

氷/水界面への不凍糖タンパク質分子の吸着と拡散

北大低温研 古川義純、Salvador Zepeda、宇田幸弘、中谷浩之

学習院大学 横山悦郎

Adsorption and Diffusion of Antifreeze Glycoprotein Molecules at Ice/Water Interface

Yoshinori Furukawa, Salvador Zepeda, Yukihiko Uda and Hiroyuki Nakaya

Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo 060-0819

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

Etsuro Yokoyama

Computer Center, Gakushuin University, Tokyo 171-8588

Abstract: Antifreeze proteins (AFPs) and glycoproteins (AFGPs) are found in nature in many cold weather organisms including fish, amphibians, plants and insects. These proteins suppress the freezing temperature of the blood serum in fish just enough to keep them from freezing in their supercooled environments while the melting temperature remains unchanged (hysteresis) and inhibit ice recrystallization enough to reduce damage in freeze tolerant organisms, making them essential for survival. To date workers have described at least 5 distinct classes of these proteins, AFP types I-IV and AFGPs, as well as two distinct types of insect AFPs. The Type I and Type II AFPs are alanine and cysteine rich, respectively, while the AFGPs are alanine rich as well as glycosylated. They exist in a variety of structures ranging from α or β helical to globular and yet to some extent they all accomplish the same function. These proteins are thought to bind to the surface of ice and inhibit growth. Although, this mechanism has recently been challenged by mutation experiments, where the residues thought to bind to the ice lattice were replaced with hydrophobic ones and these retained nearly all of the antifreeze activity. However, there is a consensus that this is a surface phenomenon, but no clear evidence for the exact nature of the mechanism is available and is necessary to understand how these proteins work.

In this work, we use 3-d confocal microscopy to gain insight into the antifreeze interaction with the ice/solution interface. Single ice crystals are grown in solution from a capillary in the presence of antifreeze proteins labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC). At \square g/ml quantities of AFGP we see a clear adsorption at the prismatic planes with growth stopped while the temperature is in the hysteresis region. When we lower the temperature below the hysteresis region growth continues while the protein is rejected from the crystal. At higher concentrations the gross morphology can vary quite dramatically, but the proteins are still rejected from the solid. This contradicts previous understandings that the mechanism for antifreeze action must be a tight irreversible binding.

Furthermore, the conformational change of Antifreeze Glycoprotein (AFGP) molecules during ice formation on the AFGP thin film was followed by Attenuated Total Reflection (ATR)-FTIR spectroscopy. The ATR-FTIR difference spectrum of the frozen and supercooled samples showed that helical conformation of AFGP molecules is predominant at the ice-water interface.

Key words; Growth Kinetics, Antifreeze protein, Adsorption, Conformation, Fluorescence, Confocal

1. はじめに

結晶成長における添加物の効果は、結晶成長カイネティクスに影響を与え、結晶のパターン発展や成長形をも変化させる。特に、タンパク質やアミノ酸などの生体高分子は、結晶成長カイネティクスに与える効果が極めて大きいことが最近の研究で明らかになりつつある。過冷却水からの氷結晶の

成長を制御する機能を持つ不凍タンパク質 (Antifreeze Protein, AFP)、及び不凍糖タンパク質 (Antifreeze Glycoprotein)は、このような添加物の最も典型的なものである^{1,2)}。AFGP や AFP 分子は、氷/水成長界面に吸着することでその結晶成長制御機能を発現すると考えられているが、吸着状態におけるタンパク質分子の吸着量、コンフォメーション、吸着特性、

界面近傍での拡散などの基礎的な解析がほとんど無いため、機能発現のメカニズムを議論することが困難な状況である。さらに、添加物による結晶周囲の拡散場や、結晶化潜熱の放出による熱拡散場の発達、結晶周囲の環境相に自然対流を発生させるために、解析をさらに困難にする。対流の効果を見積もり、さらにこの効果を排除した理想的環境のなかで結晶成長実験を行うことは、極めて重要であり、このような理想的な環境を得るための唯一の手段が微小重力環境である。我々は、AFGP や AFP の結晶成長制御機能のメカニズムの解明を目指して、さまざまな地上実験や航空機による短時間微小重力実験を行っている。さらに、これらの研究成果をもとに、国際宇宙ステーションを利用する実験の実現を目指している。

本報告では、蛍光分子でラベルした AFGP や AFP 分子を使って、結晶成長界面へのこれらの分子の吸着や界面前方での拡散場の可視化、及び結晶内部への取り込みなどを詳細に研究した結果と、界面に吸着した AFGP 分子の二次構造(コンフォメーション)の解析結果について述べる。

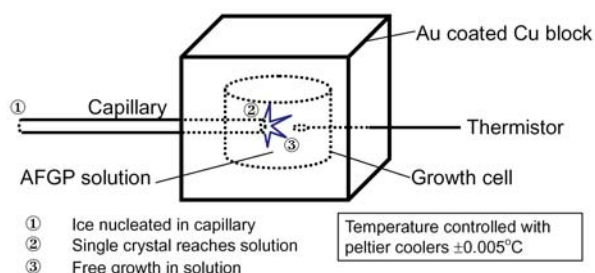


Fig. 1 Basic concept of growth cell.

(a)

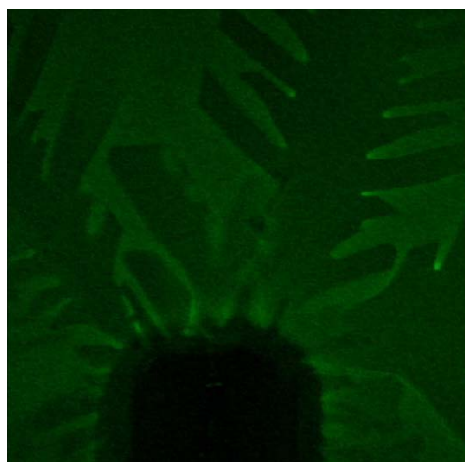


Fig.2 Images of an ice crystal growing at the tip of glass capillary, obtained by confocal microscope. Fluorescent image. Adsorption of AFGP molecules is observed as the strong fluorescent intensity.

2. 氷結晶界面への AFGP 分子の吸着と結晶成長

2. 1 自由成長実験装置の開発

氷結晶のように融点が室温以下の物質の結晶成長実験では、あらかじめ種結晶を用意しておくことが困難であるため、実験装置にはさまざまな工夫が必要である^{3,4,5}。結晶成長セルの概念図を Fig. 1 に示す。成長セルの冷却はペルチエ素子により行い、 $\pm 5\text{mK}$ の精度で温度制御が可能である。氷の結晶成長は、成長セルに挿入した細いガラス毛细管の先端で行う。成長セルの温度が所定の過冷却温度に到達したときに、セルの外部に飛び出たガラス管の一方の端を急冷することで、強制的に核生成を行う。発生した氷の結晶核はガラス管の内部を成長するとともに、互いに競合しあって、最終的に 1 個の氷単結晶がガラス管内で生き残る。この単結晶がガラス管の先端に達すると成長セルの中での氷結晶の自由成長を開始する。毛细管は、軸の周りで回転が可能である。これにより、毛细管先端で成長する氷結晶の方位を変えることができる。

本実験では、試料として蛍光物質でラベルした AFGP 分子を用いた。使用した AFGP 試料は、AF-Protein 社から提供されるもので、分子量サイズが 2600 程度のタイプ 8 と呼ばれる分子が大部分を占めている。このタンパク質分子に、蛍光物質 FITC (分子量 389、励起光波長 494nm、放射光波長 520nm) でラベルした⁶。

実験装置は、Nikon 製のスペクトル共焦点顕微鏡のステージにおいた。この装置では、レーザーにより励起された蛍光放射の共焦点観察が可能である。

2. 2 共焦点顕微鏡による観察

Fig. 2 は、AFGP の水溶液(濃度: 5 $\mu\text{g/ml}$)の中で、氷結晶を自由成長させて観察された氷結晶の一例で蛍光による画像を示す。蛍光画像を見ると、界面に沿って蛍光強度の強い縁取りが観察される面とされない面とがある。すなわち前者は、AFGP 分子が界面に高濃度に吸着していることを示すのに対し、後者は界面への吸着がないことを意味している。このような吸着の異方性は、氷結晶の成長速度を制御している。すなわち、吸着濃度の高い面は成長が抑制されほとんど成長しないが、吸着の無い面は連続的に成長を継続した。この観察は、実際に界面 AFGP が吸着することで結晶成長を抑制していることを実験的に証明した初めての画像である⁷⁾。

3. 界面に吸着した AFGP 分子の二次構造の解析

Fig.2 で示したように、AFGP 分子が界面に吸着することにより、結晶成長を抑制していることは明らかである。しかしながら、吸着がどのように起こっているのか、吸着時の AFGP 分子の二次構造は水溶液中の場合と同じなのか、などについては全く情報がない。これは、タンパク質の構造解析は、水溶液中か結晶化したときに可能であるが、界面に吸着した状態では極めて困難であることによる。しかし、結晶成長の抑制のようなダイナミックな効果を明らかにするためには、吸着状態でのタンパク質分子の状態をモニターすることが必要である。

そこで、フーリエ変換赤外分光 (FTIR) により、以下のような実験を行った⁸⁾。AFGP 水溶液を ZnSe 台形プリズム上に滴下して、乾燥させることにより、フィルム状の AFGP 試料を作製する。その試料を水蒸気雰囲気下で冷却し、AFGP フィルム上に氷を作製、その過程を赤外全反射法 (ATR-FTIR) により追跡した。AFGP 試料は、高分子量(~20000 Da)の AFGP4-6 と、低分子量(~2600 Da)の AFGP8 を用いた。また、水蒸気の供給には、AFGP との赤外ピークの重なりを避けるため、重水を用いた。

Fig.3 は、AFGP4-6 フィルム上への氷の形成過程における異なる温度の赤外 ATR スペクトルである。-15 $^{\circ}\text{C}$ では 2500 cm^{-1} 付近の O-D 伸縮振動ピークが大きく低波数側にシフトしている。これは、この温度で D₂O の氷が形成されていることを示している。Fig.4 は、AFGP 分子のコンフォメーションに敏感なピークについて、氷が形成された-15 $^{\circ}\text{C}$ と、過冷却状態の-5 $^{\circ}\text{C}$ の差スペクトルを示したも

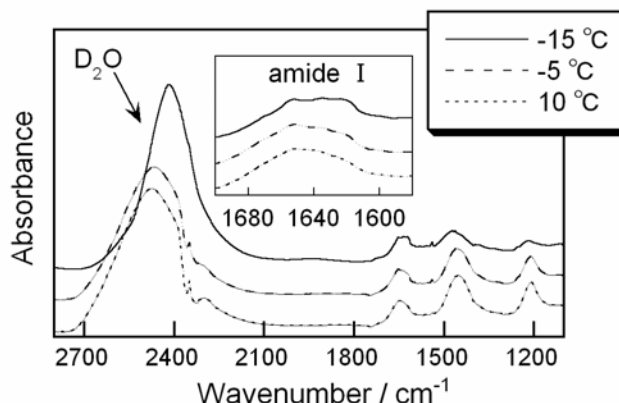


Fig.3 ATR-FTIR spectra obtained from the supercooled and frozen states of AFGP solution.

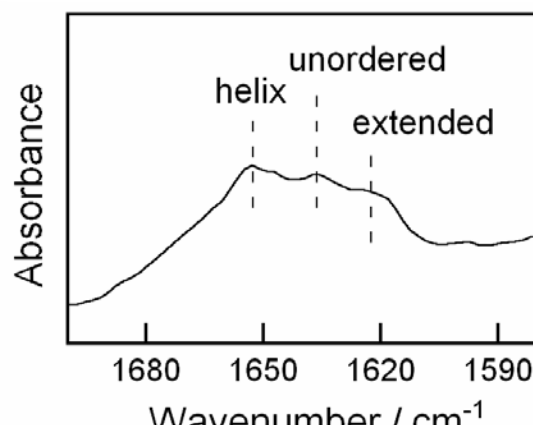


Fig. 4. ATR-FTIR difference spectrum of the frozen and supercooled samples.

のである。1621 cm^{-1} 、1636 cm^{-1} 、1652 cm^{-1} のピークはそれぞれ、AFGP の extended、unordered、helix のコンフォメーションに対応している。特に 1652 cm^{-1} のピークが強い強度を示していることから氷/水界面に吸着する際、AFGP 分子は、主として helix 構造をとっていることが示唆される。すなわち、AFGP 分子の二次構造は、水溶液中から吸着状態に移行する際に、構造変化を起こし、より吸着しやすくなると考えられる。

4. おわりに

不凍 (糖) タンパク質分子に蛍光物質でラベルすることで、結晶成長にともなう分子の拡散、吸着、偏析などのその場観察が可能になった。蛍光による観察の感度は極めて高く、従来の干渉計測定などでは観察が不可能である低濃度でも観察可能である。共焦点顕微鏡では、かえって低濃度のほうが観察が容易で、数 $\mu\text{g/ml}$ 程度の低濃度が最

も観察しやすい。今後、さまざまなタイプの不凍タンパク質に対してこの手法を適用することで、優先的に吸着が起こる面はどれなのか、さらに吸着濃度はどの程度であるかの解析が可能になろう。また、蛍光観察は結晶の内部にとりこまれたタンパク質分子に対しても有効であることが重要である。すなわち、結晶内部へ取り込まれる不凍タンパク質濃度の決定も可能である。

また、FTIR法で得られた結果は、AFGP分子が界面に強固に吸着するには、吸着時にヘリックス構造をとるように構造変化が起こることを示している。このことは、不凍タンパク質の機能の発現のメカニズムと極めて密接に関連していると考えられる。従来、吸着状態でのタンパク質分子のコンフォメーション解析は極めて困難とされていたが、我々の実験はその方法論を提供するという視点でも今後の発展が期待でき、重要である。

謝辞

本研究の実施に当たり、北大低温研片桐千仞、大阪大学金子文俊、オリンパス光学真木孝雄の各氏にお世話になった。また、本研究は、日本宇宙フォーラム「地上実験公募研究」、および日本学術振興会科学研究費補助金により実施した。

参考文献

- 1) Y. Yeh and R. E. Feeney, Antifreeze proteins : structures and mechanisms of function, *Chemical Reviews*, 96(1996)601-617.
- 2) 古川義純、氷点下でも凍らない魚ー不凍タンパク質が氷の結晶成長を支配するー、*バイオニクス*, No.2(2005)56-58.
- 3) Y. Furukawa and W. Shimada, Three-dimensional pattern formation during growth of ice dendrites – its relation to universal law of dendrite growth, *J. Crystal Growth*, 128(1993)234-239.
- 4) W. Shimada and Y. Furukawa, Pattern formation of ice crystal during the free growth in supercooled water. *J. Phys. Chem. B*101(1997)6171-6173.
- 5) Y. Furukawa, E. Yokoyama et al., Diffusion field around a single ice crystal growing in supercooled water under a short-term microgravity condition, *J. Jpn. Soc. Microgravity Appl.*, 21(2004)196-201.
- 6) Zepeda, H. Nakaya, Y. Uda, E. Yokoyama, Y.

Furukawa, Diffusion, incorporation, and segregation of antifreeze proteins at the ice/solution interface, *S. Proceedings on the International Symposium on Physics and Chemistry of Ice*, (2007) in press.

- 7) S. Zepeda, Y. Uda, Yokoyama, Y. Furukawa, Antifreeze Protein Adsorption at the Ice/Solution Interface, to be submitted.
- 8) Y. Uda, F. Kaneko, Y. Matsuura, S. Zepeda, H. Nakaya, Y. Furukawa, FTIR Study of the Structure of Antifreeze Proteins at Ice/Water Interfaces, to be submitted.