

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：54501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06215

研究課題名(和文) タンパク質結晶の熱伝導率および熱拡散率測定法の開発

研究課題名(英文) Development of measurement methods for thermal conductivity and thermal diffusivity of protein crystals

研究代表者

藤原 誠之(Fujiwara, Seiji)

明石工業高等専門学校・機械工学科・教授

研究者番号：90335985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではタンパク質結晶育成の研究分野においてモデルタンパク質として用いられている卵白リゾチーム(HEWL)に対し、磁気アルキメデス効果を用いた磁気浮揚および二液法で結晶育成したHEWL結晶に対して熱伝導率および熱拡散率の測定を行った。両者の熱伝導率の測定結果は概ね0.4W/mKで水の熱伝導率より約30%低いことがわかった。そして、温度の上昇にともない熱伝導率も上昇することがわかった。熱拡散率に関しては塩による電気漏れ等の影響で信頼性の高いデータを得るには至っていないが、本測定法で基本的に測定可能であることがわかった。また、磁気浮揚法の方が現段階では二液法より優れていることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はタンパク質の熱伝導率や熱拡散率(熱の伝わりやすさを示す物性値)の測定法を開発する。タンパク質の結晶構造を理解することは、薬品の開発などに重要である。しかし、タンパク質は結晶を作ることが難しく、その結晶育成法が重要な課題となっている。結晶を育成するには温度管理が重要となって来るが、その温度を制御するために必要な物性値がわかっていないのが現状である。タンパク質は非常にもろく、物性値を計測することが難しい。本研究では超電導磁石を用いて結晶を浮遊させた状態で育成し、物性値を計測する方法を開発した。本成果を結晶育成に活用し、最適な結晶育成法がわかれば、薬や生命体を理解するための研究が加速する。

研究成果の概要(英文)：In this study, the thermal conductivity and thermal diffusivity of Hen egg white lysozyme (HEWL) crystal, which has been used as a model protein in the field of protein crystal growth, were measured. Measurements were conducted for HEWL crystals grown by magnetic levitation method using the magnetic Archimedes effect and the two-liquid method. The thermal conductivities of the two HEWL crystals showed almost same value and it was approximately 0.4 W/mK, which was about 30% lower than that of water. It was found that the thermal conductivity increases with the increase of temperature. As for the thermal diffusivity, the reliable data have not been obtained due to the effect of electrical leakage, etc., because the salt was used for crystallization of protein, however it was found that the measurement method is basically applicable for the measurement of thermal diffusivity. Furthermore, it was found that the magnetic levitation method was superior to the two-liquid method at this stage.

研究分野：熱工学

キーワード：熱伝導率 熱拡散率 リゾチウム 磁気アルキメデス効果 二液法 塩析 非定常短細線加熱法

1. 研究開始当初の背景

高品質タンパク質結晶は三次元構造解析に必要不可欠であり、製薬・製剤関連分野やオーダーメイド医療の発展に大きく貢献する。しかしタンパク質の結晶化は非常に難しく、数万種類以上あるとされるタンパク質のそれぞれに関し結晶化条件が異なっている。現在でもその探索は研究者の経験と勘による試行錯誤が繰り返されているのが実情であり、工学的に検討された結晶成長技術の確立が望まれている。結晶化条件に最も大きな影響を与える因子の一つが温度である。タンパク質の過飽和度は無機物質と比べてはるかに大きく、飽和溶解度に決定的な影響を与える温度条件の最適化が結晶育成の一つのキーとなる。しかし、このようなタンパク質結晶化の伝熱制御を試みるにも、タンパク質結晶の熱伝導率および熱拡散率の測定例は皆無に近く、これらのデータが不足しているのが現状である。これは、タンパク質結晶は内部に多くの水分子を含んでいるため極めて脆く、結晶を溶液から取り出して計測することが困難なためである。従って、タンパク質に関する熱伝導率・熱拡散率のデータベースを構築することはもちろん、それらの標準的な計測法の確立が不可欠となっている。

申請者はこれまで熱細線を用いた熱伝導率および熱拡散率の測定法の開発を行ってきた。特に短い細線を用いた非定常短細線加熱法は、数値解析と実験を組み合わせた計測法であり、従来の非定常細線法と比べて非常に短い細線の測定プローブで高精度な液体の熱伝導率および熱拡散率の測定を可能とした。その有用性は種々の液体に対して適用することで確認されている。一方、本研究の連携研究者の一人(牧祥助教・大阪大谷大学薬学部(現 岡山理科大))は、タンパク質溶液とタンパク質結晶の磁性の相違を利用した磁気アルキメデス効果によって、比較的弱い磁場でタンパク質結晶を気液界面に安定浮上成長させる技術を開発した。この方法は結晶が容器壁の影響を受けない無容器条件下で成長できるため、歪の少ない高品質結晶が得られる。

磁場中における試料容器の位置を変えることにより、タンパク質に作用する磁気力の方向を変えることができる。磁気力を重力と同方向(即ち鉛直下向き)にして印加した結晶成長法を行えば、重力と磁気力の合力によって結晶は試料容器底面に押し付けられた状態で成長することから、底面が固体壁であれば結晶中に大きな歪が発生することが想像される。

一般的な結晶成長は、容器壁の至る所で結晶が成長し、高濃度タンパク質溶液を維持することが困難なことから、大きな結晶を成長させることは難しい。しかも、結晶が成長する位置がわからないため、測定プローブの設置位置を特定することができない問題もある。しかし、本磁気浮揚技術を用いた測定法では、結晶成長位置を試料溶液上面の気液界面あるいは容器底面に特定することができ、結晶成長位置に的確に測定プローブを設置することができるという利点を有する。

本研究では、申請者がこれまで開発してきた非定常短細線加熱法と連携研究者による磁気浮揚技術およびハイパーグラビティ技術を用いたタンパク質結晶育成技術を組み合わせ、歪のないタンパク質結晶あるいは強制的に歪を与えたタンパク質結晶の熱伝導率および熱拡散率の測定を試みるのが一つの大きな特徴である。本測定は、短い細線を用いた短細線加熱法であるため、超電導磁石の狭いボア内に設置した小さい試料容器に測定プローブを挿入することを可能とする。

2. 研究の目的

本研究ではタンパク質結晶育成の研究分野においてモデルタンパク質として用いられている卵白リゾチーム(HEWL)に対し、以下の3種類の方法で結晶成長を行った HEWL 結晶の熱伝導率および熱拡散率の測定を行う。

- (1) 超電導磁石を用いた磁気浮揚によりタンパク質溶液上面の気液界面で結晶成長させた歪のない HEWL 結晶の熱伝導率・熱拡散率の測定
- (2) 超電導磁石を用いたハイパーグラビティ下(過重力下)でタンパク質結晶を試料容器底面に押し付けて成長させた歪が多い HEWL 結晶の熱伝導率・熱拡散率の測定
- (3) 磁場を用いず、二液法により結晶成長させた HEWL 結晶に対する熱伝導率・熱拡散率の測定

3. 研究の方法

本研究では塩析に基づくバッチ法により HEWL の結晶育成を行う。沈殿剤の塩には塩化ガドリニウムを用いる。HEWL は反磁性の性質を有する。一方、塩化ガドリニウムは常磁性で大きな磁化率を有する。強磁性物質の塩を沈殿剤として使用することで溶液の磁性を強磁性化し、溶液に作用する磁気力の反作用を利用して HEWL の磁気浮揚(磁気アルキメデス効果)あるいはハイパーグラビティ状態を作り出す。

磁気浮揚を用いる実験では、磁気アルキメデス効果を利用した場合でもタンパク質を浮揚させるのに 3T 近くの磁場が必要となり、超電導磁石のような特殊な装置が必要となる。そこで、超電導磁石を利用せずとも固体壁での結晶成長を避けることができる、二液法による実験を行う。この場合も HEWL の結晶成長にはバッチ法による塩析を用いる。二液法では HEWL 溶液および HEWL 結晶より密度が大きく、非水溶性のフロリナート(3M FC-43)を利用した。HEWL 結晶は HEWL

溶液より密度が大きいため、HEWL 結晶を HEWL 溶液とフロリナートの二液相間に蓄積させることができる。

研究の手順として、磁気浮上による無容器条件下で生成した場合（実験 1）と、ハイパーグラビティ環境下で生成した場合（実験 2）の HEWL 結晶の熱伝導率および熱拡散率を計測し、体積力の影響を比較する。さらに、磁場を用いない二液法で結晶成長させた HEWL 結晶の熱伝導率・熱拡散率の測定を行う（実験 3）。二液法は超電導磁石内の狭い実験環境にも適用できるように装置を小型化し、それ以外の結晶化条件は（実験 1）と（実験 2）と等しくなるようにした。

（実験 1）と（実験 2）の測定結果の比較より、結晶の歪が熱伝導率および熱拡散率に与える影響を明らかにできる。（実験 2）では磁場の強度を変えることで歪の程度を外力場と関連付けることができる。（実験 1）と（実験 3）は共に無容器条件下での結晶成長であり、もし（実験 1）の測定結果が（実験 3）と一致すれば、大型の超電導磁石を用いずともタンパク質結晶の熱伝導率・熱拡散率の測定が可能であることが示される。

4. 研究成果

図 1 に本研究で構築した超電導磁石内における磁気浮揚実験およびハイパーグラビティ実験装置の概略図を示す。超電導磁石は連携研究者の大阪大学大学院理学研究科萩原政幸教授が所有する大阪大学低温研究センターの設備であり、ボア径は 100mm、長さは 200mm である。硬性鏡を介して CCD カメラにより結晶成長の様子を観察することができ、測定プローブの加熱細線が完全に HEWL 結晶中に埋没していることを確認して熱伝導率および熱拡散率の測定を行う。測定容器の雰囲気温度は熱電対により計測する。

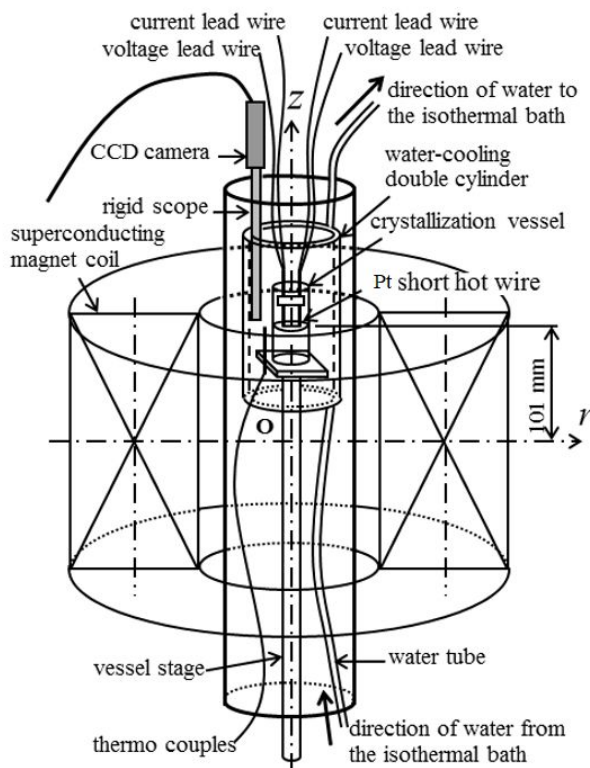


図 1 超電導磁石を用いた実験装置

図 2 (a)に実験 1 および実験 2，(b)に実験 3 のために作成した測定プローブおよびその容器を示す。超電導磁石中における実験では不要な磁気力の影響を避けるため、シンプルな構造となっている。一方、二液法の実験では結晶成長時に液面高さを微調整できるように、容器底面からフロリナートの流入流出が可能な構造となっている。測定プローブの細線に関しては、磁気力の影響を考慮して、タングステンと白金の二種類を用いた。測定結果は両者において一致したが、加工性や耐振動性を考慮すると白金細線の方が優れている。

本研究を進める上で、最適な結晶化条件を見つけることが挙げられた。しかし、同じ型番の HEWL タンパク質に関しても精製プロセス、精製バッチの違いにより最適な結晶化条件が異なることがわかった。先の実験で見出した最適条件で結晶化しても、大きな結晶が育成できないことから、その試料に対し、研究協力者の荒田敏昭特任教授（大阪市大）により更にカラムクロマトグラフィーを実施し、精製を試みた。しかし、試料に対しても結晶の成長程度に変化は生じなか

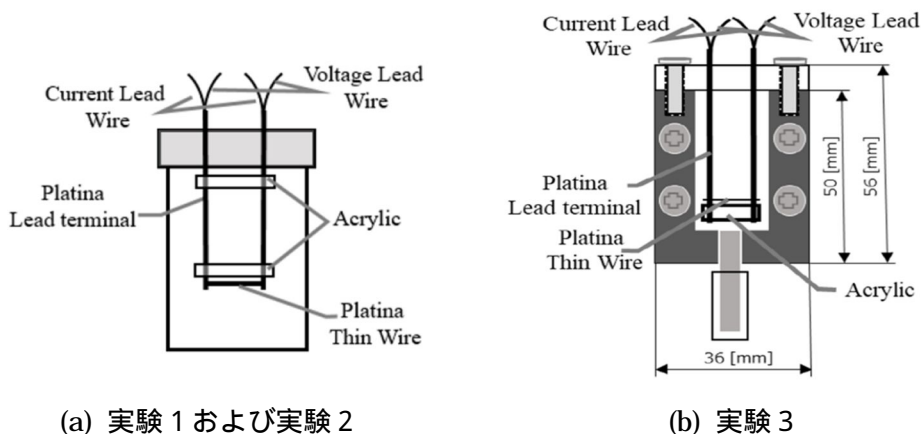


図2 測定プローブおよび測定容器

った．このように，同一型番の試料においても，新たに購入した際には最適な結晶化条件を見つけ直す必要があり，研究に長い時間を要してしまうことが問題点として挙げられる．

図3に実験1と実験3の測定結果を示す．図3(a), (b)は熱伝導率，熱拡散率の温度依存性を示す．熱拡散率はばらつきが大きかったが，熱伝導率に関しては再現性が非常に高く，安定した測定結果が得られ，真の熱伝導率が得られたと考えられる．すなわち，HEWL結晶の熱伝導率の値は約 $0.4 \text{ W/m} \cdot \text{K}$ であり，水と比べて30%ほど低い値を示す．そして，温度の上昇にともない熱伝導率の値も若干上昇する傾向がある．更に，熱伝導率は磁気浮上による実験の値と二液法による実験の値とでは，僅かに違いが見られる．この原因として，結晶の磁場配向が熱物性値に影響を与えている可能性が示唆された．これを模式的に書くと以下の図4のようになる．即ち，図4(a)は磁気浮上させた場合であり，結晶 c 軸は短細線の軸方向と直交しているのに対し，磁場を使わない方法（図4(b)）では，結晶 c 軸がランダムな状態で成長する．

そこで連携研究者の牧は，半径方向磁気力で結晶を浮上させ，結晶 c 軸を短細線の軸方向と同方向にした場合で熱物性値を計測し，異方性の効果を検討する研究を開始した（科研費基盤 C: 20K04335）．図5(a)はその装置写真である．磁場中の特殊な位置を選択することで結晶を気液界面に浮上させることには既に成功している（図5(b)）．また，垂直方向の磁場を用いた実験においても，半径方向の磁場は重要な役割をすることがわかった．図6に二液法における測定部の様子を示す．壁面に多くの結晶が付着していることがわかる．磁気浮揚実験では，超電導磁石のボア中心に試料容器を設置しても中心方向にわずかながら磁気力が作用する．この磁気力は核生成した HEWL 結晶を容器の中心方向へ運び，壁面に結晶が付着することを防ぐことがわかった．このため，特定の位置に結晶核を集中させ，十分な濃度のタンパク質溶液を供給できることから比較的大きな結晶を育成することができると考えられる．一方，二液法では二液界面で大きな結晶を成長させることが困難であった．

これまでの測定結果においては熱拡散率の測定結果にばらつきが大きい．この原因として，磁場中における測定を行うため，プローブに強度を持たせるため，太目の細線を用いていることが挙げられる．そのため，細線の長さ半径の比のアスペクト比が小さく，細線両端からの熱損失が大きくなっていることが一つの原因と考えられる．実際に細い細線を使用し，アスペクト比を向上させることにより，測定結果が安定してくることを確認できた．また，もう一つの原因として，パッチ法に塩を用いているために HEWL 溶液に導電性が生じ，漏れ電流が発生していることが挙げられる．熱伝導率の測定結果が安定していることから，その影響は大きくないとは言え，熱拡散率は加熱初期の瞬間的な立ち上がり大きく影響を受ける．その影響が熱拡散率の測定結果へ影響を与えている可能性がある．しかし，基本的には本測定方法で熱拡散率も測定可能であることがわかった．今後も引き続き計測を継続し，データを蓄積していく．

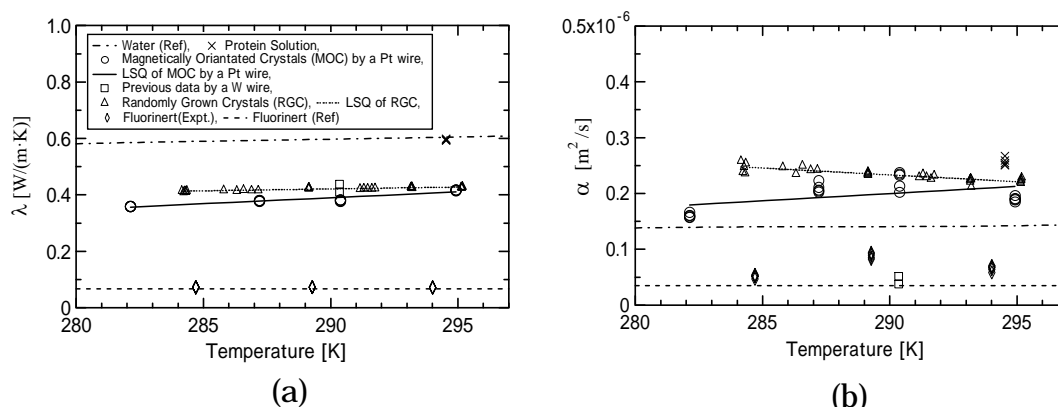


図3 熱伝導率，熱拡散率の温度依存性

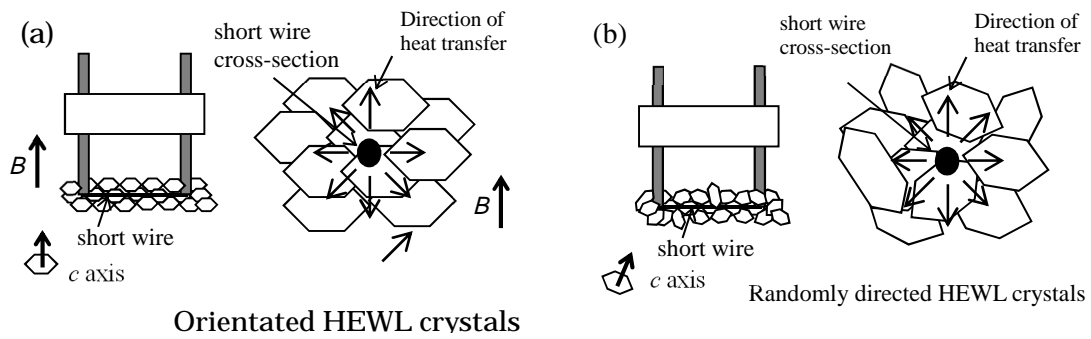


図 4 熱物性値の異方性の可能性を示す模式図. (a) 短細線と結晶 c 軸が直交しながら磁気浮上成長した HEWL 結晶, (b) 結晶 c 軸がランダムな二液法による HEWL 結晶.

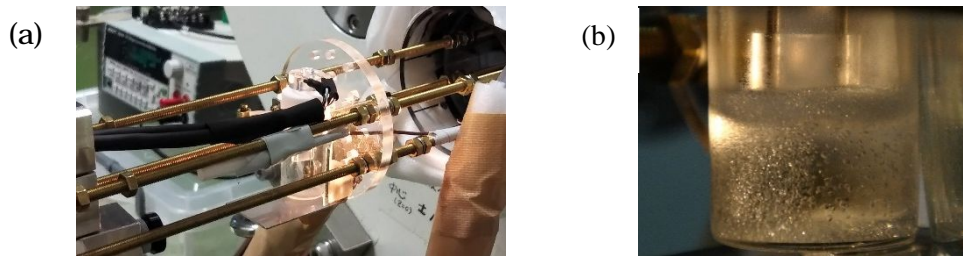


図 5 半径方向磁気力で結晶を浮上させる実験. (a) 装置写真, (b) 結晶 c 軸が短細線の軸方向と同方向に配向しながら浮上成長した HEWL 結晶.

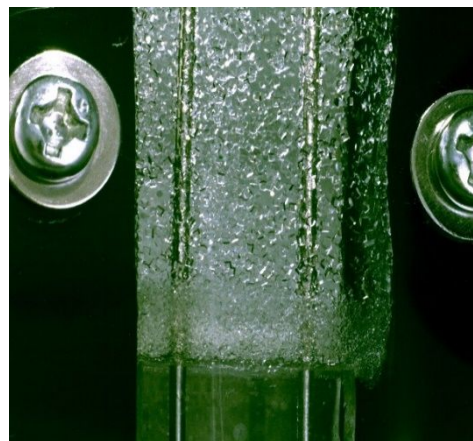


図 6 二液法における結晶成長の様子

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Seiji Fujiwara, Syou Maki, Ryunosuke Maekawa, Seiichi Tanaka and Masayuki Hagiwara	4. 巻 38
2. 論文標題 Measurements of Thermal Conductivity and Thermal Diffusivity of Hen Egg-White Lysozyme Crystals and Its Solution Using the Transient Short Hot Wire Method	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Thermophysics	6. 最初と最後の頁 123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10765-017-2258-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 牧 祥, 田中 誠一, 藤原 誠之, Eka Erzalia, 加藤 瑞葵, 肥後 克匡, 井阪 優希, 萩原 政幸, 荒田 敏昭
2. 発表標題 タンパク質結晶の熱物性値における結晶異方性の影響について
3. 学会等名 第32回バイオメディカル・ファジー・システム学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Eka Erzalia, Seiji Fujiwara, Syou Maki, Seiichi Tanaka, Mizuki Kato, Masayuki Hagiwara, Toshiaki Arata
2. 発表標題 Measurement of Thermal Conductivity and Thermal Diffusivity of Hen Egg-White Lysozyme Crystals which are Crystallized in Containerless Conditions
3. 学会等名 The 20th Symposium on Thermophysical Properties, Boulder, USA (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原誠之, 黒田茂, 牧祥, 田中誠一, 荒田敏昭, 森本正太郎, 宇田川周子, 谷本能文, 中垣俊之
2. 発表標題 非定常短細線加熱法による真性粘菌の熱伝導率および熱拡散率の測定
3. 学会等名 第39回熱物性シンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	田中 誠一 (Tanaka Seiichi) (00599251)	明石工業高等専門学校・機械工学科・准教授 (54501)	
研究 協力者	荒田 敏昭 (Arata Toshiaki)		
連携 研究者	牧 祥 (Maki Syou) (20502256)	大阪大谷大学・薬学部・助教 (34414)	
連携 研究者	萩原 政幸 (Hagiwara Masayuki) (10221491)	大阪大学・理学研究科・教授 (14401)	