

平成 30 年 12 月 21 日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K04669

研究課題名(和文) 完全無容器状態でのタンパク質結晶成長技術の開発

研究課題名(英文) Containerless Protein Crystallization by the Magnetic Force Booster

研究代表者

牧 祥 (Maki, Syou)

大阪大谷大学・薬学部・助教

研究者番号：20502256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、タンパク質結晶成長過程において結晶本体に歪や応力などの負荷を与えない条件(無容器条件)を実現し、高品質結晶の実現を目指している。核発生直後の段階から結晶を制御する必要があるため、磁気力ブースターを使って磁気力の鉛直方向のほかに、半径方向の磁気力も同時に制御した。磁気力ブースターとは2000年ごろに物質・材料研究機構が特許化し、その後、権利を放棄した技術であるが、我々は形状・材質が全く異なる新しい磁気力ブースターを独自に考案した。そしてタンパク結晶を一度も固体面に接触させずに、溶液中で浮上したまま成長させることに初めて成功した。

研究成果の概要(英文)：This research aims at producing high quality protein crystals by means of realizing the condition of "containerless", which is free from any stress or strain under the crystal growth. As required to control the crystals immediately after the nucleation, we utilized a technique of "magnetic force booster". This technique was first licensed by the National Institute for Materials Science (NIMS) around 2000, afterwards, related rights were resigned. We drastically improved the shape and material of the booster, and 13 types of booster were newly developed. These boosters have a capability of fine-tuning of magnetic force, and can locally control over the horizontal component of magnetic force as well as the vertical one. We succeeded in keeping the containerless condition of protein crystallization without contacting the crystals to any solid bodies after the nucleation.

研究分野：機械工学

キーワード：タンパク質結晶 結晶成長 磁気力ブースター 磁気アルキメデス 磁気浮上 無容器条件

1. 研究開始当初の背景

(1) 高品質タンパク質結晶は構造解析に必要不可欠であるが、現在でも研究者の経験と勘に基づく試行錯誤が行われている。その実現には容器壁などからの外的影響を一切受けない環境(無容器条件)で結晶成長が行われるのが理想とされる。無容器条件を工業的に実用化するための技術開拓は創薬分野の発展に大きく貢献する。

(2) 申請者はタンパク質結晶化の沈殿剤に常磁塩を使用し、結晶と溶液の磁性の違いを利用した磁気アルキメデス効果によって鉛直上向き磁気力の効果を増強し、2.2-2.5Tの比較的弱い磁場でも結晶を気液界面に浮上させながら結晶成長させる技術を開発した実績がある。しかし結晶を溶液中で一度も壁や界面に接触させることなく安定成長させる完全無容器条件の実現には成功していなかった。関連した先行技術も一切ない。

(3) 磁気力プースターとは物質・材料研究機構(NIMS)によって2002年に開発された手法である。励磁された電導マグネット中に磁性体を挿入することでプースター本体近傍に局所的に強い磁場勾配を発生させることができる。ただし磁場中ではプースター本体も磁気力で引き寄せられ、NIMSが開発した磁気力プースターの磁場中での負荷は200kg重以上であった。プースターを固定する大規模な支持台の存在が必要不可欠で、実用性はほとんどなかった。

2. 研究の目的

(1) 完全無容器条件の実現のためには結晶を核発生初期段階から制御する必要がある。本研究は磁気力を使って結晶成長過程の制御を試みた。タンパク質結晶成長に必要な局所的に強い磁場勾配の空間は 1cm^3 以下の狭い空間で十分である。そこで磁気力プースターの形状の小型化を進めながら最適化した。

(2) 前もって実施した数値計算結果では、微結晶を溶液中に浮上させたまま成長させるためには半径方向の磁気力を強化する必要があることが判った。そこで半径方向磁気力が対流に与える影響も同時に調べた。

3. 研究の方法

(1) 独自の数値計算結果に基づきNIMSの磁気力プースターと全く異なる形状のプースターを13種類以上試作した(図1)。主な形状は「筒状帽子型」と「筒状鍋型」と命名した2種類に大別される。詳細は特許申請に抵触するため説明を割愛する。材質は強磁性体が磁場中で飽和する問題を解決するため、さまざまな金属で検討した。SUS430, 304, 316, およびニッケルで試作した結果、SUS430が最適と判断した。磁気力プースターを固定する支持台も独自に製作した。設計、図面引きは全て申請者が行い、金属加工は大原製作所に委託した。結晶成長を可視化する観察装置系も全て科研費の支援で構築した。

(2) 磁気熱対流に及ぼす半径方向磁気力の効果を三次元数値計算を用いて検討した。

(3) 磁気浮上させるタンパク質結晶(ニワトリの卵白リゾチーム)の熱物性値を磁気アルキメデス効果と非定常短線加熱法を併用して初めて実測することに成功した。



図1. 開発した磁気力プースター。

4. 研究成果

(1) 試作した13種類以上の磁気力プースターを図1に示す。いずれも磁場中での負荷はNIMSのプースターの1/10以下で、安全性が格段に向上した。8回目の試作機で完全無容器状態のリゾチームを安定浮上させながら成長させることに初めて成功した。

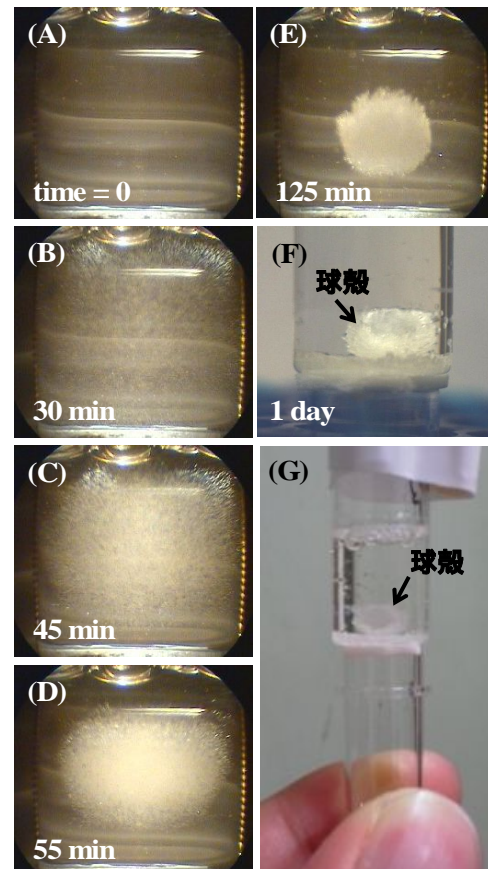


図2. 磁気力プースターによる完全無容器状態でのタンパク質結晶成長。時間と共に結晶が球状に凝集した。(A) 調製直後(time = 0), (B) 30 min, (C) 45 min, (D) 55 min, (E) 125 min, (F), (G) 1日後、ボアから取り出した結晶。

(2) 図 2(A)-(E)に完全無容器状態のリゾチームの成長過程を示す。微結晶は容器中央に凝集しながら成長した。球殻内部は空洞の特異な形状をしていた(図 2(F),(G))。本技術は、現在、NIMS と共同で特許化を目指しており、詳細な寸法や手法は開示できないが、SPring-8での構造解析を実施し、重金属の結合部位などを解析中である。なお半径方向磁気力の強い小型超電導マグネットを利用して溶液中で磁気浮上させながら結晶成長させることに成功した。この成果は〔雑誌論文〕で発表した。

(3) ソレノイダルな超電導マグネットは軸中心で半径方向磁気力が理論的にゼロになる。そこで半径方向磁気力の効果を発揮できる場所の探索と、重力と磁気力の相互作用による不安定状態の検討などを三次元数値計算を使って明らかにした〔雑誌論文〕。またこれまであまり検討されて来なかった磁気力勾配項が存在する運動方程式と存在しない場合とを比較した〔雑誌論文〕。この研究では磁気力勾配項の無次元化プロセスを示した。

(4) 非定常短細線加熱法と磁気浮上技術を併用して卵白リゾチームの結晶の熱伝導率と熱拡散率を計測することに成功した。結晶を短細線表面に付着させるために磁気アルキメデス効果を用いて結晶を磁気浮上させながら気液界面で析出させた。そのため沈殿剤に塩化ガドリニウム(常磁性物質)を使用した。結晶成長開始から 14 時間後の熱伝導率は $0.410 \text{ W/(m}\cdot\text{K)}$ 、熱拡散率は $3.77 \times 10^{-8} \text{ m}^2/\text{s}$ であった。20 時間後の熱伝導率は $0.438 \text{ W/(m}\cdot\text{K)}$ 、熱拡散率は $5.18 \times 10^{-8} \text{ m}^2/\text{s}$ であった。結晶化温度は $17.2 \text{ }^\circ\text{C}$ 、印加磁場(磁束密度)は 4.0 T 、HEWL と GdCl_3 の濃度は $6.53 \text{ wt}\%$ および 0.362 mol/kg 、pH は 3.30 である。〔雑誌論文〕。この研究成果は高く評価され、平成 29 年 11 月に日本熱物性学会論文賞を受賞した。

(5) (4)の研究を発展させ、卵白リゾチーム結晶の熱伝導率の温度依存性を調べた。短細線をタングステンから白金に改良したことで耐久性はるかに向上し、長時間の測定が可能になった。図 3 は熱伝導率の温度依存性を

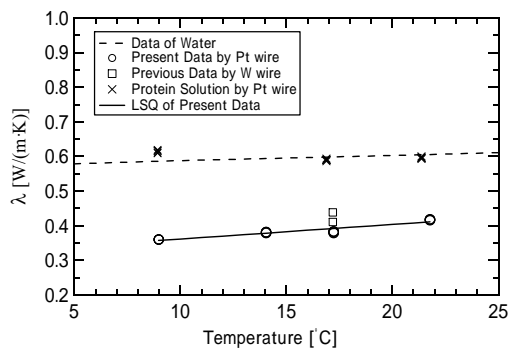


図 3. 熱伝導率の温度依存性。○がタンパク質結晶の測定値、□は我々の先行研究結果、×は水の物性値。

示す(印)。センサープローブの材質を変えても先行研究結果(印)と再現性があることを確認した。また水の温度依存性(×印)と同傾向であることも初めて明らかにした。本研究は現在、論文を投稿中である。

(6) タンパク質溶液の磁場中での対流の効果を定量的に理解するため、Rayleigh-Benard 系の円筒容器内に充填したガドリニウム水溶液に感温液晶を添加し、擬似無重力状態の温度分布を容器側面から可視化した。図 4 は 3.0 T の磁場による上向き磁気力によって対流が静止し、温度分布が水平な熱伝導状態が形成された状態を示す。Churchill and Ozoe の方法で熱損失を測定し、熱輸送をヌセルト数(Nu)、レイリー数(Ra)、磁気レイリー数(Ra_m)で整理した(図 5(a), (b))。また同系を三次元数値計算でシミュレーションした。実験結果および数値計算結果を Nu 数および Ra_m 数で整理すると Silveston の実験式と極めてよく一致した。これは磁気熱対流の熱輸送を Ra_m で整理できることを示唆している。〔雑誌論文〕

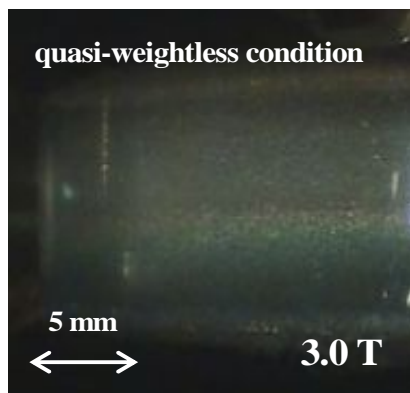


図 4. 擬似無重力状態の温度分布。

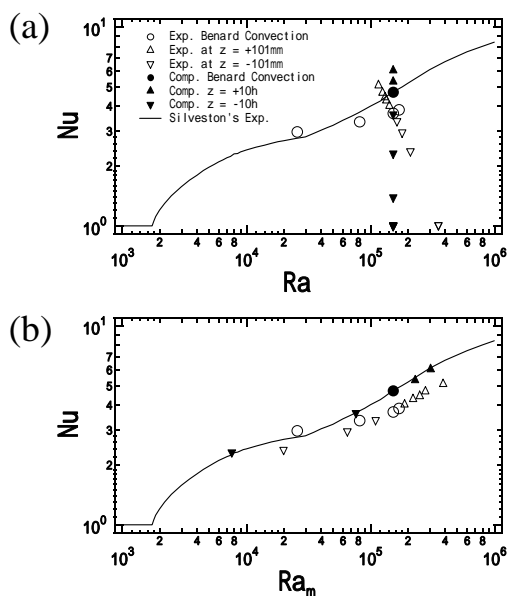


図 5. 磁気熱対流の熱輸送特性。(a) Ra 数で整理した場合、(b) Ra_m 数で整理した場合。曲線は Silveston の実験式で、 Ra_m 数を使ってきれいに整理できることが判る。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

S. Maki, N. Hirota, and M. Hagiwara, “Visualization and analysis of magnetothermal convection of paramagnetic liquid in the Rayleigh-Benard model”, *Physical Review E* **98**, 033109 (19 pages), (2018)

S. Fujiwara, S. Maki, R. Maekawa, S. Tanaka, and M. Hagiwara, “Measurements of thermal conductivity and thermal diffusivity of hen egg-white lysozyme crystals and its solution using the transient short hot wire method”, *International Journal of Thermophysics* **38** No. 8, 123 (16 pages), (2017).

S. Maki, K. Tanaka, and S. Morimoto, “Magnetothermal convection of air in a shallow vessel under the application of an axisymmetric magnetic force”, *Journal of the Physical Society of Japan* **86**, 024402 (10 pages), (2017).

S. Maki, “Magnetothermal convection of water with the presence or absence of a magnetic force acting on the susceptibility gradient”, *PLOS ONE* **11**(9) 0160090 (26 pages), (2016).

牧 祥, 藤原誠之, 前川龍之介, 田中誠一, 萩原政幸, “非定常短細線加熱法と磁気アルキメデス効果を用いた卵白リゾチーム結晶の熱伝導率と熱拡散率の同時測定”, *熱物性* Vol. **30** (3), pp. 131-139 (2016).

S. Maki, Y. Tanimoto, C. Udagawa, S. Morimoto, and M. Hagiwara, “In situ observation of containerless protein crystallization by magnetically levitating crystal growth”, *Japanese Journal of Applied Physics* **55**, 035505-1-6 (2016).

[学会発表](計 11 件)

国際学会発表(5 件)

E. Erzalia, S. Fujiwara, S. Maki, S. Tanaka, M. Kato, M. Hagiwara, and T. Arata, “Measurement of thermal conductivity and thermal diffusivity of hen egg-white lysozyme crystals which are crystallized in containerless conditions”, 20th Symposium on Thermophysical Properties, June 24–29, Boulder, Colorado, USA, (June, 2018).

S. Fujiwara, S. Maki, S. Tanaka, R. Maekawa, and M. Hagiwara, “Measurements of thermal conductivity and thermal diffusivity of hen egg-white lysozyme crystals and its solution using a transient short hot wire method”, The 11th Asian Thermophysical Properties Conference (ATPC 2016) (2016).

S. Fujiwara, S. Maki, S. Tanaka, R. Maekawa, T. Masuda, and M. Hagiwara, “Measurement of thermal conductivity and thermal diffusivity

of hen egg-white lysozyme crystals using short hot wire method”, International Conference of Global Network for Innovative Technology (IGNITE) (2016), Proceeding (6 pages).

S. Maki, Y. Tanimoto, C. Udagawa, S. Morimoto, “Effect of magnetic susceptibility gradient force on magnetothermal convection”, International Conference on Magneto-Science 2015 (ICMS 2015) (2015).

K. Tanaka, S. Maki, Y. Tanimoto, C. Udagawa, S. Morimoto, “Three-dimensional computation of magnetothermal convection of air located in the center of a superconducting magnet”, International Conference on Magneto-Science 2015 (ICMS 2015) (2015).

国内学会発表(6 件)

牧 祥, “磁気熱対流の伝熱特性と感温液晶による可視化”, *バイオメディカル・ファジィ・システム学会 第 30 回年次大会* (2017).

牧 祥, 廣田憲之, 萩原政幸, “感温液晶を利用した磁気熱対流の可視化”, *第 12 回 日本磁気科学学会年会* (2017).

牧 祥, 藤原誠之, 田中誠一, 前川龍之介, 萩原政幸, “磁気浮上技術を利用したタンパク質結晶の熱物性値計測法”. *バイオメディカル・ファジィ・システム学会 第 29 回年次大会* (2016).

牧 祥, 藤原誠之, 田中誠一, 前川龍之介, 萩原政幸, “非定常短細線加熱法と磁気浮上法による卵白リゾチーム結晶の熱物性値”. *第 11 回 日本磁気科学学会年会* (2016).

牧 祥, “全自動可視化装置による超電導マグネット中での熱対流制御”. *バイオメディカル・ファジィ・システム学会 第 28 回年次大会* (2015).

田中恵土, 牧 祥, 谷本能文, 宇田川周子, 森本正太郎, “軸対称半径方向磁気力による磁気熱対流の発達と数値輸送現象”. *第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会* (2015).

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

取得状況(計 件)

[その他]

日本熱物性学会 論文賞 受賞(2016 年)
2018 年 12 月時点で投稿中の雑誌論文 1 報.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧 祥 (MAKI, Syou)
大阪大谷大学・薬学部・助教
研究者番号: 20502256

(2) 研究分担者

萩原 政幸 (HAGIWARA, Masayuki)
大阪大学・大学院理学研究科附属・先端強
磁場科学研究センター長・教授
研究者番号：10221491

(3)連携研究者

荒田 敏昭 (ARATA, Toshiaki)
大阪市立大学・大学院理学研究科・生物地
球専攻系・特任教授
研究者番号：70151165

藤原 誠之 (FIJIWARA, Seiji)
明石工業高等専門学校・機械工学科・教授
研究者番号：90335985

(4)研究協力者

田中誠一 (TANAKA, Seiichi)