

強磁場下でのタンパク質の結晶化

東北大学金属材料研究所 佐崎 元¹⁾, 柳谷 伸一郎²⁾, Stephen D. Durbin, 宮下 哲, 中田 俊隆³⁾ 小松 啓, 中嶋 一雄, 本河 光博¹⁾

1) CREST 科学技術振興事業団, 2) 現住所: 徳島大学工学部,

3) 現住所: 立命館大学理工学部,

Magnetic field effects on protein crystallization

Institute for Materials Research, Tohoku University,

Gen Sasaki¹⁾, Shin-ichiro Yanagiya²⁾, Stephen D. Durbin, Satoru Miyashita, Toshitaka Nakada³⁾, Hiroshi

Komatsu, Kazuo Nakajima, Mitsuhiro Motokawa¹⁾

1) CREST-JST, 2) Present address: The University of Tokushima,

3) Present address: Ritsumeikan University

Abstracts

The bottleneck of a three-dimensional structural analysis of protein molecules is the crystallization of large (>0.1 μ m) and suitable high quality crystals. To overcome this difficulty, magnetic field effects have been studied intensively in recent years. Here, we outline the magnetic field effects on the crystallization of protein. Crystallization of hen egg-white lysozyme was carried out under a static and homogeneous magnetic field of 0-11 T. It is clearly demonstrated that a magnetic field decreased the number of nuclei appeared and not only oriented the crystals but also changed the crystal habit. The magnetic field effects on the orientation and growth rate of the crystals were further investigated. The degree of orientation of the crystals depends on crystal growth rate and container geometry, in addition to magnetic field strength. A magnetic field decreases the growth rate of the crystals and also the flow rate of the buoyancy convection in an electrolyte solution.

1. はじめに

結晶の成長過程に磁場を応用しようと、1960年代から多くの試みがなされてきた。特に、電磁制動を利用した液体金属中の対流抑制については、半導体融液を題材に広く研究されてきた¹⁻³⁾。しかしながら、電磁制動による対流抑制効果以外には、明確に磁場効果であると特定できるような現象は見出されてこなかった。近年、超伝導磁石の急速な発展により10T程度の強磁場が比較的容易に利用できるようになり、結晶成長に対する磁場効果が再び注目を浴びるようになってきた。特に、良質単結晶の育成技術の確立が強く望まれているタンパク質を題材とした分野で注目されており、磁場が結晶の配向^{4-6, 8-11)}、晶癖⁵⁾、生成個数^{5, 7)}、成長速度¹²⁾や水溶液中の対流¹³⁾に顕著な影響を及ぼすことが報告されている。また、低分子有機化合物結晶の磁場配向についても同様の研究がなされている¹⁴⁻¹⁶⁾。

本稿では、まず、磁場中でタンパク質を結晶化するとどのような現象が見出されるのか述べた後に、それぞれの現象について定量的な説明を試みる。

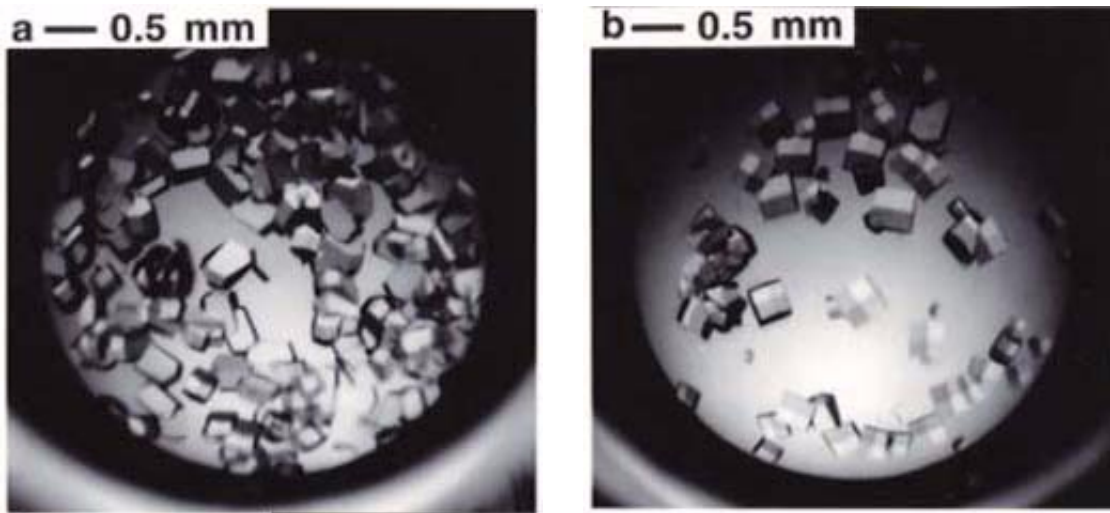


Fig. 1 Effect of a magnetic field on the crystallization of hen egg-white lysozyme⁵⁾.
(a) at 0 T, and (b) 10 T. The direction of the magnetic field was normal to the figure (optical microphotograph of a transmission type). Initial lysozyme concentration was 100 mg/ml. The crystallization period was 3 days.

2. 磁場中でのタンパク質の結晶化⁵⁾

生体内の高度な機能を司るタンパク質は、医薬・生体材料などとしての応用が期待されている。しかし、タンパク質の優れた機能を支配する立体構造の解析は主に X 線回折法によって行われるが、そのためには良質で十分に大きな単結晶が不可欠であり、その育成がボトルネックとなっている。そのため、タンパク質の結晶化過程を、磁場を利用することで制御できないであろうか、というのが研究の発端であった。

我々はモデルタンパク質として、高純度の市販品が入手しやすく、良質の単結晶が得られやすいニワトリ卵白リゾチームを選び、結晶化に及ぼす磁場効果について研究を行った。結晶化の手順は以下の通りである。リゾチームは塩析バッチ法により結晶化させた¹⁷⁾。リゾチーム溶液と沈殿剤溶液を適量ずつ混合して過飽和溶液(50mM 酢酸緩衝液(pH4.5), 25mg/ml NaCl)を調製した後、プラスチック製の96穴培養プレートに溶液を100 μ lずつ分注した(溶液層の高さ:1.8 mm)。また、試料の蒸発を防ぐため、タンパク質溶液上に流動パラフィンをさらに50 μ lずつ分注し、シールした。過飽和溶液を分注した後、ただちに培養プレートを恒温コンテナ(20.0 \pm 0.1)中に入れ、クライオクーラー冷却式超伝導磁石¹⁸⁾の直径52mmのボア中に静置した。この磁石は縦形のボアを有するため、印加した磁場の方向は鉛直方向である。過飽和溶液が占める体積中での磁場の不均一度は1%以下であった。試料は0~10Tの均一・定常磁場下で48時間静置した後に磁石より取り出し、光学顕微鏡により観察した。

リゾチーム仕込み濃度100mg/mlで晶出した結晶の写真をFig. 1に示す。図は結晶を上方より透過光で観察したものである。Fig. 1(a)は無磁場(0T)中で生成した結晶を、またFig. 1(b)は10Tの磁場中(磁場方向:紙面手前向き)で生成したリゾチーム正方晶系結晶を示す。10T磁場中で生成した結晶の個数は0Tでの個数に比べて明らかに少なく、約半分であった。リゾチーム正方晶系結晶(空

間群：P43212)は、c軸方向より眺めると4つの{101}面から成る「田」の字型に見える。10Tの磁場中で結晶化した試料中には「田」の字型の結晶が多数観察されることより、結晶のc軸が磁場と平行に配向していることがわかる。Fig. 1(b)の場合には56%の結晶が磁場により配向しており、この傾向はリゾチーム仕込み濃度が濃いほど顕著であった。また、磁場はリゾチーム結晶の晶癖にも影響を及ぼした。10T磁場中で得られた結晶は、0Tの場合と比べてc軸方向に扁平であった。この結果は、磁場が核形成過程のみならず各面の成長速度にも影響を及ぼすことを示す。

以上述べたように、磁場はタンパク質の結晶化において、1)生成核の個数、2)結晶の配向、および3)晶癖(成長速度)に顕著な影響を及ぼす。結晶の配向及び成長速度に及ぼす磁場効果について、次章以降もう少し定量的な説明を試みる。

3. 結晶の磁場配向について¹⁰⁾

本章では、結晶の磁場配向がどのような因子によって決定されるのかについて説明する。前章で述べたように、鉛直方向に磁場を印可すると、リゾチーム正方晶系結晶のc軸が容器底に対して垂直になるよう結晶は磁場配向して成長する。配向の程度を定量化するために、磁場の方向と3°以内にc軸が向いている結晶の数を析出した結晶の総数で割ることで、結晶の配向率Rを定義した。目視により配向していると認められる結晶を多数容器底からはがし、c軸と磁場方向のなす角を測定したところ、そのずれは最大で約3°程度であった。そのため、この3°以内という条件を配向の基準として用いた。

Fig. 2に、配向率Rと磁場強度およびリゾチーム仕込み濃度 C_{init} との関係を示す。データにはかなりのバラ付きが見られたが、磁場強度の増加に伴い配向率Rは増加した。1T程度の磁場であっても配向については無磁場下と有為な差が観察された。また、リゾチーム初濃度 C_{init} の増加に伴い、配向率Rは顕著に増加した。

結晶の磁場配向現象をより定量的に理解するためには、まず、リゾチーム分子およびその正方晶系結晶の磁氣的性質について知る必要がある。リゾチームについては、分子の平均の磁化率がこれまでに測定されているが¹⁹⁾、磁化率の異方性についての報告例は無い。そこで、Worcesterの方法²⁰⁾を用いて、リゾチーム分子および正方晶系結晶の磁化率異方性を計算した。計算に当たっては、ヘリックス、シート、芳香環についての磁化率異方性の文献値²¹⁾、およびリゾチーム分子の原子座標²²⁾を用いた。その結果、 $\chi_c - \chi_a = 76 \times 10^{-6} \text{ emu/mol}$ の値を得た。ここで、 $\chi_a (= \chi_b)$ および χ_c は、正方晶系結晶のaおよびc軸方向の磁化率を示す。この値には、芳香族アミノ酸の芳香環が最も大きな寄与を及ぼしていた。計算で得たこの値が正であることより、c軸が磁場の方向に向くように結晶が配向するほうがエネルギー的に安定であることがわかる。これはFig. 1に示した実験結果と一致している。

計算したこの値を用いると、N個のリゾチーム分子からなる正方晶系結晶の配向エネルギーを次式を用いて計算することができる²³⁾。

$$E(N, \theta, H) = -\frac{1}{2} \left[\frac{N}{N_A} \right] \Delta\chi \cos^2 \theta H^2 \quad (1)$$

ここで、 N_A はアボガドロ数、 θ はc軸と磁場のなす角、Hは磁場強度を示す。したがって、N個のリゾチーム分子からなる正方晶系結晶が、c軸と磁場が3°(1/60 rad.)以内になるよう配向する確率 $R(N, H)$ は、

$$R(N, H) = \frac{\int_0^{\pi/60} \exp\left[-E\frac{(N, \theta, H)}{kT}\right] \sin\theta d\theta}{\int_0^{\pi/2} \exp\left[-E\frac{(N, \theta, H)}{kT}\right] \sin\theta d\theta} \quad (2)$$

と表される。

結晶の配向エネルギーが熱エネルギー kT を上回るためには、10T の強磁場下においても、結晶は半径が 90nm 程度の大きさ (7×10^4 個の分子からなる) まで成長している必要がある。したがって、溶液中でリゾチーム分子 1 個ではもちろんのこと、臨界核 (過飽和度に依存し $10\text{-}100$ 分子からなる²⁴⁾) を超える程度の大きさの凝集体であっても、それらに働く磁場配向効果は非常に小さく無視できる。そのため、Fig. 1 に見られるような配向現象は、ずっと大きな結晶に対して働くものであることがわかる。我々は結晶中のリゾチーム分子の個数 N をさまざまに変え、(2) 式を用いて結晶の配向確率 $R(N, H)$ を計算した。その結果を Fig. 3 に示す。Figs. 2, 3 の比較より、大部分の実験点は $N = 10^7$ と 10^8 の 2 本の $R(N, H)$ 曲線の間位置することが分かる。このことより、Fig. 2 に示した実際に観測された磁場配向現象は、結晶中の分子数 N が $10^7 - 10^8$ (結晶の直径: $0.5 - 1 \mu\text{m}$) の時に起こったものであると考えられる。

我々は、いつ結晶の配向が決定されたのか、を説明するために以下のようなモデルを考えた。リゾチーム結晶が容器といたん接触するとかなり強く付着するため、結晶の磁場による配向は、結晶が溶液中を沈降し容器底に接触する前に達成されている必要がある。従って溶液中で生成された結晶核が成長し、沈降しながらさらに成長し、容器底に着床する直前の結晶の大きさによって結晶の配向が決められる、と考えた。このモデルを用いると、Fig. 2 に示した配向率のタンパク質濃度依存性も、定性的に説明できる。つまり、タンパク質濃度が高いほど結晶がより速く成長するため、容器底に達するまでに結晶はより大きくなり、配向しやすくなったものと考えられる。

このモデルが正しいならば、溶液層の高さがより高いほど (容器がより深いほど) 結晶が容器底まで沈降するのに時間がかかるため、他の条件が同じであっても、配向率は増加するものと予想される。このことを実証するために、溶液層の高さがもとの 2 倍および 13 倍になるような容器を用意し、実験を繰り返した。その結果、Fig. 4 に示すように、結晶の配向率は溶液層が高くなるほど大きくなることが確認された。

溶液中を容器底まで沈降した時のリゾチーム結晶の大きさを見積もると、 $N_c \approx 9 \times 10^8$ となり¹⁰⁾、沈降を取り入れたモデルは観察結果と定性的に一致するが、式 (2) を用いて推定した N の値 ($10^7 - 10^8$) よりも約 1 桁大きかった。二つの方法で見積もった N 値が一致しなかったのは、結晶が容器底に着地する際に、重力による結晶の転倒のために配向率が幾分小さく観察されたためであると考えられる。結晶が重力により倒れようとする回転のトルクと磁気配向のトルクを比較するとことで、配向に及ぼす「形」の影響をさらに見積もることができる¹⁰⁾。その結果、 $H = 10 \text{ T}$ 、結晶半径が $1 \mu\text{m}$ の時には、トルクの比が 0.005 程度であるため重力の効果は無視できるが、 $H = 1 \text{ T}$ の時には、二つのトルクの比は沈降して容器底に達する結晶の典型的な大きさである結晶半径 $2 \mu\text{m}$ のときに 1 となり、重力の効果が顕著に現れることがわかった。

以上より、結晶の配向率は、磁場強度に加えて結晶の成長速度および容器の深さにも強く依存することがわかった。このモデルによって導かれた配向率は、実際に観測されたものより 1 桁高い値であったが、定性的には実験結果をうまく説明することができた。本研究では磁気異方性の小さな球状タン

パク質であるリゾチームを用いたが、磁気異方性のより大きなタンパク質(例えば膜タンパク質など)ではこの効果はさらに顕著になり、結晶化への応用が広がるものと期待される。

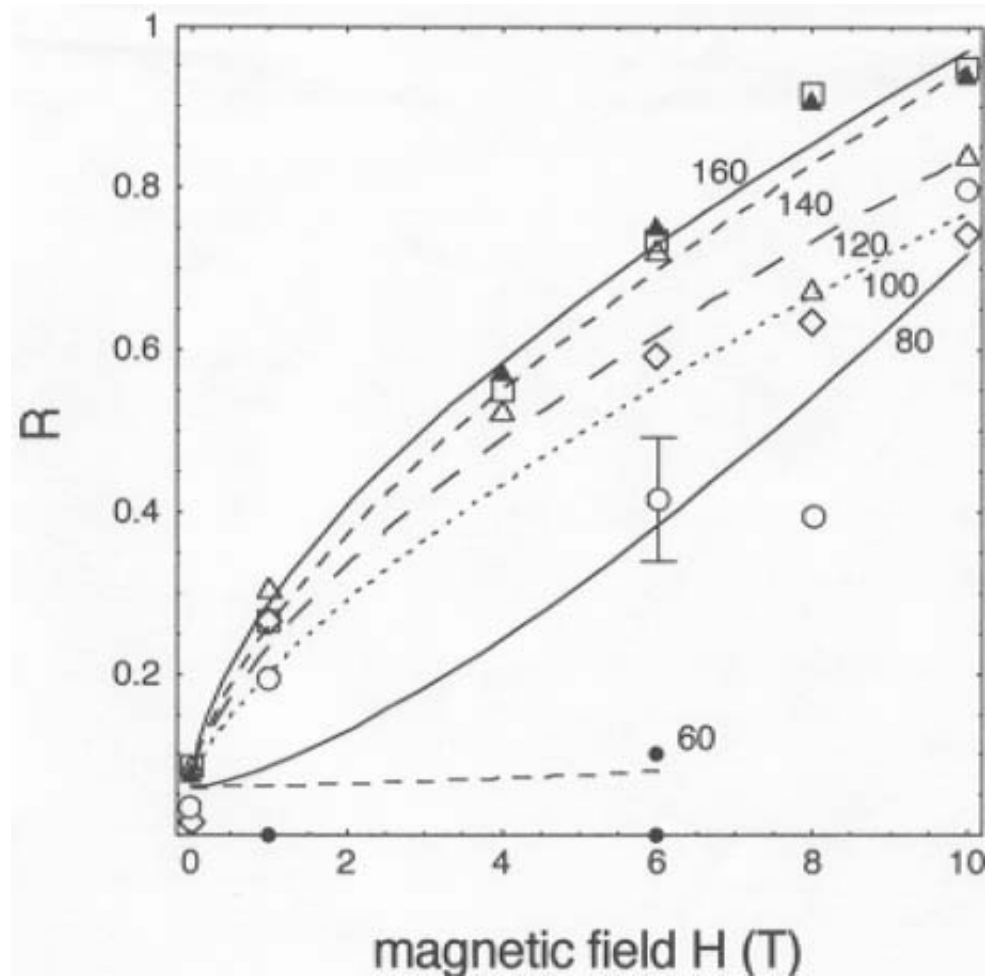


Fig.2 Dependence of the degree of orientation R on magnetic field for initial lysozyme concentration, 60 mg/ml (), 80 mg/ml (), 100 mg/ml (), 120 mg/ml (), 140 mg/ml (), and 160 mg/ml ()¹⁰. Curves are a guide for the eye. Data points are averages of several experiments; a typical error bar is indicated. R increases with both field strength and protein concentration.

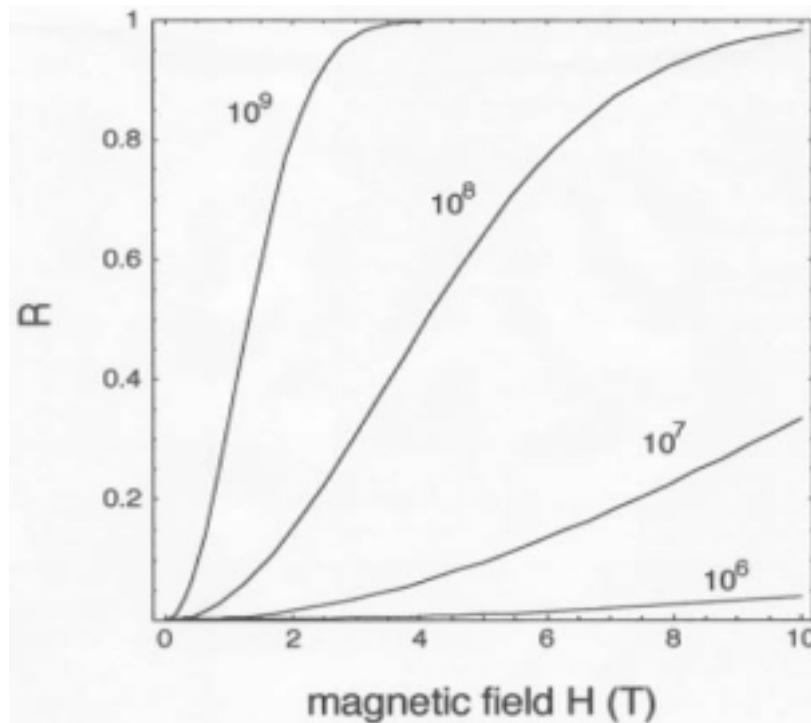


Fig.3 Changes in the probability $R(N, H)$ for a crystal of N molecules to have its c -axis within 3° of the field direction as a function of magnetic field strength $H^{10)}$. $R(N, H)$ was calculated using eq. (2) for $N=10^6, 10^7, 10^8$, and 10^9 .

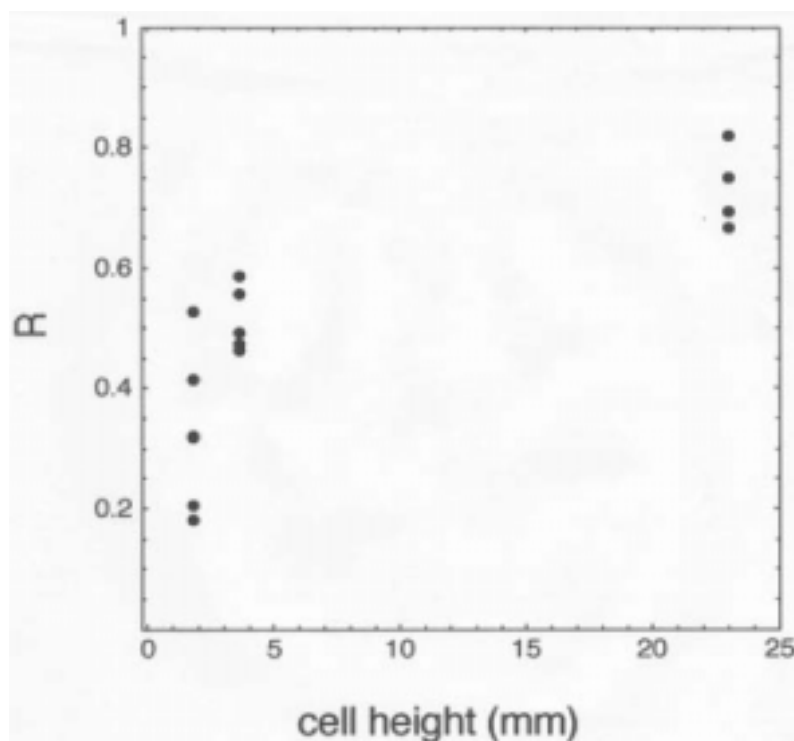


Fig.4 Dependence of the degree of orientation R on the height of the crystallizing solution¹⁰⁾. In these experiments, the initial lysozyme concentration was 80 mg/ml and the magnetic field strength was 4T.

4. 結晶の成長速度について^{12, 13)}

前章までの結果は全て、所定時間後に磁石から試料を取り出し観察した結果である。10T 程度の強磁場中においても「その場観察」ができるようになれば、晶癖を決定する各結晶面の成長速度を直接測定することができる。そこで我々は次に、超伝導磁石中で使用可能な透過型光学顕微鏡を作製し、均一磁場中でリゾチーム正方晶系結晶の成長過程を「その場観察」した。そして、成長速度の磁場依存性について検討した。

強磁場下その場観察用透過型光学顕微鏡の詳細については紙面の都合上文献¹²⁾を参照していただきたい。11T の均一磁場 ($< \pm 0.1\%$) 中で、リゾチーム正方晶系結晶の成長過程をその場観察した一例を Fig. 5 に示す。磁場の向きは紙面向こう向きである。所定時間毎に $<110>$, $<001>$ 方向について定点から結晶端までの長さを測定し、面の移動量から $\{110\}$, $\{101\}$ 面の成長速度を求めた。得られた成長速度と溶液濃度の関係を Fig. 6 に示す。それぞれの実験では、全て違う種結晶を使用したためデータはばらついているが、図より、80 mg/ml, $\{101\}$ 面での一例を除き全ての実験条件で、11T 下での成長速度が 0T 下での値を 5 ~ 60% 下回っていることが分かる。したがって、磁場による成長速度の減少は、十分に有意な現象であると考えられる。

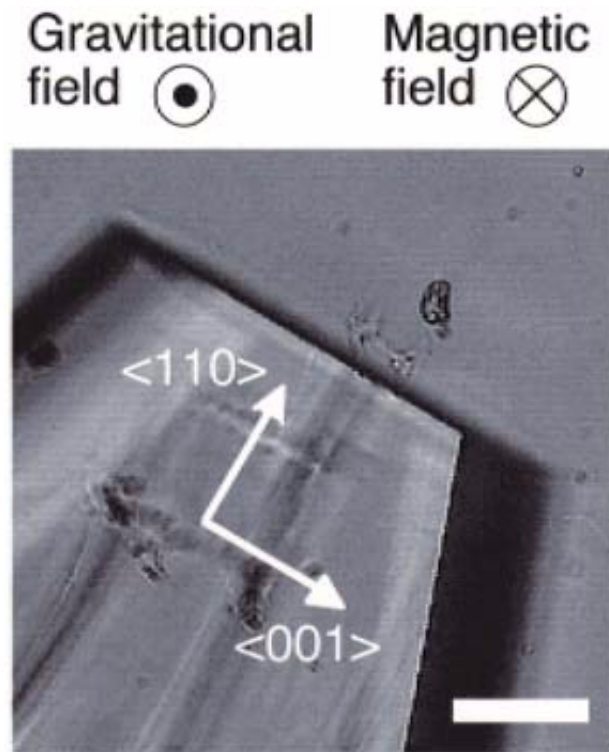


Fig.5 Tetragonal lysozyme crystal growing under 11T¹²⁾. The micrograph was taken *in situ* using the optical microscope and the observation cell. The directions of the magnetic field and the gravitational field are perpendicular to the plane of the photograph. Conditions: lysozyme, 80 mg/ml; NaCl, 25 mg/ml, in 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5). Scale bar represents 50 μ m.

溶解度は成長速度に顕著な影響を及ぼすパラメータの1つである。磁場が結晶の成長速度を減少させた理由として、磁場中で溶解度が増加した可能性が考えられる。そこで、リゾチーム結晶の溶解度に及ぼす磁場の影響について検討するため、強磁場中で溶解実験を行った。まず、十分に多量のリゾチーム結晶をサンプル管の中に作成した。次にサンプル管中の溶液を 2.5wt% NaCl, 50mM の緩衝液で置換し、すぐに磁石中にサンプル管を静置した。そして、3 ~ 6 時間毎に溶液を分取し、吸光度計

によってサンプル中のリゾチーム濃度を測定することで、0, 5, 10 T 下での結晶の溶解過程を追跡した。マシンタイムの都合上、溶解過程の追跡は70時間で打ちきった。

その結果、Fig. 7 に示したように、時間の増加とともに溶液中のリゾチーム濃度は増加し、40 時間以後ほぼ一定値に落ち着いていた。ただし、一般にタンパク質の溶解速度は非常に遅いため、溶液濃度が真の平衡値に達するには一週間程度を要する。実際に、0T, 50 時間での到達濃度は、同条件下での溶解度 $14.1\text{mg/ml}^{25)}$ より約 15% 小さい。したがって、Fig. 7 に示した結果は、(1) 5T および 10T の磁場中では結晶の溶解度が減少した、もしくは (2) 結晶の溶解速度が著しく減少した、可能性を示す。図に示した到達濃度の大小関係が実際の溶解度の大小関係を反映しているものと仮定すると、磁場によってリゾチーム結晶の溶解度は減少するものと考えられる [(1) のケース]。しかしながら、この結果は成長速度から推測される結果とは逆であるため、少なくとも磁場による成長速度の減少は、磁場中での溶解度変化では説明することはできない。

高電気伝導性の液体中での対流が、磁場によって抑制される現象についてはこれまで多くの報告がある¹⁻³⁾。また、ラマチャンドラン等は交流磁場を用いて 4M の NaCl 水溶液の流れを制御することに成功している²⁶⁾。そこで、本研究においても磁場が水溶液中の対流を抑制したため、結晶の溶解速度が著しく減少したのではないかと考え [(2) のケース]、磁場が NaCl 水溶液の対流におよぼす影響について調べた。実験手順は以下の通りである。高さ 10mm、内径 18mm の円筒形ガラスセルの上面および下面の温度をペルチエ素子を用いてそれぞれ T_C, T_H ($T_C < T_H$) に制御し、両者の温度差 $\Delta T = T_H - T_C$ に基づいた対流を定常的にセル中に発生させた。セルには 25wt% NaCl 水溶液を満たし (電気伝導度: $2.1 \times 10^1 \Omega^{-1}\text{m}^{-1}$, 25 °C), セル中の対流を可視化するために粒径 5 μm のポリスチレンラテックス粒子を溶液中加入した。

セル中を流れるポリスチレンラテックス粒子の流れの軌跡を先に述べた顕微鏡で観察・録画しトレースし、流れを解析した。その一例を Fig. 8 に示す。図は、0.5 秒おきに撮影した 3 枚のスナップショット (Nos. 1-3) を重ねて表示したものであり、磁場の有無に関わらず画面左上から右下方向に流れが存在することがわかる。しかしながら、図よりわかるとおり、0.5 秒間の粒子の移動距離は、無磁場下 (A1 A2 A3, B1 B2 B3) よりも 10T の均一磁場下 (C1 C2 C3, D1 D2 D3) の方が明らかに小さく、磁場が対流を抑制していることがわかる。同様の実験を種々の温度差 ΔT において行い、流速を解析した結果を Fig. 9 にまとめた。ここでは、セル内の平均温度が常に 25 °C になるように ($(T_H + T_C)/2 = 25$ °C), 温度を設定した。図に示したように、温度差の増加と共に対流の流速が増加するのに加え、10T の均一・定常磁場によって、対流が約 2 分の 1 に抑制されることがわかった¹³⁾。定常・均一磁場が水溶液中の対流に顕著な影響を及ぼすことを明らかにしたのは、我々が知る限りこの報告¹³⁾ が初めてである。

この実験結果から、Fig. 6 に示した磁場による成長速度の減少は、対流が抑制されるために溶質分子の結晶表面への輸送速度が遅くなり、結晶表面でのリゾチーム濃度が減少したためであると考えられる。しかしながら、対流の抑制による溶解速度の減少のみで、Fig. 7 に示した濃度の経時変化の違いを説明できるかどうかは現在のところ不明であり、研究中である。

また、予備的ではあるが、磁場が結晶の品質を向上させるという結果が得られている²⁷⁾。リゾチーム斜方晶結晶を 10T の均一・定常磁場下で育成したところ、無磁場下で得られた結晶に比べて、分解能が 1.3 から 1.1 μm へと向上した (回折スポット数の増加: 22,000 から 34,000)。その原因としては、対流の抑制による環境の擾乱の低下や、結晶中のモザイク構造の磁場配向、分子構造の変化による結晶のパッキングの向上、などが考えられるが、詳細については現在検討中である。

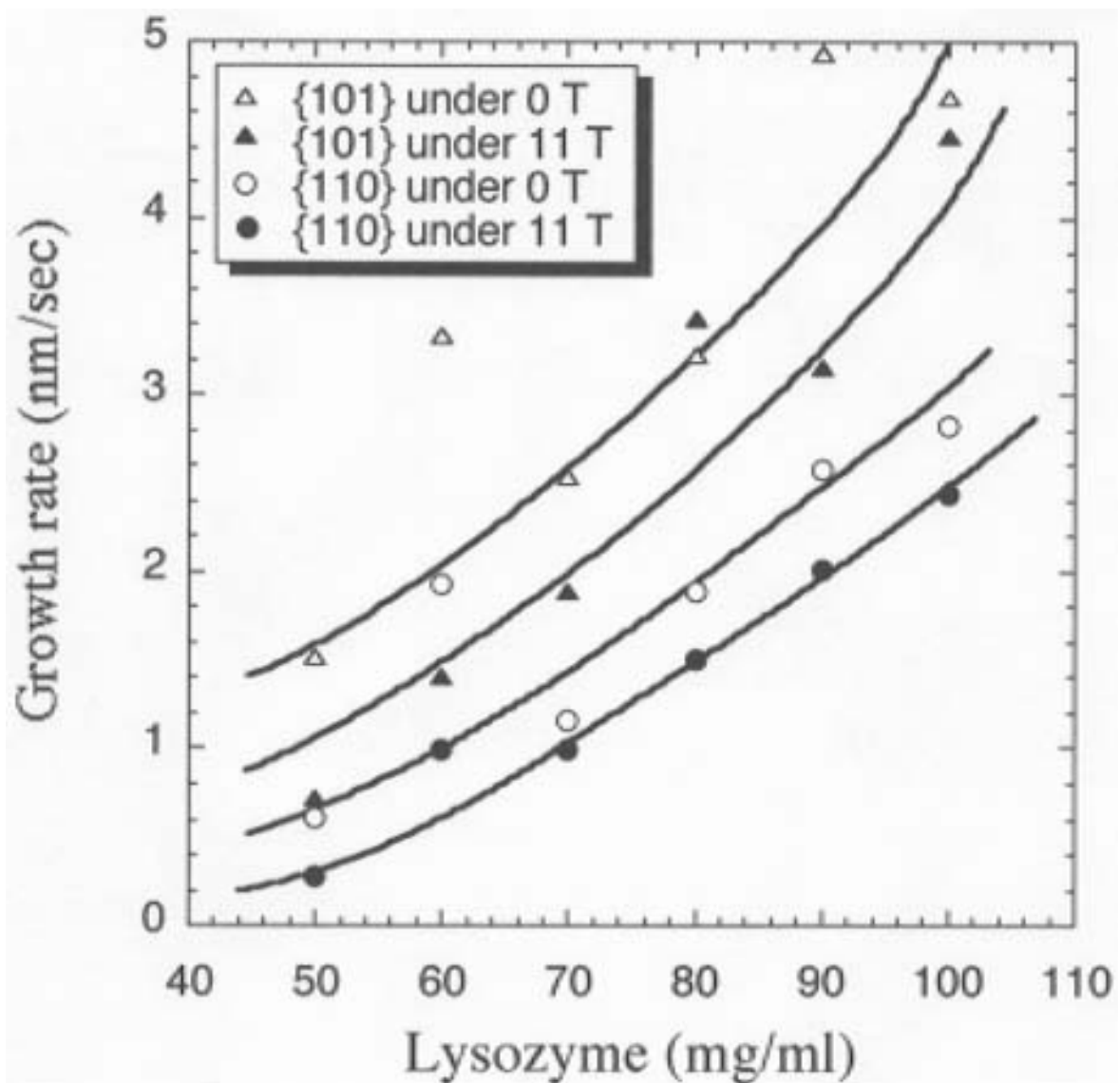


Fig.6 Effects of the magnetic field of 11 T on the growth rates of the {110} and {101} faces of the tetragonal lysozyme crystals¹²⁾. For {110} face: under 0 T (○), and 11 T (●). For {101} face: under 0 T (△), and 11 T (▲). Conditions: NaCl, 25 mg/ml, in 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5). The curves in the figure are guides for the eye. For each measurement, new seed crystals were prepared and their growth rates were measured *in situ*.

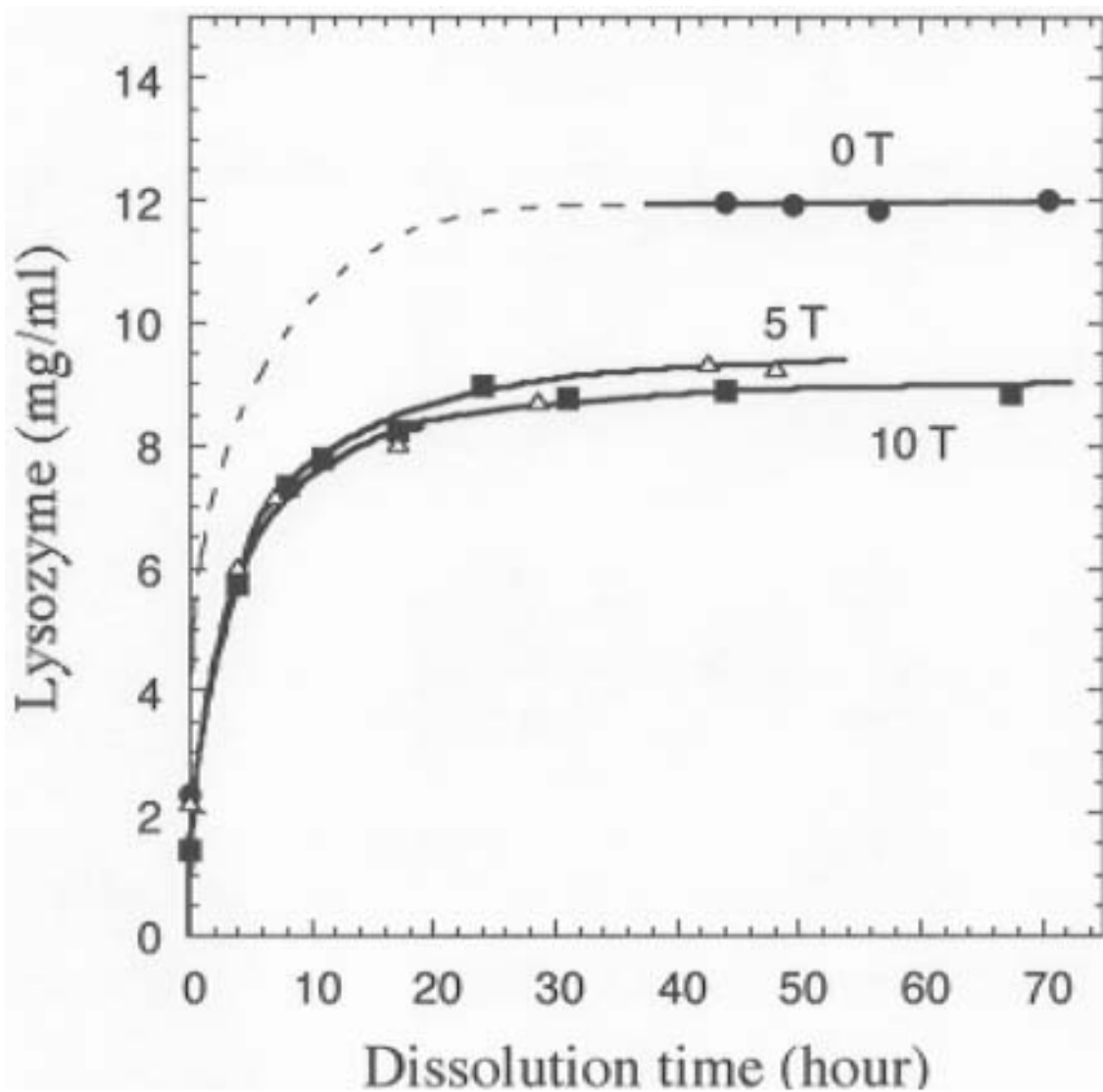


Fig.7 Changes in the lysozyme concentration under 0 (●), 5 (△), and 10 T (■) as a function of the dissolution time¹²⁾. During dissolution of the tetragonal lysozyme crystals under high magnetic field, supernatant solution was withdrawn and the lysozyme concentration in it was determined from the absorbance at 280 nm. Solid curves in the figure are guides for the eye, The concentration on the dotted curve was not measured.

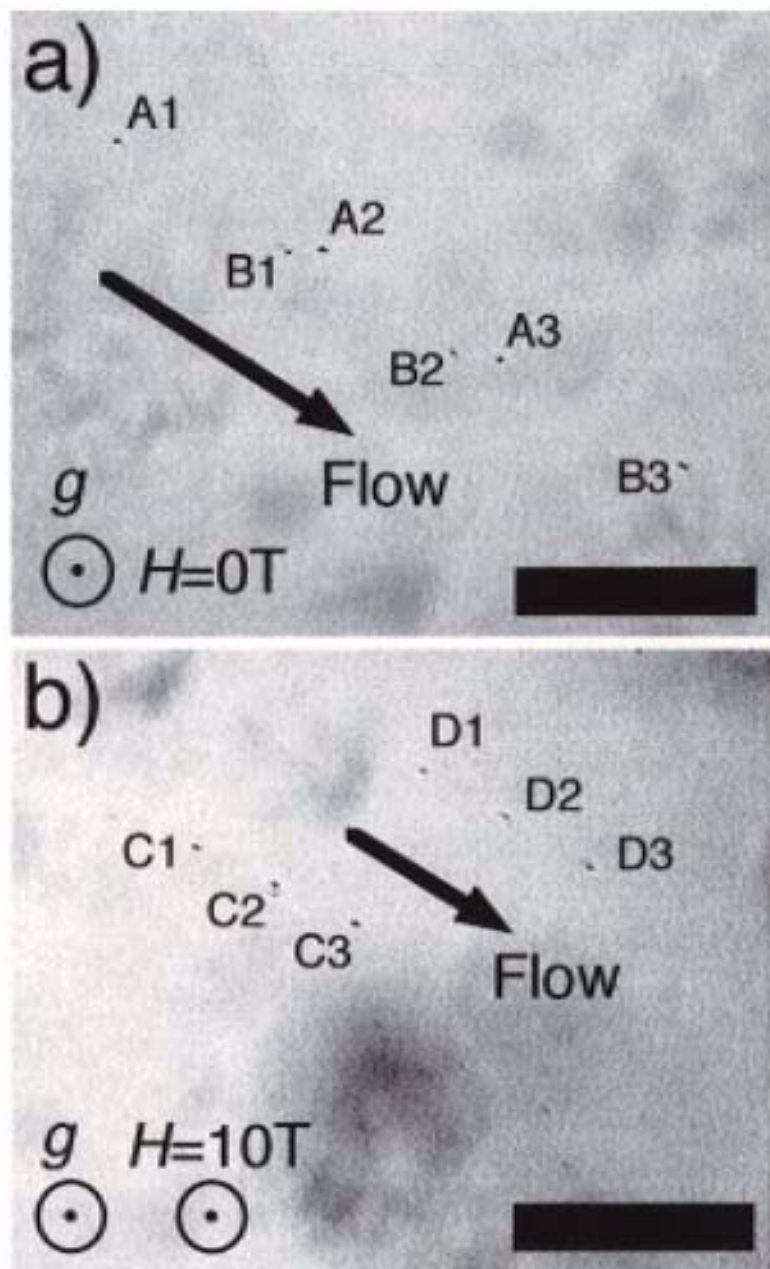


Fig.8 Micrographs of the polystyrene latex particles in 25 wt% NaCl aqueous solution at a) 0 T and b) 10 T¹³⁾. Three snapshots (Nos. 1-3) taken at 0.5 s interval were superimposed in each figure. Four particles, A and B under 0 T, and C and D under 10 T moved from upper left to lower right of the field of view. The magnetic field and gravity were perpendicular to the plane of the photograph. Scale bars represent 500 μ m.

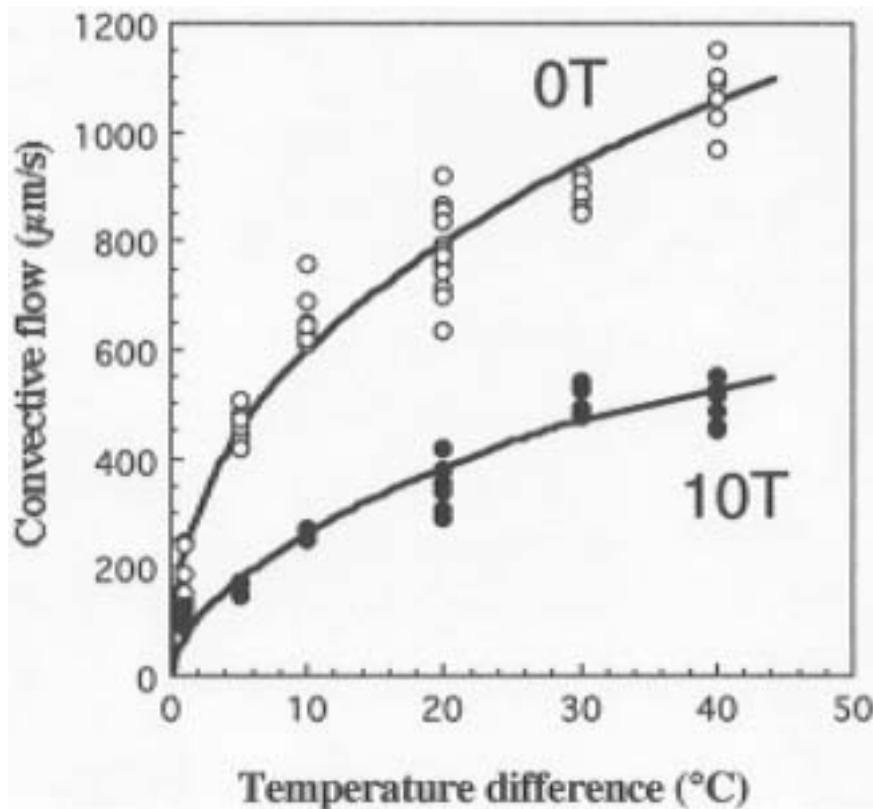


Fig.9 Effect of a static, homogeneous magnetic field on the flow rate of the convection driven by temperature difference¹³⁾. Open points correspond to flow rates under 0 T, and solid ones to those under 10 T. The curves in the figure are guides for the eye. The temperatures of the cold block T_C and the hot block TH were set so that $(T_H + T_C)/2 = 25$.

5.まとめ

タンパク質を題材に、磁場が結晶の個数、配向、晶癖（成長速度）に顕著な影響を及ぼすことを紹介した。また、結晶の配向が成長速度および容器のサイズにより制御できること、磁場中では結晶の成長速度が減少するが磁場による対流の抑制がその原因と考えられること、について示した。本稿で紹介した結晶化に対する磁場効果は、タンパク質以外の低分子有機化合物や無機塩類などにも適用できる。そのため、磁場は溶液中からの結晶成長過程を制御するための新たな操作パラメータとして有用であると考えられる。

謝辞

本研究は文部省科学研究費 (Nos. 10555001, 10304023), 宇宙開発事業団 (財) 日本宇宙フォーラムが推進している宇宙環境利用に関する地上研究公募プロジェクト, および日本原子力研究所黎明研究助成のもとで行われました。また、実験を行いました東北大学金属材料研究所附属強磁場超伝導材料研究センターの皆様へ感謝いたします。

参考文献

- 1) S. Chandrasekhar: Hydrodynamic and Hydromagnetic Stability (Oxford University Press, London, 1961).
- 2) H. A. Chedzey and D. T. J. Hurle: Nature **210**, 933 (1966).
- 3) H. P. Utech and M. C. Flemings: J. Appl. Phys. **37**, 2021 (1966).
- 4) T.M. Rothgeb, and E. Oldfield: J. Biol. Chem. **256**, 1432 (1981).
- 5) G. Sazaki, E. Yoshida, H. Komatsu, T. Nakada, S. Miyashita, and K. Watanabe: J. Crystal Growth **173**, 231 (1997).
- 6) M. Ataka, E. Katoh, and N.I. Wakayama: J. Crystal Growth **173**, 592 (1997).
- 7) N.I. Wakayama, M. Ataka, and H. Abe: J. Crystal Growth **178**, 653 (1997)
- 8) N.I. Wakayama: J. Crystal Growth **191**, 199 (1998).
- 9) J.P. Astier, S. Veessler, R. Boistelle: Acta. Cryst. **D 54**, 703 (1998).
- 10) S. Yanagiya, G. Sazaki, S.D. Durbin, S. Miyashita, T. Nakada, H. Komatsu, K. Watanabe and M. Motokawa: J. Crystal Growth **196**, 319 (1999).
- 11) S. Sakurazawa, T. Kubota, M. Ataka: J. Crystal Growth **196**, 325 (1999).
- 12) S. Yanagiya, G. Sazaki, S.D. Durbin, S. Miyashita, K. Nakajima, H. Komatsu, K. Watanabe and M. Motokawa: J. Crystal Growth, *in press*.
- 13) G. Sazaki, S.D. Durbin, S. Miyashita, T. Ujihara, K. Nakajima, M. Motokawa: Jpn. J. Appl. Phys. **38**, L842 (1999).
- 14) A.Katsuki, R.Tokunaga, S.Watanabe, and Y.Tanimoto: Chem. Lett. , 607 (1996).
- 15) M.Fujiwara, T.Chidiwa, R.Tokunaga, and Y.Tanimoto: J. Phys. Chem. B **102**, 3417 (1998).
- 16) M.Fujiwara, R.Tokunaga, and Y.Tanimoto: J. Phys. Chem. B **102**, 5996 (1998).
- 17) A. McPherson, "Crystallization of Biological Macromolecules" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1999).
- 18) K. Watanabe, S. Awaji, J. Sakuraba, K. Watazawa, T. Hasebe, K. Jikihara, Y. Yamada, and M. Ishihara: Cryogenics **36**, 1019 (1996).
- 19) G. Careri, L. De Angelis, E. Gratton, and C. Messana: Phys. Lett. **A60**, 490 (1977).
- 20) D. L. Worcester: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 5475 (1978).
- 21) L. Pauling: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 2293 (1979).
- 22) R.Diamond: J. Mol. Biol. **82**, 371 (1974).
- 23) 高橋不二雄: "磁気と生物" (学会出版センター, 1989) p.31.
- 24) A. J. Malkin, J. Cheung, A. McPherson: J. Crystal Growth **126**, 544 (1993).
- 25) G.Sazaki, K.Kurihara, T.Nakada, S.Miyashita and, H.Komatsu: J. Crystal Growth **169**, 355 (1996).
- 26) N. Ramachandran and K. Mazuruk: J. Jpn. Soc. Microgravity Appl. **15**, 249 (1998).
- 27) T. Sato, G. Sazaki, Y. Katsuya, and Y. Matsuura, Corrected abstracts in XVIIIth International Union of Crystallography Congress and General Assembly, Gragrow, U.K., August 4-13, 1999.

Figure Captions

Fig. 1. Effect of a magnetic field on the crystallization of hen egg-white lysozyme⁵⁾. (a) at 0 T, and (b) 10 T. The direction of the magnetic field was normal to the figure (optical microphotograph of a transmission type). Initial lysozyme concentration was 100 mg/ml. The crystallization period was 3 days.

Fig. 2. Dependence of the degree of orientation R on magnetic field for initial lysozyme concentrations, 60 mg/ml (●), 80 mg/ml (○), 100 mg/ml (◇), 120 mg/ml (Δ), 140 mg/ml (□), and 160 mg/ml (▲)¹⁰⁾. Curves are a guide for the eye. Data points are averages of several experiments; a typical error bar is indicated. R increases with both field strength and protein concentration.

Fig. 3. Changes in the probability $R(N, H)$ for a crystal of N molecules to have its c -axis within 3° of the field direction as a function of magnetic field strength H ¹⁰⁾. $R(N, H)$ was calculated using eq. (2) for $N=10^6, 10^7, 10^8$, and 10^9 .

Fig. 4. Dependence of the degree of orientation R on the height of the crystallizing solution¹⁰⁾. In these experiments, the initial lysozyme concentration was 80 mg/ml and the magnetic field strength was 4 T.

Fig. 5. Tetragonal lysozyme crystal growing under 11 T¹²⁾. The micrograph was taken *in situ* using the optical microscope and the observation cell. The directions of the magnetic field and the gravitational field are perpendicular to the plane of the photograph. Conditions: lysozyme, 80 mg/ml; NaCl, 25 mg/ml, in 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5). Scale bar represents 50 μm .

Fig. 6. Effects of the magnetic field of 11 T on the growth rates of the $\{110\}$ and $\{101\}$ faces of the tetragonal lysozyme crystals¹²⁾. For $\{110\}$ face: under 0 T (○), and 11 T (●). For $\{101\}$ face: under 0 T (Δ), and 11 T (▲). Conditions: NaCl, 25 mg/ml, in 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5). The curves in the figure are guides for the eye. For each measurement, new seed crystals were prepared and their growth rates were measured *in situ*.

Fig. 7. Changes in the lysozyme concentration under 0 (●), 5 (Δ), and 10 T (■) as a function of the dissolution time¹²⁾. During dissolution of the tetragonal lysozyme crystals under high magnetic field, supernatant solution was withdrawn and the lysozyme concentration in it was determined from the absorbance at 280 nm. Solid curves in the figure are guides for the eye. The concentration on the dotted curve was not measured.

Fig. 8. Micrographs of the polystyrene latex particles in 25 wt% NaCl aqueous solution at a) 0 T and b) 10 T¹³⁾. Three snapshots (Nos. 1-3) taken at 0.5 s intervals were superimposed in each figure. Four particles, A and B under 0 T, and C and D under 10 T moved from upper left to lower right of the field of view. The magnetic field and gravity were perpendicular to the plane of the photograph. Scale bars represent 500 μm .

Fig. 9. Effect of a static, homogeneous magnetic field on the flow rate of the convection driven by temperature difference¹³⁾. Open points correspond to flow rates under 0 T, and solid ones to those under 10 T. The curves in the figure are guides for the eye. The temperatures of the cold block T_C and the hot block T_H were set so that $(T_H+T_C)/2=25^\circ\text{C}$.