

# 宇宙航空研究開発機構特別資料

## JAXA Special Publication

---

### 宇宙でのタンパク質結晶表面その場観察実験

吉崎 泉, 塚本 勝男

2014年2月

宇宙航空研究開発機構

Japan Aerospace Exploration Agency

# 宇宙でのタンパク質結晶表面その場観察実験\*

吉崎 泉<sup>\*1</sup>, 塚本 勝男<sup>\*2</sup>

## In situ measurement of protein crystal growth rate in microgravity\*

Izumi YOSHIZAKI<sup>\*1</sup> and Katsuo TSUKAMOTO<sup>\*2</sup>

### ABSTRACT

A real time “in situ” measurement of a protein crystal growth rate was successfully achieved on board the International Space Station. The hardware development which supported this precise measurement is described in detail.

### 概要

2012 年, 国際宇宙ステーションにて, タンパク質結晶が成長する様子を“その場”観察し, 成長速度を詳細に計測することに成功した. 本論文では, 精密なその場観察を可能にした装置開発上の様々な工夫を中心にまとめる.

### 1. はじめに

宇宙では対流がないために, 高品質な結晶を育成できると考えられ, 1990 年代から数多くのタンパク質結晶育成実験がスペースシャトルなどの実験機会を使って実施されてきた. 結晶を地上に持ち帰り, X 線結晶構造解析を行うと, 実際に回折分解能が向上している例も多く, タンパク質の詳細構造解析に役立っている. その一方で, 宇宙で結晶品質が向上する要因について, 詳細に検討された事例はほとんどなかった.

タンパク質結晶はまず, 溶液中で結晶核を生成し, その後, 溶液中の溶質 (タンパク質分子) を取り込みながら徐々に成長する. そのため, 結晶核周辺の溶質濃度は低くなる. 地上ではこの結晶核周辺の濃度勾配は密度差対流により乱されるが, 宇宙では乱されることがなく維持されるため, 結晶は溶質濃度の低い中で成長することになり, 結晶の成長速度

---

\* 平成 25 年 12 月 17 日受付 (Received 17 December 2013)

\*1 宇宙航空研究開発機構 宇宙科学研究所 ISS 科学プロジェクト室  
(ISS Science Project Office, JAXA / ISAS)

\*2 東北大学 理学研究科  
(Graduate School of Science, Tohoku University)

が低下し、その結果、結晶欠陥が減少し品質向上につながる、というのが、これまで考えられてきた主な品質向上メカニズムである（不純物についても、宇宙では取り込みが少なくなるのではないかと考えられている）。しかし、宇宙で実際に結晶の成長速度が小さくなるという現象をその場観察した例はない。そこで、筆者らは結晶成長速度を精密に計測することが可能な、小型干渉計を搭載した装置を開発し、結晶成長速度をリアルタイムで計測することを計画した。この実験は「きぼう」2期利用テーマ募集に応募され、2008年2月にフライト候補テーマとして採択された。テーマ名は「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」（代表研究者：塚本勝男教授、実験略称：NanoStep）である。試料としては、モデルタンパク質リゾチームを用い、過去の実験結果との比較ができるようにした。実験は2012年に「きぼう」にて成功裡に実施されたが、本論文では、実験専用開発した機器の詳細、および運用・解析方法についてまとめる。

## 2. 本論

本実験は、「きぼう」内に設置されている溶液結晶化観察装置（SCOF）を用いて実施した。SCOFには振幅変調顕微鏡・マッハツェンダ型干渉計等が搭載されている。マッハツェンダ型干渉計では、タンパク質結晶界面近傍での溶質濃度低下を検出することができる。SCOF内に、NanoStep実験専用機器を取り付け、NanoStep機器内の観察系も併用して結晶観察を行った。結晶はSCOFとNanoStepの光学系を用い、直行する二方向から観察できる（図1）。専用機器内に設置された試料部の温度制御・計測やモーター制御等は、SCOFを介して地上から行った。

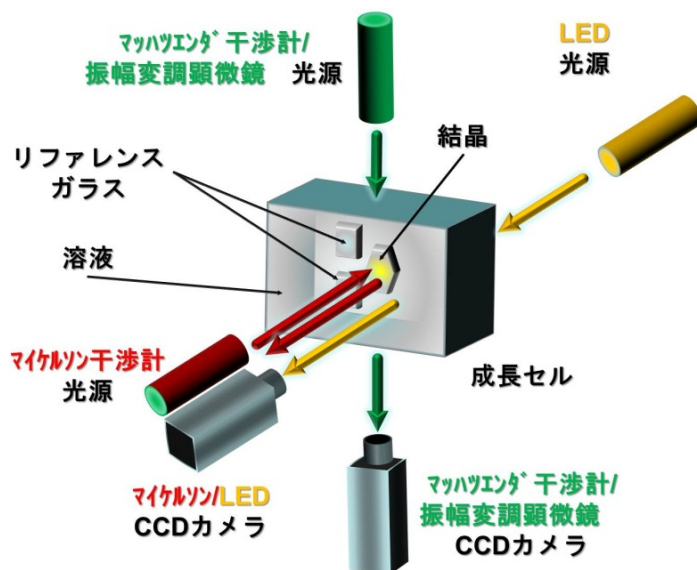


図1 結晶観察の概念図

## 2.1 光学系

専用機器の内部を図 2 に示す．機器内部には，マイケルソン型反射干渉計を準備した．干渉計の光源はレーザー光であるが，このレーザー光を試料光と参照光に分け，それらの光が試料（結晶）表面と参照板表面で反射して戻ってくる光を干渉させる（図 3）．これにより，結晶表面の凹凸に応じて，干渉縞が表れる．結晶が成長するのに伴い，レーザー光源と結晶表面との距離が短くなるため，干渉縞が移動し，結晶の成長速度を算出することができる．試料溶液の屈折率を  $n$  とするならば，干渉縞の暗線が次の暗線位置まで移動すると，レーザー光源の波長(532nm)の半分を屈折率  $n$  で割った値，つまり  $266/n(\text{nm})$  ぶんだけ，結晶の厚みが増加したことになる．この実験での溶液の屈折率  $n$  は 1.34 であるから，約 198nm の厚みの増加である．このように，光の波長を物差しとして，成長量を短時間に正確に測れることを示したのは，TR-1A4 号機(1995)による宇宙実験で，本研究の代表研究者が硝酸バリウム結晶の成長速度を測定したのが世界で最初であった．

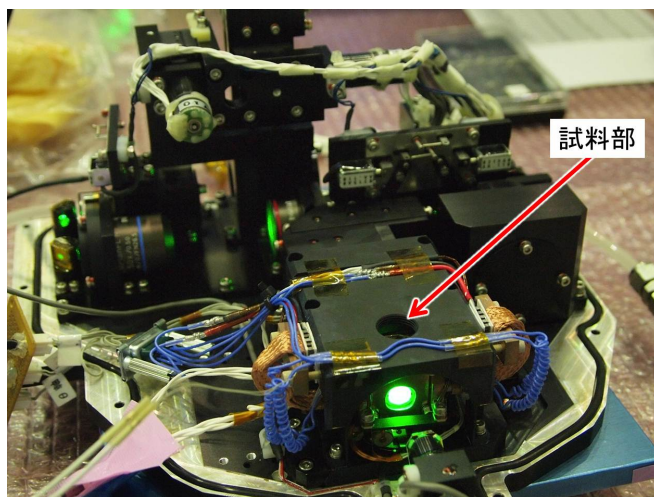


図 2 専用機器内部

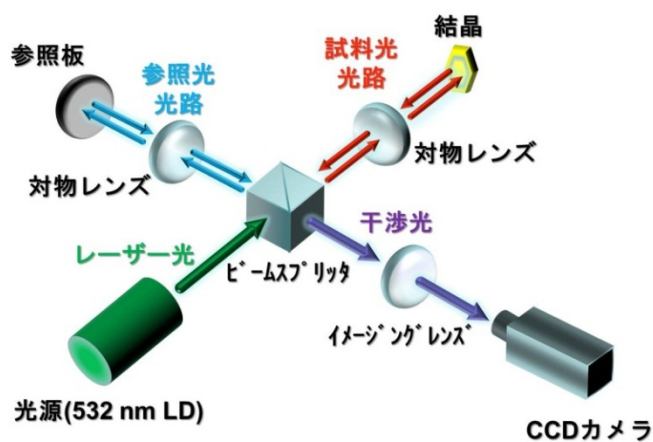


図 3 マイケルソン干渉計光路図

干渉縞を出すためには、試料表面に対し、レーザー光が完全に垂直に照射される必要がある。すなわち、結晶の角度を精密に制御する必要がある。本実験では、2つの工夫により、角度制御を行った。まず1つ目は、結晶の基板への接着である。タンパク質結晶は非常に脆く、接着剤で基板に接着することは困難である。そこで、結晶を化学的に処理することにより<sup>1,2</sup>、結晶を硬くして基板に接着し、角度を固定した。このとき、結晶表面が成長セルのガラス表面と平行であると、結晶表面からの弱い反射光がガラス表面からの反射光に隠れてしまうため、結晶の角度は3°ずらすようにした。

2つ目の工夫は、セルステージの開発である。地上で化学処理した種結晶を基板に固定していても、成長中に角度が微妙に変動する。このため、結晶を入れた成長セルは、3軸が駆動するセルステージの上に載せ、地上からの回転・あおり・焦点の調整を可能にした。専用機器内の空間の制約が厳しいため、セルステージは超音波モータを用いて小型（約40mm×40mm×17mm）のものを作製した。これにより、結晶表面の干渉縞を得ることができた。

## 2.2 試料セル部

今回の実験では、さまざまな過飽和度（結晶成長の駆動力）における結晶成長速度・表面モルフォロジーを捉えることを目的とした。過飽和度 $\sigma$ は以下のように定義される。

$$\sigma = \ln \frac{C}{C_e}$$

$C$  は溶液中の溶質濃度、 $C_e$  は溶解度である。過飽和度の変動は、溶質濃度を変えることで実現できるが、そのためには成長セルを多数準備する必要がある。セル交換にはクルーによる作業が必要であるため、あまり多数のセルを準備するのは現実的ではない。一方、溶液中のタンパク質の溶解度 $C_e$ は温度に依存するため、温度を変動させることで過飽和度を変えることができる。今回は、温度制御による過飽和度変動方式を採用し、セルの個数は3個に抑えた。（セル1：リゾチームは高純度に精製したもので濃度は30mg/ml、セル2：市販のリゾチームで濃度は35mg/ml、セル3：市販のリゾチームで濃度は30mg/ml。塩濃度はすべて2.5%NaClで緩衝液は酢酸ナトリウムバッファーpH4.5である）。

温度制御は、ペルチェ素子を用いて行った。制御範囲は7~40℃である。まず成長セルを熱伝導のよい銅のブロックではさみ、銅ブロックの両脇にペルチェ素子を配置する。ペルチェ素子は、熱を移動させる素子であるため、成長セルを冷やす場合には、ペルチェ素子の反対側の面は熱くなる。その排熱をうまく逃がさないと制御不能となるため、排熱用の銅リボン挟むなどの工夫をした。

また、温度を上げ下げする際に、銅ブロックや成長セルがそれぞれ異なる膨張率で膨張したり収縮したりするため、成長セルと銅ブロックの間に隙間が生じる可能性があった。そこで、多少の膨張・収縮があっても隙間ができないよう、ばねネジを用いて銅ブロックをガラスセルに締め付けることとした。試料セル部、成長セルの写真を図4に示す。

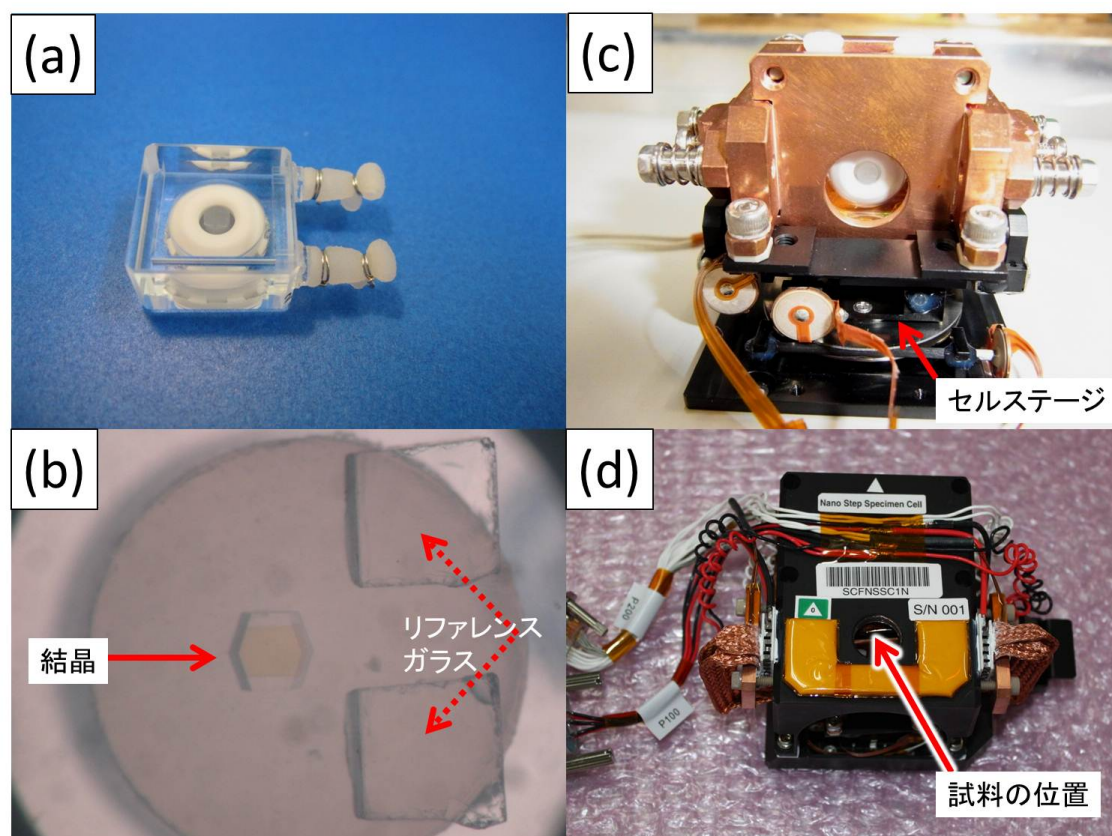


図4 (a) 成長セル（外形 15mm×15mm×9mm）. (b) 成長セルの内部で接着されているリゾチーム結晶とリファレンスガラス．結晶のサイズは 300 $\mu$ m 程度．(c) 成長セルを銅ブロックに挟み、セルステージに搭載した写真．(d) セルステージごと、成長セルを試料部に収納した写真．外形約 80mm×60mm×50mm．

温度変化による成長セルの膨張・収縮に関連し、成長セル内にはリファレンスガラスを固定した。リファレンスガラスは、成長セルと同じ石英ガラスでできており、成長セルと同様に膨張・収縮する。温度変化をかけた直後は、結晶表面の干渉縞が激しく移動するが、これは実際に結晶が成長あるいは溶解しているのではなく、成長セルの膨張・収縮により、試料光の通る光学距離が変動しているに過ぎない。同じ変化がリファレンスガラスにも起きるため、成長セル内に固定したリファレンスガラス上に表れる干渉縞の動きを観察する



ことで、結晶上の縞の動きが、実際の結晶表面の変化であるのかどうかを判別することができるのである。

リファレンスガラスは、実験データ取得中にも活用した。温度変化中でなくとも、温度制御のアルゴリズムや、環境中の何らかの変化により、リファレンスガラス上の干渉縞に微小な移動が見られることがある。こうした場合には、その変動分を、結晶上の干渉縞の移動から差し引きし、正確な成長速度を算出することとした。

## 2.3 運用

NanoStep 実験用専用機器は、2012 年 7 月のこのとり 3 号機で打ち上げられ、星出宇宙飛行士により SCOF に取り付けられた。前述のとおり、試料部は 3 つあり、それぞれリゾチーム濃度・不純物濃度の異なる溶液が成長セルに充填されている。1 つの成長セルごとに、35 日の時間をかけて、実験を行った。まず最初の 1 週間では温度を上げ、種結晶以外のすべての微結晶を溶解させた。種結晶は化学処理されており、溶解しないが、過飽和条件になると成長するという特性を持つ<sup>1,2</sup>。続く 2 週目では過飽和にし、種結晶の上にエピタキシャル成長させ、平滑な表面を作った。結晶の変化を図 5 に示す。その後は、温度を変化させることで過飽和度を変え、マイケルソン型干渉計を用いた結晶成長速度の計測、表面モルフォロジーの取得、結晶近傍の濃度場の計測を行った。結晶表面の干渉縞の例を図 6 に示す。

できるだけよい微小重力環境にて実験するために、データ取得は宇宙飛行士が寝静まる宇宙ステーションの夜間に行った。宇宙ステーションではグリニッジ標準時(GMT)を採用しているため、GMT での夜間は日本時間 JST の日中となり、地上のサポート要員にとっても都合がよい。夜間の g レベルは、対流発生に影響があると考えられる 1Hz 以下の周波数では、 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ g}$  程度であった。

実験データの解析は、2.4 項に示すとおり、最終的にはソフトウェアを用いて詳細に行ったが、実験結果を速やかに翌日の実験条件に反映するため、リアルタイムで簡易解析を行った。結晶表面の干渉縞が映っている CCD 画像を大画面に表示し、縞の位置が時間と共に徐々に動いていくのを付箋紙と定規を駆使して計測していくのである。これにより、迅速におおよその結果を知ることができ、効率的に実験することができた。

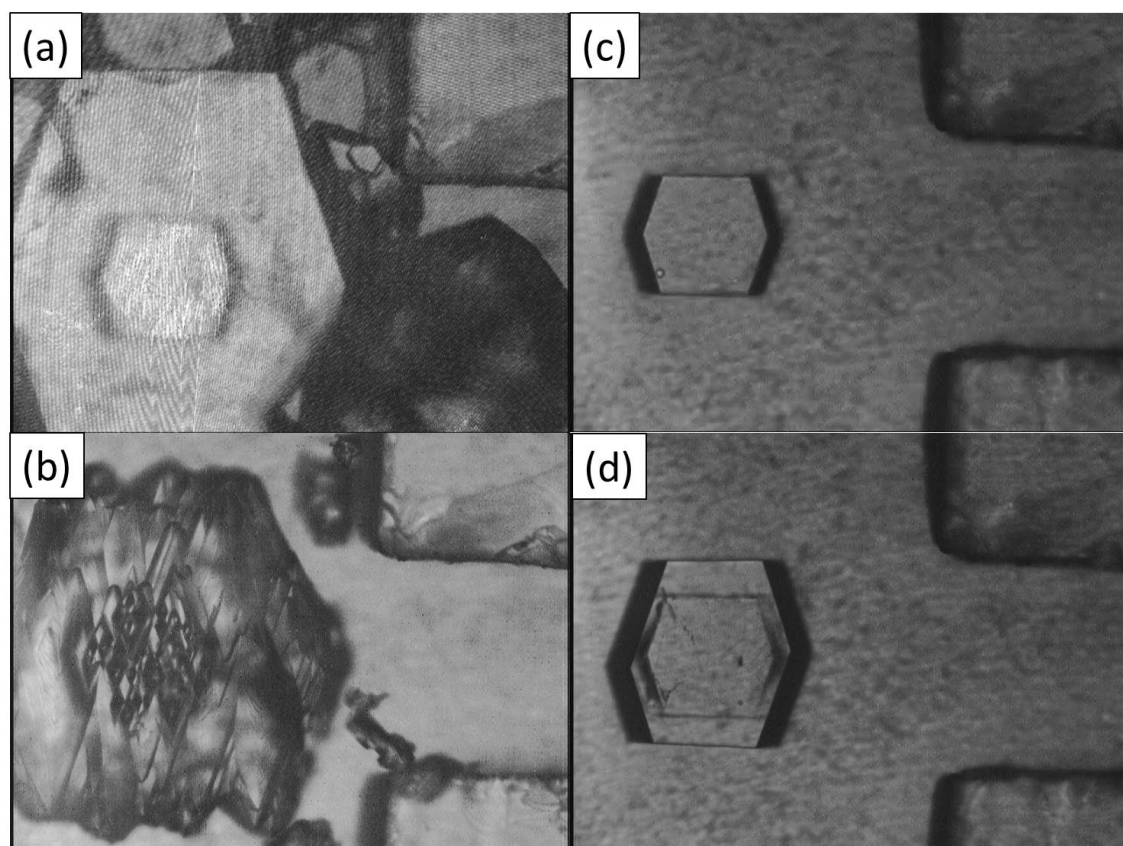


図 5 (a) 実験開始直後の様子. 種結晶が大きく成長しているとともに, 微結晶が多数みられる. (b) 温度を上げて, 余分な微結晶を溶解. (c) 種結晶とリファレンスガラスのみになった画像. (d) 種結晶がエピタキシャル成長し, 平滑な表面になったところ. 画像サイズはすべて 0.96mm×1.28mm.



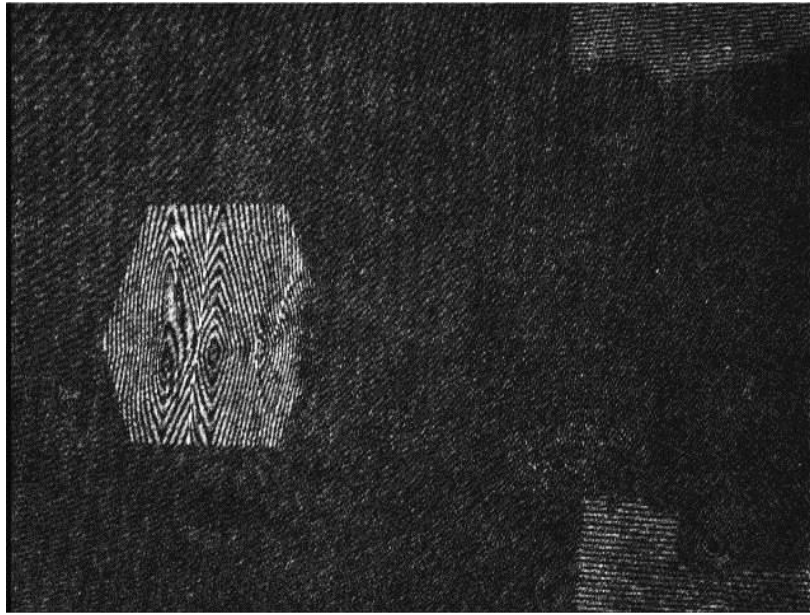


図 6 結晶表面とリファレンスガラス上の干渉縞．画像サイズは 0.96mm×1.28mm．

## 2.4 解析

成長速度の“その場”解析は，東北大学が干渉縞の測定用に製作したソフトウェアを用いて行った．ソフト上に動画を読み込み，ある一点上の干渉輝度変化を時間でプロットするのである．干渉縞の白黒の縞模様が次々に通過していくため，輝度の周期を調べることで，成長速度を計算することができる．成長速度が遅い場合は，図 7(a)のように画面上に任意の線を引く．その線上の輝度の時間変化（タイムライン）をとり，その傾きから成長速度を精密に調べた<sup>3,4</sup>．

また，らせん成長丘の傾斜角度や成長ステップ成長速度の条件依存性を，地上実験と同じ精度で求めた．

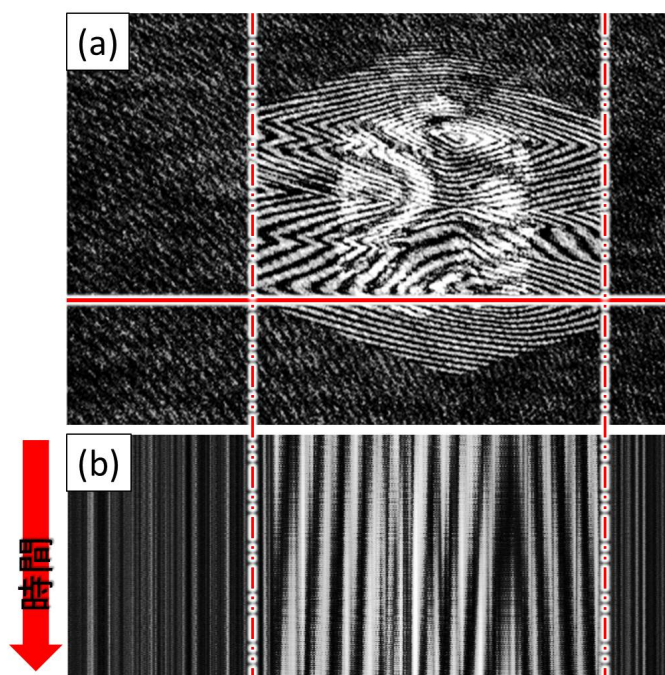


図 7 ソフトウェアでの解析方法. (a)の画面上で任意の線を引く. (最大 6 本の線を引くことが可能). その線上での輝度の時間変化を示したものが(b). 成長丘を中心に干渉縞が移動しているので(b)に傾きが得られる. その傾きより成長速度が精密に計測できる.

### 3. まとめ

長期間の微小重力を安定的に得られるという環境をフルに活用し、2012 年 8 月から 12 月までかけて 3 つの成長セルでの実験を終了した. 従来、宇宙では地上に比べると簡易的な測定しかできなかったが、今回の宇宙実験で、地上の実験室と同等の精度で地上実験と比較できるようになった意義は大きい. この鍵となったのは 2.1 項や 2.2 項で記載した様々な工夫による (より詳細な装置仕様に関しては、参考論文 5 にまとめたため、参照されたい). 加えて、代表研究者らが長年にわたり積み重ねてきたその場観察のための装置・光学系開発と、結晶成長メカニズム研究の経験によるところが大きい.

現在、詳細解析を継続しているが、地上実験からは得られない興味深い結果が得られている. 複数の科学論文にまとめており、一部はすでに公表済みである.

## 謝辞

本実験は数多くの方々とプロジェクトチームを組むことで初めて実現した。敬称略でメンバーを紹介する。供試体の全体設計・製作は友部俊之を中心に、株式会社 IHI エアロスペースが担当した。光学系は真木孝雄、山本明日香（オリンパス株式会社）、セルステージは金鐘一（テクノハンズ株式会社）により開発された。曾根武彦（有人宇宙システム株式会社）、島岡太郎（一般財団法人日本宇宙フォーラム）には、開発段階からの技術支援、試験の実施など多大な支援をいただいた。福山誠二郎（株式会社エイ・イー・エス）、山崎智也、忍健太郎（東北大学）は試料準備を担当した。東北大学の学生諸氏、橘勝教授および横浜市立大学の学生諸氏、鈴木良尚准教授および徳島大学の学生諸氏は解析を担当した。横峰誠（株式会社東陽テクニカ）には、ソフトウェアの“その場”解析に必要なプラグインを作成いただいた。また、浜松ホトニクス株式会社からは画像処理装置を、サンゴバン株式会社からは低透湿性チューブを、株式会社スリーボンドからは特殊な接着剤の提供を受けた。以上記して深謝する。

## 参考文献

- 1 Y. Iimura, I. Yoshizaki, L. Rong, S. Adachi, S. Yoda, and H. Komatsu, “Development of a reusable protein seed crystal processed by chemical cross-linking” *Journal of Crystal Growth* 275 (2005) 554-560.
- 2 吉崎泉, 栄龍, 足立聡, 依田眞一, 小松啓, 飯村好和, 福山誠二郎「タンパク質結晶成長研究における化学固定法の利用」JAXA-RR-05-035 (2006)
- 3 A. E. S. Van Driessche, J. M. García-Ruíz, K. Tsukamoto, L. D. Patiño-Lopez, and H. Satoh “Ultraslow growth rates of giant gypsum crystals” *PNAS* Vol. 108 No. 38 (2011) 15721-15726.
- 4 H. Satoh, Y. Nishimura, K. Tsukamoto, A. Ueda, K. Katoh, and S. Ueta “In-situ measurement of dissolution of anorthite in Na-Cl-OH solutions at 22°C using phase-shift interferometry” *American Mineralogist*, Vol.92 (1007) 503-509.
- 5 I. Yoshizaki, K. Tsukamoto, T. Yamazaki, K. Murayama, K. Oshi, S. Fukuyama, T. Shimaoka, Y. Suzuki and M. Tachibana “Growth Rate Measurements of Lysozyme Crystals under Microgravity Conditions by Laser Interferometry”, *Review of Scientific Instruments*, 84 (2013) p103707.

