

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660093

研究課題名(和文)食品の長期凍結保存のための生体組織内氷結晶の非平衡成長の解明と安定氷晶構造の創出

研究課題名(英文) Study on non-equilibrium freezing within a bio tissue and stable form of ice-crystal for long-term freezing preservation of foods

研究代表者

山田 雅彦 (YAMADA, Masahiko)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70230480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体中の水分の凍結状態を制御することにより、食品や生体組織を長期保持するための基礎研究として、食肉をサンプルに用いて氷結晶の成長状態の観察を行った。また、長期凍結保存による蛋白質の構造変化と温度の関係を解析し、脂質や骨格筋を構成する蛋白質が氷温以下の低温を経験すると、非可逆的な構造変化をすることを確認した。タンパク質を構成する全原子の動力学シミュレーションから、常温(37℃)と比較して、-50℃ではコラーゲンは水分子の配位により約7%伸張し、一方筋肉を構成するミオシンは、分子構造の折れやたたみ込みにより約1%収縮することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：As a basic research for the long-term preservation of bio-tissue and foods under low-temperature condition, observation of ice-crystals which form in a bio-tissue and molecular simulation of the system of proteins and water have been carried out. By both the observations and molecular simulations, irreversible change of the structure of proteins and water were confirmed to happen. From the results of molecular simulations, at -50℃, a molecule of Collagen II increased its length by 7%, while that of Myosin II decreased its length by 1% comparing to the condition at 37℃. The simulation results of Collagen and water system showed that the water molecule in freezing condition intruded in the protein structure. While for the case of Myosin, molecular structure of protein tended to fold in the middle part of the structure. This tendency implies the possibility of destruction of bio tissue such as human mussels during freezing preservation.

研究分野：伝熱工学

キーワード：生体組織 食品 凍結保存 低温変性 蛋白質 脂質 相変化

1. 研究開始当初の背景

食品や生体組織の凍結保存に関する最大の問題は、融解後の食味、あるいは組織の形態や機能の再現性である。しかし、現在の凍結保存技術は、血液や一部の細胞の保存に成功しているのみであり、組織の機能的保存にまでは至っていない。その原因は、たんぱく質や脂質などの低温による変性もしくは失活、また、生体細胞中の水分の凍結に際しての水結晶生成による細胞の破壊、細胞液の凍結濃縮によるイオン濃度などの致命的な変化などであることが知られている。

現在は、生成される氷結晶を出来る限り微細化するように、保護物質の援用や極低温による急速凍結方法が用いられているが、保持温度が -20 以上になると氷結晶の肥大化が生じる。

生体中の細胞内液の凍結に際しては、氷結晶成長に関する均質核生成理論の適用が困難なことに加え、過冷却が不可避であることと、0 以下での水溶液中の分子の水和や物性値の特異な挙動などが影響し、生体組織中の氷結晶生成のメカニズムは十分に解明されているとは言えない。

従来の生体の凍結保存方法は、液体窒素や極低温冷凍庫などを用いて急速に冷却するものである。生体組織の不可逆的変性は、細胞中の水溶液が凍結する際に、生成される氷結晶が細胞を不可逆的に破壊すること、凍結に伴う濃縮により、細胞液内の成分やイオンのバランスが変化し、不可逆的に失活することが主な原因であると考えられており、従来の凍結方法は、細胞中の水溶液を急速に凍結することで、組織内に生成される氷結晶が微細化もしくは非晶質となり、急速冷却により成分の析出が生じない状態で凍結させることができるという考えに基づいている。

従来のこの凍結保存方法では、極低温を利用する(現在は液体窒素により-196)ため、冷却凍結装置が大規模かつ高価になること、凍結状態が保存対象(組織等)の大きさに依存すること、凍結保護物質の援用など、凍結の前処理に複雑な処理手順を要するなどの不利な点が挙げられる。

また、急速冷却によって生成された非晶質は、低温に保持していてもやがて再結晶化することが知られており、長期間の保存性は良くない。よく知られているように、肉や魚などは-50 程度の低温庫に保存していても、脂質の酸化などが進行し、融解後に凍結前の状態を再元することは至極困難である。生体の凍結の方法論は、この 30 年近くにわたり変わらず、最大氷結晶を生成する温度帯を急速で通過し、かつ、氷結晶を小さく保つために出来るだけ低温に保持するというものである。この方法を達成するため、食品は超低温のフリーザーを使用、また、細胞などの保存では、グリセロールなどの保護液に浸漬し、複雑な前処理を行った後に液体窒素を用いた極低温で保存する方法が用いられている。

前述のメカニズムの理解は、水や水溶液の水結晶成長の理論と経験則に基づくものであるが、背景の理論となる水の水結晶成長に関する理論においても、細胞内の凍結では、局所平衡を仮定し、過冷却、低温域の熱物性値の特異性、結晶成長のクラスター生成・成長の理論など未だ十分に解明されていないものが多々存在する。氷結晶の成長制御(特に過冷却制御)においては、長年にわたり、磁場や電場の付与による制御が試みられて来たが、電場や磁場の付与が凍結に及ぼす影響は極めて小さいことが最終的結果として報告されている。

急冷による非晶質化(ガラス化)も一つの方法であるが、低温保持中にガラス状態から結晶への転移があるため、長期の凍結保存には適さない。そこで、生体組織または水や水溶液を含む組織を凍結させる際に、細胞の機械的損傷や、凍結濃縮を発生させない氷結晶を生成することが極低温によらず達成できれば、従来の凍結保存技術とは全く異なるメカニズムによる生体組織の保存が可能になる。

そのためには、単に生体組織内および細胞内の水溶液の凍結を考慮するのみならず、低温における水分子と組織を構成するタンパク質の非平衡系相互作用と水分子の相変化を、タンパク質に対する水分子の配位を考慮に入れた非平衡分子動力学で解明し、細胞の凍結保存を妨げる要因である氷結晶による細胞の損傷を防ぐ新たな方法が必要とされる。

本研究は、水もしくは水溶液中の水分子の運動とタンパク質との相互作用によって形成される氷結晶を考慮し、たとえば、包晶型などの氷結晶を試料全域で均一に生成する方法を、非平衡分子動力学と結晶構造理論を用いて創出することを試みたものである。

本研究における試みは、従来の極低温凍結保存とは全く異なる、通常低温における高生存率の生体組織保存法の創出と、その成果に基づく、冷凍食品の鮮度保持方法の改革など、食品産業に与える効果は非常に大きい。また、生体工学や医学に及ぼす影響も大であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、魚・肉など組織構造を有し液体を含有する食品の凍結保存による食味や鮮度などの劣化という問題のメカニズムの解明と、その対処方法を見いだすことにより食品の低温長期保存方法を確立することである。

凍結による劣化は、細胞中の水分が凍結する際の氷結晶による細胞の破壊、細胞液の凍結濃縮による不可逆変化に加え、細胞内の蛋白質や脂質などの低温による変性が原因であると考えられている。現在、魚・肉などの食品の冷凍保存には、極低温で急速凍結する方法が用いられているが、脂質やタンパク質

の変性に伴う組織の劣化は低温保存中も進行する。

本研究では、細胞中の脂質やタンパク質に影響をうけつつ、水分子が氷結晶を生成する機構や結晶の形成メカニズムを、全原子動力学シミュレーションにより解明し、凍結濃縮や氷結晶による細胞損傷を生じない、食品（生体組織）の有効な凍結保存方法を創出する事を目的としている。

本研究では、分子動力学による水分子の配位シミュレーションにより、細胞液中の氷結晶の生成機構を検討し、凍結に際し針状結晶を生成させない細胞の凍結保存方法を創出する。極低温に保たれた生体中の水分の再結晶化のメカニズムを解明する、同時に、

鮮肉などの組織を様々な条件下、特に超音波による振動を付与した状態で凍結し、生体組織中の氷結晶の状態変化を観察する。さらに、凍結した試料中の長期間における氷結晶の状態変化を明らかにする。上記4項目を研究期間内に解明することを目的として研究を遂行した。

本研究の最終的な目的は、研究者が有する氷結晶生成に関する知見に加えて、保存対象を構成する脂質やタンパク質などの分子構造が低温状態でその構造が変化し、水分子の挙動（凍結）に及ぼす影響や凍結メカニズムを解明して、食品や生体組織などを、従来の極低温に比較して高い温度の凍結状態で長期保存し、さらに融解後の食味など機能保存率の向上を図る方法を確立することである。

3. 研究の方法

(1) 凍結試験部の製作

凍結試験部は、薄い試料を下面から冷却するため、50mm×100mmのステンレス製上向き水平冷却面を有し、下部より冷却材を接触させて温度制御をしつつ試料を冷却する構造とした。冷却材には、温度範囲に応じて、冷却ブライン、ペルチェ素子、ドライアイス寒剤、および液体窒素を使用した。

試験部による冷却、試料の薄片作成および偏光顕微鏡による観察などの一連の作業は、すべて温度管理をした低温恒温室内の低温環境で実施する。また、凍結試料の長期保存も、その低温恒温室内にて実施した。

(2) 実験試料の選択と試料片の製作

凍結実験に用いる試料は、生体組織として生肉（牛など）および魚肉を可能な限り鮮度が高い状態で、かつ、凍結を経験していない状態のものを用いた。試料を30mm×60mm厚さ約3mmに成形し、凍結試験部の冷却面上に広げる状態で設置し、冷却温度の変化を実験条件として凍結試料を作成した。

(3) 試料の凍結保存と氷結晶の状態変化の観察

所定の条件で作成した凍結試料から、低温室内でスライサーを用い、約100μmの厚さで試料片を作成し、偏光顕微鏡(OLYMPUS BH-2)で氷結晶の状態を観察し、そのサイズ

分布を観察した。

(4) 水溶液中における非平衡氷結晶生成に関する解析

非平衡分子動力学法による結晶成長のシミュレーションの第一段階として、水から氷結晶の生成に関する解析を実施した。基本的な解析コードはすでに開発保有しているもので、主に冷却速度の効果に関する解析に特化して、GPU(NVIDIA, GeForce GTX TITAN)およびGPU用コードCUDAで並列計算をするために解析コードの修正を行なった。

(5) 脂質およびタンパク質と共存する水分子の全原子動力学シミュレーションの実施

さらに、水および水溶液中における脂質ならびにタンパク質と水分子の相互作用に関する解析を、全原子動力学シミュレーションソフトウェアAMBER14(CONFLEX Inc.)を用いて実施した。

解析では、サンプルに最も関連が深いタンパク質としてミオシンを、また、脂質を構成する代表的タンパク質としてコラーゲンを採用し、RCSB Protein Data Base(PDB)より取得したそれぞれのアミノ酸配置構造から、エネルギーが極小の状態を算出した上で、水分子およびNa⁺イオンを注入して電荷が0の状態、所定の温度および圧力に設定した場合のタンパクの構造の変化を模擬し、解析を行った。

水溶液中における水の結晶成長においては、過冷却の発生、特定の温度域(約-40)における物性の特異性、分子の水和など、未だ解決されていない問題が多く残されており、本研究では、非平衡分子動力学による結晶成長モデルの構築を試みた。

図1および図2に、RCSB Protein Data Bank(<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

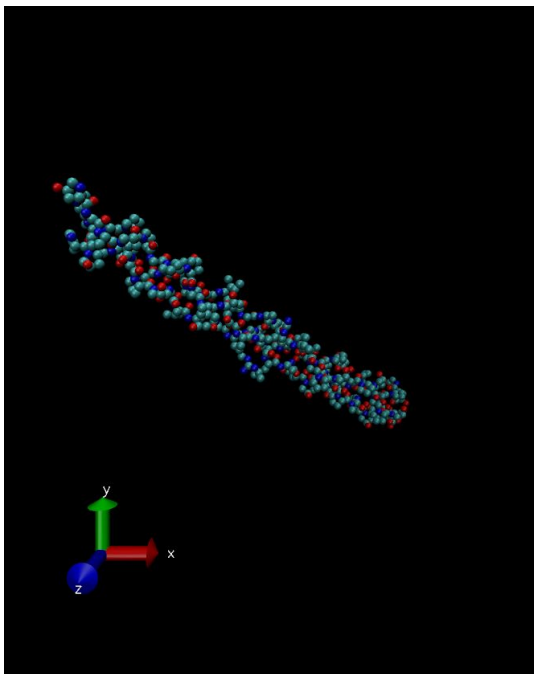


図1 コラーゲンの分子構造と極小エネルギー状態(無水)における結合状態

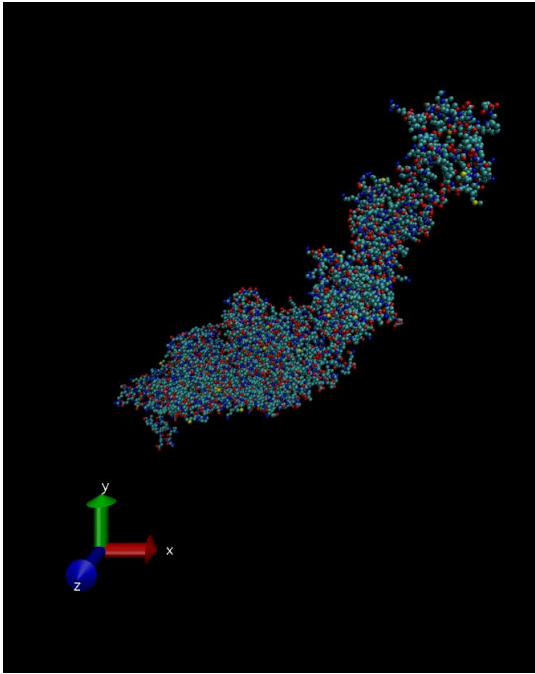


図2 ミオシンの分子構造と極小エネルギー状態（無水）における結合状態

より取得した、コラーゲン（1BKV）およびミオシン（2EC6）のアミノ酸の配置とそれらの結合状態を示す。いずれも、予め原子間の相互作用によるエネルギーが極小の状態になるよう、原子配置を予め計算してある。また、以下の図中のx y z座標系は、すべてこのデータベースにおけるものである。

コラーゲンは、脂質や細胞膜および腱を構成する重要なタンパク質であり、また、ミオシンは、骨格筋などの力を司る筋肉を構成する蛋白質の約60%を占める重要なモータータンパク質である。計算の開始にあたっては、いずれの場合もタンパク質の残基に結合している水分子も除去した状態から行っている。

4. 研究成果

図3および図4に、0 および-50においてコラーゲン分子に水分子が配位された状態をそれぞれ示す。図中白の粒子が酸素原子、赤が水素原子を示している。なお、解析結果より、自由水の状態の水分子は排除してある。図より、低温状態では、水とコラーゲン分子が、エネルギー極小状態に比べて著しくねじれており、それは、低温の方がより顕著であることがわかる。

同温度条件で、ミオシン分子に水分子が配位した状態を、図5および図6に示す。ミオシンの場合、水分子の配位による分子形状の変化は顕著に見られず、分子全体に水分子が多数配位していることのみが見られる。

一方、図7に示した、各タンパクの両末端（N-末端およびC-末端の炭素原子間距離の温度依存性を比較すると、コラーゲンは、0 近傍に比較して-50の方が距離が大き

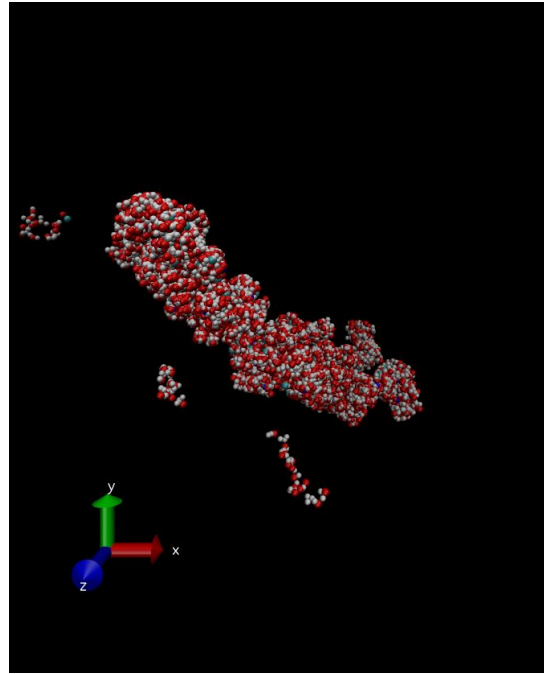


図3 水分子が結合した低温のコラーゲン分子(T=273K)

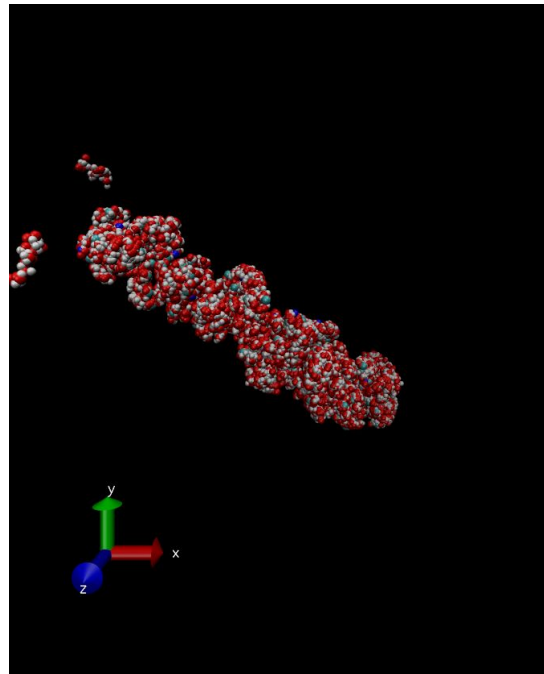


図4 水分子が結合した低温のコラーゲン分子(T=223K)

くなっている。すなわち、分子構造がその結合方向に伸張している。これは、コラーゲンの分子構造の特徴を考えると、各アミノ酸の電荷が0でない部分に、水分子が配位した上でそれをもとに氷結晶が成長するため、コラーゲンが伸張力を受けるためと推測される。さらに、コラーゲンは分子構造が比較的疎であることから、水分子が配位する際に内部に入り込み、結晶成長するためであると考えられる。

一方、ミオシンの両末端距離は、0 近

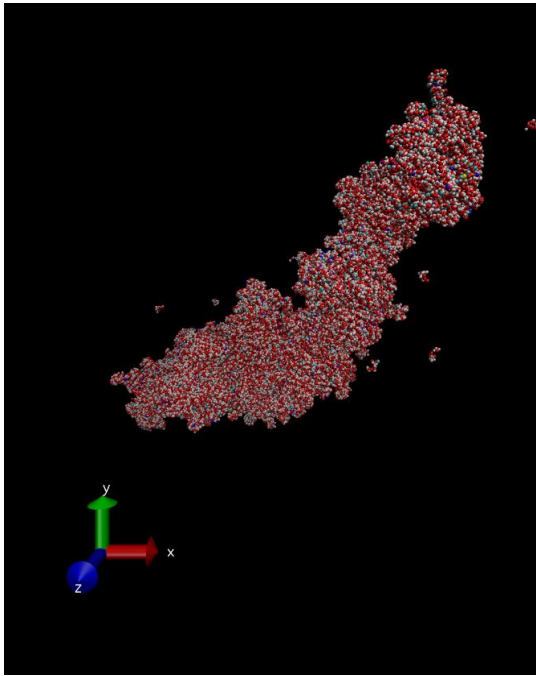


図5 水分子が結合した低温のミオシン分子(T=273K)

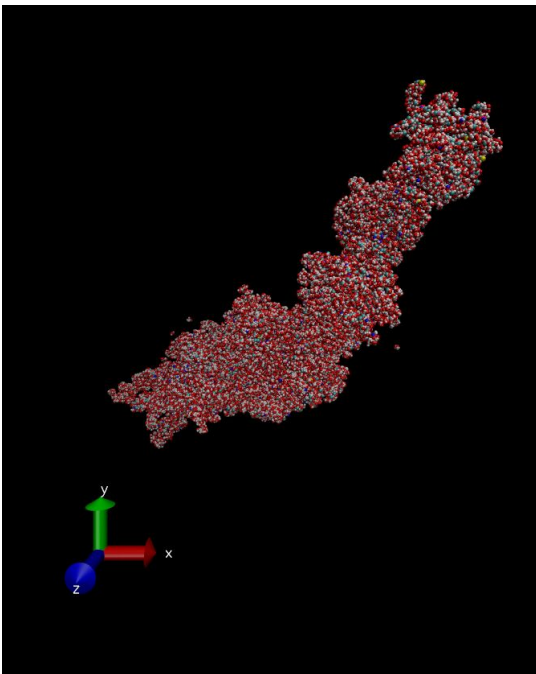


図6 水分子が結合した低温のミオシン分子(T=223K)

傍で一瞬増加を示しているが、温度の低下に伴い距離が小さくなっている。ミオシンの場合は、コラーゲンに比べて本来の残基間の力に異存する分子間距離の変化が水分子の配位による影響を受けにくいことと、ミオシンが低温においては収縮するため(図6, 7では、上端部および中央部で折れ込みが大きくなっているように見える)、末端間の距離は低温において小さくなるものと思われる。なお、図8に示す密度がいずれのタンパク質でも低温になるほど大きくなるのは、各

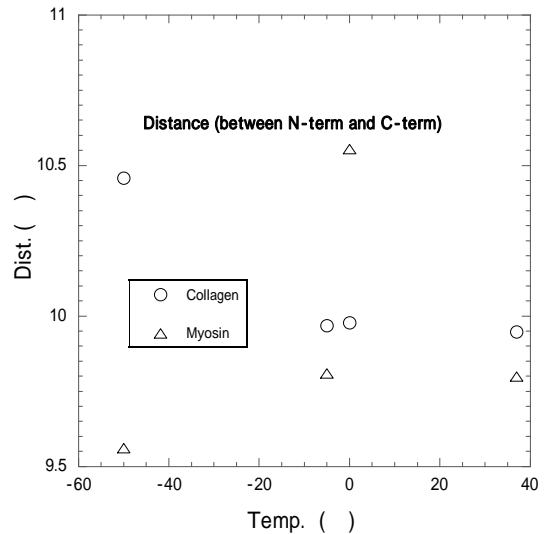


図7 各タンパクの両末端間の距離

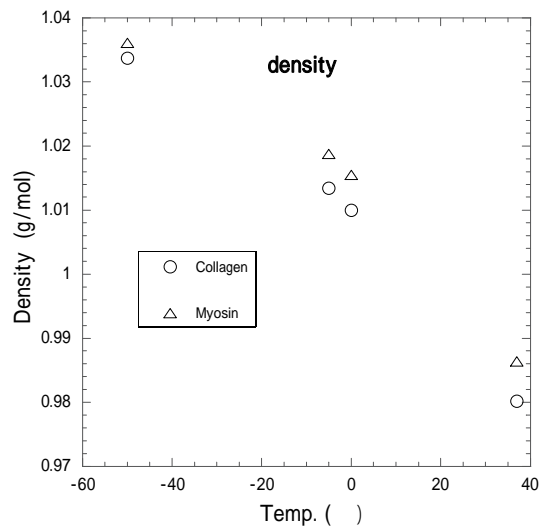


図8 密度の温度依存性

タンパクに配位する水分子数の増加によるものと思われる。上記のシミュレーション結果のみを見ても、たとえば肉などの赤身と脂肪を含む試料を-50程度低温に保持した場合に、脂質を構成するコラーゲンと脂質以外の約60%を占めるミオシンで、低温に対する構造変化の傾向が全く異なるのは、これらのタンパク質を含む生体組織などの凍結保存における大きな問題点と考えられる。

5. 主な発表論文等

- [雑誌論文](計0件)
- [学会発表](計0件)
- [図書](計0件)
- [産業財産権]
- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 雅彦 (YAMADA, Masahiko)
 北海道大学・大学院工学研究院・准教授
 研究者番号: 70230480