

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570118

研究課題名（和文） 微生物由来不凍タンパク質の構築原理と分子進化の解明

研究課題名（英文） Elucidation of protein architecture and molecular evolution of microbial antifreeze proteins

研究代表者

近藤 英昌 (KONDO HIDEMASA)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：80357045

研究成果の概要（和文）：

不凍タンパク質は氷結晶に結合しその成長を抑制する。本研究では低温環境下に生息する微生物から見出された不凍タンパク質の氷結晶結合部位を、結晶構造解析と変異体実験によって明らかにした。また、種々の微生物由来不凍タンパク質の不凍活性を詳細に解析した結果、これらの不凍タンパク質には共通した分子骨格構造が存在し、局所的なアミノ酸の置換によって生育環境に応じた不凍機能を特化させている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Antifreeze proteins bind preferentially to the surfaces of embryonic ice crystals and inhibit further growth of ice. In the present study we analyzed three-dimensional structures of microbial antifreeze proteins and revealed their possible ice-binding site by structure-based site-directed mutagenesis. Antifreeze activities measured for various kinds of microbial antifreeze proteins exhibited wide diversity both in thermal hysteresis value and ice crystal shape, in spite of their high sequence homologies. From these observations it is suggested that microbial antifreeze proteins share a common structural scaffold for their interaction with ice and adopt their own antifreeze activities according to their growing environment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶構造解析、不凍タンパク質、生物物理、微生物、極限微生物、氷結晶、低温生物学、環境適応

1. 研究開始当初の背景

不凍タンパク質 (Antifreeze protein; AFP) は氷結晶に特異的に結合する性質を有する。AFP が氷結晶に結合した結果、氷結晶

の自由な成長が抑制され形状が特異なものに変化する。また、溶液の融点が変わらないまま、凝固点のみが低下するという熱ヒステリシス現象が観察される。これまで寒冷環境

に生息する魚類、昆虫、植物、微生物などから様々な種類の AFP が発見されているが、それぞれのアミノ酸配列や立体構造は大きく異なっていることが知られている。そのためこれらの AFP は異なる祖先分子から氷結晶結合能を有するように収斂的に進化したと考えられている。

これまでに魚類や昆虫由来 AFP を対象とした機能解析や立体構造解析によって氷結晶との結合に関わる部位が特定され、AFP と氷結晶の結合モデルが提案されている。近年、多くの好冷性微生物（真菌、珪藻、細菌、小型の甲殻類）からアミノ酸配列の相同性が高い AFP が多数見出されているが、その詳細な性質や氷結晶との結合メカニズムについては知られていない。また、複数の生物種から見出されている AFP は本微生物 AFP のみであり、生物間の AFP 遺伝子の移動や起源等の進化的な知見は得られていない。

2. 研究の目的

本研究では微生物 AFP のうち、好冷性担子菌イシカリガマホタケ (*Typhula ishikariensis*)、南極海氷に生息している珪藻 (*Navicula glaciei*)、及び細菌 (*Colwellia* 属) 由来の AFP の X 線結晶構造解析及び不凍活性の測定を行い、氷結晶結合機構を解明することを目的とする。具体的にはこれらの AFP の組換え発現系を構築し、取得した AFP 試料を用いて結晶構造解析、熱ヒステリシスの詳細な測定を行うとともに、AFP の結合によって変化する氷結晶の成長の様式を顕微鏡下で観察し比較する。また、好冷菌類のライブラリーの低温培養液より新たな AFP を探索し、アミノ酸配列の解析や不凍活性の測定を行う。これらの知見と既知の AFP で知られている知見を総括することで、微生物 AFP の氷結晶結合機構及び分子進化に関する知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 担子菌 AFP アイソフォームの不凍活性の比較

魚類由来 AFP では、同一生物が発現する AFP の中にアミノ酸配列がわずかに異なる AFP アイソフォームが複数存在することが知られている。イシカリガマホタケ AFP に関してもアミノ酸配列が最大で 15% 異なる AFP アイソフォームが 7 種類分泌されていることが知られている。本研究項目では培養液より各アイソフォームを分画しそれぞれの不凍活性測定を行う。アイソフォーム間の不凍活性の差異とアミノ酸配列の相同性を関連付けることによって、不凍活性に関与している部位についての知見を得る。

(2) 担子菌 AFP の氷結晶結合部位の同定

イシカリガマホタケ AFP の立体構造解析の結果に基づき、様々な分子表面に変異が導入された変異体を作成し、不凍活性を比較することで本 AFP の氷結晶結合部位を特定する。

(3) 珪藻及び細菌 AFP の機能解析

珪藻由来 AFP 及び細菌由来 AFP を調製し、不凍活性を測定し、担子菌 AFP と比較する。また、結晶構造解析を行う。

(4) 菌類ライブラリーからの AFP の探索

菌類は形態的な特徴によってツボカビ、接合菌、子囊菌、担子菌の 4 門に分類される。これまでに知られている担子菌以外の菌類に由来する AFP を探索し機能解析を行うために、南極や北海道等の寒冷地域から収集された菌類ライブラリーを用いた新規な AFP 生産菌の探索を行う。

4. 研究成果

(1) 担子菌 AFP アイソフォームの不凍活性の比較

-1°C にて 6 ヶ月間培養したイシカリガマホタケの培養液より、不凍活性を示す 5 つの分画を精製した。全ての分画は電気泳動で同一の分子量を示したことから、これらには単一あるいは複数の AFP アイソフォームが含まれていると考えられる。各分画の不凍活性は同一の AFP 濃度で比較した場合に最大で約 3 倍の差があり (図 1)、本 AFP のアイソフォーム間には活性に違いがあるということが示された。また、各アイソフォームを組換え発現系によって取得し不凍活性を測定することによって、最も高い活性を有するアイソフォームを特定することができた。この活性の強いアイソフォームを含む水溶液中では氷結晶が平面的な六花状に成長する。一方、活性の弱いアイソフォームを含む水溶液中では氷結晶が針状に成長する様子が観察された。氷結晶の成長方向は、AFP が結合する氷結晶面の種類と相関があることが知られている。このことから担子菌 AFP には氷結晶面に対して異なる特異性を有するアイソフォームが存在していると推察される。

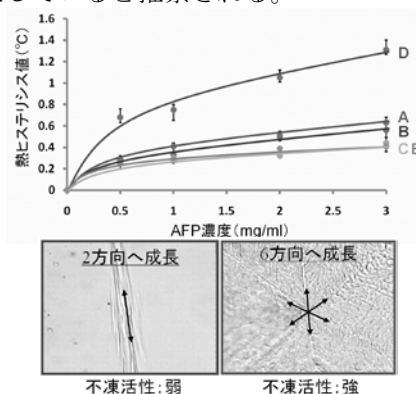


図 1 担子菌 AFP アイソフォームの不凍活性
上：各アイソフォームの熱ヒステリシス値
下：氷結晶の成長パターン

(2) 担子菌AFPの氷結晶結合部位の同定

精密化されたイシカリガマホタケAFPの立体構造は、右巻きのβ-ヘリックスドメインとそれに平行な1本のα-ヘリックスによって構成されており、他の不凍タンパク質とは全く異なるものであった。分子表面はそれぞれのヘリックスの側面として3つの領域に大別されることから、これらの中心部分へ Tyr 残基を導入した変異体を作成し不凍活性の変化を評価した(図2)。作成した変異体のうち、β-ヘリックスの側面に形成されている平坦な分子表面への変異体(Asn178Tyr)について顕著な不凍活性の低下と、氷結晶の形状の変化が観察された。このことから氷結晶結合部位はこの領域に存在していると考えられる。

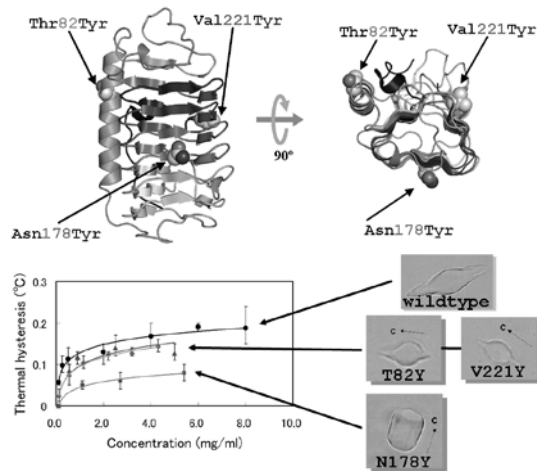


図2 担子菌AFPの氷結晶結合部位
上: 立体構造と変異導入部位
下: 各変異体の熱ヒステリシス値と氷結晶形状

(3) 珪藻及び細菌AFPの機能解析

それぞれのAFPの最大活性の値は大きく異なるものであった。珪藻AFPは担子菌AFPとともに、0.5°C程度の熱ヒステリシス値を示した。これは魚類などの他のAFPと同程度の値である。一方、細菌AFPは低濃度域においても約2°Cという高い値を示した。これは昆虫に見出されている高活性型AFPの持つ不凍活性と同程度である。(図3) また、凝固点に達した時の氷結晶の成長パターンにも明確な違いがみられた。珪藻AFPと細菌AFPでは氷結晶が六方向に向かって樹状に成長した。これは(1)の担子菌AFPの実験において活性の高いAFPアイソフォームで見られたものと同一であった。結晶構造解析については、細菌AFPを結晶化し構造解析を行った。このAFPの骨格構造は、担子菌イシカリガマホタケAFPと類似したものであることが明らかとなった。一方、前述の通りこれらのAFPの不凍活性には大きな差異があることがわかっている。このことから分子の表面に位置する残基のうちβ-ヘリックス上に存在し、かつア

ミノ酸配列の置換が多い部位が氷結晶への結合に関与する部位であることが示唆された。今後は変異体実験などによって氷結晶結合残基に関する詳細な知見を得るとともに、氷の単結晶を用いた実験などによってAFPが結合する氷結晶面の種類を特定することが必要であると考えられる。

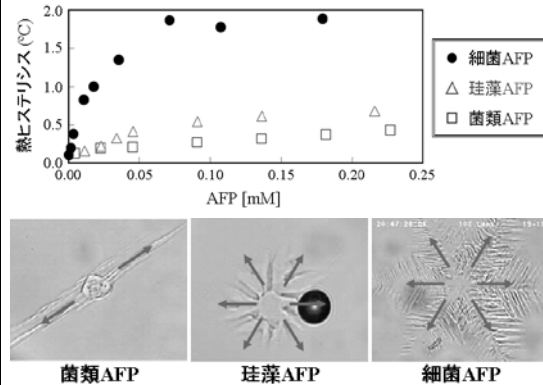


図3 3種類の微生物AFPの不凍活性
上: 各AFPの熱ヒステリシス値
下: 氷結晶の成長パターン

(4) 菌類ライブラリーからのAFPの探索

南極域より採取・単離した菌株、北海道内にて採取した菌株、及び菌株保存機関より入手した菌株を含んだ約100種からAFPを探索した。供試菌株を-1°Cにて培養し、培養上清の不凍活性の有無を凍結時の氷結晶の形状変化によって判断した。その結果、南極土壌より単離した子嚢菌 *Antarctomyces psychrotrophicus* 培養液より、AFPを見出した。このAFPは分子量が約28,000Daであり、糖鎖修飾を受けていることがわかった。また、N末端のアミノ酸配列やアミノ酸組成、及び成長する氷結晶の形状は担子菌AFPと異なっていた。また、抗担子菌AFP抗体と交叉しなかった。これらのことから本子嚢菌AFPは既知のものとは異なる構造・機能を有する新規なAFPであると考えられる。また、菌類においても魚類と同様に多様な分子種のAFPが存在していることと考えられる。

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3件)

- ① 肖楠、鈴木啓太、西宮佳志、近藤英昌、三浦愛、津田栄、星野保、Comparison of functional properties of two fungal antifreeze proteins from *Antarctomyces psychrotrophicus* and *Typhula ishikariensis*, FEBS Journal、査読有、227、2010、394-403
- ② 肖楠、稲葉重樹、東條元昭、出川洋介、藤

生誠一、花田祐一、工藤栄、星野保、Antifreezing activities of various fungi and pseudofungi isolated from Antarctica, North American Fungi、査読有、5、2010、215-220

③近藤英昌、杉本宏、野呂奈津子、肖楠、花田祐一、星野保、津田栄、Crystal structure of an antifreeze protein from snow mold fungi、Acta Crystallographica Section A、査読無、64、2008、C369

〔学会発表〕(計11件)

①花田祐一、近藤英昌、肖楠、西宮佳志、星野保、三浦愛、津田栄、Expression and characterization of recombinant antifreeze proteins from cold-adapted microorganisms、第32回極域生物シンポジウム、2010年11月30日、国立極地研究所(東京都)

②肖楠、花田祐一、Sushruta Hakkimane、西宮佳志、近藤英昌、津田栄、星野保、Antifreeze activities of fungi and sea ice diatoms from Antarctica、第32回極域生物シンポジウム、2010年11月30日、国立極地研究所(東京都)

③花田祐一、近藤英昌、肖楠、西宮佳志、星野保、三浦愛、津田栄、南極海水細菌 *Colwellia* sp. 由来不凍タンパク質の不凍機能の解析、第11回極限環境生物学会、2010年11月16日、京都大学(京都府宇治市)

④近藤英昌、杉本宏、花田祐一、肖楠、関玄彦、星野保、三浦愛、津田栄、CRYSTAL Structure of antifreeze protein from a snow mold fungus、The 12th International Conference on the Physics and Chemistry of Ice、2010年9月9日、北海道大学(札幌市)

⑤関玄彦、肖楠、花田祐一、近藤英昌、星野保、三浦愛、津田栄、好冷性担子菌不凍タンパク質アイソフォームの活性解析、第55回低温生物工学会大会、2010年6月26日、東京工業大学(東京都)

⑥近藤英昌、花田祐一、肖楠、関玄彦、杉本宏、星野保、三浦愛、津田栄、好冷性担子菌不凍タンパク質の結晶構造解析、第10回日本蛋白質科学会年会、2010年6月17日、札幌コンベンションセンター(札幌市)

⑦関玄彦、肖楠、花田祐一、近藤英昌、星野保、三浦愛、津田栄、好冷性担子菌不凍タンパク質アイソフォームの活性の解析、第10回日本蛋白質科学会年会、2010年6月16日、札幌コンベンションセンター(札幌市)

⑧関玄彦、肖楠、花田祐一、近藤英昌、星野保、三浦愛、津田栄、好冷性担子菌イシカリガマホタケ由来不凍タンパク質のアイソフォームの不凍活性の解析、第10回極限環境微生物学会年会、2009年10月29日、明治大学(東京都)

⑨花田祐一、近藤英昌、西宮佳志、星野保、三浦愛、津田栄、菌類・珪藻類由来不凍タンパク質の発現系構築と氷結晶結合機能の解析、第10回極限環境微生物学会年会、2009年10月29日、明治大学(東京都)

⑩近藤英昌、杉本宏、野呂奈津子、肖楠、花田祐一、星野保、津田栄、Crystal structure of an antifreeze protein from snow mold fungi、XXI Congress of the International Union of Crystallography、2008年8月24日、大阪国際会議場(大阪市)

⑪星野保、齋藤泉、鈴木啓太、肖楠、近藤英昌、津田栄、東條元昭、寺見文弘、Ecological strategies of snow molds against freezing stress、China-Japan Pan Asia Pacific Mycology Forum、2008年7月31日、吉林農業大学(中華人民共和国長春市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 英昌 (KONDO HIDEMASA)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：80357045

(2) 研究分担者

西宮 佳志 (NISHIMIYA YOSHIYUKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：00357716

津田 栄 (TSUDA SAKAE)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長

研究者番号：70211381

星野 保 (HOSHINO TAMOTSU)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長

研究者番号：60357944

(3) 連携研究者

なし