

航空機実験用の氷結晶成長セルの開発

中坪俊一、Salvador Zepeda、宇田幸弘、木滑英司、古川義純（北大低温研）
真木孝夫（オリンパス）

1. はじめに

極海などの寒冷環境にすむ魚や昆虫などは、生体が過冷却しても凍結せず生き延びる。これは、体液に凍結抑制タンパク質と呼ばれる特殊なタンパク質が含まれ、それらが氷の界面に吸着することで、凍結を抑制するためと考えられている。すなわち、凍結抑制タンパク質が、生体の耐凍結戦略を司る鍵となる。このような機能を持つタンパク質は、現在までに数種類が知られており、糖鎖を含む構造の不凍糖タンパク質（Antifreeze Glycoprotein, AFGP）と糖鎖のない不凍タンパク質（Antifreeze Protein, AFP）に大きく分けられている。氷結晶とこれらのタンパク質がどのように相互作用するのか、さらにそれが氷結晶成長をどのようにして制御するのかは、きわめて重要な研究課題である。このようなタンパク質の機能は、生命現象との関連のみならず、医学・工学分野などでの応用も期待され、その重要性が強く認識されている。しかしながら、これらのタンパク質が氷結晶の成長を制御するメカニズムについては、ほとんど明らかにされていない。本研究では、結晶成長の基礎的視点に立った実験・理論的研究を展開することで、凍結抑制タンパク質の機能発現メカニズムの解明を目指している。

本研究は、日本宇宙フォーラム地上公募研究（平成 16-18 年度）、及び科学研究費基盤 A（平成 18-21 年度）のテーマとして研究が継続されている。この研究の推進にあたり、氷結晶の自由成長実験を行うために、新しい結晶成長セルを開発した。この成長セルは、航空機のパラボリック飛行を利用して得られる 20 秒間の微小重力環境での実験を行うために特別に設計された。さらにこの成長セルは、実験室での様々な実験にも活用され、研究推進のために重要な役割を果たしている。本報告では、本結晶成長セルの特徴を紹介するとともに、このセルで得られた最新の成果についても紹介する。

2. 結晶成長セルと光学系の開発

AFGP、または AFP を不純物として含む過冷却水中での氷結晶の自由成長実験を行うために、新しい結晶成長セルを設計・開発した。図 1 は、結晶成長セルの構造を示す断面図である。この装置は、航空機実験も含め、氷結晶の自由成長実験に共通に使用された。対物レンズの作動距離に合わせて、成長セルの厚みを 15 mm に留めるなど、全体を小型化するように工夫されている。成長セルの冷却はペルチェ素子により行うが、高精度の温度制御装置と組み合わせることで、10 mK の精度で温度制御が可能である。氷の結晶成長は、成長セルに挿入した細いガラス毛细管の先端で行う。この毛细管ホルダーも新しく開発され、毛细管がその中心軸の周りで回転できるように工夫されている。成長セルの温度が所定の過冷却温度に到達したときに、毛细管ホルダーの毛细管の端を急冷して、毛细管内で強制的に氷核生成を行う。発生した氷の結晶核は毛细管内部を成長するとともに、互いに競合して淘汰を繰り返す、最終的に 1 個の氷単結晶のみが生き残る。この

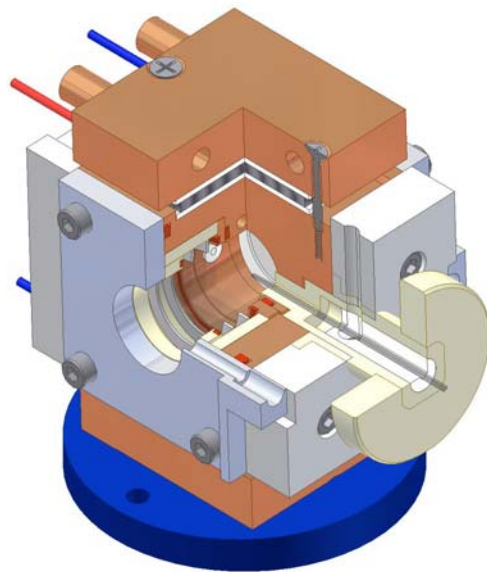


図 1 開発された氷結晶自由成長装置

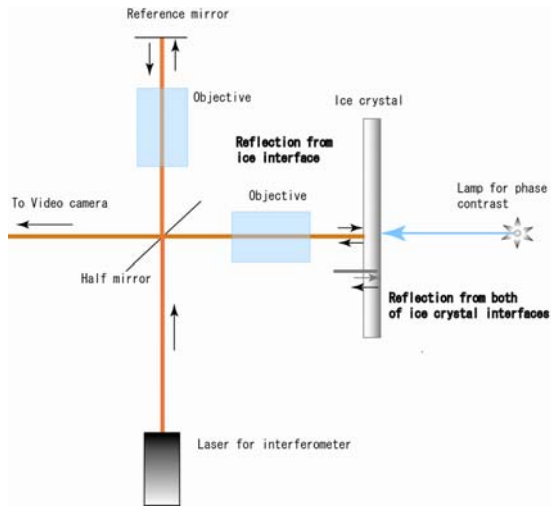


図2 マイケルソン干渉位相差顕微鏡の光学系の基本概念。氷のような薄い結晶の場合、界面からの反射と参照ミラーの間の干渉、結晶の両面からの反射による干渉の両者が同時に観察可能である。

単結晶が毛細管の先端に達すると、成長セルの中での氷結晶の自由成長が開始する[1、2]。

この実験装置による氷結晶成長の過程を観察するために、位相差顕微鏡とマイケルソン干渉計を同軸で組み合わせた新しい顕微鏡観察装置（マイケルソン干渉位相差顕微鏡）を開発した。マイケルソン干渉計は、観察面からの反射光を用いて干渉縞を発生させる光学系で、反射面の凹凸や段差の高さを定量的に解析できる装置である。このとき干渉縞を発生させるためには、反射面からの反射光がある程度強くなくてはならない。すなわち、鏡面のように入射光の反射が強い面では観察は容易であるが、氷と水の界面のようにきわめて反射が弱い界面の観察には様々な工夫が必要である。図2に、その光学系の基本概念を示す。氷/水界面からの反射光による干渉縞を得るための多くの工夫がなされている。この光学系での観察を可能にする大きな要素として、氷結晶成長実験装置との一体的な開発が極めて重要である。図1に示した実験装置側にも、ガラス面からの反射光の影響を可能な限り排除できるような構造が採用されている。

3. 本装置による航空機微小重力実験

本実験装置は航空機に搭載され、微小重力条件において氷結晶成長界面の微細構造の観察に使用された。実験は、2006年12月に実施された。図3は微小重力環境で得られたAFGP水溶液中で成長する氷結晶の位相差画像とマイケルソン干渉計画像の一例である。氷/水界面からの反射光によっても十分な強度の干渉縞が得られているのが分かる。さらに図4は干渉縞の解析により得られた氷結晶の厚みの時間変化を示している。微小重力の継続時間は20秒間と極めて短時間であ

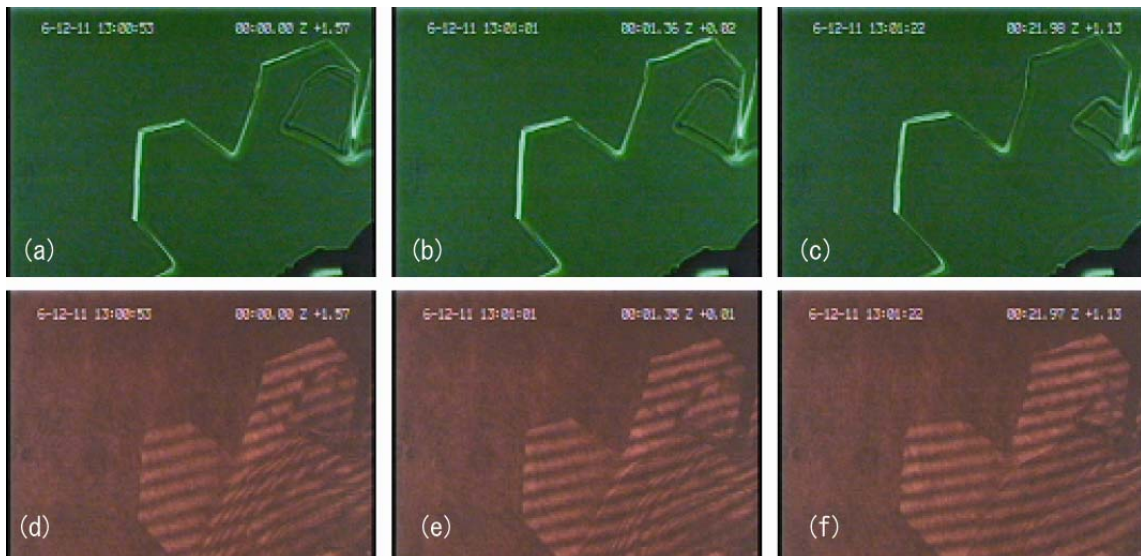


図3 マイケルソン干渉位相差顕微鏡で観察されたが画像。(a)～(c)は、位相差画像、(d)～(f)は、マイケルソン干渉計画像。2006年12月の航空機による微小重力実験で取得された実験結果の一例。AFGP4-6, 0.01 mg/ml, T = -0.24 K。

るが、その間に明らかに成長速度が低下したことが観察された。すなわち、本装置のように測定感度を十分に上げることによって、結晶成長速度に対する微小重力の効果を検知することが可能であることを示している。

4. 結晶成長セルの地上実験応用[3]

新しく開発した結晶成長セルは、航空機実験だけではなく様々な光学系に搭載して活用されている。その典型的な例として、北海道大学電子科学研究所に設置されている Nikon Imaging Center (NIC) にあるスペクトル共焦点顕微鏡により観察した結果を紹介する。

自由成長時における結晶成長に伴う AFGP 分子の再配分を観察するために、図 2 に示した自由成長セルを共焦点蛍光顕微鏡システムに搭載して実験を行った。本実験では、NIC の共焦点顕微鏡を利用した。使用した AFGP 試料は、AF-Protein 社から提供されたもので、分子量サイズが 2600 程度のタイプ 8 と呼ばれる分子が大部分を占めている。このタンパク質分子に、蛍光物質 FITC (fluorescein isothiocyanate, 分子量 389, 励起光波長 494 nm, 放射光波長 520 nm) でラベルを付けた。AFGP 分子のほぼ 100% が蛍光ラベルされるように、試料を調整した。

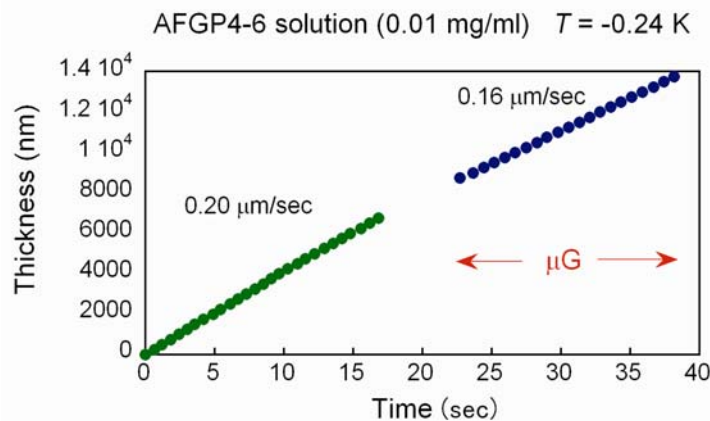


図 4 結晶のベール面の両面からの反射による干渉(明暗の繰り返し)から求めた結晶の厚みの時間変化。縦軸は、絶対値ではなく、測定開始の時間 0 からの厚みの増加量。

共焦点顕微鏡により蛍光観察を行うには、蛍光励起のためにレーザー光が試料の水溶液中を透過するため、その光路にある蛍光分子を励起し、観察の障害になる。これを避けるには、水溶液の濃度をできるだけ低くすることが必要である。本実験では、一方向成長などで使った AFGP 濃度よりも 2-3 桁小さい $10 \mu\text{g/ml}$ のオーダーの濃度が観察に最も適していることがわかった。

図 5 は、毛細管の先端から成長する氷単結晶の 1 秒ごとの共焦点蛍光連続画像である。まず、(a)では、結晶の縁に当たる界面(ピラミダル面)のうち、1 と 2 の界面には強い蛍光強度が観察され、界面 3 には観察されない。すなわち、界面 1 と 2 には、AFGP 分子が吸着しているのに対し、3 の界面には吸着分子が存在していないことを示している。(b)から(f)の画像を見ると、1 と 2 の界面は完全に成長が停止しているのに対し、界面 3 のみが成長を継続している。界面 3 は、成長とともに面積が小さくなり、やがて消失(f)する。これと同時に新しい成長ステップが界面 1 側に回り込むように現れ、その瞬間に界面に吸着していた AFGP は雲散霧消し、その界面は成長を開始する(g)。新しく生じた界面は、AFGP 分子の吸着は無いのでそのまま成長が継続する(h)。この画像は、界面への AFGP の吸着が結晶成長を阻害していることを明確に示す世界初の映像で、このような直接観察がなされたことは驚異的な結果である。さらに、吸着した AFGP 分子は従来考えられていたほど強固に界面に吸着しているのではなく、新しい成長ステップが現れると簡単に吸着状態から離脱できる、すなわち界面への吸着はかなり可逆的に起こるらしいということも明らかになった。

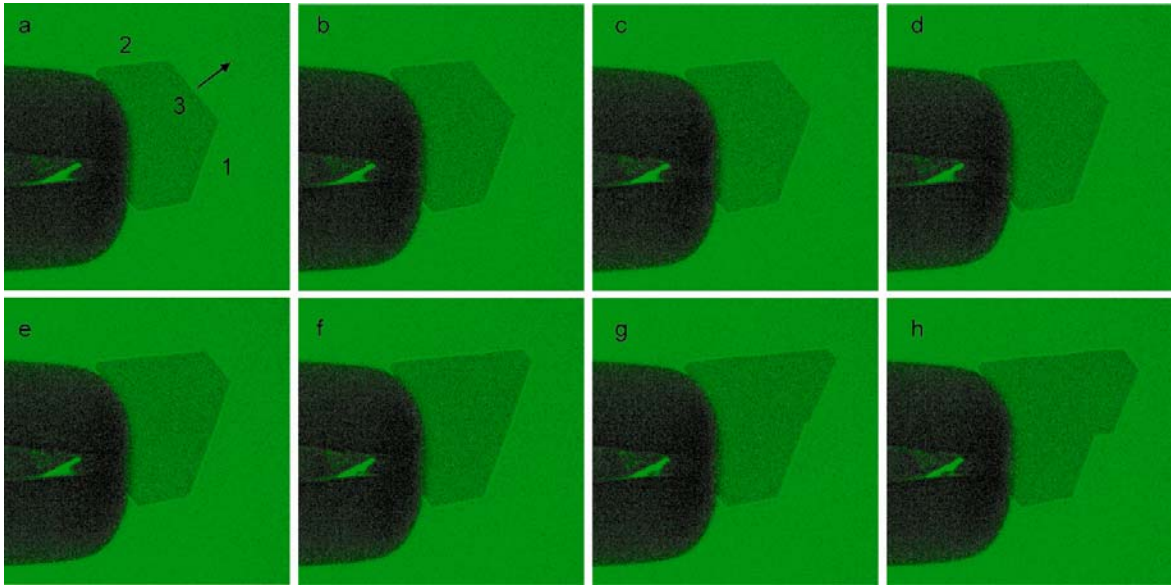


図5 共焦点蛍光顕微鏡により観察された氷結晶。AFGP8, 5 $\mu\text{g/ml}$, -0.21°C 。1秒ごとに撮影された。

5. まとめ

本研究で開発した新しい氷結晶実験装置は、従来にはない高精度での実験を可能にした。この装置を使って得られた研究成果が基礎となり、昨年公募された国際宇宙ステーション、「きぼう」日本実験棟船内実験室第2期利用前半期間（2010年度後半から2011年度までの約1.5年間）の候補テーマとして採択された（応募総数73件中14件採択）。今後、本実験装置をベースに宇宙実験用の実験装置の製作が進行する予定である[4]。

謝辞：本研究は、宇宙環境に関する公募地上研究（日本宇宙フォーラム）（平成16-18年度）、及び科学研究費基盤研究A（平成18-21年度）により実施された。

参考文献

- [1] 古川義純：氷の円盤結晶の形態不安定化の宇宙実験に向けて、平成18年度宇宙環境利用の展望（財団法人資源探査用観測システム・宇宙環境利用研究開発機構）（2007）78-98。
<http://www.jaros.or.jp/>
- [2] Y. Furukawa, E. Yokoyama, Y. Nishimura, J. Ohtsubo, N. Inohara and S. Nakatsubo: Visualization of a thermal diffusion field around a single ice crystal growing in supercooled water under a short-term microgravity condition, *J. Jpn Soc. Microgravity Appl.*, 21 (2004) 196-201.
- [3] Salvador Zepeda, Etsuro Yokoyama, Yukihiro Uda and Yoshinori Furukawa: In-situ observation of antifreeze glycoprotein kinetics at the ice surface reveals a two-step reversible adsorption mechanism, submitted.
- [4] <http://kibo.jaxa.jp/experiment/theme/jpm02/pick.html>