

ISS・きぼう利用ミッション
「生体高分子の関与する氷結晶成長—自励振動成長機構の解明(Ice Crystal 2)」
研究成果報告書

代表研究者: 古川義純(北海道大学名誉教授)

平成29年2月

1. 緒言

結晶成長における不純物(添加物)の効果は、結晶の核形成、成長形や結晶成長カインेटクスに多大の影響を与え、その機構を探るために多くの研究が行われてきた。さらに、不純物を加えることで結晶の形状やサイズを精密に制御することも可能で、製薬を始め工業的にもさまざまな分野でこの技術が利用されている。近年では、生体内の結晶成長の仕組みを活用したバイオ・クリスタリゼーションの技術が注目され、有機物質や生体高分子を不純物として使った場合の結晶成長に対する効果が課題となっている。しかしながら、未だ結晶成長に対する不純物効果には不明な点も多く、現在もなお結晶成長学の先端的な研究分野の一つとなっている。

我々は、純水中や不純物を含む過冷却水中で氷結晶の成長実験を行い、不純物の界面濃度や拡散、成長速度、結晶界面でのパターン発展に対する不純物効果を解析してきた[1、2]。その結果、樹枝状成長における周期的な先端分裂、界面の形態不安定発生における対称性の破れ[3-5]、KCl などの無機物を不純物とする系での一方向成長において観察される指状パターン間隔の周期変動[3-8]など、さまざまな現象についてのメカニズムを議論してきた。さらに、過冷却水中での円盤氷結晶の界面不安定化モデルの構築、成長界面前方での不純物の拡散場と形態不安定化の関連、それらをもとにした形態不安定化理論の検証など多くの成果をあげてきた。特に、過冷却純水中での氷結晶の自由成長における形態不安定化の問題は、国際宇宙ステーションによる科学実験の一次選定テーマとして採択され、2008-2009 年にかけて宇宙実験を実施した。この実験では、対流の無い理想的な結晶成長環境で得られる結晶成長基礎データが取得でき、結晶成長のカインेटクス効果を考慮した新しい形態不安定化の理論モデルが提案されるなど、多大の成果を上げた[9-12]。

一方、氷の結晶成長に対する不純物効果として、極限環境の一つである氷点下の温度条件で生体の凍結を防ぐ機能を持つ凍結抑制タンパク質の存在が近年話題となっている[13-15]。このタンパク質は、いわゆる溶質によるモル凝固点降下を使うのではなく、氷結晶の核形成や成長を制御するという非平衡効果により、水を過冷却状態で保つことができるもので、医療、食品、蓄熱をはじめとして多くの産業分野での活用が期待されている。このようなことから、このタンパク質が不純物として作用した場合に、氷の結晶成長に対してどのような効果を与えるのかは喫緊の研究課題であり、多くの研究者が参画するようになってきた。2013 年からは 2 年ごとに、このタンパク質に関する専門の国際会議が開催されるようになるなど、世界的な研究の機運も高まっている。さらにこの課題は、無機物質の代表である氷結晶の成長を生体高分子であるタンパク質が制御するという系であるため、まさにバイオ・クリスタリゼーションの基本概念と一致するという点も重要な点である。

このような背景のもとに、代表研究者らもかなり早い段階でこの問題に気づき、凍結抑制タンパク質を含む過冷却水中での氷結晶の成長実験を様々な手法で行い、成果を上げてきた。特に、凍結抑制タンパク質を含むバルクの過冷却水中での氷結晶の自由成長の実験は、これまで本格的に行われたことがなく、多くの興味深い現象が見出された。例えば、結晶外形が過冷却度やタンパク質濃度で変化すること、このタンパク質の氷界面への吸着が結晶成長を阻害すること、タンパク質が氷界面に吸着するときその二次構造が変化するらしいこと、成長速度は一定ではなく変動するらしいことなど、が明らかになってきた[16-19]。しかし、一方で地上の重力下で実験を行う場合は、結晶の周囲に発生する自然対流の効果を避けることができないため、結晶成長速度の測定などを行ってもその確かさを担保するのが困難という問題に直面していた。特に、不純物を含む系での結晶成

長では、成長する結晶の周囲には温度拡散場と不純物の濃度拡散場が共存して存在する。両者とも温度や濃度によって密度が変化するため対流を引き起こす要因となるので、結晶周囲での自然対流の動きは純水中での氷結晶成長のような熱拡散場だけの系に比べてより複雑なものとなる。したがって、対流などの擾乱が排除される微小重力環境において、氷結晶の自由成長実験を実施し、結晶成長界面の詳細な観察や成長速度の測定を行うことが、重要かつ有効な研究手段となる。このような観点により、2007 年に「平成19年度「きぼう」船内実験室第2期利用に向けた候補テーマ」の一件として本課題が採択され、宇宙実験を実施する機会が与えられた。

2. 研究計画

2. 1 研究目標

結晶成長における不純物(添加物)の効果は、結晶の核形成、成長形や結晶成長カイネティクスに多大の影響を与える。結晶成長に対する不純物の効果の主眼は、成長界面に吸着した不純物分子が成長ステップの移動をピン留めするため、吸着界面の面成長速度が抑制されることと一般に理解されている[20-22]。また近年では、界面への不純物分子の吸着量と成長速度との関係の非線形性から、駆動力が上昇する場合と低下する場合で成長速度に対する応答が異なる(ヒステリシス)効果が存在することが実験的にも証明され、これが成長速度の周期的変動(振動)を引き起こす可能性が指摘されるようになっている[23-26]。このような効果は、数年前から数理科学的なモデル化の研究対象となり、成長速度の振動現象に対する理論的な説明がなされるようになってきた[27]。しかし、ここで行なわれている議論は、主に溶液成長における系で無機物質の結晶成長に対する無機物質の不純物が添加された場合に限定され、不純物分子の吸着により結晶成長速度は必ず低下することを前提としている[28]。このような議論は、鉱物結晶などの断面に観察される縞々模様や人工結晶の断面で観察される周期模様などの成因を議論する上で有効に活用されると考えられる。

これに対し、本課題では過冷却水での氷結晶の自由成長を取り扱う。過冷却水には、凍結抑制タンパク質の中で最も典型的なものである不凍糖タンパク質(Antifreeze Glycoprotein、以降 AFGP と表示)を不純物として添加する。この系は、結晶成長に対する不純物効果として通常扱われる溶液成長の系とは異なり、融液からの結晶成長であることに注意が必要であるが、結晶成長に対する不純物効果としては両者で共通に考えることができる。

AFGP を含む過冷却水から成長する氷結晶では、結晶の成長形が過冷却度やタンパク質濃度に強く依存すること、プリズム面では荒れた界面がスムーズな界面へと変化する(カイネティックスムージング)こと、逆にベースル面では平ら(スムーズ)な界面から荒れた(ラフ)界面へと変化する(カイネティックラフニング)こと、結晶成長速度が面方位によって抑制される場合や促進される場合があるなど効果が異方的であること、氷の結晶成長速度が周期的に変動することなど、興味深い現象が見出されている。このような特徴は、不純物として低分子量の無機物質を含む場合の挙動とは、まったく異なる。

一方、地上の重力環境下で実験を行う限り、結晶成長に伴って結晶周囲に発生する自然対流の効果を排除することは困難である。特に、結晶の周囲には、成長に伴う潜熱の排除によって生じる熱拡散場と AFGP の物質拡散場が生じる。したがって、結晶周囲には温度分布に伴う密度分布と AFGP 濃度分布に伴う密度分布が相乗して生じることになるので、これに起因する対流はより複雑なものとなる。このため、地上実験では不純物効果により結晶の成長速度が成長時間に対してどのように変動するのかを正しく評価することは困難であり、そのような報告はなされていない。このような状況は、結晶成長に対する不純物効果のメカニズムを解明する上での障害となっている。この障害を排除し、成長速度の時間変動を精密に測定するには、重力の効果を排除した微小重力環境の利用が不可欠である。さらに、航空機実験や落下塔、ロケットのパラボリック飛行で得られる微小重力環境は数秒から数分の長さであり、結晶成長速度の時間変動を測定する実験には十分ではない。このような理由により、長時間にわたり微小重力環境を実現できる国際宇宙ステーションなどの宇宙飛翔体を用いた実験

が絶対的に必要である。

本課題では、国際宇宙ステーション日本実験棟「きぼう」において、AFGP を不純物として含む過冷却水中で氷の単結晶を自由成長させ、結晶の面成長速度の時間変動を精密測定する。これにより、氷の結晶成長カイネティクスに対する AFGP の効果を明らかにするとともに、氷点下という極限寒冷環境に住む生体の凍結抑制戦略の物理的な機構を解明する。

2.2 体制

研究チーム：

古川義純・北海道大学低温科学研究所・名誉教授・研究の立案、実験装置の設計、実験実施、取りまとめ
中坪俊一・北海道大学低温科学研究所・技術職員・実験装置の設計、製作
佐崎元・北海道大学低温科学研究所・教授・実験実施、解析
長嶋剣・北海道大学低温科学研究所・助教・実験実施、解析
村田憲一郎・北海道大学低温科学研究所・助教・実験実施、解析
麻川明俊・北海道大学低温科学研究所・博士研究員・実験実施、解析（現・山口大学工学部・助教）
Salvador Zepeda・北海道大学低温科学研究所・博士研究員・装置開発、地上参照実験（現・CCZ Crystal R&D）
横山悦郎・学習院大学計算機センター・教授・実験データ解析、モデル構築
小川直久・北海道科学大学・教授・モデルの構築
灘浩樹・産業技術総合研究所・主任研究員・計算機シミュレーション

JAXA 支援体制：

田丸晴香・JAXA・宇宙実験の取りまとめ、宇宙実験実施
吉崎泉・JAXA・宇宙実験の取りまとめ、宇宙実験実施
島岡太郎・JSF・宇宙実験装置の開発と予備実験、宇宙実験実施
曾根武彦・JAMSS・宇宙実験の管理、予備実験、宇宙実験実施

研究チーム・JAXA の体制の評価

研究チームは、北海道大学低温科学研究所の研究者を中心に、結晶成長学及び氷物理学分野で日本を代表する研究者で構成されている。実験、理論、装置開発を専門とする研究者で構成され、本研究課題を実行する上で考え得る最強の布陣となっている。一方、JAXA 側研究者の役割は、装置開発、予備実験の実施、及び宇宙実験の実施に関する支援であった。特に、宇宙実験装置の開発では、大学が独自で開発した部分とメーカー担当の部分とが共存する形をとったことから、JAXA による両者の調整作業が重要な役割を果たした。本実験のために開発した供試体は、後述するように多くの新規開発要素が含まれていたが、JAXA の調整作業により順調に進み、最終的に大変優れた性能を持つ装置の開発に結びついた。

また、宇宙実験は、JAXA 研究者・技術者による全面的かつ強力な支援体制のもとで実施された。本実験は、実験開始直後からさまざまなトラブルが発生し、実験の中止も議論されるほどの困難な事態にも直面した。しかし、JAXA チームの適切な対応によりこれらのトラブルを乗り越えることができ、最終的に当初予定の100回を上回る124回の実験を実施することができた。

本課題の宇宙実験では、その準備段階から実験実施段階に至るまで、多くの課題に直面することとなり、全体としては、実現することが困難な実験であったと言える。その過程において、本節に記載された方々はもちろん、記載できなかった多くの協力者の真摯な貢献があったことが、問題を解決に導き、実験の成功をもたらした。

2.3 スケジュール

2008 年 2 月 22 日 平成19年度「きぼう」船内実験室第2期利用に向けた候補テーマとして採択

2009年8月1日 氷結晶成長装置(Ice Crystal Cell 2:ICC2)の開発開始

2013年8月4日 HTV こうのとりの4号に搭載し、種子島宇宙センターから打ち上げ

2013年8月19日 ICC2を溶液結晶化観察装置(Solution Crystallization Observation Facility:SCOF)に取り付け。実験実施の準備が完了した。

2013年8月22日 第1回目に実験開始。宇宙において氷結晶が正常に成長することを確認した。さらに、氷の結晶成長の様子を位相差顕微鏡とマイケルソン干渉顕微鏡で同時に観察することができることを確認した。

2013年8月26日 ICC2で核形成セルの冷却ができないトラブルが発生。実験を中断。

2013年9月10日 宇宙飛行士により、ICC2をSCOFから一旦取り外して、導通テストなどのトラブルシューティングを実施した。その結果、ICC2には特に異常は認められず正常であることが確認された。トラブルの原因として、SCOF側の電源供給系に異常があるものと推定された。対策として、異常のあった電源供給系ではない他の系から電源を取ることとなり、これに対応するための新しいケーブルを作成し、打ち上げることとした。

2013年11月7日 若田宇宙飛行士の搭乗したロシア宇宙船に新たに作成したケーブルを搭載して打ち上げ。

2013年11月18日 実験を再開。核形成セルの冷却が正常に行えることを確認したが、一方で氷の結晶成長を観察する光学系に異常が確認された。すなわち、マイケルソン干渉顕微鏡からの画像は予定通り取得されるが、位相差顕微鏡からの画像のコントラストが異常に弱く、画像取得が困難となった。これを解消するための対策を検討したが、光学系のため有効な解決策はなく、最終的に位相差画像の同時取得は断念せざるを得ないこととなった。電源系のトラブルが発生する前には光学系は正常であったことが確認されているため、電源系のトラブルシューティングの過程で何らかの問題が発生したものと考えられるが、ICC2は回収されていないので原因の解明は不可能である。

2014年3月19日 再び電源系のトラブルが発生し、核形成セルの冷却ができなくなる。このトラブル解消のため、さらに別系統からの電源供給を可能とするケーブルを打ち上げることとなった。

2014年3月31日 ケーブルの再打ち上げ。

2014年4月30日 ケーブルを取り付け、実験を再開した。

2014年6月23日 実験終了。ここまで、当初予定の実験回数100回を超える124回の実験を実施した。氷結晶の成長は、124回の実験の全部で観察された。そのうち、22回の実験で氷結晶成長界面からの反射光によって生じた干渉縞の観察に成功した。本装置による氷結晶生成の確率は100%であり、そのうち18%で干渉縞の観察に成功したことになる。この確率は、実験制御の困難さを鑑みると十分に高いものと言え、ICC2の性能の高さを実証した。一方、計画では装置打ち上げ後、実験終了まで約3ヶ月間を予定していたが、トラブルが続出したため実際には10ヶ月以上を要した。AFGP水溶液の寿命については、事前に1年程度は問題ないことを確認していたので、影響はなかったと考えられる。

3. 実験準備・運用

3.1 氷結晶成長装置の開発

3.1.1 氷結晶成長装置

本研究の目標を達成させるために、SCOFのステージに搭載できる供試体を新たに設計・製作した。この装置は、氷結晶成長装置(Ice Crystal Cell 2、ICC2)と呼ばれる(図1参照)。本装置は、氷結晶を成長させる球状成長セル(Spherical Growth Cell、SGC)と、成長する氷結晶を観察し画像を取得する観察光学系の2つの部分で構成されている。前者は、北海道大学低温科学研究所技術部、後者はオリンパス株式会社で設計・製作された。特に、前者は大学の技術部が宇宙実験装置を作成するという初めての試みであったが、結果的に質の高い高度な装置を完成することができたことを強調したい。次節以降で、装置の詳細について説明する。

3.1.2 球状成長セル(Spherical Growth Cell:SGC)の開発

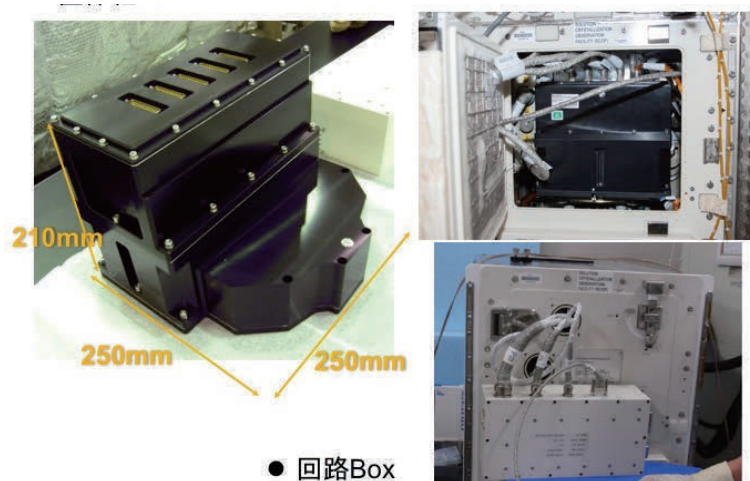


図1 (a)開発された氷結晶成長装置 ICC2 の外観写真。(b)ICC2 を SCOF に搭載した写真。(c)SCOF のステージに収まらなかった電気回路は、別ボックスとして SCOF の扉の外側に設置された。

氷結晶を成長させるための SGC の開発は、北海道大学低温科学研究所技術部において行われた。氷結晶の自由成長を実現するための装置の概念図を図2に示す。銅ブロックをくり抜き、内部に直径40mm の球形の成長容器を作る。容器の内壁は、氷の核形成を防ぐためにコーティングが施されている。この容器の中心部まで、ガラスの毛細管が差し込まれていて、その先端部で氷の単結晶を成長させることができる。成長容器には、実験試料となる AFGP を含む水(今後、AFGP 水溶液と呼ぶ)が充填される。冷却により所定の過冷却温度が達成されると、毛細管の外部の先端部を急冷する。毛細管内で氷結晶が核形成され、毛細管の内部を成長する。その過程で結晶粒の間で淘汰が起こり、最終的に一個の結晶粒が生き残り、これが毛細管の他端に到達すると成長容器内で氷結晶の自由成長が開始する。毛細管内の成長では他の結晶粒より少しでも前に出たもの(毛

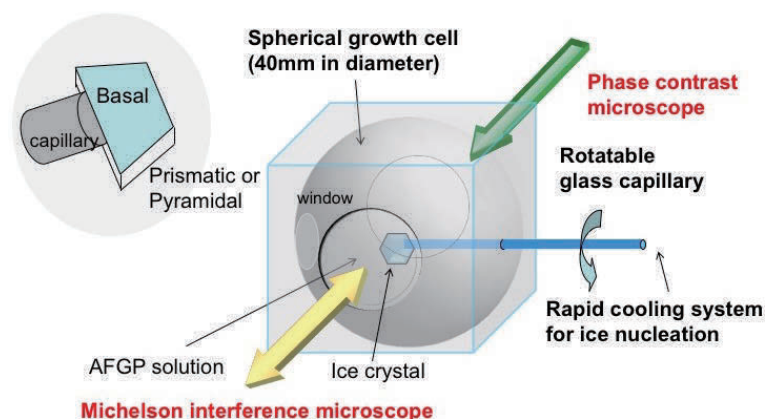


図2 SGC の基本概念。銅ブロックの中に球形(直径40mm)の穴を開け、結晶成長の容器とした。その中に、ガラス毛細管が球形容器の中心部まで差し込んであり、その先端で氷結晶を成長させる。毛細管は、その軸の周りで回転させることができ、観察光軸に対し、結晶の向きを変えることができる。

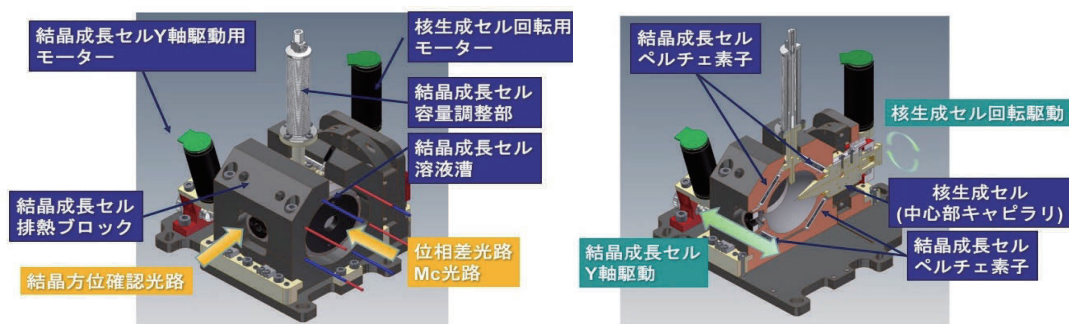


図3 (a)開発されたSGCの3次元外観図。(b)SGCの断面図。

項目		主な仕様	設計のポイント
結晶成長セル	温度制御	-3 ~ 25°C	冷却性能の向上
	位置制御	Y軸方向駆動(cmd制御)	排熱性の確保 高精度の駆動
核形成セル	内部形状	キャピラリ	核発生確率の向上
	温度制御	-18 ~ 25°C	冷却性能の向上
	位置制御	回転駆動(cmd制御)	排熱性の確保 気密性 高精度の駆動

図4 SGCの仕様のまとめ。

細管の軸方向により速い成長速度を持つ結晶粒)が他の結晶を淘汰するので、最終的に生き残る結晶粒は結晶のc軸が毛細管の軸に直交する可能性が高い。自由成長を開始した結晶は、成長容器に取り付けられたガラス窓から顕微鏡で観察される。この時、顕微鏡の光軸と結晶の軸の方位を合致させるために、毛細管はその軸の周りで回転させる必要がある。

開発したSGCの外観及び断面図を図3に示す。装置の中心部に位置する球形の結晶成長セルは、周囲に設置されたペルチエ素子で冷却される。また、

毛細管は、核形成セル(Ice Nucleation Cell、INC)の中心部に置かれており、組み込まれたペルチエ素子により、核生成に必要な急冷を実現している。さらに、毛細管をその軸周りに±45度の角度で回転を可能とする機構が組み込まれている。結晶成長の様子は、球形セルの側面に取り付けられたガラス窓から観察される。後述のマイケルソン干渉顕微鏡と位相差顕微鏡の共通光路は、球状セルの正面に設置されている。また、毛細管の先端で成長する氷結晶を、毛細管の軸方向から観察するための光学系も設置されている。これにより、結晶の回転角の推定が可能である。さらに、観察系のフォーカスを合わせるためにSGCを光軸に沿って平行移動させる機構も組み込まれた。これらの機構は、地上からの自動制御を可能とするため、ステッピングモーターで駆動させる。

本装置の開発において、最も困難を極めたのは核形成セルの開発であった。SCOFでは、装置からの排熱はステージへの伝導によって行われるため、回転系を含む核形成セルからの排熱を十分に確保するための工夫が必要であった。本実験では、反射型の干渉計を使用するために、ガラス毛細管の先端で生成した氷結晶の向きを回転により変更できるようにする必要がある。また、結晶の方位を±90度の範囲で回転できれば理想的であるが、これを実現することは装置の構造上困難であるため、本装置では±45度の範囲で回転を可能にした。SGC開発において生じた様々な困難は、文献(中坪俊一、北海道大学低温科学研究所技術部技術報告書第22号、47-50、2015。http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/tech/report_2016/tech_report2016.pdf)にまとめられている。開発されたSGCの最終的な仕様は、図4にまとめられている。この仕様により、氷結晶の成長を遠隔制御により可能とする十分な性能を達成した。

3. 1. 3 観察光学系の開発

結晶成長セル中で生成される氷結晶を観察し、成長速度の精密測定を可能にするための光学系が新たに設

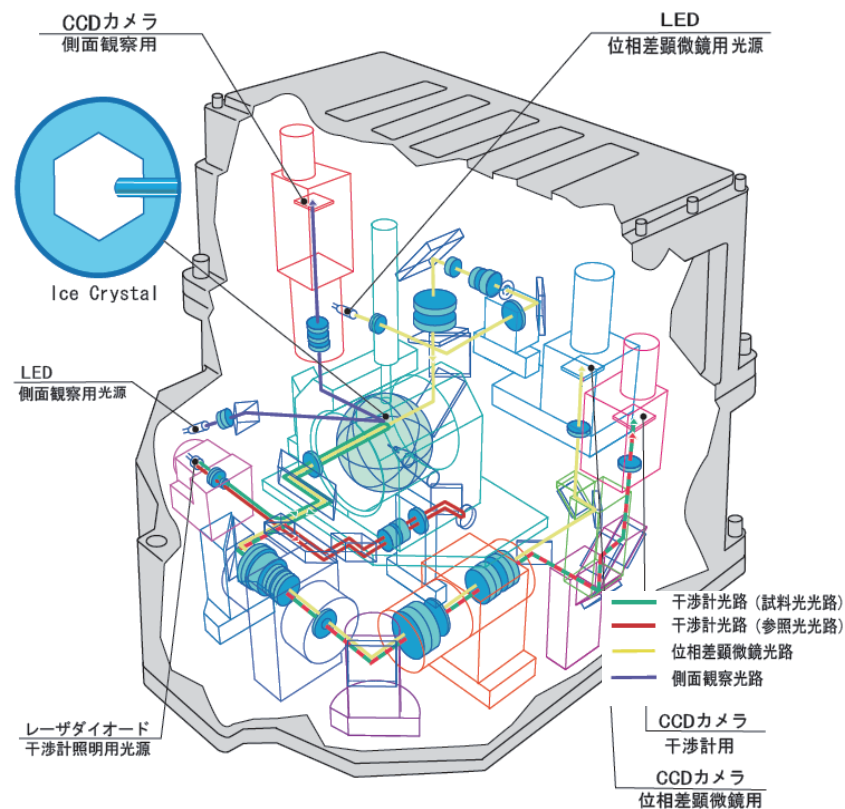


図5 ICC2 に内蔵された観察光学系の配置図。黄色の線で示した光軸は、位相差顕微鏡の光路、赤線で示した光軸は、マイケルソン干渉顕微鏡の光路、紫色で示した光軸は、結晶の回転角度を推定するための、毛細管の軸方向からの観察系の光路を示している。

計された。この光学系では、位相差顕微鏡とマイケルソン型干渉顕微鏡を同軸に配置して、氷結晶の成長界面でのステップ挙動の観察と同時に面成長速度を測定することが可能である。このような光学系は、これまで開発された例はなく、新規の光学系として設計された。図5は、ICC2 に内蔵された光学系の配置を示している。SCOFのステージに搭載可能な供試体の形状や大きさは限定されているので、光学系の配置は立体的で複雑である。

ここで、図6は本装置で開発した光学系の光路構成を示す。まず、マイケルソン干渉顕微鏡の光路構成（赤線）から説明する。マイケルソン干渉計は、試料面からの反射光と参照ミラーからの反射光（参照光）を干渉させることで、試料面の凹凸や移動速度などを検知する方法である。段差の高さや移動速度を、光の波長オーダーの分解能で解析することが可能で、高精度であることが特徴である。しかしながら、試料面からの反射光と参照ミラーからの反射光の強度差があると、良好な干渉縞を得ることが困難になる。バルクの水と氷の屈折率はそれぞれ1.3328と1.3018であるため、この界面からの光の反射係数は0.00014となる。この値は、ガラス表面からの光の反射係数の1/500の大きさに過ぎず、これほど低い反射係数の反射面による干渉縞の生成は、これまで不可能と考えられていた。本実験装置の開発では、試料面と参照ミラーからの反射光の強度差ができるだけ少なくなるような特別な工夫を図ることで、十分なコントラストの干渉縞を得ることに初めて成功した。すなわち、試料表面と参照ミラーへの“入射光”の強度を500:1に分割できれば、反射光の強度は自動的に1:1に近づき、十分なコントラストで干渉縞を生成することが可能になると期待される。このような大きな光の強度差は、単なるND フィルターでは作り出すことは困難であるが、光の偏光特性を利用することで実現可能であり、本実験装置でもこの方法を採用している。

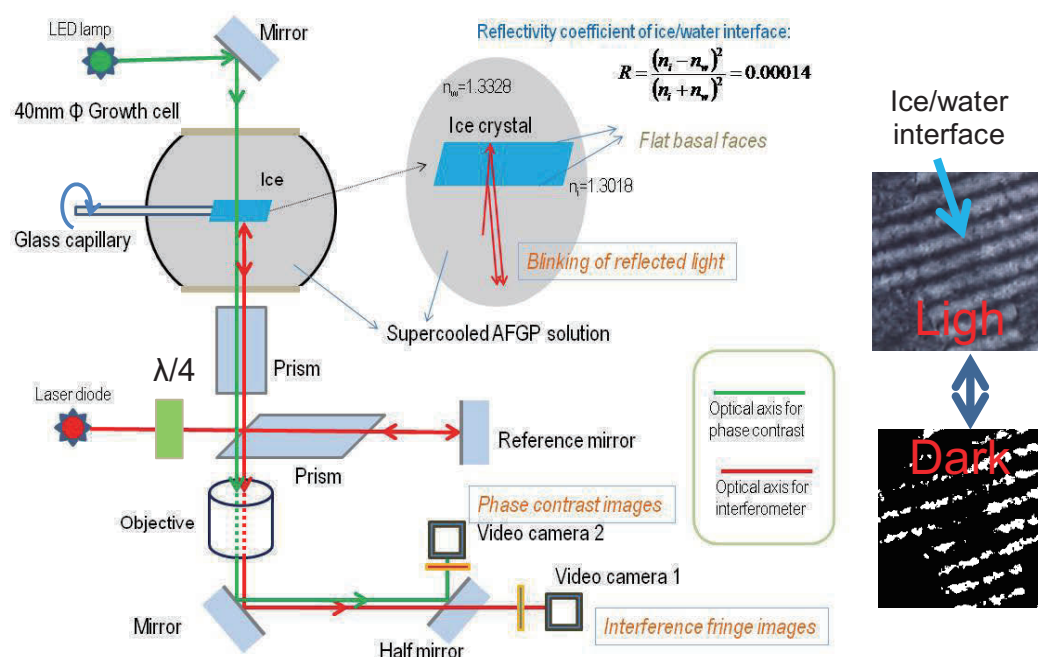


図6 ICC2 に内蔵された光学系の光路図。赤線及び緑線が、それぞれマイケルソン干渉顕微鏡及び位相差顕微鏡の光路を示す。両者の光路は、異なる波長の光を使うことで、分離が可能である。

また、光干渉が生じるためには、両方の反射光の光軸が重なり合う(完全に平行になる)ことが必要である。核形成セルで発生させた氷結晶は、毛細管内を結晶が成長する際に結晶 c 軸が毛細管軸に直交する結晶粒が最終的に生き残り、毛細管の先端に達した時に成長セル中で自由成長を開始する。この時、氷結晶の c 軸方向は光学系の光軸方向に対しては制御することができない。このため、上記の条件を達成するためには、毛細管の軸周りに結晶を回転させる必要がある。この機能は、核形成セルに内蔵されている。

一方、位相差顕微鏡は、結晶の外形や成長界面でのステップの挙動などの直接観察に有効であるが、実際には位相差リングが干渉光学系の構成に影響するので、共存することは困難とされていた。本実験装置の光学系では、位相差リングの挿入位置の調整、及び干渉光学系の構成に特別な工夫をとることで、この障害を除去することに成功した。

以上のように、本実験装置で採用された氷結晶成長装置と観察光学系は、新たな開発要素が多数含まれたものであった。前者は北海道大学低温科学研究所の技術部、後者はオリンパスの光学技術専門家が参画したことが、この複雑な装置の開発を成功に導いたものと考えている。一方、このことは両者のコミュニケーションを密にし、頻繁に開発状況の確認をとりながら作業を進めるために、丁寧な調整作業が必要であった。この調整には、JAXA 担当者が果たした役割が大きく、これがなければ装置の完成には至らなかった。

3. 2 宇宙実験で使用した AFGP 水溶液の調整

本実験では、不純物試料としてタラ (*Gadus Ogac*) の血漿から採取された不凍糖タンパク質 (AFGP) を用いた。この AFGP は、不凍効果を持つタンパク質として最初に発見されたもので、他の不凍効果を持つタンパク質に比べて、結晶成長に対する効果が比較的明らかになっている。例えば、AFGP 水溶液中での氷結晶の自由成長実験は、1985 年に最初に実施され、氷結晶の外形が AFGP 濃度や過冷却度で変化することが指摘されている[29]。さらに近年では、蛍光ラベルをつけた AFGP 分子を使って、氷結晶のプリズム界面への AFGP 分子の吸着が成

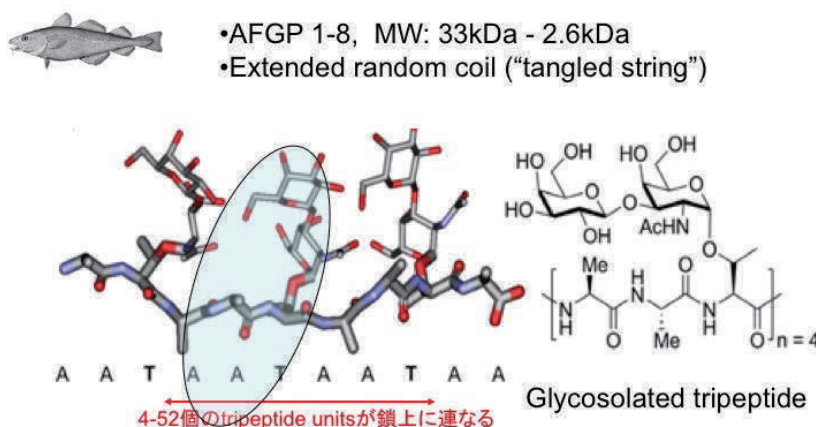


図7 AFGP の分子構造。

長抑制と直結することを示す直接的な証明[19、30]、成長界面前方での AFGP 分子の拡散と界面での分子の脱着過程[31]、氷界面に吸着した AFGP 分子の二次構造など[17]、分子の界面吸着特性についても明らかになってきた。このようなことから、本宇宙実験ではこのタンパク質を試料として使用することにした。実際に使用した AFGP 試料は、ボストンのベンチャー企業である A/F Protein Inc.から購入した。

AFGP 分子は、図7に示すように *Alanine-Alanine-Threonine* のアミノ基に糖鎖がついたトリペプチドを1ユニットとして、4-50ユニットが連続して結合した構造を持つ[15]。分子量は、結合したユニット数に応じて、2.7から32kDa の範囲で分布する。分子量の大きいものから8つのバンドに分けられており、本実験では分子量の小さい AFGP7-8の混合物を試料として使用した。

本実験では、打ち上げ後に実験試料の交換等の作業ができない。このため、宇宙実験で使用する AFGP 水溶液の濃度は慎重に決定された。地上実験において得られている氷結晶の外形の濃度・過冷却度依存のデータを精査し、0.07mg/mL の濃度をもっとも適当であると結論された。この濃度より低いと結晶の樹枝状成長が開始する過冷却度が小さすぎるため、宇宙実験での成長温度の設定に問題が生じる。また、この濃度よりも高いと、結晶外形が針状結晶になるなど結晶形の安定性が失われる。実際に宇宙で使用した AFGP 水溶液の濃度は、比色分析法により所定の濃度であることが確認された。

また、宇宙実験では、試料を調整後に実験を実施するまでかなりの時間がかかることも予測された。このため、事前に AFGP 水溶液の試料としての寿命を検証した。水溶液作成後約12ヶ月が経過した試料を用いて氷結晶成長実験を行い、試料調整直後と同等の結晶成長特性を維持していることを確認した。

3. 3 打ち上げ後に生じたトラブル

ICC2 の打ち上げ後、直ちに SCOF への設置作業が行われ、実験が開始された。最初の予備実験では、氷結晶の成長、及び光学観察系ともに正常に動作し、氷結晶の成長が観察できることが確認された。しかしながら、本格実験を開始した最初の実験で、核形成セルの冷却が突然停止し、復旧しないという事象が発生した。当初は、ICC2 の内部に問題が生じたことが疑われたが、様々なトラブルシューティングを実施した結果、ICC2 本体の異常ではなく SCOF 側の電源供給系に問題が発生したことが確かめられた。このため、対策として SCOF の別系統の電源供給系から電源を取るために新規のケーブルを開発することが決定され、打ち上げが実行された。その結果、装置の正常な再稼動が確認された。一方、実験再開直後に、干渉顕微鏡の光学系は正常であったが位相差顕微鏡の光学系に異常が発生し、位相差画像を取得できないという新たな問題が発生した。電源トラブルの発生前は、光学系の異常は発生していなかったことから、電源トラブルの復旧作業中にこの問題が発生したと考えられる。地上からの操作でこの光学系の復活を試みたが、位相差光学系は不安定で、最終的に干渉

計画像との同時取得は不可能との結論に至り、本実験では干渉顕微鏡の画像のみで実験を継続することを決断せざるをえなかった。

4. 実験結果および成果

4. 1 実験手順

宇宙実験は、宇宙飛行士の就寝時間帯に実施された。実験は、SGC 内の AFGP 水溶液の冷却からスタートするが、宇宙実験では対流が抑制されるので、水溶液全体が設定した過冷却度 ΔT_{∞} に達するまで、約120分の予備冷却時間が必要であった。一様な温度分布が得られた後、核形成セルの急速冷却を開始し、毛細管内で氷結晶を発生させる。核形成が起きると潜熱の発生があるので、毛細管の近くに設置した温度センサーによってその瞬間を検知できる。一定の待ち時間(設定温度に依存するが、10～100分程度)の後、毛細管先端から氷結晶に自由成長が開始する。この時、結晶のc軸方位は観察光学系の光軸とは一致しないため、毛細管を回転させて干渉計画像が取得できる結晶方位を探す。結晶のc軸が光軸と一致した瞬間に結晶面上に干渉縞が出現する。参考ビデオ¹⁾は、結晶の回転に伴って干渉縞が出現する瞬間を示している。干渉計画像が得られた場合は、そのまま結晶成長を継続し、干渉画像を取得する。結晶の成長は、成長温度にもよるが30分から、場合によっては60分以上にわたって継続して観察された。取得されたビデオ画像は直ちに地上にダウンリンクされて、実験データとして記録された。

結晶の成長が進行し、結晶サイズが一定の大きさになるとSGC及び核形成セルの温度を0℃以上に上昇させると、すべての結晶が融解して消失する。これにより、SGCの初期化が完了し、次の実験を開始することができる。このように、簡単な初期化作業で何度でも結晶成長実験を繰り返すことができることが、今回開発した装置の特徴であり優れた点である。

4. 2 氷結晶成長実験の成功確率

今回の実験では、試料であるAFGP水溶液の濃度は変えることができないので、氷結晶成長を開始時の初期過冷却度のみを実験パラメータとして変化させた。実験の計画では、様々な過冷却度で合計100回の結晶成長実験を繰り返すことを予定していた。しかし、実際にはこの回数を大幅に超えて、最終的に124回の実験を繰り返すことができた。このうち、氷結晶の生成は初期過冷却度 ΔT_{∞} が0.2K以上の条件では、例外なく氷結晶の成長が観察された。このうち、22回の実験において結晶の方位を回転させることにより、氷結晶の成長界面において干渉縞を発生させることができた。すなわち、全実験に対する干渉縞観察の成功確率は約18%であった。一方、キャピラリーの可動範囲は±45度であるので、結晶のc軸方位がこの範囲を外れているものは本来干渉縞を生じるような向きを実現することは不可能である。従って、全部に実験のうちその半分は、本来干渉縞を観察することができないので、この成功率は実質的には35%となる。地上からのコマンド操作のみでマイケルソン干渉顕微鏡を操作することの困難さを考慮すれば、この成功率は驚くほどの高さであることを強調したい。

4. 3 面成長速度の測定

成長する氷結晶を記録した参考ビデオ2(成長条件: $\Delta T_{\infty}=0.3\text{K}$)からの成長速度の解析例を図8に示す。図8(a)は、ビデオから取り込んだスナップショット画像で、画像中央に見える干渉縞が氷結晶の成長界面からの

¹参考ビデオ1 (http://iss.jaxa.jp/kiboexp/theme/second/ice_crystal2/vidoe1.mov):

毛細管の先端から氷結晶が成長を開始すると、毛細管を軸の周りで回転させ、結晶の観察面の法線方向を観察光学系の軸方位に一致させる。このビデオは、この作業で結晶面に干渉縞が観察された瞬間を示す。ビデオ画像は、いかなる画像処理も施されていない。 $\Delta T_{\infty}=0.2\text{K}$ 。画面のサイズは、横軸方向2.4mm、縦軸方向1.6mm(640×480ピクセル)。再生速度は、実時間。ビデオの長さは、10秒。

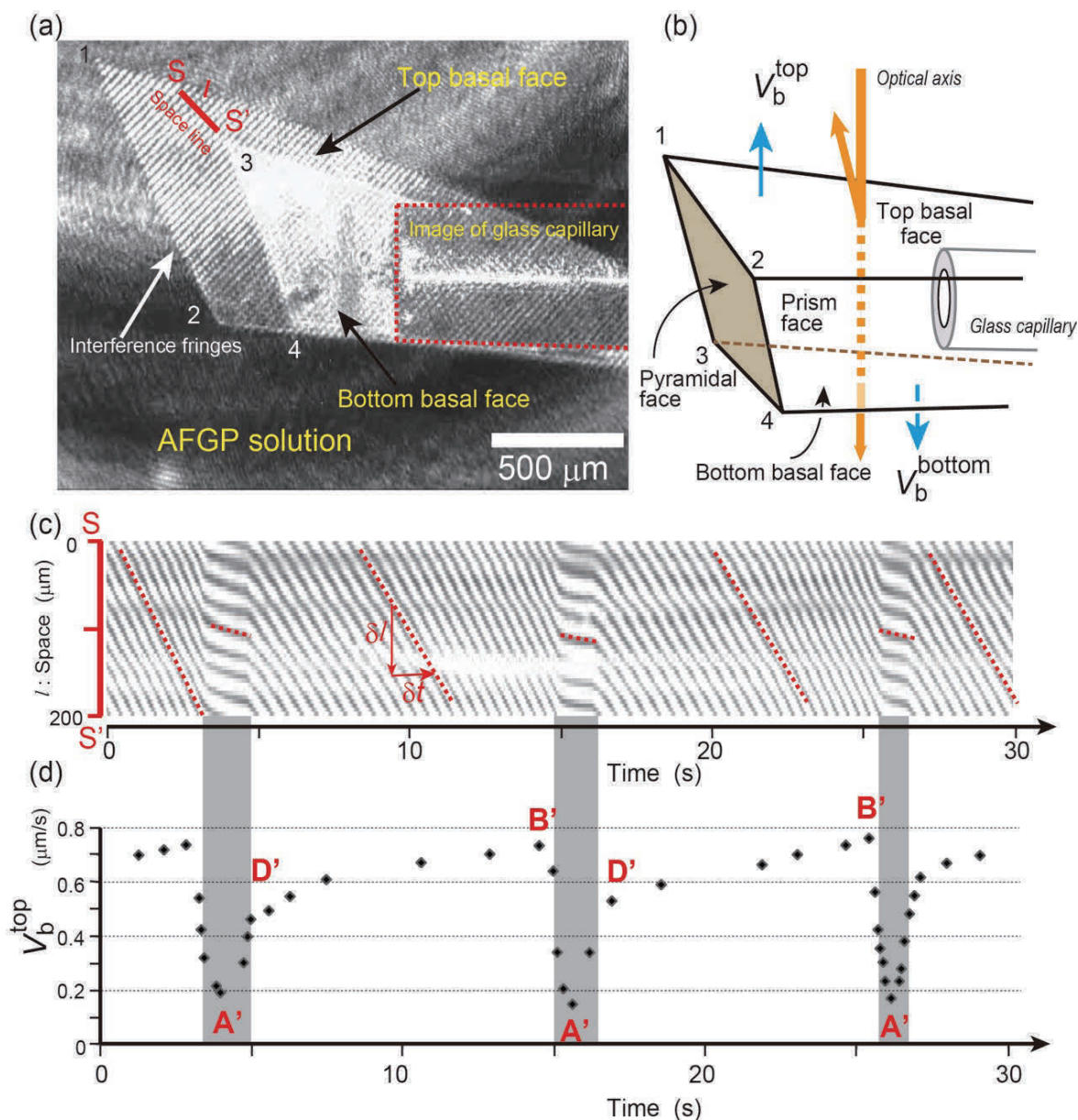


図8 (a)参考ビデオ2から取られたスナップショットの画像。毛細管の先端で成長する氷結晶の結晶面からの反射光で発生した干渉縞。結晶の中央部分の明るいイメージで部分は、干渉縞の強度が時間変動している領域になる。(b)干渉縞画像から推定される結晶外形の3次元模式図。2つのベーサル面は、Top (記号1、2で示された面)と Bottom(記号3、4で示された面)で表示されている。参考ビデオ2の結晶の中央部では、輝度の周期的な変化が観察される。これは、2つのベーサル面からの反射光が干渉することによって発生するものである。(c)スペースライン $S-S'$ に対して、参考ビデオ2の各フレームを解析して得られた、タイム・スペース画像。この画像に示される線状のイメージは、干渉縞から再構築されるもので、その傾きが干渉縞の移動速度に比例する。(d)タイム・スペース画像の解析によって得られた、氷ベーサル面(Top)の面成長速度の時間依存性を示す。 A' 、 D' 、 B' は、図13のループを作る記号に対応。

反射により生じたものである。すでに述べたように、位相差顕微鏡画像が失われたために、結晶の3次元の外形

や成長界面でのステップ挙動を直接示すことができない。しかし、干渉縞画像から氷結晶の3次元外形を推定することは可能で、その結果が図8(b)に示される。すなわち、結晶の外形は、2つの平行なベーサル面 (Top basal face、及び Bottom basal face) とそれを繋ぐプリズム面 (1枚) 及びピラミッド面 (2枚) で構成されていると推定される。この解析から、干渉縞を発生させている界面はベーサル面であることが特定できる。結晶の角につけられた番号は、それぞれ図8(a)の画像に示された角の番号と対応している。参考ビデオ²を見ると、氷結晶のベーサル面上に観察される干渉縞は、直線状で等間隔の配置を保ったまま界面に沿って移動するのが観察される。すなわち、干渉縞の移動速度は、反射界面が鉛直方向への移動に対応するために、この干渉縞の挙動を解析することでベーサル面の面成長速度を決定することができる。ビデオから観察される重要な事実は、干渉縞の移動速度が一定ではなく周期的に変動することで、ベーサル面の成長速度は成長時間に対して、周期的に変動していることを意味している。このような面成長速度の周期振動は、氷に限らずいかなる結晶成長の系でも明確に観察された例は報告されていない。これは、地上実験では、自然対流などの擾乱より結晶の成長速度は簡単に変動してしまうため、このような成長速度の変動が観察されても対流の効果によるものと区別ができない。しかし、今回の実験で観察された振動現象は微小重力環境で得られたものであり、擾乱の効果は排除されていることに注目すべきである。また、このような振動現象は、干渉縞が記録された22例の実験ビデオのすべてで観察された。すなわち、この現象は、AFGP 分子が不純物として作用する系において普遍的に生じるものである。

ビデオから干渉縞の移動速度を解析するためには、タイム・スペース解析法が有効である。ビデオのフレームごとに、図8(a)に示されたスペースライン S-S' に沿って輝度値の分布を抽出し、これをフレーム順に並べると図8(c)に示されるようなタイム・スペース画像を再構築できる。この画像に現れたラインの傾き ($=\delta l/\delta t$) が干渉縞の平行移動速度 (β) になる。この測定から、ベーサル面の法線方向成長速度は、 $V = \beta\lambda/2\delta n_w$ で与えられる。ここで、 V は成長面の成長速度、 λ は干渉計レーザーの波長 ($=670\text{nm}$)、 δ は干渉縞の間隔、 n_w は AFGP 水溶液の屈折率 ($=1.3328$) である。この解析で得られたベーサル面成長速度の変動を図8(d)に示す。成長速度が周期変動していることが明らかであり、その変動幅は最小速度で $0.08\ \mu\text{m/sec}$ 、最大速度で $0.78\ \mu\text{m/sec}$ であり、その振幅は10倍近い差となっている。また、振動の周期は、この例の場合はおおよそ11秒であり、さらに各周期内での速度の変動の仕方も一定であることがわかる。

4. 4 干渉縞画像の輝度の周期変化と面成長速度の測定の検証

一方、図8(a)のスナップショットで結晶面中央部の輝度の高い部分に注目して、もう一度参考ビデオ2を見てみると、この部分の輝度値が周期的に変動している。これは、図8(b)に示す結晶外形の模式図に示すように、氷結晶には上下2つのベーサル面 (Top と Bottom) があり、両者は結晶学的に同一であるため平行の位置関係にあることに関連する。すなわち、ベーサル面に入射した光は Top のベーサル面で反射されるだけでなく、Bottom のベーサル面からも反射されるので、この両面からの反射光は平行であり、互いに干渉することができる。さらに、両面の間隔 (すなわち、結晶の厚み) によって反射光の位相差が変化し、輝度値が変動する。結晶が成長していると、結晶の厚みは連続的に増加するので、これに応じて輝度値の強度変化の周期が変化する。

²参考ビデオ2 (http://iss.jaxa.jp/kiboexp/theme/second/ice_crystal2/vidoe2.mov):

氷のベーサル面に等間隔で並んだ干渉縞が左上から右下に向かって平行に移動している。移動速度が周期的に急に低下することが観察される。この現象は周期的に出現する。また、結晶の中央部では、輝度の周期的な変動が観察された。この周期変動は、氷結晶の上側のベーサル面と下側のベーサル面からの反射光が干渉を起こすことで発生する。したがって、輝度の変動周期は、結晶の厚みの増加速度に比例する。 $\Delta T_{\infty} = 0.3\text{K}$ 。画面のサイズは、横軸方向2.4mm、縦軸方向1.6mm (640x480ピクセル)。再生速度は、実時間。ビデオの長さは、30秒。

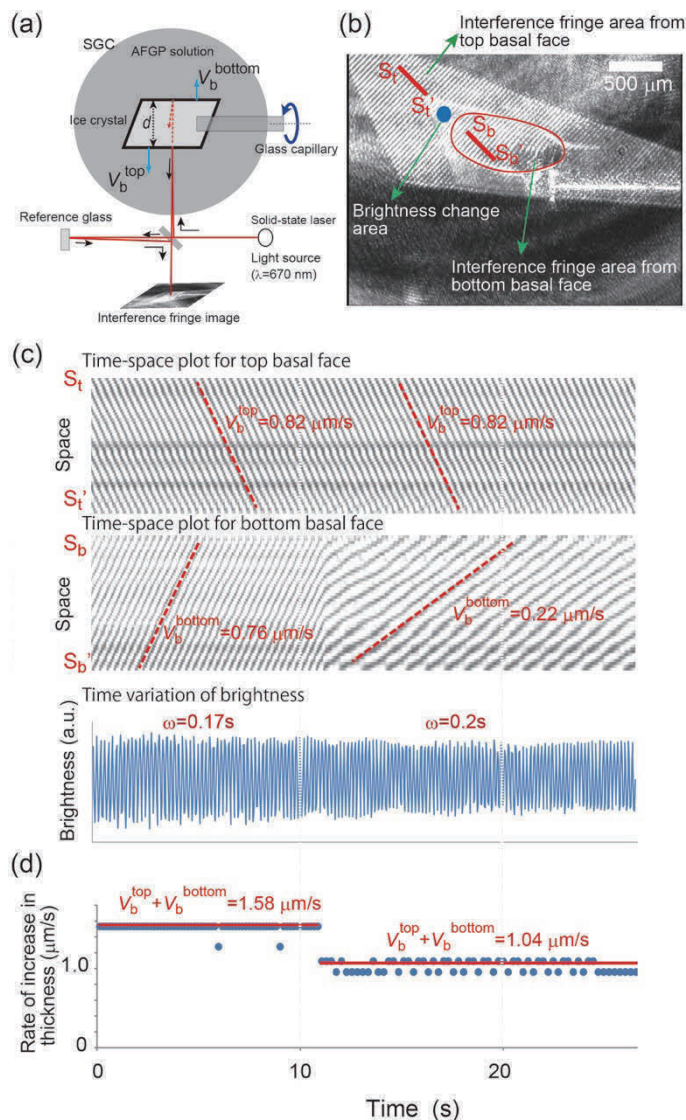


図9 (a)マイケルソン干渉顕微鏡の光学システム。(b)参考ビデオ3のから取られたスナップショット。結晶面の外周と中心部では、干渉縞の移動方向が逆転している。さらに、画像の輝度値が周期的に変動している領域も存在する。(c)これらの領域を、干渉縞の移動をタイム・スペース解析した結果と輝度値の周期変動を解析した結果を示す。(d)それぞれの解析から、結晶の厚みの増加速度とそれぞれのベーサル面の面成長速度を独立に決定でき、これらの値は矛盾なく整合することが示される。これにより、本実験で成長速度の解析が正しいものであることが再確認される。

このため、輝度値の変動周期から、結晶の厚みの増加速度 (Top と Bottom のベーサル面の成長速度の合計) を決定することができる。

このことを証明するために、参考ビデオ3³を示す。図9は、このビデオの解析結果である。まず、図9(a)は、マイケルソン干渉顕微鏡で観察した時の、光学系の構成を示している。図9(b)は、ビデオ画像のスナップショットで、観察される結晶面の外側の領域に観察される干渉縞と中央部の赤線で囲った領域に観察される干渉縞の移動方向が逆になっていることが観察される。これは、それぞれ Top 側と Bottom 側のベーサル面の成長方向

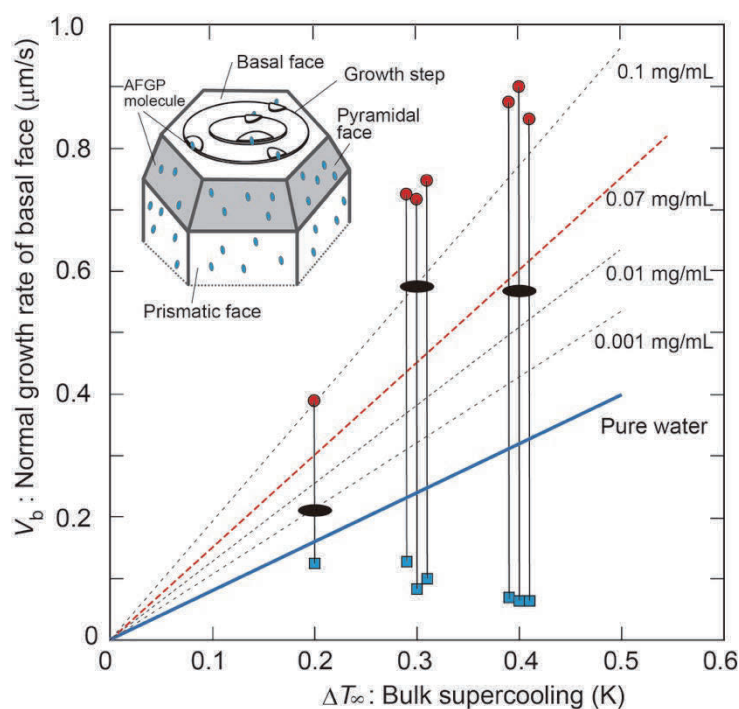


図10 周期変化するベーサル面成長速度の最大値(赤丸)と最小値(青四角)の過冷却度温度(ΔT_{∞})依存性。対応する最大値と最小値を線で結んでいる。また、 $\Delta T_{\infty}=0.3\text{K}$ と 0.4K で示した3つの測定点は、図の重なりを避けるため、横にずらせてプロットしている。図中のイラストは、氷結晶での AFGP 分子の吸着の面方位依存性を示す。

がちやうど逆向きになっていることに対応している。さらに、青丸で示した部分は、画像の輝度値が周期的に変動している領域である。この輝度値の周期変化は、上記で説明した通り、結晶の厚みの増加速度に比例する。図9(c)は、干渉縞の移動速度をスペースライン S_t-S_t' 及び S_b-S_b' に対して解析したタイム・スペースプロット画像と青丸部分の輝度値の周期変化を示している。これらの解析結果から計算されるそれぞれのベーサル面の成長速度の合計と、厚みの変化速度($\delta d/\delta t = \lambda/2\omega n_i$)を較べると両者は一致することが図9(d)に示される。すなわち、このマイケルソン干渉顕微鏡で得られる画像を元に、氷結晶の外形を構成する2つのベーサル面の成長速度を、独立に決定することが可能であることを示している。ここで、 d は結晶の厚み(2つのベーサル面の面間距離)、 ω は輝度の変動周期、 n_i は氷の屈折率($=1.3078$)である。

³ 参考ビデオ3 (http://iss.jaxa.jp/kiboexp/theme/second/ice_crystal2/vidoe3.mov):

氷のベーサル面で同時に3つのイベントが観察された例。すなわち、結晶の周辺部の干渉縞は、左上から右下へ移動、結晶中心部の干渉縞の逆方向への移動、及び両者の境界に見られる輝度の周期変化。この画像を解析することで、上下のベーサル面の成長速度、及び結晶厚みの増加速度を独立に求めることができる。 $\Delta T_{\infty}=0.3\text{K}$ 。画面のサイズは、横軸方向2.4mm、縦軸方向1.6mm(640x480ピクセル)。再生速度は、実時間。ビデオの長さは、25秒。

4. 5 成長速度の振動

前節で示したような解析により、結晶成長速度の振動特性が明らかになった。図10は、振動する成長速度の最大値(赤丸)と最小値(青四角)を過冷却度 ΔT_{∞} の関数としてプロットしたもので、対応する値を線で結んでいる。また、時間とともに変動する成長速度から、その平均値を求めた結果が図の黒の楕円でプロットされている。本実験では、 $\Delta T_{\infty}=0.2\sim0.5\text{K}$ の範囲で振動成長が観察された。 $\Delta T_{\infty}=0.2\text{K}$ では過冷却度が小さすぎるため、宇宙実験で利用できる実験時間内で十分な結晶成長を観察することができなかった。一方、 $\Delta T_{\infty}=0.5\text{K}$ 以上では、結晶の生成は観察されたが、結晶の成長速度が速すぎるため、毛細管の回転により結晶の向きを調整して、結晶面上に干渉縞を発生させることが困難であった。このため、この過冷却領域では成長速度の成長は不可能であった。観察された成長速度の振動は、最大速度が最小速度の10倍程度にも達する場合があるなど、振幅が非常に大きい。振動周期についても、 ΔT_{∞} が増加するほど短くなる傾向が明らかになった。このような、成長速度の振動が直接的な方法で明確に観察された例は、他には存在しないことを改めて強調したい。

一方、AFGP 水溶液からの氷結晶の一方向成長では、成長界面の成長速度が振動的に変化することが明らかになっている[16]。この方法は、厚み $50\mu\text{m}$ 程度の薄い結晶成長セルにAFGP 水溶液を充填し、そのセルを空間に固定された温度勾配場の中を一定速度で移動させることで、成長セルの中で結晶を成長させる。このような方法では、セルの厚みが薄いので結晶の成長界面では対流の発生が抑制され[32]、AFGP の拡散場が広がることが知られている[31]。今回の宇宙実験で観察された成長速度の振動も、対流のない環境でのみ観察される現象であった。以上のことから、成長速度の振動現象は、AFGP 分子の界面吸着と界面での結晶化潜熱の解放による熱拡散場とが相互作用することで生じる現象であり、地上実験では対流の効果に覆い隠されてしまう。このため、明確な観察が困難であったと考えられる。

4. 6 地上参照実験により得られた、AFGP 不純物によるベーサル面成長速度の促進

不純物を含まない純水中で氷結晶を成長させると、薄い円盤状または樹枝状の形態をとる事はよく知られて

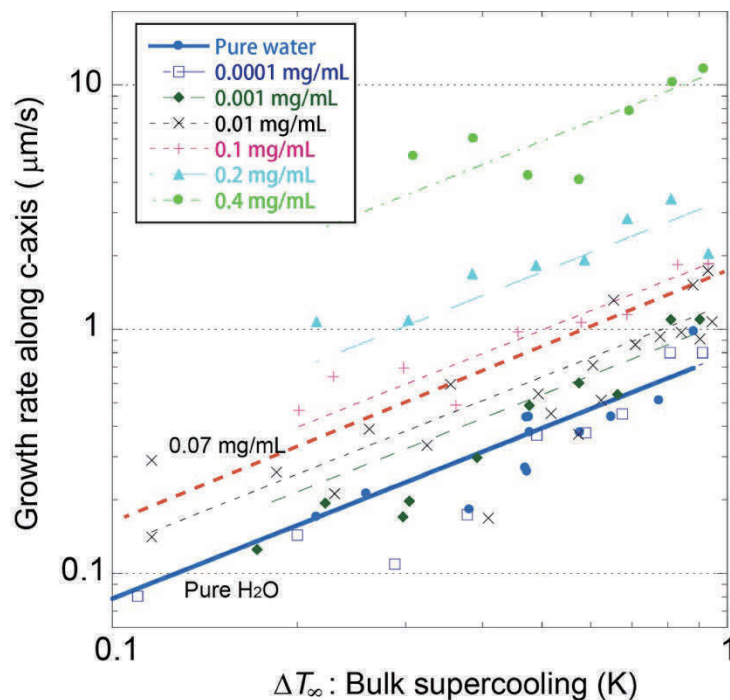


図11 地上参照実験により測定された c 軸方向成長速度の過冷却度(ΔT_{∞})依存性。AFGP を含む過冷却水中での成長速度は、純水中での成長速度より速くなる。すなわち、AFGP は c 軸方位の成長速度を促進する。

いる。このような形状になるためには、氷のベーサル面の成長が他の結晶面に比べて極端に小さいことが条件になる。一方、AFGP 水溶液中で測定されたベーサル面の成長速度は、純水中の成長速度と比べてどのような関係にあるのかは、図10で示した成長速度の測定結果を議論する上で重要である。宇宙実験では、AFGP 濃度は固定(0.07mg/mL)であったので、地上参照実験を行い、成長速度の AFGP 濃度と過冷却度依存性を測定した。測定は、直径20mm 高さ20mm の円筒形のガラスセルを用意し、その中に AFGP 水溶液を充填して、挿入したガラス毛细管の先端で氷結晶を成長させる。成長セルは、一定温度に保った冷却水バスに浸漬されており、過冷却度を変えることができる。氷結晶の成長速度は、透過型干渉計(マッハツエンダー型)や結晶側面からの観察などの方法で測定した。この方法では、成長速度の振動などの現象を見出すことは困難であるが、ある程度の時間の平均的な成長速度を求めることができる。図11は、AFGP 濃度をパラメータとして、c 軸方向の成長速度(必ずしも、ベーサル面の成長速度が測定できた訳ではない)の過冷却度を示す。測定結果のばらつきはあるが、成長速度は過冷却度にほぼ比例して増加することが分かる($V \propto \Delta T_{\infty}$)。さらに、AFGP 濃度の上昇とともに、過冷却度に対する成長速度の増加率も上昇する。すなわち、c 軸方向成長速度は、AFGP の効果で速度が上昇することが明らかである。この実験結果から、今回の宇宙実験で採用した AFGP 濃度に対応する成長速度の推定値は、図中の太い赤破線で示される。

ここで図10には、図11で示した地上実験で得られた成長速度の過冷却度依存性を AFGP 濃度ごとに破線で示している。宇宙実験と地上実験で得られたデータを比較すると、以下のことが明らかになる。まず、宇宙実験で得られた振動成長の最小成長速度は純水中での成長速度に近いので、振動成長の低速度側が AFGP の影響が少なく、速度の増加とともに AFGP とベーサル面との相互作用が強くなっていると結論される。これは、従来の結晶成長に対する不純物効果(成長抑制)とは、逆の効果(成長促進)になっていることが示唆される。また、最小成長速度が純水中の成長速度より遅くなったのは、宇宙実験では対流の効果が排除された結果と考えられる。一方、最大成長速度は、地上実験で得られた AFGP 濃度が0.07mg/mL の場合の成長速度よりも、さらに大きい値となるが、平均成長速度との比較では両者はほぼ一致する。

4. 7 ベーサル面の成長促進のメカニズム

結晶成長に対する不純物効果は、結晶の核形成や形状・サイズなどを制御するために様々な分野で活用されている。この時利用される不純物効果のメカニズムは、成長界面に吸着した不純物分子が成長ステップの移動をピン留めする効果を持ち、成長を抑制することが基本である(吸着-成長抑制)。実験的にも、不純物効果による成長速度の抑制を示す多くの証拠が示されている。さらには、表面への不純物分子の脱着の非線形性から成長速度のヒステリシス効果も指摘され、そのモデル化も近年急速に進歩してきた。しかしながら、本実験で観察された不純物分子の効果による結晶成長の促進(吸着-成長促進)は、これまで報告された例がなく、そのメカニズムについて議論された例は存在しない。

このような背景のもとに、ここでは AFGP 分子による成長速度促進機構についてその可能性を指摘したい。図12の模式図に示すように、AFGP 分子は、氷のプリズム面、及びピラミッド面に選択的に吸着することがすでに良く知られている。さらに、この両面については、AFGP 分子が吸着すると、その成長が阻害されることも、実験[19、30]や計算機シミュレーション[33、34]により明らかになっている。すなわち、これらの界面では、不純物分子によるステップ、または結晶面の前進をピン留めするというモデルが有効である。図12の左下は Zepeda ら[19]により提案された、AFGP 分子の吸着によるピン留め効果の様子を模式的に示している。

一方、氷のベーサル面には、AFGP 分子は吸着を起こさない [35、36]と考えられてきたので、ベーサル面の成長には AFGP 分子は何も作用しないというのがこれまでの理解であった。しかし、氷のベーサル面は、ステップ成長することが知られており、そのエッジ面にはプリズム面、またはピラミッド面が露出している。したがって、ベーサル面上のステップのテラス部分への吸着は期待できなくとも、図12の模式図に示すようにエッジ面には吸着が可能である。ここでポイントとなるのは、生体高分子は通常の無機物質の不純物分子に比べて、そのサ

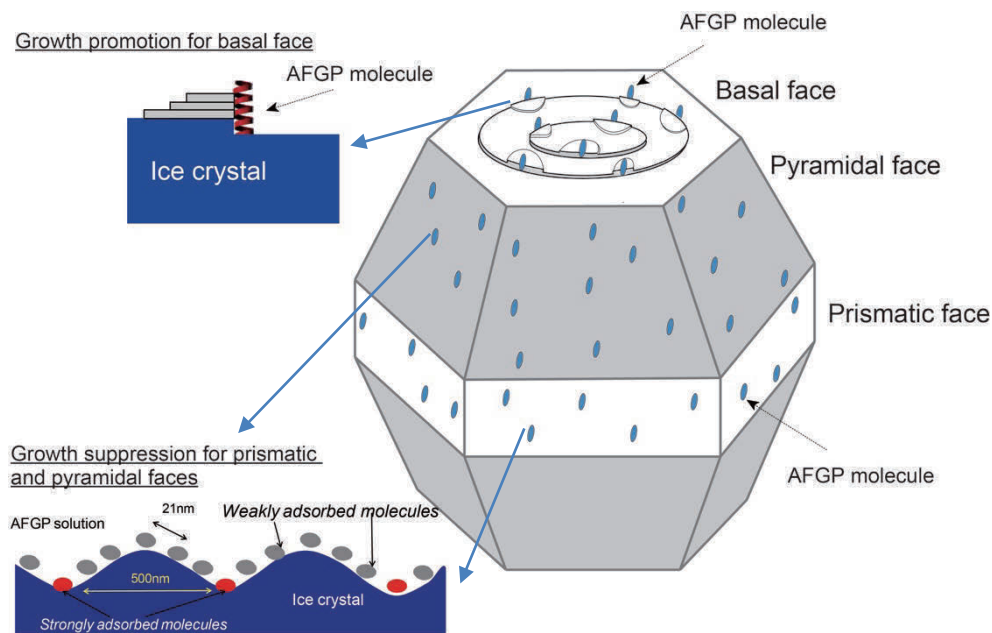


図12 氷のベーサル面とプリズム面での AFGP 分子の吸着特性、及び面成長速度に対する効果の異方性。AFGP 分子が、プリズム面(またはピラミッド面)に優先的に吸着するのはベーサル面でも同様である。しかし、両者では面方位の違いによりその機能特性が逆転する。

イズが極端に大きいことである。本実験で使用した AFGP 分子の直径は約3nm であり[37]、氷ベーサル面上の単位ステップの高さ(0.37nm)[38]より、一桁大きい。このため、ステップエッジに吸着した AFGP 分子は、エッジから大幅にはみ出すこととなる。このような分子は、ベーサル面上での成長ステップの新たな発生源となることが期待される。すなわち、ベーサル面上では、ステップエッジに沿って新たなステップの発生源が配置されることとなり、その成長速度は促進される。

このようなメカニズムは、以下に述べる実験結果によっても強く支持される。すなわち、AFGP 分子の二次構造は、水中ではランダムコイル(長い紐が絡み合ったような構造)であるが、氷界面に吸着すると α -ヘリックスと呼ばれるらせん状の構造に変化することが、FTIR 測定で明らかになっている[17]。したがって、図12の左上の模式図に示すように、ベーサル面のステップエッジに吸着した AFGP 分子も α -ヘリックス構造を取ることが期待される。この二次構造を持つ分子は、両側面が疎水性の側と親水性の側で構成され、疎水性側が氷結晶界面により強く吸着すると考えられている[33、34]ので、ステップエッジに吸着した AFGP 分子は、段差の上段側に成長ステップを生み出す発生源として作用する。

不純物効果による結晶成長促進は、これまで議論されたことはないが、タンパク質のような生体高分子が不純物として作用する場合には、上記の仕組みは普遍的な現象である。より詳細なモデル化や他のタンパク質分子についても同様な効果がないかを確認することが、今後の課題として重要になるであろう。

4. 8 成長速度の振動を引き起こす要因

本宇宙実験では、ベーサル面の成長速度が周期振動する現象が観察された。このような振動現象は、天然、あるいは人工を問わず結晶内部にしばしば観察される縞々模様(ストリーション)の成因として、古くから注目されてきた[20-22]。しかしながら、実際に成長速度が変動することは観察されてきたものの、それが振動するのかどうかを直接確認できた例は、実際には皆無に近い。一方、最近になり、成長速度のヒステリシス的な変動に

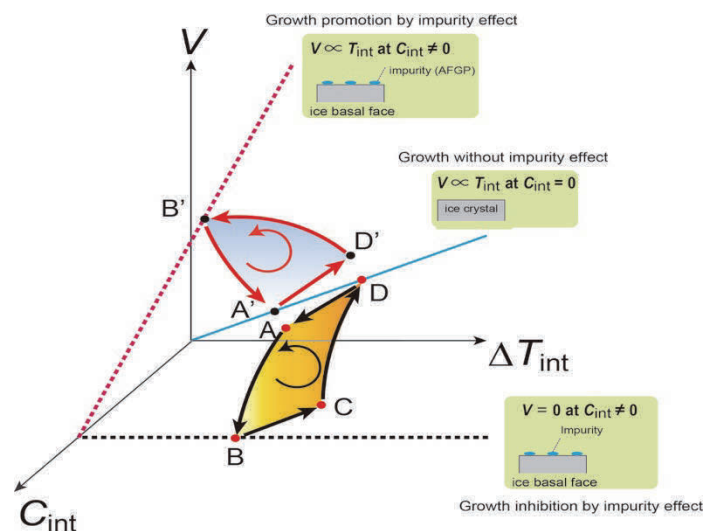


図13 結晶成長速度の周期変動を駆動する要因。黒の矢印で示したループは、不純物分子の界面吸着により成長が抑制される(吸着-成長抑制)場合のモデルで、従来から多くの議論がなされてきた。赤の矢印で示したループは、不純物分子の界面吸着で成長促進される(吸着-成長促進)場合のモデル。このモデルは、本研究により新規に提案されたものである。

対するモデルが提案されるなど、研究者の関心が高まっているが、これまで議論されてきたモデルでは、成長界面に吸着した不純物分子が成長を抑制する(吸着-成長抑制モデル)ことを前提にした議論が全てであった。今回の宇宙実験では、不純物分子が成長を促進する(吸着-成長促進モデル)場合に伴って振動が起きるものであり、議論はなされていないのが現状である。ここでは、成長速度の周期変動がいかなるきっかけで引き起こされるのかを考えることで、今後のモデル構築の指針としたい。

図13は、界面への不純物分子の吸着と結晶成長速度の変動の様子を模式的に描いた図で、AFGPを含む過冷却水からの氷結晶の融液成長を念頭に置いている。図の青の実線は、不純物が存在しない場合の成長速度(V)の界面過冷却度(ΔT_{int})依存性を示す。不純物を加えた場合の成長速度の界面過冷却度依存性は、黒または赤の破線で示される。ここで、黒の破線は界面の不純物濃度(C_{int})がある一定値を超えると成長が抑制され、最終的に停止することを示している。一方、赤の破線は不純物濃度の上昇により成長速度が促進される場合を示している。

最初に、吸着-成長抑制モデルに基づいた既存のモデルについてまとめておこう[23-25、27]。この場合は、図中の黒の矢印で構成されたループ“ABCDE”に沿って成長速度が変動する。すなわち、

- ① A→B: 界面への不純物の吸着量(C_{int})が増加すると成長が抑制され、やがて停止する。
- ② B→C: $V = 0$ となると、界面に吸着した不純物は徐々に離脱する。同時に、成長に伴う潜熱の発生がないので、 ΔT_{int} が徐々に増加する。
- ③ C→D: C_{int} が低下し、 ΔT_{int} が増加し、臨界点を超えると成長が開始する。
- ④ D→A: 成長に伴い、界面で不純物が排斥され、 C_{int} が徐々に高くなるので、 V が低下する。これによって、成長による潜熱の放出が減少し、 ΔT_{int} が低下する。

このモデルについては、すでに数理モデル化や計算機シミュレーションなど[27]が行われている。

これに対し、不純物分子の吸着により成長が促進される場合(吸着-成長促進モデル)の成長速度の変化は、図13の赤の矢印で示されたループ“ $A' \rightarrow D' \rightarrow B' \rightarrow A'$ ”で示される。すなわち、

- ① $B' \rightarrow A'$: 何らかの原因で界面に付着した不純物分子が消失することで、成長速度 V が突然減少する。
- ② $A' \rightarrow D'$: V が減少することにより、界面での潜熱の放出が低下するため、 ΔT_{int} が増加する。しかし、 V はゼロにはならないため、これと同時に不純物分子が界面から排斥され続けるので、 C_{int} も増加する。
- ③ $D' \rightarrow B'$: C_{int} の増加とともに、 V が速くなる。同時に、界面での潜熱放出も増加するため ΔT_{int} も低下し、 B' に戻る。

このループの変化の基準点である、 A' 、 D' 、 B' 点が、実際に観察された AFGP 水溶液中での成長速度の変動とどのように対応するかを示すために、図8(d)の中にこのポイントを記載した。このループが成り立つためには、 $B' \rightarrow A'$ の過程で見られる結晶成長速度が急減するメカニズムを明らかにすることが鍵となる。参考ビデオ2をもう一度見ると、干渉縞の移動速度が急に遅くなる(ベール面での成長速度が急減)する時に、同時に干渉縞の揺らぎが結晶面全体に伝搬する現象が観察される。この揺らぎは、かなり段差の高いステップ(いわゆる、マクロステップ)が界面に沿って移動するために生じたと予測される。揺らぎの大きさは、干渉縞の1本分程度であるので、このマクロステップの段差は300nm 程度であると予測される。この段差は、AFGP の分子サイズ(3nm)より十分に高いので、界面に吸着した AFGP 分子はこのマクロステップの移動ですべて覆い隠されるであろう。すなわち、マクロステップが移動した直後は、界面には吸着した AFGP 分子が存在しない状態(裸の界面)になり、成長速度も急減したと考えられる。

3. 3節で述べた通り、今回の宇宙実験では、打ち上げ後のトラブルのため位相差顕微鏡画像が失われたために、マクロステップの挙動の直接観察は出来なかった。しかし、地上実験では、氷ベール面の位相差顕微鏡

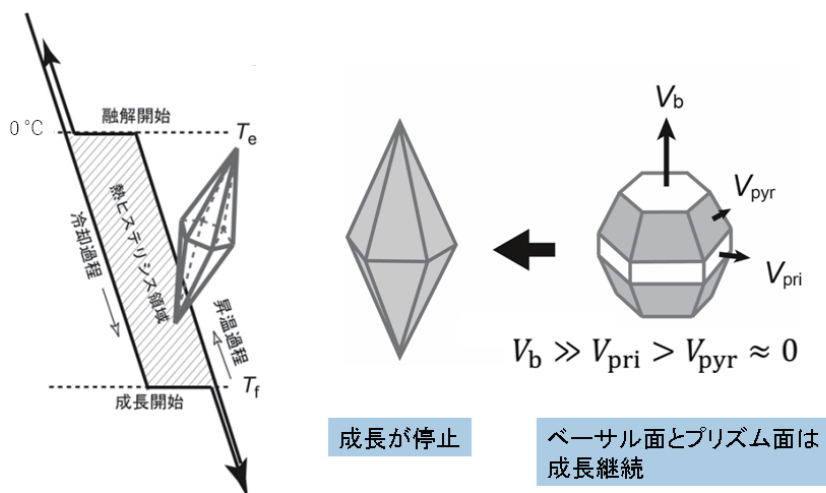


図14 AFGP による熱ヒステリシス効果。氷の成長開始温度 T_f と融点 T_e の差が熱ヒステリシス領域。この領域内では、ピラミッド面で囲まれた重六角錐十二面体結晶が存在する。この結晶形が生成されるためには、ベール面、プリズム面及びピラミッド面の成長速度の間に、 $V_b \gg V_{\text{pri}} > V_{\text{pyr}} \approx 0$ の関係が必要である。多面体結晶の成長が進行すると、最終的に最も成長速度の遅いピラミッド面のみで囲まれた結晶外形となり、これ以上の結晶成長は進行しない。

観察によって、AFGP 水溶液中で成長する氷ベーサル面には、マクロステップの運動が頻繁に観察されている。純水中で成長する氷ベーサル面上では、このようなマクロステップが観察されることは無いことから、AFGP の存在が氷の成長界面でのマクロステップの生成を促進している。

4. 9 AFGP 分子による生体の凍結抑制機構

最後に、凍結抑制タンパク質による生体の凍結を防ぐメカニズムについて再考する。従来は、凍結抑制タンパク質は氷の結晶成長を抑制するために生体の凍結を防ぐと説明されてきた。しかしながら、今回の宇宙実験で明らかになった結果は、氷のベーサル面については AFGP の効果によって成長速度が大幅に増加するという点である。これは、従来の理解では、生体の凍結抑制機構を十分説明できないことを意味している。しかし、実際にはベーサル面の成長速度が促進されることが、生体の凍結抑制機構の本質を支えるものであることを示す。

まず、AFGP 水溶液を容器に入れてゆっくり冷却するとき起きる現象について考える。図14左に示すように、水溶液の温度が融点 (T_e) 以下になると、水溶液中には氷の微結晶が発生する。しかし、この微結晶は融点以下の温度でもそこに存在するだけで、それ以上には成長しない。温度がさらに低下しある臨界の温度 (凍結温度 T_f) に達すると、微結晶は突然爆発的な成長を開始する。逆に、全凍結した状態から温度を上昇しても、 T_e に達するまで融解を開始しない。すなわち、AFGP 水溶液は、凍結温度と融点が異なり、両者の温度差を熱ヒステリシスと呼び、その大きさは AFGP 濃度に依存する[15]。

実際、熱ヒステリシスの温度範囲にある魚の血液中には氷微結晶が多数存在することが知られている。しかも、その外形は図14中に示すようなピラミッド面で囲まれた十二面体 (重六角錐) の形状を取り、大きさは数 $10\mu\text{m}$ の大きさを保っている[30、35、36]。この事実は重要で、次節で述べるように生体の不凍効果と結晶成長の抑制効果は、必ずしも同義ではないことを示唆している。

4. 10 AFGP 水溶液中での氷結晶の成長形

ここで、多面体結晶が成長するとき、その外形が決まる仕組みについて考えよう。多面体結晶の成長原理では、「多面体結晶を取り囲む平らな面のうち成長速度の速い面は、周囲の成長速度の遅い面で削り取られて徐々にその面積が減少する。その結果、最終的な結晶外形は最も成長速度の遅い結晶面だけで囲まれる。」という特徴を持つ。図15では、二次元結晶を例にとってこの原理を説明する。すなわち、初期結晶がベーサル面、プリズム面、ピラミッド面で囲まれた外形を持つ時に、各結晶面の成長速度の違いによって、その外形がどう変化するかを考える。まず、成長速度が $V_{\text{pyr}} > V_{\text{pri}} > V_b$ である場合には、結晶形は成長とともにピラミッド面が消失し、プリズム面とベーサル面で囲まれる。この両面は直交するため、これ以上の成長でいずれかの面が消失することはない、成長も継続する。これに対して、 $V_{\text{pyr}} < V_{\text{pri}} < V_b$ の関係が成り立つと、ベーサル面とプリズム面は成長とともに小さくなり、最終的にピラミッド面のみで囲まれた結晶形が実現する。

この原理に従って、不純物の効果がない純水中では、氷の結晶外形はベーサル面で挟まれた薄い円盤状であるので、プリズム面の成長速度はベーサル面より極端に遅い (図15(a) の場合に対応)。これに対し、AFGP 水溶液中では、ベーサル面の成長が加速されるので、 $V_b \gg V_{\text{pri}} > V_{\text{pyr}}$ の関係が実現するので、図14に示すようにベーサル面とプリズム面は成長とともに消失し、ピラミッド面で囲まれた十二面体結晶が実現する。すなわち、生体の凍結抑制のシナリオとして、以下のような機構が重要である。AFGP 水溶液を氷点下に冷却すると、氷結晶の核形成が起きる。生成された結晶粒は、最初は様々な結晶面で取り囲まれている。しかし、成長に伴って、成長速度の速いベーサル面とプリズム面は徐々に小さくなり、最終的にピラミッド面のみで取り囲まれた十二面体の結晶外形が生成される。ピラミッド面の成長速度は、極端に遅い (ゼロに近い) ので、十二面体結晶はこれ以上成長できない。

AFGP 分子は、吸着する結晶面の方位によって成長促進と成長抑制の正反対の機能 (異方的機能性) を持つことが、生体の凍結を防ぐメカニズムに重要な役割を果たしているのである。従来考えられてきたような、単に結

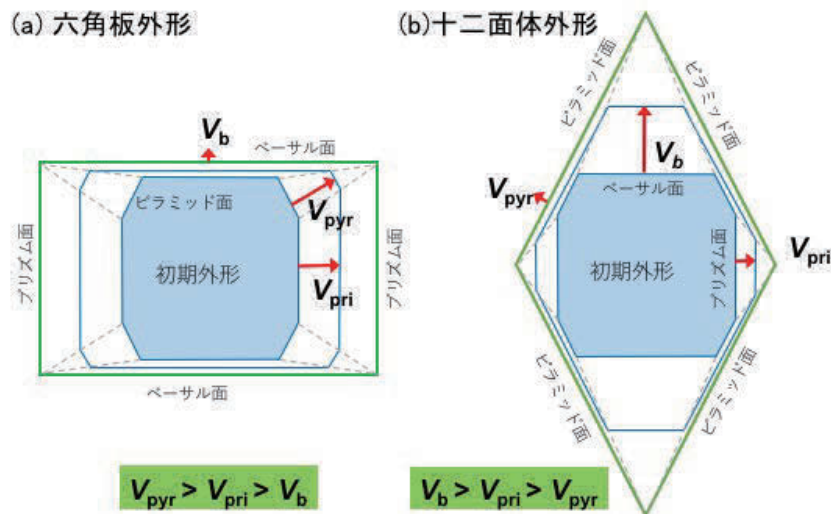


図15 多面体結晶の成長に伴う、外形の変化。分かりやすくするために、結晶の二次元断面図で表示している。結晶の初期外形は、ベーサル面、プリズム面、ピラミッド面で囲まれているとする。(a)それぞれの結晶面の成長速度が、 $V_{pyr} > V_{pri} > V_b$ の関係を持つ場合。最終的に、ベーサル面とプリズム面で囲まれた、横長の長方形結晶となる。(b)それぞれの結晶面の成長速度が、 $V_b > V_{pri} > V_{pyr}$ の関係を持つ場合。最終的に、ベーサル面とプリズム面は、結晶外形から消失し、最も成長速度の遅いプリズム面のみで囲まれた外形となる。

晶成長を抑制するという説明では、その本質を正しく説明したことにはならない。生体は凍結抑制タンパク質を活用することで凍死を免れる戦略を獲得しているが、単に不純物効果としての結晶成長抑制の機能を使うだけではなく、結晶の成長促進と多面体結晶の成長におけるパターン発展の基本原理を活用するより複雑な仕組みで、その機能を実現していると結論される。

4. 11 今後の展望

本研究により、機能性生体高分子の一つである AFGP 分子が氷の結晶成長をいかにして制御するのかというメカニズムがかなり明らかになってきた。しかし、本研究で実施された結晶成長速度の測定だけでは、個々の分子の界面吸着特性や、結晶成長カインेटイクスの変化の詳細については、直接的な情報を取得することが困難である。しかしながら、これまでは、水中で成長する氷結晶の界面において AFGP 分子の吸着挙動や分子レベルでの成長カインेटイクスを直接観察する手法が存在しなかった。近年、氷結晶の表面(氷-気体界面)では、新たに開発された顕微鏡を使って、水分子1個分の段差を持つ単位ステップの挙動や表面に局所的に存在する融解層の挙動などを、その場観察することが可能になっている[38]。しかし、氷-水界面に対しては、この方法をそのまま適用することは、現在もなお実現していない。しかし、すでにこのような実験を実現することを目指して外部研究資金を取得し、実験装置の開発が進行中である。近い将来、氷と水の界面でも、単位ステップの挙動や分子レベルでの成長カインेटイクスなどの直接観察が可能になると期待される。さらに、蛍光ラベルをつけた AFGP 分子により蛍光1分子観察法の適用も検討しており、このような観察が可能になると界面での個々の AFGP 分子の吸着挙動と成長ステップとの相互作用なども解明することが可能となるであろう。これらの研究は、AFGP の機能発現機構についての理解を深めるだけではなく、その機能性の活用にも新たなブレークスルーをもたらすであろう。本「きぼう」利用ミッションで得られた成果が、氷の結晶成長の研究だけではなく、結晶成長に

対するより一般的な不純物の役割、さらには極限寒冷環境における生体の生存戦略の解明という生物学の課題に対しても、新しい研究の方向性を示したと言えよう。さらに、AFGP 分子の新たな機能が明らかになったことで、新たな機能性タンパク質として、医療分野、食品分野、エネルギー分野を始めとして、従来以上に広範囲な分野での活用が推進されるであろう。

5. 結言

本実験により、以下の成果が得られた。

- ① 光反射係数がガラス表面の1/500程度の氷結晶界面からの反射光による光干渉画像の取得はこれまで不可能であったが、新たに開発した氷結晶成長装置(ICC2)ではこれを可能にし、宇宙実験においても高い確率で干渉縞画像を取得できた。
- ② 不凍糖タンパク質(AFGP)を含む過冷却水中で成長する氷結晶のベーサル面について、その成長速度が周期的に変動すること、及びその成長速度は純水中に比べて3-6倍も速くなる。
- ③ 不純物効果による結晶成長速度の促進や振動は、これまで地上実験レベルでは観察例がなかったが、対流などの擾乱を抑制できる微小重力環境での実験により初めて顕在化した現象で、宇宙実験で初めて明らかになった成果である。
- ④ 氷の成長界面に吸着した AFGP 分子は、吸着した面方位によって、成長を抑制(プリズム面とピラミッド面)する場合と促進(ベーサル面)する場合がある(異方的機能性)ことを明らかにした。
- ⑤ 結晶成長を促進するメカニズムとして、結晶成長界面に存在する成長ステップのエッジ面に吸着した AFGP 分子が、新たな成長ステップの発生源として作用することが指摘され、タンパク質などの生体高分子が不純物として作用する場合に特有の現象であると考えられる。
- ⑥ 本実験で観察された、不純物による結晶成長の促進効果がベースとなって発生する結晶成長速度の振動は、これまで全く知られていなかった現象であり、不純物効果が成長抑制の場合でも成長促進の場合でも発生しうることを明らかにした。
- ⑦ AFGP 分子の結晶成長に対する異方的効果は、生体が氷点下でも凍結せず生き延びることができるための戦略にとって本質的な役割を果たすことが明らかになった。
- ⑧ AFGP が氷結晶成長を促進するという結果は、結晶の成長を抑制して生体の凍結を防ぐという機能とは一見矛盾するよう見えるが、多面体結晶のパターン形成では最終的に速度の最も遅い面だけで囲まれると言う結晶成長の基本原則に従うと、両者は決して矛盾しないことが明らかになった。
- ⑨ AFGP 分子は結晶面ごとに異なる吸着特性を持つことが、結晶成長に対する異方的効果や生体の凍結を防ぐ機能発現のメカニズムに本質的に関係している。
- ⑩ AFGP の関与した氷結晶成長は生体内で起きる結晶成長の典型であり、新たな機能性材料の創製を目指すバイオ・クリスタリゼーションの分野とも関連が深い。
- ⑪ 凍結抑制タンパク質は、医療、食品、エネルギー分野などで活用が期待されているが、本研究成果によりその基本原理が明らかになり、その利用拡大にも資する。

謝辞

本宇宙実験の実施にあたり、多くの方々の支援をいただいた。ここでは、本報告の実施体制欄に記載できなかった方々のお名前を挙げて謝辞としたい。宇宙実験装置の開発では、真木孝雄氏、山本明日佳氏(オリンパス)、友部俊之氏(IHI エアロスペース)、福士博樹氏(北大低温研)、大田隆夫氏(北大電子研)の多大なるご協力を得た。AFGP の濃度の確定には、村上直子氏(AES)に協力を得た。さらに、宇宙実験の実施にあたっては、JAXA、JSF、JAMSS の「きぼう」運用担当、宇宙実験運用担当の多くの皆様の献身的な協力がなければ、本実験を成功に導くことはできなかった。以上の皆様に心から感謝する。また、ISS 及び「きぼう」において、実験装置

のメンテナンスにご尽力をいただいた若田光一宇宙飛行士を始め、関係の飛行士の皆様に御礼申し上げます。

参考文献

- [1] Y. Furukawa, 25 - Snow and Ice Crystal Growth, in: T. Nishinaga (Ed.) Handbook of Crystal Growth (Second Edition), Elsevier, Boston, 2015, pp. 1061-1112.
- [2] Y. Furukawa, G. Sazaki, H. Nada, Surface of Ice, in: K.S. Wandelt (Ed.) Surface and Interface Science, Wiley-VCH, 2014, pp. 305-348.
- [3] T. Fujioka, R.F. Sekerka, Morphological stability of disc crystals, *J. Cryst. Growth*, 24-25 (1974) 84-93.
- [4] Y. Furukawa, W. Shimada, Three-dimensional pattern formation during growth of ice dendrites — its relation to universal law of dendritic growth, *J. Cryst. Growth*, 128 (1993) 234-239.
- [5] J.S. Langer, R.F. Sekerka, T. Fujioka, Evidence for a universal law of dendritic growth rates, *J. Cryst. Growth*, 44 (1978) 414-418.
- [6] K. Nagashima, Y. Furukawa, Nonequilibrium effect of anisotropic interface kinetics on the directional growth of ice crystals, *J. Cryst. Growth*, 171 (1997) 577-585.
- [7] K. Nagashima, Y. Furukawa, Solute distribution in front of an ice/water interface during directional growth of ice crystals and its relationship to interfacial patterns, *J. Phys. Chem. B*, 101 (1997) 6174-6176.
- [8] K. Nagashima, Y. Furukawa, Time development of a solute diffusion field and morphological instability on a planar interface in the directional growth of ice crystals, *J. Cryst. Growth*, 209 (2000) 167-174.
- [9] E. Yokoyama, R.F. Sekerka, Y. Furukawa, Growth trajectories of disk crystals of ice growing from supercooled water, *J. Phys. Chem. B*, 104 (1999) 65-67.
- [10] E. Yokoyama, R.F. Sekerka, Y. Furukawa, Growth of an ice disk: dependence of critical thickness for disk instability on supercooling of water, *J. Phys. Chem. B*, 113 (2009) 4733-4738.
- [11] E. Yokoyama, I. Yoshizaki, T. Shimaoka, T. Sone, T. Kiyota, Y. Furukawa, Measurements of growth rates of an ice crystal from supercooled heavy water under microgravity conditions: basal face growth rate and tip velocity of a dendrite, *J. Phys. Chem. B*, 115 (2011) 8739-8745.
- [12] I. Yoshizaki, T. Ishikawa, S. Adachi, E. Yokoyama, Y. Furukawa, Precise measurements of dendrite growth of ice crystals in Microgravity, *Microgravity Sci. Technol.*, 24 (2012) 245-253.
- [13] P.L. Davies, J. Baardsnes, M.J. Kuiper, V.K. Walker, Structure and function of antifreeze proteins, *Phil. Trans. R. Soc. B: Biological Sciences*, 357 (2002) 927-935.
- [14] C.A. Knight, A.L. DeVries, Ice growth in supercooled solutions of a biological "antifreeze", AFGP 1-5: an explanation in terms of adsorption rate for the concentration dependence of the freezing point, *PCCP*, 11 (2009) 5749-5761.
- [15] Y. Yeh, R.E. Feeney, Antifreeze proteins: Structures and mechanisms of function, *Chem. Rev.*, 96 (1996) 601-618.
- [16] Y. Furukawa, N. Inohara, E. Yokoyama, Growth patterns and interfacial kinetic supercooling at ice/water interfaces at which anti-freeze glycoprotein molecules are adsorbed, *J. Cryst. Growth*, 275 (2005) 167-174.
- [17] Y. Uda, S. Zepeda, F. Kaneko, Y. Matsuura, Y. Furukawa, Adsorption-induced conformational changes of antifreeze glycoproteins at the ice/water interface, *J. Phys. Chem. B*, 111 (2007) 14355-14361.
- [18] S. Zepeda, S. Nakatsubo, Y. Furukawa, Apparatus for single ice crystal growth from the melt, *Rev. Sci. Instrum.*, 80 (2009) 115102.
- [19] S. Zepeda, Y. Uda, Y. Furukawa, Directly probing the antifreeze protein kinetics at the ice/solution interface, *J.*

Jpn Assoc. Cryst. Growth., 35 (2008) 151-160.

[20] A. Chernov, Crystal growth and crystallography, *Acta Cryst. Section A*, 54 (1998) 859-872.

[21] G. Müller, Convection and inhomogeneities in crystal growth from the melt, in: *Crystal Growth from the Melt*, Springer Berlin Heidelberg, 1988, pp. 1-136.

[22] K. Sangwal, K.W. Benz, Impurity striations in crystals, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.*, 32 (1996) 135-169.

[23] C. Ferreira, F.A. Rocha, A.M. Damas, P.M. Martins, On growth rate hysteresis and catastrophic crystal growth, *J. Cryst. Growth*, 368 (2013) 47-55.

[24] N. Kubota, Effect of impurities on the growth kinetics of crystals, *Cryst. Res. Technol.*, 36 (2001) 749-769.

[25] N. Kubota, Effects of cooling rate, annealing time and biological antifreeze concentration on thermal hysteresis reading, *Cryobiology*, 63 (2011) 198-209.

[26] N. Kubota, M. Yokota, N. Doki, L.A. Guzman, S. Sasaki, J.W. Mullin, A mathematical model for crystal growth rate hysteresis induced by impurity, *Cryst. Growth Des.*, 3 (2003) 397-402.

[27] H. Miura, K. Tsukamoto, Role of impurity on growth hysteresis and oscillatory growth of crystals, *Cryst. Growth Des.*, 13 (2013) 3588-3595.

[28] A. Chernov, Crystallization processes, in: *Modern crystallography*, Springer-Verlag, Berlin, 1984, pp. 1-296.

[29] K. Harrison, J. Hallett, T.S. Burcham, R.E. Feeney, W.L. Kerr, Y. Yeh, Ice growth in supercooled solutions of antifreeze glycoprotein, *Nature*, 328 (1987) 241-243.

[30] S. Zepeda, E. Yokoyama, Y. Uda, C. Katagiri, Y. Furukawa, In situ observation of antifreeze glycoprotein kinetics at the ice interface reveals a two step reversible adsorption mechanism, *Cryst. Growth Des.*, 8 (2008) 3666-3672.

[31] S. Zepeda, H. Nakaya, Y. Uda, E. Yokoyama and Y. Furukawa, Diffusion, incorporation, and segregation of antifreeze glycoproteins at the ice/water interface., in: W.F. Kuhs (Ed.) *Physics and Chemistry of Ice*, RSC Publishing, London, 2007, pp. 669-676.

[32] K. Nagashima, Y. Furukawa, Interferometric observation of the effects of gravity on the horizontal growth of ice crystals in a thin growth cell, *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 147 (2000) 177-186.

[33] H. Nada, Y. Furukawa, Growth inhibition mechanism of an ice–water interface by a mutant of winter flounder antifreeze protein: A Molecular Dynamics Study, *J. Phys. Chem., B*, 112 (2008) 7111-7119.

[34] H. Nada, Y. Furukawa, Growth inhibition at the ice prismatic plane induced by a spruce budworm antifreeze protein: a molecular dynamics simulation study, *PCCP*, 13 (2011) 19936-19942.

[35] R.A. Brown, Y. Yeh, T.S. Burcham, R.E. Feeney, Direct evidence for antifreeze glycoprotein adsorption onto an ice surface, *Biopolymers*, 24 (1985) 1265-1270.

[36] C.A. Knight, E. Driggers, A.L. DeVries, Adsorption to ice of fish antifreeze glycopeptides 7 and 8, *Biophys. J.*, 64 (1993) 252-259.

[37] A.I. Ahmed, R.E. Feeney, D.T. Osuga, Y. Yeh, Antifreeze glycoproteins from an Antarctic fish. Quasi-elastic light scattering studies of the hydrodynamic conformations of antifreeze glycoproteins, *J. Biol. Chem.*, 250 (1975) 3344-3347.

[38] G. Sasaki, S. Zepeda, S. Nakatsubo, E. Yokoyama, Y. Furukawa, Elementary steps at the surface of ice crystals visualized by advanced optical microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107 (2010) 19702-19707.

成果リスト

論文

1. Antifreeze effect of carboxylated ϵ -poly-L-lysine on the growth kinetics of ice crystals, Dmitry A. Vorontsov, Gen Sasaki, Suong-Hyu Hyon, Kazuaki Matsumura, and Yoshinori Furukawa. *J. Phy. Chem.*, B118 (2014) 10240-10249.
2. Oscillations and accelerations of ice crystal growth rates in microgravity in presence of antifreeze glycoprotein impurity in supercooled water, Yoshinori Furukawa, Ken Nagashima, Shun-ichi Nakatsubo, Izumi Yoshizaki, Haruka Tamaru, Taro Shimaoka, Takehiko Sone, Etsuro Yokoyama, Salvador Zepeda, Takanori Terasawa, Harutoshi Asakawa, Ken-ichiro Murata, Gen Sasaki, *Scientific Reports*, 7:43157 (2017), doi:10.1038/srep43157.

解説

1. 不凍タンパク質による氷の成長制御機構-結晶成長の抑制と促進-, 古川義純, 化学と工業, Vol. 69-8, 640-642, (2014).

学会発表(招待講演のみ)

1. 不凍タンパク質による氷結晶成長の制御, 古川義純, 第7回「融合マテリアル」公開シンポジウム, 2013年5月20日, 慶應義塾大学日吉キャンパス.
2. Self-oscillatory growth of ice crystal -Microgravity experiments in Kibo of ISS-. Y. Furukawa, 24th AACGE Western Section Conference on Crystal Growth & Epitaxy, Stanford Siera Camp, Fallen Leaf Lake CA, June 8-11, 2014.
3. Oscillatory growth of ice crystal in the solution of antifreeze glycoprotein., Y. Furukawa, 2nd Ice Binding Protein Conference (IBP-2), Sapporo, Japan, August 5-7, 2014.
4. Oscillatory growth of ice crystal induced by effect of antifreeze glycoprotein. Y. Furukawa, FMSP Tutorial Symposium, Symposium on Mathematics for Various Discipline 13, “Mathematical Aspects of Surface and Interface Dynamics VIII”, University of Tokyo, 22-24 October 2014.
5. 不凍糖タンパク質による氷結晶成長制御ー成長速度の促進と振動, 古川義純, 大阪電気通信大学エレクトロニクス研究所ワークショップ「氷の準液体相と不凍現象」, 2014年11月14-15日, 大阪電気通信大学.
6. 不凍糖タンパク質が制御する氷の振動成長, 古川義純, 長嶋剣, 横山悦郎, 田丸晴香, 吉崎泉, 島岡太郎, 第45回結晶成長国内会議, 2015年10月21日, 札幌.
7. Oscillatory Growth of Ice Basal Face Observed in Supercooled Water with Antifreeze Glycoprotein -Ice Crystal 2 Experiments, Y. Furukawa et al., 6th International Symposium on Physical Science in Space, Kyoto, 14-18 September, 2015.
8. Adsorption of antifreeze glycoprotein on ice-water interface and its effect for crystal growth kinetics, Y. Furukawa, 新学術領域「柔らかな分子系」「氷の分子科学」シンポジウム, 埼玉大学, 2017年5月13日.
9. Anisotropic functions of antifreeze glycoproteins, Y. Furukawa, 3rd Ice Binding Proteins Conference, Rehovot, Israel, 14-17 August 2017.

新聞発表

1. 国際宇宙ステーション日本実験棟「きぼう」で氷の結晶成長の実験, 氷から生物科学の最先端へ 朝日新聞 2014/01/01
2. 「流水直下でも凍らない魚」「不凍糖タンパク質の作用解明」北海道新聞 2017/03/07

本宇宙実験に関するアウトリーチ活動(一般、高校生向け講演・実習)

1. 氷の結晶成長と宇宙実験, 古川義純, 第 51 回高教研理科研究大会理科部会集会物理分科会講演, 2014 年 1 月 10 日, 私立札幌大通高等学校.
2. 雪氷学研究の意義と最先端研究～「宇宙で作る氷の結晶-ISS「きぼう」での無重力実験特別講義」: 古川義純, 2014 年 6 月 19 日, 札幌日大高校.
3. 雪氷学研究の意義と最先端研究～「札幌日大高校特別実習」: 古川義純, 佐崎元, 長嶋剣, 麻川明俊, 2014 年 6 月 26 日, 低温科学研究所.
4. 「結晶は生きている」: 札幌市立開成高校コズモサイエンス科先端科学特論: 古川義純, 佐崎元, 長嶋剣, 麻川明俊, 2014 年 10 月 25 日, 低温科学研究所.
5. 宇宙実験でわかった氷の結晶成長の秘密, 古川義純, 低温科学研究所公開講座「低温の魅力～低温科学の最前線～」, 2014 年 11 月 17 日, 低温科学研究所.
6. 雪氷学研究の意義と最先端研究～「札幌日大高校特別講義」: 古川義純 2015 年 6 月 2 日, 札幌日大高校.
7. 雪氷学研究の意義と最先端研究～「札幌日大高校特別実習」: 古川義純, 佐崎元, 長嶋剣, 村田憲一郎, 2015 年 6 月 16 日, 低温科学研究所.
8. 「結晶は生きている」: 札幌市立開成高校コズモサイエンス科先端科学特論: 古川義純, 佐崎元, 長嶋剣, 村田憲一郎, 2015 年 10 月 24 日, 低温科学研究所.
9. 結晶は生きている「札幌日大高校特別スーパーグローバルハイスクール SGS 特別授業」: 古川義純, 2016 年 1 月 28 日, 低温科学研究所.
10. 結晶は生きている「札幌日大高校 SSH 特別授業・実習」: 古川義純, 佐崎元, 長嶋剣, 村田憲一郎, 2016 年 6 月 16 日, 低温科学研究所.
11. 「結晶は生きている」: 札幌市立開成高校コズモサイエンス科先端科学特論: 古川義純, 佐崎元, 長嶋剣, 村田憲一郎, 2016 年 10 月 29 日, 低温科学研究所.

本研究課題に関連する発表論文

1. Roles of surface/volume diffusion in the growth kinetics of elementary spiral steps on ice basal faces grown from water vapor, Harutoshi Asakawa, Gen Sazaki, Etsuro Yokoyama, Ken Nagashima, Shunichi Nakatsubo, and Yoshinori Furukawa, *Crys. Growth Des.*, 14, 3210-3220 (2014).
2. Attachment and detachment processes of individual lysozyme molecules on a surface of a monoclinic lysozyme crystal studied by fluorescent single-molecule visualization, Guoliang Dai, Lei Zheng, Gen Sazaki, and Yoshinori Furukawa, *Cryst. Growth Des.*, 14, 5303-5309, (2014).
3. Double spiral steps on Ih ice crystal surfaces grown from water vapor just below the melting point, Gen Sazaki, Harutoshi Asakawa, Ken Nagashima, Shunichi Nakatsubo, and Yoshinori Furukawa, *Cryst. Growth Des.*, 14, 2133-2137, (2014).
4. Prism and other high-index faces of ice crystals exhibit two types of quasi-liquid layers. H. Asakawa, G. Sazaki, K. Nagashima, S. Nakatsubo, Y. Furukawa, *Crystal Growth & Design*, 15 (7), 3339-3344 (2015).
5. In situ determination of surface tension-to-shear viscosity ratio for quasiliquid layers on ice crystal surfaces: K. Murata, H. Asakawa, K. Nagashima, Y. Furukawa, G. Sazaki, *Phys. Rev. Lett.* 115, 256103 (2015).
6. Two types of quasi-liquid layers on ice crystals are formed kinetically: H. Asakawa, G. Sazaki, K. Nagashima, S. Nakatsubo, Y. Furukawa, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 113 (7), 1749-1753 (2016).
7. Direct visualization of quasi-liquid layers on ice crystal surfaces induced by hydrogen chloride gas: K.

Nagashima, G. Sazaki, T. Hama, H. Asakawa, K. Murata, Y. Furukawa, *Crystal Growth & Design*, 16 (4), 2225-2230 (2016).

8. Thermodynamic origin of surface melting on ice crystals, Ken-ichiro Murata, Harutoshi Asakawa, Ken Nagashima, Yoshinori Furukawa and Gen Sazaki, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, vol. 113 no. 44 E6741-E6748, (2016). doi: 10.1073/pnas.1608888113.

本研究課題に関連する著書(宇宙実験に言及したもの)

1. Surface of Ice, Y. Furukawa, G. Sazaki and H. Nada, Chapter VII of Volume 3: Surfaces of Multi-component Solids (Alloys, Compound, Semiconductors), Surface and Interface Science, Ed. K. Wandelt, (Wiley-VCH, 2013)305-348.
2. Snow and ice crystal growth, Furukawa Y (2014) Ed. Nishinaga T, Chapter 25:Handbook of Crystal Growth, Vol. I. Elsevier, pp1061-1112. ISBN: 9780444563699 (2014).
3. 氷および雪の結晶成長, 佐崎元, 古川義純, 長島剣, 村田憲一郎, 丸善, 低温科学便覧, pp11-49(2015年10月), ISBN978-4-621-08964-4.

本研究課題に関連する受賞

1. 中坪俊一 日本化学会 第30回化学技術有功賞「氷の結晶成長宇宙実験装置の設計と製作」に関する業績(平成24年3月26日受賞)
2. 古川義純 形の科学会 論文賞「Crystal Growth Experiments of Ice in Kibo of ISS」(平成27年6月13日受賞)

本研究課題に関連する外部研究資金の獲得状況

1. 科学研究費挑戦的萌芽研究 代表 古川義純「界面素過程の非線形性に起因する結晶成長の自発成長振動—宇宙実験による検証—」. 2013-2015年度. 3, 640千円.
2. 科学研究費基盤研究(B) 代表 古川義純「不凍タンパク質の機能は吸着氷界面の方位で異なる—氷結晶成長の促進と抑制機構の解明」. 2014-2017年度. 16, 900千円.
3. 科学研究費挑戦的萌芽研究 代表 佐崎元「不凍タンパク質が示す相互作用の解明:拡散・吸着ダイナミクスの蛍光1分子計測」. 2016-2018年度. 3, 510千円.