

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 6月 8日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21360102

研究課題名（和文）不凍タンパク質及び不凍合成高分子の凍結抑制メカニズムの解明

研究課題名（英文）Explanation of antifreeze activity of antifreeze proteins and antifreeze synthetic polymers

研究代表者

稲田 孝明（INADA TAKAAKI）

独立行政法人産業技術総合研究所・エネルギー技術研究部門・主任研究員

研究者番号：60356491

研究成果の概要（和文）：不凍タンパク質や不凍合成高分子の水核活性抑制効果を解明するため、水核活性物質による化銀を用いて、氷の核生成実験を行った。その結果、不凍タンパク質や不凍合成高分子は、氷の結晶核に直接的に作用するのではなく、水核活性物質の表面に作用して氷の核生成を抑制していることがわかった。また、これまで不凍合成高分子として認識されていなかったいくつかの合成高分子が、よう化銀の水核活性に対して不凍タンパク質と同等の抑制効果を持つことを新たに確認した。

研究成果の概要（英文）：Inhibition of ice nucleation by antifreeze proteins (AFPs) and antifreeze synthetic polymers (AFSPs) was experimentally investigated by using silver iodide particles as ice nuclei. The results showed that AFP and AFSP molecules inhibit ice nucleation not by directly affecting ice-like water clusters, but by masking ice nucleating sites on silver iodide surfaces. A few synthetic polymers, previously not considered as AFSPs, were also found to inactivate the ice nucleating activity of silver iodide.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・熱工学

キーワード：氷、核生成、結晶成長、不凍タンパク質、合成高分子、生体機能利用

1. 研究開始当初の背景

不凍タンパク質（antifreeze protein: AFP）は寒冷地に棲む魚、昆虫、植物などが氷点下の環境で生存するために必要なタンパク質であり、平衡融解点以下で氷成長を完全に止める機能を持つ。AFP水溶液中で氷が成長できない平衡融解点以下の温度域（平衡融解点と凝固点の差）は、熱ヒステリシス（thermal hysteresis: TH）と呼ばれる。一説によれば、AFP分子は、特定の氷結晶面への選択的な吸

着により結晶成長を空間的に拘束し、結晶成長界面に曲率を持たせることで、ギブス・トムソン効果（G-T効果）を引き起こす。G-T効果は、界面の曲率半径に反比例して界面の凝固点を局所的に低下させる。その結果、非束一的な効果としてTHが顕在化する。

1960年代のAFP発見以来、G-T効果をはじめ多くの凍結抑制メカニズムが検討されているが、いまだ不明な点が多い。一方、AFPの応用技術は多数提案、実証されているが、生体由来のAFPは高コストであり、ほとんど

が実用化に至っていない。そこで、AFP を代替する不凍合成高分子 (antifreeze synthetic polymer: AFSP) の研究開発も行われている。研究代表者は以前に、AFSP としてポリビニルアルコール (PVA) を提案し、PVA が TH を示すことを発見した。これを機に、各国で AFSP の設計や応用研究が進行中である。しかし AFSP 単体で AFP と同等以上の凍結抑制効果を実現した例はなく、高性能な AFSP の戦略的分子設計のためには、AFP の凍結抑制メカニズムの解明が急務である。

2. 研究の目的

本研究の目的は AFP の凍結抑制メカニズム解明への貢献であり、そのために以下の(1)~(3)の研究を行うことを検討した。

(1) AF(S)P の融解抑制：従来の研究では、AFP 水溶液中で氷結晶の成長開始温度 (凝固点) は熱力学的な平衡融解点よりも下がるが、融解開始温度 (融解点) は平衡融解点に一致すると考えられてきた。しかし研究代表者は、G-T 効果に基づけば AFP による融解抑制も可能であり、結晶成長時の TH に加えて、平衡融解点と実際の融解点との差として新たな融解時の熱ヒステリシスの存在を予見している。そこで、負結晶 (水溶液が結晶に囲まれた系) を用いて氷結晶融解時の結晶モルフォロジーの観察及び融解時の熱ヒステリシスの検出を行い、AF(S)P の融解抑制を実証するとともに、AF(S)P の氷結晶成長・融解抑制メカニズムを考察する。

(2) AF(S)P の再結晶抑制：AF(S)P による氷の再結晶抑制効果については、結晶成長抑制効果とは独立した別の効果だという考え方が支配的である。しかし研究代表者は、再結晶抑制効果を結晶成長抑制効果によって理論的に説明できると考えている。そこで、顕微鏡により多結晶氷薄膜の再結晶を観察し、結晶粒界の形状変化をもとに AF(S)P の再結晶抑制メカニズムを解明し、再結晶抑制と結晶成長抑制の関係を明らかにする。

(3) AF(S)P の核生成抑制：AFP は氷の核生成抑制効果を持ち、AFSP やそれ以外の高分子でも核生成抑制効果を持つものが知られている。AF(S)P の核生成抑制効果に対しては、主に二つの考え方が提案されている。一つは、氷核活性物質 (ice nucleus: IN) 表面に AF(S)P 分子が作用して、IN 表面に存在する氷核活性サイトを覆ってしまうという考え方であり、もう一つは、IN 表面に発生する初期の氷 (結晶核) に対して AF(S)P 分子が作用し、結晶核の成長を止めるという考え方である。そこで、AF(S)P の核生成抑制効果の機序を調べる

ために、IN が水に含まれる場合と、含まれない場合のそれぞれについて、AF(S)P 及び一般的な高分子水溶液の核生成温度を測定する。さらに AF(S)P の核生成抑制効果と結晶成長抑制効果との関係を明らかにする。

以上の(1)~(3)の研究の目的に対し、進捗状況に応じて研究内容を取捨選択することも念頭に、研究を開始した。その後、1、2年目の予備的な測定の結果を踏まえて、研究成果のインパクトの大きさや、実現性を考慮し、最終的には(3)を目的とした研究に特化することとした。そこで以下では、(3)の研究方法及び成果について述べる。

3. 研究の方法

W/O (water-in-oil) エマルジョンを冷却しながら顕微鏡観察によって水滴の凍結を検出し、個々の水滴について核生成温度を測定することにより、AF(S)P が氷の核生成に及ぼす影響を調べた。測定は、AF(S)P 水溶液に IN が含まれない場合と、意図的に特定の IN を懸濁した場合のそれぞれについて行った。多数の水滴を含んだ W/O エマルジョンを使用することにより、不純物として水に混入した IN をごく一部の水滴に隔離することができ、このような予期しない IN 混入の影響を極力排除することが可能となる。

使用した AFP は、AFP I (分子量 $M=3300$) と AFP III ($M=7000$) の二種類で、いずれも A/F Protein 社から購入した。既知の AFSP としては、PVA (重量平均分子量 $M_w=13,000$ ~ $23,000$ 、けん化度 0.98) を用いた。そのほかに、これまで AFSP としては認識されていなかった合成高分子として、ポリビニルピロリドン (PVP) ($M_w=10000$)、ポリエチレングリコール (PEG) (数平均分子量 $M_n=10000$)、ポリアクリルアミド (PAM) ($M_w=10000$) も用いた。IN としては、よう化銀 (AgI) 微粒子を使用した。

W/O エマルジョンの作成方法を簡単に説明する。まず *n*-ヘプタンに乳化剤としてソルビタントリスチアレート (SPAN 65) を 4 wt% 溶解し、これを連続相とする。この連続相と、分散相となる AF(S)P や高分子の水溶液とを体積比 2:1 で混合し、ホモジナイザーで 6 分間、12000 rpm で攪拌して W/O エマルジョンとする。さらに、顕微鏡観察を容易にするために、*n*-ヘプタンで 10 倍に希釈し、最終的にはこれを W/O エマルジョン試料として使用した。なお、水溶液に AgI 微粒子を懸濁する場合には、まず市販の AgI 微粒子を超音波振動で純水中に分散させ、その後すみやかにろ過することにより、粒径 3 μm 以下の微粒子だけを選別し、これを水溶液に懸濁した。

エマルジョン中の水滴凍結の確認には、光

学顕微鏡観察を用いた (図 1a)。エマルジョン試料は、50 μm のスペーサーを介して二枚のカバーガラスで挟む (図 1b)。この観察用試料を銅製の試料セル内に置き、液体窒素とヒーターを用いて温度制御することにより、4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の一定速度で 10 $^{\circ}\text{C}$ から -50 $^{\circ}\text{C}$ まで冷却した。冷却中は、試料セル底部から透過光を導入し、光学顕微鏡で試料を連続的に撮影する。水滴は凍結によって体積膨張するため、撮影画像中で体積膨張を確認できた時点での試料温度を氷の核生成温度 T_f とし、画像中のすべての水滴について個別に T_f を求めた。

4. 研究成果

(1) 氷核活性物質を含まない測定

まずは、水溶液に AgI を懸濁させない場合の測定結果を説明する。水、AFP III、PVA、PVP、PEG 水溶液について、水滴径 d と核生成温度 T_f の関係を図 2 に示す。水溶液濃度は 10 mg/ml で、総水滴数 n は、どの水溶液でも 1000 個以上である。比較のため、純水における均質核生成温度の既存データを実線で示した。測定された純水の T_f の d に対する傾向は実線とほぼ一致していることから (図 2a)、今回の W/O エマルジョンを用いた測定によって、水滴中に含まれる不純物の IN の影響をほぼなくすことができたと考えられる。

AFP III、PVP 及び PEG 水溶液の T_f については、純水と比較して大きな差は認められず (図 2b, d, e)、AFP III、PVP 及び PEG が T_f に対して顕著な影響を及ぼさないことがわかる。AFP III に関しては、比較的高い T_f (-36 <

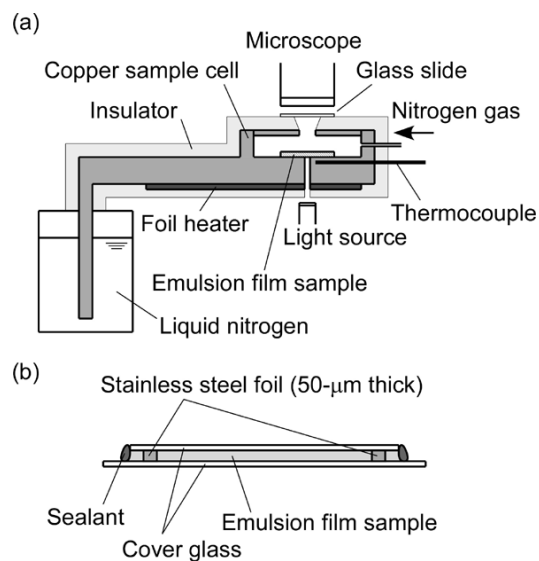


図 1 氷の核生成測定装置
(a) 全体図、(b) 観察用エマルジョン試料

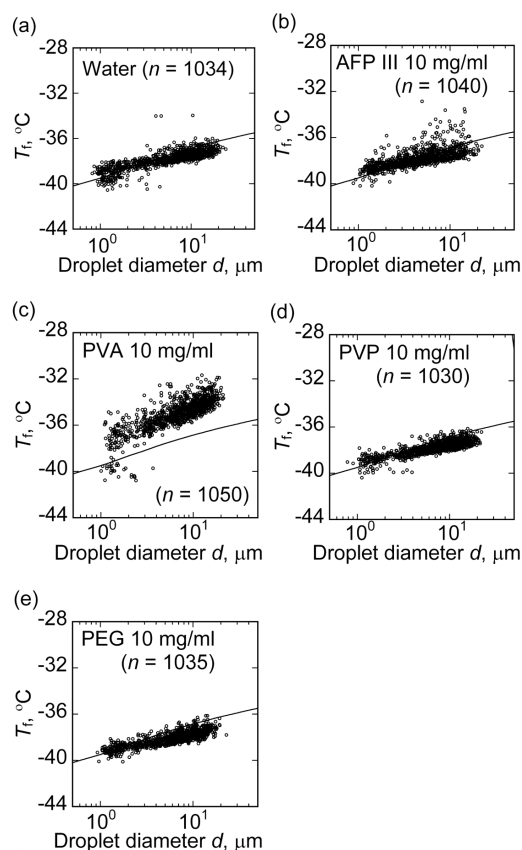


図 2 IN が存在しない条件下での氷の核生成温度に対する AFP 及び高分子の影響 (実線は既存の均質核生成のデータ)
(a) 純水、(b) AFP III 水溶液、(c) PVA 水溶液、(d) PVP 水溶液、(e) PEG 水溶液

$T_f < -32$ $^{\circ}\text{C}$) を示すデータがいくつか存在するが (図 2b)、これは AFP III の試薬に含まれる不純物が IN として機能したことが原因と思われる。一方、PVA 水溶液の T_f は、純水の T_f よりも明らかに高い傾向にある (図 2c)。これは、PVA 分子が水溶液中で微小なゲル構造を形成することによって、IN として機能していることを示唆している。

AFP III、PVP、PEG が W/O エマルジョン中の氷の核生成に影響しないことを確認するために、古典的な核生成理論に基づいた手法により、測定結果から核生成頻度 J を求めた。なお、一般に水滴径が小さいときには、水滴内部からの氷の核生成よりも、水滴表面近傍での氷の核生成が支配的となり、今回の測定においても水滴表面近傍での核生成が起こりやすいことを別途確認しているため、ここでは J を単位表面積、単位時間あたりの核生成頻度として求めている。

純水、AFP III、PVA、PVP、PEG 水溶液について、 J と試料温度の関係を図 3 に示す。グラフの横軸 τ は $\Delta T^{-2} T^{-3}$ で定義している。なお、 T は試料の絶対温度、 ΔT は過冷度 (融

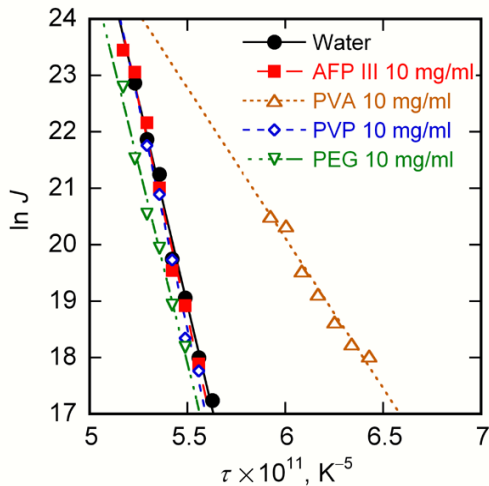


図 3 IN が存在しない条件下での水の核生成頻度に対する AFP 及び高分子の影響

点と試料温度との差)を表す。すべての水溶液において、図中の $\ln J$ と τ は線形関係を満たしており、これは古典的核生成理論に矛盾しない結果である。

AFP III 及び PVP 水溶液の $\ln J$ と τ の関係については、純水の場合と有意な差が認められず、IN を排除した条件下では、AFP III 及び PVP が水の核生成頻度に影響を及ぼさないことが確認できる。したがって、AFP III 及び PVP に関しては、氷の結晶核に直接作用して核生成を抑制することは困難だと結論づけられる。PEG 水溶液の結果は、純水の場合と比べてやや左側にシフトしており、 T_f に換算すると、約 0.4°C 低温側へシフトしている。この結果は、PEG 水溶液の束一的な融点降下と関連して説明できるため、PEG についても、氷の結晶核に直接作用して核生成を抑制することは困難だと言える。

一方 PVA 水溶液の $\ln J$ は、同じ温度で比較すると純水の場合よりも高い値を示す傾向にあり、PVA が氷の核生成を促進していることは明らかである。PVA は AFSP の一種と考えられているが、前述のとおり PVA 分子自体が IN として機能している可能性がある。

(2) 氷核活性物質を含んだ測定

水溶液に IN として AgI 微粒子を意図的に懸濁させた場合の測定結果を説明する。なお、水滴 1 個あたりに懸濁する AgI 微粒子の個数 N を制御することは困難だが、ここでは $2 \leq N \leq 8$ となる水滴を抜き出して測定対象とした。また水滴径については、 $5 < d < 25 \mu\text{m}$ を満たす水滴だけを測定対象とした。

試料温度 T と未凍結水滴の割合 f との関係を、濃度 0.01 及び 1 mg/ml の水溶液について、それぞれ図 4a, b に示す。図中の実線は AgI 微粒子を懸濁せずに調整した ($N=0$) 純水水

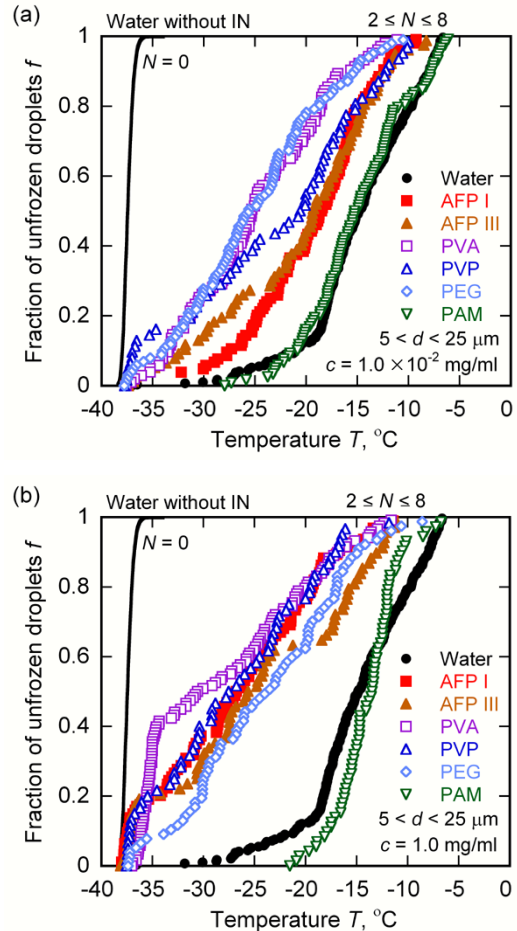


図 4 AgI の氷核活性に対する AFP 及び高分子の影響、(a) 0.01 mg/ml 、(b) 1 mg/ml

滴の測定結果を、黒塗り記号 (\bullet) は AgI 微粒子を含んだ ($2 \leq N \leq 8$) 純水水滴の測定結果を表す。AgI を懸濁させなかった純水水滴の T_f は -37°C 付近の狭い温度範囲に分布しており、この温度は従来報告されている同じ大きさ ($5 < d < 25 \mu\text{m}$) の純水水滴の均質核生成温度にはほぼ一致する (図 2 参照)。これに対して、AgI を含んだ純水の T_f は広い温度範囲 ($-37.1 < T_f < -6.6^\circ\text{C}$) に分布しており、 -20°C で 8 割以上の水滴が凍結していることから、AgI の氷核活性効果は十分に大きいことが確認できる。

図 4a の結果では、PAM 以外のすべての水溶液で純水 (記号 \bullet) に比べて T_f が低くなっている。 0.01 mg/ml の低濃度においても、AFP I、AFP III、PVA、PVP、PEG のすべてが氷の核生成抑制に貢献し、AgI の氷核活性を抑制していることがわかる。この濃度においては、AFP よりも合成高分子の方が氷核活性の抑制効果が高い。図 4b の結果からは、AFP I、AFP III、PVA、PVP では、濃度を 1 mg/ml と高くすると氷核活性の抑制効果が大きくなることわかる。特に AFP I、AFP III、PVP

については、1割以上の水滴の T_f が純水の均質核生成温度とほぼ一致しており、これらの水滴では AgI の氷核活性が完全に抑制されていると考えられる。なお、図 2, 3 に示したとおり PVA はそれ自身が IN としても機能し、AgI を含まない場合の PVA 水溶液の T_f は、濃度 1 mg/ml の場合には純水に比べて約 2°C 高くなる。したがって図 4b から、PVA については約 4 割の水滴で AgI の氷核活性を完全に抑制していることがわかる。

次に、AFP III、PVP 水溶液について T と f の関係の濃度依存性を調べた結果を図 5 に示す。水溶液の濃度低下に伴い、AgI に対する氷核活性抑制効果は小さくなる。どちらの水溶液においても、濃度 1 mg/ml では、1 割以上の水滴が純水の均質核生成温度とほぼ同じ T_f を示すが、0.0001 mg/ml まで濃度を下げると、均質核生成温度まで過冷却を維持する水滴はほとんど存在しなくなり、AgI に対する氷核活性抑制効果も検出できなくなる。

(3) 考察

図 2~5 の結果を総合すると、AFP や合成

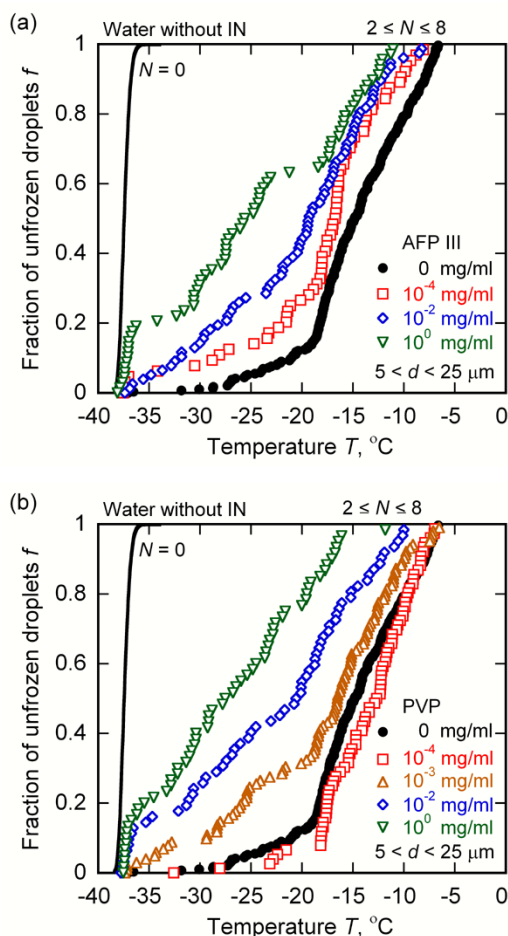


図 5 AgI の氷核活性に対する AFP 及び高分子濃度の影響、(a) AFP III、(b) PVP

高分子は、氷の結晶核に対して直接的に作用するわけではなく、IN 表面の氷核活性サイトに対して作用することによって、氷の核生成を抑制していると結論づけることができる。

図 4, 5 の結果で特筆すべきは、IN の存在下でも、AF(S)P によって T_f が均質核生成に近い温度域まで下がることを確認できた点である。AF(S)P が IN の氷核活性を完全に抑制したという例は、研究代表者が知る限りにおいて、これまでに報告されていない。今回このような結果が得られた理由の一つに、IN として AgI を用いたことが挙げられる。従来の研究では、ほとんどの場合に IN として氷核活性細菌が使用されている。AFP や今回使用した合成高分子は、氷核活性細菌よりも AgI に対して強い抑制効果を示すのかもしれない。

もう一つの特筆すべき点は、従来 AF(S)P として認識されていなかった PVP と PEG にも AgI の氷核活性を抑制する効果が見られ、しかも AFP と同等かあるいはそれ以上の効果を示していることである。この結果は、ほかに多くの合成高分子が氷核活性抑制効果を持つ可能性を示唆しており、今後さまざまな分野での応用を期待させる。

1 章でも述べたとおり、AFP は氷の核生成を抑制する効果とは別に、氷の結晶成長を平衡融解点以下の温度で完全に抑制する、すなわち TH を示すことでも知られている。PVA も TH を示すことが確認されているが、その値は AFP に比べると 1~2 桁小さく、また PVP や PEG では有意な TH は検出されていない。それに対して、PVA、PVP、PEG による氷の核生成抑制効果は、図 4 に示したように、AFP に匹敵する、あるいはそれ以上である。このことは、TH と氷の核生成抑制との直接的な関連を否定しており、AFP による結晶成長抑制効果と核生成抑制効果の機序が異なることを示唆している。

最後に、今後の展望について簡単に触れておく。2 章でも述べたとおり、当初予定していた研究のうち、AF(S)P による融解抑制については予備的な測定を行うにとどめた。その理由の一つに、本研究期間中に、海外の研究グループが融解時の熱ヒステリシス検出にいち早く成功したという背景がある (Y. Celik et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107 (2010), 7914)。ただし、彼らの検出した融解時の熱ヒステリシスは、研究代表者が予想していた数値よりも 1~2 桁小さい。今後は、測定手法を工夫してより大きな融解時の熱ヒステリシスの検出を試み、本研究を発展させて、不凍タンパク質及び不凍合成高分子の凍結抑制効果の解明をさらに進める予定である。

また、今回得られた結果に基づき、過冷却水用の熱交換器の安定運転 (凍結閉塞防止)

に AFSP を適用する試みを進めており、今後は応用技術への展開も視野に入れて本研究を発展させていく予定である。

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 5 件)

- ① 稲田孝明、小山寿恵、後藤文俊、瀬戸章文、Inactivation of ice nucleating activity of silver iodide by antifreeze proteins and synthetic polymers、Journal of Physical Chemistry B、査読有、Vol. 116、No. 18、2012、pp. 5364-5371、DOI: 10.1021/jp300535z
- ② 桑原慎子、春日純、Donghui Wang、福士幸治、荒川圭太、小山寿恵、稲田孝明、藤川清三、Freezing activities of flavonoids in solutions containing different ice nucleators、Cryobiology、査読有、Vol. 64、No. 3、2012、pp. 279-285、DOI: 10.1016/j.cryobiol.2012.02.012
- ③ 稲田孝明、小山寿恵、不凍タンパク質による氷の核生成制御、冷凍、査読無、86 巻、1005 号、2011、pp. 569-575、なし
- ④ 桑原慎子、春日純、Donghui Wang、福士幸治、荒川圭太、小山寿恵、稲田孝明、藤川清三、Change of supercooling capability in solutions containing different kinds of ice nucleators by flavonol glycosides from deep supercooling xylem parenchyma cells in trees、Cryobiology、査読有、Vol. 63、No. 3、2011、pp. 157-163、DOI: 10.1016/j.cryobiol.2011.06.001
- ⑤ 稲田孝明、小山寿恵、後藤文俊、瀬戸章文、Ice nucleation in emulsified solutions of antifreeze protein type III and poly(vinyl alcohol)、Journal of Physical Chemistry B、査読有、Vol. 115、No. 24、2011、pp. 7914-7922、DOI: 10.1021/jp111745v

[学会発表] (計 7 件)

- ① 稲田孝明、不凍タンパク質の機能とその応用 (基調講演)、2011 年度日本冷凍空調学会年次大会、2011 年 9 月 14 日、東京大学 (東京都)
- ② 稲田孝明、小山寿恵、上平未枝、後藤文俊、瀬戸章文、氷の核生成に対する不凍タンパク質の効果についての考察、2011 年度日本冷凍空調学会年次大会、2011 年 9 月 14 日、東京大学 (東京都)
- ③ 稲田孝明、Applications of antifreeze proteins and antifreeze synthetic polymers in ice slurry systems、1st International

Ice-Binding Protein Conference、2011 年 8 月 6 日、Queen's University (カナダ)

- ④ 稲田孝明、小山寿恵、後藤文俊、瀬戸章文、よう化銀の氷核活性に対する高分子の影響、第 48 回日本伝熱シンポジウム、2011 年 6 月 2 日、岡山コンベンションセンター (岡山県)
- ⑤ 後藤文俊、瀬戸章文、大谷吉生、小山寿恵、稲田孝明、W/O エマルションを用いた氷の核生成に及ぼす添加物の影響、化学工学会第 42 回秋季大会、2010 年 9 月 6 日、同志社大学 (京都府)
- ⑥ 稲田孝明、小山寿恵、後藤文俊、瀬戸章文、不凍タンパク質水溶液中の氷の均質核生成、第 47 回日本伝熱シンポジウム、2010 年 5 月 28 日、札幌コンベンションセンター (北海道)
- ⑦ 稲田孝明、船越邦夫、熱交換器における水の過冷却維持に対する添加物の影響、2009 年度日本冷凍空調学会年次大会、2009 年 10 月 21 日、中央大学駿河台記念館 (東京都)

[その他]

ホームページ等

http://staff.aist.go.jp/t-inada/index_jp.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲田 孝明 (INADA TAKAAKI)
独立行政法人産業技術総合研究所・エネルギー技術研究部門・主任研究員
研究者番号：60356491

(2) 研究分担者

平野 聡 (HIRANO SATOSHI)
独立行政法人産業技術総合研究所・エネルギー技術研究部門・研究グループ長
研究者番号：60357861

(3) 連携研究者

船越 邦夫 (FUNAKOSHI KUNIO)
鈴鹿工業高等専門学校・生物応用化学科・講師
研究者番号：00533457

瀬戸 章文 (SETO TAKAFUMI)
金沢大学・自然システム学系・准教授
研究者番号：40344155