



< 第 53 回 >

不凍タンパク質の開発とその応用展開に向けて ～食品・医療・ものづくりへの貢献～

株式会社ニチレイ 技術戦略企画部 石井 寛崇氏に聞く

第 16 回国際ナノテクノロジー総合展（nano tech 2017）の最終日に行われた nano tech 大賞の表彰式において、ライフナノテクノロジー賞を受賞したのは株式会社ニチレイ（以下ニチレイ）の不凍タンパク質の展示であった。受賞理由は「寒冷地に生息する魚類から発見した不凍タンパク質を冷凍食品に利用する研究を続けてきた。このタンパク質を医療・土木など食品以外の様々な産業に役立てようとしている活動を賞す。」であった。

この度、ニチレイで不凍タンパク質の開発を担当している石井 寛崇（いしいひろたか）氏を同社 技術戦略企画部 基盤研究グループに尋ね、ユニークな特徴と秘められた多くの可能性を持つ不凍タンパク質とその応用について伺った。



ニチレイ技術戦略企画部 石井 寛崇氏



1. ニチレイの製氷の歴史と不凍タンパク質

ニチレイは表 1 の経歴が示すように、国内の製氷事業の元祖を源流とする氷のスペシャリストであり、その始まりも、やけどや熱病などの治療用や食品保存などライフに直接関わる需要に応ずるものであった。第二次世界大戦中の国の統制会社を経て、戦後、民間会社 日本冷蔵株式会社として再出発した。冷凍事業を中心とした多角的経営を行うことを基本方針として、水産・冷蔵・製氷の 3 事業でのスタートであった。1952 年に製造・販売を開始した調理冷凍食品は、まだ家庭に電気冷蔵庫が普及していない時代で、学校給食が主な販路となった。肉食が盛んになった 1956 年には畜産事業を開始した。オイルショック後の 1985 年に社名をニチレイに変更した。当時は CI（コーポレートアイデンティティ）がブームになっており、事業内容の中心も水産会社から冷凍食品の会社に移行しつつあったことから、柔らかいカタカナ

の名前とし、商品ブランド名でもあったニチレイに決定し、企業イメージを一新して新たなスタートを切った。

1980 年代には社内キャンペーンによる提案の中から、アセロラ事業が生まれ、またバイオサイエンス事業も始まっている。時代の変化に即した事業展開を図り、2005 年には持株会社体制に移行し、ニチレイフーズ（加工食品）、ニチレイフレッシュ（水産・畜産）、ニチレイロジグループ（低温物流）、ニチレイバイオサイエンス（バイオサイエンス）に分社化して今日に至っている。

不凍タンパク質との繋がりとは、2002 年に、国立研究開発法人産業技術総合研究所（産総研）で進めてきた不凍タンパク質の研究を食品への応用を進める目的で開発をスタートしている。当初は、食品分野を対象として応用を図ってきたが、製造コストや匂い除去の問題などで、製品化に繋がらない時期が続いた。しかし、近年、不凍タンパク質の応用分野が食品だけでなく、バイオ・医療、さらに工業分野への適用の可能性が見えてきており、開発担当部署も 3 年前から、ニチレイフーズ内から持株会社内へ移管されている。色々な分野の多くの研究開発現

場からの問い合わせも増えており、不凍タンパク質の実用化に向けた動きが期待される。



2. 不凍タンパク質 (AFP) とは

2.1 研究の経緯

不凍タンパク質 (AFP: Antifreeze Protein) は、地球上の氷に覆われるような陸や海に棲む生物の体内に存在し、その身体が凍結するような低温に耐えて生存するために備わったものである。1969年に米国イリノイ大学 Arthur DeVries 教授により南極海に棲む魚の血清から発見されて以来学術的に関心がもたれ、魚以外にも昆虫、植物、菌類などから発見されている。

国内では国立研究開発法人 産業技術総合研究所 北海道センターの津田 栄氏が 1990 年代から AFP の研究を行い、北海道近海の魚にも AFP を蓄えているものがあることを発見した。以前は血液の中に存在し、微量しか採取でき

ないものと考えられていたが、魚肉の部分にも存在することが分かり、量の確保が可能となった。2002 年、食品への応用に関して産総研と共同研究を開始し、ニチレイでの AFP の開発が始まった。以来ニチレイは AFP を大量に採取する技術に取り組み、共同研究により AFP の抽出・精製法の確立・製品化に成功して、2016 年 9 月に試験研究用の製品の発売を開始した [1]。

2.2 AFP が発揮する機能

AFP は次のようなユニークな機能を持つタンパク質である。

- (1) 氷結晶成長抑制機能：氷の結晶に結合して氷が大きな塊になるのを阻止する機能で、凍結物の品質を守る。
- (2) 細胞保護機能：細胞膜に結合して膜を安定化し細胞の生存時間を延長する。

表 2 には、これらの機能が応用されると期待される分野の例を示した。

表 1 ニチレイの事業展開の経緯

年次	出来事
1869 年	中川嘉兵衛が五稜郭において天然氷を採氷し販売。(日本の製氷業の始まり)
1879 年	米国人による「ジャパン・アイス・カンパニー」設立。(機械製氷の始まり)
1884 年	ニチレイの源流となる東京製氷株式会社が設立され、6 トン/日を生産。
1897 年	中川嘉兵衛が天然氷を止めて 50 トン/日の機械製氷株式会社を創設。
1907 年	東京製氷株式会社と機械製氷株式会社が合併して日本製氷株式会社と命名。
1942 年	第二次世界大戦中、経済統制が行われ、水産統制令に基づいて帝国水産統制株式会社 (ニチレイの前身) が設立。
1945 年	終戦後、水産統制令が廃止され、民間会社 日本冷蔵株式会社として再出発。
1952 年	調理冷凍食品の開発・販売を開始。以後、各地に大型冷蔵倉庫を配置し食品流通網を整備。
1964 年	東京オリンピックに食材提供。
1994 年	電子レンジ対応の冷凍コロッケの開発。
2002 年	国立研究開発法人産業技術総合研究所(産総研)で進めてきた不凍タンパク質の研究を食品への応用を進める目的で開発を開始。
2005 年	持株会社体制へ移行し、ニチレイフーズ、ニチレイフレッシュ、ニチレイロジグループ、ニチレイバイオサイエンスを分社化。

表 2 不凍タンパク質に期待する応用分野

分野	活用機能	商品例
食品分野	氷結晶再結晶化抑制	アイスクリーム、冷凍食品
食品・工業分野	氷結晶成長抑制	冷凍食品、フリーズドライ食品、多孔体
工業分野	溶質の分散	機能性水
医療分野	非冷凍下で細胞保存	細胞保存液

以下に（１）の水結晶成長抑制機能に関して説明する。上記（２）の細胞保護機能は氷の出来ない融点より高い温度での事象であり、AFP の新たに見出された応用分野であるので、３．４節で詳述する。

2.3 AFP の機能発現メカニズムとその種類

（１）AFP による氷結晶成長抑制の現象

通常の氷は凍結速度に応じて氷結晶の大きさが変化し、凍結速度が遅いと、氷結晶の数が少なく、個々の結晶が大きく成長するが（図 1 左上）、AFP を含む水を凍らせた場合には、AFP が氷結晶に結合してその成長を阻止し、２個の六角錘を底辺同士を結合したバイピラミダルな形状の微細氷晶を作る（図 1 右上）。氷晶同士の結合も防がれ、凍結速度にほとんど関係なく凍結物の品質が守られる。現在生鮮食品の冷凍保存には低い温度で急速凍結を行っているが、もし、不凍タンパク質が利用できれば、急速冷凍不要の省エネ凍結技術の創出になる。まだ解決すべき技術的壁もあるが、期待される分野である。

バイピラミダルな形状形成のメカニズムは次のように説明される。まず氷の結晶の核は六角柱の形で成長する。AFP はその側面即ちプリズム面に結合し、上下の面には結合しない。そこで、氷の結晶は側面方向への成長が抑えられ、上下方向だけに成長する。その結果が、図 1 に模式図で示すように、二つの六角錐が底辺を結合した形

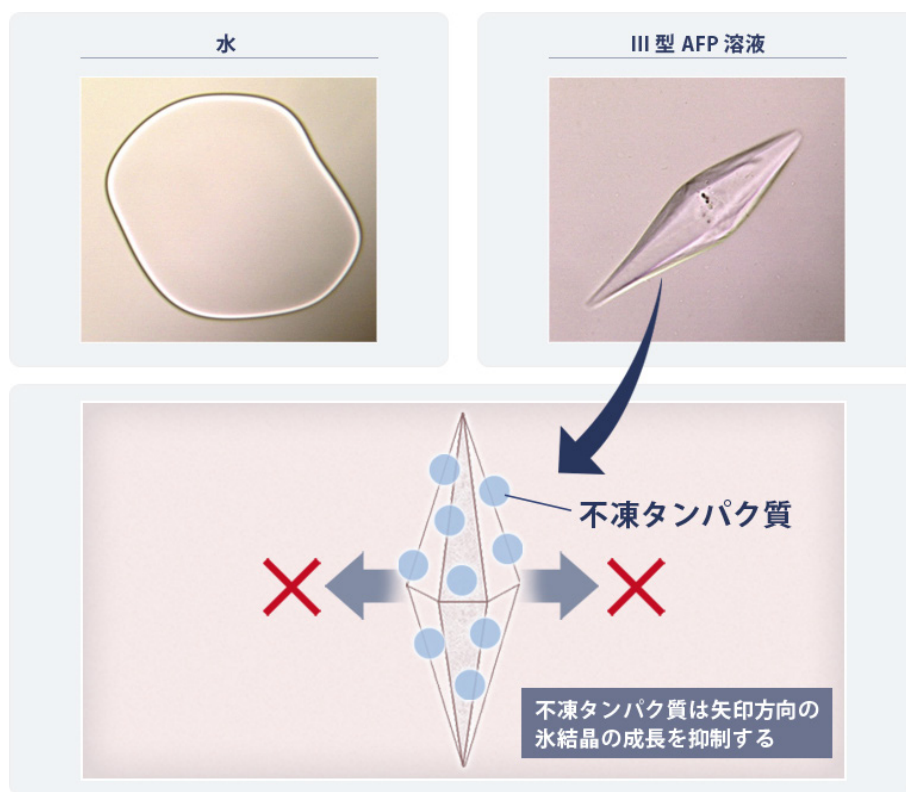
状、即ちバイピラミダルな形状をとると共に、結晶同士が結び付いて大きな塊になることが抑制される。従って、不凍タンパク質を添加した水を凍らせると、バイピラミダルな細かい結晶の集合体となり、氷は大きな塊になることはない [2][3]。

なお、AFP による氷結晶成長制御の様態についての研究はさらに続いており、2017 年 2 月 16 日に産総研から、「I 型 AFP に相当する構造を持った魚から得た AFP で、水への添加量が少ない場合は上に説明したのと同様に氷結晶のプリズム面だけに付着するが、添加量を多くしていくと、AFP が氷結晶の上下の面をも蔽い、結果としてバイピラミダル形状の角がとれて小型化し、最終的には小さなレモンの形状になることが観測された」と報告されている [4][5]。

（２）AFP の種類と特徴

なお、AFP は、魚や昆虫、植物により構造が異なり、魚でも種類によって構造が異なり、特性に差がある。図 2 に現在把握している魚類の種類に由来する主な AFP とその特徴を示す。

図に示すように、AFP（AFGP も含んだ総称）はアラニン（Ala）及びスレオニン（Thr）などのアミノ酸で構成されるが、その配列の構造や、糖鎖、メチル基や OH 基などの側鎖の接続状況が、魚の種類により大きく異なる。しかし、これら AFP はいずれも氷に結合して氷結晶の成



※画像、図は当社で作成

図 1 AFP による氷の成長の抑制

長を抑制する効果がある。不凍タンパク質以外ではこうした機能の発表はこれまで見られない。氷と AFP の結合は、OH 基やメチル基が関係しているという見方があるが、まだ十分な説明はなされていない。

(3) AFP の熱ヒステリシス活性

----- 氷結晶成長抑制効果の指標

氷結晶成長抑制効果の指標として、AFP 添加で起こる

氷の凝固点と融点が異なる現象、即ち、熱ヒステリシス現象が使われる。通常の水は凝固点と融点の温度は同一である。しかし AFP を添加した場合、融点は変わらないが、凝固点の温度は低下する。凝固点と融点の間の温度帯は水と氷が共存する領域で、この温度帯の大きさは、AFP の氷結晶成長抑制機能の強さ、即ち、活性を表すので熱ヒステリシス活性と表記している。数値が大きいほど氷結晶成長抑制効果大きい。具体的値は表 3 に記載している。

不凍タンパク質の種類	魚の種類	アミノ酸配列の特徴	3次元構造
不凍糖タンパク質(AFGP) Mw= 2,600-33,000	Emerald Rockcod  ノトセニア科、タラ科	2糖で修飾されたアラニン-アラニン-スレオニンの繰り返し。	未決定 ポリプロリンIIヘリックス構造が予測されている
I 型 AFP Mw = 3,300-4,500	Winter Flounder  カレイ科、カジカ科	Thr-X ₁₀ (X は主に Ala) の繰り返し単位で構成される。	 αヘリックス構造と呼ぶ
II 型 AFP Mw= 14,000-24,000	Atlantic Herring  ニシン科、キュウリウオ科、ケムシカジカ科	Ca ²⁺ 依存型レクチンの糖鎖認識ドメインとの相同性が高い。	 S-S 結合で安定化されている
III 型 AFP Mw = 6,500-7,000	Ocean Pout  ゲンゲ科	様々なアミノ酸で構成される。 S-S 結合を含まないものが多い。	 βサンドイッチ構造を含む

図 2 魚類由来の AFP の種類、構造とその特性

表 3 ニチレイのサンプル出荷製品の熱ヒステリシス活性

製品名	性状	販売単位	タンパク質含量	熱ヒステリシス活性
高度精製 I 型不凍タンパク質(AFP)	粉体	100 mg	90%以上	1.0℃以上 *
高度精製 III 型不凍タンパク質(AFP)	粉体	100 mg	90%以上	1.0℃以上 *
粗精製不凍糖タンパク質(AFGP)	粉体	1g	15%以上	0.5℃以上 *
粗精製 I 型不凍タンパク質(AFP)	粉体	1g	25%以上	0.5℃以上 *
粗精製 III 型不凍タンパク質(AFP)	粉体	1g	20%以上	0.5℃以上 *

* : 5w/v%濃度

AFP 水溶液を一度加熱した後の AFP 熱ヒステリシス活性の低下状況を，加熱温度との関係で調べた結果を図 3 に示す．表 3 に示す高度精製品 3 種目と，粗精製品 1 種目についての実験例である．横軸は加熱温度，縦軸は加熱処理後の残存活性で，熱処理する前の 20℃ の時を 100% とした値である．AFGP の場合は 100℃ に加熱した後も活性を失っていない．I 型 AFP の場合は 80℃，III 型 AFP の場合は 50℃ までほとんど劣化していない．また，粗精製品では I 型 AFP の例を示したが，劣化の始まりは 60℃ に下がっている．ここにグラフは割愛したが粗精製 I 型 AFP も同様に約 2 割の劣化が見られた．一方，粗精製 AFGP では 100℃ でも劣化が見られていない．

(4) ニチレイに於ける AFP の製品化

ニチレイは産総研との共同研究の中で，AFP の抽出・精製法を確立した．精製法は膜分離とカラムクロマトグラフィーを採用している．ユーザである大学や企業の研究開発機関からは高度精製品への要望が多かったので，2016 年 9 月，表 3 に示すように，5 種類の AFP を製品化している [1]．ただし，これら製品は試験研究用であり，販売先は法人または研究機関に限られている．



3. 応用分野に向けての特徴を示す実験例

3.1 氷結晶再結晶化抑制効果

表 2 に示した氷結晶再結晶化の抑制機能を卵白アルブミンゲルを用いて実験した．図 4 に示すように，凍結直後も AFP 添加の場合の方が氷結晶が小さいが，2 週間の冷凍保管後には AFP 無添加の場合は氷が粗大化し組織を破壊するのに対し，AFP 添加では氷結晶は小さいまま保たれている．

この効果を活用する応用分野と考えられるアイスクリームや氷菓では，保管中の品質変化がおり難く，口当たりが滑らかな状態を保てる．特にアイスクリームでは微量の AFP 添加だけで手軽に高級品の食感が得られる．もう一つの応用分野である冷凍食品の場合は，凍結解凍した後のドリップを軽減する．また，食感の変化を軽減する．

ただし，アイスクリーム用でも実用化のためには，コストの低減と，臭いの除去の課題を解決する必要がある．臭いは，魚由来の AFP で特に粗精製の場合，不純物から

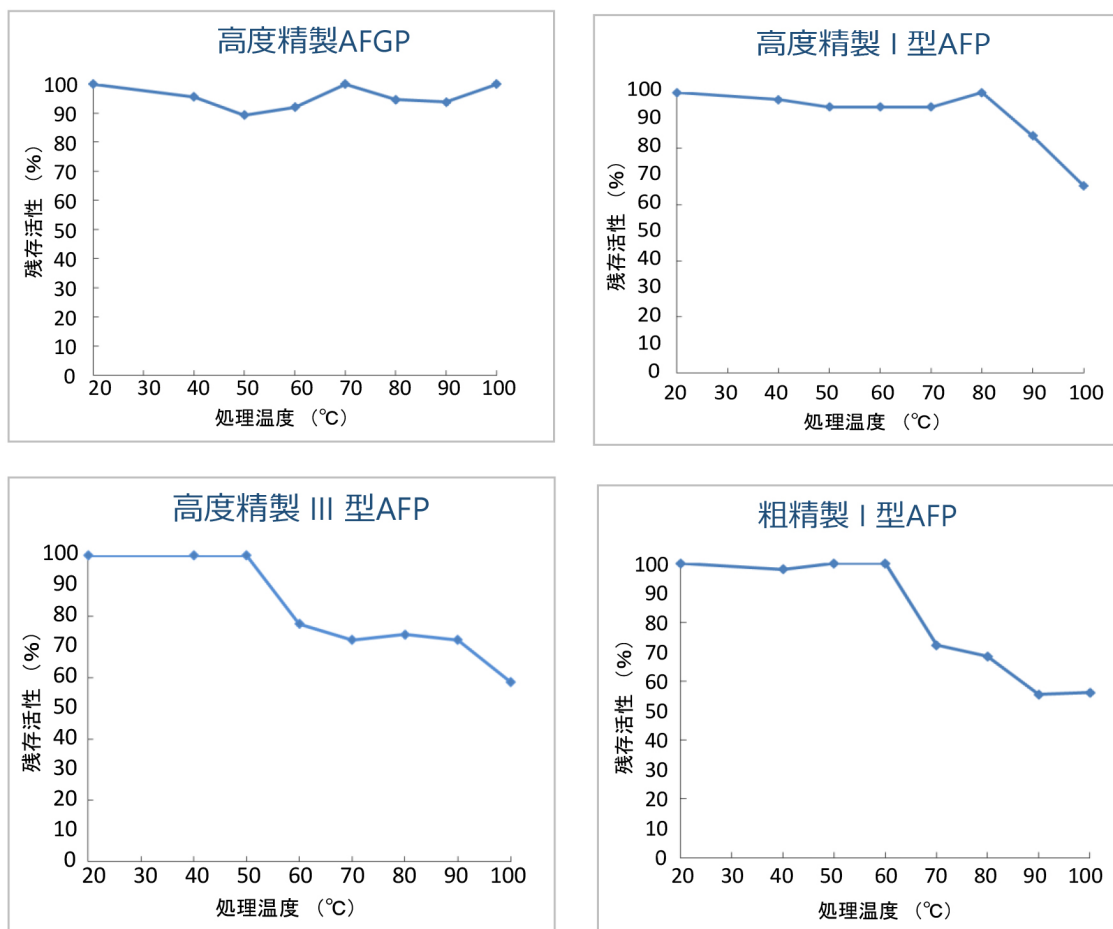


図 3 各種不凍タンパク質の活性度の高温における劣化の状況．高度精製の AFGP，I 型 AFP，III 型 AFP，および粗精製の I 型 AFP の例

発生する。これら課題の解決は本格的生産化が進む中での検討が考えられている。また、多くの食品の場合、組織内部に AFP をどのように侵入させるかが問題となる。今後の検討課題とのことである。

3.2 氷結晶成長抑制効果と多孔質セラミック製造技術への活用

表 2 に示した氷結晶成長抑制機能を卵白アルブミンゲルを用いて実験した。図 5 は、同ゲルをⅢ型 AFP 0.2% 溶液に一晩浸漬し、各種温度で 2 時間凍結し、クライオ電子顕微鏡で観察したものである。AFP 無添加の場合、冷却速度の速い -68°C 、 -110°C の低温での凍結では氷は小さいが、 -18°C では冷却速度が遅いので、氷結晶が大きく成長していることが分かる。食品を冷却した場合組織が破壊されて品質が劣化することになる。AFP 添加で、氷

の成長が抑制され、氷を除いた跡は小さな孔の緻密な集合体となっていることがわかる。

応用分野としてまず考えられる食品分野では、豆腐や寒天などのようにゲル状食品に適用すれば、凍結解凍後の組織ダメージが少なく、品質を保持できる。

一方、工業分野への応用として最近新しく浮上してきたのは、多孔質素材の製造への適用である。具体例は、産総研中部センターが開発を進めているゲル化凍結法による多孔質セラミック製造工程への適用である。ゲル化凍結法とは、セラミックス粉末と大量の水を保水できる高分子とで構成するゲルを凍結し、ゲル内に出来た細孔源となる氷を取り除いて焼結するものである。排水リサイクルや排気ガスの有害微粒子除去用フィルターを始めとする幅広い応用を狙っており、セラミックスの種類を問わない、簡便で低環境負荷の製法である [6]。この製法において、凍結時にゲルの表面と内部で冷却速度に差が

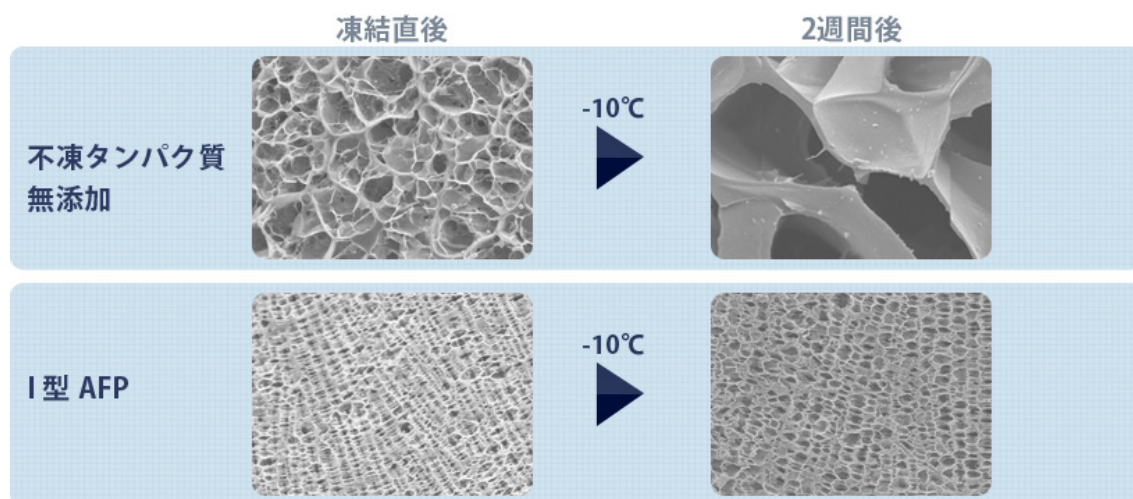


図 4 卵白アルブミンゲルについて、Ⅰ型 AFP 5% 溶液に一晩浸漬し、 -40°C で 2 時間凍結した直後と、その後 -10°C で 2 週間放置した後の電子顕微鏡写真（下段）と、AFP の添加なしの同様な凍結直後と 2 週間放置後の電子顕微鏡写真（上段）。

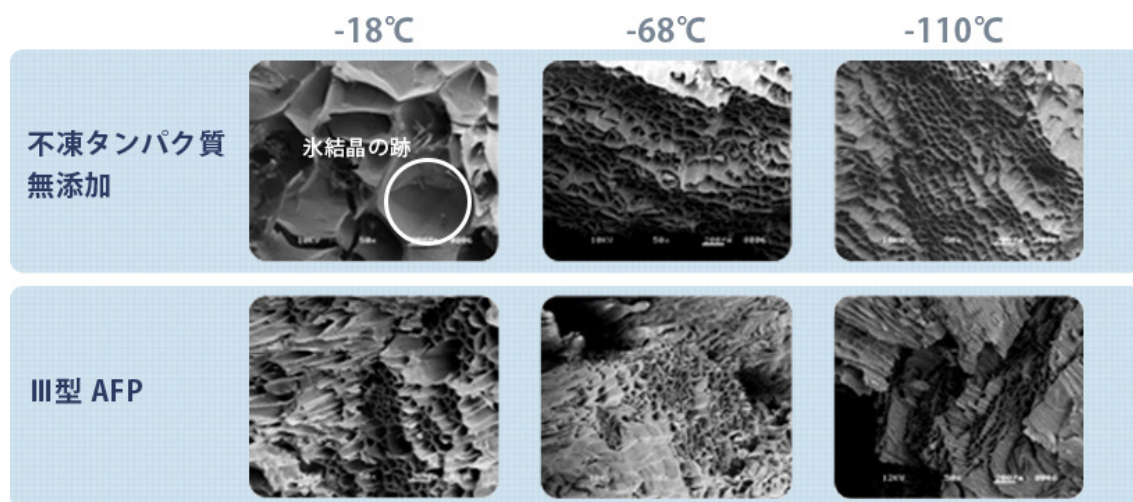


図 5 卵白アルブミンゲルを色々な温度で急冷却した場合の顕微鏡写真。
上は AFP 無添加，下は AFP を添加した場合。

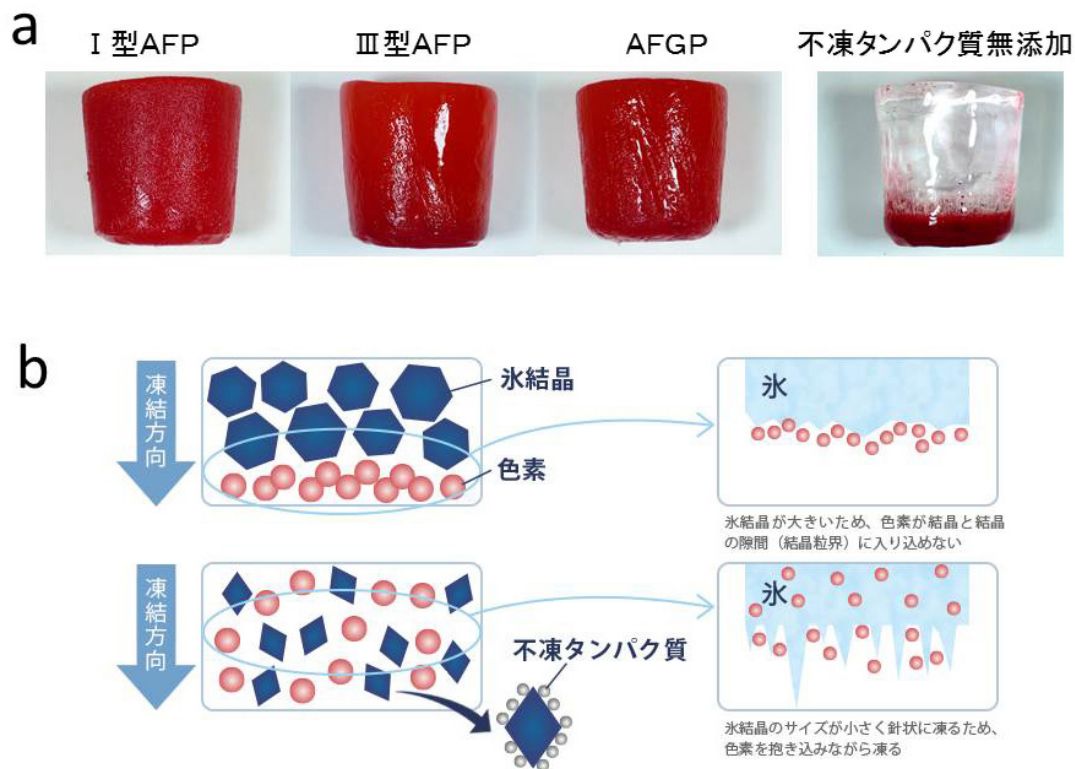


図6 不凍タンパク質の溶質成分均一分散効果 (a) とそのメカニズム (b)

できるので、発生する氷のサイズに大きな差ができる問題が発生する。AFPを添加することで、細孔のサイズの小型高密度で高均一性が著しく向上するので、多孔質セラミックスの性能や適用分野の大幅な拡大が予想される。AFPの新しい応用分野の広がりが期待される。

3.3 溶質の均一分散

溶液を凍結する場合、氷結晶の粗大化に伴って溶質が濃縮する。しかし、不凍タンパク質を添加した場合は、氷結晶の拡大を抑制し溶質の均一分散が保たれる。図6aは実験例で、色素で着色した水で、不凍タンパク質の0.5%水溶液を紙コップに入れて、家庭用冷蔵庫の冷凍室で一晩凍結した結果である。3種類の不凍タンパク質を添加した試料はいずれも色素は一样に分散したままであるが、不凍タンパク質を添加しない試料では色素が底に濃縮された。

図6bはその理由を説明している。紙コップの表面から凍結が始まり、AFP無添加の場合は氷が粗大化し、氷結晶は色素を取り込まないので、色素が残って濃縮される(bの上の図)。一方、AFP添加の場合は、氷結晶が微細化し、色素と混在する形で凍結している。

応用分野としては、機能性氷、即ち、溶質やガスを分散させた氷の作製や、食品の場合では、成分の偏りを制御したり、酵素反応による品質劣化を軽減することが、挙げられている。

3.4 細胞の冷蔵保存

以上はAFPが氷の結晶に結合してその成長を制御する機能の活用であるが、ここでは、AFPが細胞に結合して保存性が延長する能力を発揮するという新しい機能の例を紹介する。産総研との共同研究のなかで、ラットの脾臓細胞を対象に、AFPを保存液に添加することにより4℃保存の生存率が高まることが実証された。図7は実証実験の結果を示すもので、AFPの場合、魚の種類によって効果が異なるが、I型AFPおよびIII型AFPの場合、図に

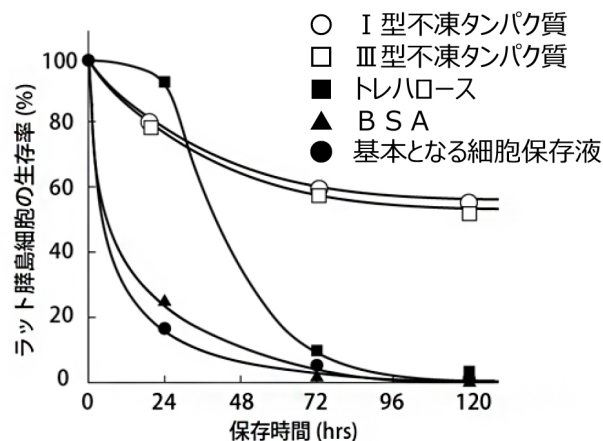


図7 細胞を4℃で保存した場合の生存率の比較。サンプルは、市販の細胞保存液（ユーロコリンズ）および、同保存液に各種溶質を10mg/ml添加したもので保存。

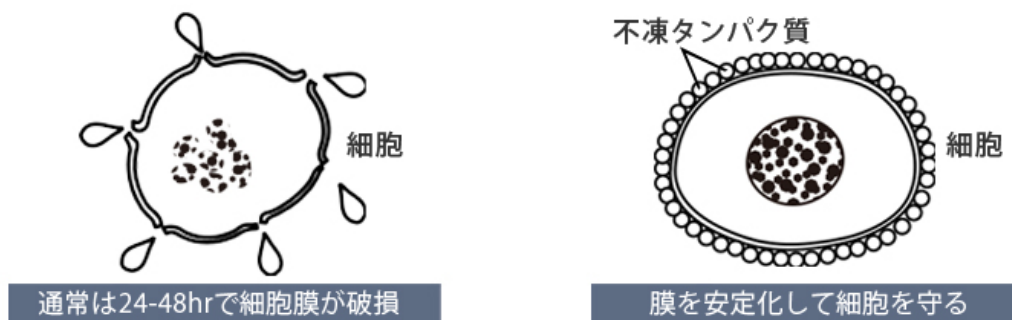


図8 AFPが細胞を保護する様態

示すように 4℃ 保存で 72 時間後でも 60% 生存しており、120 時間後でも生存していた細胞はインスリン産生能力を保持していたとのことである。AFP が細胞の保存性を高める理由については、図 8 に示すように AFP が細胞の周囲を取り囲んでいる状況から、これが細胞の膜を保護していると推察されている。

この機能は、今後、発展が予想される医療・創薬分野において、細胞・組織の保存液などの応用分野が広がるものと大きく期待される。



4. 今後の展開と課題

ニチレイは、2002 年から、産総研との協力関係の下、AFP の製造を研究レベルから実用レベルに高める努力を続けてきた。2016 年 9 月に試料レベルの製品出荷を始めている。企業や大学の研究機関からの要望に応じて、高度精製品を揃えている。一方、応用分野の開拓については、当初は食品分野を対象としたが [7]、魚由来の AFP の臭いの問題とコストが高く製品化に至っていない。しかし近年、多孔質セラミック製造への適用や、医療応用など、新しい応用分野への広がりが見えてきた。ニチレイとしては社会的課題対応に貢献するような製品市場を掴むことを期待している。それにより、生産量が増えれば製造コストも下がり、食料品を含む広い市場に対応できる。

先日 nano tech 2017 国際ナノテクノロジー総合展への出展ブースでの来場者を始めとして、最近は顧客との接触も多くなっている。応用分野によって、製品への要望の違いも見えてくるので、顧客と連携しながら解を出していくとしている。



5. おわりに

不凍タンパク質 (AFP) の機能が、極寒の地域の生物に備わっていることは、自然界の神秘な力を感じさせる。今回の取材で人間の知恵でその神秘な力を活用しようと試みている話を伺った。19 世紀後半、病気の下熱や食品

の長期保存に活用するなど Quality of Life (QOL) の改善に寄与した氷製造業を源流のひとつとするニチレイが、21 世紀の今、氷の成長を抑制し制御する技術で、より高い次元で、人々の QOL の改善、医療や産業の進化に貢献しようとしている。エールを送りたい。



参考文献

- [1] 株式会社ニチレイ、プレスリリース、「不凍タンパク質」発売のお知らせ 2016 年 9 月 9 日。 <http://www.nichirei.co.jp/news/2016/283.html>
- [2] 田中正太郎, 小橋川敬博, 三浦和紀, 西宮佳志, 三浦愛, 津田栄, 「不凍タンパク質」, 生物物理, Vol. 43, No. 3, pp. 130-135 (2003).
- [3] 西宮佳志, 近藤英昌, 坂下真実, 三浦愛, 津田栄, 「不凍タンパク質—機能と応用—」, 化学と生物, Vol. 48, No. 6, pp.381-388 (2010).
- [4] 国立研究開発法人 産業技術総合研究所, プレスリリース, 「連結して氷の結晶成長を食い止める不凍タンパク質を発見」 2017 年 2 月 16 日。 http://www.aist.go.jp/aist_j/new_research/2017/nr20170216/nr20170216.html
- [5] S. Mahatabuddin, Y. Hanada, Y. Nishimiya, A. Miura, H.Kondo, P.L. Davies and S. Tsuda, "Concentration-dependent oligomerization of an alpha-helical antifreeze polypeptide makes it hyperactive", Scientific Reports, Vol. 7, Article number 42501 (2017).
- [6] 国立研究開発法人 産業技術総合研究所, プレスリリース, 「氷を利用してマイクロメートルサイズの細孔を持つセラミックス多孔体を作製」, 2008 年 9 月 9 日。
- [7] 井上敏文, 小泉雄史, 「大量精製が可能になった不凍タンパク質の応用—食品—」, 冷凍 Vol. 86, 第 1005 号 (2011).

図面はすべてニチレイから提供されたものである。

(向井 久和)