

研究報告書

研究課題名：「不凍タンパク質作用発現機構の解明を目指したその場光観察」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：佐崎 元

1. 研究のねらい

寒冷地の動植物を凍結から護る不凍タンパク質は、食品の低温保存や冷凍食品の品質保全、低温医療などへの応用が期待されているが、その作用機構は未だ想像の域を出ていない。作用機構を直接解明するための「研究手段」がこれまでなかったことが、その理由である。不凍タンパク質の作用機構を明らかにするには、「不凍タンパク質分子」が氷結晶表面でどのように拡散・吸着・脱離するのか(図1)、そしてその結果、氷結晶の成長の大本となる「単位ステップ」(結晶を形作る分子層の成長端)の運動に不凍タンパク質がどのように影響を及ぼすのか(図1)、この両者を直接観察するための手段を新たに開発するしかないと着想した。これを実現するべく、さきがけ研究では、次に挙げる3つの直接観察を達成するための光学顕微技術の開発に挑んだ。

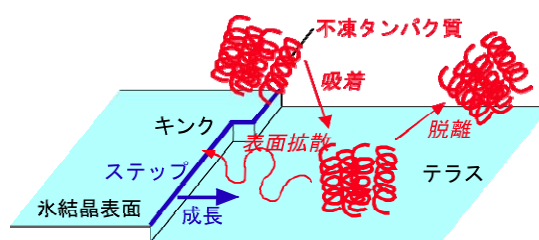


図1 氷結晶表面での不凍タンパク質の挙動と、それに対する氷結晶の分子層(その成長端をステップと呼ぶ)の応答。

- 1) 気相(過飽和水蒸気)から成長する氷結晶表面での単位ステップの観察。空気-氷界面の反射率は1.8%と比較的大きいため、この観察が出来なければ、2)の観察も不可能となる。
- 2) 融液相(過冷却水)から成長する氷結晶表面での単位ステップの観察。水-氷界面の反射率は0.007%と極めて小さい。成功すれば、融液-結晶界面の初めての分子レベル観察となる。
- 3) 水-氷界面での不凍タンパク質の蛍光1分子観察。氷結晶周囲での蛍光輝度分布の測定など、マクロな計測はこれまでもあるが、分子レベルでの観察は未だ全くない。

2. 研究成果

1) 気相から成長する氷結晶表面(空気-氷界面:反射率1.8%)での単位ステップの観察

これまでに光学顕微鏡メーカーと共に開発してきたレーザー共焦点微分干渉顕微鏡の、縦方向感度を飛躍的に改善するために、顕微鏡中の各光学素子の偏光特性を向上させるとともに、偏光面の角度を微調整する機構を作製・追加した。そして、過飽和水蒸気中で成長させた氷結晶(雪結晶と同じ)の表面を、この光学顕微鏡を用いて観察した。

その結果、氷結晶の六角底面上で、2次元島状の分子層が多数出現し、それらが横方向に成長し広がることで結晶が成長する様子が観察出来た(図2)。隣り合った分子層が合体する際にその縁(ステップ)のコントラストが完全に消滅することは(図2中の+印)、隣り合った分子層の厚みが等しいことを示す。分子層の合体に伴うステップコントラストの消滅が結晶表面上のいたるところで常に観察されることより、可視化した分子層は、結晶構造より決まる最小の厚みを持った単位ステップ(0.37 nm厚み)であることを証明した。また、氷結晶の側面上でも同様に単位ステップが観察できた。さらに、結晶が渦巻成長する様子の観察にも成功した。本

研究により、氷結晶が成長する様子を初めて分子レベルで追跡することが可能になった (PNAS, 2010)。

本研究では、氷結晶の大本となる基本構造(単位ステップ)をその成長中に直接可視化することに初めて成功した。この光学顕微鏡技術を用いると、氷結晶の成長・融解・昇華などの相転移機構を分子レベルで明らかにできるのみでなく、エアロゾルやオゾンホールなどの環境破壊、不凍タンパク質による動植物の凍結防止、さらには地球温暖化などの機構解明に役立つと期待される。

さらに、レーザー共焦点微分干渉顕微鏡を用いて、氷結晶の表面融解過程を直接観察した。その結果、氷結晶の六角底面上で、あたかも水と油の様に互いに混じり合わない2種類の表面液体相(疑似液体層)が生成することを発見した(図3)(PNAS, 2012)。 -1.5°C より低い温度では氷結晶の表面は成長するのみであるが、 $-1.5\sim-0.4^{\circ}\text{C}$ よりも高い温度ではバルク状の液滴(α 相:図3の白三角)が、

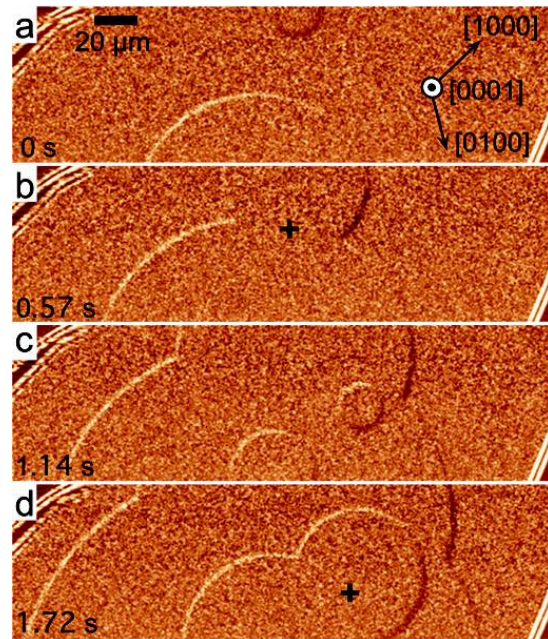


図2 氷結晶の六角底面上で、2次元島状の分子層(0.37 nm厚み)が多数出現し、それらが横方向に広がることで結晶が成長する様子。画像は0.57秒ごとに撮影した。隣り合った分子層が合体すると、互いの厚みが等しいため、分子層の縁(ステップ)のコントラストが完全に消滅する(図中+印)ことがわかる。

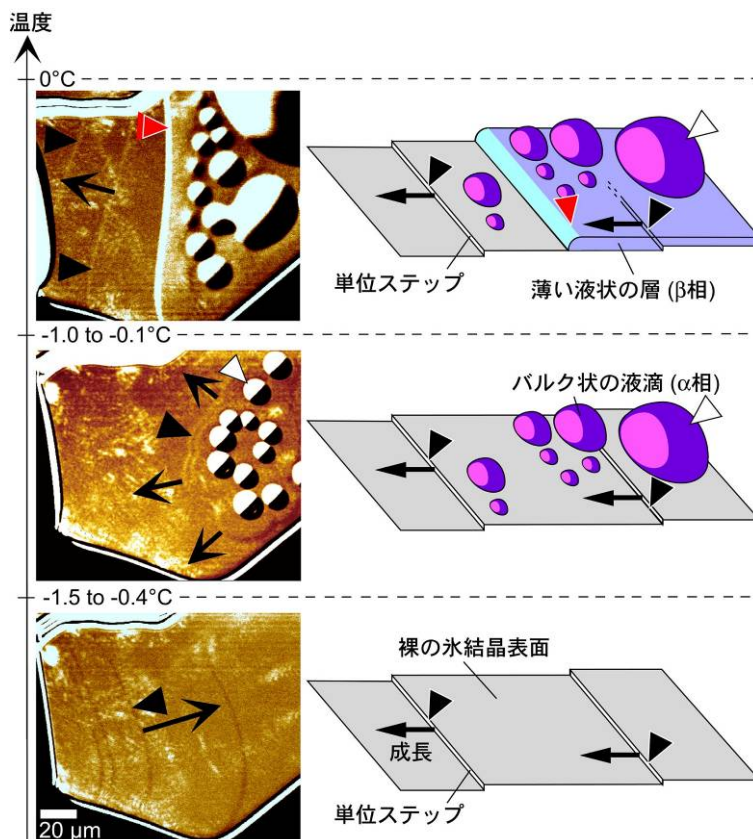


図3 氷結晶の六角底面上で生成する2種類の表面液体相。図の左側は光学顕微鏡写真で、右側は模式図。 α 相(白三角)と β 相(赤三角)の発生温度は実験のたびに若干のずれを示したが、同じ実験中では常に β 相は α 相よりも高温で発生した。2種類の表面液体相は、ダイナミックに氷結晶表面上を動き回り、合体を繰り返した。黒三角は氷結晶表面上の水1分子高さの分子層(単位ステップ)を示す。

そして $-1.0\sim-0.1^{\circ}\text{C}$ よりも高い温度では薄い液状の層(β 相: 図3の赤三角)が生成した。これらの形状の違いは、2つの表面液体相の物理的・化学的性質が大きく異なることを示す。2種類の表面液体相は、氷の結晶表面上を動き回り、合体を繰り返した。これまでは、表面液体相は1種類しか存在せず、氷の全表面から一様に生成すると考えられてきた。しかし、本研究により、2種類の表面液体相が存在し、それらは氷の表面上で極めて不均一かつダイナミックな振る舞いをするということがわかった。

水と油は性質が全く異なる分子より出来ているため互いに混ざり合わない。しかし、同じ水分子から出来ている2種類の表面液体相が互いに混ざり合わず、あたかも水面上に雨粒が乗った様な振る舞いを示すことは(図3)、基礎科学の観点から極めて興味深い。

本研究では、性質が異なる2種類の表面液体相が存在し、これらが氷の表面上で不均一かつダイナミックに振る舞うことを見出すことに成功した。本研究により得られた表面液体相についての新たな描像は、スケートの滑りやすさから雷雲での電気の発生まで、表面液体相が重要な役割を果たす幅広い現象の秘密を解き明かす鍵を握ると期待される。

2) 融液相から成長する氷結晶表面(水-氷界面: 反射率 0.007%)での単位ステップの観察

氷とその融液である水の屈折率差は非常に小さいため、水-氷界面の反射率はわずか0.007%しかない。このようなほぼ透明な界面においても単位ステップを観察するべく、1)で用いたものよりも5倍高出力なスーパーレミネッセントダイオード(波長 790 nm, 50 mW)を光源として用いた。それに伴い、光源の波長が赤外線領域に近くなったため、赤外線に対してより透過光強度の大きな素子を用いて光学系を作製し直した。また、融液からの結晶の成長は、気相からの成長に比べて何桁も速いため、分子レベルでの界面観察を行うには、氷結晶の成長を何とかして止める必要がある。そのため、上部を冷却して下部を加熱する温度勾配型の観察チャンバーを新たに作製し、観察を行った。

純水中で成長する氷結晶表面の一例を図4に示す。渦巻成長ステップ(黒矢印)とその前進を明瞭に捉えることができた。融液と結晶の界面での分子レベル直接観察には、材料によらずこれまでまだ誰も成功しておらず、本研究が初めての成功例となる。このステップが「単位ステップ」であるかどうかはまだ確認できていないが、今後様々な条件下で成長実験を繰り返し、氷結晶が2次元核成長する様子を捉えることで証明できると期待している。

また、0.01 mg/mL の濃度で不凍タンパク質を加えると、不凍タンパク質が氷結晶表面でステップの前進を妨げるために、ステップが顕著に束化(バンチング)すること、およびステップの発生と成長に振動が見られることを見出している。

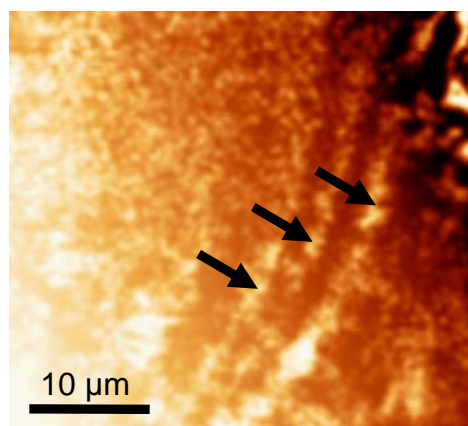


図4 純水中で観察した氷結晶の底面。黒矢印はステップを示す。

3) 水-氷界面での不凍タンパク質の蛍光1分子観察

まず、不凍タンパク質(タイプ III: ナガガジ科魚由来)に、蛍光ラベル化色素(NHS-Rhodamine)を化学修飾し、蛍光ラベル化によってタンパク質の不凍活性が失われていないことを実験的に

確認した。また、2)で作製した観察チャンバーの上部にダブリズムを設置し、ダブリズムの斜め上方より蛍光励起用レーザー(532 nm、最大 100 mW)を照射するための光学系を作製した。そして、ダブリズムとカバーガラス間に蛍光ラベル化不凍タンパク質溶液をはさみ、蛍光ラベル化した個々の不凍タンパク質分子がダブリズムによって1分子観察できることを確認した。

ダブリズムに貼付けた AgI 種結晶上で、氷結晶を蛍光ラベル化不凍タンパク質溶液から成長させた。成長が停止した水溶液-氷結晶界面の形状像(光干渉像)と、同一視野の蛍光像を直接観察することに初めて成功した(図5)。干渉縞は等高線に対応する。図より、氷結晶表面がところどころ凹状にへこんでいること、およびへこんだ底には必ず蛍光ラベル化不凍タンパク質が吸着していることが分かる。氷結晶表面に蛍光ラベル化不凍タンパク質が吸着した結果、ギブストムソン効果により氷結晶の成長が停止したものと考えられる。氷結晶表面の形状像と蛍光像を同時観察することで、従来考えられて来た予想の一つが正しいことを示す初めての実験的証拠を得ることに成功した。図5では、氷結晶表面の凹凸が激しすぎたために、氷結晶表面のステップを直接観察するにはいたらなかったが、今後同様の観察を、条件を様々に変えて行うことで、不凍タンパク質の作用発現機構を明らかにすることが出来ると期待される。

研究開始当初に目標とした、蛍光ラベル化不凍タンパク質の氷結晶表面上での1分子観察はまだ達成出来ておらず、蛍光ラベル化不凍タンパク質が集まり吸着した領域(図5模式図)を観察するにとどまっている。しかし、まだ対策はあり、今後進めてゆきたい(4. 今後の展開を参照)。

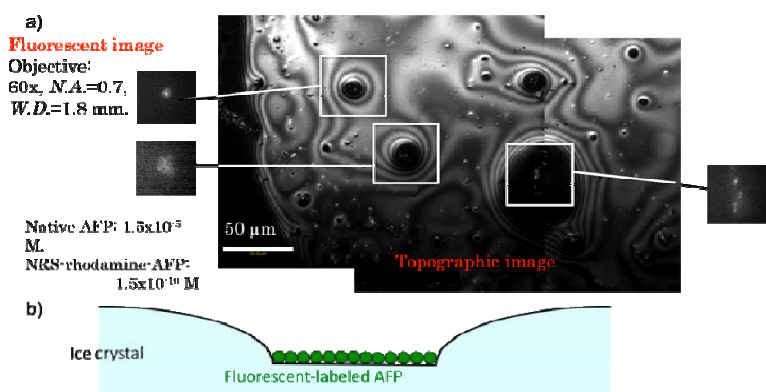


図5 蛍光ラベル化不凍タンパク質 0.01mg/mL 存在下で成長が停止した氷結晶表面(a)と断面の模式図(b)。(a)の中央は反射の光干渉像(干渉縞は等高線を示す)。白四角中を蛍光観察した結果も同時に(a)に示した。蛍光像中の白色のコントラストは、氷結晶に吸着した蛍光ラベル化不凍タンパク質を示す。

3. 今後の展開

さきがけ研究により、不凍タンパク質の作用発現機構をこれから明らかにするために必要な全く新しい観察手段を開発することに成功した。すなわち、図6に示すように、従来は氷の結晶面の縦方向への平均の成長を観察するのみであったが、本研究によって結晶面内の個々の単位ステップの横方向への成長を観察できるようになった。また、これまで結晶の表面や周囲での不凍タンパク質の濃度分布を観察するのみであったが、本研究によって氷結晶面内の吸着部位の分布等を観察できるようになった。今後、本さきがけ研究で得られた強力な観察手段を用いて、様々な条件下でステップと不凍タンパク質の相互作用を直接観察することで、不凍タンパク質の作用発現機構を明らかにする研究に取り組んでゆきたい。

ただ、氷結晶表面上での個々の不凍タンパク質の蛍光1分子観察は、まだ達成できていない。現在、ドライ型では開口数が最大(0.7)の対物レンズ(60x、作動距離 1.8 mm)を用いているが、蛍光強度がまだ不足していること、および水溶液中を観察するために発生する収差が

その原因であることがわかった。蛍光1分子観察に通常用いられる油浸型対物レンズ(開口数 1.45、60x)では、作動距離が 0.1 mm 程度と小さすぎるため、観察系を構築できない。しかし最近、開口数と作動距離の両者が必要条件を満たす対物レンズ(水浸型、開口数 1.05、作動距離 2.0 mm、25x)が開発された(2光子励起用で約 200 万円:通常型よりも瞳径が大きく、顕微鏡の改造も必要)。この対物レンズにさらにカバーガラスによる収差を補正する改造(200-300 万円)を加えることで、蛍光1分子観察を必ず達成できるものと予想している。他の予算(500-600 万円)を獲得し、近い将来に再度挑戦したい。

4. 自己評価

さきがけ研究の開始当初に設けた3つの技術的課題のうち、はじめの2つ(気相および融液相から成長する氷結晶表面でのステップの直接観察)は完全に成功した。また、この技術を用いて表面融解現象を初めて分子レベルで可視化することにも成功し、2種類の表面液体相が存在することを発見した。表面液体相の発見は、研究開始当初には全く予想していなかった大きな副産物であり、プラスに評価できる。しかし3つめの技術的課題については、水-氷界面での蛍光観察には成功し、不凍タンパク質が氷結晶の成長を抑制する機構について重要な知見を得たが、個々の分子を1分子観察するには至らなかった。この点については、技術的な改善の余地がまだ十分にあると予想しており、今後取り組みたい(4. 今後の展開を参照)。以上、予想外のプラス点とマイナス点の両方を勘案すると、達成率は 80%程度であると自己評価している。

5. 研究総括の見解

レーザー共焦点微分干渉顕微鏡の深さ方向の感度を飛躍的に高め、単一ステップの精度で気相から成長する氷結晶表面を直接観察し、また氷結晶の表面融解過程の可視化にも成功した。当初の目的である不凍タンパク質の作用発現機構については、氷結晶の成長阻害は不凍タンパク質が氷表面に吸着した場所で起こることを観察している。氷、不凍化現象、タンパク質と氷にもすぐに受け入れられる言葉や現象であるが、科学的には再現性も容易ではない複雑現象をサブナノレベルで解析してみせたことは、光技術の高いポテンシャルを示す好例と言える。近い将来、不凍タンパク質の作用機構に迫る研究がなされ、佐崎研究者の先進的研究が世界で認められるよう願っている。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. G. Sazaki, S. Zepeda, S. Nakatsubo, E. Yokoyama, Y. Furukawa, "Elementary steps at the surface of ice crystals visualized by advanced optical microscopy", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **107**, 19702-19707 (2010). (Selected as **In This Issue PNAS**)
2. G. Sazaki, S. Zepeda, S. Nakatsubo, M. Yokomine, Y. Furukawa, "Quasi-liquid layers on ice crystal surfaces are made up of two different phases", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **109**, 1052-1055 (2012). (Selected as **In This Issue PNAS**)
3. 佐崎 元, サルバドール ゼペダ, 中坪俊一, 古川義純, "レーザー共焦点微分干渉顕微

鏡を用いた氷結晶表面での分子ステップのその場観察”, 光学, 41, 33-35 (2012).

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(受賞1件、国際会議での招待講演件9件、国内会議での招待講演5件、国際会議での一般発表5件、国内会議での一般発表8件、JST News 3月号, 2012)

1. 平成 21(2009)年 11 月 12 日、日本結晶成長学会第 26 回論文賞
2. G. Sazaki, S. Zepeda, S. Nakatsubo, E. Yokoyama, Y. Furukawa, “The appearances of two types of quasi-liquid layers at air-ice crystal interfaces observed by advanced optical microscopy”, The 16th International Conference on Crystal Growth, Beijing, China, August 8-13, 2010. 【招待講演】
3. G. Sazaki, S. Zepeda, S. Nakatsubo, E. Yokoyama, Y. Furukawa, “Two types of quasi-liquid layers at air-ice interfaces visualized by advanced optical microscopy”, The 12th International Conference on the Physics and Chemistry of Ice, Sapporo, Japan, September 5-10, 2010. 【招待講演】
4. G. Sazaki, Y. Furukawa, “In-situ observation of crystal growth processes by advanced optical microscopy”, 2010 MRS Fall Meeting, Boston, USA, November 29-December 3, 2010. 【招待講演】
5. G. Sazaki, S. Zepeda, S. Nakatsubo, E. Yokoyama, Y. Furukawa, “Appearance of a novel quasi-liquid layer at air-ice interfaces visualized by advanced optical microscopy”, Symposium DD: CGCT-5 Fundamentals of Crystallization and Low Dimensional Crystallization, International Conference on Materials for Advanced Technologies, Suntec, Singapore, Jun 26-Jul 1, 2011. 【招待講演】

(4)プレス発表

平成22年10月26日 「氷結晶表面の素顔に迫る:単位ステップの運動の直接観察」

平成24年1月10日 「氷の新しい融け方を発見:2種類の異なる表面液体相の生成」