

微小重力環境を利用した 高品質タンパク質結晶生成実験



国際宇宙ステーション
「きぼう」日本実験棟



さまざまなタンパク質を宇宙へ

JAXA では日本中のタンパク質研究者と協力し、国際宇宙ステーションでタンパク質結晶の生成実験を行っています。JAXA がこれまでに蓄積してきた技術と経験を活かして、試料の性状評価、結晶化条件の検討、宇宙での実験、帰還後の結晶観察、X線回折データ取得まで、実験の一連のプロセスをサポートします

国際宇宙ステーションと「きぼう」

国際宇宙ステーションは、地上から約 400km 上空に建設された巨大な有人実験施設です。アメリカ、日本、カナダ、ロシアなど 10 数か国が参加してさまざまな実験や研究を行っています。その中で JAXA が開発を担当した日本実験棟が「きぼう」です。

実験容器について

宇宙実験では、主としてゲルチューブ法を用いて結晶生成を行います。そのほか、浸透チューブ法 (OT法) や透析法、バッチ法にも対応可能な容器も使用可能です。

詳しくは裏面をご参照ください

結晶化容器「JCB-SGT*」

標準的に使用する結晶化容器です。PET 製シートでできた細長い筒状の袋で、それぞれ個別に結晶化条件を設定することができます。それぞれの袋にゲルチューブを装着したキャピラリーを 2 本ずつ装填します。シンプルな構造・軽量・高密度という特徴があり、宇宙実験に適しています。JCB-SGT への溶液の充填は地上で行います。結晶の生成が国際宇宙ステーション到着後に始まるよう、結晶化溶液やタンパク質溶液の濃度、ゲルチューブの長さを調整します。結晶化を軌道上で開始するような機構も準備しています。



* JAXA Crystallization Box - Sealbag Gel Tube

結晶化容器「JCB-SGT DX」

酸素吸収フィルムを用いて、コンフォーカルサイエンス社が製作した JCB-SGT です。嫌気条件での結晶化に適した試料に使えます。



結晶化容器「PETIT*」

PETIT は、アメリカ便で使用可能な容器です。宇宙飛行士が指で圧力を加えることにより、2液を分離している膜を破り、軌道上で結晶化開始操作を行うことが可能です。バッチ法として使用する場合には、溶液の量や 2液の混合比は変更可能ですし、片側に浸透チューブや透析チューブを入れることも可能です。



※Protein Crystallization Research Facility

プロジェクトの流れ



微小重力環境の効果

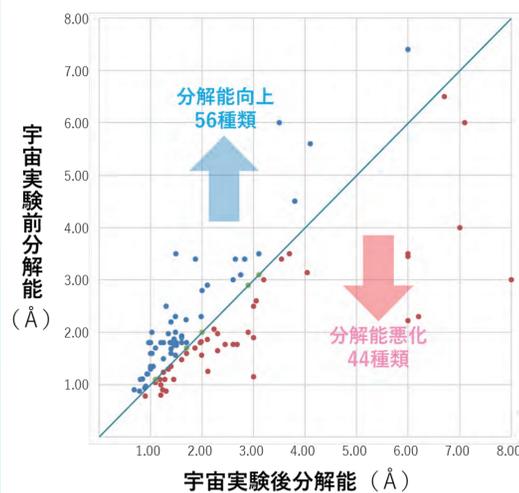
| | 地上実験 | 宇宙実験 |
|--------------|------------------------------|---------------------------|
| クラスター化の抑制 | | |
| モザイシティの改善 | 0.523 | 0.209 |
| 分解能の改善 | 2.80 Å | 1.46 Å |
| | 沈殿 | 1.50 Å |
| | 1.30 Å | 1.06 Å |
| ツイン結晶の解消 | | |
| 異なる空間群の結晶の生成 | | |
| | P2, 65.5, 102.2, 75.4, 103.8 | P2,2,2, 50.2, 66.1, 131.9 |
| | | |
| | P4,2,2, 67.0, 67.0, 270.0 | |

宇宙実験による分解能改善実績

低分解能およびクラスター化のため回折データの収集・解析が困難な試料についてその構造決定に貢献できる可能性があります。

1 Å を超える超精密構造解析に貢献することも可能です。

計 16 回の宇宙実験結果 (2009 年 7 月~2018 年 10 月)



図に示されていない結果として、

宇宙実験により初データ収集に成功 **12 種類**

JAXA との共同研究後
構造未知だったものを構造決定 **11 種類**

ターゲット分子と薬剤候補化合物との結合状態を初めて明らかにした試料 **20 種類以上**

お問い合わせ先

JAXA では、今後も制度改革・技術革新を行い、利用される方々の成果創出に貢献していきたいと考えています。宇宙実験にご興味がおありの方はお気軽にご連絡ください。

国立研究開発法人 宇宙航空研究開発機構
有人宇宙技術部門 きぼう利用センター
z-kibo-promotion@ml.jaxa.jp



結晶化法・結晶化温度の多様化と打ち上げ機会の向上

アメリカ便実験定常運用化に向けた実証実験の概要

これまでの宇宙実験では、最も結晶化温度帯としてニーズの高い 20℃限定で運用を行ってまいりました。一方、タンパク質の安定性を含む種々の要因により、4℃の結晶化が望ましいもの、4℃でしか結晶化できないものが多数あることも事実です。(下グラフ参照)

JAXA では、4℃での安定的な輸送法及び、輸送機の打ち上げ遅延への対処法を確立したことで、今後、研究者の方に広く利用して頂けるようになりました。

その他実施中の技術開発と合わせて、簡単にをご紹介します。

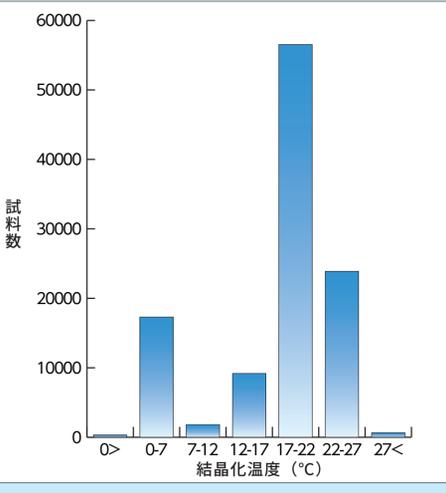
温度管理について

「きぼう」日本実験棟内には、20℃や 4℃で温度制御できるインキュベータがありますが、試料や結晶の劣化を防ぐため、日本国内からロシアやアメリカの打ち上げ射場までの輸送期間中や、打ち上げ・回収の間も、温度を安定して維持する必要があります。

地上輸送及び国際宇宙ステーションへの往復の輸送に関しても、輸送容器の工夫により、概ね ±2℃の条件で輸送することが可能になりました。

PDB登録データの結晶化温度分布

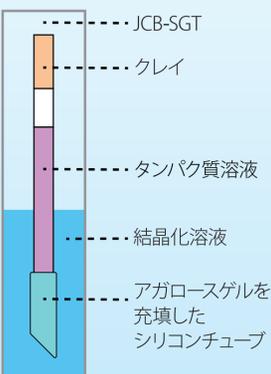
109717 試料 (2019年6月17日現在)



ゲルチューブ法

地上で一般的に用いられている蒸気拡散法は気液界面の張力差によってマランゴニ対流が発生してしまいます。微小重力環境の特徴であり、タンパク質結晶の高品質化に重要である、対流のない環境を最大限に活用するため、マランゴニ対流の発生しない、ゲルチューブ法 (GT 法) を宇宙実験の結晶化法として採用しています。

GT 法の詳しい充填手順は、以下の URL のライブラリに掲載しています。
http://iss.jaxa.jp/kiboexp/theme/first/protein/library/gel_tube_method.html#main



新サービス「簡易結晶化診断」の開始について

JAXA PCG プロジェクトでは、タンパク質の分子構造を明らかにしたいユーザーの皆様に、新しいサービス (無償) を提供いたします。

タンパク質試料を JAXA 宛にお送りいただければ、ユーザーの皆様に代わり、JAXA にてタンパク質試料の性状確認 (電気泳動、動的散乱測定等) を結晶化初期スクリーニング (回折チェックを含む) を実施します。



<http://iss.jaxa.jp/user/opp/pcg/1-3.html>
 ご興味がお有りの方は、お気軽にご連絡ください。



軌道上で確実に結晶化を開始する技術

従来の SGT 法では、地上で溶液充填作業を行っても、宇宙に到着してから結晶ができるように、アガロースゲルを介した沈殿剤の流入速度を調節していました。しかしながら、この手法は輸送機の打ち上げ遅延に対応できないという欠点があります。ドラゴン補給船 (アメリカ) はロシアの輸送船と比べて打ち上げ遅延リスクが高く、軌道上で確実に結晶化を開始する技術が必須でした。

アメリカ便では、従来の SGT 法を改変し、地上での溶液充填時にはタンパク質溶液と沈殿剤が接触しないように通液を封止する仕掛けをして打ち上げます。その後、クルーの操作によって通液を開始するように運用手順を変更しました。これにより、打ち上げ遅延のリスクを許容できるようになるとともに、確実に軌道上で結晶化を開始できるようになりました。

実験結果

- protein A 膜タンパク質** 単結晶が得られたものの、結晶品質が十分でなかった。度重なる打ち上げの遅延 (当初予定から半年以上) により、試料調整のタイミングが合わず、試料の劣化が避けられなかったことが原因であると考えられる。 (*課題 1)。
- protein B 膜タンパク質** 宇宙実験 (20℃) に継続参加しているが、構造解析が可能となる結晶が初めて得られた。経時劣化の激しい試料であるため 4℃環境で実験が行えたこと、また打ち上げから回折実験までを短時間 (2ヶ月程度) で行えたことなどが効果的だったと考えられる。
- protein C 水溶性タンパク質** これまでの最高分解能を更新 (1.8 Å⇒1.5 Å)
- protein D 水溶性タンパク質** これまでの最高分解能を更新 (2.8 Å⇒2.0 Å)

(*課題 1) 軌道上結晶化技術により、ある程度の遅延には対応できるようになったが、特に経時的な劣化の激しい試料については、可能な限り試料を凍結保存することで、長期の遅延に対応したい。

成果事例

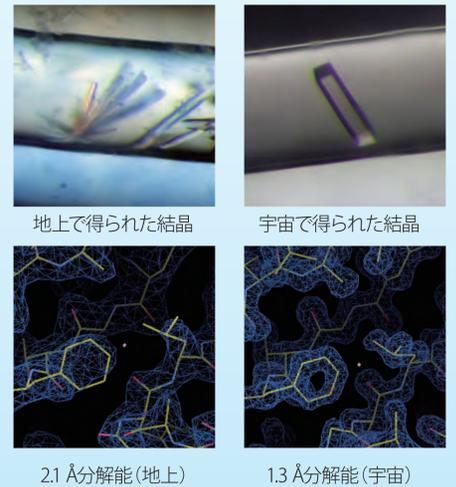
研究者 大阪府立大学 木下 誉富 教授
 対象となるタンパク質 キナーゼ

○2011 年から本キナーゼを用いた宇宙実験を実施してきたが、本試料は 20℃下では凝集が起きて沈殿してしまうため 20℃で安定して結晶を生成することができなかった。

○4℃実験の実証実験に参加し、本試料の結晶化を行ったところ、単結晶が得られ、これまでの最高分解能 2.5 Å を 1.3 Å まで更新した

(T.Kinoshita et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 493, 313-317 (2017))

経時劣化の早いタンパク質や化合物を含む条件を結晶化する際に有効であると考えられます。



打ち上げ時期を起点とした標準的な全体スケジュール



技術開発1 / 試料充填法の拡大

軌道上通液開始技術

軌道上で結晶化を開始できる技術を獲得したことで、アメリカ便で頻発する打ち上げ遅延にも対応可能に。

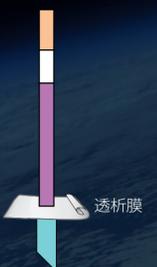
ロシアとの協定に基づく年 2 回の打ち上げ機会に加え、アメリカ便を利用することで、年間 5~6 回の打ち上げ機会を確保できるように。

ゲルチューブ部分を物理的に押しつぶすことで、溶液の移動を遮断。軌道上で開放し、通液を開始。

軌道上通液開始技術・透析法

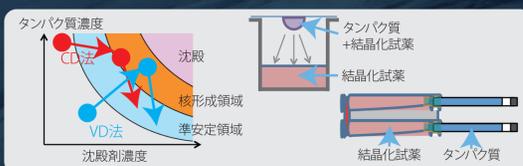
透析法

キャピラリーとゲルチューブの間に透析膜を配することで、透析法として利用することも可能に。キャピラリーからのタンパク質の漏出が起らないため、結晶化時にタンパク質濃度を下げたくない場合に有効。



技術開発2 / 条件検討作業の短期化・簡略化

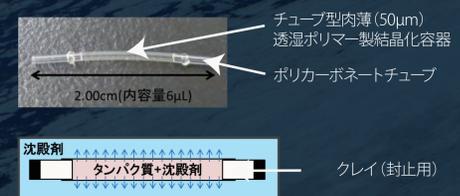
カウンターディフュージョン法と蒸気拡散法の溶液濃度変化



蒸気拡散法では、気-液界面とバルクの間の張力の差によってマランゴニ対流が発生するため、微小重力の効果を最大限に引き出すことは難しい。JAXA ではマランゴニ対流の影響を受けず幅広い結晶化条件をサーベイできるカウンターディフュージョン法 (CD 法) を採用している。ただし、結晶生成頻度が低かったり、希少な化合物であっても使用量が大きくなるなどの弊害も存在している。そこで微小重力環境でマランゴニ対流の影響を受けず、蒸気拡散法と同等の溶液濃度変化を実現する新規結晶化法を開発している。

浸透チューブ法 (OT法)

透湿性ポリマー膜を用いた新規結晶化法を開発



OT法 機能検証試験結果 (第2期 第2回宇宙実験)

