

タンパク質水溶液の凍結乾燥

今村 維克

本話の趣旨である凍結乾燥はfreeze-dryとかlyophilizationとも表記されるが、おそらく“生物工学”という業界に身を置いていれば、必ずや一度は行う、または行ったことがある操作の一つであろう。何のために？という、もちろん、“乾燥”と“濃縮”をするためであるが、“乾燥”することは“安定”にすることでもある。溶媒である水はさまざまな物質を均一に分散してくれる媒質であるとともに、不安定な物質に物理的・化学的変化（劣化）を許す場でもある。乾燥して不安定物質を固化してやれば、劣化に関わる物質（分子）の動きも制限され長期間の保存が可能となる。しかし、タンパク質などのように複雑な構造体にとっては、しばしば（凍結）乾燥操作自体が劣化の原因となる。したがって、物理化学的に不安定な物質のコンフォメーションを脱溶媒時にいかに防ぐかが“安定化”手法としての凍結乾燥操作のポイントとなる。筆者は長年、タンパク質を安定化剤である糖とともに凍結乾燥することによってタンパク質を安定化する技術と関わってきた。本稿では、この関わりの中で学んだことを述べる。

どんな操作か？

設備とすれば、市販の凍結乾燥器と真空ポンプを真空チューブでつなぎ合わせるだけで出来上がる。凍結乾燥器には凍結試料が入った容器を置く棚の温度を制御できるものもあるが、多くの場合、真空配管から伸びた枝に凍結試料（が入った容器）をぶら下げるタイプが多い。いずれのタイプの凍結乾燥器も、昇華した水蒸気を捕捉する蒸気トラップが装備されているはずで、凍結試料の示す蒸気圧とこの蒸気トラップの蒸気圧〔トラップ温度（ $\sim -50^{\circ}\text{C}$ ）における飽和蒸気圧〕が乾燥のドライビングフォースになる。真空ポンプはさまざまな排気速度のものが市販されているが、凍結乾燥器内を10 Paくらいまで減圧できるものであれば十分である。100 mL程度の糖水溶液（1～10 wt%）であれば、丸一日ほどで残留含水率を0.01 g/g-dry matter程度まで乾燥することができる。

凍結乾燥でまず行うことは凍結である。凍結は水溶液を減圧するだけで自動的に生じるが、突沸によるサン

ルのロスを防ぐためにあらかじめ凍結することが多い（予備凍結）。この予備凍結は冷凍庫で凍結する場合もあれば、ディープフリーザーやドライアイス/エタノール、場合によっては液体窒素で凍結する場合もある^A。実はこの凍結の仕方により乾燥速度が異なる（図1）。冷凍庫などで比較的緩やかに凍結した方が、乾燥は軽快に進行する。タンパク質の安定化作用についても（諸説あるが）緩やかに凍結する方が若干高くなるようである。凍結速度（温度）の影響は出来上がった試料の劈開性にも決定的な影響を及ぼす。冷凍庫のように凍結温度が高い（ -20°C ）と応力を掛けるとパラパラに崩壊し、液体窒素で瞬間的に凍結した場合は連続的な構造体となる。静電気の帯び方もだいぶ異なるので、機会があれば先生の目を盗んで色々試してみると面白いと思う。

次にいよいよ乾燥であるが、これは、二段階で進行する。第一段階（一次乾燥）では凍結水が最初に昇華・乾燥する。このときの材料温度（乾燥庫・棚の温度ではな

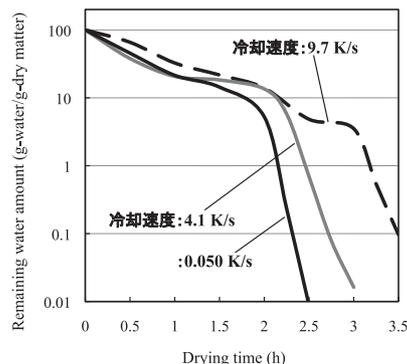


図1. 10 mg/mL sucrose 水溶液（500 μL ）を凍結乾燥したときの乾燥過程。水溶液は (i) 液体窒素中（ -197°C 、冷却速度：9.7 K/s）、(ii) ディープフリーザー内（ -80°C 、冷却速度：4.1 K/s）、あるいは (iii) 冷凍庫内（ -20°C 、冷却速度：0.050 K/s）で凍結し、10 Pa で凍結乾燥した。

^A 凍結乾燥する際にもう一つ注意する点は十分に凍結させることである。自己凍結の場合や通常の冷凍庫（ $\sim -20^{\circ}\text{C}$ ）で糖類を含む溶液を予備凍結すると部分的に流動性を持った領域が残留しており、凍結乾燥開始とともに沸騰、そして、発泡して、早々に不均一な乾燥試料となってしまう。ディープフリーザーでさらに冷却するか、液体窒素にくぐらせるなどで、駄目押しすることをお薦めする。

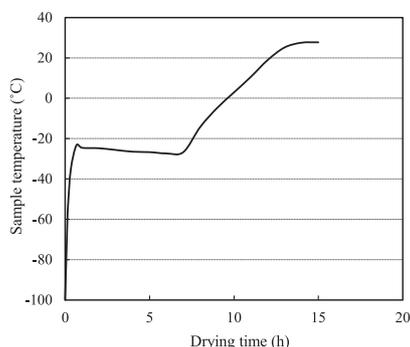


図2. 糖 (sucrose) 水溶液の凍結乾燥時における試料温度の測定結果 (糖濃度: 100 mg/mL; 液量: 5.0 mL). * 溶液は液体窒素中で凍結し, 約 10 Pa で凍結乾燥した.

い) はたいてい -30°C くらい (図2)¹⁾まで低下している (加熱により乾燥を加速することはできるが, その分, 昇華に伴う奪熱が大きくなり思ったほど試料温度は上昇しない). そして, 凍結水の乾燥が終わると結合水の脱離が始まるが, この時間帯 (図2, 7 h~) が一番“危険”である. 昇華速度が低下するため, 試料温度が急激に室温に近づく. 試料の表面付近では, 一次乾燥段階でもある程度は結合水の脱離も生じているが, 底部にはたっぶり結合水を孕んでいるため, その領域のガラス転移温度は低く, 試料温度に容易に追い抜かれてしまう. その結果, 試料が部分的 (底部) に水飴状に変化してしまう. 水飴化したサンプルはとたんに乾きにくくなるうえ, 何より容器壁面にへばりついてハンドリング性が低下する. また, 水飴化はマトリクスの流動化であり, これはタンパク質の高次構造変化を引き起こす²⁾. このような危険を極力低減するため, 試料は (ナス) フラスコ表面に薄く膜状に凍結することも一つの方法である. 含水状態での (つまり二次乾燥開始時点での) ガラス転移温度を上げるような物質 (多糖など) の添加も有効である.

どんな材料か?

こんな (図3) 材料である. 材料中には数十マイクロオーダーの“空孔が詰まって”おり, それら空孔を分け隔てる $1\ \mu\text{m}$ 程度の厚みの壁が糖からなる固体マトリクスである (タンパク質が含まれていても構造には何ら変化はない). このSEM画像は筆者自身が測定したものだが, 我ながら良く撮れたと思っている. 少糖からなる凍結乾燥試料は吸湿性が尋常ではなく, 乾燥チャンバーからグローブバック (乾燥雰囲気) への輸送時や白金蒸着装置にサンプル (ステージごと) を置く際など, ほんの一瞬の間隙について吸湿する. その結果, 試料破断部の直線的なフォームは一転, 曲線の集合体になってしまう

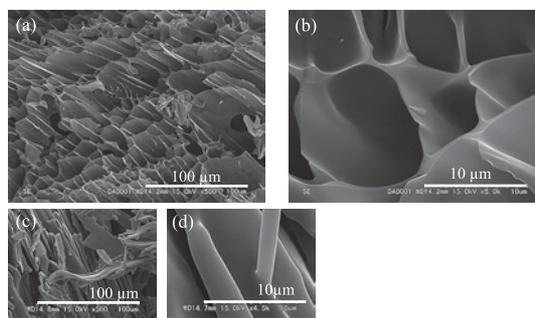


図3. 糖水溶液の凍結乾燥試料のSEM画像. 100 mg/mLの sucrose 水溶液 (5.0 mL) を液体窒素により凍結し, 10 Pa で凍結乾燥した. 残留水分量はおよそ 0.01 g-water/g-dry matter であった (a, b). 参考までにSEM試料の調製時に吸湿してしまった試料の画像も示す (c, d).

(図3c, d). ちなみに, 図3a, bは真冬の深夜 (蒸気圧がきわめて低い) に極寒と戦いながら, 試料調製したものである.

なぜ, 糖によってタンパク質が安定化されるか?

1960年代後半に, myosin ATPaseやcatalaseの水溶液にスクロースを添加して凍結乾燥すると酵素活性が高度に維持されることから³⁾, 糖からなるアモルファス固体 (マトリクス) がタンパク質を乾燥操作から守ることが分かった. さらに1980年頃には, きわめて高度な乾燥耐性を持つ微生物は乾燥状態で多量の糖類 (トレハロース) を蓄積させることが知られるようになった⁴⁾. これらの研究に端を発し, 糖, とりわけ糖のアモルファスマトリクスがどのようにしてタンパク質を安定化するか盛んに研究された⁵⁾. その結果, 三つの安定化機構が提案された. まず一つ目は, ガラス状態理論 (glassy state theory) と呼ばれるものである. 糖の水溶液を適当な条件で脱水していくと, ある含水率以下では, 流動性を完全に失ったガラス固体となる. このとき, 構造を構成する分子の運動性が極端に制限されており, その内部に埋め込まれたタンパク質の運動性もきわめて小さくなる. これによりタンパク質の変性・失活を伴う構造変化の進行が停止するものと考えられる⁶⁾. 二つ目は, 水 (水素結合) 置換理論 (water substitution theory) である. これは水溶液中でタンパク質は水和水との間に水素結合を形成し, これがタンパク質の構造形成に寄与しているが, 糖とともに乾燥した場合には水和水に代わって糖の水酸基がタンパク質と水素結合を形成するというものである⁷⁾. その結果, タンパク質の構造を水溶液中と近い状態に維持できると考えられる. 三つ目は, M. I. T.のKlibanovらが提案した理論 (partition 効果^{B)})⁸⁾である.

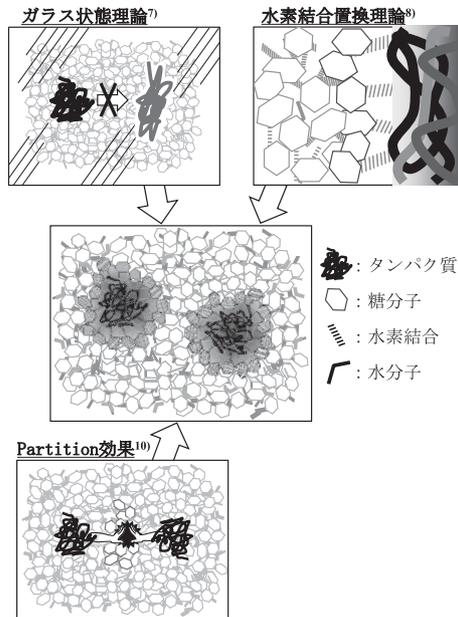


図4. 糖による(凍結)乾燥時のタンパク質安定化機構に関する三つの仮説⁶⁻⁸⁾とそれらの折衷^{9,10)}

まず、乾燥などによるタンパク質の構造変化は可逆的であるが、変性したタンパク質分子は凝集しやすく、一度凝集が起こればもはや元の構造に戻ることはない。ここで、乾燥する際に糖を添加しておく、糖のアモルファスマトリクスがタンパク質分子どうしを分け隔てるので、変性の不可逆性が避けられるはずである。

これら三つの理論は着眼点も含めてまったく別物であるが、いずれも実験的に検証されており、どれも正解と認めざるを得ない。そこで、それら三つの説明が同時に成立する理屈を考えてみた(図4)。まず、タンパク質の分子運動およびその物理化学的変化が“glassy state”の糖分子と同じタイムスケールまで遅延されるには、タンパク質とそれを囲むマトリクス界面をつなぐ相互作用が不可欠であり、“water substitution”は糖-タンパク質間の水素結合そのものである。また、糖のアモルファスマトリクス内でタンパク質分子が個々に離れた空間に仕切られる(partitioning)ためには糖とタンパク質の間に水素結合のような相互作用が不可欠であろう。この解釈はいくつかの論文^{9,10)}の中に滑り込ませており、現在、それが浸透し、一般的な解釈となるのを待っているところである。

^B Partition 効果とは、筆者が便宜上つけた呼称で、現時点では一般的なものではない。

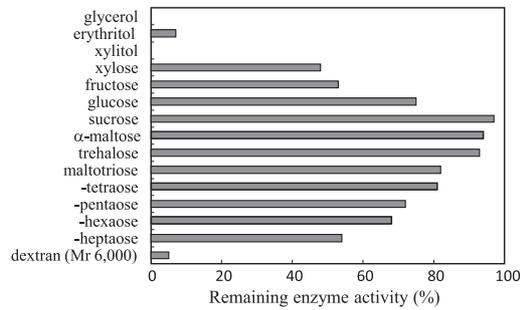


図5. 各種糖(10 mg/mL)共存下で凍結乾燥したときの酵素(alkaline phosphatase from calf intestine)の残存酵素活性(凍結操作前の酵素活性に対する相対値). 酵素濃度は72 ng/mL.

どんな安定化剤(糖類)を用いるべきか?

安定化機構から考えると安定化剤としては、「アモルファス状態を形成しやすい」、そして、「水素結合できる官能基(水酸基)を複数有している」ことが必要であり、このような特徴は正に糖が満たしている。しかし、糖であればどんなものでも良いわけではない。これはすでに多くの研究者が認めており、凍結乾燥におけるタンパク質の安定化剤には、sucroseかtrehaloseあたりが最適であると考えられている(図5)。糖分子はサイズが小さいほどタンパク質分子との相互作用が形成されやすい(サイズの大きな糖は立体障害により水素結合の置換度が低くなるようである)。しかし、糖の分子サイズが単糖クラスになるとガラス転移温度が乾燥中の試料の温度域より低くなり、乾燥時(特に二次乾燥時)に水飴化および結晶化が生じる¹¹⁻¹³⁾。その結果、糖による安定化作用が消失し、場合によっては糖を添加しない場合より変性失活が促進されることがある。

以上述べてきたことからすれば、タンパク質は二糖とともに凍結乾燥すれば万事OKと感じられるが、実はいくら二糖を加えても凍結乾燥後にはほとんど変性してしまふタンパク質もある。何が違うのか?凍結に対する感受性が違うのである。そう、凍結乾燥では乾燥の前に凍結という操作が必ず存在し、この凍結時にタンパク質は溶質(タンパク質)の濃縮(凝集)、pHシフト(酸性・塩基性物質の濃縮)、氷晶への吸着など複数の変性ストレスに曝される¹⁴⁻¹⁷⁾。少なくないタンパク質が凍結に伴う変性失活を示すのである。このタンパク質の凍結変性を防ぐための安定化剤も数多く知られている。グリセロールがもっともよく知られたものであるが、これは凍結(結晶化)自体を起こらなくする(タンパク質分子の運動性も抑制されるため変性失活も起こらなくなる)というものである。他には糖を含む種々の物質が凍結時の

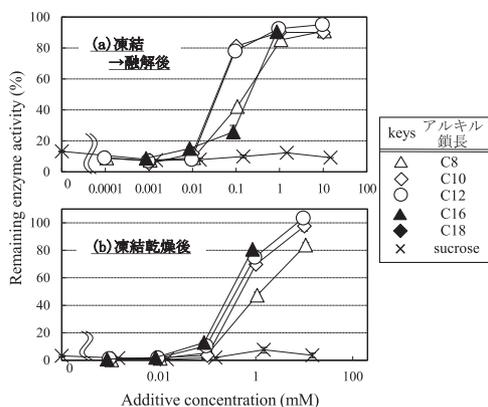


図6. 各種糖界面活性剤共存下における(a)凍結(融解)後および(b)凍結乾燥後の残存酵素活性. 酵素: serine acetyltransferase (2.0 μg/mL, from *Escherichia coli*), 糖界面活性剤: sucrose mono-ester.

安定化作用を有することが知られており, そのメカニズムとしては選択的水和^{18,19,C}により説明されることが多い^{16,20}. しかし, その効果は決して高くない.

では, どうするのか? 現時点で考えられる方法は, 二つある. 一つは単に凍結時においても乾燥時においても高度のタンパク質を安定化してくれる物質を見つけることである. これに該当するのが一部のノニオン性界面活性剤である^{9,21-23}(イオン性界面活性剤はご存知の通り, タンパク質を変性させる). 特に糖エステル(sucrose monopalmitateなど)は少量(<100 μM)の添加で凍結時に高度にタンパク質の変性を抑制することができる(図6a)⁹. ただし, 乾燥時にはその100倍程度(〜10 mM)添加しないと安定化作用を示さない(図6b)⁹. また, タンパク質自身も50 μg/mL程度の添加で, 凍結変性に対して安定化作用を示すことがわかっており, 脱溶媒時に比較的変性しにくいタンパク質であれば, 凍結乾燥時の安定化剤として有効である. もう一つの方法は, 凍結時に安定化作用を示す少量の安定化剤と脱溶媒時に安定化作用を示す著量の糖を組み合わせることである(図7)^{9,10,24}. 糖エステルやタンパク質が凍結時にタンパク質をどのように安定化しているのかは明らかでない^D

^C 選択的水和理論: タンパク質の水和構造が維持される(溶質の間に直接的な相互作用は形成しない)ことで, タンパク質の変性状態を不安定化する^{17,18}. 溶液系における各種溶質のタンパク質安定化効果はこの理論によって説明されている.

^D 一般に糖や塩, アミノ酸など完全に親水性の溶質によるタンパク質安定化機構は, 本文中で述べた通り, 選択的水和によって説明されているが, 部分的に疎水性領域を持つ糖エステルやタンパク質が少量でかつ高度に安定化する理由は明らかになっていない. Izutsuら²³は選択的水和と異なり, 糖エステルがタンパク質と直接相互作用している可能性を指摘している.

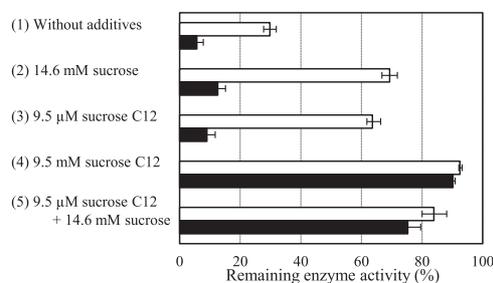


図7. 糖と少量の糖エステルを添加したときの凍結融解後(□)および凍結乾燥後(■)の酵素(10.7 ng/mL ascorbic oxidase, from *cucurbita* sp.)の残存活性. (1)酵素のみ, (2)14.6 mM sucroseのみ添加, (3)9.5 μM sucrose C12 (dodecanoyl sucrose)のみを添加, (4)9.5 mM sucrose C12のみ添加, (5)9.5 μM sucrose C12と14.6 mM sucroseを添加.

が, それら二種類の物質が共存することで, 互いの効果を希釈しあうことはない^{9,10,24}. また, 得られた試料の保存安定性(真空中, 25°C)も十分高いことが分かっている. この糖/糖界面活性剤(orタンパク質)複合系による凍結乾燥時のタンパク質安定化技術は論文として報告もされており何ら特許性があるわけでもないので, タンパク質の凍結乾燥で困ったら是非(気軽に)利用してほしい.

最後に

ここでは不安定物質としてタンパク質を取り上げたが, 油滴(O/Wエマルション)やナノ粒子(懸濁液)も乾燥固化(あるいは粉末化)する場合がある. それらの場合にも(糖とともに)凍結乾燥することは有効であり, まったくもって凍結乾燥は汎用な操作であると言える. その一方で, この研究においては, その不安定物質を用いたアッセイが主役であって, 凍結乾燥の条件やその影響は論文にもほとんど触れられない. 食品や医薬品分野の一部の領域や分離(乾燥)工学分野の研究でなければ, 『保存に支障がなければ良いんじゃない?』となりがちである. そのため, 凍結乾燥の流儀は各研究室によって独自の進化を遂げてきた感がある. 本稿の中にも, localな流儀について記述した部分もあるが, 何らかの参考になれば幸いである.

文献

- 1) Imamura, K. *et al.*: *J. Pharm. Sci.*, **91**, 2175 (2002).
- 2) Imamura, K. *et al.*: *J. Pharm. Sci.*, **98**, 3088 (2009).
- 3) Hanafusa, N.: *Freezing and Drying of Microorganisms*, p. 117, University Park Press, Baltimore (1969).
- 4) Crowe, J. H. and Clegg, J. S.: *Dry Biological Membranes*, Academic Press, New York (1978).
- 5) Crowe, J. H. *et al.*: *Biochem. J.*, **242**, 1 (1987).

- 6) Franks, F. *et al.*: *BioPharm*, **4**, 38 (1991).
- 7) Carpenter, J. F, *et al.*: Formulation and Delivery of Proteins and Peptides, ACS Symposium Series, vol. 567: pp. 134–147 (1994).
- 8) Liu, R. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 177 (1991)
- 9) Imamura, K. *et al.*: *J. Pharm. Sci.*, **103**, 1628 (2014).
- 10) Shimizu, T. *et al.*: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **81**, 687 (2017).
- 11) Prestrelski, S. J. *et al.*: *Pharm. Res.*, **12**, 1250 (1995).
- 12) Allison, S. D. *et al.*: *J. Pharm. Sci.*, **89**,199 (2000).
- 13) Imamura, K. *et al.*: *J. Pharm. Sci.*, **92**, 266 (2003).
- 14) Soliman, F. S. and van den Berg, L.: *Cryobiol.*, **8**, 73 (1971).
- 15) Hately, R. H. M. and Franks, F.: *FEBS Lett.*, **257**, 171 (1989).
- 16) Carpenter, J. F. and Crowe, J. H.: *Cryobiol.*, **25**, 244 (1988).
- 17) Privalov, P. L.: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **25**, 281 (1990).
- 18) Arakawa, T. and Timasheff, S. N.: *Biochem.*, **21**, 6536 (1982).
- 19) Timasheff, S. N.: “Biophysics of Water,” Wiley, New York, pp. 70–72 (1982).
- 20) Crowe, J. H. *et al.*: *Cryobiol.*, **27**, 219 (1990).
- 21) Brewster, M. E.: *Pharm. Res.*, **8**, 792 (1991).
- 22) Izutsu, K. *et al.*: *Int. J. Pharm.*, **90**, 187 (1993).
- 23) Izutsu, K. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 1102 (1994).
- 24) Carpenter, J. F. *et al.*: *Arch. Biochem. Biophys.*, **303**, 456 (1993).