

速度論的解析による L-ヒスチジンの 結晶核形成機構の解明

和泉 研二*・高橋 宏輔**

Study on Crystal Nucleation Mechanism of L-Histidine by Kinetic Analysis

WAIZUMI Kenji*, TAKAHASHI Kousuke**

(Received September 22, 2022)

水溶液からの L-ヒスチジンの結晶核形成機構を解明するため、pH をジャンプさせることによって得た幾つかの濃度の過飽和水溶液中から結晶核が形成されるまでの時間（誘導期 t_{ind} ）を測定した。測定された誘導期 t_{ind} を用いて結晶核形成理論に基づいた速度論的解析を行った結果、それらの溶液中で形成された結晶核の表面張 σ 、臨界核形成の自由エネルギー ΔG^* 、臨界核の半径 r^* 、臨界核を形成する分子数 n など、結晶核形成に関する重要なパラメータの値を定量的に求めることができた。pH 6 ~ pH 7 の間で行った実験からは、L-ヒスチジンの臨界核は数個から十数個程度の分子からなる半径 1 ~ 2 nm 程度であり、過飽和度が高くなるにつれて、その大きさは小さくなることが明らかになった。

1. 諸言

溶液からの結晶核の形成には、溶液の温度や濃度のみならず、結晶の表面張力も大きく影響しており、結晶の表面張力は、結晶の核形成の機構を理解するうえで重要なパラメータの一つである^[1,2]。しかし、結晶の表面張力を直接測定することは実験的に困難であり、表面張力が不明であることが、詳細な理論的な解析を進める上でのボトルネックの一つになっている。

薬品や試薬などでは、品質を揃えることが重要である。そのためには、その粒径や形状を揃えることが必要であり、必然的にその物質の核形成機構を理解することが求められる。L-ヒスチジン ($C_6H_9N_3O_2$, 分子量=155.15, $pK_{a1}=1.82$, $pK_{a2}=9.17$, $pK_{a3}=6.0$, 等電点=7.59) はタンパク質の構成要素であるアミノ酸の一種であり、L-ヒスチジンは栄養食品やサプリメント、薬品などに多く用いられている物質である (図 1)。しかし、その結晶核形成機構はほとんど解明されていない。

表面張力を推定する方法の一つとしては、所定の濃度の過飽和溶液の中から結晶の核が形成されるまでにかかる時間（誘導期）を測定し、速度論的核形成理論に基づいた解析によって推定する方法があり、これまでも幾つかの物質で研究が報告さ

れてきた^[3-5]。その理論に基づく計算では、表面張力のみならず、臨界半径や核形成における自由エネルギー変化などの核形成のパラメータの値も定量的に得ることができる。

そこで本研究では、重要なアミノ酸である L-ヒスチジン結晶が水溶液から形成される際の基本的な核形成機構を理解するために、L-ヒスチジンの結晶核が形成されるまでの誘導期を測定したのち、核形成理論による解析を行って表面張力などの核形成に関する基礎的パラメータの値を定量的に得るとともに、それらの値から水溶液からの L-ヒスチジンの結晶核形成の描像を明らかにする。

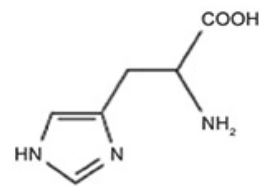


図 1 L-ヒスチジンの構造式。

* 山口大学教育学部, 〒753-8513 山口市吉田1677, bec20@yamaguchi-u.ac.jp ** 山口大学教育学部

2. 理論

古典的均一核形成理論^[1,2]より、結晶核の形成速度 B_0 は式(1)で表される。

$$B_0 = A \exp[-\Delta G^*/(kT)] \quad (1)$$

ここで、 A は頻度因子、 ΔG^* は臨界核形成の自由エネルギー、 k はボルツマン定数、 T は溶液の温度（絶対温度）を表している。

また、結晶核形成におけるギブズの自由エネルギー ΔG はバルク自由エネルギー変化 ΔG_V と表面自由エネルギー変化 ΔG_S の和として、式(2)で表される。

$$\Delta G = \Delta G_V + \Delta G_S = -4\pi r^3 \Delta G_V / 3 + 4\pi r^2 \sigma \quad (2)$$

ここで、 σ は成長中の結晶表面と溶液の間の表面張力、 r は核の半径を表す。

式(2)を図として示す(図2)。結晶核の半径が r^* のときに極値をもち、このときのギブズの自由エネルギー変化が臨界核形成の自由エネルギー ΔG^* 、またその時の結晶核の半径 r^* が臨界半径である。

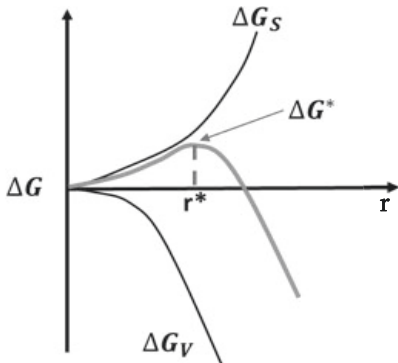


図2 核半径と結晶核形成におけるギブズの自由エネルギー変化の関係。

結晶核形成は核半径が臨界半径を超えたときと定義される。臨界状態では極値をもち、 $d(\Delta G)/dr = 0$ となることから、臨界半径および臨界自由エネルギー変化はそれぞれ式(3)および式(4)で表すことができる。

$$r^* = -2\sigma/\Delta G_V \quad (3)$$

$$\Delta G^* = 4\pi(r^*)^2\sigma/3 \quad (4)$$

一方、よく知られたギブズ-トムソン方程式は、式(5)で表される。

$$\ln(c/c^*) = \ln S = 2\sigma v/(kTr) \quad (5)$$

ここで c は実際の溶液濃度、 c^* は平衡濃度、 S は過飽和比、 v は分子体積を表す。

式(4)と式(5)を組み合わせることで、 ΔG^* は式(6)で表される。

$$\Delta G^* = 16\pi\sigma^3 v^2/[3(kT \ln S)^2] \quad (6)$$

また、この式(6)と式(1)を組み合わせることで式(7)を得ることができる。

$$B_0 = A \exp\{-16\pi\sigma^3 v^2/[3k^3 T^3 (\ln S)^2]\} \quad (7)$$

ここで、誘導期 t_{ind} は定常状態において核形成速度に反比例すると考えられるという仮定から、次の式(8)によって計算することができる。

$$\ln t_{ind} = A_m + 16\pi\sigma^3 v^2/[3k^3 T^3 (\ln S)^2] \quad (8)$$

ここで、 A_m は A とは異なる頻度因子である。

(8)式から、温度が一定の時、 $\ln t_{ind}$ と $(\ln S)^{-2}$ の間には比例の関係があることがわかる。このときの直線の傾きを β とすると、式(8)の傾き部分は式(9)で表され、表面張力は、その傾き β を用いて式(10)で表すことができる。

$$\beta = 16\pi\sigma^3 v^2/(3k^3 T^3) \quad (9)$$

$$\sigma = kT(3\beta/16\pi v^2)^{1/3} \quad (10)$$

また、臨界核内の分子数 n は、式(11)で計算することができる。

$$n = 4\pi(r^*)^3/(3v) \quad (11)$$

3. 実験方法

3-1 溶解度測定

フィルター（日本ミリポア株式会社、製品名：マイクレス LG13、孔径：0.20 μ L）を通した水に、L-ヒスチジンを入れ、塩酸を滴下し所定の pH とすることで、L-ヒスチジンを溶解した。そのモル分率 χ_{his} をその pH での溶解度として計算した。

3-2 過溶解度測定

過溶解の状態は、水酸化ナトリウムを用いて pH をジャンプさせることで作ることにした。溶解度測定と同様の操作を行い、飽和溶液を用意し、その溶液を毎分 100 回転程度の速さで攪拌しながら、毎分 10 μ L の水酸化ナトリウム水溶液を滴下した。セル内に結晶が生じたところで、水酸化ナトリウム水溶液の滴下を終了し、そのときの溶液 pH と滴下した水酸化ナトリウム

水溶液の質量から、その pH での L-ヒスチジンのモル分率を計算する一方で、水酸化ナトリウムを滴下する前のモル分率 x_{His} を、滴下して結晶が生じたときの pH の溶液の過溶解度とした。

3-3 誘導期測定

あらかじめ作成しておいた L-ヒスチジンの飽和溶液をフィルターを通してガラスセルに入れ、攪拌速度を毎分 100 回転程度に設定した。任意の量の水酸化ナトリウム水溶液を素早くセルに入れることで瞬時に溶液の pH を上昇させて過溶解状態を作り出し、その時点からの結晶ができるまでの時間として誘導期を測定した。

4. 実験のセットアップ

実際に用いた実験器具の配置を図 3 に示す。溶液は②のガラスセル内に入れ、そのガラスセル内に塩酸もしくは水酸化ナトリウム水溶液を滴下して実験を行った。

本実験での測定はレーザーモニタリング方式により行なっている。セル内に結晶が存在している間は結晶によるレーザー光の散乱によりレーザーの強度が減少することを活用した。溶解度測定では、レーザー強度が最大になったところで完全に溶解したとし、過溶解度測定および誘導期測定では、レーザー強度が減少し始めたところで結晶核が生成したとした。

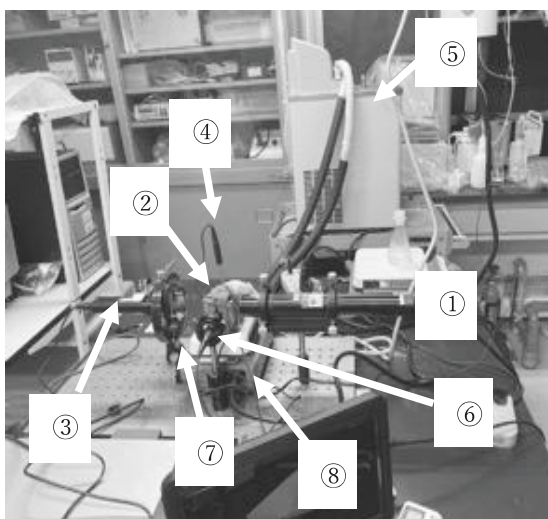


図3 測定に用いたセットアップと実験器具。

- ①He-Ne レーザー, ②ガラスセル, ③照度センサー,
- ④温度センサー, ⑤恒温水槽, ⑥モニター用 CCD カメラ,
- ⑦レーザーフィルター, ⑧マグネティックスターラー

5. 結果および考察

5-1 準安定領域

pH の関数として測定した 298K における L-ヒスチジンの溶解度および過溶解度を図 4 に示す。図 4 より、溶液の pH が上昇するにつれて、溶解度および過溶解度は減少することが確認

された。溶解度曲線と過溶解度曲線との領域が準安定領域であり、溶液の pH が上昇するにつれてその領域は徐々に狭まる傾向が見られた。

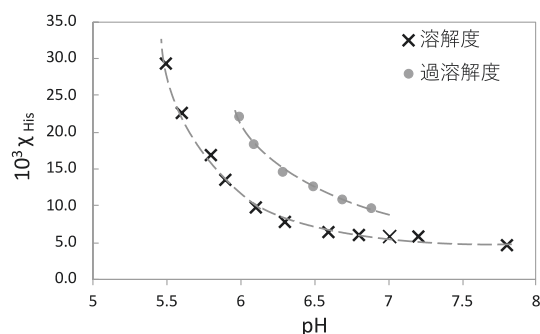


図4 298Kにおける L-ヒスチジンの溶解度と過溶解度。 x_{His} は溶液中の L-ヒスチジンのモル分率。

5-2 誘導期測定

298Kにおいて測定した結果を図 5 に示す。今回設定した過飽和比は、すべて溶液が準安定領域内の状態にあるよう設定した。過飽和比が小さくなるにつれて、誘導期は大きくなっている。誘導期の変化は、データ内の過飽和比の小さい部分では、急激に大きくなっている。このことから、誘導期と過飽和比の間には関係があることが確認できる。

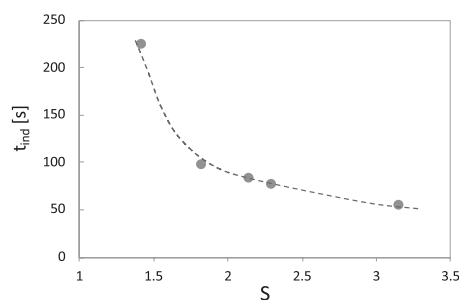


図5 各過飽和比 S における誘導期 t_{ind}

5-3 表面張力および核形成パラメーター

表面張力を求めるため、式(8)に従って、 $\ln t_{ind}$ と $(\ln S)^{-2}$ の関係を表す図を作成した (図 6)。このグラフの近似直線の傾き β は 0.209 であった。式(9)および式(10)を用いて L-ヒスチジンの表面張力 σ を求めたところ、 $\sigma = 2.98 \times 10^{-7} \text{ J cm}^{-2}$ となった。

得られた表面張力 σ の値を用い、各過飽和比 S における臨界核形成の自由エネルギー ΔG^* 、臨界半径 r^* 、バルク自由エネルギー ΔG_v 、核内分子数 n をそれぞれ式(6)、式(4)、式(3)、式(11)から求めることができる。

表1 298 Kにおける各過飽和比での核形成パラメーター

| pH | $10^3 x_{His}$ | t_{ind} (s) | S | $10^{21} \Delta G^*$ (J) | ΔG_v (J/cm ³) | $10^8 r^*$ (cm) | n |
|-----|----------------|---------------|------|--------------------------|-----------------------------------|-----------------|------|
| 6.1 | 13.3 | 1063 | 1.35 | -6.79 | 9.62 | 8.78 | 16.0 |
| 6.3 | 11.0 | 561 | 1.42 | -8.03 | 6.88 | 7.42 | 9.65 |
| 6.3 | 13.2 | 319 | 1.71 | -12.2 | 2.98 | 4.89 | 2.75 |
| 6.4 | 13.0 | 132 | 1.84 | -13.9 | 2.30 | 4.29 | 1.86 |
| 6.7 | 10.7 | 190 | 1.76 | -12.9 | 2.68 | 4.63 | 2.34 |

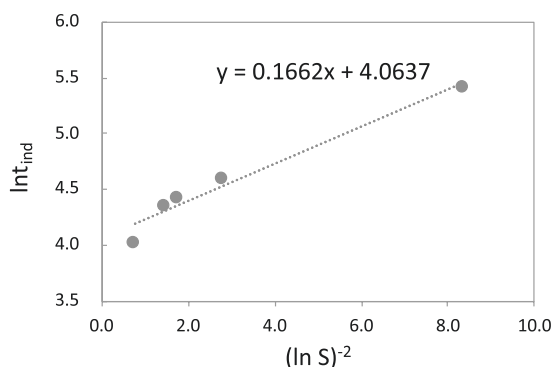


図6 $\ln t_{ind}$ と $(\ln S)^{-2}$ の関係。

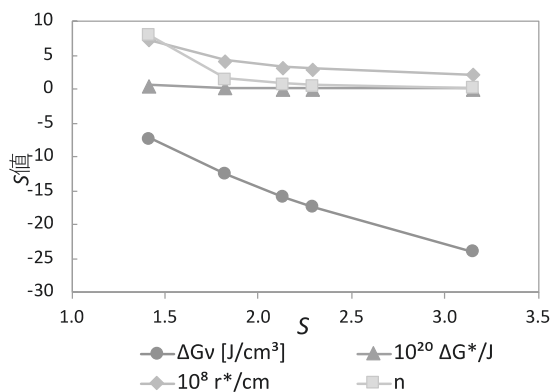


図7 過飽和比 S に対する核形成パラメーターの濃度依存性

そこで、比較的大きな結晶を得ることができる pH 6～pH 7 の間の pH に焦点を当て、その間の pH を少しずつ変えた溶液からの核形成の誘導期の測定を行い、それらの結果を用いて解析を行った。

結果を表1および図7に示す。表1および図7から、過飽和比 S が増加するにつれて、求められた臨界核形成の自由エネルギー ΔG^* 、バルク自由エネルギー ΔG_v 、臨界半径 r^* 、核内分子数 n の値はすべて減少していることがわかる。この核形

成パラメーターの濃度依存性は、一般的な核形成の傾向と調和的である。

また、今回の実験から得られた $S = 1.42$ のときの臨界半径 7.42×10^{-8} cm は、H. Arul ら^[6]がL-ヒスチジン誘導体である LHM (L-Histidinium maleate) 結晶の $S = 1.40$ のときの臨界半径として報告した値、 10.62×10^{-8} cm と同程度であった。これらのことから、今回得られた結果は、その傾向のみならず、定量的にも L-ヒスチジン結晶の核形成として妥当な結果と言える。

以上から、本実験における溶液中からの L-ヒスチジンの結晶核形成においては、その臨界核は数個から十数個程度の分子からなる半径 1～2nm 程度の大きさであり、過飽和度が高くなるにつれて、その大きさは小さくなることが明らかになった。その程度の大きさで臨界核に達して核形成が起り、その後結晶成長に転じるものと結論する。

6. 参考文献

- [1] R. A. Judge, R. S. Jacobs, T. Frazier, E. H. Snell, M. L. Pusey, Biophys. J. 77(1999) 1583.
- [2] P. G. Vekilov, Nucleation of protein crystals, Prog. Cryst. Growth Ch. 62 (2016) 136.
- [3] M. Vijayalakshmi, R. E. Vizhi, D. R. Babu, Cryst. Res. Technol. 50 (2014) 1
- [4] G. Madhurambal, M. Mariappan, G. Selvarajan, S. C. Mojumdar, J. Therm. Anal. Calorim. 119 (2015) 931
- [5] Hua Sun, Xiaowu Zhang, Baoshu Liu, J. Cryst. Growth, 523 (2019) 125163.
- [6] H. Arul, D. Rajan Babu, R. Ezhil Vizhi, G. Bhagavannarayana, J. Cryst. Growth, 423 (2015) 22.