高圧バイオサイエンスと食品加工：高圧下で観察される モルテングロビュール[†]

林 力丸, 加藤倫子

(京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻)

Key words: high pressure denaturation; cold denaturation; molten globule; protein denaturation; high pressure-food processing

タンパク質は機能の発現のためにネイティブ構造と呼ばれる特徴的な2次, 3次, 4次構造をもつ。最近, 高圧力はタンパク質の立体構造を壊す(変性)ための“試薬でない変性剤”として次第に便利に用いられるようになってきている。しかも, 圧力は瞬時に除くことができるという利点も特徴である。

タンパク質の変性は, 従来, 2状態遷移として観察されることが多かったが, 圧力による変性は3段階以上の多状態遷移として観察されることがしばしば報告されている。この中間的な変性状態の多くはモルテングロビュール状態あるいはモルテングロビュール様状態と呼ばれることが多い。圧力を変性因子として用いる場合には, 当然ながら温度を指定しないと状態記述として十分ではない。圧力変性は室温での加圧でも観察されるが, 最近になり, 氷点下を含む低温での加圧で容易に観察されている。

本総説ではタンパク質の圧力変性に関するここ数年の論文を紹介し, モルテングロビュールともいふべき変性の中間体が圧力処理により観察されやすいこと, このような圧力変性は低温での加圧で起こりやすいことなどを指摘する。さらに, これらの研究成果のもつ意味と可能性について私見を述べてみたい。

1. タンパク質の圧力変性のプロセス

タンパク質の圧力変性のプロセスの研究が蓄積し,

多くのタンパク質の圧力変性は可逆的であり, しかも, pH 変性, 熱変性, 化学試薬による変性プロセスと異なることが明らかになってきた。

加熱変性と圧力変性の大きな違いは, 前者が2状態遷移であるのに対し, 後者はいわゆるモルテングロビュールともいわれる中間的な変性状態が観察される多状態遷移をとることである。典型的な圧力変性の例を図1に示す(詳しくは3を参照)。

タンパク質の圧力変性を観察する場合, 圧力下で測定(*in situ*の測定)するのと圧力処理を一定時間行い圧力解除後に測定(*ex situ*の測定)するのでは加圧圧力は大きく異なることが多い。なお, 最近になり, 圧力をかけたまま紫外・可視領域の吸収や蛍光を容易に測定する小型圧力容器が入手しやすくなっている。また, 円偏光二色性(CD)を*in situ*で測定する工夫も進んでいる。

a. *In situ* の測定

ここ数年の間に観察された多状態遷移の例を以下に記す。これらの多くは可逆的に変化し, 圧力解除後ネイティブ状態に戻る。

アセチルコリンエステラーゼ⁽¹⁾を圧力下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動により調べると, 350 MPaまでの加圧では2次構造が変化しないが50から150 MPaの加圧の間に少なくとも二つの中間体が見られる。これらの中間体は水和の変化あるいは微妙な構造変化とされている。

NMRの*in situ*の実験⁽²⁾により, α ラクトアルブミンは300~400 MPaで変性の中間体が見られ, これはモルテングロビュールらしい。150~200 MPaではプレ・モルテングロビュールともいふべきものが観察され, これはネイティブ構造に近い構造をしている。

トリプシン⁽³⁾は0°C, 650 MPaでモルテングロビュールが観察されるが, 25°Cでは構造が安定化し, 圧力

[†] High Pressure Bioscience and Food Processing: High Pressure-induced Molten Globule
Rikimaru HAYASHI and Michiko KATO (Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

図 圧力下で (*in situ*) 観察される野生型 (左) と無糖鎖型 (右) カルボキシペプチダーゼ Y の蛍光最大波長の変化
●は 25℃で段階的に圧力を増加し, ○は最大圧力に達してから徐々に圧力を下げた場合の蛍光変化. 少なくとも三つの P_m が見られる⁽¹²⁾.

を増してもモルテングロビュールは見られない。

b. *Ex situ* の測定

この場合は不可逆変化であることが多いが, 圧力解除後に一部の構造が戻っている可能性がある。

オボアルブミン⁽⁴⁾を 800 MPa で 10 分の加圧処理をした後, 常圧で観察すると, タンパク質の蛍光はネイティブ状態と塩酸グアニジン変性の中間状態をとり, ANS の結合性は著しく増加するが, 紫外部の CD はあまり変化しない。

β ラクトグロブリン⁽⁵⁾はダイマーとして存在 (分子サイズ 32 kDa) するが, 350 MPa で 10 分間加圧処理するとモルテングロビュールらしいものが観察された。この状態のものはダイマー構造をしているが, ゲルろ過クロマトグラフィーでは 44 kDa として観察された。

2. 低温・圧力変性

タンパク質が低温で圧力変性しうことは Hawley の研究⁽⁶⁾からわかる。これは, タンパク質の変性を温度因子 (T) に加え圧力因子 (P) を入れて観察すると, 楕円形を描くというものである。実際の実験は凍結温度より高温で行われているが, 凍結温度以下に外そうすると低温変性が予想できる。例えば, キモトリプシンノグエンの例では 1 気圧では -20°C , 約 150 MPa では -10°C , 約 250 MPa では 0°C で変性する。このように, 低温変性は水の凝固点以下の温度でしばしば見られるため, 技術的な理由で広く研究されていない。低温変性の研究には特別な方法として, 例えば, 水の凝固点を低下させる不凍結溶媒を使用するが, これで

は溶媒によるタンパク質構造の攪乱が心配になる。

常圧のもとでは水は 0°C で凍結するが, 高圧のもとでは水の凍結温度が下がる。Bridgman⁽⁷⁾によれば, 200 MPa のもとでは -20°C でも水は凍結しない。したがって, 200 MPa のもとで -20°C までの条件で低温変性が不凍結のまま観察できる。ただし, これを実現するのは, 圧力を上げてから温度を下げる必要があるため, 操作としてはやりにくい。そのため, いったん温度を下げてからすばやく加圧方法がとられるが, この場合には凍結過程を経る可能性があるので, 凍結融解によるタンパク質の変性がないことをあらかじめ十分に確認する必要がある。このようにして観察された低温・圧力変性には, 次のような例がある。

ウシ臍臓リボヌクレアーゼ A⁽⁸⁾は pH 2 において, 室温では 450 MPa で変性するが -25°C では 300 MPa で変性する。ユビキチン⁽⁹⁾は pH 3 において, 常温・室温では非常に安定であるが, -16°C では 225 MPa で完全に変性する。

3. カルボキシペプチダーゼ Y の低温・高圧力変性

カルボキシペプチダーゼ Y (CPY)⁽¹⁰⁾は *Saccharomyces cerevisiae* 由来の 61 kDa の糖タンパク質であり, プロテアーゼとしてはセリンプロテアーゼに分類される。糖鎖が分子量の約 16% を占め, これはおよそ同サイズの 4 本の鎖からなっている。本酵素は低温変性しにくく, 常圧で数回凍結融解を繰り返しても失活しない。この高い抵抗力が糖鎖に起因しているという結論は今のところ早計である⁽¹¹⁾。

CPY の低温変性に果たす糖鎖の役割について知見を得るため、野生型 CPY (WtCPY) と部位特異的変異により得られた無糖鎖型 CPY (Δ glyCPY) の低温・高圧変性を比較し、糖鎖の役割を調べようとした⁽¹²⁾。天然型 CPY の変性経路は *in situ* (圧力下) で測定し、不可逆的変性の特徴は *ex situ* (圧力解除後) で測定した。

a. *In situ* での観察

天然状態の CPY に対する低温下での高圧力の影響を調べるために、固有の蛍光による芳香族の環境、ANS 結合の蛍光測定による疎水性コアの環境、アセチルチロシンエチルエステル (ATEE) に対する活性の 3 変化を *in situ* で測定した。構造変化は高圧下での電気泳動により追跡した。その結果、野生型 CPY の圧力変性は少なくとも 3 状態遷移で起こることが明らかとなった (図、左)。ここで遷移の半分の圧力を P_{m1} , P_{m2} , P_{m3} とした。

150 MPa 以下の圧力は蛍光の最大波長をわずかに青色移動させるだけで、結合した ANS の蛍光の増加は観察されず、活性はわずかに減少するにすぎなかった。これらの結果から WtCPY の構造変化はかなり少なく、このような圧力下では天然状態に近い構造をしていると考えられる。活性のわずかの減少は速度論的現象に高圧力が影響を与えたものである。

200~500 MPa の圧力では、ANS 蛍光の増加や急激な活性の減少に伴い、蛍光の最大波長は大きく青色移動した。これは、このような圧力下では芳香族残基や疎水性コアは、圧力変性により溶媒に露出することを示す。

550 MPa 以上の圧力は、蛍光の最大波長を大きく青色移動させ、ANS 結合の蛍光を増加させた。これから、さらに大きな構造変化が起こることがわかる。

ANS の結合による蛍光はモルテングロビュールの特性であるから、圧力により誘発された第 2, 3 番目の状態はモルテングロビュール様状態といえる。

野生型酵素の 3 状態遷移によく似たプロセスは Δ glyCPY でも観察できた (図、右)。興味深いことは両酵素の第 2 遷移の中間圧力 P_{m2} は WtCPY と Δ glyCPY の構造的感受性を比較するためのパラメータとなっている。すなわち、-22~25°C の温度範囲において、 Δ glyCPY の P_{m2} が WtCPY のそれよりも約 50 MPa 低い。これらの結果は、圧力に誘発される低温変性を糖鎖が保護することを示唆している。高圧

力下での活性測定や電気泳動もこの結論を支持した。

b. *Ex situ* での観察

低温と組み合わせた高圧の不可逆的な効果を研究するために、圧力 (0.1~400 MPa) と温度 (-22~25°C) を変化させ、30 分間圧力処理をした後除圧し、大気圧下で活性を測定した⁽¹²⁾。

その結果、*in situ* の測定では 400 MPa, 25°C で処理すると WtCPY は完全に失活していたが、*ex situ* の測定では処理前の 75% も残存活性があった。これは、圧力失活は圧力を解除すると即座に部分的に可逆的に戻ることを示している。部分的な不可逆性はタンパク質の凝集が原因でないことは SDS なしのポリアクリルアミドゲル電気泳動により確認できた。また、失活した CPY はより高い分子量をもつバンドとして観察された。この構造を固有の蛍光や ANS 結合蛍光、CD により調べたところ、ANS も結合せず、二次構造が半分残った状態であり、また、活性もないので、モルテングロビュール状態の特徴を備えていると結論した。

200 MPa, -10°C で行った実験を除いて、WtCPY と Δ glyCPY の残存活性に大きな違いはなく、両者の違いはある特別な条件下でのみ見られるものである。

以上の結果、2 状態遷移の熱変性に対し、CPY の低温変性が少なくとも二つのモルテングロビュール状態を伴い、複数の遷移プロセスを通して起こることが明らかとなった。この多段階遷移プロセスは CPY の構造ドメインの連続した変性によるものと思われる。このプロセスの可逆性は -22°C~25°C までの圧力処理で減少するから、ここで観察したモルテングロビュール状態は部分的に不可逆的変性状態といえる。さらに、糖鎖は多少とも安定性に影響を与え、ネイティブ状態の CPY を保護している。

4. タンパク質の圧力変性と食品科学

タンパク質をゲル化するためには、何らかの変性プロセスを必要とする。その場合、低温処理は食品の処理としては望ましいし、高圧処理によりモルテングロビュール状態ができれば、それは新しいゲル物性の創製につながる。このため、低温・高圧力処理は食品加工のユニットプロセスとして期待できる。

Dumoulin ら⁽¹³⁾ は高圧力により誘発されるオボアルブミン、卵黄、ダイズタンパク質に -20~50°C のもとで 500 MPa までの高圧をかけて、生成するゲルの性質を加熱ゲルの性質と比較した。その結果、低温

での高圧処理によりゲル化に必要な圧力は低くなることを明らかにした。特に、卵黄とダイズタンパク質の圧力処理を行う場合、温度が低いほどゲル化効果が大きかった。

低温での圧力処理は、食品の劣化を抑える低温処理を可能にするとともに、新しいテクスチャーをもたらす食品加工法を約束している。高圧加工によりすでに実用化の近い生ハム、ハム状鮭肉、スリミ加工は低温加圧による独特なテクスチャーの創製によるところが大きいと考える^(14, 15)。

おわりに

温度 (T) に加うるに圧力 (P) という因子を食品の加工・貯蔵に導入しようとする開発研究や実用化試験が盛んに行われるようになった。ここではタンパク質を中心に紹介したが、デンプンの構造変化も低温・高圧力処理が効果的らしい⁽¹⁶⁾。応用を支える高圧バイオサイエンスあるいは高圧バイオテクノロジーともいうべき基礎研究の進展が不可欠になっている。本総説では最近の基礎研究の一端を紹介したが、これが T に加うるに P を食品加工の基礎研究に利用する研究者と実用化に携わる研究者の参考になれば幸いである。

- (1) C. Clery and P. Masson: *FEBS Lett.*, **370**, 212-214 (1995).
- (2) J. Jonas: in "Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology," ed. by H. Ludwig, Springer-Verlag, Heidelberg, 1999, pp. 177-182.

- (3) K. Ruan, R. Lange, N. Bec, and C. Balny: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **239**, 150-154 (1997).
- (4) D. D. S. Smith, V. B. Galazka, and I. G. Sumner: in "Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology," ed. by H. Ludwig, Springer-Verlag, Heidelberg, 1999, pp. 247-250.
- (5) V. L. V.-Mesquita, M. M. Botelho, and S. T. Ferreira: *Biophys. J.*, **75**, 471-476 (1996).
- (6) S. A. Hawley: *Biochemistry*, **10**, 2436-2442 (1971).
- (7) P. W. Bridgman: *Proc. Am. Acad. Arts and Sci.*, **47**, 441-558 (1912).
- (8) J. Zhang, X. Peng, A. Jonas, and J. Jonas: *Biochemistry*, **34**, 8631-8641 (1995).
- (9) D. P. Nash and J. Jonas: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **238**, 289-291 (1997).
- (10) R. Hayashi: *Methods Enzymol.*, **45**, 568-587 (1976).
- (11) H. Shimizu, H. Ueno, and R. Hayashi: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1045-1050 (1999).
- (12) M. Dumoulin, H. Ueno, R. Hayashi, and C. Balny: *Eur. J. Biochem.*, **262**, 475-483 (1999).
- (13) M. Dumoulin, S. Ozawa, and R. Hayashi: *J. Food Sci.*, **63**, 92-95 (1998).
- (14) M. Dumoulin and R. Hayashi: *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, **4**, 99-113 (1998).
- (15) M. Kato and R. Hayashi: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1321-1328 (1999).
- (16) J. P. Douzals, J. M. Perrier-Cornet, P. Grrais, and J. C. Coquille: in "Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology," ed. by H. Ludwig, Springer-Verlag, Heidelberg, 1999, pp. 333-336.