

殺菌技術としての応用を指向したタンパク質の熱安定化法の開発

東北大学多元物質科学研究所・助教 村岡 貴博

■ 目的

タンパク質は重要な栄養素であると共に、乳化性、保水性、発泡性などの特性を持つ機能性物質として注目される。しかし一般にタンパク質は熱に弱く、加熱により失活、凝集するため、その安定化は重要な技術である。その実現に向け、本研究では、タンパク質の熱凝集を抑制する安定化剤の開発を行った。

■ 方法

代表的な水溶性ポリエーテルであるポリエチレングリコール(PEG)に着目した。PEGは、温度上昇に伴いそのコンフォメーションを変化し、疎水性を増加させる性質を有する。ここでタンパク質は、活性なフォールディング構造を形成している場合、親水的なアミノ酸残基が多く表面に存在し、疎水性アミノ酸残基は内部に存在するが、温度上昇などにより立体構造が崩れた変性状態となると、疎水性アミノ酸残基も表面に露出し、その結果分子間での疎水性相互作用により凝集する。ここにPEGが存在している場合、高温で疎水性を増したPEGが、変性タンパク質の表面に露出した疎水性残基と相互作用することで、タンパク質分子間の疎水性相互作用が軽減されると考えた。しかし、通常の鎖状PEGでは、顕著に疎水性を増加する温度は極めて高温であるため、上記のような凝集抑制効果は見られない。そこで本研究では、PEGに分子修飾を施すことで、比較的低温で変性タンパク質と相互作用し、凝集抑制を実現する機能性分子開発を目指した。

■ 結果および考察

疎水的な芳香族性部位を導入したPEG誘導体を開発した。PEG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、芳香族性部位としては、最も単純な構造であるフェニル基を用いることとした。安定化効果を検討するターゲットタンパク質として、リゾチームを用いた。

合成したフェニル基を有するテトラエチレングリコール(PhTEG)、オクタエチレングリコール(PhOEG)は、いずれも室温で良好に水に分散した。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から、PhTEG、PhOEG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のコンフォメーション変化を示すことが強く示唆された。

合成したPEG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、PhTEG、PhOEGを混合し、加熱した。加熱前はいずれも溶液を与えたが、PhTEG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、リゾチームが凝集した。一方、PhOEGを混合したサンプルでは、90度へ加熱した後も一切白濁は見られず、凝集抑制が示唆された。温度可変円偏光二色性スペクトル測定やリゾチームの酵素活性を調べた結果、PhOEG存在中では、部分的ではあるがリゾチームの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、フェニル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が凝集したことから、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PhOEGとPhTEGの比較から、親水部と疎水部のバランスも重要であることが分かった。

■ 結語

PEGにフェニル基を導入する、という単純な分子修飾により、タンパク質の熱凝集抑制効果を実現することに成功した。これにより、加熱してもタンパク質の高付加価値特性が維持されるため、本研究成果はタンパク質を食品添加物や栄養補助剤などとして応用する際に必要不可欠な「殺菌」プロセスを加熱により簡便に行える技術となり得ると期待される。