学位論文題名

Study of Ice Growth Inhibitory Ability of Isoforms of Type III Antifreeze Protein

(III型不凍タンパク質異性体の氷結晶成長抑制能に関する研究)

学位論文内容の要旨

緒言

AFP (antifreeze protein: 不凍タンパク質) は、0°C以下の低温環境に生息する生物から発見された、氷結晶に結合し氷成長を阻害することによって、溶液(血液・組織液)の凝固点を降下するタンパク質である。AFPによる凝固点降下はモル凝固点降下と比較して、低濃度域において数百倍大きいこと(モル濃度比)、氷結晶の形状を修飾すること、また、融点降下を伴わない(熱ヒステリシス現象: thermal hysteresis)という点で大きく異なる。

様々な生物種(魚、昆虫、植物、菌、藻類)から AFP が発見されているが、そのアミノ酸配列、立体構造は実に多様であり、魚類由来 AFP だけでも五つの構造型に分類される(I~IV型と不凍糖タンパク質)。魚や昆虫 AFP を中心とした立体構造解析と変異実験により、それぞれ特徴的な氷結晶との結合部位、結合モデルが示されており、異なる構造型の AFP 間の相違が明らかになってきている。一方、AFP は生体内で同じ構造型の複数種類の異性体として発現されているが、それら同構造型の異性体間の不凍機能の相違、また複数種発現の役割はわかっていない。

III型 AFP は、ゲンゲ科の魚類が発現している約 7 kDa の球状タンパク質であり、氷結晶面 $\{10\bar{1}0\}$ と相補的な氷結晶結合面を有する。生体内では複数種類の異性体として発現されており、それらはイオン交換カラムとの吸着性から二つのグループ(SP 異性体と QAE 異性体)に分類される。また SP、QAE 異性体間の一次配列の相同性は約 55%である。オスモメーターを用いた凝固点測定により、SP 異性体は単独では全く凝固点を降下できないこと、また QAE 異性体存在下では凝固点降下に寄与することから、SP 異性体と QAE 異性体の共同的な凝固点降下能が示唆された。

本研究では、SP、QAE 異性体間の不凍機能の相違、またその共同的な不凍機能のメカニズムの解明を目的として、氷結晶観察から直接的に氷結晶成長抑制能を解析した。解析には、市販の顕微鏡、温度制御装置と、独自に設計したサンプル冷却容器を組み合わせた装置(Photo system)を用いた。当該装置は水溶液中に微小な氷結晶(~20 μ m)を作成し、その融解、凝固を観察し、融点と凝固点を測定する装置である。不凍活性は、既報論文に倣い、熱ヒステリシス活性 (TH 活性 = |融点(T_m) - 凝固点(T_f)|) で評価した。

結果と考察

III 型 AFP の QAE 異性体は、最も研究例の多い AFP の一つである。本研究ではまず、この QAE 異性体の TH 活性の解析を行い、QAE 異性体の TH 活性が氷結晶の冷却時間に依存して高まることを明らかにした。その時間経過による上昇度は、冷却温度が低いほど、また氷結晶の大きさが小さいほど増加した。また QAE 異性体と GFP(green fluorescent protein)との融合タンパク質溶液中の氷結晶表面では、時間経過と共に氷結晶表面の蛍光強度が増加したことから、TH 活性の上昇は氷結晶表面での AFP 濃度の増加によるものだと示唆された。以上の実験結果を踏まえ、熱ヒステリシス現象中に生じる突状の氷結晶面(convex ice surface)に QAE 異性体が結合するモデルを発表した。

SP 異性体は氷結晶をバイピラミダル形状(六方両錘体)に修飾する点では QAE 異性体と同様であったが、QAE 異性体と異なり氷結晶成長を止めることができず、氷結晶はバイピラミダル形状を維持したまま成長を続けた。SP 異性体の濃度に依存して氷結晶成長速度は低下したが、高濃度(5.0mM)また僅かな過冷却であっても氷結晶成長が制止する事ができず TH 活性は見られなかった。

SP 異性体と QAE 異性体混合液中の氷結晶は、QAE 異性体単独の場合と同様に、バイピラミダル氷結晶の成長が抑制され、TH 活性を示した。また総濃度換算で、混合液の TH 活性は混合比によらず($[QAE]/[SP]=0.01\sim 100$)、QAE 単独の TH 活性と同等の値を示した。つまり QAE 異性体存在下では、SP 異性体は QAE 異性体と同程度に TH 活性に寄与した。

本論文では氷結晶観察から、なぜ SP 異性体が TH 活性に寄与できるかを考察する。QAE 異性体によって成長抑制されたバイピラミダル氷結晶は、その凝固点(T_f)においてバイピラミッドの頂点から突発且つ迅速な氷成長(burst ice growth)を開始する。これはバイピラミッドの頂点が QAE 異性体による氷成長抑制が最も弱い箇所である事を意味している。SP 異性体はそもそも氷成長を止められないが、頂点からの burst ice growth に限れば、QAE 異性体と同程度に抑制できる事がわかった。以上から SP 異性体は、QAE 異性体の氷成長抑制の弱点であるバイピラミッド頂点の抑制に加わることで、TH 活性に寄与できると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	津田	栄
副査	教授	河野	敬一
副査	教授	佐々木	直樹
副査	教授	川端	和重
副査	准教授	相沢	智康

学位論文題名

Study of Ice Growth Inhibitory Ability of Isoforms of Type III Antifreeze Protein

(III型不凍タンパク質異性体の氷結晶成長抑制能に関する研究)

不凍タンパク質(Antifreeze protein: AFP)は、摂氏0度以下の低温環境に生息する生物から発見された「氷結晶に結合してその成長を抑制する事によって凝固点を降下させる生体物質」である。これまでの研究によってAFPは複数の構造型に分類され、さらに各構造型の範疇において異なるAFP異性体群に細分類されている。しかし、AFP異性体間の不凍機能の差異やそれらがもたらす協同的な不凍効果に関する知見は十分に得られていない。本論文は、精密な氷結晶観察技術(溶液中の微小な氷の単結晶を観察し氷成長抑制能を調べる手法)を用いることによって、世界の多くの科学者が研究対象にしているIII型AFPのQAE異性体とSP異性体の不凍機能の差異を見いだすと共に、これら二つの異性体がもたらす協同的な不凍機能について解析したものである。本論文において、著者は特に氷結晶観察装置の独自構築を行っている。市販の顕微鏡と温度制御装置に対して冷却器部分を組み合わせることによって氷結晶形状の温度依存性を極めて高い精度で観測する装置の開発に成功している。これは世界的にも開発例の少ないものであり、国内では初めてと言える。著者は、この装置を用いてIII型AFP異性体の活性測定実験を粘り強く繰り返し行った。その結果としてQAE異性体と氷結晶との新たな結合様式を見出し、さらにQAE異性体とSP異性体がもたらす協同的な氷結晶成長抑制機能を明らかにして、III型AFPに関する多くの新しい知見を得たと言える。

これらを要するに、著者はAFP分子の構造と機能に関する多くの新しい知見を得たものであり、生物科学の研究分野に対して貢献するところ大なるものがある。よって本学位論文の著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格があるものと認める。