

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26287095

研究課題名(和文) 不凍タンパク質の機能は吸着氷界面の方位で異なる - 氷結晶成長の促進と抑制機構の解明

研究課題名(英文) Anisotropic function of antifreeze protein for ice crystal growth - To elucidate growth promotion and inhibition mechanism

研究代表者

古川 義純 (FURUKAWA, Yoshinori)

北海道大学・低温科学研究所・名誉教授

研究者番号：20113623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：凍結抑制タンパク質を含む過冷却水中で氷結晶の成長実験を行い、結晶の形態形成や成長速度の濃度、過冷却度、面方位依存性を、新開発の光学顕微鏡を駆使して測定した。氷のプリズム面に関しては成長速度の抑制効果が再確認されたが、ベーサル面については成長速度が促進されることが明らかになり、このタンパク質の効果は面方位に依存(異方的)することが確かめられた。ベーサル面の成長促進は、成長ステップのエッジに吸着したタンパク質分子が、新たな成長ステップの発生源として作用するためと考えられ、結晶成長に対する新たな不純物効果モデルを提案した。さらに、この異方的効果が生体の凍結抑制機構の本質であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Growth experiments of an ice crystal in a supercooled solution of antifreeze protein were carried out and separately measured the growth rates for the basal and prism faces. We clarified that the growth of basal faces was enhanced by the effect of antifreeze protein, while the growth of prism faces was suppressed. It means that the effects of antifreeze proteins for ice crystal growth were different for every crystallographic faces. The growth promotion of basal face was explained by a new model that the adsorbed antifreeze protein molecules on the edges of growth steps may work as the new sources to generate new growth steps on the basal faces. We clarified that the mechanism for the freezing inhibition of living organisms under the sub-zero temperature environments was compatibly explained on the basis of the anisotropic functions of antifreeze proteins for ice crystal growth.

研究分野：結晶成長

キーワード：氷結晶 不凍タンパク質 界面吸着 結晶成長 異方的不純物効果 振動成長 成長速度促進

1. 研究開始当初の背景

(1) 水は生体の生命維持に欠かせないが、一方で氷点下では固相の氷に変わるため、生体の生存を脅かす要因になりかねない。しかし、実際には多くの変温生物が氷点下でも凍結することなく生命活動を維持している。この生体の耐凍結戦略を担うものとして、凍結抑制タンパク質がよく知られている。このタンパク質は、氷結晶の成長界面に吸着することで、結晶の成長速度を抑制し、その結果として生体の凍結を防止すると考えられている。

(2) しかしながら、これらのタンパク質分子の氷界面への吸着状況や結晶成長に対する効果は、十分に明らかにされていない状況であった。その要因の一つは、凍結抑制タンパク質が関与する状況での氷結晶の成長実験が十分になされていなかったことである。このため、氷結晶の形態形成、成長速度の面方位依存性、さらに成長速度に時間依存性などの基本的な情報が不足していた。

(3) 特に、極地の海に住む魚由来の凍結抑制タンパク質の場合、氷の主要な結晶面であるプリズム面やピラミッド面では成長が抑制されることが明らかにされていた。しかし、もう一つの主要な結晶面であるベーサル面に関しては、特にその効果は無いと考えられてきた。

(4) 一方、AFGP 水溶液中では、氷結晶がピラミッド面で囲まれた十二面体の結晶外形を取ると、それ以上の成長が抑制されることが知られている。この結晶外形が実現されるには、ベーサル面の成長が極めて速いことが条件になる。多面体結晶の成長の基本原則として、結晶外形は最も成長速度の遅い結晶面で取り囲まれることが知られている。これは、十二面体の結晶外形の生成にはベーサル面がその他の結晶面より速く成長しなければならないことを意味する。したがって、プリズム面やピラミッド面に対する AFGP の効果を考える従来のモデルでは、十二面体結晶の生成を説明できない。

(5) 一般に、結晶成長に対する不純物効果は、結晶成長の制御などの応用面からも極めて重要な研究テーマである。近年、特にタンパク質などの生体高分子が不純物として作用する場合の結晶成長制御（いわゆる、バイオクリスタリゼーション）の機構の解明が大きな問題になっている。本課題で扱う凍結抑制タンパク質は、氷の結晶成長に対する生体高分子の効果であり、まさにこの問題の核心的な実験系である。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、凍結抑制タンパク質を含む過冷却水中での氷結晶の成長実験を行い、結晶面ごとの成長速度と結晶外形の時間変化を、

タンパク質の濃度と過冷却度をパラメータとして精密に測定する。

(2) 実験結果をもとに、成長界面でのタンパク質分子の吸着濃度や動的挙動、結晶成長速度の面方位依存性（異方性）、成長速度の時間変動などを解析する。このような結晶成長の基本的な解析をもとに、生体の凍結抑制機能の発現メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) 本研究で使用した凍結抑制タンパク質の試料は、極地の海に住む魚の体内から抽出されたものを用いる。これらの試料は、凍結抑制効果はそれほど大きくはない（熱ヒステリシスで 1 K 程度）が、近年知られる様々な凍結抑制タンパク質の中でも、最初に発見された基本的なものである。本研究では、不凍糖タンパク質 (antifreeze glycoprotein, AFGP) と不凍タンパク質タイプ III (antifreeze protein type III, AFP III) を使用した。

(2) 実験は、タンパク質を含む水を過冷却させ、その中で氷単結晶を自由成長させる。この方法は、結晶の成長に伴い結晶周囲に球対称の拡散場が生成され、結晶面ごとの成長速度や結晶外形の時間変化の観察に優れている。本実験で使用した実験システムは、研究代表者らにより開発されてきたものを利用した。このシステムは、氷結晶成長装置と氷結晶の観察に特化した光学顕微鏡により構成されている。光学顕微鏡は、明視野観察系と位相差、干渉、蛍光などの観察系を組み合わせられて構成されている。氷と水との界面での光反射係数は極めて小さい（ガラス表面の光反射係数の 1/500）ので、この界面の光学顕微鏡での観察は通常極めて困難である。本観察系では、特別な工夫を施すことで可視化を可能にしている。

(3) 実験結果をもとに、結晶面ごとに成長に対するタンパク質の効果を解析し、面方位依存性を明らかにする。さらに、この異方的効果が生体の凍結抑制機構とどのように関連するかを解明する。

4. 研究成果

(1) AFGP について、氷結晶の成長速度の精密測定を行った。この試料では、通常の地上での実験に加えて、国際宇宙ステーション「きぼう」の船内で行った氷結晶成長実験の成果も活用した。「きぼう」では、完全な無重力環境が実現するため、成長する結晶周囲の自然対流の影響が排除されるため、極めて高精度な測定が可能になる。

(2) その結果、プリズム面の成長速度は AFGP 分子の吸着の効果により結晶の成長速度が抑制されることが再確認された。一方、ベーサ

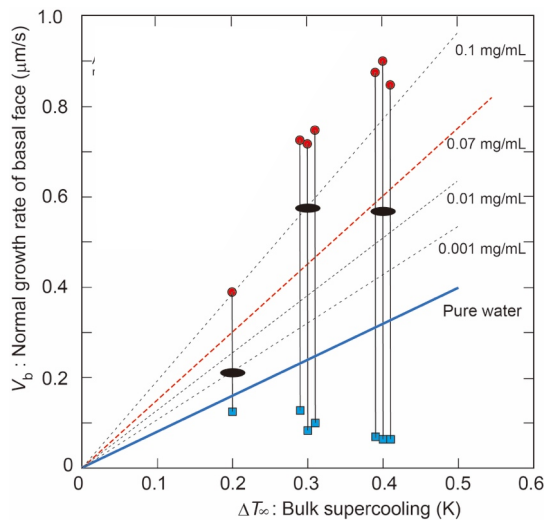


図1 AFGP水溶液（濃度 $70 \mu\text{g/mL}$ ）中で測定された氷ベーサル面の成長速度の過冷却度依存性。破線は地上実験の結果。「きぼう」実験（水溶液濃度 $70 \mu\text{g/mL}$ のみ）では、成長速度が周期変動するため、その最大値（赤丸）と最小値（青四角）を示す。速度の平均値は、地上実験と一致している。

ル面については、図1に示すように純水中での成長に比べて、3-4倍も成長が促進された¹⁾。AFGP分子は、氷のプリズム面のみ優先的に吸着するため、ベーサル面の成長には影響を与えないとされてきたが、本実験により完全に覆された。

(3) AFPIII に関しては、地上実験により同様な測定と解析を行った。その結果、AFGPの場合と同様に、プリズム面の成長抑制とベーサル面の成長促進を確認した。さらに、プリズム面に関しては、結晶の成長が完全に停止する過冷却領域（Dead zone）が存在することを初めて実験的に確認した²⁾。

(4) AFGP、および AFPIII の分子は、プリズム面、またはピラミッド面に選択的に吸着することが知られている。この特性をベースにして、結晶成長に対する異方的効果のメカニズムは、図2に模式的に示される。まず、プリズム面とピラミッド面では、界面に吸着した分子が界面移動（あるいは、成長ステップの移動）をピン留めする効果により、成長が抑制される。界面の吸着分子による被覆率は、蛍光顕微鏡観察により 10%以下であることが明らかになっている。したがって、隣接した吸着分子間の界面（または、成長ステップ）は前方に張りだすため、界面の曲率が局所的に大きくなり、ギブス・トムソン効果により界面の平衡融点温度が低下する。このため、面の成長が抑制される。このモデルは、不純物による結晶成長の抑制モデルとしてよく知られていて、ピン留めモデルあるいはギブス・ト

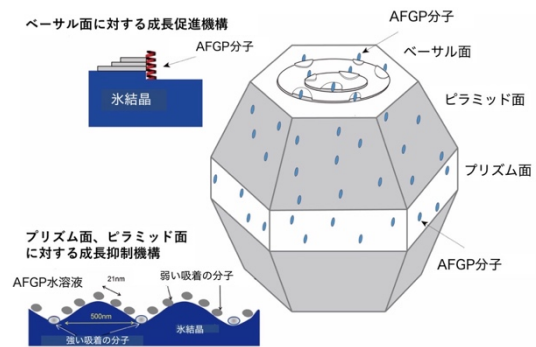


図2 氷のプリズム面とピラミッド面の成長抑制、およびベーサル面の成長促進のメカニズムを説明する模式図。タンパク質分子は、プリズム面に選択的に吸着する。この吸着分子が、成長面によってピン留め効果を持つ場合と成長ステップの発生源となる場合があり、これが異方的効果をもたらす。

ムソンモデルと呼ばれる。

(5) ベーサル面に関しては、純水から成長する場合でも常に平らで、成長ステップによる層状成長をすることが知られている。ベーサル面上の成長ステップの端面（エッジ面）に注目すると、ここはプリズム面またはピラミッド面が露出している。すなわち、タンパク質分子は、ステップのテラス面には吸着ができないが、端面には吸着が可能である（図2）。例えば、AFGP分子の大きさは3nm程度であるので、氷の単位ステップの高さ（0.37nm）よりも圧倒的に大きい。このため、端面に吸着した分子はステップから大きくはみ出すことになり、ベーサル面上での新たな成長ステップの発生源となる。その結果として、ベーサル面の成長が促進される。以上のように、タンパク質分子はプリズム面に選択的に吸着するという従来から明らかになっている特性に矛盾することなく、ベーサル面の成長促進を説明することが可能である¹⁾。

(6) 氷結晶は、熱ヒステリシスの温度領域（凍結抑制タンパク質を含む水中での氷結晶の成長開始温度（ T_c ）と氷結晶の融解開始温度（ T_m ）の間の温度領域）内では十二面体の外形（図3(a))を保って、成長も融解もせず存在している。実際に、寒冷環境にある生物から採取した血液中には、十二面体結晶が見出される。この事実と氷結晶成長に対する凍結抑制タンパク質の異方的効果は、生体の凍結抑制機能の発現と密接に関連している。図3(b)に示すように、多面体結晶の成長では、以下のような特徴がある。すなわち、成長速度は面ごとに異なり、速度の速い面は成長とともに徐々に小さくなり、極端な場合は結晶外形から消失する。一方、速度の遅い面ほど、成長とともにその面積が大きくなり、結晶外形は

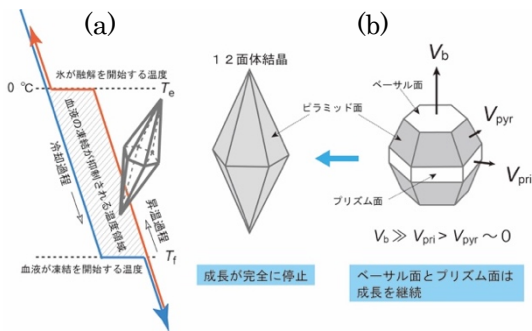


図3 (a) 熱ヒステリシスを説明する模式図。この温度領域内では、氷結晶は十二面体の形状で存在するが、成長は完全に抑制されている。(b) 氷結晶界面の成長速度の異方性と結晶外形とに関連。十二面体になると成長が停止。この結晶外形の生成には、各結晶面の成長速度に $V_b > V_{pri} > V_{pyr} \sim 0$ の関係が必要である。

最終的に速度の最も遅い面のみで囲まれる。このような特徴を考慮すると、十二面体の結晶外形が生成されるには、その稜面であるピラミッド面の成長速度が最も遅く、プリズム面やベーサル面がより速く成長する必要がある。すなわち、生成された氷微結晶は、最初は様々な結晶面を取り囲まれているはずだが、成長とともに成長速度の大きい面から順にベーサル面、およびプリズム面が消失し、最終的に成長速度の最も遅いピラミッド面のみで取り囲まれ十二面体結晶が生成されると予測される。いったん十二面体結晶が生成されると、もはや成長速度の大きい面は存在しないので、これ以上の成長は抑制される。すなわち、過冷却した血液中には多数の氷結晶が存在するにもかかわらず、生体の凍結進行が抑制されるのである。

(7) また、本研究では、極地魚由来の凍結抑制タンパク質の凍結抑制効果と比較するため、海水中で採取された珪藻 *Fragilariopsis cylindrus* から抽出された凍結抑制タンパク質 (fcIBPs) についても同様の実験を行った。この場合は、プリズム面、ベーサル面ともに成長が抑制されることが明らかになり、魚由来の凍結抑制タンパク質とは大きく異なる特徴を持つことが明らかになった³⁾。

(8) 以上の結果、凍結抑制タンパク質による氷結晶成長に対する効果は、面方位ごとに大きく異なることが明らかになった。そして、この異方性が生体の凍結抑制戦略を担う本質的な特性であることも示され、本研究課題の当初の目的は十分に達成された。さらに、種々の凍結抑制タンパク質の機能発現機構の解明に向けて、結晶の生成における最も基本的な成長速度の測定や結晶の形態形成過程の観察が重要な鍵を握ることが、この研究分野の発

展を促す指針として明確に示された。

<引用文献>

- 1) Y. Furukawa *et al.*, Oscillations and accelerations of ice crystal growth rates in microgravity in presence of antifreeze glycoprotein impurity in supercooled water, *Sci. Rep.*, 7, 43157, (2017).
- 2) D. A. Vorontsov *et al.*, Growth of Ice Crystals in the Presence of Type III Antifreeze Protein, *Cryst. Growth Des.*, 18, 2563-2571 (2018).
- 3) M. Bayer-Giraldi *et al.*, Ice crystal growth in the presence of a moderate ice-binding protein: Basal face growth suppression does not confer hyperactivity *PNAS*, under review.

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 10件)

- ① D. A. Vorontsov, G. Sazaki, E. K. Titaeva, E. L. Kim, M. Bayer-Giraldi, and Y. Furukawa, Growth of Ice Crystals in the Presence of Type III Antifreeze Protein, *Cryst. Growth Des.*, 査読あり, 18, 2563-2571 (2018), DOI: 10.1021/acs.cgd.8b00172
- ② M. Inomata, K. Murata, H. Asakawa, K. Nagashima, S. Nakatsubo, Y. Furukawa, and G. Sazaki, Temperature Dependence of the Growth Kinetics of Elementary Spiral Steps on Ice Basal Faces Grown from Water Vapor, *Cryst. Growth Des.*, 査読あり, 18, 756-793, (2017), DOI: 10.1021/acs.cgd.7b01251
- ③ Y. Furukawa, K. Nagashima, S. Nakatsubo, I. Yoshizaki, H. Tamaru, T. Shimaoka, T. Sone, E. Yokoyama, S. Zepeda, T. Terasawa, H. Asakawa, K. Murata, G. Sazaki, Oscillations and accelerations of ice crystal growth rates in microgravity in presence of antifreeze glycoprotein impurity in supercooled water, *Sci. Rep.*, 査読あり, 7, 43157, (2017), DOI:10.1038/srep43157
- ④ G. Sazaki, K. Nagashima, K. Murata, Y. Furukawa, In-situ observation of crystal surfaces by optical microscopy, *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 査読あり, 62 (2), 408-414, (2016), DOI:

10.1016/j.pcrysgrow.2016.04.024

- ⑤ K. Murata, H. Asakawa, K. Nagashima, Y. Furukawa and G. Sazaki, Thermodynamic origin of surface melting on ice crystals, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 査読あり, 113(44) E6741-E6748, (2016), DOI: 10.1073/pnas.1608888113
- ⑥ H. Asakawa, G. Sazaki, K. Nagashima, S. Nakatsubo, Y. Furukawa, Two types of quasi-liquid layers on ice crystals are formed kinetically, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 査読あり, 113(7), 1749-1753 (2016). DOI: 10.1073/pnas.1521607113
- ⑦ D. A. Vorontsov, G. Sazaki, S.-H Hyon, K. Matsumura, Y. Furukawa, Antifreeze Effect of Carboxylated ϵ -Poly-L-lysine on the Growth Kinetics of Ice Crystals, *J. Phys. Chem.*, 査読あり, B118, 10240-10249, (2014). DOI: 10.1021/jp507697q

[学会発表] (計 19件)

- ① Y. Furukawa, Anisotropic impurity effect for ice crystal growth in supercooled water(招待講演), 14th International Symposium on Physics and Chemistry of Ice (PCI2018), ETH Zurich, Zurich, Switzerland, 7-12 January, 2018.
- ② Y. Furukawa, Anisotropic functions of antifreeze glycoproteins(招待講演), 3rd Ice Binding Proteins Conference, Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel, 14-17 August, 2017.
- ③ Y. Furukawa, Oscillatory growth of ice crystal induced by effect of antifreeze glycoprotein (招待講演), FMSF Tutorial Symposium, Symposium on Mathematics for Various Discipline 13, "Mathematical Aspects of Surface and Interface Dynamics VIII" University of Tokyo, Japan, 22-24 October 2014.
- ④ Y. Furukawa, Oscillatory growth of ice crystal in the solution of antifreeze glycoprotein(招待講演), 2nd Ice Binding Protein Conference (IBP-2), Sapporo, Japan, August 5-7, 2014.
- ⑤ Y. Furukawa, Self-oscillatory growth of ice crystal- Microgravity experiments in Kibo of ISS-(招待講演),

24th AACGE Western Section Conference on Crystal Growth & Epitaxy, Stanford Siera Camp, Fallen Leaf Lake, CA, USA, June 8-11, 2014.

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/frontiers/case06/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 義純 (FURUKAWA Yoshinori)
北海道大学・低温科学研究所・名誉教授
研究者番号: 20113623

(2) 研究分担者

佐崎 元 (SAZAKI Gen)
北海道大学・低温科学研究所・教授
研究者番号: 60261509

(3) 研究分担者

長嶋 剣 (NAGASHIMA Ken)
北海道大学・低温科学研究所・助教
研究者番号: 60436079

(4) 研究分担者

村田 憲一郎 (MURATA Ken-ichiro)
北海道大学・低温科学研究所・助教
研究者番号: 60646272
平成28年度より研究分担者