

# 不凍蛋白質の大量精製と新たな応用開拓

## — 実用化を指向する蛋白質研究 —

西宮 佳志、三重 安弘、平野 悠、近藤 英昌、三浦 愛、津田 栄\*

不凍蛋白質は北極や南極に生息する動植物に固有の生体物質と考えられてきた。我々は日本国内で捕獲される多くの食用魚類が不凍蛋白質を有することを発見し、それらの筋肉から実用化に必要な量の不凍蛋白質を精製する技術を開発した。筋肉から精製された不凍蛋白質は複数の異性体の混合物であり、遺伝子工学や化学合成から得られる単一の異性体よりも優れた機能を発揮した。現在、不凍蛋白質を用いた様々な実用化技術が検討されている。

### 1 研究目標

不凍蛋白質（英語名：Antifreeze protein）は、凍結寸前の水中に生成する無数の氷核に強く結合する機能と約0℃下で細胞の生存率を向上させる機能の2つを併せ持つ生体物質である。本研究の目標は、不凍蛋白質の機能を応用した技術を開発し、それを産業や医学の分野において実用化することである。図1に従来の技術と不凍蛋白質の応用が期待される技術の例を模式的に示す。一般に水は0℃で凍結すると思われているが実はそうではない。例えば、約-18℃に設定されている汎用の冷凍庫内に静置した水は凍結せずに-18～0℃の温度域にまで冷却される。このような水は一般に“過冷却水”と呼ばれている<sup>[1]</sup>。水の凍結は過冷却水の中に無数の氷の単結晶（氷核）が自然発生することによって開始する（図1A上）。氷核は周囲の水分子を結合して結晶成長しやがて水全体を埋め尽くす大きさになる（図1A下）。このように、我々の身近にある水は全て“結晶成長後の氷核の集合体（多結晶体）”である。ここで、約-7～0℃の温度範囲は最大氷結晶生成（温度）帯と呼ばれており、食品や細胞等の含水物がこの温度範囲に長く晒されるとそれらの内部に大きな氷が生成してしまう<sup>[2]</sup>。その結果、含水物の構造が破壊されて凍結前の品質や生理機能が失われる。従来、この問題は最大氷結晶生成帯を短時間で通過させる凍結技術によって克服されてきた。その技術とは“より低い温度を用いること”であり、例えば-80～-60℃の急速冷凍庫や-196℃の液体窒素を利用することである。すなわち、より低い温度を用いるほど氷核の成長は強く抑制される（図1B）。粒径の小さい氷核は食品や細胞の内部を破壊しにくいいため、含水物は凍結前の品質や生理機能を保持できる。この他にも氷核の結晶成長を

抑制する装置等が開発されてきた。しかしながら、何れの技術もエネルギー消費量の増加を伴うものであり温暖化ガスの排出量を削減する目的にはなっていない。

我々は、不凍蛋白質の機能は比較的少ない冷却エネルギーを使って水を凍結させる技術に応用可能と考えた。例えば、不凍蛋白質分子の氷結晶結合部位を無数に集積させた基板（不凍蛋白質固定化基板、図1Cに四角で示す）を作製すると、その表面は従来（図1A）よりも高い温度（-3～0℃、図1C）で水を積極的に凍結させる機能（氷核機能）を発揮すると予測された。また、不凍蛋白質には

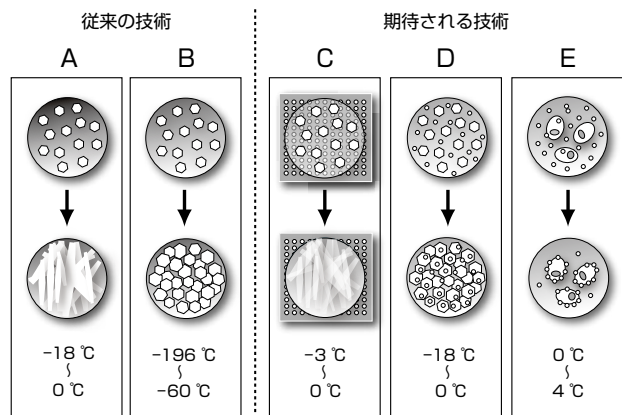


図1 従来の技術と不凍蛋白質の応用が期待される技術の比較  
A～Dの枠内の円は過冷却水を示し六角形は氷核を示す。C～Eの小さな白丸は不凍蛋白質を表す。Cの四角は不凍蛋白質固定化基板を表す。Eの円は不凍蛋白質を含む細胞保存液を示す。A. -18～0℃に冷やされた過冷却水の中に無数の氷核が発生し（上）それらが結晶成長して氷になる（下）。B. 大きな冷却エネルギー（-196～-60℃）を用いると氷核の成長は抑制される。C. 不凍蛋白質固定化基板（氷核基板）は-3～0℃の温度域で水を凍結させる。D. 不凍蛋白質は-18～0℃下で氷核の成長を強く抑制する。E. 不凍蛋白質は0℃付近で細胞の生存率を高める。

氷核の成長を効果的に抑制する機能（図 1D）や細胞の生存率を飛躍的に高める機能（図 1E）が認められている<sup>13,4)</sup>。これらは、同蛋白質を用いることによって極端に低い温度や特別な装置を使わずに含水物を凍結保存する新しい技術をもたらすと考えられた。我々は、不凍蛋白質を安価かつ大量に精製することによってこれらの技術の試行が可能になり、実用化に至ることができると考えた。そこで本研究では 1) 実用化に適した不凍蛋白質の探索と機能解析、2) 実用化量の不凍蛋白質を精製するための手法の開発、および 3) より現実的な不凍蛋白質技術の試行の 3 つを具体的な目標に設定した。

## 2 研究目標と社会とのつながり

蛋白質は生物の細胞内において絶え間なく合成されている L-アミノ酸の重合体であり、組成と重合度の異なる膨大な種類のものが代謝、運動、貯蔵、免疫反応、構造形成等の多様な生理機能を担っている。酵素等の蛋白質は生体外に取り出しても機能を発揮することから、食品産業、化学工業、および医学の分野において材料として用いられている。特に注目したいのは、火山、熱水帯、深海、砂漠地帯、北極・南極、有害物質中等に生息可能な生物が有する環境適応蛋白質であり、これらには現代の科学技術では容易に作ることでできない特殊材料としての用途が期待できる。1969 年に南極海に生息する魚類の血液から血清蛋白質として発見された不凍蛋白質はそうした特殊蛋白質の一つである<sup>15)</sup>。不凍蛋白質に匹敵するほどの強力な氷結晶成長抑制能（熱ヒステリシス活性<sup>13)</sup>）を示す化合物は他に見出されてはいないが、バイオサーファクタント<sup>16)</sup>やポリビニルアルコール<sup>17)</sup>には弱い氷結晶成長抑制能力が認められている。

現在、蛋白質分野の基礎研究は実験装置の高感度化によって極微量の試料があれば十分に完遂し得る。例えば 1 マイクログラムの量があると蛋白質の組成が解析され、数ミリグラムの量があると蛋白質の 3 次元分子構造解析が可能になる。構造生物学の分野では 10 ~ 20 ミリグラムの遺伝子発現実験のことを大量発現と呼ぶ習慣があり<sup>18)</sup>、多くの研究者はこの量を“大量”と認識している。このため、グラム量以上の蛋白質を得ることに関心をもつ人は少ないと言える。しかし、基礎研究の成果を材料工学、医学、食品などの異分野の研究と結びつけ、更に“実用化”という目標に到達しようとするならばこの量では不足する。例えば不凍蛋白質の場合、これを食品に混入してその凍結品質の時間依存性を解析する、あるいは種々の細胞の生存率の蛋白質濃度依存性を解析して再現性のある結論を得たいと考えれば、少なくともグラム量以上の試料が必要になる。

もちろん、極微量の試料を用いた研究成果をそのまま実用化できる例もあると思われるが、モデル実験やミニスケールで確認された性能がより現実的な系においても発揮されるのか否かを、それを専門とする研究者や技術者の協力を得て検討する過程が多くなると必要になる。すなわち、基礎研究の成果を異分野間の共同研究や実用化の段階にまで発展させられるか否かを決定付ける要因の 1 つは“量”ということができる。本研究の場合、グラム量以上の不凍蛋白質を精製することによって、同蛋白質に関する異分野との共同研究や実用化技術の試行が実現するものと考えられた。さらに、キログラム〜トンという量の同蛋白質の精製技術の開発によって実用化に至ることができると見込まれた。

一般に、蛋白質の大量生産を扱う研究分野は生物工学（またはバイオテクノロジー）と呼ばれている<sup>19)</sup>。生物工学が発展した引き金は 1973 年に勃発した石油ショックとされ、従来のエネルギー消費型の生産技術を生物の力を利用した省エネルギー型のものに転換する必要性がこの分野の研究背景にあった。近年の生物工学の柱は遺伝子工学と培養であり、目的物質を発現する遺伝子をもった菌株や細胞を大量培養することによって、少ないエネルギー消費量でその大量生産を達成している。世界でも特に生産量の多い洗剤用酵素、デンプン加工用酵素、医療用蛋白質、及びバイオエタノール等は“優良”菌株の培養が生産技術の要にあり、蛋白質生産といえば遺伝子工学（+培養）と考える人も多い。しかし、大量発現を担う優良菌株の発見や遺伝子組換え体の発現効率を工業レベルに上げることは容易ではない。幾つかの成功例を除けば、現実的な工業利用に至っている蛋白質の数は極めて少ないと言える<sup>19)</sup>。これらの事実を踏まえ、我々は先入観をもたずに様々な蛋白質精製の手法（遺伝子発現、化学合成、天然資源からの抽出等）を検討することが必要と考えた。

## 3 発見とシナリオ

これまでに生物学、遺伝子工学、生化学、氷物理学、生物物理学、構造生物学、計算機化学等の広範な分野の研究者が不凍蛋白質の分子機能解明を中心とした研究に取り組み、それらの成果は数百報以上の論文として発表されてきた。その中では不凍蛋白質の産業や医学の分野における潜在的な有用性も指摘され、90 年代には食品分野での不凍蛋白質技術の可能性も論じられた<sup>10)</sup>。しかし、現実的な不凍蛋白質の技術創出はなされなかった。その最大の理由は不凍蛋白質の希少性を克服することが出来なかったためと考えられる。現在までの不凍蛋白質の精製物（約 1,300 円/mg、重松貿易（株）、2007 年 10 月）の原

材料は、極地魚類の静脈から注射針を用いて採取した血液である。死んだ魚からの血液採取が困難であることも同蛋白質の希少性を一層高めたと考えられる。我々は、特に厳寒の季節がある北海道に不凍蛋白質を有する動植物が生息すると予測し、それらを含む日本国内の様々な低温適応動植物を集めて不凍蛋白質の有無を調べた。この目的のために、我々は1 μLの検体に含まれる不凍蛋白質を瞬時に検出する顕微鏡システムを構築した<sup>[11]</sup>。札幌医科大学医学部附属臨海医学研究所（利尻島）や北海道野付漁業協同組合等に魚類の提供を依頼し、我々自身も漁港、河川、市場、食品スーパー、昆虫専門店などから検体を集め、約160種類の動植物について不凍蛋白質の活性検出を試みた。その結果、予測的中し、カレイやカジカ等国内の50種類以上の魚類が不凍蛋白質をもつことを発見した。日本国内の植物（小麦）、昆虫（オオクワガタ）、菌類（担子菌）等にも不凍蛋白質が含まれていることが明らかになった。

興味深いことに、食品スーパーで売られている鮮魚の切り身にも、ワカサギ等小魚をすり潰した液にも、また珍味として売られているコマイやカレイの魚肉乾製品にも強い不凍蛋白質の活性が認められた。これらの結果は何を意味するのだろうか？ 果たして不凍蛋白質は血液からしか精製できないのだろうか？ 我々は特定の不凍蛋白質生産魚類について魚体の部位とそれから精製される不凍蛋白質の量の間の関係を調べてみた。その結果、図2Aに示すように筋肉のみを原材料とした場合にも相当量の不凍蛋白質が精製できることが示された。このことは医学者や専門家には常識なのかも知れないが、一般には良く知られていない事実と思われる。ここで、心臓部を含むcとdから精製される不凍蛋白質の量がaよりも多いことはcまたはdが原材料に適することを示唆する。しかしながら、cまたはdを

用いると脂肪や消化酵素等の共雑物が精製経路を汚すために精製効率の低下を招いてしまう。魚の頭部と内臓を除去する工程（ドレス処理）は産業的に確立されている。我々は不凍蛋白質を精製する原材料として魚体の筋肉を用いることができると考えた。

“日本産不凍蛋白質”は北極や南極の生物がもつ不凍蛋白質と同じ種類かどうか？ これは誰もが思う素朴な疑問であろう。我々は複数の日本産魚類由来の不凍蛋白質について遺伝子配列、3次元分子構造、氷結晶結合機能等の解析を進めた。その結果、これらは北極や南極に生息する動植物の不凍蛋白質と高い相同性をもつことが判明した。我々は、動植物が産生する天然の不凍蛋白質は複数の異なるアイソフォーム（アミノ酸組成が僅かに異なる分子種異性体のこと）の混合物であることに注目した。特に、北海道東部沿岸に生息するゲンゲ科魚類には13種類もの不凍蛋白質アイソフォームの発現が認められた。我々は最初その理由が理解できなかったが、実験を進めるうちに不凍蛋白質の混合物は単一のアイソフォームよりも優れた氷結晶結合活性を示すことが明らかになった<sup>[12]</sup>。単独では微弱な氷結晶結合活性（熱ヒステリシス）しか示さない不凍蛋白質アイソフォームが、活性の強いアイソフォームの微量添加によって強い活性を示すようになるのである（図2B）。このようなアイソフォーム間の協同的効果は細胞保護機能に関しても認められた<sup>[13]</sup>。遺伝子工学や化学合成からはアイソフォームの混合物が得られない。

これらの発見が、不凍蛋白質を実用化するまでのシナリオをもたらした（図3）。シナリオの出発点は、我々が発見した日本産魚類由来の不凍蛋白質に関する分子機能解明（A）である。シナリオの柱をなすのは魚類の筋肉を原材料として不凍蛋白質アイソフォームの混合物を大量に精製す

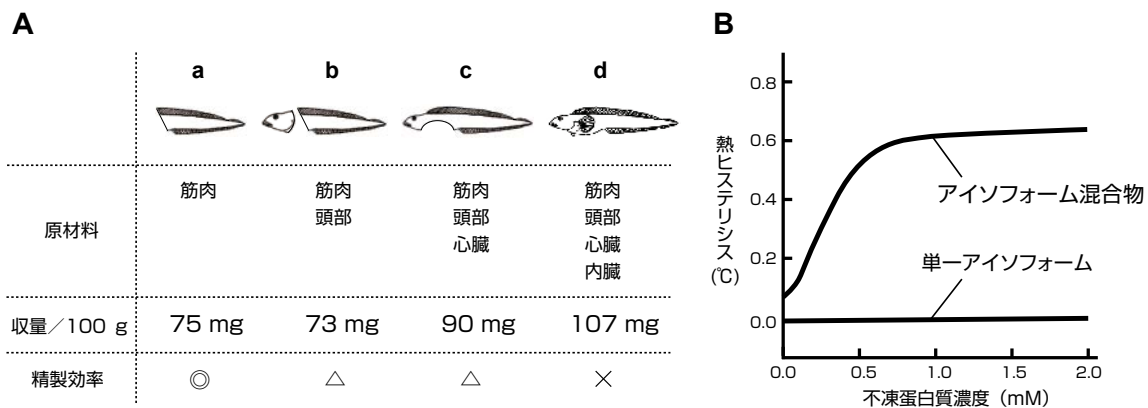


図2 A. 不凍蛋白質精製の原材料として用いた魚体の部位と収量の関係。B. 熱ヒステリシス活性（氷結晶結合能力）の不凍蛋白質濃度依存性を表す模式図  
熱ヒステリシス活性を示さない単一アイソフォームに対して微量の高活性型アイソフォームを混合すると前者にも強い活性が観測されるようになる<sup>[12]</sup>。

る技術の開発(B)である。これにより、異分野の研究者や企業の技術者の協力を得て精製不凍蛋白質を活用した応用技術の試行(C)が実現する。こうして不凍蛋白質技術の実用化が達成されると我々は考えた。

#### 4 技術開発に必要な要素と情報

蛋白質は純度の低い製品でも十分に工業レベルでの利用目的を果たす。従って、培養法等を用いて生産されている工業用蛋白質の多くはコスト性に優れた粗精製品である<sup>9)</sup>。不凍蛋白質も共雑物の影響を受けずに濃度に応じた氷結晶結合機能を発揮するため、その粗精製品を食品分野や冷蔵熱分野での技術に用いることができると考えられる。食品分野においては不凍蛋白質の粗精製品は天然抽出物に分類され、高純度品は食品添加物に分類される。前者は食経験の範囲内での安全性をきちんと確認した上でそのまま食品に応用することができるが、後者にはそれが許されていない。つまり、不凍蛋白質の高純度品は粗精製品の用途に使えない場合がある。一方、高純度品を必要とする実用化技術として細胞保存液や固定化技術がある。また、最終的には“粗精製品でも良い”という結論に至る場合でも、技術の基礎データを取得する段階では高純度品が必要である。従って、シナリオの柱である不凍蛋白質の大量精製技術は、より具体的には粗精製品と高純度品の2種類を精製するための技術である。用途の産業スケールを考えると、粗精製品を得る技術工程には特に大規模拡張性が要求される。

不凍蛋白質の大量精製技術と実用化技術の開発は図4のような表を基に進められている。横の欄(A、B、C、D、...)は、探索により見出された約50種類の魚類由来不凍蛋白質(注. アイソフォーム混合物)を示し、縦の欄(性能、資源量、...)は技術開発をもたらす要素を示している。

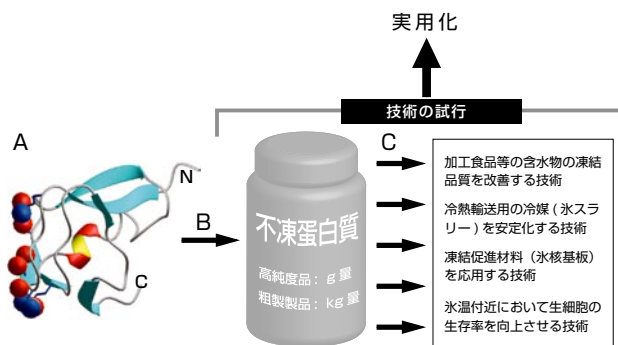


図3 本研究のシナリオ  
A. 不凍蛋白質の分子機能解明(第1種基礎研究)、B. 不凍蛋白質大量精製技術の研究(第2種基礎研究)、C. 異分野の研究者や企業の技術者の協力を得て行う実用化技術の試行(製品化研究)。

最初の実験は極微量の不凍蛋白質 A を精製してその組成と性能を調べることである(図中の太い四角)。この実験によって表の幾つかの欄に◎、○、△、×の判定がなされる。性能、分子量、3次元構造などの欄を埋める行為は基礎研究そのものと言える。これに加えて、資源量やインフラ利用性(漁業組合、蒲鉾工場、保管倉庫、流通経路などの利用性を指す)など研究とは異なる要素に関する判定結果を含んでいることが図4の特徴である。こうして得られる一群の情報が技術開発の礎となる。ここで、性能は◎だが資源量が×のAに対しては技術開発がなされない。一方、BはAに比べて性能は劣るが、量(資源量)が性能をカバーすると考えられるために技術開発がなされる。そして、高い熱安定性の特徴を生かしたBの精製技術が開発されることになる。資源量が×ではないCとDについても精製技術の開発は可能だが、インフラ利用性に欠けるCには実用化の際のコスト高が懸念される。このように縦の欄は要素間で重みが異なるが、本研究においては資源量が性能に並ぶ重要な要素と考えられた。

大量精製技術開発の基礎になる図4の表はすでに存在していたものではなく、我々自身が実験結果と調査に基づいて作成したものである。すなわち、不凍蛋白質の種類A、B、C、D、...は発見に伴って増加する。要素にも、安全性(毒性)、品質保持期間、精製後の残渣の再利用性などが本研究の進捗に伴って付加されていく。図4中の要素を分割することが必要になる場合や、◎や×の判定が変わる可能性もある。より正確で詳細な図4の改訂版を作ることが実用化研究の本質と言えるのかも知れない。

#### 5 研究結果

我々が開発した実用化量の不凍蛋白質を精製するための技術工程を図5中の太線矢印で示す。「詳細技術2」の

	A	B	C	D	...
性能	◎	○	△	◎	
資源量	×	◎	△	○	
分子量	△	○	◎	△	
3次元構造	◎	×	◎	◎	
インフラ利用性	×	◎	×	○	
酸・塩基耐性	◎	△	△	◎	
熱安定性	◎	◎	◎	×	
⋮					

図4 精製技術と実用化技術の開発に必要な情報をまとめた表  
横の欄(A、B、C、D、...)は異なる種類の不凍蛋白質(アイソフォーム混合物)を示し、縦の欄(性能、資源量、...)は技術開発をもたらす要素を示す。研究結果や調査に基づいて○×が判定される。基礎研究の典型的な例を太い四角で示す。この表は研究や技術開発が進む度に改訂される。

○は、筋肉の懸濁液から不凍蛋白質の高純度品又は粗精製品を精製するために必要な加熱、沈殿物除去、クロマトグラフィー、濃縮等の技術要素を示している。これらは図4に基づいて選択された後、コスト、時間、人力、収量等の条件を満たすように絞り込まれる。すなわち、安価で容易な○を試し、○の順序を精査し、また○の数を減らす実験によって詳細技術2の効率化が図られる。例えば高速液体クロマトグラフィー（HPLC）はコストと収量の点で問題があるために○からは除外される。詳細技術2の最初の工程はキログラム～トン量の不凍蛋白質の粗精製品を得る技術工程を兼ねている（注：原材料の量と設備は異なる）。

原材料として選んだ不凍蛋白質（I～III型）の生産魚類はいずれも北海道東部沿岸水域の主要海産物（ホタテと北海シマエビ）の捕獲時に網に掛かる極めて安価な混獲魚であり、現在でも我々の捕獲依頼分（約3トン/年）を除いた残りは産業廃棄物である。これらの魚類の筋肉すり身加工品が札幌市内の倉庫にトン単位で保管されており、その中の必要量を産総研北海道センター及び共同研究先企業に運び入れている。現在、北海道センターの実験棟内では複数の筋肉すり身約100kgからI～III型不凍蛋白質を精製するシステムが駆動している。III型不凍蛋白質の高純度試料の現在の精製効率は約3g/5日間/1名である。共同研究先企業はその200倍以上の効率で純度40～50%の不凍蛋白質の粗精製品を精製できるが、もちろんその効率が上限というわけではない。高純度のIII型不凍蛋白質試料の写真（約10g）を図6Aに示す。この高純度試料の現在の累計量は240gであり、市価に換算すると約3

億1千万円になる。しかし上述の通り我々の試料精製にかかるコストは極めて少ない。

グラム量の不凍蛋白質が得られたことによってその含水物に対する凍結保護効果を解析するための様々な実験が可能になった。含水物の例として、加工食品、スープ類、氷菓子類、めん類、パン類、清涼飲料水、酒類、医療品、化粧品、インク類、高分子ゲル、高分子膜、野菜、果実、種子、食肉、魚介類等が挙げられる。現段階では全てを試せてはいないが、原理的には製造過程で不凍蛋白質の粉末を直接混入するか不凍蛋白質水溶液を吸わせることによって、これらに強力な凍結耐性が付与されると考えられる。

食肉等含水物の構造が複雑な場合には不凍蛋白質を内部の隅々にまで浸透させることが難しいが、例えばミンチ状態にすると不凍蛋白質の効果が発揮される。なお、実用化段階では不凍蛋白質の粗精製品を用いる含水物に対しても、実験段階では高純度品を用いた効果の検証が必要である。実験結果の例を図6Bに示す。B1は、寒天ゲルを汎用の冷凍庫で凍結した後に室温に戻したときの写真である。ゲルの状態が保たれず水分が流れ出てしまうことが分かる（食肉の場合にはドリップと呼ばれる）。これは、凍結時に発生する氷核が成長して（図1A参照）ゲルの内部構造を破壊するためである。一方、B2に示すように極微量の不凍蛋白質添加によって凍結解凍後もゲル構造は保たれる。これは不凍蛋白質が氷核の表面に強く結合して氷結晶成長を止めるためにゲルの内部構造が破壊され難くなるためと考えられる（図1D）。このような凍結保護効果は最大氷結晶生成帯（-7～0℃）においても十分に発揮さ

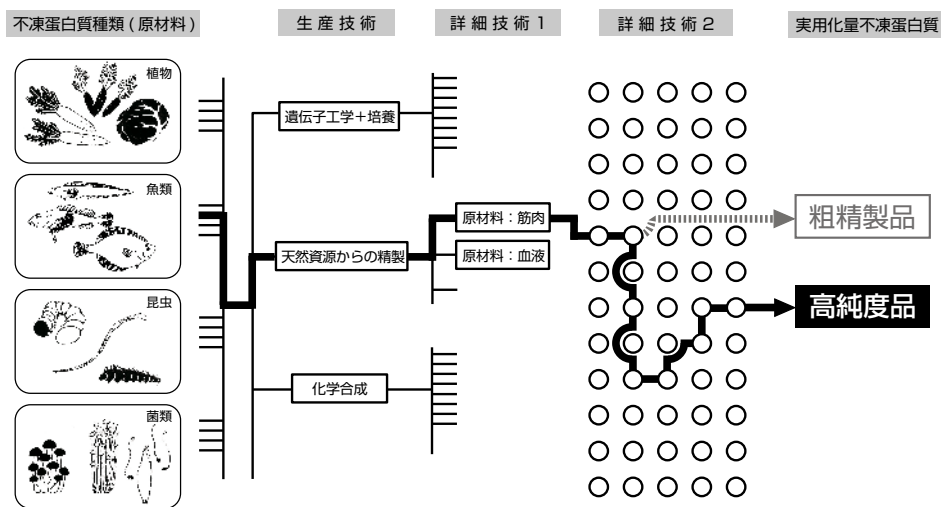


図5 実用化量の不凍蛋白質を精製するための技術工程  
○は魚肉すり身液から不凍蛋白質を精製するために必要な加熱、沈殿物除去、クロマトグラフィー、濃縮等の技術要素を表わす。詳細技術2の最初の工程はキログラム～トン量の不凍蛋白質の粗精製品を得る技術工程を兼ねている。

れる。このため本技術は凍結技術分野の省エネ化に役立つと期待される。

表面処理を施した基板表面に不凍蛋白質の高純度品の水溶液を吹き付けることによって同蛋白質を固定化する実験が電気化学分野の研究者により行われている。この実験には図3に示す魚類 III 型の不凍蛋白質が用いられる。氷結晶表面にある酸素原子の組に対して III 型不凍蛋白質の氷結晶結合部位（図3左、球で表示した原子団）は特異的に結合することが知られている<sup>[14]</sup>。我々は、この3次元構造の特徴に注目した。すなわち、III 型不凍蛋白質の N 末端残基のアミノ基を基板に固定化すると N 末端と対称の位置にある氷結晶結合部位が基板の外側を向くと考えた。無数の不凍蛋白質が固定化される結果、非常に大きな“氷結晶平面”が基板上に形成されると我々は予測した。図6Cに例として約6,000億個/cm<sup>2</sup>のIII型不凍蛋白質が固定化されているアルミニウム基板を示す。詳細説明は別の機会に譲るが、これまでの実験の結果は1) 基板表面に接する水は-3～0℃で凍結すること（氷核機能）、2) 基板表面から一方向凍結が起こること（透明氷を生成する機能）を示している。ここで、不凍蛋白質固定化の対象となる材料は特に基板状である必要はなく、容器状でも粒子状でも良いと考えられる。

図6DはIII型不凍蛋白質を溶かした細胞保存液の写真である。ヒトや動物の細胞は生体外に取り出すとその生命機能が停止するが、移植や再生医学の分野では細胞や臓器を凍結状態あるいは非凍結状態で保存する試みが行われている。これらの凍結保存にエネルギー消費量の多い急

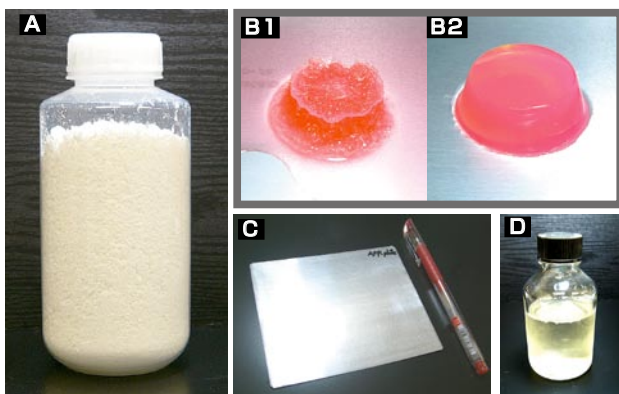


図6 本研究の成果

A. 不凍蛋白質高純度品の写真（約11 g）。この試料の現在の精製効率率は約3 g / 5日間 / 契約職員1名である。B1. 汎用冷凍庫で凍結後に解凍した寒天ゲル。氷核の成長によってゲル構造が破壊され水分が流出してしまう。B2. 凍結解凍後の不凍蛋白質入り寒天ゲル。氷核の成長が抑制されるためゲル構造が維持される。C. 凍結促進機能（氷核機能）を発揮する不凍蛋白質固定化基板（素材：アルミニウム）。D. 魚類不凍蛋白質を含む細胞保存液（200 mL）。0℃付近（非凍結状態）において様々な細胞の生存率を飛躍的に向上させる。

速冷凍庫や液体窒素が使われる理由はすでに述べた。ここでは再生医学と電気化学の研究者らにより行われた非凍結保存実験の結果を紹介する。まず1万個程度のヒト由来培養肝細胞 HepG2 を非凍結温度（～0℃）で市販の細胞保存液に浸して保存実験が行われた。その結果、この肝細胞の90%が約12時間後に死滅することが示された。一方、図6Dの液を用いて同じ実験を行った結果、不凍蛋白質存在下において肝細胞は72時間経過後もその90%以上が生命機能を維持するという結果が得られた<sup>[13]</sup>。小腸、腎臓、臍帯、リンパ球、子宮頸管、胸水等に由来する培養細胞についても同様の不凍蛋白質の細胞保護効果が認められた。グラム量の高純度不凍蛋白質は細胞レベルでの効果を調べるには十分な量だが、組織や臓器に対する保護効果を調べるためには不足する。この問題を克服することが今後の課題の1つである。

## 6 評価と将来の展開

この研究は、バイオ分野の基礎研究をいかにして実用化に結びつけるかについて考える機会を我々に与えた。キーワードは「量」であり、蛋白質の性能が良くても量が不足していると実用化に向けたシナリオに乗れないことが明らかになった。グラム量の蛋白質が基礎研究と食品、医学、工学分野の研究を結びつけたことによって、技術の実証・試行（製品化研究）の段階まで進めることができたと考えている。我々が興味深く思っている点の1つは、実用化に向けて構築した不凍蛋白質の大量精製技術が、結果として“天然資源からの物質抽出”という古典的なものになったことである。しかし、技術開発の過程には、分子生物学から3次元分子モデリングまでの多くの基礎研究成果が活かされている。

不凍蛋白質の応用が見込まれる技術や製品の種類は多いため、今後の技術的精査に費やす時間も技術の実用化を支配する1つの要素になると考えられる。特に、医学分野で不凍蛋白質を用いるためには毒性試験、変異原性試験、発ガン性試験等の生物試験を行い厚生労働省等関係機関の使用許可を受ける必要がある。また、GMP基準を満たす製造施設も必要になる。現在、これらの点に注意しながら慎重に医学応用研究が進められている。また、オフィスビル等で用いられている冷蓄熱技術への不凍蛋白質（粗精製品）の利用も我々が期待する実用化技術の1つである。現在の汎用の冷房空調は冷媒を配管に流すことによって建物を冷やす方式のものである。この冷媒を氷懸濁液（水スラリー）に置換することができれば従来よりも少ないエネルギー消費量で建物を冷やすと期待される。不凍蛋白質の粗精製品はこの水スラリーの凝集を抑制する効果を発揮す

るものと期待される。

シナリオの中に“大量生産”を課題として据えるだけで現実的な価値を生むバイオ技術は他にも数多くあると考えられる。バイオエタノールもその例であろう。北海道地域に固有の生物資源に着目した分子機能解明研究がこの技術を支えている点を最後に強調しておきたい。折しも2008年7月に北海道で主要国首脳会議(洞爺湖サミット)が開催され地球環境の問題が話し合われる。我々もエネルギー効率に優れたバイオテクノロジーを少しでも社会に役立てて行きたい。

## 謝辞

本研究を進めるに当たり、稲田孝明 博士(産総研エネルギー技術研究部門熱流体システムグループ)、松本秀一朗 博士、松下通明 教授、藤堂 省 教授(北海道大学医学部第1外科)に多くの御協力を頂いた。また、白石美美江、林 悦子、伊藤路子(産総研ゲノムファクトリー研究部門機能性蛋白質研究グループ)の3名には不凍蛋白質精製システムの構築に極めて意欲的に取り組んで頂いた。これらの方々にこの場を借りて深く感謝したい。

## キーワード

不凍蛋白質、3次元構造、氷結晶結合、大量精製、細胞保存、氷核基板

## 参考文献

- [1] P.V.Hobbs: *Ice Physics*, 18-39, Oxford University Press, London(1974).
- [2] 露木英男: *食品加工学第2版-加工から保蔵まで-*, 14-16, 共立出版, 東京.
- [3] Y.Yeh and R.E. Feeney: Antifreeze proteins: Structures and mechanisms of function, *Chemical Reviews*, 92(2), 601-617(1996).
- [4] B.Rubinsky, A.Arav and G.L.Fletcher: Hypothermic protection - A fundamental property of "Antifreeze" proteins, *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 180(2), 566-571 (1991).
- [5] Z.Jia and P.L.Davies: Antifreeze proteins: an unusual receptor-ligand interaction, *Trends Biochem.Sci.*, 27, 101-106(2002).
- [6] D.Kitamoto, H.Yanagishita, A.Endo, M.Nakaiwa, T.Nakane and T.Akiya: Remarkable antiagglomeration effect of a yeast biosurfactant, diacylmannosylerythritol, on ice-water slurry for cold termal storage, *Biotechnol.Prog.* 17, 362-365(2001).
- [7] T.Inada and S.-S.Lu: Thermal hysteresis caused by non-equilibrium antifreeze activity of poly(vinyl alcohol), *Chem.Phys.Lett.*, 394, 361-365(2004).
- [8] 岡田雅人、宮崎香 編: *改訂第3版タンパク質実験ノート(上巻)-抽出・分離と組換えタンパク質の発現-*, 202, 羊土社, 東京 (2004).
- [9] 野本正雄: *「酵素工学」*, 学会出版センター, 東京 (1993).
- [10] R.E.Feeney and Y.Yeh: Antifreeze proteins: Current

status and possible food uses, *Trends.Food Sci.Tech.*, 9, 102-106(1998).

- [11] M.Takamichi, Y.Nishimiya, A.Miura and S.Tsuda: Effect of annealing time of an ice crystal on the activity of type III antifreeze protein, *FEBS J.*, 274 (24), 6469-6476 (2007).
- [12] Y.Nishimiya, R.Sato, M.Takamichi, A.Miura and S.Tsuda: Co-operative effect of the isoforms of type III antifreeze protein expressed in Notched-fin eelpout, *Zoarces elongatus Kner.FEBS J.*, 272, 482-492(2005).
- [13] Y.Hirano, Y.Nishimiya, S.Matsumoto, M.Matsushita, S.Todo, A.Miura, Y.Komatsu and S.Tsuda: Type III antifreeze protein from notched-fin eelpout enhances viability of mammalian cell during hypothermic preservation, *in preparation*.
- [14] Y.Nishimiya, S.Ohgiya and S.Tsuda: Artificial multimers of the type III antifreeze protein: effects on thermal hysteresis and ice crystal morphology, *J. Biol. Chem.*, 278(34), 32307-32312(2003).
- [15] Y.Mie, Y.Nishimiya, F.Mizutani and S.Tsuda: Assembly of antifreeze protein reveals the ice nucleation activity, *in preparation*.

(受付日 2007.9.18, 改訂受理日 2007.11.19)

## 執筆者略歴

西宮 佳志 (にしみや よしゆき)

ゲノムファクトリー研究部門 機能性蛋白質研究グループ

平成12年産総研入所。これまで一貫して不凍蛋白質の探索、機能解析、大量生産法の開発に取り組んできた。不凍蛋白質が新しい産業技術として社会に貢献する日を目指して日夜研究に勤しんでいる。専門は遺伝子工学や進化分子工学を駆使した蛋白質の機能改変。東北大学大学院工学研究科生物工学専攻修了(平成12年)

三重 安弘 (みえ やすひろ)

ゲノムファクトリー研究部門 生体分子工学研究グループ

生物系特定産業研究技術推進機構研究員、日本学術振興会特別研究員を経て平成17年に産総研に入所。主に蛋白質の電子移動制御のための機能界面の開発と直接電気化学法を用いた蛋白質の機能解析に従事してきた。現在は蛋白質分子を固体界面上に集積・配列した新しい機能性材料とその分析ツールの研究を進めている。熊本大学大学院博士課程修了(平成12年)

平野 悠 (ひらの ゆう)

ゲノムファクトリー研究部門 生体分子工学研究グループ

平成17年産総研入所。走査型電気化学顕微鏡(SECM)を利用して低温保存された細胞の評価を行う研究に従事してきた。現在、不凍蛋白質を配合した細胞保存液を調整しその細胞保護機能を単一細胞単位で評価している。不凍蛋白質の持つ細胞保護機能の解明と同蛋白質を利用した細胞保存液の開発を並行して行いたい。東北大学大学院工学研究科生物工学専攻修了(平成17年)

近藤 英昌 (こんどう ひでまさ)

ゲノムファクトリー研究部門 機能性蛋白質研究グループ

専門は蛋白質結晶学。主として酵素や不凍蛋白質等の産業応用可能な機能性蛋白質を研究対象とし、それらの立体構造の決定と機能発現メカニズムの解明に従事してきた。現在は、蛋白質の高機能化・機能変換に関する研究を行っている。平成10年入所。北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻修了(平成9年)

三浦 愛 (みうら あい)

ゲノムファクトリー研究部門 機能性蛋白質研究グループ

平成8年に非常勤職員として入所。北海道産魚類由来の不凍蛋白

質の発見に関わりその探索対象を市販の魚類にも広げた。現在は同蛋白質を使った応用実験（食品）のほか高分解能 NMR 装置の運転および多次元 NMR スペクトル解析に従事している。特別技術補助職員（平成 12 年）を経て平成 17 年より二号契約職員

津田 栄（つだ さかえ）

ゲノムファクトリー研究部門 機能性蛋白質研究グループ

平成 7 年の入所以来、0℃付近での生命現象を解き明かす“低温生物学”の研究に従事してきた。専門は核磁気共鳴（NMR）法および X 線回折法による蛋白質の構造機能解析。水核蛋白質、不凍蛋白質、低温活性酵素などが低温下で発揮する特異的機能を解析し、それらの大量生産法を開発することによって、これまでに無い新しい産業技術を創生したいと考えている（北海道大学院生命理学専攻 客員教授）。

## 査読者との議論

### 議論 1 定量的な優位性

質問（水野 光一）

アルミニウム板への不凍蛋白質の吹きつけ表面での氷結現象ですが、0℃付近で氷結される水の量は他の方法で氷結する場合よりエネルギー的にどの程度優位かを数値で示すことができますか。

回答（津田 栄）

不凍蛋白質固定化基板の特性解析の結果は第 1 種基礎研究の成果として別の雑誌に発表する予定です。-1℃の水と-18℃の水がもつ

エネルギーの差は、水の体積を 1 mL とした場合に約 40 J と見積もられますが、生成した氷の分子構造が通常の氷のものと違う可能性もあり慎重な考察が必要と思っています。今後の知財獲得のため効果の詳細記述は避けていますので御承知置きください。

### 議論 2 生体保護作用のメカニズム

質問（水野 光一）

肝細胞の長期保存ができるのも不凍蛋白質による“高温=つまり 0℃付近”での保存でしょうか？市販保存液では 0℃付近保存で 90% 死滅とありますので、保存温度ではないように見受けられますがいかがでしょうか？この場合、不凍蛋白質が生体的な保護作用を発揮しているかも知れないと想像しますが、メカニズムは解明されているのでしょうか。

回答（津田 栄）

心臓、肝臓、脾臓などの臓器および組織断片を 0℃付近の非凍結温度下で 1～24 時間程度保存する技術は移植や再生医療の分野で実際に使われています。つまり 0℃は保存温度です（英語では hypothermic preservation と呼ばれる）。不凍蛋白質の細胞保護メカニズムですが、現状では“不凍蛋白質が本当に細胞保護機能を発揮するのかどうか”すら不確定な段階だと思います。細胞保存機能を調べるためには、細胞の種類、温度、前処理、後処理、保存液に含まれる他の成分などのパラメータを変えて実験を行い、その再現性を確認する必要があります。本研究により一定量の不凍蛋白質試料が確保されたことで、今後詳細な研究が進むと考えています。