

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

第5回宇宙実験向け説明資料（個別利用者向け）

平成 16 年 8 月 23 日

独）宇宙航空研究開発機構

1. 目的

「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」は、平成 14 年度から平成 17 年度の間、蛋白質結晶生成のための宇宙実験機会を確保し、国際宇宙ステーション（ISS）を利用した高品質な蛋白質結晶生成に関わる技術開発、プロセス及びその実施体制を整備し、それを利用して得られた蛋白質結晶を利用機関の蛋白質構造・機能解析に供することで、微小重力環境の結晶生成プロセスへの有効性を実証するとともに、併せて微小重力の利用のノウハウを蓄積することを目指しています。

また本プロジェクトを通じて、JEM 利用フェーズにおける蛋白質結晶生成ニーズに応えられる体制・制度の確立を目指しています。

このため、独）宇宙航空研究開発機構(JAXA)は利用いただく利用者（各機関・組織）と、宇宙における高品質な蛋白質結晶の生成に関する共同研究契約等を締結してこのプロジェクトを実施致します。

2. 実験機会と宇宙実験の概要

JAXA では平成 14 年度下期より、概ね半年おきに 6 回、蛋白質結晶生成向け宇宙実験機会を確保、提供しています。第 1～4 回目につきましては、概要は以下の通りです。

	第 1 回宇宙実験	第 2 回宇宙実験	第 3 回宇宙実験	第 4 回宇宙実験
打上日	02/02/2003	29/08/2003	29/01/2004	11/08/2004
射場	Baikonur (Kazakhstan)			
輸送ロケット	Progress			
帰還	03/05/2003	28/10/2003	29/04/2004	19/10/2004 (予定)
着陸地点	Kazakhstan			
帰還宇宙船	Soyuz			
飛行帰還	13 weeks	9 weeks	13 weeks	9 weeks
搭載容器	GCF2 個	GCF3 個	GCF3 個	GCF2 個 JCF1 個
GCB 容器数	46	69	69	58
保温剤入 GCB 数			12	18
JCB 数				9
搭載試料数	GA 法 : 46	GA 法 : 49 GT 法 : 20	GA 法 : 22 GT 法 : 35	GT 法 : 28 シリンジケース : 45
搭載場所	Russian Service Module	CGBA	CGBA	TBU, Kryogen-3M

注：GA 法は、オリジナルの Gel Acupuncture 法です。GT 法は、Gel-Tube 法です。シリンジケース

はGT法を高密度化したものです。第3回宇宙実験のGA法にはESAの試料が7つ含まれます。CGBAは米国モジュール内のインキュベータです。TBU、Kryogen-3Mはロシアサービスモジュール内のインキュベータです。

本プロジェクトの第5回宇宙実験につきましては、日程が以下のように予定しています。

- ・ 平成17年2月初め打上げ、4月末回収予定

打上げはロシアの無人宇宙船「プログレス補給船」を利用します。2～3か月の宇宙滞在後、同じく有人宇宙船「ソユーズ宇宙船」で帰還します。

実験装置はこれまでの経緯から、欧州宇宙機関（ESA）とスペイン・グラナダ大学が開発した結晶化容器Granada Crystallization Box（GCB）を使用します。結晶化方法は標準的にはその後JAXA/JSUPにて開発したGel-Tube法を用います。また一部GCB容器には、Gel-Tube法を高密度化して実装できるシリンジケースを搭載します。シリンジケースには個別に条件設定できるGel-Tube法のキャピラリーを5～6本装填できます。GCBあたりシリンジケースを2個、11本のキャピラリーを装填できます（このタイプをJapanese Crystallization Box（JCB）と称します）。

Gel-Tube法のGCB容器には、基本的な使い方では1種類の蛋白質が搭載可能です。JCBでは2～6種類搭載可能です。GCBもしくはJCBはGranada Crystallization Facility（GCF）と呼ばれるアルミ製コンテナもしくは、JAXA開発の真空容器型コンテナ（JCF）に格納して打ち上げ、宇宙ステーションに搭載します。GCF1個あたり最大23個のGCBが搭載可能です。またJCF1個あたり最大12個のGCBが搭載可能です。

宇宙実験の前後を含めた温度の安定性を向上させる目的で、第3回宇宙実験では相転移を利用した保温剤（アルカン類）を一部搭載しています。また第4回宇宙実験では、GCFに真空断熱材を追加したものの、ならびに真空容器型のJCFも機能検証のため打ち上げています。第5回宇宙実験ではこれらの結果を踏まえた搭載方式に最終的にいたします。

GCBは、液・液拡散（Counter Diffusion）法を用いた結晶化装置です。沈殿化剤ならびに蛋白質の拡散時間が遅いため、地上で試料を充填し拡散を開始させた後、軌道に運び、2～3か月の軌道上滞在期間中に結晶を生成させます。特に軌道上で宇宙飛行士がGCB/JCBを操作することはありません。GCB/JCBは約20に保たれた国際宇宙ステーション（ISS）内のインキュベータもしくはロシアサービスモジュール船内に保管されます。後者の場合特に温度制御等は行われませんが、ISSに不具合等が発生しなければ、20～25が維持されます。なお、打ち上げならびに、帰還時には恒温箱に格納する等により、極力温度変化がないようにしております。

3. 共同研究契約と実験の実施

宇宙実験の搭載決定後、利用者とJAXAの間で共同研究契約等を締結させていただきます。

申し込みに際して提出いただくデータにつきましては、JAXAでは機密の保持等万全の注意を払って

取り扱いますが、必要があれば機密保持に関する契約もしくは覚書を結ばせていただきます。基本的な役割分担は、以下の通りです。

- ・ JAXA：宇宙における高品質な蛋白質結晶の生成及び関連する地上支援作業（手続き等）
- ・ 利用者：結晶生成に必要な蛋白質試料の準備、結晶化条件の検討及び生成した結晶の評価

実際の実験分担については別紙 1 の通りです。JAXA で分担実施した作業の状況については、別途ご報告させていただきます。また JAXA 分担作業の費用、ならびに打上げに関わる費用は JAXA が負担いたします。

4. 知的所有権等について

本プロジェクトで得られた成果は、原則として共同研究の役割分担に応じて設定します。具体的な取り扱いにつきましては、貢献度を考慮し、個別に事前調整させていただきます。

なお、本プロジェクトで生成した蛋白質結晶を利用した構造解析による蛋白質の構造・座標等に関するデータは、利用者の専門範囲であることから、JAXA（再委託先を含む）等が権利を主張することはありません。

5. 情報の開示

必要に応じ、予め利用者と JAXA との間で秘密保持が必要な事項を特定し、その内容にアクセスする人数を最小限とすること等の秘密保持を一定期間行うことができます。また、秘密保持契約等を締結することも可能です。秘密保持が必要なデータは秘密として取り扱い、利用者の了解なしに開示することはありません。但し、以下に示すデータは例外とさせていただきます。

- ・ 蛋白質の名称（搭載の安全性判断のため RSC エネルギア社に提出する安全性データに必要。他との識別が可能な程度の略号でもよい）
- ・ 蛋白質の生物学的機能（搭載の安全性判断のため RSC エネルギア社に提出する安全性データに必要。未知の場合は推測でよい）
- ・ 蛋白質の安全性の利用者による保証（搭載の安全性判断のため RSC エネルギア社に提出する安全性データに必要）
- ・ 輸出に当たって戦略物資に該当しないことの利用者による証明（蛋白質をロシアに輸出する際、外為法、輸出貿易管理令の定めに従い戦略物資に該当しないことの証明が必要）
- ・ 蛋白質の特記すべき特長（膜蛋白質である等。ただし不都合がある場合は秘匿可能）

宇宙実験ならびに地上確認実験にて得られた結晶を用い、回折データ取得が行えた場合、品質等に関わる以下のデータ(Raw Diffraction Data)の、報告をお願いいたします。この際、できれば同一の実験条件での測定、解析もお願いします。これらは今後の JAXA の蛋白質結晶生成宇宙実験に必要な基礎データとして利用させていただくほか、宇宙開発委員会等に報告させていただきます。ただしこれらは、公開までの間は秘密として取り扱います。

- ・ Full sphere resolution range, R merge value, R symm value, completeness(%), I/sigma(I)

- ・ Highest sphere resolution range, R merge value, R symm value, completeness(%), I/sigma(I)
- ・ Mosaicity

この他、結晶化に関わる以下のデータは搭載の検討に際し参考に致しますので、ご提供をお願いいたします。

蛋白質の分子量

利用者での在来法での結晶化条件とその状況

蛋白質試料の性状に関する状況 (SDS 電気泳動、Native 電気泳動、DLS 等)

また、今後の JAXA の蛋白質結晶生成宇宙実験に必要な基礎データとして、上記、
、
の他、以下の ~ の情報を蓄積させていただきます。これらは、秘密として取り扱い、利用者の了解なしに開示することはありません。また、
~ の情報は JAXA から利用者に無償で提供させていただきます。

GCB 向け結晶化条件、地上での結晶生成時間経過、光学観察像、結晶化状況

宇宙実験での結晶化状況、光学観察像

また、今後の宇宙環境利用システムの改善を図るため、以下のご提出をお願いいたします。

構造解析における宇宙生成蛋白質結晶の貢献程度についての共同研究者の所見

JAXA では宇宙実験にかかわる技術開発成果として、蓄積したデータの一部もしくは統計値を蛋白質や利用者が特定されない形で、ESA 等に対して、あるいは学会等で発表する場合がございます。あらかじめご了承くださいませようをお願いいたします。尚、GCB/GCF の利用は ESA との協定に基づき始められたものですので、利用者のご理解をお願いいたします。

6. 成果の発表

共同研究者が本プロジェクトで作成した結晶を利用して研究成果を公表する場合には、本プロジェクトの成果であること、ESA/グラナダ大学及びロシア連邦宇宙局のロシアサービスモジュールを利用した旨の謝辞を入れていただくようお願いいたします。以下の定型文をご参照下さい。

本研究の一部は、独) 宇宙航空研究開発機構が実施している「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」の一環として行ったものである。また宇宙実験に際し、ヨーロッパ宇宙機関(ESA)とスペインのグラナダ大学が共同で開発した GCF(Granada Crystallization Facility) およびロシア連邦宇宙局(Federal Space Agency)が開発したロシアサービスモジュールを使用した。

This study is contributed by a part of "High-quality Crystallization Project on The Protein Structure and Function Analysis for Application" promoted by JAXA (Japan Aerospace Exploration Agency).

GCF(Granada Crystallization Facility) that had been developed by ESA(European Space Agency) and Univ. of Granada was used for the protein crystallization, and Russian Service Module developed by Russian Federal Space Agency was used for space experiment

7. 利用者窓口

本プロジェクトに関する利用者対応等の窓口は、10月8日までは今までどおり財)宇宙環境利用推進センターに、それ以降は、財)日本宇宙フォーラム(J S F)が業務を引き継ぎます。住所、連絡先、電話、E-Mail アドレス等は変わりますが、担当者は変わりませんので、予めご了解いただけますようお願いいたします。尚、J S Fへ移行後の連絡先等は、改めてお知らせいたします。

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

第5回宇宙実験の実施方針

平成16年8月10日
独)宇宙航空研究開発機構

1. 対象蛋白質試料について

別紙2に示すように、これまでの本プロジェクトの宇宙実験結果から、以下のような事例が得られています。

- ・ 地上実験では微結晶しか得られなかった試料からX線回折可能な単結晶が得られた
- ・ 地上実験ではクラスター状結晶しか得られなかった試料からX線回折可能な単結晶が得られた
- ・ 地上実験に比べ有意に分解能が向上した
 - 特に分解能が1台前半だったものが0.9を切る分解能になった例が2例ある

このような状況を踏まえ対象とする蛋白質試料は、下記の理由で利用者のこれまでの取り組みで構造解析に成功していない、あるいは特に宇宙実験を希望するものを想定しております。

- ・ 微結晶、針状、薄板状、クラスター状結晶等、回折実験に十分な単結晶が得られない
- ・ 高分解能結晶が得られない、または回折結果が良くないため十分なデータセットが得られない
- ・ すでに構造解析が進んでいるが、さらに超高分解能を目指したい
- ・ その他、特に宇宙実験を希望する場合

リガンドや阻害剤との複合体等につきましては、それぞれ個別の蛋白質試料として取り扱わせていただきます。また、これまでの宇宙実験で良質な結晶が得られなかった場合でも、改善の可能性が見込まれる場合には、再実験の提案が可能です。

2. 役割分担

データシート提出時には、結晶が得られると見込まれる結晶生成条件の情報を提出いただき(9月24日締め切り)、その後利用者側で結晶化条件の検討をGel-Tube法にて実施していただきます。12月15日頃に結晶生成状況を確認いたしますので、もし結晶化条件が確定できている場合には搭載候補とさせていただきます。この際、確定した結晶化条件はデータシート提出時の見込みの結晶化条件の範囲内とさせていただきます。データシート提出時には必ずしも結晶生成条件が確定している必要はありません。JAXA(委託先)にて行う作業は以下の通りです。

- ・ データシート情報をもとに、宇宙実験に必要な、文書作成や諸手続きを行います。
- ・ GCBを利用した結晶化条件の検討方法についてユーザへの説明と技術情報の提供等を行います。
- ・ 利用者側での結晶化状況を確認の上、搭載候補といたします。
- ・ 宇宙実験向け試料(地上確認実験用を含む)を集積します。

- ・ 蛋白質試料を射場に輸送し、射場作業（実験準備）を行い打ち上げます（宇宙実験）。
- ・ バックアップ用試料を用い、地上対照実験を実施します（地上確認実験）。
- ・ 宇宙から帰還後の結晶を日本まで輸送し、結晶化の状況の確認を行います。
- ・ X線回折実験が可能な単結晶についてはSPRING-8等放射光実験設備での回折データ取得の準備作業（結晶取り出し、凍結等）の支援を行います（帰還後作業）。
- ・ 残りの試料等は利用者に返却いたします。

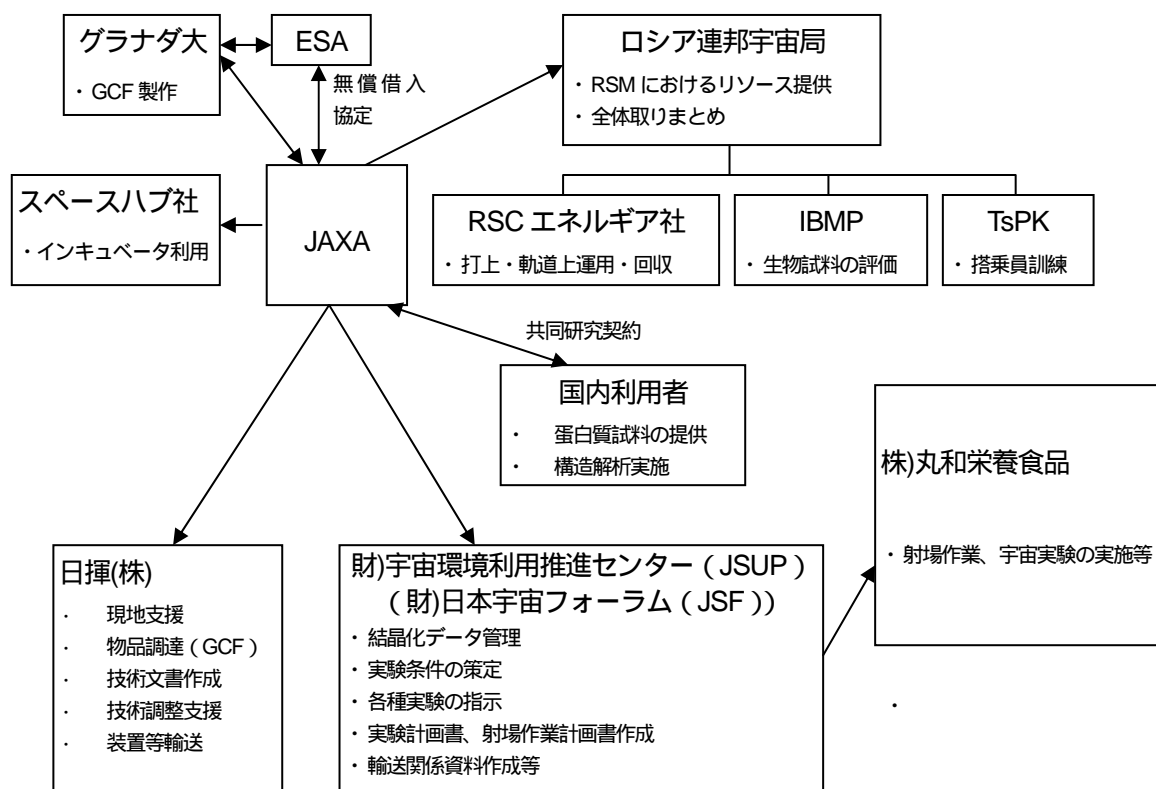
上記作業のうち、特に回折データの取得支援に関しましては利用者と別途調整させていただきます。

なお、Gel-Tube 法に関しては、(財)宇宙環境利用推進センターより結晶化キットを発売しておりますので、必要があればご利用下さい。

結晶化条件の検討および回折データの取得に関して、外部に委託し実施することも可能ですので、必要があれば、個別にご相談ください。

2.1. 実施体制

宇宙実験関連の地上支援作業は以下のように、JAXA の業務委託で、(財)宇宙環境利用推進センター（JSUP）ならびにその再委託先の(株)丸和栄養食品が担当します。



3. 宇宙実験実施手順

3.1. 候補蛋白質の申し込み

利用者より候補蛋白質を申し込みいただきます。この際、試料蛋白質に関する情報もお教えいただき

ます。

宇宙実験の場合、毒性、病原性のある蛋白質試料は使用できません。以下の4点について確認いただき、蛋白質試料の毒性がないことを利用者側で保証いただきますよう、お願いいたします。

1. 対象蛋白質に関して：対象蛋白質には毒性、病原性が無いことが保証されている。
2. 原材料に関して：原材料とした生物種（E.coli 等）は、毒性ならびに病原性を獲得する可能性がないことが保証されている。
3. 製造工程に関して：製造は、毒性物質ならびに病原性微生物の混入の無い製造工程を経ていることが保証されている。
4. 危険・毒性物質の混入に関して：上記1、2、3、またその後の最低限の品質検査（電気泳動で単一ピークを呈すること等）により、病原性ならびに毒性物質の混入が無いことが保証されている。

JAXA では利用者からの情報をもとに、国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センターにて安全性の確認をさせていただきます。

また同様に、毒性、病原性等のある試薬類は使用できません。利用者よりいただいた情報をもとに JAXA にて MSDS 等で安全性を確認の上、ロシア側と調整いたします。調整終了後に試薬の追加や、当初の濃度以上の試薬を使うことはできませんので、データシートの「これまでの実験条件」のデータを基に、JSUP にて割り増しした量、濃度でロシアへ提示させていただきます。申し込み後に利用者側で更なる条件検討を行い、溶液組成を変更する可能性がある場合には、想定される試薬をすべて、「宇宙実験向けの結晶化条件について/溶液組成に関する特記事項」に想定される最大濃度で記載くださいますようお願いいたします。

蛋白質をロシアに輸出する際、外為法/輸出貿易管理令の定めるところにより、戦略物資に該当しないことを証明する必要があります。利用者にて確認いただきますよう、お願いいたします。

蛋白質試料の純度、安定性、結晶生成の再現性は、宇宙実験で良質な結晶を得る上で非常に重要です。経験的には、これらに問題のある試料から良好な回折データが得られる結晶が生成することはあまり期待できません。なお蛋白質試料の純度、安定性、結晶生成の再現性や精製ロットごとの結晶性の差等につきましては、利用者の方で管理いただきますよう、お願いいたします。また、実験の申し込みに当たり、蛋白質試料の性状についてデータ（SDS-Page 電気泳動、Native-Page 電気泳動、DLS 等）を提出していただきます。これらのデータの取得に関して、外部に委託し実施することも可能ですので、必要があれば、個別にご相談ください。

申し込み手順につきましては、以下のようにお願いいたします。

1. お渡しいたします専用 Excel シートを用い、候補蛋白質に関わる事項、データ等を記入願います。
 - ・ Excel のファイルに記入する形になります。この際、化合物名は、ドロップダウンメニューで選択できる標準名でお願いします。

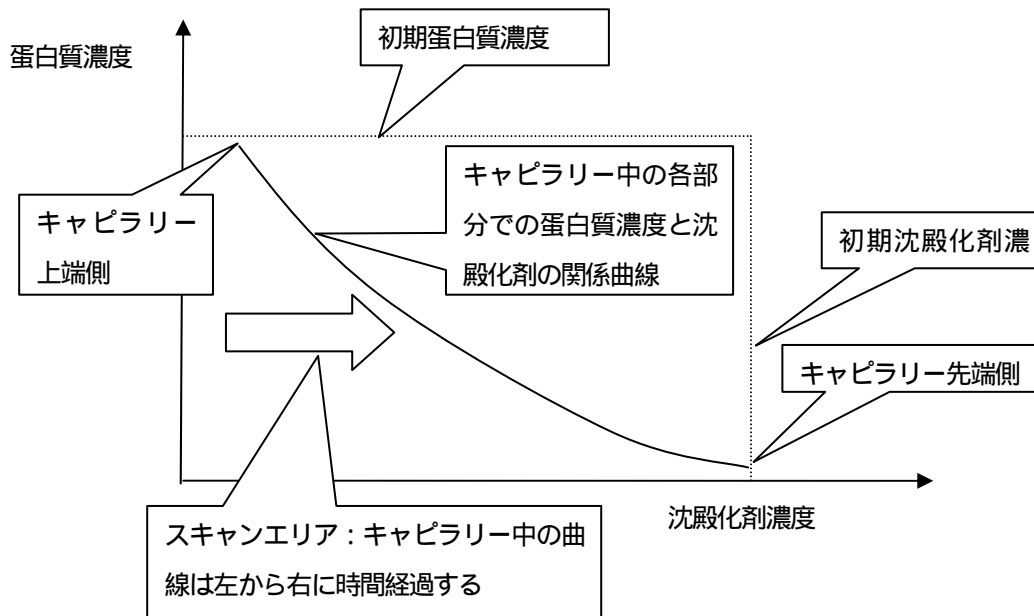
- ・ 1つのファイルは最大 10種の蛋白質に対応可能です。複数記入する際には、シートをコピー願います。ファイル中に用意されているシート1つに、1実験条件ずつ記入願います。
 - ・ ファイルの名前は、利用者の方で識別しやすい名前に変更願います。
 - ・ 10種以上の蛋白質を記入する場合には、もう一つ別の名前のファイルを作成してください。
2. 記入できましたら、Excelのファイルを電子メールにてJSUP担当者までご送付ください。
 3. また、毒性・病原性がないことの保証、ならびに戦略物資非該当の証明につきましては、シートを印刷し、シート下のサイン欄に直筆でサインの上、JSUP担当者まで郵送下さい。
 4. 3項のシートと合わせて、蛋白質試料の性状に関するデータ（SDS-Page 電気泳動、Native-Page 電気泳動、DLS等）をJSUP担当者まで郵送下さい。
 5. ファイルを受領しましたら、「蛋白質データシート受領書」をJSUP担当より電子メールにてお送りいたします。JSUPにてシートごとに固有の受付番号を付けさせていただきます。以後の対応は受付番号により行います。
 6. JSUP担当の連絡先は以下のとおりです。
〒169-8624 東京都新宿区西早稲田 3-30-16
TEL: 03-5273-2442 FAX:03-5273-0705
宇宙実験推進部 山中亜利 (yamanaka-a@jsup.or.jp) 山中麻里 (yamanaka@jsup.or.jp)
 7. また技術的なお問い合わせは同じくJSUPで対応いたします。
宇宙実験推進部 田仲広明 (PXW01674@nifty.ne.jp)

3.2. 1次調整

申し込みの際にいただいた情報を元に、安全性等を確認し、宇宙実験に適するかどうかご連絡いたします。なお、宇宙実験（含む地上確認実験）での搭載方式と使用する試料の量、濃度の考え方は以下のとおりです。

3.2.1 試料濃度・試料量の考え方

カウンターディフュージョン法の特性として、いわゆる結晶生成条件を表す相図上で、キャピラリーに充填した蛋白質濃度と、外液の沈殿化剤濃度で囲まれた領域のかなりの部分をスキャンします。ただし、沈殿化剤の拡散係数が小さくなるほど相図上の右上に、スキャンされていない領域が残る傾向があります。



このため、例えば通常の蒸気拡散法（蛋白質溶液と沈殿化剤溶液を1：1で混ぜる）で結晶が生成し始めるのは通常、上図の右上の三角形のエリア内ですので、それと同等の結晶化条件を数週間以内に実現させるためには、望ましくは蛋白質溶液、沈殿化剤溶液それぞれの濃度を2倍にするのが良いと考えられます。

(1) 蛋白質試料の濃度について

このように高濃度の蛋白質溶液が用意できることは、条件検討の上からは好ましいのですが、試料の濃縮操作では試料の損失を伴います。試料量が少ない場合、損失は極力避けたいところです。また濃縮に関わる作業は手間が大きく、沈殿を生成しやすくなるという問題もあります。このため本プロジェクトでは利用者で調製された蛋白質試料を濃縮する実験操作は行わないこととしています。

(2) 沈殿化剤の濃度について

沈殿化剤濃度に関しては、相図上のスキャンするエリアを広げる観点から、1.5~2倍程度高濃度の溶液を準備することが望ましいと考えています。この際、濃度を変えるのは沈殿剤として働く試薬のみを想定します。例えば、これまでの利用者側での蒸気拡散法での結晶化条件検討で、適当な沈殿化剤溶液組成が「10% PEG8000、100mM 酢酸ナトリウム、2mM 塩化カルシウム」の場合、準備いただく溶液組成は「20% PEG8000、100mM 酢酸ナトリウム、2mM 塩化カルシウム」です。PEG等沈殿化剤が溶けにくく2倍濃度にならない場合は、溶解しうる最大濃度で作成します。

3.2.2 搭載方式

実際の搭載に当たっては、利用者での結晶化条件の絞込み結果等を元に、以下に示します結晶化方式

の特性と試料量を勘案しつつ、いずれかの方式で宇宙実験を実施いたします。

方式	GCB GT (Gel-Tube) 法	JCB GT 法 (予定)
キャピラリー	リングキャップス 内径 0.5mm	リングキャップス 内径 0.5mm
試料長	~ 60mm	~ 40mm
蛋白質試料量	~ 12 μ l	~ 8 μ l
本数	標準 6 本 (最低 2 本)	2~6 本 (最低 2 本)
拡散バリア	1%アガロースゲル入 シラスコンチューブ 内径 1mm	1%アガロースゲル入 EVA チューブ 内径 1.2mm
外液容器	GCB 容器	JCB 容器
外液容量	~ 10ml	~ 150 μ l/各キャピラリーにつき
結晶生成までの時間	早い (数日 ~ 3 週間)	ゲルの組成で調整を想定 3 日程度 ~ 数週間)
最大沈殿化剤濃度	外液のほぼ 99%	外液の 90%程度
宇宙実験状況	JAXA-GCF#2~4 で実績あり。溶液漏 れ起きにくく、確実性の高い方法	JAXA-GCF#4 で実績あり。多条件に 対応できるため、結晶化条件を振る 目的によい。

3.2.3 蛋白質試料量

(1) 標準的な操作の場合の蛋白質試料量見積りの考え方は以下のとおりです。宇宙実験と地上確認実験 (バックアップ)

1. JCB の場合

- 1) 試料容量はキャピラリー1本につき、~ 8 μ l
- 2) 2~6本のキャピラリーを使用
- 3) 地上確認実験 (もしくはバックアップ) を含め、2倍量用意する

2. GCB の場合

- 1) 試料容量はキャピラリー1本につき ~ 12 μ l
- 2) 2~6本のキャピラリーを使用
- 3) 地上確認実験 (もしくはバックアップ) を含め、2倍量用意する

したがって必要蛋白質試料量は以下の通り。

宇宙実験と 地上確認実験 (含: バックアップ)	蛋白質試料溶液量
JCB の場合	32 ~ 96 μ l
GCB の場合	48 ~ 144 μ l

(2) 蛋白質送付試料についてまとめ

2割くらいの余裕を見るとすると以下ようになります。

	蛋白質試料溶液量
宇宙実験と地上確認実験向け	
最小量 (JCB キャピラリー2本) のケース	~ 40 μ l
最大量 (GCB キャピラリー6本) のケース	~ 170 μ l

試料搭載は打ち上げ約 1 ヶ月前に決定されることから、宇宙実験分（地上確認実験を含む）を搭載決定後ご送付頂きます。その際、一般論としては条件検討の際使用したロットと異なる試料ロットでは結果に差があることが想定されますので、できれば同じロットを分注して頂くことがベストと考えております。ただし、この点につきましては精製量や保存による劣化や、各利用者の考え方にもよりますので、適宜ご判断いただきたく思います。

3.2.4 沈殿化剤、バッファ溶液の必要量について

沈殿化剤、バッファ溶液の必要量に関しては以下の通りです。なお、沈殿化剤溶液は通常の蒸気拡散法等で使用されている沈殿化剤の濃度のみ2倍程度の濃度を想定します。

ゲル前処理

Gel-Tube で使用するゲルは純水で調製するため、Gel-Tube をキャピラリーに装着する際、蛋白質試料溶液の端の部分で化学的条件が急に变化して悪影響が生じる場合があります。これを極力抑えるため、宇宙実験および地上確認実験に先立ち、ゲルを平衡化します。バッファのみもしくは沈殿化剤を希釈して使用します。

宇宙実験と地上確認実験 ゲル前処理	沈殿化剤溶液量	バッファ溶液量
JCB の場合	~ 5ml	~ 5ml
GCB の場合	~ 10ml	~ 10ml

条件絞込み実験の結果から定めた沈殿化剤濃度を、沈殿化剤のみもしくはバッファで希釈して使用します。

宇宙実験と地上確認実験	沈殿化剤溶液量	バッファ溶液量
JCB の場合	~ 10ml	~ 10ml
GCB の場合	~ 20ml	~ 20ml

(1) 溶液量まとめ

沈殿化剤溶液ならびにバッファ溶液に関しては蛋白質試料溶液送付時にまとめていただくことを想定します。この際、GCB に搭載するケースを考えると、以下のようになります。

	沈殿化剤溶液量	バッファ溶液量
送付全量	~ 40ml	~ 40ml

なお、沈殿化剤あるいはバッファ溶液を上記の量、準備するのが難しい場合等につきましては別途ご相談いただきたくお願いいたします。

3.3. 搭載候補の調整

利用者での Gel-Tube 法を用いた結晶化条件検討実験の結果により、宇宙実験に搭載するか検討いたします。結晶生成が確認され、結晶化条件が絞り込まれた場合には搭載候補になります。搭載候補につきましては、宇宙実験向け試料の受け渡し票をお送りしますので、利用者にて蛋白質試料溶液をご準備ください。受け渡しの日程、送付先は別途連絡いたしますので、宅配便等で送付いただきます。

蛋白質試料溶液は条件絞込み実験の場合と同様、そのまま実験に供します。受領した溶液量に応じ、最終的なキャピラリー本数を調整します。なお試料は原則氷温もしくは常温（20℃）輸送です。

宇宙実験の条件は、充填後 1～3 週間程度で結晶が生成し始めるように調整願います。もし確実に結晶生成開始までに 3 週間以上かかる場合には、日本国内で事前に充填し輸送します。

3.4. 宇宙実験・地上確認実験の実施

確定した条件で宇宙実験を行います。宇宙実験に必要な諸手続き、書類の作成等はあらかじめ JAXA にて対応いたします。また、打ち上げに向けた試料輸送、射場での試料充填作業、残試料の国内への輸送も対応いたします。

輸送に当たっては、宇宙実験用試料とバックアップ用試料を射場まで運びます。もしトラブル等が発生し、打ち上げが遅延した場合には、バックアップ試料を使用して充填を行い、これにより宇宙実験を行います。先に充填した試料は地上確認実験分として持ち帰ります。もしバックアップ試料を使用しなかった場合には、地上確認実験は宇宙実験の充填後に充填します。

宇宙実験から帰還した結晶（試料）は、JAXA にて日本に輸送し、開梱作業後、外観検査、光学観察等を行い、結晶生成状況をご連絡いたします。利用者への試料の引渡しは、（1）JAXA 筑波宇宙センターでの引き渡し、（2）利用者へのお届け、もしくは（3）回折データ取得時にビームラインで引き渡しのいずれかで事前に調整させていただきます。なお地上確認実験試料も、合わせてお渡しいたします。

3.5. 結晶の取り出し、凍結、解析

宇宙実験で結晶が生成できた場合、JAXA では放射光実験施設での回折データ取得に関する準備作業として結晶の取り出し、凍結等の支援を行うこととしております。

詳細については回収後、利用者調整させていただきます。

尚、回折データの取得に必要な、放射光実験施設の利用時間等は、利用者側で確保頂けますようお願いいたします。

3.6. 結果の報告

良好な回折データが取得できた場合、以下の統計値を、帰還後 3 か月程度をめぐりにご報告いたします。

- ・ 空間群、格子定数
- ・ Full sphere resolution range, R merge value, R symm value, completeness(%), I/sigma(I)
- ・ Highest sphere resolution range, R merge value, R symm value, completeness(%), I/sigma(I)
- ・ Mosaicity
- ・ 結晶の大きさ
- ・ 構造解析における宇宙生成蛋白質結晶の貢献程度についての共同研究者の所見

この際、できれば同一の実験条件（ビームライン、波長、カメラ距離、検出器、結晶サイズ等）で回折データを取得し、同一の条件でデータ解析をして、両者の比較がより厳密に可能なデータの取得もお願いいたします。

4. 参考情報

蛋白質試料についての望ましい条件は以下のとおりです。

4.1. 不純物になるべく少ないこと

宇宙実験では微小重力環境により、成長中の蛋白質結晶周辺に不純物の欠乏層が形成され不純物の取り込みが抑制されてよりディスオーダーの少ない結晶が生成するといわれています。しかしながら、この効果はあくまでももとの不純物量が少ない場合にこそより有効であろうと考えられます。このため、できる限り不純物の少ない蛋白質試料を調製いただきたくお願いいたします。

不純物のチェックに関しては、SDS-Page 法だけでなく、Native-Page 法による分析を推奨します。この方法では、何らかの原因による蛋白質分子の表面荷電の差を検討できますが、これによる分析結果が単一バンドであるかどうかは良質な結晶を生成する上で重要な指標となります。また、DLS（動的光散乱）法による検討で、蛋白質分子の粒径分布がシャープであることも重要な指標になります。

本プロジェクトのこれまでの経験から、SDS-Page ならびに Native-Page 電気泳動でシャープなシングルバンドが得られていない試料から、良質な結晶が生成することはあまり期待できません。むしろ純度が高く地上で良好な結晶を生成する試料から、宇宙実験で更に高分解能の結晶を生成しています。

4.2. これまでの地上実験で、結晶が生成しそうな溶液条件がある程度絞り込まれていること

本プロジェクトでは、未知の結晶化条件の探索は想定していません。結晶生成の可能性のある溶液条件を利用者より教えていただき、それをもとに結晶生成条件を絞り込みます。

4.3. 20℃で結晶が生成すること

宇宙実験の温度環境は約 20℃です。この温度での結晶生成が見込めない試料は現在受け付けていません。ただし他の温度環境についてももしご要望がある場合には、将来に向けてご一報ください。

4.4. 20 で数ヶ月間、蛋白質が安定であること

カウンターディフュージョン法の場合、沈澱化剤を含まない状態の蛋白質試料溶液を長期間キャピラリー中に保持した状態となります。このため、この状態で数ヶ月間、蛋白質試料溶液が変性しないことが重要です。DTT の添加等による安定化をお願いします。ただしこれまでの実験で、調製後直ちにバッチ法や蒸気拡散法での実験を開始すれば変性することなく結晶が生成するような試料は、例えば沈澱化剤を含まない（あるいは塩強度の低い）状態では不安定だが若干量の沈澱化剤（もしくは塩等）で安定化することが想定されます。このような場合には若干量の沈澱化剤（もしくは塩等）を添加し、安定化するような対策をお願いします。個別の問題点、条件につきましてはご相談下さい。

4.5. カビ等の発生防止

試料の調製に際しては、防カビのため若干の防腐剤の添加をお願いします。なおこの防腐剤につきましては精製工程で添加したものが残留することを想定しますので、溶液組成に必ずしも記入する必要はありません。

4.6. 沈澱化剤

PEG 系沈澱化剤は溶液の粘性が高くなるため、微小重力環境での蛋白質欠乏層や不純物欠乏層の効果による結晶の品質向上がより期待できます。実際、これまでの本プロジェクトの宇宙実験結果でもこのような傾向が認められています。このため、もし結晶生成条件に関し、塩類、有機系と PEG 系の選択になった場合には、PEG 系を利用されることをお勧めします。どうしても塩類、有機系が必須の場合、JAXA にて PEG を添加した結晶化条件の探索を行います。

4.7. 沈澱化剤ならびにバッファの組成について

カウンターディフュージョン法の原理からして、沈澱化剤溶液の組成は、蛋白質溶液の組成と蛋白質ならびに沈澱化剤成分以外同一であることが望ましいです。同様にバッファ溶液の組成は、蛋白質溶液の組成から蛋白質成分以外同一であることが望ましいです。このため、従来蒸気拡散法で使用した溶液組成が必ずしも適当でない場合がありますのでご注意ください。pH が大きく異なるケースや酸化防止剤やディタージェントの添加等につきご注意ください。

5. 日程

おおよその日程は以下の通りです。（以下暫定）

9月3日から

利用者に説明資料およびデータシート記入ソフトを配布します。

9月24日まで

データシートの受付締め切りです。JSUP では、データシートの内容に基づき、安全性評価資料を作成し、ロシア側に提出します。また、ロシア通関手続のための資料を作成します。また9月30日くらいまでに一次調整します。

12月15日頃

利用者での結晶生成条件の絞込み状況を確認します。

12月20日前後

宇宙実験搭載候補蛋白質を決定します。

1月13日まで

宇宙実験向け試料（地上確認実験用を含む）をお送り下さい。

1月25日頃

射場に向けて蛋白質試料ならびに沈殿化剤溶液をロシアに輸送します。

2月はじめ

第5回宇宙実験の打ち上げ予定です。

4月末

回収予定です。

7月末

結果の一次報告をお願いします。

(別紙2)

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

これまでの主要な実験成果

平成16年8月10日

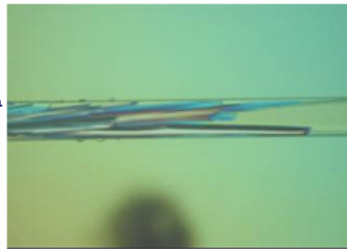
独)宇宙航空研究開発機構

1. アルファアミラーゼの高品質結晶の生成

JAXA 技術開発として搭載しているアルファアミラーゼでは、PEG8000 を沈殿化剤に使用した場合、地上実験ではクラスター状の結晶になりやすく、単結晶を得ることは難しい。唯一、シーディングにより若干の単結晶を得ることが出来ている。これに対し、宇宙実験では容易に単結晶を得られたほか、回折分解能や回折データの統計値が向上した。測定系の都合で1.0 (地上品は1.4) 分解能でのデータを用いた電子密度図も暫定的に得ている。

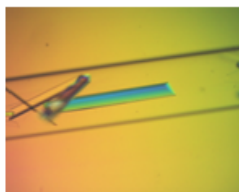
Crystallization Alpha-Amylase on the **Ground** using PEG8000 as a Precipitant

- Highly cluster-like morphology
- Maximum resolution: 1.12Å (by seeding)

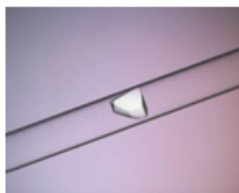


Grown on the ground

Crystallization of Alpha-Amylase in **Space** using PEG8000 as a precipitant



JAXA-GCF#1



Odyssey mission

- No cluster-like morphology
- Single crystal with same morphology as ground-grown crystal
- Maximum resolution: beyond 0.89Å (tentative)
 - May be the champion data among this M.W. proteins
- Single crystal with different morphology

Crystal Data and X-ray Data Processing Statistics

Crystals	6TAA (Swift et al.*)	Ground experiment (Batch / Seeding)	Space experiment (GCB)**	Space experiment (GCB)
Diffraction data				
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 constant (Å)	a=51.0, b=67.2, c=133.6 = = =90°	a=50.8, b=67.7, c=130.1 = = =90°	a=50.4, b=67.4, c=130.4 = = =90°	
Volume of the cell	457,960	447,187	442,807	
Maximum resolution(Å)	2.1	1.12	0.89	
Mosaicity		0.312(-1.4Å)	0.241(-0.9Å)	
Average of I/ (I)		22.2	39.2	26.6
Rmerge(overall)		0.063(30-1.40 Å)	0.036(30-1.40 Å)	0.062(15-1.0 Å)
Rmerge(outer shell)		0.188(1.45-1.40 Å)	0.039(1.45-1.40 Å)	0.262(1.04-1.00 Å)
Completeness(overall)(%)		94.5(30-1.40 Å)	99.3(30-1.40 Å)	96.5(15-1.0 Å)
Completeness (outer shell)(%)		89.9(1.45-1.40 Å)	99.3(1.45-1.40 Å)	95.7 (1.04-1.00 Å)

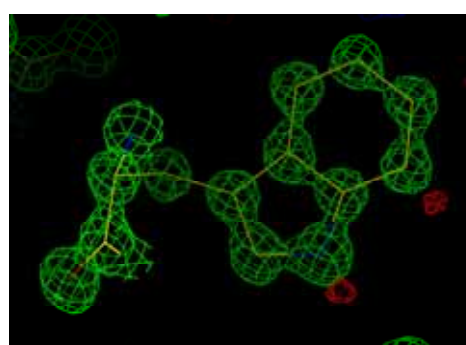
*Swift, H.J. et al.:Acta Cryst., B47, 535-544 (1991)

**Calculated for the comparison with the data of the ground experiment.

Electron Density Map of Alpha-Amylase (tentative)



Crystal grown on the ground



Crystal grown in space

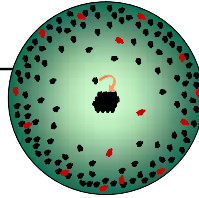
2. アルファアミラーゼ結晶高品質化についての考察

微小重力の結晶生成効果はいくつか指摘されている。この中で、結晶周辺の蛋白質ならびに不純物の欠乏層形成を数値的に検討したところ、PEG8000 のような粘性の高い溶液中では、これらの欠乏層が有意に形成されることがわかった。一方、NaCl を沈殿化剤に使うリゾチームの場合には、このような効果はあまり期待できないことが分かった。

Expected Microgravity Effects

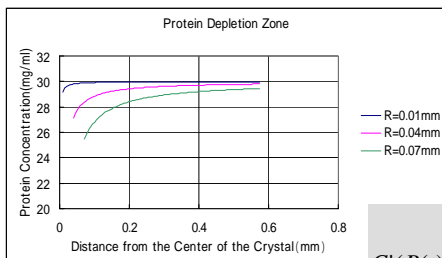
Mechanism	Effects on the crystal
Protein depletion zone (PDZ) formation	Suppression of the cluster formation Suppression of the disorder
Impurity depletion zone (IDZ) formation	
Suppression of the step bunching	
Suppression of the microcrystal capture	

Estimate PDZ and IDZ effects numerically in the case of alpha-Amylase



Diffusive field around a growing crystal

In case of 30mg/ml alpha-Amylase in 20% PEG8000



$$C_e = 10 \text{ mg/ml}$$

$$D = 3.0 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$$

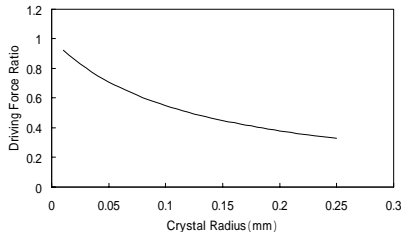
$$= 0.09 \text{ mm hr}^{-1}$$

$$C'(R(t)) = \frac{\frac{R(t) \cdot \beta \cdot C'e}{D} + C'(\infty)}{1 + \frac{R(t) \cdot \beta}{D}}$$

■ Concentration of the protein around the crystal surface becomes lower if the viscosity of the solution is high.

Depletion zone around the growing crystal (alpha-Amylase/PEG8000)

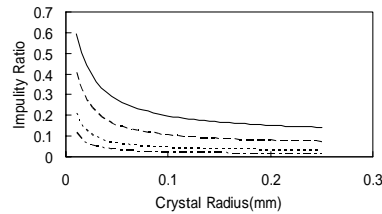
Protein depletion zone



$$\begin{aligned} C_e &= 10 \text{ mg/ml} \\ D &= 3.0 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \\ \beta &= 0.09 \text{ mm hr}^{-1} \end{aligned}$$

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

Impurity depletion zone



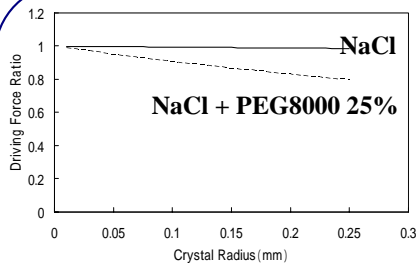
$$\begin{aligned} \text{---} & A=10 & \text{---} & A=20 \\ \text{---} & A=50 & \text{---} & A=100 \end{aligned}$$

$$IR = \frac{IUR_{0G}}{IUR_{IG}} = \frac{1 + \frac{R \cdot \beta}{D}}{1 + \frac{R \cdot \beta i}{D i}} = \frac{1 + \frac{R \cdot \beta}{D}}{1 + A \cdot \frac{R \cdot \beta}{D}} \quad A = \frac{\beta i \cdot D}{\beta \cdot D i}$$

- The effects on DFR and IR are expected in case of alpha-Amylase using PEG8000 as a precipitant.

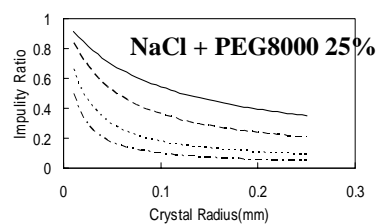
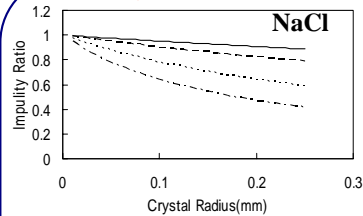
Depletion zone around the growing crystal (Lysozyme/NaCl)

Protein depletion zone



$$\begin{aligned} C_e &= 25 \text{ mg/ml} \\ D &= 1.04 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ (NaCl)} \\ D &= 5.74 \times 10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ (NaCl + 25\% PEG8000)} \\ \beta &= 0.04 \text{ mm hr}^{-1} \end{aligned}$$

Impurity depletion zone



$$\begin{aligned} \text{---} & A=10 & \text{---} & A=20 \\ \text{---} & A=50 & \text{---} & A=100 \end{aligned}$$

- If the viscosity of the solution is higher, the effects on DFR and IR can be expected.

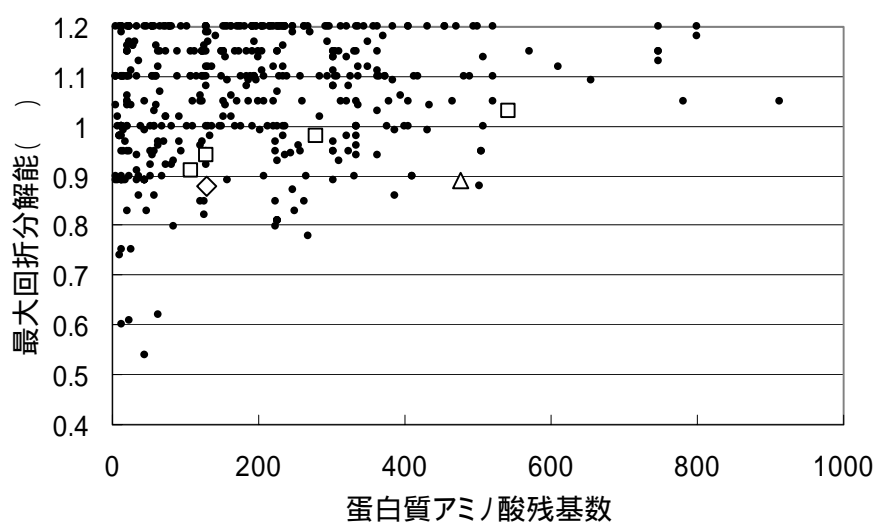
3. リゾチームの高品質結晶の生成

溶液の粘度を高めると結晶の高品質化が期待出来そうであったことから、リゾチームについて PEG8000 を添加して宇宙実験を行った。この結果、やはり分解能の大幅な向上が見られ、以前の Garcia-Ruiz らによる宇宙実験での最良値を上回る結果を得た。アルファアミラーゼとリゾチームの結果は、PDB に登録されている同程度の大きさの他の蛋白質と比較して、ほぼ最良値である。

Crystal Data and X-ray Data Processing Statistics (Tentative)

	1 μ e ^{*1} (Space crystal) (APCF)	Ground crystal (GCB)	Space crystal (GCB)
X-ray source	X11/BW7B	BL12B2	BL12B2
Space Group	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
Cell Constants (Å)			
a	77.06	77.3	78.0
c	37.22	37.9	37.7
Max Resolution(Å)	0.94-0.95	1.08	0.88
Mosicity	0.47	0.584-0.628	0.242-0.303
Rmerge % (total)	5.2(~0.94Å)	3.3(~1.08Å)	6.9(~0.88Å)
Rmerge % (outer)	32.9(0.94-0.96Å)	16.8(1.12-1.08Å)	25.8(0.91-0.88Å)
Completeness % (total)	98.9	92.3	89.9
Completeness % (outer)	88.6(0.94-0.96Å)	83.6(1.12-1.08Å)	81.4(0.91-0.88Å)

*1) Sauter et al., Acta Cryst., (2001) D57, 1119-1126



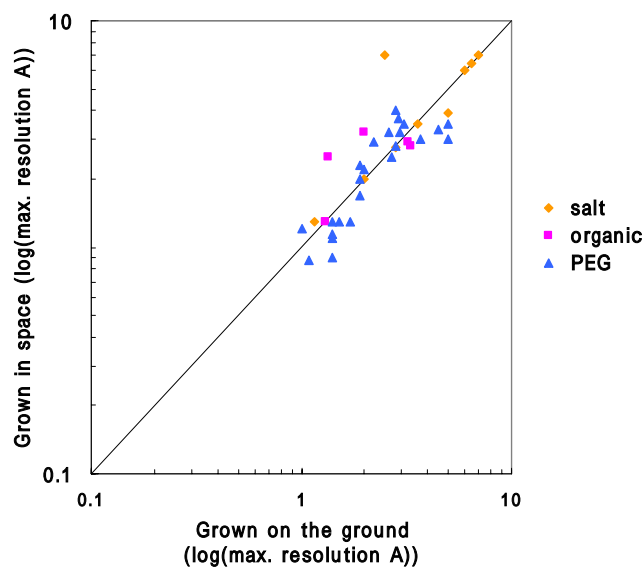
• 地上実験 □ NASA宇宙実験 △ アミラーゼ ◇ リゾチーム

4. これまでに本プロジェクトで得られた結晶の品質等について

回折分解能に関しては、PEG系沈殿化剤の方が向上している。

結晶の大きさに関しては、宇宙実験で大きくなる例がかなりあるが、沈殿化剤の種類による傾向は少ない。

Comparison between Maximum Resolution of Crystals grown on the ground and in space



Data are collected from crystals grown in JAXA(NASDA)-GCF#1, #2, and #3 space experiments

JAXA-GCF#1#2#3地上と宇宙での結晶サイズの比較

