

多結晶氷の再結晶化過程に及ぼす不凍タンパク質の影響

清田 達央¹、佐崎 元^{1,2}、中坪 俊一³、Salvador Zepeda¹、宇田 幸弘¹、
長嶋 剣¹、古川 義純¹

1. 雪氷新領域部門相転移ダイナミクス分野
2. 共同研究推進部
3. 技術部装置開発室

はじめに

寒冷圏に生息する変温動物は、血液が融点以下の過冷却状態であるにもかかわらず、凍死せずに生命活動を維持している。なぜなら、彼らの血液中には氷の成長を抑制する不凍タンパク質と呼ばれるタンパク質が存在するためである。現在、不凍タンパク質に関する生物学的な研究は多くなされているが、物理学的な研究はほとんど進んでいない。本研究では、氷の結晶成長に及ぼす不凍タンパク質の影響を、不凍タンパク質を含んだ多結晶氷の再結晶化過程をその場観察することで明らかにしようと試みた。再結晶化現象とは、多結晶内部に存在する、相対的に小さい結晶粒の融解と大きな結晶粒の成長が同時に起こる現象である。不凍タンパク質を含んだ多結晶氷の再結晶化過程をその場観察することで下記の点を同時に観察することができる。

- ・ 結晶粒の成長と融解に対する不凍タンパク質の効果
- ・ 不凍タンパク質と各結晶面間の相互作用
- ・ 結晶粒界での不凍タンパク質の振る舞い

実験を行うため、多結晶内部の結晶粒の結晶方位がランダムな多結晶氷を再現性よく作成することが出来る試料作成装置を製作した。また、作成した多結晶氷を一定温度で長時間焼鈍させ、再結晶化過程をその場観察できる再結晶化過程その場観察用チャンバーを製作した。

実験

1. 試料の作成（試料作成装置を使用）

液体窒素で冷却したカバーガラス上に少量の不凍タンパク質水溶液を滴下すると、水溶液が薄膜状に広がり、瞬間的に凍る。この方法で、多結晶内部の結晶粒の結晶方位がランダムな薄膜状の多結晶氷を作成できる。本実験では、不凍タンパク質 typeIII 水溶液 5 μ L (0.01 mg/mL) を高さ 1 m から滴下し、厚さが 70–80 μ m の多結晶氷を作成し、試料とした。今回製作した試料作成装置を用いることで、液滴の体積と滴下点が固定され、再現性よく試料を作成することができた。

2. 試料の焼鈍（再結晶化過程その場観察用チャンバーを使用）

試料は一定温度で長時間焼鈍される必要がある。今回製作したチャンバーを使用することで、銅ブロック内にある試料は $\pm 0.01^{\circ}\text{C}$ の精度で温度制御できた。

3. 観察

試料の観察は 3 種類の光学顕微鏡（透過型偏光顕微鏡、反射型レーザー共焦点顕微鏡、透過型位相差顕微鏡）を使用し、同一視野を同時観察した。

実験結果

図 1 にその場観察された純水の多結晶氷と不凍タンパク質を含んだ多結晶氷の再結晶化過程の様子を示す。両ケースにおいて、再結晶化現象を観察できたが、不凍タンパク質が再結晶化現象を顕著に抑制することが確認された。蛍光観察から、不凍タンパク質は結晶粒界に沿って網目状に分布し、結晶粒が成長する過程で、粒界に分布していた不凍タンパク質は結晶粒に取り込まれないことがわかった。結晶粒界の擬似液体層の厚みは -0.5°C で 20 nm であることが宇田らによって報告されている[1]。その結果から、粒界の不凍タンパク質濃度を計算すると観察時刻 172 分で 12 mg/mL となっており、不凍タンパク質によるモル凝固点降下は 0.003 K であった。この値は今回の実験条件の過冷却度 0.5 K より十分に小さい。このことから、粒界に存在する液体層は、過冷却状態で自発的に現れる擬似液体層であることが結論できた。また、三叉粒界が、二粒界よりも強い蛍光を発していた。この結果から、三叉粒界には二粒界よりも多くの不凍タンパク質が分布していることが結論できた。この結果は、三叉粒界の不凍タンパク質濃度が相対的に高い、または三叉粒界の液体層が相対的に厚いことを意味している。

解析

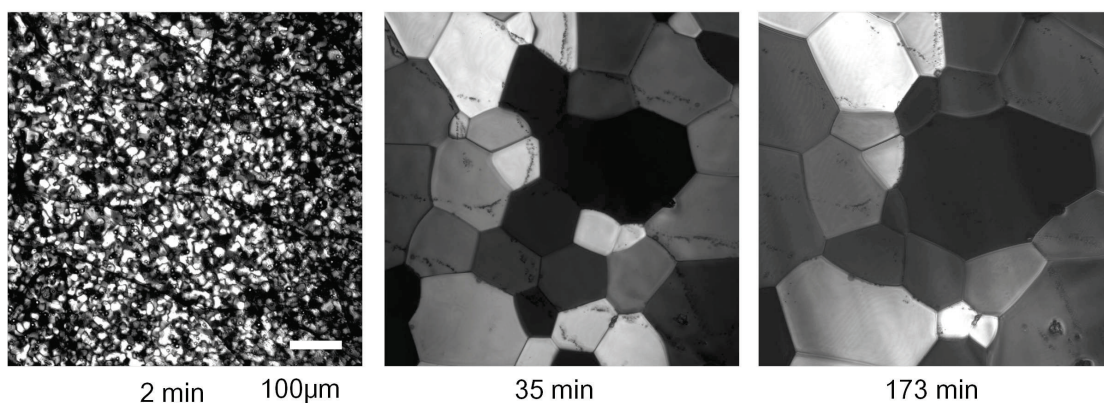
図 2 に、各過冷却度での純水の多結晶氷内部の結晶粒の平均粒径の時間変化の様子を示す。再結晶化現象の駆動力が、界面自由エネルギー不利を解消するためだけであると仮定すると、平均粒径 D は時間 t の関数として

$$D = Kt^{1/2}, \quad K: \text{速度定数}$$

と表せることが知られている[2]。

各過冷却度において、観察時間の前半は上の関係をよく満たしている。これは、前半は結晶粒が小さく、粒界面積が大きいので、従来のモデル通り界面自由エネルギー不利が再結晶現象の駆動力となっているからであると考えられる。一方、後半は従来のモデルに従っていない。これは、結晶粒が大きくなるにつれ粒界面積が下がるので、界面自由エネルギー不利以外の駆動力の影響が出てためと考えられる。また図 3 に、過冷却度 0.5 K での純水の多結晶氷と不凍タンパク質を含んだ多結晶氷の多結晶内部の結晶粒の平均粒径の時間変化の様子を示す。不凍タンパク質を含んだ結果も上記の関係を満たしていなく、純水の後半部分とよく一致していた。この結果から、結晶粒の表面に不凍タンパク質が吸着し、結晶粒の界面自由エネルギーが下がった結果、再結晶化が抑制されたものと考えられる。

純水



不凍タンパク質水溶液 0.01mg/mL

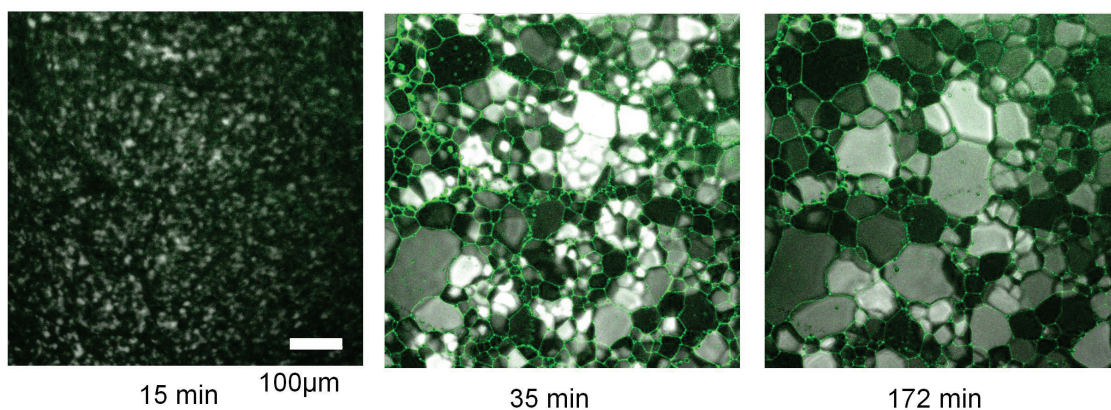


図1 偏光顕微鏡で観察した純水の多結晶氷（上段）と、偏光顕微鏡（白/黒）とレーザー共焦点顕微鏡（緑）で観察した不凍タンパク質を含んだ多結晶氷（下段）の再結晶化過程の様子。時間経過に伴い結晶粒が成長している様子が観察できた。

純水の多結晶氷内部の結晶粒の平均粒径時間変化

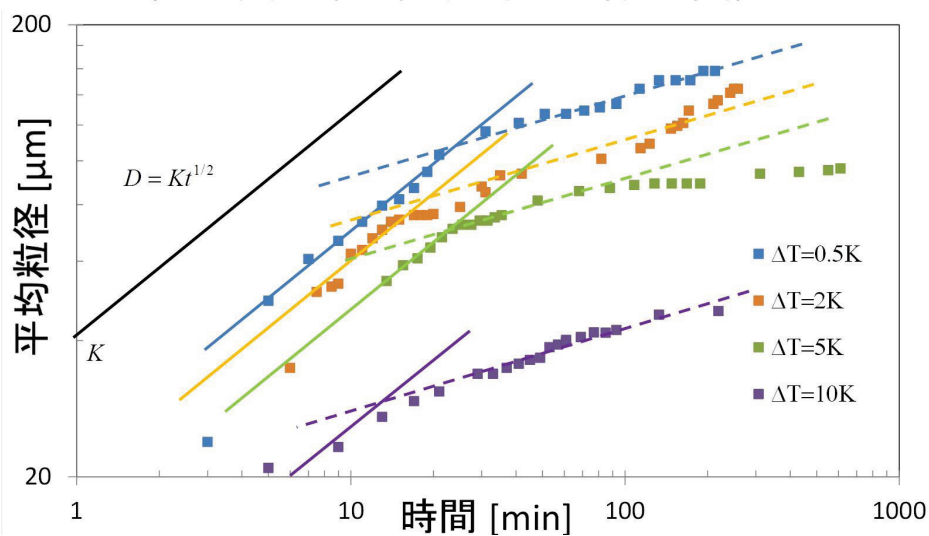


図2 純水の多結晶氷内部の結晶粒の平均粒径時間変化。前半と後半で粒成長のメカニズムが違うと考えられる。

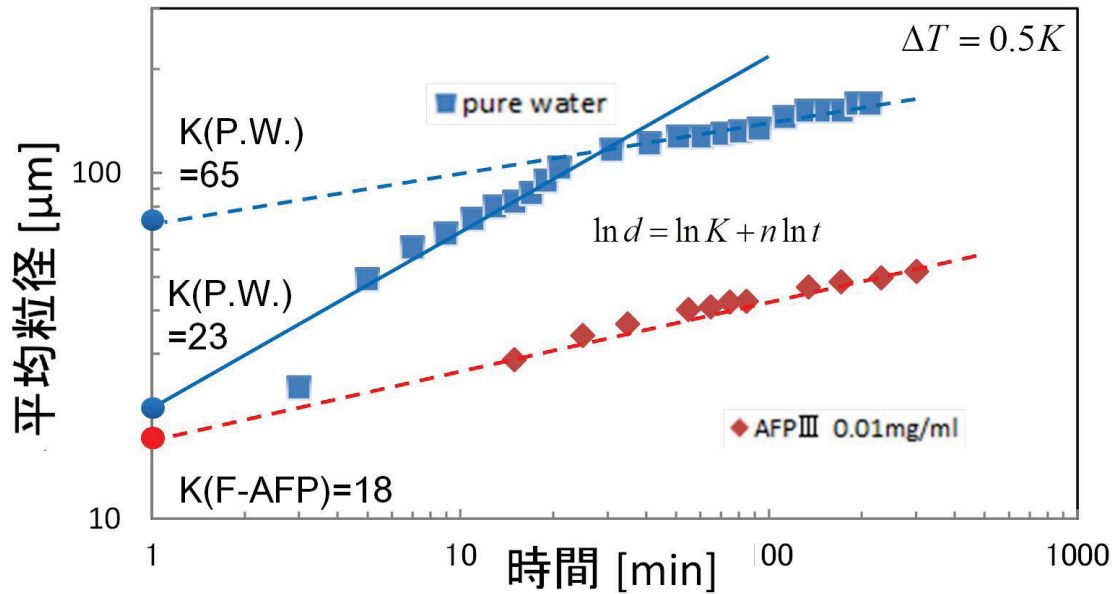


図 3 純水の多結晶氷と不凍タンパク質を含んだ多結晶氷の多結晶内部の結晶粒の平均粒径の時間変化。不凍タンパク質を含んだ結果と、純水の後半の結果のグラフの傾きがよく一致している。

おわりに

再結晶化現象を観察するため、再現性よく試料を作成できる試料作成装置と試料を一定温度で長時間観察できる観察用チャンバーを製作し、その場観察実験を行った。今後、さらに詳細に実験・解析を進め、不凍タンパク質が氷の結晶成長にどのように影響するのかを調べる予定である。

参考文献

[1] Y. Uda, *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 14355 – 14361 (2007)

[2] Beck, P. A. *et al.*, *AIME*, oct. 1–23 (1949)

Byrne, J. G., *Recovery Recrystallization and Grain Growth*. Macmillian Com., New York, pp.173 (1965)