

ⅢⅢⅢ 特集：利用が広がる「きぼう」ⅢⅢⅢ  
(解説)

## 「きぼう」を利用した高品質タンパク質結晶生成実験の現状と 合理的な宇宙実験へのアプローチ

高橋 幸子<sup>1</sup>・巖 斌<sup>1</sup>・古林 直樹<sup>2</sup>・正木 美佳<sup>3</sup>  
太田 和敬<sup>3</sup>・伊中 浩治<sup>2</sup>・田仲 広明<sup>1</sup>・小林 智之<sup>3</sup>・吉村 善範<sup>3</sup>

### Present State of High Quality Protein Crystal Growth in “KIBO” and Approach to Rational Crystallization in Space

Sachiko TAKAHASHI<sup>1</sup>, Bin YAN<sup>1</sup>, Naoki FURUBAYASHI<sup>2</sup>, Mika MASAKI<sup>3</sup>,  
Kazunori OHTA<sup>3</sup>, Koji INAKA<sup>2</sup>, Hiroaki TANAKA<sup>1</sup>, Tomoyuki KOBAYASHI<sup>3</sup>  
and Yoshinori YOSHIMURA<sup>3</sup>

#### Abstract

The formation of a protein depletion zone (PDZ) and an impurity depletion zone (IDZ) around a growing crystal due to the suppression of a convection flow were thought to be the major effects of microgravity on higher quality protein crystal growth. We studied those effects numerically using a simplified model, and found out that the combination of the diffusion coefficient of the protein molecule ( $D$ ) and the kinetic coefficient for the protein molecule ( $\beta$ ) could be an index of the extent of these depletion zones. According to this analysis, we recommended to use high-viscous crystallization reagent to decrease  $D$  on purpose and further-purified protein sample to increase  $\beta$  for microgravity experiment. As a result, for some protein samples, this approach may have increased the microgravity effects and grew higher quality crystals. There are still some more details to be elucidated, but when our technology is more established and can be applied to more variety of protein samples, the crystallization in microgravity will be more useful method and will contribute to the X-ray structural analysis more practically. In this article, we explain current status of JAXA PCG, and introduce the rational approach to high-quality protein crystal growth experiment in microgravity based on numerical analyses.

#### 1. はじめに

タンパク質の X 線結晶構造解析に関する技術は、過去数十年間にわたって、タンパク質試料の調製から、結晶化条件の探索・最適化、結晶化方法、回折実験系や解析ソフトの開発・改良等に至るまで取り組まれ、目覚ましい進歩を遂げてきた。しかし、特に、良質なタンパク質結晶の生成は、X 線構造解析実験においてはボトルネックであると言われており、未だに発展途上の分野である<sup>1)</sup>。宇宙実験によるタンパク質の結晶化は、これを解決する一つの方法として 1980 年代から期待され、多数の宇宙実験が実施されてきた。本稿では、宇宙でのタンパク質

結晶化実験に関して、その原理、方法、有用性の現状や、今後の取組みについて解説する。

#### 2. これまでの宇宙実験

地上の実験室でのタンパク質結晶化の方法としては、バッチ法、キャピラリー溶液重層による液々拡散法、蒸気拡散 (VD) 法、透析法、オイルバッチ法、カウンターディフュージョン (CD) 法等、様々な方法が開発されてきた<sup>1)</sup>。基本的には、溶解しているタンパク質試料の溶解度を低下させる結晶化試薬を添加し、高過飽和度にする事で核形成を引き起こし、その後、結晶成長させるものであ

- 
- 1 (株) コンフォーカルサイエンス 〒101-0032 東京都千代田区岩本町 2-12-2 第 2 早川ビル 7F  
Confocal Science Inc., 7F 2nd Hayakawa Building, 2-12-2, Iwamoto-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0032, Japan
- 2 (株) 丸和栄養食品 〒639-1123 奈良県大和郡山市筒井町 170-1  
Maruwa Foods and Biosciences Inc., 170-1, Tsutsui-cho, Yamatokoriyama, Nara 639-1123, Japan
- 3 (独) 宇宙航空研究開発機構 宇宙環境利用センター 〒305-8505 茨城県つくば市千現 2-1-1  
Space Environment Utilization Center, Japan Aerospace Exploration Agency, 2-1-1, Sengen, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8505, Japan  
(E-mail: tanakah@confsci.co.jp)

る。この際、一般には、結晶の高品質化や大型化を目指して、タンパク質試料の濃度、結晶化試薬の組成や濃度の探索、およびこれら結晶化条件の最適化が検討されるが、さらに積極的に、過飽和度や結晶表面の流れの制御により、よりディスオーダーの少ない結晶を成長させる方法や装置も考案されている<sup>2)</sup>。

宇宙実験によるタンパク質結晶の生成は、密度差対流や生成結晶の沈降などが抑制されることにより、結晶化に関する問題の解消が期待され<sup>1)</sup>、約30年前から取り組まれている。Littkeら<sup>3)</sup>の先駆的な実験で、リゾチーム等の結晶の大型化や品質向上が認められたことから、NASAでは90年代に多くのタンパク質結晶化実験が宇宙で実施されたが、X線構造解析実験で有用な結晶の生成率は2~3割といわれ<sup>4)</sup>、現在では実施されていない。

一方、欧州宇宙機関(ESA)を中心に、宇宙でのタンパク質結晶成長に関する研究も進められた。Chayenらはその場観察により、VD法では成長中の結晶が微小重力環境でも移動することを発見したことから、一般に使用されるVD法は宇宙実験では利用すべきでないことを明らかにした<sup>5)</sup>。この結果、以後のESAの宇宙実験では液体の拡散を利用した、CD法が主に使われることとなった。

Otárolaら<sup>6)</sup>は、光干渉法を使って、微小重力環境で成長中のリゾチーム結晶の周辺では、密度差対流が抑制されて、タンパク質欠乏層(PDZ: Protein Depletion Zone)が形成されることを観察した<sup>6)</sup>。PDZの形成により成長中結晶の表面タンパク質濃度が低下すれば、成長速度は低下し、結晶に取り込まれた分子のディスオーダーは減少し、品質の向上が期待される。ちなみに、ここでいう「品質の向上」とは、例えばX線回折実験においては、回折分解能の向上、モザイシティの減少等である。

Thomasら<sup>7)</sup>は、リゾチーム結晶への不純物の取り込みが、微小重力環境で大幅に抑制されることを明らかにした<sup>7)</sup>。これは、結晶周辺に不純物欠乏層(IDZ: Impurity Depletion Zone)が形成されることによる。結晶に取り込まれる不純物が減少すれば結晶のディスオーダーは減少する。

**Table 1** High-quality Protein Crystal Growth Experiment of NASDA/JAXA

Mission	Term	Times
Odissea(ESA)	2002.9~2002.12	1
JAXA(NASDA)-GCF	2003.2~2006.4	6
JAXA-NGCF	2007.1~2008.4	3
JAXA PCG	2009.7~2013.4 (TBD)	6

また Vekilov らは、密度差対流と結晶の成長過程との相互作用により、結晶成長速度に揺らぎが生じることを見つけており、結果としてステップバンチングによるディスオーダーを引き起こすことを示唆している<sup>8)</sup>が、微小重力環境での密度差対流の抑制は、この問題も解決する。

一方 García-Ruiz らは、アガロースで結晶化溶液をゲル化することで疑似微小重力環境を実現し、宇宙実験で生成した結晶と品質の差がないことを報告した。また、密度差対流が抑制できる結晶化容器の特性長の見積についても触れている<sup>9)</sup>。

NASDA/JAXAでも宇宙環境の応用利用の一環として、タンパク質結晶生成に取り組んできたが、2003年に始まったNASDA-GCF宇宙実験以来(**Table 1**)、特にPDZ、IDZ形成を積極的に促進することにより、微小重力環境の効果を増強することで、有用結晶の生成率を大幅に向上させることを目指した。また、比較的単純な構造の容器、合理的な実験手順を確立し、実用的な試料量で、実際の先端構造解析でターゲットとされる試料を広く対象とし、実用X線構造解析に貢献することを目指した。また、十分な事前の実験条件最適化等により、確実に宇宙実験で結晶を生成し、確実に回折データが取得できるようなプロトコルを整備してきた。JAXA(NASDA)-GCF以降の継続的な実験機会の利用により、これらの技術は逐次改善され、現在では事前に最適化できた試料に関しては、8割以上の確率で有用結晶の生成が期待できるようになっている。

### 3. 微小重力環境での結晶成長

#### 3.1 タンパク質結晶成長環境と溶液流

地上環境での成長中の結晶周辺での、密度差対流の生成の有無については、一般に浮力と粘性力の比であるGrashof Number ( $Gr_N$ )で評価される。この指標が1以上で浮力優位となり、密度差対流が発生する<sup>9)</sup>。

$$Gr_N = \frac{\text{buoyancy forces}}{\text{viscous drag forces}} = L^3 \alpha \cdot \Delta c \cdot g \nu^{-2}$$

$L$ は特性長、 $\Delta c$ は濃度差(結晶表面のタンパク質濃度は結晶への取込みで低下するので周辺との間に濃度差が生じる)、 $\alpha$ は溶液の膨張率、 $\nu$ は動粘度である。実際にリゾチームの結晶化条件で、塩化ナトリウムを主たる結晶化試薬とするようなケースでは、 $Gr_N=1$ となるのは $L=0.2\text{mm}$ 程度である<sup>9)</sup>。また、我々の試算では、30%PEG 4000を主たる結晶化試薬とするケースでは、 $L=1.17\text{mm}$ 程度となる。すなわち、この特性長よりも溶液の厚みが薄くなれば、密度の低い領域が溶液中に生じて、対流は生じないと考えられる。

実際のX線回折実験向け結晶の場合、放射光による強力なX線源や検出計の改良により、数 $\mu\text{m}$ の微結晶でもデータ取得が可能なシステムも開発されてきてい

るが、一般に個々の原子の電子密度が明瞭に識別できるような分解能（約  $1.5\text{\AA}$  分解能より良い）の回折データを取得しようとする、やはり  $100\text{ }\mu\text{m}$  程度以上の大きさの結晶が望ましい。生成する結晶の大きさは、容器の大きさの制約を受けるため、このような大きさの成長を期待する場合、最低でも  $0.3\text{mm}$  立方、できれば  $0.5\text{mm}$  立方程度のスケールの溶液が必要である。

粘性が低い塩化ナトリウム等の結晶化試薬の場合、このスケールでは前述のように、密度差対流が発生する。一方、粘性が高い PEG 4000 のような結晶化試薬の場合、原理的には密度差対流は発生しないはずである。しかしながら、バッチ法以外の結晶化方法では、タンパク質の濃度差以外に、結晶化試薬の濃度上昇に由来する密度差が必然的に容器内で発生することや、容器を立方形にすることができない等、密度差流を抑止することは実現されていない。例えば CD 法のキャピラリーの場合、結晶化試薬の密度差による流れは、キャピラリーを縦にして、結晶化試薬をキャピラリー下部から拡散させれば抑制できるが、特性長はキャピラリーの長さほどになり、過大となる。一方、キャピラリーを横にすると、特性長を抑えることができるが、キャピラリー端から拡散させた結晶化試薬は、キャピラリー底面を這うように流れてしまい、良好な結晶化条件を実現できない。このため、X 線構造解析向け結晶化の場合、密度差流を抑止した結晶成長を地上で実現するのは今のところ困難であり、より簡単に実現できる宇宙実験が期待されることになる。

### 3.2 結晶成長と拡散場

微小重力環境では、密度差対流が抑制されることにより、成長中の結晶周辺に拡散場が形成され、PDZ や IDZ の形成が期待できる。これは、結晶を球と仮定した簡便なモデル系により理解することができる。PDZ の形成による効果は  $DFR$  (Driving Force Ratio) として、IDZ の形成による不純物取り込み抑制の効果は  $IR$  (Impurity Ratio) として、以下のような式で推測できる<sup>10)11)</sup>。

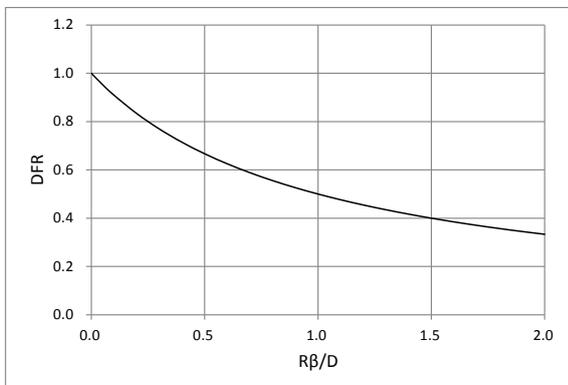


Fig. 1-1 Effect of the protein depletion zone around a crystal

$$DFR = \frac{DF_{0G}}{DF_{1G}} = \frac{1}{1 + \frac{R \cdot \beta}{D}} \quad (1)$$

$$IR = \frac{IUR_{0G}}{IUR_{1G}} = \frac{1 + \frac{R \cdot \beta}{D}}{1 + A \cdot \frac{R \cdot \beta}{D}} \quad (2)$$

ただし、 $A = \frac{\beta_i \cdot D}{\beta \cdot D_i}$

$R$ : 結晶半径

$D, D_i$ : タンパク質分子および不純物分子の拡散定数

$\beta, \beta_i$ : タンパク質分子および不純物分子の結晶成長のキネティック定数

$DF$ : Driving Force

$IUR$ : Impurity Uptake Ratio

ちなみに、 $A$  値を特定の不純物に対して求めることは容易ではないが、一般に 1 より大きい値であれば結晶品質に影響を与えるはずで、 $10 \sim 100$  程度の値である可能性が示唆されている<sup>12)</sup>。

(1)および(2)式をグラフに表すと Fig. 1-1 および Fig. 1-2 のようになる。両グラフから分かるように、欠乏層形成の効果は  $R\beta/D$  値が大きくなるほど大きい。すなわち、結晶の大きさ ( $R$ ) が大きくなるほど、また  $\beta$  が大きいほど、あるいは  $D$  が小さいほど、期待できる。また、両グラフの比較から、 $R\beta/D$  が増加するに従い、まずは IDZ の効果が期待できることが分かる。

### 3.3 濃度欠乏層の形成とその促進策

積極的に宇宙実験効果を促進するための第 1 の方策は、 $D$  を小さくすることである。 $D$  は溶液の粘性を上げれば小さくなるので、PEG 等の高粘度の試薬の利用が考えられる。しかし、もともと PEG 類を結晶化試薬として用いていた場合は良いが、そうでない場合に  $D$  を小さくするために、結晶化溶液を異なる成分に替えることは、一般的な結晶化の研究者はあまり想定しない。ISS 応用利用研究拠点の技術開発では、PEG の結晶化条件をより広

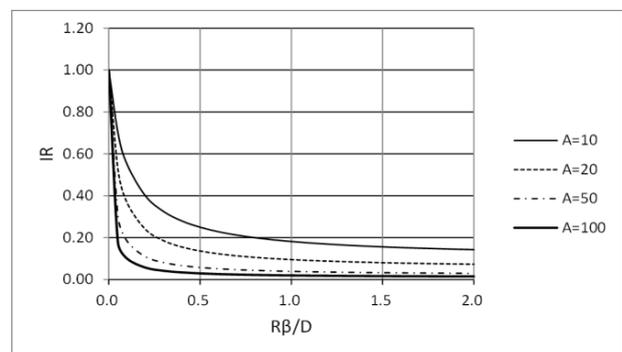


Fig. 1-2 Effect of the impurity depletion zone around a crystal

**Table 2**  $D\beta$  value depends on the sample purity and the viscosity of the precipitant

Sample purity	Precipitant	$\beta$ (mm/hr)	$D$ (mm <sup>2</sup> /hr)	$D\beta$ (mm)
High	Salt	0.34	0.36	1.06
Low	Salt	0.17	0.36	2.12
High	PEG 4000	0.41	0.094	0.23
Low	PEG 4000	0.14	0.094	0.67

**Table 3**  $D\beta$  value and the success rate of the space crystallization

$D\beta$ (mm)	<1.0	1.0~3.0	3.0~10.0	10.0<
$R\beta/D$	0.097<	0.035~0.097	0.006~0.035	<0.006
Av. of crystal radius(mm)	0.097	0.105	0.063	0.062
No. of sample	6	13	13	13
Successful result (%)	5 83.3	10 76.9	6 46.2	4 30.8

く適用するためには、溶液中の塩濃度を最適化することが重要であることを見つけた<sup>13)</sup>。実際、複数のタンパク質についてこの問題を検討したところ、タンパク質分子が持つ荷電量の密度と、結晶生成に必要な塩濃度の間には一定の関係が見いだされることが明らかになった。この結果、従来よりも様々なタンパク質試料に対して、PEG系結晶化試薬が適用可能となった。JAXAでは、タンパク質のアミノ酸組成から、この塩濃度を推定するプログラムを作成し、結晶化実験に供用している。

一方、 $\beta$ はタンパク質試料を精製し均一性を高めることで大きくすることができる。例えば、リゾチームをイオン交換クロマトグラフィーで精製し均一性を高めると、 $\beta$ が数倍大きくなることを、同じくISS応用利用研究拠点の技術開発で実測している(**Table 2**)<sup>14)</sup>。

実際、結晶化に供されるタンパク質試料をSDS/Native-PAGEならびに、分析用高分解能イオン交換クロマトグラフィーで分析すると、しばしば目的タンパク質と同じ分子量ながら、荷電の異なる分離可能な複数の成分が含まれ、そのうちのいくつかの成分では良好な結晶を生成しないことがある。おそらく、このような成分は単に結晶生成の確率や外形に影響を与えるだけでなく、結晶成長にも影響を与え、 $\beta$ 値を低めているのではないかと想像された。このため、4項に示すような例では、 $\beta$ を大きくするために、特にタンパク質試料の精製を実施したところ、良好な結果を得られることがわかった。そこでJAXA PCGでは、諸条件が整った試料に関しては、このような追加精製を適用している。

### 3.4 $D\beta$ 値と宇宙実験の有用性

我々は、タンパク質分子の拡散係数( $D$ )をラフに推定する近似式、ならびにタンパク質分子の結晶成長のカイネティック係数( $\beta$ )をラフに推定する実験方法を考案

し、 $D$ と $\beta$ 値を簡便に見積もることができるようになった<sup>14)</sup>。JAXA PCG#1~#3で得られた宇宙生成結晶の結果より、 $D\beta$ 値と宇宙実験での品質向上との相関を検討した。その結果、**Table 3**に示すように、 $D\beta$ が3mm以下で、75%以上の試料において宇宙実験の有用性が認められた。生成された結晶の大きさの平均値と $D$ 、 $\beta$ の値から $R\beta/D$ を計算すると0.035以上である。この結果と**Fig. 1-1**、**Fig. 1-2**を比較すると、宇宙実験の有用性の主たる理由は、IDZの効果であろうと考えられる。一方、中性子線回折実験向けの結晶のように、 $R$ が大きい(1辺が1mm程度以上)場合には、PDZとIDZ両方の効果が期待できることになる。

この結果、事前に $D$ と $\beta$ の値から宇宙実験の効果が期待できるかどうかを判断し、試料や結晶化条件を改善することで、宇宙実験の有用性を高める道筋はつけられたのではないかと考えている。

## 4. 宇宙実験の有用結晶生成例

これまでの宇宙実験で、地上では得難い良好な結晶が得られた例として、H-PGDS<sup>15)</sup>、L-PGDS<sup>16)</sup>、 $\alpha$ -amylase<sup>17)</sup>、lysozyme<sup>17)</sup>、H-Protein、Pfv、hMTH1、cellulase、glucose isomerase、RDV、NYHY、NusA<sup>18)</sup>、mistletoe lectin I<sup>19)</sup>が挙げられる。このうち、宇宙実験効果の促進策が有効であったいくつかの例を以下に示す。

### 4.1 $\alpha$ -amylase

$\alpha$ -amylaseは、Odyssey mission(**Table 1**)以来ほぼ毎回、JAXA技術開発タンパク質として宇宙実験に搭載してきた試料である。もともと、4℃で硫酸を用いた結晶化条件が一般的であったが、宇宙実験温度(20℃)では結晶化しないため、PEG 8000を用いた結晶化条件に変更した。この条件は、クラスター結晶になりやすく、単

**Table 4** X-ray diffraction resolution of  $\alpha$ -amylase crystals grown in space

Exp. ID	GCF #1	GCF #2	GCF #3	GCF #4	GCF #5	GCF #6	NGC F #1	NGC F #2	NGC F #3	PCG #1	PCG #2	PCG #3	PCG #4
Resolution (Å)	0.9	1.1	1.0	1.0	1.1	-*1	0.97	0.85	1.1	1.15	0.95	-*2	1.19
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$		$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$	$P2_12_12_1$		$P2_1$

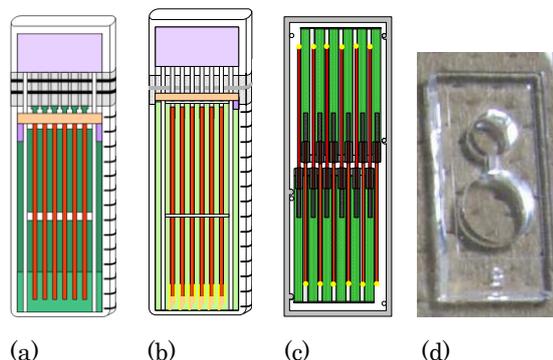
\*1: X-ray diffraction experiment was not performed.

\*2:  $\alpha$ -amylase was not launched to ISS.

結晶を得る確率が低い条件である。また、試料には荷電の異なる 3 成分が含まれることが HPLC 分析でわかったため、イオン交換クロマトグラフィーで分離し、試料の均一性向上を図った。各成分の結晶性を調べたところ、初めに溶出するピークを分取したフラクションが良好であった。地上実験ではやはりクラスター結晶ができやすく、回折分解能は  $1.12\text{\AA}$  であったが、宇宙実験では単結晶が多数生成し、回折分解能は最良のケースで  $0.85\text{\AA}$  となった。また、宇宙生成結晶はクラスター化が抑制されていた。これは結晶表面のタンパク質濃度が PDZ の効果で低下し、結晶表面での 2 次核形成を抑制するからと考えられる。 $\alpha$ -amylase の宇宙実験搭載実績を Table 4 に記すが、再現性は良く、概して毎回同様な結果であった。

## 4.2 lysozyme

lysozyme も JAXA 技術開発タンパク質として供用してきたタンパク質である。一般的には塩化ナトリウムを結晶化試薬に利用した条件が用いられるが、 $D\beta$  を低めるために、高粘度の結晶化試薬と高均一試料を適用するという考え方で、PEG 4000 を添加した結晶化条件を最適化し、またイオン交換クロマトグラフィーで試料の均一性を高めた。この結果、地上実験では回折分解能は  $1.08\text{\AA}$  であったが、宇宙実験では  $0.88\text{\AA}$  と改善した。



**Fig.2** (a) Gel-acupuncture method, (b) Gel-tube method in Granada crystallization box, (c) Gel-tube method in JAXA crystallization box, (d) Microchip for growing large crystal (©JAXA)

## 4.3 H-PGDS

大阪バイオサイエンス研究所裏出らの造血管型プロスタグランジン D 合成酵素 (H-PGDS) は、初期の JAXA 宇宙実験から搭載していたが、沈殿を生成し結晶生成に至っていなかった。この試料は地上実験ではクラスターになりやすく、単結晶を生成する確率は低かった。初めて宇宙で結晶化に成功したのは、NASDA-GCF#3 で、宇宙実験で  $1.3\text{\AA}$  程度の結晶を得た。

さらなる改善を目指し、宇宙実験向けの結晶化条件最適化を検討した。結晶化試薬はもともと PEG 6000 を用いており、 $D$  は低い。一方、HPLC での分析では荷電の異なる 3 成分が含まれることが分かったため、イオン交換クロマトグラフィーで分離し、試料の均一性向上を図った。各成分の結晶性は異なり、最初に溶出したフラクションの試料が良好であった。

この試料を用いて、様々な阻害剤を結合させた複合体を結晶化させたところ、阻害剤に応じて回折分解能は変わるが、最良のものでは  $1.1\text{\AA}$  の高品質結晶を生成した。これは、これまで報告されている H-PGDS タンパク質の結晶としては、最高レベルの分解能である (地上結晶は  $1.6\sim 2.2\text{\AA}$  程度)。また、地上実験とは異なりクラスター化が抑制されていた<sup>15)</sup>。H-PGDS の宇宙実験搭載実績は文献 20 を参照されたい。

## 4.4 L-PGDS

同じく大阪バイオサイエンス研究所裏出らのリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) は、これまで C65A 変異体を、塩類 (マロン酸ナトリウム) を結晶化試薬として結晶化してきたが、結晶生成確率は低く、宇宙実験での結晶生成は難しかった。唯一、JAXA-NGCF#2 で結晶生成したが、 $2.0\text{\AA}$  が最高分解能であった。

そこで、宇宙実験向け最適化を目指し、結晶化試薬を塩類から PEG 8000 に代えて  $D$  を低くし、試料の均一性を高めるために精製して  $\beta$  を高めて、宇宙実験を試みた。この結果、 $1.16\text{\AA}$  分解能の高品質結晶が得られた。併せて同様の考え方により、Wild Type の L-PGDS も結晶化に初めて成功し、 $1.06\text{\AA}$  分解能の回折データを得ることができた。地上結晶の分解能は  $1.3\text{\AA}$  であった<sup>16)</sup>。

## 5. 宇宙実験の実際

### 5.1 結晶化容器

2003年に開始した JAXA (NASDA) -GCF 以降、結晶化実験には CD 法を用いているが、結晶化容器は試行錯誤を重ね、その都度改良を行ってきた。

まず、2002年に ESA の Odyssea ミッションに参加して行った最初の結晶化実験以来、2004年の JAXA-GCF#3 までの計4回は、グラナダ大学 Garcia-Ruiz らが開発した Granada Crystallization Box (GCB) を用いて、ゲルアキュバンクチュア (GA) 法<sup>21)</sup>で結晶化を行った (Fig. 2a)。この方法は、GCB の底に作ったアガロースゲル層の上に結晶化溶液を重層し、アガロースゲルにタンパク質溶液の入ったキャピラリーを刺して結晶化を行うものである。この方法は、ゲルに刺し込んだキャピラリーが不安定な上に、ゲル層の体積分だけ結晶化溶液が薄まるという問題点があった。そこで、キャピラリーの先端にアガロースゲルの入ったシリコンチューブを装着する「ゲルチューブ (GT) 法」<sup>22)</sup>を開発した (Fig. 2b)。GT 法は、2004年の JAXA-GCF#4 で初めて適用され、現在まで計11回の宇宙実験で使われている。GT 法は GA 法と比べてセットアップが簡単で、結晶化溶液が薄まる問題も解決された。しかし、当初の GT 法は、キャピラリーを結晶化溶液の入った GCB に入れ、結晶化を行うものであったため、体積効率が悪く、また結晶化溶液が1つの GCB で1種類しか使えなかった。そのため、キャピラリー1本ずつを独立した結晶化溶液のセルに刺し込むように設計したシリンジケース及びその外側容器 JAXA Crystallization Box (JCB) (Fig. 2c)<sup>15)</sup>を開発し、2005年の JAXA-GCF#6 から計9回使用している。JCB を用いた GT 法は、多数の結晶化条件を試すことができるほか、体積効率が上がり、GCB 使用時と比べて2倍数のキャピラリーを搭載することが可能になった。また、JCB 各セルの容積を必要最小限にしたため、貴重な

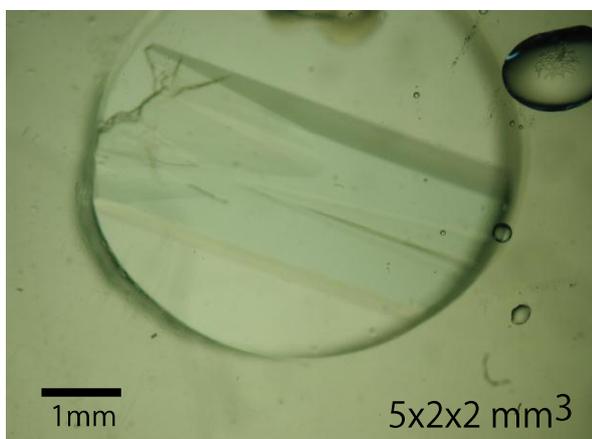


Fig. 3 Large crystal of alpha-amylase grown in space (©JAXA)

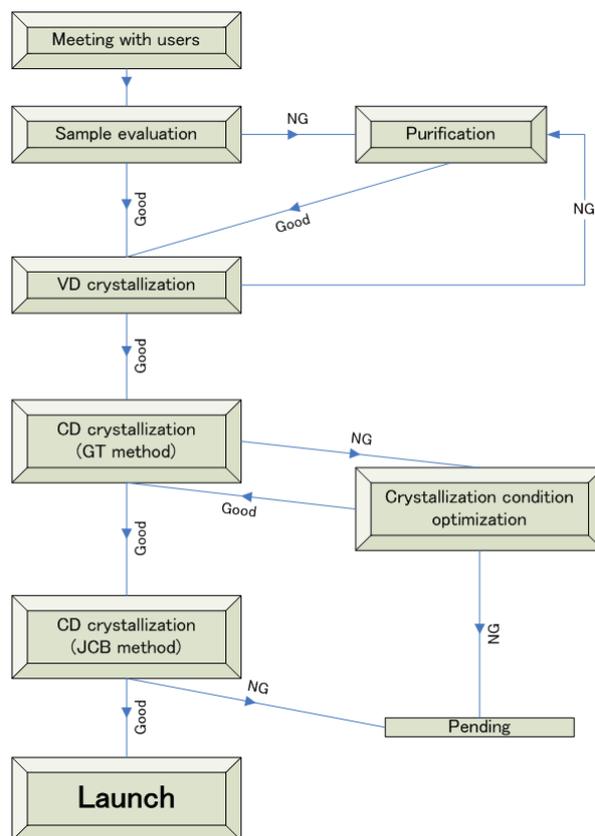


Fig. 4 Standard protocol for crystallization experiment in JAXA PCG

結晶化試薬を使う場合には利用しやすくなった。その他、2008年の JAXA-NGCF#3、2011年の JAXA PCG#4 では、大型結晶作成用容器 (Fig. 2d)<sup>23)</sup>を搭載して結晶化を試みている。JAXA-NGCF#3 では、lysozyme と  $\alpha$ -amylase (Fig. 3) の大型結晶が生成した。

### 5.2 標準搭載プロトコル

3項で説明したような技術開発成果を踏まえて、現在 JAXA PCG では、目標を結晶の高品質化に絞り、Fig. 4 のような標準搭載プロトコルで、宇宙実験向け結晶化条件の最適化を実施している。

試料の搭載にあたっては、まず、地上での結晶生成条件の最適化を重視し、CD 法での結晶生成が確認できているもののみ搭載することを原則とした。これは、地上での結晶生成に難がある場合、宇宙環境で結晶性が改善する合理的な理由がないこと、またこのような試料は性状に問題があることが多いためである。更に JAXA PCG では、JCB を用いた適合性試験をすべての試料で搭載前に実施することとし、結晶生成の確認ができたものを搭載することとした。

これまで、確実に結晶が生成すると期待された試料でも、結晶化条件検討の段階で結晶が生成しないケースはかなりの頻度で発生している。始めは、CD 法固有の間

Table 5 Usefulness of space experiment in JAXA PCG#1~#4

Flight	PCG #1			PCG #2			PCG #3			PCG #4		
Date	24/07/2009~11/10/2009			03/02/2010~02/06/2010			08/09/2010~26/11/2010			21/06/2011~16/09/2011		
Duration	11 weeks			17 weeks			11 weeks			12 weeks		
No. of protein	34			36			48			53		
Acceptance test	Good	NG		Good	NG		Good	NG		Good	NG	
	4 (12%)	30 (88%)		3 (8%)	33 (92%)		13 (27%)	35 (73%)		29 (55%)	24 (45%)	
Further purification	N/A	Applied	No	N/A	Applied	No	N/A	Applied	No	N/A	Applied	No
		23 (77%)	7 (23%)		20 (61%)	13 (39%)		8 (23%)	27 (77%)		5 (21%)	19 (79%)
No. of launched protein	4	14	7	3	12	10	8	4	20	18	4	9
Single crystal	4	8	4	1	10	4	5	2	9	13	3	4
No. of successful result	3 (75%)	6 (43%)	0 (0%)	1 (33%)	3 (25%)	0 (0%)	4 (57%)	1 (25%)	1 (5%)	8 (44%)	2 (50%)	0 (0%)
Success rate (%)	26.5			16.7			12.5			18.9		

題として、タンパク質ならびに結晶化試薬の拡散に伴う濃度の低下で、いわゆる相図上の結晶生成エリアをカバーできない（あるいは、カバーするまでに時間がかかる）問題に由来するのではないかと考え、高濃度の溶液の適用を試みたが、決定的な解決策にはならなかった。また、試料の結晶生成の再現性を利用者と同じ溶液で実施したところ、多くの試料で結晶化の再現性が取れないことを経験した。そこでこれら試料について、SDS-PAGE ならびに Native-PAGE 電気泳動で性状を確認したところ、約 8 割以上の試料で試料性状に何らかの問題があることが分かった。このため、試料性状によっては、更に精製過程を追加適用することとした。また、結晶化条件検討の過程で核形成が起こりにくい試料については、核形成促進策を適用することとした。

### 5.3 JAXA PCG 実験結果

プロトコルの適用状況とこれまでの実験結果概要 (JAXA PCG#1~#4) を Table 5 で整理した。

これらの結果から、以下の点が明らかとなった。

(1) 試料性状が良好であった試料、および良好でない場合でも追加の精製を適用し、かつ CD 法向けに最適化できた場合には、有用成果率は高い。(2) 試料性状が良好でなく、追加精製を適用しなかった場合、事前に結晶生成は認められても、有用成果は低い。

このため、宇宙実験の有用性を高めるためには、如何

に試料の品質を向上させるかが重要であることが分かった。

## 6. 残された課題

以上のように JAXA PCG では、宇宙実験での X 線回折実験向け高品質結晶を生成することを目標とし、積極的に PDZ/IDZ 形成を促進することで、宇宙環境でより良好な結晶が生成し、実用構造解析に貢献できる、としたスキームで技術開発を進めてきた。しかし、このスキームの中には実験事実が未だ不十分で、検討すべき点が多々残されている。

例えば、以下のような点は今後の課題である。

一点目は、IDZ の効果についてである。一般に試料の純度が高まると  $\beta$  が大きくなり、宇宙実験効果は促進される。塚本ら<sup>24)</sup> は、Foton を利用した宇宙実験で生成したリゾチーム結晶の成長過程を、帰還後、光学的に結晶を解析して検討したところ、 $\beta$  が大きくなっており、併せて結晶に取り込まれた試料の純度が高くなっていることを見出している。すなわち、実際の宇宙実験での結晶成長過程では、結晶表面の不純物濃度の減少に伴い  $\beta$  が上昇し、さらに不純物の取り込みが減少するという、自己促進的なプロセスが起きているようである。したがって、3 項でモデル化したような結晶成長過程は、この点を考慮して再検討する必要がある。併せて 3 項のモデ

ルは定常状態のモデルであるが、実際の結晶化は非定常過程であるので、それを考慮したモデルにする必要がある。さらに、 $\beta$  と不純物量との関係について定量的な検討を行う必要がある。この結果、宇宙実験の効果を引き出すために必要な、元の試料の許容不純物濃度の存在等が明らかになるかもしれない。

二点目は、結晶成長時の過飽和度や取り込み不純物量と、結晶の品質についての相関である。この問題については、多くの研究者がすでに取り組んでいるが、宇宙実験で実現されるような、低過飽和度、低不純物環境での生成結晶についての解析は是非進める必要がある。

三点目は、García-Ruiz らが提唱する、アガロースで高粘度化した結晶化溶液による疑似微小重力環境と宇宙環境との優劣である。われわれは、いくつかのタンパク質についてアガロース添加での結晶化を試みたが、結晶生成状況が大きく変化するケースがかなりあることを経験している。さらに、アガロースの添加は一種の不純物であることから、 $\beta$  を低下させ、PDZ/IDZ 形成を抑制するのではないかと予想しているが、まだ実験的には十分検討していない。もしこの点を実験的に確かめられれば、宇宙実験は現時点では、タンパク質結晶成長環境として最良のものであることを実証できると考えている。

四点目は、微小重力効果の予測精度を高める更なる工夫は必要である。また、PEG 系試薬では結晶生成が困難な試料も依然として存在するため、宇宙実験の汎用性を高めるためにも、このような試料に対する最適な方法の考案も必要である。

その他、これまで宇宙から帰還時の温度維持方法については問題があり、一過的な温度上昇に伴う結晶品質の劣化が一部試料で認められていたが、JAXA PCG#5 実験 (2012 年 1 月打上げ, 4 月回収) 以降では、輸送容器の改善により温度上昇を抑えることができるようになったため、今後はより良好な結晶が得られることが期待される。

## 7. まとめ

NASDA-GCF から始まった JAXA PCG では、従来の NASA/ESA 等の宇宙実験とは異なり、微小重力の効果を積極的に高めるような結晶化条件を、数値解析に基づいて検討し、高品質結晶の生成を目指してきた。様々な課題はあるものの、これらの技術が確立し、適用可能対象の試料広がることにより、宇宙実験は、間違いなく実用 X 線構造解析に実質的に貢献すると見込まれる。

## 謝辞

「国際宇宙ステーション応用利用研究拠点推進制度」のタンパク質結晶生成分野の研究拠点での研究においてお世話になりました、大阪大学中川敦史教授、兵庫県立

大学樋口芳樹教授、横浜市立大学朴三用教授に感謝いたします。プロスタグランジン合成酵素の結晶化実験を長年にわたり宇宙環境で行ってこられた、大阪バイオサイエンス研究所裏出良博部長に感謝いたします。NASDA-GCF 宇宙実験以来の宇宙実験ユーザの皆様感謝いたします。カウンターディフュージョン法を用いた結晶化実験への有用なアドバイスをいただいた、スペイン/グラナダ大学の J.M. García-Ruiz 教授とその研究グループのメンバーに感謝いたします。宇宙実験のために打上げ/回収手段を提供いただいたロシア連邦宇宙局と RSC エネルギア社に感謝いたします。また、SPRING-8 大型放射光施設の使用にあたり (財) 高輝度光科学研究センター (JASRI) に感謝いたします。

## 参考文献

- 1) A. McPherson: Crystallization of Biological Macromolecules, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1999.
- 2) H. Adachi, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, Y. Mori and T. Sasaki: J Synchrotron Rad., **11** (2004) 121.
- 3) W. Littke and C. John: J. Cryst. Growth, **76** (1986) 663.
- 4) <http://www.nap.edu/books/0309069750/html>
- 5) N. E. Chayen and J. R. Helliwell: Nature, **398** (1999) 20.
- 6) F. Otálora, M. L. Novella, J. A. Gavira, B. R. Thomas and J. M. García-Ruiz: Acta Cryst., **D57** (2001) 412.
- 7) B. R. Thomas, A. A. Chernov, P. G. Vekilov and D. C. Carter: J. Cryst. Growth, **211** (2000) 149.
- 8) P. G. Vekilov, H. Lin and F. Rosenberger: Phys. Rev., **E55** (1997) 3202.
- 9) J. M. García-Ruiz, M. L. Novella, R. Moreno and J. A. Gavira: J. Cryst. Growth, **232** (2001) 165.
- 10) H. Tanaka, K. Inaka, S. Sugiyama, S. Takahashi, S. Sano, M. Sato and S. Yoshitomi: Ann. N.Y. Acad. Sci., **1027** (2004) 10.
- 11) K. Inaka, H. Tanaka, S. Takahashi, S. Sano, M. Sato, M. Shirakawa and Y. Yoshimura: Defect and Diffusion Forum, **323-325** (2012) 565.
- 12) B. R. Thomas and A. A. Chernov: J. Cryst. Growth, **232** (2001) 237.
- 13) M. Yamanaka, K. Inaka, N. Furubayashi, M. Matsushima, S. Takahashi, H. Tanaka, S. Sano, M. Sato, T. Kobayashi and T. Tanaka: J. Synchrotron Rad., **18** (2011) 84.
- 14) H. Tanaka, K. Inaka, N. Furubayashi, M. Yamanaka, S. Takahashi, S. Sano, M. Sato, M. Shirakawa and Y. Yoshimura: Defect and Diffusion Forum, **323-325** (2012) 549.
- 15) S. Takahashi, T. Tsurumura, K. Aritake, N. Furubayashi, M. Sato, M. Yamanaka, E. Hirota, S. Sano, T. Kobayashi, T. Tanaka, K. Inaka, H. Tanaka and Y. Urade: Acta Cryst., **F66** (2010) 846.
- 16) K. Inaka, S. Takahashi, K. Aritake, T. Tsurumura, N. Furubayashi, B. Yan, E. Hirota, S. Sano, M. Sato, T. Kobayashi, Y. Yoshimura, H. Tanaka and Y. Urade: Cryst. Growth Des., **11** (2011) 2107.
- 17) 高橋幸子, 佐野智, 佐藤勝, 広田恵理華, 古林直樹, 巖城, 小林智之, 伊中浩治, 田仲広明, 田中哲夫: 日本マイクログラフィティ応用学会誌, **27(2)** (2010) 98.
- 18) H. Tanaka, T. Umehara, K. Inaka, S. Takahashi, R. Shibata, Y. Bessho, M. Sato, S. Sugiyama, E. Fusatomi, T. Terada, M. Shirouzu, S. Sano, M. Motohara, T. Kobayashi, T. Tanaka, A. Tanaka and S. Yokoyama: Acta Cryst., **F63** (2007) 69.

- 19) A. Meyer, W. Rypniewski, M. Szymanski, W. Voelter, J. Barciszewski and C. Betzel: *Biochim. Biophys. Acta*, **1784** (2008) 1590.
- 20) H. Tanaka, T. Tsurumura, K. Aritake, N. Furubayashi, S. Takahashi, M. Yamanaka, E. Hirota, S. Sano, M. Sato, T. Kobayashi, T. Tanaka, K. Inaka and Y. Urade: *J. Synchrotron Rad.*, **18** (2011) 88.
- 21) J. M. García-Ruiz and A. Moreno: *Acta Cryst.*, **D50** (1994) 484.
- 22) H. Tanaka, K. Inaka, S. Sugiyama, S. Takahashi, S. Sano, M. Sato and S. Yoshitomi: *J. Synchrotron Rad.*, **11** (2004) 45.
- 23) 田仲広明, 伊中浩治, 佐藤勝, 高橋幸子, 古林直樹, 佐野智, 小林智之, 田中哲夫: 日本結晶学会年会講演要旨集, p. 89, 2009.
- 24) 塚本勝男, 佐崎元, 小島謙一, 橘勝, 吉崎泉: *Space Utiliz. Res.*, **25** (2009) 205.

(2012年5月10日受理)