

平成21年 6月10日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19560206

研究課題名（和文） 不凍化蛋白質による微小領域内の氷成長阻害に関する研究

研究課題名（英文） Studies on the inhibition of ice crystal growth in narrow regions by antifreeze protein

研究代表者

萩原 良道 (HAGIWARA YOSHIMICHI)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授

研究者番号：50144332

研究成果の概要：

近赤外光の強度が水温に依存することを利用し、水と氷の温度を非接触で測定する方法を確立した。この方法により、きわめて狭い領域における不凍化蛋白質水溶液中を成長する氷近傍の温度計測を行った。また蛋白質濃度の計測を行い、温度低下や濃度上昇の特徴を明らかにした。1ないし数個の蛋白質モデルと氷核を含む過冷却水の分子動力学解析を行い、氷表面と蛋白質の相互作用に関する蛋白質中のアミノ酸残基の役割を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：輸送現象

科研費の分科・細目：機械工学・熱工学

キーワード：(1) 蛋白質 (2) 結晶成長 (3) 不凍化 (4) 熱工学

## 1. 研究開始当初の背景

近年、食品や食材の冷凍・冷蔵保存量が飛躍的に増加しており、省エネルギー化や生産・保存の安全性が求められてきた。また医療における低温手術や臓器保存の機会が増え、組織や臓器を長時間保持する方法の開発が必要とされてきた。このためには、対象物に含まれる水が氷に変化することによる、溶質濃度の変化や細胞・組織の破壊を最小限に食い止めることが必要不可欠である。この氷結晶の

成長抑制には、急速冷凍などの冷凍方法の改善が行われていたが、エネルギー消費は少なくなかった。他の抑制法として、相変化に影響を与えかつ安全な添加物が有力視されていた。添加物の中では、不凍化蛋白質が注目を集めていた。不凍化蛋白質は食塩と異なり、融点を下げずに凝固点を下げるので、その間の温度に設定することにより、氷結晶の成長を容易に制御できるからである。

国内外において、主として化学者や生化学者により、この蛋白質に関する多くの研究が

なされた。これらは、氷の結晶成長を阻害するメカニズム、不凍化蛋白質の構造、不凍化蛋白質を持つ動植物の発見、動植物の品種改良など、多岐にわたっていた。氷成長阻害の解明に関する研究に限っても、その手法は、分子動力学解析、電子顕微鏡による氷表面計測、氷の形状の時間変化測定など多様であった。しかしながら、得られた結果を基にした考察においては、蛋白質のアミノ酸残基の果たす役割に関する仮説に相反するものがあつた。したがって、氷成長阻害のメカニズムは不明であった。

研究代表者は、このような状況に鑑み、また伝熱学に関する研究経験と前述の社会的意義を考慮して、平成 14 年から不凍化蛋白質による氷成長阻害のメカニズム解明を目的とした分子動力学解析と計測を開始した。平成 19 年までに、以下の結果を得た。

顕微鏡のステージに置かれた冷却器に取り付けた 2 枚のカバーガラス間の狭い領域における不凍化蛋白質タイプ I の主成分である HPLC6 の水溶液の測定を行い、蛋白質の濃度、氷-水界面の形状と移動速度の結果を得た。これらの結果により、凝固点降下は蛋白質濃度に比例しないこと、濃度の増加につれて界面は細かな鋸刃状に変化すること、蛋白質は界面に沿って動くこと、会合した蛋白質は水中に液体の細長い領域を残すことを明らかにした。また、不凍化蛋白質タイプ I の一部を模擬するモデル、氷核、過冷却水の混合体に関する分子動力学解析を行い、親水性アミノ酸残基の運動、およびその残基と水中の水分子あるいは氷核中の水分子との相互作用が、水分子の氷界面への接近を阻害することを明らかにした。

## 2. 研究の目的

以上の研究成果をもとに考察を重ねた結果、不凍化蛋白質の機能の解明には、①植物の導管や魚の毛細血管といった、極めて狭い領域における氷結晶と活性状態の蛋白質の相互作用を計測すること、②そのために、非接触かつ微小領域における温度測定法を確立すること、③分子動力学解析結果を踏まえつつ、マイクロスケールの凝固過程の数値シミュレーションを実行すること、が必要不可欠であると結論付けた。これらが本申請研究の目的である。

## 3. 研究の方法

低温恒温室内に置かれた現有の生物用高性能顕微鏡のステージに電子冷却装置（ペルチェ冷却器）を設置し、銅板を介して HPLC6

希薄水溶液 20  $\mu$  リットルを冷却した。きわめて狭い間隔に保持された 2 枚のカバーガラスを用いて、資料を保持した。これにより、導管や毛細血管の内径に近い液体厚さを実現した（図 1 参照）。カバーガラスにはさまれた水溶液の冷却により、1 方向に氷が成長することを確認した。

設備備品として購入した近赤外分光器を光ファイバーにより顕微鏡に接続し、顕微鏡観察領域のごく一部の水溶液を通過する近赤外光のスペクトル強度を測定した。その強度から水溶液の温度を求めた。同様に氷の温度も測定した。顕微鏡に接続した CCD カメラにより、氷-水溶液界面の画像を取り込んだ。連続画像を処理して、界面位置と温度を同時に測定した。

HPLC6 の一部の分子に蛍光分子 FITC を付与し、顕微鏡に備え付けの水銀ランプの照射により蛍光を発するようにした。顕微鏡に接続した CCD カメラにより、蛍光と氷-水溶液界面の画像を取り込んだ。連続画像を処理して、界面位置と蛍光強度分布の移動速度を求めた。蛍光強度から不凍化蛋白質の濃度を推定した。

分子動力学解析に関しては、HPLC6 の 3 分の 1 に相当する 12 個のアミノ酸残基からなるポリペプチドモデルを作成した。また氷との水素結合に関与しているとされる特定の親水性アミノ酸残基（トレオニン残基）を別の残基に置き換えた変異蛋白質のモデルも 2 種類作成した。これらを含む水、あるいは氷-水混合系に関する分子動力学シミュレーションを行った。得られる統計量を比較し、モデルの側鎖サイトがその周辺の水分子へ及ぼす影響について検証した。さらに、HPLC6 全体のモデルを作成して、同様の分子動力学解析を行った。

分子動力学解析では、マイクロスケールの測定系の熱的境界条件や氷結晶面の予測は困難である。そこで計測対象であるカバーガラスに挟まれた水溶液の凝固を予測でき数値計算法を開発をめざし、相変化を予測できる Phase Field 法を組み込んだ数値シミュレーションプログラムを作成し、これを実行して得られた結果を検討した。

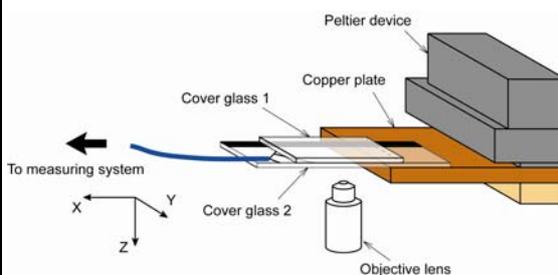


図 1 冷却測定部の詳細

#### 4. 研究成果

2枚のカバーガラスに挟まれた蛋白質水溶液の厚みを20 $\mu\text{m}$ まで狭くすることが可能となった。電子冷却器を調節して、氷の成長速度を3 $\mu\text{m/s}$ まで下げることができた。これらの値は、文献に見られる最低値に相当する。

純水を冷却した場合には、氷と水の界面は平坦で、冷却方向に垂直であり、厚み方向には一様であった。これより、一方向冷却が実現できることが確認された。他方、不凍化蛋白質水溶液を冷却した場合には、氷の表面は鋸刃状になり、場合によっては刃元部から氷の内部に細長い液体領域が残ることが観察された。

光ファイバーとピンホールを用いて、約0.001 $\text{mm}^2$ の極小領域内の蛋白質水溶液あるいは氷の近赤外光強度、したがって温度を計測できることが明らかになった。これにより、氷表面近傍の液体温度の非接触計測が可能であることが示された。なお、熱電対との同時測定を行った検定実験結果より、温度のばらつきは標準偏差0.12 $^{\circ}\text{C}$ の範囲であり、近赤外光強度による温度測定の精度は高いことが実証された。

温度測定結果の一例を図2に示す。図中のTiaは鋸刃状界面の刃先の温度と純水の氷表面近傍温度Tpwとの差を、Tibは鋸刃状界面の刃元の温度とTpwとの差を、それぞれ表す。横軸は氷成長速度を表す。図より、刃先の温度は純水の氷表面温度よりも低いこと、刃元の温度は、刃先や純水の氷表面温度よりもさらに低いこと、このような温度低下は氷の成長速度が速いほどより顕著になること、が明らかになった。

HPLC6水溶液の厚みが薄いため、HPLC6に付与した蛍光分子の蛍光強度は、HPLC6の濃度に比例すると考えられる。そこで、蛍光強度から蛋白質濃度を推定した。連続画像を処理した結果、鋸刃状界面の刃先よりも刃元のほうが、より濃度が高いという結果を得た。

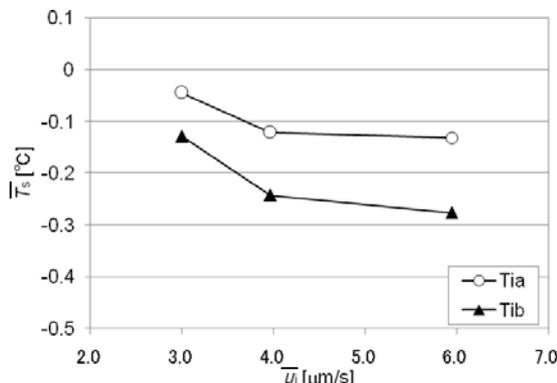


図2 鋸刃状界面近傍温度の界面速度依存性

濃度勾配によって拡散が生じるという勾配型拡散を仮定して、拡散速度を求めたところ、界面移動速度と異なる結果を得た。このことは、不凍化蛋白質の一部は界面に固着するのではなく、界面と相対運動することを示唆する。

HPLC6の3分の1のモデルと六角柱状の氷結晶を含む過冷却水の分子動力学解析を行った結果に関して、ある時刻のスナップショットを、図3に示す。図の中央が氷結晶であり、細線は氷内部の水分子の近接状態を表す。モデルは氷の右側に位置している。モデルのらせん軸は、初期状態では図の縦方向に平行であったが、図の時刻では約14度傾き、下端のトレオニン残基が氷に最も近い。いっぽう、モデルの上端にあるもう1つのトレオニン残基は、氷表面から遠い。トレオニンをバリンに置換した変異蛋白質のモデル、トレオニンをセリンに置換した別の変異蛋白質モデルも、ともに氷表面への接近は顕著でなかった。これらのことは、氷近傍のタンパク質の振る舞いは原子配置に依存することを示している。このような予測結果は、他者の実験結果と矛盾しない。

凝集した蛋白質を模擬するために、5つのモデルを氷結晶面の近くに配置し、分子動力学解析を行った。その結果、いずれのモデルも、その傾きは小さく、その動きは緩慢であった。このことは、トレオニン残基と氷の相互作用よりも、モデル間の相互作用のほうが大きく、そのためにトレオニン残基が氷に接近できないことを表している。

さらに、HPLC6の全体モデルを作成し、これを氷壁の間にある水の中に投入した系の分子動力学解析を行い、上述の結果と似た結果を得た。

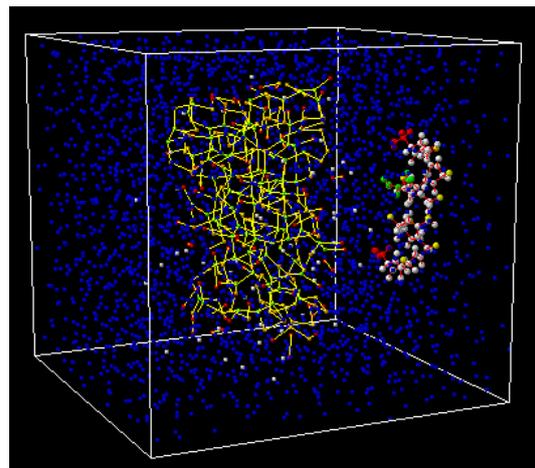


図3 1個のHPLC6の一部をあらわすモデルと、六角柱状の氷結晶を含む過冷却水のスナップショット

相変化を予測できる Phase Field 法を組み込んだ 2 次元数値計算プログラムを開発後、温度・濃度測定に用いた 2 枚のカバーガラスに挟まれた水を冷却した系の温度変化、氷の成長速度、熱流束などの予測を試みた。その結果より、温度分布とその時間変化、および界面移動は、ほぼ妥当であることが明らかになった。このことより、本数値シミュレーションは有望であることが結論付けられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① T. Nobekawa, H. Tanigichi, and Y. Hagiwara, Interaction between a twelve-residue segment of antifreeze protein type I, or its mutants, and water molecules, *Molecular Simulation*, Vol. 34 (2008), No. 3, pp.309 – 325.
- ② T. Nobekawa and Y. Hagiwara, Interaction among a twelve-residue segment of antifreeze protein type I, or its mutants, water and a hexagonal ice crystal, *Molecular Simulation*, Vol. 34 (2008), No. 6, pp.591 – 610.
- ③ Y. Hagiwara, Some biological hints on the control of heat and mass transfer, *J. of Thermal Science and Technology*, Vol. 3 (2008), No. 3, pp.381 – 390.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 立田 健人, 櫻井 亮, 萩原 良道, 二次元 Phase Field Method を用いた水の一方方向凝固に関する数値解析, 第 46 回日本伝熱シンポジウム, 2009 年 6 月 2 日, 京都市国立京都国際会館
- ② R. Sakurai, R. Nakanishi and Y. Hagiwara, 2008, Temperature measurement of antifreeze-protein solution, freezing in a micro-region, using near-infrared spectroscopy, 7th JSME-KSME Thermal and Fluids Engineering Conference, 2008 年 10 月 21 日, 札幌市北海道立道民活動センター.
- ③ 萩原 良道, 櫻井 亮, 中西 力也, 一方方向に凝固しつつある不凍化タンパク質タイプ I 水溶液のタンパク質濃度と温度, 2008 年度日本冷凍空調学会年次大会, 2008 年 10 月 20 日, 大阪市大阪市立大学杉本キャンパス学術情報センター.
- ④ Y. Hagiwara, Effects of antifreeze proteins on the prism faces of a gradually growing ice crystal, *Int. Seminar on Heat Transfer and Fluid Flow*, 2008 年 9 月 22 日, 吹田市大阪大学銀杏会館.
- ⑤ 萩原 良道, 中西 力也, 櫻井 亮, 延川 隆, 氷結晶表面近傍の不凍化タンパク

質タイプ I の凝集と拡散に関する基礎研究, 第 54 回低温生物工学会年会, 2008 年 6 月 14 日, 石川県石川郡野々市町石川県立大学.

- ⑥ 早狩 浩平, 谷口 比呂美, 丸山 善也, 萩原 良道, 不凍化タンパク質変異体と氷核を含む水の分子動力学解析, 第 45 回日本伝熱シンポジウム, 2008 年 5 月 22 日, つくば市つくば国際会議場.
- ⑦ 櫻井 亮, 中西 力也, 萩原 良道, 近赤外光を用いた凝固しつつある AFP 水溶液の微小領域温度計測, 第 45 回日本伝熱シンポジウム, 2008 年 5 月 21 日, つくば市つくば国際会議場.
- ⑧ 丸山 善也, 谷口 比呂美, 萩原 良道, タンパク質モデルと水分子の相互作用に関する分子動力学解析, 第 21 回分子シミュレーション討論会, 2007 年 11 月 27 日, 金沢市金沢歌劇座.
- ⑨ 萩原 良道, バイオミメティック伝熱制御, 日本機械学会熱工学コンファレンス 2007, 2007 年 11 月 24 日, 京都市京都大学
- ⑩ R. Nakanishi, R. Sakurai, Y. Morikane and Y. Hagiwara, Interaction between Antifreeze Protein and Growing Ice Crystal, 18th Int. Symposium on Transport Phenomena, 2007 年 8 月 27 日, 韓国大田市 Korea Advanced Institute of Science and Technology.
- ⑪ Y. Hagiwara and T. Nobekawa, Effects of Motion and Aggregation of AFP Segments on Water Molecules near an Ice Crystal, 234th ACS Annual Fall Meeting, 2007 年 8 月 20 日, 米国ボストン市 Boston Convention Center.

[その他]

解説

- ① 萩原 良道, 生物にヒントを得た熱・物質輸送現象制御の可能性, *機械の研究*, 60 巻(2008), pp. 924 – 930.

特別講演

- ② Y. Hagiwara, Effects of winter-flounder antifreeze protein on the prism face of an ice crystal, 2008 年 9 月 17 日, 米国ロサンゼルス市カリフォルニア州立大学ロサンゼルス校.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 良道 (HAGIWARA YOSHIMICHI)  
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授  
研究者番号: 50144332

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者