

2023 年度年次報告書
環境とバイオテクノロジー
2022 年度採択研究代表者

倉持 昌弘

茨城大学 大学院理工学研究科
助教

凍結低温制御分子の構造特異機能の解明および個体丸ごと保存技術の開発

研究成果の概要

本研究では、氷晶制御および低温細胞保護を示す氷晶結合タンパク質 (Ice-Binding Protein, IBP) に着目し、構造特異的な分子機構解明および基礎科学知見に基づいた個体生物丸ごとの保存技術確立する。IBP 分子は、寒冷地域に生息する生物が有するタンパク質で、氷晶に結合するユニークな性質をもつ。これまでに IBP 分子の立体構造や氷晶作用の物理特性が調べられてきた。特に構造特異的な氷晶結合能について構造レベルで詳細な解析がなされており、近年では IBP 分子の氷晶結合面に形成される水和構造の重要性が示唆されるようになった。しかし、その知見は限定的である。また、IBP 分子は非凍結低温でも細胞保護機能を示すことが報告されているが、この低温における分子メカニズムは明らかになっていない。

2023 年度は、3 課題を重点的に取り組んだ。まず中性子回折実験では、本年度 IBP 結晶の本測定を実施した。結晶自体の損傷劣化はなく、数日間の測定中、クリアな回折信号を継続して得ることができた。一方、予期しない施設トラブルが発生し、測定中断となることが複数回あり、若干の停滞が生じたが 2024 年 2 月に再測定を実施でき、良好な回折データを得ることができた。現在構造解析を進めている。また、IBP 低温効果の分子機序を調べるため、IBP 野生型および 5 種類の変異体を線虫に遺伝子発現させ、FRAP (光褪色後蛍光回復法) 実験による IBP 分子の拡散運動測定を行った。野生型および変異体の氷晶結合能と FRAP 測定から得た IBP 分子拡散速度には、一定の相関があることがわかった。極めて重要な知見であるが、個体動物レベルの結果のため、今後、培養細胞や *in vitro* な実験を実施し、より詳細な検証を進める。このほか、線虫体内の氷晶を捉える X 線計測技術開発にも引き続き取り組んだ。予備検証として、物性既知の材料を対象とした測定を実施し、測定法の妥当性や有用性を検証した。特に興味深い結果として、微粒子と高分子の同時測定から、異なる分子間の相互作用を評価することに成功した。これにより、氷晶と IBP 分子、生体膜との相互作用を調べる上で極めて重要なツールとなる可能性が出てきた。また線虫体内に結晶分子を遺伝子発現させ、そのダイナミクスを測定する計測にも取り組んだ。個体動物体内から明瞭な X 線回折輝点を、研究室レベルの X 線光源で取得できることを示した。さらに、この動物体内の微結晶でもナノスケールの動態解析が可能で、温度依存的な結晶の運動を取得できることを示した。生体内氷晶を測定する上でも重要な基盤情報を得ることができた。

【代表的な原著論文情報】

- 1) M. Kuramochi, H. J. Kirkwood, J. C. P. Koliyadu, R. Letrun, R. Wijn, C. Kim, T. Masui, K. Mio, T. Arai, H. Sekiguchi, H. Kishimoto, A. P. Mancuso, T. Sato, Y. C. Sasaki, “Direct observation of 890 nano-second dynamics of carbon black and polybutadiene in rubber materials using diffracted X-ray blinking”, *Appl. Phys. Lett.*, **123**, 101601, 2023.
- 2) Y. Yang, T. Arai, D. Sasaki, M. Kuramochi, H. Inagaki, S. Ohashi, H. Sekiguchi, K. Mio, T. Kubo, Yuji C. Sasaki, “The ice-binding site of antifreeze protein irreversibly binds to cell surface for its hypothermic protective function”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **682**, 343-348, 2023.
- 3) M. Kuramochi, I. Sugawara, Y. Shinkai, K. Mio, Y. C. Sasaki, “Time-Resolved X-ray Observation of the Crystallized Protein in the *Caenorhabditis elegans* Cells”, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**(23), 16914, 2023.