

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02529

研究課題名(和文) 微細氷結晶で埋め尽くすように細胞を凍らせる革新的技術の創成

研究課題名(英文) Development of new cell preservation technologies utilizing antifreeze protein

研究代表者

津田 栄 (Tsuda, Sakae)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級主任研究員

研究者番号：70211381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は(1)液体窒素とAFPはどちらも水を微細氷結晶で埋め尽くされた状態に変化させて凍結濃縮を抑制すること、(2)ラット膵島細胞の内部を光学顕微鏡で観察できるサイズの微細氷結晶で埋め尽くした状態にしたときには生存率に改善が見られないこと、(3)同細胞の内部を光学顕微鏡では観察できないほどに小さなナノ氷結晶で埋め尽くした状態すなわち過冷却状態にしたときには極めて高い生存率改善効果が得られることを見出した。特に、昆虫AFPを用いて細胞の内外をナノ氷結晶で埋め尽くした過冷却状態にしたときには、20日間保存後であっても53%もの高い細胞生存率が得られることを世界で初めて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

冷凍庫で保存中の細胞、組織、食品等の内部に大きな氷結晶が生成する現象が「氷の再結晶化」である。本研究はエネルギーコストのかからない不凍タンパク質(Antifreeze Protein, AFP)を使うことで再結晶化が止まることを見出し、さらにマイナス温度域に冷却した水をナノ氷結晶で埋め尽くす「準ガラス化状態」にする技術によって細胞組織を低温で長期間生かし続けられることを明らかにした。特に、昆虫由来AFPには水をマイナス5°Cで準ガラス化状態にする能力があること、その状態が細胞の生存率を大幅に改善することを初めて明らかにした。得られた成果をオープンアクセス誌やセミナー・講演等で広く公開した。

研究成果の概要(英文)：The present study revealed that (1) a phenomenon called "freeze-induced concentration" is strongly inhibited by using liquid nitrogen or AFP, among which the latter consumes quite a few energy cost, (2) the survival rate (%) is not so improved when rat insulinoma cells (RIN-5F) were cooled to be filled with relatively small ice crystals, and (3) the survival rate (%) is dramatically improved when the RIN-5F cells were cooled to make it supercooling state with AFP, or make it to be filled with ultimately small "nano" ice crystals. In this study supercooling state was achieved by using insect-derived AFP, which realized significantly high (~53%) survival rate (%) of RIN-5F cells even after 20 days of preservation at -5 deg C. These new findings were opened to public through many journals, seminars, and invited lectures. Dr. Tsuda received "2019 Society Award" from Japanese society for cryobiology and cryotechnology.

研究分野：生物物理学、低温生物学

キーワード：不凍タンパク質 ナノ氷結晶 過冷却現象 凍結濃縮現象 分子構造 熱ヒステリシス

1. 研究開始当初の背景

(1) 汎用の冷凍庫に細胞や組織、食品等の含水物を入れて凍結融解させたとき、それらの内部に大きな氷結晶が生成して組織構造を破壊することが一般に知られていた。例えば食肉の場合には、そうした構造破壊によって“うまみ成分”を含む組織液(ドリップ)が漏出し凍結前の品質が維持されない。マイナス温度域に於いて無数の氷結晶が生成して成長と融合を繰り返し巨大化すること(図1A)を「氷の再結晶化」と呼ぶ。もしも氷結晶を究極に小さな「ナノ氷結晶」(図1B)に留めることが可能になり、マイナス温度域に晒した水をナノ氷結晶で埋め尽くした「準ガラス化状態」にすることができれば、

食品や細胞組織にダメージを与えない新たな保存技術を創成できると我々は考えた。また、マイナス196の液体窒素に浸した細胞や組織が、凍結融解後に生命活動を維持できる場合があるのは、その様な極低温への深冷却が水をナノ氷結晶で埋め尽くすように凍らせる効果を有しており組織構造に対する物理的損傷が軽減されるのではないかと我々は推察していた。

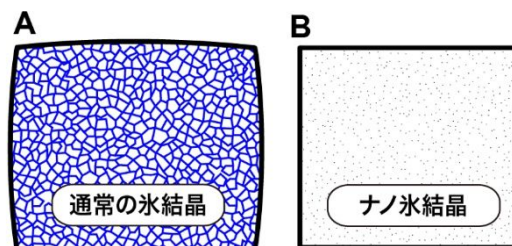


図1. 氷結晶のイメージ. 微細なナノ氷結晶で埋め尽くされた細胞は物理的損傷を受けにくいと予測した。

2) 不凍タンパク質 (Antifreeze Protein, AFP) は、凍結死を回避するために生物が作り出す低温適応物質であり、寒冷地に生息する昆虫、魚類、植物、微生物等の体液の中に含まれていることが知られていた。チャイロコメノゴミムシダマシ (*Tenebrio molitor*) は AFP が発見された最初の昆虫であり、その幼虫のミルワームは小動物用の餌として日本国内で広く販売されている。この幼虫の体液が含む不凍能力の高い AFP が TmAFP である。我々は予備的実験の結果から、国内最大級の昆虫として人気の高いオオクワガタ (*Dorcus hopei binodulosus*) の体液の中にも高い不凍性能を示す物質があることを見いだしていた。しかし、それと TmAFP との関係は不明であった。また、我々は日本国内で捕獲され量販店等で販売されているワカサギなどの魚類も AFP を豊富に含んでいることを見出し、それらの魚肉を原材料とする AFP の大量精製技術を開発していた。AFP は企業の協力を得て 2016 年に製品化し、これが +4 の非凍結温度域に於いて強力な細胞保護機能を有することも明らかにした。例えば、魚類 I 型 AFP は、ラット由来インスリン生産細胞 (臍島細胞) の 60% を +4 下で 5 日間生かし続けることができる。また、そのメカニズムを走査型電気化学顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡を活用して解析することにも成功し、例えば魚類 III 型 AFP は細胞表面を構成する脂質二重膜に対して非特異的に結合し、+4 下での細胞膜の安定化に寄与することを見出していた。魚類や昆虫が有する AFP の 3 次元分子構造

は、多次元 NMR 法や X 線回折法などの構造生物学的手法ならびに分子動力学計算法に基づいて解析した(図2)。グリセロール、トレハロース、カリウム、ナトリウム、リン酸、アミノ酸、ペプチドなどの低分子物質と AFP を組み合わせることで効果的にナノ氷結晶を作製し、零下に冷却した水を「準ガラス化状態」に変える技術が求められていた。また、細胞質内を「準ガラス化」

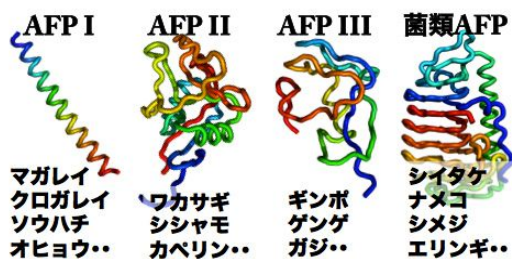


図2. 魚類 AFPI~III と菌類 AFP の3次元分子構造。生物種に依存して AFP のタイプが異なる。

状態にするために、電気穿孔法(エレクトロポレーション)や膜透過ペプチドの活用が考えられていた。

(3) 容器に入れた水溶液を冷凍庫内に静置すると、容器に接する部分から水の凍結が起こる。こうして出来た氷は無数の単結晶氷が境目なく融合したものであり、多結晶氷と呼ばれている。池の表面にある氷や飲用に用いる氷など、我々が日常的に目にする殆どの氷は多結晶氷である。マイナスの温度域で多結晶氷を構成する個々の単結晶の成長と融合が進行し、やがて多結晶氷が容器内を満たすと凍結が完了する。このとき、水分子のみが多結晶氷への取り込みが許され、水分子以外のものが多結晶氷から排除される結果として溶質が容器内の未凍結部分に濃縮される現象すなわち凍結濃縮現象(Freeze concentration phenomenon)が起こる。凍結濃縮現象は、水溶液中の果汁成分や廃棄物等を凍結して濃縮させる工業技術等に幅広く応用されている。一方、凍結濃縮現象は、凍結保存中の含水物の構造を物理的に破壊する為、食品や細胞を品質良く凍結保存する際には、これを抑制する技術が必要と考えられていた。

## 2. 研究の目的

(1) AFP を使って水を微細氷結晶で埋め尽くした「準ガラス化状態」にすることで凍結濃縮現象が抑制されるかどうかを明らかにする。もしも抑制されるならば、AFP を使うことで含水物や細胞の凍結前の構造と機能を保持できると考えられる。また、液体窒素を用いて $-196^{\circ}\text{C}$ で凍らせた水についても凍結濃縮現象を解析し、AFP を用いてナノ氷結晶で埋め尽くすこととの違いを明らかにする。

(2) AFP を使ってラット臍島細胞の内部を微細氷結晶で埋め尽くす様に凍らせたときに、解凍後の同細胞の生存率がどのようになるかを解析する。この実験にはタイプの異なる AFP を用い、また AFP の濃度に依存した生存率の変化を明らかにする。

(3) 新たに見出した昆虫 AFP を添加した細胞保存液を用いることで、マイナス温度下で保存後のラット臍島細胞の生存率を明らかにする。昆虫 AFP はマイナス温度下に生成する微細氷結晶を究極に小さなナノサイズに整え、ナノ氷結晶を形成させると予想される。この予想が正しければ、ラット臍島細胞の生存率は極めて高くなると考えられる。

(4) 膜透過型ペプチドや電気穿孔法を活用することで AFP を細胞質内に浸透させてから準ガラス化状態を形成させたときに細胞保護効果が向上するかどうかを明らかにする。AFP を使用して水をナノ氷結晶で埋め尽くす様子について、物理化学的見地から検討する。この研究を更に深化させる上で、次に何が必要かを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 水を微細氷結晶で埋め尽くす様に凍結させる現象を観察するために図3の様な実験装置を作成した。U字型のゴム板と2枚のガラス板(100 x 70 x 2 mm)をクリップで挟み(図3A)、15 mlの赤インク水溶液を流し入れた後、これを2枚の断熱材で挟んで固定した(図3B)。これを $-20^{\circ}\text{C}$ の汎用冷凍庫内に12~24時間静置することでサンプル容器の周囲から下方中心方向に向かう凍結を進行させた。この実験を AFP 存在下と非存在下で行い、また液体窒素で凍らせる実験も行った。

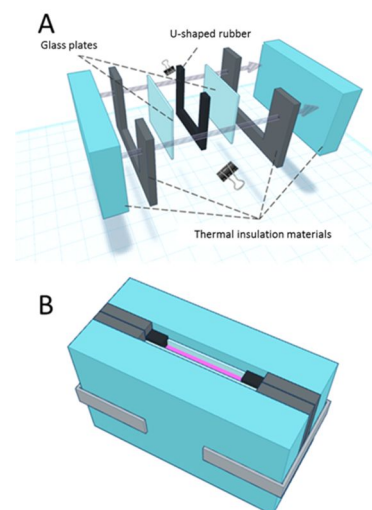


図3. 凍結濃縮現象を観察するために作製した装置。

(2) 96穴プレートに播種したラット臍島細胞をマイナス80度の冷凍保管庫に入れて12時間



凍結後に取り出し、視細胞を色素染色した後にヘモサイトメーターを使って生存細胞の割合(%)を算出した。この実験を AFP の種類と濃度を変えて実施した。

(3) 細胞保存液の市販品であるユーロコリンズ液に昆虫 AFP を溶解したものにラット膵島細胞を浸漬し、マイナス 5 のインキュベーター内にて最長 20 日間の保存実験を実施した。AFP 試料の種類と濃度を変化させ、保存後の細胞の生存率は染色法とヘモサイトメーターを組み合わせで見積もった。蛍光ラベル AFP が細胞内に侵入するかどうかを共焦点レーザー顕微鏡により解析した。

(4) アルギニンが連続した膜透過ペプチドを付加した AFP の遺伝子組換え体を作製し、細胞質内に浸透するかどうかを調べた。更に、バイオラッド社製マイクロパルサー電気穿孔装置(モデル 1652100)を用いることでラット膵島細胞内に AFP を浸透させ、細胞の生存率が向上するかどうかを解析した。これらの実験結果を基に水を微細氷結晶(ナノ氷結晶)で埋め尽くすことの物理化学的意味を考察した。

#### 4. 研究成果

図 3 の装置を用いて赤インク水を凍らせた結果、通常の氷(図 4 )は無数の単結晶氷が境目なく結びついて多結晶氷を形成する結果、赤インク成分が多結晶氷から物理的に排除され塊になること、即ち凍結濃縮現象が起こることが示された。一方、液体窒素(図 4 )または AFP (図 4 )を用いて凍らせたときには単結晶氷の融合が起きず、分散した微細氷結晶で埋め尽くされた状態(図 1 B)が形成される結果、赤インクの凍結濃縮が起きないことが示された。この結果は、液体窒素を使った深冷却は、単結晶氷が成長と融合を繰り返す時間を与えない為に微細な単氷結晶(ナノ氷結晶)で埋め尽くされた状態(図 1 B)を形成させることを示唆している。一方、AFP には単結晶氷の表面に無数に結合する機能があるため、水を微細氷結晶で埋め尽くされた状態に変えると考えられた。

100 マイクロリットルの RPMI 培地の中に  $10^6$  個/ml になる

ようラット膵島細胞を分散させた後、これをマイナス 18 の汎用冷凍庫内に静置して 24 時間凍結保存した。取り出したものを 37 の温浴に 30 秒間浸して解凍し死細胞を色素染色することで生存率を見積もった。魚類、昆虫、菌類由来の AFP 試料を用いて実験を行った結果、チフラ・イシカリエンシスと呼ばれる担子菌類が有する AFP の遺伝子組換え体が最も良好な保存効果をもつことが判明した。ただし、得られた生存率は約 18%と低かった。魚類と昆虫の AFP を用いた場合には生存率が 1~5%に低下した。ただし電気穿孔装置(エレクトロポレーション)を用いて AFP を細胞内に侵入させた後に凍結保存を行った場合には、菌類 AFP を用いたときの生存率が 25%程度に上昇した。この実験における菌類 AFP の至適濃度は約 1mg/mL であった。この実験では、細胞の内外を埋め尽くした微細氷結晶はミリメートル以上の長さになっている。細胞に対するダメージを回避する為には氷結晶のサイズをより小さく留める必要があると考えられた。

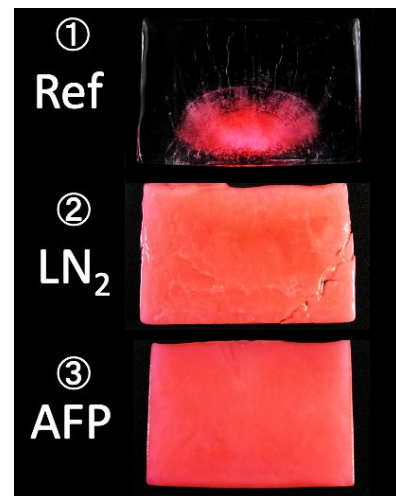


図 4. 凍結濃縮実験の結果。赤インクの凍結濃縮が起こった通常の氷(多結晶氷)、微細氷結晶で埋め尽くされた氷。凍結濃縮が起きていない。

AFP を用いて微細氷結晶で埋め尽くす様に水を凍らせることで凍結濃縮が抑制され、巨視的には凍結前の含水物の構造と機能が維持されることが明らかになった。しかし、細胞の生存率は向上しておらず、AFP を細胞保存技術に用いる為には氷結晶サイズを顕微鏡で観察できない程に小さくする(ナノ氷結晶にする)必要があると考えられた(図5)。細胞内を「ナノ氷結晶」で埋め尽くした過冷却状態にするためには、氷結晶結合力の強い昆虫AFPを用いる必要があると考えられた。

そこで、不凍能力の高い昆虫 AFP (TmAFP) を濃度 10mg/mL になるように溶解したユーロコリンズ液を作製して、ラット膵島細胞 RIN-

5F をマイナス 5 で過冷却保存する実験を行った。その結果、生存率が飛躍的に向上することが明らかになった(図6)。即ち、通常の RIN-5F 細胞の生存率は 48 時間で 0%だが、TmAFP を用いてマイナス 5 で保存した同細胞の生存率は 20 日間保存後でも 53%と驚異的に向上した。

焦点レーザー顕微鏡の観察結果から、魚類 AFP は細胞膜に結合し細胞質内には容易に浸透しないのに対し、昆虫 AFP は浸透することが示された。これは昆虫 AFP の N 末端側にある塩基性アミノ酸に富んだ特別な配列に依るものと考えられた。アルギニンに富む膜透過ペプチドを付加した魚類 AFP も細胞質内に浸透した。更に、AFP は電気穿孔法によっても細胞内に浸透することが示された。電気穿孔法は最も操作が容易なため、同法を用いてラット魚類型 AFP をラット膵島細胞内に浸透させたときの +4 下での生存率の経時変化を詳しく解析した。その結果、驚

いたことにほぼ 100%の生存率が 3 日間維持されることが判明した。しかし、10 日後になると生存率は一気に低下した。これは細胞質内の酵素が AFP を分解するためと考えられた。これらの結果から、(a)不凍活性の高い昆虫 AFP は氷結晶成長を強力に食い止めてナノ氷結晶を生成させること、(b)細胞の外側と内側の両方がナノ氷結晶で埋め尽くされた状態(過冷却状態)になること、(c)ナノ氷結晶は細胞にダメージを与えず高い生存率をもたらすこと、(c)マイナス 5 下では細胞質内の酵素が働かず昆虫 AFP が分解を受けにくいために長期間(20 日間)細胞を生かし続けることが出来たと推察された。昆虫 AFP によって過冷却水の中がナノ氷結晶で埋め尽くされた状態になること、細胞の内側と外側がそうした状態になったときに最も細胞の生存率が高まることが本研究から示唆された。

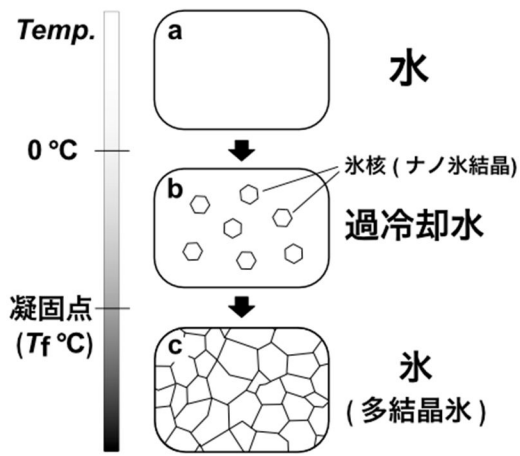


図5. 水凍結の模式図。AFP は過冷却水の中に発生する氷核(ナノ氷結晶)に強く特異的に結合して微小サイズに留め過冷却状態の維持に貢献すると予測された。

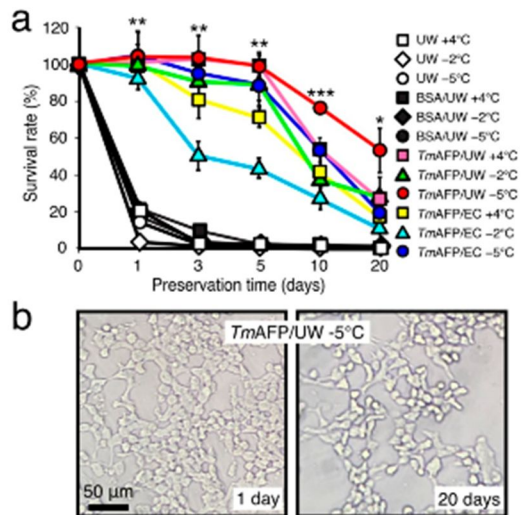


図6. TmAFP で過冷却保存したときの RIN-5F 細胞の生存率。下は過冷却保存時の顕微鏡画像。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 16件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Arai Tatsuya, Yamauchi Akari, Miura Ai, Kondo Hidemasa, Nishimiya Yoshiyuki, Sasaki Yuji C., Tsuda Sakae	4. 巻 22
2. 論文標題 Discovery of Hyperactive Antifreeze Protein from Phylogenetically Distant Beetles Questions Its Evolutionary Origin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3637-3637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22073637	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Khan N. M.-Mofiz Uddin, Arai Tatsuya, Tsuda Sakae, Kondo Hidemasa	4. 巻 11
2. 論文標題 Characterization of microbial antifreeze protein with intermediate activity suggests that a bound-water network is essential for hyperactivity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5971
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-85559-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Singh Purnima, Tsuda Sakae, Singh Shiv Mohan, Mondal Sukanta, Roy Utpal	4. 巻 in press
2. 論文標題 Partial characterization of an antifreeze protein (CRY-c) from Cryobacterium psychrotolerans MLB-29 of Arctic glacier cryoconite	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Polar Science	6. 最初と最後の頁 100661-100661
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.polar.2021.100661	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Scholl Connor L., Tsuda Sakae, Graham Laurie A., Davies Peter L.	4. 巻 288
2. 論文標題 Crystal waters on the nine polyproline type II helical bundle springtail antifreeze protein from Granisotoma rainieri match the ice lattice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 4332-4347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15717	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamauchi Akari, Arai Tatsuya, Kondo Hidemasa, Sasaki Yuji C., Tsuda Sakae	4. 巻 10
2. 論文標題 An Ice-Binding Protein from an Antarctic Ascomycete Is Fine-Tuned to Bind to Specific Water Molecules Located in the Ice Prism Planes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 759-759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10050759	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuda Sakae, Yamauchi Akari, Khan N. M.-Mofiz Uddin, Arai Tatsuya, Mahatabuddin Sheikh, Miura Ai, Kondo Hidemasa	4. 巻 10
2. 論文標題 Fish-Derived Antifreeze Proteins and Antifreeze Glycoprotein Exhibit a Different Ice-Binding Property with Increasing Concentration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 423-423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10030423	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aohara Tsutomu, Furukawa Jun, Miura Kenji, Tsuda Sakae, Poisson Jessica S., Ben Robert N., Wilson Peter W., Satoh Shinobu	4. 巻 132
2. 論文標題 Presence of a basic secretory protein in xylem sap and shoots of poplar in winter and its physicochemical activities against winter environmental conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 655 ~ 665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-019-01123-9	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kuramochi Masahiro, Takanashi Chiaki, Yamauchi Akari, Doi Motomichi, Mio Kazuhiro, Tsuda Sakae, Sasaki Yuji C.	4. 巻 9
2. 論文標題 Expression of Ice-Binding Proteins in Caenorhabditis elegans Improves the Survival Rate upon Cold Shock and during Freezing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-42650-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arai Tatsuya, Nishimiya Yoshiyuki, Ohyama Yasushi, Kondo Hidemasa, Tsuda Sakae	4. 巻 9
2. 論文標題 Calcium-Binding Generates the Semi-Clathrate Waters on a Type II Antifreeze Protein to Adsorb onto an Ice Crystal Surface	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 162-162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom9050162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki Aya, Nishimiya Yoshiyuki, Tsuda Sakae, Togashi Koji, Munehara Hiroyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Freeze Tolerance in Sculpins (Pisces; Cottoidea) Inhabiting North Pacific and Arctic Oceans: Antifreeze Activity and Gene Sequences of the Antifreeze Protein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 139 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom9040139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Rahman Anika T., Arai Tatsuya, Yamauchi Akari, Miura Ai, Kondo Hidemasa, Ohyama Yasushi, Tsuda Sakae	4. 巻 9
2. 論文標題 Ice recrystallization is strongly inhibited when antifreeze proteins bind to multiple ice planes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-36546-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arai Tatsuya, Inamasu Rena, Yamaguchi Hiroki, Sasaki Daisuke, Sato-Tomita Ayana, Sekiguchi Hiroshi, Mio Kazuhiro, Tsuda Sakae, Kuramochi Masahiro, Sasaki Yuji C.	4. 巻 8
2. 論文標題 Laboratory diffracted x-ray blinking to monitor picometer motions of protein molecules and application to crystalline materials	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Structural Dynamics	6. 最初と最後の頁 044302 ~ 044302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/4.0000112	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -



1. 著者名 Yamauchi Akari, Miura Ai, Kondo Hidemasa, Arai Tatsuya, Sasaki Yuji C., Tsuda Sakae	4. 巻 22
2. 論文標題 Subzero Nonfreezing Hypothermia with Insect Antifreeze Protein Dramatically Improves Survival Rate of Mammalian Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12680-12680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222312680	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kuramochi Masahiro, Dong Yige, Yang Yue, Arai Tatsuya, Okada Rio, Shinkai Yoichi, Doi Motomichi, Aoyama Kouki, Sekiguchi Hiroshi, Mio Kazuhiro, Tsuda Sakae, Sasaki Yuji C.	4. 巻 29
2. 論文標題 Dynamic motions of ice-binding proteins in living <i>Caenorhabditis elegans</i> using diffracted X-ray blinking and tracking	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101224-101224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2022.101224	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 倉持 昌弘、高梨 千晶、山内 彩加林、戸井 基道、三尾 和弘、津田 栄、佐々木 裕次	4. 巻 65
2. 論文標題 線虫C. エレンガンスを用いた不凍タンパク質のin vivo 解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 低温生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 23~26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20585/cryobolcryotechnol.65.1_23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 大山恭志、津田 栄	4. 巻 84
2. 論文標題 不凍タンパク質 (AFP) による過冷却安定化技術	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学工学	6. 最初と最後の頁 382-385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 津田 栄	4. 巻 67
2. 論文標題 不凍タンパク質の分子機能と応用技術に関する研究	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 低温生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20585/cryobolcryotechnol.67.1_1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 山内彩加林、三浦 愛、津田 栄	4. 巻 56
2. 論文標題 オオクワガタ由来高活性型不凍タンパク質の発見	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ニューサイエンス社 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 34-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 倉持昌弘、三尾和弘、津田 栄、佐々木裕次	4. 巻 53
2. 論文標題 線虫の凍結・低温耐性を改善する氷結合タンパク質の生体内作用機序の解明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ニューサイエンス社 月刊細胞	6. 最初と最後の頁 59-62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計27件(うち招待講演 5件/うち国際学会 9件)

1. 発表者名 根塚映見、新井達也、三浦 愛、近藤英昌、津田 栄
2. 発表標題 昆虫由来高活性型不凍タンパク質の探索と機能評価
3. 学会等名 第65回低温生物工学会(誌上開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山内彩加林、根塚映見、三浦 愛、近藤英昌、津田 栄
2. 発表標題 昆虫由来不凍タンパク質の細胞保護効果
3. 学会等名 第65回低温生物工学会(誌上開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津田 栄
2. 発表標題 不凍タンパク質の分子機能と応用技術に関する研究(学会賞受賞講演)
3. 学会等名 第65回低温生物工学会(誌上開催)(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮脇長人、津田 栄、萩原知明、鈴木 徹
2. 発表標題 界面前進凍結濃縮の応用による 不凍タンパク質の精製法について
3. 学会等名 日本食品工学会第21回年次大会(誌上開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 董芸格、倉持 昌弘、高梨千晶、三尾和弘、戸井基道、関口博史、津田 栄、佐々木裕次
2. 発表標題 SINGLE MOLECULAR OBSERVATION OF AFP AND ICE-CRYSTAL DYNAMICS IN CAENORHABDITIS ELEGANS BY TIME-RESOLVED X-RAY DIFFRACTION MEASUREMENTS
3. 学会等名 Biophysical Society 64th Annual Meeting(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 倉持 昌弘、戸井基道、三尾和弘、津田 栄、佐々木裕次
2. 発表標題 THE OBSERVATION OF THE ICE-BINDING PROTEIN FOR FREEZING AND COLD TOLERANCE OF TRANSGENIC CAENORHABDITIS ELEGANS
3. 学会等名 Biophysical Society 64th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 董芸格、倉持 昌弘、高梨千晶、三尾和弘、戸井基道、青山光輝、関口博史、津田 栄、佐々木裕次
2. 発表標題 時分割回折X線法による線虫C.エレガンスの不凍タンパク質と氷の1分子動態観察
3. 学会等名 第33回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津田 栄、三浦 愛、近藤英昌
2. 発表標題 Practical Use of New Quality Products of Antifreeze Protein
3. 学会等名 7th annual conference of AnalytiX-2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮脇長人、津田 栄、萩原知明、鈴木 徹
2. 発表標題 不凍タンパク質の界面前進凍結濃縮における ice affinityについて
3. 学会等名 日本食品科学工学会第66回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧上結葵、津田 栄、西寒水 将、今井 敬、堂地 修
2. 発表標題 ウシ体外発生培地への不凍タンパク質添加が胚発生および発育に及ぼす影響
3. 学会等名 2019年度北海道人工授精技術研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺 爽、Sheikh Mahatabuddin、三浦 愛、近藤英昌、津田 栄
2. 発表標題 トウガレイ由来I型不凍タンパク質の構造機能解析
3. 学会等名 第20回極限環境生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子雅規、室井宏仁、山内彩加林、三浦 愛、近藤英昌、津田 栄
2. 発表標題 エレクトロポレーションによる不凍タンパク質の細胞内導入がもたらす生存率改善効果
3. 学会等名 第20回極限環境生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮川 祥英、三浦 愛、近藤英昌、津田 栄
2. 発表標題 ギスカジカ由来不凍タンパク質の構造と機能の解析
3. 学会等名 第20回極限環境生物学会年会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 田中博基、津田 栄、近藤英昌
2. 発表標題 Development of an efficient production method of recombinant antifreeze proteins
3. 学会等名 第7回国際生命科学シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子雅規、室井宏仁、山内彩加林、三浦 愛、近藤英昌、津田 栄
2. 発表標題 Lifetime of cell line is dramatically improved by electroporator-assisted permeation of antifreeze protein
3. 学会等名 第7回国際生命科学シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺 爽、Sheikh Mahatabuddin、三浦 愛、近藤英昌、津田 栄
2. 発表標題 Sequence Determination and Characterization of Type I AFPs from Liposetta pinnifasciata (Barfin Plaice)
3. 学会等名 第7回国際生命科学シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉持 昌弘、董芸格、高梨千晶、戸井基道、三尾和弘、津田 栄、関口博史、佐々木裕次
2. 発表標題 Dynamics And Functions of Antifreeze Proteins In Transgenic Caenorhabditis Elegans At Freezing Environments
3. 学会等名 ASCB-EMBO2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉持 昌弘、董芸格、高梨千晶、戸井基道、三尾和弘、津田 栄、佐々木裕次
2. 発表標題 The in vivo effects of the ice-binding protein mutations for the cold tolerance in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉持 昌弘、董芸格、高梨千晶、戸井基道、青山光輝、関口博史、三尾和弘、津田 栄、佐々木裕次
2. 発表標題 Ice-Binding Proteins Improves the Survival Rate of <i>Caenorhabditis elegans</i> at Non-freezing Temperature
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉持 昌弘、董芸格、高梨千晶、山内彩加林、戸井基道、青山光輝、関口博史、三尾和弘、津田 栄、佐々木裕次
2. 発表標題 In vivo effect of Ice-Binding Protein Cold tolerance observation and X-ray single molecular measurement using living <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津田 栄
2. 発表標題 ICE RECRYSTALLIZATION IS EFFICIENTLY TERMINATED BY ANTIFREEZE PROTEIN-BINDING TO MULTIPLE ICE PLANES
3. 学会等名 2019年度国際低温生物学会 (CRYO2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内彩加林、新井達也、室井宏仁、三浦 愛、近藤英昌、津田 栄
2. 発表標題 魚類および微生物由来不凍タンパク質の比較による細胞保護メカニズムの解明
3. 学会等名 第64回低温生物工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内彩加林、三浦 愛、津田 栄
2. 発表標題 昆虫由来不凍タンパク質は細胞を-5℃で生存可能にする
3. 学会等名 第19回産総研・産技連LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sakae Tsuda
2. 発表標題 Discovery of the hyperactive antifreeze protein from a Japanese stag beetle
3. 学会等名 IBP International Seminar Series 2021-2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津田 栄
2. 発表標題 不凍タンパク質とは何か？-その構造機能解明と実用化の現況-
3. 学会等名 第61回生命科学夏の学校セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山内彩加林、三浦 愛、津田 栄
2. 発表標題 日本産オオクワガタ由来不凍タンパク質の発見-昆虫不凍タンパク質の起源を探る-
3. 学会等名 日本昆虫学会 第81回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津田 栄
2. 発表標題 不凍タンパク質と氷 -水はどのように凍結するか？-
3. 学会等名 基礎生物学研究所 Cryopreservation Conference 2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>津田 栄 Tsuda Sakae ホームページ  <a href="https://sakaetsuda.jp/index.html">https://sakaetsuda.jp/index.html</a>          北海道大学生命科学院分子適応科学研究室ホームページ  <a href="http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g_renkei/top.html">http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g_renkei/top.html</a>          プレスリリース・低温環境に弱い線虫が氷点下で生き延びた！  <a href="https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2019/pr20190515/pr20190515.html">https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2019/pr20190515/pr20190515.html</a>          プレスリリース・氷の結晶化は極少量の抗凍結タンパク質（AFP）で止まる  <a href="https://www.aist.go.jp/aist_j/new_research/2019/nr20190213/nr20190213.html">https://www.aist.go.jp/aist_j/new_research/2019/nr20190213/nr20190213.html</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大山 恭史  (OHYAMA YASUSHI)  (80356675)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員   (82626)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	近藤 英昌  (KONDO HIDEMASA)  (80357045)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員    (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関