

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13672

研究課題名(和文) 不凍タンパク質が示す相互作用の解明：拡散・吸着ダイナミクスの蛍光1分子計測

研究課題名(英文) Interaction between anti-freeze protein and ice: dynamics of diffusion and adsorption

研究代表者

佐崎 元 (Sasaki, Gen)

北海道大学・低温科学研究所・教授

研究者番号：60261509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：極域の海に生息する魚類由来のタイプIII型の不凍タンパク質(AFP-III)，および海水中に生息する藻類由来の不凍タンパク質(fc-AFP)を，それぞれ化学修飾および遺伝子操作によって蛍光ラベル化した．そして，レーザー共焦点蛍光顕微鏡およびマッハ・ツェンダー光干渉計を用いて，不凍タンパク質が氷結晶表面に吸着する挙動と、氷結晶の成長に及ぼす効果を調べた．その結果，前者は氷結晶のプリズム面に特異的に吸着するがベースル面には吸着しないこと，後者はプリズム面とベースル面の両方に吸着することを見出した．この結果は，氷結晶のc軸方向の成長を，前者は促進し，後者は抑制することを矛盾無く説明できる．

研究成果の概要(英文)：We prepared two kinds of fluorescent-labeled anti-freeze proteins, AFP-III from polar fish and fc-AFP from sea ice algae, by chemical modification and genetic engineering, respectively. Then we studied the adsorption of these AFPs on ice crystal surfaces and their effects on the growth of ice crystals using a laser confocal fluorescence microscope and a Mach-Zehnder interferometer. We found that AFP-III adsorbs specifically on ice prism faces but not on ice basal faces, and that fc-AFP adsorbs on both ice prism and basal faces. These results agree well with the effects of these AFPs on the growth of ice crystals: the growth of ice crystals in the crystallographic c-direction is promoted by AFP-III but suppressed by fc-AFP significantly. In this study, we revealed for the first time that different AFPs with different affinities with ice crystal surfaces show different effects on the growth of ice crystals.

研究分野：結晶成長学

キーワード：不凍タンパク質 レーザー共焦点蛍光観察 吸着

1. 研究開始当初の背景

骨や歯、貝殻などのバイオミネラル結晶の様に、生体高分子が、分子サイズが大きく異なる無機低分子結晶の成長を精密に制御することはよく知られているが、その機構の理解は甚だ不十分である。本研究では、そのような例として、不凍タンパク質が氷結晶の成長を制御する機構の解明に焦点を絞る。

不凍タンパク質は寒冷圏に住む外温動植物が体内で生産するタンパク質で、氷結晶表面に吸着し、その成長を抑制することで、動植物を凍死から守る働きをしている。これまでは、寒冷圏に住む魚、昆虫、藻類、バクテリアなどが不凍タンパク質を生産することが知られており、これまで主に生化学的な観点からの研究が盛んに行われて来た。

しかし、結晶成長物理の観点からの不凍タンパク質に関する研究は、申請者を含めたわずかな研究グループがこれまでにやってきたのみで大きく立ち後れており、その作用機構についての統一的な理解はまだ得られていない。

2. 研究の目的

不凍タンパク質が氷結晶の成長に効果を及ぼすためには、不凍タンパク質が氷結晶表面に吸着する必要がある。すなわち、不凍タンパク質が氷結晶の表面にどの様に吸着するか、および不凍タンパク質が氷結晶の成長にどのような影響を及ぼすかの相関を明らかにする必要がある。

そのため、まず、1) 不凍タンパク質の濃度と過冷度を様々に変化させ、氷結晶のモルフォロジーがどの様に変化するかを観察する。また、2) 同時に氷結晶の c 軸方向および a 軸方向への成長速度を光学顕微鏡およびマツハツェンダー光干渉計を使って計測する。そして、3) 氷結晶表面に吸着した蛍光ラベル化不凍タンパク質をレーザー共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察する。そして、上記 1~3) で得られた知見より、不凍タンパク質が氷結晶の成長に影響を及ぼすメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、極域の海に住む魚由来の III 型不凍タンパク質 (以降、AFP-III) および海水に住む藻類由来の不凍タンパク質 (以降、fc-AFP) の 2 種類に焦点を絞った。

まず、AFP-III を蛍光色素ローダミンと化学結合させることで、蛍光ラベル化した AFP-III (F-AFP-III) を調製した。約 10% の AFP-III を蛍光ラベル化することに成功した。一方、fc-AFP は、共同研究者のバイヤー博士 (アルフレッド・ウェゲナー研究所、ドイツ、研究員) が遺伝子的手法で緑タンパク質と 100% の収率で結合させたもの (F-fc-AFP) をいただき、そのまま使用した。

F-AFP-III の場合には、蛍光ラベル化収率が約 10% と低いため、F-AFP-III 溶液の厚み

が大きいと、バルク溶液中の蛍光分子量が大きくなるため、氷結晶に吸着した F-AFP-III を感度よく観察することができなかった。そこで、厚みが約 100 μ m と薄い観察チャンバーを作製し、この中で氷結晶を一方方向に成長させながら、氷結晶への F-AFP-III の吸着をその場観察した。一方、F-fc-AFP の場合には蛍光ラベル化収率が 100% と高いため、これまで当研究室で用いて来た、氷単結晶の成長を観察するための観察チャンバーをそのまま用いて、氷結晶の成長と氷結晶への F-fc-AFP の吸着をその場観察した。なお、蛍光観察には、レーザー共焦点蛍光顕微鏡を用いた。

4. 研究成果

1) AFP-III が氷結晶の成長におよぼす効果

様々な AFP-III 濃度および過冷度下で観察した氷結晶のモルフォロジーを図 1 に示す。低過冷度下では、純水の場合には平衡形は円板であるが (a1), AFP-III がわずかに存在するとファセットが現れた (b1)。また、高過冷度下では、純水の場合に比べて (a3), より枝が細い樹枝状結晶が得られた (b3-d3)。これらの結果より、AFP-III はプリズム面やバイピラミダル面などの氷単結晶側面に吸着し、成長を抑制するものと予想される。AFP-III 濃度が高いと c 軸方向へ長く伸びた形態の氷結晶が観察された (e2 および e3)。

次に、氷結晶および周囲の不凍タンパク質水溶液を、レーザー共焦点蛍光顕微鏡を用い

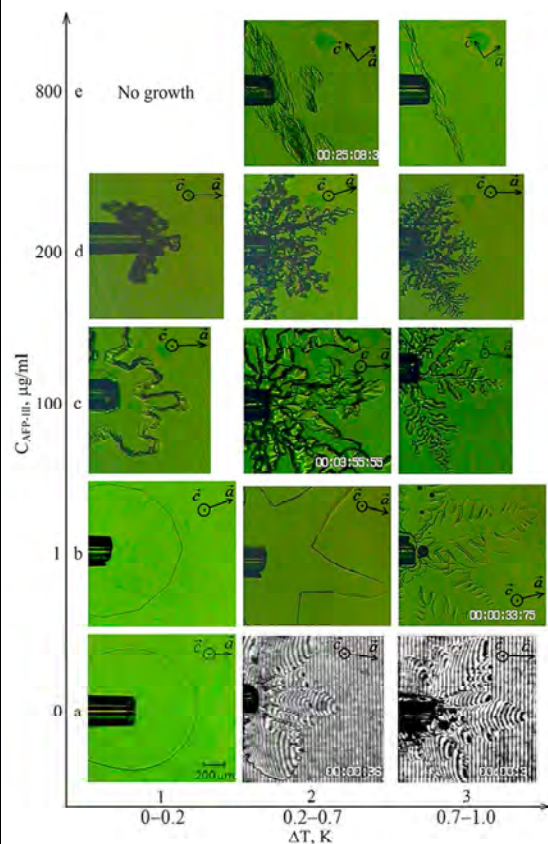


図 1. 氷結晶のモルフォロジーに及ぼす AFP-III の効果. $C_{AFP-III}$ は AFP-III の濃度を、 ΔT は過冷度を示す。

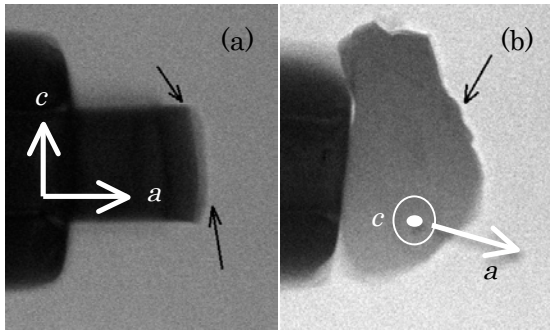


図2. F-AFP-III を加えた (64 µg/ml) 過冷却水中で成長させた氷結晶のレーザー共焦点蛍光顕微鏡観察結果. 図中の矢印は側面に吸着した F-AFP-III を示す. キャピラリーの直径は 430 µm.

でその場観察することで、バルク溶液中および氷結晶表面での F-AFP-III の濃度分布を可視化・計測した。その結果の一例を図2に示す。図2より、F-AFP-III は主にプリズム面やバイピラミダル面などの側面には顕著に吸着するが、ベーサル面には顕著な吸着が観察されないことがわかる。この結果は、図1でのモルフォロジーより得られる結果と完全に一致した。

さらに、様々な不凍タンパク質濃度および過冷却度の下で氷結晶を一方向に成長させ、氷結晶の成長速度を計測するとともに、結晶表面に吸着した不凍タンパク質の濃度を決定した。その結果、過冷却度が 0.4° C よりも小さな場合と大きな場合とで全く異なる結果が得られることを見出した。それぞれの場について以下に説明する。

過冷却度が 0.4° C よりも小さな場合には、不凍タンパク質による「不凍効果」が観察された。すなわち、不凍タンパク質濃度が増加するとともに、氷結晶は融点以下のより低い温度まで成長できなかった（この氷が成長できない温度領域を「熱ヒステリシス」と呼び、不凍効果の大きさを表す）。不凍タンパク質による氷結晶の成長抑制は、これまでギブストムソン・モデルにより次の様に説明できると考えられて来た。氷表面に吸着した不凍タンパク質が氷結晶の表面をピン止めすると、不凍タンパク質分子の間の氷表面は前方に凸の曲率半径を持つ球面となり、バルクの融点 (0° C) よりも融点が低下する。この場合には、熱ヒステリシスの大きさと吸着した不凍タンパク質分子間の距離の逆数が比例関係を持つことが知られている。そこで、本研究にもギブストムソン・モデルが適用できるかどうかを調べるために、氷結晶表面での蛍光強度より氷結晶表面に存在する不凍タンパク質の濃度を決定し、氷表面に吸着している不凍タンパク質分子間の距離を求めた。その結果、本研究の場合にも熱ヒステリシスの大きさと吸着分子間距離の逆数は良好な直線関係を示したが、その傾きより求めた氷-水溶液界面の界面自由エネルギーは、氷-水の界面自由エネルギーの 1/7 程度の小さな値

を示した。この結果は、AFP-III がもたらす不凍効果は基本的にはギブストムソン・モデルにより説明できるが、不凍効果の大きさを左右する界面自由エネルギーは不凍タンパク質により大きな影響を受ける、すなわち AFP-III が吸着していない氷-水溶液界面にも AFP-III は大きな影響をおよぼすことを示す。後者は、本研究により初めて明らかとなった現象である。

一方、過冷却度が 0.4° C よりも大きな場合には、不凍タンパク質濃度の増加とともに、氷結晶の成長速度は逆により大きく促進されるという、全く予想外の結果が得られた。そのため、本現象を説明するためには、これまでにない新たな作業仮説が必要とされる。定量的に説明するにはまだ実験が不十分であるが、不凍タンパク質濃度の増加とともに観察された「氷結晶のモルフォロジーの大きな変化」が最も重要な寄与を及ぼしたと考えられる。すなわち、氷結晶の形態が、丸い樹枝状から、大きく間隔が空いた細い樹枝状へと変化することで、氷結晶が過冷却融液中で成長する際に最も大きな律速段階となる「潜熱の除去」がより効率的に行われたためであると予想される。

2) fc-AFP が氷結晶の成長に及ぼす効果

次に、様々な fc-AFP 濃度および過冷却度下で観察した氷結晶のモルフォロジーを図3に示す。低過冷却度下では、純水の場合には平衡形は円板であるが (a1), AFP-III がわずかに存在するとファセットが現れた (d)。また、高過冷却度下では、純水の場合に比べて (c), より枝が細い樹枝状結晶が得られた (f, I, 1)。しかし、fc-AFP 濃度が高くなっても、c 軸方向の厚みが薄い、板状のままであった (k, 1)。AFP-III の場合には観察された c 軸方向への成長の促進は観察されず、常に抑制されたままであった。

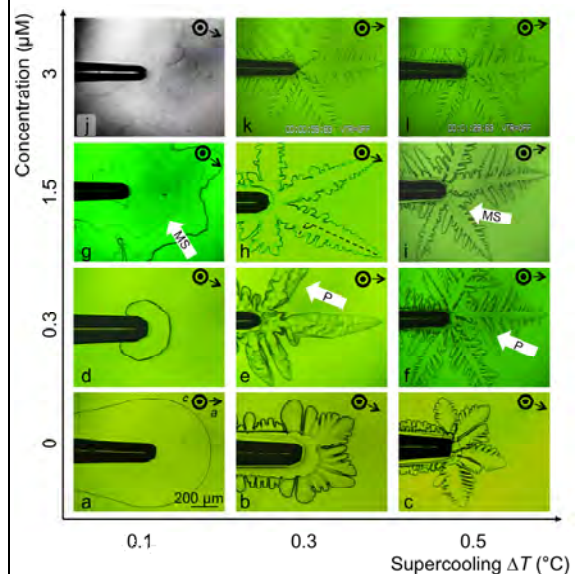


図3. 氷結晶のモルフォロジーに及ぼす fc-AFP の効果. 縦軸は fc-AFP の濃度を、横軸は過冷却度 ΔT を示す。

次に、氷結晶および周囲の不凍タンパク質水溶液を、レーザー共焦点蛍光顕微鏡を用いてその場観察することで、バルク溶液中および氷結晶表面での F-fc-AFP の濃度分布を可視化・計測した。その結果の一例を図 4 と 5 に示す。図より、F-fc-AFP はベール面 (図 4) およびプリズム面 (図 5) の両方に顕著に吸着することがわかる。この結果は、図 3 でのモルフォロジーより得られる結果と完全に一致する。

以上より、fc-AFP の効果は次の様に説明できる。fc-AFP は AFP-III とは異なり常にベール面に強く吸着することより、ベール面 (c 軸方向) の成長を常に抑制する。この点が、高過冷却下ではベール面の成長を促進した AFP-III と大きく異なる。一方、fc-AFP も AFP-III と同様にプリズム面に吸着し、その成長を抑制した。その結果、高過冷却下では AFP-III と同様に、氷結晶の形態が、丸い樹枝状から、大きく間隔が空いた細い樹枝状へと変化することで、氷結晶が過冷却融液中で成長する際に最も大きな律速段階となる「潜熱の除去」がより効率的に行われたと予想される。

fc-AFP の場合には、蛍光強度計測がまだ予備的な段階にあるため、氷結晶に吸着した fc-AFP の密度を決定するには至っていない。そのため、AFP-III の場合の様な、水-氷界面の自由エネルギーに及ぼす効果についてはまだ明らかにできていない。今後の課題である。

不凍タンパク質に関するこれまでの研究では、熱ヒステリシスが 1°C 未満である場合にはベール面には吸着せず、逆にベール面への吸着が見られる場合には数°C 以上の大きな熱ヒステリシスが見られると信じられて来た。しかし、本研究で用いた fc-AFP の様に、ベール面に吸着するにもかかわらず熱ヒステリシスが 1°C 未満であるケースも存在することが新たに明らかになった。この結果は、不凍タンパク質に対する従来の考えに修正を迫るものであり、大きな意義を持つと考えている。

3) まとめ

上記 1)2) に示した様に、本研究で題材とした 2 種類の不凍タンパク質、AFP-III および fc-AFP は、氷結晶表面と異なる親和性を示した。すなわち、両不凍タンパク質共に氷結晶のプリズム面に吸着してその成長を抑制するが、氷結晶ベール面には、AFP-III は吸着せずその成長を促進するが、fc-AFP は吸着しその成長を抑制することがわかった。以上のように、氷結晶表面と異なる親和性を示す不凍タンパク質が、氷結晶の成長にも異なる効果を及ぼすことを、結晶成長物理学の観点から定量的に明らかにすることができたのは、我々の知る限り本研究が初めてである。

5. 主な発表論文等

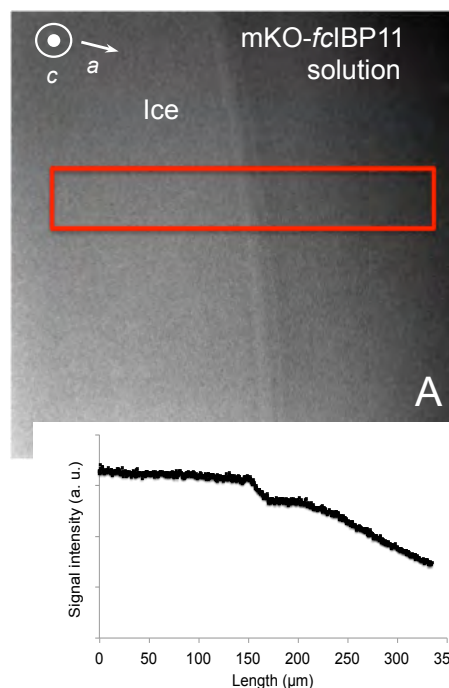


図 4. F-fc-AFP を加えた (1.5 μM) 過冷却水中で成長させた氷結晶のレーザー共焦点蛍光顕微鏡観察結果. 下図は上手の枠線中の蛍光強度を計測した結果を示す. F-fc-AFP はベール面に強く吸着することがわかる。

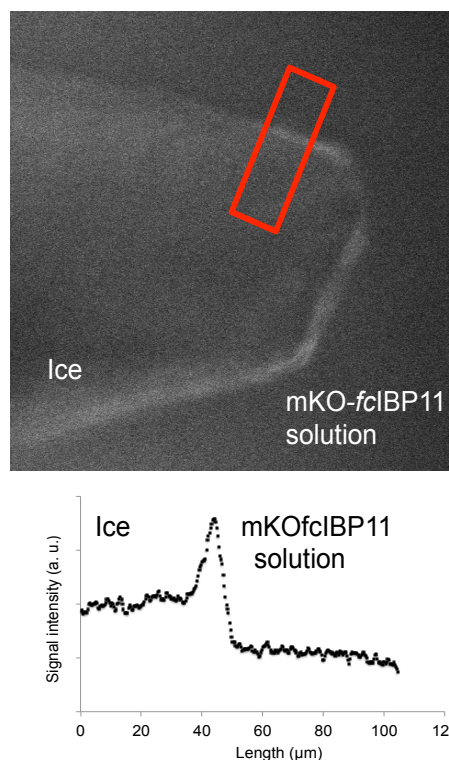


図 5. F-fc-AFP を加えた (1.5 μM) 過冷却水中で成長させた氷結晶のレーザー共焦点蛍光顕微鏡観察結果. 下図は上手の枠線中の蛍光強度を計測した結果を示す. F-fc-AFP はプリズム面にも強く吸着することがわかる。

(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 0 件)

〔学会発表〕（計 5 件：全て国際会議）

- 1) D. Vorontsov, G. Sazaki, Y. Furukawa, K. Nagashima, K. Murata, "Crystallization of ice in AFP-III solutions", 14th International Conference on the Physics and Chemistry of Ice (PCI-2018 in Zürich), Paul Scherrer Institut, Zürich, Switzerland, January 8-12, 2018.
- 2) M. Bayer-Giraldi, G. Sazaki, N. Azuma, M. Takata, S. Kipfstuhl, H. Kondo, Y. Furukawa, "Ice-binding proteins from a sea-ice diatom, their effect on ice growth and physical properties", 14th International Conference on the Physics and Chemistry of Ice (PCI-2018 in Zürich), Paul Scherrer Institut, Zürich, Switzerland, January 8-12, 2018.
- 3) D. A. Vorontsov, G. Sazaki, Y. Furukawa, K. Nagashima, K. Murata, Evgeniia Titaeva, "Growth of ice crystals in the presence of type III antifreeze protein", The 3rd International Ice-Binding Protein Conference, Rehovot, Israel, August 14-17, 2017.
- 4) D. A. Vorontsov, G. Sazaki, K. Nagashima, K. Murata, Y. Furukawa, "Effect of type III antifreeze protein on the morphology and growth kinetics of ice crystals", 12th International Workshop of the Crystal Growth of Organic Materials conjunction with 47th Annual British Association of Crystal Growth Conference, University of Leeds, UK, June 26-30, 2016.
- 5) D. A. Vorontsov, G. Sazaki, K. Nagashima, K. Murata, Y. Furukawa, "Effects of type III antifreeze protein on the morphology and growth kinetics of ice crystals", The 18th International Conference on Crystal Growth and Epitaxy, Nagoya, Japan, August 7-12, 2016.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

〔その他〕

<http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/ptdice/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐崎 元 (SAZAKI GEN)

北海道大学・低温科学研究所・教授

研究者番号：60261509

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

Dmitry Vorontsov (VORONTSOV DMITRY)