

細胞や食品の冷凍・凍結挙動とその制御物質について

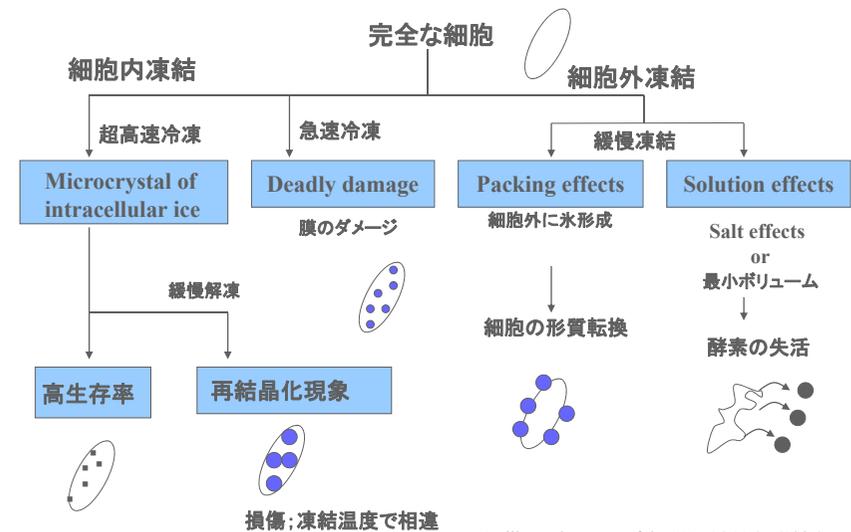
関西大学 化学生命工学部
生命・生物工学科
河原秀久

本日の講演

1. 細胞における冷凍時の挙動について
2. 食品における冷凍時の損傷について
3. 氷結晶制御物質とは
4. 不凍タンパク質とその機能

細胞における冷凍時の挙動について

細胞における冷凍損傷について



Fujikawa S.: Trans of the JAR,14,11-25 (1987)

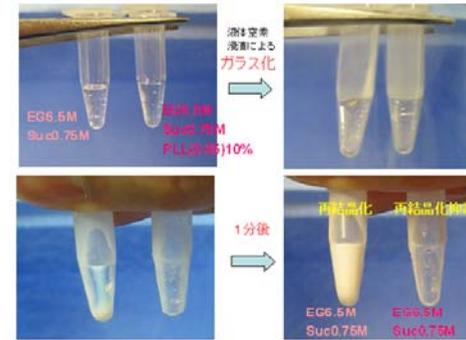
細胞保存方法

スロークーリング法；卵細胞の中にある水分を脱水することが必要になり、凍結する前の胚をアルコールなどを含んだ凍結保護剤に浸します。この際いきなり高濃度の保護剤に浸けるのではなく少しずつ濃度を上げていきます。凍結保護剤に浸された胚は細いストローに移された後、プログラムフリーザーで、ゆっくりと凍結します。凍結胚は液体窒素を満したタンク内で長期にわたる保存が可能です。解凍する場合は、ストローを取り出して暖め、凍結したときの逆のステップで培養液に戻します。良好な胚を凍結解凍した場合75～80%の胚が生存し、生存胚あたりの妊娠率は新鮮胚と同様です。

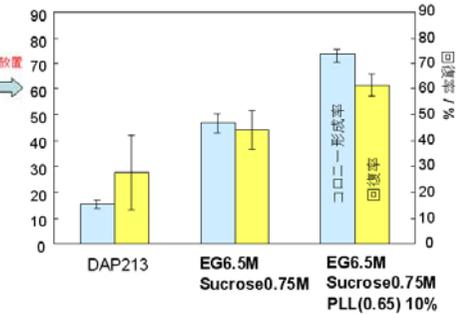


ガラス化法；近年、プログラムフリーザーを用いない新たな凍結方法としてVitrification法(ガラス化法)が開発され、現在はスロークーリング法に代わって凍結法の主流になっている。ガラス化法では細胞内に氷を作らないように高濃度の溶液に浸し、一気に凍結します。この方法の利点は今まで凍結が困難であった胚盤胞や未受精卵の凍結が可能になった。

ポリリジンコハク酸誘導体を用いたガラス化法によるiPS細胞の冷凍保存



PLL(0.65)添加ガラス化液では、ガラス化後に室温放置しても再結晶化が抑制されている。



回復率= 解凍後4日間培養後の細胞数/ 未凍結系4日間培養後の細胞数

玄丞 再生医科学研究所准教授ら

京都大学ホームページ； http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2010/101201_3.htm

食品における冷凍時の損傷について

食品の低温保存および解凍方法

低温保存の対象となる食品の分類

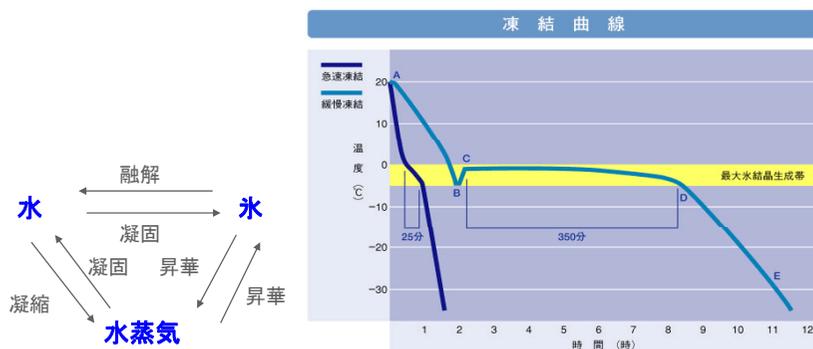
- 生鮮食品
 - 植物性食品； 農産物(野菜類, 果実類)
 - 動物性食品； 水産物(魚介類) 畜産物(食肉類, 食鳥類, 乳, 卵)
 - 加工食品
 - 植物性加工食品
 - 動物性加工食品
 - 複合調理加工食品
- そのままでは冷凍保存できない。
 ブランチング(軽く加熱する)。ok
 果実はシロップ付け。 脱水凍結
- 短期は冷蔵。長期は-18℃以下の好ましい
 魚介類の一部は凍結保存できないものもある。

目的とする貯蔵期間によって貯蔵温度を設定する。

凍結食品の解凍

- 原料形態の凍結食品； 半解凍すなわち中心温度が-5℃で表面はできるだけ0℃
- 調理冷凍食品； 食用可能な状態まで昇温させる。

水の凍結曲線と氷成長速度



凍結率と濃縮率

凍結率は結合水を除いた凍結する水の割りあい

-20°Cで90% (凍結直後)

-20°Cで93% (凍結貯蔵時)

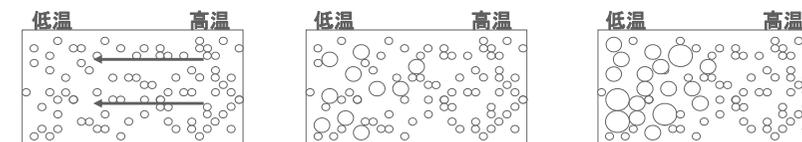
冷凍保存中の食品の物理的变化

1. 食品の乾燥 → 「凍結焼け」「油焼け」

2. すき間氷 水分が包装材の内面に移動 →

すき間に
おびた
だしい氷

3. 氷結晶の成長 → 氷の再結晶化



時間経過に

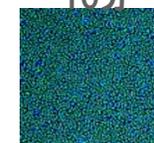
0分

10分

30分

AFP

50 μg/ml



食品冷凍の化学的問題

タンパク質の変化; タンパク質は食品の骨格、

高い水和性により食品固有の口ざわり、歯ごたえなど。

変性により、生肉では軟化、スポンジ化が起こり、ドリップ。

脂肪の変化; 魚や畜肉の冷凍では、異臭発生や油焼けと呼ばれる脂質の変化。

品質劣化

糖質の変化; 加熱調理済の冷凍食品にとって、デンプンの老化。

急速な冷凍処理。

色素の変化; ヘム色素(カツオやマグロの赤色)ミオグロビン 変色

カロチノイド類 退色は酸化

クロロフィルル 緑色 冷凍保存が高い

ポリフェノール類 アントシアニン アルカリ条件下で退色

栄養素の変化; 冷凍時には変化がない。解凍時のドリップに流出してしまう。

食品冷凍の栄養学的問題

タンパク質; タンパク質の一部は保水性を失い、変性する。

起こしやすい例; タラ

起こしにくい例; タコ、イカ

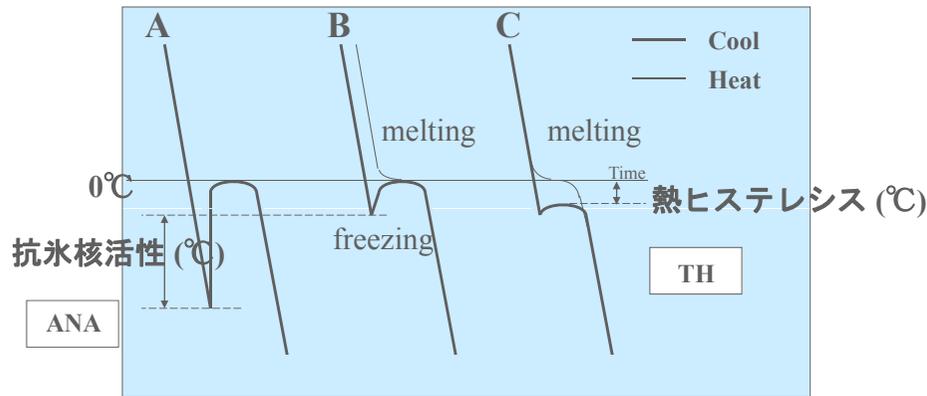
糖質; 単糖や二糖類は問題ない。デンプンの老化が進む。

脂質; 脂質の一部リパーゼの作用で加水分解し、遊離脂肪酸が増加、酸化しやすくなる。

ビタミン類; ブランチング処理により水溶性ビタミン(VC)の溶出と加熱酸化
凍結保存中の酸化による変化
解凍時におけるドリップへの溶出、加熱による溶出と酸化

ミネラル; ブランチング処理により一部(カリウム、ナトリウム)が損失

氷結晶制御物質の過冷却曲線



- A: AgI + 過冷却促進物質溶液
- B: AgI + Distilled water (1 atmospheric pressure)
- C: AgI + 不凍タンパク質溶液

不凍タンパク質とその機能

不凍タンパク質とは

南極ノトセニア



Pleuogramma antarcticum

Comp. Biochem. Physiol. B., 76, 545-548 (1983)
Comp. Biochem. Physiol. C., 111, 121-129 (1995)

存在する生物種

魚類、植物、甲虫の幼虫、昆虫、キノコ、カビ、地衣類、酵母、細菌など

不凍糖タンパク質発見。
20 mg/mlタンパク質で、-1.9°C凍結点

海水温度の凍結点より体液の凍結温度を低下させる

不凍糖タンパク質
(Antifreeze glycoprotein)

魚由来不凍タンパク質(AFP)と不凍糖タンパク質(AFGP)

Characteristic	AFI Type I	AFII Type II A	AFIII Type III	AFIV Type IV A
Mass (Da)	2600-33000	3300-4500	FP 000-24000	FP 12000
Key Properties	AAT repeat saccharide	Alanine-rich α -helix	Disulfide bonded	β -sandwich
Representative				
Structure	Antarctic-totheniods	Right-eyed, flouders	Sea raven, Smelt, herring	Ocean pout, Wolfish, eel pout
Natural Source				

植物由来不凍タンパク質の存在と構造

存在が明らかにされている植物

アブラナ科

ガーリックマスタード
フユガラシ
菜の花
芽キャベツ・キャベツ

イネ科

カラス麦 冬ライ麦
四条大麦 冬小麦
スズメノカタビラ ライ小麦
ナガハグサ ホソムギ
コスズメノチャヒキ

セリ科 ニンジン

ケシ科 コマクサ属

キク科 シオン属

トウダイグサ科 ハツユキソウ

ユリ科 ヤブカンソウ

ヤナギ科 ゴットンウッド

オオバコ科

ハラオオバコ
オニオオバコ

ナス科

ズルカマラ
ジャガイモ

ブナ科

ホワイトオーク

ナデシコ科

ハコベ

キョウチクトウ科

ヒメツルニチニチソウ

スマレ科

スマレ

モクセイ科

レンギョウ

構造として明らかに
なっているタイプ

キチナーゼタイプ

β-1,3-グルカナーゼタイプ

ゾーマチン様タンパク質タイプ

(活性化因子)

ポリガラクチュロナーゼインヒビタータイプ

昆虫の幼虫由来熱ヒステレシスタンパク質



Thecodiplosis japonensis
マツバナタマバエ 幼虫



Tenebrio molitor (②)
ゴミムシダマシ 幼虫



Choristoneura fumiferana (③)
トウヒシントメハマキガ 幼虫



Rhagium inquisitor
ハナカマキリ 幼虫

Cucujus clavipes
ヒラタムシ 幼虫

Oncopeltus fasciatus
ナガカメムシ 幼虫

Dendroides canadensis (①)
ビロウドムシ 幼虫

Rhagium inquisitor
ハナカマキリ 幼虫

	Fire beetle (①)	Mealworm (②)	Spruce budworm (③)
分子量 (kDa)	8.7	8.4	9.0
一次構造	Thr + Cys rich 12 or 13 AA 繰り返し	Thr + Cys rich 12 AA 繰り返し	Ser + Cys rich
二次構造	β-シート?	β-シート?	β-シート + コイル
相同タンパク質	Trypsin inhibitor?	Trypsin inhibitor?	Trypsin inhibitor?

細菌由来の不凍タンパク質

種	起源	タイプ	分子量	他の機能	局在
<i>Pseudomonas putida</i>	Arctic rhizosphere	Lipoglycoprotein	164,000	INA	外
<i>Marinomonas Primoryensis*</i>	Antarctic saline lake	Protein	60,000	RIA	内
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Antarctic soil	Protein	80,000	-	外
<i>Moraxella</i> sp.	Antarctic soil	Lipoprotein	52,000	-	外
<i>Flavobacterium xanthum</i>	Antarctic soil	Protein	60,000	RIA	内
<i>Colwellia</i> sp.**	Antarctic sea	Protein	26,000	RIA	外

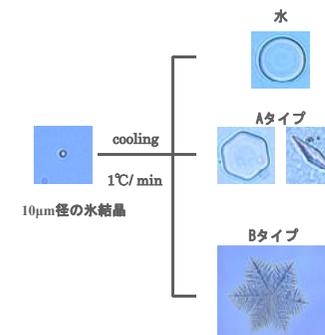
*: Garnham CP et al, *Biochem J.*, **411**, 171-180 (2008).

** : Raymond JA et al, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **61**, 214-221 (2007).

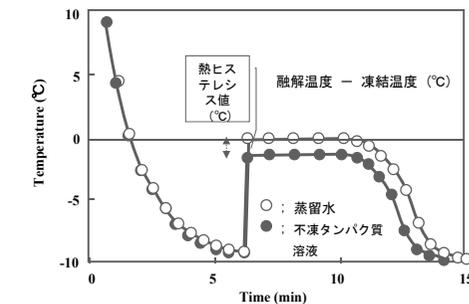
赤字は、関西大学微生物工学研究室で研究開発したものの。

不凍タンパク質の3つの基本活性

氷結晶の形態変化

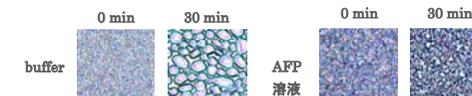


熱ヒステレシス値 (TH °C)

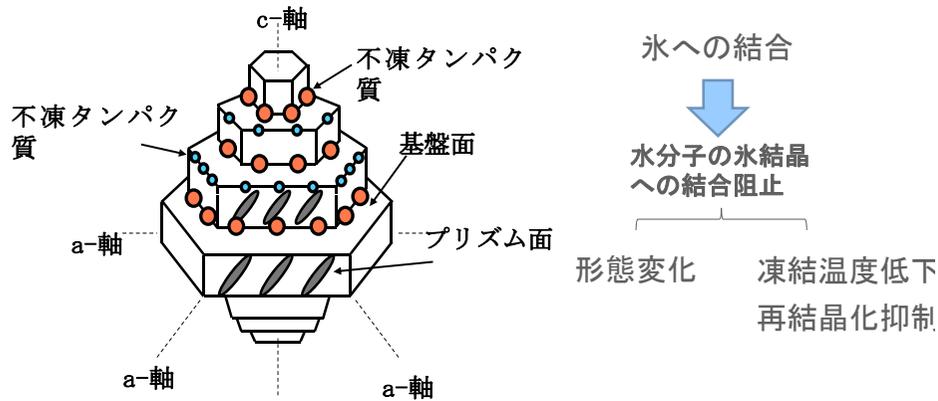


水の再結晶化抑制

-6°Cで維持



不凍タンパク質の氷結晶への結合状態



不凍タンパク質の名称と関連物質

不凍タンパク質; Antifreeze protein (AFP)

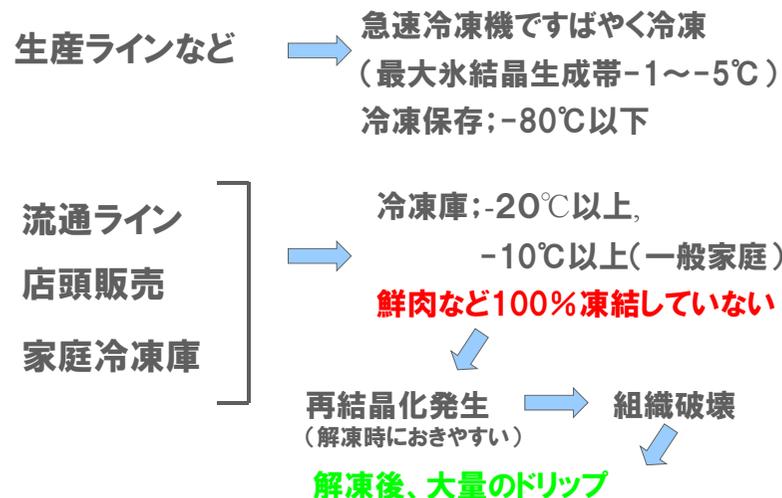
水が凍らないというイメージになる

AFPによる最大熱ヒステレシス値; 9°C

-9°Cまで、溶液中の氷結晶が成長しない。

- 氷形態を変化させる能力 → Ice structuring protein
- 熱ヒステレシスが強いもの → Thermal hysteresis protein
- 氷に結合する能力 → Ice active protein
- 再結晶化活性のみの能力 → Ice recrystallization-inhibiting protein (不凍タンパク質ではない?)

冷凍技術の現状



不凍タンパク質の機能とその応用

機能

- 氷結晶の形態制御
- 氷結晶の再結晶化抑制
- 凍結温度の低下
- 低温下での膜の安定化

期待できる応用

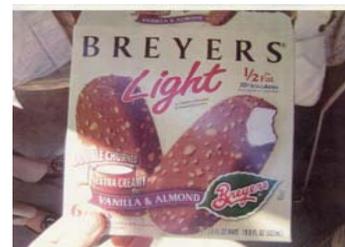
- ドリップの減少、冷菓の食感、細胞・食品などの冷凍保存
- 食材・冷凍食品の高品質保存 細胞の長期保存
- 霜発生阻害効果
- 細胞などのチルド状態での保存 食品などのチルド状態での保存

不凍タンパク質の市場性の予測(北米地域)

	全市場(百万ドル)	潜在的年収入 (百万ドル)
遺伝子導入発現		
魚	400	20
大豆	500	30~50
植物		
コーヒー	2,000	100
フルーツ	200	10
柑橘類	360	18
細胞・組織・臓器の 低温、凍結保存	4,000	150~200
血小板凍結保存	1,000	75~100
凍結外科手術	-	50
アイスクリーム	30,000	90~100
サケの成長	2,500	125

GL. Fletcher et al., *CHEMTECH*, 29,17 (1999).

北米地域で販売されている不凍タンパク質入りアイスクリーム

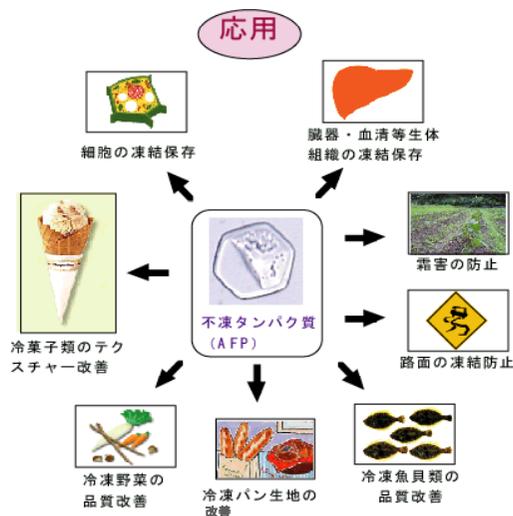


ユニリーバ

魚由来タイプIII不凍タンパク質の遺伝子を酵母に導入し、発現させて得られた組み換えタンパク質をアイスクリームに添加

植物油脂を半減し、氷再結晶化を添加した不凍タンパク質で制御している。

不凍タンパク質の応用の可能性



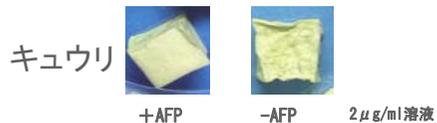
冬野菜に存在する不凍タンパク質

青色以外に存在する

アブラナ科	白菜 大根 ブロccoli キャベツ 小松菜 ミブナ チンゲン菜 シロナ 蕪 野沢菜 ミズナ カリフラワー	
キク科	春菊	ゴボウ
セリ科	ニンジン	
ユリ科	ネギ	
アカザ科	ほうれん草	
ハス科	レンコン	

食品品質における不凍タンパク質の応用性の展開

フリーズドライ食品の品質改善； 凍み込ませた後、FD



鮮肉・鮮魚の品質改善 浸漬方法、インジェクション法

家畜の場合、屠殺前に静脈注射
養殖魚の場合、？



冷凍パン生地、冷凍麺、冷凍ご飯の品質改善

冷凍パン生地 水分量増加できる できあがり軟らかくなる
AFPによってはデンプン老化抑制あり

大根葉・カイワレエキスの使用方法

使用が期待される商品

澱粉製品、餃子、中華まん、フリーズドライ用食品、かまぼこ、中華ポテト、魚卵(数の子)、釜揚げチリメンジャコ、ハム、和菓子(餅、団子類、餡)、漬物、野菜、豆乳、湯葉、にこごり、ゆで卵、パン、アイスクリーム、じゃがいも、柚子皮、大根、液体調味料、生麩、米飯、豆腐、ゼリー、ソーセージ、アボガド、畜肉食品、ドレッシング、寒天、血液、血清、血小版など

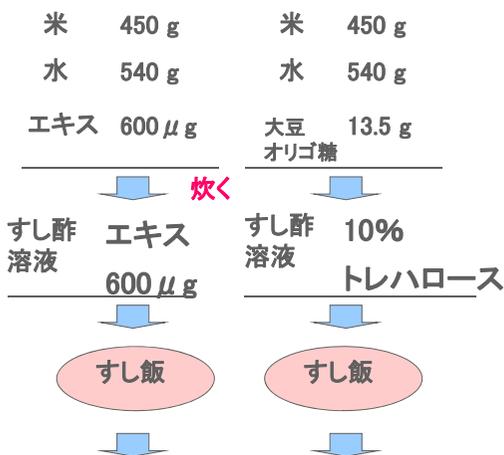
うどんの場合 大根葉エキス
1 mgで2.5kgの仕込み量

加工肉製品の場合 ムチムチ感

大根葉エキス 100 mgで肉1kg

鶏肉の場合 ドリップ量58%に
冷凍解凍後、軟らかい

冷凍すし飯に対するカイワレ大根エキスの効果

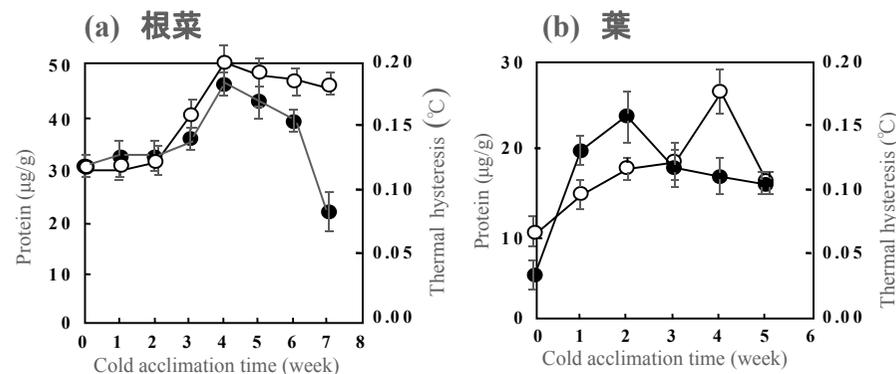


エキス トレハロース、大豆オリゴ糖

一粒、一粒が 粒同士が
分かれている 接着している

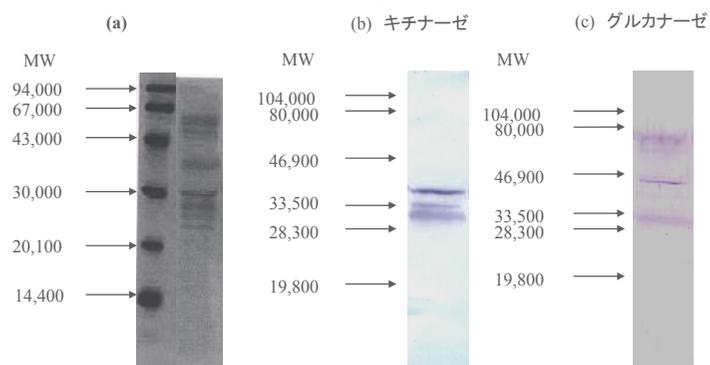
-20°C、3ヶ月間保存

大根の葉および根菜の低温馴化によるAFPの生産

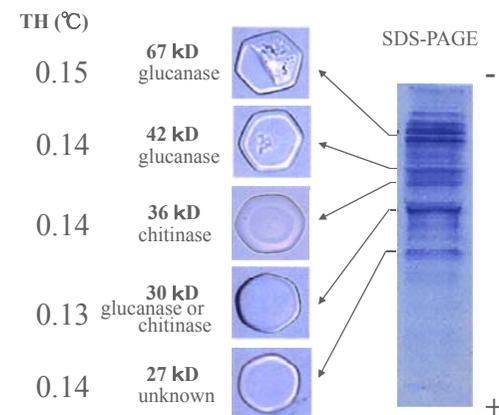


●: タンパク質 ○: 熱ヒステレシス

冬ライ麦由来不凍タンパク質抗体を用いた ウエスタンブロッティング



各タンパク質抽出物の不凍活性



複数の不凍タンパク質をアポプラスト画分に蓄積している

これからの研究展開

不凍タンパク質: 氷再結晶化抑制能のみ持ったタンパク質を発見。同じ機能を持った多糖を検索し、すでに発見。構造解析中。

植物不凍タンパク質 'クリスタ・キープ' としてカネカより販売開始

抗氷核活性物質(過冷却促進物質): 過冷却水を形成するのに最適。

食品成分(日本酒・餡粕など)からの物質生産

高冷凍耐性水分保持高分子ゲル:

食品素材多糖による冷凍耐性ゲルの開発

物産フードサイエンスで販売開始

高冷凍耐性を有する天然乳化剤:

食品から冷凍耐性を合わせ持った乳化剤

の開発

これら化合物を組み合わせて、細胞や臓器保存液の開発へ

ご清聴どうもありがとうございました。

連絡先: 関西大学 生命・生物工学科 河原秀久

TEL 06-6368-0832

kawahara@ksnsai-u.ac.jp