HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	不凍タンパク質の構造と機能
Author(s)	津田, 栄; 新井, 達也
Citation	低温科学, 81, 51-60
Issue Date	2023-03-20
DOI	10.14943/lowtemsci.81.51
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/89118
Type	bulletin (article)
Note	第一章：変温動物
File Information	06_p051-060_LT81.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

低温科学 81 （2023） 51-60
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 51

不凍タンパク質の構造と機能

津田　栄[1)]，新井　達也[2)]

2022 年 11 月 14 日受付，2023 年 1 月 6 日受理

我々が普段目にする氷は無数の単結晶氷の融合物，即ち多結晶氷である．単結晶氷は規則的に配列した水分子でできているが，これと同じ規則性をもつ水分子が不凍タンパク質（Antifreeze Protein, AFP）の分子表面にも存在することが最近の研究から分かって来た．即ち，AFP は小さな氷結晶を表面にまとったタンパク質と言うことができる．この様な物質が水中に存在するとき，その水を 0℃以下に冷やすとどのようなことが起こるのだろうか？　AFP は生物にどのような能力を付与しているのだろうか？　本稿では，特に魚類由来 AFP の構造と機能に関する著者らの研究を紹介する．

Structure and Function of antifreeze protein

Sakae Tsuda[1] and Tatsuya Arai[2]

A general block of ice is composed of an infinite number of single ice crystals, which is called ice polycrystalline state. Antifreeze protein (AFP) is a macromolecule that locates regularly organized hydration waters on its surface, whose arrangement is also adopted in a single ice crystal. As the consequence, AFP can specifically bind to single ice crystals, which prevents the ice polycrystalline state formation. We have been performed exploration of AFP against various cold-adapted organisms since the late 1990s, and found that many edible fishes available in the general Japanese food markets contain AFP in their body fluid. This finding enabled us to develop a mass-preparation technique of fish-derived AFPs, for which we have been performed structural and functional analyses and technological applications for many years. The advanced knowledge obtained from our results may ultimately realize a new AFP-technology that may prevent water freezing though the binding to single ice crystals, which may keep alive cells, tissues, and animals in the supercooled environment. The present review describes the overview of the water-freezing mechanism and our research findings on the fish AFPs including their structure, function, and applicability for both industry and medical fields.

キーワード：不凍タンパク質，単結晶氷，多結晶氷，熱ヒステリシス，凍結濃縮
Antifreeze protein, single ice crystal, thermal hysteresis, freeze-induced concentration, ice-like waters

連絡先
津田　栄
東京大学新領域創成科学研究科
〒277-0882　千葉県柏市柏の葉 6-2-3
東大柏 II キャンパス産総研イノベ棟 2109 室
e-mail：s-tsuda@edu.k.u-tokyo.ac.jp
１）東京大学新領域創成科学研究科
〒277-0882　千葉県柏市柏の葉 6-2-3
東大柏 II キャンパス　産総研イノベ棟 2109 室
Department of Advanced Materials Science, Graduate School of Frontier Sciences, The university of Tokyo, 2109 AIST innovation bldg., 6-2-3 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882, Japan
２）東京大学新領域創成科学研究科
〒277-8561　千葉県柏市柏の葉 5-1-5
基盤棟 7 階 7H8 号室
Department of Advanced Materials Science, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, 7H8 Kiban bldg., 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8561, Japan

1．はじめに

不凍タンパク質（Antifreeze Protein，AFP）は，低温環境に晒された魚類，昆虫，微生物等の体液の凍結を防ぐと共に，これらの細胞に作用して低温下での生存率を高める生体物質である（Mahatabuddin & Tsuda, 2018；津田，2018）．即ち，AFP は脂質，塩，糖，グリセロール等の凍結保護剤と共に生物の低温適応能力を向上させるように働く．近年では 0℃以下で生物を生かし続ける「コールドスリープ（人工冬眠）」技術が広く研究されており（Takahashi et al., 2020），安全性，安定性，量産性，省エネ性等を満たす AFP が同技術に応用される可能性が指摘されている．AFP は南極海に生息するノトセニア科魚類から 1969 年に発見され，その後 2000 年にかけて北極海とその周辺に生息する魚類，植物，昆虫，菌類からの発見が相次いだ．これらの AFP は不凍作用を示す点では共通しているが，分子量や立体構造は得られる生物種に依存して大きく異なっており，それらの違いに応じて AFP Ⅰ，AFP Ⅱ，AFP Ⅲ，AFGP，βらせん型等にタイプ分けされている（Davies, 2014）．なお，AFGP は不凍糖タンパク質（Antifreeze Glycoprotein）の略称である．1990 年代後半には魚類 AFP を冷凍食品技術等に応用するための複数の特許が大手企業のユニリーバから出願され，それ以降 AFP は様々な冷熱利用技術に有用な物質と見なされるようになった．しかし，極地魚類の血液を原材料とする AFP は極めて高価であったため，研究者や技術者がその試料を大量に入手して技術応用に向けた研究を様々に展開することは困難であった．そうした状況の中，著者らは 2000 年頃に日本国内に生息する魚類，昆虫，菌類等について AFP の探索を開始し，特に北海道等の寒冷地で捕獲される複数の魚類が AFP をもつことを明らかにした（Nishimiya et al. 2008）．これと同時に日本人が日常的に食べている魚の切り身からも AFP を大量に取得できることを発見し，魚肉すり身懸濁液から AFP を精製する方法として明細書に纏め特許を取得した（津田・三浦，2008，2009）．日本には蒲鉾等の“練り物”を献立とする食文化があり，トン単位の魚肉すり身を生産する工場やその流通システムが全国に展開されている．著者らは，そうした分野を手がける国内企業の協力を得ることで，安価な魚類 AFP の量産化に向けた取り組みを続けてきた．その結果，同企業によって 2016 年 9 月に従来品の 1/10～1/100 以下の価格で AFP 試料が製品化され，現在も販売が続いている．以下では，水と氷に関する基礎的知見を踏まえた上で日本産魚類由来 AFP の構造と機能について詳述する．

2．水の凍結現象と AFP の関係

2.1　水はどのように凍るか

水を負の温度域に冷却して行くとやがて氷に変化する．日常生活の中で水が氷に変化する瞬間を目にすることは希だが，冷却加熱ステージを備えた顕微鏡システムを用いればその瞬間を何度でも繰り返し観察することができる．図 1A はそうしたステージの上に置いた水（10 μL）の顕微鏡画像である．不純物や空気が黒い影になる以外，水の中に特に物体は見当たらない．この水を例えば－0.2℃/min で冷却し続けると，凍結温度は通常－10℃以下になる．この様に，水が 0℃以下で液体状態を保つことを過冷却現象と呼ぶ．不純物を徹底的に除いた水は約－40℃まで過冷却するとされる．この過冷却水の中に極めて小さな単結晶氷（核）が出現し，その大きさが過冷却の深度で決まる臨界サイズを超えると急速に成長して凍結が起こり，水は氷（多結晶氷）に変化すると考えられている（Holten et al., 2012）．水中に存在する何らかの微粒子の表面に水分子が集積して氷核になる場合と，水分子同士が集まってクラスターを形成したものが氷核になる場合の 2 通りがあると考えられており，前者は不均一核生成（heterogenous nucleation），後者は均一核生成（homogenous nucleation）と呼ばれている（Zachariassen & Kristiansen, 2000）．なお，単結晶氷の核形成が起こり結晶成長をする際には「潜熱」が周囲に放出される．水が凍結する瞬間を撮影した顕微鏡画像を図 1B に示す．視野内の水は凍結に伴い厚みのある氷に変化するため，顕微鏡視野は暗くなり不均一模様で満たされる．この状態からステージの温度を上昇させると，0℃に近づくに連れて少しずつ氷は融解し，－1℃付近では図 1C の様な海島構造を呈する．「島」に相当する楕円～円盤型のものが単結晶氷である．つまり，凍結の瞬間にできる氷は多くの単結晶氷が境目なく融合した多結晶氷である．そこから溶け出してバラバラになった単結晶が図 1C の様に観察される．通常の氷が多結晶氷であることを端的に表わすために，実際の氷の写真を図 1D に，そのイラストを図 1E に示す．我々が普段目にする氷の中で恐らく唯一の単結晶氷が雪の結晶であり，それ以外の氷，すなわち製氷皿で作る氷，飲食に用いる氷，池に張った氷，氷山等は全て多結晶氷である．AFP を理解するためにはこの事実を知ることが欠かせない．

2.2　AFP とは

1 気圧下で生成する円盤型の単結晶氷（図 1C）は，図 1F に示される様な六角形模様に規則的に配列した水分

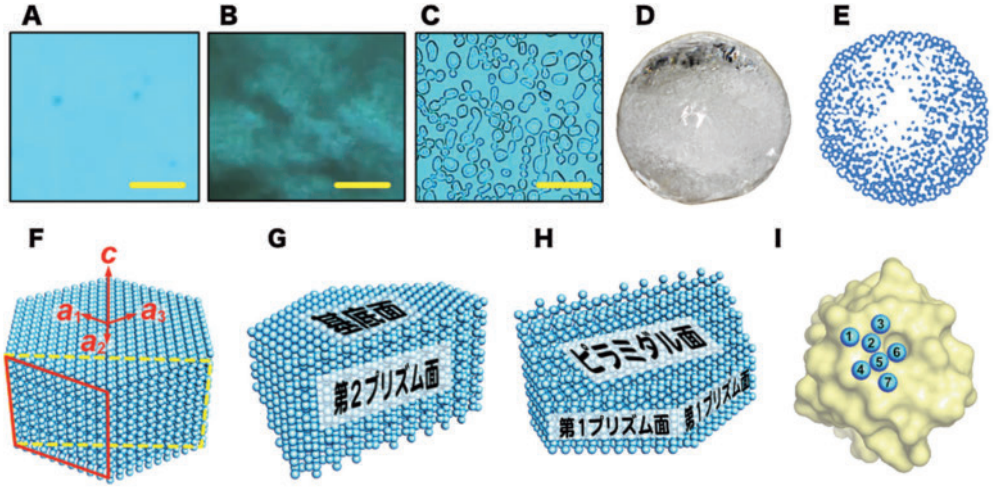

図 1：氷に関する説明．A．水の顕微鏡画像（黒は不純物）．B．水が凍結した瞬間を捉えた顕微鏡画像．C．B でできた氷（多結晶氷）を加温したときに生じる無数の単結晶氷．右下のスケールバーは 5 μm を示す．D．普段目にする氷．E．D が単結晶氷の融合物であることを表すイラスト．F．単結晶氷を構成する水の配列規則性（単位格子）．球は水の酸素原子．G．F の基底面と第 2 プリズム面（破線部分）を示したもの．H．F の第 1 プリズム面（実線部分）とピラミダル面を示したもの．I．AFP Ⅲの分子表面（GRASP 表示）に観測される 6 個の結合水．これらのうち 1，2，3，5 は第 1 プリズム面を構成する水分子と同じ空間配置をとる．また，2，4，5，6，7 はピラミダル面を構成する水分子と同じ空間配置をとる．

子群で構成されている．この規則性を示す最小単位のことを結晶学では単位格子または単位砲と呼ぶ．単結晶氷の単位格子は 4 つの単位ベクトル（a_1－a_3 ならびに c 軸）で規定される六方晶系に分類される．英語ではこれを hexagonal ice crystal（I_h）と呼ぶ（Hobbs, 1974）．なお，六角形模様の単位格子は単に水分子の配列規則性を示すもので，1 気圧の過冷却水の中に顕微鏡で観察される単結晶氷は必ず円盤型である．一方，空気中の水蒸気から単結晶氷が成長するときには六角板／六角柱を中心に a_1～a_3 軸方向に結晶成長が起こり，皆が知る樹枝状氷結晶（雪の結晶）に変形する．このため，樹枝状氷結晶の中心部には必ず六角模様が観察される．図 1F（I_h）を構成する上下の六角形の氷晶面をベーサル面（基底面），実線で囲った氷晶面を第 1 プリズム面（柱面），破線で囲った氷晶面を第 2 プリズム面と呼ぶ．c 軸に対して斜めにカットした氷晶面がピラミダル面である．六角形模様は基底面にのみ観察される．これらの氷晶面の水分子の配列を図 1G と図 1H に示す（津田，2018）．0℃以下の水中に存在する単結晶氷が周囲の水分子を取り込んで結晶成長を起こしている間，これらの氷晶面は絶え間なく生成して面積を拡大し続ける．これと同時に単結晶氷同士が氷晶面を介して無限に融合し合い，多結晶氷を形成すると考えられる．

これまでに X 線や NMR などの構造生物学的手法を用いることで AFP の 3 次元分子構造が解析されてきた．その結果，AFP はタイプに依存して大きく構造骨格が異なるものの，多くの場合，それらの分子表面には一定の間隔で並んだ結合水が観察されることが分かってきた．例えば，AFP Ⅲの分子表面に水素結合している 6 個の水分子（図 1I）は，第 1 プリズム面ならびにピラミダル面を構成する水分子と同じ空間配置をとる．すなわち「AFP は単結晶氷の一部を表面にまとったタンパク質」と言うことができる．AFP Ⅱは C 型レクチン，AFP Ⅲはシアル酸還元酵素，AFGP はトリプシノーゲンと構造骨格が酷似しており，これらの“先祖タンパク質”が長い年月をかけて変異を繰り返し，それらの分子表面にある結合水が氷結晶様の配置に変化したものが AFP として現在に残ったのではないか？と推察されている（Graham et al., 2022）．

上述の通り，顕微鏡下に水を凍らせて多結晶氷を作り 0℃付近にまで加温すると，図 1C の様な単結晶氷の分散状態が形成される．これと同じ操作を AFP 水溶液について行い，顕微鏡を用いて単結晶氷の海島構造を観察した例を図 2A に示す．このように AFP 水溶液中に生成する単結晶氷は，その表面に AFP が無数に結合することで米ツブの様な形になる．1 個の米ツブだけを残し，それ以外を融かす様にステージ温度を調整し，米ツブ模様の単結晶氷を高倍率で撮影した結果を図 2B と図 2C に示す．図 2B は六方両錐体（hexagonal bipyramid），図 2C は六方偏四角面体（hexagonal trapezohedron）と呼

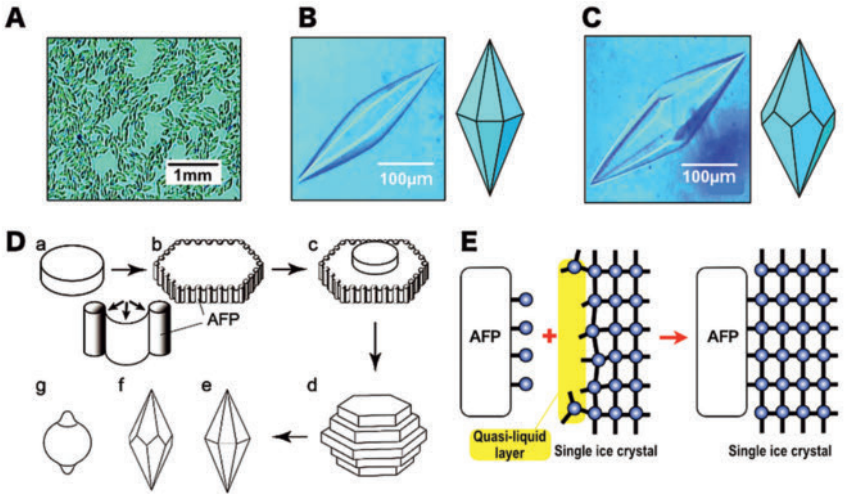

図 2：AFP の単結晶氷結合メカニズム．A．AFP 水溶液を凍結後に 0℃付近まで加温したときの顕微鏡画像．単結晶氷は米ツブ型に変形する．B．AFGP の結合によって六方両錐体（hexagonal bipyramid）に変形した単結晶氷とそのイラスト表現．C．AFP Ⅱの結合によって六方偏四角面体（hexagonal trapezohedron）に変形した単結晶氷とそのイラスト表現．D．AFP の結合に伴う単結晶氷の変形過程を表すイラスト．a．水中に生じる円盤型単結晶氷，b．AFP の結合に伴い六角平面に変形した単結晶氷，c．新たな円板型単結晶氷が二次元核生成により六角平面上に生成する様子，d．AFP 結合により六角平面型単結晶氷が積み上がって行く様子，e．B と同じ．f．C と同じ．g．昆虫 AFP などが基底面に結合したときにできるレモン型氷結晶．E．AFP の表面にある氷結晶様の結合水が単結晶氷の表面に接した瞬間に結晶中に飲み込まれる様子を表したイラスト．単結晶氷の成長界面（黄色）は Quasi liquid layer（準液体層）と呼ばれている．

ばれており，本稿ではこれらをまとめてバイピラミッド氷結晶と呼ぶことにする（津田，2018）．円盤型単結晶氷の表面にプリズム面やピラミダル面（図 1G，H）の水分子群が現われた瞬間，AFP は表面の結合水（図 1I）を介してそれらに結合し成長を止める．その結果，円盤型単結晶氷はこうしたバイピラミッド氷結晶に変形すると考えられる．円盤型単結晶氷がバイピラミッド氷結晶に変化する過程を描いたイラストを図 2D に示す．AFP に挟まれた部分が曲率を帯びるために水を取り込めず，その成長が止まる現象（図 2Db）は Gibbs-Thomson 効果として知られる．氷晶面の上に円盤型単結晶氷が生成する現象（図 2Dc）は二次元核生成（two-dimensional nucleation）と呼ばれる（Sazaki et al. 2010）．図 2E に示す様に，AFP の分子表面にある氷結晶様の結合水（図 1I）は，過冷却水中に存在する単結晶氷の表面に接触した瞬間に中に取り込まれて単結晶氷の一部になると考えられている．このため，氷結晶様の結合水は Anchored Clathrate Water（ACW）とも呼ばれる．即ち，AFP は図 2E に示す ACW メカニズムによって単結晶氷の特定の氷晶面に強く特異的に結合すると考えられる（Garnham et al., 2011）．AFP が接触する単結晶氷の成長界面は疑似液体層（Quasi-liquid layer，QLL）と呼ばれるもので，自由水と結晶水の中間の性質をもつ水分子群によって構成されると考えられている．図 1I の様な結合水に加えて，単結晶氷とは異なる五角形模様の水分子ネットワーク（polypentagonal water network）が AFP の分子表面に形成されている場合がある（Sun et al. 2014）．こうした氷結晶様の水分子ネットワークは，AFP が瞬時に QLL に混ざる上で有利に働くと考えられている．

2.3　熱ヒステリシス

魚類 AFP を結合した単結晶氷がバイピラミッド型氷結晶（図 2B，C）になることは既に述べた．この単結晶氷が顕微鏡下に観察されている状態でステージの温度を下げて行くと，例えば－2℃付近でバイピラミッドの上端と下端から爆発的な成長が起こり，針状の氷結晶になる．これは，魚類 AFP が単結晶氷の基底面に結合しておらず，その成長が強く抑制されないことに起因する．高活性型の昆虫 AFP や微生物 AFP が単結晶氷の基底面とプリズム面の両方に結合している場合には，レモン型単結晶氷（図 2Dg）の赤道付近から爆発的な成長が起こる（Scotter et al., 2006）．このように，温度低下に伴い 1 個の AFP 結合状態のバイピラミッド氷結晶が結晶成長を開始する温度のことを非束一的凝固点（non-colligative freezing point）（T_f*）と呼び，通常の水の凝

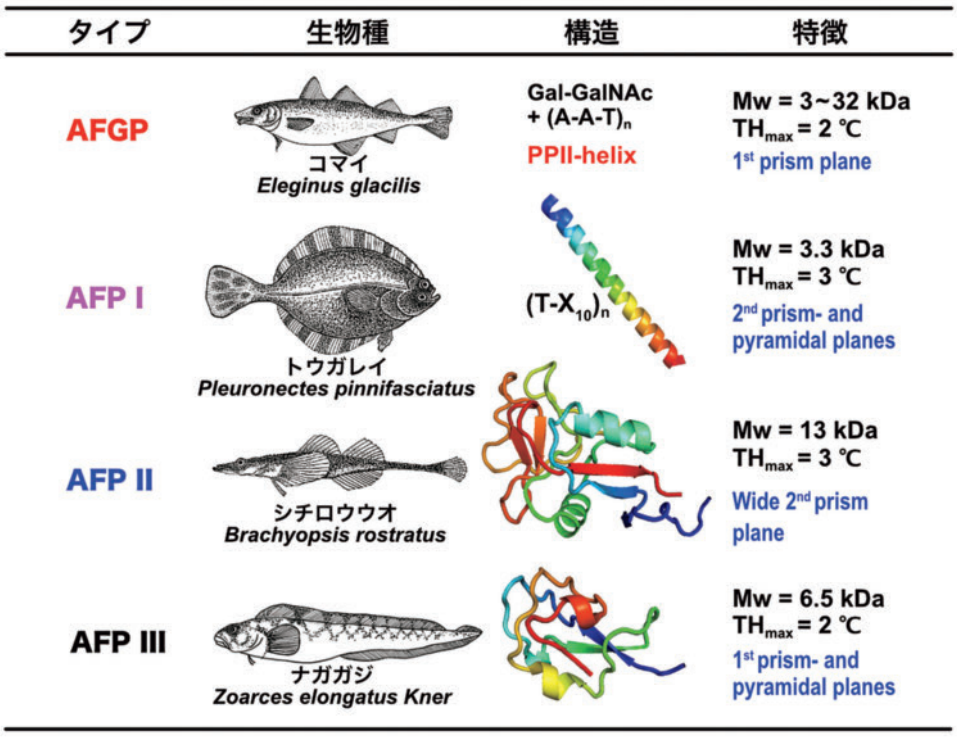

図 3：魚類由来不凍タンパク質（AFP）の分類．日本近海で捕獲されるコマイ，トウガレイ，シチロウウオ，ナガガジが不凍糖タンパク質（AFGP）並びに不凍タンパク質（AFP Ⅰ～Ⅲ）をもつことが明らかにされている．いずれも複数のアイソフォームで構成されており，AFGP のアイソフォームには分子量分布がある（3～32 kDa）．タイプに応じてアミノ酸配列，分子量，立体構造などが大きく異なる．個々の AFP が結合する氷結晶面を特徴欄に青字で示す．

固点（T_f）とは区別する．これとは逆に温度上昇に伴ってバイピラミッド氷結晶が融解する温度が融点（T_m）である．T_m と T_f* の差は熱ヒステリシス（Thermal Hysteresis，TH）と呼ばれ，バイピラミッド氷結晶が成長も融解もせずに安定に存在できる温度範囲を表す（TH＝$T_m - T_f$*）（Raymond & DeVries, 1977）．T_mの値は AFP に依らず概ね 0℃だが，強く単結晶氷の成長を抑制する AFP は T_f*を押し下げるため TH 値が大きくなる．即ち，TH は AFP の氷結晶成長抑制能の強さを表す物理量である．なお，T_fは昇温速度，降温速度，単結晶氷サイズに依存して変化するため，AFP 間で TH 値を比較するためにはそうした測定条件を統一しなくてはならない．また，示差走査熱量計（DSC）は水が氷すなわち多結晶氷に変化するときの潜熱を測定するもので，AFP が結合した 1 個の単結晶氷の成長開始温度を測定する方法ではないため，正しい TH 値を与えない．現時点では AFP 水溶液の TH 値を測定するためには冷却加熱ステージを備えた顕微鏡システムが必要不可欠と言える．

3. 日本産魚類由来 AFP の特徴

3.1 AFGP

日本国内で捕獲される魚類の中で AFGP を含むものにコマイ（*Eleginus glacilis*, Saffron cod）（図 3）がある．AFGP は A-A-T（A：アラニン，T：スレオニン）で表わされる 3 残基のペプチドの反復配列（Tandem repeat）によって構成される一本鎖ポリペプチドであり，Thr の側鎖の OH 基は必ず二糖（*β*-D-galactosyl-(1→3)-*α*-N-acetyl-D-galactosamine）で修飾されている．AFGP は反復回数（n）が異なる複数アイソフォームとして魚体内に発現されており，n＝52（156 残基，M.w.＝34 kDa）のものを AFGP1，n＝4（12 残基，M.w.＝2.6 kDa）のものを AFGP8 と呼ぶ．これらに AFGP2（n＝45，29 kDa），AFGP3（n＝32，21.5 kDa），AFGP4（n＝26，17 kDa），AFGP5（n＝16，10.5 kDa），AFGP6（n＝12，7.9 kDa），AFGP7（n＝5，3.5 kDa）を加えた合計 8 種類のアイソフォームが AFGP の天然物を構成すると考えられている（Osuga & Feeney, 1978）．なお，コマイ由来の AFGP は A が R（アルギニン）や P（プロリン）に置換されたアイソフォームを含んでいる（Burcham et al., 1086）．AFGP は南極海に生息するノトセニア科魚類と北極海

に生息するタラ科魚類から発見されたものだが，これらの魚類が赤道を越えて北極と南極の間を往来したとは考え難いため，各々が如何にして AFGP 遺伝子を獲得したかが大きな謎であった．DNA 解析の結果，南極魚類由来の AFGP はトリプシノーゲンから派生したと考えられる一方，北極魚類由来 AFGP の遺伝子にはそうした遺伝子の痕跡が全く認められなかった．これにより，AFGP は 1 つの先祖タンパク質から派生したものではなく，収斂進化（convergent evolution）の産物であると考えられる様になった（Chen et al, 1997）．AFGP は冷水に極めて良く溶けること（1,200 mg mL^{-1} 以上），約 200 mg mL^{-1} の AFGP 水溶液について約 2℃の TH 値が見積もられること，単結晶氷の第 1 プリズム面に特異的に結合すること等も明らかにされている（Tsuda et al., 2020）．また，AFGP は細胞の脂質二重膜に結合することによって＋4℃下で生殖細胞や浮遊細胞の生存時間を延ばす細胞保護機能を有する（Rubinsky et al. 1990）．また，AFGP にはポリプロリンタイプⅡヘリックス構造の形成が予測されているが，現時点ではその X 線結晶構造が解かれていない．

3.2　AFP Ⅰ

AFP Ⅰは多数の連続した A から成る約 40 残基の一本鎖ポリペプチドである（図 3）．AFP Ⅰの N 末端は必ず D-T-A-S-D- で始まり，この後に（T-X$_{10}$）n（X は主として A）で表わされる 11 残基のペプチドの反復配列が続く（n＝3）．日本国内に生息するトウガレイ（*Pleuronectes pinnifasciatus,* Barfin plaice）（図 1）が合計 9 種類の AFP Ⅰアイソフォームを発現しており，著者らはその中の 1 つである 40 残基の AFP Ⅰ（D-T-A-S-D-A-A-A-A-A-A-A-T-A-A-A-A-A-A-A-A-A-A-T-A-K-A-A-A-E-A-A-A-A-T-A-A-A-A-）（BpAFP1）の構造解析を行った．この配列から分かるように BpAFP1 の 30/40 残基（75%）が疎水性アミノ酸（A）である．それにも関わらず，BpAFP1 は冷水に対して極めて高い水溶性を示す（＞400 mg mL^{-1}）．また，濃度約 200 mg mL^{-1} における TH 値は約 3℃と非常に高い．BpAFP1 は低濃度（0.01 mg mL^{-1}）では第 2 プリズム面とピラミダル面にだけ結合し，濃度を 10 倍（0.1 mg mL^{-1}）に高めると全ての氷結晶面に結合を拡大する風変わりな性質を有する（Mahatabuddin et al., 2017）．低温下（＋4℃）における優れた細胞保護機能は AFP Ⅰにも認められる（Kamijima et al. 2013）．AFP の中で最初に X 線構造が解かれたのは米国の Winter flounder（*Pseudopleuronectes americanus*）が発現する 37 残基の AFP Ⅰ（wfAFP）であり，同分子は一本鎖 α ヘリックスであった（Sicherl & Yang, 1995）．BpAFP1 も同じ構造を形成し，その棒状分子の片側に T（スレオニン）の OH 基が 16.5Å の間隔で配列すると考えられる．Alaskan plaice や Yellow-tail flounder から見出された AFP Ⅰも n＝3 のペプチドだが，例外的に n＝12 の AFP Ⅰ（Maxi, 194 残基）が 2004 年に発見された．X 線結晶構造解析の結果，Maxi は 400 個以上の五角形模様の水分子ネットワークに取り囲まれていることが判明した．このような単結晶氷に酷似した水分子ネットワークを伴うことで Maxi は単結晶氷の全面に結合する能力を有すると考えられている．但し，Maxi は極めて不安定なタンパク質である．なお AFPI の仲間はカジカ科魚類からも発見されており，（Thr-X$_{10}$）の繰り返しが不規性である点と N 末端領域に必ず 1 個の Pro が含まれている点がカレイ類由来の AFP Ⅰと異なっている．

3.3　AFP Ⅱ

AFP ⅡはC 型レクチンと高い相同性をもつ約 130 アミノ酸残基（分子量 14kDa）の球状タンパク質である（図 3）．AFP Ⅱは ワ カ サ ギ（*Hypomesus nipponensis,* Japanese smelt）等のキュウリウオ科の魚類に加えてタイセイヨウニシン（*Clupea harengus*, Atlantic herring），ケムシカジカ（*Hemitripterus americanus*, Sea raven），シチロウウオ（*Brachyopsis rostratus,* Longsnout poacher）等から発見され，3 次元分子構造が解析されている．ニシンやワカサギ由来の AFP Ⅱが単結晶氷への結合に 1 分子あたり 1 個の Ca^{2+} イオンを必要とするのに対し（Ca^{2+} 依存型 AFP Ⅱ），ケムシカジカやシチロウウオ由来の AFP Ⅱはこれを必要としない（Ca^{2+} 非依存型 AFP Ⅱ）（Nishimiya et al., 2008；津田, 2018；Arai et al., 2019）．シチロウウオ由来の AFP Ⅱ（LpAFP）は僅か 2 種類のアイソフォームで構成される．他の AFP と同様に，LpAFP も冷水に対して 200 mg mL^{-1} 以上の良好な水溶性を示し，同濃度の LpAFP 水溶液について約 3℃の TH 値が見積もられている．LpAFP は 0.01 mg mL^{-1} 以下では単結晶氷の第 2 プリズム面に特異的に結合するが，濃度上昇に伴って結合領域を拡大し，0.1 mg mL^{-1} では単結晶氷の全面に結合する．この性質は LpAFP と BpAFP についてのみ認められている（Tsuda et al. 2020）．全ての AFP Ⅱが 10 個の C（システイン）を含んでおり，これらが分子内で 5 対のジスルフィド結合を形成することで全体構造が安定化すると考えられている．＋4℃下での優れた細胞保護機能は AFP Ⅱにも認められている．

3.4 AFP Ⅲ

AFP Ⅲはゲンゲ科魚類の *Macrozoarces americanus*, Ocean pout から発見されたもので，wfAFP と並んで多くの機能解析が行われている AFP である（図 3）．日本国内では寒冷地の汽水域に生息するナガガジ（*Macrozoarces elongatus Kner*, Notched-fin eelpout）から AFP Ⅲが発見された（Nishimiya et al., 2005）．AFP Ⅲはアミノ酸組成に偏りの無い 65–70 残基のポリペプチド（Mw＝7 kDa）であり，ナガガジ由来 AFP（NfeAFP）の天然物は 13 種類ものアイソフォームの混合物である．これらの AFP Ⅲアイソフォームは陽イオン交換樹脂に結合する 6 種類（SP タイプ）と陰イオン交換樹脂に結合するもの 7 種類（QAE タイプ）に分けられる．著者らは前者に属する NfeAFP6 と後者に属する NfeAFP8, 11，13 の遺伝子組換え体を作製し，それらの TH 値が大きく異なることを明らかにした．また，NfeAFP6 の 20 番目の A（アラニン）を G（グリシン），T（スレオニン），V（バリン），I（イソロイシン），L（ロイシン）に置換したものの間で TH 値が大きく異なることを見出した（Mahatabuddin et al., 2018）．これらの X 線構造を解析した結果，最も高活性の A20I 変異体（図 1I）の分子表面にのみ強固な五角形模様の水分子ネットワークが形成されていることが明らかになった．AFP Ⅲは 3–5 残基の短鎖 β 構造で構成される円形セグメントが 2 つ寄り添った全体構造を形成している．これをプレッツェル（Pretzel）構造と呼ぶことがある（Antson, et al. 2001）．ヒトシアル酸合成酵素と構造が似ていることから同酵素が AFP Ⅲの先祖タンパク質と考えられている．一方の円の表面に単結晶氷と結合するアミノ酸残基が配置しており，それらに捕捉された結合水が単結晶氷のプリズム面とピラミダル面に特異的に結合すると考えられている．NfeAFP も冷水に溶けるが他の AFP に比べると溶け切るまでに要する時間が長い．最大溶解度は約 100 mg mL^{-1}，TH の最大値は約 2℃と報告されている．AFP Ⅲも＋4℃下において優れた細胞保護機能を発揮する．

4. AFP の応用技術

4.1 凍結濃縮インヒビター

何らかの物質を添加した水を冷凍庫等で凍らせたとき，その物質が氷の中央付近に濃縮される凍結濃縮（Freeze-induced concentration）と呼ばれる現象が観察されることがある（Yamanouchi et al., 2013）．図 4 にその例を示す．これは四角形のアクリルケースに赤インク水を入れて冷凍庫で凍らせる実験を行ったときの画像で，凍結に伴いインク成分が濃縮されて色玉が形成することを示している（図 4A→B）．この実験では最も冷熱に近い場所が容器のフチと水面であるため，それらの付近にある水が最初に凍結する．即ち，それらの場所で単結晶氷が発生し，互いに強く結びついて多結晶氷を形成する（図 4C）．単結晶氷を構成する水分子は様々な配置をとるが（図 1F～H），水分子の配列が違う氷晶面であっても成長界面にある準液体層（図 2E）を介して無限に結びつくことができ多結晶氷が形成されると考えられる．一方，構造が異なる赤インク成分は単結晶氷への結合が許されない．その結果，赤インクは多結晶氷から排除されて未凍結部分に溜まると推察される．この現象は添加する物質の構造や量，水の粘性，冷却速度等に依っては視認されない．

AFP は単結晶氷に強く特異的に結合するため，凍結濃縮現象を抑制する．AFP Ⅲを用いたその実験例を図 4 に示す（図 4A→D）．AFP を添加した赤インク水においても容器のフチと水面付近にある水の中に無数の単結晶氷が生成するが，AFP が個々の単結晶氷に結合して成長と融合を阻害する結果，多結晶氷ではなく単結晶氷の分散状態が形成される．赤インク成分は互いに結びつかない単結晶氷の隙間に存在し，凍結濃縮が起こらない．こうした凍結濃縮インヒビターとしての AFP の活用例を図 4F～H に示す．これらは左から 0，0.05，0.2 mg mL^{-1} になるように AFP Ⅲを添加した 0.5 重量％濃度の寒天ゲルの凍結解凍後の写真である（凍結温度＝－18℃，凍結時間＝12 時間）．図 4F のように，AFP を添加していない寒天ゲルでは多結晶氷が高分子鎖のネットワーク構造を破壊する．その結果，ゲル構造が保持されず保水力も失われる．一方，0.2 mg mL^{-1} という極微量の AFP を添加した寒天ゲルはその内部が単結晶氷の分散状態で満たされ，多結晶氷ができないためにゲル構造が保持される（図 4G，H）．凍結濃縮は加工食品，スープ類，氷菓子類，麺類，パン類，野菜，果実，種子，清涼飲料水，酒類，医療品，化粧品，インク顔料，高分子ゲル，細胞，組織，臓器などの含水物を凍結保存する際に問題になる現象である（津田，2018）．従って，AFP はこうした含水物の凍結保護剤として活用できる可能性がある．なお，糖やジメチルスルホキシド（Dimethyl sulfoxide，DMSO）等も単結晶氷と容易に結びつき凍結濃縮を抑制するため，食品や細胞の凍結保護剤として広く用いられている．また，液体窒素やディープフリーザー（－80℃）を用いて瞬間凍結を行った場合にも凍結濃縮が抑制されるが，これらに比べると AFP はエネル

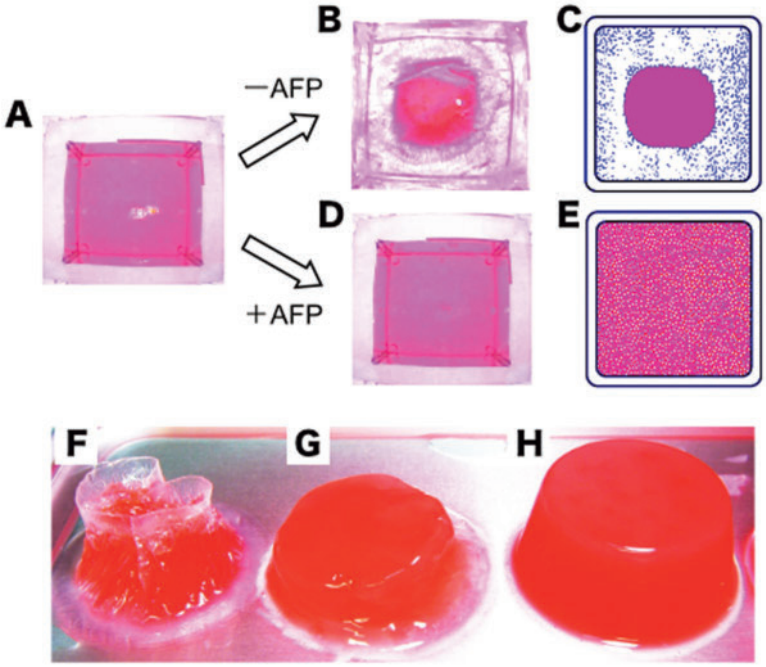

図 4：AFP の凍結濃縮抑制効果．A．透明なアクリルケースに入れた赤インク水（50 mL）．B．A を家庭用冷凍庫（−18℃）で凍らせたときに観察される凍結濃縮現象．C．B のイラスト表現．結晶成長する氷（多結晶氷）からインクが排除されて濃縮する．D．AFP を添加した赤インク水凍結物の画像．凍結濃縮現象が抑制される．E．D のイラスト表現．AFP が結合した単結晶氷が分散状態を形成するためインク成分が濃縮されない．F〜H．左から 0，0.05 mg mL^{-1}，0.2 mg mL^{-1}になるように AFP Ⅲを添加した 0.5 重量％の寒天ゲルを凍結解凍した後の写真．

ギー消費量が少なく取り扱いが容易な凍結濃縮インヒビターと言える．

4.2　コールドスリープ（人工冬眠）技術への応用可能性

AFP 水溶液の凍結過程の想像図を図 5 に示す．水（a）を冷やし続けると 0℃以下でも凍らない過冷却水（b）になることは既に述べた．この過冷却水の中に極めて小さな単結晶氷（核）が生成することで凍結が起こり水は多結晶氷（c）に変化するが，このとき AFP は個々の単結晶氷に結合して，それらの結晶成長と続く多結晶氷形成を阻害している可能性がある．即ち，AFP は水の過冷却状態を安定化すると想像されるが，現時点でその実験的証拠は得られていない．著者らはそうした予想に関係するデータを得るために，体液成分として高活性型 AFP をもつオオクワガタ（*Dorcus hopei binodulosus*, Stag beetle）の幼虫を−5℃の冷凍庫内に静置して 24 時間後の生存率を調べた（Arai, et al., 2021）（山内の稿参照）．驚いたことに，冷凍庫から取り出した 10/10 頭の幼虫の身体は凍っておらず，室温に戻ると元気に動き回った（生存率＝100％）．一方，幼虫を湿紙の上に置いた状態で同じ実験を行うと幼虫の身体は凍結し，3/3 頭

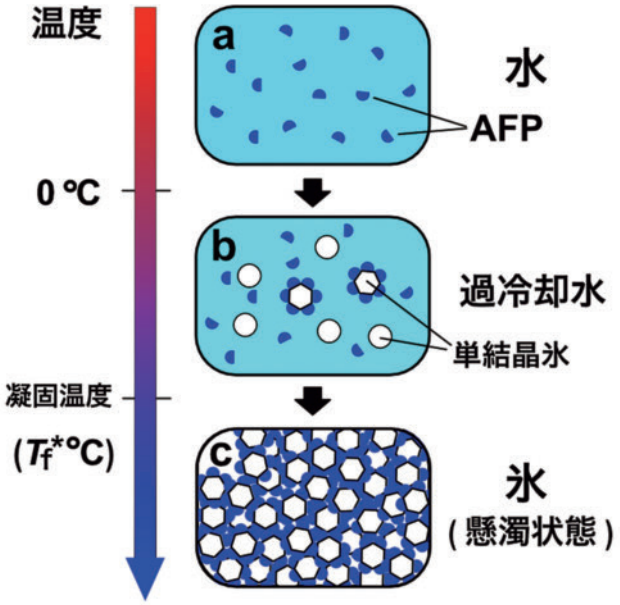

図 5：不凍タンパク質（AFP）の水溶液が凍結する過程の想像図．（a）AFP を含んだ水．（b）過冷却水の中に発生した単結晶氷に AFP が結合する様子を描いたイラスト．円盤型の単結晶氷は AFP の結合に伴い六角平面やバイピラミッド型に変形する．（c）AFP を含む水の凍結状態を描いたイラスト．AFP が結合した微細氷結晶の集合体（懸濁状態）が生成すると考えられる．このときの凝固温度（T_f*℃）は非束一的凝固点（Non-colligative freezing point）と呼ばれており，通常の凝固点とは異なる．

がすべて死滅した（生存率＝0%）．また，高活性型 AFP を添加した細胞保存液を用いてラット膵島細胞を－5℃の過冷却状態で保存したところ，20 日後で 53%という極めて高い生存率が得られた（Yamauchi et al., 2021）．過冷却状態にある昆虫の体液や細胞保存液の中で AFP が単結晶氷と結びつき，それらを極微少サイズに抑制したために，細胞が損傷を受けず生命機能が保持されたのかもしれない．水の凍結現象が生命に危機的状況をもたらすことは疑いようがない．より多くの研究データを得ることで生物の低温適応能力と AFP の関係が一層明らかになり，AFP がコールドスリープ技術等に応用される日が来ることを期待したい．

謝辞

本研究を進めるにあたり，株式会社ニチレイ 小泉雄史氏，井上敏文氏，石井寛崇氏から極めて多くのご協力を頂きました．不凍タンパク質の精製技術は産業技術総合研究所 三浦 愛氏とともに開発しました．北海道大学大学院生命科学院 山内彩加林氏（現 北海道大学低温科学研究所 助教）には特に細胞保存に関する極めて多くのデータを取得して頂きました．北海道大学低温科学研究所 教授 佐﨑 元氏には本論文を査読して頂きました．これらの方々を始め，AFP の研究にご協力を頂いた全ての方々に心から感謝を申し上げます．

参考文献

Antson, A. A., Smith, D. J., Roper, D. I., Lewis, S., Caves, L. S. D., Verma, C. S., Buckley, S. L., Lillford, P. J., & Hubbard, R. E. (2001) Understanding the mechanism of ice binding by type III antifreeze proteins. J. Mol. Biol., **305**, 875–889.

Arai, T., Nishimiya, Y., Ohyama, Y., Kondo, H., & Tsuda, S. (2019) Calcium-binding generates the semi-clathrate waters on a type II antifreeze protein to adsorb onto an ice crystal surface. Biomolecules, **9**, 162.

Arai, T., Yamauchi, A., Miura, A., Kondo, H., Nishimiya, Y., Sasaki Y. C., & Tsuda, S. (2021) Discovery of hyperactive antifreeze protein from phylogenetically distant beetles questions its evolutionary origin. Int. J. Mol. Sci. **22**, 3637.

Burcham, T. S., Osuga, D. T., Rao, B. N. N., Bush, C. A., & Feeney, R. E. (1986) Purification and primary sequences of the major arginine-containing antifreeze glycopeptides from the fish *Eleginus gracilis*. J. Biol. Chem. **261**, 6384–6389.

Chen, L., DeVries, A. L., & Cheng, C.-H. C. (1997) Convergent evolution of antifreeze glycoproteins in Antarctic notothenioid fish and Arctic cod. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 3817–3822.

Davies, P. L. (2014) Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth. Trends Biochem. Sci., **39**, 548–555.

Garnham, C. P., Campbell, R. L., & Davies, P. L. (2011) Anchored clathrate waters bind antifreeze proteins to ice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **108**, 7363–7367.

Graham, L. A., Gauthier, S. Y., & Davies, P. L. (2022) Origin of an antifreeze protein gene in response to Cenozoic climate change. Sci. Rep., **12**, 8536.

Hobbs, P. V. (1974) *Ice Physics*, Oxford Univ Press, London, UK, pp. 461–523.

Holten, V., Bertrand, C. E., Anisimov, M. A., & Sengers, J. V. (2012) Thermodynamics of supercoold water. J. Chem. Phys. **136**, 094507 (1–18).

Kamijima, T., Sakashita, M., Miura, A., Nishimiya, Y., & Tsuda, S. (2013) Antifreeze protein prolongs the life-time of insulinoma cells during hypothermic preservation. PLoS One, **8**, e73643.

Takahashi, T. M., Sunagawa, G. A., Soya, S., Abe, M., Sakurai, K., Ishikawa, K., Yanagisawa, M., Hama, H., Hasegawa, E., Miyawaki, A., Sakimura, K., Takahashi, M., & Sakurai, T. (2000) A discrete neuronal circuit induces a hibernation-like state in rodents. Nature **406**, 611–614.

Mahatabuddin, S., Hanada, Y., Nishimiya, Y., Miura, A., Kondo, H., Davies, P. L., & Tsuda, S. (2017) Concentration-dependent oligomerization of an alpha-helical antifreeze polypeptide makes it hyperactive, Sci Rep, **7**, 42501.

Mahatabuddin, S. & Tsuda, S. (2018) Applications of Antifreeze Proteins: Practical Use of the Quality Products from Japanese Fishes, Adv Exp Med Biol, **1081**, 321–327.

Mahatabuddin, S., Fukami, D., Arai, T., Nishimiya, Y., Shimizu, R., Shibazaki, C., Kondo, H., Adachi, M., & Tsuda, S. (2018) Polypentagonal ice-like water networks emerge solely in an activity-improved variant of ice-binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **115**, 5456–5461.

Nishimiya, Y., Sato, R., Takamichi, M., Miura, A., & Tsuda, S. (2005) Co-operative effect of the isoforms of type III antifreeze protein expressed in Notched-fin eelpout, *Zoarces elongatus Kner*. FEBS J, **272**, 482–492.

Nishimiya, Y., Kondo, H., Takamichi, M., Sugimoto, H., Suzuki, M., Miura, A., & Tsuda, S (2008) Crystal structure and mutational analysis of Ca^{2+}-independent type II antifreeze protein from Longsnout poacher, *Brachyopsis rostratus*. J. Mol. Biol., **382**, 734–746.

Nishimiya, Y., Mie, Y., Hirano, Y., Kondo, H., Miura, A., & Tsuda, S. (2008) Mass preparation and technological development of an antifreeze protein - Toward a practical use of biomolecules - Synthesiology, **1**, 7–14.

Osuga, D. T. & Feeney, R. E. (1978) Antifreeze glycoproteins from Arctic fish. J. Biol. Chem. 253, 5338–5343.

Raymond, J. A. & DeVries, A. L. (1977) Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes. Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 2589–2593.

Rubinsky, B., Arav, A., Mattioli, M., & DeVries, A. L. (1990) The effect of antifreeze glycopeptides on membrane potential changes at hypothermic temperatures, Biochem. Biophys. Res. Commun. 173, 1369–1374.

Sazaki, G., Zepeda, S., Nakatsubo, S., Yokomine, M., & Furukawa, Y. (2010) Elementary steps at the surface of ice crystals visualized by advanced optical microscopy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **107**, 19702–19707.

Scotter, A. J., Marshall, C. B., Graham, L. A., Gilbert, J. A., Garnham, C. P., & Davies, P. L. (2006) The basis for hyperactivity of antifreeze proteins, Cryobiology, **53**, 229–239.

Sicherl, F. & Yang, D. S. C. (1995) Ice-binding structure and mechanism of an antifreeze protein from winter flounder. Nature **375**, 427–431.

Sun, T., Lin, F.-H., Campbell, R. L., Allingham, J. S., & Davies, P. L. (2014) An antifreeze protein folds with an interior network of more than 400 semi-clathrate waters. Science, **343**, 795–798.

津田　栄，三浦　愛（2008）特許「魚類由来の不凍タンパク質」第 4228068 号.

津田　栄，三浦　愛（2009）特許「魚類由来の不凍タンパク質」第 4332646 号.

津田　栄（2018）不凍タンパク質の機能と応用．Functions and Applications of Antifreeze Protein，シーエムシー出版（289 頁），東京.

Tsuda, S., Yamauchi, A., Khan, N. M., Arai, T., Mahatabuddin, S., Miura, A., & Kondo, H. (2020) Fish-derived antifreeze proteins and antifreeze glycoprotein exhibit a different ice-binding property with increasing concentration. Biomolecules, **10**, 423.

Yamanouchi, T., Xiao, N., Hanada, Y., Kamijima, T., Sakashita, M., Nishimiya, Y., Miura, A., Kondo, H., & Tsuda, S. (2013) Dependence of freeze-induced concentration inhibition on antifreeze protein. Low Temp. Sci. **71**, 91–96.

Yamauchi, A., Miura, A., Kondo, H., Arai, T., Sasaki, Y. C., & Tsuda, S. (2021) Subzero nonfreezing hypothermia with insect antifreeze protein dramatically improves survival rate of mammalian cells. Int. J. Mol. Sci. **22**, 12680.

Zachariassen K. E., & Kristiansen, E. (2000) Ice nucleation and antinucleation in nature. Cryobiology **41**, 257–279.