細菌の氷核活性とその食品工業への応用

荒井綜一*

強力な凍結促進タンパク質の開発をめざして

茶畑の若葉の表面に生息する氷核細菌は、春の晩霜の原因になり、一番茶に被害を与える。この菌の氷核活性タンパク質の遺伝子がクローン化され、その一次構造が解明された。これにより、タンパク質の構造と氷核生成機構との関係が解明されつつある。一方、このタンパク質は食品の凍結促進剤として、果汁や卵白の凍結濃縮など、生鮮食品の風味と機能を保持した加工に有効であり、今後、食品工業での活用が期待される。

“八十八夜の別れ霜”という風流だが、実はこれが農業の大敵で、静岡県などの茶畑では、せっかくの一番茶が一夜で台なしになってしまう。

霜の原因は細菌である。とりわけ、春の晩霜や秋の初霜のように、厳冬前後に降る霜は、ほとんど百パーセント、細菌による一種の生物現象といつてよいようだ。ある種の細菌（後述）は、細胞表層に強力な氷核（ice nucleus）があって、水を簡単に凍らせてしまう。氷核活性（ice nucleation-active ; Ina⁺）細菌あるいは単に氷核細菌と呼ばれるこの種の菌が霜害の原因をなすものとして発見されたのは、わずか 20 年前のことである⁽¹⁾。以来、氷核細菌の研究は農業微生物学者を中心として行なわれてきた。その代表格はカリフォルニア大学の Lindow であろう。彼のグループは氷核細菌には氷核形成に関係する遺伝子があることを明らかにし、ice nucleation-active gene の頭文字をとって *ina* 遺伝子と名づけるとともに、この遺伝子の欠失した Ina⁻ 変異株を作製して圃場に散布し、Ina⁺ 野生株を駆逐する霜害防止実験を行なって有名になった^(2,3)。一方、カリフォルニアの民間研究所の Warren のグループは、各種の氷核細菌の *ina* 遺伝子のクローニング、塩基配列の決定（したがってコードする氷核タンパク質の一次構造の推定）といった研究を精力的に進めており（後述）、また優れた総説も書いている⁽⁴⁾。

筆者らは、以前から、水の凍結を抑制するタン

パク質の研究を行なってきたが⁽⁵⁾、数年前から、細菌の氷核活性を低減化させる試薬（界面活性剤）の開発を試み⁽⁶⁾、最近では並行して、*ina* 遺伝子のクローニング、氷核タンパク質の構造・活性相関の究明、そして氷核活性の食品加工への応用といった研究を進めている。

本稿では、①氷核活性とは何か、② *ina* 遺伝子と氷核タンパク質、③氷核タンパク質の構造と活性、④氷核活性の活用の順に話を進め、最近世界的に関心が高まっている氷核細菌の研究の新たな一側面を解説したみたい。なお、ごく最近、本誌に「昆虫体内に棲息する氷核活性細菌」という興味深い記事⁽⁷⁾が載っているので参照されたい。

氷核活性とは何か

氷核というのは水の凍結のきっかけとなるタネのことである。これが存在しないと、氷点下の温度になっても凍結（H₂O 分子の結晶化）は決して起こらず、水は過冷却の状態を保つ。完全に純粋な水は -40℃ 程度まで過冷却しうる。しかし、この辺の温度になると、H₂O 分子自体が集合してクラスター状となり、これが氷核の役割を果たすので凍結が始まる。この様式の凍結開始を均一核生成（homogeneous nucleation）という。普通われわれが見たり扱ったりする水は、完全には純粋でなく、何らかの異物を混入しており、それが核となって凍結し始める。この様式の凍結開始を不均一核生成（heterogeneous nucleation）という。

いずれの様式にせよ、水は必ず核生成をきっかけにして凍結し、六方晶の単結晶（図 1）とな

Bacterial Ice Nucleation Activity and Its Application to Food Technology

* Soichi ARAI, 東京大学農学部農芸化学科食糧化学研究室

図 1 ■ 氷の六方晶⁽⁸⁾

る⁽⁸⁾。次いで、これが成長していくが、成長の方向はc軸よりもa軸（互いに等価の a_1 , a_2 , a_3 軸の総称）のほうが優勢なので、細長く伸びるのではなく偏平に広がっていく。実はこの点が非常に重要で、凍結の促進には底面よりもプリズム面のほうが寄与する率が高いことを、読者はぜひ記憶に留めておいていただきたい。

要するに水の凍結は、物質一般の結晶化と同様、核生成と氷晶成長という2つのプロセスを経て完成する。この場合、水をいち早く凍結させるのに必要なのは、水の過冷却状態を氷点下のなるべく高い温度で破壊する強力な不均一核の存在である。不均一核には強いものから弱いものまでさまざまな物質がある。われわれが日常取り扱う水の凍結は塵や埃が核になることが多いが、これらはそれほど強い核ではなく、核生成（過冷却破壊）の温度 T_n は $-10 \sim -15^\circ\text{C}$ 程度（家庭用冷蔵庫の氷室の温度は -20°C ）である。砂塵に含まれるカオリンはやや強力で、 T_n は約 -9°C であるといわれ、昔から強力な氷核剤とされているAgI結晶の T_n は約 -8°C であるといわれる⁽²⁾。これらと比較して、氷核細菌は一般に -5°C 以高

の氷点下温度で、時として -1°C で水の凍結を開始させるほど強いのであって、現在までに知られている最も強力な氷核とされる⁽²⁾。もし茶畑の葉に氷核細菌が生息していなければ、空中から凝縮した水（露）が陽春の朝の気温などで霜に変わるはずはないのである。

氷核細菌としては、*Pseudomonas* に属する *P. fluorescens*, *P. syringae*, *P. viridiflava*, *Erwinia* に属する *E. ananas*, *E. herbicola*, *E. stewartii*, *Xanthomonas* に属する *X. campestris* などが挙げられる^(2,4,7)。これらが氷核活性（たとえば -5°C 以上の温度で水を凍結させる能力）を示すためには生菌である必要はなく、加熱以外の手段であれば滅菌してもかまわない。破壊して得た細胞膜画分にも氷核活性は十分に残存している。このことから、活性の発現は細胞表層に存在する特定の氷核物質によってなされ、その物質の存在形態は小胞体（vesicle）であろうと推定された^(9,10)。そして、最近 *ina* 遺伝子の発現産物である氷核タンパク質がその本体であることが判明した。

氷核遺伝子 *ina* と氷核タンパク質

氷核遺伝子の研究を初めて手がけたのは Lindow である。彼は、*P. syringae* の DNA フラグメントをベクターにつなぎ、大腸菌を形質転換させ、氷核活性をもつか否かを調べることにより、その遺伝子を単離して *ina* と命名した⁽¹¹⁾。一方、Warren のグループは、*P. fluorescens* の氷核遺伝子 *inaW* と *P. syringae* の氷核遺伝子 *inaZ* の塩基配列を解析し、それから推定される一次構造を提出した^(12,13)。筆者らのグループは、静岡県茶畑から分離された *E. ananas* IN-10⁽¹⁴⁾ の氷核遺伝子をクローン化して *inaA* と命名し、その全塩基配列と氷核タンパク質の一次構造を決定した^(15,16)。ほぼ同時に、Warren のグループは、*E. herbicola* の氷核遺伝子 *inaH* の塩基配列と氷核タンパク質の一次構造を決定した⁽¹⁷⁾。

inaA, *inaH*, *inaW*, *inaZ* がそれぞれコードする氷核タンパク質の一次構造（図 2）をみると、構成アミノ酸の数に多少の差はあるものの、きわ

inaA				inaH					
N	MKEDKVLILRTCANNMADHGGIHWPLSGIVECKYKPKVGFENGLTGLIWGKGS			55	N	MKEDKVLILRTCANNMADHGGIHWPLSGIVECKYKPKVGFENGLTGLIWGKGS			55
	SPLSLHADARRVVAEVADECIAIETHGWIKFPRAEVLHVGTQNSAMQFILHRA			110		SPLSLHADARRVVAEVADECIAIETHGWIKFPRAEVLHVGTQNSAMQFILHRA			110
	DYVACTELQAGPGPDVTSKAGNRSILPYTDDIDATIESGTSPTQTITIEI----			161		DYVACTEMQAGPGSPDVTSEKVGNSRLPYTDDIDATIESGTSPTQTITIEI----			161
R	-----			193	ATYGSTLS GTHQSOLI AGYGSTET AGDSSTLI			193	
	AGYGSTGT AGDSSTLV AGYGSTQT AGEESQOM AGYGSTQT GKGSDSLT			241	AGYGSTGT AGADSTLV AGYGSTQT AGEESQOM AGYGSTQT EMKGSOLD			241	
	AGYGSTGT AGADSSLI AGYGSTQT AGEDNSLT			273	AGYGSTGT AGDSSSLI AGYGSTQT AGEDSSLT AGYGSTQT AQKGSOLD			289	
	-----			305	AGYGSTGT AGADSSLI AGYGSTQT AGEESTQT AGYGSTQT AQKGSOLD			337	
	AGYGSTGT AGADSSLI AGYGSTQT AGEESTQT AGYGSTQT AQKGSOLD			353	AGYGSTGT AGDSSSLI AGYGSTQT AGEESDSSI AGYGSTQT AQKGSOLD			385	
	AGYGSTGT AGADSSLI AGYGSTQT AGEESDSSI AGYGSTQT AQKGSOLD			401	AGYGSTGT AGDSSSLI AGYGSTQT AGEESTQT AGYGSTQT AQKGSOLD			433	
	AGYGSTGT SGADSSLI AGYGSTQT AGEESTQT AGYGSTQT AQKGSOLD			449	AGYGSTGT AGDSSSLI AGYGSTQT AGEESDSSI AGYGSTQT AQKGSOLD			481	
	AGYGSTGT AGDSSSLI			465	AGYGSTGT AGYESSLI AGYGSTQT AGYGSTLT AGYGSTQT AQNESDIL			529	
	-----			481	TGYVSTST AGANSSLI AGYGSTQT ASYNSVLT AGYGSTQT AREGSDLT			577	
	AGYGSTST AGYESSLI AGYGSTQT AGYNSVLT AGYGSTQT AQNESDIL			529	AGYGSTGT AGDSSSLI AGYGSTQT ASYHSSLT AGYGSTQT AREQSVLT			625	
	TGYVSTST AGANSSLI AGYGSTQT AGYNSVLT AGYGSTQT AREGSDLT			577	AGYGSTST AGADSSLI AGYGSTQT AGYNSILT AGYGSTQT AQEGSDLT			673	
	AGYGSTGT AGDSSSLI			593	AGYGSTST AGADSSLI AGYGSTQT AGYNSILT AGYGSTQT AQEGSDLT			721	
	AGYGSTST AGADSSLI AGYGSTQT AGYNSILT AGYGSTQT AEEGSDLT			641	SGYVSTST AGADSSLI AGYGSTQT ASYHSSLT AGYGSTQT AREQSVLT			769	
	AGYGSTST AGADSSLI AGYGSTQT AGYNSILT AGYGSTQT AQEGSDLT			689	TGYVSTST AGADSSLI AGYGSTQT AGYNSILT AGYGSTQT AQERSDIL			817	
	AGYGSTST AGADSSLI AGYGSTQT ASYHSSLT AGYGSTQT AQEQSVLT			737	TGYVSTST AGADSSLI AGYGSTQT AGYNSILT AGYGSTQT AQENSOLD			865	
	TGYVSTST AGADSSLI AGYGSTQT AGYNSILT AGYGSTQT AQERSDIL			785	TGYVSTST AGYDSSLI AGYGSTQT AGYNSILT AGYGSTQT AQENSOLD			913	
	TGYVSTST AGADSSLI AGYGSTQT AGYHSLT AGYGSTQT AQERSDIL			833	TGYVSTST AGYESSLI AGYGSTQT ASFKSTLM AGYGSSTQ AREQSSLT			961	
	TGYVSTST AGADSSLI AGYGSTQT AGYNSILT AGYGSTQT AQENSOLD			881	AGYVSTST AGYDSSLI AGYGSTQT AGYQSTLT AGYGSTQT AEHSSTLT			1009	
	TGYVSTST AGYDSSLI AGYGSTQT AGYHSLT AGYGSTQT ARTSRDIL			929	AGYVSTAT AGADSSLI			1025	
	TGYVSTST AGPDSLI AGYGSTQT AGYNSILT AGYGSTQT GQNSDIL			977	AGYGSSTL SGIRSLT AGYGSSTL SGIRSLT AGYGSSTL SGIRSLT			1073	
TGYVSTST AGYESSLI AGYGSTQT ASFKSTLM AGYGSSTQ AREQSSLT			1025	AFSLVHADARRVVAEVADECIAIETHGWIKFPRAEVLHVGTQNSAMQFILHRA			1121		
AGYVSTAT AGYDSSLI AGYGSTQT AGYQSTLT AGYGSTQT AEHSSTLT			1073	SGADSVNQ AGHRSKLI AGADSTQ AGDRSKLI AGNNSVLT AGDRSKLI			1169		
-----			1089	AGNDCILM AGDRSKLI AGINSILT AGCRSKLI GSGNSTLT AGENSVLI			1217		
AGYGSSTL SGIRSLT AGYGSSTL SGIRSLT AGYGSSTL SGIRSLT			1137	C FRCWDGKRYTNVVAKTGKGIEADMPYQMDENNINVKPEE			1258		
AGYVSNQI ASHRSKI AGPESTQI TGNRSKLI AGKGSSTQ AGYRSLTI			1185						
SGADSVNQ AGHRSKLI AGADSTQ AGDRSKLI AGNNSVLT AGDRSKLI			1233						
AGNDCILM AGDRSKLI AGINSILT AGCRSKLI GSGNSTLT AGENSVLI			1281						
C FRCWDGKRYTNVVAKTGKGIEADMPYQMDENNINVKPEE				1322					
inaW				inaZ					
N	MKSEKVLVLRITCANMTDHCGLVWPLILGVECKFWEPWIKLENGLTGALWGGSS			55	N	MNLDKALVLITCANMADHCLGILWPAAGTGVESRYQSTRRHENGVLGLWAGTS			55
	AQLSMNADAKWVCEVIMDGLIFLENNEGVKFPRAEVVHVGRSSALGYISONS			110		AFLSVHADARRVVAEVADECIAIETHGWIKFPRAEVLHVGTQNSAMQFILHRA			110
	KHEACSSNLIKFTFSDVKSETRNIPALPIVDNMPNGVNRSTTVRNTQILET-			164		DPASTSTSTLTPMPTAIPMPAVASVTLPAVEQARHEVFDVASVAAAAPVNP			165
R	-----			212	PVTTPQNWQT-----			175	
	AYGSGTLT QANQSOLI AGYGSTET AGDSSTLI AGYGSTGT SGDSSTII			212	ATYGSTLS GDNHSLI AGYGSNEK AGNHSLI			207	
	AGYGSTGT AGDSSTLV AGYGSTQT AGGDSSTL AGYGSTQT AQVGSNLT			260	AGYGSTGT AGSDSLV AGYGSTQT AGGDSALT AGYGSTQT AREGSLT			255	
	AGYGSTGT AGPDSLI AGYGSTQT AGGESSTL AGYGSTQT AQVGSNLT			308	AGYGSTGT AGDSSLI AGYGSTQT SGGDSSTL AGYGSTQT AQEGSLT			303	
	AGYGSTGT AGPDSLI AGYGSTQT AGGDSSTL AGYGSTQT AQVGSNLT			356	AGYGSTGT AGDSSLI AGYGSTQT SGGDSSTL AGYGSTQT AQEGSLT			351	
	AGYGSTGT AGPDSLI AGYGSTQT AGGESSTL AGYGSTQT AQVGSNLT			404	AGYGSTGT AGVDSLI AGYGSTQT SGGDSSTL AGYGSTQT AQEGSLT			399	
	AGYGSTGT AGPDSLI AGYGSTQT AGGESSTL AGYGSTQT AQVGSNLT			452	AGYGSTGT AGVDSLI AGYGSTQT SGGDSSTL AGYGSTQT AQEGSLT			447	
	AGYGSTGT AGPDSLI AGYGSTQT AGGDSSTL AGYGSTQT AQVGSNLT			500	AGYGSTGT AGVDSLI AGYGSTQT SGGDSALT AGYGSTQT AQEGSLT			495	
	AGYGSTGT AGPDSLI AGYGSTQT AGGDSSTL AGYGSTQT AQVGSNLT			548	AGYGSTGT AGADSLI AGYGSTQT SGSESLT AGYGSTQT AREGSLT			543	
	AGYGSTGT AGPDSLI AGYGSTQT AGGDSSTL AGYGSTQT AQVGSNLT			596	AGYGSTGT AGADSLI AGYGSTQT SGSESLT AGYGSTQT AQEGSVLT			591	
	-----			628	-----			607	
	AGYGSTGT AGHSLT AGYGSTQT AQEGSLT			660	SGYVSTQ AGAASLT			673	
	AGYGSTST AGPESSI AGYGSTQT AGHESLT AGYGSTQT AQEDSLT			708	TGYVSTGT AGHESFI AGYGSTQT AGHSLT AGYGSTQT ARGSALT			655	
	AGYGSTST AGFNSLI AGYGSTQT SGYSLT AGYGSTQT AQDSSLT			756	AGYGSTGT AGGSSLI AGYGSTQT ASYRSLT AGYGSTQT AREHSLT			703	
	TGYVSTST AGYSLI AGYGSTQT AGYESTLT AGYGSTQT AQEQSLK			804	TGYVSTST AGNSLI AGYGSTQT AGFKSLT AGYGSTQT AQERTSLT			751	
	TGYVSTST AGYSLI AGYGSTQT AGYSLT AGYGSTQT AQEESLT			852	AGYGSTST AGYSSLI AGYGSTQT AGYESTLT AGYGSTQT AQENSALT			799	
	AGYGSTST AGYSLI AGYGSTQT AGYSLT AGYGSTLT ALDSLT			900	TGYVSTST AGYSSLI AGYGSTQT AGYESTLT AGYGSTQT AQERSALT			847	
	AGYGSTST AGYSSLI AGYGSTQT AGYSLT AGYGSTLT ALDSLT			948	TGYVSTST AGYSSLI AGYGSTQT AGYESTLT AGYGSTQT AQENSALT			895	
	-----			964	TGYVSTST AGFASLI SGYVSTQ AGYKSLT AGYGSTQT AEYSSLT			943	
	AGYGSTGT AGQDSSI			964	AGYGSTAT AGQDSSI			959	
AGYGSSTL SGHRSKI AGYGSSTL SGHRSKI AGYGSSTL SGHRSKI			1012	AGYGSSTL SGIRSLT AGYGSSTL SGIRSLT AGYGSSTL SGIRSLT			1007		
AGYVSNQI ASHRSKI AGHESLT AGHKSMLI AGKGSSTQ AGFRSLTI			1060	AGYGSSTL SGIRSLT AGYGSSTL SGIRSLT AGYGSSTL SGIRSLT			1055		
AGANSVQ AGDRSLT AGANSVLT AGDRSKLI AGNSVLT AGDRSKLI			1108	AGAGSVNQ AGDRSKLI AGADSNQ AGDRSKLI AGNNSVLT AGDRSKLI			1103		
AGDDCVLM AGDRSKLI AGKNCVLT AGDRSKLI GSGNSTLT AGENSVLI			1156	GGHDCILM AGQDRLT AGKHSLT AGARSKLI GSEGSTLS AGEDSLI			1151		
C FRCWDGKRYTNVVAKTGTEADVPYQIDEDSNVLIKAEDNSOTPDVQSQIQP				1211	C FRLWDGKRYQLVARTGENGEADIPYVYVNEDDIDVOKPEDDDWIEVK				1201

図 2 ■ *E. ananas*, *E. herbicola*, *P. fluorescens* および *P. springae* の氷核遺伝子 *inaA*⁽¹⁶⁾, *inaH*⁽¹⁷⁾, *inaW*⁽¹⁸⁾ および *inaZ*⁽¹³⁾ がコードする氷核タンパク質の一次構造と 3 つのドメイン (N, R および C ドメイン)

めて相同性が高いことがわかる。とくに, *inaA* タンパク質と *inaH* タンパク質はよく似ている。

4 つの氷核タンパク質にみられるもう一つの共通性はそのドメイン構造である。図 2 に示すように, いずれのタンパク質にも 3 つのドメインがある。なかでも最も特徴的といえるのが中央部に存在する繰り返し領域 (R ドメイン) で, 16 アミノ酸を 1 単位とする繰り返しが続く長大な領域である。*inaA* タンパク質では Ala¹⁹³~Ile¹²⁸¹ が R ドメインに相当し, 16 アミノ酸モチーフの繰

り返し数は 70 回に及ぶ。このドメインは 8 アミノ酸を 1 つのモチーフとするようにも見え, 繰り返し数が 140 回となる。この繰り返し単位をよく見ると, 8 つのアミノ酸の 5 番目に必ず (といってよいほど) セリンが存在することに注目したい。また, 48 アミノ酸を 1 つのモチーフと見ると, 繰り返し数は 23 回ぐらいとなる。*inaH* は *inaA* とまったく同等といえるほどよく似ている。*inaW* タンパク質および *inaZ* タンパク質では R ドメインの大きさ (したがって特定モチーフ

図 3 ■氷核タンパク質の立体モデルの1つ⁽¹⁸⁾

この図は立体構造の断面(図1の底面に相当)を示す。48 アミノ酸残基で1周する。AGYG は内部に埋没し、STLT は外部に露出し、6分の1周する。これが6回繰り返されてから2周目に入る。表面(図1のプリズム面に相当するところ)から氷晶が形成されていく。

の繰り返し数)は *inaA* および *inaH* でのそれよりやや小さい。

いずれの場合も、Rドメインの前後に、アミノ末端側のNドメインとカルボキシル末端側のCドメインが存在するが、これらはとくに特徴のないアミノ酸配列から成っている。

Rドメインの繰り返しモチーフがどのような立体構造に反映されるかは、X線結晶解析が行なわれていない現在、結論的なことはいえないが、Mizuno⁽⁹⁾ は8アミノ酸残基 AGYGSTLT を代表的なモチーフとして選び、その安定立体構造を計算して図3のモデルを提出した。これによれば、8アミノ酸で1回転するヘリックス構造が6回繰り返されて1周するが、露出された領域の特定の部位(セリン残基か?)に水分子が歪なく結合でき、しかも結合した水から氷晶が成長する場合も構造的に無理がないとい

う。つまり、氷核タンパク質のRドメインこそ細菌の氷核活性の本質の部分である。さらに想像を逞しくすれば、これが真の氷晶のプリズム面(図1)に似たように機能するとも受けとめられる。

氷核タンパク質の構造と活性

氷核タンパク質のNドメイン、Rドメイン、Cドメインが活性の発現にどのように寄与するかを明らかにするため、筆者らは⁽¹⁶⁾、*inaA* の5'末端あるいは3'末端から少しずつ欠失させたDNA断片を大腸菌に導入し、その大腸菌が氷核活性を獲得するか否かを調べた。それによれば、図4のように、5'末端からの欠失では、コード領域のNドメインの欠落はもとより、コード領域のSer⁴⁶² (Rドメイン)に相当する部分までの欠落でも有意の氷核活性を獲得した大腸菌が得られた。これに対し、3'末端からでは、コード領域のThr¹²⁹¹ (Cドメイン)に相当する部分まで欠失させたような塩基欠失処理で氷核活性を示さない大腸菌が得られた。

筆者らは最近、非欠失型および各種の欠失型タンパク質をWesternブロッティングによって確認し、これらのタンパク質を抽出することによって、図4に示す結果が菌株レベルのみならず、タンパク質レベルでも得られることを明らかにしているが、現在のところ、Rドメインが氷核として

図 4 ■*inaA* タンパク質の一次構造の大きさと氷核活性の強さとの関係

左欄の記号はプラスミドの名称、*lacZ'* プロモーターからの転写の方向を矢印で示す。数字はタンパク質のアミノ酸残基番号、▨: *inaA* プロモーター、▨: Nドメイン、□: Rドメイン、■: Cドメイン。氷核活性は試験管内の水(2ml)を-5℃で凍結させるのに要する大腸菌(*inaA*を導入して形質転換させたもの)の菌数(2ml中)で表わし、右欄に記す。

図 5 ■ 大腸菌で封入体として大量発現させた *inaA* タンパク質 (矢印)

機能する上に、小さなC末端ドメインが何故に不可欠の存在であるのかについては明らかになっていない。

氷核細菌は低温微生物で、26°C 以上の温度で培養すると氷核活性を示さなくなる⁽¹⁹⁾。したがって、*inaA* を導入した大腸菌を生育至適温度 37°C で培養してしまうと氷核活性はなくなる。ところが、この大腸菌を低温にしばらく放置しておくと氷核活性が回復する⁽¹⁶⁾。このことは、氷核タンパク質が氷核活性を示すためには特定の立体構造をとる必要があることを示唆する。

上記のように、遺伝子工学的方法によって構造・活性相関を追求する研究が行なわれる一方、活性が最も大きい非欠失型タンパク質を大腸菌で大量生産させる研究が行なわれている。筆者らは、*lacZ* プロモーター下流に *inaA* をつなぎ、これを *E. coli* YA 21 株に組み込み、isopropyl- β -D-thio-galactopyranoside (IPTG) による誘導をかけたところ、図 5 のように、細胞内に封入体と

して *inaA* タンパク質が得られることを見いだした。この結果は、*E. herbicola* の氷核物質が小胞体 (vesicle) として産生され、それが脱離して菌体外に分泌されるという知見⁽⁹⁾、あるいは *P. syringae* では *inaZ* タンパク質が細菌表層でクラスター状になって存在するという知見⁽²⁰⁾と異なり、非常に興味深い。というのは、大腸菌内で産生された *inaA* タンパク質は内膜の内部に封入された状態であるのにもかかわらず、この大腸菌が強い氷核活性を示すからである。なお、これから抽出した *inaA* タンパク質そのものが氷核活性をもつことはすでに確認されている (未発表)。

氷核活性の活用

農業の分野では、農作物の霜害防除の観点から、もっぱら氷核活性の低減化を目的として研究がなされてきたが、近年、氷核細菌の性質を逆手にとって、これを有効利用しようとする試みがあり、一部は実用化されている。その最初の具体的

な例は、1988 年の カルガリー冬季オリンピック大会における降雪剤としての使用であろう。ここでは、 γ 線照射によって滅菌された *P. syringae* 菌体粉末を氷核剤として使用し、雪不足のゲレンデに雪を降らせたと伝えられる（この製品はわが国にも輸入されている）。

筆者ら⁽²¹⁾は、*E. ananas* のもつ高い凍結能力を食品に応用させるべく、まず食品素材の凍結組織化を行なった。凍結組織化とは、食品に含まれる水を凍らせることによって他の成分を局在化させて固定化し、もとのものと異なったテクスチャーの素材を得る手法である。しかし旧来の方法では、氷核を生成させるのに水の融点 (T_m) よりもはるかに低い温度にまで冷却させるために高いコストを要し、また過冷却度 ($T_m - T_n$) が高いと氷核生成頻度が高くなって一度にたくさんの氷晶ができ、組織がスポンジ化してしまうなど、問題が多かった。そこで、*E. ananas* の菌体を、卵白、ウシ血液、分離大豆タンパク質、豆腐に混ぜて凍結させ、凍結組織化を施したところ、氷核細菌を加えないものではスポンジ状の組織になるのに対して、加えたほうはフレック状の組織ができていた。また凍結の難しいしょうゆやみそなどの難凍結食品も氷核細菌を加えることにより、ほとんど過冷却することなく凍らせることができ、凍結乾燥の簡易化に途を拓いた。

次に、食品の凍結濃縮への応用を試みた。一般に、氷は H_2O の純粋な結晶であるから、氷晶の成長に伴って H_2O 以外の成分が氷晶から排除され溶液層に濃縮されてくる。この状態で、氷だけを分離し、溶液層を採れば、そこに食品成分が濃縮されていることになる。この方法は、食酢やコーヒーなどの濃縮で実用化されているが、細菌の氷核活性をこれに応用した例はない。とりわけ、生卵白や新鮮果汁の濃縮におけるように、加熱濃縮はもとより、凍結乾燥でも品質が損傷されるようなものを対象にする場合、きわめてマイルドな氷点下温度で目的を達成しうる氷核細菌の活用は非常に有効である。

筆者ら⁽²²⁾は、*E. ananas* 菌体膜画分を氷核として用いることにより、卵白では固形分が 30% に

なるまで濃縮でき、卵白の重要な機能特性の 1 つとされている気泡性は凍結濃縮前後で変わらないことを示した。同様にして、新鮮果汁（レモンジュース）を凍結濃縮したときは、減圧濃縮したものとは比べ、濃縮前の新鮮なレモン香気を保持していることがガスクロマトグラムからも官能検査からも認められた⁽²³⁾。新鮮な香気を保持したまま濃縮できるという長所のために、凍結濃縮法は広く食品加工の分野で応用される可能性を秘めていると考えられる。この場合、菌体は高圧処理によって滅菌してから使用することができる⁽²⁴⁾。菌体あるいは膜画分をアルギン酸などに固定して利用することも可能⁽²¹⁾、それによってこの氷核が食品に混入するのを避けると同時に、回収して再利用することも可能になる。

将来は、氷核タンパク質そのものをこれらのことに利用することができるようになると考えられる。そのためには、より有効な氷核タンパク質を人工的に造成する必要がある、これには、R ドメインの立体構造の確定、および各ドメインの変異 (domainary mutation)、そして部位指定変異 (site-directed mutagenesis) といったタンパク質工学的研究が必要となろう。

*

水の凍結の促進と抑制は 1 つの事象の表と裏の関係にある。ある生物（たとえば氷核細菌）は凍結促進タンパク質を産生し、ある生物（たとえば極地魚）は凍結抑制タンパク質を産生し、自らを外界の変化に適応させている。従来、純物理学的現象としてのみ扱われていた凍結という現象に、このように生物が深くかかわっていることは大変に興味深い。また、こうした生物の生活の知恵から、われわれ人間は、水を凍りやすくする方法を学び、これを工業的に応用しようとする。同時に、われわれは水を凍りにくくする方法をも学ぶことができ、これも工業的に応用することもできるのである⁽²⁵⁾。

約 1 年前の 1989 年 12 月、ハワイで環太平洋化学会議 (PACIFICHEM '89) が開催され、たくさんのシンポジウムが行なわれたが、そのなか

で、“常夏の地で氷の話題”というパラドックスのもとに R. E. Feeney 教授（カリフォルニア大学）と筆者とで企画したシンポジウム “Freeze Promotion and Inhibition” には、この記事の中でもたびたび名前のできた Lindow 博士や Warren 博士も参加して、活発な討論が行なわれた。とりわけ、細菌の氷核タンパク質の食品工業への利用の可能性については大きな関心が寄せられ、強力な凍結促進タンパク質の開発競争が世界的に開始されようとしているのである。いずれ機会を改め、その辺の状況を紹介してみたいと思う。

終りに、この解説記事の執筆に際し、筆者の共同研究者で現在日本たばこ(株)に所属する渡部聡氏に大変お世話になった。ここに心から感謝の意を表わしたい。筆者の共同研究者である渡辺道子（現在東京学芸大学教育学部）、阿部啓子（東京大学農学部農芸化学科）の両博士にはこの記事の原稿を精読していただいた。また、牧野孝宏（静岡県農業試験場）、黒田登志雄（北海道大学低温科学研究所）、小幡 斉（関西大学工学部）、平田愛子（東京大学応用微生物研究所）の四先生には、それぞれ氷核細菌の取り扱い方、凍結の理論、氷核活性の測定法、電顕撮影についてご教示いただいている。これらの諸氏に厚く感謝いたす次第である。

文献

- 1) R. C. Schnell & G. Vali : *Nature*, 236, 163 (1972).
- 2) S. E. Lindow : *Ann. Rev. Phytopathol.*, 21, 363 (1983).
- 3) S. E. Lindow, D. C. Arny & C. D. Upper : *Phytopathology*, 68, 523 (1978).
- 4) P. Wolber & G. Warren : *TIBS*, 14, 179 (1989).
- 5) 渡辺道子, 荒井綜一 : 化学と生物, 23, 366 (1985).
- 6) M. Watanabe, T. Makino, K. Okada, M. Hara, S.

- Watabe & S. Arai : *Agric. Biol. Chem.*, 52, 201 (1988).
- 7) 金子順一 : 化学と生物, 28, 666 (1990).
- 8) 黒田登志雄 : “結晶は生きている”, サイエンス社, 1984, p. 15.
- 9) P. Phelps, T. H. Giddings, M. Proccoda & R. Fall : *J. Bacteriol.*, 167, 494 (1986).
- 10) H. Obata, T. Tokuyama, S. Kawate, H. Hori, & Y. Higashi : *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2171 (1990).
- 11) C. S. Orser, J. B. Staskawicz, N. J. Panopoulos, D. Dahlbeck & S. E. Lindow : *Phytopathology*, 72, 1000 (1982).
- 12) R. L. Green & G. J. Warren : *Nature*, 317, 645 (1985).
- 13) G. J. Warren, L. Gorotto & P. Wolber : *Nucleic Acids Res.*, 14, 8047 (1986).
- 14) M. Goto, B. L. Hauang, T. Makino, T. Goto & T. Inaba : *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, 54, 189 (1988).
- 15) S. Arai, K. Abe, S. Watabe, Y. Emori & M. Watanabe : *FEMS Microbiol.*, 61, 53 (1989).
- 16) K. Abe, S. Watabe, Y. Emori, M. Watanabe & S. Arai : *FEBS Lett.*, 258, 297 (1989).
- 17) G. J. Warren & L. V. Corotto : *Gene*, 85, 239 (1989).
- 18) H. Mizuno : *Proteins : Structure, Function, and Genetics*, 5, 47 (1989).
- 19) C. Oser, B. J. Staskawicz, J. I. Oper, N. J. Panopoulos, D. Dahlbeck, S. E. Lindow & M. N. Schroth : “Modern Genetics of the Bacteria-Plant Interaction”, ed. by A. Puhler, Springer-Verlag, Berlin, 1983, p. 353.
- 20) G. M. Mueller, P. K. Wolber & G. J. Warren : *Cryobiology*, 27, 416 (1990).
- 21) S. Arai & M. Watanabe : *Agric. Biol. Chem.*, 50, 169 (1986).
- 22) M. Watanabe, J. Watanabe, K. Kumeno, N. Nakahama & S. Arai : *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2731 (1989).
- 23) M. Watanabe, K. Kumeno, N. Nakahama & S. Arai : *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2055 (1990).
- 24) M. Watanabe, T. Makino, K. Kumeno & S. Arai : *Agric. Biol. Chem.*, 55, 291 (1991).
- 25) 荒井綜一 : 化学と工業, 42, 1215 (1989).

書 評

“メダカの生物学”

評者には最近気に入っている言葉がある。「特殊なればこそ一般に通じ、一般では特殊にさえも通じない」という、物理学者 西沢潤一氏の言葉である。浅学にして物理学はすべて“一般”としか思っていなかった評者だから、氏の言葉の含意をとり違えているかもしれない。しかし、勝手な解釈を許してもらおうとすれば、この言葉はいみじくも生物科学の本質を衝いているといえる。

地球上にすむ生物はごく一部の例外を除けば、みな共通の遺伝暗号を使っているし、その例外にしても暗号が塩基3文字からなるという点では共通である。このよう

に、生物というものは1つ1つがどれほど特殊にみえても、ひと皮か、ふた皮むけば驚くほどの共通性をもつというのが我々の確固たる認識であり、そのことがまた、ダーウィン以来、生物の起源を単一のものに求める根拠ともなっている。そこで、生物科学に携わる研究者の態度が問われることになり、「特殊」か「一般」かの問題が出てくる。

今から 30 年近く前、分子生物学の第一次興隆期と呼ばれた時代、この分野の優れた研究者たちがこぞって、“一般”にうつつを抜かしていた日々があった。あえて言えば、この時代、“一般”に最も近い生物はファージと大腸菌だと信じられていて、生物の特殊性を問題にする研究は、切手収集と選ぶところのない“枚挙”にすぎ