

微小重力環境を利用した高品質蛋白質結晶生成技術の進展と課題

(独)宇宙航空研究開発機構 宇宙環境利用センター 佐藤勝

(財)宇宙環境利用推進センター 田仲広明

1. はじめに

(独)宇宙航空研究開発機構(JAXA)では2003年からロシアの輸送手段と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)を実施している。このプロジェクトの背景や宇宙環境を利用したタンパク質結晶生成実験の現状については、昨年度の本稿で詳述したのでそちらを参照されたい^[1]。本年度はその後のプロジェクトの実施状況と、そこで得られた技術的知見を詳述したい。

2. JAXA 高品質蛋白質結晶生成プロジェクト (JAXA - GCF プロジェクト)

JAXA-GCFプロジェクト第2回目宇宙実験から第5回目宇宙実験までの実施概要を表1に示す。いずれもカザフスタンのバイコヌール宇宙基地から打上げられるプログレス補給船で試料を打上げ、国際宇宙ステーション(ISS)内に8~13週間静置して結晶化を行った後、ソユーズ宇宙船で帰還している。今のところ打上げ等の直前の遅延はなく、当初の予定通り実施されている。

プロジェクト開始当初と比較して、宇宙実験の回数を追うごとに高品質蛋白質結晶が得られる確率は上がってきている。これは本プロジェクトにおける様々な技術開発の成果であると思われる。以下にその例をいくつか述べる。

まず、温度環境の改善が挙げられる。

本プロジェクト開始当時は、ISS内の温度はほぼ20℃に設定されており温度環境の面では問題ないと考えていた。しかし、試料と一緒に搭載している温度データロガーの記録から、ISS内でも宇宙飛行士の活動などにより温度変化が観察されること、帰還時のソユーズ宇宙船内で温度上昇が認められることなどがわかり、帰還した結晶に溶けた形跡も一部観察された。そこで、ISS内ではインキュベータに試料を搭載すること、20℃付近に温度を安定させるアルカン(ヘプタデカン;融点が21℃であることを利用して温度上昇を抑制)を試料と一緒に搭載すること、真空断熱材を使用すること、また帰還時のソユーズ船内温度を低めに設定してもらうこと等の対策をとった結果、温度環境は安定してきた。

また、結晶化容器の改善も行った。

本プロジェクトでは当初からGranada Crystallization Box(GCB)を結晶化容器として使用してきた(文献[1]参照)。本容器は一般の構造生物学研究者には比較的なじみの薄いカウンターディフュージョン法を用いた容器である。そのセットアップの概要は以下のとおりである(文献[1]参照)。容器の底にゲル層をつくり、そこに蛋白質試料溶液を充填したキャピラリーを刺し込む。またゲル層の上には沈殿化剤溶液を重層する^[2]。この2つの溶液はゲル層を介して互いに逆向きにキャピラ

リー内に拡散する。従って時間がたつにつれて拡散が進むと、キャピラリー内での両溶液の濃度勾配が変化し、結晶化条件の整った位置で結晶成長が始まる。キャピラリーのゲル層への刺入は単純な方法であるが、刺入部のゲルにひびが入ったり緩んだりして、溶液の漏出が起きやすい。このためプロジェクト当初はキャピラリーからの液抜けがかなり観察された。キャピラリー上端のシールを強化することで対応したが十分ではなかった。しかし第3回宇宙実験より本プロジェクトで開発されたゲルチューブ法³⁾を利用し始め、この問題はほぼ解決された。ゲルチューブ法は拡散速度の面でも沈殿化剤溶液の希釈の面でも有利であるため、現在ではすべてこの方法を用いている。

また、結晶の取り出し法、および凍結操作法の開発も行い、データ収集まで行える確率の上昇につながっている(第4章参照)。

さらに、より多くの試料を搭載するために高密度結晶化容器の開発を行っている。

本プロジェクトでは宇宙実験のために GCB を Granada Crystallization Facility (GCF) というアルミニウム製の容器に収納している(文献[1]参照)。GCF には GCB が 23 個搭載でき、また1つの GCB には最大6本のキャピラリーが搭載できるため、最大で23種のタンパク質試料で138本のキャピラリーが1つの GCF に搭載できることになる。JAXA では将来的なコスト低減のため高密度結晶化容器の開発に取り組んできた。現在開発中の JAXA Crystallization Box (JCB) は、それぞれのキャピラリーごとに独立した沈殿化剤セルがあるため、1本1本のキャピラリーで異なる条件を用いて結晶化実験を行うことができる。1つの GCB に最大12本のキャピラリーが独立の条件で搭載可能であるため、1つの GCF に最大276種の蛋白質試料が搭載可能である(図1)。第4回宇宙実験から試験的に本容器を打上げているが、結晶化状況は良好である。

また、第3章、第4章で触れるが、本プロジェクトでは微小重力環境をより生かせる結晶化条件を探索しており、ポリエチレングリコール(PEG)を沈殿化剤として用いた場合、微小重力の効果を有効に利用することができ、より高品質な結晶が生成する機会が多いことがわかってきた。これは、PEG の高粘性により結晶周辺の拡散場形成の効果が有効に働くためと考えられる。塩系の沈殿化剤を用いる場合でも、PEG を沈殿化剤と共存させることにより、その効果が上がる事が確かめられた。第3回宇宙実験以降、利用者へも PEG の使用を推奨しており、高品質結晶生成の確率上昇につながっている。

これらの技術開発および改良の結果、第4回宇宙実験では全搭載蛋白質中約6割で単結晶が得られており、そのうちの約5割においてX線回折データ収集が行える質の改善が見られる結晶であった。これは2004年12月現在のデータであり、まだX線回折実験に供していない結晶もあることから、この割合はさらに増えるものと期待される。またこれらの割合は第1回、第2回宇宙実験と比較して向上している。宇宙実験と地上対照実験で得られた結晶の分解能の比較を図2に示す。使用した沈殿化剤の違いがわかるようにプロットしてある。PEG系沈殿化剤を使用すると宇宙生成結晶の分解能が改善傾向にあることが分る。また、地上実験では必ずクラスター状になっていた結晶が宇宙では非常にきれいな単結晶になる例がかなりあること、結晶の大型化、同じ分解能でもモ

ザイシティの改善, さらに地上で得られるものとは異なる空間群の結晶が得られることなどが観察されており, 微小重力は様々な形で結晶の高品質化に効果があると考えられる.

3. 微小重力の効果

JAXA は, アルファアミラーゼを本プロジェクトの技術開発蛋白質として搭載してきた. これまで地上で行ってきた実験では, PEG 8000 を沈殿化剤として用いてアルファアミラーゼを結晶化した場合, 結晶表面からの新たな核形成によりクラスター状結晶を生成しており, X 線回折実験には不向きであった(文献[1]参照). しかし第 1 回宇宙実験で得られた結晶はクラスター化が抑制された非常にきれいな単結晶であり(文献[1]参照), その最高分解能は 0.89 (SPring-8, BL12B2) を超えた(文献[1]参照). 得られた電子密度図を図 3 に示す. 地上対照実験で得られた結晶は 1.12 (SPring-8, BL12B2) 分解能であった. アルファアミラーゼはその後宇宙で再現性良く高品質結晶が得られている.

ところで, 成長中の結晶周辺には蛋白質や不純物の欠乏層(protein depletion zone: PDZ, impurity depletion zone: IDZ)の形成が期待されている. 微小重力環境のように溶液の対流や沈降が抑えられた状況では, 欠乏層が乱されることなく存在していると考えられる^{[4][5]}. 我々はアルファアミラーゼ宇宙生成結晶の分解能の改善は PDZ および IDZ の効果が要因の 1 つであろうと考え, 数値解析を行った結果, 粘性が高いとこれらの効果が有効に現れることがわかった^[6]. すなわち, 粘性の高い PEG 8000 を沈殿化剤として用いることによって微小重力環境をより効果的に利用することができたと考えられた.

そこで意図的に結晶化溶液の粘性を高め, 結晶の品質に及ぼす影響を調べた.

たとえばリゾチームは塩化ナトリウムを沈殿化剤として用いて結晶を生成することができるが, PEG 8000 では高濃度にしても結晶が生成しないこともわかっている. そこで第 3 回宇宙実験において PEG 8000 を添加した塩化ナトリウム溶液を沈殿化剤として用いてリゾチームの結晶化実験を行った. その結果, 地上対照実験の 1.08 (SPring-8, BL12B2)を上回り 0.88 (SPring-8, BL12B2) 分解能の結晶を生成した(図 4). 回折データを表 2 に示す.

このように微小重力環境において溶液の粘性を上げると, 結晶の高品質化を促すことが示された.

これらアルファアミラーゼとリゾチームの最高分解能のデータを 現在 Protein Data Bank (PDB) に登録してある分解能データと一緒にプロットしてみると, いずれも世界で登録されているデータの中でも高分解能に属することが分かった(図 5).

4. 高品質回折データ取得

前述のように JAXA-GCF プロジェクトでは回を追うごとに技術的に安定してきており, 現時点では事前の条件設定が十分であればかなりの確率で, 地上実験に比べ品質の良い, X 線回折実験可能な結晶を取得できるようになってきた. 例えば溶液の粘性を高めることで, 回折分解能の改善をかなり期待できるようになった. また結晶表面での 2 次核形成が激しく結晶がクラスター化するケ

ースでの単結晶化も同様である。

一方で、そもそも宇宙実験申し込み時点までの地上での結晶化条件検討が不十分で、その後宇宙実験実施中に利用者が継続して地上での条件検討を進めたことにより、結晶性が大幅に改善する例もいくつか経験した。断定的なことはいえないが、回折分解能が3 に満たないような結晶の場合、もとの蛋白質試料の改善や、結晶化条件を変えることで結晶の質が大幅に改善する可能性は高く、結果として迅速性の点で宇宙実験は苦しい面がある。他方、地上での条件検討で既に回折分解能が1.5~2 を切るようなケースでは、それ以上の改善は地上実験ではなかなか見込めないが、宇宙実験ではさらに回折分解能が改善する。アルファアミラーゼやリゾチームの技術開発蛋白質で示したように、1 を切るような超高分解能結晶を比較的簡単に生成できることは、地上の他の結晶化技術と比較し絶対的に優位な点である。我々の経験では宇宙実験で確実に高分解能の回折データを与える結晶を取得するのは以下の点が重要と考えている。

試料の純度

高品質な蛋白質結晶の生成には不純物の少ない試料が重要であることは多くの研究者が認識しているところである。しかし結晶化の場合にはとくに対象タンパク質分子の均一性が重要である。一般には SDS-PAGE 電気泳動でシングルバンドになることを指標にするが、それでは分子の均一性は必ずしも保障されない。フォールディングがおかしいとか、変性しているといった標的タンパク質分子も同一バンドを示してしまう。これら似て非なる分子が混在すると結晶の質には非常に悪影響を及ぼす印象がある。このため純度の検定方法としては、Native-PAGE 電気泳動を併用することを推奨している。それらは分子の表面荷電の違いを検出でき、それらの蛋白質分子を識別できる。

同様に DLS(動的光散乱)法で測定した蛋白質分子の粒径分布がシャープな単分散であることも重要である。変性した蛋白質分子が混在する場合、それらは多数凝集している可能性が高く、粒径分布はブロードになる。このように粒径分布がブロードである場合結晶はまず生成しない。

実際 SDS-PAGE 電気泳動ではシングルバンドだが、Native-PAGE 電気泳動ではバンドがブロードになるとか、DLS で単分散にならないといったケースは少なからずあるが、結晶が生成しないと生成しても回折分解能が上がらないことが多い。

試料の均一性を高めるには精製方法に注意が必要である。塩析をすとかエタノール沈殿をするといった蛋白質を変性させるような工程が精製過程になるべく含まれない方がよい。イオン交換カラム、疎水カラム、ゲルろ過等による緩和な溶液条件での精製方法が望ましい。高品質な結晶の生成を目指す場合、似て非なる分子が結晶に取り込まれないようにすることが重要である。このため発現量が少ない蛋白質の場合にはなかなか困難であるが、収量が犠牲になってもアミノ酸組成が若干異なるアイソザイムは極力除いた方がよい。

凍結保存した試料は一般に結晶化実験ではしばしば使用される。我々もプロジェクトの初期の頃には、凍結試料を現地で溶解して充填することも行っていた。しかし溶解後の試料は得てして沈殿等を生じやすく、変性した分子が多少なりとも生じてしまう印象があった。いずれにせよ軌道上で

は20 で長時間放置することになること、また日本から現地にわざわざ凍結輸送する必然性はあまりないことから、第3回目の宇宙実験以降、原則として凍結試料は取り扱わないこととした。

試料の安定性

一般に地上の結晶化実験では4 前後、10 前後、20 前後が結晶化温度として使われている。しかし当面利用できるロシアの打上げ機会を利用した宇宙実験の場合、結晶生成温度は20 であり、その状態で2~4 ヶ月維持される。蛋白質試料の中には、この温度では変性してしまうものもあるが、いまのところあきらめざるを得ない。ただしDTTの添加や脱酸素環境では安定になる場合もあり、検討する価値はある。

また我々の経験では、蒸気拡散法やバッチ法では蛋白質試料が安定に存在するが、カウンターディフュージョン法にするとキャピラリー内の試料が変性する例が時々見られている。この場合、前者では沈殿化剤を蛋白質試料と混ぜることが安定化に寄与していると考えられるため、予め事前に混ぜる処置を行うことで対応しており、概ね良好である。

沈殿化剤の種類

一般に蛋白質の結晶化実験では沈殿化剤としてPEG 類、塩類、有機溶媒類が単独、あるいは組み合わせて使用されている。(独)理化学研究所のハイスループットファクトリーでの結晶化実験約270例の結果では、全体の約50%がPEG 類、約25%がPEG と塩類あるいは有機溶媒類との組み合わせ、残りが塩類または有機溶媒類とのことである^[7]。

一方我々の経験ではゲルチューブ法の場合、PEG 類を含む沈殿化剤溶液の方が結晶生成の再現性が高い印象がある。これは主にPEG 類は溶液の粘性が高く、蛋白質の拡散を抑制するため、キャピラリーからの蛋白質分子の拡散、漏出を抑えられるからと考えている。

さらにまた、第3章でも述べたが、粘性の高い溶液の方が微小重力環境での結晶成長において、結晶周辺でのPDZの形成やIDZの形成を促進する。このことから、粘性の高いPEG 類を沈殿化剤に含むことが望ましい。

結晶の取り出しと凍結

ゲルチューブ法のようなキャピラリーを利用した結晶化法の場合、キャピラリーからの結晶の取り出しは細心の注意を要する技術である。特に、PEG 類のような拡散が遅い沈殿化剤を使用している場合、3 ヶ月程度ではキャピラリー中の沈殿化剤の濃度は平衡化しない。このため、取り出した結晶の周辺の濃度に合わせた沈殿化剤を含むハーベスト溶液を調製する必要がある。我々は1次元シミュレーションを用いて沈殿化剤濃度を予測する方法を開発した。これまで予測した濃度の溶液より若干高めの濃度のハーベスト溶液を用いたところ、概ね良好な結果を得られるようになっていく。

結晶を取り出す手技については、熟練する必要がある。キャピラリーを結晶のすぐそば、1~2mm

程度はなれたところで確実に折る必要がある。また経験的には不用意に結晶に触れると回折分解能の劣化につながりやすい。細心の注意でピペッティングにより結晶を動かすといった作業が必要である。これらを確実に実行するため、キャピラリーを固定する専用治具を開発し使用している。

高分解能回折データの取得では大型放射光の利用が必須である。その際にはX線による損傷を回避するため、結晶を凍結し低温でデータを取得する必要がある。結晶の凍結では、結晶周辺の水がガラス状に凍結しないと結晶が損傷する。このため従来から様々な方法が多くの研究者によって考案されてきた。

我々は過去4年分のActa Crystallographica Dの論文をもとに結晶凍結条件をデータベース化し、また標準的な実験技術を利用者に普及することを試みた。そのデータを分析したところ、抗凍結剤を含む溶液に数秒間結晶を浸漬して結晶周辺の溶液を置換し、液体窒素を気化させた低温ガスを吹き付ける方法がもっとも頻用される方法であることが明らかとなった。

これらの情報は、利用者説明会等により普及を図っている。しかし実際には、結晶の取り出しと凍結過程で結晶に損傷が加わっていると思われる事例が続発した。このため3回目の宇宙実験以降、利用者調整の上、結晶の取り出しと凍結に関する技術支援を行うようにしている。結果として、宇宙実験で生成した結晶による回折データの改善例が大幅に増加している。

それでもなお現時点でもこれらの技術はまだ未熟な印象がある。最終的には高分解能の回折データが取得できないと最終的な成果につながらないことを考えると、結晶化から凍結まですべての工程を考慮して結晶化溶液条件を最適化した方がよい(例えばPEG類は抗凍結作用もあるので、これを含む結晶化条件をなるべく探索する方がよい。またグリセリン類は抗凍結作用があるので、これらをはじめから結晶化溶液に含ませておくもよい)。さらにまた結晶の取り扱いを容易にするため、キャピラリーごと凍結するといった技術も最近では報告されており⁸⁾、具体的な検討を進めてみたい。

回折データの測定の問題

現在放射光施設に設置されている回折データの測定装置は、多くの場合分解能として1.2程度の分解能の回折データまでしか対応していない。良い分解能の回折像を与える結晶の場合、より高角度までX線を回折するが、そのためには検出器の受光面をより大きくするか、受光面を結晶に近づけなければならない。

現在頻用されるCCD方式の検出器は、受光面の大きさは電子デバイスの問題として限りがありまた空間分解能も有限であるため、結晶に受光面を近づけすぎると低角の反射点が分離できなくなる。さらにCCD検出器はダイナミックレンジがあまり大きくないため、高角側の弱い反射点を検出しようとする、低角側の強い反射点が飽和してしまう問題もある。

この問題は簡単には解決できないが、よりダイナミックレンジと空間分解能が高いイメージングプレートを利用した検出器を特に開発する等の努力が必要になってきている。物理的に1をきるような高分解能データが収集できるようにセッティングされているビームラインの整備が望ましい。

残留 G の問題

ISS の場合、宇宙飛行士の移動やコリオリ力による加速度が若干ではあるが存在し、概ね $10^{3-4}G$ 程度の重力が残留する。ESA では、GCB キャピラリー中の結晶成長をその場観察できる PROMISS と呼ばれる装置を用い、最近宇宙実験を実施しているが、その画像を見ると、キャピラリー中で結晶がかなり動き回っていることが分かっている。

移動の速さは、結晶周辺の蛋白質欠乏層での蛋白質分子の拡散移動速度よりは遅いため、欠乏層形成にはあまり影響は無いと考えられる。しかし結晶が移動して異なる沈殿化剤濃度の領域にさらされることは避けられず、品質にとって悪影響を与える可能性がある。この問題をグラナダ大の Garcia-Ruiz 教授と議論した際、彼のコメントとしては「PEG による粘性の高い溶液の効果として、この残留 G による結晶の移動を抑制する効果もあるのではないか」とのことであった。

彼らはこのため、より微小重力環境の良いロシアの回収カプセルであるフォトンを用いて 2006 年に宇宙実験を実施する計画を進めている。一方、結晶がキャピラリー中を浮遊することはあまり好ましくないと考えられることから、キャピラリーの壁面を表面処理し、そこから結晶が生成させるような技術を検討中である。

5. 高精度座標データの取得と利用

蛋白質の構造座標データは、その蛋白質が関わっている疾病の治療薬の開発に役立つといわれてきた。インフルエンザウイルスの増殖に必須の蛋白質であるノイラミダーゼの例では、その蛋白質の活性部位に結合し酵素活性を抑制する薬物であるリン酸オセルタミビル（商品名：タミフル（ロッシュ））やザナミビル水和物（リレンザ（グラクソ・スミスクライン））が開発され、インフルエンザの特効薬となっている。

同様に、様々な疾病の鍵となる蛋白質に選択的に作用する強力な阻害剤をつくれれば、その疾病の特効薬となりうる。蛋白質の構造データはその際に、結合部位の構造を明らかにし、そこに結合しうる化合物を設計もしくは探索する際に役に立つ可能性がある。このような情報に基づく合理的な医薬品分子設計を SBDD（Structure Based Drug Design）とか RDD（Rational Drug Design）という。

SBDD の代表的な方法としては、コンピュータの中で仮想的な蛋白質と化合物ライブラリにある低分子が結合可能かどうか検索する、*in silico* スクリーニングがある。しかしこれまでの *in silico* スクリーニングでは 2 弱の回折分解能の座標データで十分ともいわれていた。上述のように宇宙実験の最大の優位性は、比較的簡単に 1 を切る分解能の回折データを与える結晶を得られるところであるが、オーバースペックの可能性も指摘されていた。

しかしこのレベルのデータを使うと、原子 1 個 1 個に対応した電子密度図を得ることが可能となる。この結果、蛋白質分子の水素座標、配位水の座標が分かるようになる。特に回折分解能が 0.7 を切ると結合電子や d 電子の形まで分かるようになる。そこまでの分解能はなくとも活性部位周辺の水素結合、イオン結合や配位水との相互作用等、原子間相互作用が正確に解明可能となる。こ

の結果、例えばリガンドや基質が結合した蛋白質の構造を解析すれば、蛋白質と配位したリガンドや基質のアミノ酸残基との相互作用をリアルに表現可能となる。また蛋白質を構成する各原子の占有率や温度因子が正確に決定でき、マルチコンフォーマ（複数の構造の共存）も明らかになって蛋白質分子の動きが解明可能となる。

このような構造データは、蛋白質の反応機構の詳細な解析に興味のある研究者にとっては、貴重な情報である。またこのような理解に基づき、リガンド分子の改変を行うことで、研究者の有機化学的な知見を生かした分子設計が可能となるかもしれない。近年、SBDD で扱うのよりもずっと小さいフラグメントを蛋白質に結合させ、その際の構造や複数の異なる部位に結合するフラグメントを架橋して薬物分子を設計する、FBDD (Fragment Based Drug Design) という手法が普及し始めている^[9]。おそらくそれには、宇宙実験で得られるようなより高精度な構造データが非常に有効である。

宇宙実験の普及のためには、このようなレベルの構造解析の需要が盛り上がる必要がある。JAXA では国際宇宙ステーション応用利用大学拠点推進制度でサブオンゲストロームの構造解析の実例を示すことを目指している。より精密な構造データを用いてより合理的で効率の良いドラッグデザインを可能にできれば、宇宙実験の真の需要につながると考えている。

6. 定常的実験機会の実現

しかしながら国際的に見ると、宇宙環境における高品質蛋白質結晶の生成実験は決して高い評価を得ているわけではない。例えば、米国は 2004 年のブッシュ大統領の決定により、宇宙環境を利用した蛋白質の結晶化実験を中止すると言われている。それまで打上げられていたスペースシャトルの 2 回に 1 回は蛋白質の結晶化装置を搭載していたことを考えると極端な決定ではあるものの、これまでの宇宙実験結果は構造生物学に対する貢献があまり認められないという NSF (National Science Foundation) による評価を考えると致し方ないかもしれない^[10]。

欧州の研究グループは微小重力環境での結晶の高品質化のメカニズムの検討をこれまで実験的に検討してきた^[11]。また GCB による宇宙実験では、地上での多大な試行の後に得られる最高品質の結晶が、宇宙実験では比較的簡単に得られることからその潜在的な可能性については認識されているが、未だ試行錯誤中の印象である。

一方、我々は本稿で説明してきたように宇宙実験による高品質蛋白質結晶の生成にはかなり自信を深めている。しかし利用者が自らの研究にタイミングよく使える、信頼性の高い技術とするためには、単なる技術的有用性だけでは難しい。最も重要なことは定期便のように宇宙実験を実施できることである。すでに宇宙実験機会に期待している利用者もいるので、本プロジェクト終了後も、実験機会を確保し 7 回目以降も継続して宇宙実験を実施していくことが重要である。

JAXA の本来業務では JEM 向け実験技術の開発や利用者の確保を目指しており、必ずしも定常的な定期便を飛ばさず義務を負っていない。また、将来の JAXA 開発の輸送手段が現在のロシアのロケットと同じような、ほとんど遅延のない安定した輸送手段となる可能性も不透明である。蛋白質

結晶化宇宙実験の実施の観点からは、ロシアの輸送手段はあてになる。現時点で商業的に利用することも可能なので、民間ベースの枠組みを模索した方がよいのかもしれない。

謝辞

本プロジェクトの実施に当たり、欧州宇宙機関(ESA)、ロシア宇宙庁(FSA)、RSC エネルギア、米国航空宇宙局(NASA)に感謝いたします。大型放射光施設 SPring-8 BL12B2 の使用に当たり、財団法人高輝度光科学研究センター(JASRI)に感謝いたします。また、スペイングラナダ大学のガルシア ルイツ教授とその研究グループに感謝いたします。

本原稿をまとめるにあたり、(財)日本宇宙フォーラム高橋幸子氏に感謝いたします。

JAXA のプロジェクト推進グループとそれに関連する諸事業者((財)日本宇宙フォーラム、日揮(株)、(株)丸和栄養食品、ファルマ・アクセス(株)等)に感謝いたします。

参考文献

- [1] 高橋幸子, 田仲広明 :平成 15 年度 JSUP 宇宙環境利用の展望 ,38-52 ,2004
- [2] Garcia-Ruiz JM, Gonzalez-Ramirez LA, Gavira JA & Otorola F: *Acta Cryst.*, **D58**, 1638-1642,2002
- [3] Tanaka H, Inaka K, Sugiyama S, Takahashi S, Sano S, Sato M & Yoshitomi S: *J. Synchrotron Rad.*, **11**, 45-48, 2004
- [4] McPherson A: *Crystallization of Biological Macromolecules*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1999
- [5] Otorola F, Novella ML, Gavira JA, Thomas BR & Garcia-Ruiz JM: *Acta Cryst.*, **D57**, 412-417, 2001
- [6] Tanaka H, Inaka K, Sugiyama S, Takahashi S, Sano S, Sato M & Yoshitomi S: *Transport Phenomena in Microgravity, Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1027**, 10-19, 2004
- [7] 糸井麻希 理研シンポジウム構造生物学(X) ~ これからの構造生物学における新ツール ~ 講演要旨集 ,38 ,2005
- [8] Lopez-Jaramillo FJ, Garcia-Ruiz JM, Gavira JA & Otorola F: *J. Appl. Cryst.*, **34**, 365-370, 2001
- [9] Rees DC, Congreve M, Murray CW & Carr R.: *Nature Review*, **Vol. 3** (August): 660-672, 2004
- [10] <http://www.nap.edu/books/0309069750/html>
- [11] Vergara A, Lorber B, Zagari A & Giege R: *Acta Cryst.*, **D59**, 2-15, 2003



図1 .JAXA Crystallization Box (JCB)

Results of JAXA-GCF#1 #4

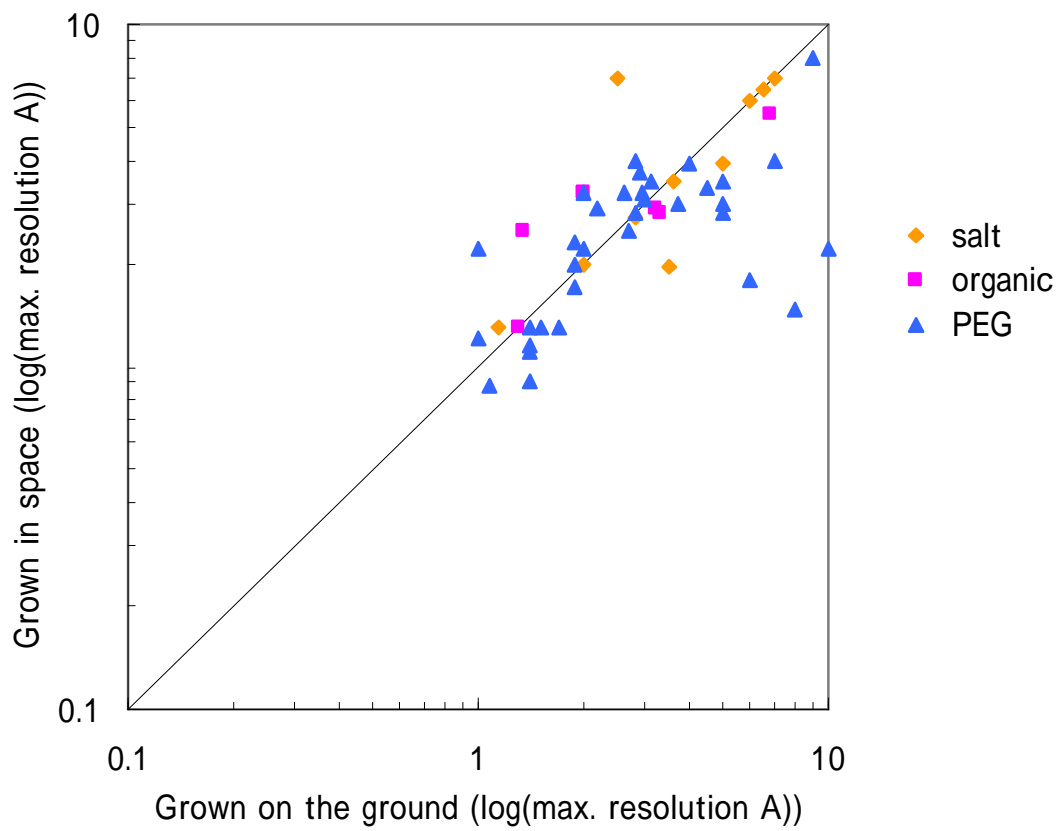
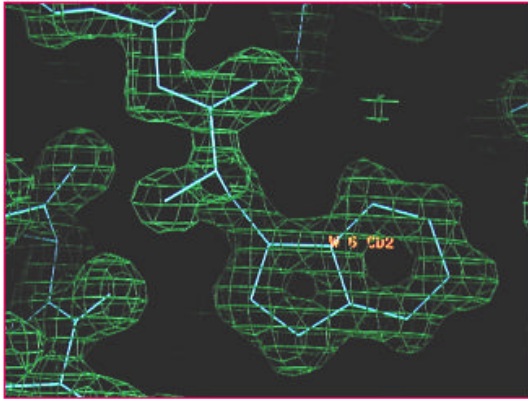
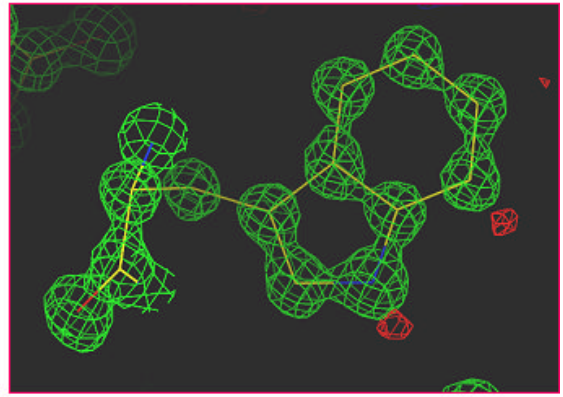


図2 .宇宙生成結晶と地上生成結晶の分解能の比較



Crystal grown on the ground



Crystal grown in space

図3. アルファアミラーゼ結晶の X 線回折データから得られた電子密度図

左 地上生成結晶 右 宇宙生成結晶

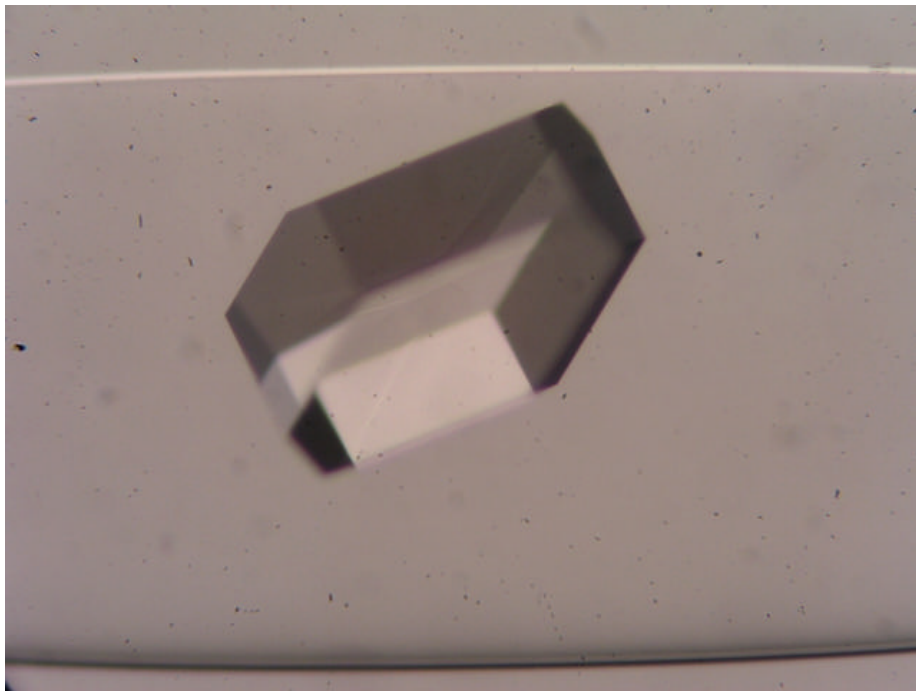


図4. 宇宙実験で生成したリチウム結晶 (カウンターディフュージョン法)

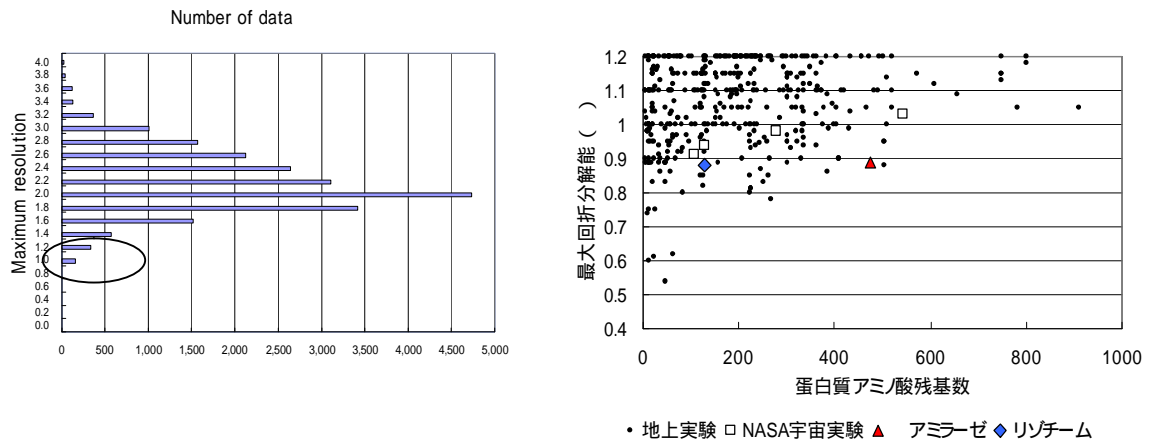


図5 .PDB から抽出した蛋白質アミノ酸残基数とX線最大回折分解能の分布 (2004.12.現在)

左図は PDB に登録されている最大回折分解能データを 0.2 Å ごとに区切り,分布を調べたものである.1.2 Å 以下のデータは 496 件あった. そのデータを横軸に蛋白質のアミノ酸残基数を取り縦軸に最大回折分解能をとってプロットしたものが右図である. また,公開されている NASA 宇宙実験の成果を JAXA-GCF プロジェクトで得られたアルファアミラーゼのデータを,リチウムのデータを で表した.

表1 .JAXA-GCF プロジェクト宇宙実験概要 (#2~ #5)

Mission	NASDA-GCF #2	JAXA-GCF #3	JAXA-GCF #4	JAXA-GCF #5
Launch	29/08/2003	29/01/2004	11/08/2004	28/02/2005
at	Baikonur (Kazakhstan)			
Vehicle	Progress			
Landing	28/10/2003	29/04/2004	24/10/2004	25/04/2005 (TBD) ⁶⁾
at	Kazakhstan			
Spacecraft	Soyuz			
Duration	9 weeks	13 weeks	9 weeks	8 weeks
Flight facility	GCF ¹⁾		GCF, JCF ⁴⁾	GCF
No. of GCB (No. of protein species)	69 GCB ²⁾ (53 protein)	50 GCB (41 protein)	37 GCB* (38 protein)	42 GCB (36 protein)
Installation location	CGBA ³⁾ (US module)	CGBA(US module)	TBU ⁵⁾ /Cryogem-3M (Russian Service Module)	TBU (Russian Service Module)

*28 GCB for Gel-Tube method and 9 GCB for JCB⁷⁾ method

1)GCF: Granada Crystallization Facility, 2)GCB: Granada Crystallization Box, 3)CGBA: Commercial Generic Bioprocessing Apparatus, 4)JCF: JAXA Crystallization Facility, 5)TBU: Thermo-electric Biological Universal, 6)TBD: to be determined
7)JCB: JAXA Crystallization Box,

表2 . リゾチーム X 線回折データ

Diffraction Data	Crystal	1iee* (in space) (Sauter et al.)	On the ground	In space
X-ray source		X11 / BW7B	SPring-8 BL12B2	
Space Group		P ₄ ₃ 2 ₁ 2	P ₄ ₃ 2 ₁ 2	P ₄ ₃ 2 ₁ 2
Cell constant(?)		a=b=77.06, c=37.22	a=b=77.3, c=37.9	a=b=78.0, c=37.7
Maximum resolution (?)		0.94-0.95	1.08	0.88
Mosaicity		0.47	0.584-0.628	0.242-0.303
Rmerge (overall)		5.2 (~0.94?)		6.9 (~0.88?)
			3.3 (~1.08?)	4.0 (~1.04?)
Rmerge (outer shell)		32.9(0.94-0.96?)		25.8(0.91-0.88?)
			16.8(1.12-1.08?)	6.6(1.11-1.04?)
Completeness (overall)(%)		98.9	92.3	89.9
Completeness (outer shell)(%)		88.6		81.4
			83.6	86.9
Flight facility		APCF	GCB	GCB

* Sauter C, Otolara F, Gavira JA, Vidal O, Giege R & Garcia-Ruiz JM: Acta Cryst., D57, 1119-1126, 2001
(1iee は ESA 宇宙実験を利用して生成した結晶から得られたデータ)