

「極限環境状態における現象」
平成9年度採択研究代表者

安宅 光雄

(産業技術総合研究所 人間系特別研究体 グループ長)

「磁気力を利用した仮想的可変重力場における タンパク質の結晶成長」

1. 研究実施の概要

構造生物学の発展には、良質のタンパク質単結晶の作製が鍵となっている。また重力パラメータはタンパク質結晶の質を支配する例が知られている。本研究では、磁気力を利用して重力値が連続的に変化するような極限環境を創生し、その中でタンパク質を結晶化し、重力値の変化が結晶成長に及ぼすメカニズムを解明するとともに、良質の結晶の合成に役立てる。

計画開始以来、世界で初めてだと思われる「磁気力均一」超伝導マグネットを設計・稼働させた。磁気力を印加させると、タンパク質結晶の質が変化し、とくに上向きの磁気力印加によって、質の高い結晶が再現性よくできる例を見いだした。また、磁気力を用いて、電気伝導性が低い液体の対流を抑制・制御できることを初めて明らかにした。今後、発生できる磁気力を大幅に増加させた2号機を実現すると共に、実験に使用するタンパク質結晶の種類を増やして磁場と磁気力の影響を解明する。

2. 研究実施内容

(1) 均一磁気力発生超伝導マグネットの設計と製作

本研究の目的、すなわち「鉛直方向の磁気力を重力に重ね合わせることで、仮想的に可変な重力環境を作る」ことを理想的な状態で実現し、さらに磁気力の効果を定量的に評価するためには、実験空間内で均一な磁気力場を発生するマグネットが必要である。そこで、Aグループでは、均一磁気力場を発生する超伝導マグネットの開発を分担している。磁気力場を均一に制御するマグネットはこれまでに存在せず、全く新しい取り組みである。本マグネットはタンパク質の結晶成長の実験に使用されるため、1ヶ月以上の長期間にわたり大きな磁気力場を発生する必要があり、冷媒の補給を必要としない伝導冷却型超伝導マグネットとして開発を進めている。

現在すでにタンパク質の結晶成長の実験に使用されている1号機に引き続き、発生する磁気力場を1号機の $218 \text{ T}^2/\text{m}$ から $880 \text{ T}^2/\text{m}$ へ大幅に増加した2号機の製作を実施中である。本マグネットは通電電流157 Aで中心磁場17.1 Tを発生す

るとともに、 $880 \text{ T}^2/\text{m}$ の磁気力場を直径10mm、高さ10mmの円筒空間（すなわちタンパク質結晶成長実験には十分な大きさ）で、軸方向の不均一性1%以下、径方向の不均一性2%以下で発生する設計である。

平成12年度に線材の製作とコイルへの巻線を終了した。本マグネットは Nb_3Sn 線材のコイル3個、 NbTi 線材のコイル2個と、合計5個のコイルから構成されている。 Nb_3Sn 線材で作製した内側から3番目のコイルの写真を図1に、5個のコイルを組み上げた写真を図2に示す。平成13年度に試験用クライオスタットに組み込んでその性能を確認するとともに、並行して専用クライオスタットを製作し、タンパク質の結晶成長実験用システムとして完成する予定である。

超伝導マグネットでは超伝導コイルが何らかの原因で常伝導状態となるクエンチや停電等によって励磁電源、冷凍機が停止した場合の保護方法が重要である。本マグネットのような多層コイルではこの保護方法の設計は複雑となる。本マグネットに対する適切な保護方法を設計するとともに、その方法を酸化物系高温超伝導コイルのような非常にクエンチをしにくいコイルが1部含まれる場合でも適用できるように拡張し、新しい方法として提案した。

(2) 磁気力を利用した仮想的可変重力場の検出・検証・応用

この部分は、Bグループが担当した。

重力下では、自然対流や結晶の沈降がタンパク質結晶の成長過程に大きな影響を及ぼす。上向き磁気力を印加することで自然対流を抑制・制御するという発想は従来存在しない新しいものであり、そのため強磁場がタンパク質過飽和水溶液や結晶に与える影響についての研究は皆無に近い。そこで均一磁気力発生超伝導マグネット中で上向きの磁気力が作用する場合、溶液内で起こる対流に関する流体力学的な数値計算を実施した(論文発表)。タンパク質過飽和水溶液はわずかではあるが電気伝導性があるため($\text{数} \text{ Ohm} \cdot \text{m}^{-1}$)、ロレンツカも考慮した。ロレンツカと磁気力を共に考慮したという点で、世界で初めての試みである。

計算モデルでは、直径10mm、高さ10mmの円筒形の溶液の底で、直径1mm、高さ1mmの円筒形の結晶が成長する場合を想定した。微小重力環境下では自然対流は存在せず、タンパク質の輸送は拡散律速になる(図3a)。タンパク質結晶の近辺では結晶成長によりタンパク質濃度が低くなるため、重力下では(図3b)、密度差による自然対流が発生し、その最大流速は 1.11 mm/s に達する。第2号機で容易に実現する勾配磁場($\mu_0^2 H(dH/dz) = 685 \text{ T}^2/\text{m}$, $F_m = 0.5 \mu\text{g}$)では、最大流速はほぼ半減して 0.58 mm/s になる(図3c)。この場合、計算結果によると、ロレンツカによる減速効果は無視できる。さらに $m_0^2 H(dH/dz) = 1370 \text{ T}^2/\text{m}$, $F_m = 1 \text{ rg}$ の場合(図3d)、自然対流はほとんど抑制され、濃度分布も無重力環境と同様になることが分かる。

さらにラバル大学との共同研究で、本方法を利用してタンパク質結晶を作成した場合、みかけ上の重力レベルが1.3Gから0.7Gまでかわると、結晶のX線の分解能が高くなることが明らかになった(後述)。この事実は、自然対流がタンパク質結晶の品質に大きな影響を及ぼすことを示している。さらに磁気力が発生しない均一磁場(1Gに相当)でも、ある程度の分解能の向上が観測された。強磁場がタンパク質の結晶成長に及ぼす影響は、ロレンツ力や結晶の磁場配向などいろいろ考えられるが、今後の興味深い研究課題である。

重力が対流を介してタンパク質結晶の成長過程に及ぼす影響について流体力学的な数値解析の手法を利用して研究した(論文発表)。結晶のサイズが数 μm 以上になると結晶は容器底に沈降して、そこで成長する。10 μm くらいまでは、結晶成長の速度は重力下でも微小重力環境下と同じであるが、それ以上では、結晶の成長と共に自然対流の影響が大きくなり、結晶成長速度も微小重力環境にくらべて増大する。X線構造解析で利用する結晶は最低でも100 μm 程度である。すなわち、利用する結晶の全体積のうち、99.9%は重力による自然対流の影響下で作成されることになる。このことを考えると、本プロジェクトで提案する、自然対流の影響を磁気力で制御しようという方法のメリットも期待される。

平成13年5月に、本制度により米国の「環太平洋マイクログラビティ国際会議」に出席し、同時に米国におけるタンパク質結晶成長宇宙実験を行っているマーシャル・スペース・フライト・センターを訪問した。同センターのタンパク質結晶成長の責任者であるAlexander Chernov教授は、「磁気力を用いて重力の効果を調べるといふあなた方の発想は魅力的で、NASAでも、世界で2番目になってしまうが、実施を検討したいが構わないか」と言っておられた。我々の方法に対する評価の1つとして紹介させていただく。

(3) タンパク質結晶成長の実験

Cグループで分担するタンパク質結晶成長については、卵白リゾチームという優れたモデルタンパク質を用いた実験を継続して、磁場や磁気力が及ぼす影響の把握に努めると共に、チトクロームc(ウマ由来)およびチトクロームc'(微生物由来)の結晶を用いた。双方の結晶をマグネット中で育成したところ、鉄を含み常磁性のチトクロームc'では、反磁性のリゾチームとは逆に、磁化力が上向きになるときに沈み、下向きの時に浮くという挙動が見られた。チトクロームcでは、この挙動は顕著ではなかった。その理由はいまのところ明らかではない。X線回折を行ったところ、チトクロームcでは、磁場と磁気力による違いは誤差の範囲で一定で存在せず、チトクロームc'では、磁場が存在しない時を含めて極めて良好で、磁場の効果を検出するに至らなかった。さらに、これらの結晶をSPRING-8においてX線トポグラフで調べた。とくにチトクロームc'については、良好な

トポグラフが得られた。この実験は平成13年度も継続する予定で課題申請中である。

フルクトース・ビスリン酸化酵素は、体内における糖の合成に関係し、血糖値の調節にも関与している重要な酵素である。金材研の共同利用磁石を用いてカナダのラバル大学と共同でこの酵素結晶を育成した。X線回折によって、マグネットの内外で成長させた結晶の分解能（小さいほど望ましい）を調べた結果を図4に示す。

図の上側の軸に示すように、磁気力を重力に重ね合わせて得た仮想的な重力レベルは最低で0.7G、最高で1.3Gで、マグネット中央では磁気力が働かないので1G相当である。このように異なる仮想的重力レベル下でフルクトース・ビスリン酸化酵素結晶を同時に溶液から析出させ、さらに対照として、マグネット外でも同様に結晶を作製した。図から分かるように、仮想的な重力レベルが小さいほど、すなわち図で右から左に移るほど、結晶の分解能は向上した。このことは、重力レベルと、タンパク質結晶の分解能とが相関することを示す。マグネット外で作製した結晶の分解能は $4.24 \pm 1.24 \text{ \AA}$ であり、一方、低重力レベルで作製した結晶の分解能は $3.06 \pm 0.14 \text{ \AA}$ であった。すなわち0.7Gという仮想的低重力環境で、結晶の品質は向上した。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

T. Kiyoshi, S. Matsumoto, T. Asano and H. Wada: Recent advances in high field magnets at TML. *Physica* 294-295, 535-540 (2000).

尾崎修、木吉司、松本真治、和田仁：酸化物系金属系ハイブリッドマグネットのクエンチ保護方法。電気学会B部門誌「電力・エネルギー分野における超伝導技術」

J. Qi and N. I. Wakayama: Suppression of natural convection in nonconducting and lowconducting fluids by the application of a static magnetic field. *Materials Transactions, JLM* 41 (8) 970-975 (2000).

J. Qi and N. I. Wakayama: Solute convection during the whole process of protein crystal growth. *Journal of Crystal Growth* 219, 465-476 (2000).

S.-X. Lin, M. Zhou, A. Azzi, G.-J. Xu, N.I. Wakayama and M. Ataka: Magnet used for protein crystallization: Novel attempts to improve crystal quality. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 274-278 (2000)