

「微小重力における溶液からのタンパク質結晶の 成長機構と完全性に関するその場観察による研究 (NanoStep)」

研究成果報告書

代表研究者：塚本勝男(所属)東北大学大学院理学研究科

平成 29 年 2 月

1. 諸言

1.1. 研究内容、目標の概要

微小重力で成長させたタンパク質結晶をX線回折でしらべると、地上で作るよりも分解能が良い結晶が20%程度あることが1990年代に報告されている。構造生物学の分野では、微小重力では溶液の対流が阻止されるために結晶成長速度が遅くなり、その結果として結晶の完全性がよくなるためと潜在的に考えられてきた。その推察を確かめるための宇宙実験としては、タンパク質結晶を宇宙環境で成長させて、それらを地上に回収してX線回折結果を統計的に調べるのが一般的な手法であり現在に至っている。しかしそれでは、なぜ、完全性が良く、高い分解能が得られる結晶ができるかの本質的で直接的な理解が得られない。

一方、結晶の完全性は結晶の成長メカニズムに大きく依存することは既知の事実であるにもかかわらず、地上での成長メカニズム研究に匹敵するような詳しい研究は、行われてこなかった。本研究代表者は、これまで結晶の成長メカニズムの研究手法として、結晶成長速度の精密測定と結晶表面のナノレベルの観察を併せた、結晶成長の分子レベルでの“その場”観察法を開発して結晶成長メカニズムの研究に応用してきた[1-5]。その結果、日本で初めて結晶成長国際連合よりフランク賞を授与されたほど結晶成長の“その場”観察法は有効な方法であると認められるようになった。この方法を微小重力環境で利用できれば、地上の実験室と同じ精度で微小重力での結晶成長メカニズムが理解でき、両環境での結晶成長メカニズムの違いが明瞭になろう。さらには、この環境の功罪を有効に利用することで、地上でも良質の結晶をつくることにも繋がるであろう。

今回の実験では、成長メカニズム決定のために、結晶の成長速度、成長丘の形状、成長ステップ前進速度の過飽和度依存性を、地上の最も詳細なデータに匹敵する精度で取得する。結晶の完全性はこれらのキネティックなデータの総合的な解析より得られる。後に詳しく述べるように、このような精度での測定を微小重力環境で“その場”観察実験[6-8]するのは容易ではない。まず、 10^{-3} nm/sの成長速度の分解能を有する速度測定装置の世界初の開発、オンラインで4ヶ月間ダウンロードされる干渉図形データ(数Tバイト)

より結晶成長速度のリアルタイム解析のためのハードとソフトウェア開発、5-40°Cの温度で結晶成長速度の精密測定にたえる結晶成長セルと温度制御セルの開発、などが、このプロジェクトで開発する必要がある[9, 10]。いずれをとってみても、これまで宇宙実験用に開発されたことはない。幸い、レーザー干渉計だけは、本代表者が行ったTR-1Aロケット実験[11](2001、2004年)で基本的な装置を開発していたので、本実験ではその基本コンセプトを熟成させることで光学装置を完成させた。

この結晶成長実験を実施するには、結晶成長の科学としてクリアーしておくべきことがある。まず、結晶成長速度はらせん成長丘を利用して測定するので、リゾチーム種結晶上にらせん成長丘を確実に出現させる[12]必要がある。また、変質しやすいタンパク質溶液が長期間の保存に耐える[13]か、あるいは、目的とする正方晶系の多形(組成は同じで構造が違う結晶)のみが成長して、他の多形が結晶化[14]しないかなどの多くの予備研究は必須である。

1.2. 研究内容の重要性、分野・領域での位置付け、意義

タンパク質の機能性研究は生体、製薬など様々な分野の発展にとって不可欠なものである。その機能性を調べる有力な方法として、結晶化させ X 線回折法調べる方法が多用されている。そのために、さまざまな環境や条件でタンパク質の結晶化が試みられてきた。その一つとして、微小重力での結晶化がある。これまで微小重力を利用したタンパク質結晶成長実験は数多くある。これらの研究では、宇宙環境でタンパク質結晶を長時間かけて作り、地上に回収後に X 線などの評価を行う方法[15]が多い。しかし、この方法には次のような問題点が含まれている。

- ① これまでは宇宙で結晶を作ることが主であったため、微小重力下で成長中の結晶成長条件(核形成時期、成長速度、過飽和度経過)を正確に計測していない。このため、欠陥発生や完全性を結晶成長メカニズムとの対応で議論することが難しい。
- ② 結晶の成長後、地上に回収され X 線解析に託されるまでに、結晶にダメージを与える取り扱いプロセスが含まれるために、結晶成長時の結晶の完全性とその後の完全性が同じである保証がない。

それに対して、本研究では、結晶の完全性の評価と成長メカニズムの研究を、軌道上で“その場”観察で行い、かつ、“リアルタイム”に速度データを得るのが狙いである。このような研究はこれまで存在しない。特に、結晶成長の“その場”観察法による研究では他では行えない研究が可能である。

1.3. 研究動機、バックグラウンド

これまで、無数のタンパク質結晶が宇宙実験で作られ、地上に回収された後に X 線回折で構造解析に託されている。その結果は統計的に成長の初期条件と対応され、宇宙で成長した20%程度の結晶からは結晶学的に地上より高い分解能が得られたと報告されている。しかし、結晶の完全性に密接に関係する結晶成長速度の研究は皆無である。この結晶成長メカニズムの解析方法は、成長速度の過飽和度依存

性を調べる[16, 17]方法と、結晶表面上の成長パターン(らせんステップ、2次元島)の詳細な観察[18-24]をおこなう方法に大別される。本研究では、“その場”観察により、両研究手法を同時に行う。これは宇宙実験では初めてのことである。

さらに重要なことは、微小重力と地上の実験結果を比較するためには、同じ精度の実験を行わなければ正しい比較とは言いがたい。JEM内で地上と同じ精度(実験した結果。地上より精度の良い実験結果が得られることが分かった)の実験結果を出すためには後述のように多様な準備と工夫が必要であった。

2. 研究計画

2.1. 研究目標

サクセス	クライテリア
Minimum Success	温度制御、供試体/SCOFによる光学観察を正常に行うことができ、試料セル 1～3のいずれか1つが結晶表面観察ができること。
Full Success	温度制御、供試体/SCOFによる光学観察を正常に行うことができ、試料セル1～3の結晶表面観察ができること。
Extra Success	軌道上実験結果に基づいた新たな条件での実験実施を行う。

表 1 軌道上運用のサクセスクライテリア

本研究の最終目標は、これまで個別に研究されてきた分子レベルで成長表面を“その場”観察する方法と、光学的に結晶内欠陥や完全性を可視化する方法を総合し、リゾチーム結晶の成長条件と結晶の完全性との相関の解明を、成長速度の目指すことにある。その実験を成功させるためのサクセスクライテリアを表1に示した。また、科学的なサクセスクライテリアは表2に示した。いずれにせよ、溶液温度を 5-40℃の範囲で段階的に変化させて結晶表面からの干渉縞と溶液濃度・温度勾配による干渉縞の変位が測定できれば実験は成功である。もちろん、運用開始までに多数析出した種結晶だけが無事に成長して測定可能な(110)結晶表面の出現が不可欠ではある。

サクセス	クライテリア
Minimum Success	試料セル1を用いて、過飽和度に応じたステップ成長速度の計測を行い、ステップ成長速度に重力(対流)がどのように影響しているかを明らかにする。
Full Success	試料セル1～3を用いて、過飽和度・不純物濃度に応じたステップ成長速度の計測を行うとともに、表面の結晶成長様式、微小欠陥などを観察し、タンパク質の結晶成長機構と完全性との相関に関して新たな知見を加える。
Extra Success	軌道上実験結果に基づいた新たな条件での実験実施を行い、新たな知見が得られること。

表 2 科学的なサクセスクライテリア

2.2. 研究チーム体制

研究者

- (1) 代表研究者 (装置開発を含め総括、成長速度と成長メカニズム解析)

塚本 勝男

東北大学大学院・理学研究科

- (2) 共同研究者 1 (JAXA としての支援と実験準備)

吉崎 泉

宇宙航空研究開発機構・宇宙科学研究所

- (3) 共同研究者 2 (結晶成長速度の理論的解析と新たな理論創出)

三浦 均

名古屋市立大学システム自然科学研究科

- (4) 共同研究者 3 (結晶成長速度測定)

鈴木 良尚

徳島大学工学部

- (5) 共同研究者 4 (タンパク質結晶成長メカニズムの検証)

佐崎 元

北海道大学低温科学研究所

(6) 共同研究者 5 (結晶の完全性の測定と X 線トポグラフ測定)

橘 勝

横浜市立大学大学院・国際総合科学研究科

(7) 共同研究者 6 (干渉縞解析ソフト開発準備)

横山 悦郎

学習院大学・計算機センター

日本宇宙フォーラム JSF

(8) JSF 担当者 (実験準備と取りまとめ)

島岡 太郎

(財) 日本宇宙フォーラム 宇宙利用事業部

- ・ 各研究者と JAXA、JSF 担当者は有機的、かつ、能率的なチームワークをくむことができ実験の成功に導いた。この成功については API でもハイライトとして紹介されている。各研究者は実験終了後も本 JEM 実験結果を補強しさらに発展させる地上研究を継続し、それらの研究成果はハイレベルな国際誌にも発表されている。
- ・ 実験データの解析に関しては ESA の研究グループとの議論が不可欠であった。その結果、ESA の今後の宇宙実験にも大きなインパクトを与えたことを記しておく。なお、末尾に ESA の Physical Science の長である Olivier Minster からの、この実験を評価した手紙を添付しておく。

2.3. スケジュール

- ・ フィジビリティスタディ(FS)計画選定から飛行後解析までのスケジュールは、実験計画書に従って予定通り。JEMでの運用は予定通り2012年8月より12月の間に実施し予定した実験項目は全て成功裏に終了した。

平成24年7月21日:こうのとり3号機(HTV-3)打上

平成24年7月28日:こうのとり3号機(HTV-3)ISS到着/NanoStep供試体など搬入開始

平成24年7月30日(月):宇宙飛行士によりSCOFに供試体取り付け

平成24年8月2日(木):機器の動作確認(CO)実施

平成24年8月6日(月)~9月7日(金):Cell1実験

平成24年10月1日(月)~11月2日(金):Cell2実験

平成24年11月12日(月)~12月14日(金):Cell3実験

3. 実験準備・運用

3.1. 実験装置

観察装置の概念図を図1に示した。リズチーム結晶(110)面の Michelson 干渉計の観察方向と、結晶周囲の濃度分布の測定のための Mach-Zehnder 干渉計の観察光軸は直行する。

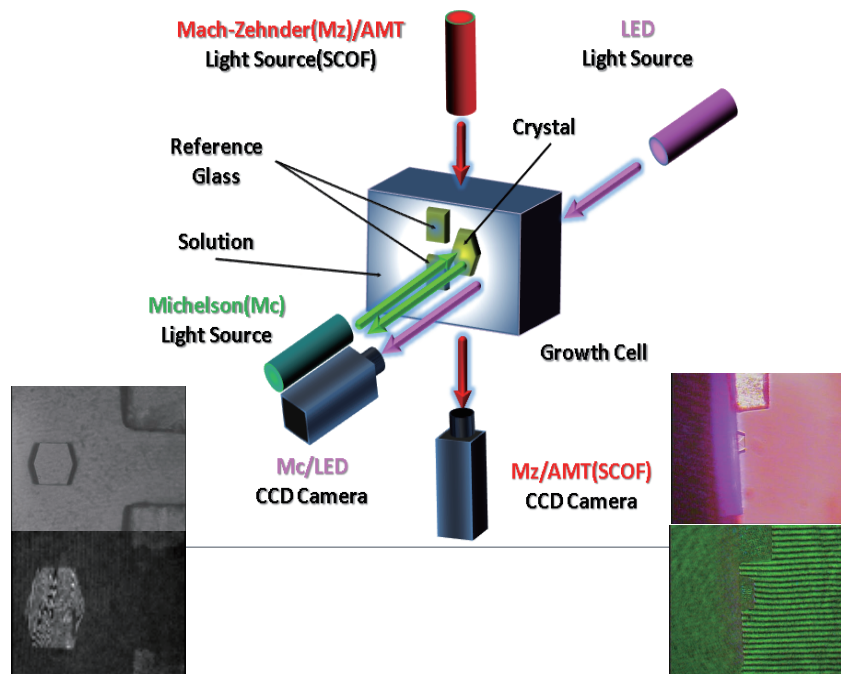


図1 観察方法の概念図。左下は結晶のMCにより表面観察。右下は結晶近傍のMZによる濃度分布。

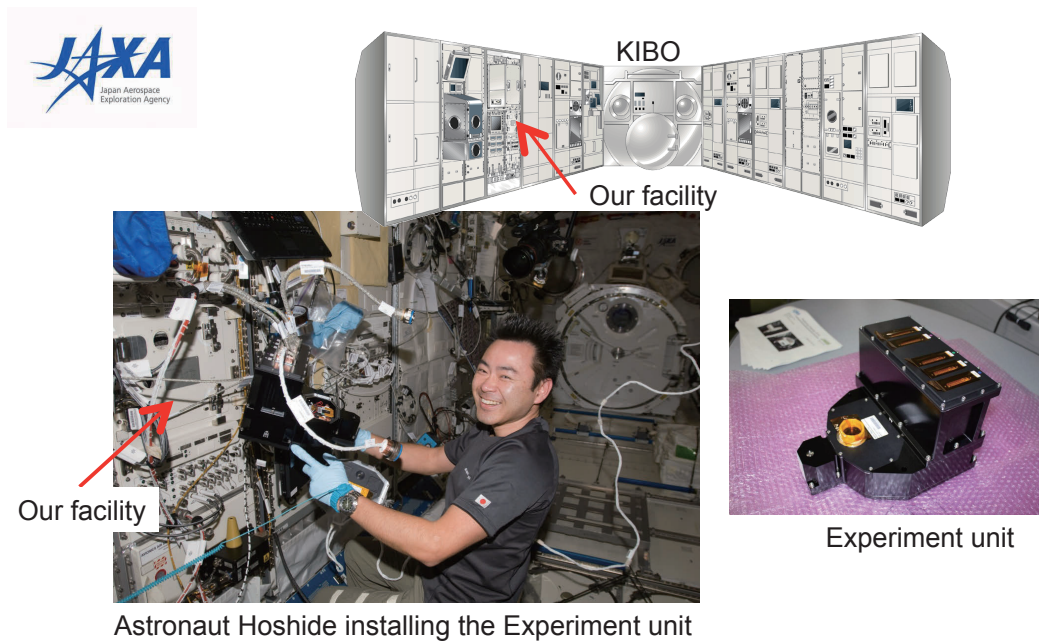


図2 SCOF 結晶成長その場観察装置。

(1) 主要な使用装置

溶液蛋白質結晶成長実験装置(SPCF)にセットされた溶液結晶化観察装置(SCOF)図 2 に示す。

3.2. 溶液の準備

卵白リゾチームは時間とともに変質する。特に高温では顕著である。そのため、事前に溶液の安定性を動的散乱装置などで調べ論文として発表した[25]。また、成長条件により様々な多形(化学組成はおなじで結晶構造が違う結晶)が晶出するので、多形の塩析剤による制御[14]や電場による制御[26]方法を試み最適な溶液を準備した。

(1) 試料種類

	タンパク濃度 (mg/ml)	Purity (%)
Cell 1	30	99.85
Cell 2	35	98.5
Cell 3	30	98.5

表 3 溶液の濃度と純度

塩析剤:NaCl、緩衝液:酢酸ナトリウムバッファー、タンパク質:鶏卵白リゾチーム(市販品および高純度精製品)を用いて表 3 のように調製し Cell 1-実験に使用した。

正方晶系鶏卵白リゾチーム結晶をグルタルアルデヒドで化学固定し[27]再利用可能な種結晶を作製して、結晶成長セル表面からの光の反射を防ぐために[2]、セル底面に3度の off 角度で接着した。

(2) 結晶成長セル内部

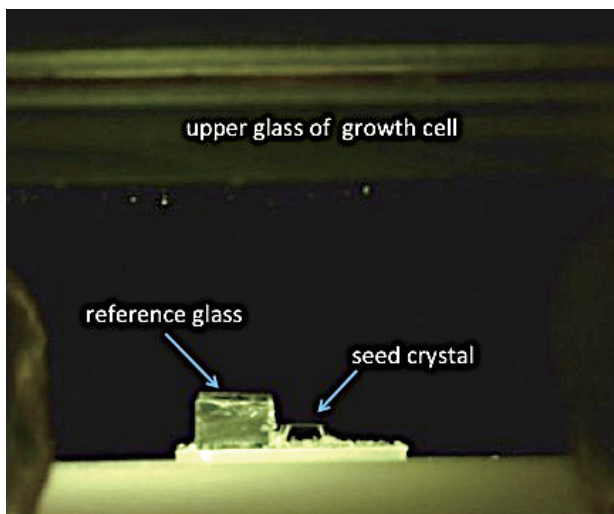


図 3 に種結晶(横幅約 0.5mm)と参照ミラーを 3 度 off で接着した様子を示す。角度をつけるのは反射干渉計の測定に際してセルガラス表面での反射を避けるため。

図 3 フライト直前の結晶成長セル内部。セル内に接着された参照ミラーと種結晶。セルガラス表面を基準としてともに 3 度 off で接着。

なお、セルの詳細設計図は図 4 に示す。セル本体は石英ガラスを溶着して接合し、種結晶はセラミック製のヘリサート底面に接着され、ヘリサートをねじ込んでセルと合体させる(図5)。このセルの製作は、この実験の要であり、その詳細は文献[9]に発表した。

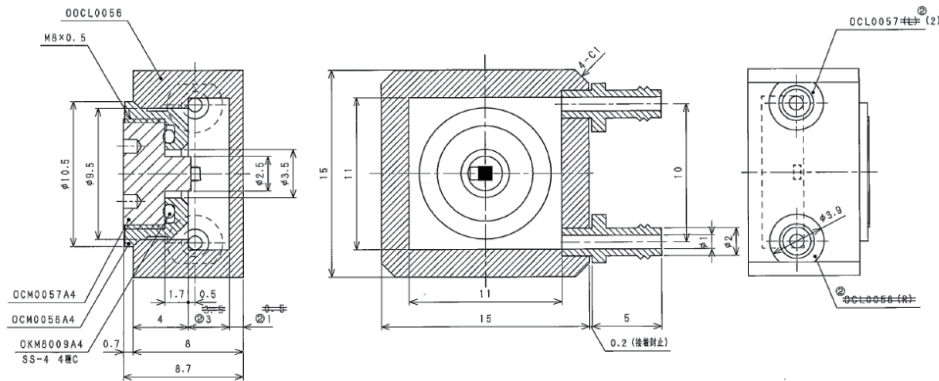


図 4 セル詳細図、石英ガラスの本体に種結晶を接着したセラミック製ヘリサートをねじ込む。

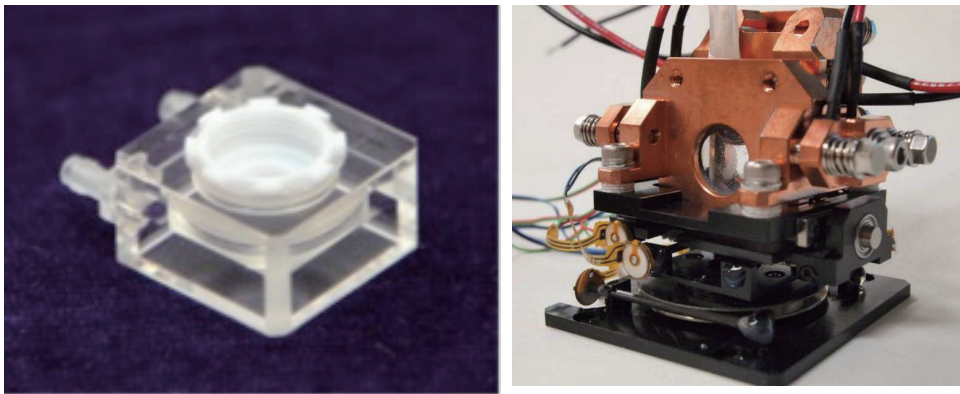


図 5 石英ガラスセル 12x12x4mm(左)を挟み込んだペルチェ温調ブロック(右)。黒い下部は超音波モータ(φ1mm)を使った超小型3軸ステージ(20mm 角)。

3.3. 供試体部の開発

供試体部の詳細は実験計画書に記されているが、これまでの宇宙実験の経験[6, 28-30]をもとに打ち上げ時の振動に耐えるような光学系になっている[8, 11, 31-35]。供試体部の内部を図6に示した。

3.4. 成長速度解析ソフトの新開発

JEM からリアルタイムにダウンロードされる干渉縞データは数テラバイトに達するので手動による速度解析は不可能である。そのために微速で移動する干渉縞動画より、結晶表面の任意の場所(座標、ライン、エリア)を選び出し 0.001nm/s 以下の成長速度をリアルタイムに測定できるソフトを東陽テクニカと共同で開発した。

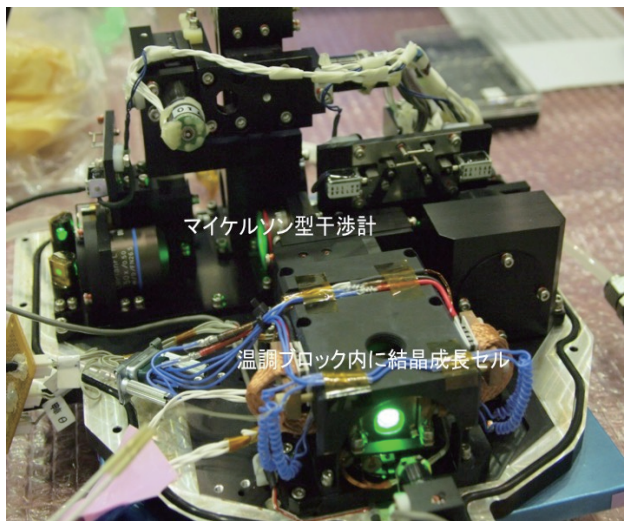


図 6 供試体内部。横幅25センチでコンパクト。

この NanoStep 実験では、実験はもちろん“その場”観察であるが、データ処理も“その場”の解析を原則とした。一定温度にしてから数分から30分間を費やして測定した干渉縞動画に含まれる成長速度データは“その場”で粗解析して、約 10 分後の次の実験の条件を設定する方法をとった。なお、精密な速度解析は、実験当日の夜にバッチ処理で速度解析が終了するようにした。

(1) 成長速度の測定原理

光の波長を物差しとして変位を測定するレーザ

ー干渉法は非常に振動に敏感なため JEM の微振動を拾ってしまい、結晶表面からの干渉画像は常に振動している。この振動を除去するために、ダウンリンクされた動画像の 8-16 フレームをリアルタイムに移動平均をとる。その原理図を図 7 に示した。過飽和度を変化させるには温度を変化させる。そのため、結晶成長セルが熱膨張・収縮してセル底部に接着した結晶の表面位置が変わる。その変位を参照ミラーの変位から求めて差分をとる。この方法により、結晶表面の真の変位量が精密に測定できる[30, 36]。この変位の時間微分が成長速度である。

(2) 成長速度測定自動化ソフト

干渉縞画面に任意の6ラインを選び、そのタイムラインを同時に取得して演算することで、任意の場所での成長速度を測定できる。この開発品は SPIP のプラグインソフトとして製品化された。

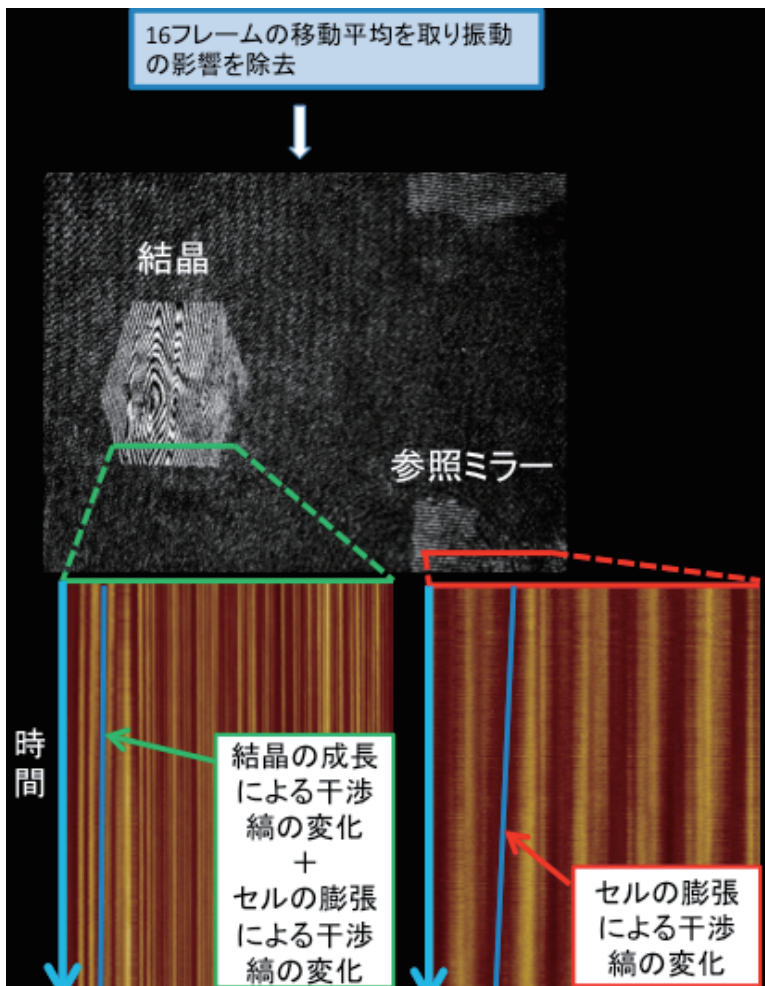


図 7 成長速度解析原理。干渉縞移動のタイムライン。温度変化によるセルの変位を除去するために、結晶近傍にある参照ミラーの変位も同時に測定。

3.5. クルー操作

基本的には地上からのコマンド制御により実験を実施する。ただし、1つの試料セル組立の実験が終了した際には(35日後)クルーによる試料セル組立交換を行う(2回)。

3.6. 実験シーケンス

概略は図8の通りであり計画書と変更はない。

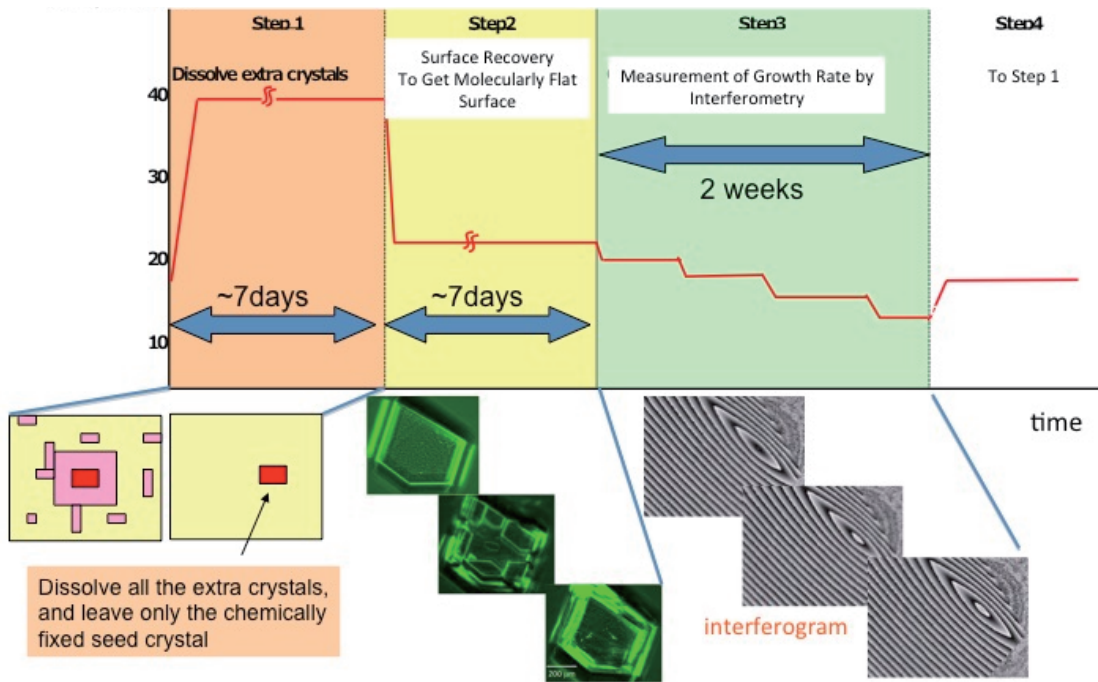


図8 実験シーケンス概要(1試料セルあたり)。最初の1週間で不要な結晶を溶かし種結晶だけにする。その後、一定過飽和度に放置し結晶表面を平らにして、綺麗な干渉縞が出る状態にして実験を開始する。

4. 実験結果および成果

2種類のレーザー干渉計で得られた生画像が図9である。お互い直行する2方向の光軸方向からの観察で、左はMach Zehender干渉計(MZ)による透過干渉図形をしめす。干渉縞の曲がりや温度と濃度勾配による屈折率分布をしめす。結晶近傍での干渉縞の曲がりや結晶が成長するために生じる濃度分布。この干渉図形を位相シフト法で濃度分布に変換したのが図10で、より直感的に濃度分布を示すことができる。このMZ干渉図形は、(1)結晶界面での過飽和度の測定ができるだけでなく、(2)結晶成長実験前後の飽和温度の確認のために重要である。長期間の実験のため、飽和点は僅かに変動して、成長速度の比較に支障をきたす。この点については後に詳しく述べる。

図9の右はMichelson(MC)干渉図形である。この干渉縞の動きから結晶表面の任意の場所の成長速度が測定できる(3.4参照)。ここでは、 10^{-3} nm/sの僅かな成長速度の違いが意味をもつので、結晶成長セル

の熱膨張による結晶の移動速度に比べて結晶面の移動速度、つまり、成長速度がはるかに小さいことである。そのために、図でみられるような参照ミラー(図 3)を結晶の接着面と同一面に接着しておき、結晶の

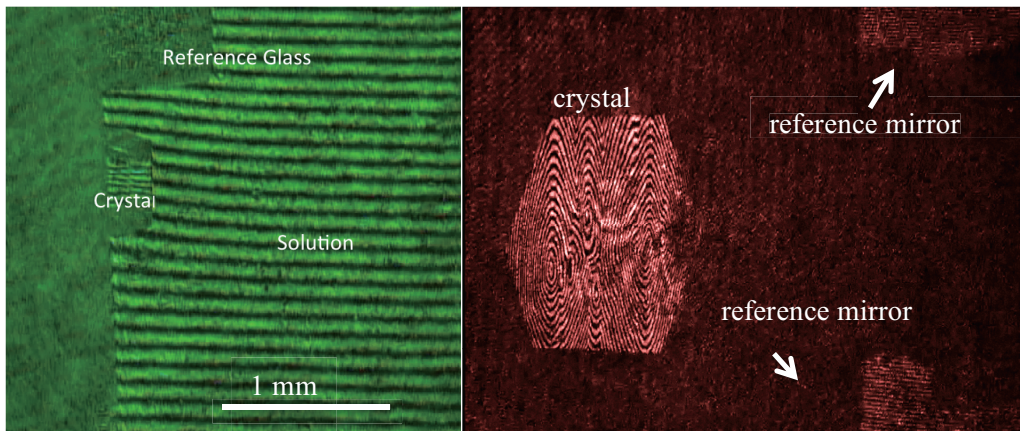


図 9 宇宙で成長しているリゾチーム結晶成長の初の“その場”観察。結晶周囲の濃度分布を示す Mach-Zehnder 干渉図形(左)と結晶表面と2個の参照ミラーの Michelson 干渉図形(右)。

成長にかかわらないセル本体のゆがみや動きをキャンセルする方法をとった。これにより、 10^{-4} nm/s までの分解能で成長速度が測定できた(図 7)。

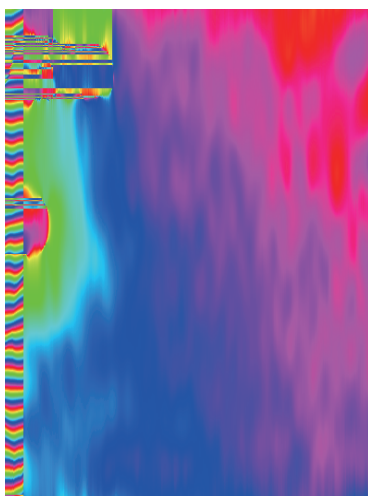


図 10 図9左の干渉像を位相シフト処理により濃度分布になおした(横山 et al.)

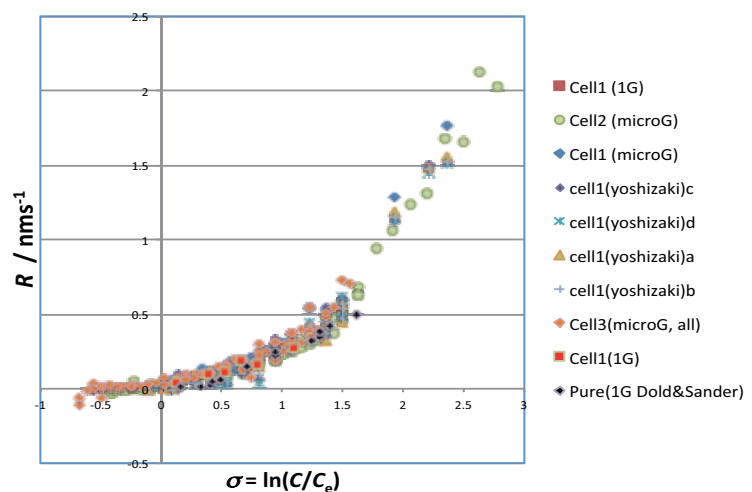
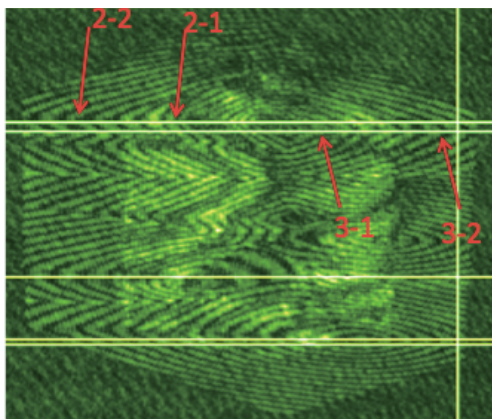


図 11 成長速度 vs 過飽和度の補正前のデータ。装置の測定精度は記号のサイズ以下。マイクロ G での $\sigma=0.8$ 付近の成長速度は大きく散らばることに注目。

4.1. 成長速度の測定



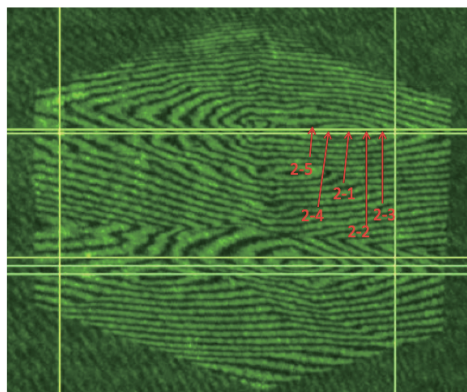
例: 17°Cのデータ

	Rreal	nm/sec	Vstep aveage nm/sec
t2-1		0.225097501	15.10098652
t2-2		0.218181504	14.63701701
t3-1		0.285481799	19.15195317
t3-2		0.216342899	14.51367156

図 12 成長速度の散らばり。

究のような詳細な比較をするには次に述べるような問題が生じる。

NanoStep で測定した MC 干渉計データからの成長速度の一部を、地上での結晶成長データと併せて過飽和度の依存性としてプロットしたのが図 11 である。微小重力のほうが結晶成長速度が遅いというのはこれまでの“宇宙の常識”であった。しかし、この全体のプロットをみると、ほぼ同じ成長速度か地上のほうが遅いことを示していた。ただ、本研



例: 10°Cのデータ

	Rreal nm/sec	Vstep aveage nm/sec
2-1	1.146497317	167.5155863
2-2	1.134372156	165.7439699
2-3	1.164601684	170.160829
2-4	1.181872598	172.6842952
2-5	1.165762208	170.3303941

この場合、同じ成長丘であれば、縞による違いはほとんどない。

図 13 乱れのない成長領域からの速度測定。散らばりはわずか。

4.2. 成長速度測定上の問題点

(1) どこの成長速度？

結晶成長速度の溶液飽和度依存性は結晶成長メカニズムを反映しているので測定は重要である。古くは Bennema[37]による重量法などがあるが結晶全体の平均速度しかえられ得られない。一方、干渉計で測るほうが結晶面や必要な測定箇所を選ぶことができ、かつ、速くて正確である[3, 38]ので最近干渉計が多用されている。

今回問題となるケースを図 12 に示そう。結晶表面には約4個のらせん成長丘があり、この(110)面の成長を担っている。ところが、同じ成長丘で成長する領域であっても、どこで測定するかによって30%もの散らばりがでる。通常、これは平均をとって成長速度とするが、現実結晶の成長をリードしているのは最も成長速度が速い成長丘である。

結晶がどう成長するかは成長ステップの形状を見ることで判断できる[20]。よって、結晶ステップが他のステップと干渉していない場所を選んで速度の比較をしたのが図 13 の結果である。これにより散らばりが極めて小さい成長速度データが得られる。興味あることは、結晶成長面でもっとも成長速度が速いのがこの成長丘であることである。したがって、それ以降の結晶成長速度の解析は、他の成長丘や欠陥と干渉しない、かつ、成長丘の傾斜が最大(成長速度が最大)であるらせん成長丘の中心部付近の速度を重点的に解析した。

(2) 飽和点の補正

図 11 のグラフを注意深くみると、 μG でのセル3の過飽和度ゼロ付近でも速度が正でありおかしいことが分かる。NanoStep 打ち上げ前には全てのセル内の溶液の飽和温度は測定してある。しかし、負の過飽和度でも成長

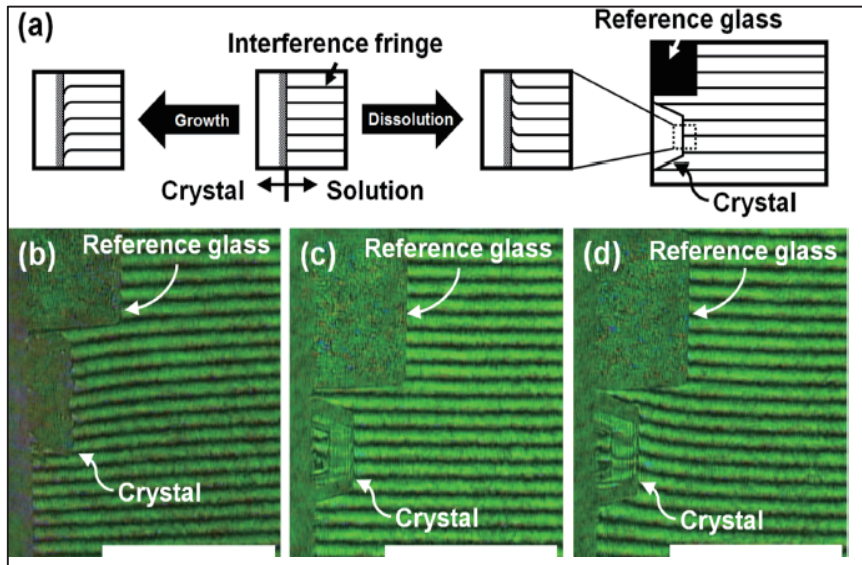


図 14 平衡温度での再測定。結晶近傍の干渉縞が直線のときが平衡温度。

していることは、溶液濃度が何らかの上昇していることを示している。溶液内の水の蒸発が温度変化による溶液の体積変化をキャンセルするために用いるフレキシブルチューブから長期間の間に生じることは予想していたので[9]、軌道上で実験前後の飽和温度を再測定し水の蒸発量を測定し、溶液組成がどう変化したかを詳細に検討した。

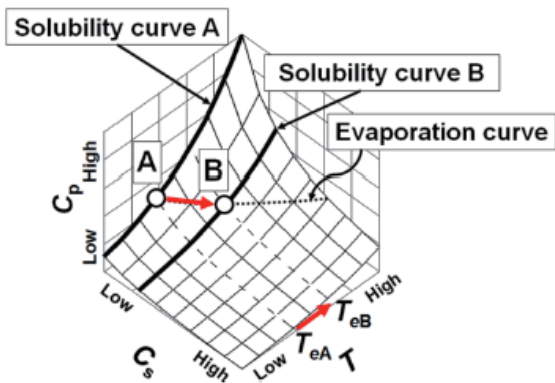


図 15 溶解度の温度と塩析剤濃度(C_s)依存性。

結晶が成長しているか溶解しているかを図 14 のように確かめた。干渉縞が直線のときは平衡であるので、その温度を飽和温度とした。セル3の初期値は $27.5 \pm 0.5^\circ C$ であったが、軌道上での実験時には $25.5 \pm 0.5^\circ C$ まで下がっていた。タンパク質結晶の溶解度 (C_p) は塩析剤 $NaCl$ (C_s) と温度の関数であるのであるので、図 15 上に示した蒸発の軌跡を考察した。それによると、2.7%の水が実験開始までに蒸発したことが分かった。2.7%の水の蒸発

による溶液の体積変化をキャンセルするために用いるフレキシブルチューブから長期間の間に生じることは予想していたので[9]、軌道上で実験前後の飽和温度を再測定し水の蒸発量を測定し、溶液組成がどう変化したかを詳細に検討した。

Fujiwara ら[39]は、まずセル3の軌道上の干渉データを再検討した。まず、温度変化により

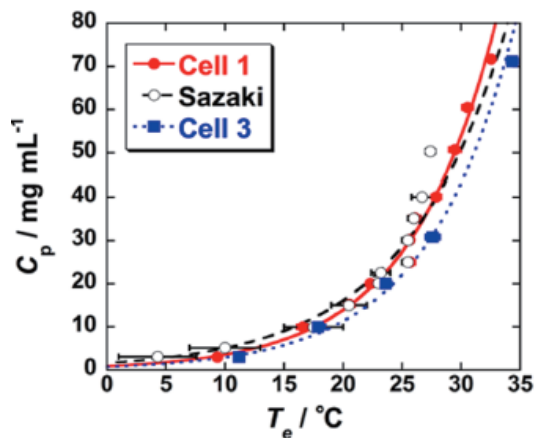


図 16 再測定したセル1とセル3の溶解度。

はタンパク濃度を僅かに上昇させるが、塩析剤濃度の僅かな上昇はタンパク質の溶解度を大きく低

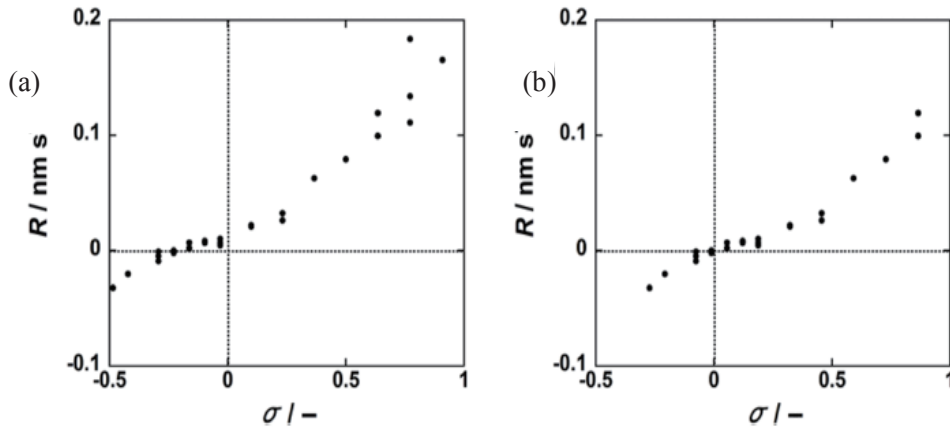


図 17 (a)溶解度の補正前と(b)補正後。過飽和度ゼロで速度が原点を通る。

性を求めると図 17 が得られる。これによって初めて成長速度の比較ができるようになった。

4.3. 地上と微小重力での成長速度比較

1Gと μG での成長速度を比較した一例が図 18 である。一般に使用される $\sigma < 2$ では、これまでの常識と異なり、微小重力のほうが結晶の成長は速い。この溶液は 99.85%と最も純度の高い溶液を使用しているが、地上で実験すると低過飽和度では成長も溶解もしない領域 (dead zone)がある。これは結晶表面に付着するが不純物 (NanoStep 実験ではリゾチーム分子のダイマー) が成長を阻害するからである。図 19 にそのモデルを示した[40]。

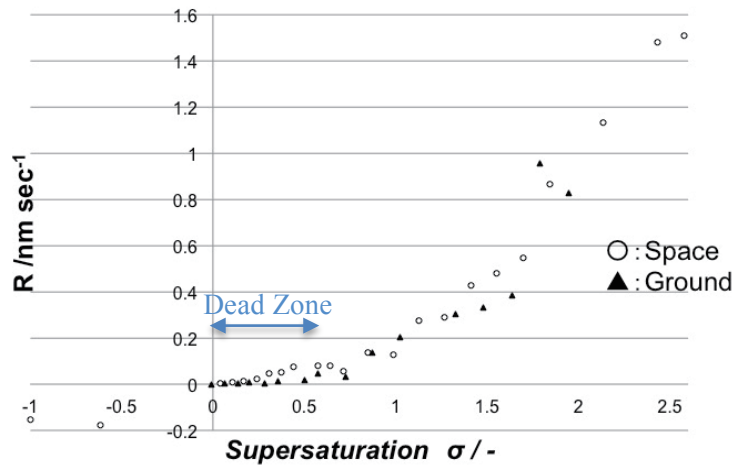


図 18 1G と μG での成長速度比較。同じ過飽和度ならば微小重力のほうが結晶は速く成長する。

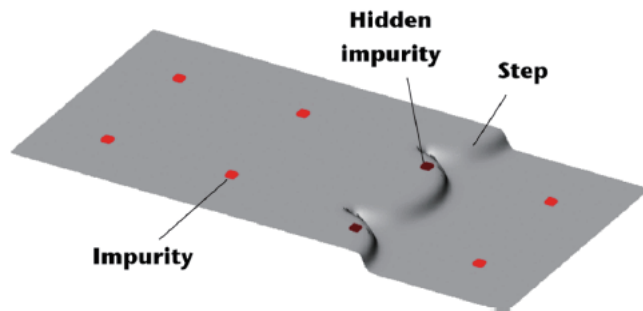


図 19 不純物による成長ステップの進行阻害(pinning model)。分子ステップは左から右に進むことで積み重なり結晶面が成長する。過飽和度が大きくなるとステップは不純物の間をすり抜ける。

ところが、微小重力では同じ純度の溶液をつかっても dead zone が現れない。これは、微小重力のほうが結晶表面に付着する不純物が少ないことを示している。この結論については、後ほど別の立場からも

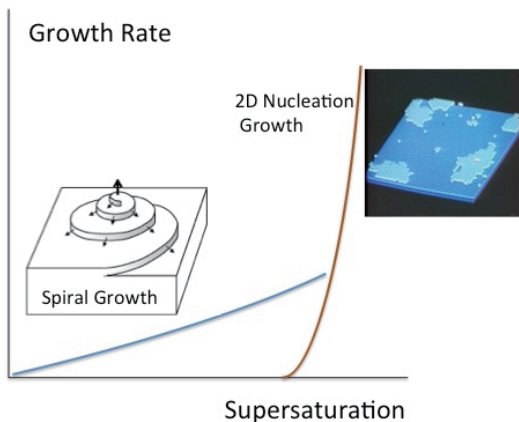


図 20 2D 成長モデルによる成長速度 vs 過飽和度の違い。低過飽和度ではらせん成長、高過飽和度では2次元核形成による成長が一般的。仕方がある。

考察することにする。なお、微小重力での不純物の影響は Suzuki et al.により詳しく調べられた。

もう一点重要なことは、地上では $\sigma > 2$ 以上では溶液中に多数の微結晶が発生し成長速度が測れない。しかし、微小重力ではこの微結晶の発生が抑えられる。

4.4. 成長メカニズムの違い

結晶の成長メカニズムを解析するには成長速度の過飽和度依存性を詳しく調べる必要がある[16, 37, 41]。その関係を図 20 に模式的に示した。ただ、その速度差はわずかであるので成長モデルに応じて様々なプロットの

(1) 高過飽和度での2D 核形成による成長

Liu et al.らは2次元核形成による成長を一般化した[42]。それによると、結晶面の成長速度、R は、

$$R = C_1 \sigma^{5/6} \delta^{1/3} \exp\left(-\frac{C_2 f}{T^2 \sigma}\right), \text{ ここで } C_2 = \frac{\Omega \gamma_{sf}^2 \pi h}{3k_B^2}$$

をおこない直線の関係が得られれば、このモデルが妥当である。またその傾きより γ_{sf} 、表面自由

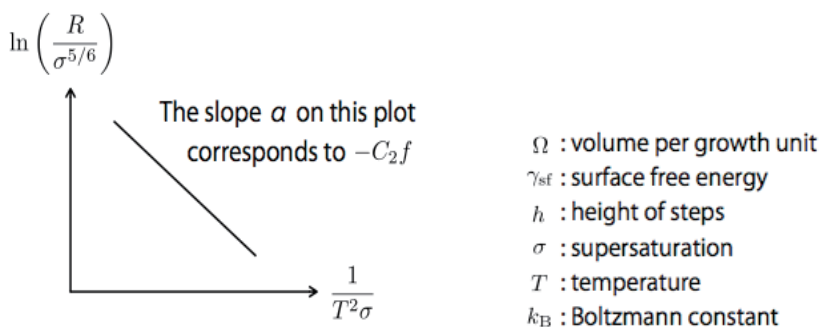


図 21 2D 核形成モデル。直線の傾きより表面自由エネルギーが求まる。

エネルギーが求められる。温度依存性を考慮して三浦らは図 22 を得た。このオレンジ色の破線の傾きより、 $\sim 0.8 \text{ mJ/m}^2$ の表面自由エネルギーが得られる。

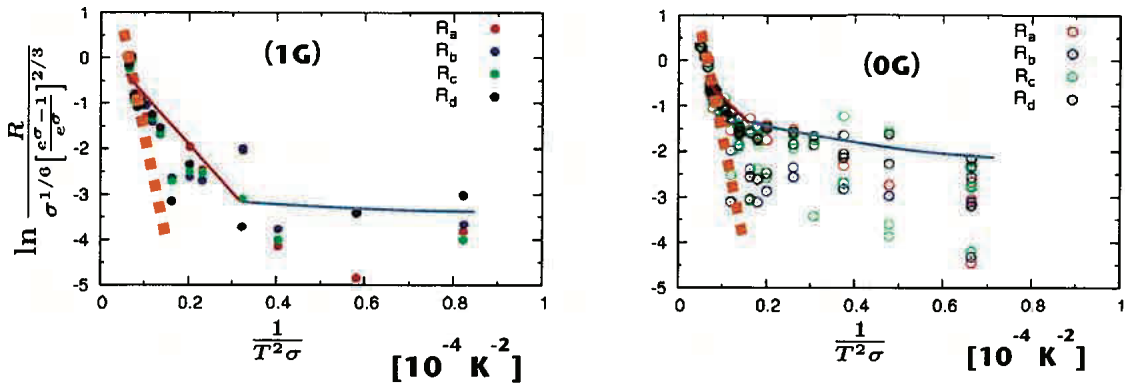


図 22 図 21 に温度依存性をいれて速度の過飽和度依存性を調べた。1G と0G での核形成の違い。破線:均質核形成、赤実線:不均質核形成、グレー実線:らせん成長。

Liu ら[43]によると、2D 核形成は不純物や壁面の助けなく理想的に核形成する均質核形成 (homogeneous nucleation) と、これらの不均質物の助けを得て核形成する不均質核形成 (heterogeneous nucleation) に区別できる。実際 Suzuki らの解析でも2種類の傾きが得られる。それと同様に図 22 でも2種類の傾きが得られる。さらに低い過飽和度では結晶はらせん成長する。このらせん成長については次に詳しく述べる。

図 22 のらせん成長領域での重力環境の違いによる成長速度をくわしく調べるために、違う成長丘からの速度の過飽和度依存性を調べたのが図 23 である。BCF のらせん成長モデルより破線の曲線が得られる。

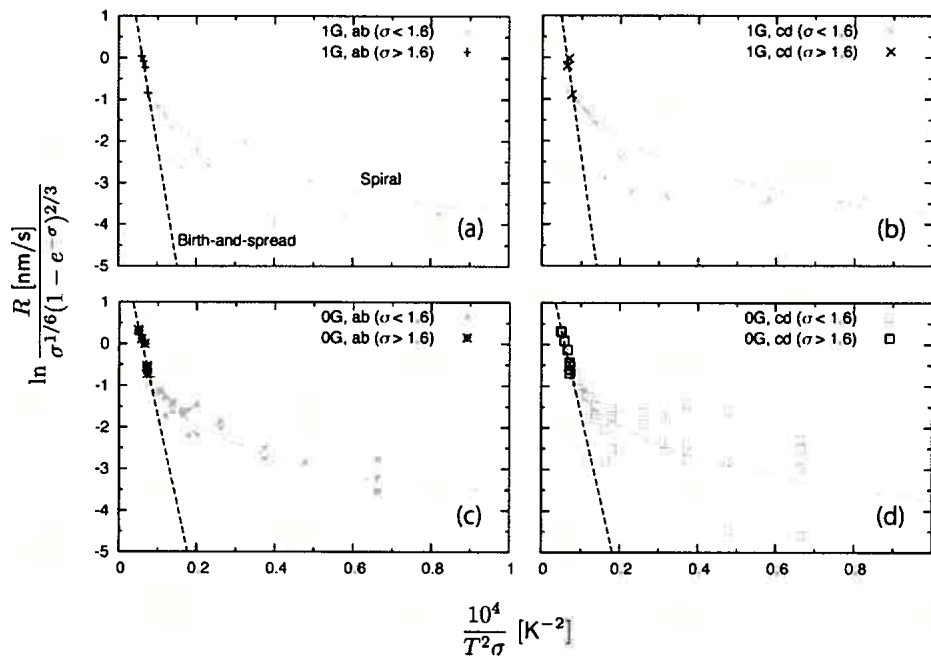


図 23 低飽和度での成長速度の重力依存性。らせん成長は薄い曲線。この領域でも 1G 下での成長速度は遅い。

(2) 成長メカニズムと結晶の完全性

成長メカニズムと結晶の完全性が密接に関連することを示そう。図 24 は (110)面の成長の様子

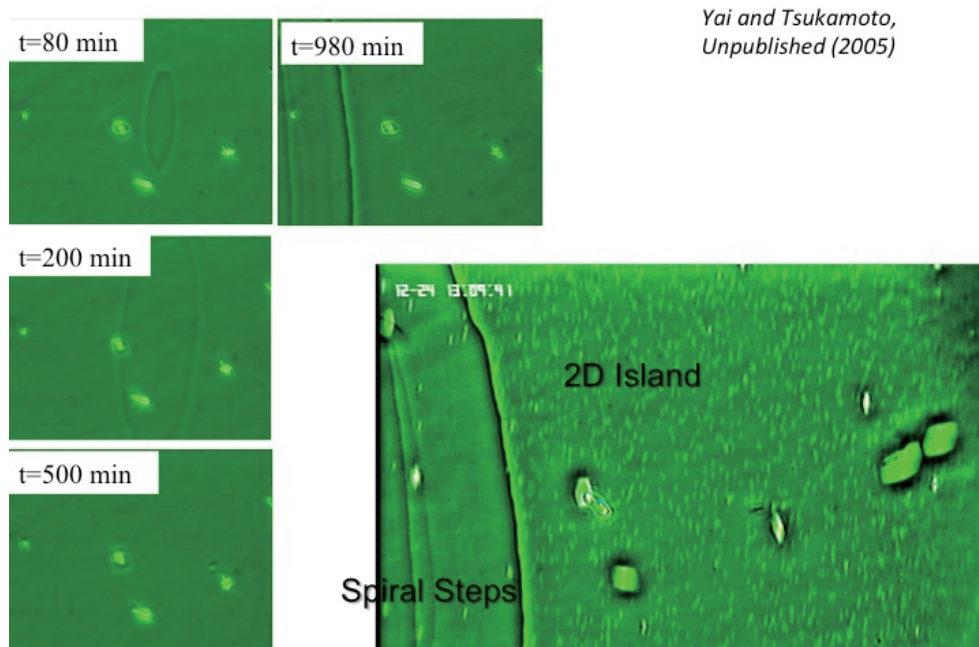


図 24 微細欠陥の形成はらせん成長では皆無。右は僅かな溶解後のシャローエッチピットの分布。位相差顕微鏡。

を位相差顕微鏡(ナノメートルの高さのステップを観察できる)で連続的に調べた写真である。500分までは表面は2次元テラスが広がることで平坦になる。その後、左のほうから、らせんステップが表面を覆うようになり、980分後には左の1/3程度がらせんステップで覆われている。つまり、右は2次元核形成によって形成された領域、左はらせん成長によって形成された領域である。その後、温度をわずかに上昇させ、わずかに成長表面を溶解させる。その結果を図の右下に示した。2D Islandの領域では浅い(一分子程度の深さ)小さなエッチピットが無数できる。それに対して、左のspiral stepの領域ではエッチピットはできない。これは、2D核形成成長では多数の微細欠陥が取り込まれていること示している。このエッチピット数と不純物のダイマー数とは正の相関があることがわかっているので、らせん成長メカニズムで結晶成長させたほうが微細欠陥がとりこまれにくく完全性の良い結晶ができる事を示唆している¹[44]。それを積極的に利用した最近の研究[45]もある。

4.5. 成長ステップの形状

¹ 微細欠陥が晶のモザイク構造の形成を助長していると考えている。

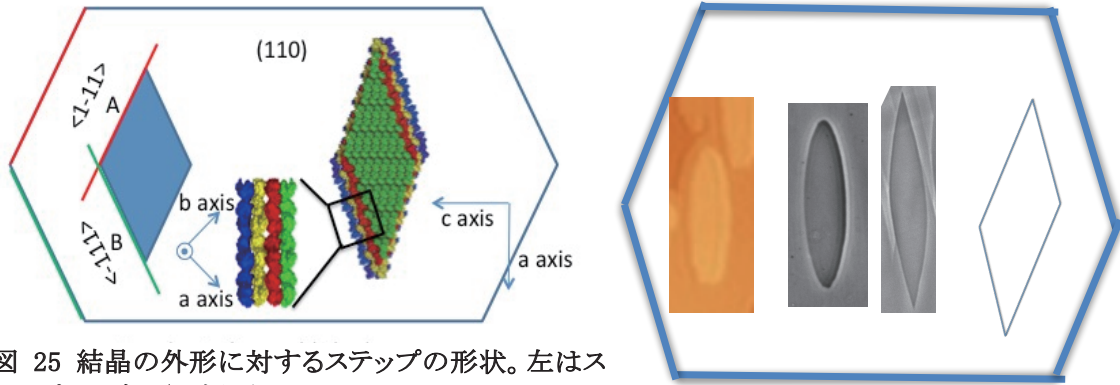


図 25 結晶の外形に対するステップの形状。左はステップの理想形、本同ら 2017。

結晶成長のメカニズムの研究方法として、結晶表面の成長パターンを調べる方法がある。最近では AFM や位相シフト干渉計などにより単分子ステップステップの観察が容易にできるようになっている[2, 46, 47]。結晶の形態と同様に、ステップの形状は結晶構造から導くことができる[48]。しかし、リ

図 26 (110)面に見られる2次元ステップの形態。右が理想形であるが地上では観察例がなかった。

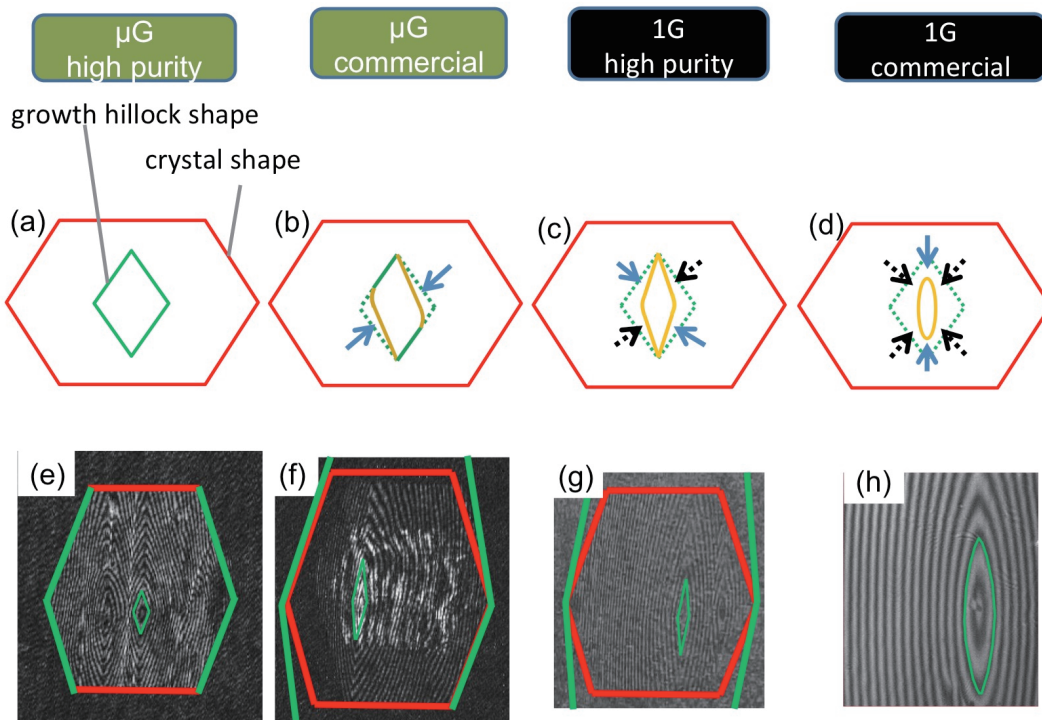


図 27 重力環境と不純物濃度の違いによる2次元ステップの形状変化。NanoStep 実験で初めて理想形が現れた。これも表面での不純物効果が減少した効果。

ゾチーム結晶の(110)面の2次元島の形態は不思議であったが理解されてなかった。結晶構造から期待できるステップの形状は本同らによって研究された、図 25。しかし、現実の表面に見られる形は違っている(図 26)。

この地上実験の結果を μG 実験の結果の比較することは興味がある。図 27 に、1G での結果と併せて形の変化を示した。はたして、この理想的なステップの形態は、今回の宇宙実験で初めて見ることができた。ステップの形態変化はステップフロントに吸着する不純物によるものと一般に考えられる NanoStep 実験での成長速度の解析から不純物効果が μG では減少することを示した。この理想的なステップの μG での出現は、速度論から得られた結論を別の立場から強くサポートする。同じ溶液純度ならば、過飽和度が高いほど理想的な形状に近づくというデータデータも得られている。これも不純物効果として考えると辻褃があう。

4.6. 成長丘の傾斜と成長速度

BCF のらせん成長モデル[17, 37, 49]では、らせんステップ間隔は、

$$y_0 = 19r_c = \frac{\gamma\Omega}{\Delta\mu}$$

で表せる。よって成長丘の傾きは、 $p = \frac{h}{y_0} = \frac{h\Delta\mu}{\gamma\Omega}$ となり、過飽和度依存性をプロットすると原点を通るは

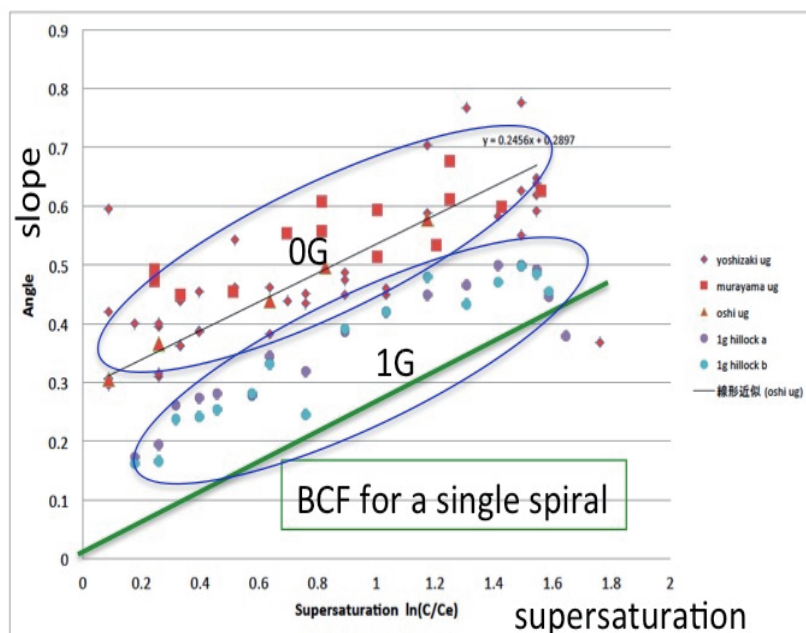


図 28 成長丘の傾き傾き、 p の過飽和度依存性。原点を通る直線は BCF モデルから。 μG では特に原点からはずれる。

ずである。しかし、NanoStep で得られたデータをプロットすると図 28 が得られ、BCF の予想と異なる。これはラセン転位が狭い範囲で競合してらせん成長丘をつくるときに見られる。Bennema[17]によると、競合する転位がつくる傾きは、

$$p = \frac{h\Delta\mu}{19\Omega\alpha + 2L\Delta\mu}$$

となる。ここで、L は転位間の距離である(図 28[50])。これは原点を通らない式である。 $\Omega = 2.7 \times 10^{-26} \text{ m}^3$ 、 $\alpha = 0.6 \text{ mJ/m}^2$ とすると $2L > 750 \text{ nm}$ となる。このことは 1 μm ϕ 領域に 1-2 本の転位が存在することを示している。

現実の結晶成長では、転位が一本から成長することは皆無である。実際らせん成長丘のセンター付近を偏光顕微鏡やエッチング法によって調べてみると[51]この結論通りである²。このように成長速度を測定することで転位密度まで予測できることは大変興味深い。地上実験に比べて、なぜ成長にかかわる転位の密度が大きくなるかは未解決である。しかし、この関係も含めて成長と完全性の X 線トポグラフによる研究も進められている[12, 52]。

4.7. 微小重力の功罪

無機塩では結晶をつくる時には必ず流れをつける。一方、タンパク質結晶では流れは禁物と言われてきた。しかし、最近で成長中に流れをつけたほうが良質な結晶が育ち X 線回折での分解能もあがるという報告もある[53]。一方、流れは微細欠陥の原因となる不純物を結晶に取り込む働きがある。そのために、流れのない微小重力実験が有効であるというのも、本研究の結



図 29 複数の転位による競合。

論の一つである。この無重力の功罪についての最近の考

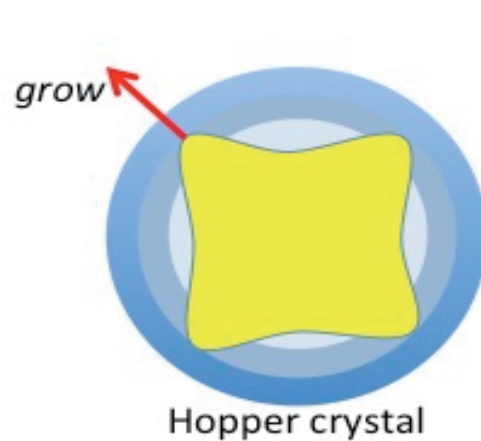


図 30 Berg 効果。角が高濃度なので結晶中央が凹む。

については文献[54]を参考にしていきたい。

² X 線トポグラフでは解像度がないために一本に見える転位でも、光学観察すると複数の束であることが多い。成長中心に対応するラセン転位は多数の刃状転位と共存する。

ここでは、結晶周囲の濃度分布について考察しよう。無機塩で流れをつけて成長させる大きな理由は、結晶界面濃度を均一にするためである。流れがないと、Berg 効果と言われる濃度の不均質ができる(図

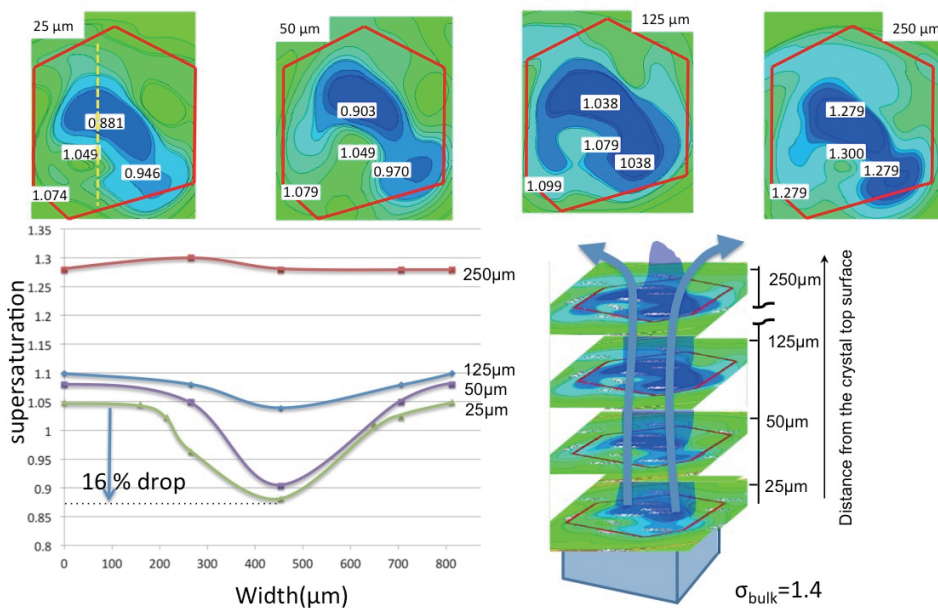


図 31 1G 下で成長しているリゾチーム結晶周囲と表面での過飽和度過飽和度分布。8 方向の MZ 干渉図を CT の原理で解析。

CT 法で3次元濃度解析したのが図 31 である。グラフから分かるように結晶面中央では過飽和度が 16% も落ちている[55]。そのために、結晶は中央部が凹んだ骸晶となりやすく、中央部に包有物や欠陥が多数発生する。

30)。

微小重力でのリゾチーム結晶周囲の濃度分布は図 10 に示したように対流や流れがないために容易に求めることができる。それに対して重力下での濃度分布は3次的に複雑である。比較対照実験として 1G 下で濃度分布をするために MZ 干渉計で 8 方向から干渉図形を得て

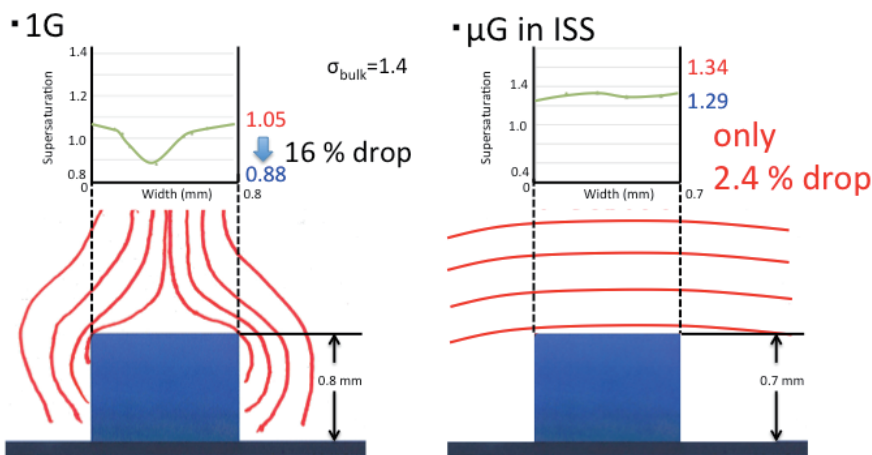


図 32 1G と μG での結晶周囲の濃度分布。

この結果を NanoStep 実験での結果と比較してみた(図 32)[55]。μG では結晶中央部での過飽和度の低下は 2.4%であるのに対して、1G では 16%も低下する。この濃度勾配を流れで少なくするのは、粘性の高いタンパク質溶液では容易でないだろう。仮に可能だとしても、かなりの流速が必要

になり、不純物が結晶に取り込みやすくなったり、微結晶が発生したりして結晶の完全性は低下するであろう。

中性子回折に必要な数ミリ大の良質な結晶をつくるには、対流を抑えた無重力環境は不向きかもしれない。それは、無重力で大きな結晶をつくらうとすると結晶面にそった濃度勾配が大きくなりすぎ結晶形態の安定性[56]が損なわれるからである。

4.8. 完全性の高いリゾチーム結晶をつくるには

結晶に不純物(ダイマー)を取り込まず結晶の完全性を低下させる微細欠陥をつくらないようにするには、結晶をらせん成長させれば良い。地上でも良質なタンパク質結晶をつくることできるが、その過飽和

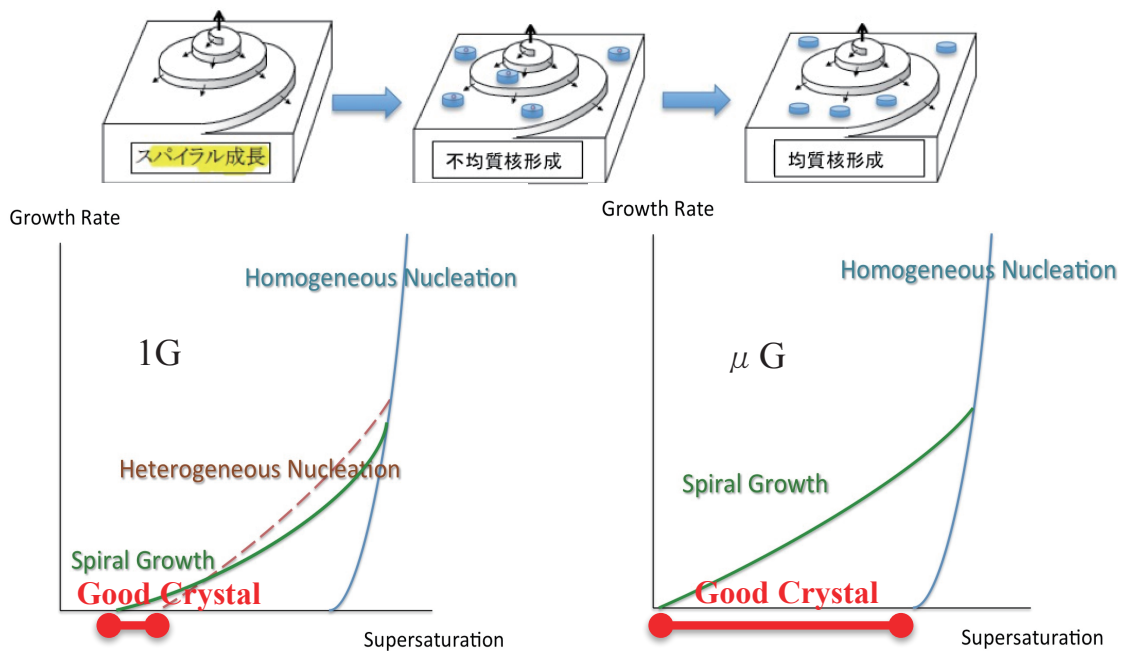


図 33 良い結晶をつくるには？ らせん成長領域で結晶を育てる。

度条件は不均質核形成のために狭い(図 32)。

結晶周囲の濃度条件としては、結晶から濃度対流の発生を防ぐことが必要である。例えば、ゲル法[57]、あるいは、天地を逆にして成長させる方法[58]などがある。ただ、この二つの条件を同時に長時間満足させる必要がある。また、結晶サイズが大きくなると形態安定性の検討が必要となつてこよう。

4.9. その他の注目点

興味深いのは、 $\sigma = 0.8$ 前後では成長速度の散らばりが大きいことである(図 11)。この条件では他の多形(組成は同じであるが構造が違う)が析出することが知られている。そのために、溶液物性や構造が不安定で成長速度が散らばるのかもしれない。いずれにせよ、この観察は μG の擾乱の少ない静かな環境で初めて測定されたものである。したがって、この過飽和溶液で何が起きているかを知りたくなる。そのためにも溶液の TEM による“その場”観察などの新しい手法も興味深い[59, 60]。

4.10. 国際的なレベルでの位置付け、関連科学分野・分野外学術・技術領域、また、社会生活への成果活用や波及効果

結晶成長の“その場”観察は本研究代表者が世界をリードしている領域である。特に、宇宙実験に干渉計などの高精度な光学系をもちこんだのは 2000 年、2004 年に TR-1A 小型ロケット実験が初めてである。その後、NASA や ESA が類似の光学実験を行ったが実験は成功していない。燃焼、流体などの宇宙実験に干渉計を使うケースが増えてきたが、全てこの TR-1A 実験の成功のあとである。

タンパク質の結晶化による構造解析が製薬や医学に多大な貢献をすることは明白である。この結晶化を宇宙だけに頼っていることは、たとえ良質な結晶ができるとしても無理がある。そのために、なぜ、宇宙環境では良質な結晶ができるのかを、基礎研究として見極めることは意義があろう。その知識でもって今度は地上で成長させることが出来るからである。最近、極小の結晶でも構造解析ができるようになった。しかし、中性子回折には大きな結晶が必要であり、本研究のような基礎研究も必要である。

海外の研究にどう影響を与えたかは、Olivier Minster (ESA の物理化学部門のヘッド) のレターに詳しいので末尾に添付する。

4.11. 成果の意義

地上と同じ精度で宇宙での速度測定や結晶表面観察ができた最初の例である。これにより、何が宇宙と地上では違うのかがメカニズムの点で明らかになり、未知の環境での結晶成長や完全性の予測が可能となった。現在、小泉ら[12, 52, 61]が中心となって、結晶成長の完全性と構造解析での分解能を支配する要因が放射光をつかって精力的に調べられている。これによると、完全性のよい結晶は必ずしも分解能がよいとも限らなさそうである。また、木村ら[59]によって、TEM 内でのタンパク質結晶のナノメートルサイズからの結晶化が調べられるようになってきている。これらは、直接構造解析につながるものではない。しかし、結晶化が不可能とされているタンパク質が多数残っている現在、基礎研究からのアプローチも重要と考えている。

4.12. サクセスクライテリア

- (1) 運用上のサクセスクライテリアは全て達成。なんのトラブルもなく予定回数以上の実験がスムーズに行われた。軌道上での振動の干渉縞への影響は画像データの移動平均をリアルタイムでとることで解決した。◎
- (2) サイエンスクライテリア: 計画書に記載されていた予定されていた全ての計測、観察は早期に完了した。NanoStep 実験は“その場”観察実験であり、“その場”解析実験でもある。それのためのソフトウェアを新規に開発して、速度計測のための干渉測定実験を行いながら、同時に速度の解析を実施した。成長速度は結晶表面の状態、特に、成長ステップ密度により変化する。従って、表面状態をモニターしながら(例えば、ステップ密度、新たならせん成長丘の出現や、ステップ同士の

干渉など)常に正確な条件での実験を実施することができた。これは“その場”データ解析が可能となったからである。結果的には、地上の最良の実験よりもより精密な実験データが得られたことは特筆でき、ISS は結晶成長研究にとって素晴らしい実験室であることも実証できた。これは微小重力では環境の変動が少ないためでもあるが、この変動のなかのわずかな変化を捉えることができる宇宙用の“その場”観察装置を開発できた結果でもある。◎

5. 結語

ISS・きぼう利用ミッション「NanoStep」により、以下の新たな成果が得られた。

- (1) これまでの”宇宙の常識“と違い、微小重力でのほうが結晶の成長は速いことが証明された。
- (2) 不純物の影響は微小重力では激減し結晶の完全性が増すメカニズムが明らかになった (Self-purification)。
- (3) 結晶がらせん成長すると結晶の完全性は良くなることが分かった。したがって、らせん成長できる過飽和領域が広い微小重力のほうが良質結晶を得ることができやすい。ただ、その狭い領域を地上で有効に利用する方法を見いだす研究が必要である。
- (4) 最純度のタンパク試薬を使っても、地上の実験では不純物効果は残る。
- (5) 2D、3D 核形成は微小重力で抑制されるために欠陥の発生を抑えることになる。
- (6) 中性子回折用の大型結晶では、欠陥を減らすために流れをつけて結晶形態を安定化させることも必要であろうことが濃度場の比較測定から推測できる。
- (7) 成長ステップの形状の成長環境依存性と不純物濃度依存性の観察は重要。今では、成長ステップの形態を見ることで、宇宙で出来たものか、不純物濃度がどの程度なのか、不純物の種類が複数あるあるのかが推察できるようになった。
- (8) 結晶のセクターごとの結晶の完全性とX線構造解析における分解能の関連は継続して研究中である。

参考文献:

- [1] K. Tsukamoto, In Situ observation of mono-molecular growth steps on crystals growing in aqueous solution. I, *Journal of Crystal Growth*, 61 (1983) 199-209.
- [2] K. Tsukamoto, In-situ observation of crystal growth and the mechanism, *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 62 (2016) 111-125.
- [3] K. Tsukamoto, In situ observation of crystal growth from solution, *Faraday Discussions*, 95 (1993) 183-189.
- [4] 塚本勝男, 溶液からの成長のその場観察, 「宇宙基地利用基礎実験費」研究成果報告書(宇宙科学研究所), (1995) 219-220.
- [5] 塚本勝男, リアルタイム位相シフト干渉法による溶液成長界面の動的観察, *応用物理*, 63 (1994) 713-720.
- [6] 塚本勝男, 無重力での結晶成長”その場”観察による研究
Int. J. Microgravity Sci. Appl. Vol. 31 No. 3 2014 (115–123), *JASMA*, 31 (2014) 115-123.
- [7] K. Tsukamoto, Application of Hoffman modulation contrast microscopy coupled with three-wavelength two-beam interferometry to the in situ direct observation of the growth process of a crystal in microgravity, *NASA Conference Publication*, 2438 (1987) 89-98.
- [8] K. Tsukamoto, In situ observation of mono-molecular growth steps on aqueous solution grown crystals and the transport of molecules to the crystals, in: *NASA Conference Publication*, 1986, pp. 233-238.
- [9] T. Yamazaki, K. Tsukamoto, I. Yoshizaki, S. Fukuyama, H. Miura, T. Shimaoka, T. Maki, K. Oshi, Y. Kimura, L. W., J. C., Development of compartment for studies on the growth of protein crystals in space, *Review of Scientific Instruments*, 87 (2016) 033107.
- [10] 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).
- [11] 塚本勝男, 横山悦郎, 圓山重直, 真岩幸司, 清水健司, 原田匡, 依田真一, 川崎晴夫, 無転位結晶の微小重力場での結晶成長メカニズム-TR-1A-#4実験結果, *日本マイクログラビティ応用学会誌*, 13 (1996) 332.
- [12] H. Koizumi, M. Tachibana, I. Yoshizaki, S. Fukuyama, K. Tsukamoto, Y. Suzuki, S. Uda, K. Kojima, Dislocations in High-Quality Glucose Isomerase Crystals Grown from Seed Crystals, *Crystal Growth & Design*, 14 (2014) 5111-5116.
- [13] W. Pan, J. Xu, K. Tsukamoto, M. Koizumi, T. Yamazaki, R. Zhou, A. Li, Y. Fu, Crystal Growth of Hen Egg-White Lysozyme (HEWL) under Various Gravity Conditions, *Journal of*

Crystal Growth, 377 (2013) 43-50.

[14] E. Petrova, P. Dold, K. Tsukamoto, Growth of tetragonal lysozyme crystals from solutions containing NaCl, CsCl and NaNO₃, Journal of Crystal Growth, 304 (2007) 141-149.

[15] A. McPherson, L.J. DeLucas, Microgravity protein crystallization, Npj Microgravity, 1 (2015) 15010.

[16] P. Bennema, The importance of surface diffusion for crystal growth from solution, Journal of Crystal Growth, 5 (1969) 29-43.

[17] P. Bennema, Analysis of crystal growth models for slightly supersaturated solutions, Journal of Crystal Growth, 1 (1967) 278-286.

[18] I. Sunagawa, Crystals: Growth, Morphology, & Perfection, (2011).

[19] H. Miura, K. Tsukamoto, Role of impurity on growth hysteresis and oscillatory growth of crystals, Crystal Growth and Design, 13 (2013) 3588-3595.

[20] I. Sunagawa, K. Tsukamoto, K. Maiwa, K. Onuma, Growth and perfection of crystals from aqueous solution: Case studies on barium nitrate and K-alum, Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials, 30 (1995) 153-190.

[21] I. Sunagawa, K. Tsukamoto, T. Yasuda, Surface Microtopographic and X-ray Topographic Study of Octahedral Crystals of Natural Diamond from Siberia, in: I. Sunagawa (Ed.) Materials Science of Earth's Interior, Terra Pub, 1984, pp. 331-349.

[22] I. Sunagawa, P. Bennema, Observations of the influence of stress fields on the shape of growth and dissolution spirals, Journal of Crystal Growth, 53 (1981) 490-504.

[23] I. Sunagawa, K. Tsukamoto, Growth spirals on NaCl and KCl crystals grown from solution phase, Journal of Crystal Growth, 15 (1972) 73-78.

[24] I. Sunagawa, Step height of spirals of natural hematite crystals, Am. Min., 46 (1961) 1216-1226.

[25] W.C. Pan, J. Xu, K. Tsukamoto, M. Koizumi, T. Yamazaki, R. Zhou, A. Li, Y.Y. Fu, Crystal Growth of Hen Egg-White Lysozyme (HEWL) under Various Gravity Conditions, Journal of Crystal Growth, 377 (2013) 43-50.

[26] W. Pan, H. Xu, R. Zhang, J. Xu, K. Tsukamoto, J. Han, A. Li, The influence of low frequency of external electric field on nucleation enhancement of hen egg-white lysozyme (HEWL), Journal of Crystal Growth, 428 (2015) 35-39.

[27] Y. Iimura, I. Yoshizaki, S. Yoda, H. Komatsu, Development of an Embedding Method for Analyzing the Impurity Distribution in Protein Crystals, Crystal Growth & Design, 5 (2005) 295-300.

- [28] 塚本勝男, 微小重力でのタンパク質結晶成長速度, 日本マイクログラビティ応用学会誌, 29 (2012) 106-110.
- [29] 塚本勝男, タンパク質結晶成長の”その場”観察, シーエムシー出版, 2013.
- [30] 西村良浩, 塚本勝男, 友部俊之, 上田晃, 結晶成長・溶解速度のレーザー・マイケルソン干渉計による精密測定の問題点, 日本マイクログラビティ応用学会誌, 21 (2005) 170-173.
- [31] 塚本勝男, 西村良浩, 横山悦郎, 微小重力での結晶成長”その場”観察, 可視化情報, 25 (2005) 8-15.
- [32] 塚本勝男, 宇宙でも使われるリアルタイム位相シフト干渉計, 応用光学, 2 (2002) 1-4.
- [33] 塚本勝男, リアルタイム位相シフト法による結晶成長観察技術の研究, 科学技術振興調整費, 短時間微小重力場を利用した材料生成に関する基盤技術開発(平成 7 年度~8 年度)成果報告書, (1998) 160-169.
- [34] K. Tsukamoto, C. Li, H. Kobatake, T. Maki, In Situ Observation of Crystal Growth in Microgravity, J. Jpn. Soc. Microgravity Appl., 18 (2001) 190-196.
- [35] K. Tsukamoto, K. Onuma, S. Maruyama, K. Shimizu, T. Irisawa, Y. Furukawa, S. Yoda, In Situ Observation of Crystal Growth from Solution in Microgravity, J. Jpn. Soc. Microgravity Appl., 11 (1994) 58-70.
- [36] H.E. King, H. Satoh, K. Tsukamoto, A. Putnis, Nanoscale observations of magnesite growth in chloride- and sulfate-rich solutions, Environmental Science and Technology, 47 (2013) 8684-8691.
- [37] P. Bennema, Interpretation of the relation between the rate of crystal growth from solution and the relative supersaturation at low supersaturation, Journal of Crystal Growth, 1 (1967) 287-292.
- [38] K. Maiwa, K. Tsukamoto, I. Sunagawa, Activities of spiral growth hillocks on the (111) faces of barium nitrate crystals growing in an aqueous solution, Journal of Crystal Growth, 102 (1990) 43-53.
- [39] T. Fujiwara, Y. Suzuki, I. Yoshizaki, K. Tsukamoto, K. Murayama, S. Fukuyama, K. Hosokawa, K. Oshi, D. Ito, T. Yamazaki, M. Tachibana, H. Miura, Correction of the equilibrium temperature caused by slight evaporation of water in protein crystal growth cells during long-term space experiments at International Space Station, The Review of scientific instruments, 86 (2015) 083704.
- [40] H. Miura, Phase-Field Modeling of Step Dynamics on Growing Crystal Surface: Step Pinning Induced by Impurities, Crystal Growth & Design, 15 (2015) 4142-4148.
- [41] P. Bennema, J.P.V.D. Eerden, W.J.P.V. Enkevort, B.V.D. Hoek, K. Tsukamoto, Observation

- and Interpretation of Spirals for Spiral Growth from the Liquid State, *Phys. stat. sol.*, (a) 55 (1979) 403-413.
- [42] X.Y. Liu, K. Maiwa, K. Tsukamoto, Heterogeneous two-dimensional nucleation and growth kinetics, *The Journal of Chemical Physics*, 106 (1997) 1870-1879.
- [43] X.Y. Liu, K. Maiwa, K. Tsukamoto, Heterogeneous two-dimensional nucleation and growth kinetics, *J. Chem. Phys.*, 106 (1997) 1870-1879.
- [44] Tsukamoto, Katsuo; Tachibana, Masaru; Irisawa, Toshiharu; Okutsu, Tetsuo; Waizumi, Kenji; Nishimura, Yoshihiro; Yoshizaki, Izumi; Sazaki, Gen, Report from the WG of dependence of growth condition on the perfection of protein crystals, *Space Utilization Research: Proceedings of the Twenty-third Space Utilization Symposium*, 23 (2007) 12-15.
- [45] Y. Tominaga, M. Maruyama, M. Yoshimura, H. Koizumi, M. Tachibana, S. Sugiyama, H. Adachi, K. Tsukamoto, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, H.Y. Yoshikawa, Y. Mori, Promotion of protein crystal growth by actively switching crystal growth mode via femtosecond laser ablation, *Nat Photon*, 10 (2016) 723-726.
- [46] J.J. De Yoreo, P.U.P.A. Gilbert, N.A.J.M. Sommerdijk, R.L. Penn, S. Whitelam, D. Joester, H. Zhang, J.D. Rimer, A. Navrotsky, J.F. Banfield, A.F. Wallace, F.M. Michel, F.C. Meldrum, H. Cölfen, P.M. Dove, Crystallization by particle attachment in synthetic, biogenic, and geologic environments, *Science*, 349 (2015).
- [47] G. Sazaki, M. Okada, T. Matsui, T. Watanabe, H. Higuchi, K. Tsukamoto, K. Nakajima, Single-molecule visualization of diffusion at the solution-crystal interface, *Crystal Growth and Design*, 8 (2008) 2024-2031.
- [48] P. Bennema, H. Meekes, S.X.M. Boerrigter, H.M. Cuppen, M.A. Deij, J. van Eupen, P. Verwer, E. Vlieg, *Crystal Growth and Morphology: New Developments in an Integrated Hartman – Perdok Connected Net Roughening Transition Theory, Supported by Computer Simulations*, *Crystal Growth & Design*, 4 (2004) 905-913.
- [49] W.K. Burton, N. Cabrera, F.C. Frank, The Growth of Crystals and the Equilibrium Structure of their Surfaces, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 243 (1951) 299-358.
- [50] H. Miura, R. Kobayashi, Phase-Field Modeling of Step Dynamics on Growing Crystal Surface: Direct Integration of Growth Units to Step Front, *Crystal Growth & Design*, 15 (2015) 2165-2175.
- [51] G. Sazaki, K. Tsukamoto, S. Yai, M. Okada, K. Nakajima, In situ observation of dislocations in protein crystals during growth by advanced optical microscopy, *Crystal Growth & Design*, 5

(2005) 1729-1735.

[52] H. Koizumi, R. Suzuki, M. Tachibana, K. Tsukamoto, I. Yoshizaki, S. Fukuyama, Y. Suzuki, S. Uda, K. Kojima, Importance of Determination of Crystal Quality in Protein Crystals when Performing High-Resolution Structural Analysis, *Crystal Growth & Design*, 16 (2016) 4905-4909.

[53] M. Maruyama, H. Kawahara, G. Sasaki, S. Maki, Y. Takahashi, H.Y. Yoshikawa, S. Sugiyama, H. Adachi, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami, Y. Mori, Effects of a Forced Solution Flow on the Step Advancement on {110} Faces of Tetragonal Lysozyme Crystals: Direct Visualization of Individual Steps under a Forced Solution Flow, *Crystal Growth & Design*, 12 (2012) 2856-2863.

[54] K. Tsukamoto, e. al, Do we need microrgravity to improve the diffracton properties of protein crystals?, *JASMA*, 34(1) (2017) 1-7.

[55] 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.

[56] R.F. Sekerka, Role of instabilities in determination of the shapes of growing crystals, *Journal of Crystal Growth*, 128 (1993) 1-12.

[57] F. Otálora, J.A. Gavira, J.D. Ng, J.M. García-Ruiz, Counterdiffusion methods applied to protein crystallization, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 101 (2009) 26-37.

[58] A. Adawy, E.G.G. van der Heijden, J. Hekelaar, W.J.P. van Enkevort, W.J. de Grip, E. Vlieg, A Comparative Study of Impurity Effects on Protein Crystallization: Diffusive versus Convective Crystal Growth, *Crystal Growth & Design*, 15 (2015) 1150-1159.

[59] T. Yamazaki, Y. Kimura, P.G. Vekilov, E. Furukawa, M. Shirai, H. Matsumoto, A.E.S. Van Driessche, K. Tsukamoto, Two types of amorphous protein particles facilitate crystal nucleation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (2017).

[60] Y. Kimura, H. Niinomi, K. Tsukamoto, J.M. Garcia-Ruiz, In situ live observation of nucleation and dissolution of sodium chlorate nanoparticles by transmission electron microscopy, *Journal of the American Chemical Society*, 136 (2014) 1762-1765.

[61] H. Koizumi, H. Kawamoto, M. Tachibana, K. Kojima, Effect of intracrystalline water on micro-Vickers hardness in tetragonal hen egg-white lysozyme single crystals, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 41 (2008) 074019.

[成果リスト]

1. 論文発表(予備実験、実験成果)[IF: impact factor]:

- [1] K. Tsukamoto, e. al, Do we need microgravity to improve the diffraction properties of protein crystals?, *JASMA*, 34(1) (2017) 1-7.
- [2] T. Yamazaki, Y. Kimura, P.G. Vekilov, E. Furukawa, M. Shirai, H. Matsumoto, A.E.S. Van Driessche, K. Tsukamoto, Two types of amorphous protein particles facilitate crystal nucleation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (2017). [IF:9.423]
- [3] K. Tsukamoto, In-situ observation of crystal growth and the mechanism, *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 62 (2016) 111-125. [IF:4.75]
- [4] H. Koizumi, R. Suzuki, M. Tachibana, K. Tsukamoto, I. Yoshizaki, S. Fukuyama, Y. Suzuki, S. Uda, K. Kojima, Importance of Determination of Crystal Quality in Protein Crystals when Performing High-Resolution Structural Analysis, *Crystal Growth & Design*, 16 (2016) 4905-4909. [IF:4.425]
- [5] Y. Tominaga, M. Maruyama, M. Yoshimura, H. Koizumi, M. Tachibana, S. Sugiyama, H. Adachi, K. Tsukamoto, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, H.Y. Yoshikawa, Y. Mori, Promotion of protein crystal growth by actively switching crystal growth mode via femtosecond laser ablation, *Nature Photonics*, 10 (2016) 723-726. [IF:31.167]
- [6] T. Yamazaki, K. Tsukamoto, I. Yoshizaki, S. Fukuyama, H. Miura, T. Shimaoka, T. Maki, K. Oshi, Y. Kimura, L. W., J. C., Development of compartment for studies on the growth of protein crystals in space, *Review of Scientific Instruments*, 87 (2016) 033107. [IF:1.336]
- [7] K. Tsukamoto, In Situ Observation of Crystal Growth and Flows by Optical Techniques, in: T. Nishinaga (Ed.) *Handbook of Crystal Growth (Second Edition)*, Elsevier, Boston, 2015, pp. 1031-1060.
- [8] Y. Suzuki, K. Tsukamoto, I. Yoshizaki, H. Miura, T. Fujiwara, First Direct Observation of Impurity Effects on the Growth Rate of Tetragonal Lysozyme Crystals under Microgravity as Measured by Interferometry, *Crystal Growth & Design*, 15 (2015) 4787-4794. [IF: 4.425]
- [9] W. Pan, H. Xu, R. Zhang, J. Xu, K. Tsukamoto, J. Han, A. Li, The influence of low frequency of external electric field on nucleation enhancement of hen egg-white lysozyme (HEWL), *Journal of Crystal Growth*, 428 (2015) 35-39. [IF:1.462]
- [10] T. Fujiwara, Y. Suzuki, I. Yoshizaki, K. Tsukamoto, K. Murayama, S. Fukuyama, K. Hosokawa, K. Oshi, D. Ito, T. Yamazaki, M. Tachibana, H. Miura, Correction of the equilibrium temperature caused by slight evaporation of water in protein crystal growth cells during long-term space experiments at International Space Station, *The Review of scientific instruments*, 86 (2015) 083704. [IF:1.336]

- [11] Y. Kimura, H. Niinomi, K. Tsukamoto, J.M. Garcia-Ruiz, In situ live observation of nucleation and dissolution of sodium chlorate nanoparticles by transmission electron microscopy, *Journal of the American Chemical Society*, 136 (2014) 1762-1765. [IF:13.038]
- [12] H. Niinomi, A. Horio, S. Harada, T. Ujihara, H. Miura, Y. Kimura, K. Tsukamoto, Solubility Measurement of a Metastable Achiral Crystal of Sodium Chlorate in Solution Growth, *Journal of Crystal Growth*, 394 (2014) 106-111. [IF:1.462]
- [13] Y. Araki, K. Tsukamoto, R. Takagi, T. Miyashita, N. Oyabu, K. Kobayashi, H. Yamada, Direct Observation of the Influence of Additives on Calcite Hydration by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy, *Crystal Growth & Design*, 14 (2014) 6254-6260. [IF: 4.425]
- [14] H. Koizumi, M. Tachibana, I. Yoshizaki, S. Fukuyama, K. Tsukamoto, Y. Suzuki, S. Uda, K. Kojima, Dislocations in High-Quality Glucose Isomerase Crystals Grown from Seed Crystals, *Crystal Growth & Design*, 14 (2014) 5111-5116. [IF: 4.425]
- [15] H. Niinomi, H. Miura, Y. Kimura, M. Uwaha, H. Katsuno, S. Harada, T. Ujihara, K. Tsukamoto, Emergence and Amplification of Chirality via Achiral–Chiral Polymorphic Transformation in Sodium Chlorate Solution Growth, *Crystal Growth & Design*, 14 (2014) 3596-3602. [IF: 4.425]
- [16] E. King Helen, H. Satoh, K. Tsukamoto, A. Putnis, Surface-specific measurements of olivine dissolution by phase-shift interferometry, in: *American Mineralogist*, 2014, pp. 377. [IF: 1.918]
- [17] 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. [IF: 0.908]
- [18] H. Miura, R. Kobayashi, Phase-Field Modeling of Step Dynamics on Growing Crystal Surface: Direct Integration of Growth Units to Step Front, *Crystal Growth & Design*, 15 (2015) 2165-2175. [IF:4.425]
- [19] H. Niinomi, A. Horio, S. Harada, T. Ujihara, H. Miura, Y. Kimura, K. Tsukamoto, Solubility Measurement of a Metastable Achiral Crystal of Sodium Chlorate in Solution Growth, *Journal of Crystal Growth*, (2014). [IF: 1.462]
- [20] H. Miura, K. Tsukamoto, Role of impurity on growth hysteresis and oscillatory growth of crystals, *Crystal Growth and Design*, 13 (2013) 3588-3595. [IF: 4.425]
- [21] W. Pan, J. Xu, K. Tsukamoto, M. Koizumi, T. Yamazaki, R. Zhou, A. Li, Y. Fu, Crystal Growth of Hen Egg-White Lysozyme (HEWL) under Various Gravity Conditions, *Journal of Crystal Growth*, 377 (2013) 43-50. [IF: 1.462]
- [22] S. Ueta, H. Satoh, H. Kato, A. Ueda, K. Tsukamoto, A novel technique of in situ phase-shift interferometry applied for faint dissolution of bulky montmorillonite in alkaline solution, *Journal of*

Nuclear Science and Technology, 50 (2013) 731-741. [IF: 1.201]

[24] Y. Araki, K. Tsukamoto, N. Oyabu, K. Kobayashi, H. Yamada, Atomic-Resolution Imaging of Aragonite (001) Surface in Water by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy, Japanese Journal of Applied Physics, 51 (2012) 08KB09. [IF: 1.122]

[25] G. Sazaki, A.E.S. Van Driessche, G. Dai, M. Okada, T.A. Matsui, F. Otálora, K. Tsukamoto, K. Nakajima, In situ observation of elementary growth processes of protein crystals by advanced optical microscopy, Protein and Peptide Letters, 19 (2012) 743-760.

[26] G. Sazaki, A.E.S. Van Driessche, G.L. Dai, M. Okada, T. Matsui, F. Otalora, K. Tsukamoto, K. Nakajima, In Situ Observation of Elementary Growth Processes of Protein Crystals by Advanced Optical Microscopy, Protein and Peptide Letters, 19 (2012) 743-760. [IF: 1.994]

[27] A. Srivastava, K. Tsukamoto, K. Murayama, Single lens-based schlieren microscope for investigation of three-dimensional buoyancy-induced convective flow fields, Journal of Flow Visualization and Image Processing, 18 (2011) 347-369. [IF: 0.44]

[28] A.E.S. Van Driessche, J.M. García-Ruiz, K. Tsukamoto, L.D. Patiño-Lopez, H. Satoh, Ultraslow growth rates of giant gypsum crystals, Proceedings of the National Academy of Sciences, 108 (2011) 15721-15726. [IF:9.423]

[30] Y. Kimura, H. Miura, K. Tsukamoto, C. Li, T. Maki, Interferometric in-situ observation during nucleation and growth of WO₃ nanocrystals in vapor phase, Journal of Crystal Growth, 316 (2011) 196-200. [IF:1.462]

[31] H. Miura, Phase-Field Modeling of Step Dynamics on Growing Crystal Surface: Step Pinning Induced by Impurities, Crystal Growth & Design, 15 (2015) 4142-4148. [IF:4.425]

2. 主な国際会議での宇宙実験に関する招待講演:

- ① Plenary: ICCGE-17 (Warsaw): In-situ Observation of Crystal Growth in Space and on the Earth, 2013.8
- ② Annual Lecture: British Association for Crystal Growth 2014.7.
- ③ Invited Lecture: American Association for Crystal Growth 2015.8.

3. 外部資金:

科研費: 基盤研究 A、B、萌芽的研究、基盤研究 C
共同研究費(名古屋大学)(厦門大学)(杭州大学)(JAXA)
COE(東北大学)、GCOE(東北大学)

4. 主な受賞:

- ① 結晶成長国際連合より”フランク賞”の授与、「地球および宇宙での結晶成長その場観察による研究」2013.8 ワルシャワ。
- ② 日本結晶成長学会より”赤崎勇賞”および“功績賞”の授与 2014.8、名古屋。
- ③ “CGCT Distinguished Explorer Award 2011”, ICMAT-2011 (International Conference on Materials for Advanced Technologies, Singapore, Jun 26-Jul 1, 2011).

5. パブリシティ

- ・ 横浜サイエンススクールでの宇宙実験に関する特別授業 2010.7.2
- ・ 仙台でのサイエンスカフェ 2011.4.23
- ・ 河北新報での随筆の連載:「プリズム」宇宙の常識、宇宙では速くなる等、全 16 回 2013.1～
- ・ 河北新報での随筆の連載:「科学の泉」結晶の成長 全 6 回 2013.8「宮城の新聞」での連載 <http://shinbun.fan-miyagi.jp/feature/tsukamoto/>:全 11 回 2013.3
- ・ その他、予備実験などは NHK ニュース9など

ESA UNCLASSIFIED - For Official Use

**estec**

European Space Research
and Technology Centre
Keplerlaan 1
2201 AZ Noordwijk
The Netherlands
T +31 (0)71 565 6565
F +31 (0)71 565 6040
www.esa.int

Dr. Katsuo Tsukamoto
Department of Earth and Planetary
Materials Science Graduate School
of Science,
Tohoku University
Aramaki, Aoba, 980-8578, Sendai,
Japan

Our ref.

HRE/UP/2017-02/OM

Noordwijk, 15/02/2017

Subject: JAXA's NANOSTEP experiment and the cooperative project PROTEIN

Dear Doctor Tsukamoto,

We wish to congratulate on the outstanding results that were obtained with the NANOSTEP experiment. These have cast a unique light on the influence of gravity on the crystallisation of biological macromolecules and beautifully complimented precursor results obtained by your group in Sendai on the cooperative flight of ESA's GCF facility on a FOTON capsule.

Contrary to the usual speculative claim of structural biologists involved in growing macromolecules' crystals in space, in-situ measurements in NANOSTEP demonstrated that in fact, crystals grow faster in space than they do on the ground. This unexpected results has comforted a new type of analysis of the questions on the relation between the growth conditions of crystals and the resulting quality of these crystals and in particular on the intricate role that unavoidable impurities play in the process. Answering these fundamental questions can lead to the optimisation or new design of ground-based techniques employed in structural biology and in a number of other applications.

Furthermore, truly pertinent questions concerning the relevance of growing crystals in space for structural biology purposes have finally been raised. Answering these questions may lead to identifying criteria that predict the benefit, or not, of growing crystals in space.

The seminal work of the Sendai group on optical measurement methods to investigate crystal growth kinetics has therefore had a profound influence on which scientific questions are now at hand, as well as on which scientific questions experiments in space can answer.

European Space Agency
Agence spatiale européenne

ESA UNCLASSIFIED - For Official Use



The scope of the cooperative project PROTEIN that involves scientists from Japan, Europe and the US builds to the largest extent on the remarkable scientific progress enabled by the world leading work of your group in Sendai and on the performances of the NANOSTEP instrument in space.

We are even more happy to hear that NANOSTEP-II will be flying within this year because we have high confidence that next week, a firmly positive decision will be made by our Programme Board on the development of the facility COLLOID SOLIDS that will enable complementary measurements by light scattering of the nucleation step that precedes the growth phase that your instrument is able to diagnose.

In this way this cooperative project will properly document still poorly understood key steps of protein crystallisation and the excellent coordination that your team in Japan and the other scientists in Europe and the US have actively maintained will undoubtedly yield together some ground-breaking scientific results.

We congratulate again for this major scientific step forward and look forward to supporting further the cooperation with the team you represent.

Sincerely

A handwritten signature in blue ink that reads 'O Minster'.

Dr. Olivier Minster
Physical Sciences Unit Head
Science Department
Human Spaceflight and Robotic Exploration Directorate

cc.:

Prof. D. Maes, V.U. Brussels, coordinator of the cooperative PROTEIN project
Dr. M. Braibanti, ESA Science Coordinator for Soft Matter Physics