

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13760

研究課題名(和文)氷の再結晶化を阻害する不凍タンパク質機能の定量的解明

研究課題名(英文)Quantitative analysis of the ability of ice recrystallization inhibition of antifreeze protein

研究代表者

津田 栄(Tsuda, Sakae)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・上級主任研究員

研究者番号：70211381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：通常の氷は無数の氷の単結晶(氷核)が再結晶化を起こし互いに固く結びついたものである。不凍タンパク質(AFP)は氷核の再結晶化抑制機能(Ice Recrystallization Inhibition, IRI)を有するがその定量法は未確立であった。本研究では、AFP含有氷を構成する任意の氷核の再結晶化速度をOstwald Ripening則に基づいて算出することによって、IRI機能を定量化できることを見出した。更に、この解析法を用いることで分子量3.3kDaの40アミノ酸残基から成るBpAFPが優れたIRI活性を発揮することを見出した。論文総数9、学会等発表総数41(うち招待講演数5)。

研究成果の概要(英文)：Numerous embryo single ice crystals are generated in water when it is frozen. They are progressing crystal growth and combined together to form a multi crystalline state, whose process is called ice recrystallization. Antifreeze protein (AFP) has a strong ability of ice recrystallization inhibition (IRI), while it has not been established an efficient method to analyze the IRI activity quantitatively. Here we developed a new method, which is different from the known splat cooling assay, to precisely evaluate IRI rate of AFP based on the equation ( $r_3 = r_3(0) + Kt$ ) of the Ostwald Ripening. We also identified a new species of AFP (BpAFP) from righteye flounder that showed a strong IRI and thermal hysteresis activity in concentration-dependent manner.

研究分野：生化学、分子生物学、構造生物学、低温生物工学

キーワード：不凍 タンパク質 氷 再結晶化 氷結晶結合 分子構造 ナノスケール 計測

## 1. 研究開始当初の背景

我々が普段目にする氷は、氷核と呼ばれる「氷の単結晶」が無数に固く結びついたものである。この結びつきを抑制できれば、バラバラにした氷核の集合体で含水物の内部を埋め尽くすようなユニークな凍結技術を開発できると考えられている。このような凍結制御は「氷の再結晶化阻害 (IRI)」と呼ばれるもので、0 付近の高い凍結温度域でも強力な IRI 活性を發揮する物質として不凍タンパク質 (AFP) が知られていた。しかし、IRI 活性を理論式に基づいて定量的に解析する方法はきちんと確立されておらず、優れた IRI 活性を有する AFP の特定を行い、その製品化を検討することが期待されていた。

## 2. 研究の目的

氷の再結晶化の経時的变化を表す LSW モデルまたは Ostward Ripening は理論物理学者リフシッツが 1961 年に導出したものであり  $r^3(t) = r^3(0) + Kt$  (式 1) で表される。変数  $r$  は氷核の半径、 $t$  は時間経過、IRI を示す変数は速度定数  $K$  と考えることができる。本研究の目的は、式 1 に基づいた IRI 活性の定量方法すなわち  $K$  を正しく見積もる為の実験方法を確立し、既に取得済みの複数種類の AFP について IRI 活性 ( $K$ ) の評価を行うことである。これまでも冷却した金属板の上に水滴を落とし、生成する円盤状氷晶を零下に静置したときの顕微鏡画像を一定の時間間隔で撮影したデータを取得し、式 1 に当てはめて  $K$  を算出する案等が示されている (splat cooling assay 法と呼ばれる)。しかし、この方法では時刻  $t_1$  で撮影した氷核と時刻  $t_2, t_3, \dots$  で撮影した氷核が異なるため実験データと理論式の間整合性に疑問が残る。膨大な氷核から  $r$  の平均値を見積る手順にも誤差が生じ易いため、より正確で簡便な IRI の定量化方法を開発する必要があった。

## 3. 研究の方法

IRI の定量化実験には 型と 型に属する AFP の天然抽出物、氷結晶の成長を完全に抑制できない 2 種類の 型 AFP アイソフォーム、ならびに標準的な熱ヒステリシス活性を有する 1 種類の 型 AFP アイソフォームを用いた。各々の試料を濃度 0.01 ~ 2.0 mg/ml になるように 40% (v/v) スクロースを含む蒸留水に溶解して試料検体とした。AFP アイソフォームは大腸菌を宿主とした遺伝子組換え技術により発現し、電気泳動で単一性が確認される純度まで精製した。ライカ社製 DMLB 型顕微鏡システムのステージにリンカム社製 LK600 温度制御装置付きサンプルホルダーを乗せ、同ホルダー中に静置した約 1  $\mu$ l のサンプル液を  $\pm 0.01$  の精度で温度制御する実験系を新たに構築した。サンプルは、マイナス 10 にまで過冷却して全面凍結させた後マイナス 6 に静置した。顕微鏡視野には凍結水 (氷) が無数の氷核の集合体とし

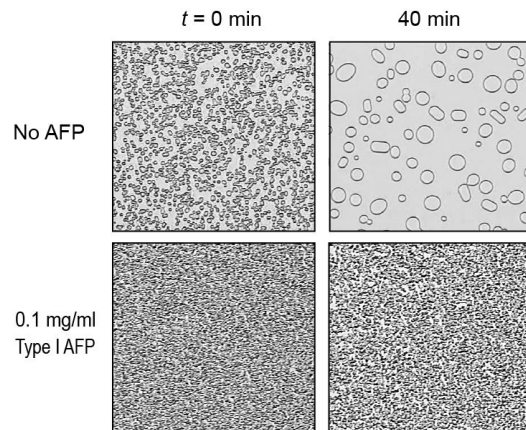


図 1. 氷の顕微鏡画像の経時変化。Type I AFP は濃度 0.1mg/ml でも氷核の再結晶化を強く抑制する。

て観察される (図 1)。式 1 の  $r^3(t) = r^3(0) + Kt$  は特定の氷核が時間経過に伴い再結晶化を進行していく様子を示すものであるから、本研究では氷核 (顕微鏡画像) の経時变化を不連続静止画ではなく動画として撮影し、1 個の氷核が Ostward Ripening により再結晶化を辿る過程を経時的にモニターした。理論的には 1 個の氷核データからでも  $K$  が求まる

が系の不均一性等を考慮して 10-15 個の氷核の変化を解析し K の平均値を算出した。

#### 4. 研究成果

氷の再結晶化過程を表す LSW 理論式 (Ostward Ripening)  $r^3(t) = r^3(0) + Kt$  は、半径  $r$  をもつ任意の氷晶の成長速度が  $K$  に等しいことを示している。はじめに一定時間毎に視野の異なる氷の顕微鏡画像のスナップショットから 200-300 個以上の氷核を選択し、それらの  $r$  の平均値の経時変化から  $K$  を求める方法 (splat cooling assay 法) の検討を行った。しかし AFP 存在下では氷核サイズが極微小になり氷晶形状が楕円で近似できず、Image-J 等の画像解析ソフトの自動輪郭抽出機能が正常に動作しないことが判明した。手作業には任意性が伴い誤差が大きいことも問題であると考えられた。一方、新たに考案

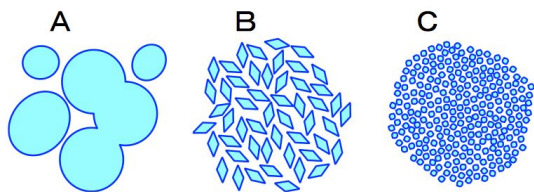


図 2. 通常の水中では氷核の再結晶化(A)が進行するが AFP があると抑制されて B 又は C の様な氷核集積体が生成する。本研究ではこれらの経時変化を動画として撮影することで任意の氷核の再結晶化速度を見積もった。

した氷核顕微鏡画像の動画を用いて任意の氷核の再結晶化過程をモニターする方法では、再結晶化が進み、氷核サイズが判別できる時間帯の  $r$  値を計測することにより  $r$  の計測精度が上がること、作業量が著しく軽減されることが判明した(図 2)。この方法を用いることで複数の AFP サンプルについて IRI 活性の指標となる  $K$  値を比較検討した( $K$  値が小さいほど IRI 活性が強い)。その結果、カレイ類から抽出された 40 アミノ酸残基から成る分子量 3.3kDa の小分子量 AFP (BpAFP) が、特に強い IRI 活性を示すことが明らかになった。そこで BpAFP の遺伝子とアミノ酸の

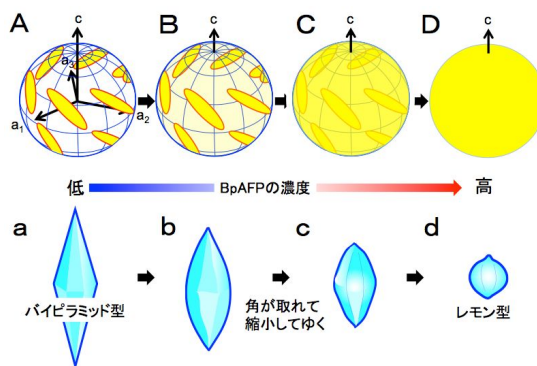


図 3. 球状の氷核を作成して蛍光ラベル BpAFP の水溶液に浸し UV 光の下で観察した結果の模式図。BpAFP は低濃度では氷核の特定の場所に結合するが(A)、濃度を高めるに連れて結合領域を氷核の全体に拡大して行くことが分かった(B-D)。BpAFP を含む氷を構成する氷核は濃度に応じて小さなレモン型に変化することが判明した(a-d)。

組成、熱ヒステリシス活性、溶解度、耐熱性、耐酸・アルカリ性、分子構造等を詳しく調べたところ、BpAFP は濃度に応じて分子同士が互いに連結することで氷核への結合範囲を拡大していく新しいタイプの AFP であることが判明した(図 3)。この研究成果は英科学誌サイエンティフィック・リポーツにオンライン掲載されたほか、所属機関等の主な研究成果としてリリースされた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Mahatabuddin, S., Hanada, Y., Nishimiya, Y., Miura, A., Kondo, H., Davies, P.L., and Tsuda, S.: Concentration-dependent oligomerization of an alpha-helical antifreeze polypeptide makes it hyperactive. *Scientific Reports* 7, 42501 (2017). DOI. 10.1038/srep42501. 査読有り

Cheng, J., Hanada, Y., Miura, A., Tsuda, S., and Kondo, H.: Hydrophobic Ice-Binding Sites confer Hyperactivity of an Antifreeze Protein from a Snow Mold Fungus. *Biochem. J.* 473 (21), 4011-26 (2016). DOI. 10.1042/BCJ20160543. 査読有り

Mahatabuddin S., Nishimiya, Y., Miura, A., Kondo, H., and Tsuda, S.: Critical Ice Shaping Concentration (CISC): A New Parameter to Evaluate the Activity of Antifreeze Proteins. *Cryobiology and Cryotechnology* 62 (2), 95-103 (2016). ISSN 1340-7902. 査読有り

Okamoto R, Izumi M, Kajiwara Y, Fukami D, and Tsuda S. Chemical synthesis of homogenous antifreeze glycoprotein having uniform GalNAc modification and its antifreeze activity. Protein Science 25, 65 (2016). ISSN 0961-8368. 査読あり

津田 栄 : 不凍タンパク質の構造と機能—高品質魚類不凍タンパク質がもたらす冷熱技術イノベーション—. 化学と工業 69 646-648 (2016). ISSN 0022-7684. 査読あり

Tsuda, S.: Mass preparation of fish antifreeze protein. J. Bioprocess Biotechniq. 6 (7), 30 (2016). ISSN 2155-9821. 査読なし

東伸晃、宮崎裕司、津田 栄 : 型不凍蛋白質-水系のガラス転移挙動-、大阪大学科学熱学レポート, 37, 86-87 (2016). ISSN 0910-6774. 査読なし

津田 栄 : 不凍液, 再生医療 15, 52-53 (2016). ISSN 1347-7919. 査読なし

新井達也、成 晶、Sheikh Mahatabuddin, 近藤英昌、津田 栄 : 不凍蛋白質の界面前進凍結濃縮抑制効果の観察, 日本低温生物工学会誌, 61, 121-124 (2015). ISSN 340-7902. 査読あり

〔学会発表〕(計41件)

津田 栄 : 不凍タンパク質の生産と産業医学応用. TIA かけはし第3回ナノバイオ・コンソーシアム討論会. 東京大学、東京都文京区. 2017年2月27日. 招待講演.

岡田璃生、池崎圭吾、関口博史、張 宰源、宮澤佳甫、福間剛士、太田 昇、津田 栄、佐々木裕次: Temperature dynamics of single molecular Antifreeze Protein. 61<sup>st</sup> Biophysical Society Annual Meeting. Ernst N. Morial Convention Center, New Orleans, USA. 2017年2月11-15日.

ラーマンアニカ、マハタウッディンシェイク、大山恭史、近藤英昌、津田 栄: Quantitative Method to Evaluate Ice Recrystallization Kinetics of AFP Solutions. 第26回化学工学・粉体工学研究発表会. 北海道大学、北海道札幌市 2017年1月27日.

津田 栄 : 不凍物質の科学、第3回低温科学技術交流調査会. ちよだプラットフォーム、東京都千代田区. 2017年1月20日. 招待講演.

ラーマンアニカ、大山恭史、マハタウッディンシェイク、近藤英昌、津田 栄 :

Quantitative Method to Evaluate Ice Recrystallization Inhibition Rate using Feret's Diameter. 4<sup>th</sup> International Life Science Symposium. 北海道大学、北海道札幌市. 2016年11月18日.

新井達也、室井宏仁、武山将大、近藤英昌、津田 栄 : 高純度魚類不凍タンパク質を用いた細胞保存技術の創生. Cryopreservation Conference 2016. 基礎生物学研究センター、愛知県岡崎市. 2016年11月10-11日. 招待講演.

津田 栄 : Mass preparation of fish antifreeze protein. Bioprocess 2016 International Meeting. Crowne Plaza Houston River Oaks, Houston, USA. 2016年10月20-21日. 招待講演.

武山将大、マハタウッディンシェイク、近藤英昌、津田 栄 : 人工脂質二重膜を用いた不凍タンパク質の細胞膜保護機能の解析. 第89回日本生化学会大会、仙台国際センター、宮城県仙台市. 2016年9月25-27日.

新井達也、近藤英昌、津田 栄 : 魚類 Type II AFP の細胞保護機能の解析. 第61回低温生物工学会年会、東京電機大学、埼玉県比企郡鳩山町. 2016年6月25-26日.

岡田璃生、松下祐福、張 宰源、関口博史、西島正樹、池崎圭吾、津田 栄、佐々木裕次: X線1分子追跡法による不凍タンパク質の異常なブラウン運動観察. 第16回日本蛋白質科学会、福岡国際会議場、福岡県福岡市. 2016年6月7-9日.

その他 31 件

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称: 生体材料保護用ペプチド  
発明者: 津田 栄、ほか5名  
権利者: 国立研究開発法人 産業技術総合研究所、株式会社ニチレイ  
種類: 特許  
番号: 特願 2015-166206  
出願年月日: 2015年8月25日  
国内外の別: 国内

〔その他〕

プレスリリース・報道・広報誌ほか

産総研公式ホームページ (主な研究成果)  
「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-小さな氷結晶で埋め尽くすように水を凍らせる新技術-」

URL:

[http://www.aist.go.jp/aist\\_j/new\\_research/2017/nr20170216/nr20170216.html](http://www.aist.go.jp/aist_j/new_research/2017/nr20170216/nr20170216.html)  
2017年2月16日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

津田 栄 (TSUDA, Sakae)  
国立研究開発法人 産業技術総合研究所  
生物プロセス研究部門・上級主任研究員  
研究者番号：70211381

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし