

## マクロ分子の界面吸着が関与する結晶成長機構の解明と 結晶成長制御への応用

古川義純、Salvador Zepeda、宇田幸弘（北大低温研）、横山悦郎（学習院大計算機セ）  
小川直久（北海道工大）、灘浩樹（産総研）

### Crystal growth mechanisms associated with the macromolecules adsorbed at a growing interface and its application to growth form control

*Yoshinori Furukawa, Salvador Zepeda and, Yukihiro Uda*

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

*Etsuro Yokoyama*

Computer Center, Gakushuin Univ. Toshima-ku, Tokyo, 171-8588

*Naohisa Ogawa*

Hokkaido Institute Technology, Teine-ku, Sapporo, 006-8585

*Hiroki Nada*

AIST, Tsukuba, 305-8568

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

**Abstract:** Ice crystal growth in supercooled antifreeze protein solutions is inhibited by their adsorption at the ice/water interface, and this phenomenon is a matter of vital importance for survival of living organisms in subzero environments. Several kinds of proteins with this function are known at the present time and are mainly categorized into two types of proteins: antifreeze glycoproteins (AFGP) with sugar and antifreeze proteins (AFP) without sugar. These interactions are being studied with keen interest as the functional proteins to control ice crystal growth. While these proteins have dramatic consequence for natural biological processes and technological applications, only little is known about the dynamic mechanism of ice growth inhibition. The purpose of this research is to learn the antifreeze mechanism based on the fundamental studies of ice crystal growth. Precise measurements of growth rates of ice crystals in AFGP solutions showed that oscillations are a fundamental feature for the crystal growth controlled by the adsorbed macro molecules such as the AFGP. Since the oscillatory phenomena may be strongly affected by the external turbulence like convection, the microgravity experiments in space will be very important to understand the mechanism of self oscillatory growth. We propose a project of a new space experiment using the ice cell specimen that has been developed by JAXA to carry out the space experiments of the morphological instability of ice crystals in pure supercooled water. Theoretical considerations for ice crystal growth in the AFGP solution were also carried out to explain the relationships between the adsorption states of antifreeze proteins and the growth kinetics.

#### 1. 宇宙ステーション「きぼう」による氷結晶 成長実験

JEM「きぼう」一次選定テーマの一環として「氷結晶成長におけるパターン形成」テーマの実験が2008年秋以降に実験の実施が予定され準備が進んでいる<sup>1</sup>。このテーマの詳細については、すでに様々な文献やホームページ等で紹介されているので、本報告では詳しく述べない。文献としては、平成18年度「宇宙環境利用の

展望」<sup>2</sup>（（財）資源探査用観測システム・宇宙環境利用研究開発機構（JAROS）発行）に詳細が紹介されている。また、JAXAのHPにも、本実験の紹介がなされているので参照いただきたい<sup>3</sup>。

<sup>2</sup> <http://www.jaros.or.jp/>

<sup>3</sup> [http://www.jaxa.jp/article/special/kibo/furukawa\\_j.html](http://www.jaxa.jp/article/special/kibo/furukawa_j.html)

<sup>1</sup> <http://kibo.jaxa.jp/experiment/theme/jpm01/>

## 2. マクロ分子の界面吸着が関与する結晶成長機構の研究

極海などの寒冷環境にすむ魚や昆虫などは、生体が過冷却しても凍結せず生き延びる。これは、体液に凍結抑制タンパク質と呼ばれる特殊なタンパク質が含まれ、それらが氷の界面に吸着することで、凍結を抑制するためと考えられている。すなわち、凍結抑制タンパク質が、生体の耐凍結戦略を司る鍵となる。このような機能を持つタンパク質は、現在までに数種類が知られており、糖鎖を含む構造の不凍糖タンパク質 (Antifreeze Glycoprotein, AFGP) と糖鎖のない不凍タンパク質 (Antifreeze Protein, AFP) に大きく分けられている。氷結晶とこれらのタンパク質がどのように相互作用するのか、さらにそれが氷結晶成長をどのようにして制御するのかは、きわめて重要な研究課題となってきている。このようなタンパク質の機能は、生命現象との関連での重要性のみならず、医学・工学分野などでの応用も期待され、その重要性が強く認識されている。しかしながら、これらのタンパク質が氷結晶の成長を制御するメカニズムについては、ほとんど明らかにされていない。本研究では、結晶成長の基礎的視点に立った実験・理論的研究を展開することで、凍結抑制タンパク質の機能発現メカニズムの解明を目指している。

本研究は、地上公募研究のテーマとして平成16-18年度の3年間にわたり行われた研究の成果である。さらに、宇宙環境利用科学委員会研究班WG研究会「マクロ分子の関与する結晶成長機構」の一環としても研究が推進されている。

氷の結晶成長の最も基礎的な実験として、まずAFGP水溶液中で氷結晶を自由成長させ、その面成長速度を精密に測定した。その結果、ベール面およびプリズム面とも成長速度が振動する現象を見出した。しかも、ベール面では成長は常に継続するがその速度が連続的に変動するのに対し、プリズム面では成長が完全停止したり急に成長を開始したりする、ON-OFF的な振動が起こることを明らかにした。すなわち、マクロ分子の界面吸着によって結晶成長が制御される系では、“振動成長”が本質的な性質であると結論される。このような振動現象は、結晶成長の環境相などの外的条件の振動によっても起こるため、そのメカニズムの解明には擾乱のない環境での実験が重要である。擾乱の最も大きな原因は、熱拡散場や物質拡散場に起因する対流であるので、これらを守るには微小重力環境における実験が極めて有効である。しかも、マクロ分子の関与する結晶成長ではその挙動が比較的ゆっくりであるため、航空

機などによる短時間微小重力環境を利用する実験では不十分である。したがって、宇宙ステーションによる長時間微小重力環境の利用が本研究には必要不可欠である。以上のことから、「AFGPまたはAFPの水溶液中での氷結晶の自由成長における振動現象の解明」を新しい宇宙実験テーマとして提案する。この実験に用いる装置は、現在JAXAで開発中の過冷却純水中での氷結晶の形態不安定実験の供試体 (Ice Cell) を一部改良することで製作可能である。

宇宙実験を目指す予備的研究として、氷結晶の成長に対する対流の効果の大きさを見積もるために、航空機による微小重力実験を3回にわたり実施した。この実験のために、高精度での温度制御が可能な新しい結晶成長セルを開発した。また、光の反射が極めて微弱である氷/水界面からの反射光 (ガラス表面の反射の1/500) による干渉観察が可能な新しい光学系の開発にも成功し、界面でのステップ挙動が観察可能になった。この装置を使うと、20秒間しかない短時間微小重力環境においても、結晶成長に対する対流の効果を検出可能になる。その結果、成長速度やステップ移動速度が微小重力環境では大きく低下することが初めて確認された。

一方、AFGPやAFPの界面吸着状態を明らかにし、氷結晶成長を制御するメカニズムを明らかにするため、さまざまな地上実験も実施した。特に、AFGPやAFP分子に蛍光物質 (fluorescein isothiocyanate, FITC) でラベルを付け、氷結晶成長に伴う界面とその近傍での分子の再配分 (すなわち、結晶成長に伴う排斥、界面吸着、拡散、取り込みなど) の様子を蛍光強度分布として観察した。たとえば、AFGP水溶液中で氷結晶を自由成長させて共焦点蛍光顕微鏡で観察すると、AFGP濃度が $\mu\text{g/ml}$ のレベルでも十分に蛍光強度分布が観察可能で、AFGPが吸着したピラミッド面では結晶成長が完全停止するが、吸着が無い場合には成長し続ける様子が世界で初めてその場観察された。この観察から、界面に吸着したAFGP分子の濃度が見積もられ、過冷却度が0.2Kのときには吸着した分子と分子の間隔が $90 \pm 10$ であることが分かった。吸着分子が界面の移動をピン止めし、吸着分子間の氷界面は曲率を持って張り出すとすると、ギブス・トムソン効果による界面温度の低下は、ほぼ0.2Kと見積もられる。この温度は実験条件とよく一致し、ギブス・トムソンモデルが有効であることを示唆している[1]。

また、蛍光ラベルしたAFGPの水溶液から、氷結晶の一方成長実験を行った。成長界面では、成長に伴いAFGP分子が排斥されて界面濃度が高まり、界面前方に拡散場が発達する。この様子は、

AFGP 濃度 100  $\mu\text{g/ml}$  以下でも観察可能で、干渉計よりも圧倒的に感度が高い。この実験では、成長速度が遅いときは氷/水界面は完全にフラットなままで成長するが、成長速度が増加すると界面は不安定化し、やがて周期的な指状パターンが形成されることが観察された。指先端は平らな界面で囲まれていることが特徴で、塩水溶液からの成長で観察される丸い指先端の形状とは全く異なる。さらに、成長速度が界面前方での拡散場と連動して時間変動することも観察された。また、発達した拡散場が生じたときに成長を停止させると、拡散場の減衰過程が観察され、AFGP の拡散係数や界面吸着した AFGP 分子の離脱速度なども決定した。以上の結果から、AFGP 分子は、界面にそれほど強固に吸着するのではなく、可逆的な性質を持つことが明らかになった。

これらの実験結果を説明するために、界面へのタンパク質分子の吸着状態を考慮した新しい結晶成長カインेटクスモデルを提案した。このモデルのポイントは、氷/水界面へのタンパク質の吸着には不完全吸着から完全吸着への遷移過程が存在することである。すなわち、不完全吸着では結晶成長は抑制されないが、完全吸着を起こすと結晶成長が完全に抑制される。この遷移過程は、吸着状態でのタンパク質の二次構造形成と関連する(界面吸着の階層性)。ここでは、単純な二状態の吸着と仮定して取り扱うことにより、結晶成長速度と結晶成長駆動力の間にヒステリシス(カインティックサイクルと呼んでいる)が生れる。このような性質により、結晶成長速度の自励振動や成長抑制効果、熱的ヒステリシスなど、実験で明らかになった現象をよく説明することができる。この新しい理論モデルは、マクロ分子による結晶成長制御の本質的な性質を与えると考えられ、その検証を行うことも宇宙実験の主要な目的となる。

一方、氷/水界面に吸着した状態での AFGP 分子の二次構造(コンフォメーション)は、結晶成長制御機構を解明する鍵であり、界面吸着の階層性とも密接に関連している。本研究では FTIR 全反射測定(ATR-FTIR)法によって、氷/水界面に吸着した AFGP 分子の二次構造の解析を試みた。その結果、水溶液中ではランダムコイルと呼ばれる状態にある分子が、界面に吸着すると  $\alpha$ -ヘリックスのラセン状構造に変化することが明らかになった。これは、水溶液中の AFGP 分子が氷/水界面に到達してもそのままでは吸着せず、二次構造を変化させることで初めて完全な吸着状態が実現することを示している。すなわち、AFGP 分子の界面吸着の階層性に対する直接証拠である [2]。

以上のように、本研究では、実験、理論、そしてシミュレーションによる凍結抑制タンパク質の吸着と氷結晶成長の特性の詳細な解析を行った。それによって、凍結抑制タンパク質による氷結晶成長の制御機構を、分子レベルで議論することが可能になった。これらを基に、より普遍性のあるマクロ分子の関与する結晶成長機構の新しいモデルを提案するに至った。このような系での結晶成長では、自励的に発生する振動現象が大きな特徴だが、地上実験のみではそのメカニズムの解明は困難である。宇宙空間における長時間微小重力実験の実現が、今後の研究の発展に不可欠である。

#### 謝辞

本研究は、日本宇宙フォーラム地上公募研究費、および科学研究費基盤研究 A の補助により実施されている。

#### 参考文献

- [1]S.Zepeda et al., Submitted to JACS.
- [2]Y.Uda, S.Zepeda, F.Kaneko, Y.Matsura, Y.Furukawa, J. Phys. Chem., B111, 2007, 14355-14361.