

IIIIII 特集：利用が広がる「きぼう」IIIIII  
(解説)

## 微小重力でのタンパク質結晶成長速度

塚本 勝男

### Growth Rate of Protein Crystals under Microgravity

Katsuo TSUKAMOTO

#### Abstract

To find out important factors controlling crystal growth rate and perfection of protein crystals in microgravity, a microgravity experiment using a Foton-M3 has been conducted in September 2007. Using seed crystals at constant supersaturation, the growth rate was successfully measured *ex-situ* for the first time to be 0.7-1.5 times larger than the rate under gravity. The result was very surprising because large reduction of growth rate under reduced gravity has been expected. This experiment will be continued as a "NanoStep" project, which will be started on 21st, July 2012.

#### 1. はじめに

流れをうまく利用して結晶を作るのが均質で良質な結晶を得る根本的に大事な考えである。それはメルトから成長する結晶であっても、溶液から成長する結晶でも同じ考えである。そのため、結晶成長と流れは切っても切れない密接な関係が続いている。事実、現在でも工業的に作られる全ての結晶は流れをうまく利用して形態不安定性をなくすようにして育成されている。それに対して、宇宙環境利用が幕開けした 1980 年代に微小重力を利用して流体の流れを抑制したほうが良質な結晶ができるというのは、当時の考えからすると異端児的な考えであった。当初その考えは科学的な根拠からきているものではなく、地上と異なった浮遊環境で結晶をつくれば、地上でできない良い結晶が出来るのではないかとという多分に希望的観測でもあった。

1980 年後半になって研究は本格的になってきた。FZ 結晶成長時に生じる成長縞（ストリーション）の発生がメルトの不安定な流れのためである、というスペースシャトルを利用した実験成果が Benz らによって報告されている<sup>1)</sup>。また、無重力で作られた結晶はルツボに非接触であるため、転位などの欠陥も少ないという研究も Chernov や Nishinaga らによって行われた<sup>2)</sup>。しかし、これらの研究は高品質の結晶を宇宙でつくるという NASA が当初めざしていた宇宙工場的な方向には進まず、Hibiya<sup>3)</sup>らによって推進されてきたように、宇宙でしかで

きない基礎実験を宇宙環境で行い、そこで得られた成果、例えば、メルト物性データを地上での結晶育成に適用するという方向に変わってきた。

それに対して、微小重力での水溶液からの結晶成長実験はタンパク質結晶以外には余り多く行われていない。タンパク質は製薬や病気治療と直接関わるため、見つめられた新しいタンパク質の機能を明らかにすることが必要である。また、他の無機物質に比べて桁違いに高価である。そのために、宇宙環境を利用することで、少しでも新しい結晶化方法が分かれば、また、少しでも大きな結晶ができれば、社会に対するインパクトが強い。そのため NASA は数多くのタンパク質結晶化実験を行った。NASA では商業利用に向けた宇宙利用が盛んであり 1996 年の Commercial Space Center の創設以来、宇宙実験には多くの民間企業、大学、政府系研究機関が関わっている。これらの研究機関には NASA から多額の補助金がだされ多くの結晶成長実験がスペースシャトルで行われていた。そのため、著者がアメリカの大学研究室を訪問したときには、スペースシャトルから戻ってきた試料が机に山積みされており、解析が間に合わない状況であった。一方、欧州では微小重力環境利用実験は商業利用としてはあまり重視されておらず、メカニズムの解明に向けた物理、化学的な結晶成長の基礎研究に重点を置いていた。

1998 年米国細胞生物学会 (American Society for Cell Biology) から NASA のライフサイエンス分野の宇宙実験プログラムに関する批判的な声明が出された<sup>4)</sup>。内容はラ

東北大学大学院 理学研究科 地球惑星物質科学 〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻町青葉 6-3  
Department of Earth and Planetary Materials Science, Graduate School of Science, Tohoku University, 6-3, Aoba, Aramaki,  
Aoba, Sendai, Miyagi 980-8578, Japan  
(E-mail:ktsuka@m.tohoku.ac.jp)

イフサイエンス全般にわたっているが、宇宙実験はコストがかかりすぎる割に成果があがっておらず、また将来も見込めないの地上研究に予算を回すべきというものである。結論として宇宙で良質の結晶を得ようとする蛋白質結晶生成実験は直ちに取りやめるべきと主張した。これに対し DeLucas はただちに反論している。彼は多数の学術雑誌に成果が公開され関連分野の進展に寄与していること、および宇宙で生成した蛋白質結晶により 20 以上の蛋白質の構造解析が進展したと主張した。2000 年末には米 National Research Council が NASA の Macromolecular Crystallography Program に対して評価および勧告を提出している。実際、蛋白質結晶成長に対する微小重力のポジティブ効果に関する結果は、数例を除いて決定的でなかった。

このような否定的な意見が出ている一方、タンパク質結晶の成長時に溶液の流れがあると何故悪い影響が出るのか、という基礎研究も 2000 年ごろには本格的にスタートし始めていた。実際、タンパク質を結晶化させるには流れをつけたほうが良い結晶ができるという結晶成長関係者も多かった。一つの考えとして、流れが結晶表面の成長ステップのバンチングの発生を助長し、荒れた表面ができ欠陥ができるというストーリーもあった。そのため、日本で開発された結晶成長“その場”観察法を利用して、宇宙での結晶表面の観察をしようという大きな NASA プロジェクトも走っていた。

このように、“宇宙工場”的に宇宙で良い結晶をつくる方向から、宇宙実験で得られた成果を地上の実験に“スピノフ”して、地上での品質向上や新しい結晶化に役立てるという基礎研究指向の研究に移り変わっている。最近では、流れを抑えるため、ゲル成長法<sup>5)</sup>やシリンダー状の容器を逆さまにする方法を考案する<sup>6)</sup>なりして地上でも結晶の質の向上が図られている<sup>7)</sup>。これらの方法で作られた結晶は X 線構造解析において宇宙で作るより解像度が向上しているとしている。

21 世紀に入ると NASA は基礎的なプロジェクトに資金提供をするようになった。その様子は、当時採択されたタンパク質結晶成長関連の以下のテーマを見れば傾向がつかめる：

- ① 巨大分子の核形成と成長に影響を及ぼす基本的なファクターの理解。
- ② 微小重力環境が結晶成長に有利に働くファクターの解明。
- ③ 構造決定のために、微小重力で決定的に良質な結晶化方法。
- ④ 膜蛋白、糖蛋白、リポ蛋白など、より複雑で先進的な結晶化における微小重力利用の可能性の見極め。
- ⑤ 宇宙だけでなく地上の結晶化実験を改善する自動化やモニター装置といった技術や方法の開発。

残念なことに、これらのほとんどは NASA に対する政府の資金カットで研究は途中でストップしている。ただ、ESA ではこれらの基礎研究に目を向けた宇宙実験を継続

しているが、実験方法、特に、光学的な“その場”観察による実験はほとんど成功しておらず、この分野での先進の日本に協力要請が続いている。今回報告する Foton-M3 回収衛星を利用したタンパク質結晶成長実験はこの延長上に位置し、ESA 側から無償で場所と実験機会が与えられた。

## 2. フォトン M3 実験で得られたもの

スペイン・グラナダ大学 Garcia-Ruiz 教授との共同研究により、2007 年 9 月に回収衛星を用いた宇宙実験を実施し成功した (Fig. 1)。今回の宇宙実験の目的は、微小重力下における結晶成長速度を計測すること、得られた結晶の完全性を評価することであった。完全性の評価には、結晶内の欠陥分布検出に優れる放射光を利用した X 線トポグラフィー法を用いることとした。これらの目的のために、宇宙実験として初めて種結晶を用いた結晶成長実験を行った。溶液温度は 20°C に保ち 65 個の種結晶を様々な過飽和度の結晶成長溶液に入れることで、異なる過飽和度での結晶成長速度の測定が可能となった。X 線トポグラフィー法で良好なコントラストの画像を得るためには、1mm 以上の結晶が必要であるため、あらかじめ大きな種結晶を準備した。その結果、地上で成長させた種結晶と、その後の異なる重力環境で成長する部分との品質の比較も可能となった。



Fig. 1 Recovery of the Foton-M3 satellite. The temperature was kept at 20 deg. during experiments.

結晶の成長速度の測定は、結晶内部のゾーニングを回収後に調べることで行った。この結晶内部や結晶表面の詳細な観察は世界でも例がない (Fig. 2)。この成功は光学観察に適した平板状の結晶成長セルを宇宙研究で初めて使ったことによる (Fig. 3)。

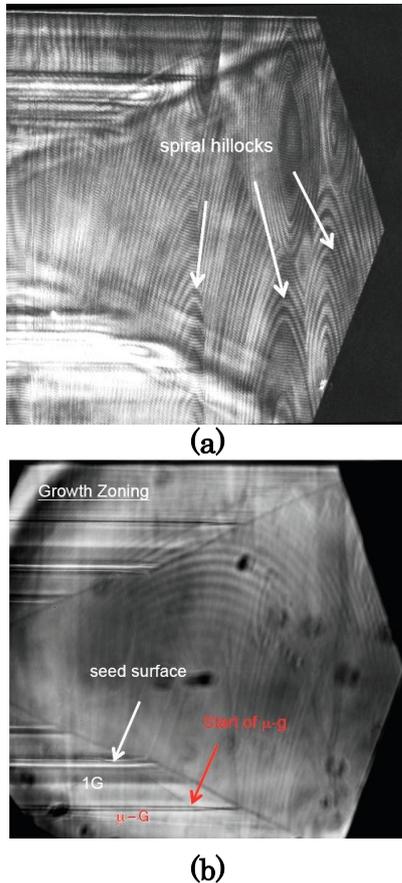


Fig.2 The surface (a) and the internal zoning (b) of a lysozyme crystal grown in space, followed by forthcoming earth environment. The difference can be seen in the zoning taken by confocal microscopy.

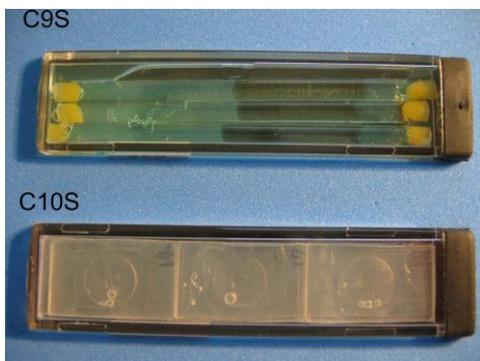


Fig. 3 Tube cells, C9S and flat cells, C10S. Flat cells enabled us to visualize the crystal surface and internal zoning very clearly by optical methods.

## 2.1 結晶内部の観察

一部の種結晶は日本で準備し、オランダに持ち込んだが、大半の結晶はオランダ・ナイメーヘン大学の Elias Vlieg 研究室にて準備した。最終的には  $\phi 3\text{mm}$  程度のキャピラリー56本、ガラス製の平板容器9個を準備し、オランダ・ノルドバイクにて Garcia-Ruiz のグループに引渡した。結晶は ESA によってカザフスタンに輸送され、9月14日に打ち上げられた。着陸は9月26日であった。なお、打ち上げ前・着陸後はアルカンを用いて20度前後に温度制御した。

得られた結晶を共焦点顕微鏡で観察した一例を Fig.4 に示す。種結晶を使用したため、打ち上げまでの1gでの成長部分、打ち上げ後の $\mu\text{g}$ での成長部分、着陸後の1gでの成長部分が結晶面に平行なゾーニングとして見える。これは、温度揺らぎなどによる環境の変化により結晶層の屈折率がわずかに異なるためである。これにより、打ち上げ前後の結晶の厚み、結晶成長速度を計測できることとなる。

平板セルを使用することで結晶内部の詳細な観察が可能となる。Fig.5 にその一例を示す。大変興味のある事実として、微細な3個の結晶が結晶成長中に方向を異にして取り込まれるように発達しており (A,B,C)、その微結晶の角からクラック (短い矢印) が発達している。さらに興味のある事実として、これらの微結晶は FOTON-M3 打ち上げ時にできたゾーニング (長い矢印) の形成時から成長を始めたことが分かる。つまり、打ち上げ時の突然の重力環境の変化が微結晶の結晶化を促進したことが分かる。このように、高解像の画像が平板セルと共焦点顕微鏡の組み合わせで得ることが出来、地上と宇宙での成長の違いを高解像な可視化を通して行えるようになった。

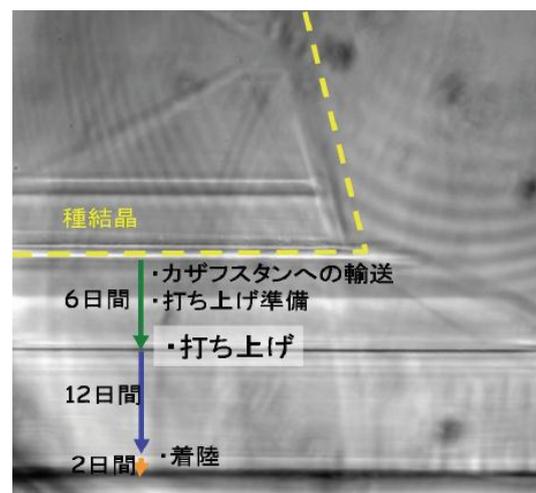
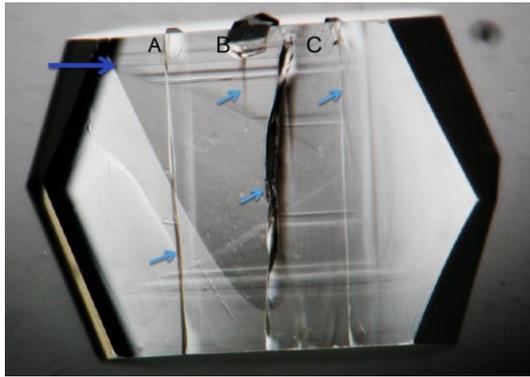


Fig. 4 Internal zonings formed due to the change of environments. These zonings are kind of time-marker which leads to the measurement of growth rates.



**Fig. 5** A confocal optical image, showing that the formation of cracks (short arrows) are the result of crystallization which started during launching. The launch time is seen from a sharp zoning, a long arrow.

## 2.2 成長速度測定

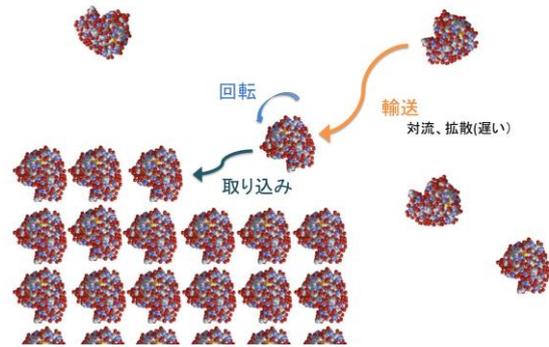
地上で成長させる結晶の成長速度は、結晶のもつ大きさや欠陥の種類などの個性によって、同一過飽和度でも20%以上の成長速度の幅をもつが、今回のように種結晶を用いることで、同一結晶中での1G部分・ $\mu\text{G}$ 部分を比較することが可能となり、成長条件の違いによる成長速度の違いを明らかにすることができた。

結晶成長のメカニズムを調べるために、結晶の成長速度の測定は不可欠である。それにも関わらず、これまで微小重力でのタンパク質結晶の成長速度を測定した例は皆無であった。これはタンパク質結晶の成長速度がメルトから成長する半導体や酸化物結晶に比べて4桁以上遅いため測定し難いことにも拠る。

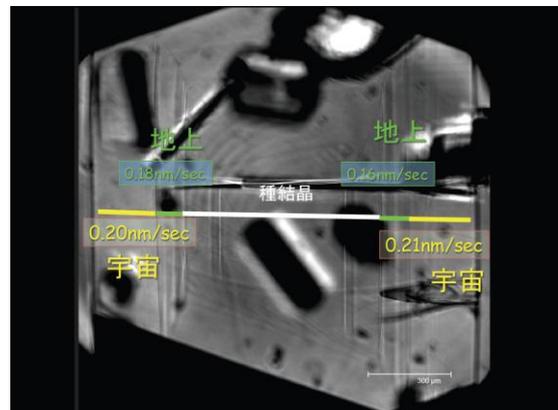
一般的に、微小重力では分子が容易に輸送されないため結晶成長速度が1桁~2桁程度抑えられると考えられている。また、拡散律速だから結晶完全性が良くなるというような因果関係が不明瞭な考えを聞くことも多い。これらの考えの根底には、タンパク質の結晶成長メカニズムはメルトからの結晶成長と類似する、という潜在的な考えがあるように思えてならない。しかし、この考えは間違っている。

最も成長させ易い卵白リゾチーム結晶を、対流や流れを抑制したゲル環境で成長させながら速度を精密に測定すると、対流を抑制していない溶液からの場合とあまり変わらないことが我々の地上実験からでも分かっている。この事実はタンパク質結晶の成長速度の律速過程は分子の移動ではなく、それ以外の過程が決められていることを示している (Fig. 6)。

本当の微小重力での結晶成長速度測定に成功したのが、航空機を利用した微小重力実験である。この方法ではたった20秒の微小重力しか得られないので、 $10^{-2}\text{nm/s}$ の微小な成長速度の測定は不可能と思われていた。しかし、著者の得意な結晶成長“その場”観察法で、結晶表面での分



**Fig. 6** Elementary processes in crystal growth of a protein crystal. Integration or rotation of molecules at surfaces might be the important rate determining process.



**Fig. 7** Growth with formed during 1G and micro-G duration. Note the higher growth rate in space.

子ステップが表面を覆う速度を測定することに初めて成功した。

結晶の成長速度は不純物などが左右することは容易に想像できる。この点を調べるために、2007年9月にロシアのFOTON-M3衛星を使って、やや不純物濃度が高い(98.5%)リゾチーム溶液から結晶の成長速度を初めて測定した。驚くべきことに、微小重力での結晶成長速度は地上に比べ1.5倍にまで増加する例も明らかになった (Fig.7)。これをさらに広い条件下で測定するためにNano Stepプロジェクト装置が7月21日の“こうのとりの3号”で打ち上げられ、半年に渡って“きぼう”での結晶成長“その場”観察を行う。

通常の結晶成長環境では結晶の成長速度はリゾチーム分子の輸送速度によって決定されるわけではなく、主要な不純物である2分子が結合したダイマーの輸送速度が遅くなるため、結晶表面での不純物分子の密度が減少し結果的に結晶成長速度を増大させているためであろう。詳細は現在解析中であるが、不純物分子の結晶表面での滞在時間と成長ステップ速度との競合で、不純物の結晶への取り込み、従って、結晶の完全性の低下が生じるという全く新しいストーリーができつつある。同一の結晶を

もちいて成長速度 vs 過飽和度は 1 G と  $\mu\text{G}$  で取得した。これらの多くの結晶は放射光で完全性の解析も行われ、完全性と結晶成長速度の関係も得られている。詳細は原著論文として発表する。

一方、成長した結晶の完全性についても新しい結果が得られている。フライト後、オランダにて数日間詳細な光学観察を行い、結晶成長速度の計測などを行ったが、日本へ帰国した翌日から KEK で放射光による X 線トポグラフの撮影に供した。さらに 1 週間後には SPring8 にて追加解析を行った。結晶サイズが 2mm 程度と巨大であるため、良質なトポグラフ像が得られた。1G および  $\mu\text{G}$  での完全性の違いについては、結晶の全体にわたるピクセル毎のロッキングカーブ解析を横浜市立大学のグループが精力的に解析を進めている。

### 3. 最後に

Foton-M3 実験で得られた成果は従来の欧米の宇宙実験では得られていない画期的なものであったと誇ることができる。これは、宇宙実験を行うまでに十分な地上実験を行っていたからこそ達成できたことである。同時に、海外とのフレキシビリティに富むチームワークがあったからこそ実現できたことである。今回の宇宙実験で明らかになった、どのファクターが結晶成長速度や結晶

の完全性にどう影響を与えるかという理解が、今後の地上での結晶成長研究に役立つことを期待する。そのためにも結晶成長と構造生物学との関係を密にして、結晶化が難しい膜タンパクなどの結晶化研究に新たに挑戦すべきであろう。

### 参考文献

- 1) D.T Hurl, G. Mueller, R. Nitsche, in "Fluid Sciences and Materials Science in Space" ed. H.U. Walter, Springer-Verlag, 1987, pp313.
- 2) 西永頌, 日本結晶成長学会誌, **39** (2012) 3.
- 3) 日比谷孟俊: "宇宙実験とどうむきあったか?", 日本マイクログラフィティ応用学会誌, **18** (2001) 216.
- 4) (1) Science struggles to gain respect on the space station. *Nature*, **391** (1998) 732, (2) Expensive space crystal program has produced little of scientific value, says panel. *Nature*, **404** (2000) 114.
- 5) García-Ruiz, J. M. *Methods Enzymol.* **368** (2003) 130.
- 6) Elias Vlieg, private communication.
- 7) (1)宇宙環境を利用した高品質なタンパク質結晶の生成, 高橋ら, 日本結晶学会誌, **46** (2004) 323, (2) H. Tanaka, T. Tsurumura, K. Aritake, N. Furubayashi, S. Takahashi, M. Yamanaka, E. Hirota, S. Sano, M. Sato, T. Kobayashi, T. Tanaka, K. Inaka and Y. Urade, *J. Synchrotron Rad.*, **18** (2011) 88.

(2012年7月19日受理)