

大豆たん白質の凍結変性の速度論的解析

宮脇長人*

東京大学大学院農学生命科学研究科

Kinetic Analysis of Freeze Denaturation of Soy Protein

Osato MIYAWAKI

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657

ABSTRACT

Freeze-induced concentration of protein triggered freeze denaturation of soy protein isolate (SPI) in aqueous solution. The SPI denaturation was a rate process strongly dependent on time and temperature. A kinetic model was proposed to describe the freeze denaturation in consideration of freeze-induced concentration of solute, which accelerated the reaction rate substantially. The theoretical model was effective to describe the freeze denaturation process of SPI. The apparent reaction order was 2 suggesting that the reaction cascade of freeze-induced denaturation of SPI is limited by the initial interaction between the two protein molecules. The influence of temperature on SPI denaturation and the protective effect of glucose against denaturation were also effectively explained by the theoretical model. *Soy Protein Research, Japan* 2, 16-19, 1999.

Key words : soy protein, freeze denaturation, freeze concentration, kinetic model

たん白質凍結変性については酵素に関する多くの研究があり、乳酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、ピルビン酸キナーゼについて、凍結による活性喪失のメカニズムとしてサブユニット解離¹⁾、凝集、アンフォールディング、コンフォーメーション変化²⁾などの機構が報告されている。また、凍結乾燥した乳酸脱水素酵素およびピルビン酸キナーゼの凍結と乾燥による活性変化が解析され、ポリエチレングリコールの

耐凍結変性保護効果に対して、たん白質に対する選択的水和機構により説明がなされている³⁾。

酵素以外にも多くのたん白質について凍結変性の研究がなされており、大豆たん白質の凍結による凝集はS-S結合の形成がその基本的メカニズムであること⁴⁾、ricin Dの凍結変性は酸濃縮および水溶液構造の変化によるものであること⁵⁾、ウサギ筋ミオシンの非イオン界面活性剤による保護効果はたん白質に対する選択的水和機構では説明できないこと⁶⁾などが報告されている。

以上のように、たん白質の凍結変性に対しては、

*〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

個々のケースについて種々のメカニズムが各論的に唱えられているものの、いまだに定説は確立されていない。本研究においては、たん白質の凍結変性を定量的かつ統一的に解析するために、凍結変性を凍結に伴う凍結濃縮を引き金とする高濃度濃縮場におけるたん白質分子間相互作用による速度過程ととらえる立場から、新しい反応速度論モデルを提唱し、実験結果との比較検討を試みる。

たん白質凍結変性の速度論モデル

たん白質の変性を以下に示すような n 分子間の凝固反応と考えることにする。



ここに C_N および C_D は未変性および変性たん白質のモル濃度である。この反応を n 次反応と仮定すると、反応速度式は次のようになる。

$$-(dC_N/dt) = kC_N^n \quad (2)$$

ここに t は時間、 k は反応速度定数である。凍結変性においては溶液は凍結に際して、微小な氷結晶が生成し、たん白質は Fig. 1 のように凍結濃縮される。この濃縮効果により、たん白質濃度は α 倍、それに伴い反応有効体積は $1/\alpha$ となる。ここに α は凍結濃縮に伴う濃縮倍率である。従って、式 (2) は次のようになる。

$$-(dC_N/dt) = (1/\alpha)k(\alpha C_N)^n = k\alpha^{n-1}C_N^n \quad (3)$$

濃縮倍率 α が一定の時、この式は積分可能で、次のようになる。

$$C_N/C_{N0} = \frac{1}{\{1 + (n-1)k\alpha^{n-1}tC_{N0}^{n-1}\}^{1/(n-1)}} = \frac{1}{\{1 + Kt\}^{1/(n-1)}} \quad (4)$$

$$K = (n-1)k\alpha^{n-1}C_{N0}^{n-1} \quad (5)$$

ここに C_{N0} は凍結変性可能なたん白質濃度であり、 K は見かけ速度定数である。

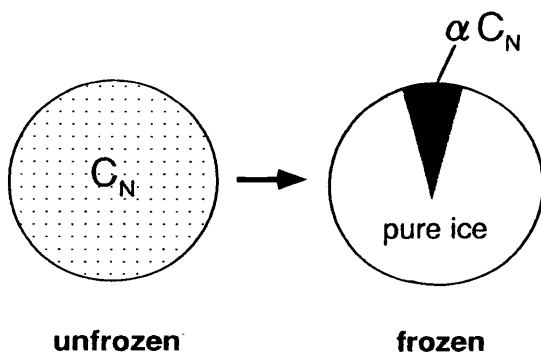


Fig. 1. Freeze-induced concentration of solute.

方 法

分離大豆たん白質 (SPI: ニューフジプロ SE, 不二製油) を蒸留水と混合して 8 wt% 懸濁液とし、これを 18,000 rpm で 3 分間ホモジナイズ (日本精機) し、さらに 10,000 rpm において 15 分間遠心分離 (4℃) を得られた上清画分を 11 倍希釈して被凍結試料とした。

この SPI 溶液の凍結特性を示差走査熱量分析計 (Perkin Elmer, DSC-7) により測定した。約 20 mg の試料をアルミパンに入れ、液体窒素温度で完全凍結ののち、0.5℃/min の昇温過程において凍結水の解凍特性を測定した。

たん白質凍結変性の測定は上記 SPI 溶液を小プラスチックチューブ (2 mL) に入れ、-10、-18、および -50℃ において凍結してそのまま保存し、適当な時間間隔において取り出して解凍 (25℃) し、600 nm または 280 nm における吸光度から変性度を求めた。

結果と考察

Fig. 2 に SPI 溶液の熱分析結果を示す。これにより、

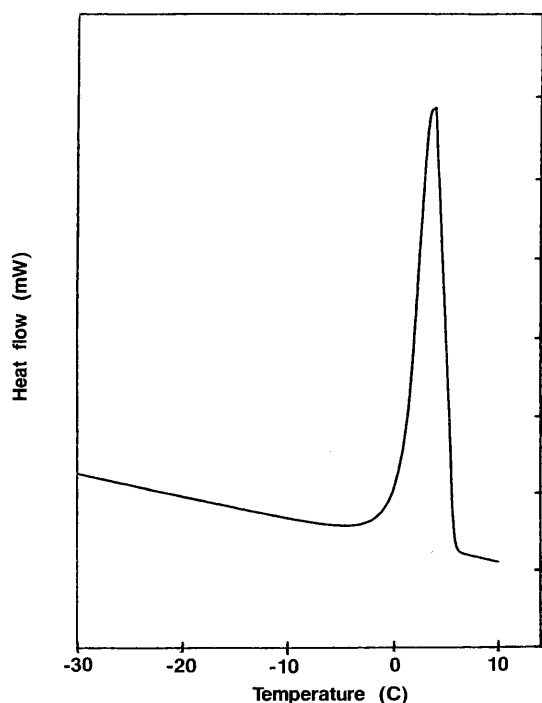


Fig. 2. DSC chart of SPI solution (0.064 wt%).

凍結は-5℃程度で完了しており、これより低い温度においては凍結水量あるいは凍結濃縮度は一定値とみなして良いことがわかる。このことは本実験における凍結保存最高温度は-10℃であるので、いずれの条件においても Fig. 1 に示す凍結濃縮度 α は一定値と見なしてよいことを意味している。

Fig. 3 は SPI の凍結変性度の時間および温度に対する依存性を示す。この結果より、SPI の凍結変性プロセスは時間に強く依存する速度過程であること、そしてその変性速度は温度に強く依存していることがわかる。温度-10℃ においては SPI 凍結変性速度はかなり早い、-50℃ においてはこれはかなり抑制されている。この図における実線、破線等は式 (4) により凍結変性プロセスを記述し、パラメーターを最適化した結果を示しており、SPI 凍結変性を凍結濃縮場における高濃度のたん白質分子間の反応であるとみなすモデルによる式 (4) は実験結果を良く記述できることを示している。ここで得られた最適反応次数は $n = 2$ であり、この場合、式 (4) は次のように単純化される。

$$C_N/C_{N0} = \frac{1}{1+k\alpha C_{N0} t} \quad (6)$$

この見かけ反応次数が 2 であることは SPI 凍結変性の反応カスケードにおける律速段階が最初のたん白質 2 分子間の相互作用の段階にあることを示唆しているものと思われる。

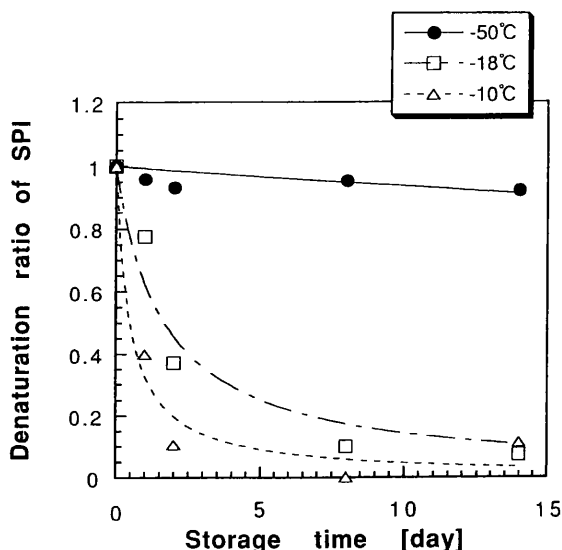


Fig. 3. Effect of temperature on freeze-denaturation rate of SPI.

式 (3) は反応次数が 1 より大きいとき、凍結により反応速度が加速されることを意味している。Fig. 3 における結果より、 $n=2$ であるため凍結は SPI 変性反応を凍結濃縮度 α に比例して加速している。凍結により化学反応が加速される例はこれまでもいくつかの報告があり、水溶液中でのエチレンクロロヒドリンと水酸化ナトリウムの反応が、同じ温度の過冷却溶液の場合と比較して、凍結により 1,000 倍加速されること⁷⁾、亜硝酸の水溶液中での酸化速度が凍結により加速され、このことにより酸性雨における硝酸生成のメカニズムが説明されている⁸⁾。さらに、グルコース添加は SPI 凍結変性を抑制したが、これは糖の共存による凍結濃縮度 α に対する抑制効果により説明することができた (Fig. 4)。

以上により、大豆たん白質の溶液中における凍結変性が、凍結に伴う凍結濃縮を引き金とするたん白質の高濃度濃縮場における反応プロセスとして記述できることが理論的および実験的に明らかとなった。今後は本モデルを他のたん白質の凍結変性についても適用し、そのより広い応用可能性について検討を加えて行く予定である。

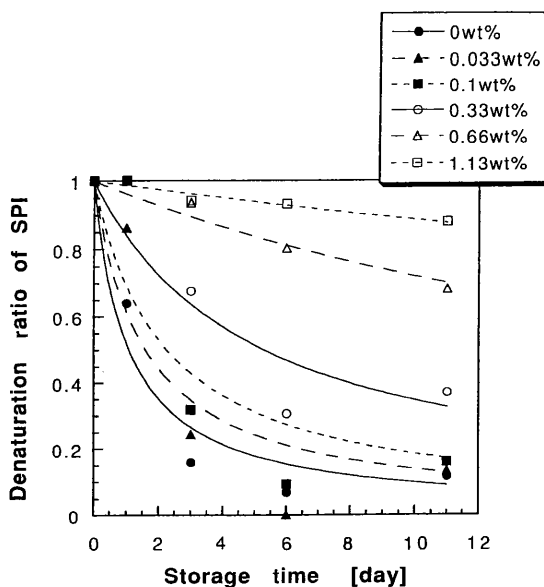


Fig. 4. Effect of glucose added on freeze-denaturation rate of SPI at -20°C. Initial SPI concentration was 0.064 wt%. Denaturation ratio was measured from optical absorbance at 600 nm.

要 約

水溶液中での分離大豆たん白質 (SPI) の凍結変性は凍結に伴う凍結濃縮を引き金とする時間および温度依存性の速度過程であった。凍結に伴う溶質の凍結濃縮はたん白質変性反応を大きく加速し、このことを考慮した理論的反応速度モデルは SPI 凍結変性現象を良好に説明することができた。得られた凍結変性の見かけ反応次数の値は 2 であり、たん白質変性カスケードの律速段階が最初の 2 分子間反応にあることを示唆していた。グルコース添加による凍結変性抑制効果も理論モデルにより凍結濃縮抑制効果として説明することができた。

文 献

- 1) Chilson OP, Costello LA and Kaplan NO (1964) : Effects of freezing on enzymes. *Fed Proc*, **24**, suppl. 15, 55-65.
- 2) Tamiya T, Okahashi N, Sakuma R, Aoyama T, Akahane T and Matsumoto JJ (1985) : Freeze denaturation of enzymes and its prevention with additives. *Cryobiology*, **22**, 446-456.
- 3) Carpenter JF, Prestrelski SJ and Arakawa T (1993) : Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization. I. Enzyme activity and calorimetric studies. *Arch Biochem Biophys*, **303**, 456-464.
- 4) Hashizume K, Kakiuchi K, Koyama E and Watanabe T (1971) : Denaturation of soybean protein by freezing. *Agric Biol Chem*, **35**, 449-459.
- 5) Yamazaki N, Hatakeyama T and Funatsu G (1988) : Denaturation of ricin D in frozen aqueous solutions. *Agric Biol Chem*, **52**, 2547-2553.
- 6) Watanabe T, Kitabatake N and Doi E (1988) : Protective effect of non-ionic surfactants against denaturation of rabbit skeletal myosin by freezing and thawing. *Agric Biol Chem*, **52**, 2517-2523.
- 7) Pincock RE and Kiovsky TE (1966) : Reactions in frozen solutions. *J Am Chem Soc*, **88**, 4455-4459.
- 8) Takenaka N, Ueda A and Maeda Y (1992) : Acceleration of the rate of nitrite oxidation by freezing in aqueous solution. *Nature*, **358**, 736-738.