

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K04335

研究課題名(和文) タンパク質結晶の熱物性値の異方性に関する研究

研究課題名(英文) Experimental study on anisotropy of thermal properties of protein crystals

研究代表者

牧 祥 (Maki, Syou)

岡山理科大学・フロンティア理工学研究所・准教授

研究者番号：20502256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまで存在すら知られていないタンパク質結晶の熱物性値の異方性の有無について、我々は、実験的手法で測定を行い、その存在を示す結果を初めて明らかにした。非定常短細線加熱法と磁気アルキメデス効果を利用した磁気浮上法を併用しながら、磁場配向した結晶と短細線プローブの方向を変化させ、伝熱方向と結晶c軸の違いによる熱伝導率、熱拡散率の変動を詳細に解析した結果、異方性の存在を示す初めての結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質結晶の生成は経験に基づく試行錯誤で行われているのが実情であるが、成長時に発生する反応熱が溶液相と結晶相のそれぞれにどのように熱輸送されるか不明であった。タンパク質結晶の熱物性値(熱伝導率、熱拡散率)が解明されることで、結晶成長時の伝熱モデルが定量化されることは工業的にも重要な知見であり、さらに異方性の存在を示すことは学術的にも価値のある研究である。いずれも未知の知見であり、本研究でその存在を初めて示すことが出来た意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We have experimentally measured the anisotropy of thermal properties of protein crystals, the existence of which was not even known until now, and have clarified the results showing its existence for the first time. By combining the transient short hot-wire method and the magnetic levitation on the bases of the magneto-Archimedes effect, the direction between the magnetically oriented crystals and the short hot-wire probe were adjusted by changing along that of magnetic field applied. We performed a detailed analysis of the slight variations in the measurement results of thermal conductivity and thermal diffusivity, which will be attributed to the differences between the heat transfer direction and the crystal c-axis. As a result, we obtained the first results indicating the existence of anisotropy of protein crystals.

研究分野：応用物理学

キーワード：磁気力 磁気浮上 タンパク質結晶成長 非定常短細線加熱法 熱物性値 熱伝導率 熱拡散率 磁場配向

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

研究課題番号 20K04335

課題名 「タンパク質結晶の熱物性値の異方性に関する研究」

1. 研究開始当初の背景

タンパク質結晶の熱物性値は未だほとんど不明である。熱物性値の解明は結晶成長時に発生する反応熱が結晶と溶液のどちらに対して支配的に輸送配分されるかを定量的に説明し、結晶成長界面で起こる熱伝達プロセスの解明に大きく貢献する。分子量や構造がそれぞれ異なるタンパク質結晶のそれぞれの熱物性値を系統的に調べてデータ集積することで、結晶化に必要な最適条件の探索にも役立つと期待出来る。2016年に申請者はタンパク質のリゾチームの熱物性値（熱伝導率と熱拡散率）の測定に初めて成功したが、このとき非定常短細線加熱法と磁気アルキメデス効果に基づく磁気浮上成長法を併用した。リゾチームは結晶の c 軸が磁場方向に対して配向する性質があるが、磁気浮上させた結晶と磁場無し環境下で自由成長させた結晶の熱物性値には有意な差があることを発見した。多くの磁性物質には異方性が存在するため、タンパク質結晶の熱物性値にも異方性の効果が存在するかもしれないと考えた。これが本研究を着想した背景である。

2. 研究の目的

タンパク質結晶の熱物性値の異方性の有無を実験的に調べるのが本研究の目的である。リゾチームは構造既知のモデルタンパク質であり、結晶も肉眼で確認できるくらい大型化し、磁気アルキメデス効果で磁気浮上させる方法も確立していることから、まずリゾチームを使って実験を開始した。それ以外のタンパク質も並行して検討した。

3. 研究の方法

熱物性値の測定は非定常短細線加熱法と磁気アルキメデス効果に基づく磁気浮上成長法を併用した。印加する磁場の方向を変えることで結晶の c 軸をそろえ、短細線プローブの軸方向に対して結晶 c 軸が垂直な場合（条件 A） 平行な場合（条件 B） 磁場なし環境で自由成長させた場合（条件 C）の 3 通りで測定して結果を比較した。異方性の効果がなければ全て同じ数値にならない。一方、有意な差が観測されれば熱物性値の異方性の存在を示すことが出来る。その模式図を図 1 に示す。

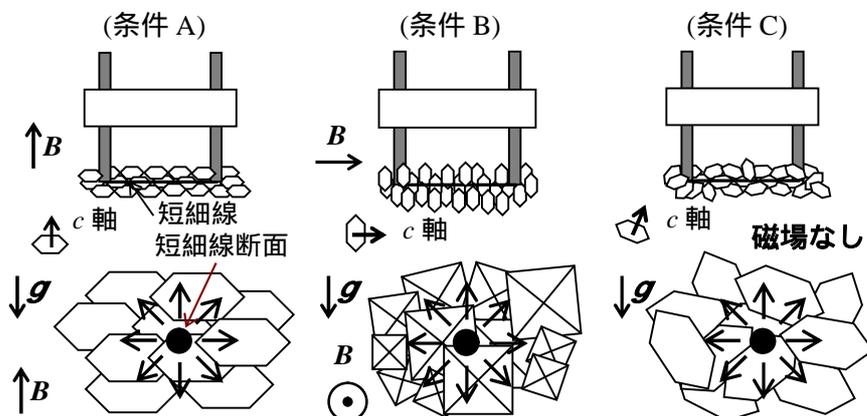


図 1.短細線プローブの方向と結晶方位. 条件 A は磁束 B と結晶 c 軸が垂直. 条件 B は磁束 B と結晶 c 軸が水平. 条件 C は磁場なし条件での自由成長である.

条件 A での実験は、まず超電導マグネットのボアを鉛直方向に設置して、磁気力の鉛直方向性成分で結晶を磁気浮上させる。一方、条件 B での実験は、超電導マグネットのボアを水平方向に傾斜させ、磁気力の半径方向成分で磁気浮上させる。水平ボア内部の磁場環境の数値計算結果を図 2 に示す。図 2(a)は磁束密度の分布、図 2(b)は磁気力場の分布、図 2(c)は磁気力場と重力の合力分布である。超電導マグネットのコイルはソレノイダルであるため、磁気力分布は軸対称になる(図 2(d))。鉛直上向きの半径方向成分を発生出来る領域は中心軸より下方のコイル中心付近の狭い空間のみである(図 2 (e)の破線部分)。その場所で結晶を浮上させながら成長させた。実験では短細線プローブを結晶が包埋したことを CCD カメラで確認してから熱物性の測定を実施した。

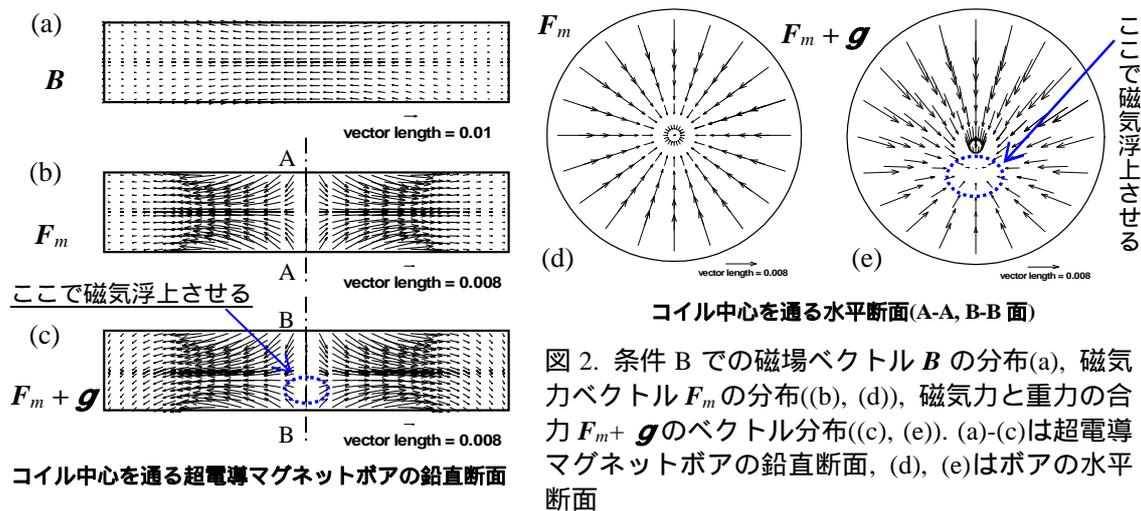


図 2. 条件 B での磁場ベクトル B の分布(a), 磁気力ベクトル F_m の分布((b), (d)), 磁気力と重力の合力 $F_m + g$ のベクトル分布((c), (e)). (a)-(c)は超電導マグネットボアの鉛直断面, (d), (e)はボアの水平断面

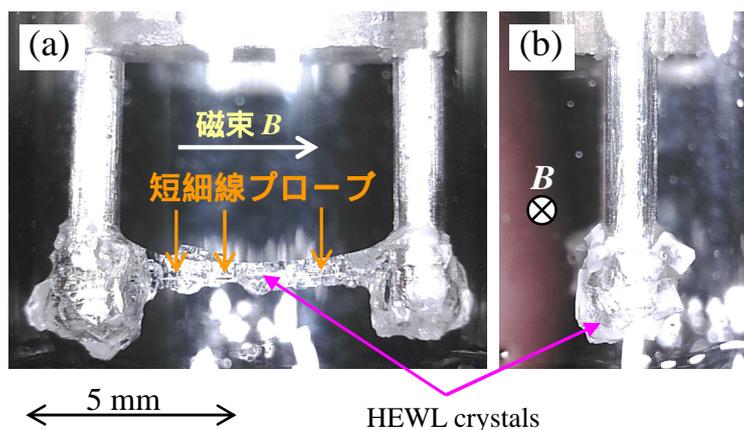
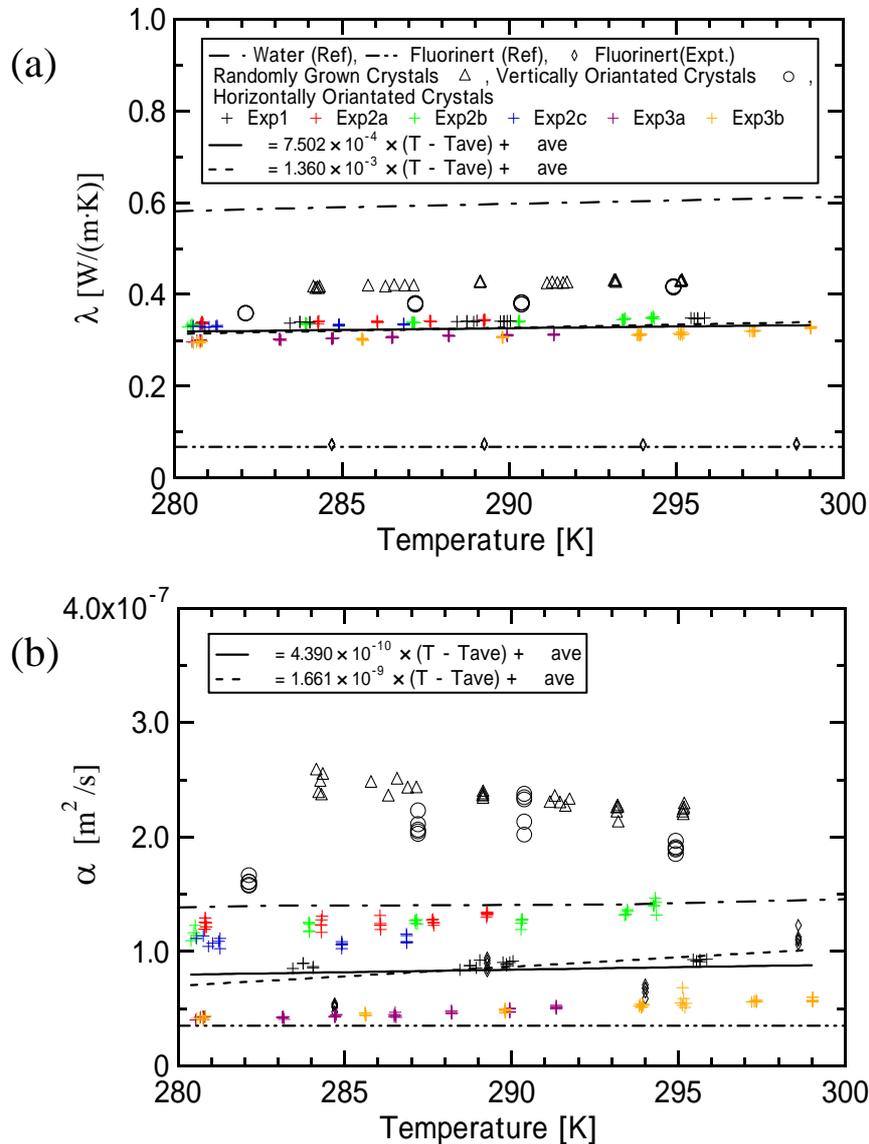


図 3. 条件 B で析出したリゾチーム結晶と短細線プローブ. (a) 正面写真, (b) 側面写真. 結晶が短細線プローブを包埋しているのが判る.

4. 研究成果

水平磁場を印加した実験(条件 B)は独立して 3 回実施した。3 回のうち 2 回は、同一結晶を使って温度測定を繰り返した。従って合計 5 回の測定を実施した。温度範囲は 283K から 299K までである。

図 4(a)は熱伝導率 λ 、図 4(b)は熱拡散率 α の測定結果である。条件 A は丸印(○)、条件 B は十字印(+), 条件 C は三角印(△)で示した。条件 B の 5 回の測定は色の違いで区別した。図中には水(一点鎖線)、フロリナート(二点鎖線)の文献値も追加した。フロリナートの測定も実施した(ダイヤモンド印(◇))。



実験の結果、熱伝導率、熱拡散率は共に、条件 C が最も高く、条件 B が最も低いという共通の傾向が見られた。熱拡散率は熱伝導率に比べてばらつきが大きかったが、同一結晶の場合は再現性が高かった。この理由は、熱伝導率が通電加熱による温度変化応答の勾配で算出出来るのに対し、熱拡散率は勾配と切片の比が指数のべき乗に含まれるため、実験誤差が拡大しやすくなるという根本的な原因に由来するためである。条件 B が最も低くなった理由として、結晶の c 軸と短細線プローブの方向が一致していることで、伝熱方向に対し、異方性の効果が最も顕著に出ていることが挙げられる。図 1 に示しているように、条件 C では異方性の効果は検出しにくく、条件 A は異方性の効果が限定的である。つまり条件 B は、結晶の c 軸に対して、それと垂直方向の伝熱が計測されている。このことから、結晶の熱物性値に異方性の効果が存在している可能性が極めて高いと考えられた。なお、本研究結果の詳細は文献(4)で紹介している。また関連する研究も文献(1)で紹介している。

本研究課題では、非定常短細線加熱法を利用した未知の生物試料の測定も実施した。詳細は文献(2)で紹介している。また、磁気力や磁気アルキメデス効果を利用して、結晶を特定の場所に析出させる研究や、完全無容器状態で析出させる研究も行った。それについては文献(3)、図書(5)、特許出願(6)、その他(7), (8)で紹介している。

<引用文献>

- (1) S. Maki^{*}, S. Fujiwara, S. Tanaka, E. Erzalia, M. Kato, K. Higo, Y. Isaka, R. Maekawa, M. Hagiwara, and T. Arata, “Temperature dependence and anisotropic effects in the thermal properties of hen egg-white lysozyme crystals”, *Symmetry* **12**(8), 1279 (13 pages) (September, 2020). DOI: 10.3390/sym12081279
- (2) S. Maki^{*}, S. Kuroda, S. Fujiwara, S. Tanaka, E. Erzalia, M. Kato, K. Higo, T. Arata, and T. Nakagaki, “Thermal conductivity and thermal diffusivity of slime mold (*Physarum polycephalum*)”, *Biomedical Journal of Scientific and Technical Research* **31**(3), pp. 24140-24145 (October 2020). DOI: 10.26717/BJSTR.2020.31.005090
- (3) S. Maki, M. Hagiwara, “Contactless crystallization method of protein by a magnetic force booster”, *Scientific Reports* **12**, 17287, (10 pages) (October 2022). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21727-x>
- (4) S. Maki, S. Tanaka, K. Miyagi, T. Mori, Y. Isaka, M. Hagiwara, and Seiji Fujiwara, “Thermal conductivity and thermal diffusivity of lysozyme crystals, the c-axis of which is magnetically orientated along the direction of the probe wire”, *Experimental Heat Transfer* **36** (4), (17 pages) (April 2023). DOI: 10.1080/08916152.2023.2197903
- (5) 「タンパク質の構造解析手法 In silico スクリーニングへの応用事例」(牧の執筆担当箇所) “3章第9節 磁気力ブースターを利用した完全無容器結晶成長”, pp. 214-222, (株) 技術情報協会, 東京 (2023). ISBN978-4-86104-971-2
- (6) 「磁気力ブースター、強磁気力場発生装置、結晶及びその製造方法」, 特願 2021-147094, 出願日 令和3年9月6日,
発明者 牧 祥(岡山理科大学), 廣田憲之(物質・材料研究機構), 萩原政幸(大阪大学),
権利者名 学校法人加計学園 岡山理科大学(90%), 国立研究開発法人 物質・材料研究機構(10%).
- (7) OUS フォーラム 2021 奨励賞 (2021年12月21日).
(対象講演)「磁気浮上によるタンパク質結晶化技術」
筆頭受賞 牧 祥, 廣田憲之, 萩原政幸
- (8) 牧 祥, “磁気力ブースターを利用したタンパク質の無容器結晶成長法”, 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年次報告書 No. 9 (令和4年度), pp.17-19 (2023).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 S. Maki, M. Hagiwara | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Contactless crystallization method of protein by a magnetic force booster | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 17287 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-21727-x | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 S. Maki, S. Fujiwara, S. Tanaka, E. Erzalia, M. Kato, K. Higo, Y. Isaka, R. Maekawa, M. Hagiwara, and T. Arata | 4. 巻 12(8) |
| 2. 論文標題 Temperature dependence and anisotropic effects in the thermal properties of hen egg-white lysozyme crystals | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Symmetry | 6. 最初と最後の頁 1279 -13 pages |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/sym12081279 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 S. Maki, S. Kuroda, S. Fujiwara, S. Tanaka, E. Erzalia, M. Kato, K. Higo, T. Arata, T. Nakagaki | 4. 巻 31(3) |
| 2. 論文標題 Thermal conductivity and thermal diffusivity of slime mold (<i>Physarum polycephalum</i>) | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biomedical Journal of Scientific and Technical Research | 6. 最初と最後の頁 24140-24145 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26717/BJSTR.2020.31.005090 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 S. Maki, S. Tanaka, K. Miyagi, T. Mori, Y. Isaka, M. Hagiwara, S. Fujiwara | 4. 巻 36 |
| 2. 論文標題 Thermal conductivity and thermal diffusivity of lysozyme crystals, the c-axis of which is magnetically orientated along the direction of the probe wire | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Experimental Heat Transfer | 6. 最初と最後の頁 2197903-17pages |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/08916152.2023.2197903 | 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9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 牧 祥 |
| 2. 発表標題 磁気力による擬似無重力環境の積極利用と生体材料の熱物性値計測への応用 |
| 3. 学会等名 岡山-今治研究連携を志向したシンポジウム（理学・生命科学系） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 牧 祥 |
| 2. 発表標題 卵白リゾチーム結晶の熱物性値の異方的な効果に関する研究の続報 |
| 3. 学会等名 第16回日本磁気科学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 牧 祥, 廣田憲之, 萩原政幸 |
| 2. 発表標題 新しい磁気カプスターの開発 |
| 3. 学会等名 第15回日本磁気科学会年会, 鹿児島大学郡元キャンパス（オンライン開催） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 牧 祥, 廣田憲之, 萩原政幸 |
| 2. 発表標題 磁気浮上によるタンパク質結晶化技術 |
| 3. 学会等名 2021年度OUSフォーラムA-14, 岡山理科大学(VOD開催) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 牧 祥 |
| 2. 発表標題 磁気浮上技術を利用したタンパク質結晶化技術と最近の研究 |
| 3. 学会等名 岡山理科大学フロンティア理工学研究所2020年度シンポジウム「バイオインフォマティクスと関連技術の最前線」(招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 牧 祥 |
| 2. 発表標題 卵白リゾチーム結晶の熱伝導率と熱拡散率の測定研究の続報 |
| 3. 学会等名 第4回OUSフロンティアセミナー, 「岡山発」実用化を見据えた医用材料開発の最前線 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 S. Maki |
| 2. 発表標題 Techniques for using a magnetic force booster as a stirrer |
| 3. 学会等名 The 2023 Annual SPACC Meeting and the 3rd International OUS Frontier Symposium, Science of new functional materials and devices that contribute to achieving SDGs (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 牧 祥 |
| 2. 発表標題 磁気力ブースターによる対流制御 |
| 3. 学会等名 OUSフォーラム2023基礎から応用・未来技術への出会いと対話 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 S. Maki, M. Fujiwara, M. Hagiwara, Y. Fujiwara |
| 2. 発表標題 Protein crystallization using the method of magnetic levitation |
| 3. 学会等名 The 9th International Workshop on Materials Analysis and Processing in Magnetic Fields, MAP9 (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 (牧の執筆担当箇所) “3章第9節 磁気力ブースターを利用した完全無容器結晶成長”, pp. 214-222 | 4. 発行年 2023年 |
| 2. 出版社 株式会社 技術情報協会 | 5. 総ページ数 9 |
| 3. 書名 タンパク質の構造解析手法 In silicoスクリーニングへの応用事例 | |

〔出願〕 計1件

| | | |
|---|--|------------------------------------|
| 産業財産権の名称 磁気力ブースター、強磁気力場発生装置、結晶及びその製造方法 | 発明者 牧 祥 (岡山理科大学), 廣田憲之 (物材機構), 萩原政幸 | 権利者 加計学園 岡山理科大学(90%), 物材機構(10%) |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-147094 | 出願年 2021年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

| |
|---|
| (1) OUSフォーラム2021奨励賞 (2021年12月21日). (対象講演)「磁気浮上によるタンパク質結晶化技術」 筆頭受賞 牧 祥, 廣田憲之, 萩原政幸 (2) 牧 祥, “磁気力ブースターを利用したタンパク質の無容器結晶成長法”, 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年次報告書No. 9 (令和4年度), pp.17-19 (2023). |
|---|

| | | | |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
| 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 |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|