

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：44523

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640140

研究課題名(和文) 常温ガラス化保存技術開発のための基礎的研究

研究課題名(英文) Basic study of preservation technologies using normal temperature vitrification

研究代表者

吉田 徹 (YOSHIDA, Toru)

武庫川女子大学短期大学部・食生活学科・教授

研究者番号：00378952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、アルテミアなどの極限環境生物で保存されている特徴的なクリプトビオシスに注目し、生物資源保存のための新規保存技術の開発を目指して行われた。まず試験管レベルのゲルモデル系によるシミュレーションを行って、常温ガラス化のための適正条件を検索した。具体的には、アガロースゲルにトレハロース等の各種糖類を添加したゲルの水分含量と糖類別のガラス化傾向の対応関係を明らかにした。さらに、うずら卵ゲルに対して、トレハロースと乾燥耐性をもったLEAペプチドを添加したところ、LEAペプチド濃度に応じたガラス化促進作用が得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the distinctive features of "cryptobiosis" preserved among extremophiles, such as *Artemia franciscana*, an aquatic arthropod, and investigated the optimal conditions for normal temperature vitrification using gelatinous models. We reported the causal relationship between the amount of water content and the degree of vitrification after adding various kinds of saccharides to agarose-based gelatinous models. We also confirmed that normal temperature vitrification depends on the concentration of LEA (Late Embryogenesis Abundant) peptide and nonreducing disaccharide, trehalose using a quail egg model. We concluded that the precise ratio of LEA peptide to trehalose is important in determining the success of normal temperature vitrification for the preservation of bioresource materials.

研究分野：生物資源保存

キーワード：ガラス化 常温保存 トレハロース LEAペプチド 極限環境生物 アルテミア クリプトビオシス

1. 研究開始当初の背景

昨今、貴重な生物資源をいかに効果的に保存できるかどうかは緊急を要する重要な課題となっている。しかしながら、今日利用されている保存技術のほとんどは専ら凍結保存であり、液体窒素などに直接浸漬させるか、冷媒の冷凍サイクルに基づいた冷蔵庫や冷凍庫に頼っている。このような保存技術はいわゆるオールドサイエンスに属するものであり、根本的な原理は20世紀初頭から大きく変わっていない。既に使用が禁止されたフロンガス問題や、冷凍庫を稼働させるために使われる膨大なエネルギー消費量などを鑑みれば、全く新しい視点から保存効率のよい、なおかつ地球環境に優しいサステナブルな新規技術の開発が急務と考えられる。

生物資源のための保存はその対象が生体であることから、凍結障害を極力抑えられる革新的技術が望まれる。このような保存方法を開発するにあたり、申請者が注目したのが紫外線や電離放射線に耐性を持ち、超低温、強乾燥、高真空など、極めて厳しい環境下でも生育可能な一連の極限環境生物の存在である。広範なストレス耐性を備えた極限環境生物の生体内部はほとんど無水状態であり、代謝活動が停止したクリプトビオシスと呼ばれる状態になっている。本研究室で長年扱ってきた小型の海水生節足動物であるアルテミア (*Artemia franciscana* 以下 *A. franciscana* と略す) は、生育環境が悪化すると、原腸胚期で発生が停止した耐久卵を産出するが、この耐久卵がクリプトビオシスを示すことから、極限環境生物の一群に含められている(図1)。

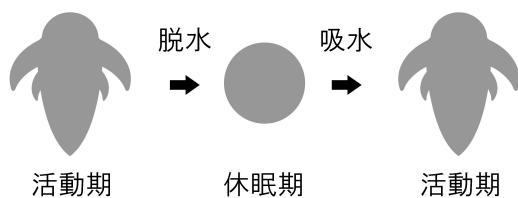


図1. *A. franciscana*における活動期と休眠期の区分。生体の含水量と代謝状態が深く関係している。劣悪環境下で産出される耐久卵がクリプトビオシスの状態にある。出典：発表論文

代表的な極限環境生物であるクマムシやネムリユスリカなどの例から、クリプトビオシスの実現には生体内部の常温ガラス化が深く関与していると考えられている。また、ガラス化には、トレハロースのような非還元性二糖類や、LEA (Late Embryogenesis Abundant) と呼ばれる耐乾性タンパク質が深く関与していることが明らかにされつつある。以上の背景より、極限環境生物のクリプトビオシスで実際に起こっていることを試験管レベルのゲルモデル系で再現することによって、常温ガラス化に必須な成分や、その配合比について

調べ、生物資源保存のために必ずしも凍結保存に頼らない常温ガラス化保存技術の開発に向けた基礎的研究を試みた。

2. 研究の目的

本研究の連携研究者である東京工業大学の櫻井実教授は日本におけるLEAタンパク質研究の第一人者であり、申請者は、LEAタンパク質の機能ユニットからなるLEAペプチドの情報提供を受けた(図2)。そこで、このペプチドを委託合成し、トレハロースなどと共にゲルベースに添加することによって、乾燥前後の状態を評価できるゲルモデル系の構築を目指した。ゲルモデル系の各成分や水分含量を自由に設定操作することにより、安定したガラス化を達成できる種々の糖質やLEAペプチドとその配合比などを調査することが目的である。LEAペプチドに関する機能性ドメインと、その性状モデルについては次の図に示す通りであり、乾燥状態で変性せず、細胞組織の乾燥耐性を著しく高めることが提唱されている。

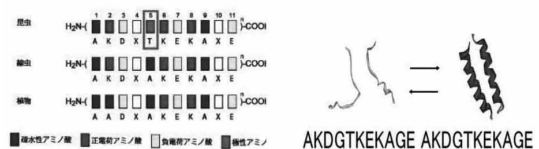


図2. LEAタンパク質の機能性単位である11アミノ酸からなるペプチド配列(左図)と、水和時と乾燥時のLEAペプチドの構造変換モデル図(右図)。出典：連携研究者櫻井実教授

一方、*A. franciscana*の耐性卵は、海水中に水和させることで、原腸胚の状態に停止していた卵発生が再開し、その著しいストレス耐性を急速に失ってしまう。そこで、このようなクリプトビオシス状態が解かれた *A. franciscana* の再水和胚を敢えて用いることによって、凍結保存や乾燥保存による細胞組織レベルの障害程度を評価することが可能になる。本研究では、様々な保存条件前後の再水和胚の孵化率を調べることで、それらの有効性を調べるバイオアッセイを利用した。このような指標により、前述のゲルモデル系によって突き止められたガラス化条件を評価し、生物資源保存のための常温保存技術の開発へと繋げていくことを最終的な目的とする。

3. 研究の方法

アガロースゲルは、1.5%低融点アガロースゲルを用い、複数の糖質と3種のタンパク質、ゼラチン、卵白アルブミン、カゼインをそれぞれ一定濃度で混和し、一定口径のガラスリングで成型した。固化させたゲルは、減圧乾燥器内 ($4 \sim 1 \times 10^2$ Pa) で常温もしくは高

温（100℃）に保ちながら、一定時間の間乾燥させた。その後、一部のゲル片を赤外水分計によって水分測定し、残りのゲル片（5mg）は示差走査熱量測定（DSC）によって熱分析を行った。減圧乾燥させたゲルは、ガラス化判断の必要性に応じて、粘弾性測定や走査型電子顕微鏡（SEM）によるゲル表面の観察も行った。

アガロースゲルに添加した糖質は、単糖類のグルコース、二糖類のスクロース、マルトース、トレハロースを 0.1M から 0.6M までの濃度範囲で添加した。一方、LEA ペプチドを添加する場合のゲルモデル系としては、アガロースベースのゲルから、うずら卵黄及びうずら卵白ゲルへと、本研究期間中に変更を行った。うずら卵黄及びうずら卵白ゲルはアガロースゲルで得られた適正な濃度のトレハロースと、様々な濃度の LEA ペプチドを添加した上で、ガラスリングで固化させ、減圧真空による常温乾燥またはシリカゲルによる常温乾燥を 1 日間もしくは 3 日間行った。常温乾燥後のゲルは DSC によりガラス化の判定を行った。

A. franciscana の再水和胚の孵化率を利用したバイオアッセイでは、乾燥した耐久卵をコントロール実験とし、耐久卵を海水で一定時間水和させたものを再水和胚として用いた。なお、再水和胚は硬い卵殻に覆われており、水や二酸化炭素などは自由に通過するが、多くの不揮発性化合物は遮断されることから、0.5% 次亜塩素酸ナトリウムと 0.5M 水酸化ナトリウムの混合液によって、脱殻処理を行い、0.1% チオ硫酸ナトリウムにより反応を停止させた。このようにして得られた脱殻再水和胚を対象として、ゲルモデル系で有効であった常温ガラス化成分の添加を試みた。バイオアッセイを用いた有効性の確認は、コントロール区画と比べて凍結や乾燥後の孵化率変化によって評価を行った。

4. 研究成果

本研究において構築したゲルモデル系を用い、様々な減圧乾燥条件下で乾燥させ、ゲル中の水分含量と再水和後のゲル状態を確認した。その結果、減圧乾燥後のゲル中の水分含量はトレハロース濃度に応じて、有意に減少し、ある一定以下の水分含量では、ほぼすべてガラス化していた。次に、DSC を用いて、アガロースゲルの水分含量とガラス転移温度をプロットしたところ、水分含量が低下するほど、ガラス転移温度が高くなる傾向が認められた。また、SEM による観察では、ガラス化したゲル表面は極めて平滑な状態（ガラス状態）であることが確認できた。以上より、アガロースゲルモデル系での必要なガラス化達成条件を把握した（投稿準備中）。

次に、アガロースゲルに添加する糖として、グルコース、スクロース、マルトース、トレハロースの各添加糖の違いによるガラス化傾向の違いについて調べたところ、単糖類のグルコースの添加ではガラス化への寄与がなかったが、二糖類の添加では、いずれもガラス化傾向が示され、特にトレハロースで顕著なガラス化の傾向が認められた（投稿準備中）。以上より、アガロースゲルモデルにおいて、ガラス化の達成に必要な水分含量限界と、トレハロースのガラス化への顕著な寄与が明らかになった。トレハロースのこうした特異な役割について、アガロースゲル中のトレハロースが水分子と置換し、高濃度のトレハロースがガラス状態の形成に貢献しているものと考えられる。

最後に、乾燥耐性を備えた機能性ペプチド LEA によるガラス化効果を調べるため、うずら卵由来のゲルモデルを用いて、トレハロースと LEA ペプチドを様々な配合比で添加後、常温減圧乾燥または常温シリカゲル送風乾燥を行い、DSC による熱分析を行った。その結果、LEA ペプチドを添加したうずら卵黄、うずら卵白のいずれの場合においても、融解の吸熱量（エンタルピー）は大幅に減少することが認められた。特に、卵白においては、LEA ペプチドを添加することによってガラス化傾向が認められた（投稿準備中）。LEA ペプチドによるガラス化促進機能については、LEA タンパク質が水溶液中ではランダムコイルをとり、脱水されて乾燥すると α -ヘリカル構造をとる独特の性状により、分子シールド効果を発揮し、ガラス状態の実現に寄与することが想定されている。

本研究の総括として、ゲルモデル系での添加二糖類、特にトレハロースと、乾燥耐性タンパク質の機能ドメインである LEA ペプチドによるガラス化達成のための条件を明らかにすることが出来た。トレハロースや LEA ペプチドを添加したゲルモデルでの詳しい常温ガラス化条件の調査はあまり例がなく、新規性があると考えられる。次の段階として、これらの知見を生物資源保存へと応用していくため、*A. franciscana* の常温ガラス化保存技術の実験へと進めるべく、脱殻再水和胚の孵化率を指標としたバイオアッセイを繰り返し実施したが、主に膜透過性の問題により当初の目標には到達できなかった。

3 年間のごく限られた研究期間では、ゲルモデル系の構築実験に予想以上の時間を取られたことや、LEA ペプチドの委託合成費用が律速となり、*A. franciscana* の常温ガラス化保存の応用面の研究では明確な結論に至らなかった。しかしながら、脱殻再水和胚へ幾つかの膜透過改善剤を共添加することによって、トレハロースや LEA ペプチドなどの機能性分子を添加できる見込みが得られ、常

温ガラス化保存のための準備が整えられたことは非常に大きな成果であると考えている。今後は、これまで当研究室で長く扱ってきた *A. franciscana* の脱殻再水和胚を用いて、適正なガラス化条件を精力的に検討していき、生物資源保存研究の実用化を目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

吉田徹, アルテミアのストレス耐性とバイオアッセイ法, 日本冷凍空調学会誌「冷凍」, 査読有, Vol.92, No.1077, 2017. (印刷中)

〔学会発表〕(計 2 件)

吉田徹, 阪上綾, 福尾恵介, 凍結脱水や減圧乾燥によるアガロースゲルのガラス化条件の検討, 第 70 回日本栄養食糧学会, 2016 年 5 月 13 日~15 日, 神戸ポートピアホテル(兵庫・神戸市)

阪上綾, 矢野めぐむ, 横路三有紀, 福尾恵介, 吉田徹, 各種糖添加アガロースゲルにおけるガラス化条件の熱分析, 第 71 回日本栄養食糧学会, 2017 年 5 月 19 日~21 日, 沖縄コンベンションセンター(沖縄・那覇市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 徹 (YOSHIDA, Toru)
武庫川女子大学短期大学部・食生活学科・教授
研究者番号: 00378952

(2)研究分担者

福尾 恵介 (FUKUO, Keisuke)
武庫川女子大学・生活環境学部・教授
研究者番号: 40156758

(3)連携研究者

櫻井 実 (SAKURAI, Minoru)
東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・教授
研究者番号: 50162342

(4)研究協力者

阪上 綾 (SAKAGAMI, Aya)
矢野 めぐむ (YANO, Megumu)
横路 三有紀 (Yokoro, Miyuki)