

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656149

研究課題名(和文) 不凍タンパク質の融解抑制機能の発現

研究課題名(英文) Inhibition of ice melting by antifreeze protein

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：寒冷地の生物が持つ不凍タンパク質(AFP)は、氷の成長を抑制する機能を持つことで知られている。一方、AFPによる氷の融解抑制機能も期待されているが、これまでに有意な融解抑制効果を定量的に測定できた例はほとんどない。本研究では、AFP水溶液が氷結晶に囲まれた系(負結晶)でのみAFPの融解抑制が検出できるという仮説を立て、実際に負結晶を利用して氷結晶の融解実験を行った。その結果、AFP水溶液の平衡融点よりも高い温度域で、AFPが特異な氷結晶面に作用することにより、氷の融解が停止することが確認された。

研究成果の概要(英文)：Antifreeze protein (AFP), which has been discovered in several organisms living in cold regions, has a function to inhibit ice growth. AFP is also expected to inhibit ice melting. However, there are few reports on melting inhibition by AFP. In this study, melting of ice crystal was examined using a negative crystal system, where AFP solution is surrounded by an ice crystal, based on the hypothesis that the melting inhibition can be detected only in a negative crystal system. The results showed that AFP can inhibit ice melting at temperatures even above the equilibrium melting temperature by acting on specific ice crystal planes.

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：氷結晶 不凍タンパク質 融解 結晶成長 負結晶

1. 研究開始当初の背景

不凍タンパク質 (AFP: antifreeze protein) は氷に対して複数の特殊な機能を持ち、寒冷地の生物の生存戦略の一翼を担っている。中でも AFP が平衡融点以下でも氷の成長を止める機能については、これまでに多くの研究が行われてきた。平衡融点以下で氷の成長が完全停止する温度領域 (FH: freezing hysteresis) は、AFP の効果を表す代表的な指標となっている。

AFP が氷の結晶成長を抑制する機能を説明する有力な考え方として、Gibbs-Thomson 効果 (G-T 効果) が挙げられる。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。AFP 分子は、特定の氷結晶面への選択的な作用によって結晶成長を空間的に拘束し、結晶成長界面に曲率を与えることで、G-T 効果を引き起こすと考えられている。その結果、非束一的な効果として FH が検出される。しかし、FH の要因となる AFP 分子と氷結晶面との相互作用には不明な点が多く、国内外でその解明を目指した研究が盛んである。

一方、G-T 効果に基づけば、AFP による氷の融解抑制も可能なはずであり、実際に融解抑制を示唆する結果も古くから報告されている (C.A. Knight, A.L. DeVries, Science, 245 (1989), 505.)。本研究提案の前年には、海外の研究グループが、平衡融点以上で氷の融解が完全に抑制される温度領域 (MH: melting hysteresis) の定量的な検出に初めて成功した (Y. Celik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107 (2010), 5423.)。しかし、そこで報告された MH は、FH と比べて 1~2 桁も小さい値であった。

研究代表者も、これまでの自身の研究成果から AFP による融解抑制効果の存在を支持しており、さらに G-T 効果に基づけば、FH と同じオーダーの MH の検出が可能だと考えている。従来の研究において FH と同オーダーの MH が検出されなかったのは、測定対象となる結晶の形状によって、MH が見かけ上小さく測定されてしまうためであり、結晶形状の工夫によっては、FH と同オーダーの AFP 本来の MH の測定も可能だと推測して、本研究の提案に至った。

2. 研究の目的

本研究では、魚の AFP の一種である III 型 AFP を用いて、従来報告されている MH (0.02 °C) と比べて 1 桁以上大きい、FH と同じオーダーの MH の値を検出することを目的とする。MH の測定値は氷の結晶形状に影響を受けるため、従来の研究では AFP の本来の MH を過小評価していると考え、本研究では負結晶の系 (水溶液が結晶に囲まれた系) で測定を行うことにした。

具体的な手法としては、負結晶中に AFP 水

溶液を保持して温度制御を行い、観察から氷結晶の融解速度を求め、平衡融点以上の温度で結晶の融解が停止する温度領域 MH の検出を目指す。

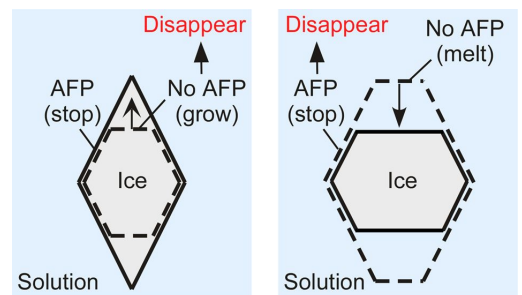
3. 研究の方法

(1) 融解抑制の結晶形状依存性の仮説

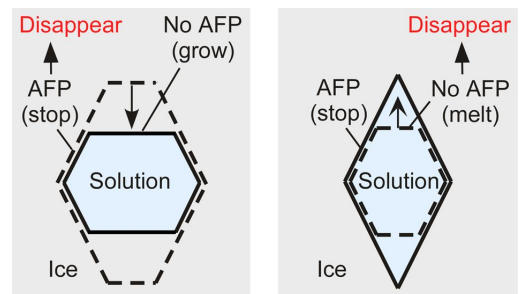
まず、本研究提案の前提となっている FH と MH の結晶形状依存性について、研究代表者の仮説を説明する。

ここでは、周囲を水溶液に囲まれた結晶を正結晶、周囲を結晶に囲まれた空間を負結晶と定義する (図 1)。特定の氷結晶面に対する AFP 分子の選択的作用により、本来の FH 及び MH の温度範囲では、AFP が作用した氷結晶面の成長及び融解速度がそれぞれ 0 になると仮定し (図 2: 実線) 正・負結晶それぞれの系において氷の成長形と融解形を考察する。簡単のため、結晶を二次元的に扱い、AFP が作用して成長・融解が止まる結晶面と、AFP が作用せずに成長・融解が止まらない結晶面の、二種類の結晶面のみが存在すると仮定する (図 1)。

正結晶系の氷の成長形では (図 1a)、成長速度 0 の AFP 作用面が支配的になり、FH の温度域では AFP 作用面に囲まれて氷の結晶成長は完全に止まる。正結晶系の氷の融解形では (図 1b)、融解速度が速い AFP 非作用面が支配的になり、AFP 作用面の面積が減少していくため、MH の温度域でも融解は止まらず、やがて氷結晶は完全に融解する。一方、負結晶系の氷の成長形では (図 1c)、成長速



(a) 正結晶 (氷成長) (b) 正結晶 (氷融解)



(a) 負結晶 (氷成長) (b) 負結晶 (氷融解)

図 1 結晶形状と成長・融解抑制の関係

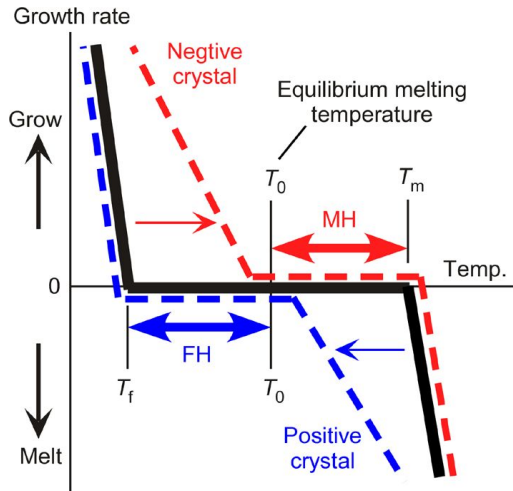


図2 凍結ヒステリシス (FH) と融解ヒステリシス (MH) の結晶形状依存性の概念

度が速い AFP 非作用面が支配的になり、AFP 作用面の面積が減少していくため、FH の温度域でも氷の成長は止まらず、溶質 (AFP 分子) の濃縮を無視すれば、水溶液はすべて結晶化して負結晶は閉じる。負結晶系の融解形では (図 1d) 融解速度 0 の AFP 作用面が支配的になり、MH の温度域では AFP 作用面に囲まれて、氷結晶の融解は完全に止まる。

G-T 効果に基づけば、本来 FH と MH の大きさは同じオーダーとなるはずである。しかし図 1、2 の仮説に従えば、通常の正結晶系の測定では、MH の温度域で AFP が作用した結晶面の融解が止まったとしても、結晶形状の影響によって氷結晶は完全に融解してしまう (図 1b)。これが、従来の研究で MH が検出されなかった主要因だと考えられる (図 2: 青点線)。逆に負結晶系で測定を行えば、FH の温度域であっても氷の成長が止まらない状況が起こるが (図 1c)、MH の温度域では AFP が作用した結晶面を残して氷の融解を止めることができるはずである (図 2: 赤点線)。

以上のような仮説のもと、本研究では、FH と同オーダーの AFP 本来の MH を検出するために、単結晶氷を用いて結晶の方位が特定されている負結晶系を作成し、氷の融解を観察する。

(2) 負結晶の作成方法

本研究で使用した装置はアクリル製の二重容器であり、内槽に単結晶氷 (10 × 10 × 15 mm) を設置でき、外槽には温度可変の透明な液冷媒が循環する構造となっている (図 3)。負結晶を作成する際には、図 3 の白金抵抗温度計とヒーターを使わず、代わりに真空ポンプ及びピラニゲージと接続された注射針 (24G) を、針の先端が単結晶氷の中心に位置するように、上部から氷を融解させながら差し込む。注射針を所定の位置に設置したら、融解した針の周囲をゆっくりと凍結させ

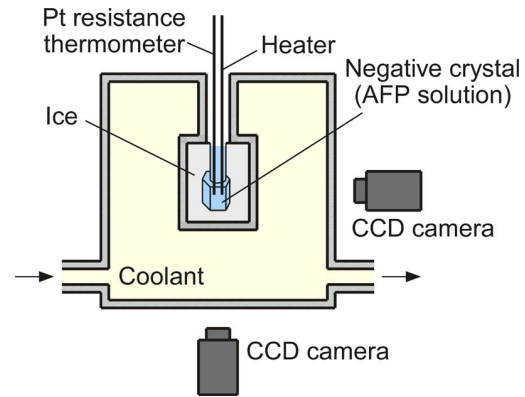


図3 測定装置の概要

る。その後、注射針の先端から単結晶氷の内部を真空ポンプで減圧し、氷結晶を内部から昇華させることによって負結晶の系を作成する。

本研究においては、できるだけ安定な形状の負結晶が作成できる条件として、負結晶作成時の氷の温度を約 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ とし、氷結晶の昇華速度が数十 $\mu\text{m/h}$ となるように、負結晶内部の圧力を数百 Pa に調整した。この手法によれば、六方晶系の氷結晶 Ih の平衡形を反映した、大きさ数 mm 程度の六角柱状の負結晶を作成することができる。したがって、負結晶の形状から直接的に六方晶系の結晶軸を特定することができ、氷結晶の成長・融解過程で出現する結晶面の指数を正確に同定することが可能となる。

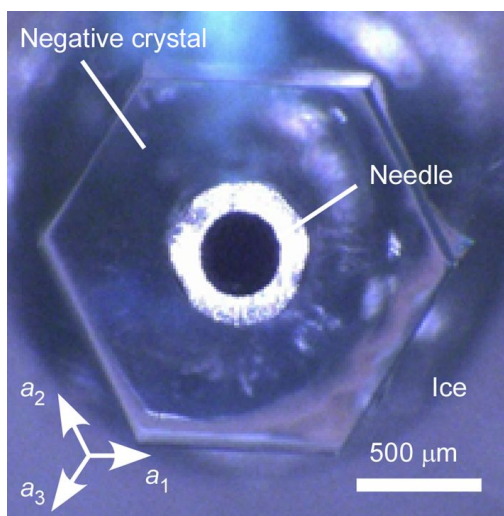
(3) 負結晶系での氷融解測定方法

生成した負結晶の内部に、 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ に調整した 0.5 mg/mL の III 型 AFP の水溶液を、シリンジポンプを使って注入する。その際に、装置外槽の液冷媒の温度を微調整し、単結晶氷の周囲をわずかに融解して水膜の存在を確認し、この状態を測定終了時まで保つようにした。単結晶氷の周囲を、融解した液相の純水と共存させることにより、単結晶氷の外側の温度境界条件を常に $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ に維持することが可能となる。その後、装置上部から温度制御用の銅線 (ヒーター) を AFP 水溶液に直接浸漬し、装置直上での銅線の温度を変えることによって、白金抵抗温度計によって測定される水溶液の温度を制御した (図 3)。氷結晶の融解過程の観察には長焦点距離レンズと CCD カメラを用い、装置下面及び側面の二方向から、結晶融解の過程で現れる特異な結晶面を調べる。

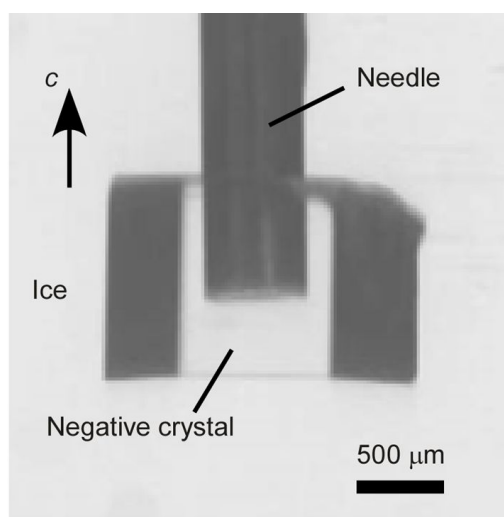
4. 研究成果

(1) 負結晶作成

上述の方法で作成した負結晶の観察例を図 4 に示す。図 4a は下からの観察画像、図 4b は横からの観察画像である。注射針の先端から減圧することにより、針の先端を中心と



(a) 下からの画像



(b) 横からの画像

図4 負結晶の作成

した六角柱形の負結晶を作成できる。単結晶は、 c 軸が注射針とほぼ平行になるように設置しており、負結晶の六角柱形の上面と下面がベーサル面に対応し、六つの側面がプリズム面に対応する。この画像から、単結晶氷の結晶方位を正確に把握することができる。

(2) 負結晶における氷の融解挙動

一例として、負結晶内部を 0.5 mg/mL の AFP 水溶液で満たし、水溶液温度を $0.09 \text{ }^\circ\text{C}$ に維持したときの横方向からの画像を図5に示す。ここで、 0.5 mg/mL の AFP 水溶液のモル凝固点降下は無視できるため、水溶液温度はそのまま過熱度と読み替えることができる。負結晶の下側の部分に、ピラミッド状の特異な結晶面が現れており、この結晶面の融解は停止している。水溶液に十分に大きな過熱度 ($0.09 \text{ }^\circ\text{C}$) を与えた条件で氷結晶の融解が停止したことから、この観察結果が MH の存在を示しているのは明らかである。

今回使用した III 型 AFP 水溶液の 0.5 mg/mL

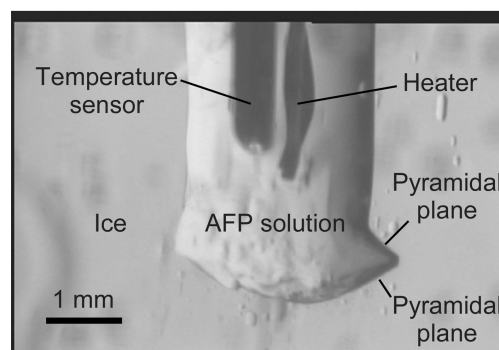


図5 負結晶系の氷結晶融解の様子 (水溶液過熱度 $0.09 \text{ }^\circ\text{C}$)

における FH の値を別途測定したところ、約 $0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ であった。すなわち、FH の $1/2$ 程度の大きさの過熱度においても、氷結晶の融解が停止したことになる。従来報告されている MH が FH の値に対して $1\sim 2$ 桁小さいことを考えると、今回の測定で負結晶系を用いたことによって、検出される MH の値が大きくなる可能性を示せたと言える。

なお、成長停止するピラミッド状の結晶面は、過熱度の条件や氷結晶の融解過程 (負結晶形状の変化の過程や温度履歴) によって影響を受けることがわかっており、融解停止に至るまでの固液界面近傍での AFP 分子の挙動とも関連して、さらなる実験結果の蓄積と考察が必要である。

(3) 現状の課題と今後の展望

本研究の最大の成果は、図5に示した通り、従来報告されている結果よりも大きな MH を検出できる可能性を示すことができた点にある。この結果から、本研究の提案時に立てた仮説、すなわち、G-T 効果に基づけば FH と MH は同じオーダーとなるという仮説と、測定される FH と MH の値は結晶形状に依存し、FH と同じオーダーの MH を測定するためには負結晶系が必要であるという仮説は、正しかったと考えている。

その一方で、当初の目標であった MH の定量的な検出には、厳密な意味では現在のところ到達できていない。その理由の一つとして、水溶液の温度制御の難しさが挙げられる。周囲を氷結晶で囲まれた μL オーダーの空間で、AFP 水溶液の温度を局所的に制御するためには、周囲からの熱侵入を十分に考慮した上での熱的な制御が必要である。この問題に対しては、研究期間の終盤になって、ヒーターの改良によって $0.01 \text{ }^\circ\text{C}$ 単位での水溶液の温度制御が可能となり、現在もさらなる改善に取り組んでいる。

MH の定量的な検出に至らなかったもう一つの理由は、氷・水界面の温度測定の難しさにある。負結晶系の測定における AFP 水溶液及び氷結晶の温度分布を、わかりやすく一次的に表したのが図6である。実験では、氷結晶の周囲を液相の純水と共存させている

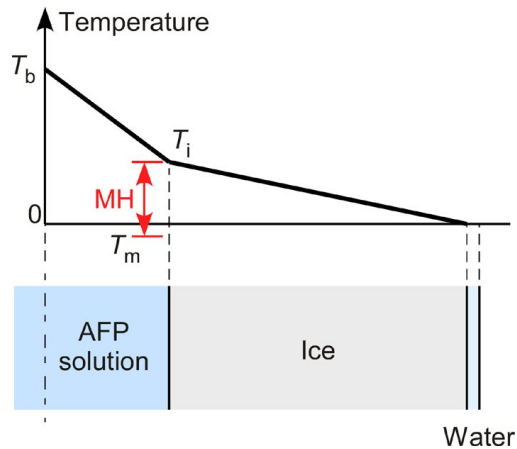


図6 水溶液及び氷内部の温度分布

ため、氷結晶の周囲温度は 0°C である。実験で計測している温度は、水溶液の中心位置の温度 T_b に対応しており、水溶液及び氷には温度分布が存在する。氷の融解が停止している状況では、水溶液側から氷側への熱流束は場所によらず一定となる。このとき、厳密な意味でMHの値を検出するためには、氷・水界面の温度 T_i の値が必要であり、AFP水溶液の平衡融点を T_m とすると、 $\text{MH} = T_i - T_m$ となる(図6)。

しかし、 T_i を精度よく直接測定することは困難である。当初は氷・水界面近傍で単結晶氷内部の温度を計測し、その値から T_i を推算する予定であったが、氷内部にセンサーを挿入するとセンサー周囲がわずかに融解し、センサーの温度は常に 0°C となってしまうことが判明した。そのため現在は、 T_b の測定値を用いて T_i の値を数値的に二次元のモデルで計算し、MHの正確な値を得ることを計画中である。

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1件)

稲田孝明、富田博之、小山寿恵、Ice nucleation in water droplets on glass surfaces: From micro- to macro-scale、International Journal of Refrigeration、査読有、vol. 40、2014、pp. 294-301、DOI: 10.1016/j.ijrefrig.2013.11.024

〔学会発表〕(計2件)

稲田孝明、富田博之、小山寿恵、固体・水界面での氷の核生成に対する接触面積の影響、日本機械学会熱工学コンファレンス2013、2013年10月19~20日、弘前大学(弘前市)

稲田孝明、小山寿恵、富田博之、固体面を起点とする氷の核生成についての考察、2013年11月26~27日、神戸大学(神戸市)

〔その他〕

ホームページ等

https://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