

IIII 結晶成長その場観察 IIIII
(解説)

グルコースイソメラーゼの結晶化に及ぼす微小重力効果
—Nanostep 2 プロジェクト提案に向けた共同研究—

鈴木 良尚¹・塚本 勝男²・吉崎 泉³・福山 誠二郎⁴・橋 勝⁵
小泉 晴比古⁶・藤原 貴久⁷・塩澤 宏章⁸・植原 悠太⁸・塩本 知弘⁸・中橋 大道⁸

**Effects of Microgravity on Crystallization of Glucose Isomerase
- Collaborative Studies toward the Proposal for Nanostep 2 Project -**

Yoshihisa SUZUKI¹, Katsuo TSUKAMOTO², Izumi YOSHIZAKI³, Seiji FUKUYAMA⁴,
Masaru TACHIBANA⁵, Haruhiko KOIZUMI⁶, Takahisa FUJIWARA⁷, Hiroaki
SHIOZAWA⁸, Yuta UEHARA⁸, Tomohiro SHIOMOTO⁸ and Daido NAKAHASHI⁸

Abstract

We focus on the growth mechanism of protein crystals and their perfection. The growth mechanism will be studied by surface observation and by measuring growth rates. Crystal defects will be studied by special etching and X-ray topography. We successfully carried out Nanostep experiments in 2012 using lysozyme crystals as model protein crystals. To generalize this result, a NanoStep2 experiment is planned to be flown in near future using glucose isomerase crystals. We need to obtain ground based data for the comparison with the Nanostep data. International collaboration is important to share a wide range of expertise for optimal scientific interpretation from different points of view.

Keyword(s): crystal growth, surface morphology, growth rates, in situ observation

1. はじめに

タンパク質もしくはその他の生体高分子の集合体の結晶化を宇宙で行うと、そのうちの 20%程度の結晶の分解能は、地上で得られた結晶のベストデータよりも高くなるといわれている¹⁾。この結果は、特にゲノム創薬の観点から大変重要であるが、何故そのような結果がもたらされるのかについては、きちんと明らかになっていないのが現状である。様々な原因が考えられるが、一般的には結晶の成長中に取り込まれる不純物の有無によって、結

晶の品質が大きく左右されると言われている。これはすなわち、結晶の成長メカニズムが重力の有無によって変化することで結晶の品質も変わるということを意味する。微小重力下で結晶が成長するということは、密度対流や沈降がない状況で結晶が成長することである。そのとき、結晶がどのようなメカニズムで高品質化するのを探り、それを地上実験で実現できる工夫をすることができれば、ゲノム創薬の発展に大きく貢献できるであろう。

我々は、タンパク質結晶の完全性が成長メカニズムにどう依存するかを多角的に調べるために、光学的手法、

- 1 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部 〒770-8506 徳島市南常三島町 2-1
Institute of Technology and Science, The University of Tokushima, 2-1 Minamijosanjima, Tokushima 770-8506, Japan
- 2 大阪大学大学院工学研究科 〒565-0871 吹田市山田丘 2-1
Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
- 3 宇宙航空研究開発機構 〒305-8505 つくば市千現 2-1-1
Japan Aerospace Exploration Agency, 2-1-1 Sengen, Tsukuba, Ibaraki 305-8505, Japan
- 4 株式会社エイ・イー・エス 〒305-0032 つくば市竹園 1-6-1 つくば三井ビル 7F
Advanced Engineering Services Co., Ltd., 1-6-1 Takezono, Tsukuba, Ibaraki 305-0032, Japan
- 5 横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科 〒236-0027 横浜市金沢区瀬戸 22-2
Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University, 22-2 Seto, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0027, Japan
- 6 東北大学金属材料研究所 〒980-8577 仙台市青葉区片平 2-1-1
Institute for Materials Research, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai 980-8577, Japan
- 7 徳島大学大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部 〒770-8502 徳島市南常三島町 1-1
Institute of Socio-Arts-and-Science, The University of Tokushima, 1-1 Minamijosanjima, Tokushima 770-8502, Japan
- 8 徳島大学大学院先端技術科学教育部 〒770-8506 徳島市南常三島町 2-1
Graduate School of Advanced Technology and Science, The University of Tokushima, 2-1 Minamijosanjima, Tokushima 770-8506, Japan

(E-mail: suzuki@chem.tokushima-u.ac.jp)

X線的手法などを用いて、不純物分子による表面モルフォロジーの変化やステップ成長速度の変動、欠陥発生などをとらえ、完全性との相関を調べることを目的としている。

2012年、東北大学の塚本らを中心とした先行チームでニフトリ卵白リゾチーム (HEWL) 結晶をもちいた国際宇宙ステーション (ISS) 実験 Nanostep を実施し²⁾、3種類の異なる溶液を用いて、過飽和度に依存する結晶成長速度データを世界で初めて詳細に取得した。その結果、微小重力下では、成長を阻害する効果を持つ不純物が結晶表面に取り込まれることが抑制されるために、特に低過飽和度領域において結晶の成長速度が地上よりも速くなることが明らかになった。つまり、無対流の無重力環境では、溶液中での拡散過程で不純物の結晶表面への輸送を抑制する。すなわち自己精製能力をもつことが、速度論的にも表面ステップ形態からもわかった。これは、無重力での完全性の高いタンパク質結晶の成長機構に対して、ひとつの明快な実験的な回答を与えたことになる (解析中につき未発表, 論文作成中)。

一方、これらの現象は、結晶構成分子よりも分子量の大きい不純物 (HEWL の場合は二量体) でのみ起こる可能性が高い。そのため、分子量がほぼ等しく、かつ不純物効果の高い遺伝子組み換え体を不純物として利用できる点、および HEWL に次いで多くの結晶成長メカニズムの研究がなされている点の二点から、グルコースイソメラーゼ (GI: glucose isomerase from *Streptomyces rubiginosus*) 結晶を用いて、微小重力効果を検証するための次なる ISS 実験, Nanostep2 として、フライト実験公募に向けての準備作業を計画している。そして、2013年度より、本格的にベルギーグループとの共同研究をスタートしている。この種の“その場”観察による研究は、他国の研究機関ではできないため、この共同研究にはヨーロッパの研究グループからの強い要請がある。また、上記実験プロジェクトを Nanostep2 として、国際チームとしてフライト公募に応募することの確認と、その提案書作成のための具体的な計画・予備実験進捗状況の確認を、2013年7月に Brussels で行われた、International Topical Team Meeting (ITT) において行った。

本研究では、タンパク質をモデルケースとした結晶成長メカニズムと不純物取り込みや完全性との関連を調べることを大目標としている。そのために、Nanostep 実験の結果を科学的な面から多面的に解析するための活動の継続はもちろん、ISS のその場観察装置を利用して、ベルギーの研究者と共同で、GI をモデルタンパク質とした Nanostep2 における一連の結晶成長実験の実施を準備することを目標としている。なお、Nanostep2 が実施され、分子量が同等の不純物効果に対する微小重力の抑制効果の確認ができれば、一連のタンパク質結晶の成長メカニズムと結晶の完全性の関係についての ISS における宇宙実験は終了する予定である。その後は、得られた知見を利用して地上での高品質結晶化技術の開発に移行する。

2. Nanostep2 の実験方法・条件

2.1 ハードウェア

測定は、Nanostep のときと同じく、「きぼう」日本実験棟の溶液結晶化観察装置 (SCOF: Solution Crystallization Observation Facility) に、すでに Nanostep で使用した専用機器を設置して、結晶面からの反射二光束干渉像の時間変化を解析することで面成長速度および沿面成長速度を測定する予定である。実際には今軌道にある Nanostep 専用機器を地上に持ち帰り、レーザーの選定や、超音波モーターの再検討等、改良をしたのち、再度打ち上げをする予定であるが、基本設計は変えないため、装置開発にかかる費用等は大幅に削減できる。また、装置開発にかかる予算は、国際共同研究チーム (ITT) 相手の ESA が負担する予定である。

2.2 結晶成長速度の測定原理

Nanostep2 においても、Nanostep と同様、二光束干渉計による結晶表面のらせん成長丘の変位の測定により、結晶の成長速度の測定を行う予定である²⁾。測定の対象は、面成長速度および沿面成長速度 (二次元核生成が起っていない領域であれば、ステップ前進速度と同じ) である。これらの過飽和度依存性を測定することによって、微小重力による結晶の高品質化メカニズムを、成長メカニズムを定量的に解明することを通して明らかにすることを目的としている。

しかし、今やレーザー共焦点微分干渉顕微鏡 (LCM-DIM)³⁾ など、ハイエンドの光学顕微鏡を用いて結晶表面を観察すれば、分子ステップを直接観察できる。それにもかかわらず、なぜ敢えて二光束干渉計を使う必要があるのだろうか。それは、宇宙実験の制約によるものである。

ハイエンド顕微鏡を使って分子ステップを観察するには、結晶面を光軸に対してほぼ完全に垂直にセットする必要がある。そして、鮮明な画像を得るための原理を完全に理解した人間が現場で調整をする必要がある。ISS 実験でそれを宇宙飛行士にさせることはほぼ不可能である。また、自動制御で微妙な調整をすることも現実的には相当難しい。さらに、共焦点顕微鏡の心臓部である、ガルバノミラー等が故障を起こさずに、振動試験をクリアすることもなかなか難しい。それに対して、二光束干渉計のシステムは、既に Nanostep で成功をおさめている実績がある。

ただし、ハードウェア的な問題の他に、測定に不可欠なものがある。それは、グルタルアルデヒドを用いて化学固定された種結晶である⁴⁾。地上で溶液を仕込んでも、実際に ISS 内で実験が行われるまでの間に月単位の時間がかかる。その間に、準安定状態の溶液からは多くの核がランダムに生成し、正確な溶液濃度に対する結晶成長速度を測れなくなる。そのため Nanostep では、化学固定された正方晶系 HEWL 種結晶をセル中に固定し、一度全ての結晶を溶かしたのち、その化学固定種結晶のとき

ろのみで結晶を再成長させ、その結晶を用いて成長速度の測定を行った²⁾。この方法を使うと、観察する結晶および結晶面を一つに決めることができるため、セル中の溶液の濃度もほとんど変化なく、正確な過飽和度を見積もることが可能となる。

さらに、そのようにして用意された結晶は、必ず複数個のらせん成長丘を中心とした成長をした。実際に Nanostep では3つの条件で実験を行ったが、そのすべてにおいて、らせん成長丘からの結晶成長を観察することができた。転位の生成に関しては様々な可能性が考えられるが、恐らくは再成長プロセスに起因すると考えられる。化学固定種結晶から再成長する場合、種結晶上の異なる場所から核生成した再成長結晶同士が衝突して融合する様子が観察された。その衝突した部分にひずみが多まり、転位が発生したものと考えられる。実際には、Nanostep でも、このようならせん転位の優先的な発生がなければ、二光束干渉計での詳細な結晶成長速度の測定は難しかったはずである。これも、化学固定種結晶を使用することの大きなメリットである。Nanostep の専用機器をほぼそのまま使用する予定の Nanostep2 では、やはり化学固定 GI 種結晶は必要不可欠である。

2.3 モデルタンパク質

2.3.1 物性値

モデルタンパク質として、Nanostep2 で使用する予定の GI は、Nanostep で使用した HEWL と、様々な点で異なるタンパク質である。主な物性値について、Table 1 にまとめた。まず、大きな違いとしては、溶液中で安定な形態が、HEWL では単量体であったのに対して、GI では四量体になっているということが挙げられる。また、分子量が一ケタ違うため、拡散定数等、物質輸送プロセスに違いが生じる可能性がある。さらに、等電点に関しては、HEWL がアルカリ側にあるのに対し、GI では弱酸性側にあり、この間の pH の条件の溶液中では、トータルの電荷が正負逆転するという違いがある。

GI は、HEWL に次いで多くの結晶成長の基礎研究がなされている⁵⁻¹¹⁾タンパク質であるにもかかわらず、基礎的な物性値について、上述のような大きな違いがある。これは、Nanostep で得られた微小重力の不純物抑制効果が HEWL だけに見られた特殊な現象か否かを検証し、宇宙実験における高品質化のメカニズムをより一般的にまとめていくうえで大きなメリットとなりうる。

Table 1 Properties of model proteins

	GI	HEWL
Stable form	tetramer	monomer
Molecular weight	173000 (as tetramer)	14307
Isoelectric point	3.95 ¹²⁾	11.35 ¹³⁾

2.3.2 結晶化パラメタ

結晶面上に溶液から結合してくる分子は、一分子の層の面に沿った広がり、その層の上への新たな層の積み重ねによって結晶成長を起こす。この層の周囲は、元の結晶との間に一分子分の段差を形成する。この段差をステップと言い、このステップに新たな分子が結合をしてステップが前進するプロセスは結晶成長の素過程である。この速度をステップ前進速度 V_{step} という。 V_{step} の温度依存性から分子がステップに取り込まれる際の活性化エネルギー、圧力依存性から活性化体積、そして溶解度の圧力依存性から結晶化体積変化を見積もることができる。

まず、 V_{step} は(1)式のように表される¹⁴⁾。ここで、 β_{step} 、 Ω 、 C 、 C_e はそれぞれステップカイネティック係数、結晶中の成長ユニットが占める体積、溶液の濃度、溶解度を

$$V_{\text{step}} = \beta_{\text{step}} \Omega (C - C_e) \quad (1)$$

示す。この中の β_{step} の温度依存性から、(2)式のように kink 取込みの活性化エネルギー ϵ_{kink} が求められる。ここ

$$\epsilon_{\text{kink}} = -k \frac{\partial \ln \beta_{\text{step}}}{\partial \left(\frac{1}{T}\right)} \quad (2)$$

で、 k は Boltzmann 定数、 T は絶対温度を示している。さらに、 β_{step} の圧力依存性から、(3)式のように、kink 取

$$\Delta V^\ddagger \equiv V^\ddagger - \bar{V} = -RT \frac{\partial \ln \beta_{\text{step}}}{\partial P} \quad (3)$$

り込み過程の活性化体積 ΔV^\ddagger を求めることができる¹⁵⁾。ここで、 V^\ddagger は、分子ステップ上の kink 取り込みに際し、活性化された分子の部分モル体積、 \bar{V} は溶液中の分子の部分モル体積、 R は気体定数、 P は圧力を示している。

C_e の圧力依存性からは、(4)式のように結晶成長に伴うモル体積変化 ΔV を求めることができる⁵⁾。ここで、 V_c は、結晶のモル体積を示している。

$$\Delta V \equiv V_c - \bar{V} = RT \frac{\partial \ln C_e}{\partial P} \quad (4)$$

以上の関係式とステップ前進速度の温度・圧力依存性および溶解度の圧力依存性のデータから求めた ϵ_{kink} 、 ΔV 、 ΔV^\ddagger を Table 2 にまとめた。

ϵ_{kink} は、HEWL ではほとんどゼロに近い値を示したにもかかわらず、GI では有意に大きな値を示した。また、

Table 2 Growth parameters of model proteins

	GI	HEWL
$\epsilon_{\text{kink}} / \text{kJmol}^{-1}$	65 ± 2	1 ± 1
$\Delta V / \text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$	-60 ± 40	27 ± 7
$\Delta V^\ddagger / \text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$	-30 ± 2	20 ± 1

ΔV , ΔV^* については、両者正負が反対の結果となった¹¹⁾。すなわち、HEWL では、溶解することで系の体積が減少するのに対し、GI では結晶化することで系の体積が減少する。通常、体積変化が大きく異なるのは水和・脱水とのメカニズムが大きく異なることによる。この場合は結晶の溶解時に HEWL が親水的な水和、GI が疎水的な水和を起こすため、溶解・結晶化の際の水和・脱水による体積変化の正負が逆になることによって系の体積変化の正負が逆になると考えられる。

これらの結果も、宇宙実験における高品質化のメカニズムが、タンパク質の性質によらない、普遍的なものであるということを議論する上で、重要な要素である。

2.3.3 不純物

既に述べたように、Nanostep における HEWL 結晶への微小重力下における成長速度の促進効果は、HEWL の不純物が主に HEWL の共有結合二量体で、微小重力における対流抑制により、成長界面に運ばれにくくなることによって起こったと考えている。であれば、不純物の分子量が大きくなければ、そのような微小重力下での促進効果は見られなくなるのではないかと考えられる。

ITT のベルギーチームで合成された、GI の組み換え体 (GI mutant) は、6 番目の Threonine を Cysteine に組み換えたものである。この GI mutant の 5% 程度の添加によって、分子ステップの形状を大きく変えることに成功した。GI 結晶の結晶表面は直線的なステップによって囲まれた 2 次元島に覆われているが、GI mutant の添加によってステップが明確に丸みを帯びることが LCM-DIM によって観察された。直線ステップが丸みを帯びるのは、ステップの形状がラフになることを意味しており、GI mutant のステップへの吸着でステップのラフニングが起こった。すなわち、GI mutant の吸着によってステップの前進が阻害されたことを示している。Nanostep2 では、この GI mutant を不純物の第一候補として考えている。

更に GI よりもずっと小さい HEWL を不純物として、GI 結晶の溶解度、面成長速度、ステップ形状に及ぼす影響の予備実験を行っている。これもステップ形状、面成長速度等を見ると明らかに不純物効果がある。Table 1 に示したとおり、HEWL は GI の 10 分の 1 の分子量である。このような場合、宇宙では不純物の結晶表面への輸送が地上よりもしやすくなり、結晶の成長速度が低下する可能性がある。これらの状況を Table 3 にまとめる。

このほかにも、Van Driessche らが使用した蛍光分子ラベル HEWL をつかって、HEWL 結晶の成長速度に及ぼす同サイズの不純物に対する微小重力効果を明らかにするというのも選択肢の一つである¹⁶⁾。また、GI を不純物にして、HEWL 結晶の溶解度やステップ前進速度を測定する予備実験も現在進行中である。他に、GI の tetramer を共有結合で結合させた、GI よりも大きな不純物としての dimer of tetramer は現在合成を試みている最中である。

Table 3 Impurities of model proteins

Proteins Size	GI	HEWL
Larger		Covalently bound dimer
Comparable	GI mutant	(Fluorescent monomer)
Smaller	HEWL monomer	

これらの組み合わせを地上実験で十分に明らかにして、ISS 実験に載せるべき不純物条件をしっかりと押さえる必要があるが、分子量の大小に関してはここまでで充分微小重力効果を網羅することが可能である。これが、ISS 実験を Nanostep2 で終了すると述べた大きな理由である。

しかしながら、実際には分子の大きさのみではなく、結晶中への取り込まれやすさである、分配係数の大小が複雑に絡み合ってくる。分配係数は塩濃度によっても変わってくるため¹⁷⁾、Nanostep2 実施に際し、条件決めを慎重に行う必要がある。

2.4 結晶の品質の評価

福山らのマクロシーディング法によって大きく (~1 mm 程度) 育成された GI 結晶を用いて、橋、小泉らが中心となり、高エネルギー加速器研究機構、フォトンファクトリーのビームライン BL20B で X 線トポグラフの撮影を行った。

3. クリアすべき課題と進捗状況

3.1 化学固定種結晶とスパイラル成長丘の作成

Nanostep のシステムでの結晶成長速度測定に必要な不可欠ならせん成長丘は、吉崎、福山らによってグルタルアルデヒドで化学固定された種結晶の上に育成した結晶上に生成することができた (Fig. 1)。これは、Nanostep の二光束干渉計のシステムで、GI をモデルタンパク質として使って実験するために不可欠なプロセスであり、Nanostep2 実現に向けて大きく前進する一歩となった。化学固定種結晶から再成長する場合は、Nanostep の時の HEWL 結晶と同じく、種結晶上の異なる場所から核生成した再成長 GI 結晶同士の衝突・融合が見られたことから、同様の転位生成メカニズムによるらせん転位の発生が起こったものと考えられる。

3.2 格子欠陥の評価

化学固定種結晶および化学固定なしの種結晶から育成した GI 結晶の X 線トポグラフの撮影を行った。その結果、通常の種結晶から成長した GI 結晶には、目立った格子欠陥が確認されずかなり完全性が高いことがわかった。それに対し、化学固定を行った種結晶から成長した GI 結晶は、種結晶の表面から、成長結晶の結晶面に向かって、

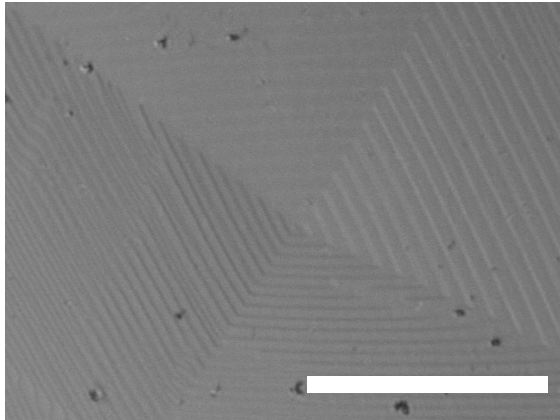


Fig. 1 A confocal microscopic image of a spiral growth hillock of a GI crystal which is grown on a chemically-fixed GI seed crystal. Scale bar represents 50 μm .



Fig. 2 An experimental system for in situ observation of step movements on a crystal face of a GI crystal.

明確な転位を確認することができた。これらのことから、化学固定を行った種結晶を使うことで、結晶中に意図的に転位を作り出すことが可能となり、その転位がらせん転位であれば、二光束干渉法で観察できる成長丘になりうる事が明らかになった。

3.3 パラボリックフライトを利用した微小重力下における GI 結晶のステップ観察

GI 結晶のステップ前進速度が重力によって変化するかどうかを測定するために、高過飽和度領域における速いステップ前進速度に及ぼす微小重力効果を、ダイヤモンド・エア・サービス (DAS) において実施されたパラボリックフライト実験で測定した。20 秒間という非常に限られた時間ではあるが、速い成長速度の領域での微小重力効果の有無を確認できる重要な機会である。

実験に使用したシステムの機内写真を Fig. 2 に示す。装置の大部分は、Nanostep の航空機実験用に塚本らによって開発されたもので、位相差顕微鏡 (Fig. 2 左下) にペルチエ素駆動の温度コントロールセルを組み合わせ、粗動用の電動ステージと、対物レンズの微動コントロール用のピエゾユニットを組み込んだもので構成されている。画像は、高精度の冷却 CCD カメラを使って取得した。顕微鏡の本体は、より高分解能の像を得るため、航空機の振動を吸収する制振装置上に設置されている。さらに、重力の変化に伴う、顕微鏡ステージの極微小のたわみによるフォーカス位置の変化が起こるが、その変化に対応したフォーカスの調整は、搭乗したメンバーが手動でピエゾコントローラ (Fig. 2 右側ラックのモニタ左側の装置) の微動つまみを回すことで行った。

このセットアップで得られたステップの画像と、それを解析して得られたステップ前進速度のデータを Fig. 3 に示す。Fig. 3 (a) は、GI 結晶面上の 2 次元島 (ひし形のコントラスト部分) を示している。2 次元島周囲のステッ

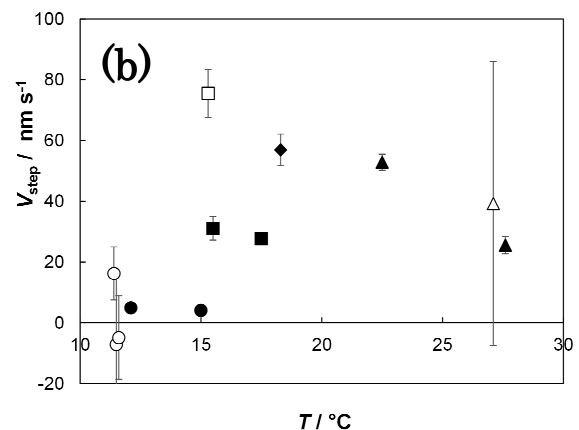
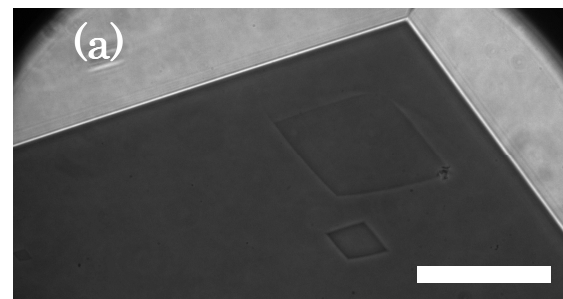


Fig. 3 (a) An image of a face of a GI crystal which was taken by phase contrast microscopy. Scale bar represents 100 μm . (b) Step velocities with temperature at 1 G (solid marks) and 0 G (open marks). Circles, squares, triangles, and diamonds indicate data at 19.1, 25.9, 22, and 29.4 mgmL^{-1} , respectively.

プが鮮明に観察された。そして実際にこのようなステップ画像を、パラボリックフライトの最中の 0 G ~ 2 G の変動重力下で取得することができた。また、このような画

像の時間変化から、ステップ前進速度 V_{step} を求めると **Fig. 3 (b)** のようになった。ここで黒が 1 G、白が 0 G でのプロットを示し、●, ■, ◆, ▲ の順に 19.1, 25.9, 22, 29.4 mgmL⁻¹ の濃度の溶液中でのプロットを示している。

Figure 3 (b) より、濃度が高いほど、温度が低いほど V_{step} が大きくなる傾向があるようにも見えるが、同一条件におけるデータのばらつきが大きく、最終結論には至っていない。これらのデータは、既にいくつか報告されている GI 結晶の V_{step} の値と、オーダーは合っている。しかし、今後より詳細なメカニズムの議論を行うためには、温度を固定して濃度を変える実験や、逆に濃度を固定して温度を変える実験など、さらなる系統的な実験が必要である。

4. 結論

成長メカニズムに依存するタンパク質結晶の高品質化に関する、ISS を使った宇宙実験 Nanostep2 を行う目的と、フライト公募の提案書作成実施を目指した共同研究の進捗状況について解説した。その過程で得られた主な結論を下記に記す。

1. GI 結晶に対して、現時点で十分な不純物効果を示すものとして、結晶成長単位である GI tetramer とほぼ同じ大きさの GI mutant と一桁小さい分子量の HEWL monomer が用意できるため、Nanostep の結果と合わせ、不純物の大きさについては網羅した研究が実施できる状況にある。
2. 二光束干渉計を使った成長速度の測定に必要な不可欠な、化学固定 GI 種結晶の作製に成功した。また、その結晶から再成長させた結晶表面に、スパイラル成長丘を観察することができた。
3. X 線トポグラフにより、化学固定 GI 種結晶から成長したもののみならずその種結晶からスタートする転位を確認した。通常の GI 結晶は、転位等が確認されず、高い完全性を示すことがわかった。
4. パラボリックフライトを利用した GI 結晶表面の位相差顕微鏡観察により、微小重力下での分子ステップのその場観察と、短時間の成長中の V_{step} の測定に成功した。

謝辞

現在進行中の主な研究およびディスカッションは、2013 年度 JAXA WG 「成長メカニズムに依存するタンパク質結晶の完全性」の一環として行われている。また、研究の一部については、科学研究費補助金挑戦的萌芽研究（代表 鈴木良尚 課題番号 24656016）の補助によって行われた。さらに、2013 年度の JAXA WG の一環として実施された航空機実験は、日本宇宙フォーラムの伏島

様、高木様、および DAS の松崎様、加藤様ほか皆様にお世話になった。とくに DAS の松崎様、福島様、土居様には、夜中遅くまでフライト準備作業等、様々な面で大変お世話になった。また、活性化エネルギーを測定するための V_{step} の測定について、GI については、卒業生の松本賢臣君、HEWL については、卒業生の近藤大貴君の温度依存性のデータから算出した。ここに厚く感謝申し上げたい。

参考文献

- 1) Task Group for the Evaluation of NASA's Biotechnology Facility for the International Space Station, Space Studies Board, National Research Council: Future Biotechnology Research on the International Space Station, Chap. 1, p. 13, The National Academic Press, Washington, DC, 2000.
- 2) I. Yoshizaki, K. Tsukamoto, T. Yamazaki, K. Murayama, K. Oshi, S. Fukuyama, T. Shimaoka, Y. Suzuki and M. Tachibana: Rev. Sci. Instrum., **84** (2013) 103707.
- 3) G. Sazaki, T. Matsui, K. Tsukamoto, N. Usami, T. Ujihara, K. Fujiwara and K. Nakajima: J. Cryst. Growth, **262** (2004) 536.
- 4) Y. Iimura, I. Yoshizaki, L. Rong, S. Adachi, S. Yoda and H. Komatsu: J. Cryst. Growth, **275** (2005) 554.
- 5) Y. Suzuki, G. Sazaki, K. Visuri, K. Tamura, K. Nakajima and S. Yanagiya: Cryst. Growth Des., **2** (2002) 321.
- 6) Y. Suzuki, G. Sazaki, T. Matsui, K. Nakajima and K. Tamura: J. Phys. Chem. B, **109** (2005) 3222.
- 7) M. Sleutel, D. Maes, L. Wyns and R. Willaert: Cryst. Growth Des., **8** (2008) 4409.
- 8) M. Sleutel, R. Willaert, C. Gillespie, C. Evrard, L. Wyns and D. Maes: Cryst. Growth Des., **9** (2009) 497.
- 9) Y. Suzuki, G. Sazaki, M. Matsumoto, M. Nagasawa, K. Nakajima and K. Tamura: Cryst. Growth Des., **9** (2009) 4289.
- 10) Y. Suzuki, M. Tsukamoto, H. Sakuraba, M. Matsumoto, M. Nagasawa and K. Tamura: Rev. Sci. Instrum., **81** (2010) 084302.
- 11) Y. Suzuki, T. Maruoka and K. Tamura: High Press. Res., **30** (2010) 483.
- 12) A. Vuolanto, S. Uotila, M. Leisola and K. Visuri: J. Cryst. Growth, **257** (2003) 403.
- 13) L. R. Wetter and H. F. Deutsch: J. Biol. Chem., **192** (1951) 237.
- 14) A. A. Chernov: Modern Crystallography III, Chap. 1, p. 108, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1984.
- 15) K. J. Laidler: Chemical Kinetics, Harper & Row, New York, Tokyo, 1987.
- 16) A. E. S. Van Driessche, G. Sazaki, G. Dai, F. Otalora, J. A. Gavira, T. Matsui, I. Yoshizaki, K. Tsukamoto and K. Nakajima: Cryst. Growth Des., **9** (2009) 3062.
- 17) Y. Iimura, I. Yoshizaki, H. Nakamura, S. Yoda and H. Komatsu: Cryst. Growth Des. **5** (2005) 301.

(2014 年 5 月 9 日受理, 2014 年 6 月 17 日採録)