不凍化蛋白質を利用する氷スラリーの結晶構造のミクロな研究*

Svein GRANDUM^{*1}, 矢部 彰^{*2}, 中込和哉^{*3}
田中 誠^{*4}, 竹村文男^{*4}
小林康德^{*5}, Per-Erling FRIVIK^{*6}Microscale Analysis of Crystals in Ice Slurry Made from
an Antifreeze Protein SolutionSvein GRANDUM, Akira YABE, Kazuya NAKAGOMI,
Makoto TANAKA, Fumio TAKEMURA,
Yasunori KOBAYASHI and Per-Erling FRIVIK

In order to clarify the crystal growth mechanism and to realize the low-temperature heat transportation system of ice slurry made from an antifreeze protein (AFP) solution which consists of ice crystals resistant to recrystallization, a fundamental and microscale analysis has been conducted on the ice crystals. Since the thermophysical properties of ice slurry used for ice storage applications, such as energy storage ability and flowability, depend on the shape and size of individual crystals, crystal growth patterns were experimentally investigated by changing the local supercooling temperature while neglecting the influence of heat flux. At low temperatures, when supercooling exceeded a certain transition value, dendritic crystals were generated, which were apparently unaffected by the existence of AFP. In between the transition temperature and the freezing point, needle-like crystals were observed to grow rapidly in the c-axis direction. If these needle-like crystals were held at temperatures within the hysteresis gap (between the freezing and the melting point), bipyramidal crystals within a maximum tip angle of approximately 30° were formed. Since protein adsorption to the ice crystal surface will strongly affect the crystal growth, the surface of crystals was investigated by using a Scanning Tunneling Microscope (STM) in order to determine the influence of AFP on the microscale surface structure. A systematic groove/ridge pattern that was aligned 65°(±5°) to the hexagonal side on one bipyramidal plane was observed. The grooves' length and width were similar to the length and width of AFP, indicating adsorption of single protein molecules to ice with an orientation corresponding to the alignment angle. Their depth, ranging from 2 nm to 10 nm, gives information about the surface curvature. Knowledge from microscale analysis can be used in order to create cost-effective artificial additives for ice slurry systems.

Key Words: Ice Slurry, Antifreeze Protein, Microscale Heat Transfer, STM, Freezing

1. 緒 言

氷スラリーは冷熱供給および冷熱蓄熱のための有望な熱媒体であり、潜熱分によりエネルギー密度が大きく、装置、配管等の大幅なコンパクト化が期待される。しかしながら氷の生成過程や構造上、静電的な相互作用をする水素結合が重要になるため、かなり複雑な現象になり詳細なメカニズムのわからないまま経験的に使用されている要素が多い。また、長時間の貯蔵に

対する凝固防止法の確立など残された課題も多い。著者らは北極の魚の中に存在する Antifreeze protein (不凍化蛋白質略して AFP) を用いて、お互いに付着しない氷結晶を作成し、この氷結晶による氷スラリーの可能性を検討している。前報¹⁾では、この AFP を用いた氷スラリーシステムについて、AFP 溶液に特徴的である針状結晶の場合の蓄熱特性と流動特性を測定しており、その結果として、スラリーは典型的なビンガム流体を示し、氷が質量比 30% の溶液において、速度と内径の比が 100 s⁻¹ の場合、有効粘性係数は純水の 2 倍となり、氷スラリーシステムとして利用可能であることを示している。本研究では AFP 水溶液中での氷結晶の形状と過冷度の関係を検討し、またミクロな電気熱流体力学現象としての観点からのメカニズムの解明とその人工物への代替を目的に、走査トンネル顕微鏡 (STM) を用い nanometer オーダでの表面構造を測定した。現在まで AFP のミクロな構造につい

* 原稿受付 1996 年 6 月 25 日。

*¹ 筑波大学大学院 (〒305 つくば市天王台 1-1)。*² 正員、通商産業省工業技術院機械技術研究所、筑波大学構造工学系。*³ 富山医科薬科大学 (〒930-01 富山市杉谷 2630)。*⁴ 正員、通商産業省工業技術院機械技術研究所 (〒305 つくば市並木 1-2)。*⁵ 正員、筑波大学構造工学系。*⁶ ノルウェー国立工科大学 (SINTEF ENERGY 7034, Trondheim, Norway)。

Fig. 3 Ice crystal patterns for various growth initiation temperatures. The scales are equal for all three pictures

観察した。2 mg/ml AFP 溶液 (50 mM NaCl 添加) を温度コントロールのできるエチルアルコールで冷やし、光学顕微鏡で氷の成長の様子を観察した。溶液の温度はサーミスタで測定した。目的温度の安定した過冷却状態を達成した後、種結晶を入れて結晶を生成させた。結晶表面の近くには潜熱により温度分布が生じるが、ここでは観察した氷のチップが小さいことから生ずる熱流束が小さいと考え、結晶表面温度はサーミスタの温度とした。観察の結果、2 mg/ml AFP 溶液の場合、針状結晶の c 方向の成長速度は凝固点 (-0.3°C 程度) と遷移温度 (-1.0°C 程度) の間で速いことがわかった (図 3)。Coger ら⁽¹⁸⁾ の観察にれば、針状の氷成長の形態は 1 mg/ml から 10 mg/ml までほぼ同様に見られたことが報告されているので、ここでは過冷度と氷結晶の形状の関係を実験的に明らかにした。一方、遷移温度以下では典型的な樹枝状の成長が観察された。AFP が決まった結晶平面に吸着すると仮定すると、これらの観察結果は AFP にエネルギー的に最少である結晶平面 ($\{20\bar{2}1\}$) に整列するのに時間が必要で、過冷却が臨界値を超える場合には、水分子が AFP 分子の親水基に水素結合により吸着するよりも速く水分子が氷表面に吸着してしまうと考えられる。

針結晶を含む溶液の温度を遷移温度から上昇させていくと c 方向の成長速度は遅くなり、凝固点で成長が完全に止まった。しかし、熱ヒステリシス温度間では、

Fig. 4 Photograph of bipyramidal crystals forming from needle type crystals

c 方向に垂直な方向の成長は止まらず、上下対称の六角すい形状に成長していくことが観察された (図 3)。熱ヒステリシス温度間において凝固点に近い温度領域では、氷の成長速度が融点に近い温度領域よりも速い。

六角すい状結晶の成長に対する観察から、AFP がピラミッド平面に吸着されている可能性が示唆される。もし、AFP はプリズム平面に吸着するとしたら、 a 方向の成長が止まると考えられるからである。さらに、温度を上昇させ、針結晶の太さを増していくと、図 4 に示すような六角すい形状が作られていく。観察によれば、六角すい形状の頂点は 30° 以下であり、 $\{20\bar{2}1\}$ ピラミッド平面の頂点が最大 34° であることに一致している (結晶の単位セルの大きさは、 $a=4.519 \text{ \AA}$, $c=7.3616 \text{ \AA}$ ⁽⁶⁾)。AFP の親水基側の鎖は水素結合しながら、氷格子の間隔に合せて吸着する。

以上のことから、 c 方向に成長する針状結晶は AFP が吸着したピラミッド平面が階段状に重なり合うと考えられ、これにより針状氷が生成される機構が定性的に説明できると思われる。熱ヒステリシスギャップ内の温度の中で小さい針状結晶を維持すれば、結晶は上下対称の六角すい形状になり、AFP が吸着した階段状の表面が $\{20\bar{2}1\}$ 平面に近づき、平らとなった時点で成長が止まると考えられる。しかしながら、温度が凝固点以下の状態で結晶が c 方向に成長するメカニズムは説明できておらず、今後の数値シミュレーションなどにおける課題である。

4. AFP 水溶液中の氷結晶の 表面構造の STM による観測

本研究では、氷結晶の接触による現象の変化を避けるためトンネル電流が一定になる距離を保って測定できる STM を使用した点に特徴がある。Digital Instruments の Nanoscope III の STM を用いて、氷の結晶表面に吸着した AFP の状態を観察した。氷を凍結した状態に維持し、昇華を防ぎ、また、氷の生成・制御を精度よく行うため、STM の実験装置は -7°C の低温室内に設置した(図 5)。3.2 mg/ml AFP を 50 mM NaCl 溶液に溶かした液から作った氷結晶の試料をピンセットで取り、試料のパックに移し、過冷却状態の AFP 溶液の液滴に接触された。過冷却状態の液滴は結晶種子に接触すると、直ちに結晶化し、それを固定した。溶液からパックに移して 10~20 s 後、氷結晶の昇華を防ぐために、有機物油の薄い膜で覆った(図 6)。結晶は、図 3 に示した上下対称の六角すい形状と針形状の間の形をとった。昇華が起こると異なった表面が作られ、よい画像とはならないため、STM による観察では油で氷表面を覆うことが最もよい方法であると思われる。画像を得るためのバイアス電圧とトンネル電流は比較的高く設定した(4 V と 23 nA)。スキャン速度は 1 line/s とし、画像のノイズを除去するため、以下の手続きを行った。(1)Nanos-

Fig. 5 Experimental apparatus setup for STM

Fig. 6 Attachment of the ice crystal to the sample puck. The supercooled liquid freezes when the crystal is applied and generates the necessary contact

cope III の画像にローパスフィルタをかける。(2)同じ表面を逆にトレースした画像との比較をする。(3)トレース方向を 45° 回転させ測定し、(4)純水から生成した氷表面と比較する。氷表面の分子的な画像ははっきりとした画像ではないが、上記の方法を用いれば表面の曲率から得られるパターンを観察することができる。

図 7 に、20 nm × 20 nm のスキャンサイズでの典型的な表面構造を示す。ノイズの影響があるが、上下対称の六角すいの対称面に対して溝は $65 \pm 5^{\circ}$ の角度でほぼ平行に並んでいることがわかる。 $\{20\bar{2}1\}$ 平面の $\langle 01\bar{1}2 \rangle$ 方向は、一つの角柱の側面に対して 66° であり、溝の角度とほぼ一致する⁽¹⁹⁾。恒低温室に置かれた

Fig. 7 STM surface plot indicating the ice surface curvature generated by the adsorbed AFP

Fig. 8 STM surface plot as in figure 7, marked with the possible attachment sites for the AFP molecules

STM で測定した溝の角度および長さは x -スキャン方向と y -スキャン方向の校正値とした。スキャン角度を 45° 回転すると、溝の角度も同様に回転した。溝の部分を図 8 では印を付けて示した。

AFP の長さは約 5 nm (50 Å), 直径は約 1 nm (10 Å) で、これらは溝の長さ約 6 nm と横幅約 2 nm にほぼ一致している (図 9)。本研究の観察では、溝の大きさが一つの AFP 分子に相当し、溝がそれぞれ約 50 Å おきに並んでいた。溝のパターンは吸着した AFP 分子が成長をする表面の曲率に相当すると考えられ、そのときの溝部の深さは図 10 に示すように 2 nm から 10 nm であった。

Fig. 9 Schematic figure of the surface grooves, their average size and concentration and their alignment angle relative to one hexagonal side on a bipyramidal plane

Fig. 10 Cross section plot (above) for the line on the image (below) for ice surface influenced by AFP adsorption

AFP は氷表面に付着し、氷の成長を抑制するが、AFP で覆われていない部分の水が成長すると、AFP は最終的に新しくできた氷で覆われる。液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析をすると、氷結晶の中の AFP 濃度は初期溶液濃度の約 20% であった。AFP 溶液の体積が限られているため、氷の体積割合が増大すれば、AFP の水溶液中の濃度がだんだんと増大する。氷/水溶液の界面での局所的な濃度がだんだんと増大し、表面に吸着する AFP 分子の個数に対して影響を与える。氷および水溶液中の AFP 濃度と表面に吸着した AFP 分子の個数を直接に比較することは困難であるが、単純な見積もりによって、90% の水が凍り、平均的に 30% の AFP が氷の内部の表面に付着すると仮定すれば、氷の外部表面の AFP 濃度が 7 mg/ml となり、周囲の溶液の濃度が 20 mg/ml となる。STM の画像から AFP 分子を吸着させた溝の数は 20 nm × 20 nm のスキャン面積内で平均的に 6 であり、これは 15 000 個/μm² に相当する。これから、氷の層の深さ (二つの AFP 層の距離) は 10 nm となり、観察により得られた溝部の深さによく一致する。

なお、純水の氷の場合にも、STM 像はノイズによって影響を受ける。しかしながら、図 11 中に見られるように、横方向のノイズが存在しない領域において、表面構造を見てみると、図 8 などで見られたような凸凹のある構造は観察されず、2 nm から 3 nm が最大深さのより平坦な構造を示していることがわかった。以上より、氷表面に同じ傾きで、また、ほぼ等間隔に AFP が付着し、AFP の周りは疎水性であるため AFP の近傍で氷の成長の阻害された状況が測定され

Fig. 11 STM surface plot for pure water ice (basal plane), marked with the area where the systematic noise lines are not present

ており、これが氷成長抑制法となっている。また、氷表面に AFP が吸着してできる針状の氷を使用する氷スラリーにより針状の氷が成長することなく、氷スラリーが冷熱を輸送することが可能となる。特に、AFP が氷の表面にほぼ同じ傾きで、ほぼ等間隔で吸着しているようすは、今後氷の成長抑制法を改善するために、有用な知見を与えている。今後、AFP による氷の成長抑制現象を分子力学的数値シミュレーションで解明する予定であり、AFP の付着面が $\{20\bar{2}1\}$ 面かどうかとも検討する。

5. 結 論

AFP 水溶液中に生じる氷結晶を STM 等を用いてミクロに観察し、以下の結論を得た。

(1) 氷結晶の形状は過冷却度の増大に伴い、上下対称の六角すいの針状から、樹枝状になる。

(2) AFP は氷結晶の六角すいの底面を含む面に対して $(65 \pm 5)^\circ$ の角度でほぼ平行に付着する。

(3) 氷結晶の表面に付着した AFP の個数は約 7 mg/ml (溶液中には 20 mg/ml) の AFP 濃度相当の場合、 $15\,000$ AFP 分子/ μm^2 となる。

(4) AFP が付着した部分の溝の深さは 2 nm から 10 nm であった。

STM による観察に多大なるご助力をいただいた産業技術融合領域研究所の鈴木誠氏と、機械技術研究所

の二瓶光弥氏、低温環境室を貸して下さった濱純氏に感謝いたします。

文 献

- (1) Grandum, S., ほか 6 名, 第 32 回日本伝熱シンポジウム, **2** (1995), 451-452.
- (2) DeVries, A. L., ほか 1 名, *Biochim. Biophys. Acta*, **495** (1977), 388-392.
- (3) Wen, D., ほか 1 名, *Federat. Europ. Biochem. Soc.*, **317-1, 2** (1993), 31-34.
- (4) Harrison, K., ほか 5 名, *Nature*, **328** (1987), 241-243.
- (5) Knight, C. A., ほか 2 名, *Biophys. J.*, **59** (1991), 409-418.
- (6) Chakrabarty, A., ほか 2 名, *J. Biologic. Chem.*, **264-19** (1989), 11313-11316.
- (7) Yang, D. S. C., ほか 3 名, *Nature*, **333** (1988), 232-237.
- (8) Wen, D., ほか 1 名, *Biophys. J.*, **63** (1992), 1659-1662.
- (9) Wen, D., ほか 1 名, *J. Biolog. Chem.*, **268-22** (1993), 16401-16405.
- (10) Chou, K. C., *J. Molecular Biolog.*, **223** (1992), 509-517.
- (11) McDonald, S. M., ほか 3 名, *AIChEJ.*, **41** (1995) 959-973.
- (12) Lal, M., ほか 4 名, *Faraday Discuss*, **95** (1993), 299-306.
- (13) Madura, J. D., ほか 5 名, *J. Am. Ch. Soc.*, **116** (1994), 417-418.
- (14) Jorgensen, H., ほか 6 名, *Protein Eng.*, **6-1** (1993), 19-27.
- (15) Yabe, A., ほか 2 名, *Annual Rev. Heat Transf.*, **7** (1995), Chap. 4, 1-52.
- (16) Chao, H., ほか 2 名, *FEBS Lett.*, **357** (1995), 183-186.
- (17) Knight, C. A., ほか 2 名, *Biophys. J.*, **64** (1993), 252-259.
- (18) Cogger, R., ほか 2 名, *HTD* **205**, Heat Transfer in phase change ASME, (1992), 37-46.
- (19) Slicheri, F., ほか 1 名, *Nature*, **375** (1995), 427-431.