

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 for the enhancement and self-oscillation of ice growth induced by biological macromolecules

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：氷結晶 生体高分子 結晶成長 不凍タンパク質 自励振動 吸着

1. 研究計画の概要

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 glycoprotein (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。これは、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改変と、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、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添加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、塩などの無機の小分子が添加物である場合には決して観察されない。

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う。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」を目指す。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・耐寒冷戦略のメカニズム解明を物理的手法で目指すという生命科学的役割も果たす。

2. 研究の進捗状況

①当初の計画以上に進展している。

理由： 蛍光分子でラベルした AFGP の水溶液中での氷単結晶の自由成長を行い、共焦点蛍光顕微鏡によりその場観察実験を行った。その結果、氷/水界面への AFGP 分子の吸着が結晶成長を抑制することを世界で初めて実証した。さらに、AFGP の吸着は不完全吸着から完全吸着へと移行する二段階で起こること、完全吸着といっても、界面からの離脱も簡単に起こり、可逆的な吸着であることを明らかにした。さらに、AFGP 分子が氷/水界面に吸着すると、その二次構造がランダムコイルから α -ヘリックスに変化し、不完全吸着から完全吸着状態に移行することを示した。

これらの実験結果をもとに、AFGP の界面吸着に対する新しい理論モデルとして、「二段階可逆吸着モデル」を提唱した。これは、結晶成長駆動力に対する成長速度依存性がヒステリシス特性を持つことに起因することが理論的に証明され、数理モデル構築も最終段階にある。さらに、結晶成長速度の自励振動も、このモデルにより説明される。

一方、 α -ヘリックス構造を持つ AFP タイプ I が氷/水界面に吸着した条件で、氷結晶成長過程の分子動力学シミュレーションにも成功した。その結果、界面に対するタンパク質分子の方位によって吸着状態が大きく異なることが明らかになった。すなわち、不完全な吸着では氷の結晶成長が抑制されないが、分子の向きが変化して完全な吸着状態が実現した時点で成長が完全に抑制される。これは、実験とも良く一致するもので、「二段階可逆吸着モデル」の正当性を証明するものである。

3. 現在までの達成度

氷/水界面への、AFGP/AFP の吸着状態を実験・理論・計算機シミュレーションにより明らかにし、「二段階可逆吸着モデル」を提唱した。従来のモデルでは、不凍タンパク質分子が非可逆的に界面吸着するため氷の結晶成長が抑制されるとされてきたが、このモデルではもはや説明が困難な結晶成長現象が次々と明らかになる状況であった。我々の提唱する新しいモデルは、この状況を解消し、AFGP/AFP による氷結晶成長抑制機構の根幹をなす考え方を提起している。この意味で、本研究課題の初期の目標は、すでに90%以上が達成されたと言える。

さらに、本研究課題の成果を基にして、国際宇宙ステーション「きぼう」の第二期利用に向けた候補テーマの公募に申請したところ、候補に採択（応募73件中14件採択）された。2011年の実験実施を目指して、実験装置の開発がすでに開始されている。この実験は、宇宙環境の擾乱のない理想的な環境で氷結晶成長実験を行い、成長速度の精密測定により自励振動を検出することを目的とする。これにより、「二段階可逆吸着モデル」の高精度検証実験の役割を果たす。

一方、この研究の進行とともに新たな課題も生まれてきた。異なるタイプの不凍タンパク質を混合した場合、あるいは同じタイプの不凍タンパク質であっても分子量の異なるものを混合した場合に、タンパク質を単独で使った場合よりも結晶成長カイネティクスに与える影響が増強されることが明らかになった。すなわち、これはタンパク質の混合により一種の協同効果が存在することを意味している。これは、不凍タンパク質の機能の発現機構を解明する上で極めて重要な問題であるが、その機構は明らかではない。

4. 今後の研究の推進方策

最終年度には、協同効果のメカニズムを明らかにするための実験・理論的研究をさらに推進する。しかし、本研究課題の期間中にこの問題に結論を出すことは困難と思われる。この問題は極めて重要であり、新たに生じた課題として次期の科学研究費への申請を行う予定である。

また、本研究は、「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」ということも大きな目標としてきた。すなわち、添加物としての生体高分子と結晶化分子が空間的・時間的に桁違いに異なるスケールを持つときに、結晶成長カイネティクスがどのような影響を受けるかという興味深い問題である。このような視点は、結晶成長と生物物理分野にまたがる新しいパラダイムを展開するものとして注目されている。

さらに、このマクロ分子で制御された結晶

成長は生体内での結晶化に特徴的であることから、生物に倣い新しい機能性融合材料を創製するという応用技術にも直結する。今後、本研究の成果はこのような視点での応用研究にも発展させていく。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計11件)

- ① 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)
- ② Salvador Zepeda, Etsuro Yokoyama, Yukihiro Uda, Chihiro Katagiri, Yoshinori Furukawa, 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)
- ③ 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)

[学会発表] (計45件)

- ① Y. Furukawa, Reversible adsorption of antifreeze glycoprotein and ice growth, *NORDITA Symposium on Ice & Water in the Universe: from Astrobiology to Terrestrial Bodies*. 24 September 2008, Stockholm. (招待講演)

[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]

新聞掲載：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」

「きぼう」船内実験実驗室第二期利用に向けた候補テーマのホームページ：

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