

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（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21540423

研究課題名（和文）バクテリア氷核タンパク質と昆虫不凍タンパク質の類似性および相違性の計算科学研究

研究課題名（英文）Computational Science Study of Similarities and Differences between bacterial Ice-Nucleating Protein and Insect Anti-Freeze Protein

研究代表者

灘 浩樹（NADA HIROKI）

独立行政法人産業技術総合研究所・環境管理技術研究部門・主任研究員

研究者番号：90357682

研究成果の概要（和文）：本研究では、バクテリアが持つ氷核タンパク質と昆虫不凍タンパク質の類似点および相違点を計算科学シミュレーション手法と結晶成長実験により調べた。その結果、類似点として、氷核タンパク質は不凍タンパク質と同様に氷結晶成長速度の異方性を劇的に変化させる性質があることがわかった。相違点として、氷核タンパク質は氷のベーサル面にのみ吸着するが、不凍タンパク質はベーサル面とプリズム面の両方に吸着する。結論として、どちらのタンパク質も氷結合性を持つが、それらの構造は互いに異なると思われる。

研究成果の概要（英文）：In this project, similarities and differences between bacterial ice-nucleating protein (INP) and insect antifreeze protein (AFP) were studied using both computer simulation and ice crystal growth experiment. The results suggested that as a similarity, both INP and AFP are the proteins that significantly alter the anisotropy in ice crystal growth rate. The results also suggested that as a difference, INP binds selectively to ice basal planes, whereas AFP binds to both ice basal and prismatic planes. In conclusion, both INP and AFP are ice-binding proteins. However, the structure of INP is thought to be different from the structure of AFP.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：結晶成長、計算物理、表面・界面、機能性分子、分子シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

氷核タンパク質（Ice-Nucleating Protein, INP）と不凍タンパク質（Anti-Freeze Protein, AFP）は相反する機能を持つ。INPは氷の核生成を“促進”し、AFPは氷の成長を“抑制”する。これらのタンパク質は生物の耐凍結・避凍結機能と絡んで極めて重要であり、医療・食品・エネルギー技術への応用も期待

されている。また、バイオミネラリゼーションにおける結晶成長制御タンパク質や材料科学における結晶形成・モルフォロジー制御分子の機能とも関係している。このように、これらのタンパク質は様々な分野の問題とも関係したホットな研究対象である。

AFPは、代表的なものに対して構造が判明している。しかし、INPの構造は不明である。

このため、INP が何故高い氷核機能を示すのかよく判っていない。これまでは、INP と AFP は発現する機能が相反するため、タンパク質構造も本質的に異なると考えられてきた。しかし最近、昆虫 AFP と植物着生バクテリア INP のアミノ酸配列が互いに類似していることがわかってきた。このため一部の研究者は、AFP と INP は同じ構造を持っており、違いはサイズのみであるという極端な推論を唱えている（つまり、サイズが小さいと AFP として働き、サイズが大きいと INP として働くという推論）。この推論が正しいかどうかは疑問だが、興味深く、まだよくわかっていない INP の構造を解明するためにも調べてみる価値があると思われる。まずは、AFP と INP の構造上の特徴が比較できるとよい。しかし、X 線や NMR による解析が極めて困難な INP 構造の特徴を如何にして知るかが問題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、INP の構造上の特徴や氷との相互作用特性、またそれらの AFP との類似点や相違点を分子レベルで明らかにし、タンパク質が発現する機能（氷核もしくは不凍）を分けるものがサイズだけなのかどうかを判定することである。化学物理や生物物理の分野に対してのみならず、医療技術、食品技術、エネルギー技術などの分野における産業応用や、生命科学、材料科学、地球科学など異なる学術分野の関連研究に対しても貢献し得る基礎的知見として成果を発信していくことを目指す。

3. 研究の方法

本研究では、バクテリア *Xanthomonas Campestris* の INP と昆虫 *Spruce budworm* の AFP を研究対象とする。研究手法は、分子動力学 (Molecular Dynamics, MD) シミュレーションと氷の結晶成長実験である。シミュレーションは、INP の氷吸着部分ペプチドおよび氷成長界面へ吸着した AFP に対して実施する。実験は、バクテリアを溶かした過冷却水からの氷の結晶成長に対して実施する。本研究手法の独創的な点は、氷の成長速度異方性および成長形を純水からの成長の場合と比較することにより INP の吸着面方位を決定し、その結果から INP 構造の特徴を推定することである。さらに、その実験で得られる INP 構造の特徴をシミュレーションにより検証する。また、AFP の氷界面吸着構造特性をシミュレーションで解析し、INP と比較・検討することにより、AFP と INP の構造の類似点および相違点を探り出す。本研究の実験では、バクテリア添加が及ぼす氷の結晶成長への影響は全て、バクテリア INP の作用によるものと仮定した。

4. 研究成果

研究成果は以下の通りである。

(1) INP 構造の特徴と氷との相互作用特性
バクテリア存在下での氷の結晶成長実験において氷の成長速度を測定した結果、氷ベール面に垂直な方向（氷の c 軸方向）の成長速度が純水の場合と比べて劇的に小さくなることがわかった。この結果は、バクテリアがベール面に吸着する性質を反映したものと思われる。したがって、本結果は INP が AFP と同様に氷に吸着する性質があるタンパク質であることを強く示唆している。

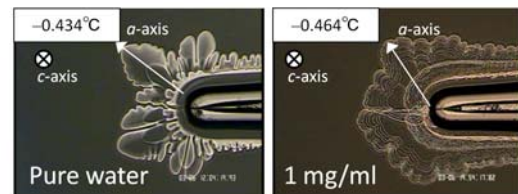


図 1：純水（左）およびバクテリア水溶液（右）から成長する氷の結晶形

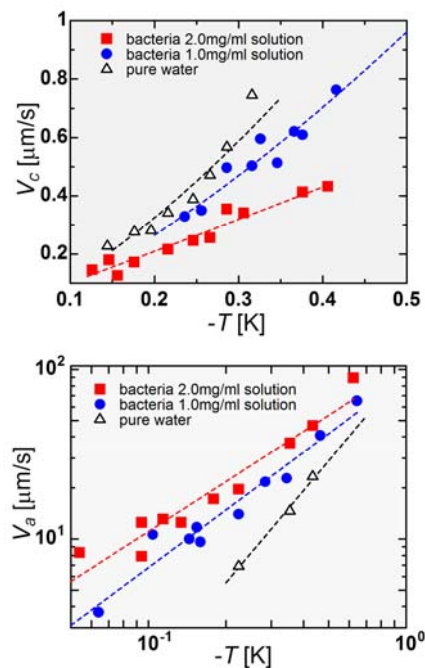


図 2：氷ベール面に垂直な方向（上）および平行な方向（下）の氷成長速度の温度依存性。

一方、氷ベール面に平行な方向（c 軸に垂直な方向、例えば a 軸方向）の成長速度は、純水の場合より劇的に大きくなることがわかった。純水から成長する氷結晶形は、平坦なベール面を持つ薄い円盤（もしくは、六角樹枝）である。本研究により、バクテリア存在下では、この薄い氷結晶形がさらに薄く

なることがわかった。すなわち、本結果は INP が AFP と同様に氷結晶形に作用するタンパク質であることを強く示唆している。

c 軸に垂直な方向の成長速度増大の要因として二つの可能性を検討した。一つは、INP が c 軸に垂直な方向の界面において液体構造から氷結晶構造への水分子整列を促進させた可能性である。INP は氷の結晶核生成を促進させるタンパク質であるため、水分子整列化を促進させる働きがあることは容易に想像できる。しかし、一般に c 軸に垂直な方向の成長速度は潜熱の排除速度によって決まると考えられており、水分子整列化速度が成長速度を支配しているというわけではない。本研究では、純水からの成長の場合に比べ、バクテリア添加により最大で約 4 倍も成長速度が上昇した。これだけ大きな成長速度の上昇を、INP の水分子整列効果だけで説明するのは無理がある。

もう一つの可能性として、バクテリア添加による結晶化潜熱発生量とその分布の変化が c 軸に垂直な方向の成長速度増大を引き起こしたことが考えられる。すなわち、本実験では、バクテリア添加により c 軸方向の成長速度が大きく減少した。したがって、ベール面にて発生する単位時間当たりの結晶化潜熱量も純水の場合に比べて著しく少なかったはずである。潜熱発生量の減少は氷結晶界面周辺の温度上昇を抑えるため、成長速度増大につながる。このようなメカニズムで、ベール面での潜熱発生量の著しい減少が、c 軸に垂直な方向の界面温度上昇を抑制し、成長速度増大を引き起こした可能性がある。

ベール面での潜熱発生量変化が c 軸に垂直な方向の成長速度へ及ぼした影響を推測するために、フェーズ・フィールドモデルによるシミュレーションを実施した（東北大学理学部・三浦均助教の協力）。その結果、バクテリアの INP がベール面にのみ強く吸着して成長を抑制したと仮定すると、潜熱発生量の減少により c 軸に垂直な方向の成長速度が増大することがわかった。しかし、約 4 倍もの成長速度増加を定量的に説明するのは難しいように思われる。

結論として、本実験で観察された c 軸に垂直な方向の成長速度増大は、INP による水分子整列化促進の効果と、ベール面における潜熱発生量減少の効果の両方（あるいはどちらか）により説明することができる。観察された成長速度増大を定量的に説明することは、今後の課題として残された。

本研究結果は、INP がベール面に選択的に安定吸着する性質があることを強く示唆した。したがって、INP の氷接触部分はベール面格子とマッチする構造を持つものと考察される。このことを検証するために、INP の氷接触部分に相当するポリペプチドの MD

シミュレーションを実施した。しかしながら、ポリペプチド構造はかなりフレキシブルであり、本研究のシミュレーションにおいてその安定構造を決定するには至らなかった。

実際のバクテリア INP はサイズが極めて大きく、また細胞膜に埋め込まれた状態で安定構造を保ち、それにより氷核機能が発現されているものと思われる。したがって、氷核機能を発現する INP の詳しい構造を決定するためには、本研究で実施したものより遥かに大規模なシミュレーションが必要だと思われる。そのような大規模シミュレーションは今後の課題として残されたが、本研究によって少なくとも INP の構造上の特徴が初めて明らかにできたことは強調しておきたい。

(2) AFP の氷界面吸着構造特性

次に、AFP 氷界面吸着挙動の MD シミュレーション研究の結果について述べる。シミュレーションは、成長状態にある氷プリズム界面に対して実施した。AFP の初期界面吸着構造として、AFP のスレオニン配列面がプリズム面格子とマッチするような吸着構造（エネルギー的安定吸着構造、以下、吸着構造 A と記述）と、それとはまったく異なる吸着構造（エネルギー的不安定吸着構造、以下、吸着構造 B）の二通りを調べた。

シミュレーションの結果、吸着構造 A の AFP は、周辺に氷が成長しても界面に安定配置したままであった。また、周辺に成長する氷の成長速度が劇的に減少した。この成長速度減少は、AFP による氷の成長抑制に相当するものであったと思われる。結論として、吸着構造 A は氷の成長抑制を引き起こす安定な界面吸着構造である。

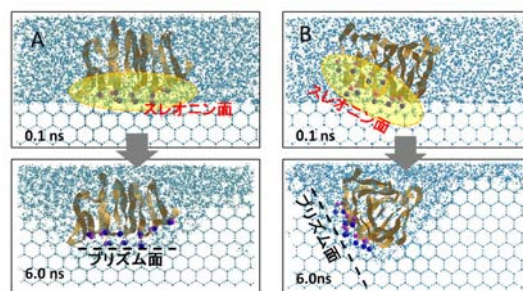


図 3：吸着構造 A（左）および吸着構造 B（右）のプリズム界面吸着構造の時間変化。

一方、吸着構造 B はシミュレーション開始するや否や別の吸着構造へ遷移した。これにより、この吸着構造は氷成長界面で安定にならないことがわかった。しかし最終的には、吸着構造 A と同じようにプリズム面に AFP スレオニン配列面が接触するように安定吸着し、そして氷の成長抑制に相当する成長速度現象が起こった。以上により、AFP スレオニン配列面の氷への接触が、吸着構造安定化

の必要条件であると結論付けられる。

しかし、吸着構造 B からの遷移により最終的に到達した安定吸着構造は、吸着構造 A とは異なるものであった (AFP はベータ・ヘリックス構造を持つが、吸着構造 A と B ではヘリックス軸の方向ベクトルが 90°ずれていた)。以上より、プリズム面の成長抑制を引き起こす安定吸着構造は少なくとも二通りあると結論付けられる。本研究結果は、AFP の安定吸着にはプリズム面格子との厳密な構造マッチングは必ずしも必要ないことを示唆している。このことは、格子構造が若干異なるベータ面へも AFP が安定吸着するという事実も説明すると思われる。

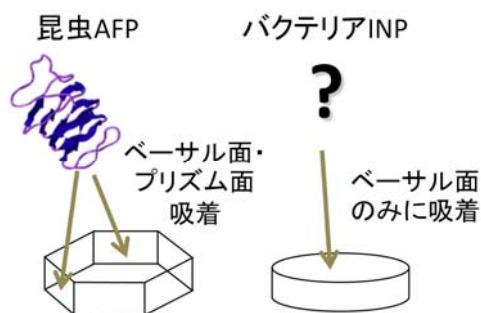


図 4: AFP と INP の氷結晶吸着面の違い。

以上、本研究の結果は次のようにまとめられる。INP はベータ面に選択的に安定吸着する構造を持つ。AFP はベータ面にもプリズム面にも安定吸着する構造を持つ。アミノ酸配列は両方のタンパク質で類似している。したがって、氷との相互作用特性も両方のタンパク質で極めて類似していると思われる。しかし、構造は全く同じではない。したがって、タンパク質が発現する機能が氷核であるか不凍であるかを分けるものは、タンパク質のサイズだけではなく、その構造にもあると結論付けられる。

最後に、本研究において氷結晶の成長モルフロジーを直接解析できる MD シミュレーション手法開発も行った。この手法を用いることにより、AFP 吸着による氷結晶モルフロジーの分子レベル直接解析 MD シミュレーション研究が可能である。これは、本研究に引き続いて実施されるべき先々の計算科学研究テーマの一つかと思われる。

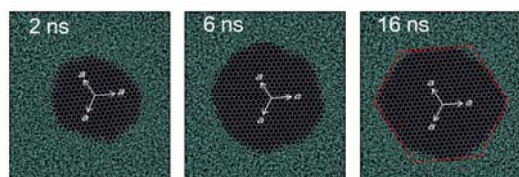


図 5: 氷結晶自由成長 MD シミュレーションで観察される成長モルフロジー時間変化。

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 7 件)

- ① 灘浩樹, 古川義純, Antifreeze proteins: Computer simulation studies on the mechanism of ice growth inhibition, *Polymer Journal* (招待論文、Selected for Cover Picture), 査読有, 印刷中, 2012, DOI: 10.1038/PJ.2012.13
- ② 灘浩樹, 古川義純, Growth inhibition at the ice prismatic plane induced by a spruce budworm antifreeze protein: a molecular dynamics simulation study, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 査読有, Vol. 13, 2011, pp.19936–19942, DOI: 10.1039/C1CP21929D
- ③ 灘浩樹, 不凍タンパク質による氷の成長抑制: 理論と計算科学研究, *冷凍*, 査読無, Vol. 86, 2011, pp.545–550, DOI: なし.
- ④ 灘浩樹, Analysis of ice crystal growth shape under high pressure using molecular dynamics simulation, *Crystal Growth & Design*, 査読有, Vol. 11, 2011, pp.3130 – 3136, DOI: 10.1021/CG2003904
- ⑤ 灘浩樹, A challenge to observe ice growth shape in molecular dynamics simulation, *Physics and Chemistry of Ice 2010*, 査読有, 2011, pp.293–298, DOI: なし.
- ⑥ 灘浩樹, 古川義純, Growth mechanism of a hexagonal bipyramidal ice crystal in the presence of winter flounder antifreeze proteins, *Physics and Chemistry of Ice 2010*, 査読有, 2011, pp.429–436, DOI: なし.
- ⑦ 灘浩樹, サルバドール・ゼペダ, 三浦均, 古川義純, Significant alternations in anisotropic ice growth rate induced by ice nucleation-active bacteria *Xanthomonas Campestris*, *Chemical Physics Letters*, 査読有, Vol. 498, 2011, pp.101–106, DOI: 10.1016/j.cplett.2010.08.062

[学会発表] (計 17 件)

- ① 灘浩樹, Ice Crystal Growth Controlled by Antifreeze Proteins, NEPTIS-20 (招待講演), 2011 年 11 月 29 日, 大津プリンスホテル (滋賀).
- ② 灘浩樹, Salvador Zepeda, 三浦均, 古川義純, 不凍タンパク質と氷核タンパク質共存下での氷の結晶成長, 第 41 回結晶成長国内会議, 2011 年 11 月 3 日, つくば国際会議場 (茨城).

- ③ 灘浩樹、古川義純, 不凍タンパク質の氷結晶界面吸着構造と分子レベル成長制御機構, 第 60 回高分子討論会, 2011 年 9 月 29 日, 岡山大学 (岡山).
- ④ 灘浩樹, Significant alternations in anisotropic ice growth rate induced by bacterial ice-nucleating proteins, 1st International Ice-Binding Protein Conference (招待講演), 2011 年 8 月 4 日, キングストン大学 (カナダ).
- ⑤ 灘浩樹, Studies on mechanism of ice growth inhibition by antifreeze proteins, The 5th Asian Conference on Crystal Growth and Crystal Technology (招待講演), 2011 年 7 月 1 日, パンパシフィックシンガポールホテル (シンガポール).
- ⑥ 灘浩樹, 高圧下における氷結晶成長の分子動力学シミュレーション, 日本物理学会 2010 年秋季大会, 2010 年 9 月 24 日, 大阪府立大学 (大阪).
- ⑦ 灘浩樹, Growth shape of nanoscale hexagonal ice crystal: a molecular dynamics study, 12th International Conference on the Physics and Chemistry of Ice (招待講演), 2010 年 9 月 10 日, 北海道大学 (札幌).
- ⑧ 灘浩樹, サルバドール・ゼベダ, 三浦均, 古川義純, Anisotropic growth rate of ice in the presence of ice nucleation-active bacteria, 12th International Conference on the Physics and Chemistry of Ice, 2010 年 9 月 9 日, 北海道大学 (札幌).
- ⑨ 灘浩樹, 古川義純, Growth inhibition mechanism of ice by antifreeze protein: a molecular dynamics study, 12th International Conference on the Physics and Chemistry of Ice, 2010 年 9 月 7 日, 北海道大学 (札幌).
- ⑩ 灘浩樹, Growth mechanism of tetrahydrofuran clathrate hydrate, 12th International Conference on the Physics and Chemistry of Ice, 2010 年 9 月 6 日, 北海道大学 (札幌).
- ⑪ 灘浩樹, Ice growth shape analyzed by molecular dynamics simulation, 16th International Conference on Crystal Growth, 2010 年 8 月 10 日, 北京国際コンベンションセンター (北京).
- ⑫ 三浦均, 灘浩樹, 塚本勝男, 過冷却水中で成長する氷結晶の形態における結晶化潜熱の影響, 2010 年 5 月 23 日, 日本地球惑星科学連合 2010 年大会、幕張メッセ国際会議場 (千葉)
- ⑬ 灘浩樹, Growth mechanism of tetrahydrofuran clathrate hydrate: a molecular dynamics study,

ACAM-CECAM Workshop on Molecular Simulation of Clathrate Hydrates (招待講演), 2010 年 5 月 6 日, University College Dublin (ダブリン).

- ⑭ 灘浩樹, 氷核活性バクテリア存在下での氷結晶成長速度の異方性, 日本物理学会第 65 回年次大会, 2010 年 3 月 21 日, 岡山大学 (岡山).
- ⑮ 灘浩樹, バクテリア氷核タンパク質が氷の結晶成長に与える影響, 第 39 回結晶成長国内会議, 2009 年 11 月 14 日, 名古屋大学 (名古屋).
- ⑯ 灘浩樹, 氷核活性バクテリア存在下での氷の結晶成長, 日本物理学会 2009 年秋季大会, 2009 年 9 月 27 日, 熊本大学 (熊本).
- ⑰ 灘浩樹, An experimental study of ice growth in the presence of ice nucleation-active bacteria, CRYO2009, 2009 年 7 月 20 日, 北海道大学 (札幌).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

灘 浩樹 (NADA HIROKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・環境管理技術研究部門・主任研究員

研究者番号: 90357682

(3) 連携研究者

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