

卵白を原料としたタフマテリアルの開発

東京工業大学科学技術創成研究院・特任助教 野島 達也

■ 緒言

本研究は卵白を原料としたタフマテリアル(高強度材料)の開発を目的とした。

近年、次世代の材料として、生体高分子である蛋白質の活用が進められている。本研究では鶏卵の卵白蛋白質を素材とした材料開発を目指した。生の状態で液状である卵白を加熱すると固まる(ゲル化する)ことはよく知られている。しかしながら加熱ゲル化した白身の強度は低く、材料開発の素材としては注目されていなかった。

ゲルとは分子が三次元的に絡まりあったネットワーク構造に溶媒が含まれた状態の固体物質である。卵白の加熱によるゲル化は蛋白質の熱変性と凝集によって引き起こされる。変性蛋白質の凝集はランダムに進行するため、ゆで卵の白身では変性蛋白質は不規則なネットワーク構造を形成している。本研究助成者は卵白の加熱ゲル化を秩序的に進行させることで高強度ゲルを作成できると考えた。

これを達成するため、本研究助成者は卵白蛋白質を予め秩序的な集合状態とした上で加熱することで、高強度ゲルが作成可能ではないかと着想した。本研究助成者はこれまでに、蛋白質が一定間隔に秩序的に集合した状態の液状物質である「蛋白質凝縮体」を開発していた¹⁾。そこで卵白より蛋白質凝縮体を作成し、それを加熱することで高強度の卵白蛋白質ゲルが形成されると考え実験を行った。

■ 方法

卵白蛋白質の調製

鶏卵より分離した白身を二回濾した後、等重量の純水を加え4度で1時間攪拌し、遠心分離(10,000g, 20分)した上清を純水に対して4度で一晩透析した後、遠心分離した上清を実験に使用した。蛋白質濃度は、BSA溶液を標準品としてBCA法で定量した。

イオン性界面活性剤の調製

陰イオン性および陽イオン性 C_xE_y を純水に溶解させ、それぞれ KOH と HCl を用いて中和した後、100mM とした。実験にはアルキル鎖長 x が 12 であり、PEG 鎖長 y が 4.5 および 9 である二種類の界面活性剤($C_{12}E_{4.5}$, $C_{12}E_9$)を用いた。

卵白蛋白質凝縮体の調製

10mg/mL 卵白蛋白質水溶液 1mL あたり、100mM 陰イオン性 $C_{12}E_y$ を 20 μ L、100mM 陽イオン性 $C_{12}E_y$ を 80 μ L 加えた。懸濁した溶液を遠心分離し(10,000g, 1分)、二層に別れた下層の液体を回収し、実験に用いた。

卵白蛋白質凝縮体の蛋白質含有量定量

卵白蛋白質凝縮体と9倍体積量の200mM NaClを含む20mM Tris-HCl, pH8.0を混合し、得られた水溶液の蛋白質濃度をBCA法で定量した。

卵白蛋白質凝縮体ゲルの作成

適当な容器または型に入った卵白蛋白質凝縮体を70度で20分加熱した。

卵白蛋白質凝縮体ゲルの分解性試験

卵白蛋白質凝縮体ゲルを200mM NaCl、10mg/mL キモトリプシン(蛋白質分解酵素)、1mM PMSFをそれぞれ含む20mM Tris-HCl, pH8.0に37度で浸漬した。

水分量測定

セイコーインスツル社製TG/DTA 6300を用いて、空気雰囲気下で熱重量変化測定を行い、150度までに失われた重量割合を水分量とした。

小角X線散乱(SAXS: Small Angle X-ray Scattering)の測定

リガク社製NANOPIXと二次元検出器を用いて、波長1.54オングストロームのCuK α 線を用いて測定した。

卵白蛋白質凝縮体ゲルの強度測定

圧縮試験はInstron社製INSTRON5565を用いて行った。引張試験はInstron社製INSTRON5943を

用いて行った。それぞれの応力—ひずみ曲線より圧縮強度および引張強度を得た。

■ 結果

卵白蛋白質凝縮体の作成と成分および構造解析

1mL の 10mg/mL 卵白蛋白質水溶液に、100mM 陰イオン性 $C_{12}E_9$ を 20 μ L、100mM 陽イオン性 $C_{12}E_4.5$ を 80 μ L 加えると蛋白質凝縮体が発生した(図 1A)。界面活性剤として $C_{12}E_9$ および $C_{12}E_{4.5}$ を用いて作成した蛋白質凝縮体それぞれの蛋白質含有量は 124mg/mL と 154mg/mL だった。蛋白質凝縮体は主にオボアルブミン(OVA)を構成蛋白質とすることが明らかになった(図 1B)。蛋白質凝縮体の SAXS プロファイルには、散乱ピークが観察された(図 1C)。

卵白蛋白質凝縮体ゲルの作成と分析および強度測定

得られた卵白蛋白質凝縮体を適当な型に流し込み、70 度で加熱したところ、80 重量%の水分を含む白く不透明なゲルが得られた(図 2A)。得られたゲルを蛋白質分解酵素を含む溶液に浸漬すると、ゲルの分解が観察された(図 2B)。得られたゲルの圧縮及び引張試験を行った(図 2C,D)。界面活性剤として $C_{12}E_9$ および $C_{12}E_{4.5}$ を用いて作成した蛋白質凝縮体ゲルそれぞれの最大圧縮強度は 2.9MPa と 34.5MPa、最大圧縮変形率は 87% と 94.3%、最大引張強度は 90kPa と 380kPa、最大引張変形率は 165% と 260% だった(表 1)。参照実験として鶏卵を 20 分茹で得たゆで卵の白身の圧縮強度測定を行ったところ、最大圧縮強度は 0.2MPa、最大圧縮変形率は 77.8% だった。卵白蛋白質凝縮体ゲルは最大でゆで卵の白身の 170 倍の圧縮強度を示した。ゲルの AFM 観察では特徴的な構造は観察されなかった。

卵白蛋白質凝縮体ゲルの化学処理による構造分析

蛋白質のジスルフィド結合形成を阻害するヨードアセトアミド(IAA)存在下で界面活性剤として $C_{12}E_{4.5}$ を用い卵白蛋白質凝縮体作成して加熱により白く不透明なゲルを得た(図 3A)。この強度を測定したところ、最大圧縮強度は 0.4MPa、最大圧縮変形率 73.7% だった。変性蛋白質の疎水凝縮を抑制する蛋白質変性剤である塩酸グアニジン(GdmCl)の溶液に、界面活性剤として $C_{12}E_{4.5}$ を用いて作成した卵白蛋白質凝縮体ゲルを浸漬したところ、ゲルが半透明になると同時に約 4 倍のゲルの膨潤が観察された(図 3B)。GdmCl 処理したゲルの最大圧縮強度は 0.6MPa、最大圧縮変形率 87% だった。

OVA 凝縮体ゲルと卵白蛋白質凝縮体

卵白の加熱ゲル化は卵白に含まれる OVA がゲル化因子である。単離 OVA を用いて作成した蛋白質凝縮体も加熱するとゲル化した。このゲルの圧縮強度は卵白蛋白質を用いたものと同程度であったが、引張強度では卵白蛋白質凝縮体ゲルに優位性が見られた(表 1)。

■ 考察

卵白蛋白質凝縮体は SAXS 測定で散乱ピークを示したことから、内部で蛋白質が一定間隔で集積していることが確認された。加熱によって得られた卵白蛋白質凝縮体ゲルは蛋白質分解酵素処理によって分解したためゲルのネットワーク構造は蛋白質由来であることが明らかになった。得られたゲルは最大で 34.5MPa の圧縮強度を示した。この値は既存の高強度ハイドゲル材料と遜色ないものであり²⁾、本研究の目的である卵白を原料としたタフマテリアルの作成は達成された。

$C_{12}E_9$ および $C_{12}E_{4.5}$ を用いて作成した蛋白質凝縮体ゲルの蛋白質含有量は大差ないものの、最大圧縮強度で 11 倍以上の差があった。界面活性剤の構造に依存する蛋白質凝縮体の集合秩序性がゲルの強度に大きく影響することが推測された。

IAA 存在下で作成したゲルと、GdmCl 処理によって得られたゲルはその強度が大きく減少していた。ジスルフィド結合によって蛋白質同士が共有結合で連結した構造と、疎水凝集によって蛋白質同士が非共有結合で会合した構造という二つの性質の異なるネットワーク構造が卵白蛋白質凝縮体ゲル内部には存在し、両方がゲルの高強度性に重要であることが判明した。

OVA を用いて作成したゲルが卵白蛋白質凝縮体ゲルと同程度の圧縮強度を示したことから、卵白蛋白質凝縮体のゲル化因子は OVA であると考えられた。また、卵白蛋白質凝縮体に含まれる OVA 以外の蛋白質が引張強度向上に関与していると考えられた。材料開発において微量の添加成分が性能向上に重大に影響することはよく知られている。そのため、卵白蛋白質凝縮体ゲルの引張強度向上に関与する蛋白質を決定する必要があると考え、卵白蛋白質凝縮体に含まれる全ての蛋白質の質量分析

によるプロテオーム解析による同定を目指した。しかしながら、蛋白質凝縮体状態のプロテオーム分析は前例がないため、サンプル調製条件から検討する必要があった。そこで、すでに分析経験のある生物試料から作成した蛋白質凝縮体を用いて条件検討を行った。その結果、蛋白質凝縮体のプロテオーム解析が可能であることが判明したが、助成期間中には卵白蛋白質凝縮体の分析には至らなかった。

■ 要 約

卵白蛋白質にイオン性界面活性剤を加えることで、蛋白質が一定間隔に集合した卵白蛋白質凝縮体を得た。これを加熱することで最大圧縮強度が 34.5 MPa である高強度ゲルを得ることに成功した。構造解析より、蛋白質凝縮体という蛋白質が秩序を持って一定間隔で集積した状態から、共有結合及び非共有結合という性質の異なるネットワーク構造が形成されたことがゲルの高強度性の由来であると考えられた。本助成研究の結果は学術論文として発表した³⁾。

■ 文 献

- 1) Tatsuya Nojima and Tomokazu Iyoda(2017), Water-rich fluid material containing orderly condensed proteins, *Angew. Chem. Int. Edit*, 56, 1308-1312
- 2) Jian Ping Gong, Yoshinori Katsuyama, Takayuki Kurokawa and Yoshihito Osada(2003), Double-Network Hydrogels with Extremely High Mechanical Strength, *Adv. Mater.*, 15, 1155-1158
- 3) Tatsuya Nojima and Tomokazu Iyoda(2018), Egg-white based strong hydrogel via ordered protein condensation, *NPG Asia Materials*, 10, e460

表 1：圧縮試験と引張試験より得られた、卵白蛋白質凝縮体ゲル、OVA 凝縮体ゲル、ゆで卵の白身のパラメーター

	界面活性剤	処理	圧縮試験		引張試験	
			最大変形率 (%)	最大圧縮強度 (MPa)	最大変形率 (%)	最大圧縮強度 (MPa)
卵白たんぱく質凝縮体ゲル	C12E9		87.0	2.90	164.5	0.085
	C12E4.5		94.3	34.5	260.1	0.382
	C12E4.5	ヨードアセトアミド処理	73.7	0.43		
	C12E4.5	塩酸 Guanin 処理	87.0	0.59		
オボアルブミン凝縮体ゲル	C12E9		87.9	5.40	191.3	0.205
	C12E4.5		94.5	33.8	192.5	0.321
ゆで卵の白身			77.8	0.20		

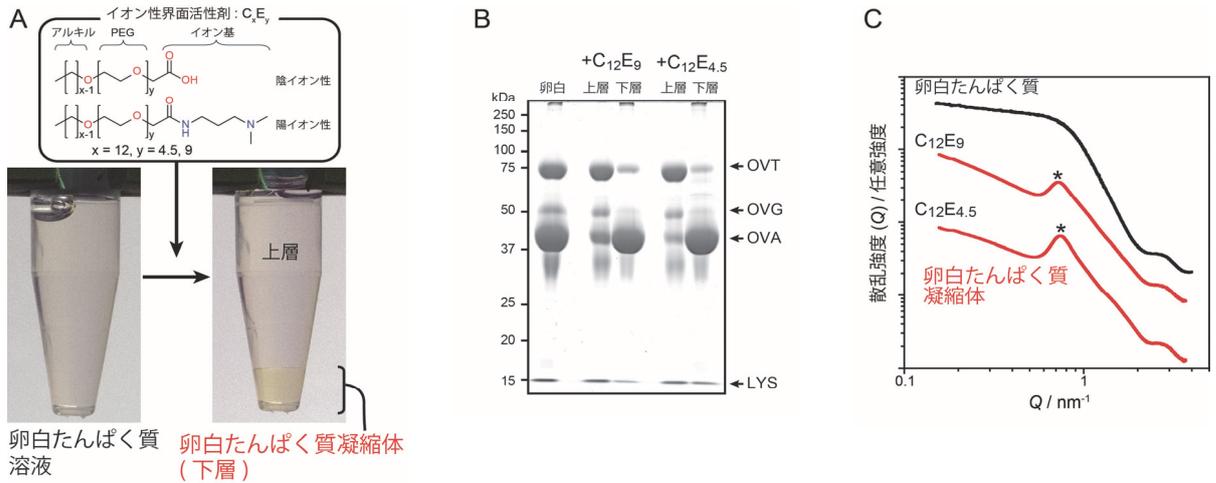


図 1: (A) 卵白蛋白質溶液にイオン性界面活性剤を加えると、二相に分れた液体の下層として卵白蛋白質凝縮体が発生する。
 (B) 卵白蛋白質凝縮体(下層)および上層に含まれる蛋白質の電気泳動分析。卵白の主要蛋白質を矢印で示した(OVT: オボトランスフェリン、OVG: オボグロブリン、OVA: オボアルブミン、LYS: リゾチーム)。
 (C) 卵白蛋白質溶液および卵白蛋白質凝縮体の SAXS 測定。

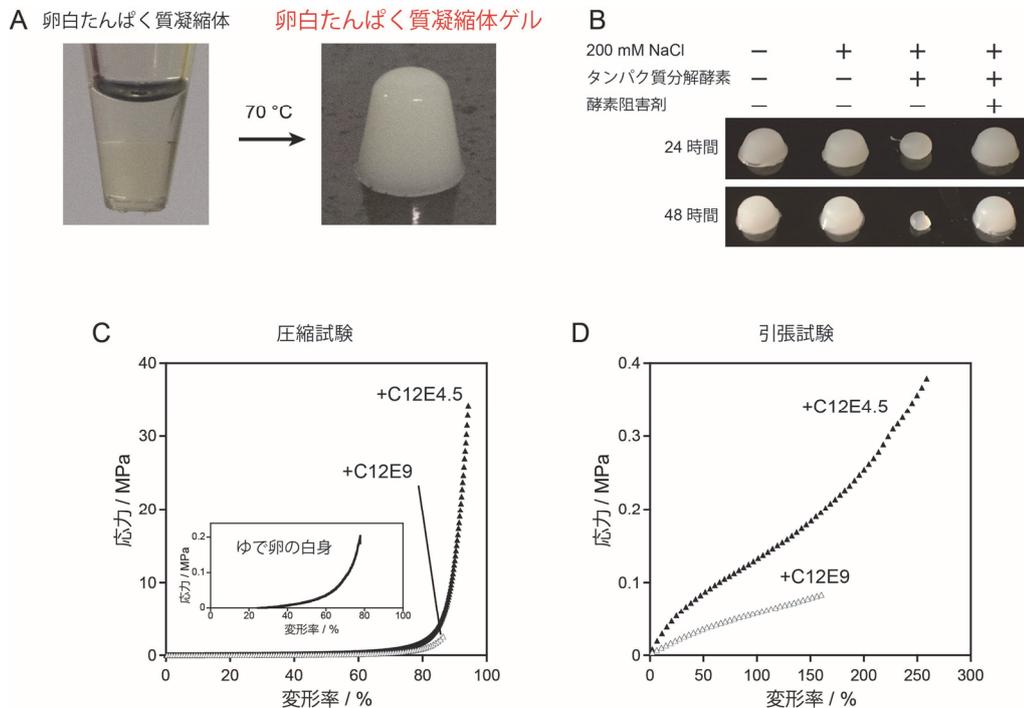


図 2: (A) 卵白蛋白質凝縮体を 70 度で加熱すると卵白蛋白質凝縮体ゲルが得られる
 (B) 卵白蛋白質凝縮体ゲルは蛋白質分解酵素によって分解される。
 (C,D) 卵白蛋白質凝縮体ゲルの圧縮および引張試験測定結果。挿入図はゆで卵の白身の測定結果。

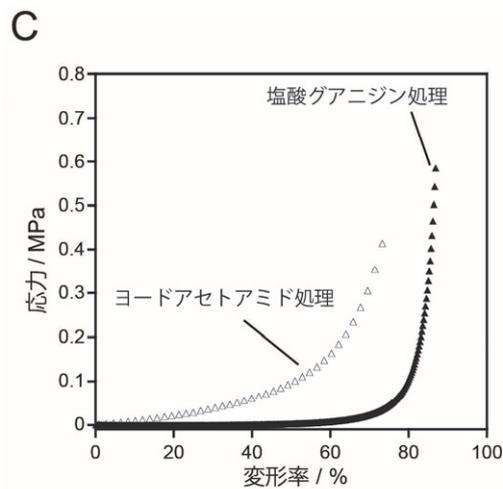
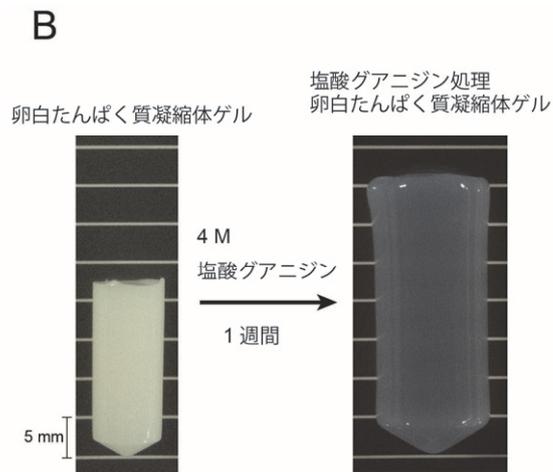
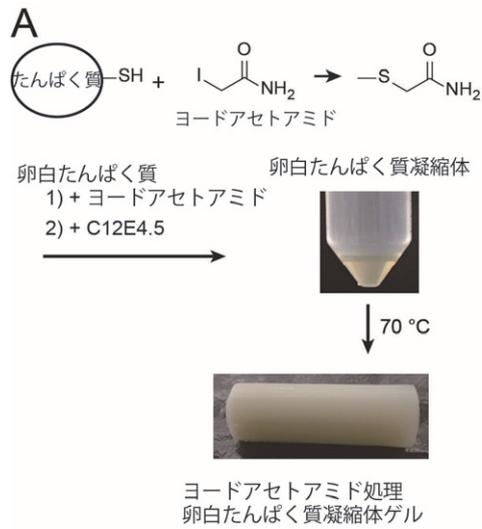


図 3 : (A) IAA 存在下での卵白蛋白質凝縮体ゲルの作成
 (B) 卵白蛋白質凝縮体ゲルの GdmCl 処理による半透明化と膨潤。
 (C) IAA および GdmCl 処理卵白蛋白質凝縮体ゲルの圧縮試験測定結果。未処理のゲル(図 2C) と比べて大幅に強度が低下している。