

平成 22 年 4 月 23 日現在

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18204036
 研究課題名（和文）生体高分子の界面吸着が誘起する氷の結晶成長促進・自励振動現象の異方的ダイナミクス
 研究課題名（英文）Anisotropic dynamics of ice growth promotion and its self-oscillation induced by the interfacial adsorption of biological macro molecules
 研究代表者
 古川 義純（FURUKAWA YOSHINORI）
 北海道大学・低温科学研究所・教授
 研究者番号：20113623

研究成果の概要（和文）：寒冷環境に住む変温生物の凍結を防ぐ機能を持つ凍結抑制タンパク質の機能が発現するメカニズムを解明するために、実験・理論的研究を行った。氷結晶の成長がこのタンパク質の界面吸着と関連することを初めて実証するとともに、2段階可逆吸着様式というタンパク質分子の氷界面への吸着特性を明らかにした。すなわち、界面に吸着したタンパク質分子は、界面へのより強い吸着状態を実現するために自らその形状(二次構造)を変化させる。この特性は、結晶成長速度の促進や自発的な振動現象を引き起こすことも示した。

研究成果の概要（英文）：Experimental and theoretical studies of antifreeze proteins, which have the special function to prevent the freezing of living organisms under the subzero environment, were carried out. Direct evidence for the relation between the adsorption of proteins on the ice interfaces and the prohibition of crystal growth was first demonstrated directly, and it was made clear that the protein molecule adsorption proceeded in two stages depending on the conformation change of protein molecules. This adsorption mode was completely new and called as “two-step reversible adsorption”. This adsorption model also explained the growth promotion of basal planes of ice and the self oscillations of growth rates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2007年度	13,700,000	4,110,000	17,810,000
2008年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2009年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
年度			
総計	36,500,000	10,950,000	47,450,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学・生物物理・化学物理

キーワード：生物物理

1. 研究開始当初の背景

氷結晶の成長を抑制する機能を持つ凍結抑制タンパク質(糖鎖を持つものを

Antifreeze glyco-protein(AFGP)、持たないものを Antifreeze protein(AFP)と呼ぶ)の水溶液中で氷結晶を成長させると、成長速度が

大幅に促進されたり、成長速度が自発的に振動したりするらしいことを、研究代表者のグループが発見した。この現象は、結晶成長する氷界面へのこれらのタンパク質が吸着することで起こると考えられているが、その吸着特性やメカニズムに関しては未解明であった。

特に結晶成長速度の促進は、従来これらのタンパク質が界面に吸着すると成長速度の抑制方向にのみ作用すると考えられていたことと、全く矛盾する結果である。さらに、成長速度の変動は、結晶成長における自発的振動現象と考えられるが、そのメカニズムについては明らかにされていない。この、自発振動成長は、鉱物結晶などの内部に良く観察されるストリーションと呼ばれる縞々模様の生成とも密接に関連するが、この模様と成長速度の直接測定を同時に観察した例は殆どなく、そのメカニズムにも諸説がある。

AFGP や AFP は、氷結晶成長を制御する機能性タンパク質としてその応用にも期待されているが、タンパク質分子の構造や生理学的な研究が中心で、氷結晶の成長界面にどのように吸着をするのか、さらにそれが結晶成長をいかにして制御するのかについては、ほとんど解明されていないのが現状であった。界面への吸着が重要な役割を果たすということは、古くから指摘されていたが、実際に界面にタンパク質分子の吸着が起きているかどうかさえ、実証するような実験結果は得られていなかった。その大きな原因にひとつは、氷物理学や結晶成長学など氷界面に特有な物理的性質、現象の非平衡論的な取り扱いが十分ではなかったことにある。

2. 研究の目的

本課題で扱う現象は、成長界面に吸着したタンパク質分子による結晶成長カイネティクスの変動と、結晶成長に伴い界面で排斥されたタンパク質分子の挙動（拡散や分配）とが、非線形的に相互作用することに起因する。さらに、同じ分子であっても、結晶の面方位ごとにその作用が異なる（異方性）。このような現象は、塩などの無機物が不純物として結晶成長に作用する場合には決して観察されない。アミノ酸やタンパク質など、いわゆるマクロサイズの生体高分子が不純物として作用する場合に極めて特徴的に現れる、新しい物理現象である。

本研究では、結晶が成長しつつある動的状態での界面吸着状態にあるタンパク質分子のコンフォメーションや結晶成長過程などのその場測定を行った。さらに、理論的考察や計算機シミュレーションとも共同し、凍結抑制タンパク質の不純物効果が氷結晶の異方的成長カイネティクスに与える効果を解

明し、マクロ分子の関与した新しい結晶成長機構モデルの構築を目指した。さらに、氷の凍結を抑制するタンパク質を研究試料として用いることから、生体の耐凍結・耐寒戦略のメカニズム解明という生命科学的役割を、新しい物理的手法で解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究を行うために、生命科学の分野で活用される手法を、結晶成長の物理実験の分野に導入した。まず、蛍光特性を持つ分子により AF(G)P 分子をラベルすることにより、結晶成長に伴いタンパク質分子がどこに、どの様な濃度で再配分されるかを、蛍光顕微鏡によりその場観察した。これにより、結晶成長界面近傍での、AF(G)P 分子の界面への吸着過程、結晶内部への取り込み過程、界面からの排斥過程、さらに界面近傍から遠方への拡散過程の直接観察が可能になった。さらに、成長界面の空間的な位置の時間変動も精密測定することで成長速度の振動周期や振幅などの解析を同時に行うことも可能となった。

(2) このような測定を高精度に行うには、いかにして氷の結晶を成長させるかが鍵となる。このため、本研究では水溶液中での氷単結晶の自由成長法と、温度勾配の中を成長させる一方向成長法を採用した。

(3) 氷界面に吸着した状態での AF(G)P 分子の二次構造を解明するために、ATR-FTIR 法を導入した。この測定でも、氷結晶をどの様にして生成するかが測定の重要な鍵になるため、新しい薄膜状氷結晶生成装置を開発した。

(4) これらの実験的研究の成果を元に、分子動力学法による AFP 分子の界面吸着特性の検証、および氷界面吸着に関する新しいモデルを構築した。

4. 研究成果

(1) 自由成長法による成果

① AFGP 水溶液中で自由成長する氷結晶をレーザー共焦点蛍光顕微鏡でその場観察した。その結果、氷の成長界面に蛍光輝線が観察されると、その面の成長が停止する様子が、直接観察された。図 1 の界面 1、および 3 には明るい蛍光輝線が観察され成長は完全に停止しているが、輝線のない界面 2 は成長を継続している。この観察は、AFGP 分子の界面への吸着が、結晶成長を実際に抑制していることを実験的に証明した世界初の画像である。

また、成長を継続した界面 2 は、成長を停止している界面(1 と 3)に挟まれているので、成長とともに面のサイズが小さくなり最終的に消失する。同時に界面 3 では、成長が再

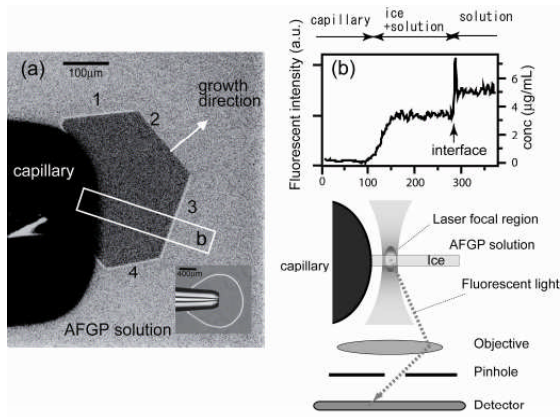


図1 (a)ガラス毛細管の先端でAFGP水溶液から成長する角板状氷結晶のスナップ写真(濃度 $5\mu\text{g/ml}$ 、温度 -0.05°C)。6角の面がベールサル面である。側面(プリズム面)に蛍光輝線が観察される1、3、4の面は成長が完全に停止しているが、輝線のない界面2だけが成長を継続した。(b)写真の白枠内で蛍光強度のプロファイルを取った結果。界面には鋭いピークが観察され、AFGPの吸着濃度が高い。(c)共焦点蛍光顕微鏡の観察原理を示す模式図。氷結晶の位置にレーザー光の焦点を結び、水平面内でスキャンして、蛍光画像を取得する。

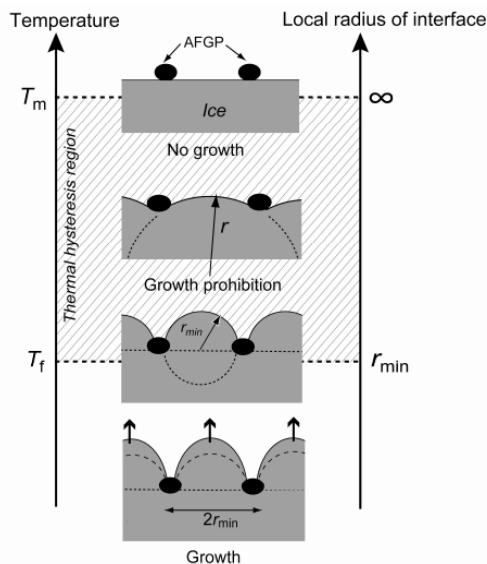


図2 氷界面へのAFGP分子の吸着と氷の凍結温度(熱的ヒステリシス温度)との関連を示す模式図。界面への分子の吸着間隔が広い(吸着密度が小)場合は、ピン止め効果により結晶成長を停止する。吸着密度が上がり、吸着間隔がギブス・トムソン効果で予想される曲率半径より小さくすると、ピン止め効果が作用せず成長を開始する。

開し、界面の蛍光輝線も消失した。この結果は、界面へのAFGPの吸着は従来考えられていたほど強固ではなく、可逆的であることを示唆する。

② 界面において観察される蛍光強度ピークは、プリズム面に吸着したAFGPからの積算値である。これと結晶の厚みの推定値($40\mu\text{m}$)から、プリズム面へのAFGP分子の面吸着間隔(d)を計算すると $d=21.4\pm 4\text{nm}$ となる。界面に吸着したAFGP分子が、界面の移動をピン止めするというモデルから、この界面が成長を開始できる臨界の過冷却度を推定することが可能で、最大 -6°C 程度となる。この温度は、この結晶が成長している実際の温度 -0.05°C よりも桁違いに大きくなる。すなわち、この結果は従来多くの研究者が採用してきた、AFGP分子の界面吸着による界面移動のピン止め効果が、成長抑制の原因とするモデルは、もはや成り立たないことを意味している。

(2) AFGP分子の界面吸着状態での二次構造解析

水中でのAFGP分子は、非常に柔軟で、いわゆる絡まった紐のような二次構造を持つので、このままの形では氷結晶格子との適合性が悪い。この分子が氷界面に吸着できるのはなぜかという疑問に答えるため、我々はATR-FTIR法により、氷界面に吸着状態にあるAFGPの二次構造解析を行った。

図3(a)は、試料から得られたスペクトルの温度変化を示す。まず、室温から温度をゆっくり低下させて測定すると、 -15°C で D_2O 分子のO-D伸縮振動バンドの最大ピーク波数の位置がシフトし、スペクトル形状も変化する。これは、 D_2O の液相から固相への変化に相当するもので、この温度で試料が凍結したことを示す。逆に、いったん凍結した試料の温度を上昇させながら測定すると、 D_2O の融点まで液相に戻らない。

一方、AFGPの二次構造に敏感な吸収バンドは、 $1600\sim 1700\text{cm}^{-1}$ に現れるアミドIバンド(C-O伸縮振動バンド)で、図3(b)および(c)に、 $+10^\circ\text{C}$ (液相)と -15°C (固相)でのこのバンドの拡大図を示す。スペクトル形状の明確な変化が観察される。図に示された破線は、このスペクトルをAFGP分子のさまざまなタイプの二次構造に対応するピーク波数をコンポーネントとして分解したものである。すなわち、試料が液相から固相に変化すると、特に α -ヘリックス構造に対応するコンポーネントが顕著に増加した。

凍結による α -ヘリックス構造のコンポーネントの増加を示す結果は、氷界面に吸着したAFGPの構造を反映したものと結論される。すなわち、AFGP分子は界面においてラ

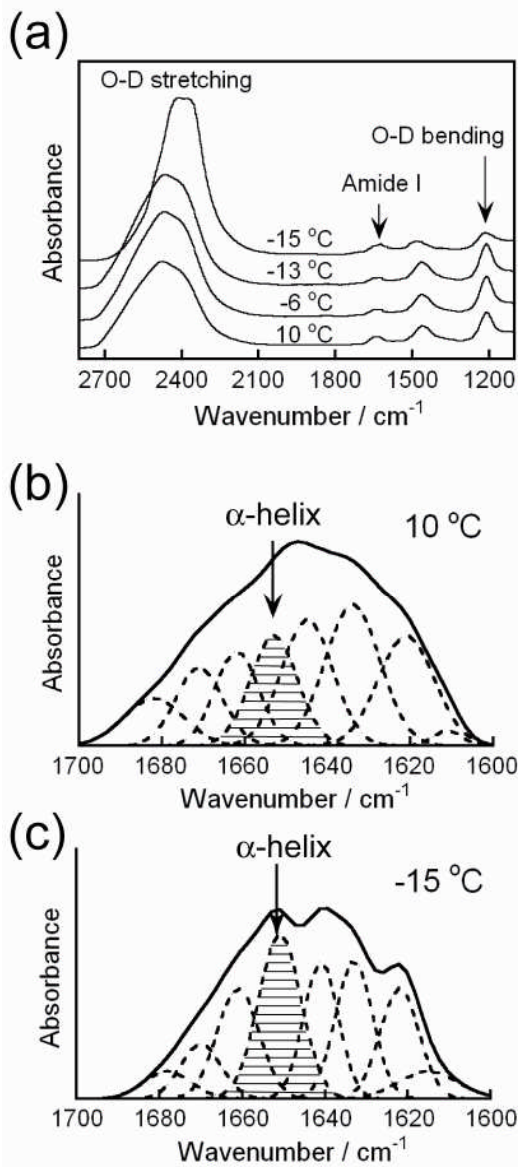


図3 (a)AFGP 水溶液薄膜から得られた FTIR スペクトルの温度変化、(b)および(c)は、Amide I バンドの吸収スペクトル (実線) と、それを各二次構造に対応する波数で分解した結果 (破線)。それぞれ、液相状態の試料と固相状態の試料に対応する。ハッチングを入れたピークは、 α -ヘリックス構造の AFGP に対応し、試料が固相のときに配分比が上昇することが分る。

ンダムコイルの状態から α -ヘリックスの状態に二次構造を変化させることで、氷界面への吸着が強くなる。

(3) AFGP 分子の氷界面吸着モデル

これらの実験結果が示す結論は、AFGP 分

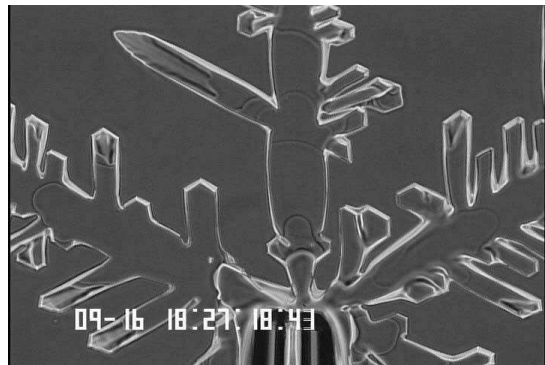


図4 AFGP 水溶液中で成長する氷結晶のベーサル面の位相差顕微鏡写真。多くの成長ステップが観察される。成長ステップの運動が明瞭に観察される。純水中の成長では観察されない。

子の氷のプリズム面への吸着は、まずランダムコイルの二次構造の状態で行き起る弱い結合が起こり、やがて α -ヘリックスへの二次構造変化が起こり、界面に強く吸着することができるようになる。しかし、強く結合するといっても、離脱が可能な程度の強さであり、吸着は可逆的な性質を持つ。すなわち、このような吸着は二段階可逆吸着 (2-step reversible adsorption) モデルとも呼ぶべき新しい結晶界面への分子吸着である。

(4) 成長速度の自励振動

本研究で明らかになった AFGP 分子の二段階可逆吸着モデルは、結晶成長速度にヒステシスを引き起こす。すなわち、AFGP 分子が界面に吸着するにはある程度の時間がかかる。この時間に界面が移動してしまい、界面への吸着が常に更新されるような状況では、吸着による結晶成長の抑制力は弱い。しかし、成長が遅く界面の更新が遅くなると吸着はより強くなり、さらに成長を抑制するように作用する。すなわち、このような AFGP 界面吸着と成長速度とが非線形的に相互作用するので、成長の振動が誘起される。

(5) ベーサル面の成長速度促進機構

AFGP は、プリズム面には上に述べた様式で吸着するが、ベーサル面には吸着しない。しかしながら、氷のベーサル面は二次元核またはらせん転位による沿面成長をする。このとき、生成される成長ステップの端面はプリズム面であるため、ここには優先的な吸着が生じて良い。AFGP 分子の大きさは、氷のベーサル面の単位ステップ高さよりも圧倒的に大きいため、吸着した AFGP 分子はベーサル面から突き出す形で吸着する。このため、この吸着分子は、新しい成長ステップ源として作用することができる。これによりベーサル面の成長速度は促進されることになり、

AFGP 分子の氷結晶成長に対する機能は吸着面方位によって全く逆の作用となる。このモデルを証明する直接観察には残念ながら成功しなかったが、AFGP 水溶液中で成長する氷のベール面では、明らかにステップの運動が活発になることが観察された(図4参照)。このステップの詳細な解析は、今後に残された問題である。

(6) 計算機シミュレーションによるタンパク質分子吸着ダイナミクス

分子動力学シミュレーションにより、氷/水界面への不凍タンパク質の吸着特性を明らかにした。その結果、吸着面に対するタンパク質分子の向きによって吸着特性が異なることが明らかになった。強い吸着が起きるためには、氷結晶格子の周期性とタンパク質分子の持つ内部周期性が一致するようにタンパク質分子の方位が変化することも明らかになった。このような振る舞いは、実験で得られたタンパク質分子の吸着特性や理論的考察とも矛盾しない。

(7) 本研究の成果のインパクト

本研究で得られた成果は、国内外の多くの研究者により注目され、特に国際会議やシンポジウムの特別講演や招待講演を多数依頼されている。さらに、多くの学術誌から解説等の執筆依頼を受けた。

さらに、本研究課題の連携研究者や博士研究員として雇用した若手研究者から、2件の学会賞を受賞した。

また、本研究で得られた成果をもとに、国際宇宙ステーション「きぼう」における長時間微小重力実験のテーマに採択された。この実験では、本課題で開発した位相差干渉顕微鏡システムと成長セルを搭載した氷結晶成長装置を製作し、氷結晶ベール面での成長速度の超精密測定を予定している。微小重力環境では、対流などに起因する擾乱がないため、この効果に影響されない結晶成長速度の自励振動の観察や振動周期の決定などが可能になると期待されている。2011年夏の打上を目指し、現在では実験装置の最終フライトモデルの設計が進行中である。

<http://kibo.jaxa.jp/experiment/theme/application/pm02pick.html>

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 17 件)

- ① 古川義純, Salvador Zepeda, 宇田幸弘, 氷結晶成長を支配するタンパク質-氷点下に生きる生物はいかにして凍結を回避

するかー, 日本物理学会誌, 65(2010)98-103. (査読有)

<http://hdl.handle.net/2115/42707>

- ② Salvador Zepeda, Shunichi Nakatsubo and Yoshinori Furukawa, Apparatus for single ice crystal growth from the melt, Rev. Sci. Inst., 80, 115102 (2009). (査読有)
- <http://hdl.handle.net/2115/42548>
- ③ E. Yokoyama, R.F. Sekerka and Y. Furukawa, Growth of ice disk: Dependence of critical thickness for ice disk instability on supercooling of water. Journal of Physical Chemistry, B113(2009)4733-4738. (査読有)
- ④ Salvador Zepeda, Yukihiro Uda and Yoshinori Furukawa, Directly probing the antifreeze protein kinetics at the ice/solution interface. Journal of Japanese Society for Crystal Growth, 35(2008)151-160. (査読有)
- <http://hdl.handle.net/2115/42637>
- ⑤ Zepeda, Salvador, Yokoyama, Etsuro, Uda, Yukihiro, Katagiri, Chihiro, Furukawa, Yoshinori, In-situ observation of antifreeze glycoprotein kinetics at the ice surface reveals a two-step reversible adsorption mechanism, Crystal Growth & Design, 8 (2008) 3666-3672. (査読有)
- ⑥ Hiroki Nada and Yoshinori Furukawa, Growth inhibition mechanism of an ice-water interface by a mutant of winter flounder antifreeze protein: a molecular dynamics study, Journal of Physical Chemistry, B112 (2008) 7111-7119. (査読有)
- ⑦ Yukihiro Uda, Salvador Zepeda, Fumitoshi Kaneko, Yoshiki Matsuura and Yoshinori Furukawa, Adsorption-Induced Conformational Changes of Antifreeze Glycoproteins at the Ice/Water Interface, Journal of Physical Chemistry, B111(2007)14335-14361. (査読有)
- ⑧ H. Nada and Y. Furukawa, Growth kinetics on interface between (2021) plane of ice and water investigated by a molecular dynamics simulation, Proceedings on International Conference on Physics and Chemistry of Ice, (2007)443-450. (査読有)

- ⑨ S. Zepeda, H. Nakaya, Y. Uda, E. Yokoyama, Y. Furukawa, Diffusion, incorporation, and segregation of antifreeze proteins at the ice/solution interface, Proceedings on International Conference on Physics and Chemistry of Ice, (2007) 669-676. (査読有)

[学会発表] (計 48 件)

- ① Y. Furukawa, Ice Crystal Growth—From Space Experiment to Biological Aspect. (Plenary lecture) The 3rd UT Horiba International Symposium and The 11th ISSP International Symposium (ISSP-11) on Hydrogen and Water in Condensed Matter Physics, 20 October 2009, Chiba
- ② Y. Furukawa, Antifreeze (glyco-) proteins— How do they affect ice crystal growth? (Invited lecture), 17th American Conference on Crystal Growth and Epitaxy (ACCGE-17), 12 August 2009, Lake Geneva, WI.
- ③ Y. Furukawa, Ice crystal growth —from space experiment to antifreeze— (Plenary lecture), 46th Annual Meeting of the Society for Cryobiology (CRYO2009), 20 July 2009, Sapporo.
- ④ Y. Furukawa, Reversible adsorption of antifreeze glycoproteins and ice growth (Invited lecture), NORDITA Symposium on Ice & Water in the Universe: from Astrobiology to Terrestrial Bodies. 23, September 2008, Stockholm.
- ⑤ Furukawa, Y., Zepeda, S., Nakaya, H., Uda, Y., Yokoyama, E., Behavior of antifreeze protein and glycoprotein at the ice/solution interface and ice growth kinetics during one-directional growth, American Chemical Society Fall 2007 National Meeting & Exposition, 20 August 2007, Boston.
- ⑥ Y. Furukawa, Diffusion, Adsorption and Incorporation of Antifreeze Protein Molecules at Growing Ice Interface (Invited lecture), Graduate School Initiative Young Brains 21 Program—Frontier of Crystal Growth Science (Tohoku Univ.), 10, February 2007, Sendai.

[図書] (計 1 件)

- ① Y. Furukawa and K. Nagashima,

Effects of additives on ice crystal growth in supercooled water, Recent Development of Chemistry and Photochemistry in Ice, Ed N. Takenaka, (Transworld Research Network, India) (2008) 27-48.

[その他]

(1) 新聞報道

北海道新聞2009年1月7日

「研究室探訪:自然現象を読み解く鍵」

(2) 本研究課題に関連する受賞

- ① Zepeda Salvador: 日本結晶成長学会奨励賞「不凍タンパク質の氷/水界面吸着と氷結晶成長抑制機構の解明」(2009年11月13日受賞)
- ② 灘 浩樹: 日本結晶成長学会論文賞「新しい水分子ポテンシャルモデルの開発とこれに基づく一連の氷結晶成長機構の分子レベルの解明」(2008年11月11日受賞)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 義純 (FURUKAWA YOSHINORI)

北海道大学・低温科学研究所・教授

研究者番号: 20113623

(2) 研究分担者

佐崎 元 (SAZAKI GEN)

北海道大学・低温科学研究所・准教授

研究者番号: 60261509

(3) 連携研究者

片桐 千仞 (KATAGIRI CHIHIRO)

北海道大学・低温科学研究所・助教

研究者番号: 90002245

横山 悦郎 (YOKOYAMA ETSURO)

学習院大学・計算機センター・教授

研究者番号: 40212302

灘 浩樹 (NADA HIROKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・環境管理研究部門・主任研究員

研究者番号: 90357682

金子 文俊 (KANEKO FUMITOSHI)

大阪大学・大学院理学(系)研究科・准教授

研究者番号: 70214468