



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	不凍糖タンパク質の氷/水界面吸着と結晶成長制御
Author(s)	古川, 義純; Zepeda, Salvador; 宇田, 幸弘 他
Citation	低温科学, 71, 69-79
Issue Date	2013-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/52355
Type	departmental bulletin paper
File Information	LTS71_008.pdf



不凍糖タンパク質の 氷/水界面吸着と結晶成長制御

古川 義純, Salvador Zepeda[†], 宇田 幸弘[¶], 中谷 浩之[§], 中坪 俊一

2013 年 1 月 18 日受付, 2013 年 1 月 21 日受理

寒冷な環境に住む変温動物には、体液を過冷却状態に保ちながら凍結することなく生き延びることが出来るものがある。これは、寒冷な環境になると生体内に生成される特殊な不凍糖タンパク質が、体液中に生成した氷結晶界面に吸着することで、氷の結晶成長を抑制するためである。蛍光分子でラベルした不凍糖タンパク質分子の水溶液を冷却し、その中で氷結晶が成長させることで、タンパク質分子と氷結晶との相互作用をその場観察することが初めて可能となった。本解説では、氷結晶成長界面でのタンパク質の吸着・拡散挙動、結晶成長の抑制との関連、不凍糖タンパク質の界面への 2 段階可逆吸着など、不凍糖タンパク質の凍結抑制機構に迫る最新の成果について紹介する。

Ice/water interface adsorption of antifreeze glycoprotein and its effect for inhibition of ice growth

Yoshinori Furukawa, Salvador Zepeda, Yukihiro Uda, Hiroyuki Nakaya, Shunichi Nakatsubo

In situ observations of ice crystal growth in the supercooled solution of antifreeze glycoprotein (AFGP) labeled by the fluorescent molecule were carried out based on the one-directional growth and free growth methods. Diffusion, adsorption, rejection and incorporation processes of AFGP molecules at/in front of the growing interface were clearly observed even at low concentrations. Analysing the fluorescent intensity distribution on each image, we found that the AFGP adsorption proceeded in two steps, namely from weak to strong adsorption states. Furthermore, the adsorption was reversible even under the strong adsorption state. We introduce the recent experimental results and the new adsorption model of AFGP molecules on ice interface.

1. はじめに

液体の水は、生き物の生命維持にとって必要不可欠な物質である。しかし、氷点下では水は固相の水に変わるため、体温が環境温度に近い変温生物にとっては、その生存を脅かすものに変貌する。たとえば、細胞内の水が完全に凍結すると、その組織は破壊され生物は死滅してしまうはずだ。しかし実際には氷点下の極限環境のなかでも多くの変温生物が凍結することなく、生命活動を維持している (Scholander et al., 1957)。すなわち、これ

らの生き物は進化の過程で、凍結から身を守るための何らかの戦略的なしくみを獲得しているのである。

このしくみのうち最も単純なものは、生体内液体成分の糖や電解質の濃度を高くし、それらのモル濃度に比例して融点が低下するいわゆるモル凝固点降下を利用するものである。すなわち、平衡論的な原理で凍結を防ぐメカニズムで、植物や菌糸類にこの戦略を取るものが多い。一方、液体成分の融点を変化させることなく、冷却されても過冷却状態を維持したまま、凍結することなく生命活動を維持する生き物もある。これらの生き物は、どのような戦略で凍結を防いでいるのであろうか。すなわち、これらの生き物は、「自身の生体内で“氷結晶の成長を制御する機能”を持つ特殊なタンパク質を生成し、それらが氷結晶と水の界面に吸着することで氷結晶の成長を物理的に阻止する」という驚くべきしくみを獲得しているのである (Davis and Hew, 1990)。このようなしくみは、海水で覆われた極海に住む魚 (Yeh and Feeney, 1996) や寒冷圏に住む陸生昆虫 (Graham et

北海道大学低温科学研究所

[†] 現所属: CCZ Crystal R&D, MEMC Electronic Materials, Inc.

[¶] 現所属: 住友化学株式会社

[§] 現所属: 三菱化学株式会社

Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University

E-mail: frkw@lowtem.hokudai.ac.jp

al., 1997; Liou et al., 2000), 植物 (Atici et al., 2003), バクテリア (Gilbert et al., 2004; Kawahara et al., 2007) などで, 普遍的に見られることが明らかになっており, それぞれ多くの種類のタンパク質が同定されている. この現象は, 氷の界面構造や結晶成長機構, そしてタンパク質の氷結晶との相互作用などさまざまな素過程が複雑に絡み合って起きるものであり, まさに非平衡論的な原理を生き物がうまく利用している典型的な例と言える.

このような特徴を持つタンパク質分子そのものの構造や機能についての研究は生物学や化学の分野で極めて盛んであるが, その一方で氷/水界面でのタンパク質分子の挙動や氷の結晶成長を制御する物理的なしくみについては, 未解明な部分が多い. その大きな理由は, 氷/水界面で起きる, タンパク分子が関与したダイナミックな結晶化の過程を直接観察することが困難であったためと考えられる. 一方で, 生物実験などではタンパク質分子に蛍光分子をラベルとして付けることで, 蛍光顕微鏡などによりタンパク質分子の局所的な分布状況から分子1個1個の挙動に至るまでを, 直接観察する実験手法が活用されている. 我々は, この手法を氷の結晶成長実験に導入し, 結晶成長に伴う界面でのタンパク質の挙動をその場観察してきた. この解説では, タンパク質分子への蛍光ラベル法で可能となった氷の成長特性とタンパク質の成長界面での挙動に関する最新の実験成果を取りまとめて, 生体の凍結抑制機構の理解がどこまで進んだかを紹介する.

2. 不凍(糖)タンパク質とその機能の特徴

最初に, 生体の凍結を抑制する機能を持つタンパク質について, その特徴と機能をまとめておこう.

このような機能性タンパク質が最初に発見されたのは, 極地の海水下から採取された魚の血液中であった (DeVries and Wohlschlag, 1969). 一般に魚の血液は約1.5%の塩分を含むが, 海水の塩濃度(3%)よりも低く, 融点はそれぞれ -0.9°C と -1.9°C となる. 変温動物である魚の体温は環境相の温度(すなわち, 海水の融点)に一致するので, 海水下に住む魚の血液温度は, 約1 Kの過冷却状態におかれることになるが, 血液が凍結してしまうことは無い. このような魚から採取した血液中から, いくつかの特殊なタンパク質が同定され, それらの存在が凍結抑制と密接に関連することが明らかになっている.

これらのタンパク質は, 糖鎖を持つ構造のものと持たない構造のものが同定され, それぞれ不凍糖タンパク質 (Antifreeze glycoprotein; AFGP) と不凍タンパク質 (Antifreeze protein; AFP) と呼ばれている. 前者は, アラニン-アラニン-スレオニン (Ala-Ala-Thr) のト

リペプチドに糖鎖が結合した糖ペプチドを1ユニットとし, それが4~52個も連なったひも状構造を持つ(図1). 分子量はユニット数に応じて2.6~33 kDaで, 分子量の大きいものから順に8つのタイプ (AFGP1~8) に分けられている (DeVries et al., 1970). 水中での分子の2次構造は, 拡張ランダムコイル状 (Extended random coil) が基本で柔軟性が高い (Lane et al., 2000). 後者は, それぞれ大きく異なる構造をもつ3種類が同定されており, それぞれ AFP Type I~III と呼ばれている (Yeh and Feeney, 1996).

この機能性タンパク質による凍結抑制の原理は, 基本的に氷結晶の核生成を抑制するのか, あるいは結晶の成長を抑制するのかのいずれかに関連していることは, 説明を要さない. 我々は, 上記の4つのタイプの不凍(糖)タンパク質(今後はAF(G)Pと表記)を使って, 氷の結晶成長実験を行っている. 本稿では混乱を避けるために, 不凍糖タンパク質(今後はAFGPと表記)の場合に限定して解説する. まず, AFGPの関与する氷結晶の成長について, 明らかになっている点について簡単にまとめておこう (Yeh and Feeney, 1996; 古川ほか, 2010). ここに述べる特徴は, AFPにおいても同様に観察されることを注意したい.

- (1) AFGP水溶液を容器に入れて, 平衡を保ちながらゆっくり冷却するとき起きる現象を, 図2(a)に示す温度変化に沿って思考実験してみる. 水溶液の温度が, 水の融点($T_e = 0^{\circ}\text{C}$)以下になると氷の微結晶が発生する. 本来, モル凝固点降下により融点は 0°C より低いはずだが, 容質の分子量が大きいので水溶液のモル濃度は極めて小さくなり, この効果は無視して良い. 温度が T_e 以下の過冷却状態になると, 水溶液中には氷微結晶が生成されるが, それらは水溶液中に安定して存在するだけで, すぐには成長を継続しない. 温度がさらに下がり, ある臨界温度(すなわち, 凍結温度 T_f)に達すると氷結晶は突然成長を開始する. 一方, T_f 以下では水溶液

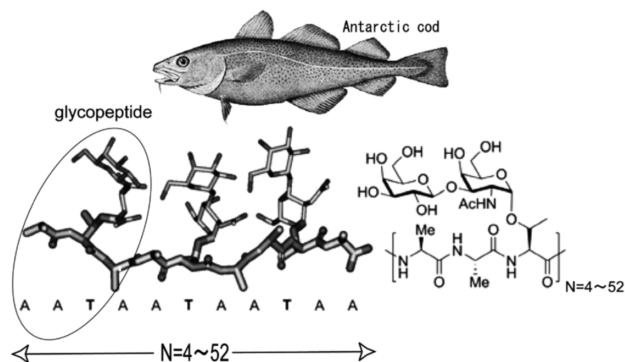


図1 AFGPを含む南極タラ(上図)とAFGPの分子構造(下図). だ円で囲ったポリペプチドを1ユニットとして, 4~52ユニットがひも状に連なっている.

は完全に凍結するが、この状態から温度を上昇させても、もとの融点である T_e に達するまで融解を開始しない。すなわち、AFGP が存在する場合には、 $T_f < T_e$ となり、両者の温度差 ΔT ($= T_e - T_f$) を熱ヒステリシスと呼ぶ。 ΔT の大きさは、AFGP 濃度に依存し、モル凝固点降下で予測される融点低下の 500 倍以上の大きさに達する。すなわち、AFGP の機能は、氷結晶の核生成に対する効果ではなく結晶成長に対する効果である。

- (2) ΔT の温度範囲にあるタンパク質水溶液中の氷結晶の形状は、氷の c 軸方向に伸びた重六角錐 (hexagonal bipyramid) である (図 2(a))。一般に、結晶の外形は、成長速度の速い面から消失し、最終的に最も成長速度の遅い結晶面で囲まれるので、重六角錐の稜面が最も成長速度の遅い面となる。一方、 ΔT より過冷却度大きくなると氷結晶は成長を開始し、その成長形はタンパク質濃度に大きく依存する (Harrison et al., 1987)。図 3 は、AFGP 水溶液中で成長する氷結晶の写真である。純水中では、平らなベーサル面で挟まれた薄い円盤状の結晶形であるが、AFGP がわずかに含まれるだけでも平らなプリズム面が現れ、六角板結晶となる。濃度上昇とともに徐々に c 軸方向に伸びた多面体の成長形となり、さらに高濃度では針状結晶が生成される。この

ような成長形の濃度依存性は、AFGP により氷のプリズム面は成長抑制、ベーサル面では逆に成長促進が起きていることを示唆している。すなわち、AFGP の効果は異方性が強い。

- (3) AFGP による結晶成長の抑制機構として、界面吸着した分子による界面 (あるいは、成長ステップ) のピン止め効果が提案されている (Raymond and DeVries, 1977; Knight and DeVries, 1989)。図 2(b) は、ピン止め効果による界面の局所形状の温度変化を示す模式図である。吸着した AFGP 分子は界面の移動をピン止めするので、隣接した分子の間の界面は前方 (融液側) に出っ張り、曲率を生じるため界面の融点は低下する (Gibbs-Thomson 効果)。界面が前進すると曲率が増加し、それとともに局所界面融点は低下する。やがて、その融点が環境相の温度と一致すると、それ以上の界面の前進は抑制される (Wen and Laursen, 1993; Sichheri and Yang, 1995)。 T_e と T_f の間ではこの機構で成長が抑制されるが、 T_f では界面の局所曲率半径は吸着分子間隔の 1/2 に一致するため、界面はピン止めされた点をすり抜けることが可能となり、この機構はもはや有効ではなくなる。このため、この温度以下では、氷結晶の成長が開始し、吸着した AFGP 分子は結晶内に取り込まれるであろう (Knight et al., 2001)。

AFGP の氷結晶成長に対する効果は、以上のように極めて興味深い特性をもつ。しかし、AFGP 分子がどのような界面吸着特性を示し、それが結晶の成長をいかにして抑制しているのかは、直接実験的に確認することは、困難である。このため、吸着分子のピン止め機構で氷結晶の成長が実際に抑制されているのかどうかについても、十分な証明がされているとは言い難い。その要因

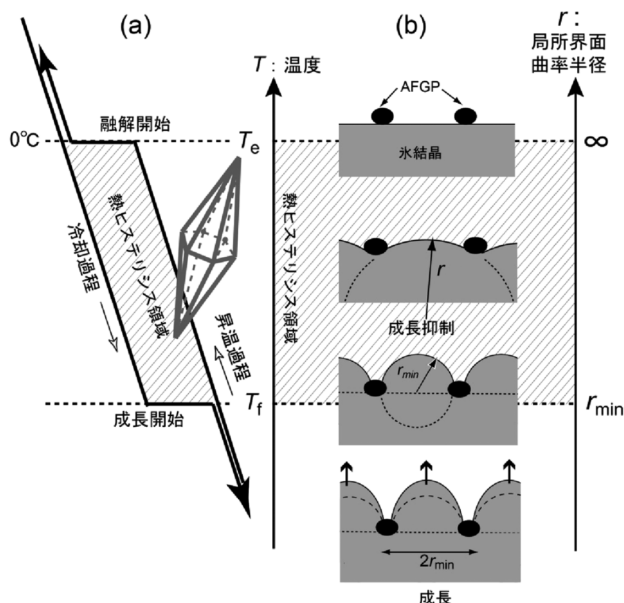


図 2 (a)熱ヒステリシスを示す模式図。この領域では、氷結晶は重六角錐の形状で存在するが、成長は完全に抑制されている。(b)氷結晶の成長抑制を説明する Gibbs-Thomson モデル。吸着した AFGP 分子により、界面の成長がピン止めされる。このため、分子間の氷界面は前方に凸の曲率半径 r を持つ球面となり、界面の融点は Gibbs-Thomson 効果により、バルクの融点 (T_e) より低下する。温度がさらに低下し、 r が AFGP の分子間距離の半分 (r_{min}) より小さくなると、ピン止め効果が消失して界面は成長を開始する。したがって、結晶成長抑制の最大の過冷却度温度は、 $r = r_{min}$ となる温度で、 $\Delta T = T_e - T_f$ が熱ヒステリシスの大きさになる。

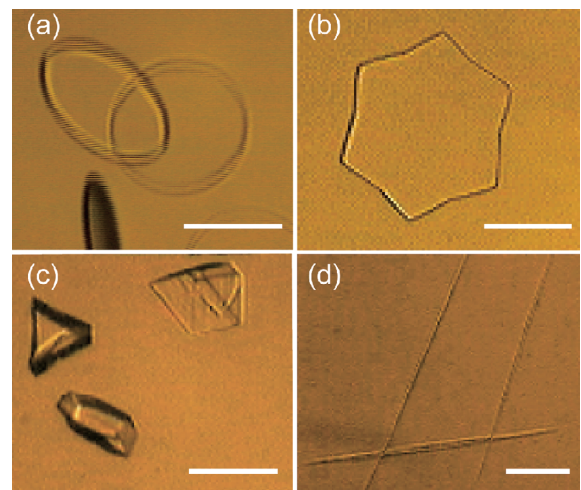


図 3 AFGP 水溶液中で成長した氷結晶。(a)~(d)は、それぞれ AFGP 濃度が 0, 0.01, 0.2, 5 mg/ml に対応する。スケールバーは、すべて 500 μm 。

は、この分野の研究がタンパク質科学や生化学的視点でなされることが多く、界面科学や結晶成長学などの物理的視点に欠けていたこと (Knight, 2000)、さらに氷/水界面及びその近傍でのタンパク質分子の挙動を直接観察する手法が乏しいことにある。我々は、この点に注目して、AFGP の氷結晶成長の制御機構を解明することを目指して、物理的視点での研究を行ってきた。次章以下では、二つの異なる結晶成長手法（一方向成長法と自由成長法）と蛍光ラベル法によるタンパク質分子の可視化手法とを組み合わせ実施した実験的研究の成果について、その概要を紹介する (Zepeda et al., 2008a)。

3. 一方向成長法による氷成長界面近傍での不凍糖タンパク質の拡散

3.1 一方向成長法

一方向成長法は、空間に固定した温度勾配を作り、その勾配に沿った方向に薄膜状の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ある (Nagashima and Furukawa, 1997a; 1997b; 2000)。実験システムの模式図を、図 4 に示す。2つの銅ブロックを 10 mm の間隔をおいて水平に並べ、スライドガラス 2 枚を 50~100 μm の隙間を空けて重ね合わせた結晶成長セルに AFGP 水溶液を充填し、両ブロックを跨ぐように置く。両ブロックは、ペルチエ素子によって独立に温度制御され、低温側ブロックの温度 (T_L) と高温側ブロックの温度 (T_H) を一定に保つと、両者の隙間にかかる成長セル内には直線的な温度勾配が生じる。この時、 T_L を水溶液の融点以下、 T_H を融点以上にすると、成長セル内の低温側の水溶液は結晶化し、セルの温

度がちょうど融点に一致するに位置に固液界面が形成される。この様な状況で、結晶成長セルを高温側から低温側に一定速度で強制的に移動させる。この結果、界面ではセルの移動とは反対方向への結晶成長が強制されることになり、界面の位置は見掛け上同じ位置に留まる。すなわち、この結晶成長法では、結晶成長セルの移動速度を変えることで、成長速度を実験パラメーターとして制御できる。このことは、他の成長法では実現すること不可能な大きな特徴である。さらに成長界面が見掛け上同じ位置に留まるので、界面やその近傍で起きる現象の時間経過をその場観察するために好都合である。

この装置で氷の結晶成長実験を行い、AFGP 分子の界面と界面近傍での挙動をその場観察するため、蛍光分子である FITC (Fluorescein isothiocyanate isomer-I) でラベルした AFGP 分子を使った。この実験システムは、透過型位相差蛍光顕微鏡のステージに設置され、位相差画像と蛍光画像を切り替えながら、氷の結晶成長過程を観察した (Zepeda et al., 2007)。

3.2 成長界面に吸着した AFGP の可逆離脱と拡散

図 5 は、成長セルを一定速度 (5 $\mu\text{m/s}$) で移動させた場合の、氷界面周囲の位相差画像と蛍光画像の一例を示す。水溶液の初期濃度は 0.1 mg/ml (重量比では、0.01 wt% に相当する) である。位相差画像 (図 5 (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、同じ画面の蛍光画像 (図 5 (b)) では、界面をはさんで水溶液側と結晶側ではコントラストが大きく異なる。図に示す白枠内で界面に直交する方向 (X 方向) での蛍光強度分布を見ると、結晶内では蛍光は検出されないが、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

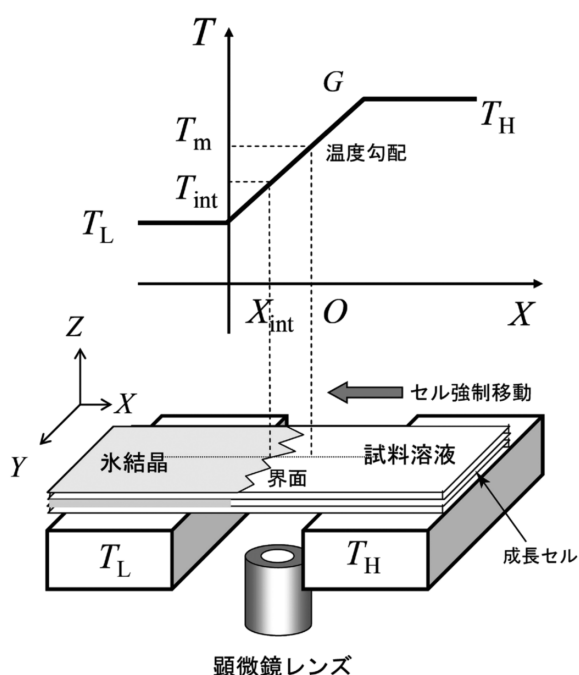


図 4 氷結晶の一方向成長実験装置の模式図。

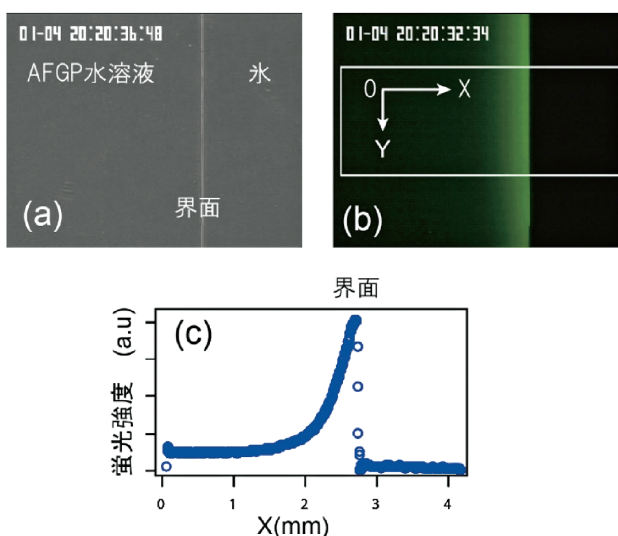


図 5 一方向成長している界面前方で観察された蛍光強度分布。AFGP の初期濃度、0.1 mg/ml。成長速度 5 $\mu\text{m/s}$ 。(a) 位相差顕微鏡画像、(b) 蛍光顕微鏡画像、(c) 蛍光画像に示された白枠矩形領域の中でもとめた X 方向蛍光強度分布。蛍光強度は、矩形の Y 軸方向に積分した値である。

たがって指数関数的に減衰する (図 5(c)). この場合, 結晶セルは薄膜状であるため, 観察された蛍光強度は蛍光分子の空間数密度 (AFGP 濃度) に比例する. すなわち, 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. また, 氷結晶側では蛍光強度がゼロであったことは, 氷結晶の成長に伴って結晶内部へ AFGP 分子が取り込まれることはないことを示す, 直接的な証拠と言えよう.

さらに, 成長を継続させると拡散場は定常状態に達するが, この状態でセルの移動を突然停止すると, 界面前方の拡散場は時間と共に減衰する. 図 6 は, 界面前方の AFGP 濃度分布の時間経過を示している. 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がまず注目される. 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 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, この流入は界面に吸着していた AFGP 分子が離脱することによって生じる. また, 界面において蛍光強度の鋭いピークが観察されるが, これも界面に AFGP の吸着層が存在することを示唆している. すなわち, これらの観察結果は, 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することを意味している.

また, 界面前方に観察される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ことが出来る. この方法で求めた拡散係数は, $(1.0 \pm 0.1) \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$ となり, NMR (Nuclear Magnetic Resonance) で測定された拡散係数 (Krishnan et al., 2004) の値 ($0.9 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$) とよく一致する.

3.3 成長界面のパターン形成と AFGP の分布

一方, 成長セルの移動速度を上昇させると, 界面は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 (Furukawa et al., 2005). 最終的に, 界面形状は, 図 7(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

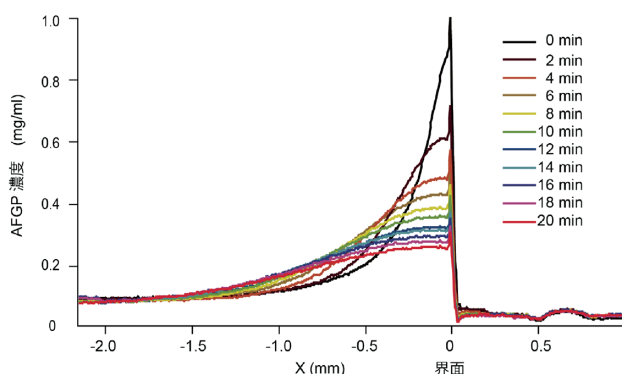


図 6 一方向成長で成長を停止した界面からの AFGP 分子の離脱, 拡散の時間変化 (0 分から 20 分まで, 2 分ごとにプロット). 拡散場は, 単純な指数関数的な濃度分布ではない. これは, 界面に吸着した AFGP 分子が定常的に離脱していることを示している.

果 (図 7(c)) は, 界面が平らな場合に較べて拡散場の発達大幅に抑制されている. 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 7(d)) では, 結晶格子内には AFGP は取り込まれず, 粒界面に蓄積されたことを示している.

これらの観察結果は, 氷結晶成長に伴い, AFGP は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が, 結晶粒界が生じると, 粒界に AFGP が濃縮されて取りこまれるため, 成長界面前方の拡散場の発達は抑制されることを示唆している.

4. 自由成長法により観察された不凍糖タンパク質の界面吸着と結晶成長抑制

4.1 自由成長法

一方, 自由成長法では, 一様に過冷却した水溶液中で 1 個だけの氷単結晶を成長させる. 前章と同じように, 結晶成長の母液として蛍光分子でラベルした AFGP 水溶液を使用した. この方法では, 水溶液中で一様に分散していた AFGP 分子が, 氷/水界面や結晶内部に再配分される過程と, それが結晶の成長速度や形態にどのように関連しているかを観察できる.

実験装置は, 銅ブロックをくりぬいて作製した円筒型の成長セル (直径 20 mm, 奥行 10 mm) に, 外部からセルの中心部までガラス毛細管を挿入した単純な構造である. 毛細管は, ホルダーにより軸の周りに自由に回転できる. 成長セルと毛細管に充てんされた水溶液は, 銅ブロックに取り付けたペルチエ素子で冷却され, $\pm 5 \text{mK}$ の精度で安定した過冷却状態を作り出すことができる (Zepeda et al., 2009).

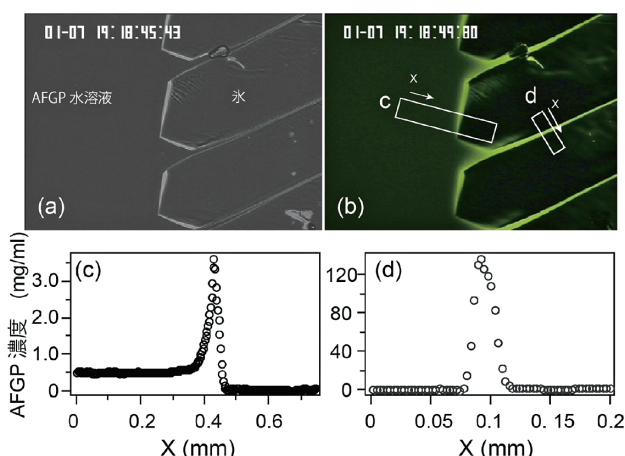


図 7 成長速度が大きくなると, 一方向成長界面では形態不安定化が発生し, やがて周期的なジグザグパターンで定常状態に達する. このとき, AFGP は, 結晶の粒界に取り込まれるため, 形態不安定化前の平らな界面に較べて, 界面前方の AFGP 拡散場の発達が抑制される. (a)位相差顕微鏡画像, (b)蛍光顕微鏡画像, (c)蛍光顕微鏡画像の矩形枠 c に対して測定された蛍光強度分布から求めた AFGP 濃度分布. (d)同じく, 矩形枠 d における濃度分布.

実験手順は、以下のとおりである。まず AFGP 水溶液全体が所定の過冷却温度に到達したら、成長セルの外側に突き出した毛細管の端を急冷して水を核生成させる。生成された結晶粒は、毛細管内部で軸方向に成長を継続するが、水の成長速度の異方性から、軸に沿った成長速度の速い結晶粒ほど前方に突出するので、結果的に結晶粒の取捨選択が進行する。このようにして、最終的に1個の結晶粒のみが生き残り、その結晶粒が毛細管先端に達すると、成長セルの中で氷単結晶が自由成長を開始する。氷結晶は、c 軸に直交する向き (a 軸方向) の成長速度が速いので、生き残った結晶粒は、その c 軸が毛細管の軸に直交する確率が高くなる。すなわち、毛細管内での成長により、結晶粒の数と結晶の向きが自動的に制御される。

結晶成長の観察には、スペクトラム共焦点顕微鏡を使った。この顕微鏡は、レーザー光の焦点を走査させて観察体の三次元画像を取得するものであるが、本実験では、時間分解能を向上させるために二次元平面内の走査に固定して観察を行った。FITC の励起波長のレーザー光を光源として照射し、その蛍光波長 (520 nm) でイメージングすることで、観察面内の蛍光強度分布の画像を取得することができる。

4.2 氷結晶の自由成長と AFGP の分布

図 8(a)は、過冷却状態にある AFGP 水溶液中で、毛

細管の先端から自由成長する氷単結晶の蛍光画像である。この場合の成長条件は、水溶液の初期過冷却度は、0.05 K (実際の温度が -0.05°C)、及び AFGP の初期濃度は $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ (すなわち、0.0005 wt%) であった。毛細管の先端に六角形の薄い板状結晶が観察される。図 8(b)は、毛細管を 90° 回転して氷結晶の断面を観察した明視野画像であるが、結晶の厚みがおおよそ $40\text{ }\mu\text{m}$ であることが分かる。純水や塩などの無機分子の水溶液の中で成長する氷結晶では、図 8(c)に示すようにプリズム面が平らな面として観察されることは無い (Yokoyama et al., 2011) ので、このような六角板状結晶が観察されたことは AFGP の結晶形に対する効果が低濃度であっても極めて大きいことを示している。

図 9 は、この六角板結晶の成長過程を示す連続写真である。結晶のプリズム面 (六角板の側面) に注目すると、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が分かる。また、成長停止した界面では、界面に沿って強い蛍光の輝線が観察されるが、成長中の界面では観察されない。この輝線は、氷/水界面に吸着した AFGP 分子によって生じたものであると考えられる。すなわち、この画像は、AFGP 分子の氷/水界面への選択的な吸着が結晶成長の抑制を引き起こすことを、初めて実験的に証明したことになる。

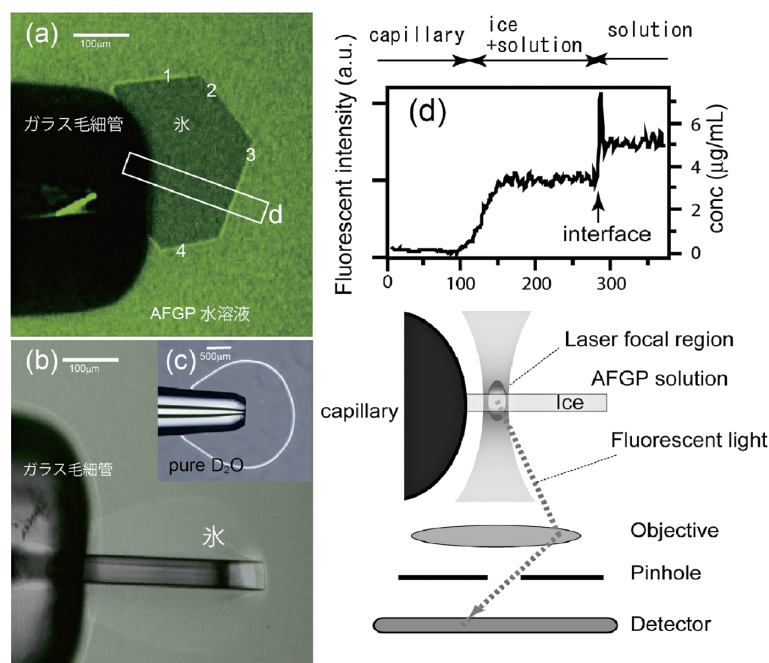


図 8 (a) AFGP 水溶液中で自由成長により得られた氷結晶の共焦点蛍光画像。界面 2 は成長を継続しているが、界面 1, 3, 4 は成長が停止している。(b)氷結晶をガラス毛細管の周りに 90° 回転して、横方向から観察した共焦点明視野画像。(c)同じ過冷却度の純水の中で成長した薄い円盤状の氷結晶。(d)共焦点蛍光画像に示す矩形枠 d の短軸方向で積算した蛍光強度を長軸方向にプロットしたもの。左縦軸は蛍光強度であるが、AFGP の濃度に換算可能で、右縦軸にプロットした。界面位置に鋭い蛍光強度のピークが観察される。このピークは成長を継続している界面では観察されない。右下の図は、共焦点顕微鏡の光学系を示す模式図で、結晶を含む約 $100\text{ }\mu\text{m}$ のスライス面からの蛍光だけを検出できる。

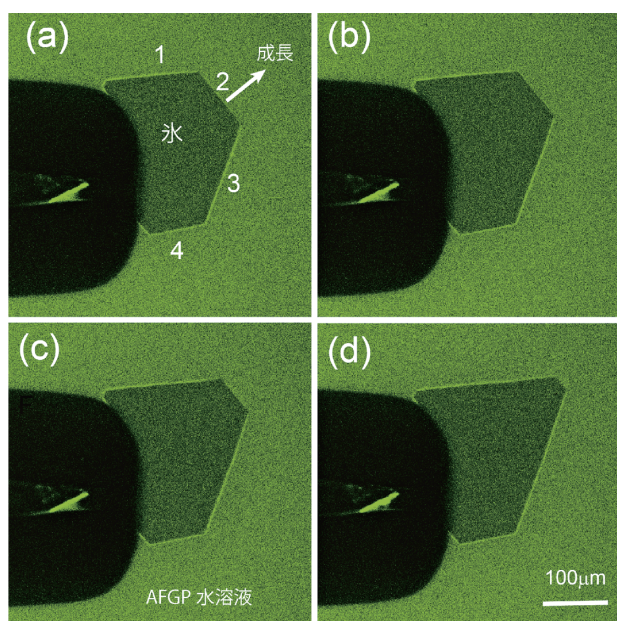


図9 図8で示した同じ氷結晶の成長過程を示す。各写真は、約2秒間隔。界面2は成長を継続しているが、界面1, 3, 4は成長が完全に停止している。これらの面に沿って、蛍光の明るい輝線が観察される。

4.3 AFGP 分子の界面吸着密度の推定

これらの蛍光画像は、共焦点型の顕微鏡で得られたものである。共焦点顕微鏡の焦点深度はおよそ $100\ \mu\text{m}$ である（図8右下）ので、一枚の2次元画像で示される蛍光強度は、試料をこの厚みでスライスした薄膜の中に分布する蛍光分子の空間数密度に比例する。したがって、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 の濃度分布を推定することが可能である。たとえば、図8(a)に示された矩形領域dについて、図8(d)のような蛍光強度分布が得られた。毛細管の領域（左端）と水溶液の領域（右端）では、AFGP 濃度が明らかなので、縦軸の蛍光強度を濃度に変換することが可能である。中央部の結晶領域については、焦点深度（ $100\ \mu\text{m}$ ）内に氷結晶（厚さ $40\ \mu\text{m}$ ）と水溶液（ $60\ \mu\text{m}$ ）の両方が含まれる。結晶を毛細管の周りに90度回転させて蛍光強度を測定すると、氷結晶内部では蛍光が全く観察されないことが確認されており、結晶内の AFGP 濃度はゼロであることが保証される。したがって、この領域で測定された蛍光強度はすべて水溶液中にある AFGP からの寄与である。実際にこの領域で観察された蛍光強度は、水溶液のみの場所の蛍光強度のおよそ60%の強度である。

一方、図8(d)に示すように、成長が停止した界面において観察される蛍光の輝線に対応する蛍光強度ピークは、六角板結晶の側面（プリズム面）に吸着した AFGP 分子からの寄与を反映している。結晶の厚み（ $40\ \mu\text{m}$ ）から側面の面積を計算できるので、この側面への AFGP 分子の吸着分子数を推定することが可能である。その結果、側面に吸着した AFGP 分子の吸着間

隔は、 $d=21\pm 4\ \text{nm}$ と計算された。AFGP 分子1個の大きさはおおよそ $3\ \text{nm}$ であるので、この面の AFGP 分子による被覆率は、10%以下に過ぎない。また、この値は、Pertaya et al. (2007; 2008) が求めた AFP 水溶液（濃度が $0.3\text{--}3\ \text{mg/ml}$ ）中での、氷/水界面への AFP 分子の吸着間隔 $d=20\pm 5\ \text{nm}$ と数値的には一致する。しかしながら、水溶液濃度は両者でおおよそ200倍もの差があることに注意が必要である。すなわち、我々の解析結果は、水溶液中の AFGP 濃度が極めて低い場合でも、結晶成長により界面に濃縮されて、高濃度の分子吸着が生じることを示している。このことは、一方向成長で観察された界面吸着とも一致する。

4.4 界面吸着した AFGP 分子の再離脱

一方向成長実験では、結晶の成長が停止すると界面に吸着していた AFGP 分子は離脱し、水溶液中に再拡散することが示された。自由成長では、界面に吸着した AFGP 分子は、そのままで安定してその状態を保つのであろうか？ 図9で示した氷結晶の成長過程で、注目すべきもう一つの現象が観察された。結晶成長を継続している界面2は、成長が停止した界面1と3に挟まれているので、図9の連続写真に示すように成長とともに徐々に縮小していく。図10はそのあとに観察された成長過程の連続写真を示す。界面2が消失した瞬間（図10(a)）に、先端部から界面3の上を新しい成長ステップが移動

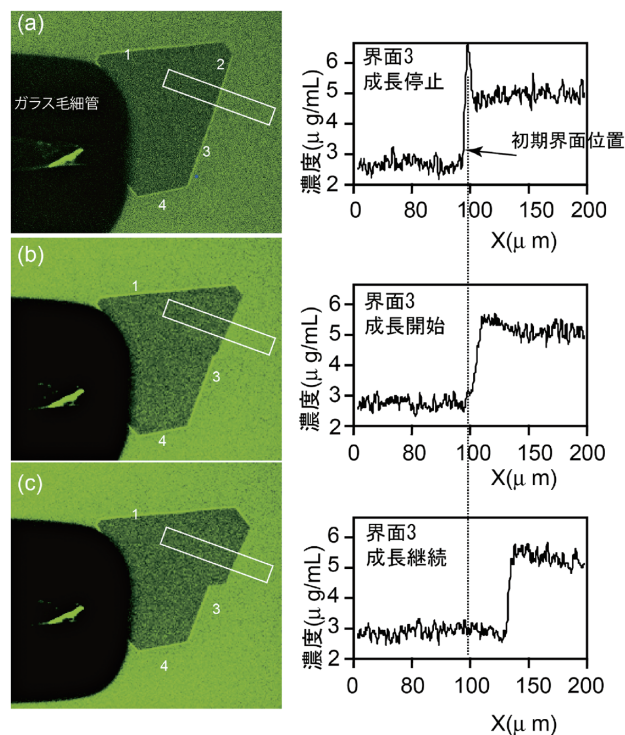


図10 図9で示した氷結晶の成長のその後を示す連続写真と各画像の矩形枠内での AFGP 濃度分布の解析結果。画像の間隔は約2秒。界面2が消失すると同時に、それまで停止していた界面3の上に成長ステップが観察され、そのまま成長を継続した。同時に、界面に吸着していた AFGP 分子は離脱し、水溶液中に再拡散する。この過程は、界面近傍の AFGP 濃度分布の経過にも明確に観察される。

するのが観察され、そのまま成長が再開した(図10(b)). 界面3の成長開始と同時に界面に沿った蛍光輝線も消失した. 図10右側には、写真に示した白枠内での蛍光強度分布から計算されたAFGP濃度の分布が示されている. 成長が停止している時には、明確に界面にピークが見られるが、成長が再開した瞬間に消失した. 界面から水溶液に向かってわずかではあるが濃度が指数関数的に減衰する様子も観察された(図10(c)). すなわち、界面から離脱したAFGP分子は、水溶液側に再拡散する.

この結果は、結晶成長の抑制が、AFGP分子の界面への非可逆的な強い吸着によって引き起こされるという従来の予測とは大きく異なり、吸着していたAFGP分子は成長ステップ移動などで簡単に離脱可能であることを示すものである.

5. 不凍糖タンパク質分子の界面吸着と結晶成長抑制機構

5.1 Gibbs-Thomson モデルは有効か?

図2で示したような「界面に吸着したAFGP分子が界面の移動をピン止めすることにより生じる界面融点の低下(Gibbs-Thomson 効果)に起因して結晶成長が抑制される」という古典的モデルの有効性について、最初に考えてみよう.

4.3節で求められた、プリズム面におけるAFGP分子の吸着間隔から、逆にGibbs-Thomson 効果による界面の局所温度低下を計算すると、 $\Delta T=6\text{ K}$ と見積もられる. この値は、水溶液の過冷却温度 0.05 K とは一致しない. また、Gibbs-Thomson 効果が作用するとともにと平らであった界面が荒れて、凸凹の多いラフ面に変化するのが通常である. しかしながら、氷の結晶界面では、AFGPの作用によって逆の変化、すなわちラフな面が平らな界面への変化が観察された. これらの事実から、従来のモデルでは、AFGPの凍結抑制効果を説明することは、もはや困難であるといえるであろう.

5.2 AFGP 分子の2段階可逆吸着モデル

これらの実験で観察されたAFGP分子の氷/水界面への吸着特性から、界面へのAFGP分子の新しい吸着モデルを提案しよう.

まず、面の成長が継続して水界面に蛍光のピークが見られない状況であっても、側面は平らなファセット面として観察される. 純水中では、この面はファセット面として観察されることはないの、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、いわゆるラングミュアタイプの吸着が起きていると予測される. 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.

い.

一方、界面の成長が停止した場合のAFGP分子の吸着間隔は、およそ 21 nm であった. しかし、この時の水溶液温度は -0.05°C であるので、界面の温度も同じであるとすれば、ギブス・トムソン効果で予想される界面吸着間隔は、約 $2\text{ }\mu\text{m}$ となる. したがって、Gibbs-Thomson 効果を援用すれば、吸着したAFGP分子のごく一部がピン止め効果として作用すれば、十分に氷結晶の成長抑制が作用することになる. すなわち、界面にあるAFGP分子には、ピン止め点として作用する“強い吸着状態”のものとピン止め効果が作用しない“弱い吸着状態”のものが存在することを意味している. さらに、弱い吸着状態のAFGP分子は、脱着が容易であり、結晶成長が再開するとこれらの分子は結晶内に取り込まれることはなく簡単に離脱して、水溶液中に再拡散することができる. この様な考察は、一方向成長で観察されたAFGPの拡散場の挙動とも一致する. 我々は、このような特徴的なAFGP分子の水界面吸着を“二段階可逆吸着(2-step reversible adsorption)”と呼んでいる.

5.3 界面に吸着したAFGP 分子の二次構造変化

AFGP分子の二段階可逆吸着とは、具体的にどのようなものであろうか? その回答の一つとして、氷結晶界面に吸着状態にあるAFGP分子の二次構造の変化を解析した実験(Uda et al., 2007)について最後に紹介する.

水溶液中でのAFGP分子は、いわゆる拡張ランダムコイルと呼ばれる二次構造(conformation)を持つことがNMR解析で明らかになっている. しかし、この様な構造の分子が氷/水界面に吸着しても、氷結晶格子との適合性が悪く、簡単には強い吸着を実現することはできない. したがって、界面に吸着したAFGP分子が実際にはどのような二次構造を取るのかが重要なヒントを与えると考えられる.

このため、我々はATR (Attenuated Total Reflection) 法により、氷界面に吸着した状態にあるAFGP分子のフーリエ変換赤外分光(Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy)を試みた. ATR法とは、赤外波長に透明な材料(ZiSe)で作製したATRプリズムの界面で赤外線を全反射させるとき、反射面後方に生じるエバネセント光(evanescent light)をプローブとして使う手法である. 図11に示すように、このプリズムの反射面にAFGP水溶液の薄膜を試料として置き、薄膜試料が液相の場合(a)と固相の場合(b)について、解析を行った. この測定では、アミノ酸分子と H_2O 分子からのスペクトル波長域の重なりを避けるため、溶媒として重水(D_2O)を使った. これによって、アミノ酸分子に敏感な波長域のFTIRスペクトルを独立に取得でき、AFGP分子の二次構造についての情報を得ることがで

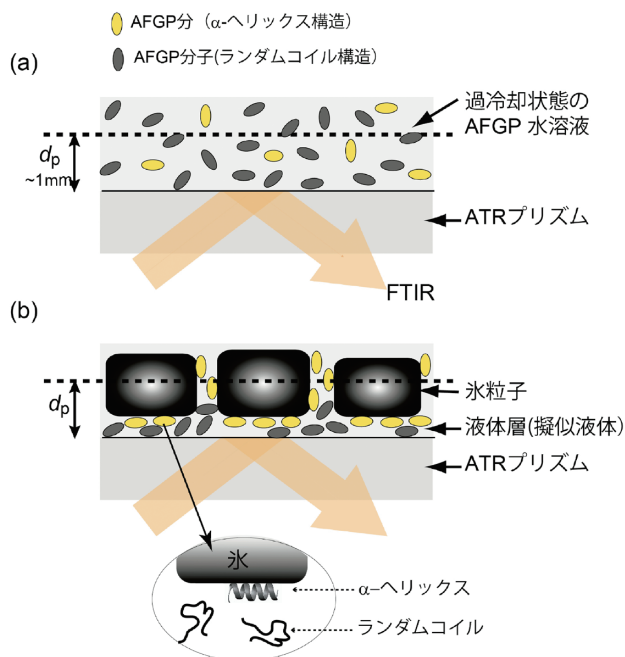


図 11 ATR プリズム表面近傍での薄膜試料の内部構造を示す模式図。(a)は水溶液が凍結する前で、AFGP は一様に分布している。(b)は凍結後の試料の構造。擬似液体層中に AFGP が濃縮されている。氷界面に吸着した AFGP 分子は、 α -ヘリックス構造をとる (下部の界面拡大図参照)。 d_p はエバネセント光の浸出深さで、およそ $1 \mu\text{m}$ 。

きる。

図 12 (a)は、FTIR スペクトルの温度変化を示す。室温から温度をゆっくり低下させると、 -15°C で D_2O 分子の O-D 伸縮振動バンドのピーク波数がシフトするとともに、スペクトル形状も変化した。これは、 D_2O が液相から固相へと変化したことを意味している。このスペクトルを詳細に解析すると、固相試料には一部液相のままで残留する D_2O が存在する、これは氷結晶とプリズムとの界面、及び氷結晶粒界に残った擬似液体層に対応すると考えられる。すなわち、試料の状況は、図 11 (b)に示すように、氷粒子と粒界に残存する擬似液体層とが共存している (Sadchenko and Ewing, 2002)。

一方、アミノ酸に敏感な吸収バンドである $1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ に現れるアミド I バンド (C-O 伸縮バンド) に注目すると、図 12 (b)及び(c)に示すように、試料が液相と固相の場合でスペクトルに明確な変化が観察される。このスペクトルを、AFGP 分子で予測されるさまざまなタイプの二次構造ユニットに対応するスペクトルピークに対して、逆たたみ込み解析 (deconvolution) した結果が黒の実線で示される。それぞれの相対ピーク積分面積は、その二次構造を持つ AFGP 分子の数分率に比例する。この解析の結果、試料が液相から固相に変化すると、特に α -ヘリックス構造のコンポーネントが顕著に増加することが見出された。この増加分は、図 11 (b)に模式的に示されるように、氷粒子本体には取りこまれず擬似液体層の中に凝縮された AFGP 分子の一部が、氷/水界面に吸着して α -ヘリックス構造に変化

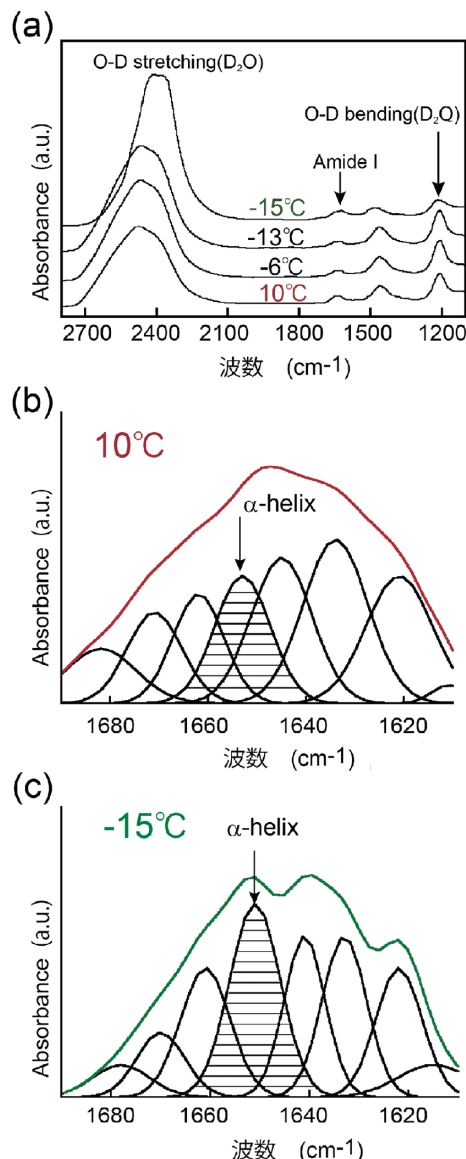


図 12 (a) AFGP 水溶液薄膜から得られた FTIR スペクトルの温度変化。(b)および(c)は、Amide I バンドの吸収スペクトル (それぞれ、赤線と緑線) と、それを各二次構造に対応する波数で分解した結果 (黒の実線)。それぞれ、液相状態と固相状態の試料に対応する。ハッチングを入れたピークは、 α -ヘリックス構造の AFGP に対応し、試料が固相の時その配分比が顕著に上昇することが分かる。

したために生じたと考えられる。AFGP 分子は、界面に吸着しても拡張ランダムコイル状態のままでは、分子周期性と氷結晶格子の周期性のマッチングが悪く、吸着力も弱い。しかし、吸着した AFGP 分子がその二次構造を変化させて、周期性が高い α -ヘリックス構造に変化すると、氷結晶格子とのマッチングが良くなるため、より強い吸着状態が実現する。すなわち、AFGP 分子は、弱い吸着から強い吸着へと二段階で吸着状態が変化する。弱い吸着状態の AFGP 分子は、可逆的に界面からの着脱が可能である。

以上のことから推論すれば、界面に弱く吸着した

AFGP 分子のごく一部が, その二次構造を変化させることで, 強い吸着状態を実現する. この変化を実現した AFGP 分子だけが界面の移動をピン止めし, Gibbs-Thomson 効果の助けを借りて結晶成長の抑制を実現しているという描像を描くことができる. 氷/水界面への α -ヘリックス構造を持つタンパク質分子 (AFP Type I) が界面移動のピン止め点として作用することは, 計算機シミュレーションでも証明されている (Nada and Furukawa, 2008; 2011).

6. 終わりに

AFGP 分子に蛍光分子でラベルを付けることによって, 一様な濃度の水溶液から氷結晶が成長する際に, 結晶の成長界面近傍で分子がどのように再分布されるのかを, 初めて可視化することが可能となった. これによって, AFGP の凍結抑制効果のメカニズムについて, さまざまなことが明らかになりつつある. その代表的な成果については, 本文中にまとめた通りである.

しかしながら, 本解説に紹介した結果は, 空間的な蛍光強度の測定から濃度分布や吸着状態の解析を行ったものであり, 分子一個一個の挙動についての情報は得られていない. したがって, さらに不凍 (糖) タンパク質による氷結晶成長の制御機構を明らかにしていくためには, 界面に吸着した個々のタンパク質分子の挙動を観察することが, 極めて重要な今後の目標となる. 本誌の佐崎らの解説にも示されているように, 氷結晶表面において水分子 1 個分の高さを持つ単位ステップのその場観察が可能になっている (Sazaki et al., 2010; 2012). 近い将来, この技術は氷/水界面での単位ステップの観察にも適用できるようになると期待される. さらに, この技術とタンパク質分子の単分子挙動観察とを組み合わせることによって, 成長ステップとタンパク質分子との相互作用の直接観察も可能になるであろう. この様なその場観察実験が実現した暁には, 不凍 (糖) タンパク質の氷結晶成長制御機構の解明に向けて, さらに大きなブレークスルーが期待される.

謝辞

本研究の推進に当たり, 学習院大学の横山悦郎教授, 産総研の灘浩樹主任研究員, 大阪大学理学部の金子文俊准教授, 大阪大学蛋白質研究所の松浦良樹元教授, およびカリフォルニア大学デービス校の Yin Yeh 名誉教授には, 実験試料の準備, 実験結果の解釈, およびモデルの構築にあたり, 議論と支援を頂いた. ここに記して感謝申しあげる.

引用文献

- Atici, O. and B. Nalbantoglu (2003) Antifreeze proteins in higher plants. *Phytochemistry*, **64**, 1187-1196.
- Davies, P. L. and C. L. Hew (1990) Biochemistry of fish antifreeze proteins. *FASEB J.*, **4**, 2460-2468.
- DeVries, A. L. and E. Wohlshlag (1969) Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science*, **163**, 1073-1075.
- DeVries, A. L., S. K. Komatsu and R. E. Feeney (1970) Chemical and physical properties of freezing point-depressing glycoproteins from Antarctic fishes. *J. Biol. Chem.*, **245**, 2901-2908.
- Furukawa, Y., N. Inohara and E. Yokoyama (2005) Growth patterns and interfacial kinetic supercooling at ice/water interfaces at which anti-freeze glycoprotein molecules are adsorbed. *J. Cryst. Growth*, **275**, 167-174.
- 古川義純, Salvador Zepeda, 宇田幸弘 (2010) 氷結晶成長を支配するタンパク質——氷点下に生きる生物はいかにして凍結を回避するか——. *日本物理学会誌*, **65**, 98-103.
- Gilbert, J. A., P. J. Hill, C. E. R. Dodd and J. Laybourn-Parry (2004) Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. *Microbiology*, **150**, 171-180.
- Graham, L. A., Y. C. Liou, V. K. Walker and P. L. Davis (1997) *Tenebrio* antifreeze proteins. *Nature*, **388**, 727-728.
- Harrison, K., J. Hallett, T. S. Burcham, R. E. Feeney, W. L. Kerr and Y. Yeh (1987) Ice growth in supercooled solutions of antifreeze glycoprotein. *Nature*, **328**, 241-243.
- Kawahara, H., Y. Iwanaka, S. Higa, N. Murayoi, M. Sato, M. Honda, H. Omura and H. Obata (2007) A novel, intracellular antifreeze protein in an antarctic bacterium, *Flavobacterium xanthum*. *Cryoletters*, **28**, 39-49.
- Knight, C. A. and A. L. DeVries (1989) Melting inhibition and superheating of ice by an antifreeze glycopeptide. *Science*, **245**, 505-507.
- Knight, C. A., C. C. Cheng and A. L. DeVries (1991) Adsorption of alpha-helical antifreeze peptides on specific ice crystal surface planes. *Biophys. J.*, **59**, 409-418.
- Knight, C. A. (2000) Adding to the antifreeze agenda. *Nature*, **406**, 249-250.
- Krishnan, V. V., W. H. Fink, R. E. Feeney and Y. Yeh (2004) Determination of molecular self-diffusion coefficients using pulsed-field-gradient NMR: An Experiment for undergraduate physical chemistry laboratory. *Biophys. Chem.*, **110**, 223-230.
- Lane, A. N., L. M. Heys, N. Tsvetkova, R. E. Feeney, L. W. Crowe and J. H. Crowe (2000) Comparison of the solution conformation and dynamics of antifreeze glycoproteins from Antarctic fish. *Biophys. J.*, **78**, 3195-3207.
- Liou, Y. C., A. Tochilj and P. L. Davis (2000) Mimicry of ice structure by surface hydroxyls and water of a α -helix antifreeze protein. *Nature*, **406**, 322-324.
- 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.*, **B112**, 7111-7118.
- 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.
- Nagashima, K. and Y. Furukawa (1997a) Nonequilibrium effect of anisotropic interface kinetics on the directional growth of ice crystals. *J. Cryst. Growth*, **171**, 577–585.
- Nagashima, K. and Y. Furukawa (1997b) Solute distribution in front of an ice/water interface during directional growth of ice crystals and its relationship to interfacial patterns. *J. Phys. Chem.*, **B101**, 6174–6176.
- Nagashima, K. and Y. Furukawa (2000) Time development of a solute diffusion field and morphological instability on a planar interface in the directional growth of ice crystals. *J. Cryst. Growth*, **209**, 167–174.
- Pertaya, N., C. B. Marshall, C. L. DiPrinzio, L. Wilen, E. S. Thomson, J. S. Wettlaufer, P. L. Davis and I. Braslavsky (2007) Fluorescence microscopy evidence for quasi-permanent attachment of antifreeze proteins to ice surfaces. *Biophys. J.*, **92**, 3663–3673.
- Pertaya, N., C. B. Marshall, Y. Celik, P. L. Davies 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.
- Raymond, J. A. and A. L. DeVries (1977) Adsorption inhibition as a mechanism of freeze resistance in polar fishes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2589–2593.
- Sadtchenko, L. M. and G. E. Ewing (2002) Interfacial melting of thin ice films: An infrared study. *J. Chem. Phys.*, **116**, 4686–4697.
- Sazaki, G., S. Zepeda, S. Nakatsubo, E. Yokoyama and Y. Furukawa (2010) Elementary steps at the surface of ice crystals visualized by advanced optical microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**(46), 19702–19707.
- Sazaki, G., S. Zepeda, S. Nakatsubo, M. Yokomine and Y. Furukawa (2012) Quasi-liquid layers on ice crystal surfaces are made up of two different phases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 1052–1055.
- Scholander, F. H., L. van Dam, J. W. Kanwisher, H. T. Hammel and M. S. Gordon (1957) Fish physiology, fish toxicology, and fisheries management. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **49**, 5–24.
- Sichheri, F. and D. S. C. Yang (1995) Ice-binding structure and mechanism of an antifreeze protein from winter flounder. *Nature*, **375**, 427–431.
- Uda, Y., S. Zepeda, F. Kaneko, Y. Matsuura and Y. Furukawa (2007) Adsorption-induced conformational changes of antifreeze glycoproteins at the ice/water interface. *J. Phys. Chem.*, **B111**(51), 14355–14361.
- Wen, D. and R. A. Laursen (1992) A model for binding of an antifreeze polypeptide to ice. *Biophys. J.*, **63**, 1659–1662.
- Yeh, Y. and R. E. Feeney (1996) Antifreeze proteins: structures and mechanisms of function. *Chem. Rev.*, **96**(2), 601–618.
- Yokoyama, E., I. Yoshizaki, T. Shimaoka, T. Sone, T. Kiyota and Y. Furukawa (2011) Measurements of growth rates of an ice crystal from supercooled heavy water under microgravity conditions - Basal face growth rate and tip velocity of a dendrite. *J. Phys. Chem.*, **B115**, 8739–8745.
- Zepeda, S., H. Nakaya, Y. Uda, E. Yokoyama and Y. Furukawa (2007) Diffusion, incorporation, and segregation of antifreeze glycoproteins at the ice/water interface. In: W. F. Kuhs (ed) *Physics and Chemistry of Ice*, 669–676, RSC Publishing, London.
- Zepeda, S., Y. Uda and Y. Furukawa (2008a) Directory probing the antifreeze protein kinetics at the ice/solution interfaces. *J. Jpn. Asso. Cryst. Growth*, **35**, 151–160.
- Zepeda, S., E. Yokoyama, Y. Uda, C. Katagiri and Y. Furukawa (2008b) In situ observation of antifreeze glycoprotein kinetics at the ice interface reveals a two-step reversible adsorption mechanism. *Cryst. Growth Des.*, **8**, 3666–3672.
- Zepeda, S., S. Nakatsubo and Y. Furukawa (2009) Apparatus for single ice crystal growth from the melt. *Rev. Sci. Inst.*, **80**, 115102(4 pages).