

コロイド分散タンパク質溶液の冷解凍プロセスにおけるナノ構造変化の 小角 X 線散乱解析

SAXS Analyses on Nanostructure Change of Colloidal Suspension of Protein during Freezing and Thawing Process

中川 究也^a, 方 博文^a, 磯部 和宏^b, 半田 明弘^b
Kyuya Nakagawa^a, Bowen Fang^a, Kazuhiro Isobe^b, Akihiro Handa^b

^a京都大学, ^bキユーピー(株)
^aKyoto University, ^bKewpie Corporation

冷解凍プロセスを経て変化するコロイド分散タンパク質の凝集構造の解析を目的とした小角散乱測定を実施した。種々の条件にて冷凍した卵タンパク質分散液中のタンパク質凝集構造を小角および極小角 X 線散乱測定によって解析することを試みた。凍結環境下におけるエージングは、数百ナノメートルサイズの凝集体内部の構造変化に大きく寄与することが伺え、これは凝集体内部をより密にするような変化であることが示唆された。これは抵抗性パルスセンシングによって得られた分散凝集体のサイズ、数密度測定の結果とも合致する結果であった。加糖全卵においては、糖とタンパク質の相互作用によってより緻密で安定な構造がすでに形成しており、これが凍結環境下において大きく変化しないと考えることができた。この差異は凝集微粒子もしくはそれに格納される物質のバイオアベイラビリティと強く関連している可能性が高く、機能性の異なるタンパク質ナノ粒子を作り分ける技術として凍結下におけるエージングを利用できると強く期待できる。本測定から得られた結果は、このような構造変化がどのような動力学で進行しているかを知る糸口となる。

キーワード： タンパク質凝集ナノ粒子；極小角 X 線散乱；自己凝集；カゼイン

背景と研究目的：

冷解凍プロセスを経て変化するコロイド分散タンパク質の凝集構造の解析を目的とした測定を行った。コロイド分散ナノ・マイクロ微粒子（ナノ・マイクロカプセル）は、食品栄養物質や薬剤をカプセル化し、体内へ適切に運搬・放出するキャリアとしての利用が期待できる。本研究グループは、凍結を利用したナノ粒子作製プロセスを検討し、特性の異なるナノ粒子を作り分ける事ができる可能性を示してきた[1]。特に近年 SPring-8 を利用して得られた結果を基礎として、カゼインナトリウムの自己凝集体形成を利用した微粒子作製に際し、微粒子そのものの消化特性、消化過程におけるマイクロ構造形成が凍結条件と強く関連していることを見出している[2-6]。この一連の研究が食品を対象とした栄養物質の送達や、それと関わる品質物性の制御を、凍結というプロセス操作によって制御する技術を確立するための一歩と期待している。今回の測定では、全卵をターゲットとして詳細なデータ収集を行うことで、これまでの検証では明らかにできなかったネイティブタンパク質の冷解凍プロセスにおける構造変化の追跡を目指した。

実験：

測定に供した液卵試料は、全卵、加糖全卵、卵白である。調整した液卵試料を 2 mL マイクロチューブに入れ、一定の条件にて -35°C に冷却し凍結させた後、設定温度（-35°C, -20°C, -5°C）にて一定期間保持した（エージング：1 h, 1-5 days）。これらの試料を測定直前に解凍し、速やかに 0.4% NaCl 溶液にて 100 倍希釈した。ここで NaCl 溶液を用いるのはイオン強度変化に伴うタンパク質凝集を防ぐためであり、ネイティブの液卵試料のイオン強度が変化しないように設定している。試料溶液を注入した 2 mm 径キャピラリーチューブを試料ステージに設置させることで測定を行った。使用エネルギーは 18 keV、カメラ長は 4000 mm の USAXS モードと 3000 mm の nSAXS モードの二通りの設定にて実験を実施した。露光時間は USAXS, nSAXS モードについてそれぞれ 300 秒と 180 秒に設定した。検出器は PILATUS3 2M (Dectris Ltd.) を使用した。

結果および考察：

-35°C の凍結条件で調整した全卵分散液から得た小角散乱プロファイルを図 1A に比較する。ここに示すのは USAXS と nSAXS モードの双方から得たプロファイルをマージしたものである。まずこれらのプロファイルから明確に判別できるのは全卵試料溶液の凍結の適用に依存した構造の差異であり、これはエージングの適用時間にも依存した凝集構造の違いを示唆している。未凍結試料、1 時間凍結試料、5 日間凍結試料を比較すると、散乱プロファイルが大きく異なり、凍結とその期間に依存した構造変化が進行したことが伺えた。同様の検討を加糖全卵にて行くと、図 1B に示すように凍結の有無による散乱プロファイルの変化がほとんど現れなかった。これらの散乱プロファイルから、Guinier プロット慣性半径 (R_g) の推算を行った (表 1)。凍結前の全卵分散液から推算される慣性半径が約 2.0 nm であったが、5 日間の凍結過程においてそのサイズは約 1.85 nm 程度まで減少したと推算できるが、その変化は極めて小さい。加糖した試料では凍結前より約 1.8 nm 程度の慣性半径と推算されたが、5 日間の凍結過程においてその構造サイズに有意な変化は無かった。

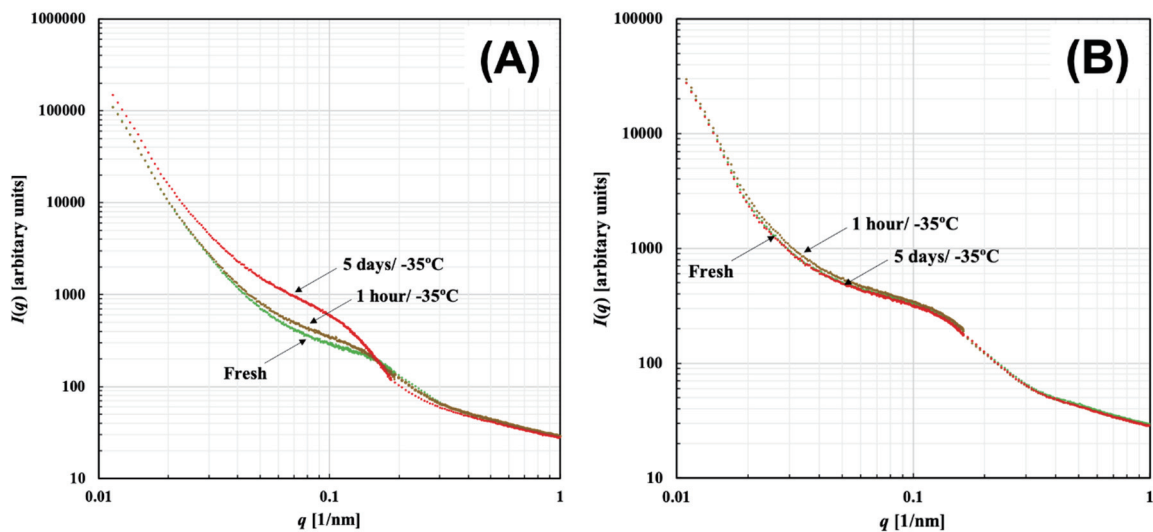


Fig. 1. 散乱プロファイル；凍結全卵試料 (A)，凍結全卵試料 (B)

これらの散乱プロファイルを詳細に比較するために、微粒子凝集に適用できる下記の散乱モデルを適用してフィッティングパラメータを得た[6]。

$$I(q) = \frac{I(0)}{\{1+(|q-q_0|\xi)^m\}^p} \quad (1)$$

ここで ξ は相関長さ ([nm]) であり、一次凝集体がさらに凝集して形成した高次凝集体の内部構造 (おそらく一次凝集体サイズ) を反映すると筆者らは考えている。抵抗性パルスセンシング (TRPS) を用いた実験 (筆者らが別途実施[7]) にて今回の測定対象としている全卵由来の凝集体の粒子サイズはおおよそ 2-3 μm に分布していることが分かっており、このサイズがエージングの適用によって変化するケースと大きく変化しないケースがあることが分かっている。また、 $I(0)$ は散乱体 (凝集体) の質量や体積を反映した数値を示す。散乱実験へのフィッティングにより得たパラメータを表 1 にまとめる。相関長さ ξ は数百ナノメートルのオーダーの値が得られており、溶液の希釈度と凝集体のサイズと比して考えて高次凝集体の内部構造を代表すると考えて妥当と考える。全卵試料において、凍結によって相関長さが増加し、顕著な増加はエージング 1 日目以降に起こっている。また、 $I(0)$ の値もエージングを経ることによって増加傾向を示している。今回の全卵試料における凝集体の個数密度は、エージングの過程で徐々に増加することが TRPS を用いた実験にて確認されている。また、エージングの初期に粒子サイズには大きな変化が生じないが、エージング 3 日目以降に顕著に増加することも確認している。これらのデータより、凍結環境下において新たな凝集体が生成し、それらがさらに凝集す

ることで高次の凝集体を形成していると考察していた。今回の分析結果である相関長さの増加は、高次の凝集体を構成している一次凝集体のサイズの増加を示唆している。 $I(0)$ の値の増加は一次凝集体に加え、高次凝集体双方のサイズの増加を示唆している。これは TRPS より得られた実験結果とも合致する結果である。加糖全卵においては凍結とエージングに伴うこれらの変化は観測されなかった。加糖全卵の散乱データから推算された相関長さは全卵試料よりも大きな値を示しているが、おそらく糖とタンパク質の相互作用によってより緻密で安定な構造がすでに形成しており、これが凍結環境下において大きく変化しないと考えることが妥当である。

凝集微粒子の構造的差異は、そのマトリクスもしくはそれに格納される物質のバイオアベイラビリティと強く関連している可能性が高く、機能性の異なるタンパク質ナノ粒子を作り分ける技術として凍結下におけるエージングを利用できると強く期待できる。本測定から得られた結果は、このような構造変化の動力学を知る上で重要であろう。ちなみに加糖は凍結液卵製品の変性（凝集）を防ぐために産業的に実施されている。今回の測定結果はこれの妥当性を示している。加糖無しで凍結変性を防ぎたいという産業ニーズがあるが、本測定結果によれば、数時間程度の短時間の凍結であっても、変性は顕著に進み得ることを明示している。ただし、数日かけて進行する凝集とはその機序が異なることが考えられる。

表 1：散乱モデルから得た各種パラメータ

	全卵試料			加糖全卵		
	RG [nm]	ξ [nm]	$I(0)$	RG [nm]	ξ [nm]	$I(0)$
未凍結試料(Fresh)	1.93±0.08	302±18	1.47×10 ⁵	1.81±0.01	514±34	2.81×10 ⁴
凍結試料 (1h/ -35°C)	1.92±0.01	312±14	1.45×10 ⁵	1.80±0.01	507±32	3.02×10 ⁴
凍結試料 (1day/ -35°C)	1.92±0.01	350±9	1.63×10 ⁵	1.80±0.01	510±38	2.82×10 ⁴
凍結試料 (3days/ -35°C)		348±11	1.74×10 ⁵			
凍結試料 (5days/ -35°C)	1.86±0.01	340±14	1.88×10 ⁵	1.83±0.01	516±40	2.78×10 ⁴

注 1) p , m の値は全卵試料についてそれぞれ約 1.0, 2.0 で一定、加糖全卵試料についてそれぞれ約 0.66, 2.1 で一定。

注 2) 全卵と加糖全卵試料について $I(0)$ の値がワンオーダー異なるが、両者のタンパク質含量が異なるため直接比較はしないべきである。

今後の課題：

今後、今回得られた散乱プロファイルをさらに解析し、別途計測している凝集構造変化と対応付けることで、凍結過程で進行している現象のメカニズムを明らかにしたい。本報告では掲載しきれていないエージング温度や種々のプロセスの影響を詳細に考察することでこれに取り組む。また、凝集体構造の解析に際し、式 (1) に示すモデル式以外に物理化学的情報を導くためによりふさわしいものも報告されており、今回の測定結果に適用できるかも検証の必要がある。

参考文献：

- [1] K. Nakagawa, H. Nagao, *Colloids and Surfaces A*, **411**: 129 (2012).
- [2] K. Nakagawa, M. Kagemoto, *Colloids and Surfaces B*, **103**: 366 (2013).
- [3] K. Nakagawa, *Drying Technology*, **31**: 1466 (2013).
- [4] T. Jarunglumlert, K. Nakagawa, *Drying Technology*, **31**: 1459 (2013).
- [5] K. Nakagawa, N. Sowasod, W. Tanthapanichakoon and T. Charinpanitkul, *LWT Journal of Food Science and Technology*, **54**: 600 (2013).
- [6] K. Nakagawa, T. Jarunglumlert, S. Adachi, *Japan Journal of Food Engineering*, **15**: 51 (2014).
- [7] B. Fang, K. Nakagawa, *Food Hydrocolloid*, **98**: 105259 (2020).