

低温生物工学会誌 [Cryobiology and Cryotechnology], Vol. 49, No. 2, 139~143, 2003

## 二糖類によってガラス包埋した凍結乾燥タンパク質の 貯蔵時における安定性

東京海洋大学海洋食品科学科

川井 清司, 鈴木 徹, 萩原 知明, 高井 陸雄

### Storage Stability of Freeze-Dried Protein Failed into Glassy State by Disaccharides

Kiyoshi KAWAI, Toru SUZUKI, Tomoaki HAGIWARA and Rikuo TAKAI

*Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries,*

*4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan*

Residual biological activity of lactate dehydrogenase (LDH) freeze-dried in presence of four kinds of disaccharides (i.e. trehalose (TRE), sucrose (SUC), maltose (MAL) and lactose (LAC)) was examined, and the stabilizing effect of disaccharides was compared and discussed based on water replacement and glass transition hypothesis. Every disaccharide protected LDH from stress induced by freeze-drying, although the protecting ability was almost same degree among them. However, the more residual moisture content of sample raised the LDH residual activity. This result will be explained by steric hindrance of water replacement by disaccharide. Although LDH lost all of the activity within one month during storage at the temperature above  $T_g$ , when the sample was in glassy state at the same temperature, the activity was enough kept. This will result from the immobilizing effect by glass transition. On the other hand, when the sample was stored below the  $T_g$ , TRE and SUC enough protected LDH during at least three months. However, MAL and LAC destabilized LDH by the browning reaction to LDH. It is thought that TRE has non-reactivity to protein and high  $T_g$  will work to protein as the most effective lyoprotectant among four disaccharides through the current research.

(Received for publication September 5, 2003)

## 1. 緒 言

凍結乾燥は不安定なタンパク質を安定化する技術として利用される。しかし多くのタンパク質は“凍結”と“乾燥”プロセスにおいて不可逆的なダメージを受けてしまう。従って、この様なタンパク質へのストレスを緩和する為には保護物質を添加する必要がある。凍結に対するタンパク質保護効果は、比

較的多くの物質 (e.g. 単糖類, 二糖類, アミノ酸, 高分子) が有する事, 保護物質の溶質濃度に依存する事などが見出されており, このメカニズムは選択的水和説によって説明されている<sup>1,2)</sup>。一方, 乾燥に対する保護効果はこれよりも少し複雑である。例えば, 凍結に対して有効な保護効果を示す物質であっても, 乾燥に対してはほとんど効果がない場合が多く, 特に二糖類が有効である事が実験的に示されている<sup>1,2)</sup>。この二糖類の乾燥保護メカニズムは水置換&ガラス転移説によって理解されている。即ち, タンパク質に二糖類が結合し, 水の代替として振舞うと共に, ガラス化する事で分子運動を抑制するという考え方である<sup>2,3)</sup>。しかし二糖類の中で凍結乾燥

第49回低温生物工学会研究報告 9

[Key words : LDH, Glass transition, Disaccharide, Freeze-dry, Browning reaction ; LDH, ガラス転移, 二糖類, 凍結乾燥, 褐変反応]

(64)

保護効果を比較したとき、最も有効なものは何なのか、具体的に示した例は少なく、またこういった研究の多くは凍結乾燥前後でのタンパク質の活性変化から評価したものであり、貯蔵時の安定性まで十分に議論されてはいない。そこで本研究ではモデルタンパクとして乳酸脱水素酵素 (LDH) を用い、4種の二糖類 (トレハロース (TRE), スクロース (SUC), マルトース (MAL), ラクトース (LAC)) の共存下で凍結乾燥した LDH の残存活性から、貯蔵安定性を3ヶ月に渡り追及した。

## 2. 材料および方法

LDH from rabbit muscle, sucrose, lactose monohydrate は和光株式会社より、maltose monohydrate は国産化学株式会社より購入した。Trehalose dehydrate は林原株式会社より提供して頂いた。

リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) に対して LDH 懸濁液を 5℃ で 24hr 透析した。280nm での吸光度より LDH 濃度を決定し、100  $\mu$ g/ml に調製した。100  $\mu$ g/ml の LDH 溶液に各二糖類が 100mg/ml 含まれるように調製し、2ml プロピレンチューブに 1ml 採った。液体窒素下に約1分間浸漬して凍結し、あらかじめ棚冷却を行っておいた凍結乾燥機に入れた。-40℃ から 15℃ に昇温しながら2日間かけて凍結乾燥した。更にサンプルの残存水分を調整するため、相対湿度 0% 下の真空デシケータ、及び 22% のデシケータ内で1週間放置した。得られたサンプルを 60, 40, 20℃ で3ヶ月間貯蔵し、1ヶ月ごとに残存活性を測定した。活性測定はサンプルの復水後、buffer で NADH を 0.2mM, ピルビン酸ナトリウムを 0.98mM に調製した基質溶液 3ml に 10  $\mu$ g/ml の LDH 溶液を 50  $\mu$ l 加え、25℃ で 340nm での吸光度変化から求めた。各3サンプル測定し、その平均値を求めた。貯蔵前の活性を基準に活性保持率 (%) を評価した。

サンプルのガラス転移温度 ( $T_g$ ) は DSC (SIMADZU DSC50) によって調べた。サンプル、及び基準物質の  $\alpha$ -アルミナ粉末を 10mg 程度耐圧アルミニウム DSC セルに封入した。蒸留水とインジウムで校正し、5℃/min で 0~120℃ 付近まで昇温走査した。

## 3. 結果および考察

### 3.1 凍結乾燥前後での LDH 活性変化

凍結乾燥前後での LDH 残存活性変化を Fig. 1 に示す。凍結の段階では二糖類を含むものはほぼ 100%, 含まなくても 80% の活性を保っており、凍結によるダメージ少なかった。凍結乾燥後の残存活性に着目すると、二糖類を含まない LDH は残存活性 10% まで減少したが、二糖類を含む LDH は活性を 60-80% 程度保持しており、顕著な凍結乾燥保護効果が見られた。二糖類間で保護効果を比較しても、この段階では明確な差は見出せなかった。しかし、RH 0% と RH 22% を比較すると、全体的に RH 22% の方が残存活性は高かった。この結果は以下のように考えられる。本来タンパク質は水を含めた (水和した) 状態が天然状態であり、脱水による水和シエルの崩壊は大きな負荷となる。その際二糖類の存在が擬似水和を促す事でタンパク質を安定化するわけだが、水と二糖類の分子サイズは大まかに見積もって約 20 倍異なるわけで、立体障害的に水の代替として完全にタンパク質の水和サイトを満たしているとは考えにくい。しかし凍結乾燥を完全脱水でなく、若干の残存水分を残す程度を終了とした場合、二糖類によってカバーしきれないタンパク質水和サイトにも水が存在するわけで、タンパク質構造を安定化できるかもしれない。一般に凍結乾燥タンパク製剤にとって残存水分は邪魔者として扱われる。これは水が加水分解などのリアクタントとして、或い

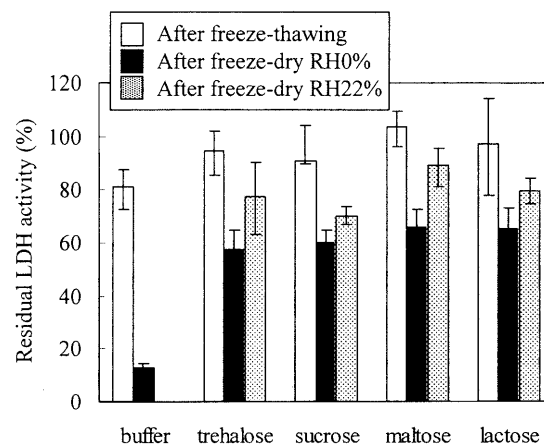


Fig. 1. LDH biological activity with or without disaccharides after freeze-thawing and freeze-drying.

は可塑剤として振舞う事で分子運動を高める, などの理由による<sup>3)</sup>. しかしタンパク質構造の観点から見た場合, ある程度の水の存在が有利なわけで, 結果的にこれらの条件が一致する, 最適残存水分含量があるかもしれない. 尚, 続く貯蔵試験では Fig. 1 の残存活性を100としてその活性変化を%として評価した.

### 3. 2 DSC によるサンプルの $T_g$ の決定

Fig. 2 -a, -bに RH 0 %, 及び RH 22%に水分調整したサンプルの DSC 昇温曲線を示す. どのサンプルにもガラス転移による吸熱シフトが確認でき, それぞれの  $T_g$  をシフトの onset から決定した. RH 22%のサンプルは水の可塑効果により RH 0%のものより  $T_g$  は減少した. 本研究で用いた4種の二糖類のうち, 若干 SUC の  $T_g$  は低かった. これらのサンプルは60°C, 40°C, 20°Cで貯蔵されたのだが, RH 22%に調整し, 60°Cで貯蔵したサンプルは  $T > T_g$ , 同じく RH 22%に調整し, 40°Cで貯蔵したサンプルは  $T \geq T_g$  それ以外のサンプルは  $T < T_g$  という条件になる.

### 3. 3 $T > T_g$ における LDH 貯蔵安定性の評価

Fig. 3 には RH 0%に調製したサンプルを60°C, 40°Cで貯蔵した際の LDH 活性の経時変化を, Fig. 4 には RH 22%に調製したサンプルを60°C, 40°Cで貯蔵, 及び RH 0%に調製した二糖類を含まない buffer のみのサンプルを20°Cで貯蔵した際の LDH 活性の経

時変化を示す. まず,  $T > T_g$  のサンプルに着目する (Fig. 4). 二糖類を含まないもの, 二糖類を含むが  $T_g$  以上で放置されたサンプル (60°C) は1ヶ月以内に完全に失活した (Fig. 4). 一般に, 二糖類が過冷却状態にある場合, 分子運動は急激に高くなり, それに伴い結晶化速度も急激に高くなる事が知られる<sup>4)</sup>. タンパク質と水素結合した二糖類はガラス (或いは過冷却液体) 状態にあるわけだが, この糖が結晶化するとタンパク質-糖間水素結合は糖-糖間水素結合へと変化する<sup>5)</sup>. 従って二糖類が結晶化するとタンパク質の擬似水和圏が崩壊するため活性も激減するものと考えられる<sup>6)</sup>. 貯蔵中に二糖類が結晶化していたかどうかを調べるため, 復水前のサンプルを DSC 測定した. ここでは結果を示さないが, 60°Cで1ヶ月貯蔵の RH 22%サンプルは LAC 以外, ガラス転移が確認できた. 従って, この失活は二糖類の結晶化が直接的な原因ではないといえよう. 同じ60°Cでも二糖類がガラス状態にある場合 (Fig. 3), LDH 活性は保持されていた事 (但し, 活性保持率は二糖類間で大きく異なる. これについては次節で述べる.) から, 二糖類のガラス化による immobilizing 効果の重要性が伺える. 一方,  $T_g$  よりわずかに高い温度なら (Fig. 4, RH 22% at 40°C), 少なくとも3ヶ月は安定であった. しかし, 先にも述べたように結晶化の問題などを考えると, 長期安定性という意味ではやはりガラス状態にある事が望ましいといえよう.

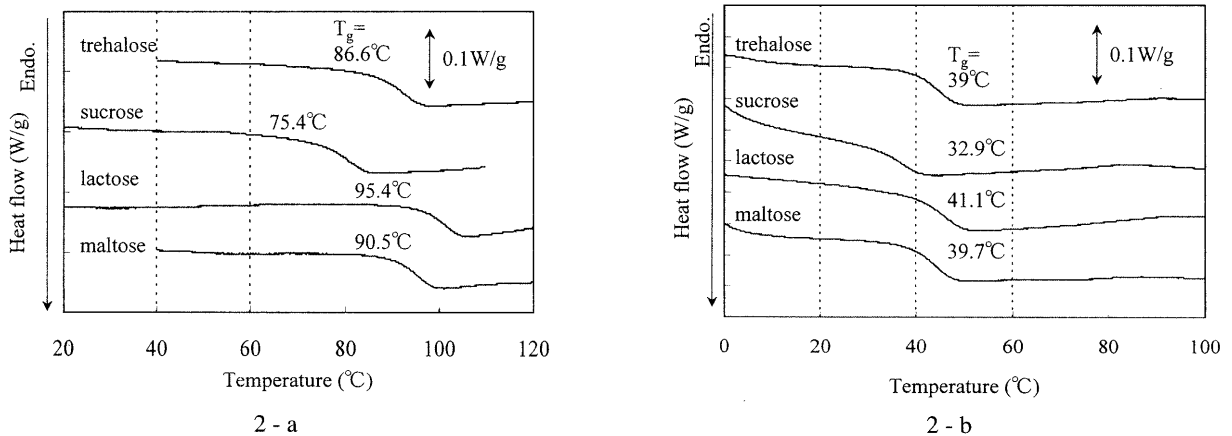


Fig. 2. -a DSC thermograms of LDH freeze-dried in present of disaccharides and adjusted the final moisture content under RH 0 %, and -b RH22%.

(66)

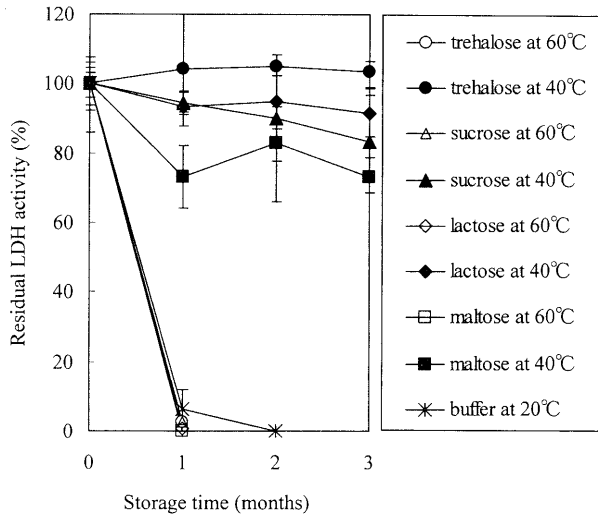


Fig. 3. Time course of residual LDH activity in terms of sample adjusted the final moisture under RH 0 % at 60°C and 40°C. Every sample is below the  $T_g$ .

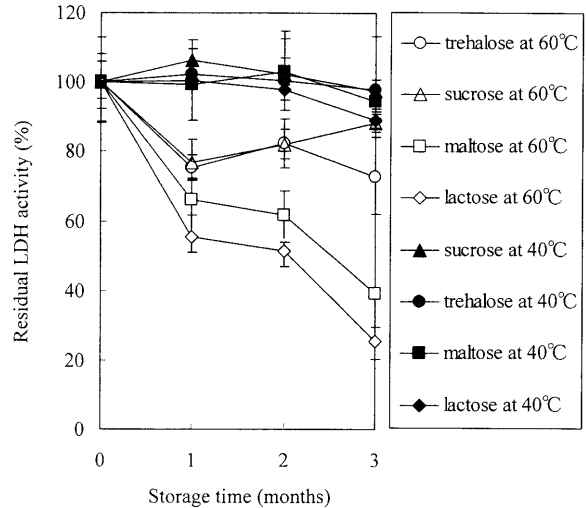


Fig. 4. Time course of residual LDH activity in terms of sample adjusted the final moisture under RH22% at 60°C and 40°C. Every sample is below the  $T_g$ .

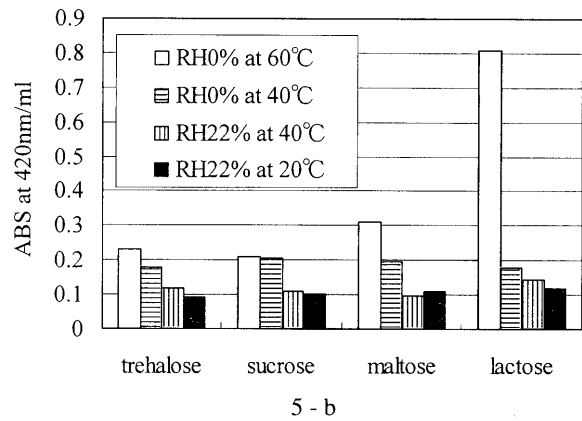
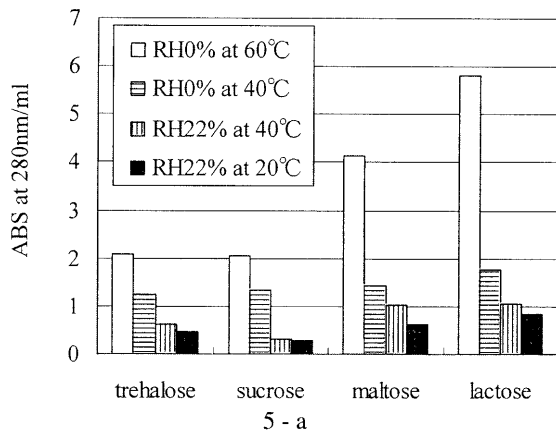


Fig. 5. -a Absorbance at 280nm, and -b at 420nm. Each absorbance indicates the degree of browning reaction.

### 3. 4 $T < T_g$ における LDH 貯蔵安定性の評価

続いて  $T < T_g$  での LDH 活性変化に着目する (Fig. 3). TRE と SUC は貯蔵温度にほとんど影響なく、どの状態においても十分に活性を保持していた。しかし RH 0 % で 60°C 貯蔵の MAL と LAC は復水後の溶液を見ると明らかに褐変しており、LDH 活性保持率も時間と共に低下し、3ヶ月で50%以下となった。これは還元糖である MAL と LAC がタンパク質と褐変反応 (i.e. メイラード反応) した結果によるものと考えられる。この褐変反応の進行を検出するため、活性測定後のサンプルに関して280nm と 420nm での吸光度を測定した。褐変反応は数段階からなる複雑な化学反応であるが、実験的に初期の反応生成物は280nm で、後期の反応生成物は420nm で吸光する事が知られている<sup>7)</sup>。この結果の例として

RH 0 % に調整したサンプルの60°C, 40°C貯蔵, RH 22% に調整したサンプルの40°C, 20°C貯蔵の2ヶ月目の280nm, 及び420nm での吸光度変化を Fig. 5-a と -b に示す。280nm, 420nm のどちらの吸光度に関しても明らかに MAL, LAC は TRE, SUC よりも高い値を示した。また, RH 0 %, 60°C の MAL と LAC を比較すると LAC の方が吸光度は高く, LDH 活性保持率は低かった。褐変反応はガラス状態 ( $T < T_g$ ) にあればその反応速度も遅くなると報告される<sup>7)</sup>。しかし, 長い時間スケールで観察すると, ガラス状態下であっても褐変反応は徐々に進行しており, タンパク質構造にダメージを与えた結果, 活性保持率は低下していったものと考えられる。一方, RH 22% の40°C貯蔵と RH 0 % の60°C貯蔵サンプルを比較すると, RH 22%, 40°Cのサンプルの方が  $T_g$

に近い温度 ( $T_g$ -T が低い) であったにもかかわらず, 褐変反応は RH 0%, 60°Cの方がよく進行していた. 一般に, 褐変反応は“diffusion limit reaction”と考えられているが<sup>7)</sup>, だからといって単純に  $T_g$  のみで褐変反応速度を説明できないように思える. ガラス状態下で進行する褐変反応速度と  $T_g$  の関連については現在検討中である.

#### 4. ま と め

4 種の二糖類, TRE, SUC, MAL, LAC の凍結乾燥保護効果は凍結乾燥直後では同程度であった. しかし MAL, LAC はタンパク質との反応性に優れ, 更にその反応はガラス状態下にあっても進行するため, 貯蔵安定性まで考慮するとむしろ不安定化物質となってしまう. 一方, タンパク質の貯蔵安定性にはガラス化による immobilizing 効果が重要な因子の一つである. SUC の  $T_g$  は二糖類の中で最も低く,

残存水分の影響によっては  $T_g$  が貯蔵温度より低くなるかもしれない. そういった意味において, やはり少しでも  $T_g$  は高い物質が望ましい. 以上の議論をまとめると, 最終的に TRE が最も有効な保護物質であるといえよう.

#### 文 献

- 1) 荒川: 蛋白質 核酸 酵素, **37**, 1517 (1992).
- 2) Arakawa, T., S. J. Prestrelski, W. C. Kenney and J. F. Carpenter: *Adv. Drug Del. Rev.*, **46**, 307 (2001).
- 3) 阿曾, 吉岡, 小嶋: 低温生物工学会誌, **48**, 42 (2002).
- 4) Roos, Y. J. and M. Karel: *J. Food Sci.*, **56**, 38 (1991).
- 5) Carpenter, J. F. and J. H. Crowe: *Biochem.*, **28**, 3916 (1989).
- 6) Suzuki, T., K. Imamura, H. Fujimoto and M. Okazaki: *J. Chem. Eng. Jpn.*, **31**, 565 (1998).
- 7) Karmas, R., M. P. Buera and M. Karel: *J. Agric. Food. Chem.*, **40**, 873 (1992).