

タンパク質水溶液の相分離と結晶化の競合

新倉菜恵子, 西田 玲子, 高橋 雅江
日本女子大学 理学研究科 数理・物性構造科学専攻

(2011年12月14日受理)

要 旨 リゾチーム水溶液は、相分離と結晶化が競合する興味深い挙動を示す。そこで、本研究では pH4.0, リゾチーム濃度 100mg/ml を固定条件とし、塩濃度とクエンチ温度に対する相図を作製し、得られた相図をもとに、相分離の有無が結晶の形成過程と結晶の質に与える影響について検討した。その結果、多角形結晶に着目してみると、一相領域から形成された場合は、ほぼ一定の成長速度で相似形に成長し、形成された結晶を融解するとある程度もとの形状を保ったままかたまり状に融解することがわかった。一方、相分離領域から形成された場合は、成長速度が途中から速くなり、かつ結晶の形状を変化させながら成長し、融解すると細かな結晶子に分かれてモザイク状に融解することが確認できた。このように興味深い特徴が確認された結晶について、どちらの結晶がより質のいいものであるかを明確にするためにX線回折パターンを比較した結果、一相領域で形成された結晶の方がより質がいいという結果が得られた。

キーワード: タンパク質水溶液, リゾチーム, 相分離, 結晶化

1. はじめに

タンパク質は生体を構成する主成分で、複雑な立体構造をとることにより、皮膚の形成や酸素の輸送など、さまざまな固有の機能を発揮する。一方、タンパク質に異常が生じることで、多くの病気が引き起こされる。例えば、アルツハイマー病、狂牛病、白内障などの病気は、タンパク質の凝集、沈着、相分離によって引き起こされると考えられている¹⁾。これらの病気の解明のためには、病気の原因となるタンパク質の立体構造を細かく正しく知る必要があり、その手法としてX線結晶構造解析法が非常に有力である。そのため、X線を強く回折するような、分子の向きがそろった質のいいタンパク質の結晶が必須である。しかし、タンパク質は分子形態がいびつであるため、一般的に質のいい結晶を作製することが困難であり、立体構造が未だ不明なものが多くある。そこで、本研究では比較的結晶化が起こりやすいとされているニワトリ卵白由来の球状タンパク質リゾチームを試料として用い、質のいい結晶を得るための条件の検討を目的とした。

Contribution No.: MP 11-5

リゾチーム水溶液は、pH、リゾチーム濃度、塩濃度、クエンチ温度に依存して相分離や結晶化を引き起こす系である²⁾。リゾチーム水溶液に NaCl などの塩を添加し、リゾチーム分子間の静電斥力を制御することにより、分子同士の凝集のしやすさを操作することができるため、リゾチーム水溶液に添加する塩の濃度は、相分離や結晶化に影響を与えると考えられる。そこで、本研究ではまず pH4.0, リゾチーム濃度 100mg/ml を固定条件とし、塩濃度 (3.0wt%~7.5wt%) とクエンチ温度 (3℃~35℃) に対する詳細な相図を作製することを試みた。そして、得られた相図をもとに、一相領域または相分離領域から形成される結晶の成長の様子を観察し、どのような成長を示す結晶がどのような性質をもつものであるかを顕微鏡やX線回折装置を用いて多方面から比較検討することにより、より質のいい結晶が得られる条件を求めた。

2. 理 論

2.1. リゾチーム分子の表面電荷と塩による静電斥力の遮蔽

リゾチームの等電点は pH11.0 であり³⁾、それより pH が低い水溶液中において、分子は表面に正電荷を帯びる

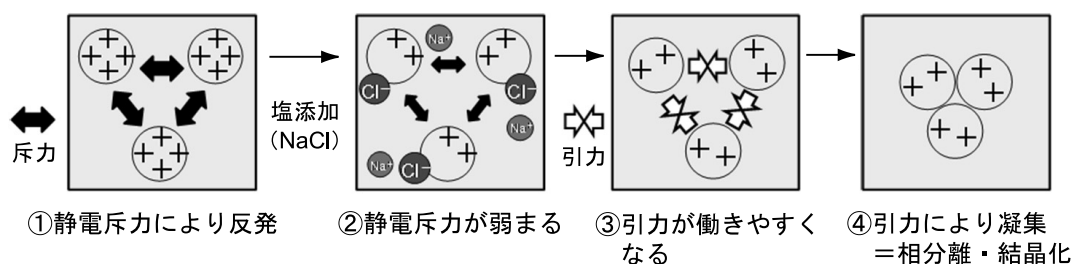


図 1. リゾチーム分子の表面電荷と塩による静電斥力の遮蔽

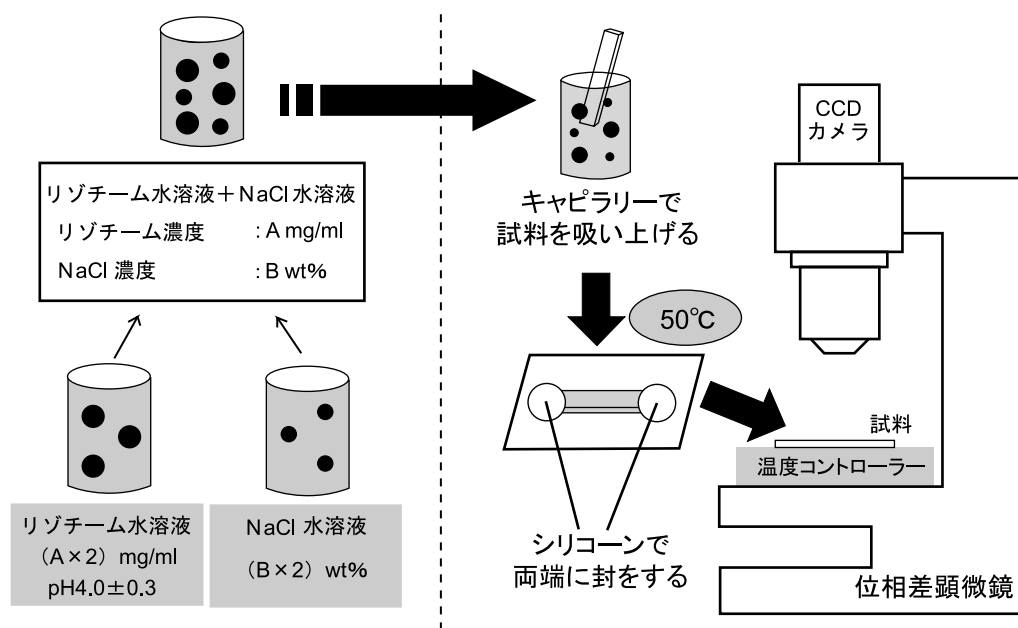


図 2. 位相差顕微鏡観察

ため、分子同士は静電斥力によって反発し合い、凝集することはない（図 1 ①）。しかし、リゾチーム水溶液に NaCl などの塩を添加すると、塩は水溶液中で電解を起こし、分子表面の正電荷を打ち消す（図 1 ②）。正電荷を打ち消された分子は静電斥力が弱まり、引力相互作用により凝集を始める（図 1 ③、④）。このように、リゾチーム水溶液に塩を添加することにより、分子同士が凝集しやすくなり、相分離や結晶化を引き起こすことができる。そのため、リゾチーム水溶液に添加する塩の濃度は、相分離や結晶化に影響を与えと考えられる。

3. 実験

3.1. 試料

本研究で使用した卵白リゾチームは㈱和光純薬工業製で、分子量は 14,400 である。リゾチーム水溶液の作製方法は、pH4.4 に調整した 50mM の酢酸緩衝液の溶媒にリゾチームを溶解し、さらに少量の 1M の塩酸を添加することにより、pH4.0 に調整した。

3.2. 実験方法

3.2.1. 位相差顕微鏡観察

リゾチーム水溶液に塩（NaCl）を添加すると、その時点でリゾチーム分子が凝集を開始するため、リゾチーム水溶液と NaCl 水溶液はそれぞれ実験条件の倍の濃度で別々に作製し、観察直前にそれらを混合した。混合するときの温度はリゾチーム水溶液が相分離および変性を起こさない温度（50°C）とした。そして混合した試料を、Vitro Com 社製のガラスキャピラリー（厚さ：0.05mm, 幅：0.5mm）に毛細管現象を用いて吸い上げ、50°C からあらかじめ目的の観察温度に設定しておいたホットステージ（ジャパンハイテック㈱製：LK-600PM）にのせてクエンチ（急冷）し、そのときの相分離パターンと、その後起こる結晶化の時間発展の様子を、位相差顕微鏡（OLYMPUS㈱製：BX50）で観察した（図 2）。

3.2.2. X線回折

X線発生装置は FR-E+SuperBright, ゴニオメータは Vertical Goniometer, 人工多層膜ミラーは VariMax-HF,

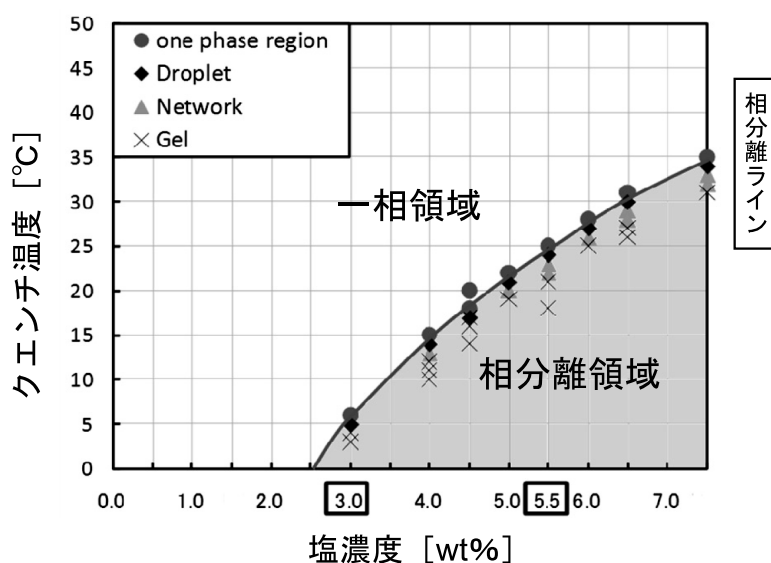


図 3. リゾチーム濃度 100mg/ml を固定条件とした相図

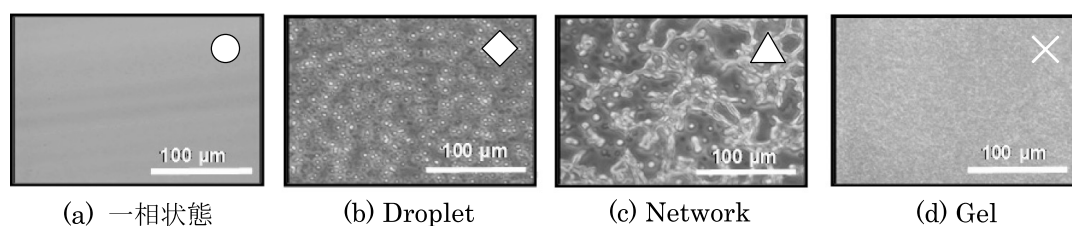


図 4. 一相領域と相分離領域で観察されるパターン

X線検出器は R-AXIS VII (すべて株式会社リガク製) を用いて、リゾチーム水溶液と NaCl 水溶液の混合水溶液から形成された結晶の X 線写真を撮影した。X 線のコリメーター径は 0.3 mm, ターゲットは Cu で、測定条件は管電圧 45 kV, 管電流 55 mA, X 線 ($\text{CuK}\alpha_1$) の照射時間は試料により 1 分または 5 分とし、振動写真法により実験を行った。

4. 実験結果と考察

4.1. 相図の作製

はじめに pH 4.0, リゾチーム濃度 100 mg/ml を固定条件とし、塩濃度 (3.0 wt% ~ 7.5 wt%) とクエンチ温度 (3 °C ~ 35 °C) に対するリゾチーム水溶液の相図を作製した (図 3)。一相状態では図 4 a に示すように特徴的なパターンは無く、一様な状態に見える。一方、相分離領域ではクエンチ温度が相分離温度に近いと、濃度の高い溶液が Droplet を示す「Droplet」(図 4 b), そしてそれより低温にクエンチすると、粘弾性相分離特有の濃度の高い相が Network 構造を示す^{4,5)}「Network」(図 4 c), さらに低温にクエンチすると、濃度の高い相と低い相が

混ざり合う「Gel」(図 4 d) と呼ばれるパターンがそれぞれ観察された。

4.2. 相分離の有無による結晶の形成過程の比較

本研究では、塩濃度 5.5 wt% および塩濃度 3.0 wt% の試料を用い、一相領域および相分離領域から生成される多角形結晶の形成過程について検討を行った。

4.2.1. 一相領域から生成された多角形結晶の形成過程

一相領域から生成された多角形結晶の形成過程の典型的な例として、塩濃度 5.5 wt%, クエンチ温度 25 °C における多角形結晶の成長グラフ (横軸: クエンチからの経過時間, 縦軸: 結晶の長軸の半分の長さ) を図 5 に、そのときの位相差顕微鏡での観察結果を図 6 に示す。

一相領域なので、クエンチ直後のリゾチーム水溶液は図 6 a のように一様にみえる。図 5 中の①②③各時間における多角形結晶 (図 6 b, c, d) をみると、結晶ははじめに生成された多角形の形状のまま、形状変化せず、相似形に成長したことがわかる。なお、多角形結晶の右側にある結晶は針状結晶で、この結晶も時間とともに成長

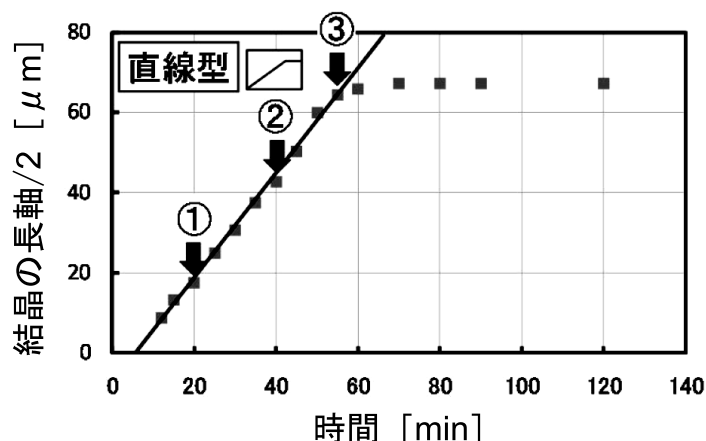


図 5. 一相領域から生成された多角形結晶の結晶成長の時間依存性（直線型）

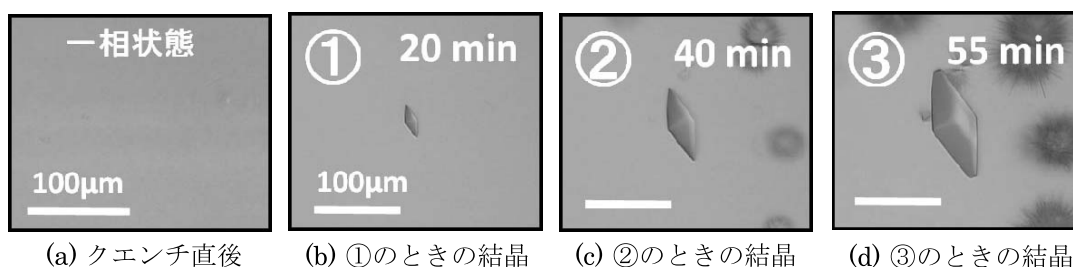


図 6. 一相領域から生成された多角形結晶の形成過程（形状変化なし）

するが、本検討では中央の多角形結晶のみに注目した。

図 5 から、結晶は成長が終わるまでほぼ一定の速度 ($1.24 \mu\text{m}/\text{min}$) で成長することが確認できた。このように、成長速度が結晶化が終わるまでほぼ一定であるような成長を示す場合を、グラフの形から「直線型」と呼ぶことにする。

4.2.2. 相分離領域から生成された多角形結晶の形成過程

相分離領域から生成された角形結晶の形成過程の典型的な例として、塩濃度 5.5 wt%, クエンチ温度 18°C で、「Gel」状態から多角形結晶が生成されたときの結晶の成長グラフを図 7 に、位相差顕微鏡での観察結果を図 8 に示す。

クエンチ直後のリゾチーム水溶液は、図 8 a のように水溶液の濃度が高い相と低い相が混ざり合う「Gel」パターンが観察される。図 7 中の①②③の各時間における図の中央にある多角形結晶の様子（図 8 b, c, d）をみると、結晶は初めは丸みを帯びた形をしており、徐々に角ばった形状に変化しながら成長することがわかる。なお、相分離領域からの結晶化においても、一相領域からの結晶化と同様に針状結晶が生成、成長していることが

図 8 b, c, d で確認できる。

図 7 から、この多角形結晶は、初期段階の成長速度（破線部）が $0.60 \mu\text{m}/\text{min}$ であったのに対し、②の時点から成長速度が $1.24 \mu\text{m}/\text{min}$ に速くなっていることがわかる。このように、成長速度が二段階に分かれるような成長を示す場合を、グラフの形から「S 字型」と呼ぶことにする。成長速度が変わった②の時点の観察結果（図 8 c）をみると、結晶周辺が相分離状態から一様な状態に変わり始めていることがわかる。さらにこの後、結晶を中心として徐々に相分離している領域が減り、最後には完全に相分離パターンは消え、一様な状態になった（図 8 d）。

4.3. 多角形結晶の融解パターンの比較

一相領域から生成され、「形状変化なし」で、「直線型」に成長した多角形結晶と、相分離領域から生成され、「形状変化あり」で、「S 字型」に成長した多角形結晶とでは、最終的な形状は同じであるが、その形成過程の違いを反映して結晶の質が異なると推測した。そこで、融解したときに相違が得られるのではないかと考え、偏光顕微鏡（Nikon 製：OPTIPHOT2-POL）と前述のホットステージを用いて多角形結晶の融解パターンを観察した。

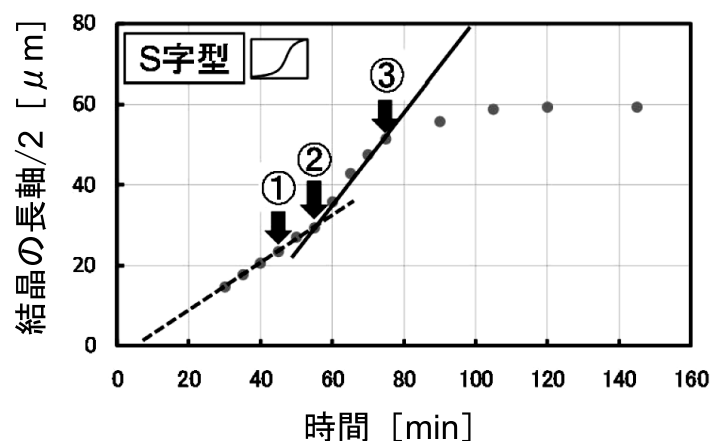


図 7. 相分離領域から生成された多角形結晶の結晶成長の時間依存性 (S 字型)

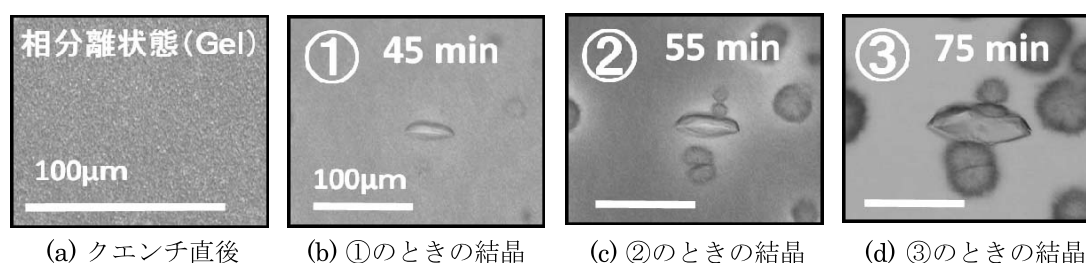


図 8. 相分離領域から生成された多角形結晶の形成過程 (形状変化あり)

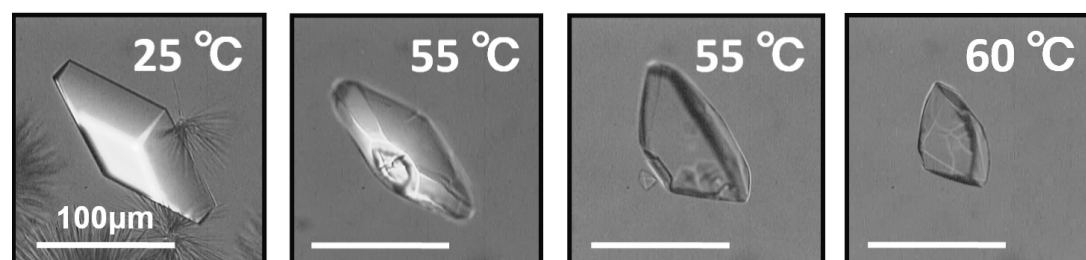


図 9. 一相領域から形成された多角形結晶の融解パターン (かたまり状)

なお、結晶を融解するために、結晶作製時のクエンチ温度から、多角形結晶が融解しきるまで 99 K/min で 5K おきにステップ状に温度上昇させて観察を行った。

4.3.1. 一相領域から形成された多角形結晶の融解パターン

一相領域から形成された多角形結晶の典型的な融解パターンとして、塩濃度 5.5wt%，クエンチ温度 25°C において形成された結晶の融解の様子を図 9 に示す。温度が 55°C に達すると多角形結晶の表面が融け始め、その後ある程度もとの形状を保ったままかたまり状に融解し、60°C で融けきった。このような融解パターンを「かたまり状」で融解したと呼ぶことにする。

4.3.2. 相分離領域から形成された多角形結晶の融解パターン

相分離領域から形成された多角形結晶の典型的な融解パターンとして、塩濃度 5.5wt%，クエンチ温度 12°C において形成された結晶の融解の様子を図 10 に示す。温度が 50°C に達すると多角形結晶は細かな結晶子に分かれ、モザイク状に融解し、60°C で融けきった。このような融解パターンを「モザイク状」で融解したと呼ぶことにする。

この結果から、塩濃度 5.5wt% で作製した多角形結晶の融解開始温度は、相分離の有無によらず、50°C～55°C であることがわかった。また、「かたまり状」で融解し

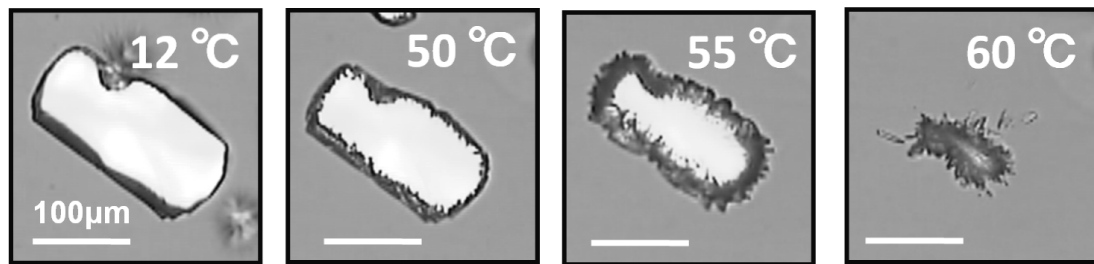


図10. 相分離領域から形成された多角形結晶の融解パターン（モザイク状）

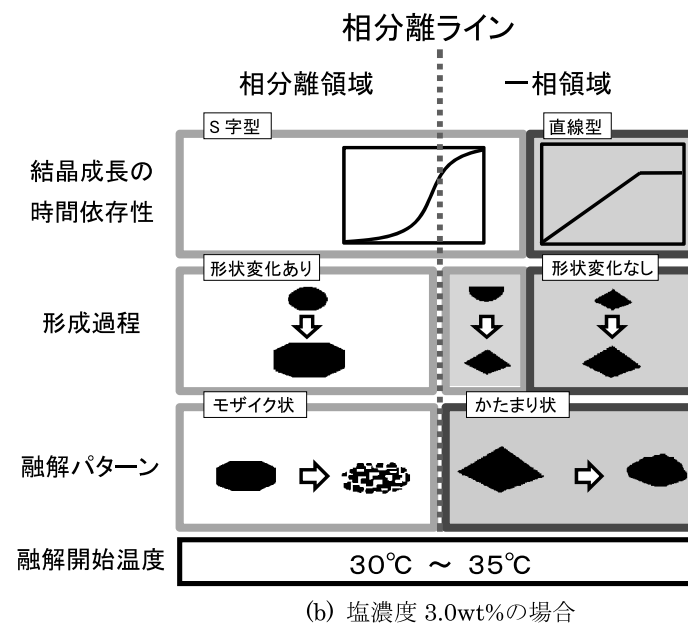
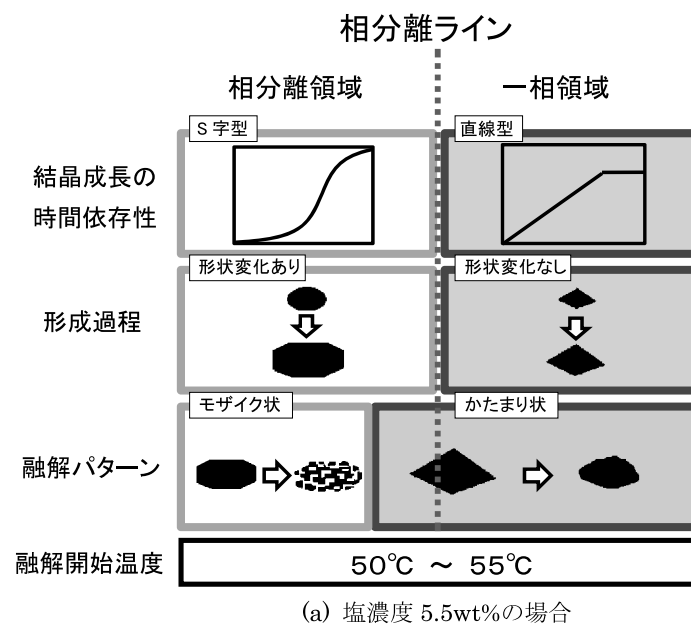


図11. 多角形結晶の結晶成長の時間依存性，形成過程，融解パターン，融解開始温度のまとめ

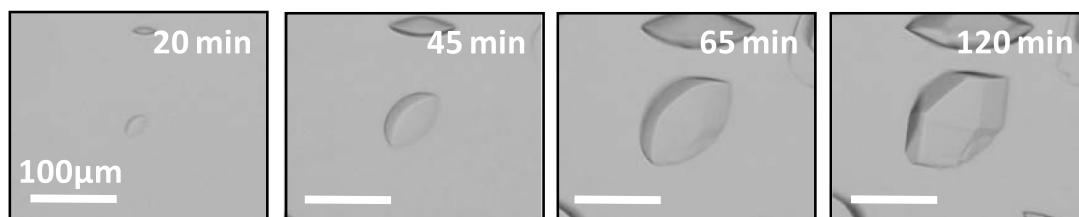


図12. 塩濃度 3.0wt%の試料を用い、相分離ラインから+5Kの領域で作製した結晶の形成過程

た結晶は融解してもある程度もとの形状を保つことができるので、「モザイク状」で融解した結晶と比較して結晶子が大きく、結晶子間の結合が強い結晶であると推測できた。

4.4. 塩濃度 5.5 wt%および塩濃度 3.0 wt%の試料で作製した多角形結晶の形成および融解の比較

4.2., 4.3. では塩濃度が 5.5 wt%であったが、塩濃度 3.0 wt%の場合も同様に観察を行った。そして、相分離の有無に対する多角形結晶の結晶成長の時間依存性および結晶の形成過程、融解パターン、融解開始温度について検討を行い、塩濃度 5.5 wt%および塩濃度 3.0 wt%の結果を図 11 a, 図 11 b にまとめた。

この結果、塩濃度 5.5 wt%と塩濃度 3.0 wt%ともに、結晶成長の時間依存性および形成過程は、基本的には相分離の有無を反映して分類できることがわかった。しかし、塩濃度 3.0 wt%の場合、相分離ラインから+5Kの領域で、一相領域にも関わらず、形状変化を経る「S字型」の成長を示す結晶が観察された。これを位相差顕微鏡で観察すると、図 12 に示すように、はじめに一相状態からキャップ状の結晶が生成され、徐々に角ばった形状に変化しながら成長し、多角形結晶を形成するという、塩濃度 5.5 wt%の場合ではみられなかった特徴的な形成過程を示した。この成長様式の原因について考察すると、リゾチームの結晶は多くの水分を含んでおり、さらに塩濃度 3.0 wt%で作製した結晶は、塩濃度 5.5 wt%で作製した結晶と比較して分子間に働く引力が弱いため、はじめは界面張力により丸みを帯びた形状となるが、結晶が成長するにつれ、界面張力より結晶本来の界面が打ち勝った結果であると考えられる。

また、融解パターンに関しては、塩濃度 5.5 wt%の場合、相分離ラインから-4Kの範囲までかたまり状に融解するのに対し、塩濃度 3.0 wt%の場合、相分離ラインを境に分類された。さらに、融解開始温度が、塩濃度 5.5 wt%の場合は 50°C~55°Cであったのに対し、塩濃度 3.0 wt%の場合は 30°C~35°Cだった。この結果から、塩濃度 5.5 wt%で作製した結晶の方が塩濃度 3.0 wt%で作製した結晶と比較して、相分離の影響を受けにくく、融

解開始温度が高い結晶子間の結合が強い結晶ができていたと推測できる。これは、2.1. に示したように、リゾチーム水溶液に添加する塩の濃度が高いと、それだけリゾチーム分子間の引力が働きやすくなり、結晶化が起りやすくなったためと考えられる。

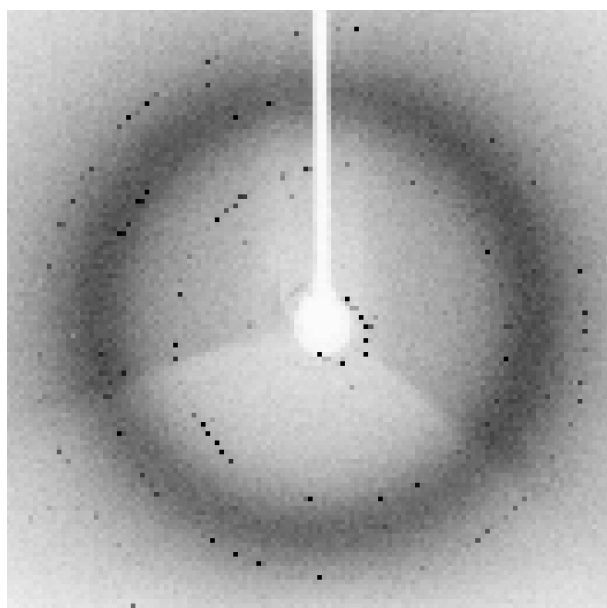
4.5. 融解パターンが異なる多角形結晶のX線回折パターンの比較

4.3. で、多角形結晶の融解パターンを観察したところ、「かたまり状」に融解する結晶の方が「モザイク状」に融解する結晶よりも結晶子が大きく、融解してもある程度もとの形状を保つことのできる結晶子間の結合が強い結晶であると推測できた。そのため、「かたまり状」に融解する結晶と「モザイク状」に融解する結晶のX線回折パターンを比較し、その結果から両者の結晶性を比較することにした。また、4.4. から、塩濃度 5.5 wt%で作製した結晶の方が塩濃度 3.0 wt%で作製した結晶と比較して、相分離の影響を受けにくく、融解開始温度が高い結晶子間の結合が強い結晶ができていたと推測できた。そのため、塩濃度 5.5 wt%と塩濃度 3.0 wt%で作製した結晶のX線回折パターンを比較し、どちらの塩濃度で作製した結晶がより結晶性が高いものであるかも検討した。なお、X線回折で用いる試料は Vitro Com 社製のガラスキャピラリー（厚さ:0.2mm, 幅:2mm）に作製した。

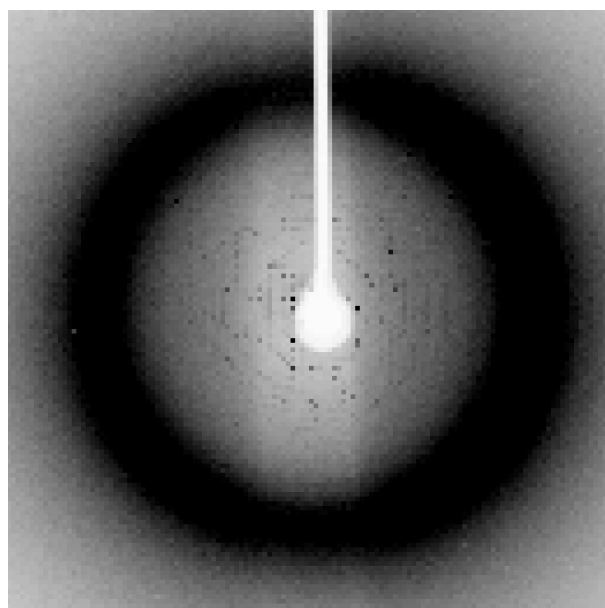
塩濃度 5.5 wt%の試料を用いて、一相領域で「かたまり状」に融解する条件（クエンチ温度 28°C）、相分離領域で「モザイク状」に融解する条件（クエンチ温度 2°C）で作製した結晶のX線回折パターンをそれぞれ図 13 a, b に示す。

また、塩濃度 3.0 wt%の試料を用いて、一相領域で「かたまり状」に融解する条件（クエンチ温度 20°C）、相分離領域で「モザイク状」に融解する条件（クエンチ温度 2°C）で作製した結晶のX線回折パターンをそれぞれ図 14 a, b に示す。

図 13 a と図 13 b, 図 14 a と図 14 b の結果から、「かたまり状」に融解する結晶のX線回折パターンは、はっきりとしたスポット状の回折点がみられるのに対し、「モザイク状」に融解する結晶は、薄い線状の回折点がみら

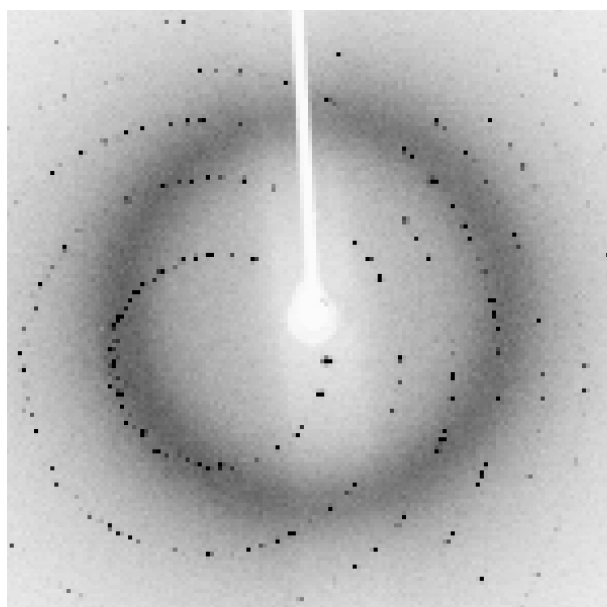


(a) 一相領域で「かたまり状」に融解する結晶のX線回折パターン

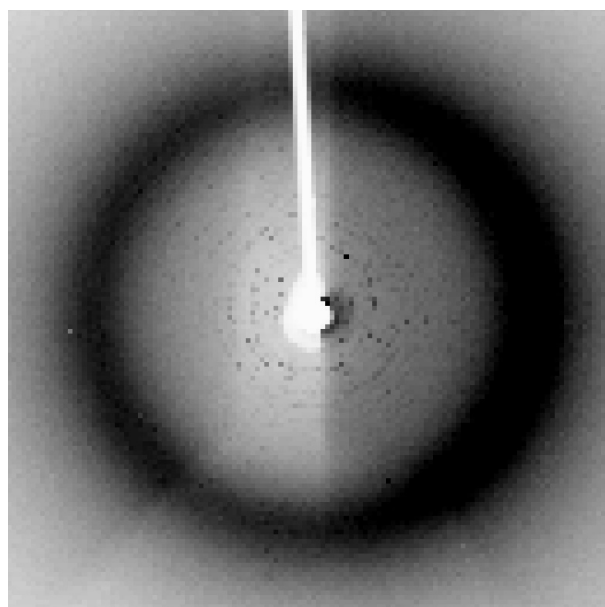


(b) 相分離領域で「モザイク状」に融解する結晶のX線回折パターン

図13. 塩濃度 5.5wt%で作製した多角形結晶の融解パターンの相違によるX線回折パターンの比較



(a) 一相領域で「かたまり状」に融解する結晶のX線回折パターン



(b) 相分離領域で「モザイク状」に融解する結晶のX線回折パターン

図14. 塩濃度 3.0wt%で作製した多角形結晶の融解パターンの相違によるX線回折パターンの比較

れることがわかる。この結果から、「かたまり状」に融解する結晶の方が、「モザイク状」に融解する結晶と比較すると明らかに結晶性のいい結晶であることが確認できた。

また、図13aと図14aの結果を比較すると、図14aの方が図13aよりも多くの回折点を得られたことから、「かたまり状」に融解する結晶に関しては、塩濃度 3.0wt%

で作製した結晶の方が、塩濃度 5.5wt%で作製した結晶より結晶性のいい結晶であることが明らかになった。一方、「モザイク状」に融解する結晶のX線回折パターン(図13bと図14b)を比較すると、図13bでみられた回折点の方が、図14bでみられた回折点よりもシャープな矩形形状の回折点を示したことから、「モザイク状」に融解する結晶に関しては、塩濃度 5.5wt%で作製した結晶の

方が、塩濃度 3.0wt% で作製した結晶より結晶性のいい結晶であることが強く示唆された。このように、「かたまり状」に融解する結晶と「モザイク状」に融解する結晶では、結晶性の良し悪しに関して、塩濃度の影響が逆転するという興味深い結果が得られたため、この理由については今後更に検討を行う必要がある。

また、卵白リゾチームの結晶系は正方晶、斜方晶、単斜晶などが知られているが^{6,7)}、「かたまり状」に融解する結晶の X 線回折パターン (図 13 a と図 14 a) からデータ測定・処理ソフトウェア Crystal Clear を用いて結晶系を調べた結果、本検討で用いた「かたまり状」に融解する結晶は、格子定数が $a = b = 79.0 \text{ \AA}$, $c = 38.0 \text{ \AA}$, $\alpha = \gamma = \beta = 90^\circ$ の正方晶であることが確認できた。一方、「モザイク状」に融解する結晶は結晶性が悪いため、結晶系を同定することはできなかった。

5. ま と め

5.1. リゾチーム水溶液の相図の作製

位相差顕微鏡により、リゾチーム水溶液の相分離温度を調べ、pH 4.0、リゾチーム濃度 100 mg/ml を固定条件とした、塩濃度とクエンチ温度に対するリゾチーム水溶液の相図を完成させた。リゾチーム水溶液は一相状態では一様な状態にみえる一方、相分離領域ではクエンチ温度が相分離温度に近い順に、「Droplet」、「Network」、「Gel」と呼ばれるパターンがそれぞれ観察された。

5.2. 相分離の有無による結晶の質の比較

一相領域から形成された多角形結晶は、基本的には「形状変化なし」の形成過程で結晶成長の時間依存性が「直線型」を示し、融解すると「かたまり状」に融解した。一方、相分離領域から形成された結晶は、基本的には「形状変化あり」の形成過程で結晶成長の時間依存性が「S 字型」を示し、融解すると「モザイク状」に融解した。一相領域および相分離領域で形成された結晶の融解パターンの比較により、一相領域で形成された結晶は相分離領域で形成された結晶より結晶子が大きく、結晶子間の結合が強い結晶ができたことと推測できた。そのため、両者の X 線回折パターンを比較検討した結果、一相領域から形成された結晶はスポット状の X 線回折パターンが得られたのに対し、相分離領域から形成された結晶は線状の X 線回折パターンを示したため、前者の方が結晶子が大きく、結晶性のいい質がいい結晶であることが確認できた。

5.3. 塩濃度の変化による結晶の質の比較

塩濃度 5.5 wt% で作製した結晶の方が塩濃度 3.0 wt% で作製した結晶と比較して、相分離の影響を受けにくく、

融解開始温度が高かったという結果から、塩濃度が高い方が結晶子間の結合が強い結晶ができることが推測できた。また、「かたまり状」に融解する結晶に関しては、X 線回折パターンの解析結果から、塩濃度 5.5 wt% の場合も塩濃度 3.0 wt% の場合も、どちらも結晶系は同じ正方晶を示すことが確認できた。一方、「モザイク状」に融解する結晶は結晶性が悪いため、結晶系を同定することはできなかった。

また、「かたまり状」に融解する結晶に関しては、X 線回折パターンを比較すると、塩濃度 3.0 wt% で作製した結晶の方が塩濃度 5.5 wt% で作製した結晶より多くの回折点を得られたことから、塩濃度が低い方が結晶性のいい結晶ができることが明らかになった。一方、「モザイク状」に融解する結晶に関しては、X 線回折パターンを比較すると、塩濃度 5.5 wt% で作製した結晶の方が塩濃度 3.0 wt% で作製した結晶よりシャープな矩形状の回折点を示したことから、塩濃度が高い方が結晶性のいい結晶ができることが示唆された。

5.2., 5.3. の結果からまとめると、一相領域で形成された結晶は相分離領域で形成された結晶より質のいい結晶が作製できるという結果が得られた。また、「かたまり状」に融解する結晶に関しては、塩濃度が低い方が質のいい結晶が得られるのに対し、「モザイク状」に融解する結晶に関しては、塩濃度が高い方が質のいい結晶が得られることが示唆された。このように、「かたまり状」に融解する結晶と「モザイク状」に融解する結晶では、結晶性の良し悪しに関して、塩濃度の影響が逆転するという興味深い結果が得られたため、この理由については今後更に検討を行う必要がある。

謝 辞：本研究を進めるにあたり、東京大学生産技術研究所の田中 肇教授に有益な議論をしていただきました。心より感謝いたします。また、本研究における X 線回折実験は、株式会社リガクにて測定させていただきました。感謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) 小野寺 節, 佐伯圭一: 脳とプリオン 朝倉書店 (2001)
- 2) C. Ishimoto and T. Tanaka: *Physical Review Letters*, **39**, 474-477 (1977)
- 3) 神立 誠: たんぱく質の知識 幸書房, **19** (1971)
- 4) H. Tanaka and T. Araki: *Chemical Engineering Science*, **61**, 2108-2141 (2006)
- 5) H. Tanaka and Y. Nishikawa: *Physical Review Letters*, **95**, 78-103 (2005)
- 6) 相原茂生: タンパク質の結晶化 ―回折構造生物学のために. 京都大学学術出版会, **103** (2005)
- 7) V.I. Strelov, B.G. Zakharov, I.Zh. Bezbakh and N.I. Sosfenov: *Crystallography Reports*, **53**, 143-146 (2008)

Competition between Phase Separation and Crystallization in Protein Solutions

Naeko Niikura, Reiko Nishida and Masae Takahashi
The Graduate School of Science, Division of Mathematics and
Material Structure Science, Japan Women's University

(Received December 14, 2011)

Abstract: Lysozyme solution shows the interesting behavior of competition between phase separation and crystallization. In this study, the phase diagram for salt concentration versus quenching temperature was made under the fixed conditions of pH4.0 of protein buffer and of 100mg/ml. On the basis of this phase diagram, we have investigated the influence of phase separation on the formation process and the quality of protein crystals. In this paper, we provide experimental evidence focusing on the facet crystals. When the crystal was formed from the one phase region, it grew with a constant growth rate keeping its shape. Moreover, when this crystal was melted, it melted in the lump state. On the other hand, when the crystal was formed from the phase separation region, the growth rate became more quickly at middle point of progress and furthermore, the crystal shape has become to vary from spherical to facet. When this crystal was melted, it melted in the mosaic state. Therefore, in order to clarify each individual quality of these crystals formed from the one phase region and the phase separation region, we made a comparison between the X-ray diffraction patterns of each crystal. As the result, we obtained that the crystal formed from the one phase region has higher quality than that formed from the phase separation region.

Key words: protein solutions, lysozyme, phase separation, crystallization