

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15071

研究課題名（和文）氷と細胞に結合する天然多機能性タンパク質の分子メカニズム解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism of multifunctional proteins binding to ice and cells

研究代表者

新井 達也（Arai, Tatsuya）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・助教

研究者番号：90890145

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、氷結晶結合タンパク質（IBP）が非凍結低温下でどのように細胞を保護しているのかを、分子レベルで明らかにすることを目的とした。様々な種類のIBPを作製し、構造の大きく異なるIBP全てが細胞を保護することを明らかにした。さらに、氷結晶結合部位にアミノ酸変位を導入した結果、それらの細胞保護効果が大きく変化するため、氷結晶結合部位が細胞吸着に関与することが示された。また、IBPが低温において細胞に不可逆的に吸着することを実験的に証明した。これらの結果をまとめ、責任著者として論文発表した。これらの結果は、細胞の低温耐性機構獲得の解明に大きく貢献すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の保存技術の発展は、研究・医療分野において非常に重要な課題である。一般的に細胞は-80℃以下の超低温で冷凍保存される。しかし、血小板などの細胞や臓器は凍結保存ができないため、非凍結低温下で保存される。この際にも細胞は様々なダメージを受けるため、短期間しか保存することができないのが現状である。本研究において明らかになった、様々な構造を持つIBPが低温で細胞を保護可能であるという発見は、IBP添加するだけで様々な細胞の保存期間を延長できる可能性を示唆している。今後、この細胞保護効果の分子メカニズムを更に解明していくことで、細胞をより長期間保存する技術の発展に貢献する事ができると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate at the molecular level how ice-binding proteins (IBPs) protect cells under non-freezing low temperatures. Various types of IBPs were synthesized, and it was revealed that all IBPs with significantly different structures could protect cells. Furthermore, introducing amino acid substitutions into the ice-binding sites resulted in significant changes in their cell protection effects, indicating the involvement of ice-binding sites in cell adhesion. Additionally, it was experimentally demonstrated that IBPs irreversibly absorb cells at low temperatures. These findings were summarized and published as a paper. It is believed that these results significantly contribute to understanding the mechanisms underlying cellular cold tolerance acquisition.

研究分野：構造生物学

キーワード：非凍結細胞保存 氷結晶結合タンパク質 不凍機能 細胞膜 氷結晶

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の低温保存は、研究・医療分野において非常に重要な技術である。通常の細胞は、凍結保護剤を用いてマイナス 80 以下で冷凍保存される。しかし、血小板などの特殊な細胞や組織・臓器は冷凍することができず、4~20 で非凍結低温保存される。凍結保存と比べて非凍結保存は代謝反応を完全に停止することができず、細胞へのダメージが蓄積するため、保存期間は数日~数週間と極めて短い。

氷結晶結合タンパク質(Ice-binding protein: IBP)は、低温環境に生息する様々な生物が生産する生体保護物質である。IBP は生体内外で発生した氷結晶に結合して、その成長を抑制する不凍活性を有する。更に、IBP は哺乳類の細胞にも結合し、非凍結の低温下でそれらを保護する細胞保護機能を有する事も知られている。前者の活性については分子レベルで詳細なメカニズムが解明されてきているが、後者の分子レベルのメカニズムについてはほとんど調べられていない。低温における細胞膜の安定化を担っているという説や、細胞内外のイオンの流れを阻害する説などが提唱されているが、議論に決着はついていない。IBP がどのように細胞を保護しているのか? を調べることは、細胞の非凍結保存技術の発展のためにも非常に重要だと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、IBP が非凍結低温下で細胞を保護する分子メカニズムを解明することにある。特に、氷結晶結合機能と細胞結合機能の相関関係に着目する。そのために不凍活性の異なる複数種類の IBP やその変異体を用いて、細胞保護効果の検証を網羅的に行う。また、IBP の氷結晶結合機能に関する知見を広げるために、新規 IBP の探索も行った。

### 3. 研究の方法

様々な IBP を天然資源・遺伝子組換え体から精製し、それらの細胞保護機能を調べた。IBP の非凍結細胞保護機能は、ヒト白血病細胞株 CCRF-CEM を細胞保存液ユーロコリンズ(EC)液中で 4・24 時間保存し、その後の生存率で評価した。EC 液に添加する IBP の量は 0.1~20mg/ml とし、細胞保護機能の濃度依存性を調べた。生存率は血球計算盤とトリパンブルー染色により算出した。不凍機能と細胞保護機能の関係を知るための変異体は、大腸菌を用いた遺伝子組換え発現で作製した。

北極菌類 *Psychromyces glacialis* からの新規 IBP は菌体培養上清から精製した。菌体培養液を遠心し、IBP が含まれる上清を回収した。断熱容器に上清とスターラーを入れ、これをマイナス 2~5 に設定したインキュベーターに静置した。液体表面に氷の膜が張ったところでスターラーによる攪拌を開始し、一晩放置した。サンプル溶液の 8 割程度が凍結したところで、凍結画分を回収し、融解することで IBP を回収した。アイソフォームを分離するために、氷画分サンプルに対し、陽イオン交換カラム・ゲルろ過カラムを用いて更に精製した。

### 4. 研究成果

(1) 魚や昆虫や菌類由来の様々な IBP を発現・精製し、それらが全て細胞を保護することを明らかにした。図 1 には 3 種類の魚類由来 IBP を添加した保存液中における 4、24 時間後の CCRF-CEM 細胞の生存率を示した。全ての IBP が濃度依存的に細胞を保護することが明らかになった。細胞保護効果を発揮するには 5~10 mg/ml 程度の濃度が必要であることが明らかになった。この濃度は魚類血液における IBP 濃度(10~30 mg/ml)と非常に近く、生体においても IBP が細胞保護機能を発揮していると考えられる。

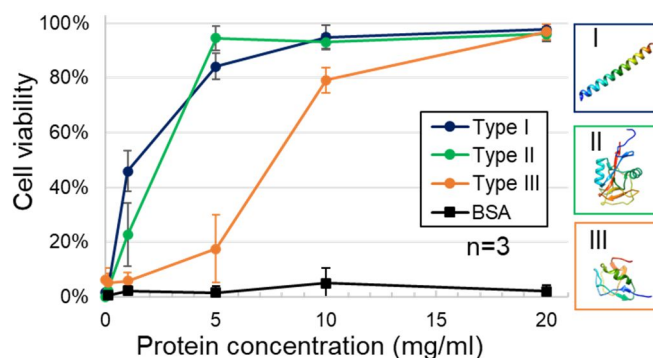


図 1. 4、24 時間保存後の細胞生存率。

また、本結果は IBP が浮遊細胞に対して細胞保護機能を発揮するという初めての報告である。魚類の血液中において、上皮細胞のみならず、血液系の細胞も保護している可能性が示された。

コントロールとして使用したウシ血清アルブミン(BSA)を同様の濃度で添加しても細胞生存率は上昇しなかった。この結果から、細胞保護機能は IBP に特有の機能であることが示唆された。図 1 の右側に示すように、これらの IBP は構造が大きく異なる。そのため、それらの共通部位である氷結晶結合部位が細胞保護機能に関与していると考えられた。この仮説を検証するために魚類 type III IBP の氷結晶結合部位にアミノ酸変位を導入し、それらの氷結晶成長抑制機能と細胞保護機能を比較した(図 2)。その結果、わずか 1 アミノ酸の変異で細胞保護機能が大きく変

化することが明らかになった。すなわち、氷結晶結合部位が細胞吸着に与与することが間接的にはあるが示された。一方で、不凍活性と細胞保護活性に相関はなかった。例えば、弱い不凍活性を持つ変異体 (A20L) は野生型よりも高い細胞保護効果を示した。

更に、IBP を含む EC 液に細胞を 30 分間浸した後に IBP を含まない EC 液中で 4・24 時間保存したところ、細胞の生存率は高いままであった。このことから、IBP は低温において細胞に強くに吸着していると考えられる。

これらの結果をまとめると、IBP は氷結晶結合部位を用いて細胞に強く結合することで細胞を保護していると考えられる。これらの結果をまとめ、責任著者として論文発表 (Y. Yang, et al., Biochem Biophys Res Commun. 682 (2023) 343-348.) および学会発表した。本研究の結果は、非凍結細胞保存期間の延長だけではなく、細胞の低温耐性機構獲得の解明に大きく貢献する発見だと考えられる。今後は、IBP が細胞のどの部位に結合しているのかを明らかにする必要がある。

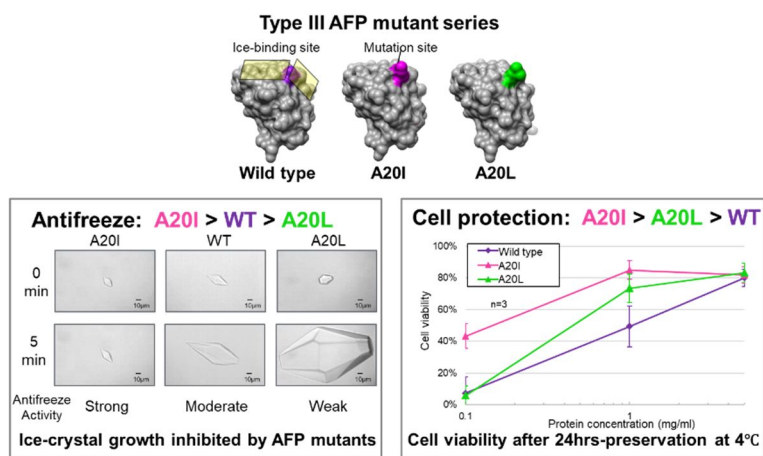


図 2. 魚類 type III IBP 変異体を用いた細胞保護実験結果

(2) 強力な氷結晶結合機能や細胞保護機能を持つ IBP を探索するために、天然資源からの新規 IBP 精製を行った。北極圏の菌類 *Psychromyces glacialis* が分泌する 2 種類の新規 IBP を発見・

精製した。これらの未知の IBP を精製するために、IBP 特有の精製方法である Ice-affinity purification (IAP) をより簡便に行えるように改良した手法を考案した。IAP は、サンプルの一部を凍らせ、IBP が氷に取り込まれることで IBP のみを選択的に精製する手法である。元の IAP では銅製のロッドに冷媒を流して冷却する特殊な装置群が必要であった (図 3A 左)。考案したオリジナルの IAP では、断熱効果のある容器にサンプルを入れ、それを低温インキュベーターに置くことで、一方向凍結を促す (図 3A 右)。溶液表面から徐々に凍結することで、IBP は氷の内部に、それ以外の不純物は底に溜まっていく。

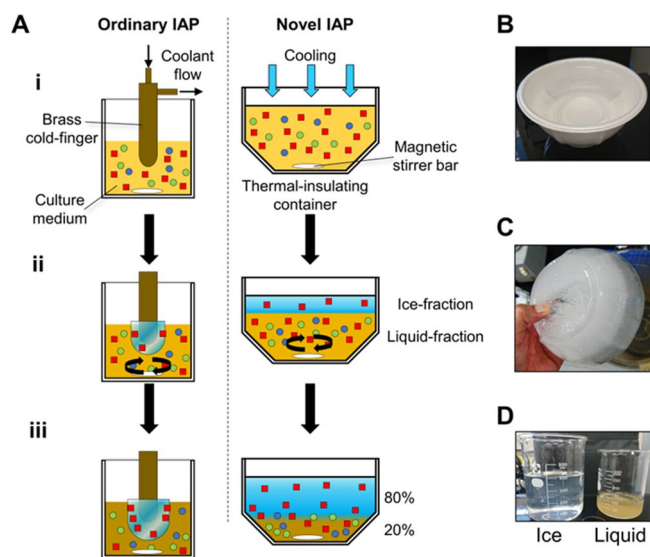


図 3. 新規 Ice-affinity purification のイメージ図

この方法では、スターラーと低温インキュベーターのみで IBP 精製を行うことができる。また、従来の方法では不可能であった、数百 ml の大容量のサンプルを扱うことができる。

IAP で精製したサンプルを陽イオンカラム・ゲルろ過カラムで更に精製した結果、少なくとも 2 種類の IBP アイソフォームの混合物であることが明らかになった。これらの IBP の氷結晶結合機能を解析したところ、2 種の IBP はどちらも全ての氷の結晶面の結合する能力を持っているが、凝固点降下機能 (熱ヒステリシス) は低いことがわかった。すなわち、全ての氷結晶面に結合できることは、氷の結晶成長を強く抑制するための十分条件ではないということが明らかになった。更に、氷の再結晶化阻害機能を調べたところ、どちらのアイソフォームも非常に高い活性を有することが明らかになった。つまり、これらの IBP は凍結を阻害するためではなく、氷結晶のサイズを小さく保つことで菌体のダメージを抑制していると考えられる。これらの結果をまとめ、国際論文として発表した (T. Arai, et al, Sci Rep. 12 (2022) 15443.)。IBP が結合する氷の結晶面と氷結晶成長抑制の関係はまだよくわかっていない。今後これらの IBP のメカニズムを X 線結晶構造解析などを用いて解明することで、IBP の機能を強化する新たな分子指標を提示することが可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yang Yue, Yamauchi Akari, Tsuda Sakae, Kuramochi Masahiro, Mio Kazuhiro, Sasaki Yuji C., Arai Tatsuya	4. 巻 682
2. 論文標題 The ice-binding site of antifreeze protein irreversibly binds to cell surface for its hypothermic protective function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 343 ~ 348
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.10.015	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 Arai Tatsuya, Yamauchi Akari, Yang Yue, Singh Shiv Mohan, Sasaki Yuji C., Tsuda Sakae	4. 巻 12
2. 論文標題 Adsorption of ice-binding proteins onto whole ice crystal surfaces does not necessarily confer a high thermal hysteresis activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1, 12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-19803-3	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Tatsuya Arai, Yang Yue, Kazuhiro Mio, Sakae Tsuda, Yuji C. Sasaki
2. 発表標題 Observation of dynamics of ice-crystals on the surface of antifreeze proteins by using time-resolved X-ray diffraction analysis
3. 学会等名 15th International Conference on the Physics and Chemistry of Ice (PCI-2023)（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新井 達也, 楊 越, 津田 栄, 三尾 和弘, 佐々木 裕次
2. 発表標題 回折X線明滅法で見る不凍タンパク質分子表面の凍結水和層のダイナミクス
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新井 達也, 楊 越, 津田 栄, 三尾 和弘, 佐々木 裕次
2. 発表標題 氷と細胞の双方に結合するタンパク質の分子機能解析
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tatsuya Arai, Yue Yang, Akari Yamauchi, Sakae Tsuda, Kazuhiro Mio, Yuji C. Sasaki
2. 発表標題 Elucidating the molecular mechanism of cell protective function of ice-binding proteins at non-freezing temperature
3. 学会等名 Ice Binding Protein conference 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tatsuya Arai
2. 発表標題 "Cell-adsorption and -protection of ice-binding protein at non-freezing temperature"
3. 学会等名 IBP international seminar series (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tatsuya Arai, Yue Yang, Akari Yamauchi, Sakae Tsuda, Kazuhiro Mio, Yuji C. Sasaki
2. 発表標題 Elucidating the molecular mechanism of cell protective function of ice-binding proteins at non-freezing temperature
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------