



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                  |                                                                                   |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | 不凍タンパク質の氷界面吸着に関する分子動力学シミュレーション研究                                                  |
| Author(s)        | 灘, 浩樹                                                                             |
| Citation         | 低温科学, 71, 23-28                                                                   |
| Issue Date       | 2013-03-31                                                                        |
| Doc URL          | <a href="https://hdl.handle.net/2115/52336">https://hdl.handle.net/2115/52336</a> |
| Type             | departmental bulletin paper                                                       |
| File Information | LTS71_004.pdf                                                                     |



# 不凍タンパク質の氷界面吸着に関する 分子動力学シミュレーション研究

灘 浩樹<sup>1)</sup>

2012 年 12 月 28 日受付, 2013 年 1 月 15 日受理

不凍タンパク質による氷の成長抑制は、それらが氷界面へ吸着することにより起こる。しかしながら、何故それらが吸着するのかという基本的な点が未だによくわかっていない。本解説では、最近行われた不凍タンパク質の氷界面吸着に関する分子動力学シミュレーション研究を紹介し、吸着構造の熱力学的安定性を議論する。

## Molecular dynamics simulation studies on the binding of an antifreeze protein to an ice interface

Hiroki Nada<sup>1</sup>

Ice growth inhibition by antifreeze proteins occurs when the proteins bind to ice interfaces. However, a fundamental question of why the proteins bind to the interfaces still remains unclear. This review presents recent molecular dynamics simulation studies on the binding of the proteins to the interfaces. We will discuss the thermodynamic stability of the binding conformations of the proteins at the interfaces.

### 1. はじめに

寒冷圏に生息する魚や昆虫は、氷の結晶成長を抑制する不凍タンパク質 (Anti-Freeze Protein, AFP) を体内に持っている (Yeh and Feeney, 1996)。植物着生バクテリアは、氷の核生成を促進する氷核タンパク質 (Ice-Nucleating Protein, INP) を細胞膜に持っている (Lee Jr. et al., 1997)。これらの氷結晶化制御機能を持つタンパク質は、生命科学はもちろん、物理学や結晶成長学など幅広い学術分野における研究対象である。

AFP による氷成長抑制を記述する代表的な理論モデルは、AFP の強い氷界面吸着を仮定している (Knight et al., 1991; Kuroda, 1991)。INP による氷核生成促進は、INP が鋳型として働くことにより起こると考えられている (Lee Jr. et al., 1997)。AFP と INP は互いに相反する機能を示すものの、構造は類似していると考えられており (Graether et al., 2001)、また INP の部分ポリペプチドは AFP のように氷界面吸着して成長抑制するとも報告されている (Kobashigawa et al., 2005)。

最近の実験研究により、AFP が氷界面吸着している

ことはかなり確かとなってきた (Pertaya et al., 2008; Zepeda et al., 2008; Celik et al., 2010)。また、INP も AFP と同様に氷界面吸着する性質があることがわかってきた (Nada et al., 2010)。このように、氷界面吸着は AFP と INP に共通しており、それらタンパク質による氷結晶化制御機構を理解するためのキーとなる性質である。

しかしながら、それらタンパク質が何故、どの程度安定に氷界面吸着するのかは未だよくわかっていないため、それらタンパク質による氷結晶化制御機構の理解も未だに乏しい。その最大の理由は、氷界面におけるタンパク質挙動や吸着構造を実験的手法により調べるのが困難なことにある。このため、分子動力学法などの分子間相互作用に基づいた計算機シミュレーションによるアプローチが極めて重要といえる。

本報では、シミュレーションによる研究が進んできている AFP の氷界面吸着に絞って解説する。最近行われた winter flounder AFP (wfAFP) のミュータント (wfAFP に含まれるアミノ残基の一部が別なアミノ残基に置換されたもの, mwAFP) および spruce budworm AFP (sbwAFP) の氷界面吸着に関する分子動力学シミュレーション研究を紹介し (Nada and Furukawa, 2008, 2011, 2012)、そこで見られた吸着構造や吸着挙動について述べるとともに、それら AFP の氷界面吸着の熱力学的安定性について議論する。

1) 産業技術総合研究所

<sup>1</sup> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, Japan  
e-mail: hiroki.nada@aist.go.jp

## 2. AFP の構造と氷表面吸着構造

Figure 1a に mwfAFP の構造を示す (Liepinsh et al., 2002). mwfAFP は, wfAFP と同じ  $\alpha$  ヘリックス構造を持つ. wfAFP に見られる等間隔に配置した 4 つのスレオニン (Thr) が, mwfAFP ではバリン (Val) に置換されている (Yang et al., 1988). どちらの AFP 存在下でも, 氷の成長形は  $\{20\bar{2}1\}$  ピラミッド面に覆われる (Figure 1b) (Davies and Hew, 1990; Haymet et al., 1999). したがって, どちらもそのピラミッド面に選択的に吸着する性質があり, 同じ機構で氷の成長を抑制すると考えられる. wfAFP ではなく mwfAFP をシミュレーション研究の対象として選択した理由は, mwfAFP の方が詳細な三次元原子配列構造が判っていたため (Liepinsh et al., 2002), シミュレーションに便利だったからである.

mwfAFP の理想的なピラミッド表面へのポテンシャルエネルギー最小吸着構造を Figure 1b に示す (Nada and Furukawa, 2008). 分子レベルのピラミッド表面構造には,  $\langle 01\bar{1}2 \rangle$  方向に沿って周期的な凹凸が現れる. その凹凸周期は mwfAFP の Val の配列周期と一致する. Val が凹部分にはまるように吸着すると, ポテンシャルエネルギー最小となる. wfAFP も同じポテンシャルエネルギー最小吸着構造を示す (Jorov et al., 2004).

Figure 2a に sbwAFP の構造を示す (Graether et al., 2003). sbwAFP は  $\beta$  ヘリックス構造を持つ. sbwAFP をヘリックス軸方向に沿って見ると三角柱形状であり, その一つの柱面部分に Thr が周期的に配列している. sbwAFP 存在下での氷の成長形は,  $\{0001\}$  ベーサル面と  $\{10\bar{1}0\}$  プリズム面によって囲まれた六角板となる (Graether et al., 2000). このことから, sbwAFP はそれらの面に選択的に吸着してそこでの成長を抑制すると考えられている.

Figure 2b に理想的なプリズム表面への sbwAFP のポテンシャルエネルギー最小吸着構造を示す (Nada and Furukawa, 2011).  $\beta$  ヘリックスが  $\langle 11\bar{2}0 \rangle$  方向に向き, sbwAFP 柱面の Thr 配列周期とプリズム表面の水分子配列周期が一致するように吸着すると, ポテンシャルエネルギー最小となる. 同様に, ベーサル表面においても, Thr 配列周期と氷表面格子とのマッチングが良くなるような吸着構造が安定になると考えられている (Graether et al., 2000).

AFP-理想的氷表面構造間のポテンシャルエネルギー解析は, AFP の氷表面吸着構造のエネルギー的安定性を検討する上では有効である. しかし実際には, AFP が“成長している氷の界面”に吸着することにより成長抑制が起こる. 氷の界面は数分子層程度の厚みを持ち, そこでは固体から液体へ構造がゆるやかに変わっ

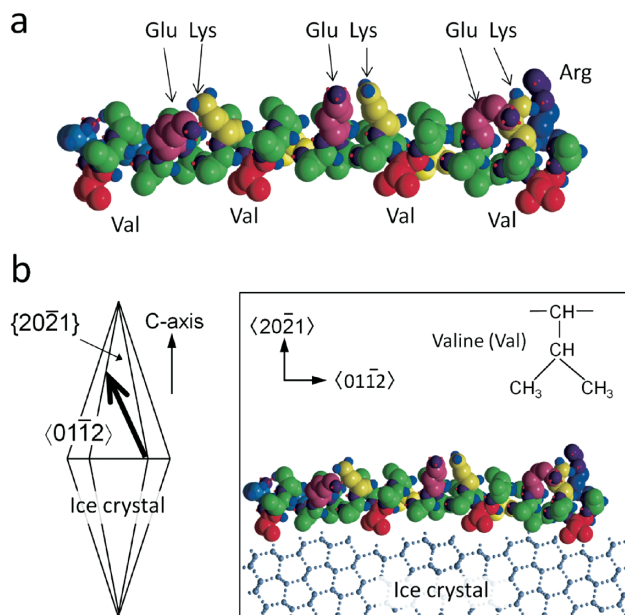


図 1: (a) mwfAFP の構造, (b) mwfAFP 存在下での氷の成長形および理想的な  $\{20\bar{2}1\}$  ピラミッド表面へのポテンシャルエネルギー最小吸着構造. ポテンシャルエネルギー計算には, six-site model (Nada and van der Eerden, 2003) と CHARMM 力場 (Neria et al., 1996) を用いた. 方法の詳細は文献を参照されたい (Nada and Furukawa, 2008). 赤, 紫, 黄, 青の大きい球は, それぞれ Val, Lys, Glu, Arg の炭素原子を表す. 緑球は, 他のアミノ残基 (その殆どは Ala) の炭素原子を表す. 紫と青の小さな球は, それぞれアミノ残基の窒素原子, 酸素原子を表す. 薄い水色の小さな球と極めて小さな球は, それぞれ水分子の酸素原子と水素原子を表す.

Fig. 1: (a) a schematic of mwfAFP structure. (b) the shape of a growing ice crystal in the presence of mwfAFP, and the potential energy minimum adsorption conformation of mwfAFP at the ideal  $\{20\bar{2}1\}$  pyramidal plane surface of ice. The potential energy calculation was done using the six-site model (Nada and van der Eerden, 2003) and the CHARMM force field (Neria et al., 1996). Details of the potential energy calculation method are given in a paper by Nada and Furukawa (Nada and Furukawa, 2008). Large red, purple, yellow, and blue spheres represent carbon atoms of Val, Lys, Glu, and Arg, respectively. Carbon atoms of other residues are shown as large green spheres (most of them are of Ala). For all the residues depicted, small dark purple spheres represent nitrogen atoms and very small spheres represent oxygen atoms. Small and very small bright sky blue spheres represent oxygen and hydrogen atoms of  $H_2O$  molecules, respectively.

ており (Karim and Haymet, 1988; Nada and Furukawa, 1995, 2005), 理想的な氷表面の構造とは大きく異なる. したがって, AFP による氷の成長抑制機構を理解するためには, 成長する氷の界面における AFP の吸着挙動を調べるのが重要であり, 現状分子動力学シミュレーションがその唯一の手段である.

## 3. 分子動力学シミュレーション

### 3.1 シミュレーション方法

水分子間に働く相互作用ポテンシャルは six-site

modelを用いて計算した (Nada and van der Eerden, 2003). AFP のポテンシャルパラメータは, CHARMM 力場により決定した (Neria et al., 1996). AFP の構造モデルは, 回折実験により決定された原子配列に従って構築した (Liepinsh et al., 2002; Graether et al., 2003).

シミュレーション系として, 氷界面を二つ含む三次元周期境界直方体セルを用いた. mwfAFP に対しては 8640 水分子から成る  $\{20\bar{2}1\}$  ピラミッド界面の系, sbwAFP に対しては 9720 水分子から成る  $\{10\bar{1}0\}$  プリズム界面の系を用いた. 各界面には AFP を一つ置いた.

各分子に対する運動方程式は, 時間刻み幅を 1 フェムト秒として合計 4 ナノ秒分解いた. 水分子も AFP も剛体として取り扱った. 系の温度と圧力がそれぞれ  $-10^{\circ}\text{C}$ , 1 気圧に保たれるように, 分子の運動エネルギーと系の体積を制御した. シミュレーション方法の詳細は文献を参照されたい (Nada and Furukawa, 2008, 2011).

シミュレーションは, 界面における複数の AFP 初期吸着構造に対して実施した. wAFP に対しては, 理想的なピラミッド表面におけるポテンシャルエネルギー最小吸着構造 (Figure 1b) およびそれとは異なる三通りの吸着構造を初期界面吸着構造としてシミュレーションを実施した. sbwAFP に対しては, 理想的なプリズム表面におけるポテンシャルエネルギー最小吸着構造 (Figure 2b) およびそれとは異なるもう一通りの吸着構造を調べた. 以下では, ポテンシャルエネルギー最小吸着構造およびそれとは異なる吸着構造を, それぞれ吸着構造 A および吸着構造 B と呼ぶ.

### 3.2 シミュレーション結果

Figure 3 に mwfAFP のシミュレーション結果を示す. 初期吸着構造を吸着構造 A としたシミュレーションでは, 界面で mwfAFP 周辺に氷が成長しても初期位置のままで吸着構造を変えずに安定であった (Figure 3a). 吸着構造 B に対するシミュレーションにおいては, もともと吸着構造 A に近い初期吸着構造をとっていた mwfAFP は自発的に吸着構造 A へ変わり, そして界面に安定吸着した. しかし, 吸着構造 A とは大きく異なる初期吸着構造をとっていた mwfAFP は, 周辺の氷の成長とともに初期位置から移動していき, 界面に安定吸着しなかった (Figure 3b).

また, 界面に安定吸着した mwfAFP 周辺の氷の成長において, 劇的な成長速度減少が起こった. この成長速度減少は, mwfAFP による成長抑制に相当したものである. その減少分は, Gibbs-Thomson 効果 (または Kelvin 効果) による成長界面先端での融点降下を仮定して理論的に予測される値とオーダーは一致することがわかった. ここで Gibbs-Thomson 効果とは, 曲率界

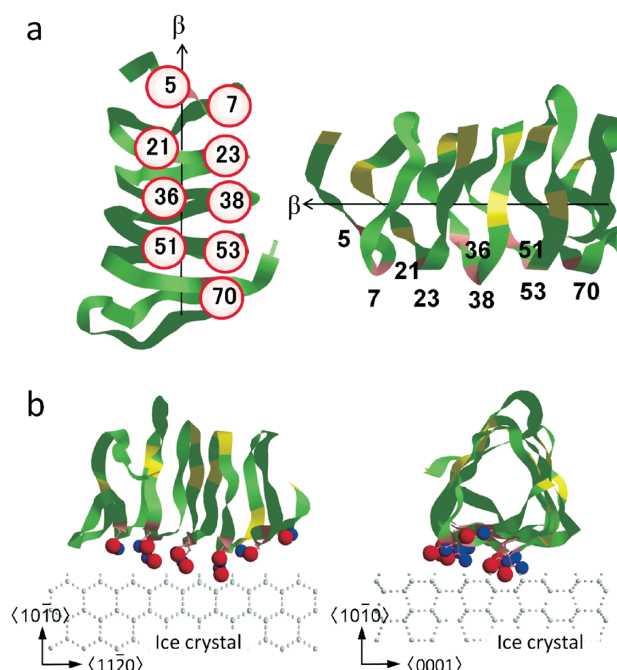


図 2 : (a) sbwAFP の構造. Thr 配列面の Thr 残基位置 (No.5, 7, 21, 23, 36, 37, 51, 53, 70) は左側の絵に赤い円で示してある. (b) 理想的な  $\{10\bar{1}0\}$  プリズム表面へのポテンシャルエネルギー最小吸着構造 (Nada and Furukawa, 2011). ポテンシャルエネルギー計算には, six-site model (Nada and van der Eerden, 2003) と CHARMM 力場 (Neria et al., 1996) を用いた. 青と紫の球は, それぞれ Thr 側鎖先端のメチル基と水酸基を表す.

Fig. 2 : (a) schematics of sbwAFP structure. Positions of Thr residues in the sbwAFP's Thr-face (No.5, 7, 21, 23, 36, 37, 51, 53 and 70) are marked by blue circles in the left-hand schematic. (b) the potential energy minimum adsorption conformation of mwfAFP at the ideal  $\{10\bar{1}0\}$  prismatic plane surface of ice (Nada and Furukawa, 2011). The potential energy calculation was done using the six-site model (Nada and van der Eerden, 2003) and CHARMM force field (Neria et al., 1996). Large dark blue and purple spheres represent Thr's methyl and hydroxyl groups of the Thr-face, respectively.

面においては成長に伴って界面エネルギー不利が増加し, 成長に必要な駆動力が平坦界面の場合と比べて増加するため, 界面における融点が局所的に下がる効果である (Yeh and Feeney, 1996).

Figure 4 に sbwAFP のシミュレーション結果を示す. 吸着構造 A を初期吸着構造としたシミュレーションでは, mwfAFP の場合と同様に, 周辺に氷が成長しても sbwAFP は初期位置のまま吸着構造を変えずに安定に界面吸着していた (Figure 4a). 吸着構造 B に対するシミュレーションでは, 周辺に氷が成長するにつれて吸着構造が変化した. しかし, 成長氷に現れたプリズム面に Thr 配列面が接触する吸着構造となったところで, そのまま安定に吸着した (Figure 4b). そこで観察された吸着構造は吸着構造 A とは異なるものであり,  $\beta$  ヘリックス軸が吸着構造 A のものから表面に沿って  $90^{\circ}$  回転したものであった.

結果として, どちらの初期吸着構造に対するシミュ

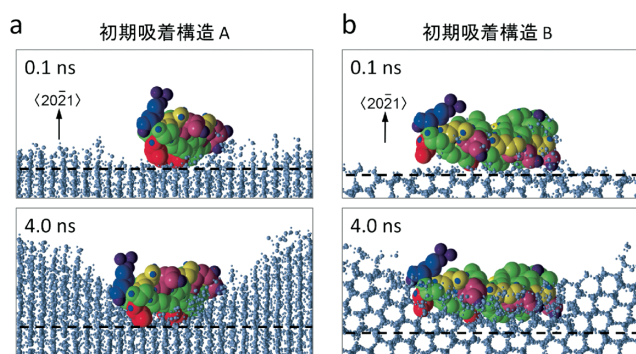


図3：シミュレーション開始から0.1ナノ秒後および4ナノ秒後のピラミッド界面付近のmwAFP吸着構造および水分子配列構造。(a)初期吸着構造A、(b)初期吸着構造B。破線は、シミュレーション開始時の界面位置を表す。氷の水分子のみを表示している。氷の水分子の定義は、最近接位置に配位した四個の水分子の各々と水素結合により結ばれていた水分子とした。

Fig. 3: The binding conformation of mwAFP and the structure of H<sub>2</sub>O molecular arrangement near the pyramidal interface at 0.1 and 4.0 ns after the beginning of the simulation for mwAFP's initial position corresponding to (a) the potential energy minimum conformation and (b) one of the energetically metastable conformations. The dashed lines show the initial positions of the interfaces. Here, ice-like H<sub>2</sub>O molecules only are shown. The ice-like H<sub>2</sub>O molecules were defined as H<sub>2</sub>O molecules that were connected via hydrogen bonds to each of their four nearest neighbors.

レーションにおいても氷の成長抑制に相当する成長速度減少が起こった。その減少分は、mwAFPの場合と同様に、Gibbs-Thomson効果 (Yeh and Feeney, 1996) をベースとして理論的に予測される値とオーダーが一致した。本シミュレーション結果は、氷プリズム成長界面におけるsbwAFPの安定吸着構造が、吸着構造A以外にも存在することを強く示唆するものである。このことは、sbwAFPの水への親和性が強いことも示唆しており、また成長抑制効果が他のAFPに比べて格段に高いことと関係しているかも知れない。

#### 4. 議論

ここで、シミュレーションで観察された氷成長界面における吸着構造の熱力学的安定性を議論する。ピラミッド界面に安定吸着したmwAFPでは、疎水性Valメチル基が下地氷に接触し、親水性アミノ残基の多くは水に接触していた。この吸着構造では、液体水分子によるメチル基周辺の疎水性水和構造形成がもたらすエントロピーロスを避けられ、また親水性アミノ残基は液体水分子と水素結合をつくるためにエンタルピーが下がる。さらに、mwAFP構造と下地氷の凹凸構造とがマッチすることにより接触面積が大きくなるため、エンタルピーが下がる。このようにして、シミュレーションで観察されたmwAFPの水界面吸着構造が熱力学的に安定であった理由を定性的に説明することができる。

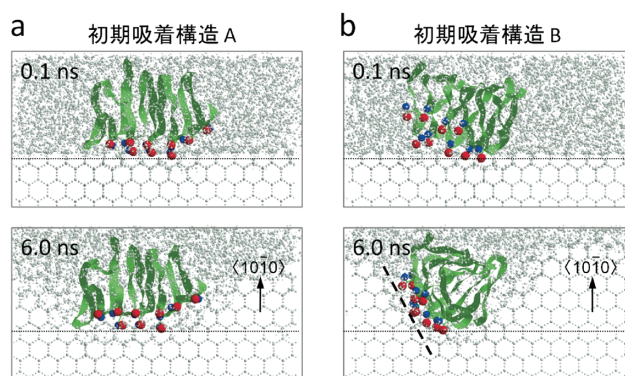


図4：シミュレーション開始から0.1ナノ秒後および6ナノ秒後のプリズム界面付近のsbwAFP吸着構造および水分子配列構造。(a)表面安定吸着構造、(b)表面不安定吸着構造。点線は、シミュレーション開始時の界面位置を表す。破線は、初期吸着構造BのsbwAFPが最終的に安定吸着した氷界面。0.1ナノ秒間の時間平均座標を使って各分子を表示している。

Fig. 4: The binding conformation of sbwAFP and the structure of H<sub>2</sub>O molecular arrangement near the prismatic interface at 0.1 and 6.0 ns after the beginning of the simulation for sbwAFP's initial position corresponding to (a) the potential energy minimum conformation and (b) one of the energetically unstable conformations. The dashed line shows the grown ice's prismatic interface to which sbwAFP with the initial binding conformation B finally, stably bound to. Here, H<sub>2</sub>O molecules and sbwAFP were illustrated using the time-averaged coordinates of them for a period of 0.1 ns.

しかし、水平界面に対するシミュレーションも実施したところ、吸着構造AであってもmwAFPは界面に安定吸着しなかった (Nada and Furukawa, 2008)。氷成長界面では、mwAFP周辺に成長した氷との相互作用によりエンタルピーが下がる効果が吸着安定化に大きく寄与していたのである。平衡界面に安定吸着しないということは、mwAFPの水への吸着は、従来の理論で仮定されてきたように不可逆的に強いものではなさそうだ (Knight et al., 1991)。

sbwAFPの水成長界面吸着構造の熱力学的安定性にも、mwAFPの場合と同様な説明が成り立つ。下地氷と接触するThrの側鎖先端にはメチル基だけでなく水酸基も存在するが、その水酸基の吸着安定化への寄与よりも疎水性メチル基が氷へ接触することによる寄与の方が大きいようである (Haymet et al., 1999; Jorov et al. 2004; Nada and Furukawa, 2011)。sbwAFPやwfAFPなど、氷に接触するアミノ残基がThrであるケースは多い。Thr水酸基の吸着安定化への寄与については定性的にも定量的にもまだ十分に理解されているとは言えず、今後より詳しく調べられるべきである。

sbwAFPは、プリズム界面だけでなくベースル界面にも吸着する。Scotterらは、sbwAFPなど極めて高い不凍効果を示すAFPは、ベースル面へ吸着する性質があると指摘している (Scotter et al., 2006)。本シミュレーションにおいて、プリズム界面におけるsbwAFP

の安定吸着構造が少なくとも二通り存在することがわかった。このことは、sbwAFPの水への親和性が強く、またその界面安定吸着には下地水格子構造との厳密なマッチングが必ずしも必要ではないことを意味しており、sbwAFPがベーサル面など他の面指数の界面へも安定吸着できることと矛盾しない。Garnhamらは、sbwAFPのような極めて強い不凍効果を示すAFPが氷界面に吸着するとき、界面の水分子がAFPと下地水を連結するクラスレート状の緩和構造を形成するため、それによりAFPがベーサル面を含む複数の面に安定吸着できると指摘している (Garnham et al., 2011)。界面吸着したAFPと下地水間の水分子配列構造に焦点をあてた研究も、大いに意味がありそうだ。

本解説で紹介したシミュレーション研究において、界面に安定吸着したAFP周辺の氷成長速度減少分がGibbs-Thomson効果を仮定して計算される値とオーダーが一致した。しかし、Gibbs-Thomson効果により氷成長抑制を記述する理論モデルにおいて仮定されてきた不可逆的に強いAFP吸着はシミュレーションでは認められず、このため成長抑制機構の基本的部分に関しても未だ不確かな点が多い。AFPによる成長抑制機構を解明していくためには、実験研究や理論研究との比較および検討を交えながら、より精度の高い大規模シミュレーション研究を実施していくことが必要であろう。

## 5. おわりに

本解説では、AFPの氷成長界面吸着に関する最近の分子動力学シミュレーション研究を紹介し、界面におけるAFP吸着構造の熱力学的安定性を議論した。wfAFPとsbwAFPに対するシミュレーション結果から、AFP疎水基が氷に接触してAFP親水基が氷に向くような吸着構造が自由エネルギー的に安定になることが判ってきた。また、吸着AFPとその周辺に成長する氷との相互作用も吸着の安定化に重要な役割を果たしていることも判ってきた。

しかし、まだ判らないことも多く残されている。氷など無機結晶への生体分子吸着は、生物の耐凍結・避凍結だけでなくバイオミネラリゼーションや有機／無機ハイブリッド結晶材料の合成など、基礎科学から産業応用まで幅広く関係する極めて重要な現象である。その原理解明に向けて、理論や実験だけでなく、原子・分子レベルの計算科学シミュレーション法によるアプローチの必要性が今後より一層増すに違いない。

## 謝辞

本研究は、文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「融合マテリアル」(領域番号2206, 課題番号

22107004)の支援を受けて実施した。本研究を行うにあたり、北海道大学低温科学研究所古川義純教授、Salvador Zepeda博士には有益な助言をいただいた。本研究で実施したシミュレーションの一部は、東京大学物性研究所スーパーコンピュータ施設を利用した。

## 参考文献

- Celik, Y., Graham, L. A. Mok, Y.-F., Bar, M., Davies, P. L., and I. Braslavsky (2010) Superheating of ice crystals in antifreeze protein solutions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A*, **107**, 5423-5428.
- Davies, P. L., and C. L. Hew (1990) Biochemistry of Fish Antifreeze Proteins, *FASEB J.*, **4**, 2460-2468.
- Garnham, C. P., Campbell, R. L., and P. L. Davies (2011) Anchored Clathrate Waters Bind Antifreeze Proteins to Ice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 7363-7367.
- Graether, S. P., Kuiper, M. J., Gange, S. M., Walker, V. K., Jia, Z., Sykes, B. D., and P. L. Davies (2000)  $\beta$ -helix Structure and Ice-Binding Properties of a Hyperactive Antifreeze Protein From an Insect, *Nature*, **406**, 325-328.
- Graether, S. P., and Z. Jia (2001) Modeling *Pseudomonas syringae* Ice-Nucleation Protein as a  $\beta$ -helical Protein, *Biophys. J.*, **80**, 1160-1173.
- Graether, S. P., Gagné, S. M., Spyropoulos, L., Jia, Z., Davis, P. L., and B. D. Sykes (2003) Spruce Budworm Antifreeze Protein: Changes in Structure and Dynamics at Low Temperature, *J. Mol. Biol.*, **327**, 1155-1168.
- Haymet, A. D. J., Ward, L. G., Harding, M. M., and C. A. Knight (1998) Valine Substituted Winter Flounder 'Antifreeze': Preservation of Ice Growth Hysteresis, *FEBS Lett.*, **430**, 301-306.
- Haymet, A. D. J., Ward, L. G., and M. M. Harding (1999) Winter Flounder "Antifreeze" Proteins: Synthesis and Ice Growth Inhibition of Analogues that Probe the Relative Importance of Hydrophobic and Hydrogen-Binding Interactions, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 941-948.
- Jorov, A. Zhorov, B. S., and D. S. C. Yang (2004) Theoretical Study of Interaction of Winter Flounder Antifreeze Protein With Ice, *Protein Sci.*, **13**, 1524-1537.
- Karim, O. A., and A. D. J. Haymet (1988) The Ice/Water Interface: A Molecular Dynamics Simulation Study, *J. Chem. Phys.*, **89**, 6889-6896.
- Knight, C. A., Cheng, C. C., and A. L. DeVries (1991) Adsorption of  $\alpha$ -helical Antifreeze Peptides on Specific Ice Crystal Surface Planes, *Biophys. J.*, **59**, 409-418.
- Kuroda, T. (1991) in *Proc. 4th Topical Conference on Crystal Growth Mechanisms*, 1-4.
- Lee Jr., R. E., Warren, G. J., and L. V. Gusta (1997) in *Biological Ice Nucleation and Its Applications*, (APS Press).
- Kobashigawa, Y., Nishimura, Y., Miura, K., Ohgiya, S., Miura, A., and S. Tsuda (2005) A Part of Ice-Nucleation Protein Exhibits the Ice-Binding Ability, *FEBS Lett.*, **579**, 1493-1497.

- Liepinsh, E., Otting, G., Harding, M. M., Ward, L. G., Mackay, J. P., and A. D. J. Haymet (2002) Solution Structure of a Hydrophobic Analogue of the Winter Flounder Antifreeze Protein, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 1259–1266.
- Nada, H., and Y. Furukawa (1995) Anisotropic Properties of Ice/Water Interface: A Molecular Dynamics Study, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **34**, 583–588.
- Nada, H., and J. P. J. M. van der Eerden (2003) An Inter-molecular Potential Model for the Simulation of Ice and Water near the Melting Point: A Six-Site Model of H<sub>2</sub>O, *J. Chem. Phys.*, **118**, 7401–7413.
- Nada, H., and Y. Furukawa (2005) Anisotropy in Growth Kinetics at Interfaces between Proton-Disordered Hexagonal Ice and Water: A Molecular Dynamics Study using the Six-Site Model of H<sub>2</sub>O, *J. Cryst. Growth.*, **283**, 242–256.
- Nada, H., and Y. Furukawa (2008) Growth Inhibition Mechanism of an Ice–Water Interface by a Mutant of Winter Flounder Antifreeze Protein: A Molecular Dynamics Study, *J. Phys. Chem. B*, **112**, 7111–7119.
- Nada, H., Zepeda, S., Miura, H., and Y. Furukawa (2010) Significant Alternations in Anisotropic Ice Growth Rate Induced by the Ice Nucleation-Active Bacteria *Xanthomonas Campestris*, *Chem. Phys. Lett.*, **498**, 101–106.
- Nada, H., and Y. Furukawa (2011) Growth Inhibition at the Ice Prismatic Plane Induced by a Spruce Budworm Antifreeze Protein: A Molecular Dynamics Simulation Study, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13**, 19936–19942.
- Nada, H., and Y. Furukawa (2012) Antifreeze Proteins: Computer Simulation Studies on the Mechanism of Ice Growth Inhibition, *Polymer J.*, **44**, 690–698.
- Neria, E., Fischer, S., and M. Karplus (1996) Simulation of Activation Free Energies in Molecular Systems, *J. Chem. Phys.*, **105**, 1902–1921.
- Pertaya, N., Marshall, C. B., Celik, Y., Davies, P. L., and I. Braslavsky (2008) Direct Visualization of Spruce Budworm Antifreeze Protein Interacting with Ice Crystals: Basal Plane Affinity Confers Hyperactivity, *Biophys. J.*, **95**, 333–341.
- Scotter, A. J., Marshall, C. B., Graham, L. A., Gilbert, J. A., Garnham, C. P., and P. L. Davies (2006) The Basis for Hyperactivity of Antifreeze Proteins, *Cryobiology*, **53**, 229–239.
- Yang, D. S. C., Sax, M., Chakrabartty, A., and C. L. Hew (1988) Crystal Structure of an Antifreeze Polypeptide and Its Mechanistic Implications, *Nature*, **333**, 232–237.
- Yeh, Y., and R. E. Feeney (1996) Antifreeze Proteins: Structures and Mechanisms of Function, *Chem. Rev.*, **96**, 601–618.
- Zepeda, S., Yokoyama, E., Uda, Y., Katagiri, C., and Y. Furukawa (2008) In Situ Observation of Antifreeze Glycoprotein Kinetics at the Ice Interface Reveals a Two-Step Reversible Adsorption Mechanism, *Cryst. Growth Des.*, **8**, 3666–3672.