

宇宙環境利用の展望

ロシアサービスモジュールを利用した蛋白質結晶生成宇宙実験

(財)宇宙環境利用推進センター 高橋 幸子、田仲 広明

1. はじめに

2000年にヒトゲノムの解読が終了し、遺伝情報の本体であるDNAの概略が明らかになった。しかし、実際にゲノムのどの部分で蛋白質を発現するか、また、その蛋白質のもつ機能や生理的意義はどのようなものであるかということは、ゲノム情報だけでは明らかにならない。実際、生体内で重要な生理的役割を果たすのはDNAではなく、DNAから発現される10万種類以上といわれる蛋白質である。ポストゲノム時代と呼ばれる現在は、解読されたゲノム情報を元に、その次の段階として、ゲノムから発現させた蛋白質の構造や機能の解析を行い、創薬を始めさまざまな科学研究に生かすことが新たな目標となっている。特に、蛋白質の立体構造に基づく薬剤の分子設計(Structure-Based Drug Design:SBDD)の手法を用いた医薬品の開発には期待が高まっている。

原子レベルでの精密な蛋白質立体構造解析を行うためには、現在のところ核磁気共鳴(NMR)あるいは結晶のX線回折が用いられているが、分子量数万以上の生体高分子の構造解析にはX線回折が主流である。近年、X線構造解析技術の向上や、様々なハードウェア・ソフトウェアの改良により、構造生物学はめざましい進歩をとげているが、研究推進上のボトルネックとなっているのは、X線回折実験に必要な高品質蛋白質結晶の取得であるというのが実情である。

宇宙環境では、対流や沈降効果が抑制されるため、結晶周辺に理想的な拡散場が形成され、ゆるやかな結晶成長が実現すると考えられる。そこで我々は、宇宙環境を利用した蛋白質結晶化実験を推進している。宇宙では、地上で生成する結晶より高品質な結晶の生成が期待される。

宇宙航空研究開発機構(JAXA)では、国際宇宙ステーション(International Space Station:ISS)の日本の実験棟「きぼう」による本格的な宇宙環境利用の先駆けとして、2003年から2005年にかけて計6回の予定で、ロシアサービスモジュールを利用した「タンパク質構造・機能解析のための高品質タンパク質結晶生成プロジェクト」(JAXA-GCFプロジェクト)を実施している。本稿では、本プロジェクトにより得られたこれまでの結果を元に、宇宙環境利用の今後の展望について述べる。

2. 宇宙環境利用の現状

宇宙環境を利用した蛋白質結晶成長実験は、欧米では1983年以降積極的に実験が行なわれており、2003年1月までに米国の場合、スペースシャトル全112フライト中54フライトで、欧州の場合はその他の実験機会を含め13フライトで宇宙実験が行なわれている[1,2]。また、わが国においても、1989年以降宇宙実験の経験が蓄積されつつある[3,4,5]。

米国では、これまでに商業利用目的以外で宇宙実験が試みられた蛋白質の総数は219

種(1994年以降の商業利用は除く)であり、このうち57種類(89実験:2001年12月現在)で宇宙実験の有効性が示されている[1]。また、結晶の品質が向上した実験のうち、データの

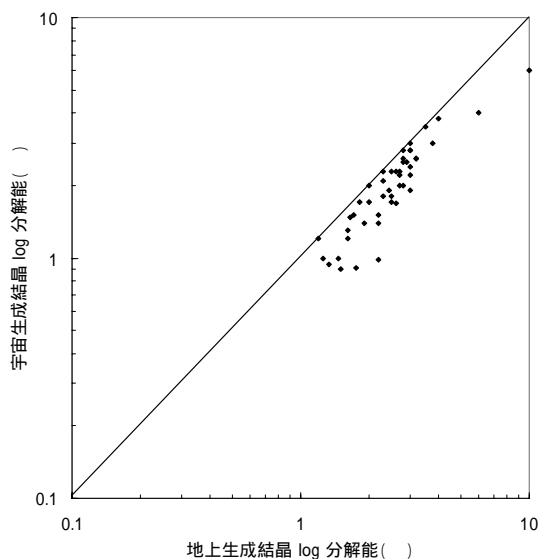


図1 . 宇宙および地上実験で得られた結晶の回折分解能の比較 (NASA ホームページの資料を再編)

報告されている75実験について、地上実験との比較や文献等がホームページ上でも公開されている[6]。そのうちNASA(アメリカ航空宇宙局)のホームページに公開されている、宇宙実験生成結晶が地上生成結晶に比べて改善されていたデータを再編し、宇宙と地上で得られた結晶の分解能をプロットしたものが図1である。また、公開データを単純に平均すると、宇宙生成結晶から得られた反射点の数は、地上生成結晶に比べて2.4倍程度多く、より高精度な構造解析に資することが期待される。

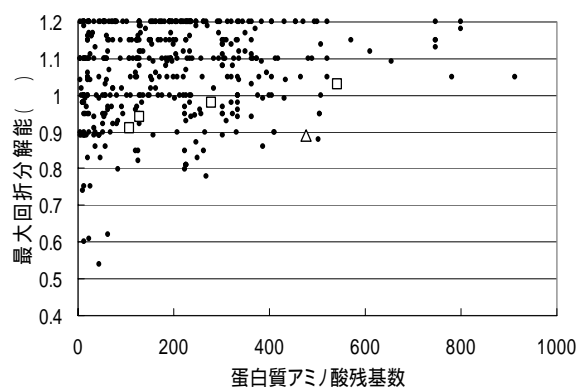
図2: A scatter plot showing the maximum resolution (最大回折分解能) on the y-axis (ranging from 0.4 to 1.2) versus the number of amino acid residues (蛋白質アミノ酸残基数) on the x-axis (ranging from 0 to 1000). The plot shows a general trend where larger proteins tend to have lower maximum resolutions. Data points are categorized by experiment type: solid circles for Earth experiments, open squares for space experiments, and open triangles for Amylase. The Amylase data points are notably clustered at higher resolutions (lower values) across various protein sizes.

酸残基数と結晶の回折分解能をプロットした。一般論として、タンパク質分子が大きくなりアミノ酸残基数が増えると、最大回折分解能は悪くなる(値は大きくなる)傾向がある。また図中では、これまでに宇宙実験を利用したことが明らかなデータを、また、後述のJAXA-GCFプロジェクトで得られたアミラーゼのデータをで示した。この図から分かるように、大雑把ではあるが、地上実験で生成した結晶の最も質的に優れたものと同等かあるいはそれ以上の結晶が、いくつかの宇宙実験で得られている。このことは、宇宙実験による高品質結晶生成のポテンシャルの高さを示すものである。

その他、これまでの実験結果から、宇宙環境を利用した蛋白質結晶生成実験では、(1)地上より大型の結晶が生成できる、(2)まれに地上とは異なる結晶形が得られる、ことが報告されており[8]、構造生物学や新規医薬品の分子設計に必要な蛋白質構造解析に資するものと期待されている。

このように、多くの実験実績がある一方、宇宙環境を利用した蛋白質結晶生成実

験で生成した結晶の質を、これまでに構造が解かれ、データが登録されているものと比較したものが図2である。ここでは、Protein Data Bank (PDB)[7]に登録されたデータのうち、1.2 を超える回折分解能を示したのもののみを抽出し、蛋白質のアミノ



・地上実験 □ 宇宙実験 △ アミラーゼ

org/pdb/index.html)に登録されたデータのうち、1.2 を超える分解能を示した結晶のみのデータをピックアップ(439件)し、蛋白質のアミノ酸残基数と分解能を でプロットした。また、そのうち宇宙実験による成果を で示した。尚、 は我々の宇宙実験技術検証蛋白質である -アミラーゼの結果である。

験に対する評価は、必ずしもポジティブなものばかりではない。

2000 年末に出された米国 NRC (National Research Council) の評価および勧告 [9] によると、

(1) 微小重力効果に関するこれまでの実験結果は決定的でない、

(2) 構造生物学に対する貢献は極めて限定されたものだった、とされている。しかし、

(3) 地上での蛋白質結晶生成技術は非常に進歩したが、高解像度まで回折する結晶を得ることの難しさは結晶構造解析の主たる障害要因として残っている、とし、NASA のプログラムはこの点を最大の対象とすべきである、とされている。

2001 年 12 月には、European Science Foundation が ESA (欧州宇宙機関) の蛋白質結晶化実験装置 (APCF) について勧告 [10] を出している。ここでは、これまでの APCF 実験は成果に乏しく、即利用を中止すべきであるとしているが、一方、将来の微小重力での蛋白質結晶成長は、以下の 3 分野に集中すべきであるとしている。

(1) 結晶成長の物理

(2) 高密度実験装置での多数の試料による結晶生成の統計的検討。例として Garcia-Ruiz による Counter-diffusion 法 [11]

(3) 中性子ならびに X 線回折による 3 次元構造解析

このように、欧米ではやや厳しい評価を受けている宇宙実験であるが、我々は宇宙環境の利用が、もし比較的容易に行えるならば、地上での結晶化実験に行き詰まったときの 1 つの選択肢として有効かつ大きな可能性を秘めていると考えており、従来の宇宙実験とは異なる枠組みのプロジェクトを実施している。

JAXA-GCF プロジェクトではこれまでに 2 回の宇宙実験を実施しており、NASDA (JAXA)-GCF#1 宇宙実験においては、地上での従来法 (主に蒸気拡散法) では結晶生成に至らない、または結晶は生成するが回折データ取得には至らない蛋白質試料のうち、約 2 割において回折データ取得に供することができる単結晶が生成した。NASDA-GCF#1 宇宙実験に搭載した、JAXA 技術開発試料である α -アミラーゼの宇宙生成結晶は、現時点で 0.89 μm を超える高分解能をしめしており、分子量 5 万程度の蛋白質結晶の回折データとしてはチャンピオンデータと言っても過言ではない。また、NASDA-GCF#2 宇宙実験においても、約 3 割において回折データ取得に供することができる単結晶が生成している。

3. 微小重力環境の結晶成長への効果

微小重力環境で生成する蛋白質結晶の品質が良くなるメカニズムについては、おおよそ図 3 の可能性がある [12]。

3.1. 密度差流の抑制

結晶に取り込まれるもの (蛋白質、不純物、微結晶、核、蛋白質分子のクラスター等) は、本来成長中の結晶周辺に濃度勾配 (拡散場) を形成し、結晶表面付近では低濃度であると考えられる [12, 13, 14]。しかし、重力のある環境では、密度差による対流 (密度差流) の発生

により、このような拡散場は乱され、結晶周辺の濃度が均一に近くなっている。一方、微小重力環境では密度差流が抑制されるため、この拡散場は維持され結晶表面の濃度は低くなり、ゆっくりとした結晶成長が実現し、不純物等の付着が減少し、ディスオーダーの少ない結晶格子の生成が期待できる。実際、光学観察可能なESAのAPCF[15]を用いることにより、微小重力環境で成長中の蛋白質結晶周辺に蛋白質濃度の拡散場が形成されることが観察されている[12]。

従って、微小重力環境を利用すれば、結晶のディスオーダーが増大しやすい溶液条件（高濃度蛋白質溶液、不純物の含有等）においても、成長中の結晶表面付近では相対的に蛋白質濃度が低下し、よりディスオーダーの少ない結晶成長に向けた溶液環境が実現すると考えられる。また、結晶表面での核形成の確率が下がり、結晶のクラスター化が起きにくくなり、また、不純物の結晶への取込が抑制されて結晶成長が停止せず、結晶の大型化が期待できると考えられる[12]。

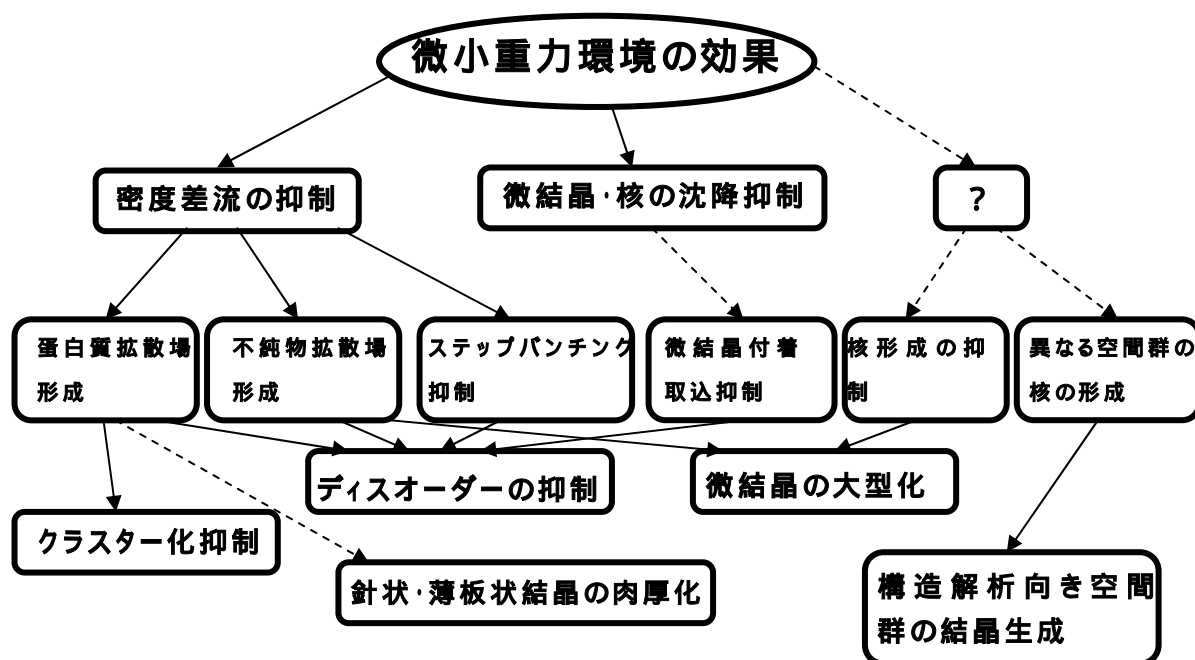


図3. 微小重力環境の結晶生成に対する効果（推測を含む）

3.2. 微結晶の沈降抑制

重力環境では、成長を続けた結晶はやがて試料溶液中で沈降する。この際、すでに生成している結晶の表面に別の結晶が落下し付着すると、その場でさらにお互いに成長を続け、その箇所ではディスオーダーを生じる原因となる。微小重力環境ではこのような沈降が抑制されるため、微結晶が他の結晶表面に付着する確率が大幅に減少し、ディスオーダーの少ない結晶を生成する。実際、地上での結晶生成過程を原子間力顕微鏡（AFM）で観察したところ、微結晶の沈降による結晶のディスオーダーが観察されている[12]。

3.3. その他の効果

宇宙実験においては地上とは異なる結晶形が得られることも報告されている[5]。NASDA-GCF#1 宇宙実験に搭載した、JAXA 技術開発試料である -アミラーゼの結晶も、地上と同一の結晶化条件であるにもかかわらず宇宙実験では空間群の異なる単結晶を取得している。この現象の理由は明らかではないが、結晶の核形成過程が何らかの重力影響を受けている可能性も考えられる。一般に、臨界寸法の核は重力の影響を受けるような大きさとは考えにくいことから、何らかの流体的な擾乱の抑制が関連しているかもしれない。いずれにせよ、地上実験でX線回折向きでない結晶形が得られている場合、宇宙実験を試みることにより新たな空間群の結晶が得られ、構造解析の突破口となる可能性もある。

また、宇宙実験においては核形成が抑制されていることも報告されている[5]。このことも、微小重力環境における結晶化実験ではの微結晶の大型化と関連があるかもしれない。

4. 蛋白質構造・機能解析のための高品質蛋白質結晶生成プロジェクト (JAXA-GCF プロジェクト)

4.1. プロジェクト概要

JAXA-GCF プロジェクトは、2003年2月から年2回3年間(計6回)の予定で始まった。プロジェクトを開始する前に、ESA のオデッセイミッション[16]にも参加し、予備実験を行っている(2002年9月)。本プロジェクトは従来の日本における宇宙実験とは異なり、定期的に打ち上げが行われているロシアのプログレス輸送船に試料を搭載して打ち上げ、ISS 内のロシアサービスモジュールに結晶化装置を設置して結晶を生成し、ソユーズ宇宙船にて帰還する。これにより継続的で安定な宇宙実験機会を提供できるようにするとともに、手続きや実験に掛かる準備等をできるだ

表 1 JAXA - GCF プロジェクトの宇宙実験概要

宇宙実験	オデッセイ(予備実験)	NASDA-GCF#1	NASDA-GCF#2	JAXA-GCF#3
打ち上げ	2002年9月25日	2003年2月2日	2003年8月29日	2004年1月29日 (予定)
打ち上げ 場所	バイコヌール宇宙基地(カザフスタン)			
打ち上げ 輸送船	プログレス補給船			
着陸	2002年12月7日	2003年5月4日	2003年10月28日	2004年4月29日 (予定)
着陸場所	アメリカ	カザフスタン		
回収 宇宙船	スペースシャトル	ソユーズ宇宙船		
実験期間	10週間	13週間	8週間	13週間(予定)
結晶化 装置	Granada Crystallization Box (GCB)			
蛋白質 結晶化 実験数	23 実験 (NASDA 蛋白質 2 種類)	46 実験 (蛋白質 36 種類)	69 実験 (蛋白質 53 種類)	69 実験(予定)

け簡便化した、今までよりも身近な宇宙実験を目指している。また、国際宇宙ステーション内での滞在期間は2~3ヶ月であるため、時間をかけて結晶成長を行うことができる。これまでに行われた JAXA-GCF プロジェクト宇宙実験の実施概要を表1に示す。

4.2. Granada Crystallization Box (GCB)

現在 JAXA が JAXA-GCF プロジェクトで宇宙実験結晶生成容器として用いているのは、ESA とスペイン/グラナダ大学の García- Ruiz ら[17]によって開発された Granada Crystallization Box (GCB) である(図4)[18]。この容器は、小型(3.3cm x 10cm x 0.7cm)・軽量で結晶化の際に特に複雑な操作のいらない passive な容器であり、宇宙実験装置としても適している。GCB は GCB 本体、ガイド、GCB ふた、の3つの部品からなる。ガイドにはキャピラリーを支える穴があいており、直径最大 1mm までの6本のキャピラリーを挿すことができる。



図 4 Granada Crystallization Box (GCB) 概観

- 1) GCB は GCB 本体、ガイド、GCB ふた、から成る。図はガイドにキャピラリー6本をセットしている。
- 2) ガイドに6本のキャピラリーを挿し、GCB にセットした様子。

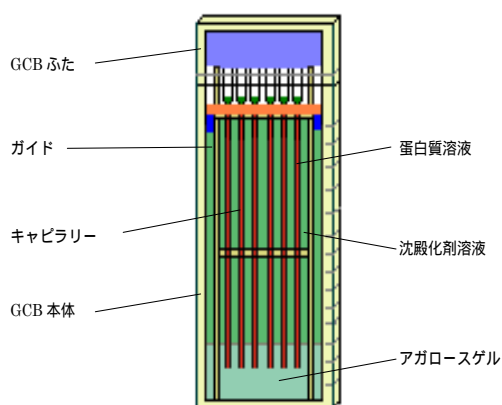


図 5 Granada Crystallization Box (GCB)に試料を充填した様子

GCB に試料を充填した様子を図5に示す。使用例としては、GCB 容器の底には高さ 12 ~ 16mm になるように 1% アガロースゲルを入れ、蛋白質試料溶液を高さ 60mm まで吸い入れたキャピラリー(内径 0.5mm、長さ 80mm)を、ガイドの穴を通してアガロースゲルに 6 ~ 10mm 突き刺す。その後、GCB 容器に沈殿化剤溶液を満たしてふたをし、漏れや蒸発を防ぐためにふたの周りをテフロンテープでシールする。宇宙実験の場合には内容液が漏れないようにさらに厳重なシールを施す。

この装置の特徴は、図6のように、沈殿化剤のキャピラリー内への拡散と蛋白質のキャピラリー外への拡散が同時に起き、経時的にキャピラリー内での両成分の濃度変化が起きる点である(カウンターディフュージョン法)。その結果、結晶化条件が整ったキャピラリー内の場所で結晶成長が始まると考えられる。また、もう一つの特徴は、この拡散が GCB 容器の底に入れたアガロースゲルを介する点である。そのため、GCB をセットしてから実際に結晶化が始まるまでにはある程度時間がかかる。通常、宇宙実験はセットしてから微小重力環境に到達するまでに時間が必要なので、この点でも当容器は宇宙実験装置として適している。

実際の宇宙実験では、Granada Crystallization Facility (GCF)と呼ばれる箱の中に自記式温度計と共に GCB23 個をキャピラリーが水平方向になるように搭載し(図 7)、ISS 内では20℃に設定されたインキュベータ内に静置して結晶化実験を行う。

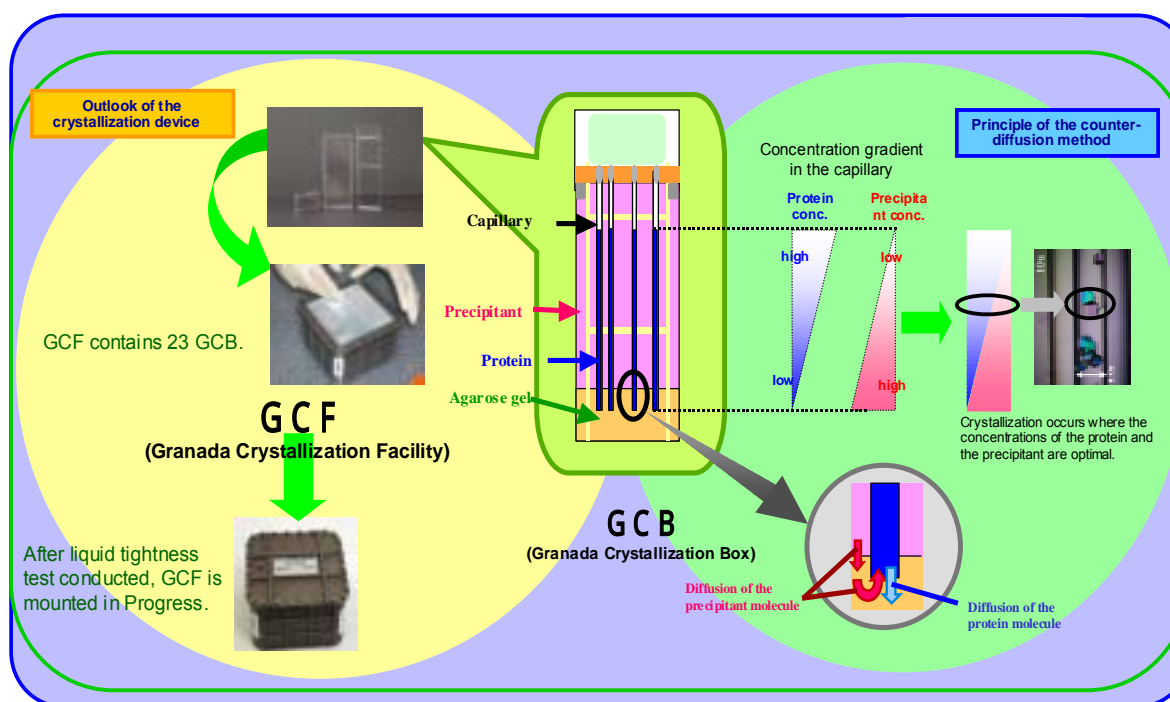


図6 キャピラリー内に生じる蛋白質溶液と沈殿化剤溶液の濃度勾配

蛋白質溶液と沈殿化剤溶液はアガロースゲルを介して互いに拡散しあい、その結果経時的に変化しながらキャピラリー内での両溶液の濃度勾配ができる。

4.3. JAXA-GCF プロジェクト第1回宇宙実験(NASDA-GCF#1)

NASDA-GCF#1 では、地上実験で良質な結晶が得られない試料、すなわち結晶が大きにならない、針状・薄板状になる、クラスター状になる、ディスオーダーが多い、などの問題がある試料を多数搭載した。これらの試料を宇宙および地上においてGCBを用いて結晶化した場合の結晶生成状況を表2に示す。GCB46個のうち9例に何らかの改善が見られた。また、単結晶が得られた14



図7 Granada Crystallization Facility (GCF)概観
GCFにはGCB23個と自記式温度計が搭載される。

種類の蛋白質のうちX線回折実験を行った 13 種類において、GCB を用いて地上で生成さ

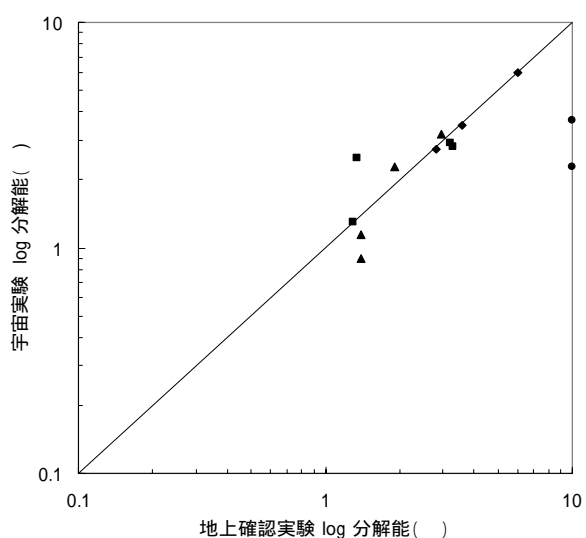


図 8 NASDA-GCF#1 宇宙実験における宇宙生成結晶と地上生成結晶の回折分解能の比較

NASDA-GCF#1 宇宙実験において単結晶が得られた 14 種類の蛋白質のうち X 線回折実験を行った 13 種類について宇宙生成結晶と地上生成結晶の最大回折分解能を比較した。は塩系沈殿化剤、は有機系沈殿化剤、およびは PEG を沈殿化剤として用いている。また、は地上実験では回折可能な結晶が生成していない。

せた結晶と宇宙生成結晶の最大分解能を比較したものが図 8 である。これによると、6 蛋白質において宇宙生成結晶の最大分解能が地上生成結晶に比べて勝っており、そのうち 2 蛋白質は地上実験では回折実験可能な結晶生成に至らないものであった。また、用いた沈殿化剤の種類(塩系・有機系・PEG 系)による違いを見ると、概して、PEG 系の沈殿化剤を用いた方が、宇宙実験における分解能の改善度が高かった。宇宙実験でのみ回折可能な結晶が得られた 2 蛋白質はいずれも PEG 系沈殿化剤を用いていた。PEG 系沈殿化剤が宇宙実験に適しているという理論的根拠もあるが、詳しい説明は本文では割愛する。

また、得られた単結晶の大きさを地上と宇宙生成結晶とで比較したところ、図 9 に示すように宇宙でのほうが大きな結晶が生成する傾向があった。

次章では、JAXA がモデル蛋白質として用いている α -アミラーゼについて、宇宙での結晶化実験で得られた結果を紹介す

る。

表 2 NASDA-GCF#1 での結晶生成状況

NASDA-GCF#1 では 46 実験が行われた。そのうち 29 実験は地上実験において単結晶を生成できない様々な問題点があったが、そのうち 9 実験では宇宙実験で何らかの結晶性の改善がみられている。

		宇宙生成結晶(GCB)			
		変化なし	オイル状・沈殿物	不完全だが結晶生成	単結晶生成
晶地上生成結(GCB)	変化なし	1	4	1	0
	オイル状・沈殿物	0	8	0	1
	不完全だが結晶生成	0	2	9	3
	単結晶生成	0	0	1	16

5. α アミラーゼを用いた微小重力環境での結晶化実験

5.1. α -アミラーゼについて

糖鎖消化酵素である *Aspergillus oryzae* 由来 α -アミラーゼ(アミノ酸 476 残基・分子

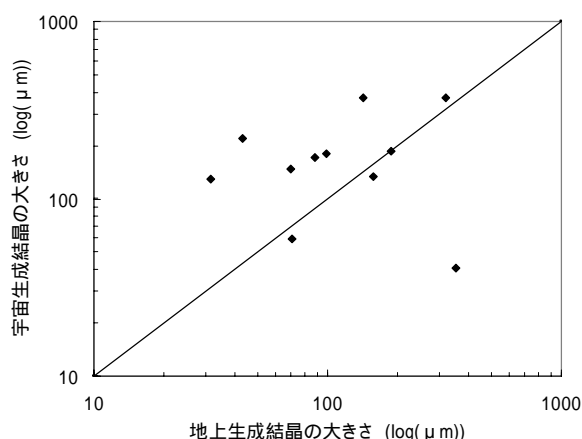


図9 宇宙生成結晶と地上生成結晶のサイズの比較

宇宙および地上生成結晶の大きさを対数で表して比較した。

5.2. 結晶化条件

市販の α -アミラーゼには、若干構造が異なるアイソザイムが含まれている。このため、本実験では、まず陰イオン交換と疎水性クロマトグラフィーを用いて α -アミラーゼ試料のアイソザイムを分離し、量的に最も多い、2つの画分をそれぞれ α -アミラーゼアイソザイム1と α -アミラーゼアイソザイム2として試料に用いることとした。

微小重力環境下では密度差流の抑制から、不純物枯渇帯が形成され、結晶への不純物の取り込み抑制効果が期待される。この効果が α -アミラーゼのアイソザイムに適用できるかは興味あるところである。そこで、これら1、2の2種類のアイソザイムを混合した溶液も蛋白質試料溶液(III)として用いた(表3)。

予備実験として、これまでの報告[22]を元に実験条件を検討し、表4に示す条件で、20において α -アミラーゼ結晶化実験を行った結果、3種の α -アミラーゼ試料から、ともにセットアップ5日目からクラスター化した結晶が多数得られた(図10)。

表3 α -アミラーゼ試料溶液の α -アミラーゼアイソザイム組成

市販の α -アミラーゼからイオン交換と疎水性クロマトグラフィーにより2種類のアイソザイムを分離し、試料I~IIIの三種類を調製した。

α -アミラーゼ	α -アミラーゼ アイソザイム No.1	α -アミラーゼ アイソザイム No.2
試料 I	90mg/ml	0
試料 II	0	90mg/ml
試料 III	45mg/ml	45mg/ml

表4 蒸気拡散法における α -アミラーゼ結晶化最適条件

Sitting drop 法による α -アミラーゼ結晶化最適条件を20において求めた。

蛋白質溶液	15~45mg/ml alpha-Amylase 15%(w/v) PEG8000 50mM AcOH-AcONa pH 6.0, 2mM NaCl	4 μ l
リザーバー溶液	17~22%(w/v) PEG8000 50mM AcOH-AcONa pH 6.0, 2mM NaCl	500 μ l

量約5万)は、分子量が比較的大きく、単結晶を得るには若干の努力と工夫が必要とされる等、実際の実験現場で扱われる蛋白質と似ており、また、精製標品が手に入りやすいことなどから、JAXAの技術検証用蛋白質として使用した。 α -アミラーゼの構造解析の試みは、1970年代から大阪大学蛋白質研究所でスタートしたが[19,20]、その後構造が精密化され、現在ではその構造がPDBに登録されている[21]。

本章ではオデッセイミッションおよびNASDA-GCF#1での α -アミラーゼ結晶化実験を例として、地上対照実験と比較しながら紹介する。

試料 III から生成した結晶を取り出し電気泳動を実施したところ、結晶化前の試料溶液の泳動像とほぼ同一であることがわかった。このことは、 α -アミラーゼのアイソザイムは結晶化する際に、それぞれの分子は互いに分離されることなく、結晶の中に取り込まれることを示唆している。

以上の結晶化実験は、一般的に使用されている蒸気拡散法を用いたものであるが、GCBではカウンターディフュージョン法で結晶化を行うため、結晶化実験条件の最適化が必要となる。そのため、まず上記の結果を元に、20 においてバッチ法で結晶化実験を行い、PEG8000 を沈殿化剤として用いた場合の α -アミラーゼの結晶化条件の検討を行った。結晶成長が見られた溶液濃度を図 11 に示す。

JAXA-GCF プロジェクトの場合、試料充填から ISS 到着までの時間に結晶化が始まるのは好ましくない。このため、充填後、軌道上に試料が到着してから結晶化が開始し、帰還前に結晶化が終了するような溶液条件の設定が必要である。

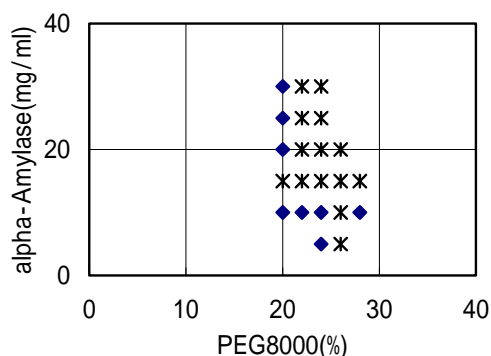


図 1 1 バッチ法による α -アミラーゼ結晶化最適条件の確定

* は結晶化が起きた蛋白質および沈殿化剤の溶液濃度条件、◆ は結晶化が起きなかった濃度条件を示す。

が整うことがわかった(図 12)。そこで、宇宙実験において、この条件を GCB 内での結晶化初期濃度として採用することとした(表 5)。

5.3. 結晶化実験

地上で行った結晶化実験では、実験開始後約 10 日にキャピラリー開口部付近において結晶成長が開始し、上記シミュレーション結果とよく一致した。また結晶はキャピラリーの奥の

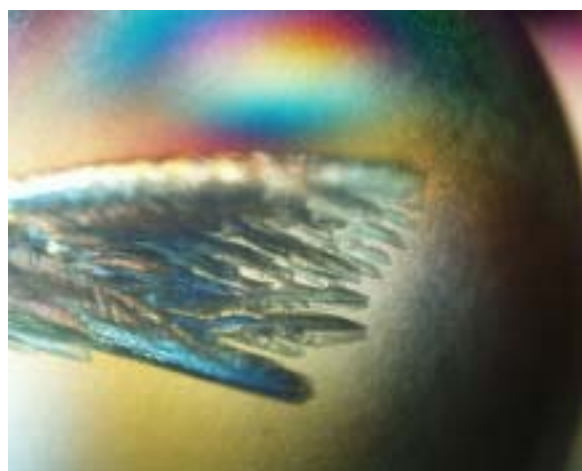


図 1 0 α -アミラーゼ結晶

Native-PAGE で 3 種類に分けた α -アミラーゼ試料をそれぞれ結晶化したところクラスター化した結晶が多数得られた。

そのような条件を見つけるために、簡単な 1 次元拡散モデルを作成し、キャピラリー中の蛋白質と沈殿化剤濃度の時間経過をシミュレーションにより推定した。この計算では、蛋白質ならびに沈殿化剤の拡散係数が必要なため、それらは薄層拡散対法により実測した。

この結果をバッチ法で得られた結晶化条件と組み合わせることにより、GCB 内のゲル層の高さは 15mm、キャピラリーのゲル層への刺し入れ深さは 6mm とし、キャピラリー内の α -アミラーゼ初期濃度を 90mg/ml とし GCB 内の PEG8000 初期濃度を 40% とすると、実験開始後、約 2 週間後にキャピラリー下端から約 4mm 付近で結晶化最適条件

方に向かって約 3 ヶ月にわたり成長し続けた。これは、PEG の拡散が非常にゆっくりであるためと考えられる。ただし、生成した結晶は、蒸気拡散法の場合と同じくクラスター化し、X 線回折に適した単結晶の取得は難しかった(図 13)。

オデッセイミッションでは、ISS で 10 週間にわたり結晶化実験を行った結果、GCB 内の 6 本のうち 1 本のキャピラリーでのみ結晶成長が見られ、また得られた結晶は地上実験で得られたものとは全く異なる結晶形の単結晶となった(図 14a)。オデッセイミッションでは実験環境の温度変動が大きく(14.7 ~ 22.5)、その影響を受けたのではないかと考えられる。

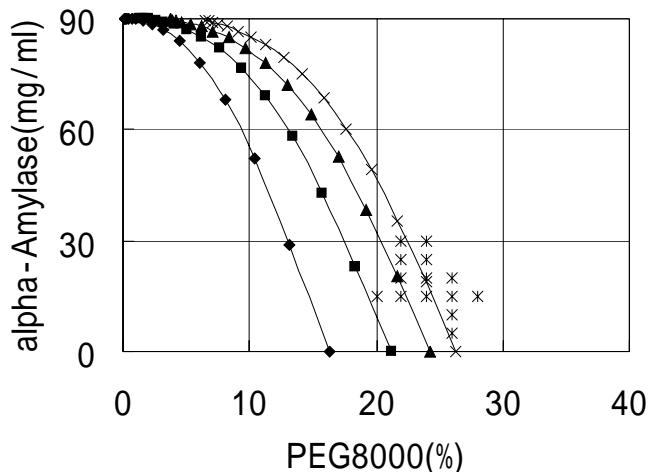


図 1.2 GCB キャピラリー内での α -アミラーゼ/PEG8000 濃度変化のシミュレーションとバッチ法による α -アミラーゼ/PEG8000 結晶化最適条件の相図

● : 1 週間後、■ : 2 週間後、▲ : 3 週間後、× : 4 週間後のキャピラリー内での各溶液の濃度を表す。各曲線の水平軸上の点がキャピラリー下端(ゲルに突き刺さった部分)で、キャピラリー内を 4mm 間隔でシミュレーションしている。

NASDA-GCF#1 では、13 週間にわたり ISS で結晶化を行った。GCB 内のキャピラリー 6 本すべてで結晶成長が見られ、クラスター化は

全くみられずきれいな単結晶が生成した(図 14b)。NASDA-GCF#1 での環境温度が安定していた(21.0 ~ 24.8)ことが結晶化に好影響を与えたと考えられる。

結晶の取り出しは、ガラスカッターで結晶周辺のキャピラリーに傷をつけてからキャピラリーを切断し、実体顕微鏡下でピンセットを用いてキャピラリーのガラス管を破断して結晶を取り出した。生成した結晶の保存溶液は、前出のシミュレーションから結晶取り出し時のキャピラリー内での PEG8000 濃度を推定した。

X 線回折実験のための凍結処理条件は、JAXA が作成している抗凍結剤データベースの情報[23]を元に決定した。すなわち、抗凍結剤としては最も汎用されているグリセロールを添加し、濃度は PEG8000 濃度約 30%の場合、グリセロール濃度は約 10%が適当[24]であると考え、凍結方法は最も広く行われている吹き付け凍結を行った。このような方法を用いて結晶の取り出しと凍結作業を行った結果、結晶の質を損なうことなく X 線回折実験を行うことができた。

表 5 GCB を用いての α -アミラーゼ結晶化条件

キャピラリー内での蛋白質溶液と沈殿化剤溶液の濃度変化のシミュレーションを行った結果得られた、宇宙実験での α -アミラーゼ結晶化最適条件を示す。

蛋白質溶液	90mg/ml α -Amylase in 50mM Tris-HCl pH 6.0, 5mM CaCl_2
沈殿化剤溶液	40%(w/v)PEG8000 in 50mM Tris-HCl pH 6.0, 5mM CaCl_2
ゲル層	15mm
キャピラリー刺入深さ	6mm

5.4. X線回折結果

オデッセイミッション、NASDA-GCF#1、および地上実験で得られた結晶のSPring-8でのX線回折結果を表6に示す。試料Iに関しては、地上生成結晶と宇宙生成結晶の空間群単位格子は同一のものと異なるものが得られた。また、

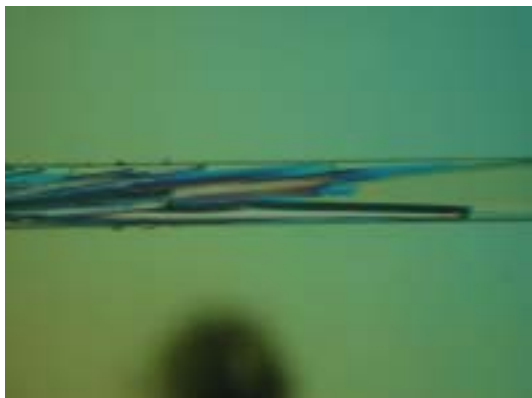


図13 地上で生成した α -アミラーゼ結晶
実験開始後約10日にキャピラリー開口部付近で結晶成長が始まり、クラスター化した結晶が生成した。

試料II、試料IIIに関しては、地上生成結晶とは異なる空間群の結晶が宇宙で生成した。さらに、オデッセイミッションで得られた試料IIの結晶は、NASDA-GCF#1で得られた結晶の空間群とは異なるものであった。

最も分解能の良い結晶は、NASDA-GCF#1において試料Iから生成した $P2_12_12_1$ の空間群を持つ単結晶で、分解能は0.89を超えた(X線検出器の限界を超えており、限界はまだわかっていない)。これは、すでに分子量5万程度の蛋白質結晶のX線回折データとしては、現在のところチャンピオンデータと言っても過言ではない(図2)。

現在、検出器の問題を改善しつつ、このデータの詳細をさらに解析中である。

試料I、IIとIIIを比較して得られる、微小重力環境下でのIDZ効果については、現在、生成結晶の組成と蛋白質試料の組成を比較検討中である。

今回得られた α -アミラーゼ結晶のX線回折データおよびSwiftらの報告[21]を比較したものが表7である。地上生成結晶と宇宙生成結晶を比べると、かなり反射データの質が改善していることがわかる。

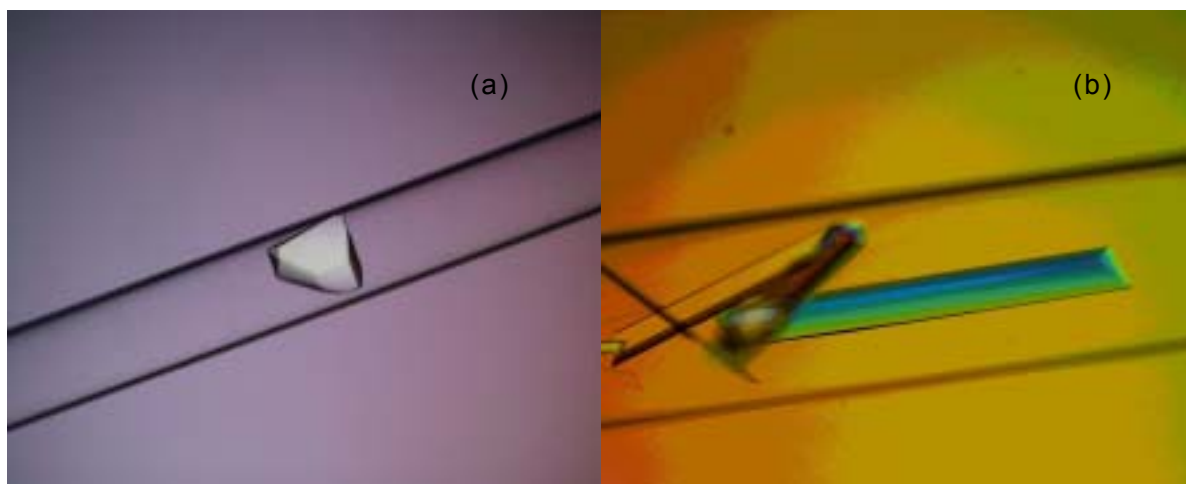


図14 宇宙で生成した α -アミラーゼ結晶

(a) オデッセイミッション 6本中試料IIのキャピラリー1本でのみ結晶生成が起こり、通常得られるものとは異なる結晶形の単結晶であった。温度の変動が大きかったことが原因とも考えられる。
(b) NASDA-GCF#1 試料IからIIIのすべてのキャピラリーで結晶生成が起こり、すべてクラスターのない単結晶であった。

表 6 - アミラーゼ結晶の X 線回折データ
 試料 I~III を用いて地上および宇宙で生成した結晶の X 線回折データを示す。

		Sample I	Sample II	Sample III
Ground-grown	Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
	Cell constant(Å)	a=50.78 b=67.71 c=130.06	a=50.42 b=67.27 c=129.59	a=50.37 b=67.3 c=129.5
	Max resolution (Å)	~1.2 Å	~1.6 Å	~1.4 Å
	Volume of the cell	447,187	439,542	439,033
Space-grown	Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
	Cell constant(Å)	a=50.43 b=67.34 c=130.4	a=66.09 b=102.89 c=75.5 β=104.1	a=132.68 b=50.28 c=147.67 β=116.68
	Max resolution (Å)	<0.89 Å	~1.6 Å	~1.6 Å
	Volume of the cell	442,807	497,907	879,060
	Mission	NASDA-GCF#1	NASDA-GCF#1	NASDA-GCF#1
	Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ or P2 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	
	Cell constant(Å)	a=50.33 b=132.27 c=132.95	a=b=67.4 c=268.0	
	Max resolution (Å)	~1.2 Å	~1.6 Å	
	Volume of the cell	885,068	-	
	Mission	NASDA-GCF#1	Odissea	

表 7 地上実験と宇宙実験の X 線回折データの比較
 Swift らのデータ、およびわれわれの地上実験・宇宙実験により生成した - アミラーゼ結晶の X 線回折データを比較した。宇宙生成結晶において顕著な改善が見られたものをシャドウで示した。

		6TAA (published)	Ground crystal (batch/seeding)	Space crystal (GCB) Tentative
X-ray source		conventional	BL12B2	BL12B2
Wavelength(Å)			1	0.7
Space Group		P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell Constants (Å)				
	a	51.04	50.78	50.43
	b	67.18	67.71	67.34
	c	133.56	130.06	130.4
Volume of the Cell		457,960	447,187	442,807
Resolution (for the statistics calculation)		2.1	1.4	1.4
Max Resolution		2.1	1.12	0.89 (under investigation)
No. of frames			180	180
Number of measured reflections		851,283	960,665
Averaged No. of reflections on each frames		(~1.4Å)	4,729	5,337
Number of independent reflections		82,435	85,217
Mosaicity			0.312(~1.4Å)	0.241(~0.9Å)
I/σ(I)		22.2(~1.4Å)	34.4(~0.9Å)
Rmerge(-1.12Å)		0.063	0.059
Rmerge(1.16-1.12Å)		0.188	0.146
Completeness % (-1.4Å)		94.5	96.6
Completeness % (1.5-1.4Å)		89.9	97.8
Completeness % (1.0-0.9Å)		~ 90

6. 今後の展望

これまでの宇宙実験は、実験機会が不定期で実現までの期間が長いものというのが一般的な認識であった。しかし当プロジェクト推進により、約半年に1回、多種類の蛋白質試料を同時に搭載することが可能になった。宇宙実験効果への認識が広まれば、利用者がさらに増え、宇宙実験がより身近になるであろう。

本稿には特には述べなかったが、JAXA-GCF プロジェクトにおける結晶化条件の最適化のために、ゲルチューブ法と呼ばれる簡易な結晶化予備実験を開発し[25]、前述のシミュレーションプログラムを組み合わせ、結晶化条件探索の迅速化を試みている。

これまでの経験から、宇宙実験を成功させるために重要な点を挙げると、次の5点になると考えている。

1. 蛋白質試料の純度
2. カウンターディフュージョン法による結晶化技術
3. 結晶化溶液の高粘度化による蛋白質・不純物枯渇帯効果の促進
4. 生成結晶の適切な凍結方法
5. 実験環境の温度コントロール

この中で3.については特に本稿では詳しくは述べていないが、成長中の結晶周辺に生成する蛋白質および不純物枯渇帯について数値的解析を行った結果、特に高粘度の結晶化溶液を使用した場合に、枯渇帯形成効果がより期待できることがわかった。すなわち、このような溶液を用いての宇宙実験では、より低過飽和度での結晶成長が実現し、また試料中に含まれる不純物の取込が抑制され、不純物含有量の少ない高品質の蛋白質結晶の成長が期待できる。これは、塩系・有機系と比べて粘度の高いPEG系沈殿化剤を使用した場合に、宇宙での結晶化実験の効果がより上がった理由と考えられる(4.3項参照)。

このように有効利用が望まれる宇宙環境ではあるが、宇宙環境をますます効率よく利用していただくために、われわれは次のような点に重点を置いて、利用者の方々の満足度の向上を目指している。

1. 多様な試料に対応できる技術の検討
2. 宇宙実験条件の最適化法検討(より積極的に)
3. 受け入れ試料の性状確認の検討
4. より安定した温度環境の実現
5. より多数の試料への効率的な対応
6. より確実な凍結技術の検討

これらの結果として、近い将来完成予定である、ISS内の日本の実験棟「きぼう」における宇宙環境の本格的応用利用に向けて、体制が整備されていくことを期待する。

本プロジェクトは宇宙航空研究開発機構(JAXA)が、蛋白質構造・機能解析に関する国のプロジェクトを推進する研究機関や大学およびゲノム創薬に取り組む民間企業、先導的応用化研究実施機関、およびESA・RSA(ロシア宇宙庁)・グラナダ大学からの協力を得て進められている。JAXAから委託を受けた(財)宇宙環境利用推進センター、およびその再委託先である(株)丸和栄養食品は、技術支援および射場作業支援等を行っている。

7. 参考文献

- 1) http://pcg.tecmasters.com/pcg_main.html
- 2) http://esa.int/mgdb/european_experiments/
- 3) http://133.242.8.15/db_data/summary/japanese/seika_gaiyou_index.html
- 4) 「ふわっと'92 宇宙実験成果報告」宇宙開発事業団(1994)
- 5) 「スペースシャトル及びミール利用宇宙実験結果報告会予稿集」宇宙開発事業団(1998)
- 6) <http://www.nisb.org/SBpapers.htm>
- 7) <http://www.rcsb.org/pdb/index.html>
- 8) 田仲、他、日本マイクログラフィティ応用学会誌 18, 233-237(2001)
- 9) <http://www.nap.edu/books/0309069750/html>
- 10) <http://www.esf.org/publication/126/APCF.pdf>
- 11) Garcia-Ruiz, J.M., Moreno, A.: *Acta Cryst.*, **D50**, 484-490(1994)
- 12) McPherson A., *Crystallization of Biological Macromolecules*, Cold Spring Harbor Lab. Press (1999)
- 13) Thomas, B.R., Chernov, A.A., Vekilov, P.G., Carter, D.C.: *J. Crystal Growth*, **211**, 149-156 (2000)
- 14) Lin, H., Petsev, D.N., Yau, S.-T., Thomas, B.R., Vekilov, P.G.: *Crystal Growth & Design*, **1(1)**, 73-79 (2001)
- 15) Bosch, R., Lautenschlager, P., Potthast, L., Staplemann, J.: *J. Cryst. Growth*, **122**, 310-316 (1992)
- 16) http://www.esa.int/export/esaMI/Odissea_Mission_ENGLISH/
- 17) <http://lec.ugr.es/>
- 18) <http://www.hamptonresearch.com/>
- 19) Matsuura, Y., Kusunoki, M., Date, W., Harada, S., Bando, S., Tanaka, N., Kakudo, M.: *J Biochem(Tokyo)*, Dec., **86(6)**, 1779-1783 (1979)
- 20) Matsuura, Y, Kusunoki, M., Harada, W., Tanaka, N., Iga, Y., Yasuoka, N., Toda, H., Narita, K., Kakudo, M.: *J Biochem(Tokyo)*, May, **87(5)**, 1555-1558 (1980)
- 21) Swift, H. J., Brady, L., Derewenda, Z. S., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Turkenburg, J. P., Wilkinson, A. J.: *Acta Cryst.*, **B47**, 535-544 (1991)
- 22) Ninomiya, K., Yamamoto, T., Oheda, T., Sato, K., Sazaki, G., Matsuura, Y.: *J. Cryst. Growth*, **222**, 311-316 (2001)
- 23) http://133.242.8.15/db_data/protein/200211J02474000.html
- 24) Takahashi, S., Yoshimine, T., Sato, M., Tanaka, H., Hamada, K., Yoshitomi, S.: International Symposium on Diffraction Structural Biology 2003, Symposium Booklet, P-088 (2003)
- 25) Tanaka, H., Inaka, K., Sugiyama, S., Takahashi, S., Sano, S., Sato, M. and Yoshitomi, S.: *J. Synchrotron Rad.*, **11**, 45-48(2004)