様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ６ 月 ２２ 日現在

機関番号：１４３０３
研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2012～2014
課題番号：２４３６００８１

研究課題名（和文）不凍タンパク質とイオンの協同効果による氷スラリー流中の氷粒子成長の高度制御

研究課題名（英文）Advanced control of ice-particle growth in ice slurry flow by a cooperative effect of antifreeze protein and ions

研究代表者
萩原　良道（Hagiwara, Yoshimichi）

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授

研究者番号：５０１４４３３２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,200,000円

研究成果の概要（和文）：微細流路内の氷水混合体（氷スラリー）の実験を行い、氷スラリーに塩と不凍タンパク質を添加することにより、不凍タンパク質を添加していない場合に比べて氷粒子塊の規模が小さくなることを得た。この理由を明らかにするために、不凍タンパク質とイオンの混合水溶液の一方向凍結実験を行い、溶質の相互作用により不凍タンパク質とイオンの濃度分布の時間依存性が変化することを得た。また、分子動力学解析により、イオンと不凍タンパク質と氷表面の相互作用の知見を得た。さらに、不凍タンパク質の一部分に着想を得たポリペプチドの有効性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We carried out experiments on flow of the mixture of ice and water (ice slurry) in a mini-channel. It was found that the clusters of ice particles in the case with the ions and antifreeze protein in flow were smaller than those in the case with ions only. To clarify the reason for this result, we conducted experiments on unidirectional freezing for the mixed solution of ions and antifreeze protein. We obtained that the evolution of concentration profiles of ions and antifreeze proteins was modified due to the interaction of solutes. Also, we obtained results concerning the interaction among ions, antifreeze protein and an ice surface using a molecular dynamics analysis. In addition, we clarified the effectiveness of a polypeptide, which was inspired with the antifreeze protein.

研究分野：熱工学

キーワード：省エネルギー　蛋白質　結晶成長　生物物理　ナノバイオ

１．研究開始当初の背景

福島第一原子力発電所の過酷事故以後、いっそうの省エネルギー化が求められてきた。以前より、夜間電力を利用して水の一部を凍らせて潜熱を蓄え、これを夏の昼間の冷房に用いる氷蓄熱式空調システムが注目を浴びたが、このシステムは大規模のため、かならずしも節電や震災対策にはならない。他方、節電や震災対策に有効とされる分散型電源や分散型エネルギー利用は、住宅や小型設備に有効であるが、細い配管内に氷がつまりやすくなるため、氷の成長を高度に制御しない限り、運転に適さない。つまり、小型分散氷蓄熱式空調システムの確立には、氷の成長を制御する方法の開発が必要不可欠である。

上記の空調システムに利用される氷を含む水、つまり氷スラリーは、近年、食材の冷蔵や長距離輸送に利用されるようになってきた。これは、食材が直接氷に触れると、その部分の水分が凍結して材料が破壊され、食用に適さなくなるからである。氷スラリーを用いる食品材料の冷蔵・輸送法は有効であるが、氷の成長あるいは融解の制御が必要不可欠である。しかも、その制御に可能な限り電力を使用しないようにすれば、停電や物流の停滞が起こった場合にも対処できる。

氷成長の制御に関しては、これまでに、様々な方法が検討され、実用化されてきたが、添加物の利用が最も進んでいる。水を外から取り入れる開放系や食材の場合には、安全性の高い添加物が要求されてきた。そのような添加物として、不凍タンパク質がある。不凍タンパク質は、ある種の魚、昆虫、植物、菌類から発見されており、一部食品添加物として実用化されつつある。これまでの世界中の研究成果より、極めて低い冷却率(<1℃/min)の下では、不凍タンパク質は氷結晶に吸着あるいは接近して、凝固点を下げ、氷結晶成長あるいは再結晶を阻害する機能を有することがわかっている。なお、融点はほとんど変化しないため、凝固点と融点の間に温度を設定すれば、氷は成長も融解もしない。このような、不凍タンパク質の優れた特徴を氷水混合体に利用することはほとんど検討されていなかった。

２．研究の目的

本研究の最終目標は、小型分散高効率熱交換システムの開発や食材などの保存法開発に極めて有効である、氷スラリーの流れにおける氷粒子の長期間安定化である。この目標達成に向けて、氷スラリー流に添加したイオンと不凍タンパク質の現象への影響を解明することを本研究の目的とする。この解明のために、氷粒子の形状、液体速度、温度、イオンとタンパク質の濃度に関する新しい計測法と数値シミュレーション法を開発し、確立する。これらの新しい手法を用いて計測と数値シミュレーションを実行し、得られる結果を考察して、イオンと不凍タンパク質により氷スラリー流中の氷粒子の変化を高度に制御する方法を提示する。

３．研究の方法

まず、氷の微粒子を多数含む氷スラリーの生成法を確立する。つぎに倒立顕微鏡のステージ上に固定された微細流路（断面が 1mm × 0.7mm）内に氷スラリーを導入して流動させ、氷粒子の形状と速度を測定する。トレーサー粒子を添加して、液体の速度を測定する。近赤外光の吸収を利用して平均温度場を測定する。外部委託により合成した冬ガレイ由来不凍タンパク質に蛍光分子を付与して、不凍タンパク質の濃度場を測定する。

氷スラリー流においては、その流動のゆえに、氷表面、不凍タンパク質、イオンの相互作用を詳細に調べることはきわめて困難である。そこでこの相互作用を詳細に調べるために、一方向凍結の実験を行った。イオンの濃度場を計測するために、赤紫色を示す過マンガン酸イオンを用い、予め得た濃度と透過光強度の較正曲線から局所濃度を求めた。なお、極細熱電対を用いて氷・水溶液界面の温度を測定し、純水・氷界面温度との差である界面温度低下度を議論した。

フェーズフィールド法を用いて、サブミリスケールの氷スラリー流の速度・温度・氷成長の予測を試みた。また、イオンと冬ガレイ由来不凍タンパク質分子が氷表面近傍の水分子に与える影響を調べるために、分子動力学解析を行った。

４．研究成果

微細流路内の氷スラリーに塩化ナトリウムのみを添加した場合には、多数の氷粒子が結合したクラスターが生成された（図 1(a)参照）。この氷粒子クラスターは、その流れ方向のサイズが大きく、かつ高い速度で移動した。氷スラリーに塩化ナトリウムと冬ガレイ由来不凍タンパク質を添加した場合には、氷粒子クラスターはその規模が小さくなり（図 1(b)参照）、流路上部を低速で移動することを得た。これは氷粒子クラスターの規模が小さくなり、浮力の影響により氷粒子クラスターは流路上部の低速液流域に集中するためである。さらに小さな氷粒子クラスターは揺動的に回転し、それにより周りの液流が攪拌さ

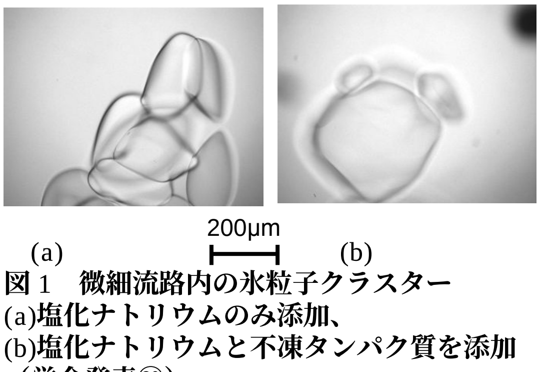


図１　微細流路内の氷粒子クラスター
(a)塩化ナトリウムのみ添加、
(b)塩化ナトリウムと不凍タンパク質を添加
（学会発表⑳）

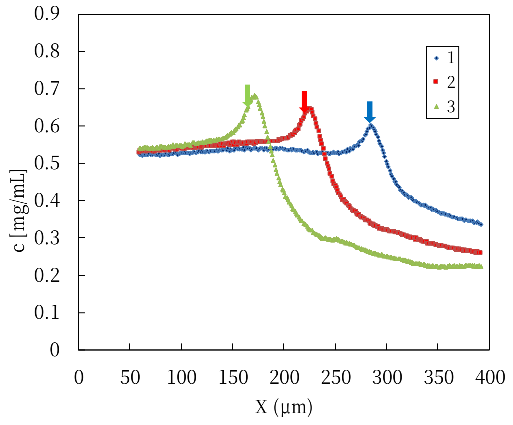
れること、これらのことより、AFP 添加により熱伝達が促進される可能性があることを明らかにした。

厚さ 0.02mm のきわめて薄い水溶液に関する一方向凍結実験を行った。その結果、混合水溶液の氷の界面温度は、冬ガレイ由来不凍タンパク質水溶液の氷の界面温度と塩化ナトリウム水溶液の氷の界面温度の和よりも低いことを得た。これは準平衡状態における凝固点降下を計測した先行研究の結果と首尾一貫する。

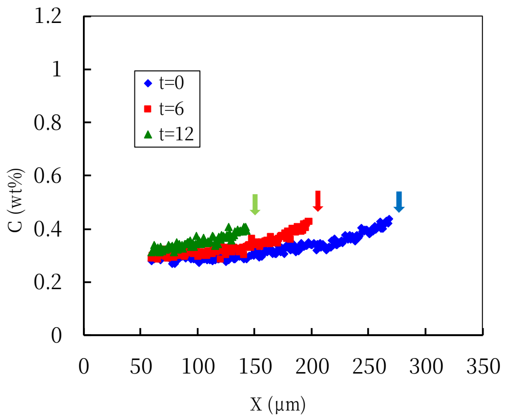
他方、準平行状態では問題にならない氷成長速度の影響を詳細に調べた。氷成長速度が 7 – 15μm/s の範囲では、溶質が一種類の場合には界面温度は氷成長速度の増加とともに低下した。これは氷に排除された溶質が界面に堆積することによる。対照的に、混合水溶液の界面温度は氷成長速度の増加とともに上昇することが明らかになった。この違いの原因として、以下の 2 点が挙げられる。①イオンにより不凍タンパク質高濃度域の形成と不凍タンパク質の氷表面への吸着が抑制され、界面近傍の不凍タンパク質濃度が氷の成長につれて増加する（図 2(a)参照)。②不凍タンパク質によりイオンの拡散が促進され、氷の成長に伴うイオン濃度の上昇が抑えられる（図 2(b)参照)。

一般に、不凍タンパク質は変性する。さらに生物内の不凍タンパク質は微量であり、抽出にはコストがかかる。原子配列が既知の不凍タンパク質の場合には化学的に合成可能であるが、合成に時間とコストがかかる。このような状況から、近年代替物質の検討が行われている。その例として、合成保存料のポリリジンを基にした不凍ポリアミノ酸、冬ガレイ由来不凍タンパク質を基にしたポリペプチドがある。後者については、著者らのグループが行った一方向凍結実験の結果、ポリペプチド濃度を高めることにより、界面形状は櫛状になり（図 3 参照）冬ガレイ由来不凍タンパク質の場合の鋸刃状界面とは異なるものの、不凍タンパク質の場合と同様の界面温度低下と塩化ナトリウムとの相互作用を得た。さらに、ポリペプチド水溶液を数時間予熱し、冷却後に実験を行ったところ、界面温度の低下が促進されることを新たに発見した。

氷表面近傍のイオンと水分子の運動の分子動力学解析の結果、氷表面近傍のイオンの運動は著しく抑制されることを明らかにした。具体的には、カルシウムイオンの拡散係数を求めたところ、界面から 1.5 nm の範囲では、拡散係数は距離に比例して増加することを明らかにした（図 4 参照)。この理由として、イオンの水和殻にある水分子が氷表面の水分子と水素結合することが考えられる。



(a)



(b)

図 2　界面の頂部近傍の液体領域における溶質濃度分布の時間変化
(a)不凍タンパク質
(b)過マンガン酸ナトリウム
（論文②）

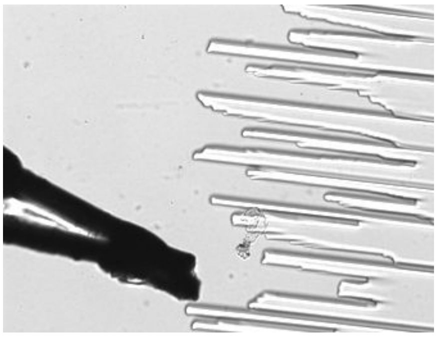


図 3　ポリプチ度水溶液の一方向凍結により得られた界面形状。左の黒い線は熱電対
（学会発表⑦）

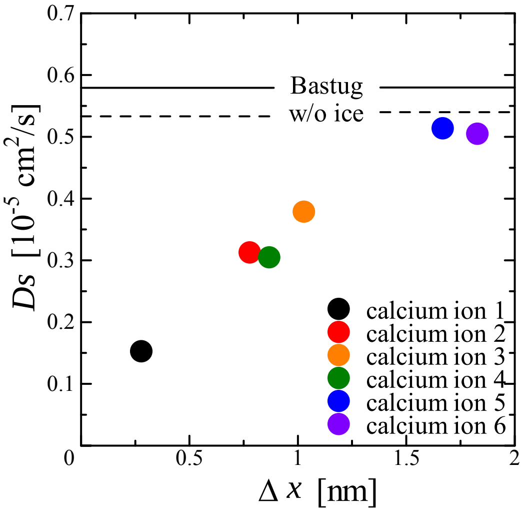


図 4　氷表面近傍における水中のカルシウムイオンの拡散係数の位置依存性
（論文①）

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 Y. Nohara and Y. Hagiwara, Diffusion of cations in salt solutions between ice walls, Molecular Simulation, vol. 41 (2015), No. 10-12, pp. 980-985.査読有. DOI: 10.1080/08927022.2014.931580. URL: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08927022.2014.931580#.VYA6B8sViM8.

② Y. Hagiwara and H. Aomatsu, Supercooling enhancement by adding antifreeze protein and ions to water in a narrow space, Int. J. Heat Mass Transfer, vol. 86 (2015), pp. 55-64. 査読有. DOI: 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2015.02.058. URL: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0017931015002215.

③ 萩原　良道，不凍タンパク質とイオンが水と氷に与える影響に関する古典分子動力学解析，分子シミュレーション研究会会誌「アンサンブル」第 15 巻 (2013). pp. 172 - 178.査読無. DOI:10.11436/mssj.15.172. URL: http://www.org/10.11436/mssj.15.172.

〔学会発表〕（計２９件）

① 西 真人，萩原　良道，田中 直毅，和久 友則，加熱したポリペプチド水溶液による氷界面温度低下の促進，「氷の準液体相と不凍現象」ワークショップ，2014 年 11 月 14 日，寝屋川市，大阪電気通信大学．

② 寺井 航，萩原　良道，野原 佑太，陽イオンと氷のピラミッド面に吸着した不凍タンパク質の水和殻内の水分子の挙動，「氷の準液体相と不凍現象」ワークショップ，2014 年 11 月 14 日，寝屋川市，大阪電気通信大学．

③ H. Aomatsu and Y. Hagiwara, On the depression of ice/water interface temperature by adding antifreeze protein and ions to water in a narrow space, 2nd Ice-binding Protein Conference, 2014 年 8 月 5 日，札幌市，北海道大学．

④ N. Nishi, Y. Hagiwara, T. Waku and N. Tanaka, Enhancement of the depression of ice/water interface temperature by heating polypeptide solutions, 2nd Ice-binding Protein Conference, 2014 年 8 月 4 日，札幌市，北海道大学．

⑤ Y. Nohara, K. Terai and Y. Hagiwara, Trapping of water molecules by cations and sites of winter flounder antifreeze protein adsorbed on an ice pyramidal facet, 2nd Ice-binding Protein Conference, 2014 年 8 月 4 日，札幌市，北海道大学．

⑥ 西 真人，青松 大貴，萩原 良道，不凍タンパク質の一部を基にしたポリペプチドの氷成長抑制，第 51 回日本伝熱シンポジウム，2014 年 5 月 23 日，浜松市，アクトシティ浜松・コングレスセンター．

⑦ 平 和也，萩原 良道，微細流路内における不凍タンパク質および塩化ナトリウム水溶液の氷結晶成長，第 23 回日本 MRS 年次大会ネイチャーテクノロジーシンポジウム，2013 年 12 月 10 日，横浜市，万国橋会議センター．

⑧ 萩原 良道，前田 穣，青松 大貴，一方向凝固における氷・水界面に内部電場が与える影響，第 3 回潜熱工学シンポジウム，2013 年 11 月 26 日，神戸市，神戸大学．

⑨ H. Aomatsu and Y. Hagiwara, Comparison of the effects of two different dilute solutions of antifreeze protein and ions on ice growth, 24th Int. Symposium on Transport Phenomena, 2013 年 11 月 3 日，山陽小野田市，山口東京理科大学．

⑩ 平 和也，萩原 良道，大西 洋輔，中川 嘉章，微細流路における不凍タンパク質と塩化ナトリウムの水溶液流内の氷成長と温度場，熱工学コンファレンス 2013，2013 年 10 月 20 日，弘前市，弘前大学．

⑪ 中川 嘉章，萩原 良道，平 和也，微細流路内における不凍タンパク質を含む氷スラリー流の速度場計測，熱工学コンファレンス 2013，2013 年 10 月 19 日，弘前市，弘前大学．

⑫ 青松 大貴，前田 穣，萩原　良道，凍結しつつあるイオンと不凍タンパク質の水溶液に対する電場付与による界面温度低下，日本機械学会 2013 年度年次大会講演会，2013 年 9 月 9 日，岡山市，岡山大学．

⑬ 黒島 考平，萩原　良道，早狩 浩平，水・氷・混合体における水分子への力学的振動

が及ぼす影響に関する分子動力学的研究，第 26 回分子シミュレーション討論会，2012 年 11 月 26 日，福岡市，九州大学．

⑭ Y. Nohara, K. Kuroshima and Y. Hagiwara, Molecular dynamics simulation for the behavior of cations near ice wall, JSME-CMD International Computational Mechanics Symposium, 2012 年 10 月 9 日，神戸市，理化学研究所．

⑮ Y. Hagiwara, H. Fujii and A. Kitagawa, Experimental verification for the prediction of particle path and particle Reynolds number using local Stokes number, 7th Int. Symposium on Turbulence, Heat and Mass Transfer, 2012 年 9 月 25 日，Palermo, Italy, University of Palermo．

⑯ 野原 佑太，萩原　良道，黒島 考平，分子動力学法による氷壁付近のイオンの挙動，日本機械学会 2012 年度年次大会講演会，2012 年 9 月 12 日，金沢市，金沢大学．

⑰ Y. Onishi, Y. Nakagawa, A. Kitagawa and Y. Hagiwara, Temperature, flow velocity and protein concentration near ice surfaces in mini-channels, 10th Int. Conference on Phase-change Materials and Slurries for Refrigeration and Air Conditioning, 2012 年 7 月 30 日，神戸市，神戸大学．

⑱ T. Tsurugasaki, K. Tatsuta, Y. Hagiwara and T. Takaki, Numerical simulation of supercooled water flow with an ice crystal in a two-dimensional duct, 10th Int. Conference on Phase-change Materials and Slurries for Refrigeration and Air Conditioning, 2012 年 7 月 30 日，神戸市，神戸大学．

〔図書〕（計　２件）

① Y. Hagiwara, Bio-mimetics and bio-inspiration, Multiphase Flow Handbook 2nd ed., CRC Press (2015), to appear.

② 萩原　良道，不凍タンパク質による氷結晶成長抑制のメカニズムとその応用，生体模倣技術と新材料･新製品開発への応用，技術情報協会，pp. 236 – 241 (2014).

〔産業財産権〕

○出願状況（計　０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.cis.kit.ac.jp/~kitagawa/
http://www.bioinspiredm.org/

招待講演

① 萩原 良道，不凍タンパク質とイオンの添加による界面温度低下，「氷の準液体相と不凍現象」ワークショップ，2014 年 11 月 15 日，寝屋川市，大阪電気通信大学．

② 萩原 良道，生物の優れた機能から着想を得た新しいものづくり，特定非営利活動法人 CAE 懇話会第 39 回関西 CAE 懇話会，2014 年 6 月 20 日，京都市，京都工芸繊維大学．

③ 萩原 良道，生物の不凍機能にヒントを得た氷成長制御，第 2 回潜熱工学シンポジウム，2012 年 12 月 10 日，神戸市，神戸大学．

６．研究組織

(1)研究代表者

萩原　良道（HAGIWARA　Yoshimichi）
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授
研究者番号：５０１４４３３２

(2)研究分担者

稲田　孝明（INADA Takaaki）
産業技術総合研究所・主任研究員
研究者番号：６０３５６４９１

角田　直人（KAKUTA Naoto）
首都大学東京・准教授
研究者番号：７０３４５４３７

(3)連携研究者