

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21360097

研究課題名（和文） 不凍化蛋白質を用いた食品や医療の安全性向上・省エネルギー化に適する氷成長抑制

研究課題名（英文） The inhibition of ice growth, appropriate for the energy-saving and safety improvement for foods and medical treatment, by using antifreeze protein

研究代表者

萩原 良道 (HAGIWARA YOSHIMICHI)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授

研究者番号：50144332

研究成果の概要（和文）： 不凍化蛋白質水溶液の一方方向冷却を行い、濃度場推定と近赤外光を利用した温度場測定を行った。その結果、この蛋白質水溶液に特有の鋸刃状氷表面近傍では、冷却方向と直角方向に熱流束があること、その原因として不凍化蛋白質の高濃度域が考えられることを得た。さらに、不凍化蛋白質と塩化ナトリウムの混合水溶液における界面温度が、各々の水溶液の界面温度より低いことを実験的に明らかにした。このことと首尾一貫する分子動力学解析結果を得た。

研究成果の概要（英文）： We carried out measurement of temperature field for the solution of antifreeze protein under unidirectional freezing using near-infrared light. Also, we estimated protein concentration with fluorescence microscopy. We found that noticeable heat flux exist in the direction perpendicular to the ice growth direction in the serrated interface. This heat flux was due to the high concentration regions of antifreeze protein. The interface temperature for the mixed solution of antifreeze protein and sodium chloride is lower than the sum of the interface temperature for antifreeze protein solution and the interface temperature for sodium chloride solution. We obtained the results of molecular dynamics analysis, which was consistent with the measured result.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	7,900,000	2,370,000	10,270,000

研究分野：伝熱学

科研費の分科・細目：機械工学・熱工学

キーワード：省エネルギー、蛋白質、結晶成長、生物物理、ナノバイオ

1. 研究開始当初の背景

近年、氷結晶の成長を抑制することの重要性が、とくにバイオ・医療分野や食品分野で高まっている。これまでに、多くの氷成長抑制の方法が検討されてきた。それらの中で最も有望でかつ、安全性と省エネルギー化の要

求にも応えられるものは、不凍化蛋白質の添加である。

これまでに、国内外の生化学者や化学者により、不凍化蛋白質に関する多くの研究がなされてきた。その内容は、不凍化蛋白質を持つ動植物の発見、構造と不凍効果の検討、不

凍メカニズムの解明、動植物の品種改良など多岐にわたる。不凍効果に関しては、準平衡状態における微量浸透圧計を用いた凝固点計測と結晶形の観測より、融点と凝固点に差が生じる、浸透圧を上げることなく氷結晶成長を抑制するという特異な性質が明らかになった。また、メカニズム解明に関連して、分子動力学解析、走査型トンネル顕微鏡による氷表面計測結果から、水素結合や水和などによる水分子と不凍化蛋白質との相互作用の仮説が得られた。

しかしながら、ほとんどの研究の計算条件や実験条件では、氷のサイズ、冷却時間(つまり熱流束)などが実際の動植物の場合と異なる。また、バイオ・医療分野や食品分野での応用とも異なる。さらに、得られた結果を基にした仮説には、不凍化蛋白質のアミノ酸残基の果たす役割に相反するものがある。ゆえに、氷結晶成長抑制のメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、不凍化蛋白質のはたらきを制御することにより、ある特定の時間に、ある特定の領域の氷結晶成長を抑制する方法を確立することである。この最終目的達成のために、本研究では、以下の事項を目的とした。

まず、熱力学的非平衡状態における、不凍化蛋白質水溶液の温度場と濃度場を明らかにする。得られる結果をもとに、熱力学的非平衡状態における、不凍化蛋白質の氷成長抑制機構を考察する。

つぎに、不凍化蛋白質水溶液にイオンを添加して、熱力学的非平衡状態における不凍化蛋白質の氷成長抑制へのイオンの影響を考察する。

以上の考察をもとに、熱力学的非平衡状態における、不凍化蛋白質とイオンを用いた氷成長抑制方法の可能性を探る。

3. 研究の方法

熱力学的非平衡状態として、厚さ 0.02mm の水溶液膜の一方凝固を取り上げた。水による近赤外光の吸収が温度に依存することを利用して、近赤外カメラを用いて、近赤外光透過強度を測定することにより、水溶液膜の二次元温度場を計測した。このとき、同時に界面形状も観察した。

また、別途不凍化蛋白質に蛍光分子を付与し、蛍光顕微鏡法により輝度を測定し、その結果から不凍化蛋白質の濃度を推定した。

4. 研究成果

極細熱電対の近くに微小領域を設けて較正実験を行った結果、純水膜の近赤外吸光度から求めた温度が熱電対測定温度と誤差 0.01°C で一致すること、不凍化蛋白質水溶液や氷の温度もほぼ同程度の精度で測定できることを明らかにした(図1参照)。

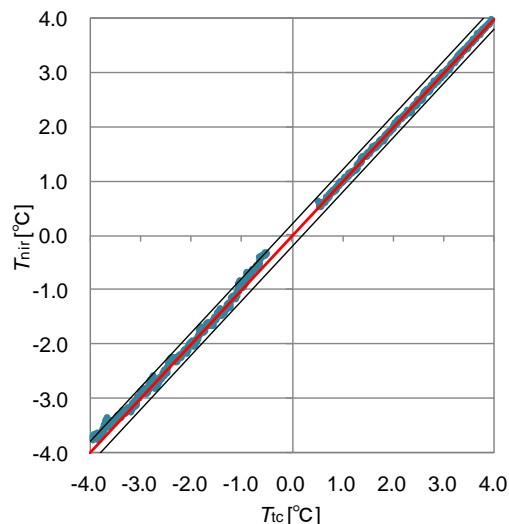
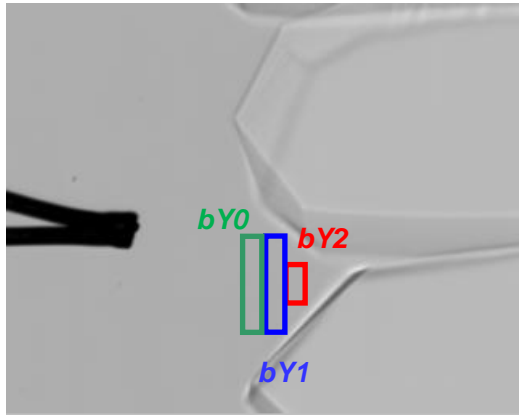


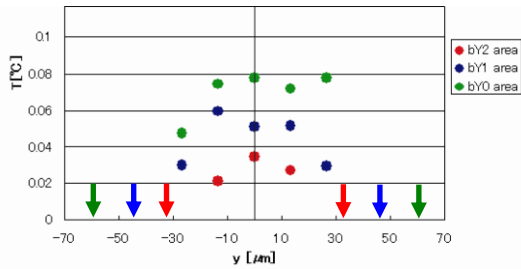
図1 熱電対測定温度と近赤外吸光度から求めた温度の関係(論文③)

近赤外カメラを用いて、微小領域において一方向に徐々に凝固する不凍化蛋白質希薄水溶液の温度分布を測定した。その温度分布から、局所の熱流束を求めた。その結果、界面のごく近傍を除いて、十分な精度の温度計測が可能であることを明らかにした。また、不凍化蛋白質希薄水溶液に特徴的な鋸刃状界面の近傍では、結晶成長と直角方向の熱流束が高いことを初めて明らかにした(図2参照)。

蛍光分子イソチオシアン酸フルオレセインを付与した不凍化蛋白質の水溶液を、温度測定の場合と同様に徐々に冷却し、成長する氷界面近傍における蛍光画像を取得した。得られた画像を解析した結果、鋸刃状界面の先端から界面に沿って蛋白質濃度は増加すること、鋸刃状界面の底部における蛋白質濃度の上昇が氷内部に液体領域の残る原因であること、上記の2次元熱伝導の原因は高濃度蛋白質領域の存在およびその移動と考えられることを明らかにした(図3参照)。



(a)



(b)

図2 近赤外カメラによる温度計測結果
(a) 画像例と熱流束計算用温度計測領域、
(b) 温度分布 (論文①)

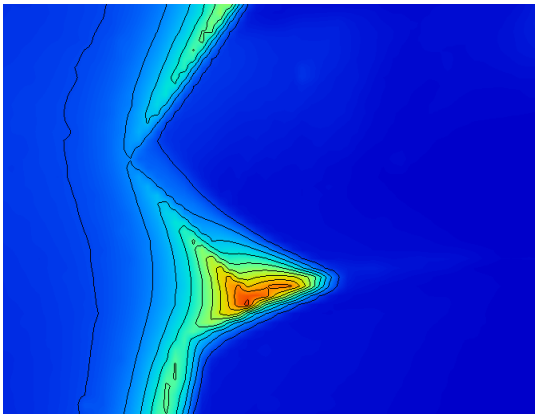


図3 蛍光輝度分布の例 (論文①)

微小領域において、不凍化蛋白質と塩化ナトリウムの希薄水溶液の一方方向凝固の際の、界面温度を極小熱電対を用いて測定した。その結果、混合液の界面温度は、蛋白質水溶液の界面温度と塩化ナトリウム水溶液の界面温度の和よりも低いこと (協同効果) (図4参照)、混合液の場合に界面移動速度の低下とともに界面温度が下がることを明らかにした。

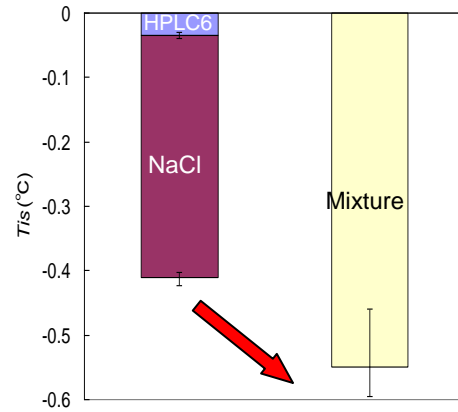


図4 不凍化蛋白質と塩化ナトリウムの混合水溶液における氷界面温度 (学会発表④)

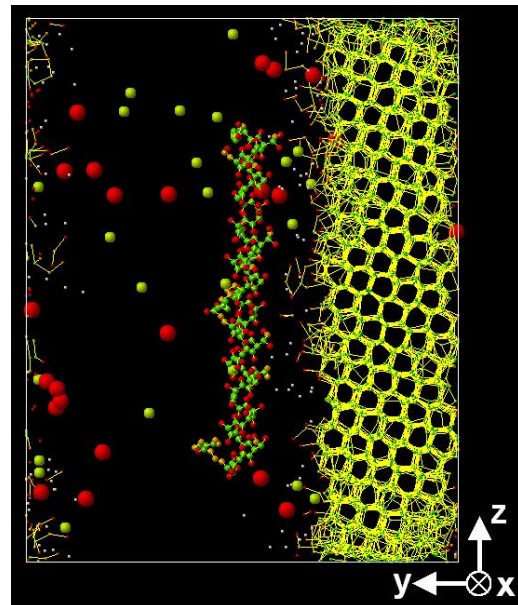


図5 不凍化蛋白質、ナトリウムイオン、塩化物イオン、氷壁、水からなる系の分子動力学シミュレーションにおけるスナップショット例 (論文②)

ナトリウムイオン、塩化物イオン、不凍化蛋白質、氷結晶を含む水に関する分子動力学シミュレーションを行い、イオンの存在により、水分子および氷に近い蛋白質分子の運動が抑えられること、その結果蛋白質分子が氷表面と直接相互作用する可能性が高くなることを、明らかにした (図5参照)。したがって、不凍化蛋白質と塩化ナトリウムの混合水溶液における界面温度が、各々の水溶液の界面温度より低い上述の協同効果と首尾一貫することを明らかにした。

さらに、実用上重要で、かつより熱力学的非平衡状態の著しい場合である、水溶液

が流れている場合について、検討をおこなった。その結果、微細流路内の不凍化蛋白質水溶液流についても、温度場計測と濃度場推定が可能であること、不凍化蛋白質の水への影響が大きいこと、フェーズフィールド法を用いた氷を含む液流の予測が有望であることを得た(学会発表①、③)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Y. Hagiwara and D. Yamamoto, Temperature distribution and local heat flux in the unidirectional freezing of antifreeze-protein solution, *Int. J. Heat and Mass Transfer* Vol. 55, No. 9 - 10 (2012) pp. 2384 - 2393. 査読有. DOI: 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2012.01.024. URL: <http://www.science-direct.com/science/article/pii/S001793102000361>.
- ② K. Hayakari and Y. Hagiwara, Cooperative effect of ions and winter flounder antifreeze protein near the ice/water interface, *Molecular Simulation*, Vol. 38, No. 1 (2012) pp. 26 - 37. 査読有. DOI: 10.1080/08927022.2011.600759. URL: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08927022.2011.600759>.
- ③ Y. Hagiwara, R. Sakurai and R. Nakanishi, Temperature of the solution of winter flounder antifreeze protein near ice surfaces in a narrow space, *J. Crystal Growth*, vol. 312, No. 2 (2010), pp.314 - 322. 査読有. DOI: 10.1016/j.crysgro.2009.10.056. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S00220248/312/2>.

[学会発表] (計18件)

- ① 大西 洋輔, 萩原 良道, 山本 大智, 前田 穰, 北川 石英, 微小流路内水流の凝固過程における温度場・速度場計測, 日本機械学会熱工学コンファレンス 2011, 2011年10月30日, 浜松市, 静岡大学.
- ② 萩原 良道, 山本 大智, 特定波長の近赤外光の吸収を用いた氷・不凍タンパク質水溶液界面近傍の温度場計測, 日本機械学会熱工学コンファレンス 2011, 2011年10月30日, 浜松市, 静岡大学.
- ③ 鶴ヶ崎 辰也, 立田 健人, 萩原 良道, 高木 知弘, 二次元ダクト内の過冷却水における氷結晶成長に関する数値解析, 日本機械学会熱工学コンファレンス 2011, 2011年10月29日, 浜松市, 静岡大学.
- ④ Y. Maeda, D. Yamamoto and Y. Hagiwara, A mixed solution of saline and HPLC6 and its

effects on the interface with ice in unidirectional freezing, 1st International Ice-binding Conference, 2011年8月5日, カナダキングストン市, クィーンズ大学.

- ⑤ Y. Hagiwara and D. Yamamoto, Temperature and heat flux of HPLC6 solution near serrated ice surfaces in unidirectional freezing, 1st International Ice-binding Conference, 2011年8月5日, カナダキングストン市, クィーンズ大学.
- ⑥ K. Hayakari, Y. Hagiwara and K. Kuroshima, Effects of hydration due to sodium ions on the motion of winter flounder antifreeze protein near a pyramidal ice surface, 1st International Ice-binding Conference, 2011年8月5日, カナダキングストン市, クィーンズ大学.
- ⑦ 前田 穰, 山本 大智, 萩原 良道, 微小領域での水溶液の一方向凍結における不凍タンパク質と塩化ナトリウムの協同効果, 第48回日本伝熱シンポジウム, 2011年6月3日, 岡山市, 岡山コンベンションセンター.
- ⑧ 山本 大智, 櫻井 亮, 萩原 良道, 北川 石英, 氷界面近傍の冬ガレイ由来不凍タンパク質水溶液中のタンパク質の局所濃度, 第48回日本伝熱シンポジウム, 2011年6月2日, 岡山市, 岡山コンベンションセンター.
- ⑨ 黒島 考平, 萩原 良道, 早狩 浩平, 水・氷・混合体における水分子への力学的振動が及ぼす影響に関する分子動力学的研究, 第48回日本伝熱シンポジウム, 2011年6月1日, 岡山市, 岡山コンベンションセンター.
- ⑩ Y. Hagiwara, R. Sakurai, D. Yamamoto and A. Kitagawa, Effects of local concentration on freezing solutions of winter flounder antifreeze protein, Proc. of 8th ASME/JSME Thermal Engineering Joint Conference, 2011年3月15日, 米国ハワイ州ホノルル市, ワイキキビーチマリOTTホテル.
- ⑪ 萩原 良道, 早狩 浩平, 氷近傍の水におけるイオンと不凍化タンパク質の相互作用, 第24回分子シミュレーション討論会, 2010年11月26日, 福井市福井県民ホール.
- ⑫ 山本 大智, 大西 洋輔, 萩原 良道, 微小空間における不凍化タンパク質水溶液の氷界面近傍における局所温度および熱流束, (社)日本機械学会熱工学コンファレンス 2010, 2010年10月31日, 長岡市長岡科学技術大学.
- ⑬ 大西 洋輔, 山本 大智, 萩原 良道, マイクロチャネル内水流における氷結晶の成長への不凍タンパク質の影響, (社)日本機械学会熱工学コンファレンス 2010, 2010年10月30日, 長岡市長岡科学技術大学.

- ⑭ Y. Hagiwara and D. Yamamoto, Cooperative effect of winter flounder antifreeze protein and ions on the unidirectional freezing of their solution in a narrow space, Physics and Chemistry of Ice, 2010年9月9日, 札幌市, 北海道大学.
- ⑮ Y. Hagiwara, D. Yamamoto and Y. Ohnishi, Local temperature and heat flux in the aqueous solution of antifreeze protein near ice surfaces in a narrow space, Proc. of 14th Int. Heat Transfer Conference, 2010年8月11日, 米国ワシントン DC, オムニショアハムホテル.
- ⑯ Y. Hagiwara, Y. Ohnishi and D. Yamamoto, Inhibition of blockage by ice crystal in water in a micro-channel by using antifreeze protein, Proc. of 14th Int. Heat Transfer Conference, 2010年8月11日, 米国ワシントンDC, オムニショアハムホテル.
- ⑰ K. Hayakari, Y. Kanamori and Y. Hagiwara, Molecular dynamics analysis on the interaction among water, cations, anions and antifreeze protein, Proc. of 14th Int. Heat Transfer Conference, 2010年8月11日, 米国ワシントン DC, オムニショアハムホテル.

[その他]

ホームページ等

<http://www.cis.kit.ac.jp/~kitagawa/>

特別講演

- ① Y. Hagiwara, Experimental and computational studies on the cooperative effects of ions and antifreeze protein, 2010年8月6日, 米国ロサンジェルス市カリフォルニア州立大学ロサンジェルス校.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 良道 (HAGIWARA YOSHIMICHI)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授

研究者番号：50144332

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

角田 直人 (KAKUTA NAOTO)

九州大学・工学研究院・准教授

研究者番号：70345437