

||||| 特集：国際宇宙ステーションの応用利用 |||||  
(原著論文)

## 宇宙実験での蛋白質結晶の高品質化事前予測技術

田中 広明<sup>1</sup>・伊中 浩治<sup>2</sup>・古林 直樹<sup>2</sup>・佐藤 勝<sup>3</sup>・高橋 幸子<sup>1</sup>  
山中 麻里<sup>1</sup>・広田 恵理華<sup>1</sup>・佐野 智<sup>3</sup>・小林 智之<sup>3</sup>・田中 哲夫<sup>3</sup>

### Prediction Method for Improvement of Protein Crystal Quality Grown in Microgravity

Hiroaki TANAKA<sup>1</sup>, Koji INAKA<sup>2</sup>, Naoki FURUBAYASHI<sup>2</sup>, Masaru SATO<sup>3</sup>,  
Sachiko TAKAHASHI<sup>1</sup>, Mari YAMANAKA<sup>1</sup>, Erika HIROTA<sup>1</sup>,  
Satoshi SANO<sup>3</sup>, Tomoyuki KOBAYASHI<sup>3</sup> and Tetsuo TANAKA<sup>3</sup>

#### Abstract

It is said that the microgravity environment has a positive effect on protein crystallization because concentration depletion zones (CDZ) are positively formed due to minimized convection fluid motion and sedimentation. However, the microgravity experiment was thought to have a limited contribution to structural biology. In the JAXA's protein crystallization project since 2002, high viscosity of the precipitant solution had positive effects on the quality of the protein crystal grown in microgravity. Thus, we developed the method for estimating ' $D/\beta$ ' for the evaluation of CDZ formation using values of the diffusion coefficient ( $D$ ) and kinetic coefficient ( $\beta$ ) by a simple experiment. The  $D/\beta$  indicates that CDZ is formed around the crystal in microgravity if it is low enough. Since we can predict the effects of microgravity on the protein crystal growth before performing space experiment, it is possible to select samples and crystallization conditions which have high possibility to improve the crystal quality. Moreover, if we could modify the crystallization condition to lower  $D/\beta$ , the improvement of the crystal quality will be expected.

## 1. はじめに

宇宙環境を利用した X 線構造解析向けタンパク質結晶生成実験は、1983年に Littke ら<sup>1)</sup>により行なわれたのが最初であり、生成結晶の高品質化や大型化が示唆された。その後、米国を中心として、欧州、日本、ロシア等で宇宙実験が行なわれるに至ったが、本来の目的である X 線構造解析への貢献は十分できているとは言い難い<sup>2)</sup>。宇宙航空研究開発機構 (JAXA) では2002年から、X 線構造解析に貢献することを目的に、年2回のペースで、国際宇宙ステーション (ISS) 内ロシアサービスモジュールでタンパク質結晶生成実験 (JAXA-GCF プロジェクト) を開始し、その技術の確立と、生成結晶の応用利用を試みてきた。本稿では、その過程で得られてきた、宇宙実験での結晶の高品質化を事前に予測する技術について報告する。

## 2. 高品質化のメカニズムとモデル化

### 2.1 主要なメカニズム

微小重力環境でのタンパク質結晶生成実験では、回折分解能やモザイシティといった X 線回折実験で取得される回折データの質の向上の他<sup>3)</sup>、地上では結晶表面での2次核形成によるクラスター成長により単結晶の得られない結晶から単結晶が得られた<sup>4)</sup>、ヘミヘドラルツインが解消した<sup>5)</sup>、といった事例が報告されている。その理由としては、微小重力環境での成長中結晶周辺に形成される拡散場の効果や、ステップバンチングの抑制、微小核の結晶表面への沈降の減少等が指摘されている<sup>3)</sup>。しかしながら、X 線構造解析向けタンパク質結晶の大きさがせいぜい数十〜数百  $\mu\text{m}$  であるため、主要な理由は拡散場形成の効果ではないかと考えられる。

1 株式会社コンフォーカルサイエンス 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町3丁目3-6 ワカ末ビルディング7階  
Confocal Science Inc., Wakamatsu Building 7F, 3-3-6 Nihonbashi Hon-cho, Chuo-ku, Tokyo 103-0023 Japan  
(E-mail: tanakah@confsci.co.jp)

2 株式会社丸和栄養食品 〒639-1123 奈良県大和郡山市筒井町170  
Maruwa Foods and Biosciences Inc., 170 Tsutsui-cho, Yamatokoriyama, Nara 639-1123, Japan

3 宇宙航空研究開発機構 〒305-8505 茨城県つくば市千現 2-1-1  
Japan Aerospace Exploration Agency, 2-1-1 Sengen, Tsukuba, Ibaraki 305-8505, Japan

この拡散場の形成とは、タンパク質結晶が過飽和溶液中で成長する際、結晶の周りのタンパク質分子や不純物が結晶に取り込まれるため、結晶表面周辺にそれぞれの濃度が低い領域 (CDZ: concentration depletion zone) が形成されることを指す<sup>6)</sup>。微小重力環境での結晶成長実験では、結晶周辺の溶液に密度差流が生じないため、この CDZ が乱されにくい。CDZ のうち、タンパク質の濃度が低い領域はタンパク質欠乏層 (PDZ: protein depletion zone) と呼ばれ、これが形成されることにより、結晶は、より低過飽和の状態で成長することになる。また不純物の濃度の低い領域は不純物欠乏層 (IDZ: impurity depletion zone) と呼ばれ、これが形成されることにより、結晶への不純物の取り込みが抑制されることになる。結果として、結晶内でのタンパク質分子の配向性はより向上し、X 線回折データの回折分解能、モザイシティ、コンプリートネス、 $I/\sigma(I)$  等の各種統計指標で示されるデータセットの質が向上する<sup>3)</sup>。

実際、Otalora らは、欧州宇宙機構 (ESA) の APCF (Advanced Protein Crystallization Facility) を使って、微小重力環境下でタンパク質結晶成長のその場観察を行い、結晶周辺での拡散場形成を報告した<sup>7)</sup>。また Thomas らは、微小重力環境で生成したタンパク質結晶では不純物の取り込みが抑制されていることを報告した<sup>6)</sup>。

## 2.2 CDZ 形成のモデル化

PDZ 形成による成長中の結晶表面のタンパク質濃度 ( $C$ ) は、結晶を半径  $R$  の球状であると仮定すると次式のようにモデル化できる<sup>8)</sup>。

$$C(R) = \frac{\frac{R \cdot \beta \cdot C_e}{S} + C(\infty)}{1 + \frac{R \cdot \beta}{D}}$$

ここで  $C(R)$ 、 $C(\infty)$ 、 $C_e$  はそれぞれ結晶表面でのタンパク質濃度、結晶から遠く離れた場所でのタンパク質濃度、ならびにタンパク質溶解度を表す。また  $R$  は結晶半径、 $\beta$  は結晶へのタンパク質取り込み係数、 $D$  はタンパク質拡散係数を表す。

PDZ による効果は、結晶成長の駆動力 (DF: driving force) が重力の有無でどの程度低下するかで見積もることが可能である。そこで次式のような DFR (driving force ratio) を導入する。

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

ここで、 $DF_{0G}$  は PDZ が生成する場合の結晶へのタンパク質取り込み力 (微小重力環境下を想定)、 $DF_{1G}$  は欠乏層が乱された場合の結晶へのタンパク質取り込み力 (重力環境下を想定) である<sup>8)</sup>。

IDZ による効果は、結晶に取り込まれる不純物の割合 ( $IUR$ : impurity uptake ratio) が重力の有無でどの程度低下するかで見積もることが可能である。そこで次式のような  $IR$  (impurity ratio) を導入する<sup>8)</sup>。

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

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

ただし、 $IUR_{0G}$  と  $IUR_{1G}$  は微小重力環境ならびに重力がある環境での  $IUR$  である。また、 $\beta_i$  は結晶への不純物取り込み係数、 $D_i$  は不純物拡散係数を表す。不純物取り込み係数  $\beta_i$  は、 $\beta$  に比べて数十倍大きい例が知られている<sup>9)</sup>。したがって、実際に結晶に取り込まれやすく、結晶品質に悪影響を与えるような不純物はそのような大きな値をとっていると考えることは妥当である。このことから、 $A$  は少なくとも 10~100 程度の値を想定しても良いと考えられる。

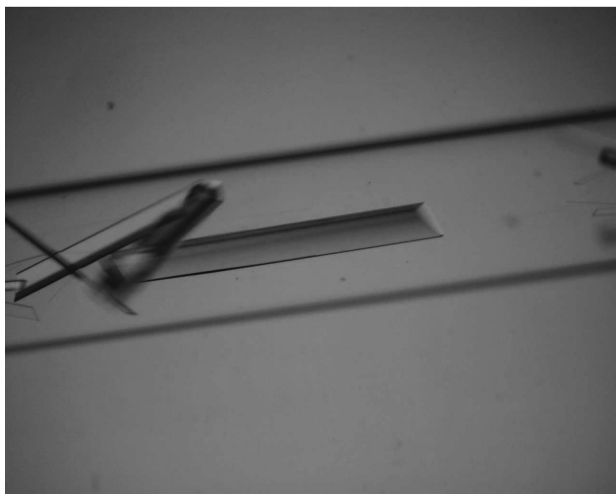
## 2.3 数値モデルによる解析

JAXA-GCF プロジェクトで技術開発のモデルタンパク質として搭載した  $\alpha$ -アミラーゼについて、上述の数値モデルによる解析を行った。*Aspergillus oryzae* が産生する  $\alpha$ -アミラーゼは 476 アミノ酸からなるタンパク質で、その三次元構造は 1991 年に 2.1 Å 分解能で報告されている<sup>10)</sup>。以前より、 $\alpha$ -アミラーゼをポリエチレングリコール (PEG) 8000 を結晶化剤として結晶化させる際の問題点は、クラスターになりやすく、単結晶が得にくいことであった。JAXA-GCF プロジェクトでは、このタンパク質の高純度試料を用い、宇宙実験を実施したところ、地上で得られる結晶とは明らかに異なる、単結晶が生成した (**Fig. 1**)。また X 線回折分解能は、最外殻の回折点を目視で観察したところ、シーディングにより得た地上生成単結晶では 1.12 Å であったが、宇宙実験での生成結晶では 0.89 Å に向上した<sup>4,11)</sup>。CDZ の数値解析のためには、このタンパク質に関する結晶化溶液条件での  $D$  と  $\beta$  の値が必要となる。詳細は省略するが、 $D$  に関しては吉崎らの方法<sup>12)</sup>により実測し、PEG の効果を外挿して **Table 1** の値を得た<sup>8)</sup>。また  $\beta$  に関しては、次のように推定した<sup>8)</sup>。すなわち、結晶を球形と仮定し、溶液中の結晶は同時に成長を開始し、全て同じ速さで成長して、同じ大きさになるものと仮定すると、結晶の成長速度は以下の式で表される。

$$\frac{dR(t)}{dt} = \frac{\beta}{1000n} \frac{R^3(\infty) - R^3(t)}{C(0) - C_e - \frac{R^3(t)}{1000n - C_e}} \quad (3)$$

ただし、 $R(t)$  は時間  $t$  のときの結晶半径を表す。そこで、この微分方程式を解いて、実際の結晶の成長速度に近

( a )



( b )

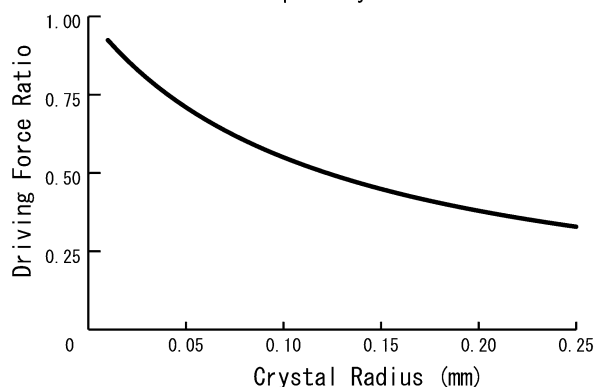


**Fig. 1** Crystals of alpha-amylase grown (a) in microgravity and (b) in terrestrial. The diameter of the capillary is 0.5 mm.

**Table 1** Numerical data of alpha-amylase obtained from the experiments

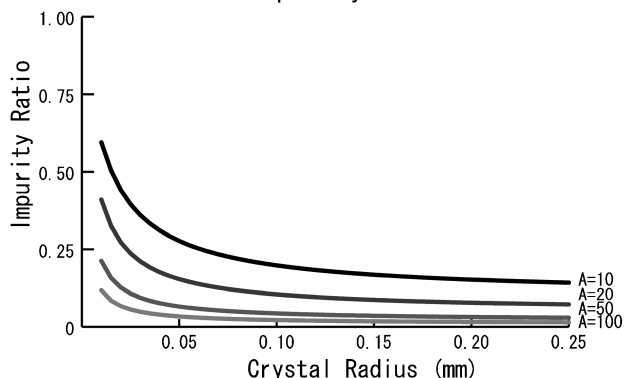
Parameter	Data
Solubility ( $C_e$ )	10 mg/ml
Terminal crystal size ( $R(\infty)$ )	0.15 mm
Time required to grow half size	50 hrs
Relative density	1.1
Diffusion coefficient (measured in 18% PEG 8000)	$2.97 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$
Diffusion coefficient (estimated in 22% PEG 8000)	$1.78 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$

alpha-amylase



**Fig. 2-1** Protein depletion zone around a growing crystal (alpha-amylase)

alpha-amylase



**Fig. 2-2** Impurity depletion zone around a growing crystal (alpha-amylase)

い速さとなるように  $\beta$  を求めると、 $\beta = 2.5 \text{ cms}^{-1}$  となった。なお、この際溶解度  $C_e$  も別途、実験を行い、求めている (Table 1)。

このようにして得られた  $D$  および  $\beta$  を、(1)(2)式に代入して、横軸に結晶の半径、縦軸に DFR および IR をとると、**Fig. 2-1** および **Fig. 2-2** のようになる。すなわち、PEG 8000 溶液内で  $\alpha$ -アミラーゼが結晶成長する際には、結晶の半径が X 線構造解析に実際に供用できる大きさである 0.1 mm 程度のときに、DFR は数十%に低下し、IR は数分~十数分の 1 に低下する。すなわち、CDZ の効果が十分期待できることが分かった。

一方、同じく JAXA-GCF プロジェクトにモデルタンパク質として搭載したリゾチームの場合には、 $D = 1.0 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}^{-1}$ 、 $\beta = 8.0 \times 10^{-6} \text{ cms}^{-1}$  (13) を用いて上記の解析をした結果を **Fig. 3-1** および **Fig. 3-2** に示すが、 $\alpha$ -アミラーゼの場合と比較して、微小重力効果が期待しにくいことが分かる。

そこで、25% PEG 8000 を加えた塩化ナトリウム溶液 ( $D = 0.20 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}^{-1}$ ) を用いて、宇宙で結晶化実験を

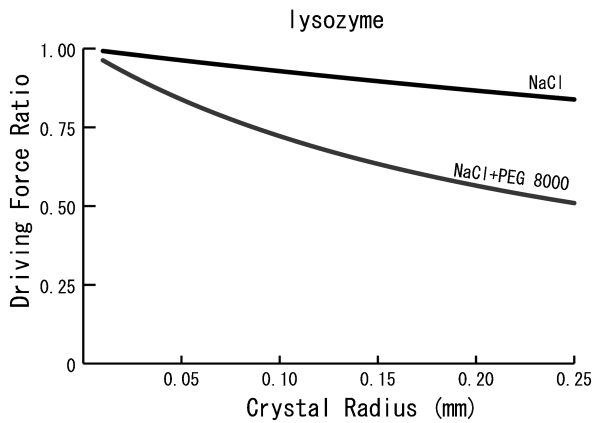


Fig. 3-1 Protein depletion zone around a growing crystal (lysozyme)

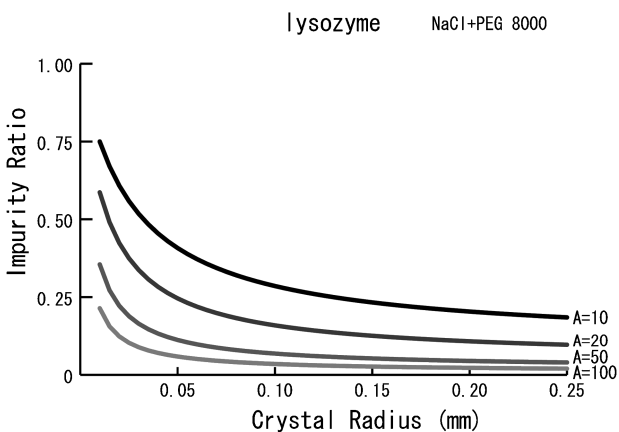
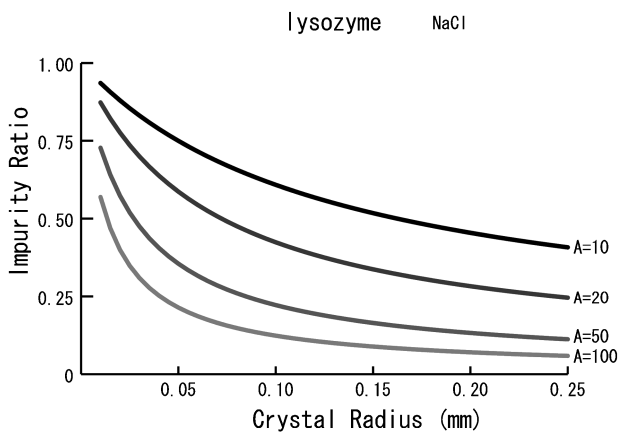


Fig. 3-2 Impurity depletion zone around a growing crystal (lysozyme)

行った。DFR および IR は Fig. 3-1 および Fig. 3-2 のようになる。すなわち、PDZ と IDZ の効果は PEG 8000 添加により、有意に促進されることが分かった。

実際に宇宙実験を行った結果、PEG を入れない条件で

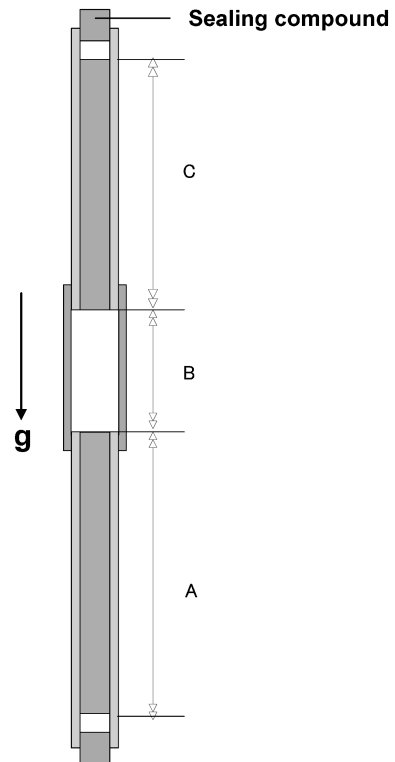


Fig. 4 Device for measuring diffusion coefficient

成長した結晶は、回折分解能が  $1.4 \text{ \AA}$  から  $1.3 \text{ \AA}$  に改善したのに対し、PEG 8000 を添加した条件で成長した結晶では、 $1.1 \text{ \AA}$  から  $0.88 \text{ \AA}$  と顕著に改善した。

### 3. 宇宙実験の効果予測

X 線構造解析向け高品質タンパク質結晶の取得を目指す宇宙実験技術の構築では、タンパク質構造解析研究者から持ち込まれる、多種多様なタンパク質について、前述のような解析を迅速、簡便に行い、宇宙実験の効果をあらかじめ見積もって、効果が期待できる場合にのみ、宇宙実験を実施することが理想的である。また、タンパク質試料は多くの場合、稀少であることから、見積りに使用するタンパク質試料量を数十  $\mu\text{l}$  に抑えなければ現実的ではない。このような制約を考慮しつつ、我々は以下のような方法を開発した。

#### 3.1 $D$ の見積もり

一般に球状タンパク質の拡散係数は、Stokes-Einstein の関係に従い、水溶液中ではその分子量に依存し、 $-1/3$  乗に比例して減少する。現実にご利用者から持ち込まれるタンパク質は理想的な球状とは考えにくい、大雑把な見積りとしては、代表的な複数種類の分子量の異なるタンパク質の拡散係数を、代表的な結晶化試薬溶液中で測定し、その分子量依存性から推定するのは、良い方法と思われる。

そこでキャピラリーを用いた拡散計測装置を作成し (Fig. 4)、タンパク質の拡散に伴う濃度変化を測定して  $D$

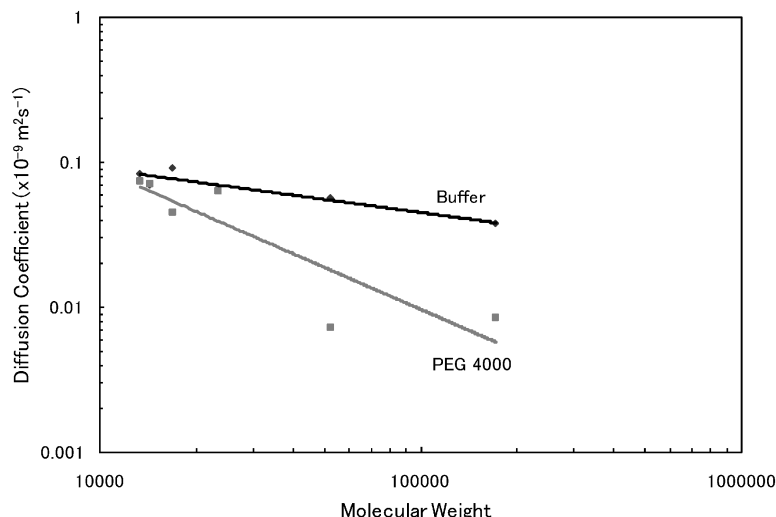


Fig. 5 Relationship between molecular weight and diffusion coefficient of various protein in a buffer (◆) or in a 20% PEG 4000 (■) solution

を見積もった。測定は、キャピラリー A に 10 mg/ml のタンパク質と結晶化試薬を含む溶液，キャピラリー C には結晶化試薬溶液を充填し，シリコンチューブ B にはあらかじめ結晶化試薬で浸漬した 1% アガロースゲル充填して，A, B, C を結合し，数日拡散させ，経時的にサンプルを採取した。溶液 A, 溶液 C を 50~100 倍に希釈し，OD<sub>280</sub> で濃度を求め，さらに最小自乗法を用いて拡散係数を推定した。この際，結晶化試薬の濃度は結晶が生成しない程度の濃度とした。

結果の一例を Fig. 5 に示す。これらの例について分子量  $M$  と  $D$  の相関を近似式で表したところ，バッファー溶液中の場合，

$$D = 1.4 M^{-0.3}$$

PEG 4000 の場合，

$$D = 650 M^{-1.0}$$

となった。同様の関係は他の結晶化試薬でも測定し，例数を増やしつつある。また  $D$  の値に対する，PEG の分子量と濃度の影響も現在，検討中である<sup>14)</sup>。

### 3.2 $\beta$ の見積もり

(3) 式による  $\beta$  の見積りでは，溶解度を求める必要があることや，微分方程式を解いて  $\beta$  を推定する必要があり，決して簡単ではない。しかし，大雑把な見積りを目指す場合，以下の仮定により簡略化が可能である。すなわち，結晶の密度は結晶化に用いる初期タンパク質溶液濃度よりもずっと高いとする ( $1000n \gg C(0)$ )。すると，初期濃度はタンパク質の溶解度よりもずっと高いため ( $C(0) \gg C_e$ )，(3) 式は以下のように近似できる。

$$\frac{dR(t)}{dt} = \frac{C(0)\beta}{1000n} \left( 1 - \left( \frac{R(t)}{R(\infty)} \right)^3 \right) \quad (4)$$

さらに，

$$r = \frac{R(t)}{R(\infty)}, \quad T = \frac{C(0)\beta}{1000nR(\infty)} t$$

とすると，(4) は

$$\frac{dr}{dT} = (1 - r^3)$$

という形に単純化される。この微分方程式を数値計算で解くと，結晶の大きさが最終寸法の半分になる  $r = 0.5$  の際の  $T$  は 0.515 であるので，この関係を利用して  $\beta$  を以下のよう求めることができる。

$$\beta = \frac{0.515 \times 1000nR(\infty)}{\frac{t_1/2}{2} C(0)} \quad (5)$$

ここで  $t_{1/2}$  は結晶が成長を開始してから最終の大きさの半分になるまでの時間である。具体的な実験としては，タンパク質結晶生成実験を開始後，一定時間ごとに実験経過を観察し，結晶が認められ始めた時点を経験開始時として，それから結晶が最終の大きさの半分になるまでの時間を求めるという，簡単な実験でよい。

## 4. 考 察

以上のような方法により， $D$  と  $\beta$  の値は簡単に見積り可能となった。次の問題は，そこで得られた  $D/\beta$  の値はどの程度以下であれば宇宙実験の効果が期待できるか，である。我々は，実際の宇宙実験試料について， $D/\beta$  の見積り値と，得られた結晶の品質向上の相関についてのデータを

蓄積中である。今のところ、 $D/\beta$ はだいたい2 mm以下くらいが望ましい印象である。すなわち対象タンパク質が、この条件に適するかどうか、事前に見積もり、そのような試料のみを宇宙実験に供用すれば、地上で生成するよりも良好な品質の結晶が期待できるということである。

ちなみに結晶の半径を0.1 mmとし、 $D/\beta$ を2 mmとした場合、結晶化の駆動力DFRは0.95であり、IRはAを10と小さめに見積もって0.7である。DFR、IRの値と、生成結晶中のタンパク質分子の配向性向上や、X線回折データの質の向上との相関は、今後検討を進めなければならない課題であるが、 $D/\beta$ が2 mm程度の場合、IDZの効果はある程度、期待できそうであることが分かった。

ここで開発した技術は非常に粗い予測技術である。しかしX線構造解析向け結晶生成を目的として利用者から持ち込まれる、構造生物学的あるいは医薬品開発ターゲット等として興味を持たれるタンパク質試料は、多種多様である。また結晶化条件も多種多様である（ということは $D/\beta$ も多様であることを意味する）。そして様々な技術を駆使し、最大限の迅速な対応が要求される分野である。如何に少ない試料量で構造解析できるかも重要である。一方、結晶のX線回折データの質については、それを利用した構造解析で、より良好な座標データが得られるかという、比較相対的な評価がされる。このため、宇宙実験の効果についての事前予測に関しては、方法が実用上十分に簡便であれば、精度がある程度犠牲になっても、意味のあるものと考えられる。

一方、より積極的に、微小重力効果を高める結晶化条件を探索、最適化することも考えられる。 $D$ に関しては、結晶化試薬としてPEG等を用いる結晶化条件を探索する、もしくはPEG等を既知の結晶化溶液に添加するなど、 $D$ を低下させる方法は有効である<sup>15)</sup>。 $\beta$ に関しては、タンパク質固有の性質による傾向は強い。しかし一般に、不純物が結晶表面に付着すると成長は遅くなる（すなわち $\beta$ が小さくなる）ので、試料の純度が高いほど $\beta$ は大きく宇宙実験の効果は得やすいと考えられる。実際、JAXA-GCFプロジェクトでの経験では、極限までタンパク質試料の精製度を高め、それゆえ地上での結晶化でも従来よりも回折分解能が著しく向上している試料ほど、宇宙実験による品質改善効果が高い傾向がある。

このように、タンパク質結晶生成分野では、より宇宙実験の有用性を高める技術が蓄積されてきており、今後、創薬やタンパク質の機能解明に実質的に役立つことが期待されている。本技術がこれらの研究や開発の一助になれば幸いである。

## 謝辞

JAXA-GCFプロジェクトにおいて、GCBを用いた結晶化実験への有用なアドバイス、ならびに射場作業を支援していただいた、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。また、欧州の宇宙実験機会を提供していただいたESA、ならびにベルギー国政府と、宇宙実験のためにロシアサービスモジュールを提供いただいたロシア連邦宇宙局（Russian Federal Space Agency）とRSC Energiaに感謝いたします。また、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。

## 参考文献

- 1) W. Littke and C. John: *J. Cryst. Growth*, **76** (1986) 663.
- 2) <http://www.nap.edu/books/0309069750/html>
- 3) A. McPherson: *Crystallization of Biological Macromolecules*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1999.
- 4) 高橋幸子, 田仲広明: *日本結晶学会誌*, **46** (2004) 323.
- 5) 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.
- 6) B. R. Thomas, A. A. Chernov, P. G. Vekilov and D. C. Carter: *J. Cryst. Growth*, **211** (2000) 149.
- 7) F. Otorola, M. L. Novella, J. A. Gavira, B. R. Thomas and J. M. Garcia Ruiz: *Acta Cryst.*, **D57** (2001) 412.
- 8) H. Tanaka, K. Inaka, S. Sugiyama, S. Takahashi, S. Sano, M. Sato and S. Yoshitomi: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1027** (2004) 10.
- 9) B. R. Thomas and A. A. Chernov: *J. Cryst. Growth*, **232** (2001) 237.
- 10) H. J. Swift, L. Brady, Z. S. Derewenda, E. J. Dodson, G. G. Dodson, J. P. Turkenburg and A. J. Wilkinson: *Acta Cryst.*, **B47** (1991) 535.
- 11) H. Tanaka, K. Inaka, S. Masaru, S. Sugiyama, S. Takahashi, M. Yamanaka, S. Sano, M. Motohara, T. Kobayashi and S. Yoshitomi: *Organized Research Combination System on Development of New Structural Biology Including Hydrogen and Hydration 2005 Proceedings*, 244.
- 12) H. Nakamura, S. Fukuyama, I. Yoshizaki and S. Yoda: *Thermophysical Properties*, **22** (2001) 259.
- 13) F. Otorola, J. M. Garcia Ruiz, L. Carotenuto, D. Castagnolo, M. L. Novella and A. A. Chernov: *Acta Cryst.*, **D58** (2002) 1681.
- 14) H. Tanaka, I. Yoshizaki, S. Takahashi, M. Yamanaka, S. Fukuyama, M. Sato, S. Sano, M. Motohara, T. Kobayashi, S. Yoshitomi and T. Tanaka: *Microgravity sci. technol.*, **XVIII-3/4** (2006) 91.
- 15) M. Sato, H. Tanaka, K. Inaka, S. Shinozaki, A. Yamanaka, S. Takahashi, M. Yamanaka, E. Hirota, S. Sugiyama, M. Kato, C. Saito, S. Sano, M. Motohara, T. Nakamura, T. Kobayashi, S. Yoshitomi and T. Tanaka: *Microgravity sci. technol.*, **XVIII-3/4** (2006) 5.

(2008年2月14日受理, 2008年4月4日採択)