HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	昆虫由来不凍タンパク質の氷結晶結合機能と細胞保護機能
Author(s)	山内, 彩加林; 津田, 栄
Description	第一章：変温動物
Citation	低温科学, 81, 37-49
Issue Date	2023-03-20
DOI	https://doi.org/10.14943/lowtemsci.81.37
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89119
Type	departmental bulletin paper
File Information	05_p037-049_LT81.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

低温科学 81 （2023） 37–49
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 37

昆虫由来不凍タンパク質の氷結晶結合機能と細胞保護機能

山内　彩加林[1)]，津田　栄[2)]

2023 年 2 月 3 日受付，2023 年 2 月 8 日受理

一部の生物は氷点下にもなる低温環境に生息し，凍結や低体温のリスクに晒されるにも関わらず，生命活動を維持することができる．なぜこれらの生物は凍結障害や低温障害を受けずに生命活動を維持できるのだろうか？　不凍タンパク質（Antifreeze protein：AFP）は寒冷な環境に生息する様々な魚類・昆虫・植物・微生物等で見出される低温適応タンパク質の 1 つである．AFP は氷に結合しその成長を抑制する機能（氷結晶結合機能）と，細胞膜に結合し低温障害から細胞を保護する機能（細胞保護機能）を有する．AFP の両機能は低温下におけるこれら生物の生命維持に重要な役割を果たすと考えられている．本稿では，昆虫由来 AFP を中心に，AFP の氷結晶結合機能と細胞保護機能について紹介する．

The ice-binding and cell-protection function of insect-derived antifreeze protein

Akari Yamauchi[1] and Sakae Tsuda[2]

Some organisms can be alive in cold environment even below 0℃, in spite of the risk of freezing and hypothermia. How are these organisms able to maintain their life without freezing injury and cold damage? Antifreeze proteins (AFPs) are one of cryoprotective proteins found in various cold-adapted fish, insects, plants, and microorganisms living in cold environments. AFPs can bind to single ice crystal and inhibit its growth (ice-binding function). Moreover, AFPs can prolong the life-time of mammalian cells at low temperature through its binding to lipid bilayer (cell-protection function). Both functions of AFPs are thought to play important roles in sustaining the life of these organisms at low temperatures. In this paper, we introduce the ice-binding and cell-protection functions of insect-derived AFP.

キーワード：低温適応，不凍タンパク質，熱ヒステリシス，細胞保護，オオクワガタ
Cold-adaptation, antifreeze protein, thermal hysteresis, cell-protection, *Dorcus hopei binodulosus*

1．はじめに

不凍タンパク質（Antifreeze protein：AFP，氷結晶結合タンパク質とも呼ばれる）は，低温環境に生息する魚類，昆虫，植物，バクテリア，菌類等から見出されている低温適応タンパク質の 1 つである（Davies, 2014;

連絡先
山内　彩加林
北海道大学低温科学研究所　生物環境部門　冬眠代謝生理発達分野
〒060–0819　北海道札幌市北区北 19 条西 8 丁目
Tel. 011–706–5490
e-mail：a.yamauchi@lowtem.hokudai.ac.jp
1）北海道大学低温科学研究所　生物環境部門　冬眠代謝生理発達分野
Institute of low temperature science, Environmental biology division, Hibernation metabolism, physiology, and development Group
北海道札幌市北区北 19 条西 8 丁目
（Kita 19, Nishi 8, kita-ku, Sapporo, Hokkaido, 060–0819, Japan）
2）東京大学新領域創成科学研究科
〒277–0882　千葉県柏市柏の葉 6–2–3 東大柏 II キャンパス　産総研イノベ棟 2109 室
Department of Advanced Materials Science, Graduate School of Frontier Sciences, The university of Tokyo, 2109 AIST innovation bldg., 6–2–3 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277–0882, Japan

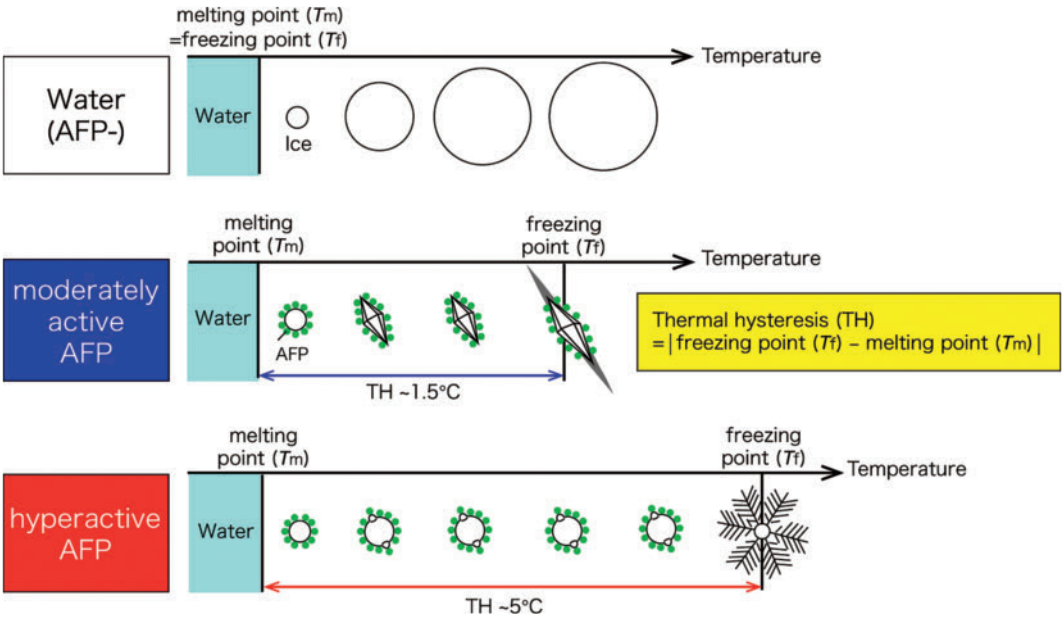


図 1：不凍タンパク質の氷結晶結合機能．
AFP 非存在・存在下の過冷却水中に生成する単結晶氷の形状および TH を示す．TH は凝固点（T_f，氷結晶が急激に成長し始める温度）と融点（T_m，氷結晶が融解し始める温度）の差を指す．（上段）純水 /AFP 不含の溶液：過冷却水中に生成する単結晶氷を顕微鏡下で観察すると，円盤状の氷結晶が観察される．T_m と T_f は同じ値であり，冷却すると氷結晶はすぐに大きく成長する．（中段）中活性型 AFP：中活性型 AFP（主に魚類 AFP）存在下では，バイピラミッド型の氷結晶が観察される．約 1.5℃の範囲で氷結晶の成長を抑制する．（下段）高活性型 AFP：高活性型 AFP は氷結晶の成長を抑制できる温度範囲が広く，μM 濃度で 2℃～7℃の TH 活性を有する．例えば昆虫 AFP 存在下の過冷却水中にはレモン型の氷結晶が観察される．

Voets et al., 2017）．AFP は 0℃以下でも凍らない水，すなわち過冷却水中に生じる単結晶氷に結合し，その成長を抑制することにより溶液の凝固点を降下させる氷結晶結合機能を有する（DeVries & Wohlschlag, 1969）（図 1）．

AFP は生物種ごとに異なる先祖タンパク質が何度も変異を繰返すうちに氷結晶結合能を獲得するよう進化（収斂進化）したと考えられている（Graham et al., 2022）．そのため，各生物種の AFP はアミノ酸配列・3 次元構造・分子量・氷結晶結合部位・氷結晶結合機能が大きく異なる（Davies, 2014）（津田の稿参照）．氷結晶結合機能の相違は，1）結合する単結晶氷の面，2）氷結晶の形状修飾能，3）熱ヒステリシス活性等が挙げられる．以下簡単に説明する．

1）結合する単結晶氷の面：単結晶氷を構成する面は基底面・第 1 プリズム面・第 2 プリズム面・ピラミダル面が代表的であるが（Mahatabuddin & Tsuda, 2018; Hew & Yang, 1992; Olijve et al., 2016），これらのうちどの氷結晶面を認識するのかは AFP ごとに異なる（Rahman et al., 2019）．全ての氷結晶面に結合できる AFP は，氷結晶のどの面からの成長も抑制できるため，氷結晶結合機能は強いことが多い．

2）氷結晶の形状修飾能：AFP は結合する氷結晶面を反映した，単結晶氷の形状修飾を行う（Basu et al., 2014; Takamichi et al., 2009; Scotter et al., 2006）．例えば，AFP を含まない溶液中の単結晶氷は円盤型を呈するが，AFP を含む溶液中の単結晶は，AFP が一部の結晶面に結合する場合はバイピラミッド型（Takamichi et al., 2009），全ての結晶面に結合する場合はレモン型を呈する（Scotter et al., 2006）．

3）熱ヒステリシス（Thermal Hysteresis：TH）活性：AFP は単結晶氷に結合し，その融点を変えずに凝固点のみを降下させる．AFP の不凍活性指標として，TH 活性が用いられる．TH は，単結晶の融点（氷結晶が溶け始める温度）から凝固点（氷結晶が急激に成長する温度）を差し引いた値であり，融点と凝固点の差を示した値である．例えば，TH 活性＝ 3℃の AFP は，融点が 0℃の時，－3℃まで氷の成長を抑制できることを意味する．AFP は TH 活性を指標に，中活性型（mM 濃度の AFP 存在下で TH 活性が 2℃以下）・高活性型（μM 濃度の AFP 存在下で TH 活性が 2℃以上）に大きく分類される（Scotter et al., 2006; Celik et al., 2010; Barrett, 2001; Takamichi et al., 2007）．

上記の物理的特性の違いに加えて，AFP はアミノ酸配列が僅かに異なる分子（アイソフォーム）が複数存在

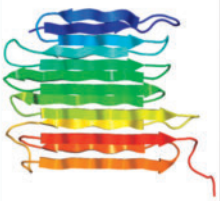
	*Tm*AFP	*Cf*AFP (SbwAFP)	*Ri*AFP	*Sf*AFP
立体構造				
モチーフ配列	TCT	TxT (x is variable)	TxTxTxT	Repetitive Glycine-rich
特徴	Mw= 8.4-12 kDa TH_{max}=5.5℃ Whole-plane	Mw= 9 kDa TH_{max}= >3℃ Basal and primary prism planes	Mw= 13 kDa TH_{max}=6.5℃ Whole-plane	Mw= 6.5 kDa TH_{max}=4.1℃ Whole-plane
生物種	**甲虫類** *Tenebrio molitor* *Dendroides canadensis* *Anatolica polita* *Microdera punctipennis*	**蛾** *Choristoneura fumiferona*	**カミキリムシ** *Rhagium inquisitor* **蛾** *Campaea perlata*	**ユキノミ** *Hypogastrura harveyi* *Granisotoma rainieri*

図 2：各種無脊椎動物（昆虫）AFP の構造.
代表的な 4 種類の無脊椎動物 AFP について，立体構造・モチーフ配列・特徴・同じタイプの AFP を発現する生物種の例を示す．甲虫 *Tenebrio molitor* 由来 *Tm*AFP（PDB code: 1EZG），蛾 *Choristoneura fumiferan* 由来 *Cf*AFP（PDB code: 1M8N），カミキリムシ *Rhagium inquisitor* 由来 *Ri*AFP（PDB code: 4DT5），トビムシ *Hypogastrura harveyi Folsom* 由来 *Sf*AFP（PDB code: 2PNE）．これらの無脊椎動物 AFP は高活性型 AFP に分類される．

する．異なる生物種では AFP のアイソフォーム数が異なるとともに，同種が有する各アイソフォームの氷結晶結合機能も異なる（Takamichi et al., 2009）．さらに，魚類 AFP は氷結晶だけでなく，細胞の脂質二重膜にも結合し，細胞を低温障害から保護するという，氷結晶結合機能だけでは説明がつかない細胞保護機能に関する報告もある（Rubinsky et al., 1990）．本稿では，こうした AFP が有する氷結晶結合機能と細胞保護機能について，近年我々が発見した昆虫 AFP に関する知見を基に紹介する．

2．無脊椎動物（昆虫）由来不凍タンパク質の構造

無脊椎動物由来の AFP はその多くが高活性型であり，厳しい寒冷環境に生息する宿主の生存に重要と考えられている（Graether & Sykes, 2004）．これまで甲虫（革質化した堅い前翅（まえばね）が背中を覆っている昆虫）・蛾・カミキリムシ・トビムシ等で AFP の発現が確認された．ここでは，既報の無脊椎動物 AFP について構造的特徴とともに紹介する（図 2）．

昆虫 AFP は 1997 年にチャイロコメノゴミムシダマシの幼虫（ミールワーム，*Tenebrio molitor*）で初めて確認された（Graham et al., 1997）．チャイロコメノゴミムシダマシは夜間に −5℃ 以下の気温となる砂漠地帯に生息する甲虫である（Duman, 1982）．チャイロコメノゴミムシダマシ由来の *Tm*AFP は 9 つのアイソフォーム（Mw = 8.4–12 kDa）が存在し，いずれも 12 残基のアミノ酸配列（TCTxSxNCxxAx，x は任意のアミノ酸配列）の 7〜11 回の繰返しからなる右巻き β らせん構造を有する（Duman & Newton, 2020）．*Tm*AFP の有する Thr-Cys-Thr（TCT）モチーフは氷結晶結合部位を形成すると考えられている（詳しくは本稿 3 章を参照）．TCT モチーフを有するタイプの AFP は他の 3 種類の甲虫類でも確認された（*Dendroides canadensis, Anatolica polita borealis, Microdera punctipennis dzungarica*）（Duman et al., 1998; Ma et al., 2009; Qui et al., 2010）．また，北米やカナダに生息する蛾であるトウヒノシントメハマキ（spruce budworm, *Christoneura fumiferana*）由来の *Cf*AFP（SbwAFP，Mw = 9 kDa）は，*Tm*AFP と似た Thr-X-Thr（TXT，X は任意のアミノ酸）モチーフを有し，15 残基の繰返し配列からなる左巻き β ストランド構

造を有する（Tyshenko et al., 1997; Graether et al., 2000; Liou et al., 1999; Liou et al., 2000）．カミキリムシの一種である *Rhagium inquisitor* はヨーロッパ全域やシベリアの極寒地に生息し，トウヒやマツ等の枯れた枝や切り株の樹皮の下で越冬する（Zachariassen & Husby, 1982; Kristiansen et al., 1999）．*Rhagium inquisitor* が発現する *Ri*AFP（Mw = 13 kDa）は，平坦なβらせん構造からなる（Kristiansen et al., 2011）．*Ri*AFP は Thr-X-Thr-X-Thr-X-Thr（TXTXTXT）モチーフを含む 13 残基の配列が 6 回繰返されており，2 列のβシート構造が薄い板状に張り合わされた構造を有する．*Ri*AFP は 100 μM よりも低い濃度で 6.5℃という非常に高い TH 活性を示し，AFP の中でも活性が極めて高い分子として知られる．また，尺蛾（*Campaea perlata*）の幼虫（シャクトリムシ, inchworm）も *Ri*AFP と同じタイプの AFP（IwAFP, Mw = 3.5–8.3 kDa）を発現する（Lin et al., 2011）．

昆虫に近縁な種とされるトビムシからも AFP が発見されている．トビムシは腹部の跳躍器によりよく飛び跳ねる性質を有し（跳び虫），特に冬の雪上で観察される種はユキノミ（snow flea, *Hypogastrura harveyi Folsom*）として知られる．ユキノミは分子量の異なる 2 つの AFP アイソフォーム（*Sf*AFP, Mw = 6.5 kDa・15.7 kDa）を発現する（Graham & Davies, 2005）．6.5 kDa のアイソフォームは 6 つの逆並行左巻きポリプロリン II（PPII）ヘリックス構造を有しており，親水性部位と疎水性部位が逆方向を向いた構造をとる（Pentelute et al., 2008）．また，15.7 kDa のアイソフォームも同様の構造を有すると予測されている（Mok et al., 2010）．*Sf*AFP には TXT モチーフが存在しない代わりに Gly に富んだアミノ酸配列を有し，TH 活性は 5.8℃と高い値を示す．また最近，北海道に生息するユキノミ（*Granisotoma rainieri*）も Gly に富んだ配列を有する *Gr*AFP を発現することが報告された（Scholl et al., 2021）．X 線結晶構造解析の結果から，*Gr*AFP はヘリックスバンドル構造であり，その構造は *Sf*AFP に似ているものの，ヘリックスの数が 6 ではなく 9 つである点が異なることが示された．

3．越冬昆虫オオクワガタ由来 AFP

既報の高活性型昆虫 AFP の多くは北米やシベリアなどの極低温環境に生息する種から発見されたものである．一方で，日本も冬季には 0℃以下の低温となる環境であり，多くの越冬昆虫が生息する．例えば，冬の北海道における越冬昆虫を調べた研究では，甲虫類，ハチ類，蛾類，ハエやアリが越冬するという報告がある（Asahina & Ohyama, 1969）．これら越冬昆虫の中で最も確認された種は甲虫類であり，甲虫類は雪の降り積もった木の根株で越冬することが確認された．しかしながら意外にも，日本産越冬昆虫の AFP についての報告はほとんどない．そこで我々は，日本全国に生息する代表的な越冬甲虫であるオオクワガタ（*Dorcus hopei binodulosus*）に着目し，その AFP 探索と機能解析を試みた（Arai et al., 2021）．

オオクワガタは一般家庭でもペットとしての人気が高く，その飼育方法が確立しており，研究室内で繁殖させることも比較的容易である．オオクワガタは，卵→ 1 齢（初齢）幼虫→ 2 齢幼虫→ 3 齢（終齢）幼虫→蛹→成虫という成長過程を辿る．一般に，オオクワガタは夏に交配し，秋になると雌がコナラ等の朽ち木をかじり，穴を作ってそこに産卵する．我々はオオクワガタの雌雄を購入しペアリング後，コナラの朽ち木を入れたケージで雌を飼育し，51 個の卵を得ることに成功した．卵は産卵から約 1 カ月後に孵化し，体長数 mm サイズの 1 齢幼虫が生まれた．1 齢幼虫は自身の周囲にある木を食餌として食べて成長し，約 1 カ月後に体長 25 mm 程度の 2 齢幼虫へと成長した．この 2 齢幼虫を菌糸瓶に入れて 25℃で 2 か月間飼育し終齢幼虫になるまで飼育した．オオクワガタは幼虫期の大半を終齢幼虫として過ごし，終齢幼虫のまま越冬することが知られる．我々は，オオクワガタの終齢幼虫において AFP が発現しているか否かを調べることにした．

ある生物が AFP を発現しているかどうかはその体液/血液中に観察される氷結晶の形状および TH 活性を確認することで判断できる．我々はまず，オオクワガタの終齢幼虫を 25℃，10℃および 4℃に設定したインキュベーターに入れ 2 か月間飼育後，各幼虫の体液を回収した．各幼虫の体液を温度調節機能付き光学顕微鏡のステージ上にセットし，−20℃まで冷却し完全に凍結させた後，少しずつ昇温し，視野内に 1 つの単結晶氷を作成し観察した．その結果，10℃および 4℃で低温馴化させた幼虫の体液中にはレモン型の氷結晶が観察された（Arai et al., 2021）．特に 10℃で低温馴化させた幼虫の体液の TH 活性は約 4℃であり最も高かった．TH 活性の強さは AFP の濃度に依存することから（Kristiansen & Zachariassen, 2005），10℃で低温馴化させた幼虫は高濃度の AFP を含むことが示唆された．オオクワガタは雪の降り積もった木の根株で越冬することが知られるが，その木の根株の温度は −5℃にもなる（Asahina & Ohyama, 1969）．オオクワガタの越冬における AFP の

役割について知見を得るため，10℃で飼育した幼虫（AFPを発現させた幼虫）を−5℃および−10℃の冷凍庫で1日保存し，室温に戻した後の回復率を確認した（図3A）．−5℃で保存した幼虫は10匹中10匹が凍結せず，室温に戻した後も活発に動き回ることが確認された．一方，−10℃で保存した幼虫（10匹/10匹）は全て凍結し生き返ることはなかった．また，幼虫の体表面を水で軽く濡らし凍結を起こりやすくした（植氷，宇高の稿参照）条件で，−5℃で保存した幼虫（3匹/3匹）も凍結死した．昆虫には凍結を回避し越冬する凍結回避型と，凍結しても死なずに越冬できる耐凍型のものがいる（Zachariassen & Kristiansen, 2000; Duman, 2001; Vrielink et al., 2016）（泉の稿参照）．我々の結果は，オオクワガタは季節的な外気温低下に伴い越冬に備えてAFPを発現し，体液中にAFPを初めとする凍結保護物質を蓄積することにより越冬を可能にする凍結回避型昆虫ということを示唆する．

続いて，オオクワガタが発現するAFP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．既報の昆虫AFPのアミノ酸配列を参考に，オオクワガタのAFPを探索した結果，12残基のアミノ酸配列（TCTxSxNCxxAx）の繰返しからなるタンパク質が発見された（以下，*Dhb*AFPとする）．*Dhb*AFPは12残基のアミノ酸配列の繰返し回数が異なる，少なくとも6種類のアイソフォーム（*Dhb*AFP1-6）の存在が示唆された．*Dhb*AFPとチャイロコメノゴミムシダマシ由来*Tm*AFPのアミノ酸配列を比較した結果，どのアイソフォームも82%以上の相同性を示した．さらに*Dhb*AFPが不凍活性を有するかを確認するために，*Dhb*AFPの大腸菌発現系を構築し，各種クロマトグラフィーにより組換え*Dhb*AFPを精製した．組換え*Dhb*AFPは150 μM濃度で約3℃のTH活性を示し，単結晶氷の全ての面（プリズム面，ピラミダル面，基底面）に結合することが確認された．これらの氷結晶結合機能は，高活性型AFPである*Tm*AFPの特徴とよく一致した（Liou et al., 2000; Basu et al., 2014）（本稿，1章と2章参照）．以上より，日本産越冬昆虫であるオオクワガタのAFPのアミノ酸配列を同定し，*Dhb*AFPが高活性型AFPであることが明らかとなった（Arai et al., 2021）．

*Dhb*AFPの氷結晶結合メカニズムに関する知見を得るために，*Tm*AFPのX線結晶構造データを元に*Dhb*AFPのモデル構造を構築した（図3B）．*Dhb*AFPは（TCTxSxNCxxAx）で1巻きする，βシートがらせん状に積み重なった右巻きβらせん構造を示した（図3C）．*Dhb*AFPは四角柱状の外形を呈しており，TCTモチーフが7列連なる規則性に富んだ面の中央には長い溝が確認された．*Tm*AFPの結晶構造解析の結果では，この長い溝に水和水が直線状に配置することが報告されている（Liou et al., 2000）．またTCTモチーフのThr側鎖のOH基は直線状に配置しているため，*Tm*AFPの分子表面には水分子とOH基が3列に規則的に配置し，平面性の高い分子表面を構成する（Graether & Sykes, 2004）．これらの整列した水分子とOH基の酸素原子（O原子）の配置は，単結晶氷の基底面やプリズム面を構成する水分子（O原子）の配置と完全に一致する（Liou et al., 2000）．これまでの複数の既報から，AFPは自身の分子表面に宿した氷様の水分子（単結晶氷と配置の一致する

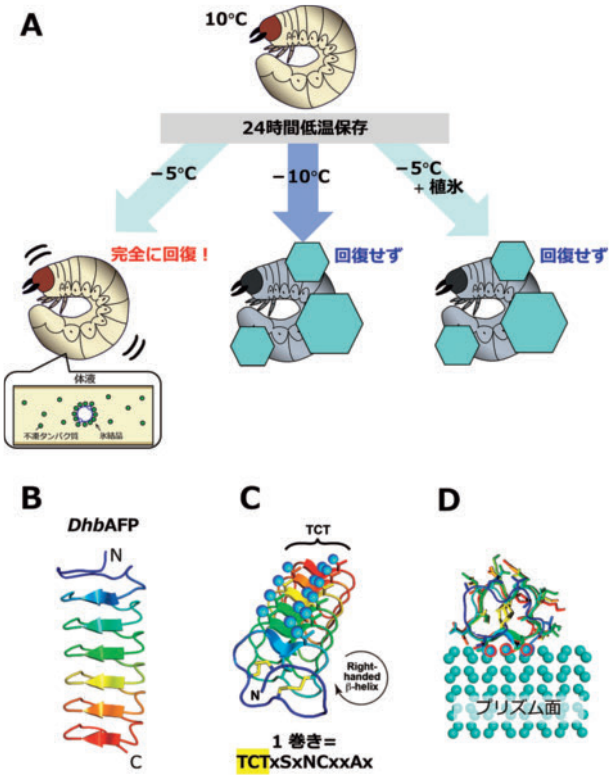


図3：オオクワガタAFP（*Dhb*AFP）の氷結晶結合機能．（A）オオクワガタ*Dorcus hopei binodulosus*終齢幼虫の−5℃下1日保存実験．低温馴化（10℃，2か月）によりAFPを体液中に発現したオオクワガタの終齢幼虫は，−5℃下で1日保存しても凍結死せず，室温に戻すと完全に回復する．−10℃および−5℃＋植氷条件下ではオオクワガタは凍結死する．オオクワガタはAFPにより凍結を回避し越冬すると考えられる．（B）*Dhb*AFPのモデル構造．（C）*Dhb*AFPのTCTモチーフ．12残基のアミノ酸配列（TCTxSxNCxxAx）で一周する右巻きβらせん構造を有する．水色の球はOH基および水分子のO原子を示す．TCTモチーフにはThr側鎖のOH基（両端）と中央の長い溝の水分子が3列に規則的に並ぶ．（D）*Dhb*AFPの氷結晶結合メカニズムの模式図．3列に規則的に並んだ水分子（O原子）は氷結晶を構成する水分子（O原子）の配置と一致する．*Dhb*AFPモデル構造構築には*Tm*AFP（PDB code: 1EZG）をテンプレートとして使用．Arai et al., 2021を一部変更して引用．

水分子）を介して，氷結晶に結合すると考えられている（Garnham et al., 2011; Chakraborty & Jana, 2018; Yamauchi et al., 2020）．*Dhb*AFP は *Tm*AFP とアミノ酸配列（相同性は 85％以上）・氷結晶結合機能（結合する結晶面や TH 活性）が非常によく似ていた．これらを考え合わせると，*Dhb*AFP は *Tm*AFP と同様に，TCT モチーフをもつ分子表面が氷結晶結合部位であり，その分子表面に宿した高度に組織化された氷様の水分子を介して，氷結晶に結合しその成長を極めて強く抑制すると考えられる（図 3D）．

4．AFP の細胞保護機能

低温は生物を凍結の危機に晒すだけでなく，凍結せずとも細胞に障害を与える可能性がある．特に，哺乳動物は体温が 37℃付近に維持される恒温動物であり，低体温下で長時間生存することは困難である．その組織や細胞はそれより低い低体温に長時間陥ると，様々な低温誘導性障害を生じるためである．哺乳動物細胞で生じる低温誘導性障害（曽根の稿参照）には，脂質の過酸化，細胞膜の機能低下による制御不能なイオン漏出/流入（細胞内外イオンの恒常性の喪失），Ca^{2+} イオン流入に伴うホスホリパーゼ・プロテアーゼの活性化や細胞骨格の損傷等が挙げられる（Hochachka, 1986; R. G. Boutilier, 2001; Rubinsky, 2003; Boutilier, 2001; Qin, 2003; Sun, 2016; Nickel, 2014; Quinn, 1985）．一方，低温環境に生息する変温動物は低体温状態にもなるにも関わらず生命活動を維持できることから，その細胞が低温により障害を受けない何らかの機構を有すると考えられる．1 章で述べたように魚類由来 AFP は非凍結温度である 4℃下で哺乳動物細胞の脂質二重膜に結合して膜を安定化し，細胞の生存期間を延長できるとの報告がある（Rubinsky, 1990）．

この Rubinsky らによる AFP の細胞保護機能に関する論文では，不凍糖タンパク質（Antifreeze glycoprotein：AFGP）を添加した保存液にブタ卵母細胞を浸漬し，4℃下で 24 時間保存後の卵膜の膜電位の変化を調べた．膜電位とは細胞膜を挟んだ細胞内と外の電位差であり，細胞内外のイオンの分布の差を示す．膜電位の変化は細胞内外のイオン分布の変化を示すため，低温曝露により細胞膜機能低下に伴うイオン漏出/流入が生じたかの指標となる．同論文では，AFGP 不含の保存液で保存された卵母細胞は低温曝露後に膜電位が完全に失われたのに対し，AFGP 含有の保存液で保存された卵母細胞は通常（22℃）時の 65％の膜電位を維持することが示された．この結果から，AFGP は低温下で生じる卵母細胞の膜損傷を防ぐことにより，細胞からのイオン流出を抑制すると考えられた．翌年，AFGP のみでなく，魚類 AFPI-III にも 4℃下における細胞保護効果が認められた（Rubinsky et al., 1991）．また電気生理学的手法により，AFPI を添加したブタ卵母細胞では K^+ イオンと Ca^{2+} イオン電流の抑制が確認されたため，AFP は K^+ チャネルに結合し K^+ イオンの流出と，Ca^{2+} チャネルに結合し Ca^{2+} イオンの流入を抑制することが示唆された（Rubinsky et al., 1992）．以上の報告から，AFP は細胞膜上のイオンチャネルと相互作用することにより，低温曝露により細胞で生じるイオン恒常性の破綻を防ぐと考えられた．

一方，Hays らは人工細胞膜であるリポソームと AFP の相互作用を報告した（Hays et al., 1996）．一般に，細胞膜は 37℃から 4℃に冷却されると，リン脂質の脂肪酸鎖が柔軟な構造である液晶相から，脂肪酸鎖同士が密接した構造であるゲル相へと相転移する（Quinn, 1985）．この脂質の相転移は膜脂質の均一な並びにズレを生じ，細胞膜から細胞内イオンの漏れを引き起こすとされる（Crowe & Crowe, 1986）．Hays らは，蛍光物質を内封したリポソームを作製し，蛍光物質の漏れが AFGP 濃度依存的に抑制され，10 mg/ml 濃度の時に完全に抑制されることを示した．AFGP はイオンチャネル等を含まない人工細胞膜においても内封物の漏れを抑制したため，脂質の相転移を防ぐという仮説が生じた．さらに 2002 年には AFPI も脂質の相転移を抑制することが示唆された（Tomczak et al., 2002）．総じて，AFP は細胞膜上のイオンチャネルあるいは脂質二重膜と相互作用し，低温曝露時に生じる細胞内イオンの漏出や細胞外イオンの流入を防ぎ，細胞のイオン恒常性の維持に寄与すると考えられた．

その後，魚類 AFP の細胞保護効果が様々な細胞・組織・臓器で調べられてきた．例えば，平野らは日本産魚類 AFPIII を用いてヒト肝がん細胞株 HepG2 に対する 4℃下での細胞保護効果を報告した（Hirano et al., 2008）．この報告では，様々な臓器の保存に利用されており，タンパク質を含まない保存液であるユーロコリンズ液（Euro-Collins，EC）液に AFPIII を 10 mg/ml となる様に溶解し，約 1 万個の HepG2 細胞をその保存液に浸漬し保存した．その結果，EC 溶液のみでは 1 日後にほぼ全ての細胞が死滅した一方，AFPIII 存在下では 3 日後も約 75％の HepG2 細胞が生存可能であった．また同論文では，細胞膜損傷の程度を評価するために，細胞から放出された乳酸脱水素酵素（LDH）活性を測定した．LDH は通常，細胞質に存在している酵素であるが細胞

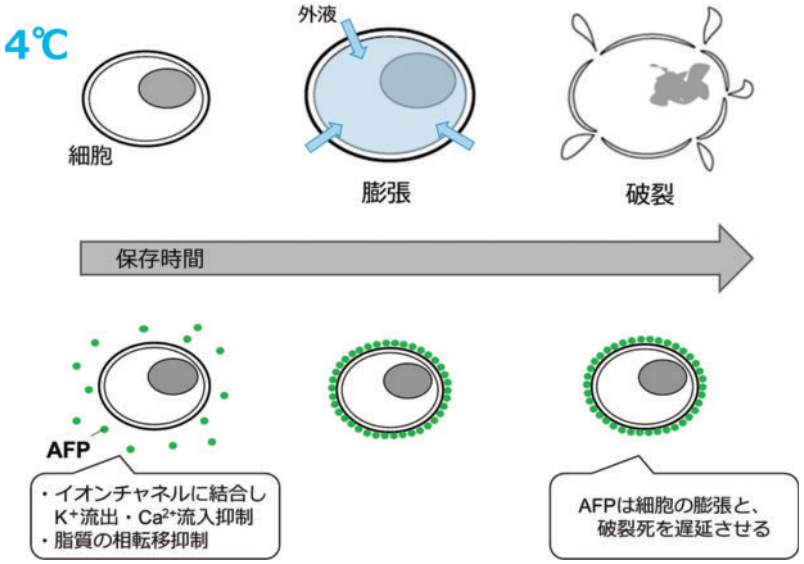


図 4：AFP の細胞保護機能.
保存液中に浸漬し 4℃保存された細胞の経時的な状態変化を示す.（上段）AFP 不含の保存液中で保存された細胞は，時間経過につれて細胞が膨張し，約 8 時間後に破裂して死滅する.（下段）AFP を含む保存液中で保存された細胞は，4℃下での生存期間が延長される．保存液中の AFP は細胞膜上のイオンチャネルや脂質二重膜に結合し細胞内イオンの漏出・細胞外イオンの流入を防ぐため，細胞の膨張・破裂の過程を遅延させると考えられる.

膜が損傷を受けると培地中に放出されるため，膜損傷を受けた細胞や死細胞数を測る指標として用いられる．AFPIII で保存された細胞は放出される LDH 量も 38%まで減少しており，AFP により細胞膜の損傷から保護されたため生存率が向上したことが示唆された．さらに平野らは，4℃保存中の 1 個の細胞を走査型電気化学顕微鏡により観察し，細胞の経時的な状態変化を報告した（Hirano et al., 2008）．EC 溶液中で 4℃保存された HepG2 細胞は，保存時間が経過するにつれ徐々に細胞が膨張し，約 8 時間後に破裂し死滅した．一方，AFPIII 存在下では，HepG2 細胞の膨張は保存開始から 16 時間後まで観察されなかった．この観察結果は，AFP が細胞の表面に結合することにより細胞の膨張とそれに引き続いて生じる破裂死を抑制し，細胞死を遅らせることを示唆した．しかしながら，AFP が細胞膜に結合している様子を観察したという報告はそれまで無かった．その 5 年後，上島らが共焦点レーザー顕微鏡により蛍光標識した AFP が HepG2 細胞およびラット膵島細胞株 RIN-5F の細胞膜表面に結合する様子を初めて報告した（Kamijima et al., 2013）．同論文は，RIN-5F 細胞に対する日本産魚類 AFPI-III および AFGP（天然物）の細胞保護効果も示した．各 AFP を 10 mg/ml になるように溶解した EC 保存液に RIN-5F 細胞を浸漬し，4℃で 1〜5 日間保存後の細胞生存率を調べた．その結果，EC 溶液で保存された細胞は 1 日後の生存率が 20%であり，3 日後にはほぼ死滅した．一方，AFP を添加した EC 溶液で保存された細胞の 1 日後の生存率は AFPI-III で 80%，AFGP で 50%であった．AFPI および III で保存された細胞は 5 日後であっても約 60%が生存可能であり，高い細胞生存率が確認された．以上の知見をまとめると，AFP は細胞膜表面に結合し，細胞内イオンの漏出・細胞外イオンの流入を抑制することにより，細胞の膨張・破裂を遅らせて，低温下での細胞の生存期間を延長すると考えられる（図 4）.

AFP の細胞保護効果は，臓器移植に用いられる保存液の改善や繁殖工学分野での応用が期待されており，これら応用を目指した基礎研究も実施されてきた．例えば，心臓は保存可能な期間が短いことで知られ，ヒトの場合 4 時間程度しか保存ができない．Amir らは，AFPI および III を用いてラットの心臓を −1.3℃下で 24〜32 時間保存する実験を実施した（Amir et al., 2004）．その結果，AFP 不含の保存液を使用した場合，心臓は凍結したが，AFP 含有の保存液で保存した場合，心臓を凍結させずに保存できた．AFPI あるいは AFPIII（15 mg/ml）はラットの心臓を −1.3℃下で 32 時間保存可能にすることが示された．さらに，Ideta らはウシの 7 日齢胚を AFPIII 含有保存液に浸漬し 4℃下で保存したところ 10 日後でも生存可能になること，AFP で 4℃保存した受精

卵を代理母に移植させたところ仔牛が誕生したことを報告した（Ideta et al., 2015）．また倉持らは，線虫（*Caenorhabditis elegans*）を用いて動物個体レベルでの魚類 AFPIII と微生物 AFP（南極子嚢菌由来 *Anp*AFP，雪腐病菌（担子菌）由来 *Tis*AFP8）の細胞保護効果を報告した（Kuramochi et al., 2019）．各 AFP の TH 活性の強さは *Tis*AFP8 ＞ *Anp*AFP ＞魚類 AFP である．各 AFP を体壁の筋肉に発現させた線虫を低温ショック条件（0℃・−2℃）および凍結条件（−5℃）で 1 日保存後，線虫の生存率を測定した．その結果，AFP を発現していない線虫（コントロール）の 1 日保存後の生存率は 20%（0℃），10%（−2℃），6%（−5℃）であった．一方，中活性型の魚類 AFPIII を発現させた線虫は，−5℃の凍結条件において，コントロールと比較して有意に高い生存率（19%）を示した．また，中活性型の *Anp*AFP を発現させた線虫は 1 日保存後の生存率が 50%（0℃），30%（−2℃），32%（−5℃）であり，保存温度に関わらず有意な生存率の向上が確認された．さらに，高活性型の *Tis*AFP8 を発現した線虫は，いずれの保存温度においても 1 日保存後に約 70%が生存可能であり，最も高い生存率を示した．従って，いずれの AFP も凍結条件（−5℃）下では，氷結晶の成長による細胞の破壊から線虫を保護し，線虫に耐凍性を与えると考えられる．このことは，AFP の TH 活性の強さと線虫の生存率の高さに相関が見られたことからも支持される．また，微生物 AFP は低温ショック（0℃・−2℃）条件においても線虫の生存率を向上させたことから，細胞膜を保護し低温障害から線虫を保護することが示唆された．

5．昆虫 AFP の細胞保護機能

一方，高活性型である昆虫 AFP も非凍結温度下において細胞保護機能を有するのか否かは不明のままであった．また，過冷却温度下での非凍結保存が可能であれば，氷結晶による細胞破壊を避けつつ，低温により細胞の代謝を最低限まで抑制することにより，細胞の保存期間を延長できる可能性がある（Brockbank et al., 2020）．しかしながら，過冷却温度下の非凍結条件における AFP の細胞レベルの保護効果は検討されていなかった．そこで我々は昆虫 AFP を用いて，4℃および過冷却温度下における細胞保護効果を調べた（Yamauchi et al., 2021）．

AFP の細胞保護効果を比較検討するために，魚類 AFPI-III，昆虫 *Tm*AFP，コントロールタンパク質としてウシ血清アルブミン（Bovine Serum Albumin，BSA）の 5 種類のタンパク質を用意した．なお，AFP はいずれも天然物（アイソフォーム混合物）を使用した．これらのタンパク質を EC 溶液に対して 0.02–2.5 mM となるように溶解した保存液に RIN-5F 細胞を浸漬し，4℃，−2℃，−5℃下で 1〜20 日間保存した．保存前後の生細胞数は，死細胞を染色するトリパンブルー法により測定し，細胞生存率（保存後の生細胞数密度/保存前の生細胞数密度）を算出した．AFP の細胞保護効果の強さは保存後の細胞生存率から判断した．まず *Tm*AFP が非凍結温度（4℃）および過冷却温度（−2℃と−5℃）下において細胞保護効果を有するか調べた（図 5A）．4℃下で 1 日保存後の RIN-5F 細胞の生存率は，AFP なし（EC）の時 12%であった．また−2℃および−5℃下で保存した細胞はほぼ全て死滅した．一方，*Tm*AFP 溶液で保存した場合は，AFP の濃度に依存して RIN-5F 細胞の生存率は飽和曲線様に上昇した．そして，保存温度（4℃，−2℃，−5℃）に関わらず，*Tm*AFP 濃度が 1.5 mM 以上の時に生存率は 90%以上に達した．この結果から，昆虫 AFP も細胞保護機能を有することが明らかとなった．続いて，細胞保存に十分な濃度と判断された 1.5 mM の各 AFP を含む EC 溶液を用いて，魚類 AFP と *Tm*AFP の細胞保護効果を比較した．*Tm*AFP は魚類 AFPI-III よりも全ての保存温度（4℃，−2℃，−5℃）および保存期間（1〜20 日）において常に高い生存率を示した（図 5B）．特に *Tm*AFP を用いて−5℃で保存した RIN-5F 細胞は最も高い生存率を示し，20 日保存後の細胞生存率も 20%であった．ここで我々は保存液を検討することにより，保存後の細胞生存率をさらに向上できるのではないかと考えた．University of Wisconsin（UW）液は臓器移植に汎用される保存液の 1 つであり，EC 溶液に比較して細胞を保護するのに適する様々な物質（ATP や抗酸化物質）を含む．この UW 液に 1.5 mM となるよう *Tm*AFP を加えた溶液で，RIN-5F 細胞を−5℃下で保存したところ，20 日間保存後の生存率は 53%と極めて高い値を示した（図 5C）．以上の結果から，昆虫 AFP は魚類 AFP に比べて高い細胞保護効果を有すること，昆虫 AFP は過冷却温度域で哺乳動物細胞を長期間生存可能にすることが示された．

なぜ昆虫 AFP は魚類 AFP に比べて高い細胞保護効果を発揮できたのだろうか．昆虫 AFP の特徴は，1）分子表面に単結晶氷を構成する水分子と配置が一致するような高度に組織化された氷様の水和水を有すること，2）その結果，魚類 AFP に比べてより多くの氷結晶面に結合できること，3）2）により，あらゆる面からの氷の成長を極めて強く抑制でき過冷却状態を安定化できることが挙げられる（本稿 3 章および津田の稿参照）．興味深

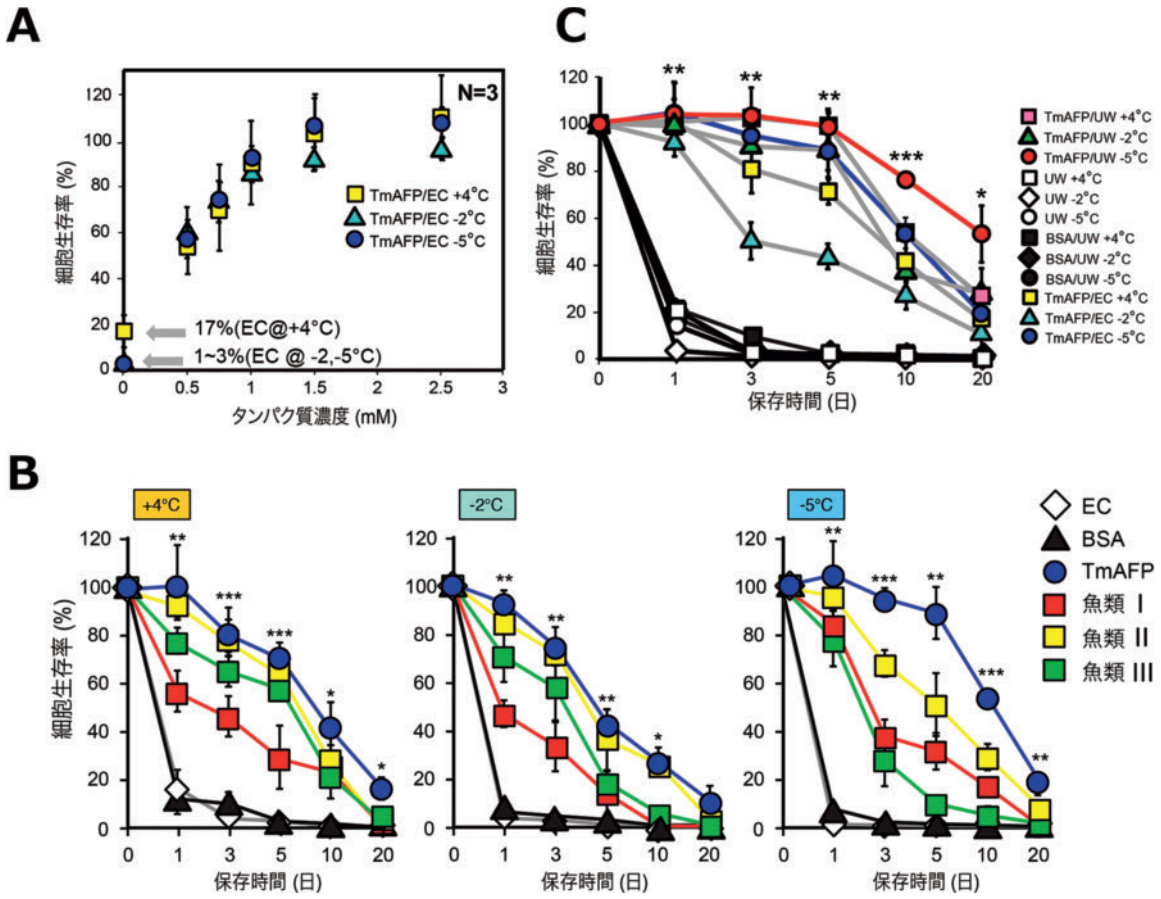


図 5：昆虫 AFP の細胞保護機能.
（A）*Tm*AFP の細胞保護効果．ラット膵島細胞株 RIN-5F 細胞を 0–2.5 mM の *Tm*AFP を含む EC 溶液に浸漬し，4℃，−2℃，−5℃下で 1 日保存後の細胞生存率を示す．*Tm*AFP は細胞保護機能を有し，その効果は 1.5 mM 以上の濃度で最大となる．（B）魚類 AFPI-III と *Tm*AFP の細胞保護機能の比較．RIN-5F 細胞を 1.5 mM のタンパク質を含む EC 溶液に浸漬し，4℃，−2℃，−5℃下で 1～20 日保存後の細胞生存率を示す．*Tm*AFP はいずれの保存温度（4℃，−2℃，−5℃），保存期間（1～20 日）においても最も高い生存率を示した．（C）*Tm*AFP 含有 UW 溶液で保存された RIN-5F 細胞の生存率．*Tm*AFP 含有 UW 溶液で −5℃保存された RIN-5F 細胞は 20 日後でも 53%が生存可能となった．EC：Euro-Collins 溶液，UW：University of Wisconsin 溶液.
*p ＜ 0.05，**p ＜ 0.01，***p ＜ 0.001．Yamauchi et al., 2021 を一部変更して引用.

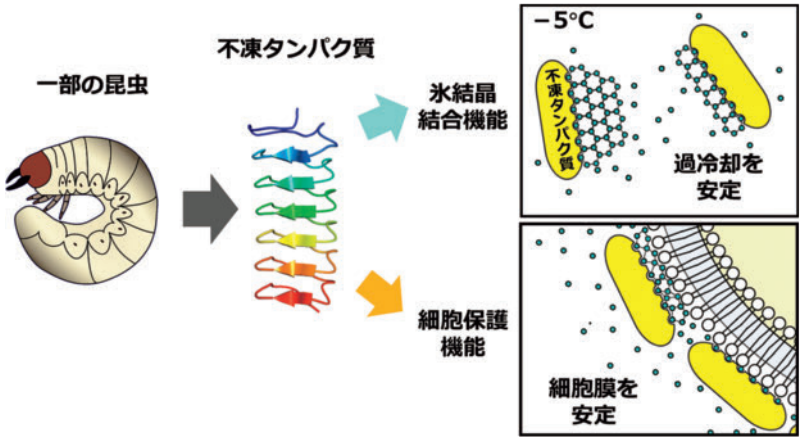


図 6：昆虫 AFP の氷結晶結合機能と細胞保護機能.
AFP は氷結晶結合機能により凍結を防ぎつつ，細胞保護機能により低温障害から細胞を保護し，寒冷地に生息する昆虫の生存に寄与すると考えられる.

いことに，シミュレーション実験により，動物細胞の細胞膜主成分であるホスファチジルコリン（PC）で構成されたモデル膜上にも，氷様の構造の水分子ネットワークが観察されている（Murzyn et al., 2006; Hsieh & Wu, 1996）．これらを考え合わせると，AFP は氷に結合するときと同様のメカニズムにより，その分子表面に宿した氷様の水和水を介して細胞膜に結合するという仮説が考えられる．昆虫 AFP はより多くの結晶面に結合可能な高活性型 AFP であるため，細胞膜上の水分子を認識しやすく細胞膜への親和性が上昇した可能性が考えられる．そして，昆虫 AFP は TH 活性が高い，すなわち氷結晶の成長を極めて強く抑制できるため，過冷却保存実験の条件（−2℃・−5℃）下では過冷却安定化に寄与したと予想される．以上より，昆虫 AFP は氷結晶結合機能により過冷却を安定化しながら，細胞膜保護機能により細胞膜を保護し低温障害から細胞を守ることにより，過冷却温度下において細胞の生存期間を延長したと推察される（図 6）．

6．おわりに

本稿では，昆虫 AFP で得られた最近の知見を中心に，AFP の氷結晶結合機能および細胞保護機能について概説した．AFP の両機能は昆虫の凍結回避や低温障害から細胞を保護する役割を果たしており，昆虫の低温環境下における生命維持に重要なことが示唆される．我々は日本産越冬昆虫の 1 つとしてオオクワガタに着目し，その AFP がオオクワガタの凍結回避に果たす役割を明らかにした．オオクワガタの他にも，日本には数多くの越冬昆虫が生息しており，それら越冬昆虫の低温適応へ AFP がどのように関与するのかについても，今後徐々に明らかにされていくだろう．また，昆虫 AFP も魚類 AFP と同様に低温下において細胞保護機能を発揮することも明らかとなった．AFP は生物種によりその立体構造が異なるにも関らず，複数種で細胞保護効果が認められる．このことは，AFP に共通する氷結晶結合特性が細胞保護効果に重要だという考えを想起させる．一方で，AFP が細胞膜のどの部位と相互作用しているのか，AFP のどのアミノ酸が細胞膜結合に関与するかの完全な同定には至っておらず，AFP-細胞膜の相互作用メカニズムを解明するためには更なる研究が必要である．AFP の構造・氷結晶結合機能と細胞保護機能にどのような関係があるのか，今後の研究のさらなる進展が望まれる．

謝辞

本研究を進めるにあたり，株式会社ニチレイ　小泉雄史氏，井上　敏文氏，石井寛崇氏から多くのご協力を賜りました．不凍タンパク質の精製は産業技術総合研究所三浦　愛氏にご協力頂きました．また本研究を進めるにあたり，近藤英昌氏，新井達也氏，佐々木祐次氏には大変お世話になりました．本研究にご協力を頂いた全ての方々に心より感謝申し上げます．

参考文献

Amir, G., Horowitz, L., Rubinsky, B., Yousif, B.S., Lavee, J. & Smolinsky, A.K. (2004). Subzero nonfreezing cryopreservation of rat hearts using antifreeze protein I and antifreeze protein III. *Cryobiol*, **48**, 273–282. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2004.02.009

Arai, T., Yamauchi, A., Miura, A., Kondo, H., Nishimiya, Y., Sasaki, Y.C. & Tsuda, S. (2021). Discovery of hyperactive antifreeze protein from phylogenetically distant beetles questions its evolutionary origin. *Int J Mol Sci,* **22**(7), 3637. Doi: 10.3390/ijms22073637.

Asahina, E. & Ohyama, Y. (1969). Cold Resistance in insects wintering in decayed wood. *Low Temperature Science (Hokkaido University Library),* **27**, 143–152. http://hdl.handle.net/2115/17760.

Barrett, J. (2001). Thermal hysteresis proteins. *Int J Biochem Cell Biol,* **33**, 105–117. Doi: 10.1016/s1357-2725(00)00083-2.

Basu, K., Garnham, C.P., Nishimiya, Y., Tsuda, S., Braslavsky, I. & Davies, P. (2014) Determining the ice-binding planes of antifreeze proteins by fluorescence-based ice plane affinity. *JoVE*, **83**, e51185. Doi: 10.3791/51185.

Boutilier, R.G. (2001). Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *J Exp Biol*, **204**, 3171–3181. Doi: 10.1242/jeb.204.18.3171.

Brockbank, K.G.M., Duman, J.D., Chen, Z., Greene, E.D., Vu, H. M. & Campbell, L. H. (2020). Cell, tissue, and organ preservation with insect-derived antifreeze proteins. In *Antifreeze Proteins*; Ramløv, H., Eriis, D.S., Eds.; Springer Nature: Cham, Switzerland, Volume 2, pp. 261–285.

Celik, Y., Graham, L.A., Mok, Y.F., Bar, M., Davies, P.L. & Braslavsky, I. (2010). Superheating of ice crystals in antifreeze protein solutions. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**, 5423–5428. Doi: 10.1073/pnas.0909456107.

Davies, P. L. (2014). Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth. *Trends Biochem Sci*, **39**, 548–555. Doi: 10.1016/j.tibs.2014.09.005.

Davies, P. L. (2017). Ice-binding proteins: A remarkable

diversity of structures for stopping and starting ice growth. *TiBS*, **39**, 548–555. Doi: 10.1016/j.tibs.2014.09.005

DeVries, A.L. & Wohlschlag, D.E. (1969). Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science*, **163**, 1073–1075. Doi: 10.1126/science.163.3871.1073.

Duman, J. G. (1982). Insect antifreezes and ice-nucleating agents. *Cryobiol*, **19**, 613–627. Doi: 10.1016/0011-2240(82)90191-2.

Duman, J.G. (2001). Antifreeze and Ice Nucleator Proteins in Terrestrial Arthropods. *Annu Rev Physiol*, **63**, 327–357. Doi: 10.1146/annurev.physiol.63.1.327.

Duman, J. G., & Newton, S. S. (2020). Insect antifreeze proteins. In *Antifreeze Proteins Volume 1: Environment, Systematics and Evolution* (pp. 131–187). Springer International Publishing. Doi: 10.1007/978-3-030-41929-5_6.

Duman, J. G.; Verleye, N. L.-D.; Goetz, F. W.; Wu, D. W.; Andorfer, C. A.; Benjamin, T.; Parmelee, D. D. (1998). Molecular characterization and sequencing of antifreeze proteins from larvae of the beetle *Dendroides canadensis*. *J. Comp. Physiol.* B, *168*, 225–232. Doi: 10.1007/s003600050140.

Chakraborty, S. & Jana, B. (2018). Optimum number of anchored clathrate water and its instantaneous fluctuations dictate ice plane recognition specificities of insect antifreeze protein. *J Phys Chem B*, **122**, 3056–3067. Doi: 10.1021/acs.jpcb.8b00548.

Graether, S.P.; Kuiper, M.J.; Gagné, S.M.; Walker, V.K.; Jia, Z.; Sykes, B.D.; Davies, P.L. (2000). β-helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect. *Nature*, 406, 325–328. Doi: 10.1038/35018610.

Graether, S.P. & Sykes, B.D. (2004). Cold survival in freeze-intolerant insects: The structure and function of β-helical antifreeze proteins. *Eur J Biochem*, **271**, 3285–3296. Doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04256.x.

Garnham, C. P., Campbell, R. L., & Davies, P. L. (2011) Anchored clathrate waters bind antifreeze proteins to ice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **108**, 7363–7367. Doi: 10.1073/pnas.1100429108.

Graham, L.A. & Davies, P.L. (2005). Glycine-rich antifreeze proteins from snow fleas. *Science*, **310**, 461. Doi: 10.1126/science.1115145.

Graham, L. A., Gauthier, S. Y., & Davies, P. L. (2022) Origin of an antifreeze protein gene in response to Cenozoic climate change. *Sci Rep*, **12**, 8536. Doi: 10.1038/s41598-022-12446-4.

Graham, L.A., Liou, Y.-C., Walker, V.K. & Davies, P.L. (1997). Hyperactive antifreeze protein from beetles. *Nature*, **388**, 727–728. Doi: 10.1038/41908.

Hays, L.M., Feeney, R.E., Crowe, L.M., Crowe, J.H. & Oliver, A. E. (1996). Antifreeze glycoproteins inhibit leakage from liposomes during thermotropic phase transitions. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 6835–6840. Doi: 10.1073/pnas.93.13.6835.

Hew, C.L. & Yang, D.S.C. (1992). Protein interaction with ice. *Eur J Biochem*, **203**, 33–42. Doi: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb19824.x.

Hirano, Y., Nishimiya, Y., Kowate, K., Mizutani, F., Tsuda, S. & Komatsu, Y. (2008). Construction of time-lapse scanning electrochemical microscopy with temperature control and its application to evaluate the preservation effects of antifreeze proteins on living cells. *Anal Chem*, **80**, 9349–9354. Doi: 10.1021/ac8018334.

Hirano, Y., Nishimiya, Y., Matsumoto, S., Matsushita, M., Todo, S., Miura, A., Komatsu, Y. & Tsuda, S. (2008). Hypothermic preservation effect on mammalian cells of type III antifreeze proteins from notched-fin eelpout, Cryobiol, **57**, 46–51. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2008.05.006.

Hochachka, P. W. (1986). Defence strategies against hypoxia and hypothermia. *Science*, **231**, 234–241. Doi: 10.1126/science.2417316.

Hsieh, C.-H. & Wu, W.-G. (1996). Structure and dynamics of primary hydration shell of phosphatidylcholine bilayers at subzero temperatures. *Biophys J*, **71**, 3278–3287. Doi: 10.1016/S0006-3495(96)79520-6

Ideta, A., Aoyagi, Y., Tsuchiya, K., Nakamura, Y., Hayama, K., Shirasawa, A., Sakaguchi, K., Tominaga, N., Nishimiya, Y. & Tsuda, S. (2015). Prolonging hypothermic storage (4C) of bovine embryos with fish antifreeze protein, *J Reprod Dev*, **61**, 1–6. Doi: 10.1262/jrd.2014-073.

Kamijima, T., Sakashita, M., Miura, A., Nishimiya, Y. & Tsuda, S. (2013). Antifreeze protein prolongs the life-time of insulinoma cells during hypothermic preservation. *PLoS One*, **8**, e73643. Doi: 10.1371/journal.pone.0073643.

Kristiansen, E., Pedersen, S., Ramløv, H. & Zachariassen, K.E. (1999). Antifreeze activity in the cerambycid beetle *Rhagium inquisitor*. *J Comp Physiol B*, **169**, 55e60. Doi: 10.1007/s003600050193.

Kristiansen, E., Ramløv, H., Højrup, P., Pedersen, S.A., Hagen, L. & Zachariassen, K.E. (2011). Structural characteristics of a novel antifreeze protein from the longhorn beetle *Rhagium inquisitor*. *Insect Biochem Mol Biol*, **41**, 109–117. Doi: 10.1016/j.ibmb.2010.11.002.

Kristiansen, E. & Zachariassen, K.E. (2005). The mechanism by which fish antifreeze proteins cause thermal hysteresis. *Cryobiol*, **51**, 262–280. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2005.07.007.

Lin, F.-H., Davies, P.L. & Graham, L.A. (2011). The Thr- and Ala-rich hyperactive antifreeze protein from Inchworm folds as a flat silk-like β-helix. *Biochemistry*, **50**, 4467–4478. Doi: 10.1021/bi2003108.

Liou, Y.-C., Thibault, P., Walker, V.K., Davies, P.L. & Graham, L.A. (1999). A complex family of highly heterogeneous and internally repetitive hyperactive antifreeze proteins from the beetle *Tenebrio molitor*. *Biochemistry*, **38**, 11415–11424. Doi: 10.1021/bi990613s.

Liou, Y.-C., Daley, M.E., Graham, L.A., Kay, C.M., Walker, V.K., Sykes, B.D. & Davies, P.L. (2000). Folding and structural

characterization of highly disulfide-bonded beetle antifreeze protein produced in bacteria. *Protin Expr Purif*, **19**, 148–157. Doi: 10.1006/prep.2000.1219.

Liou, Y.-C; Tociij, A.; Davies, P.L.; Jia, Z. (2000). Mimicry of ice structure by surface hydroxyls and water of a β-helix antifreeze protein. *Nature*, *406*, 322–324. Doi: 10.1038/35018604.

Ma Y., Hou, F. & Ma, J. (2009). Seasonal changes in cold tolerance of desert beetle *Anatolica polita borealis* (*Coleoptera: Tenebrionidae*) and their physiological mechanisms. *Acta Entomol Sin*, **52**, 372–379. Doi: 10.16380/J.KCXB.2009.04.004.

Mahatabuddin, S. & Tsuda, S. (2018). Applications of Antifreeze proteins: Practical use of the quality products from Japanese fishes. *Adv Exp Med Biol*, **1081**, 321–327. Doi: 10.1007/978-981-13-1244-1_17.

Murzyn, K., Zhao, W., Karttunen, M., Kurdziel, M. & Róg, T. (2006). Dynamics of water at membrane surface: Effect of headgroup structure. *Biointerphases*, **1**, 98–105. Doi: 10.1116/1.2354573

Mok, Y.F., Lin, F.H., Graham, L.A., Celik, Y., Braslavsky, I. & Davies, P.L. (2010). Structural basis for the superior activity of the large isoform of snow flea antifreeze protein. *Biochemistry*, **49**, 2593–2603. Doi: 10.1021/bi901929n.

Nickel, A., Kohlhaas, M. & Maack, C. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *J Mol Cell Cardiol*, **73**, 26–33. Doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.03.011.

Olijve, L.C., Meister, K., DeVries, A.L., Duman, J.G., Guo, S., Bakker, H.J. & Voets, I.K. (2016). Blocking rapid ice crystal growth through nonbasal plane adsorption of antifreeze proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 3740–3745. Doi: 10.1073/pnas.1524109113.

Pentelute, B.L., Gates, Z.P., Tereshko, V., Dashnau, J.L., Vanderkooi, J.M., Kossiakoff, A.A. & Kent, S.B. (2008). X-ray structure of snow flea antifreeze protein determined by racemic crystallization of synthetic protein enantiomers. *J Am Chem Soc*, **130**, 9695–9701. Doi: 10.1021/ja8013538.

Qin, M. Hypothermic preservation of Hepatocytes. (2003). *Biotechnol Prog*, **19**, 1118–1127. Doi: 10.1021/bp025628n.

Qiu, L., Wang, Y., Wang, J., Zhang, F. & Ma, J. (2010). Expression of biologically active recombinant antifreeze protein His-MpAFP149 from the desert beetle (*Microdera punctipennis dzungarica*) in *Escherichia coli*. *Mol Biol Reports*, **37**, 1725–1732. Doi: 10.1007/s11033-009-9594-3.

Quinn, P.J. (1985). A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiol*, **22**, 128–146. Doi: 10.1016/0011-2240(85)90167-1.

Sun, W., Wang, Z., Cao, J., Cui, H. & Ma, Z. (2016). Cold stress increase reactive oxygen species formation via TRPA1 activation in A549 cells. *Cell Stress Chaperones*, **21**, 367–372. Doi: 10.1007/s12192-015-0663-3.

Rahman, A.T., Arai, T., Yamauchi, A., Miura, A., Kondo, H., Ohyama, Y. & Tsuda, S. (2019). Ice recrystallization is strongly inhibited when antifreeze proteins bind to multiple ice planes. *Sci Rep*, **9**, 2212. Doi: 10.1038/s41598-018-36546-2.

Rubinsky, B. (2003). Principles of low temperature cell preservation. *Heart Fail Rev*, **8**, 277–284. Doi: 10.1023/a:1024734003814.

Rubinsky, B., Arav, A., Mattioli, M. & Devries, A.L. (1990). The effect of antifreeze glycopeptides on membrane-potential changes at hypothermic temperatures. Biochem Biophys Res Commun, **173**, 1369–1374. Doi: 10.1016/s0006-291x(05)80939-8.

Rubinsky, B., A. Arav, G.L. Fletcher, (1991). Hypothermic protection - a fundamental property of "antifreeze protein". *Biochem Biophys Res Commun*, **180**, 566–571. Doi: 10.1016/s0006-291x(05)81102-7.

Rubinsky, B., M. Mattioil, A. Arav, B. Barboni, G.L. Fletcher, G.L. (1992). Inhibition of Ca^{2+} and K^{+} currents by "antifreeze" proteins. *Am J Physiol*, **262**, R542-R545. Doi: 10.1152/ajpregu.1992.262.3.R542.

Scholl, C.L.; Tsuda, S.; Graham, L.A.; Davies, P.L. (2021). Crystal waters on the nine polyproline type II helicalbundle springtail antifreeze protein from *Granisotoma rainieri* match the ice lattice. *FEBS J*, **288**, 15717. Doi: 10.1111/febs.15717.

Scotter, A.J., Marshall, C.B., Graham, L.A, Gilbert, J.A., Garnham, C.P. & Davies, P.L. (2006). The basis for hyperactivity of antifreeze proteins. *Cryobiol*, **53**, 229–239. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2006.06.006.

Takamichi, M., Nishimiya, Y., Miura, A. & Tsuda, S. (2007). Effect of annealing time of an ice crystal on the activity of type III antifreeze protein. *FEBS J,* **274**, 6469–6476. Doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06164.x.

Takamichi, M., Nishimiya, Y., Miura, A. & Tsuda, S. (2009). Fully active QAE isoform confers thermal hysteresis activity on a defective SP isoform of type III antifreeze protein. *FEBS J*, **276**, 1471–1479. Doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.06887.x.

Tomczak, M.M., Hincha, D.K., Estrada, S.D., Wolkers, W.F., Crowe, L.M., Feeney, R.E., Tablin, F. & Crowe, J.H. (2002). A mechanism for stabilization of membranes at low temperatures by an antifreeze protein. *Biophys J*, **82**, 874–881. Doi: 10.1016/S0006-3495(02)75449-0.

Tyshenko, M.G., Doucet, D., Davies, P.L. & Walker, V.K. (1997). The antifreeze potential of the spruce budworm thermal hysteresis protein. *Nature Biotechnol*, **15**, 887–890.

Voets, I.K. (2017). From ice-binding proteins to bio-inspired antifreeze materials. *Soft Matter*, **12**, 4808–4823, Doi: 10.1039/c6sm02867e.

Vrielink, A.S.O., Aloi, A. & Olijve, L.L.C. (2016). Interaction of ice binding proteins with ice, water and ions. *Biointerphases*, **11**, 018906. Doi: 10.1116/1.4939462.

Wu, Y., Banoub, J., Goddard, S.V., Kao, M.H. & Fletcher, G.L. (2001). Antifreeze glycoproteins: relationship between

molecular weight, thermal hysteresis and the inhibition of leakage from liposomes during thermotropic phase transition. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **128**, 265–273. Doi: 10.1016/s1096-4959(00)00323-7.

Yamauchi, A., Miura, A., Kondo, H., Arai, T., Sasaki, Y.C. & Tsuda, S. (2021). Subzero nonfreezing hypothermia with insect antifreeze protein dramatically improves survival rate of mammalian cells. *Int J Mol Sci*, **22**(23) 12680. Doi: 10.3390/ijms222312680.

Yamauchi, A., Arai, T., Kondo, H., Sasaki, Y.C., and Tsuda, S. (2020). An ice-binding protein from an Antarctic ascomycete is fine-tuned to bind to specific water molecules located in the ice prism planes. *Biomolecules,* **10**(5), 759. Doi: 10.3390/biom10050759.

Zachariassen, K.E. & Husby, J.A. (1982). Antifreeze effect of thermal hysteresis agents protects highly supercooled insects. *Nature*, **298**, 865e867. Doi: 10.1038/298865a0

Zachariassen, K.E. & Kristiansen, E. (2000). Ice nucleation and antinucleation in nature. *Cryobiol*, **41**, 257–279. Doi: 10.1006/cryo.2000.2289.