1P109

コールドフィンガーを用いた不凍タンパク質のスクリーニング

○三浦 和紀¹、星野 保^{2,3}、津田 栄^{1,3} (¹産総研・ゲノム・機能性蛋白質、²産総研・ゲノム・遺伝子資源解析、³北大院・理・基礎産業生物科学)

不凍タンパク質 (AFP) は、ある特定の氷結晶面に結合し結晶成長を抑制することで、浸透圧の上昇を伴わずに凝固点を下げる機能を持っている。AFP が結合する氷結晶面の特定には、Davies らが開発したコールドフィンガー装置 (CF) が用いられている。CF は、温度制御可能な金属の棒でできており、その先端で氷結晶を成長させることのできる装置である。一般の溶質は成長する氷結晶から排除されるのに対し、AFP は「氷結晶と結合する能力」を有しているため、氷結晶中に取り込まれる性質を持っており、CF を用いて成長させた氷面分のタンパク質のうち、特に割合が増大している成分を分析することで、AFP 候補のスクリーニングが可能となる。我々はこの装置を利用し、ギスカジャカ、および、エノキより新規 AFP 候補のスクリーニングを行った。ギスカジャカに関しては、血液のサンプルを用いてスクリーニングを行った。得られた氷面分タンパク質の SDS-PAGE において、22kDa、および 31kDa の分子量に、割合が増大されたバンドが確認された。これらのタンパク質は、これまでに報告されている魚類由来 AFP のいずれとも異なる分子量であり、新規 AFP である可能性が高い。エノキに関しては、培養液の遠心分離上清サンプルを用いてスクリーニングを行った。得られた氷面分タンパク質の SDS-PAGE において、25kDa の分子量に、割合が増大されたバンドが確認された。これは、菌類由来 AFP とすでに報告されているイシカリガマボタケ由来 AFP と近い分子量であるが、観察される氷結晶形状が異なっているため、アミノ酸配列等がいくらか異なっている可能性がある。現在これらの新規 AFP 候補に関してアミノ酸配列の決定を進めている。

K.Miura, T.Hoshino and S.Tsuda : Screening research for antifreeze proteins using cold-finger device

1P111

ヤナギノマイ由来不凍タンパク質の研究

○吉田 敬幸¹、田中 正太郎²、西宮 佳志³、三浦 和紀³、三浦 愛³、津田 栄^{1,3} (¹北大院・理・生物科学、²大阪バイオサイエンス研究所、³産総研・ゲノムファクトリー)

不凍タンパク質 (AFP) は、寒冷水域に生息する魚類の体液中に見出されるタンパク質であり、凍結温度域において体内に生成する氷結晶の表面に特異的に結合してその成長を抑制し魚体組織の凍結温度を低下させる能力を持っている。現在までに明らかにされている魚類由来の AFP は、その組成および構造上の特徴から I～IV 型および AFGP (糖鎖を有する種類) に分類されている。このうちの I～IV 型 AFP の特徴は以下の通りである。1) I 型 AFP : カレイやカジカに見出され、一本鎖 α -らせん型構造を特徴とする。2) II 型 AFP : キュウリウオ、ニシンに見出され、S-S 結合を特徴とし、カルシウム依存型レクチンの糖鎖認識領域との配列相同性を有する。3) III 型 AFP : ゲンゲに見出され、複数の短い β シートを特徴とし、シアル酸合成酵素の C 末端ドメインとの配列相同性を有する。4) IV 型 AFP : カジカに見出され、アポリボプロテインとの配列相同性を有する。

我々は、上記のどの AFP 生産魚種とも異なる食用魚種のヤナギノマイ (*Sebastes steindachneri* Hilgendorf) について筋肉の可溶性成分を調べ、その成分が強い凝固点降下能および氷結晶成長抑制機能 (不凍活性) を示すことを新たに見出した。ヤナギノマイ筋肉の可溶性成分が有する不凍活性には還元剤感受性およびカルシウム依存性があることが示唆された。これらの実験結果は、ヤナギノマイは II 型に分類される AFP を筋肉組織内に有することを示唆している。現在、より詳細な活性測定やアミノ酸配列の決定を行うため、ヤナギノマイ筋肉より高純度の AFP の精製を行っている。本会では、ヤナギノマイ AFP の一次配列・遺伝子配列の決定と同タンパク質がもつ氷結晶成長抑制機能について発表する。

T.Yoshida, S.Tanaka, Y.Nishimiya, K.Miura, A.Miura, and S.Tsuda : Characterization of a fish antifreeze protein from *Sebastes steindachneri* Hilgendorf

1P110

担子菌 *Typhula ishikariensis* 由来組換え不凍タンパク質の発現と活性の解析

○鈴木 啓太¹、藤原 峰子²、星野 保^{2,3}、扇谷 悟^{2,3}、津田 栄^{2,3} (¹北大・理・生物科学、²産総研・ゲノムファクトリー、³北大院・理)

不凍タンパク質 (AFP) は、寒冷地域に生息する生物が生体の凍結を防ぐために生産するタンパク質の一つであり、はじめは極地の魚類の血液より発見された。主な機能としては、モル凝固点降下を伴わず、その約 500 倍の凝固点降下を起こすことが挙げられ、凍結初期に発生する氷核の表面に結合して特異的な形の氷結晶を形成し、その成長を抑制することが分かっている。AFP は現在、魚類のみならず昆虫や菌類においても存在が確認されており、その働きにより寒冷地域で生物個体を凍結から守っていると考えられている。

これまでの魚や昆虫から採取された AFP では、3 次元構造の解明や、氷結晶の成長の様子の顕微鏡観察、融点と凝固点の温度差 (熱ヒステリシス) を測定するといった活性測定がなされている。一方、担子菌類由来 AFP では、培養上清より陽イオン交換クロマトグラフィーによって分離される 4 つのタンパク質が発見され、魚や昆虫の AFP とは違った氷結晶形状や熱ヒステリシス測定結果が得られている。またこれら菌類 AFP の遺伝子は他の AFP と相同性が低く、新規のタイプであることが示唆されている。しかし、このタンパク質には遺伝子として 16 種類のアイソフォームがあることがわかっており、これまでの実験ではこれらの混合物としてのサンプルでしか活性測定が行われてこなかった。

本研究ではこの担子菌類由来 AFP のうち、不凍活性が特に高いと報告されている *Typhula ishikariensis* 由来のアイソフォームの中から 1 つを選び、メタノール資化酵母 *Pichia pastoris* を用いて組換えタンパク質発現系を構築し、精製を行った。発表ではこの組換えタンパク質について、顕微鏡による氷結晶写真や熱ヒステリシス測定値などから担子菌由来 AFP についての厳密な活性の解析検討を行いたい。

K.Suzuki, M.Fujiwara, T.Hoshino, S.Ohgiya, and S.Tsuda : Activity of recombinant antifreeze protein from basidiomycetes, *Typhula ishikariensis*

1P112

不凍糖タンパク質の界面吸着が氷結晶成長カイネティクスに及ぼす効果

○古川 義純¹、Zepeda Salvador¹、中谷 浩之¹、宇田 幸弘¹、野村 耕介¹、横山 悦郎²、松浦 良樹³ (¹北大低温研、²学習院大計算機セ、³阪大蛋白研)

不凍糖タンパク質 (Antifreeze Glycoprotein, AFGP) は、極地の海に住む魚の体液に含まれ、過冷却状態にある魚体の凍結を抑制する効果がある。これは、氷と水の界面に吸着した AFGP が氷結晶成長カイネティクスを大幅に改変するためと考えられるが、その詳細は未解明な部分が多い。これは、物理あるいは結晶成長学の観点からの AFGP の効果に対する理解が不足していることにある。本発表では、AFGP を含む過冷却水中での氷結晶成長実験を行った結果について報告する。氷の結晶成長実験は、自由成長法と一方向成長法の 2 種類の手法を用いた。自由成長法では、過冷却温度と AFGP 濃度に対し氷結晶の成長形どのように半脚するかを示すダイヤグラムを決定し、さらに氷の a 軸と c 軸方向の成長速度を実測した。その結果、c 軸方向の成長速度 (すなわち、ベール面の成長速度) は、AFGP 濃度の上昇とともに加速されるのに対し、プリズム面では抑制されることが明らかになった、すなわち、同じ AFGP 分子であっても、ベール面では成長の促進因子となるのに対し、プリズム面では抑制因子として作用することが明確に示された。また、自由成長する界面の微細構造が位相差顕微鏡で精密観察された。成長ステップの挙動が解析された。一方、一方向成長では、プリズム面の成長が AFGP の効果により自動的に振動することが初めて観察された。さらに、蛍光ラベルを付けた AFGP 分子を用いることで、界面前方での分子の拡散過程や結晶内部への分子の分配係数などが決定された。このように、AFGP の存在により氷結晶成長カイネティクスは大きく変化を受けることが明らかになった。これは、マクロ分子 (AFGP) の不純物効果による小分子 (氷) の結晶成長の制御と言う新しい研究領域を開くものと期待される。

Y. Furukawa, S. Zepeda, H. Nakaya, Y. Uda, K. Nomura, E. Yokoyama and Y. Matsuura : Effects of Antifreeze glycoprotein (AFGP) molecules for growth kinetics of ice crystals