

「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) 均一磁気力発生マグネットの設計と開発

平成13年4月1日に、独立行政法人の最初のいくつかの設立が行われ、国立研究所が独法化された。金属材料技術研究所と無機材質研究所から物質・材料研究機構が、また、工業技術院の15研究所が母体となって産業技術総合研究所(産総研)が生まれた。

物質・材料研究機構強磁場研究グループでは、均一磁気力場を発生する超伝導マグネットの開発を行っている。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、長期間に渡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。

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号機の製作を実施している。本マグネットは通電電流 $157 \text{ A}$ で中心磁場 $17.1 \text{ T}$ を発生するとともに、 $880 \text{ T}^2/\text{m}$ の磁気力場を直径 $10 \text{ mm}$ 、高さ $10 \text{ mm}$ の円筒空間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13年度にはコイルを試験用クライオスタットに組み込んで冷却し、コイルが $3.8 \text{ K}$ まで均一

に冷却されることを確認した。さらに 50 A まで通電し、設計値通りの磁場が発生していることを確認した。電流が 50 A を越えたところで漏れ磁場のため、冷凍機の動作音に変化したため励磁を止めたが、これは予定通りである。

漏れ磁場の対策を施し、本コイルを定格まで励磁できる専用のクライオスタットを並行して製作した。クライオスタットの単体試験でコイルステージが 3.9 K まで冷却でき、160 A の連続通電に耐えることを確認した。本クライオスタットの写真を Fig.1 に示す。平成 14 年度に本クライオスタットにコイルを組み込み冷却し、性能を確認した後、産総研人間系特別研究体グループ(関西センター)に移設し、タンパク質結晶育成実験に提供する。

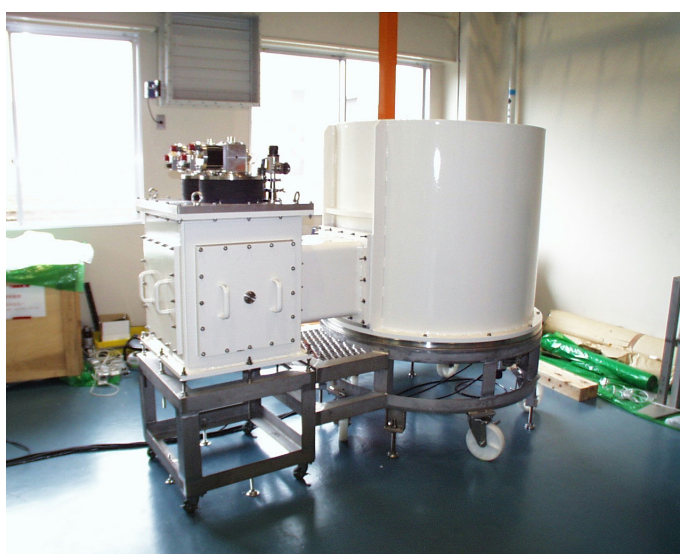


Fig.1 均一磁気力発生超伝導マグネット 2 号機用クライオスタット

この2号機の開発と並行して、当初の計画には含まれていなかった開発であるが、超伝導マグネットの室温ボア内に、強磁性体の円筒と円盤を適切に配置することで、磁気力場の均一性を一定程度保ちつつ、その値を大幅に向上する手法(磁気力ブースター)を見出した。Fig.2 のように、市販の 10 cm の室温ボアに 10 T を発生する伝導冷却型超伝導マグネットにこの磁気力ブースターを組み込むことで、Fig.3 に示すように磁気力場の値を重力に対して水を浮かすことのできる  $1400 \text{ T}^2/\text{m}$  近傍まで比較的容易に増加できることを実験的に確認した。このブースターを用いない場合には、中心で 10 T を発生させたときに発生できるのは  $400 \text{ T}^2/\text{m}$  程度に過ぎなかったが、磁気力ブースターを用いれば、 $1400 \text{ T}^2/\text{m}$  が発生可能であることが Fig.3 から分かる。市販の超伝導マグネットに付加させることで水を浮遊できるほどの磁気力を、ある程度均一に発生する手段が具体的に得られたことになる。

この磁気力ブースターは、磁気力場の均一性を高めることを第一に追求した第2号機の開発とは別に、市販の超伝導マグネットに付加させることで、比較的手軽に大きな磁気力を発生させる手段と位置づけることができる。両者を併せ、これまで閑却視されていた磁気力利用が多く研究室

や企業で実施できることになり、磁気力利用の促進、推進という観点からは、ハードの提供の面で大きな前進を示せたということができると考えている。

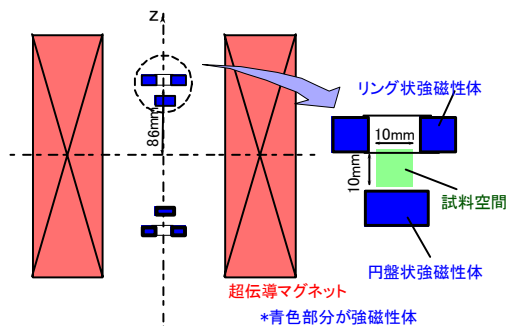


Fig.2 磁気力ブースターの一例

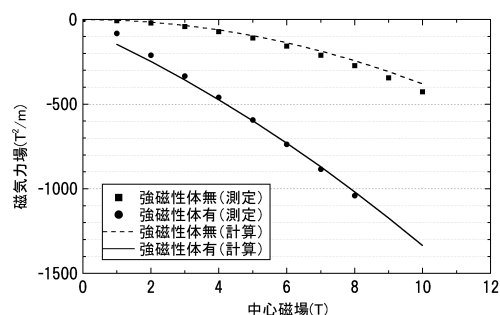


Fig.3 市販の伝導冷却型超伝導マグネットに磁気力ブースターを組み込むことによる磁気力場の増加。

(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、産業技術総合研究所 若山グループが担当した。

勾配磁場で発生する上向き磁気力はみかけ上の重力レベルを減少させ、タンパク質結晶成長の際、発生する自然対流を抑制する効果があることが、これまでの我々の研究で明らかになってきた。しかし最近、磁気力ばかりでなく、強磁場はタンパク質結晶成長にさらに広汎で複合的な数々の影響を及ぼすことを明らかにした (Table 1 参照)。

	勾配磁場	均一磁場
磁気力	Yes	No
ロレンツ力	Negligible	Negligible
結晶の磁場配向	Yes	Yes
新しい磁場効果 (粘性率の増加)	Yes	Yes

Table1Magnetic effects on protein crystal growth.

タンパク質水溶液の電気伝導度は低いため、電気良導体で見られるロレンツ力による対流抑制効果は小さい。また溶液中で浮遊している結晶が磁場配向するので、容器底で成長している結晶上に小結晶が沈降した場合、結晶軸が揃い、母結晶の品質劣化の可能性が少ない。ここでは、それ以外に見いだした新しい磁場効果、タンパク質水溶液の強磁場による粘性率 ( $\eta$ ) の増加について報告する。

【実験】粘性率の測定は落球法で行った。超伝導マグネット中に Fig.4 のような実験装置を配置し、チューブ Q1 に純水、Q2 にタンパク質 (リゾチーム) 水溶液をいれ、糸 R を引きあげた時、矢印方向に落下するガラス玉の速度から液体の粘性率を求めた。純水は参照物質で強磁場で粘性率

は変化しないと仮定した。

### 【実験結果および検討】

#### イ) タンパク質結晶が生じにくい溶液

溶液を0.4 $\mu\text{m}$ のフィルターでこした場合、10Tの強磁場下でも粘性率の変化は見られなかった(Fig.5, Type A ●)。次にろ過しない溶液 (Type B)で、同様な実験を2回行った。最初の溶液( $\square$ )は10T 下で約20%粘性率が增加し、磁場を切ると元の値に戻った。次に作成した溶液( $\triangle$ )も同様な挙動を示し、10T の下で粘性率が約10%増加した。これらは血液の粘性率が強磁場下で赤血球の磁場配向により増加するのと同様、水溶液中の未溶解のタンパク質結晶が磁場配向して、ストッパーのように働き、みかけ上の粘性率を上げるためと考えられる。

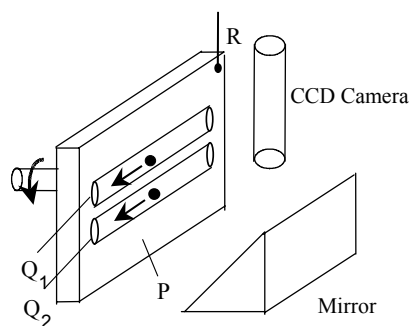


Fig.4 落球法による粘性率測定装置

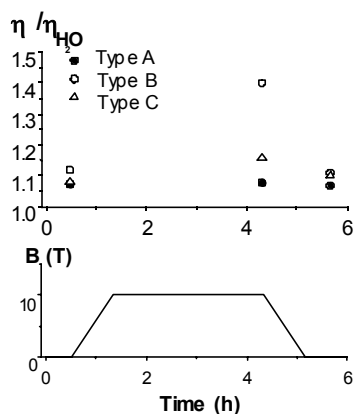


Fig.5 タンパク質水溶液の粘性率の磁場依存性  
(結晶が生じにくい場合)

ロ) タンパク質結晶が生じやすい溶液結晶が急激には生じない、ろ過した溶液を使用し、同様な実験を行った。粘性率の時間依存性はイ)と異なり、時間経過とともに増加し、3時間後には20-30%増加し、磁場を切っても元の値に戻らなかった。但し磁場印加が1時間であった場合は元の値に戻った。ロ)の粘性率増加はすべて浮遊結晶片によるとは考えにくい。

イ)、ロ)ともに粘性率の増加は、結晶成長に伴って発生する自然対流の抑制につながる。粘性率の増加が自然対流を抑制し、さらにタンパク質結晶の成長を抑制することを、流体力学的な数値解析で明らかにした。

今後、上向き磁気力ばかりでなく、Table 1 に示すような強磁場の種々の効果を総合的に利用することで、多くのタンパク質のX線構造解析用高品質単結晶作成が可能になるであろう。Table 1 の磁場効果について考察を加え、最近の研究例も紹介した総説を作成した (“Effects of a magnetic field on the process of protein crystal growth”, J. Jpn. Soc. Microgravity Appl.4月号掲載予定)。同時に、若山・安宅連名で、タンパク質結晶成長の関する最も基本的な国際会議として2年に1度開かれる The 9th International Conference on the Crystallization of

Biological Macromolecules における招待講演として Table 1 に示したような我々の考えの基本を  
発表し理解と討論を求めた。

最後に 1996 年に出願した基本特許である「重力制御法及び装置」が今年度、日本国特許と  
して認められたことを申し添えておく(特許第 3278685 号)。

### (3) タンパク質結晶成長

産業技術総合研究所人間系特別研究体、安宅グループが担当する部分である。

工業技術院の15研究所が1つの独立行政法人になる機会に拠点間移動を行うことができた。タ  
ンパク質結晶を利用した構造解析という面では、最近、西播磨において第三世代の大型放射光施  
設 SPring-8 が稼働を始め、世界トップクラスの強度のX線の発生に成功したことにより、第二世代  
の施設、つくばの KEK は急速に補完的な役割にまわったという状況があった。また、産業技術総  
合研究所関西センターにおいてライフサイエンスの拠点整備を行うことも決まった。そこで、この機  
会に、タンパク質結晶成長の研究を行う拠点を関西にも設け、SPring-8 などの積極的な利用や連  
携を行うことに意義があると考え、平成13年4月1日をもって、つくばから関西センターへの移動を  
行うこととした。磁気力均一マグネット第1号機は、5月に関西センターへと移設し、すぐに稼働を開  
始した。

本プロジェクト開始直後にフルクトース・ビス・ホスファターゼの結晶化を共同で行って、磁場及  
び磁気力印加による品質向上の例を見つけたカナダの Lin 教授の研究室から、Peter Rehse 博士  
を6-8月に招へいし、新たな実験例を増やすことを試みた。しかし、残念なことに、今回持参された  
タンパク質試料はいずれも(磁場の有無に関わりなく)結晶化せず、磁場の利用による変化を実証  
するには至らなかった。

SPring-8 の利用という面では、白色X線トポグラフ撮影のマシントイムを申請していたが、2002  
年2月によりやく最初の割り当てをうけることができた。チトクロームcおよびチトクロームc'の結晶を  
作製・持参し、トポグラフ撮影は順調に進行した。結晶成長は、毎回異なった精製を経た試料から  
出発して溶液調製、過飽和化、核形成、成長を行わせなければならず、その制約の下で、磁場の  
影響の有無の他には、結晶の大きさを含めた条件を揃えて比較した場合に磁場の影響が明らかと  
なる。今回は、磁場内外で結晶の大きさが揃わなかったなどの事情により、磁場や磁気力の有無  
によって、明確な質の差をX線トポグラフで示すには至らなかった。平成14年度以降もこの実験は  
継続する。

関西センターに移動して同じグループを形成した超好熱性微生物ゲノムの利用を目指す分子  
生物学者チームは、順調に遺伝子工学の実験を立ち上げることができた。とくにゲノムの発現、精  
製などの詳細が明らかになっているアミノペプチダーゼ (*Pyrococcus horikoshii* 由来デブロッキン  
グ・アミノペプチダーゼ) について、部位特異的なアミノ酸置換体を3つ作製し、その性質を調べて、こ  
れまで分かっていた活性部位の推測を行った。今後、この超耐熱性タンパク質を結晶成長  
の研究のための試料として利用することを考える。

いままで使用したの試料の他にカルシウム結合タンパク質 CBP40 についても磁場及び磁気力  
の作用の有無の違いを調べた。このタンパク質は、使用した条件下では球状晶にしかならず、質に

関する明確な差をみつけるには至らなかった。

### 3. 研究実施体制

#### ① 代表者名

安宅 光雄(産総研人間系特別研究体精密構造解析研究グループ グループリーダー)

#### ② 研究項目

タンパク質結晶成長

#### ① 代表者名

若山 信子(産総研環境調和技術研究部門 主任研究員)

#### ② 研究項目

仮想的可変重力環境の実態の検証と解明

#### ① 代表者名

和田 仁(物質・材料研究機構 強磁場研究グループ 主幹研究員)

#### ② 研究項目

磁気力発生磁石の設計と開発

### 4. 研究成果の発表

#### (1) 論文発表

- C. Zhong and N.I.Wakayama: “Effect of a high magnetic field on the viscosity of an aqueous solution of protein”, *Journal of Crystal Growth* 226, 327-332 (2001).
- J.Qi, N.I.Wakayama and M.Ataka, “Magnetic suppression of convection in protein crystal growth processes”, *J. Crystal Growth* 232, 132-137 (2001).
- C. Zhong, L.B. Wang and N.I. Wakayama: “Effect of a high magnetic field on protein crystal growth -magnetic field induced order in aqueous protein solutions” *J. Crystal Growth* 233, 561-566 (2001).
- T. Kubota, K. Homma, J. Noda, T. Yamane and M. Ataka: “Importance of nitrate in the crystal growth of cytochrome c from four biological species judged by morphodrom analysis”, *J. Crystal Growth* 233, 813-822 (2001).
- S. Tanaka, M. Ataka, T. Kubota, T. Soga, K. Homma, W. C. Lee and M. Tanokura: “The effect of amphiphilic additives on the growth and morphology of *Aspergillus niger* acid proteinase crystals”, *J. Crystal Growth* 234, 247-254 (2001).
- S. Tanaka, Y. Oda, M. Ataka, K. Onuma, S. Fujiwara and Y. Yonezawa: “Denaturation and aggregation of hen egg lysozyme in aqueous ethanol solution studied by dynamic light scattering”, *Biopolymers* 59, 370-379 (2001).
- S. Onoe, S. Ando, M. Ataka and K. Ishikawa: “Active site of deblocking aminopeptidase from *Pyrococcus horikoshii*”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 994-997 (2001).
- J.Qi, N.I.Wakayama and A.Yabe: “Magnetic control of thermal convection in electrically

nonconducting or low-conducting paramagnetic fluids”, International Journal of Heat and Mass Transfer 44, 3043-3052 (2001).

- N.I.Wakayama, C.Zhong, T.Kiyoshi, K.Itoh and H.Wada: “Control of vertical acceleration (Effective gravity) between normal-and micro-gravity”, AIChE Journal 47, 2640-2643(2001).
- L.B.Wang and N.I.Wakayama: “Dependence of aspect ratio on magnetic damping of natural convection in low-conducting aqueous solution in a rectangular cavity”, Int. J. Heat and Fluid Flow, 23, 92-95 (2002).
- 小柳 圭、松本真治、福島敬二、木吉 司、和田 仁: Persistent Mode Operation of Cryocooler-cooled HTS Magnet, IEEE Transactions on Applied Superconductivity, in press.
- 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, 電気学会論文誌 B, 121 1276 (2001).

(2) 特許出願

国内出願1件