

担子菌類の不凍タンパク質による耐凍性獲得機構の解明

近藤 英昌 [独立行政法人産業技術総合研究所 / 主任研究員]

背景・目的

不凍タンパク質(Antifreeze protein; AFP)は氷結晶に結合することでその成長を抑制し、凝固点の降下や氷結晶の形状の変化をもたらすタンパク質である。これまでに多くのタイプのAFPが主に寒冷地に生息する生物から見出されており、耐凍性の獲得による低温環境適応に関与していると考えられている。我々は好冷性担子菌類を対象にAFPを探索した結果、イシカリガマホタケ(*Typhula ishikariensis*)培養液中から既知のAFPとは異なるアミノ酸配列を有する新規AFPを見出している。本研究では、イシカリガマホタケ由来AFPの機能解析及びX線結晶構造解析を行い、その氷結晶結合機構及び耐凍性獲得による環境適応機構に関する知見を得ることを目的とする。

内容・方法

(1) イシカリガマホタケAFPの機能解析

0 付近の温度制御が可能なステージを有する顕微鏡を用いて、AFP溶液に生じる氷結晶を観察し、形状の特徴(外形、成長方向、速度等)を他のAFPと比較することによって本AFPが結合する氷結晶面に対する知見を得る。また、溶液の凝固点降下のAFP濃度依存性及びpH依存性を測定し、最大不凍活性及び分子のpHに対する安定性に関する知見を得るとともにイシカリガマホタケの生育環境(生育土壌のpHや温度など)との関連性を明らかにする。

(2) イシカリガマホタケAFPのX線結晶構造解析

結晶化条件のスクリーニング及び最適化によって、結晶構造解析に適した*T. ishikariensis* AFP結晶を作成する。構造解析は重原子同型置換体結晶を作成し、異常分散法によって行なう。立体構造情報に基づき他のAFPで提唱されているAFPに特徴的な氷結晶結合面に着目し比較・検討することで、AFPの機能と立体構造の相関を明らかにする。氷結晶とAFPとのドッキングモデルを作成し、氷結晶結合状態を検討する。

結果・成果

(1) イシカリガマホタケAFPの機能解析

AFP存在下で観察される氷結晶は不規則な凹凸のある面を持つものであった。これは魚類のAFPで観察される平滑な表面を持つパイラミッド型氷結晶とは異なる。また、AFP濃度が高まるにつれて凝固点降下は大きくなり、約0.15mMで一定の値(-2)になった。これまでに不凍活

性が調べられているAFPでは、魚類由来のAFPの凝固点降下はおおよそ -1 であり、昆虫ではおおよそ -2 と最も大きな凝固点降下を示すことがわかっている。イシカリガマホタケAFPは昆虫由来AFP同様に高い凝固点降下を示すことがわかった。また、凝固点近傍では氷結晶が平面状に広がって急激に成長し始めることがわかった。この現象は昆虫のAFPでも観察されることが知られている。これらのAFP存在下での氷結晶の成長の様子が類似していることから、イシカリガマホタケAFPと昆虫AFPは、高い凝固点降下をもたらすAFPに共通した氷結晶への結合の様式を有しているのではないかと推測される。昆虫AFPは分子表面に平面性の高い部位が存在し、Thr残基が規則的に配列していることが知られている。イシカリガマホタケAFPのアミノ酸配列には明確な繰り返し配列を見出すことができないが、分子表面に特定のアミノ酸残基が規則的に配列している可能性がある。

(2) イシカリガマホタケAFPのX線結晶構造解析

市販のスクリーニングキットを用いて結晶化条件を探索したところ、リン酸アンモニウム、クエン酸ナトリウム及び硫酸アンモニウムを沈殿剤として用いた溶液から結晶が析出した。これらの溶液条件を変化させて最適化した結果、0.1M Bis-Tris pH6.0、1.0M硫酸アンモニウム、0.1M NaClの溶液において0.1×0.2×0.5mm程度の大きさの結晶を得た。この結晶の空間群はP1であり、格子定数は $a = 38.9$ 、 $b = 41.7$ 、 $c = 81.5$ 、 $\alpha = 81.5^\circ$ 、 $\beta = 83.1^\circ$ 、 $\gamma = 62.4^\circ$ であった。この結晶を用いたX線回折強度データを放射光実験施設で収集し、1.0 Å分解能のネイティブデータを測定した。

今後の展望

本研究にて行なった実験によって、アミノ酸配列の全く異なる昆虫AFPの持つ性質との類似性が示唆された。また、取得した高分解能の回折データによって分子表面に存在する水和水を含めた詳細な立体構造が可能になると思われる。現在は位相決定のための実験を行なっているところである。

近年、細菌類及び珪藻類からイシカリガマホタケAFPとアミノ酸配列の類似性を有するAFPが見出されている。イシカリガマホタケAFPに着目することによって、高い凝固点降下をもたらすAFPに共通な立体構造情報を取得すること、及び生物種を超えたAFPの氷結晶結合機構に関する知見を得ることが可能になると期待される。また、魚類AFPとは異なる氷結晶結合機構を持つ菌類AFPを用いた応用研究の進展につながり、AFPの産業利用への具体性が高まると期待される。