

インスリン結晶の核形成に対する微小重力の影響

山口大・教育 和泉研二

Effects of Microgravity on the Nucleation of Insulin Crystals

Kenji Waizumi

Faculty of Education, Yoshida 1677-1, Yamaguchi, Yamaguchi 753-8513

E-Mail: bec20@yamaguchi-u.ac.jp

Abstract: We found abnormal light scattering from insulin particles in some aqueous solutions during the microgravity experiments, i.e. the scattering images on the monitor became coarser than those under the normal gravity, and the diffusion coefficients analyzed by the dynamic light scattering technique became smaller than those obtained under the normal one. The phenomena should be mainly due to the depression of fluctuations of small insulin particles by suppression of gravitational drifts under the microgravity. Such drifts and fluctuations of small particles give an accidental solution flow around themselves, and some imperfection of grown-up crystals would be originated by the motions of particles during pre- and post-nucleation stages.

1. はじめに

宇宙で良質のタンパク質結晶が得られる原因には、いくつかのことが考えられよう。しかし、その多くの研究の視点は、静置したバルク結晶の成長や溶液相の対流に向けられており、核形成段階での重力沈降については、これまであまり関心が向けられてこなかったように思われる。

私たちはこれまでにインスリンの結晶核生成過程の解明を目指して、動的光散乱、走査型電子顕微鏡、磁場など用いた研究を行ってきた。その結果、インスリンの核形成過程として、1) 溶液調整後すみやかに4個程度のインスリン六量体からなる凝集体の臨界核を形成し、2) その後、六量体を成長単位とした拡散律速によって数百nmサイズの球状凝集体に成長する。3) 約10分程度経つと、それらの凝集体の中から固相転移によって結晶となるものが現われる。4) その結晶は溶液中に浮遊した状態で30分から1時間半くらいをかけて約2 μ m程度にまで成長を続け、5) 約2時間後までには重力沈降によってほぼすべての結晶が容器の底に沈降し、6) 残りの凝集体は結晶の成長に対する溶質バッファの役割を果たしながら再溶解するという成長モデルを提唱した^{1,2)}。

このモデルに因れば、インスリンは溶液中で微結晶として成長する段階はもちろん、核生成段階ですでにミクロンサイズに達しているため、重力の影響が無視できないと考えられる。そこで、微小重力環境下におけるインスリンの微結晶および核形成段階の凝集体の挙動を、その場観察および動的光散乱法によって調査するとともに、インスリン微粒子の粒径に対する重力沈降およびブラウン運動の影響を検討した。また、これらの結果から、インスリン結晶核形成前後における宇宙利用の効果につい

て簡単に言及する。

2. 実験

微小重力実験は、ダイヤモンドエアサービス社の航空機 MU300 および G-II を用いた。インスリンの結晶化は、0.02mol/l の塩酸に、所定量のインスリン、Zn²⁺ およびアジ化ナトリウムを溶かした溶液 500ml と、0.10mol/l のクエン酸三ナトリウム溶液 500ml を、分光用の角形セル内で混合することによって行った。混合後の溶液の pH は約 6 であり、角形セルは恒温循環水によって 20°C に保持したセルホルダーにセットした。セル内におけるインスリンの挙動は、小型 CCD カメラでモニターしながらビデオで録画した。

微小重力下における微結晶の巨視的挙動の観察には、事前に実験室で調整した、10 μ m 程度のインスリン微結晶が成長した溶液を用いた。微結晶は、ある程度の時間が経つと溶液中で沈殿してしまうため、微小重力実験では、微小重力突入の前にセルを振って、微結晶が浮遊する状態にした。

結晶核形成時におけるインスリン微粒子の挙動の研究には、動的光散乱法を用い、試料調整は微小重力突入時刻から遡った所定の時刻に、航空機内で行った。動的光散乱計測は、ALV5000(ALV 社)で行い、照明には 10mW He-Ne レーザーを用いた。

3. 結果と考察

3-1) 微小重力下における微結晶の挙動

微小重力実験により、重力が働いている状態で沈降していた微結晶は、微小重力突入後、速やかにほぼ完全に停止することが、モニター上で確認された。直径約 10mm、15mm、20mm のインスリン微粒

子の鉛直方向の位置が、時間とともに変化する様子を Fig. 1 に示す。図中の線の傾きが沈降速度であり、粒径に応じて異なる速度で沈降していても、微小重力突入後、ほぼ同時に並進運動を停止したことがわかる。

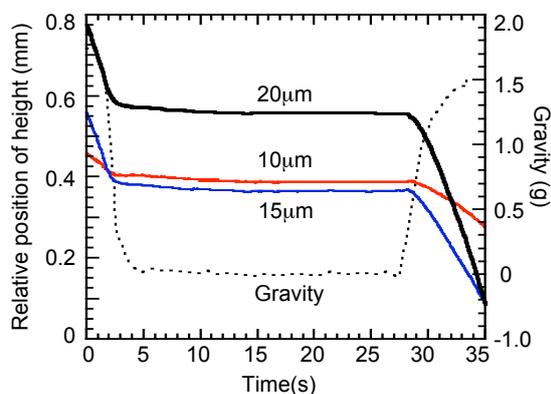


Fig. 1 Drifts of insulin crystals along gravitational axis during the microgravity experiments. The solid lines indicate changes of height positions of crystals, which approximate diameters are shown near the lines. The gravity during the experiments is also shown as the dotted one.

さらに実験では、重力環境下で溶液中を移動する際には観察される個々の微粒子の散乱光強度の揺らぎが、微小重力下で小さくなる様子が確認された。例として、Fig. 2 に、モニター上の輝度変化を解析して得た、約 $10\mu\text{m}$ の大きさの微粒子の散乱強度の時間変化を示す。微小重力時間内の散乱強度変

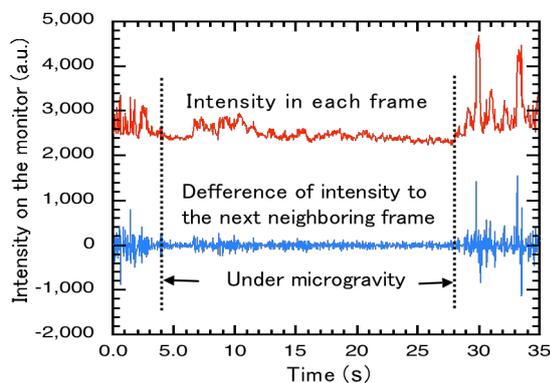


Fig. 2 The light scattering intensities of the insulin microcrystal in the aqueous solution under the microgravity. The intensity is the sum of those of 5×5 pixels including the image of the target microcrystal in the video frame on the monitor. The frame ratio was about 30 fps.

化は、重力環境下で溶液中を移動している時に比べ、明らかに穏やかになっている。

一般に媒体中を粒子が沈降するとき、溶媒から受ける抵抗のため、粒子に回転運動が生じる。紙吹雪がひらひらと舞うのと同じである。無重力実験で観察された今回の現象も、沈降中に溶液から受ける抵抗によって生じていたインスリン微結晶の回転運動（揺らぎ）が、並進移動の停止によって抑制されたためである。

2) 微小重力下における核形成段階での光散乱

核形成段階にあるような $1\mu\text{m}$ 程度の微粒子に対して、前章のような個々の直接観察は困難であった。しかし、微小重力時間中、インスリンの核形成段階における溶液からの光散乱光は、微小重力になると全体的に斑になるという、興味深い現象がモニター上で観察された。このような微小重力時間内の散乱光を動的散乱法によって解析すると、拡散係数が小さく (Fig. 3)、結果として粒径が大きく算出される傾向が見られた。

これらの原因については、前説の結果と合わせて、次節で考察する。

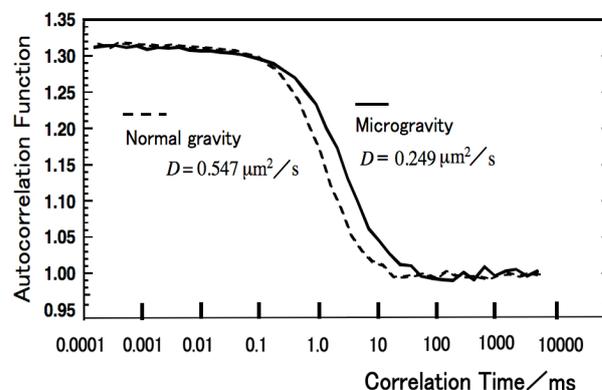


Fig. 3 Comparison of diffusion constants of insulin particles under the microgravity and normal gravity.

3) 重力沈降とブラウン運動による移動速度

粒子のサイズが小さくなると、沈降速度は遅くなるが、ブラウン運動による移動速度は大きくなる。沈降よりもブラウン運動による移動が大きいならば、微小重力環境下で沈降が停止しても、粒子の回転運動の抑制効果は小さいであろう。そこで、インスリン微粒子の沈降速度とブラウン運動による運動速度のそれぞれについて、粒径依存性を検討する。

よく知られたように、沈降速度 v_d は、次のスト

ークスの沈降速度式によって計算できる。

$$v_d = (\rho - \rho_0) \cdot g \cdot D^2 / 18\eta \quad \text{----- (1)}$$

ここで、 ρ および ρ_0 は、それぞれ粒子および溶液の密度、 g は重力加速度、 D は拡散係数、 η は溶液の粘度である。

一方、水溶液中におけるインスリン微粒子のブラウン運動による並進運動速度は、微粒子を球体と仮定して、以下のように考えることができる。

熱運動による水中の球体の拡散係数 D は、

$$D = k_B T / 6\pi a \eta \quad \text{----- (2)}$$

である。ここで、球体が拡散によって距離 a だけ移動し、それにかかる時間を t とすると、拡散定数の定義より、 $a^2/t = D$ となる。よって、ブラウン運動によって距離 a を移動するときの平均速度 v_r は、

$$v_r = a / t = k_B T / 6\pi a^2 \eta \quad \text{----- (3)}$$

となる。

以上の(1)式と(3)式によって計算した速度を、Fig. 4 に示す。溶液の粘度と密度は測定値を、結晶の密度は文献値³⁾の 1.245 g/cm^3 を用いた。Fig. 4 より、溶液中で成長するインスリンは、約 $1 \mu\text{m}$ 程度の大きさから、沈降速度がブラウン運動による平均移動速度に匹敵し始めることがわかる。その大きさは、ちょうどインスリンが凝集体を形成し結晶へと変化していく段階に相当する。

このことから、前節の核形成段階で述べた特異な散乱現象と動的散乱の結果は、核形成の段階の粒子の並進および回転運動に、重力が影響を及ぼしたためであると推測する。つまり、回転運動が抑制された結果、個々の微粒子からの散乱方向の時間変化が少なくなり、散乱像が斑になると同時に、散乱光強度の時間変化も小さくなって(強度の相関時

間が長くなって)、動的散乱の解析では、拡散が遅くなったように解析されたと考える。

4. 宇宙環境利用との関連

重力下で核形成して成長する結晶の品質が、容器壁に沈着するまでの間に行う並進・回転運動によって、どの程度の影響を受けるのかは不明である。しかし、沈降し回転運動している結晶は、それにより生じる不規則な溶液の流れに曝されるため、欠陥が発生する頻度は高いと思われる。例えば、重力環境下と無重力環境下で育成した結晶とを比較すると、結晶の中心付近からの転位の発生頻度に違いがあることなどが考えられよう。

沈降は地上で結晶を育成する限り避けられない。X線トポグラフ法などにより、結晶欠陥の発生場所や頻度の違いを比較することができれば、宇宙環境利用がタンパク質の育成にとって本質的な意味を持つことを、端的に示すことが可能と予想する。

5. まとめ

航空機を利用した微小重力実験により、 $10 \mu\text{m}$ サイズのインスリン微結晶および核形成段階の $1 \mu\text{m}$ 程度のインスリン微粒子の溶液中での挙動を、それぞれ、その場観察と動的散乱によって調査した。微結晶は微小重力突入後、速やかに重力沈降を停止すると同時に、回転運動が抑制された。核形成段階の微粒子では、微小重力期間中、溶液からの散乱像が全体的に斑となり、動的散乱では拡散係数が小さくなった。この散乱現象も、インスリン微粒子の重力沈降の停止に伴う回転運動の抑制によるものであり、インスリンは、結晶が形成される段階で重力の影響を受けていると結論した。

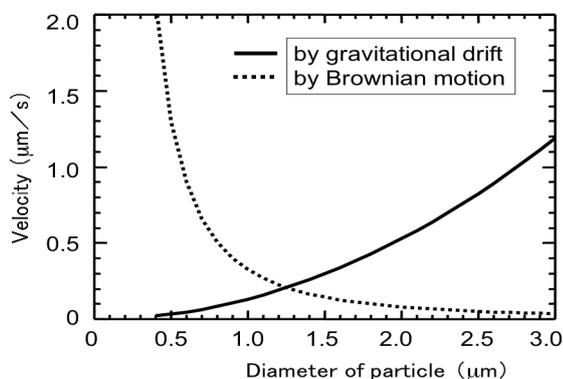


Fig. 4 Calculated velocities of the insulin particles in the experimental solutions by using of the equations of (1) and (3).

謝辞： 本研究は日本宇宙フォーラムが推進する「宇宙環境利用に関する地上研究公募」プロジェクトの一環として行った。また、本研究をまとめるあたりご助言頂いた、山口大学教育学部の古川浩教授、野村厚志助教授に深く感謝致します。

参考文献

- 1) K. Waizumi, T. Matsumoto, H. Masuda, Chemistry Letters, **1998**, 999.
- 2) 和泉研二、増永靖代、吉武菊代、日本マイクログラビティー応用学会誌、**19**、19 (2002).
- 3) E. N. Baker, et al., Phil. Trans. R. Soc. Lond. **B319**, 369 (1988).