



Title	不凍糖タンパク質の氷／水溶液界面吸着と氷結晶成長
Author(s)	古川, 義純; Furukawa, Yoshinori
Description	特集 冷凍化学の新展開 1. 凍結状態で進む化学反応 1.3
Citation	冷凍, 84(985), 929-934
Issue Date	2009-11-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/42638
Type	journal article
File Information	reitou-11-017-022.pdf



1. 凍結状態で進む化学反応

1.3 不凍糖タンパク質の氷／水溶液界面吸着と氷結晶成長

Adsorption of Antifreeze Glycoprotein on Ice/Solution Interface and its Effect for Ice Crystal Growth

キーワード：不凍糖タンパク質，氷結晶，界面吸着，結晶成長
Antifreeze glycoprotein, Ice crystal, Adsorption, Crystal growth

古川 義純* Yoshinori FURUKAWA

1. はじめに

氷点下の寒冷な環境に住む変温生物の耐凍結戦略を担うものとして、不凍化タンパク質と呼ばれる特殊な生体高分子の存在が良く知られている。このタンパク質は、いわゆる添加物濃度に比例した平衡論的な融点降下（モル凝固点降下）ではなく、分子が氷界面に吸着することで結晶成長を機械的に抑制するという特別なしくみで、生体の凍結を抑止している。このタンパク質は、生体臓器の低温保存や冷凍手術などの医療分野や、冷凍食品に添加してその品質保持期間を延長するなどの食品工学分野での活用が期待される機能性タンパク質の一種で、これらの応用を目指す研究も近年盛んになっている。

不凍化タンパク質は、極海を覆う海水の直下に住む魚の血液中で最初に同定され¹⁾、糖鎖が結合した不凍糖タンパク質（Antifreeze Glycoprotein; AFGP）1種と糖鎖が含まれない不凍タンパク質（Antifreeze Protein; AFP）4種が存在することが知られている²⁾。その後、分子構造解析や機能特性解析など、様々な視点で研究が進められてきた。一方、2000年代に入ると、魚だけではなく陸生変温生物の体内にも、様々なタイプの不凍化タンパク質が含まれることが明らかになってきた。たとえば、昆虫³⁾やバクテリア⁴⁾などに含まれるタンパク質は、魚の体内のタンパク質に較べ桁違いに不凍効果が大きく、ハイパーAFPと呼ばれることもある。また、植物⁵⁾の体内にも不凍タンパク質が含まれることも明らかになり、このような生体の凍結抑止戦略は決して特殊なものではなく、普遍的に多くの生物で見られるものであることが明らかになってきた。

しかしながら、この現象が氷と水の界面という局所場で起きるものであり、結晶成長の素過程や不凍化タンパク質の界面吸着状態を直接観察することが非常に困難であることから、このタンパク質が氷結晶の成長を制御するメカニズムについて未だ多くの謎が残されている。本解

説では、蛍光物質でラベルした不凍化タンパク質を使うことにより、氷の結晶成長にともなう、界面近傍でのタンパク質の再分配（濃度分布の変化）の過程を直接観察した最新の実験結果⁶⁻⁹⁾を紹介する。さらに、この実験をもとに不凍化タンパク質の界面吸着と結晶成長の関連についても考察する。

2. 不凍化タンパク質が氷結晶成長に及ぼす効果

最初に、これまでに行われた多くの観察結果から明らかになっている、不凍化タンパク質が氷結晶成長に及ぼす効果についての基本特性をまとめておこう²⁾。

1) まず、不凍化タンパク質水溶液を容器に入れて、一定速度で冷却した場合に水溶液中で起きる現象を思考実験する（図1(a)）。水溶液の温度が水の平衡融点（ $T_e = 0^\circ\text{C}$ ）以下になると、氷の微結晶が発生する。本来、水溶液の融点はモル凝固点降下により 0°C より低いはずだが、タンパク質は分子量が大きいので水溶液のモル濃度はきわめて小さく、この効果は無視してよい。この結晶は、 T_e より温度が低下しても十二面体の形状を保ったままでこれ以上の成長を起こさない。しかし、さらに温度が低下し、ある臨界温度に達すると突然成長を開始する。この臨界温度を凍結温度（ T_f ）と定義する。逆に、完全に凍結した水溶液の温度を上昇させると、 T_e まで融解は開始しない。すなわち、凍結温度と融解温度が異なる。この現象を、熱ヒステリシスと呼び、不凍化タンパク質の機能の本質的な特徴である。熱ヒステリシスの大きさ $\Delta T (= T_e - T_f)$ が、不凍化タンパク質の機能の大きさに対応し、タンパク質の種類や濃度に依存する。

2) ΔT の大きさは、魚のAFGPやAFPで、モル凝固点降下則で予測される融点降下より500倍も大きい。また、タンパク質濃度に対しては、非線形な依存性を示す。昆

*北海道大学低温科学研究所
Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University
原稿受理 2009年8月26日

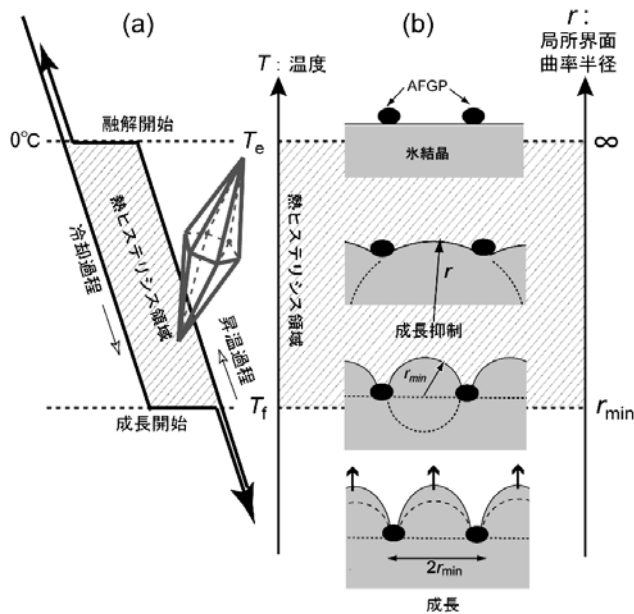


図1 (a) 不凍化タンパク質水溶液の冷却・昇温過程と氷結晶生成. 成長開始温度と融解温度の差が熱ヒステリシスに当たる.
(b) ギブス・トムソンモデルによる, 氷結晶成長抑制機構.

虫などに含まれるハイパーAFPでは, ΔT が10 K以上に達するものも同定されている.

3) 氷の結晶成長の抑制は, 氷界面に吸着したタンパク質分子が界面の移動をピン止めするためと考えられる(吸着抑制モデル)¹⁰⁾. このとき, 吸着分子の周囲の界面は凸の曲率を持つ(図1(b))ので, ギブス・トムソン効果(あるいはケルビン効果とも呼ぶ)により, 界面の局所的な融点が低下する. この融点降下は, 界面の曲率半径 r の関数として, $\Delta T = 2\sigma\gamma T_e / r\Delta H$ (σ , γ , ΔH は, それぞれ1分子あたりの体積, 界面過剰自由エネルギー, 潜熱)で与えられ, $r = r_{\min}$ のとき最大になる. 水溶液の過冷却度が, G-T効果で与えられる最大の ΔT 以内であれば, 結晶の成長は抑制される. しかし, 水溶液の温度が下がると, それに釣り合う ΔT をもたらす界面曲率が大きくなり, ついには吸着分子間の距離が曲率半径の2倍よりも大きくなると, 界面は吸着分子を乗り越えて前進することが可能になる. このモデルでは, タンパク質分子は強く界面に吸着し, 結晶成長が開始すると結晶内に取り込まれるという特性を持つ(すなわち, 非可逆的な吸着). 逆に, 融解は氷の平衡融点で起き, 界面の局所曲率が負になることはない. すなわち, 融解の際にはAFGPは簡単に離脱できることを意味している.

4) 氷結晶の成長形は, 水溶液の過冷却温度だけではなく, タンパク質濃度にも強く依存する. 図2は, AFGP水溶液中で成長する氷結晶の形の濃度依存性を示す. 純水中では薄い円盤状の形状で, ベーサル面以外の結晶面

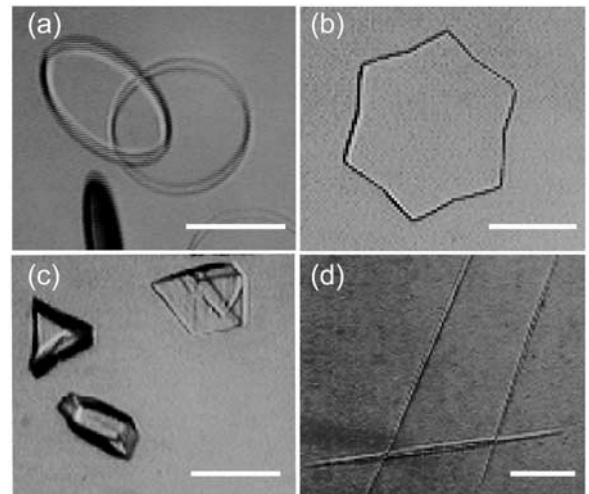


図2 AFGP水溶液中で成長した氷結晶
(a)~(d)は, それぞれAFGP濃度が0, 0.01, 0.2, 5 mg/mLに対応. スケールバーは500 μm .

がファセット面として出現することはない. しかし, AFGPがわずかに含まれると, 顕著な六方対称のファセット面が現れ, 10 $\mu\text{g/mL}$ では六角板状結晶となる. 濃度が0.2 mg/mLに上昇すると, 三角や台形状の角柱状結晶が, さらに5 mg/mL以上では c 軸方向に成長する針状結晶が観察される. すなわち, 基本的な成長形は, 濃度上昇とともに, 平板→角柱・紡錘形→針状へと変化する. このような変化が生じるには, プリズム面では成長が抑制され, ベーサル面では成長が促進される必要がある. すなわち, 氷結晶成長に対する不凍化タンパク質の効果はきわめて異方性が強く, 面方位によって成長抑制にも促進にも作用する.

5) 分子量の異なるAFGPの混合, あるいはわずかに性質の異なるAFPを混合すると, 特定の分子が単独で存在する場合より, 凍結抑制効果が上昇する. すなわち, 異なる分子の混合により, ある種の協同現象が生じる.

6) 不凍化タンパク質が微量添加された多結晶氷では, 融点直下における氷の再結晶化が抑制される.

7) 生体の過冷却した血液内には実際に氷結晶が存在することから, 不凍化タンパク質は氷結晶の核生成には寄与しないと考えられている. しかし, 核生成に対する効果が認められるという報告もある¹¹⁾.

3. 氷結晶成長界面近傍での不凍化タンパク質の拡散

不凍化タンパク質の氷結晶成長に対する効果は, きわめて興味深い多くの特性をもつが, 実際に界面への吸着状態を直接観察した報告はない. 我々は, この直接観察を行うことを目標に氷の結晶成長実験を行った. 氷結晶成長の方法には様々な方法があるが, ここでは一方向成長法と自由成長法による氷結晶成長の実験について, その概要を紹介する.

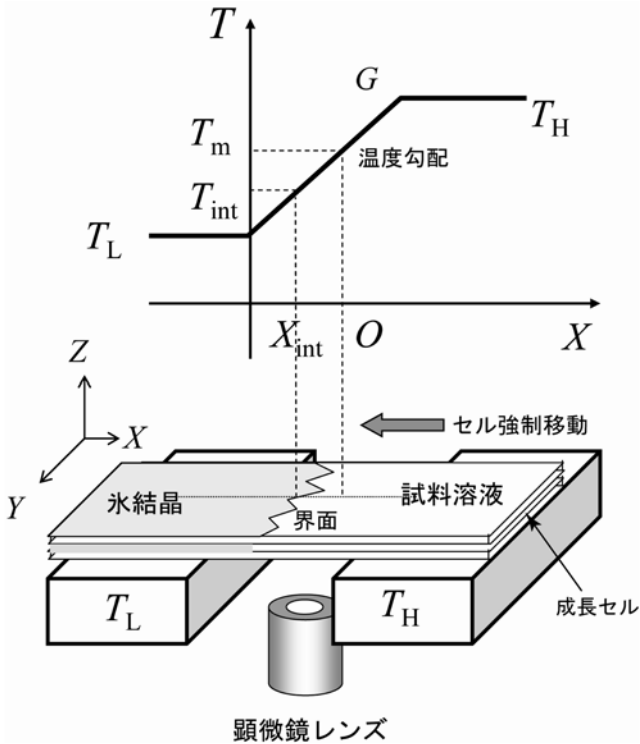


図3 一方向成長装置の模式図

まず、氷の成長界面近傍での不凍化タンパク質の拡散挙動の観察に適した一方向成長実験を行った^{6,7)}。これは、空間に固定した温度勾配中を、結晶成長セルを一定速度で強制的に平行移動させて結晶を成長させる方法で、結晶成長速度を実験パラメーターとして自由に制御できる。装置の概念図を図3に示す。結晶成長セルは、光学ガラス2枚をわずかなすき間(50~100 μ m)を空けて重ねて作る。このセルにタンパク質水溶液を入れて温度勾配場に置くと、低温側は結晶となり高温側は母液がそのまま残るので、セル中央部に固液界面が形成される。成長セルを高温側から低温側に一定速度で強制的に押し込むと、結晶界面はセルとは反対方向に移動し、成長を開始する。温度勾配は固定してあるので、界面位置は空間的に常に同じ場所に留まり、界面やその近傍で起きる現象の時間経過の観察に適している。この装置を、位相差蛍光顕微鏡のステージに置き、界面近傍でのタンパク質の分布をその場観察した。

図4は、温度勾配1.5 K/mmにおいて、成長セルを一定速度(0.5 μ m/s)で移動させたときの氷界面近傍の位相差画像と蛍光画像を示す。結晶成長の母液は、FITC(Fluorescein isothiocyanate isomer-I;分子量389 Da)でラベルしたAFGP(分子量2.6 kDa)の水溶液で、濃度は0.1 mg/mLである。位相差画像(図4(a))では、界面の位置が明確に観察されるが、結晶内(右側)や溶液内には何も観察されない。しかしながら、同じ画面の蛍光観察(図4(b))では、界面をはさんで水溶液側と結晶側では

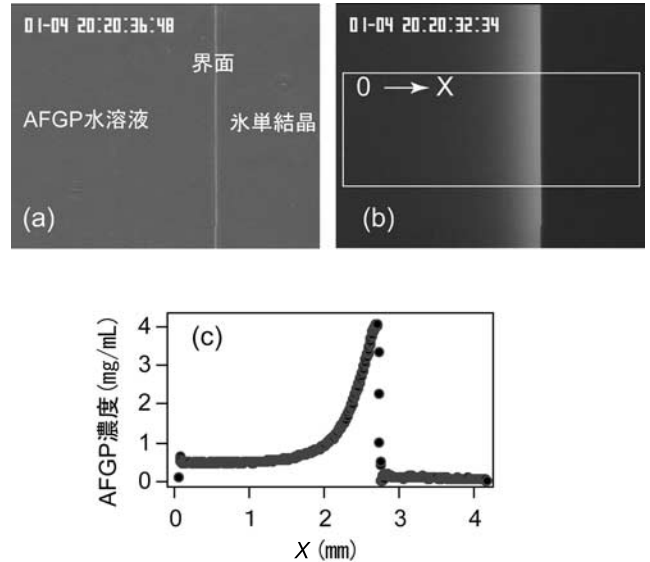


図4 一方向成長装置で観察された氷/AFGP水溶液界面 (a) 位相差画像; (b) 蛍光画像; (c) 蛍光画像の中の枠内で解析した蛍光強度分布から求めた、AFGP濃度分布。成長界面前方での拡散場が観察される。

コントラストがまったく異なる。界面に直交する方向の蛍光強度分布を見ると、結晶内では蛍光はほとんど検出されないが、水溶液側では界面での強度が最大となり、界面から離れるにしたがって指数関数的に減衰する。すなわち、蛍光強度は蛍光分子の空間数密度(AFGP濃度)に比例するので、結晶の成長界面前方に発達したAFGPの拡散場が観察されたことになる。

さらに、拡散場が十分に発達したあと、結晶成長を停止させると、界面前方の拡散場は時間とともに減衰する。この過程を図5に示す。減衰過程での界面前方の蛍光強度分布は、単純な指数関数的ではないことにまず注目される。このような分布が生じるためには、界面から水溶液内へのAFGP分子の流入が必要である。結晶の成長はすでに停止しているのに、このAFGPの流入は界面に吸

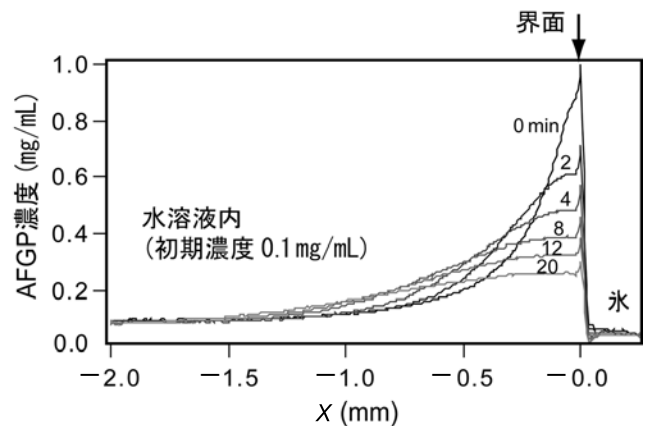


図5 図4の定常成長状態から、結晶成長を停止させた時の界面前方の拡散場の減衰過程

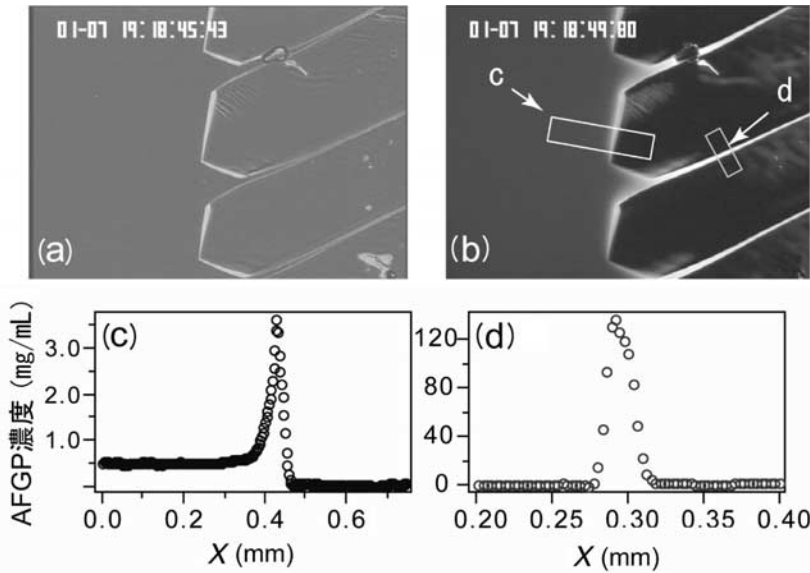


図6 一方向成長で成長速度を増加させた時に観察される界面
(a) 位相差画像；(b) 蛍光画像；(c) 蛍光画像の中の矩形枠cについて解析したAFGP濃度分布；(d) 矩形枠(d)について解析したAFGP濃度分布

着していたAFGP分子が離脱するしか可能性はない。すなわち、界面に吸着したAFGP分子は結晶の成長が停止すると可逆的に離脱できることを示唆している。図5では、界面において鋭い蛍光強度ピークが存在することが観察されるが、これも界面にAFGPの吸着層が存在することと関連している。また、この拡散場の減衰過程からAFGPの水溶液中での自己拡散係数を求めると $(1.0 \pm 0.1) \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ となり、NMRで測定された値¹²⁾ $(0.9 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s})$ とよく一致する。

一方、成長セルの移動速度を上昇させると、もはや平らな形状を保つことができなくなり、形態不安定化が生じる。最終的に、界面の形状は、図6(a)と(b)に示されるようなファセット面で囲まれた周期構造を持つジグザグパターンを生じ、定常状態に達する。界面前方でのAFGPの濃度分布を求めた結果(図6(c))は、界面が平らな場合に比べて拡散場の発達大幅に抑制されていることを示し、結晶側にAFGPが取り込まれたことを示唆している。しかしながら、結晶の粒界を横切る方向で求めたAFGP濃度分布(図6(d))では、結晶格子内にはAFGPは取り込まれず、粒界面に蓄積されて取り込まれたことを示している。

これらの観察結果は、AFGPは氷結晶成長に伴い、結晶格子に取り込まれることはなく、すべて界面前方に排斥されることを示している。さらに結晶内に取り込まれても、結晶粒界にすべてのAFGPが集積される。

4. 氷結晶の自由成長による不凍化タンパク質の再分配

氷結晶成長のもう一つの方法である自由成長法では、

バルクの水溶液中に1個の氷単結晶を成長させる。この方法では、結晶周囲に発達する拡散場が隣接する他の結晶や容器の形状に影響されないため、結晶成長の駆動力に対する成長パターンや成長速度の測定、界面での不凍化タンパク質の再配分などのその場測定が可能になる⁸⁹⁾。

氷結晶の自由成長のための装置は、一方向成長装置に比べ非常に単純であるが、重要な点は1個の単結晶をいかにして成長セルの中心部に生成するかである。このため、結晶は成長セルに外部から挿入した、ガラス毛细管の先端で成長させる。すなわち、毛细管内で生成した氷結晶を管内で成長させることで、結晶粒の数と成長方位を制御することができる¹³⁾。

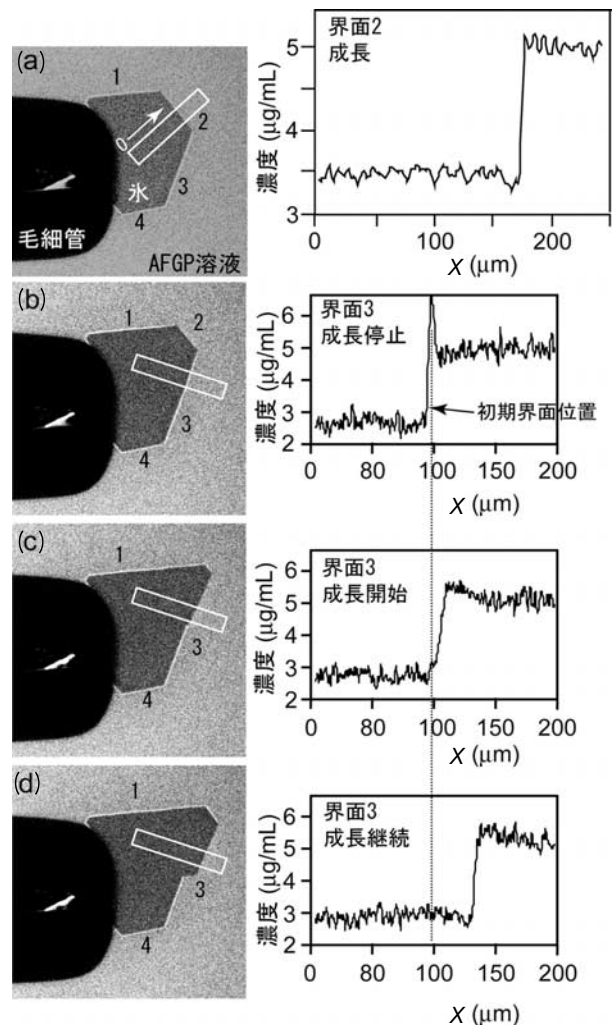


図7 AFGP水溶液中で自由成長する氷結晶と、蛍光強度解析で得られた濃度分布。各写真の時間間隔は、約2 s。

図7は、毛細管の先端でAFGP水溶液から自由成長する氷単結晶を、スペクトル共焦点顕微鏡でその場観察した結果を示す。結晶成長開始前の水溶液の温度は -0.05°C 、濃度は $5\mu\text{g/mL}$ であった。ここで特徴的な点は、薄い六角板状結晶が成長し、この結晶の側面を作る界面（プリズム面）では、成長が継続しているもの（界面2）と完全に停止しているもの（界面1, 3, 4）が同時に存在していることである。さらに成長が停止した界面に沿っては、強い蛍光のラインが観察されたが、成長を継続している界面では観察されない。すなわち、成長が停止した界面にはAFGPの選択的な吸着が存在する。また、氷結晶の成長とともに、界面1と3に挟まれた界面2の面積が徐々に小さくなり、やがてこの界面は消失する。その瞬間に、それまで停止していた界面3が成長を再開する様子が観察され、同時に界面での強い蛍光のラインも消失した。この観察は、不凍化分子の界面吸着が実際に氷結晶の成長を阻害していることを示す最初の直接的証拠であり、さらに吸着したAFGPは界面の成長開始により、容易く界面から離脱できることを示唆している。

スペクトル共焦点顕微鏡の特徴は、絞られたレーザー光の焦点から発生する蛍光強度により、三次元的に試料をスキャンすることで三次元観察画像を取得できる点にある。この機能を利用して、我々は氷結晶を含む二次元平面画像の時間変化を得ることで、図6に示す画像を得た。このため、これらの画像は、試料を厚み $100\mu\text{m}$ でスライスしたときの画像に相当するので、一方向成長実験で得られた画像と同様に、画像の蛍光強度からAFGPの濃度分布を議論することが可能である。

画像の中に示された矩形の領域について、AFGPの濃度分布を解析した結果が、図7の右側に示される。成長が停止した界面では、界面に鋭い濃度ピークが観察される（図7(b)）が、成長中の界面ではそのようなピークは観察されない。このピークの大きさから、AFGP分子による界面の被覆率（界面吸着量）を求めることができる。その結果、界面を完全に覆うような高密度の吸着ではなく、吸着分子の間隔が $21\text{nm} \pm 4\text{nm}$ となることが明らかになった。AFGP分子のサイズは、 3nm 程度であるので、AFGP分子による被覆率は10%以下に過ぎない。

また、図7(c)では、成長停止界面が再び成長を開始すると界面の吸着ピークが消失し、界面の前方の水溶液中の濃度が上昇した。この水溶液中の濃度上昇は、界面の成長とともに元の水溶液濃度に戻った（図7(d)）。

5. 不凍化タンパク質の界面吸着の新しいモデル

蛍光を使った不凍化タンパク質の界面吸着特性の観察結果から、氷界面へのAFGPの新しい吸着モデルを提案しよう。まず、界面の成長が継続して氷界面に蛍光のピ

ークが見られない状況であっても、界面は平らなファセット面となっていることが観察された。AFGPを含まない純水中では、この界面はファセット面として観察されることはないので、すでに界面とAFGP分子の間で十分な相互作用が存在することを意味している。すなわち、この状態ではAFGP分子の界面への吸着と離脱が釣り合った、ラングミュアの吸着等温式で表現されるような界面吸着が起きていると考えられる。このような吸着では、界面の移動を停止するようなピン止め効果は期待できない。一方、界面に吸着したAFGP分子の一部は、より強い吸着状態へと変化し、この状態の吸着分子が氷結晶界面の成長の停止に寄与する。すなわち、AFGPの氷界面への吸着は、まず脱着平衡の成り立つ弱い吸着（不完全吸着）が起こり、その中の一部の分子がより強い吸着状態（完全吸着）へと二段階で起きる。この完全吸着したAFGP分子が、界面での蛍光強度のピークとして観察される。

しかしながら、図7(c)と(d)に示されるように、AFGP分子が界面に完全吸着した状態にあったからといって、結晶の成長が再開されてもAFGPが結晶内に取り込まれることはなかった。むしろ、成長が再開すると界面から簡単に離脱して、水溶液中に再拡散したように見える。一方向成長で観察したAFGPの拡散場の挙動とも一致する。すなわち、完全吸着といっても離脱不可能なほどの強い吸着が起きるわけではなく、なんらかのきっかけがあれば界面から簡単に離脱可能で、むしろ可逆的な吸着特性が残されていることを示している。我々は、このような特徴を持つAFGPの氷界面吸着を二段階可逆吸着と呼んでいる。

このような二段階で起きる吸着とは、具体的にどのようなものであろうか？我々は、フーリエ変換赤外分光法により、氷結晶界面に吸着状態にあるAFGP分子の二次構造を解析した¹⁴⁾。その結果、水溶液中ではランダムコイルであったAFGPの構造が、界面吸着状態では α -ヘリックス構造を持つことを明らかになった。ランダムコイル状態のままでは、界面に吸着しても分子構造の持つ周期性和氷結晶格子の周期性が一致せず、吸着力も弱い。しかし、分子の構造が周期性の高い α -ヘリックスに変化することで、より強い吸着が実現すると考えられる。すなわち、不完全吸着から完全吸着への移行は、AFGP分子の二次構造変化により引き起こされる。

一方、 α -ヘリックス構造を持つAFPタイプI分子を吸着させた氷界面構造と結晶成長の分子動力学シミュレーションでは、分子の向きが変化すると吸着状態が変化し、結晶成長を抑制する場合としない場合が存在することも明らかになった¹⁵⁾。この結果も、不凍化タンパク質の界面吸着機構として、二段階可逆吸着モデルが有効である

ことを強く示唆する結果である。

6. おわりに

蛍光ラベルをつけた不凍化タンパク質を使うことで、タンパク質分子の界面近傍での挙動の可視化が可能になり、吸着特性と結晶成長の関連が解明されつつある。しかしながら、まだこのタンパク質分子が界面でどのような挙動をし、界面の移動を抑制しているのかは明らかではない。今後、タンパク質分子の1分子観察や氷/水界面の分子レベルでの構造の観察など、もう一段分解能の高い観察を行うことが重要になる。まだ、十分な実現には至っていないが、観察技術の発展とともに近い将来議論が可能となるであろう。

謝辞

本解説の内容は、Salvador Zepeda, 宇田幸弘, 中谷裕乏, 横山悦郎らとの共同研究である。

文献

- 1) P.F.Scholander, L. Van Dam, J.W. Kanwisher, H.T.Hammel and M.S.Gordon : J. Cell. Comp. Physiol., (49), 5 (1957).
- 2) Y. Yeh and R.E. Feeney : Chem. Rev., (96), 601 (1996).
- 3) Y-C. Liou, A. Tocilj and P. L. Davis : Nature, (406), 322 (2000).
- 4) N. Muryo, M. Sato, S. Kaneko, H. Kawahara, H. Obata, M. W. F. Yaish, M. Griffith and B.R. Glick : J. Bacteriol., (186), 5661 (2004).
- 5) M. Griffith and M. W. F. Yaish : Trends Plant Sci., (9), 399 (2004).
- 6) Y. Furukawa, N. Inohara and E. Yokoyama : J. Crystal Growth, (275), 167-174 (2005).

- 7) S. Zepeda, H. Nakaya, Y. Uda, E. Yokoyama and Y. Furukawa : Physics and Chemistry of Ice, The Proceedings of the 11th International Conference on Physics and Chemistry of Ice, Ed. W.F. Kuhs, RSC Publishing, pp.669-676, (2007).
- 8) S. Zepeda, E. Yokoyama, Y. Uda, C. Katagiri and Y. Furukawa : Crys. Growth Desig., (8), 3666 (2008).
- 9) S. Zepeda, Y. Uda and Y. Furukawa : J. Jpn Assoc. Cryst Growth, (35), 151 (2008).
- 10) 古川義純 : 「食品とガラス化・結晶化技術」, pp.195-203, サイエンスフォーラム, (2000).
- 11) N. Du, X-Y. Liu and C. L. Hew : J. Phys. Chem., (B110), 20562-20567 (2006) ; J. Biolo. Chem., (278), 36000-36004 (2003).
- 12) V. V. Krishnan, W. H. Fink, R. E. Feeney and Y. Yeh : Biophys. Chem., (110), 223-230 (2004).
- 13) S. Zepeda, S. Nakatsubo and Y. Furukawa : Rev. Sci. Inst., (2009) in press.
- 14) Y. Uda, S. Zepeda, F. Kaneko, Y. Matsuura and Y. Furukawa : J. Phys. Chem., (B111), 14355 (2007).
- 15) H. Nada and Y. Furukawa : J. Phy. Chem., (B112), 7111-7119 (2008).

Summary

In situ observations of ice crystal growth in the supercooled solution of antifreeze glycoprotein (AFGP) labeled by the fluorescent molecule were carried out. Diffusion, adsorption, rejection and incorporation processes of AFGP molecules at/in front of the growing interface were clearly observed even at the very low concentrations. On the basis of the analysis of fluorescent intensity distribution, we found that the AFGP adsorption proceeded in two steps, namely from incomplete to complete adsorptions. Furthermore, the adsorption was reversible even under the complete adsorption state. We introduce the recent experimental results and the new adsorption model of AFGP molecules on ice interface.

複写される方へ

本学会は下記協会に複写に関する権利委託をしていますので、本誌に掲載された著作物を複写したい方は、同協会より許諾を受けて複写して下さい。但し、(社)日本複写権センター(同協会より複写に関する権利を再委託)と包括複写許諾契約を締結されている企業の社員による社内利用目的の複写はその必要はありません。(社外頒布用の複写は許諾が必要です)

権利委託先：有限責任中間法人 学術著作権協会 〒107-0052 東京都港区赤坂9-6-41 乃木坂ビル3階
電話 03-3475-5618 FAX 03-3475-5619 E-mail : info@jaacc.jp

注意：複写以外の許諾(著作物の転載・翻訳等)は、学術著作権協会では扱っていませんので、直接本学会へご連絡ください。

また、アメリカ合衆国において本書を複写したい場合は、次の団体に連絡して下さい。
Copyright Clearance Center, Inc. 222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA
Phone 1-978-750-8400 FAX 1-978-646-8600