



Title	Study on the structure and function of β -helical antifreeze proteins from cold-adapted microorganisms [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	花田, 祐一
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11554号
Issue Date	2014-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57289
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuichi_Hanada_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏 名 花田 祐一

学 位 論 文 題 名

Study on the structure and function of β -helical antifreeze proteins from cold-adapted microorganisms (微生物由来不凍タンパク質の構造と機能に関する研究)

不凍タンパク質（antifreeze protein: AFP）は過冷却溶液中に発生する氷結晶に不可逆的に結合し、凝固点降下をもたらすことでその成長を抑制する。これまでの半世紀に渡る研究により、魚類、節足動物、植物、真菌、細菌など寒冷な環境に適応した多様な生物種がアミノ酸配列・立体構造の異なる十数タイプの AFP 分子を発現することが明らかとなっている。これらの分子は不凍活性の強さに基づき、高活性型と中活性型に分類される。ほとんどの高活性型 AFP は β ラせん構造をとり、分子表面の一面に一定の配向を持った特定のアミノ酸残基（Thr や Asn など）からなる高度に規則的な氷結晶結合部位を構成する。一方、ほとんどの中活性型 AFP の氷結晶結合部位には特有の規則構造はない。規則構造中に見られるアミノ酸側鎖間の間隔は氷結晶を構成する水分子の間隔とよく適合することが知られており、そのことが AFP の高活性発現に重要であると考えられている。近年、広範囲な微生物群においてアミノ酸配列の保存性が高い AFP 分子が共有されていることが明らかとなった。本 AFP 群は β ラせん構造を有することが明らかとなっているが、既知の高活性型 AFP とは異なり氷結晶結合部位上にあるアミノ酸残基の側鎖は一様ではなく規則性は低い。著者の修士論文までの研究で、担子菌 *Typhula ishikariensis*、珪藻 *Navicula glaciei*、細菌 *Colwellia* sp. SLW05 株由来の各 AFP の組換え発現系を構築し、不凍機能を解析した。その結果から、本 AFP 群は分子種ごとの不凍活性に大きな差異のあることを明らかにした。本研究では、本 AFP 群の不凍活性の強さと氷結晶結合部位の構造の違いを分子レベルで議論し、多角的な観点から機能発現機構に関する知見を得ることを目的とした。

T. ishikariensis (Tis) AFP は立体構造が既知であるため、本研究では詳細に不凍機能を解析した。AFP の活性の強さは、氷結晶の成長が抑制される温度域（融点と凝固点の差：熱ヒステリシス）の絶対値で評価される。既知 AFP の溶液中では、氷結晶を温度一定のもと数時間静置することで熱ヒステリシスが数倍に上昇する場合のことが知られている。TisAFP は通常の条件では最大で約 0.5°C 程度の熱ヒステリシスを示し、その溶液中での氷結晶は凝固点において二方向（ c 軸）に伸長する（修士論文）。これらは既知の中活性型 AFP に典型的な特徴である。一方、二時間の氷結晶の静置後において熱ヒステリシスは約 2.5 倍に上昇し、その氷結晶は c 軸とは垂直の方向（ a 軸）に伸長することがわかった。この氷結晶伸長の特徴は、氷の基底面と少なくとも一つ以上のプリズム面に結合する高活性型 AFP の溶液中において観察される。さらに蛍光標識した AFP を用いてその AFP が結合する氷の結晶面を決定する実験（fluorescence-based ice plane affinity [FIPA] 解析）を行ったところ、TisAFP は酸性溶液中ではプリズム面にのみしか結合しないのに対し、中性溶液中では基底面を含む氷の全体に結合することが明らかとなった。以上より、TisAFP は実験条件により熱ヒステリシスの値だけではなく氷結晶結合の特異性も変化することが明らかとなった。これは既存の AFP には見られないユニークな特徴である。（投稿準備中）

Colwellia sp. (Col) AFP は、約 4°C の高い熱ヒステリシスを示す（修士論文）。本研究では高い不凍活性の分子基盤を明らかにすることを目的に、ColAFP の X 線結晶構造を決定した。TisAFP では、 β ラせんを構成する 3 つの β シートのうちもっとも平坦で広い面が氷結晶結合部位であると示されている。ColAFP の氷結晶結合部位を同定するために、複数の部位特異的変異体を作製した。その結果、TisAFP と同様の β シート面に加えて、その面と隣接するターンの領域も ColAFP の氷結晶結合に関与している可能性が示唆された。さらに、ColAFP の野生型と全ての変異体の FIPA 解析を行った。野生型は、氷結晶の基底面を含む複数の面に結合することがわかった。この特徴は、既知の全ての高活性型 AFP において観察される。ターン・ β シート両方の氷結晶結合部位を変異したもの（二重変異体）以外は、野生型と同様の FIPA パターンを示した。これは、それらの変異体が氷結晶に対する結合力（親和性）は減少した一方で結合の特異性は変化していないことが理由であると考えられる。これに対し、その二重変異体は基底面に対する結合特異性を完全に失っていることがわかった。これらの結果は、高い親和性をもって基底面に結合することが ColAFP の高活性発現に重要であることを示唆している。最後に、ColAFP と複数の

氷結晶面との分子ドッキングシミュレーションを行った。その結果 ColAFP は変異体実験により同定された 2 つの氷結晶結合部位のどちらでも、基底面を含む複数の氷結晶面に結合することが理論的に示された。ColAFP は既知の高活性型 AFP とは異なり、氷結晶結合部位のアミノ酸残基は一樣ではなく特定の残基による反復構造を有していない。その代替として、ColAFP は多様な氷結晶面に特異性を示す 2 つの氷結晶結合部位を持つことにより、他の高活性型 AFP と遜色がない高い不凍活性を獲得したと考えられる。(FEBS Journal, 掲載受理)

NagAFP は約 1.7°C の熱ヒステリシスを示す (修士論文)。NagAFP は前二者 (TisAFP : 中活性、ColAFP : 高活性) の中間的な活性を有することから、氷結晶結合部位の構造を三者間で比較することで不凍活性に違いをもたらす構造的要因に関する知見が得られることが期待される。NagAFP の FIPA 解析を行ったところ、基底面のみに結合している状態が観察された。NagAFP の活性の強さを考慮すると ColAFP と同様に複数の氷結晶面に結合することが予測されるが、結果としては TisAFP よりも少なかった。FIPA 解析の際に使用した蛍光標識の試薬は、リジン残基に結合する性質を持つ。そのことから、NagAFP の氷結晶結合部位にはリジン残基が関与しており、同部位が蛍光分子によって覆われたことで活性が減弱したと考えた。そこで NagAFP の C 末端のバリンをシステインに置換した V220C 変異体を作製し、システイン残基のみに特異的に作用する蛍光試薬を用いて標識した。それを用いて FIPA 解析したところ、ColAFP と同様に氷結晶の全体に結合している状態が観察された。ホモロジーモデリングによる NagAFP の予測立体構造に基づき、リジン残基が集中している分子表面の平坦な領域を探した。その結果、 β ラセンと並行に位置する α ラセン部位と、隣接するターン領域が氷結晶結合部位であると推察された。以上より、TisAFP、ColAFP、NagAFP は分子の骨格構造は同一であるにも関わらず、それぞれ異なる氷結晶結合部位を有する可能性が示唆された。その構造上の違いが三者間の不凍活性に違いをもたらしていると考えられる。(投稿準備中)