【解説】

不凍タンパク質 機能と応用

西宮佳志*¹, 近藤英昌*^{1, 2}, 坂下真実*¹, 三浦 愛*¹, 津田 栄*^{1, 2}

不凍タンパク質は、過冷却状態の水溶液中に生成する氷結晶の表面に特異的に結合し、その成長を抑制する機能を有する生体物質であり、様々な低温適応生物から様々な性状のものが発見されている。どのようにしてこれらのタンパク質が氷結晶に結合するのか？、不凍タンパク質間にはどのような共通性があるのか？、不凍タンパク質の機能発現機構を理解するための基礎研究に加え、医学や畜産分野をはじめとしてその成果を新しい技術開発に利用しようと実用化研究も進められている。ここでは、不凍タンパク質の氷結晶成長抑制機構に関する最近の研究状況について紹介する。

不凍タンパク質 (AFP: antifreeze protein) は、1969年に血液の凝固点を降下させる物質として南極海に生息するノトセニア科の魚類から発見された⁽¹⁾。海水の凝固点がおおよそ -1.9°C であるのに対し、一般的な真骨魚類の血液の凝固点は -0.7°C 程度である。このため、水温の低い南極海では魚類は常に血液が凍結する危険に曝されることになる。ところが、このノトセニア科の魚の血液の凝固点は -1.9°C 以下であり、この凝固点の低下は、血中のイオン濃度や低分子に起因するモル凝固点降

下だけでは説明がつかなかった。この研究の過程で、凝固点降下に寄与する高分子として同定されたのが AFP であった。それ以降、AFP は魚類のみならず、昆虫、植物、菌類、バクテリアなど、様々な低温適応生物から発見されている。

通常、水または水溶液の凍結は、過冷却状態の水溶液中に発生する氷結晶（氷核）が成長し系全体を埋め尽くすことで起こる。AFP は一つ一つの氷結晶の特定の表面を認識し、吸着する機能を有している。この吸着により、水分子の氷結晶表面への結合が抑制される。その結果、水溶液中のすべての氷結晶の成長が妨げられ、系全体の凍結が回避される。AFP が発揮するこの“不凍活性”によって水溶液の凝固点が低下することになる。しかし、冷却がさらに進むと、突如として氷結晶の爆発的な成長が開始される（図1）。この温度が AFP の氷結晶成長抑制の限界であり、AFP 溶液の凝固点となる。一方、氷結晶が融解する温度すなわち融点は、AFP によってわずかに上昇する⁽²⁾。したがって、融点と凝固点は一致せず、AFP による凝固点降下はモル凝固点降下とは区別される現象であることがわかる。AFP 溶液の凝固点と融点の差は熱ヒステリシス (TH: thermal hysteresis) といわれ、AFP の不凍活性の指標となっている。

不凍機能に加えて、1990年代には Rubinsky らに

Antifreeze Protein: Functions and Applications
Yoshiyuki NISHIMIYA, Hidemasa KONDO, Mami SAKASHITA, Ai MIURA, Sakae TSUDA, *¹(独)産業技術総合研究所, *²北海道大学大学院生命科学院

図1 ■ 不凍タンパク質溶液の凝固点降下

水の融点と凝固点は等しい。融点では水と氷が平衡で共存するが、融点より高ければ液相が安定となり、低ければ固相が安定となる。AFP 存在下では、融点より低い温度域でも成長抑制された水と氷が共存できる。この温度域の下限が凝固点であり、凝固点以下では固相が安定となる。

よって“非凍結温度の低温環境下において低温障害から細胞を保護する機能”が AFP に見いだされた⁽³⁾。彼らは、AFP 存在下で低温に曝されたウシ未成熟卵母細胞は、AFP 非存在下と比べ膜の損傷が低減され、*in vitro*での成熟率も向上したことを報告している。細胞は低温に曝されると、代謝の低下に伴う ATP (アデノシン三リン酸) の生産量の減少、細胞膜を構成するリン脂質の相転移や膜タンパク質の機能低下によって細胞の恒常性維持が困難になり、死に至る。AFP が細胞の低温障害を低減する機構は明らかになっていないが、AFP がイオンチャンネルに作用してカルシウムイオンの細胞内流入を防止する、もしくは細胞膜の相転移を防ぐという仮説が提唱されている。

AFP の有するこれらの特殊な機能は、氷菓子の食感や冷凍食品の品質改善、凍結不能食品の凍結、細胞・臓器の保存、さらには水を細孔源とする高気孔構造体の構築、氷スラリーの安定化など、食品、畜産、医療、工業分野で幅広い産業利用が期待されている。しかし、AFP を産生する生物が極地周辺の高緯度地域に生息するうえ、体液や血液から精製する必要があることから、AFP

は希少性がきわめて高く、コスト・実用面で普及が困難な物質であった。筆者らは、日本最北の北海道であれば AFP を産生する生物が生息している可能性が高いと考え、種々の低温適応生物を集めて AFP の有無を調査した。その結果、50 種を超える国内の魚種、昆虫、植物、菌類が AFP を発現していることが明らかとなった。

不凍タンパク質の種類

これまでに発見されている AFP の中でも、特に魚類、昆虫類由来の AFP は構造と機能に関する研究が数多くなされており、最も解析が進んでいる。図2に魚類および昆虫類由来 AFP の特徴をまとめた。魚類からは不凍糖タンパク質 (AFGP: antifreeze glycoprotein) および AFP I~IV が報告されており、これらは 1℃ 程度の TH 値を示す。AFGP はノトセニア科やタラ科の魚類から発見されており、主として Ala-Ala-Thr の繰り返し配列から成る。Thr 側鎖の水酸基は *N*-アセチルガラクトサミンとガラクトースからなる二糖で修飾され、この糖鎖が氷結晶結合に関わっていることが明らかになっている。

トリペプチドの繰り返し回数は様々であり、分子量 2,600~33,000 の AFGP が確認されている⁽⁴⁾。

AFP I はカレイ科とカジカ科に属する魚類から発見されている分子量 3,300~4,500 の Ala に富んだ α -ヘリックス構造のタンパク質である。肝臓で生産される分泌型の liver-type と皮膚や鰓で生産される skin-type があり、カジカ由来 AFP I とカレイ由来の skin-type AFP I のアミド末端領域には α -ヘリックスの形成を阻害する Gly や Pro が含まれている。カレイ由来 AFP I は α -ヘリックスの同一面上に周期的に現われる Ala と Thr のメチル基が、カジカ由来 AFP I では Ala のメチル基が氷結晶結合に関わっている⁽⁵⁾。

AFP II は C-タイプ (カルシウム依存性) レクチンの糖認識ドメイン (CRD: carbohydrate recognition domain) に高い相同性を示す分子量 14,000~24,000 の AFP で、不凍活性に対するカルシウムイオンの必要性の違いから Ca^{2+} 依存型と非依存型に分類されている^(6,7)。 Ca^{2+} 依存型 AFP II は CRD と同様の Ca^{2+} 結合残基を保持しているが、 Ca^{2+} 非依存型では保存されていない。 Ca^{2+} 依存性 AFP II はニシン科とキュウリウオ科の魚類、 Ca^{2+} 非依存性 AFP II はケムシカジカ科のヘミトリプテルス・アメリカヌスから単離されている。 Ca^{2+} 依存性と非依存性 AFP II の氷結晶結合部位は互いに異なり、 Ca^{2+} 依存性 AFP II の場合、 Ca^{2+} 配位サイトが氷結晶結合部位の中心であることが報告されてい

図2 ■ 魚類および昆虫類由来不凍タンパク質

魚類および昆虫類由来 AFP の多くは、機能と構造が詳しく解析されている。一次構造や三次元構造の特徴から、魚類由来 AFP は 5 種類、昆虫由来 AFP は 3 種類に分類されている。

る⁽⁸⁾。

AFP III はゲンゲ科の魚類から発見された、分子量 6,500~7,000 の球状タンパク質である。平面性の高い分子表面を一部に有しており、この領域が氷結晶結合部位とされる⁽⁹⁾。一魚体中に 10 種類以上もの AFP III アイソフォームが発現されている場合があり、これらはイオン交換樹脂に対する吸着性の違いから、QAE-Sephadex 結合型と SP-Sephadex 結合型に分類される⁽¹⁰⁾。

AFP IV はカジカ科のミオクソケファルス・オコトデケンスピノスから単離された Gln に富んだ分子量 12,200 のタンパク質である。その一次構造から、4 つの α -ヘリックスが互いに逆方向に並列したアポリポタンパク質様のバンドル構造を形成すると予想されている⁽¹¹⁾。

昆虫由来 AFP では、Thr-Cys-Thr を含む 12~13 アミノ酸からなる配列を繰り返し単位にもつ右巻き β -ヘリックス型 AFP がチャイロコメノゴミムシダマシなどの甲虫類の幼虫から、また Thr-Xaa-Thr (Xaa: 任意のアミノ酸) を含む 15 アミノ酸配列を繰り返し単位とする左巻き β -ヘリックス型 AFP がハマキガの一種から見つかった^(12,13)。いずれの AFP も、タンパク質表面

上に整然と配置される 2 列の Thr が氷結晶結合残基として特定されている。また、Gly-Xaa-Xaa の繰り返し配列を有する Gly に富んだ新規 AFP がトビムシの一種から発見されている⁽¹⁴⁾。これらの昆虫由来 AFP は魚類由来 AFP と比べて 10 倍以上高い TH 値を示すことから、高活性型 (hyperactive) AFP と呼ばれる。最近、カレイ科の魚類から分子量 17,000 の AFP I がホモ二量体を形成した高活性型 AFP I が発見されている⁽¹⁵⁾。

この他にも、植物由来の AFP として、キチナーゼ様、タウマチン様 AFP などの報告がある⁽¹⁶⁾。バクテリア⁽¹⁷⁾ および菌類からも AFP は発見されており、筆者らも担子菌由来の AFP を報告している⁽¹⁸⁾。

氷結晶形状と不凍タンパク質の吸着面

なぜ、構造が大きく異なるこれらのタンパク質が共通して「不凍活性」を示すのだろうか？ 氷結晶成長抑制機構を説明する前に、まず各々の AFP 溶液中で観察される氷結晶形状の違いと AFP が吸着する氷結晶面を見ていきたい。私たちが普段生活している 1 気圧下では、

図3 ■ 氷結晶の形状と構成面

(A) 六方晶氷 (Ih). 基底面 (0001) とプリズム面 ($10\bar{1}0$) で囲まれている. (B) 氷結晶の顕微鏡写真. (a) 水, (b) 魚類由来 AFP 溶液, (c) 昆虫由来 AFP 溶液. 水中では氷結晶が円盤状に成長するが, AFP 溶液中では形状修飾を受け, 成長が抑制された氷結晶が観察される. (C) カレイ由来 AFP I が吸着するピラミダル面 ($20\bar{2}1$) およびカジカ由来 AFP I が吸着する第二プリズム面 ($2\bar{1}\bar{1}0$). (D) バイピラミダル氷結晶の模式図. a 軸方向の成長抑制を受けながら, 基底面上に新たな層が積み重なっていくことで形成されると考えられている.

氷結晶は2つの基底面と6つのプリズム面からなる六方晶系 (Ih) の構造を形成する (図3-A). 詳細は専門書に譲るが, 氷結晶 Ih の単位格子は a_1, a_2, a_3 および c の4つの結晶軸で規定され, ミラー面指数を用いて各結晶面を表わすことができる. c 軸とのみ交わる基底面は (0001), a_1, a_3 軸のみと交わるプリズム面は ($10\bar{1}0$) で表わされる. 基底面に垂直な他の5つの氷結晶面もプリズム面 ($10\bar{1}0$) と同等な面である.

氷結晶 Ih の a 軸方向の成長速度は c 軸方向に比べ100倍以上速く, 水溶液中に生成した氷結晶は a 軸方向に沿って円盤状に成長する. しかし, AFP 溶液中では異なる形状の氷結晶が観察される. たとえば, 魚類由来 AFP, AFP I~IV 溶液中では2つの六角錐を底面で重ねたバイピラミッド型, 昆虫由来 AFP 溶液中では AFP の種類に応じてレモン型や六方平板型などの特徴的な形状の氷結晶が観察される (図3-B). これは, それぞれの AFP が吸着し成長を阻害する氷結晶表面が異なるため

だと考えられている.

Knight らはアイスエッチング法によりカレイおよびカジカ由来 AFP I について, それぞれが吸着する氷結晶面の特定を試みた. その結果, カレイ由来 AFP I はピラミダル面 ($20\bar{2}1$), カジカ由来 AFP I は第二プリズム面 ($2\bar{1}\bar{1}0$) に結合することが明らかにされた⁽¹⁹⁾ (図3-C). このアイスエッチング法は, 結晶軸方位を決定した氷の種結晶を非常に希薄な AFP 溶液中 (3×10^{-2} mg/ml 程度) で成長させ, その結晶表面を昇華させることで AFP の吸着面を検出する方法である. 希薄溶液中では AFP が氷結晶の成長を抑制できず, 氷結晶中に取り込まれていく. この氷結晶の表面を昇華させると AFP の吸着面は白濁して見え, それ以外は滑らかな鏡面状になる. これまでに, アイスエッチング法を用いて幾つかの AFP についてその吸着面が解析されている. 魚類由来 AFP では AFP と AFP III がプリズム面 ($10\bar{1}0$) に吸着することが示された⁽²⁰⁾. 一方, 高活性型のハマキガ由来 AFP

図4 ■ 不凍タンパク質溶液中での氷結晶成長

(A) 氷結晶の成長様式。(B) 爆発的に成長する氷結晶の顕微鏡写真。魚類由来 AFP 溶液中で成長を抑制されていたバイピラミダル氷結晶は、凝固点でピラミッドの頂点から c 軸方向に沿った急激な伸長成長を開始する。昆虫由来 AFP 溶液中では c 軸に垂直な 6 方向への爆発的な成長が観察される。

はプリズム面 ($10\bar{1}0$) と基底面 (0001) の両方に吸着できることが明らかにされている⁽¹³⁾。前述の AFP I も含め、魚類由来 AFP には基底面 (0001) への吸着が確認されない。魚類由来 AFP 溶液中に共通してバイピラミダル氷結晶 (図 3-D) が形成されるのは、AFP が基底面に吸着せず c 軸方向の氷結晶成長を抑制できないためだと考えられている。

基底面の成長抑制能の違いは、凝固点における氷結晶の爆発的な成長様式にも表われる。魚類由来 AFP の場合、バイピラミダル氷結晶の頂点から c 軸方向に急激に伸長する⁽²¹⁾。一方、ハマキガ由来 AFP の場合、氷結晶を中心として c 軸に直交する a 軸方向に急激に拡大していき c 軸方向の成長は観察されない⁽¹³⁾。同様の爆発的な成長は、甲虫由来 AFP や高活性型 AFP I などでも観察される (図 4)。これは、魚類由来 AFP がバイピラミッドの頂点上の極微小な基底面からの成長を阻止できないのに対し、高活性型 AFP は基底面の成長も抑制できるため、 c 軸方向に比べて非常に速い a 軸方向の成長が優位になると理解できる⁽²¹⁾。

氷結晶-不凍タンパク質間相互作用

図 2 で示しているように、一部の AFP については部位特異的変異実験や高分解能の三次元構造解析から氷結

晶結合部位が推定され、氷結晶結合モデルが提唱されている。各々の AFP の氷結晶結合部位には、氷結晶面上の酸素原子の配置に符合する幾つかの極性アミノ酸残基が存在する。そのため、これらの極性アミノ酸残基と氷結晶面上の酸素原子との水素結合モデルが初期に提案された。しかし、AFP と氷結晶の強固な結合を説明するには水素結合の数が少なすぎることを、充填度の高い氷結晶結合部位では極性アミノ酸側鎖の運動性が低く、指向性の結合を形成しにくいことが指摘されていた。そして、カレイ由来 AFP I で氷結晶面との水素結合が予想されていた 4 つの Thr をすべて Val に置換した変異体が、野生型と同じ TH 値を示したことにより、水素結合モデルに疑問がもたれるようになった。

このモデルに代わって提案されているのが、分子表面の相補性に基づいた結合モデルである。高分解能構造解析により、AFP の氷結晶結合部位は各々の標的氷結晶面と形状相補性が高いことが示されている。こちらのモデルでは、AFP と氷結晶間に形成される van der Waals 相互作用と幾つかの水素結合がエンタルピー的に有利に働き、結合によって生じる氷結晶-AFP 界面の水分子の放出がエントロピー的に有利に働くとしている⁽²²⁾。筆者らは、国産 AFP を用いて Ca^{2+} 非依存性 AFP II の X 線結晶構造解析に初めて成功し、このモデルに基づいてその氷結晶結合機構を議論している⁽²³⁾。

図5 ■ 不凍タンパク質による氷結晶成長抑制機構

AFPが存在しない場合、結晶面の層状成長が容易に進行する。AFPの存在下では、吸着したAFPとAFPの間に突起の面が形成され結晶面の成長が抑制される。温度の低下により突起面の曲率は増大していくが、その上限を超えると突如上面から急激な成長が開始される。

氷結晶成長抑制機構

それでは、AFPが氷結晶面に吸着することで、どのように氷結晶成長が抑制されるのであろうか。その機構については諸説あるが、現在最も受け入れられているのは氷結晶面上でのAFPの不可逆的吸着による“adsorption-inhibition mechanism”⁽²⁴⁾の概念である。ここではKristiansenらによって発表されたモデル⁽²⁵⁾を基に、できるだけ簡略化してその概要を述べる(図5)。

過冷却水溶液中に氷結晶が生成した場合、氷結晶面上に水分子が容易に結合し核が形成される。この核を中心として次々と水分子が結合していき、新たな結晶面が構築される。この結晶面上にさらに核が形成され、新たな結晶面が積み重なる。この層状成長を繰り返すことにより、結晶面が前進していく。AFP存在下では、氷結晶面上の成長は吸着したAFP間の空きスペースに限定され、結果として結晶面上にいくつもの突起の隆起面が形成される。突起面と水分子間の水素結合は、突起面の曲率に比例して形成されにくくなる(Gibbs-Thomson effect または Kelvin effect)。突起面が成長を続け、その曲率がある値まで増大すると、突起面への水分子の結合が抑制され、成長を停止する。したがって、水溶液中の氷結晶は、局所的に突起面が成長するのみで全体としての成長は抑制される。温度がさらに低下して水分子の結合が促進された場合も、突起面の成長が曲率の増大をもたらす、再びその成長が停止する。突起面の曲率は吸着したAFP間の距離 d と突起面を球面とする球の半径(曲率半径) r で規定される。曲率は r の逆数であり、 $r = d/2$ のとき最大となる。曲率が最大値に達すると、これ以上の突起面の成長は曲率の低下を招く。その結果、突起面での成長が急速に進み氷結晶の爆発的な成長が誘引

される。

非凍結低温環境下における細胞保護機能

氷結晶成長抑制とは別に、AFPには細胞保護機能が見いだされている。これまで主に魚類由来AFP(AFGP, AFP I~III)について、非凍結低温環境下における細胞保護機能について検証されてきた。ブタやウシの未成熟卵母細胞などでその保護効果が確認される^(3, 26)一方で、ヒツジ精子に対しては運動性を低下させる⁽²⁷⁾という報告もある。また、リボソームを一定の速度で冷却・加温した場合、膜の相転移温度においてリボソーム内の溶質成分が漏出するのをAFPが抑制することが示されている。

図6 ■ 低温保存による細胞膜の損傷度

HepG2 (3×10^4 cell/well) を 37°C の CO_2 インキュベータで一晩培養後 PBS(-) で洗浄し、EC 液、BSA (10 mg/ml)/EC 液、nfeAFPs (10 mg/ml)/EC 液に浸漬して 4°C で 24 時間保存した。保存後の細胞を 37°C で 1 時間保温し、膜が損傷した細胞から保存液に放出された LDH 量を測定した。

図7 ■ 解凍後の寒天ゲルの写真

(A) AFP の添加なし. 水分を保持できずに潰れる. (B) AFP (0.12 mg/ml) を添加. 凍結前と同じ形状を保っている.

る^(28, 29).

筆者らは、国産のナガガジ由来 AFP III (nfeAFPs) を用いて HepG2 に対する細胞保護効果を検証した。分離腎保存液であるユーロコリンズ液 (EC 液) に BSA、魚体から精製した nfeAFPs (アイソフォーム混合体) をそれぞれ 10 mg/ml の濃度で溶解し、継代培養した HepG2 を各々の保存液に浸漬して 4℃ で 24 時間保存した。保存後の細胞を 37℃ で 1 時間保温し、細胞染色試薬で生死判定を行なったところ、EC 液と BSA を溶解した EC 液では大多数の細胞が死滅したのに対し、AFP を添加した保存液では明らかに高い生存率が確認された。細胞膜に障害を受けた細胞から保存液に放出される乳酸脱水素酵素 (LDH: lactate dehydrogenase) 量も AFP を添加することで劇的に減少することが示された (図 6)。また、走査型電気化学顕微鏡による一細胞観察を行なったところ、4℃ に保冷した HepG2 が EC 液中では 8 時間で膨張・破裂するのに対し、AFP を溶解した EC 液中では 16 時間まで膨張が確認されなかった⁽³⁰⁾。これらの結果から AFP が細胞膜の安定化に寄与することが示唆される。

不凍タンパク質の大量生産

氷結晶成長阻害の観察や TH 値の測定には数マイクログラムの AFP があれば十分である。十数 mg の AFP があれば、構造解析を行なうこともできる。しかし、この基礎研究で必要とされる量は産業利用を想定した応用研究では不十分である。「日本国内にも AFP を産生する生物が生息している」。この事実が明らかになったとき、筆者らは国産生物からの AFP 大量生産法の開発に取り組んだ。そして、生息個体数が多く食用として扱えるが市場価値のない廃棄魚を原料とし、血液からではなく魚肉から AFP を精製する方法を構築するに至った⁽³¹⁾。実は、前述の細胞保護効果の検証も、AFP を魚体から大量生産できるようになったことで実現した。この他にも、

寒天ゲルを食品モデルとして AFP の冷凍食品に対する品質改善効果を検証している。図 7 は、家庭用冷凍冷蔵庫で凍結し室温で解凍した寒天ゲルの写真である。AFP を添加しない場合、ゲルの構造が破壊され水の漏出が確認される。一方、AFP を添加したゲルは構造を維持している。これは、氷結晶の成長に伴うゲル構造の物理的破壊が AFP によって阻止されたためと考えられる。現在、数種類の魚類由来 AFP の高純度精製品および粗精製品を大量生産し、水を細孔源とする高気孔体の製造や細胞保存液などの応用研究を進めている。

おわりに

本稿では、AFP の機能とその発現機構に関する研究状況、そして応用の可能性までを紹介した。南極海の魚類から AFP が発見されてから、すでに 40 年以上が経過した。そして、AFP が特定の氷結晶面に吸着しその成長を抑制するというモデルが提唱されてからは 30 年以上が経っている。今なお広範な分野にまたがる多くの研究者によって、AFP と氷結晶の相互作用が解析され、数多くの成果が報告されているが、未だ原子レベルで記述されるには至っていない。AFP は氷という非常に身近な物質と相互作用するタンパク質であることから、その機能発現機構の解明は食品、工業をはじめ様々な産業分野での新技術の開発に貢献すると思われる。大量生産法の確立により実用化を見据えた応用研究も可能となってきた今、AFP の基礎研究成果のさらなる蓄積と産業利用の実現を期待したい。

謝辞：本稿で紹介した筆者らの研究は、産業技術総合研究所生物プロセス研究部門遺伝子資源解析研究グループの星野保グループ長、生体分子工学研究グループの小松康雄グループ長、平野悠博士、機能性蛋白質研究グループの上島達朗博士、大阪大学蛋白質研究所の鈴木守准教授、理化学研究所播磨研究所の杉本宏博士、株式会社ニチレイフーズの小泉雄史氏、井上敏文氏をはじめとする多くの方々の協力を得て行なわれました。この場を借りて深く感謝いたします。

文献

- 1) A. L. DeVries & D. E. Wohlschlag : *Science*, **163**, 1074 (1969).
- 2) Y. Celik, L. A. Graham, Y.-F. Mok, M. Bar, P. L. Davies & I. Braslavsky : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 5423 (2010).
- 3) B. Rubinsky, A. Arav & G. L. Fletcher : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **180**, 566 (1991).
- 4) M. M. Harding, P. I. Anderberg & A. D. J. Haymet : *Eur. J. Biochem.*, **270**, 1381 (2003).
- 5) M. M. Harding, L. G. Ward & A. D. J. Haymet : *Eur. J. Biochem.*, **264**, 653 (1999).
- 6) K. V. Ewart, D. S. C. Yang, V. S. Ananthanarayanan, G. L. Fletcher & C. L. Hew : *J. Biol. Chem.*, **271**, 16627 (1996).
- 7) W. Gronwald, M. C. Loewen, B. Lix, A. J. Daugulis, F. D. Sönnichsen, P. L. Davies & B. D. Sykes : *Biochemistry*, **37**, 4712 (1998).
- 8) Z. Li, Q. Lin, D. S. C. Yang, K. V. Ewart & C. L. Hew : *Biochemistry*, **43**, 14547 (2004).
- 9) Z. Jia, C. I. DeLuca, H. Chao & P. L. Davies : *Nature*, **384**, 285 (1996).
- 10) X.-M. Li, K.-Y. Trinh & C. L. Hew : *J. Biol. Chem.*, **260**, 12904 (1985).
- 11) G. Deng & R. A. Laursen : *Biochim. Biophys. Acta*, **1388**, 305 (1998).
- 12) Y.-C. Liou, A. Tocilj, P. L. Davies & Z. Jia : *Nature*, **406**, 322 (2000).
- 13) S. P. Graether, M. J. Kuiper, S. M. Gagné, V. K. Walker, Z. Jia, B. D. Sykes & P. L. Davies : *Nature*, **406**, 325 (2000).
- 14) L. A. Graham & P. L. Davies : *Science*, **310**, 461 (2005).
- 15) C. B. Marshall, A. Chakrabartty & P. L. Davies : *J. Biol. Chem.*, **280**, 17920 (2005).
- 16) M. Griffith & M. W. F. Yaish : *Trends Plant Sci.*, **9**, 399 (2004).
- 17) H. Kawahara, Y. Iwanaka, S. Higa, N. Muryoi, M. Sato, M. Honda, H. Omura & H. Obata : *Cryo Lett.*, **28**, 39 (2007).
- 18) N. Xiao, K. Suzuki, Y. Nishimiya, H. Kondo, A. Miura, S. Tsuda & T. Hoshino : *FEBS J.*, **277**, 394 (2010).
- 19) C. A. Knight, C. C. Cheng & A. L. DeVries : *Biophys. J.*, **59**, 409 (1991).
- 20) C. C. Cheng & A. L. DeVries : "Life Under Extreme Conditions", Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1991, p. 2.
- 21) A. J. Scotter, C. B. Marshall, L. A. Graham, J. A. Gilbert, C. P. Garnham & P. L. Davies : *Cryobiology*, **53**, 229 (2006).
- 22) P. L. Davies, J. Baardsnes, M. J. Kuiper & V. K. Walker : *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*, **357**, 927 (2002).
- 23) Y. Nishimiya, H. Kondo, M. Takamichi, H. Sugimoto, M. Suzuki, A. Miura & S. Tsuda : *J. Mol. Biol.*, **382**, 734 (2008).
- 24) J. A. Raymond & A. L. DeVries : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2589 (1977).
- 25) E. Kristiansen & K. E. Zachariassen : *Cryobiology*, **51**, 262 (2005).
- 26) B. Rubinsky, A. Arav, M. Mattioli & A. L. DeVries : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 1369 (1990).
- 27) S. R. Payne, J. E. Oliver & G. C. Upreti : *Cryobiology*, **31**, 180 (1994).
- 28) L. M. Hays, R. E. Feeney, L. M. Crowe, J. H. Crowe & A. E. Oliver : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6835 (1996).
- 29) M. M. Tomczak, D. K. Hinch, S. D. Estrada, W. F. Wolters, L. M. Crowe, R. E. Feeney, F. Tablin & J. H. Crowe : *Biophys. J.*, **82**, 874 (2002).
- 30) Y. Hirano, Y. Nishimiya, K. Kowata, F. Mizutani, S. Tsuda & Y. Komatsu : *Anal. Chem.*, **80**, 9349 (2008).
- 31) 西宮佳志, 三重安弘, 平野 悠, 近藤英昌, 三浦 愛, 津田 栄 : *Synthesiology*, **1**, 7 (2008).