

氷結晶の振動成長にともなう不凍糖タンパク質の拡散と偏析

北大低温研 中谷浩之、ZEPEDA Salvador、宇田幸弘、古川義純

学習院大学計算機センター 横山悦郎

Diffusion and Segregation of Antifreeze Glycoprotein during Oscillatory Growth of Ice Crystals

Hiroyuki Nakaya¹⁾, Salvador Zepeda¹⁾, Yukihiro Uda¹⁾, Yoshinori Furukawa¹⁾ and Etsuro Yokoyama²⁾

¹⁾ Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo 060-0819

²⁾ Computer Center, Gakushuin University, Tokyo 171-8611

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

Abstract: we study ice crystal growth in AFGP and AFP solutions with phase contrast and fluorescence microscopy in a 2-d growth apparatus and in free solution growth under various conditions including microgravity. With fluorescence microscopy we have directly visualized the protein dynamics at the interface of a growing ice crystal. Contrary to previous understandings, the proteins become incorporated into brine veins and not directly into the crystal matrix. Free-solution growth experiments show an anisotropic self-oscillatory growth mode of the steps and interface near the freezing temperature. We will discuss the implications of our results on the AFP/AFGP mechanism.

Key words; Ice crystal, Antifreeze glycoprotein, Self-oscillatory, Macro molecules, Impurity effect,

1. はじめに

結晶成長における不純物の効果は、結晶成長カインテックスを変化させたり、結晶周囲の環境相における拡散場の発達により、結晶成長の様子を大きく変動させたりする。さらに、重力が存在する場では、対流の効果も強調されるため、結晶成長に対する不純物効果の解明を困難にしている。

結晶成長に対する不純物効果は、従来は低分子結晶の成長に対し、低分子の不純物が関与したとき、どのような現象が起こるかが主たる研究の対象であった。また、最近話題になっているたんぱく質の結晶成長に対する不純物効果の研究においては、不純物もまたたんぱく質の分子であり、基本的な低分子の結晶成長に対する不純物の効果を説明するモデルが適用できると考えられている。

一方、バイオミネラリゼーションと呼ばれる分野で扱われる結晶成長に対する不純物効果は、低分子の結晶化分子に対し、たんぱく質やアミノ酸などのマクロ分子が不純物としてどう関与するかを解明することが重要である。すなわち、前者の場合は、結晶化分子と不純物分子の空間的・時間的スケールがほぼ同一であるのに対し、後者ではこれらのスケールが桁違いに異なることが大きな特徴である。したがって、前者の系で従来なされてきた不純物効果の議論は、後者の系には基本的に直接適用することは困難である。

マクロ分子の関与する系での結晶成長機構の研究は、ごく最近になって研究が急速に進展し始めた、斬新な研究分野であり、まさに結晶成長機構の解明を目指す研究分野の中で残された重要課題のひとつとなっている。

本研究では、不凍糖たんぱく質 (AFGP) や不凍たんぱく質 (AFP) を不純物として含む過冷却水からの氷結晶の成長の問題を扱うが、まさに上に述べたマクロ分子の関与する結晶成長機構の典型的な例である。AFGP や AFP の水溶液である結晶成長の母相も氷結晶も無色透明であるため、結晶成長の過程をその場観察することが可能である。このような系をモデルとして、マクロ分子の関与する新しい結晶成長機構の解明を目指している^{1,2)}。

一方、氷結晶の成長を扱うということで、氷に特有な性質とも密接に関連して、さまざまな研究分野との関連も非常に深い。この研究で得られる成果は、単に結晶成長の視点での重要性に留まるものではないことも強調しておきたい。たとえば、不凍たんぱく質による凍結抑制効果は生体の耐凍結戦略の重要なメカニズムであり、さらに医学分野への応用も強く期待されている³⁾。

本報告では、AFGP 水溶液中で成長する氷結晶成長速度の自励振動にともなう界面でのタンパク質濃度分布の変動との関連について述べる。

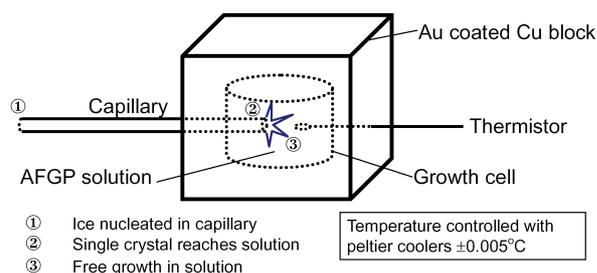


Fig. 1 結晶成長セルの概念図

2 . AFGP 水溶液中で成長する氷結晶の成長速度の振動

AFGP を不純物として含む過冷却水中での氷結晶の自由成長実験を行うための結晶成長セルの概念図を Fig. 1 に示す。観察光学系としては、位相差顕微鏡を使用した。この光学系では、対物レンズの作動距離が短いため、成長セルの厚みを 15mm に留めるなど、成長セル全体を小型にすることで観察可能にした。この成長セルの冷却はペルチエ素子により行うが、高精度の温度制御装置と組み合わせることで、10mK 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 個の水単結晶のみ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氷結晶の自由成長が開始する。

Fig. 2 は、ガラス管の先端で成長する氷結晶の一例である。成長条件は、AFGP 濃度 0.1mg/ml で過冷却温度は、 -0.21 ± 0.01 である。氷結晶は、純水中での結晶の成長形とは全く異なり、c 軸方向に伸びた角柱状結晶として成長した。ベール面が平らなファセット面として観察されるだけでなく、プリズム面にも大きく発達したファセット面が観察され、その面上では成長ステップの運動が観察される。純水中で成長する氷結晶では、プリズム面でももちろんベール面でも成長ステップが観察されることはないので、この特徴はまさに AFGP の不純物効果として生じたものである。

結晶成長の様子を示す連続写真から、成長速度やステップの移動速度、およびその時間的空間的変動を得るために新たに開発された手法(時空間画像処理法)が導入された。Fig. 2 の i-iii は、それぞれ解析ライン i、ii 及び iii についての時空間画像解析画像を示す。また、右端の図は結晶成長開始後の過冷却水温度の時間変化を示す。

この解析画像から明らかになる重要な結果は、プリズム面の位置が時間の経過に対して振動することが観察され、成長が完全に停止している期間と連続的に成長を継続している期間とが交互に出現することである。すなわち、プリズム面の振動は、ON-OFF タイプの結晶成長速度の自励振動が観察される。

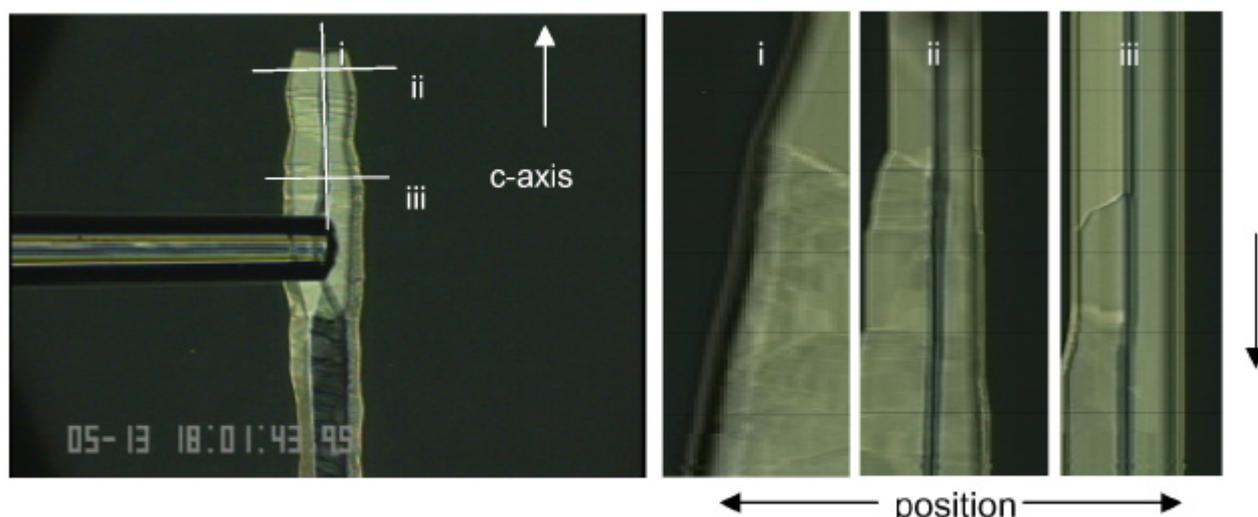
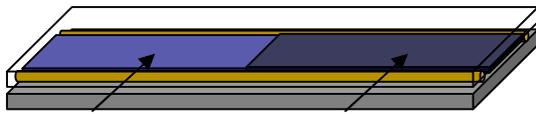


Fig. 2 成長セル中での氷結晶成長の例。プリズム面上でのステップの挙動と面成長速度の自励振動する様子が明確に示された。成長温度： 0.21 ± 0.01 、AFGP 濃度： $5 \mu\text{g/ml}$ 。

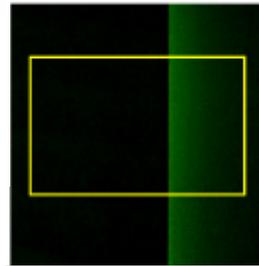
2-d growth apparatus



Solution → Ice

- ① Solution in growth cell 16 mm × 76 mm × 0.05mm
- ② Place in a linear temperature gradient: 1.5K/mm
- ③ Single crystal is prepared with basal face perpendicular to glass cover
- ④ growth cell is moved towards the cold side with stepper motor

Protein location from fluorescent labeled



- ① Proteins labeled at the N-terminal with FITC molecule
- ② average intensity of vertical line in yellow box give protein distribution
- ③ corresponding plot of intensity vs position
- ④ intensity in solution is used to scale concentration



Fig. 3 一方向成長装置の概念図。薄膜状のセルに温度勾配を付与し、この状態を保ったままでセルを高温側から低温側へ一定速度で移動させる。このとき界面は、セルの移動方向は反対方向に移動し、結晶が成長する。右の図は、成長界面を蛍光顕微鏡での観察画像である。蛍光物質でラベルした AFGP 分子を用いることで、界面近傍での AFGP の濃度分布が解析できる。結晶内部での濃度分布も解析可能であることがこの方法の大きな特徴であり、干渉計では検出不可能な低濃度でも観察可能である。

3. 一方向成長による AFGP 水溶液からの氷結晶成長実験

AFGP 水溶液から成長する氷結晶の成長界面近傍での AFGP 分子の拡散・分配挙動を実験的に解明するために、一方向成長実験を行った。前節で述べた位相差顕微鏡に、蛍光顕微鏡ユニットを取り付けることにより、位相差と蛍光を同時に観察可能であるよう改造した。この顕微鏡に搭載可能な、小型の一方向成長実験装置を新たに設計し作製した。一方向成長装置の概念図は、Fig. 3 に示される。温度制御用の銅ブロックを水平に並べ、両者を独立にかつ精密に温度制御する。成長セルは、2枚のスライドガラスを 50 μ m のスペーサーを挟んで接着したものである。このセルに AFGP 水溶液を充填し、温度勾配場に置くと成長セルに、一定の温度勾配が生じる、低温側を融点以下、高温側を融点以上に設定することで、温度勾配の中の融点に対応する位置に氷/水界面が生じる。結晶成長は、成長セルをステップモータにより一定速度で高温側から低温側に向かって強制的に移動させることで実現させることができる。このとき、成長界面の位置は、結晶融点温度の周辺に留まるので、界面での成長パターンの発展や拡散場のその場観察に適している。自由成長とは異なり、温度勾配が存在するため、成長中の界面の絶対温度や界面の位置の変動による成長

速度の変動の観察などが可能である。

本実験では、AFGP 水溶液からの氷結晶が成長するときの、AFGP 分子の拡散と結晶内部への取り込みの定量的測定を行うため、蛍光物質でラベルした AFGP 分子を用いて蛍光で観察を行った。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は、蛍光物質 FITC (分子量 389、励起光波長 494nm、放射光波長 520nm) でラベルされた。

Fig. 3 の右は、蛍光顕微鏡で観察された成長界面近傍の写真の一例である。界面を挟んで、液体側から結晶側までの蛍光強度分布を見ると、界面では傾向強度が上昇し、液体側に向かって exponential に減少する。また、結晶側ではこのような分布は観察されず、結晶内の蛍光強度は液体側の界面から遠方での強度より明らかに小さい。すなわち、蛍光強度分布を測定することにより、AFGP 分子の拡散と分配がその場観察できることを示している。

この装置を使用して実験を行い、以下に述べるような成果を現時点までに得ている。

(1) 成長セルの移動速度を一定に保っても、界面の空間的な位置は固定されず前後に移動する (Fig. 4)。すなわち、成長速度の自発的な振動がこの場合も観察された。成長速度が遅いほど、AFGP 濃度

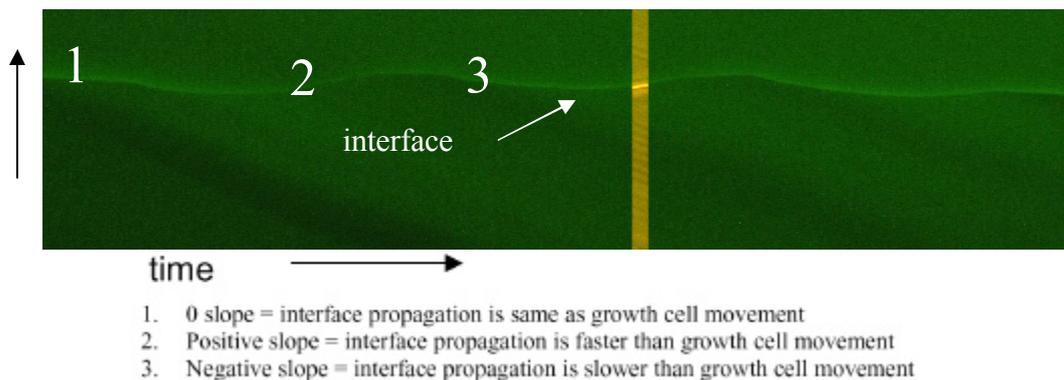


Fig. 4 一方向成長した界面の時空間断面画像。界面の周期的な位置の変動が明瞭に観察される。すなわち、結晶内部に観察される縞模様が自励的振動成長にともなう界面での不純物の偏析と拡散によって生成されることを示す。

が界面ではより高く結晶内の濃度はより低いという蛍光が明確に示された。さらに、成長速度の振動に伴って、結晶内部には蛍光強度の強い領域と弱い領域が交互に観察された。これは、鉱物結晶の内部などでしばしば観察される縞模様と同様のものである。これは、縞模様が不純物の偏析が成長速度依存性と振動成長とのカップリングにより生じることを実験的に示した最初のその場観察である。

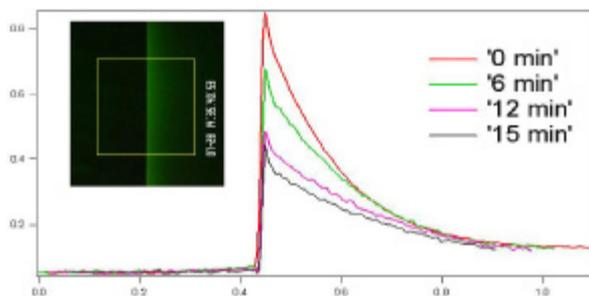


Fig. 5 一方向成長で、界面の移動を停止した後の界面前方での拡散場の減衰。界面にごく近い部分では、減衰が遅い。これは、拡散と界面からの吸着分子の離脱が相互作用した結果と考えられる。

(2) 結晶成長セルの移動をある一定時間継続して界面前方の拡散場が定常状態になった時点で、セルの移動を停止する。このとき、界面前方での拡散場は時間とともに減衰する。Fig. 5 は、拡散場の減衰過程を示したものである。ここで注目されるのは、本来 exponential な分布を示しながら減衰するはずの拡散場の濃度分布が界面のごく近傍で急激に立ち上がっていることである。すなわち、拡散場の減

衰は単に拡散係数によって決まるのではなく、界面から AFGP 分子が離脱する速度とのカップリングにより濃度分布が決定されていることを示唆している。これは、計算機シミュレーションを行うことで検証可能であり、現在 AFGP 分子の水溶液中での拡散係数と界面から離脱係数の二つのパラメータを含むモデルを構築中である。このシミュレーション結果との比較により、AFGP 分子の拡散係数 (diffusion coefficient) と離脱係数 (detachment coefficient) を決定できる。

4. まとめ

ここで観察している AFGP 濃度は、0.1 ~ 0.5mg/ml(すなわち、0.001 ~ 0.05wt%)の範囲であり、通常拡散場の観察に使用される干渉計による方法では解析困難な領域である。しかしながら、タンパク質分子に蛍光ラベルすることで、拡散場や結晶内部への取り込みなど極めて高精度に観察・解析が可能になった。

この方法により、結晶成長速度の自励振動と界面前方での AFGP の拡散場との連動が始めて明らかになった。

参考文献

- 1) Y.Furukawa, N.Inohara, E.Yokoyama: JCG 275(2005)167-174.
- 2) Y.Nishimura, Y.Furukawa, E.Yokoyama: To be submitted.
- 3) S.Matsumoto, M.Matsusita, T.Morita, H.Kamachi, S.Tsukiyama, Y.Furukawa et al.: Cryobiology in press.