

# 完全対流停止条件における結晶のらせん成長ステップの前進速度に及ぼす不純物効果

鈴木 良尚 (徳島大), 土谷 一眞 (徳島大), 藤原 貴久 (徳島大), 塚本 勝男 (阪大), 稲富 裕光 (JAXA)

## Impurity Effects on the Step Velocity of a Spiral Hillock on a Crystal under Perfect Stagnant Conditions

Yoshihisa Suzuki\*, Kazuma Tsuchiya, Takahisa Fujiwara, Katsuo Tsukamoto, Yuko Inatomi  
\*Grad. School of Sci. Tech. / Tokushima Univ., 2-1 Minamijosanjima, Tokushima 770-8506  
E-Mail: yoshis@tokushima-u.ac.jp

Abstract: Effects of gravity on step velocities  $V_{\text{step}}$  of hen egg-white lysozyme (HEWL) tetragonal crystals are studied. Parabolic flight experiments revealed that  $V_{\text{step}}$  in  $\langle 110 \rangle$  directions of the crystals have a tendency to increase with a decrease in gravity. This increase is mainly due to the decrease in convection flow rates, since the decrease would result in the decrease in the transportation rates of covalently bound dimer of HEWL molecules (major impurity of this study) onto the growth interface of the crystals.

**Key words;** Step velocity, In situ observation, Flow rates, High supersaturation, Hypergravity, Microgravity

### 1. はじめに

単結晶 X 線構造解析において、回折分解能 1.5 Å 以上の高品質タンパク質結晶は、病因タンパク質の構造をもとにした創薬 (Structure based drug design: SBDD) のために必要不可欠である<sup>1)</sup>。抗インフルエンザ薬や HIV の阻害薬など、重要な新薬の開発に成功すれば、数 1000 億円レベルの売り上げになるものもある為、多くの製薬会社などが SBDD による創薬を行っている。

しかし、回折分解能 1.5 Å 以上の高品質タンパク質結晶の育成は大変困難である。Protein data bank<sup>2)</sup>に登録されているタンパク質分子の構造の数は、構造因子までわかっているもので 2017 年 1 月 18 日現在 105,478 個にもなるが、その中で、1.5 Å より高い分解能を持つものは 9,149 個に限られる。

一方、宇宙ステーションでは、多くのタンパク質結晶の育成が執り行われている。それは、宇宙でタンパク質の結晶を作ると、その中の 20%程度が地上のチャンピオンデータよりも高い分解能を持つと報告されており<sup>3)</sup>、宇宙で作れば、これまで実現できなかった高分解能のタンパク質結晶が育成できると期待されたことによる。

しかし、宇宙でのタンパク質結晶の高品質化メカニズムについては、様々な研究がなされいながら、いまだに最終結論が得られていない。これは、「生きている」結晶成長界面のその場観察が、宇宙実験において実現されてなかったことが大きい。

2012 年に塚本らによって行われた NanoStep project は、初めて宇宙で生きたタンパク質結晶の成長界面

をナノメートルレベルでその場観察したプロジェクトである<sup>4)</sup>。二光束干渉計を用いて、ニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) の正方晶系結晶の成長速度を測定したところ、過飽和度  $\sigma \equiv \ln(C/C_e)$  ( $C$ : 濃度、 $C_e$ : 溶解度) に対する面成長速度  $R$ 、 $C - C_e$  に対するステップ前進速度  $V_{\text{step}}$  の測定結果などより、「宇宙では地上よりも成長速度が大きくなる」ということがわかった<sup>5)</sup>。従来は、宇宙では物質の移動が拡散のみになるため、結晶の成長速度が小さくなって、きれいな結晶が成長するというのが通説であった。しかし、NanoStep の結果は、この通説を見事に覆した。

これは、HEWL の溶液中に存在する主要な不純物が、HEWL 自身の共有結合の二量体であることによると考えられる。つまり、溶質分子より大きい不純物の為、対流の抑制された宇宙では、不純物の成長界面への輸送が抑制され、不純物による成長阻害が抑制され、結晶成長速度が速くなったということである。

このことを証明するためには、対流の強さを変化させながら、直接分子ステップの前進速度を測定する必要がある。その実現のためには重力を変化させつつ分子レベルの凹凸を観察できるシステムが必要である。我々は、小型ジェット機による Parabolic flight (PF) において、分子高さのステップを観察できる透過位相差顕微鏡を使った HEWL 正方晶系結晶の成長界面のその場観察を実際に行ってきた。

平成 27 年度の PF では、MU-300 型機に透過位相差顕微鏡を搭載して実験を行った。このときは、NanoStep で、微小重力環境において明らかに成長速

度が増加した、スパイラル成長丘が安定に成長している低い過飽和度領域で実験を行った。具体的にはステップ前進速度 $V_{\text{step}}$ の重力変化と、結晶成長に伴う濃度場形成によって誘起される対流の流速の重力変化を測定した。その結果、 $V_{\text{step}}$ の方は、絶対値が小さいため、20秒の0.0 Gの間で精度よく測定できなかった。しかし、濃度場誘起対流の流速はしっかり測定でき (Fig. 1)、従来対流を抑制できるとされ

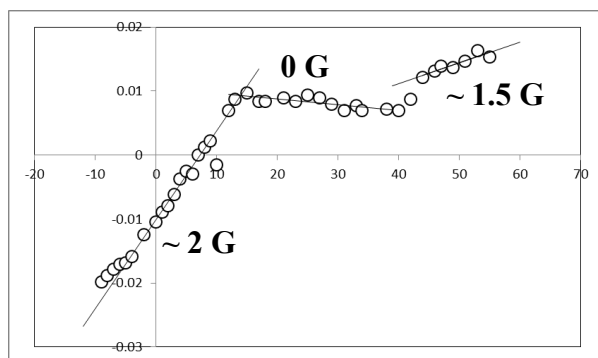


Fig.1. Horizontal position of a marker particle due to convection flows around a growing crystal at a ceiling (upside down) position with time. Flow rates of the marker discretely change with changing gravitational acceleration values.

ている、容器天井 (Ceiling) から逆さまに成長させた結晶周囲<sup>6)</sup>においても、容器底部から成長した結晶周囲とほぼ同様の流速で、重力変化に伴う、不連続な流速変化を確認できた。これにより、PFによって、対流の条件をしっかりと制御できることが分かった。

あとは、 $V_{\text{step}}$ である。幸い、NanoStepの結果において、0.0 Gにおける、高過飽和度 $\sigma$ における面成長速度 $R$ が、不純物の入っている系で減少していることがわかっている。これは、不純物の成長界面への輸送によるものであると考えられるため、重力変化による対流状態の変化によって、変化する可能性が十分に高く、なおかつ、高過飽和度であれば20秒間の0.0 Gにおいても、精度よく測定できる可能性が高い。

そこで、本研究では、PFで実際に、HEWL 正方晶系結晶を使って、

- (1) 高過飽和度状態において、分子ステップを観察し、
- (2) ステップ前進速度が重力変化に対してどのように変化するかを明らかにすることを目的とした。

## 2. 実験

高過飽和度条件での成長溶液は、HEWL 80 mgmL<sup>-1</sup>, NaCl 25 mgmL<sup>-1</sup>になるよう、0.05 M 酢酸ナトリウム緩衝溶液 (pH = 4.5) に溶かしたものをを用いた。これらを O-ring とカバーガラスの空間に封入し、銅製のサンプルホルダで密封した。ペルチエ素子を用いた温度コントローラ上で、温度変化により過飽和度

を制御して $V_{\text{step}}$ を測定した。

0.0 ~ 1.8 G までの重力変化は、ダイヤモンドエアサーブ株式会社製のG-II型機のPFによって実現された。成長する結晶表面は、20倍の対物レンズを用いて透過位相差観察 (Olympus, IMT) によってその場観察した (Fig. 2)。振動によるフォーカス変動を抑えるため、顕微鏡はG-II機内のジュラルミン製の専用ラック内で制振装置上に設置した。重力の変化に伴う、顕微鏡ステージのたわみによるフォーカスのずれは、ピエゾステージによって、対物レンズの位置を制御することによって制御した。



Fig.2. Experimental setup in G-II rack. An inverted microscope is fixed on a vibration control device. Precise focus adjustments during parabolic flights are achieved by using a piezo stage.

## 2. 結果と考察

最初の目的である、高過飽和度状態における分子ステップの観察ができた (Fig. 3)。高分解能顕微鏡用カメラ (QImaging, Retiga 4000R) を使い、高速のビデオボードを搭載した PC で駆動することによって、0.25 s ごとに、高分解能のまま連続的な画像取得を行うことができた。その結果、明瞭なコントラストで、笹の葉型のステップ (二次元島) をいくつも観察することができた。また、それよりも薄いコントラストのステップも分解できている。これらのコントラストの違うステップは、しかしながらほぼ同

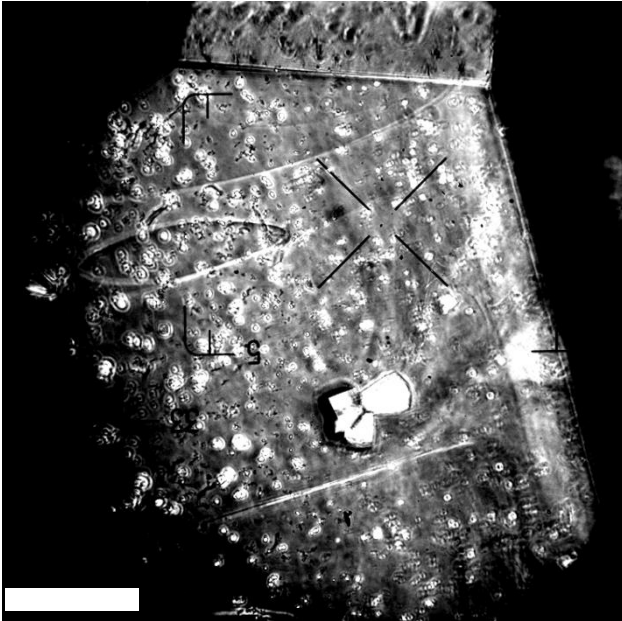


Fig.3. Surface microphotograph of a {110} face of a tetragonal HEWL crystal. Two-dimensional (2D) nucleation mainly occurs on the growth interface. The shape of 2D islands is elongated circle. Scale bar represents 100  $\mu\text{m}$ .

じ速度で前進していた。よって、解析はよりコントラストの高いマクロステップを選び、行った。

測定した $V_{\text{step}}$ を、低過飽和度領域で、共焦点微分干渉顕微鏡および、NanoStep の二光束干渉計によって測定した見かけのステップ前進速度と共に示す (Fig. 4)。○は 0.0 G における $\langle 110 \rangle$ 方向へのステップ前進

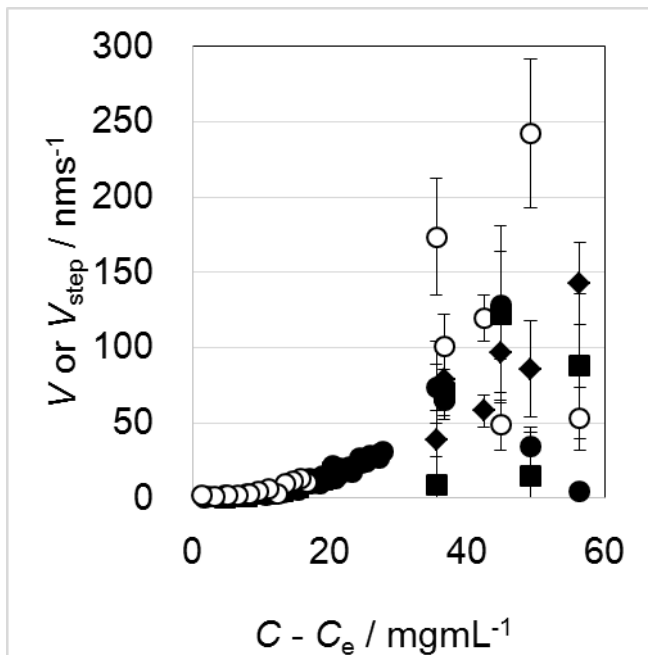


Fig.4. Step velocities in a  $\langle 110 \rangle$  direction. ○, ●, ◆, and ■ are  $V_{\text{step}}$  at 0.0, 1.0, 1.5, and 1.8 G, respectively. Scatter data of right-hand side are the results of this study.

速度を示し、●、◆、そして■はそれぞれ 1.0、1.5、そして 1.8 G におけるデータを示している。また、データの解析点が少ないこと、および重力変化付近のフォーカス変動の大きな点も入れて速度を出してしまっていることなどから、ばらつきが大きい、傾向として、やはり 0.0 G の値が最も大きいように思える。今後早急に解析を進め、より正確な議論ができるようにしたい。また、最も高い濃度領域において、全体的に速度が低下しているのは、溶液入れ替え時に混入した二次核等による多くの微結晶の生成が関係していると考えている。

### 3. まとめ

高過飽和状態で成長するニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) 正方晶系結晶の成長界面を透過位相差顕微鏡で PF 中にその場観察することで、以下のような結果が得られた。

- (1) 高過飽和度領域において、HEWL 正方晶系結晶の {110} 面上で、様々な高さのステップおよび二次元島が観測できた。
- (2) データのばらつきは大きかったが、全体として 0.0 G の時のステップ前進速度が最も大きかった。

### 参考文献

- 1) Davis, A. M., Teague, S. J. and Kleywegt, G. J.; Application and limitations of X-ray crystallographic data in structure-based ligand and drug design, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 2718-2736 (2003).
- 2) <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>
- 3) Task Group for the Evaluation of NASA's Biotechnology Facility for the International Space Station, Space Studies Board, National Research Council: Future Biotechnology Research on the International Space Station, Chap. 1, pp13, The National Academic Press, Washington, DC, (2000).
- 4) Yoshizaki, I., Tsukamoto, K., Yamazaki, T., Murayama, K., Oshi, K., Fukuyama, S., Shimaoka, T., Suzuki, Y. and Tachibana, M.; Growth rate measurements of lysozyme crystals under microgravity conditions by laser interferometry, *Rev. Sci. Instrum.*, **84**, 103707 (2013).
- 5) Suzuki, Y., Tsukamoto, K., Yoshizaki, I., Miura, H. and Fujiwara, T.; First direct observation of impurity effects on the growth rate of tetragonal lysozyme crystals under microgravity as measured by interferometry, *Cryst. Growth Des.*, **15**, 4787-4794 (2015).
- 6) Adawy, A., van der Heijden, E. G. G., Hekelaar, J., van Enckevort, W. J. P., de Grip, W. J. and Vlieg, E.; A comparative study of impurity effects on protein crystallization: diffusive versus convective crystal growth, *Cryst. Growth Des.*, **15**, 1150-1159 (2015).