

||||| 特集：産学官の連携による協力・スピンオフ技術 |||||  
(解説)

## 国際宇宙ステーションを利用した 高品質タンパク質結晶生成実験技術のスピンオフ

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

### Spin-offs of JAXA Protein Crystallization Experiment on International Space Station

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

#### Abstract

There are three types of spin off technology which relate to the JAXA's protein crystallization projects in space, in these last 15 years. The first type is to obtain a patent on the crystallization device, 'gel-tube' and 'MicroChip', which has been designed for the space experiments but which can also be useful for the terrestrial crystallization in usual laboratory. The second type is to accumulate some know-how for the protein crystallization which is definitely useful for the terrestrial crystallization. The third one is to accumulate some know-how not for the crystallization but for the structure analysis, including sample preparation, diffraction data collection and the method for structure modeling, etc. As a result, it can be said that, to obtain more excellent results from space grown crystals, not only the crystallization process in space but also the whole technology for the protein structure analysis has been improved during JAXA's project. These technologies are contributed to the progress of the terrestrial protein crystallography and structure determination.

#### 1. はじめに

宇宙でのタンパク質結晶生成実験が始まって、30年近くになる<sup>1)</sup>が、これまでわが国だけでなく、米国、欧州、ロシア等、各国が挑戦してきた。しかし、最先端の構造生物学に貢献できるような利用体系は、いまだ構築途上である。宇宙航空研究開発機構（JAXA）ではタンパク質結晶生成のための宇宙実験を手掛けてから20年近く経過しているが、2003年に始まったロシアサービスモジュールを利用したタンパク質結晶生成のための宇宙実験（JAXA（NASDA）-GCF）をきっかけに、効率的な実施プロセスと確実な結晶生成技術を整備し、その利用の枠組みを構築してきた<sup>2)</sup>。2009年から開始した「きぼう」日本実験棟でのタンパク質結晶生成実験（JAXA PCG）まで、計10回

の宇宙実験を行い、その結果、これまでに延べ500種以上のタンパク質の結晶化を経験しており、地上実験も含めタンパク質の結晶生成に関しては、かなりの経験を積んできている。

さて、タンパク質結晶生成の宇宙実験に関連して得た技術開発成果のスピンオフとは、宇宙実験で蓄積した技術を地上のタンパク質結晶生成や構造解析において有効に活用することである。本稿では、JAXA-GCF以来、蓄積してきた技術開発成果について、(1)結晶生成・構造解析関連技術として特許化した事例、(2)結晶生成・構造解析関連のノウハウとして獲得した事例、及び(3)結晶生成・構造解析以外の技術的なノウハウとして獲得した事例を挙げ、宇宙実験で得られた技術が広く地上のタンパク質結晶・構造解析に貢献していることを紹介したい。

1 ㈱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丁目12-2 第2早川ビル77階  
Confocal Science Inc. Hayakawa 2nd Building 7F, 2-12-2 Iwamoto-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0032 JAPAN  
2 ㈱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  
(E-mail: tanakah@confsci.co.jp)

## 2. 結晶生成関連技術として特許化した事例

1980年代から90年代にかけて、米国や欧州を中心に様々な宇宙実験用のタンパク質結晶生成装置が考案、製作され、実際に宇宙実験で使われてきた。結晶生成の原理としては、蒸気拡散法、液々拡散法、透析法、温度可変法、バッチ法等、さまざまな方法が試みられてきた。特に、蒸気拡散法は一般のタンパク質結晶生成実験で最も良く使われる方法であり、米国アラバマ大学のグループが開発した、Vapor Diffusion Apparatus (VDA) や High Density Protein Crystal Growth (HDPCG) といった装置を中心に広く使われていた<sup>3)</sup>。しかしながら、Chayenら欧州のグループが、宇宙実験で蒸気拡散法のタンパク質溶液のドロップ中で生成中の結晶が、マランゴニ対流により動き回っていることを、CCDカメラによるその場観察で発見したことから、蒸気拡散法は宇宙実験の有用性を活かさないことが明らかとなってきた<sup>4)</sup>。このため、欧州宇宙機関 (ESA) では1990年代後半から液々拡散の一種であるカウンターディフュージョン法<sup>5)</sup>を使い宇宙実験を行なうようになってきた。特に、2001年以降の宇宙実験では、GCB (Granada Crystallization Box) (Fig. 1) という、通常の実験室でのタンパク質結晶生成に使用する目的で開発されたカウンターディフュージョン法の結晶生成容器を、そのまま宇宙実験でも利用するようになった<sup>6)</sup>。

JAXA (当時 NASDA) では、2002年から宇宙実験の成果を産業へ応用することを目的とし、低コストで定期的利用でき、確実性の高い、タンパク質結晶生成システムの確立を目指し、NASDA-GCF (Granada Crystallization Facility) プロジェクトを開始した。プロジェクト発足の当初はGCBの技術をESAから導入し、欧州のグループと同じ方式でタンパク質の結晶生成宇宙実験を開始した。

このプロジェクトにおいて、カウンターディフュージョン法に習熟するとともに、数回の宇宙実験の実施によりGCBの問題点が明らかになったため、より使いやすく確実な結晶生成が行なえるように、結晶生成セルの改良を実施した。

GCBでは底部のアガロースゲル層にタンパク質溶液を充填したキャピラリーを刺して使用する (Fig. 1)。しかしながら、①結晶化溶液がこのアガロースゲル層の体積の分だけ希釈されてしまうため、結晶化溶液の濃度が十分に上昇しないことにより、結晶生成に影響を与えること、②刺したキャピラリーがアガロースゲル層から抜けやすいなど信頼性が不十分なこと、③アガロースゲル層が大きいため拡散時間経過が遅いこと、及び、④ゲル層の準備に時間がかかること、等の問題があった。そこで、これらの問題を解決し、GCBを更に使いやすく改良したゲルチューブ法 (GT法)<sup>7)</sup>を開発した。GT法の組み立て手順を Fig. 2 に示す。この方法は、キャピラリーの先端にアガロースゲルが入ったチューブを取り付けることにより、低コストで

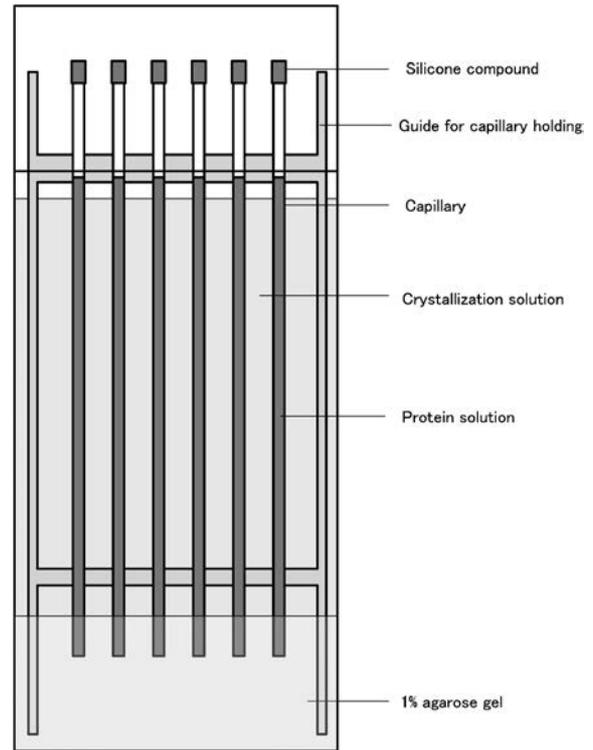


Fig. 1 Granada Crystallization Box (GCB).

信頼性が高く容易に組み立てられるため、地上のタンパク質結晶生成にも有用なツールとなっている (特許第4354457号)。

また、最近の宇宙実験では、GT法の宇宙実験向け容器を改良し、同じ容積で倍のキャピラリーが搭載できるJCB (JAXA Crystallization Box)を開発し、より高密度化された結晶生成セルを利用している。

更に、少量 (最低  $2 \mu\text{L}$ ) のタンパク質溶液で、カウンターディフュージョン法での結晶生成を実現したマイクロチップの開発も実施し、地上のタンパク質結晶生成でのツールとして普及を進めている (特許第4292279号, 特開2008-126135)。

## 3. 結晶化に関わるノウハウとして獲得した事例

タンパク質の結晶化は、タンパク質溶液中の結晶化試薬濃度を高める等の方法により、過飽和度を高め結晶の核を発生させ、その核をもとに結晶を生成すると考えられているが、それほど単純ではなく、理論通りではないことがたくさん起こる。

われわれは、前項で述べたように、カウンターディフュージョン法に習熟し、使いやすい形に技術改良してきた。その過程でPEG類を結晶化試薬として用いる場合タンパク質濃度と結晶化濃度の相関上では、結晶生成が期待できるPEG濃度の条件下でも、結晶がうまく成長しないケースが少なからずあることに気がついた。そこで、蒸気

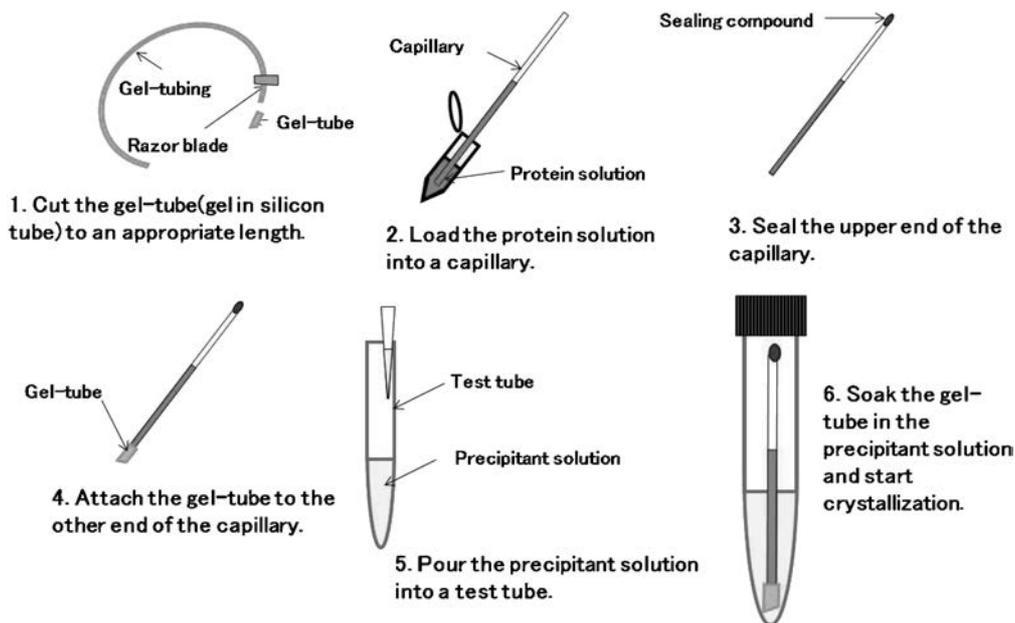


Fig. 2 Gel-Tube Method Assembly.

拡散法とカウンターディフュージョン法との違い，という観点から，その原因を検討した。

一般に，蒸気拡散法の場合には，タンパク質溶液と結晶化溶液（リザーバ溶液）を一定の比率で混合し，結晶化ドロップを作成する．このドロップとリザーバ溶液が蒸気平衡に達するまでの過程で，蒸発によりドロップ溶液量が減少することで，ドロップ内のタンパク質の過飽和度が高まり，結晶生成がおこる．この方法では，結晶化ドロップに含まれる，タンパク質試料の濃度，PEG等の結晶化試薬濃度はともに上昇するが，その他の塩類やバッファ成分の試薬の濃度も上昇する．多くの場合，タンパク質溶液にも何らかの塩類やバッファ成分が含まれるため，これら試薬の最終到達濃度は，リザーバ溶液の濃度よりも高くなる（Fig. 3a）．

一方，カウンターディフュージョン法の場合には，タンパク質溶液中に結晶化試薬が徐々に拡散していくため，タンパク質溶液の溶質が濃縮されるということはない．キャピラリー中のPEG等の結晶化試薬濃度は時間とともに徐々に上昇するが，タンパク質溶液量に対し，リザーバ溶液の絶対量の方が圧倒的に大きいため，最終的には，リザーバ溶液濃度に限りなく近い濃度に達する．また，タンパク質溶液の拡散も，キャピラリー内からリザーバ溶液内に，若干ではあるがおこっており，キャピラリー中のタンパク質濃度はやや低くなる．したがって，タンパク質溶液と結晶化試薬の拡散が平衡に達するまでは，キャピラリー内で両溶液の逆向きの濃度勾配が発生する．このように，カウンターディフュージョン法の結晶は，蒸気拡散法とは異なる溶液条件によって生成する（Fig. 3b）．タンパク質溶液と結晶化試薬がそれぞれ拡散のみで濃度変化していくため，

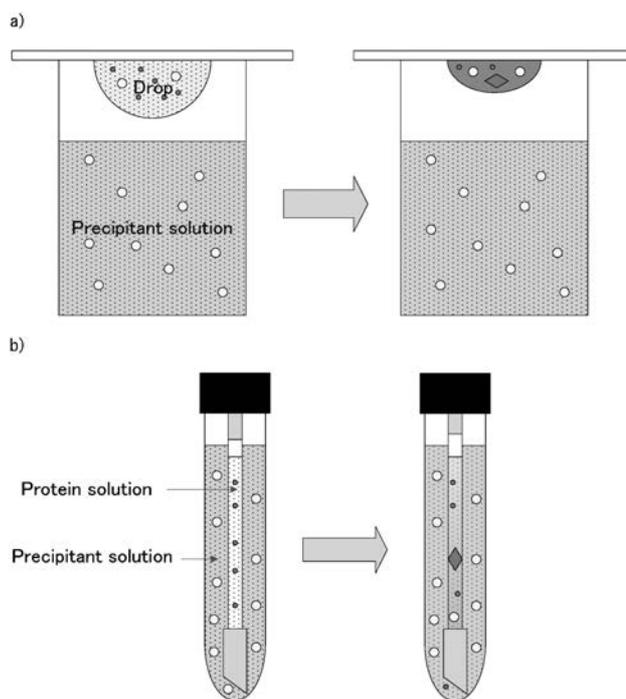


Fig. 3 Hanging-Drop Vapor-Diffusion (a) and Counter-Diffusion (b).

カウンターディフュージョン法では，濃度結晶成長中の溶質濃度をコントロールしやすい．

そこで，カウンターディフュージョン法を用い，さまざまな塩濃度を含むPEG溶液をリザーバ溶液として結晶化を行ったところ，次のような興味深い結果が得られた（Table 1）<sup>8)</sup>．

**Table 1** Crystal growth observed within 14 days in various NaCl concentration in various pH containing 30% PEG 4000 and 50 mM buffer

Protein	Lysozyme		Alpha-amylase			Glucose isomerase	
pI	11.0		4.2			4.7	
pH	4.5	7.0	5.5	7.0	9.0	7.0	9.0
Charge density (M)	0.56	0.40	0.29	0.37	0.43	0.30	0.33
V <sub>M</sub> /PDB	2.08/1 bwh		2.18/6 taa			2.79/1 xia	
NaCl	0	×	×	×	×	×	×
	0.1	×	×	○	×	×	×
	0.2	×	×	○	○	oil	O/ppt
	0.3	×	○	O/oil	O/oil	oil	O/ppt
	0.4	○	○	Oil	oil	oil	O/ppt
	0.5	○	○	Oil	oil	oil	O/ppt
	0.6	○	○	Oil	oil	oil	O/ppt
	0.7	○	○	Oil	oil	oil	O/ppt

Striped cells: Crystal growth was expected by calculation.

○: Crystallization occurred.

×: No crystallization occurred.

- 1) 結晶生成には最適な塩濃度範囲があり、それより低いと結晶が全く生成しない。また、それより高いと、オイルや沈殿になる。
- 2) 結晶が生成するのに必要な、最小の塩濃度は、タンパク質溶液の pH がタンパク質の等電点より離れるほど高くなる。この値は、松島と伊中<sup>9)</sup>が提唱する、タンパク質分子の電荷密度に相当する濃度である。

このため、PEG 類で結晶化させる際の結晶化溶液中の最低塩濃度を、タンパク質のアミノ酸組成から見積もるソフトを作成した (Fig. 4)。見積りの際に必要なタンパク質分子の電荷密度は、タンパク質のアミノ酸組成と、タンパク質溶液の pH、および V<sub>M</sub> 値 (溶媒含量) から以下の式で推定できる。V<sub>M</sub> 値は、これまでに PDB に登録されている値のヒストグラムから<sup>10)</sup>、最も頻度の高い値、及び想定される最小の値と最大の値の 3 通りを想定する。

$$\text{Charge density (M)} = \frac{\text{Number of charges}}{\text{Volume for one protein}} = \frac{\text{Number of charges} \times 10^{27}}{V_M \times MW \times 6.02 \times 10^{23}}$$

この計算ソフトを用いて、結晶化条件が未知のタンパク質について、結晶生成が見込める NaCl 濃度の範囲を比較的簡単に推定できるようになった。

このソフトは宇宙実験のみならず、地上での一般の結晶化実験にも利用できるものである。カウンターディフュージョン法で、PEG 類での結晶化を試みる場合には、前もって最低塩濃度を見積もることにより、結晶化条件のスク

リーニング範囲を狭めることができる。また、蒸気拡散法での結晶化でも、PEG 類に対して全く結晶成長しない場合や、オイルや沈殿になる場合には、上記の観点から、塩濃度を再検討すると良好な結果になることも多い。

以上の結果は、宇宙実験をきっかけにこれまでの結晶化条件の考え方では見落とされていた重要なノウハウを得ることができた良い例である。

#### 4. 技術的ノウハウとして獲得した事例

タンパク質結晶生成の本来の目的は、そのタンパク質分子の 3 次元立体構造を求めることにある。宇宙実験でのタンパク質結晶生成はあくまでもそのための一工程にすぎない。良質な結晶生成のためには、十分なタンパク質試料の調製が重要であるが、現実には容易でない。また、タンパク質により試料の品質・純度等もまちまちである。また、得られた結晶の品質が良質でも、X 線回折データ取得や構造解析の方法が十分でないと、結晶の品質の良さを活かしきれない。このため、より確実に最良の構造解析結果が得られることを目指し、結晶生成の上流 (タンパク質試料の調製) ならびに下流 (回折データ取得や構造解析) の工程について検討し、様々なノウハウを蓄積することができた。

##### 4.1 タンパク質試料の調製

初期の宇宙実験で悩まされたのは、結晶生成の再現性が悪いという問題である。利用者からは、結晶が生成するといわれるタンパク質溶液と結晶化溶液を預かり、宇宙実験向けにカウンターディフュージョン法での結晶化条件の検討を行なうが、いくら待っても全く結晶が生成しないとか、生成しても品質が悪いという事例を数多く経験した。利用者側でも結晶生成が十分に再現しない場合も多い。つまり、再現性の良いタンパク質試料の調製は容易でないということである。

そこで、この問題を検討するため、タンパク質溶液受け入れ時には SDS-PAGE 電気泳動、Native-PAGE 電気泳動等を実施し、タンパク質溶液の性状をチェックするとともに、利用者には試料品質の再現性が重要であることを周知し、試料調製を依頼した。実際、利用者側での結晶化の再現性が悪かった事例はいくつもあるが、宇宙実験機会の効果的な利用の観点から好ましいことではないため、十分に結晶生成が再現するような試料の調製と結晶化条件の絞り込みを目指した。

こうした経験の中で、結晶生成向けに調製されたタンパク質溶液は、一般に生化学実験で使うものよりも精製度が高いにもかかわらず、まだ目的のタンパク質成分以外の高分子の夾雑物が含まれることも多いことが分かってきた。SDS-PAGE 電気泳動で目的成分以外のバンドが認められることをしばしば経験するが、このような場合、分解能が高い回折データが得られる単結晶 (以下、「高品質結晶」と呼ぶ) を再現性よく得られる確率はあまり高くない。さ

PEG/NaCl Conc. Optimization Chart.					
Copy Right (C) 2008-2009 Confocal Science Inc. All rights					
		Exp.Date	2010/12/31		
pH	Buffer Conc.				
7	50 mM				
Amino-Acid	C-Terminal	N-Terminal	Num. of Res.	Num. of S-S	
Ala	A		12		
Arg	R		11		
Asn	N		14		
Asp	D		7		
Cys	C		8	4	
Gln	Q		3		
Glu	E		2		
Gly	G		12		
His	H		1		
Ile	I		6		
Leu	L	1	7		
Lys	K		1	5	
Met	M		2		
Phe	F		3		
Pro	P		2		
Ser	S		10		
Thr	T		7		
Trp	W		6		
Tyr	Y		3		
Val	V		6		

Input data in blue cells. The results for 1st to 3rd candidates will be calculated in yellow cells below.

Put "1" in "C-Terminal" cell, which corresponds to the C-terminal amino-acid.  
 Put "1" in "N-Terminal" cell, which corresponds to the N-terminal amino-acid.  
 Put numbers of each amino-acid (including both ends) in "Num. of Res." cells, which corresponds to each amino-acid.  
 Put numbers of S-S bonds in "Num. of S-S" cell.

	Composition	Unit	1st	2nd	3rd
	Buffer	mM	50	50	50
	NaCl	mM	305	474	222
	PEG4000	%	30	30	30

Try 1st solution first.  
 If the protein solution stays clear (no crystal, no precipitate, no oil), try 2nd solution.  
 If oil or precipitate is observed in the 1st solution, try 3rd solution.

Fig. 4 Polyethylene Glycol/Sodium Chloride Concentration Optimization Chart.

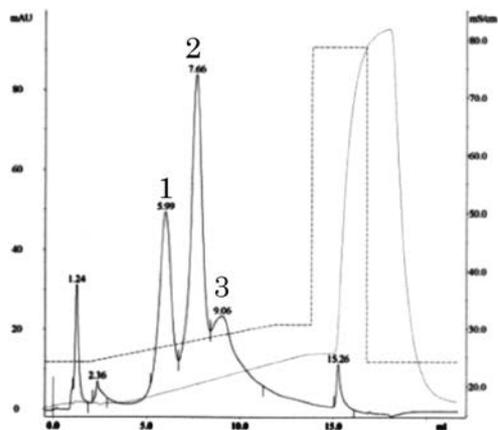
らに、SDS-PAGE ではシングルバンドであるにもかかわらず、Native-PAGE 電気泳動でシングルバンドを示さないタンパク質溶液もある。これらは、何らかの理由により、タンパク質分子の持つ表面電荷が均一でないものであり、概して高品質結晶が得られる確率は高くない。

ところが、このようなタンパク質溶液を、高性能液体クロマトグラフィーシステムのイオン交換クロマトグラフィー (Fig. 5) で精製し、電荷の均一な成分のみを集めると、高品質結晶が得られる確率が格段に向上する事例を多数経験してきた。つまり、対象タンパク質溶液の電荷の均一な成分のみを集めると、①結晶生成の確率が高くなる、

②結晶が大型化する、③クラスターになりにくくなる、④回折データの分解能が向上する、などの効果が現れた。もちろん、結晶化条件の探索効率も格段に高くなった。このような精製過程を経ると、試料量は数分の一に減少するため、全てのタンパク質に適用することは難しいが、タンパク質溶液の均一性を向上させることが、高精細な立体構造解析への近道と考えている。なお、タンパク質の表面電荷が均一な試料は、動的光散乱 (DLS) でも良好な単分散を示す場合がほとんどである。

#### 4.2 タンパク質結晶の高圧下での凍結技術

これまでの宇宙実験で良質な結晶が得られているにも関



**Fig. 5** Purification of alpha-Amylase  
The alpha-Amylase sample was purified by Mono-Q HR5/5 ion-exchange chromatography. The protein was separated into three peaks. High-quality crystals grew from the first peak fractions.

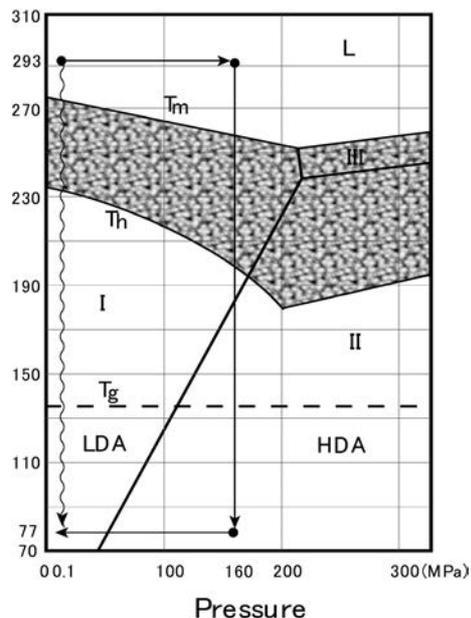
a)



b)



**Fig. 6** High-Pressure Cooling Apparatus Main Body (top) and High-Pressure Tubing Assembly in a Liquid Nitrogen Container (bottom).



**Fig. 7** Simplified Diagram of the High-Pressure Cooling Method Embedded in the Pressure-Temperature Phase Diagram of  $H_2O$  (based on Kim's report<sup>11)</sup>  
Arrow (straight line): High pressure cooling, Arrow (wavy line): Ordinary pressure cooling  
Hatched region: Supercooled liquid water  
I, II: Hexagonal ice  
LDA: Low-density amorphous ( $0.94 \text{ g/cm}^3$  at 77 K, 0.1 MPa)  
HDA: High-density amorphous ( $1.17 \text{ g/cm}^3$  at 77 K, 0.1 MPa)  
 $T_m$ : Melting point for supercooled water  
 $T_h$ : Lowest temperature for supercooled water  
 $T_g$ : Glass-transition temperature.

ならず、放射光施設での X 線回折データの取得の際に、抗凍結剤の条件が十分に検討されていないために、結晶が劣化し十分な回折データが取得できないケースをいくつか経験してきた。

コーネル大学の Kim ら<sup>11)</sup>は 200 MPa 程度の高圧下でタンパク質の結晶を凍結すると、抗凍結剤を使わなくても、あるいは、従来よりも非常に低濃度の抗凍結剤で、良好に凍結できることを報告している。これは、①高圧下では水が通常の水とは異なり比重が 1 よりやや大きな相の水となることで、体積変化による結晶へのダメージが少ないこと、②高圧下では、比較的ゆっくりとした冷却速度で高密度なアモルファス状 (HDA) に凍結しやすいこと、を利用して

JAXA では、Kim らの論文を参考に、最大 160 MPa の高圧環境下でタンパク質結晶を凍結する装置を製作した (Fig. 6)。160 MPa でも 200 MPa と同様に高密度非晶質水を生成することができる (160 MPa が、高圧ガス規制法において容易に許可が得られる最高圧力)。

凍結の手順は、自作のクライオループで結晶を掬ったのち、サンプル凍結管にクライオループを挿入し、上部に取

付けた磁石で凍結管内の上端に保持する。凍結管の先端を液体窒素に入れ、冷却するとともにヘリウムガスで凍結管の内部を160 MPaまで加圧する。加圧後、凍結管の磁石を外し、冷却された凍結管の下部にクライオループを落下させ、結晶を凍結する (Fig. 7)。

リゾチームの結晶を用いた実験では、窒素ガス吹き付けによる凍結の場合、最高分解能が1.3 Å程度であったが、本装置を利用した凍結では、通常の半分程度の濃度の抗凍結剤であったにも関わらず1.15 Å分解能の反射を得ることができた。また、RDVは、従来3.1 Å分解能であったものが、本装置の利用で、通常よりも低い濃度の抗凍結剤で2.7 Å分解能の良好な結果が得られている。

これまでの実験では、オイルや若干の抗凍結剤があるほうが、高圧凍結後の結晶の状態が良好である。

### 4.3 X線回折データの取得方法

宇宙実験でタンパク質結晶の品質が向上し、分解能が高い回折データが得られるようになると、より詳細な構造解析を行なうための回折データの取得方法には、十分な注意が必要である。特に、多くのビームラインで使われているCCD検出器では、ダイナミックレンジが16ビット程度と低いため、高角の強度の弱い反射点を測定できるセッティングでデータを取得すると、低角の反射が飽和してしま

う。一方、高精細な構造解析における最大の興味は、水素原子の電子密度の同定であるが、水素原子の反射は低角寄りであるため、低角の反射点を十分に測定しないと、水素原子の電子密度は見えてこない。このため、低角から高角までを複数のデータセットに分割して取得し、データをマージして構造解析に使用する必要がある。分割したデータの取得とマージの効果について検討したところ、1.0 Åを切るような回折データでは、概ね3つのデータに分割して取得し、マージして利用することで、目的のデータセットが取得できることが分かった (Fig. 8)。ちなみに、ダイナミックレンジが20ビットと非常に大きいPILATUS検出器 (CCD検出器の数十倍) を用いて同様のデータを取得する場合には、このような問題は発生せず、良好な回折データが取得可能である (Fig. 9)。我々はこれまでの宇宙実験を通して、11種程度のタンパク質において1.0 Åを切るようなX線回折データを取得し、必要なデータセットにすることに習熟してきた。さらに、この技術の普及を図っていきたいと考えている。

### 4.4 高精細な構造解析技術

宇宙実験でタンパク質結晶の品質が向上し、分解能が高い回折データが得られるようになると、構造解析もより精密な電子密度に対応した方法が必要となってくる。一般に、

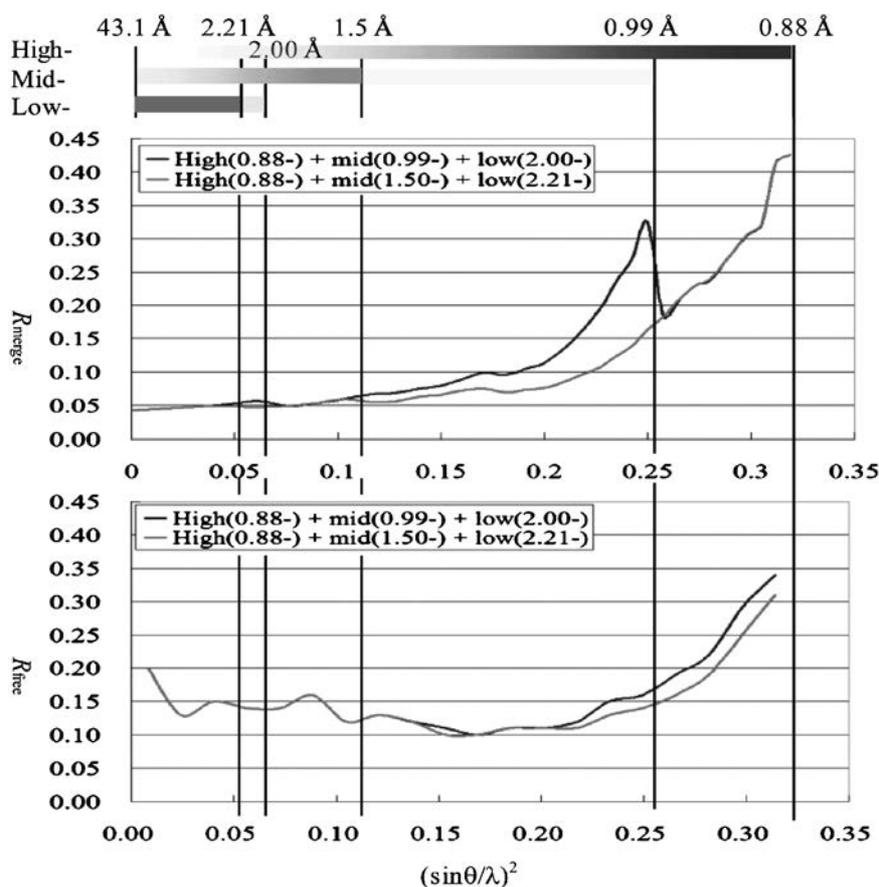


Fig. 8 Merge Method of Diffraction Data for High-Resolution Crystal Structure Analysis.

X線構造解析で3次元原子座標を求めるための基本的な原理は、X線回折実験で取得するX線回折データをフーリエ変換して求める3次元の電子密度イメージと、タンパク質を構成する原子（アミノ酸配列は既知であるので、それぞれの原子間の位置関係には一定の制約がある）を適当に配置させたモデルから推定される電子密度の計算値との差が最小になるように、モデル中の原子座標等のパラメータを最小二乗法で調整し、最終的な立体構造モデルを推定するものである。

この際、各原子の周りの電子密度は、分解能が1.2~1.5 Å程度よりも悪いケースでは球と仮定する、isotropicモデルを用いる。また原子間の位置関係や距離にも、すでに知られている標準的な値をもとに拘束をかけている。これは、回折データから得られる独立な反射点データの数が限られるため、なるべく少ないパラメータで表現できるモデルを使わざるを得ないからである。

一般に独立な反射点の数は回折分解能の逆数の3乗に比例して増大する。このため、上記の分解能よりも高い分解能のデータが得られるようになると、よりパラメータ数の

多いモデルを適用できることになる。各原子周りの電子密度は本来等方的ではないため、その非等方性を比較的簡単に表現できるanisotropicモデルが適用可能となる。さらに、原子間の位置関係や距離に拘束をかけずにモデルの推定が行なえるようになる。この結果、より正確な電子密度の推定ができるようになり、結果として、より正確な原子座標が得られるようになる。また、タンパク質分子の構造の一部が複数の構造をとりうる(multi-conformation)場合には、それぞれの同定が可能となる。さらに、タンパク質分子に結合する未知の化合物が見つかったり、X線構造解析では本来同定が難しいとされる水素原子も同定できるようになる(Fig. 10)。

さらに、0.8~1 Åを超えてくると、ナンシー大学のLecomteらのグループが開発した、結合電子や孤立電子対由来の電子密度を考慮した多極(multi-polar)モデル(プログラム名はMoPro)が適用可能となる<sup>12)</sup>。このモデルでは、従来であれば量子化学計算をしなければ得られない局所的なポテンシャルを求めることが可能である。これまで、このモデルが適用可能となるような高分解能の結晶は、溶媒領域が極端に少ないといった特殊な結晶に限られ、構造解析も数例しかなかったが、宇宙実験を利用すると標準的(50%を超えるような)な溶媒含量の結晶でも、分解能の高い回折データが得られる結晶になり得る例が見つかってきた。このことは、宇宙実験で得た高品質結晶を用い、従来よりもより高精細な構造解析が多くのタンパク質に対して適用できるようになり、構造解析分野に新しい展開をもたらしていることを示している。我々は現在MoProの習熟に取り組んでおり、近い将来、我々の手でこのような構造解析が可能となることを目指している。

## 5. 最後 に

JAXA (NASDA)-GCF宇宙実験では、X線構造解析向けタンパク質の結晶生成に関して、技術開発やその有用性の検討を進めてきた。しかしながら、最終的に有用な構造解析結果をより確実に得るためには、結晶生成だけでなく結晶生成・構造解析に関わる上流から下流までの総合的な技術として向上させる必要があり、様々な技術の向上を図



Fig. 9 Pilatus 6 M in Swiss Light Source (© PSI/SLS).

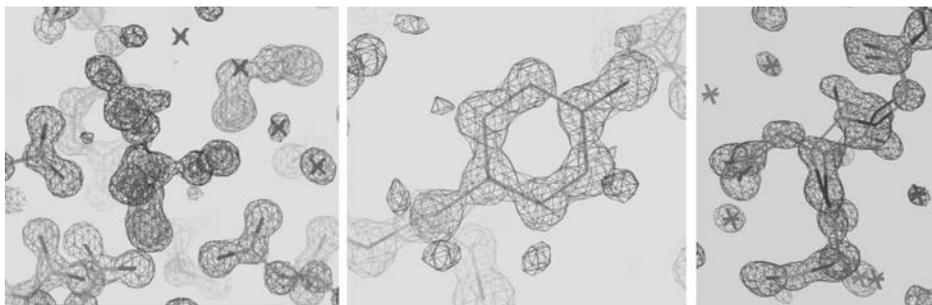


Fig. 10 Electron Density Map of alpha-Amylase (Maximum resolution 0.92 Å).

ってきた。結果として、タンパク質 X 線構造解析という総合技術の進展に宇宙実験技術は大いに貢献することとなってきている。

このような事例は、宇宙実験が実施されている他の研究対象でも多かれ少なかれ経験されているところかと思われる。宇宙実験の成果を問われた際に、実際の実験で得られた狭義の「役に立つ成果」にだけ関心が集まるが、宇宙実験をきっかけに関連する分野の技術向上にいかに関与したかという点についても、評価いただきたいところである。

### 謝辞

宇宙実験のためにロシアサービスモジュールと打上げ/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、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. Garcia-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。「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。高圧凍結装置の作製にあたり、アメリカのコネル大学 Gruner 教授、Kim 博士に感謝いたします。MoPro の習得にあたり、フランスのナンシー大学 Lecomte 教授、Jelsch 博士に感謝いたします。また、SPring-8 大型放射光施設の使用にあたり、高輝度光科学研究センター (JASRI) に感謝い

たします。スイス放射光施設 SLS の使用に当り Paul Scherrer Institut (PSI) 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) 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.
- 3) <http://www.cbse.uab.edu/index.htm>
- 4) Chayen, N. E. et al.: *J Cryst. Growth*, **171** (1997) 219-225.
- 5) J. M. Garcia-Ruiz and A. Moreno: *Acta Cryst.*, **D50** (1994) 484.
- 6) J. M. Garcia-Ruiz, L. A. Gonzalez-Ramirez, J. A. Gavira and F. Otalora: *Acta Cryst.*, **D58** (2002) 1638.
- 7) H. Tanaka, K. Inaka, S. Sugiyama, S. Takahashi, S. Sano, M. Sato and S. Yoshitomi: *J. Synchrotron Rad.*, **11** (2004) 45.
- 8) M. Yamanaka, H. Tanaka, S. Takahashi, K. Inaka, A. Nakagawa, M. Sato, T. Kobayashi and T. Tanaka: *The 9<sup>th</sup> Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan Abstract Book* (2009) 119.
- 9) M. Matsushima and K. Inaka: *The 7<sup>th</sup> Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan* (2007) 2P-113.
- 10) K. A. Kantardjieff and B. Rupp: *Protein Science*, **12** (2003) 1865.
- 11) C. U. Kim, R. Kapfer and S. M. Gruner: *Acta Cryst.* **D61** (2005) 881.
- 12) C. Jelsch, B. Guillot, A. Lagoutte and C. Lecomte: *J. Appl. Cryst.*, **38** (2005) 38.

(2010年3月25日受理)