



Title	Structure-function relationship of ice-binding proteins from cold-adapted organisms [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	山内, 彩加林; Yamauchi, Akari
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第14664号
Issue Date	2021-09-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/83598
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Akari_Yamauchi_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 山内 彩加林

学位論文題名

Structure-function relationship of ice-binding proteins from cold-adapted organisms
(低温適応生物由来氷結晶結合蛋白質の構造機能相関)

氷結晶結合タンパク質 (Ice-binding protein: IBP、不凍タンパク質とも呼ばれる) は極地や寒冷地に生息する魚類、昆虫、植物、微生物等が有する低温適応物質の1つである。IBP は、過冷却水中に無数に発生する微細な単結晶氷に特異的に結合し、それらの成長を抑制することで水の凝固点を降下させる。IBP には様々なタイプがあり、それらのアミノ酸配列や立体構造は大きく異なっている。一方、単結晶氷も水分子の配列が異なる複数の結晶面 (基底面、プリズム面、ピラミダル面等) で構成されている。IBP はタイプに応じて異なる氷結晶面に結合する為、凝固点降下度、正確には単結晶氷の融点から結晶成長開始温度を差し引いた値 (熱ヒステリシス、Thermal Hysteresis, TH) に差を生じさせる。この TH の値が IBP の不凍活性の指標となる。また、直径約 3 cm の単結晶氷半球を作成して蛍光ラベル IBP の水溶液に浸し、その半球上に観察される蛍光模様 (Fluorescence-based Ice Plane Affinity, FIPA パターン) から IBP が結合する氷結晶面を特定することができる。更に、IBP を含む過冷却水の中に生じさせた単結晶氷の顕微鏡画像も不凍活性の指標となる。これらの実験データを得ることにより、本研究では中活性型に分類される微生物由来 IBP と高活性型に分類される昆虫由来 IBP について分子構造と不凍機能の相関関係を解析した。解析には分子生物学から構造生物学までの様々な手法を用いた。

これまでに発見された微生物由来 IBP はどれも β -らせん構造で出来ている。しかし、それらのアミノ酸配列は大きく異なっており、各々がどのように単結晶氷に結合するのかは良く分かっていない。そこで、申請者らは南極産子囊菌 *Antarctomyces psychrotrophicus* から新たに見出した IBP (AnpIBP) の野生型を遺伝子組換え技術を用いて作成し、初めに FIPA パターンを観察した。その結果、AnpIBP は単結晶氷半球の赤道を構成する特定の水分子にだけ結合し、赤道をリング状に光らせる「プリズムリング」を生じさせることが判明した。プリズムリングは過去に報告例がなく、また変異体には観察されないため、AnpIBP 野生型がもつ特別な構造と機能を反映していると考えられた。そこで、AnpIBP を結晶化して X 線構造を解析した。AnpIBP の変異型も複数作成して X 線構造解析を行った。それらは予想通り β -らせん構造を形成しており、全体構造からは AnpIBP がプリズムリングを生じさせる理由が分からなかった。

次に、AnpIBP の野生型と変異型の TH 活性の濃度依存性を調べて IBP の特定を試みた。AnpIBP の野生型は 250 μ M で 0.6°C の TH 活性 (中活性型 IBP の値) を示したが、 β シート面 (S153、T156) に変異導入をした AnpIBP 変異体の TH 活性は約 0.1°C に低下した。このことから、AnpIBP は β シート面に氷結晶結合部位 (Ice-Binding Site, IBS) を構築しており、2つの変異体はプリズム面への結合能力を失っていると考えられた。

更に、AnpIBP の野生型と変異体の IBS に存在する水和水の構造を解析した。野生型 AnpIBP の IBS 上には 88 個の水分子が存在していた。このうち 3.5 Å (水素結合の限界値) 以内の距離にある水分子の位置関係を解析したところ、少なくとも 13 個の五角形型に配置した水分子ネットワークの存在が示唆された。一方、活性の低い S153Y 変異体にはそのようなネットワークは見出されなかった。これらのことから、AnpIBP がもつ五角形型の水分子ネットワークは、AnpIBP と氷結晶の成長界面を瞬時に結びつける役割を果たしていると推察された。また、AnpIBP の IBS 上には 4 つの凹みが並んでおり、4 個の水和水を直線上に配置する役割を果たすと考えられた。これらの水和水間距離は単結晶氷のプリズム面を構成する水分子の距離 (4.6 Å および 14.7 Å) と極めて良く一致していた。これらの結果から、AnpIBP は分子表面に一定間隔で配置した 4 個の水分子を使

って単結晶氷の特定の水分子と特異的に結合しプリズムリングを生じさせると推察された。即ち、本研究は僅か4つの水和水がIBPに氷結晶結合の特異性をもたらすことを初めて明らかにした。AnpIBPは現時点において五角形型の水分子ネットワークと一定間隔で隔てられた凹みの両方を併せもつ世界唯一のIBPである。

IBPの構造機能相関の解明を更に推し進める為、オオクワガタ(*Dorcus hopei binodulosus*)由来IBP(DhbIBP)の研究を行った。1990年代にチャイロコメノゴミムシダマシ(*Tenebrio molitor*)という名前の甲虫から発見されたTmIBPが世界初の昆虫由来IBPである。TmIBPは12残基の特徴的なアミノ酸配列(TCTxSxNCxxAx)の繰返しから成る高活性型IBPであり、このタイプのIBPはゴミムシダマシ上科に属する4種類の昆虫からしか見つかっていない。オオクワガタは日本全国で生息が確認されている越冬性昆虫である。オオクワガタはチャイロコメノゴミムシダマシとは異なりコガネムシ上科(*Scarabaeoidea*)に属する為、本研究はIBPの系統進化学的関係の解明にも役立つと考えられた。

実験試料が確かにオオクワガタであるかどうかを確認するために、成虫の胸部筋肉からミトコンドリアDNAを抽出し、16SリボソームRNA(16SrRNA)配列を決定した。得られた配列はGenBankに登録されているオオクワガタの16SrRNA配列と99.2%一致したことから、試料は確かにオオクワガタであると結論付けられた。この昆虫がIBPを発現しているか否かを調べる為、3齢(終齢)幼虫を25℃、10℃、及び4℃で2か月間飼育したところ、10℃で低温順化させた幼虫が最も高濃度のIBP(DhbIBP)を含むことが明らかになった。また10℃で飼育した幼虫を-5℃及び-10℃の冷凍庫で24時間保存したところ、-5℃で保存した幼虫は凍らず、室温に戻した後、活発に動き回ることが確認された。-5℃下で植氷した場合、幼虫は凍結し生き返ることはなかった。これらの結果から、オオクワガタはIBPを体液中に蓄積することで越冬性を獲得していると考えられた。

オオクワガタが発現するDhbIBPのアミノ酸配列情報を取得するために、cDNAライブラリを構築した。その結果、DhbIBPは12残基のアミノ酸配列(TCTxSxNCxxAx)の繰返しにより構成された6種類のアイソフォームの混合物(DhbIBP1-6)であることが明らかになった。この12残基の配列は、意外にもチャイロコメノゴミムシダマシ由来のTmAFPを構成する12残基の配列と極めて高い相同性を示した。次に、DhbIBPの不凍活性を調べるために大腸菌発現系を構築してDhbIBP2の遺伝子組換え体を取得した。DhbIB2は150 μMで約3℃という高いTH活性を示した。またFIPAパターンからDhbIB2は単結晶氷の全ての面に結合することが示された。これらの結果はDhbIBPがTmIBPと同様に高活性型のIBPであることを示している。

TmIBPのX線構造は既に決定されており、DhbIBPとTmIBPは85%もの高いアミノ酸配列の相同性を示すことから、DhbIBPの3次元分子構造を予測することが十分に可能であった。即ち、DhbIBPは12残基のアミノ酸配列を1ステップとするβらせん構造で出来ており、その四角柱状の分子表面にはTCT配列が7列並んだことにより1本の長い溝が形成されていると推察された。この溝の縁にはTの側鎖の水分子が7個直線状に配置しており、また溝の中には7個の水和水が直線状に配置している。即ち、TmIBPの分子表面には7個の水分子が3列に並んだ状態になっており、これらの水分子は単結晶氷の基底面やプリズム面を構成する水分子の配置と完全に一致すると考えられた。ここで、なぜチャイロコメノゴミムシダマシとオオクワガタが極めて良く似たIBPを有するのかを考察する必要が生じた。DhbIBP1-6のDNA配列は非翻訳領域、シグナルペプチド領域も含めて、TmIBPのものと同様な相同性を示した。最新の甲虫の系統進化学的解析の結果は、コガネムシ上科とゴミムシダマシ上科が地質時代のペルム紀の氷期に対応する2億5000万~3億年前に分岐したことを示している。遺伝子構造が約3億年もの間保持されたとは考えにくいから、これら2つの昆虫の祖先がIBP遺伝子を獲得したとは考え難い。即ち、これら2つの昆虫はIBPの遺伝子を水平伝播により獲得したと推察された。

本研究から、微生物と昆虫は生物学的には全く異なるものの、極めて精密にデザインされたIBPを合成することによって、凍結に耐える能力を獲得していると結論付けられた。