

地上と Kibo で精密測定されたリゾチーム結晶成長速度

塚本勝男(大阪大学)、三浦均(名市大)、鈴木良尚(徳島大)、村山健太(名大)、
藤原貴久(徳島大)、吉崎泉(JAXA)

Exact Measurement of Crystal Growth Rate of Lysozyme on The Ground and in “Kibo”

K. Tsukamoto*, H. Miura**, Y. Suzuki***, K. Murayama****, T. Fujiwaha***, I. Yoshizaki*****

*Osaka University, **Nagoya City University, ***Tokushima University, ****Nagoya University, *****JAXA

E-Mail: ktsuka@cryst.eei.eng.osaka-u.ac.jp

Abstract: Growth rate of lysozyme crystals vs supersaturation has exactly been measured for the first time by means of laser interferometry at Kibo in order to analyze the optimum condition and/or the growth mechanism for good quality protein crystals. The growth rate and shape of spiral growth hillocks were compared as obtained in gravity using the same growth cells. We here found the larger growth rate under microgravity than the rate in gravity in the wide range of supersaturation, which has commonly been used for growing crystals in gravity. The higher growth rate in space is attributed to the suppression of the adsorption of dimer-molecules that are present as impurity molecules, which block step movement along specific crystallographic directions depending on supersaturation. The lack of 2D heterogeneous nucleation growth regime in space is also due to the reduction of this impurity concentration at the growth surface. These effects would eventually widen the growth regime that is suitable for getting high quality protein crystals.

Key words; ISS, Kibo, lysozyme, growth mechanism, growth rate, interferometry, nucleation

1. はじめに

これまで宇宙環境を利用してタンパク質結晶が数多く作られている。そのメインの理由は、その2割程度が構造解析をすると解像度が地上で作った時に比べて良くなるという理由である。最近、ゲルや対流を押さえるような仕組みを考えて、宇宙よりも高品質な結晶ができるという研究も多くなってきた。しかし、それは“なぜか？”に関する研究は皆無と言わざるを得ない。従って、“宇宙では成長速度が遅くなるから品質が良くなる”といった、あまり科学的に根拠のない説も散見される。

2013年にKiboで実施した、本研究は、この疑問に対する答えを、結晶成長学の立場から出すための研究である。そのために、従来のタンパク質結晶の研究手法のように、宇宙で結晶をつくって地上に回収し、それを地上でX線回折で調べ統計処理するというスクリーニング的な方法をとらず、宇宙で成長しているならば、“その場”で成長中の結晶を“その場”観察することにより、成長メカニズムの違いを明らかにすることを目的とした。そのためには、宇宙での結晶成長メカニズムが地上とどう違うかを直接調べることが必要である。

このように速度論的に良質な結晶ができる条件を

結晶成長メカニズムから予想し併せて、結晶化に必要な成長パラメータを取得することで、今後の未知タンパク結晶の結晶化に対しても新たな指針を与えることが本研究の大きな目的である。そのためには、宇宙と地上での結晶成長メカニズムの成長メカニズムの違いを、速度論的な立場で見極めるのが最善であり、したがって、結晶成長速度の過飽和度依存性を地上の実験と同じ精度で測定するため、宇宙で初めて、結晶近傍の濃度分布と結晶成長速度の過飽和度依存性をレーザー干渉計で測定することを行った。

2. その場観察結果

Fig.1に結晶が成長中のMach-Zehnder干渉図を示す。直交する方向から観察した結晶表面のMichelson干渉図形はFig.2に示した¹⁾。

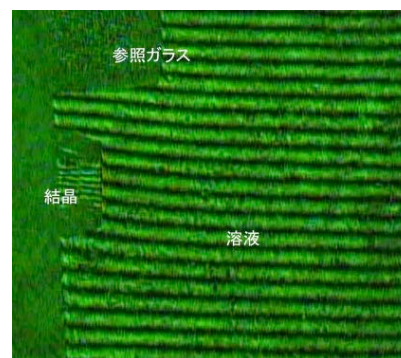


Fig. 1 Concentration field observed by Mach-Zehnder Interferometer at Kibo.



Fig. 2 Michelson Interferogram from lysozyme (110) face.

溶液の過飽和度は温度を7-40°Cまで変化させることで変える。従って、その温度変化によって結晶成長セルが熱膨張する。その膨張の程度を知るために、結晶面と参照ガラス面の位置の差を、干渉計で常にモニターしている。実際、結晶の成長速度はセル全体にくらべて僅かであり、 10^{-2} nm/s の精度で速度測定するには、この参照ガラスによるセルの熱膨張の測定は不可欠である。

3. 解析方法と結果

このような方法で成長速度を測定した一例が Fig.3 である。上に地上での成長速度、下には宇宙での成長速度データを示した。

詳細な議論は原著論文にゆずるが、通常使用する $2 < \sigma$ (過飽和度) 以下では、対流を押さえた宇宙での結晶成長速度が速い。これは予想を完全に覆す。

この速度データから成長メカニズムを決めるために Birth and Spread モデルでプロットをし直したのが Fig.4

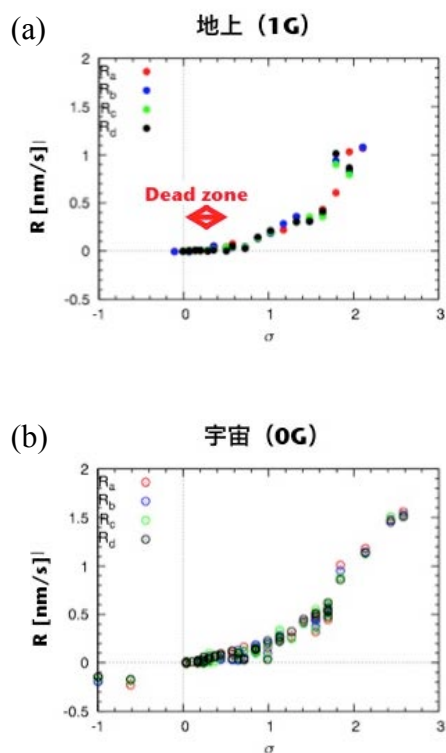


Fig. 3 Growth rate vs supersaturation. In gravity (a) and under 0G (b).

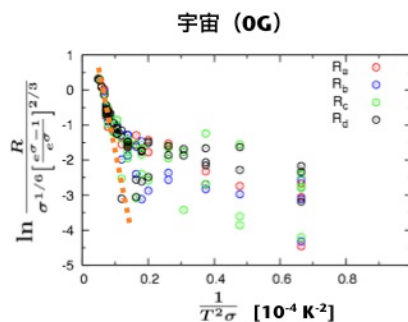


Fig. 4 Birth and spread model as an example of 2D nucleation growth.

である。このグラフより模式的にモデルを描くと Fig.5 になる。つまり、低い過飽和度ではらせん成長、過飽和度が上がるにしたがって、らせんステップ間に2次元核が発生し成長速度を増加させる。高過飽和度で見られる直線部の傾きから、2D 核の界面張力 γ を求めると、 $\gamma = 0.8$ mJ/m² となり従来の地上での実験例に比べてやや大

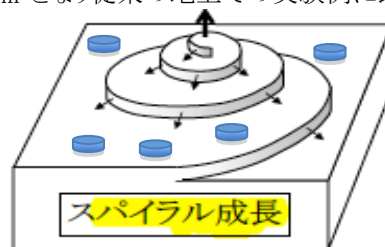


Fig. 5 Predicted model from the growth rate analysis of at lower supersaturation. With increase of supersaturation, 2D nucleation starts in between steps, leading to the increase of growth rate.

きくなる。これは、地上では不純物(ダイマー分子)を核とする heterogeneous (不均質) 2D nucleation が貢献するが無重力では不純物の貢献が少なくなるためと考えられる。したがって、同じような2D 核形成であるが、やや低い過飽和度では heterogeneous 2D nucleation、さらに高い過飽和度では homogeneous (均質) 2D nucleation による成長と分けられる。実際、無重力の成長速度の測定では、この heterogeneous 2D nucleation の領域が狭いように見え不純物の影響がすくないことを示している。

成長に不純物が関与するかを見極めるには成長パターンの観察が重要である。リゾチーム(110)面に現れる成長丘の形状観察から、重力下での成長では不純物の吸着を示唆するらせん成長丘の形状を示しているが、無重力ではそれが現れにくい。このことも、無重力では不純物の影響が地上に比べて少なくなっていることを示唆している。

これらの結果を総合して結論すると Fig.6 のようにまとめられる。地上ではダイマー分子が不純物の働きをして heterogeneous 2D nucleation が成長に貢献する。しかし、無重力では拡散の遅いダイマー分子は結晶表面に運ばれにくい。そのために、ダイマー分子を核とする heterogeneous nucleation が抑制され、homogeneous

nucleationが生じる高過飽和度まで、らせん成長メカニズムが結晶の成長を支配する。

すでに報告したように、らせん成長で成長したほうが、2D nucleationで成長するより、結晶に微細欠陥を含まない²⁾ことがわかっているので、これが無重力で成長させたほうが完全性の良い結晶ができやすい理由であろう。もちろん、地上でもらせん成長領域を選べば完全性の高い結晶をつくることができるはずである。しかし、無重力環境のほうが、その領域がはるかに広いので手軽に良い結晶をつくりやすい。

結晶表面の過飽和度分布の測定してみると、結晶形態安定性の面からも無重力のほうが広い条件で結晶表面の平坦性を維持でき、欠陥を発生しにくいことがわかってきた³⁾。したがって、リゾチーム結晶の完全性を向上させるには、成長にともなう不純物粒子の取り込みが少ない中過飽和度領域でのらせん成長領域を利用し、結晶形態安定性がくずれない高過飽和領域をさけることで、さまざまな環境で良質な結晶をつくれよう。このような方法は、従来の結晶化条件を探すスクリーニング法に対して、物理的なスクリーニング法ということができよう。

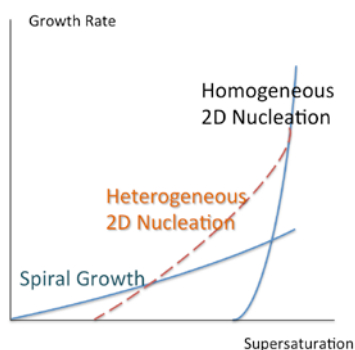


Fig. 6 Suppression of heterogeneous nucleation under microgravity, this was verified from the rate measurement.

参考文献

- 1) I. Yoshizaki, K. Tsukamoto, T. Yamazaki, K. Murayama, K. Oshi, S. Fukuyama, T. Shimaoka, Y. Suzuki, M. Tachibana, Growth rate measurements of lysozyme crystals under microgravity conditions by laser interferometry, *Review of Scientific Instruments*, 84 (2013).
- 2) Tsukamoto, K.; Sasaki, G.; Kojima, K.; Tachibana, M.; Yoshizaki, I. Growth rate of protein crystals using FOTON-M3 satellite. *Space Utilization Res.* 2009, 25, 2.
- 3) K. Murayama, K. Tsukamoto, A. Srivastava, H. Miura, E. Yokoyama, Y. Kimura, Measurement of two-dimensional distribution of surface supersaturation over a sodium chlorate crystal surface using multidirectional interferometry, *Crystal Research and Technology*, 49 (2014) 315-322.