高いことも明らかとなった。加熱によるリゾチームの凝集を抑制する効果について定量的に調べた結果、オクタエチレングリコール、両親媒性テトラエチレングリコールを添加したサンプルでは無添加の場合と同様の凝集形成、および酵素活性消失が見られたのに対し、両親媒性オクタエチレングリコールを用いた場合、顕著な凝集抑制効果、ならびに酵素活性の保持が見られた。従って、両親媒性構造と、ある程度高い親水性、という二つの要素を満たすことが重要であることが示唆された。変性リゾチームのリフォールディング促進効果についても同様に、両親媒性オクタエチレングリコールが最も高い効果を示した。従って、熱および化学的に変性されたりリゾチームに対して、安定化効果を示すポリエチレングリコール誘導体を開発することに成功した。今回の成果は、食品タンパク質を熱に対して安定化する新材料開発につながるものである。

## 謝 辞

研究助成のご支援をいただきました公益財団法人浦上食品・食文化振興財団に深く御礼申し上げます。

## Development of protein stabilizing materials

**Takahiro MURAOKA**

*Tokyo University of Agriculture and Technology  
Institute of Global Innovation Research*

Proteins denature in response to the application of various stimuli, such as heating, and then form aggregates irreversibly due to intermolecular hydrophobic interactions. In this study, materials were developed to enhance the thermal stabilities of proteins. Specifically, amphiphilic poly(ethylene glycol)s bearing an aromatic unit were synthesized. These amphiphilic poly(ethylene glycol)s showed a response to temperature elevation, in terms of a change in the conformation of the poly(ethylene glycol) chain which is known to enhance hydrophobicity. One of these synthesized amphiphilic poly(ethylene glycol) displayed the ability to suppress the formation of protein aggregates upon heating. This suppressive effect is likely due to the thermal response of the poly(ethylene glycol) chain to increase its hydrophobicity, allowing it to interact with denaturing proteins. This suppressive effect was also found to depend on the length of the poly(ethylene glycol) chain, so that longer chains display a higher suppressive effect.