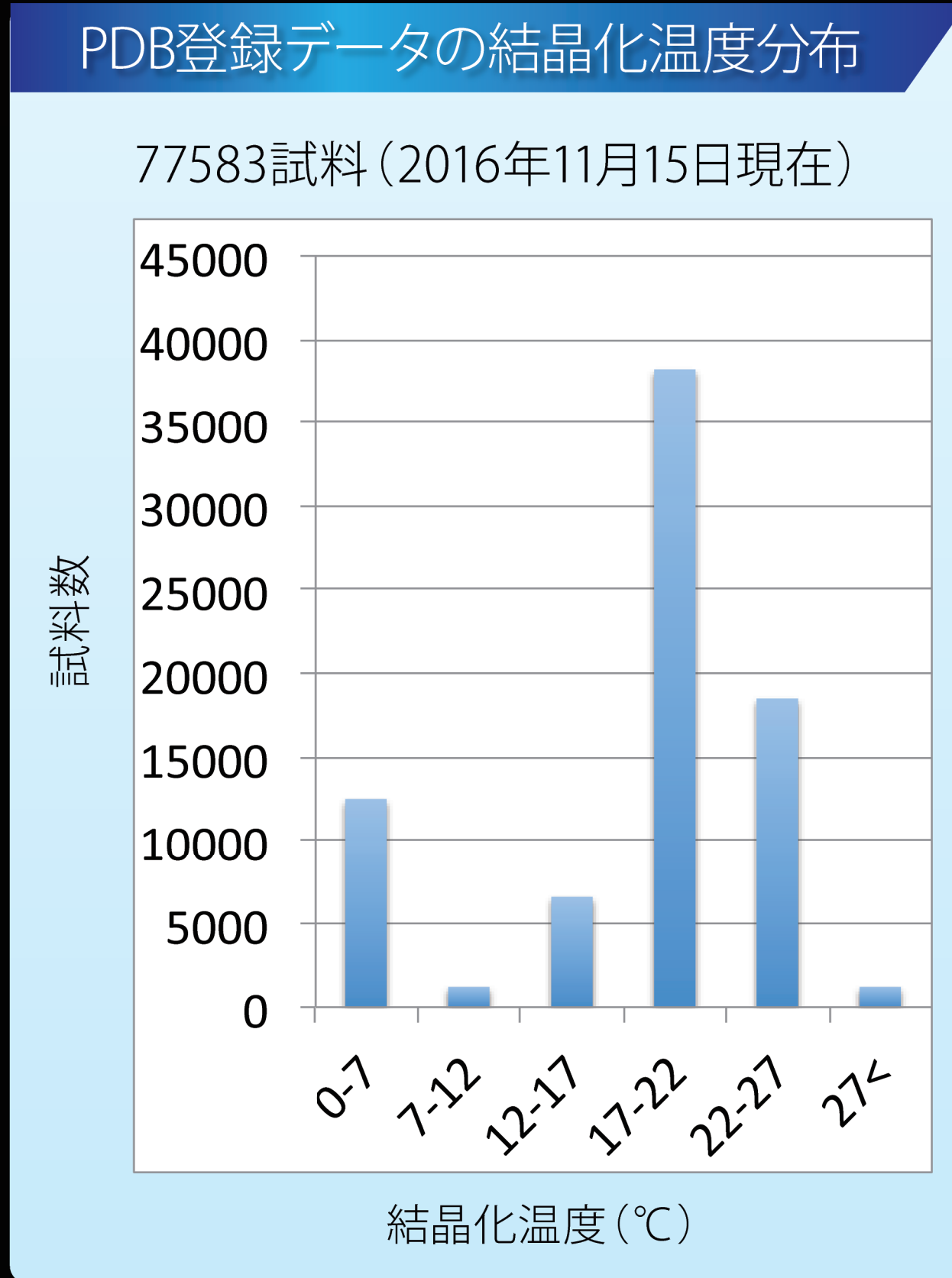


これまでの宇宙実験では、最も結晶化温度帯としてニーズの高い20°C限定で運用を行ってきました。一方、タンパク質の安定性を含む種々の要因により、4°Cの結晶化が望ましいもの、4°Cでしか結晶化できないものが多数あることも事実です(下グラフ参照)。JAXAでは、4°Cでの安定的な輸送法および、輸送機の打ち上げ遅延への対処法を確立したことで、今後、研究者の方に広く利用して頂けるようになりました。その他、実施中の技術開発と合わせて、簡単にご紹介します。

温度管理について

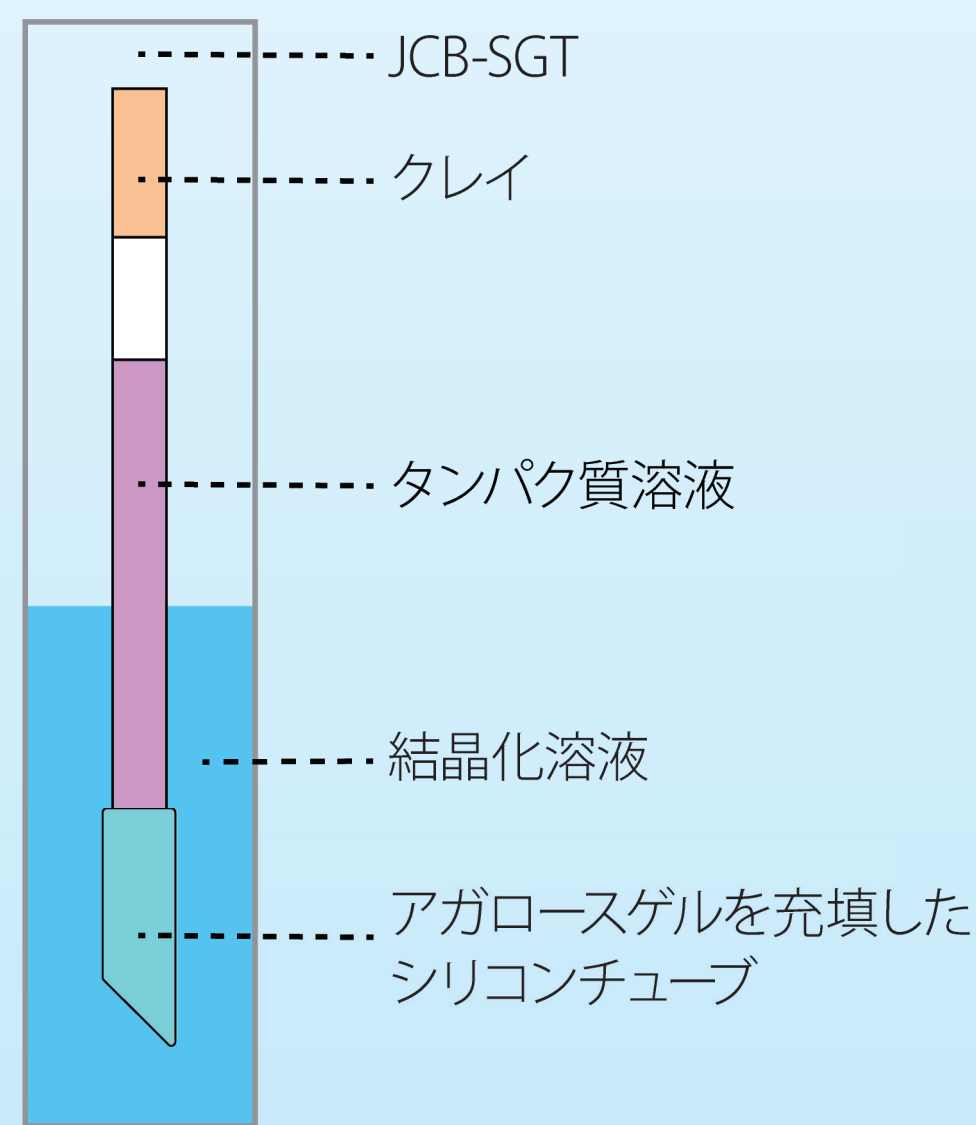
「きぼう」日本実験棟内には、4°Cインキュベータがありますが、試料や結晶の劣化を防ぐため、日本国内からSpax打ち上げ射場(アメリカ)までの輸送期間中も4°C環境を安定して維持する必要があります。この条件を満たすべく、これまで2回の実証実験において、新たに制作した輸送容器の性能評価及び改修を実施しました。それにより、4°C +/- 2°C以内の条件で試料を輸送することができるようになりました(下グラフ参照)。今後、輸送容器の性能向上およびクレー操作の簡略化を更に実施することで、より厳密な温度管理が実現できると考えています。



カウンターディフュージョン法

地上で一般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カウンターディフュージョン法(CD法)を宇宙実験の結晶化法として採用しています。

CD法の詳しい充填手順は以下のページに掲載予定です(2018年3月)。
<http://iss.jaxa.jp/kiboexp/theme/first/protein/>

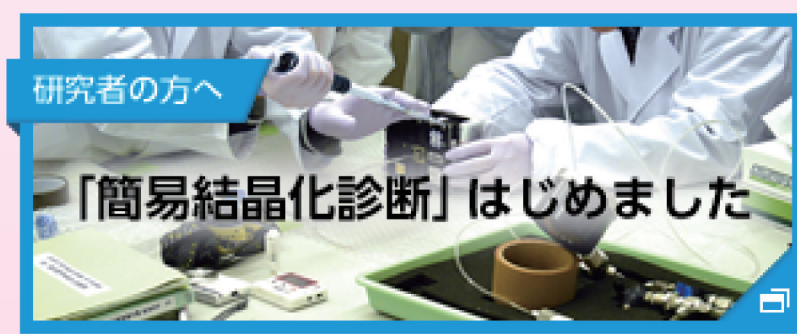


新サービス「簡易結晶化診断」の開始について

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へ、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、ユーザーの皆様へ代わりJAXAにて、タンパク質試料の性状確認(電気泳動、動的光散乱測定等)や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出来るように、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。4°C実験で使用するドラゴン補給船(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。

4°C実験では、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、クレ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(技術開発1)。

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。度重なる打上げの遅延(当初予定から半年以上)により、試料調製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°C)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°C環境で実験が行えたこと、また打上げから回折実験までを短期間(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とすることで、長期の遅延に対応したい。

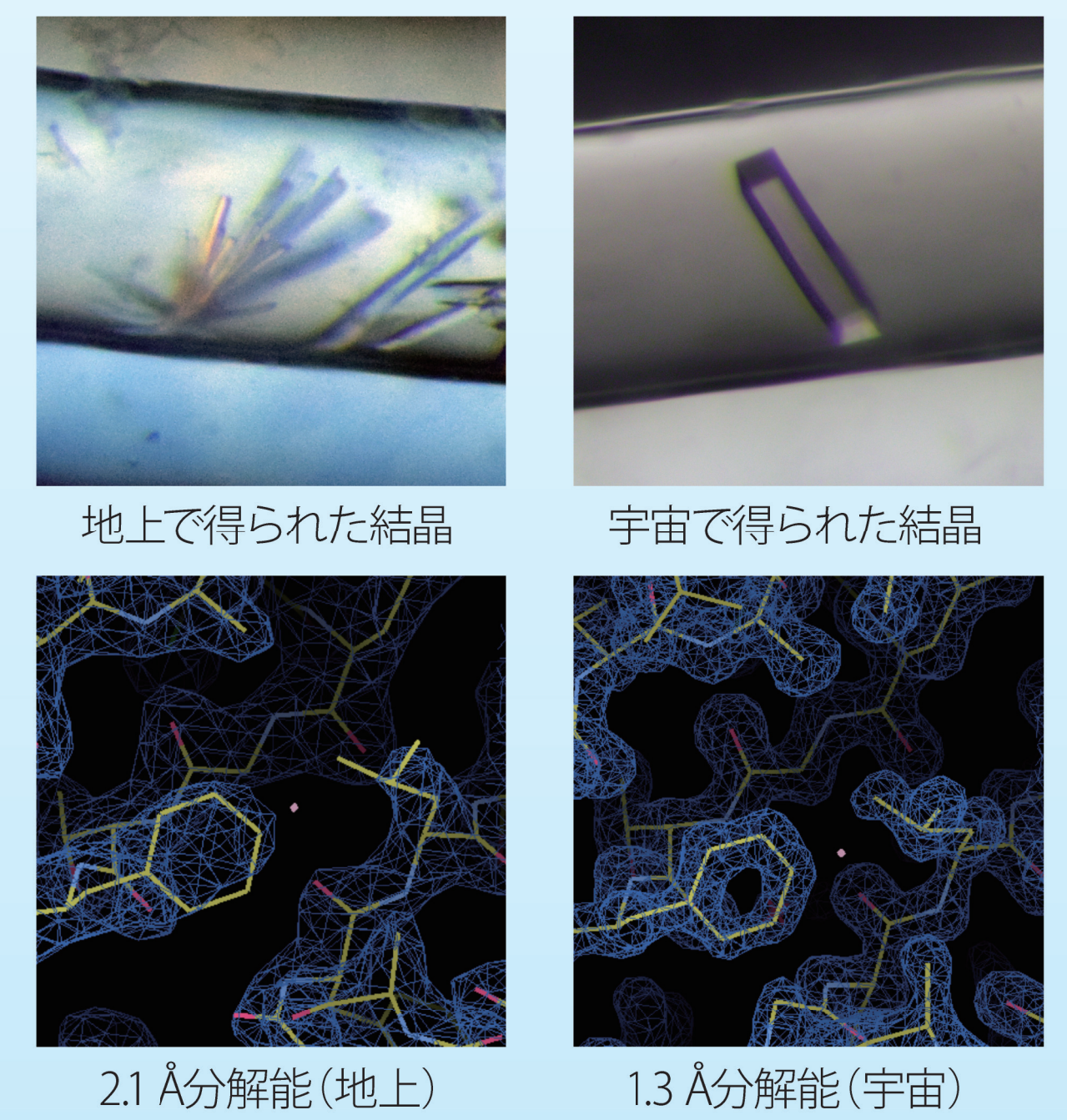
成果事例

研究者 大阪府立大学 木下 誉富 准教授
 対象となるタンパク質 キナーゼ

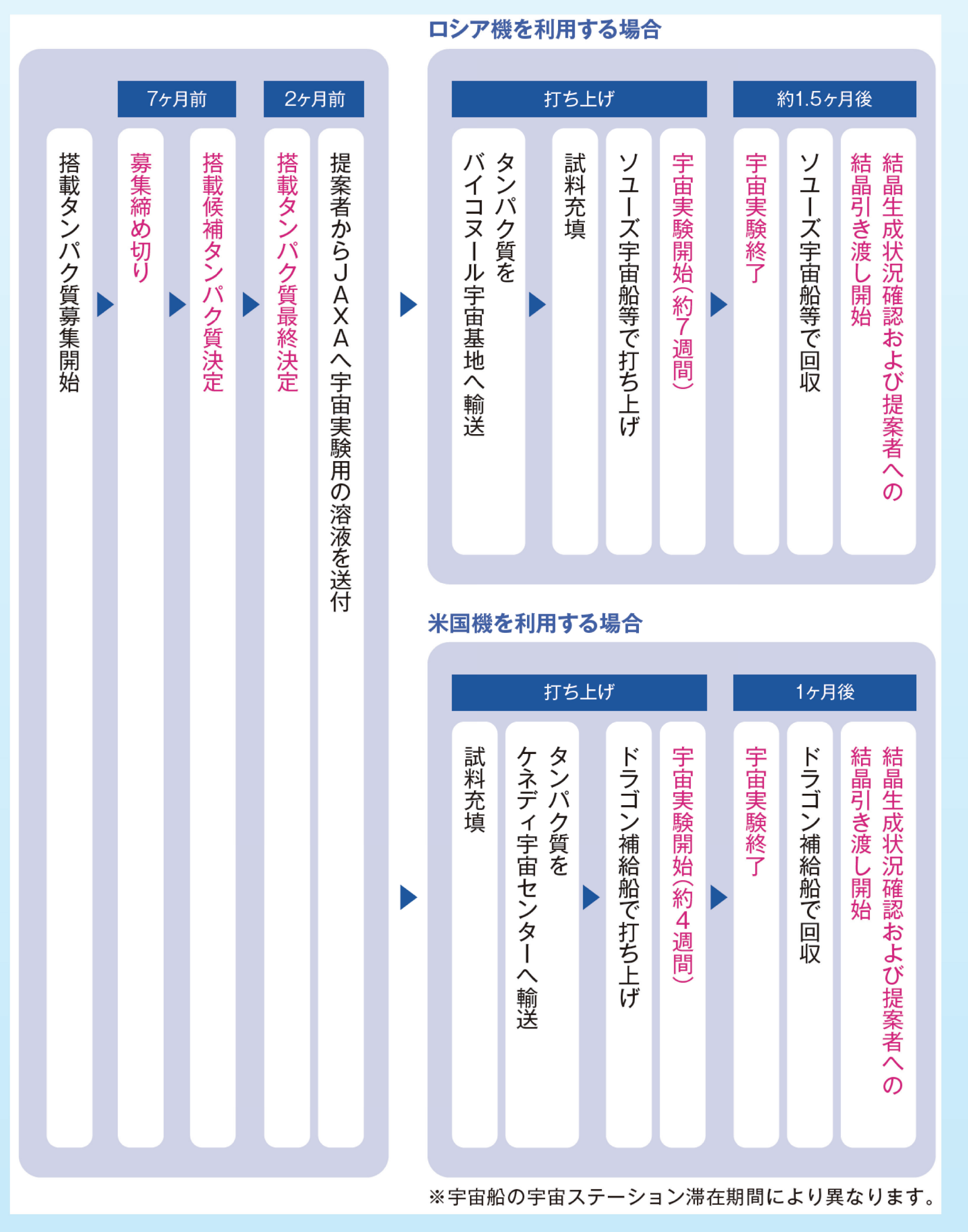
○2011年から本キナーゼを用いた宇宙実験を実施してきたが本試料は20°C下では凝集が起きて沈殿してしまうため20°Cで安定して結晶を生成することができなかった

○4°C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で結晶化する際に有効であると考えられます。



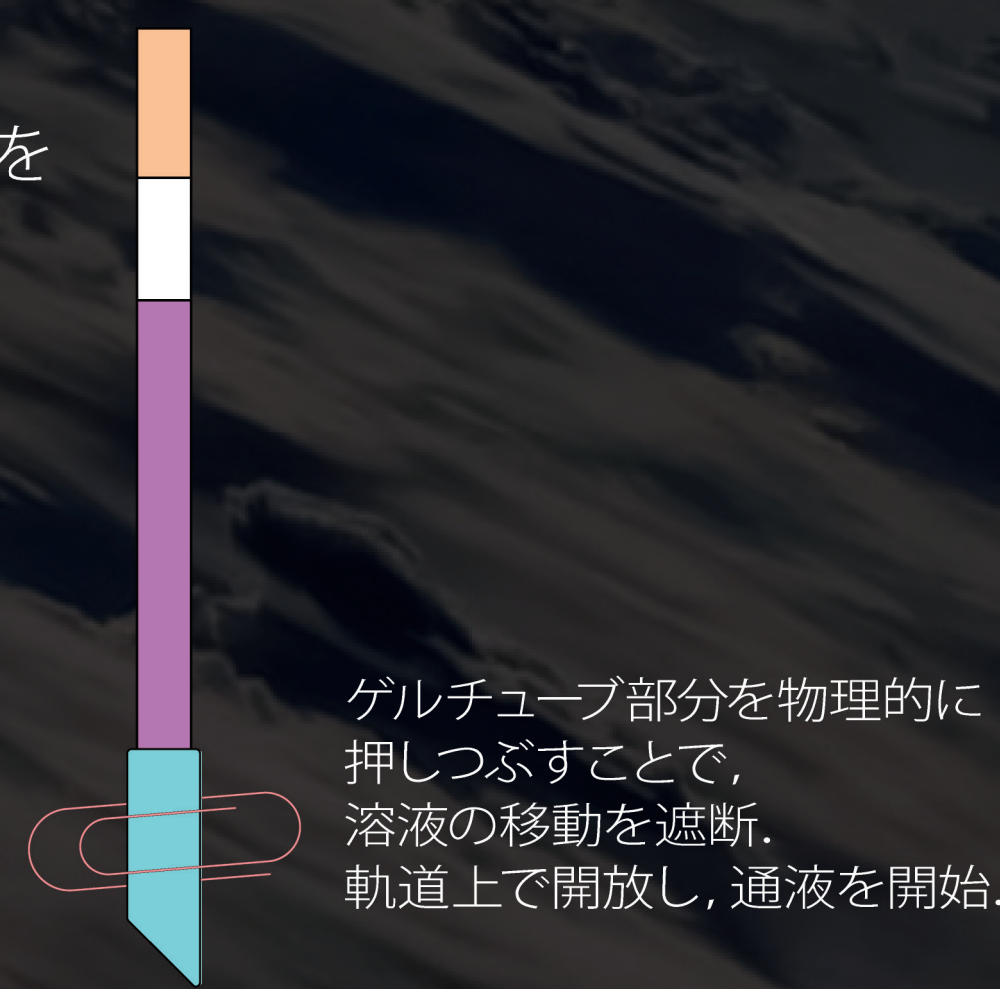
打ち上げ時期を起点とした標準的な全体スケジュール



技術開発1 / 試料充填法の拡大

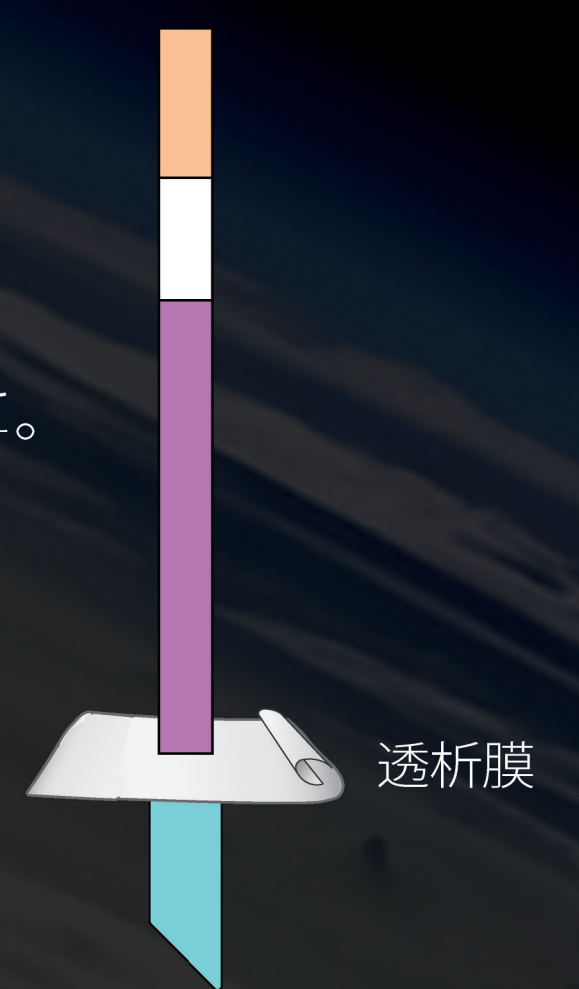
軌道上通液開始技術

軌道上で結晶化を開始できる技術を獲得したことで、アメリカ輸送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、アメリカ輸送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。



透析法

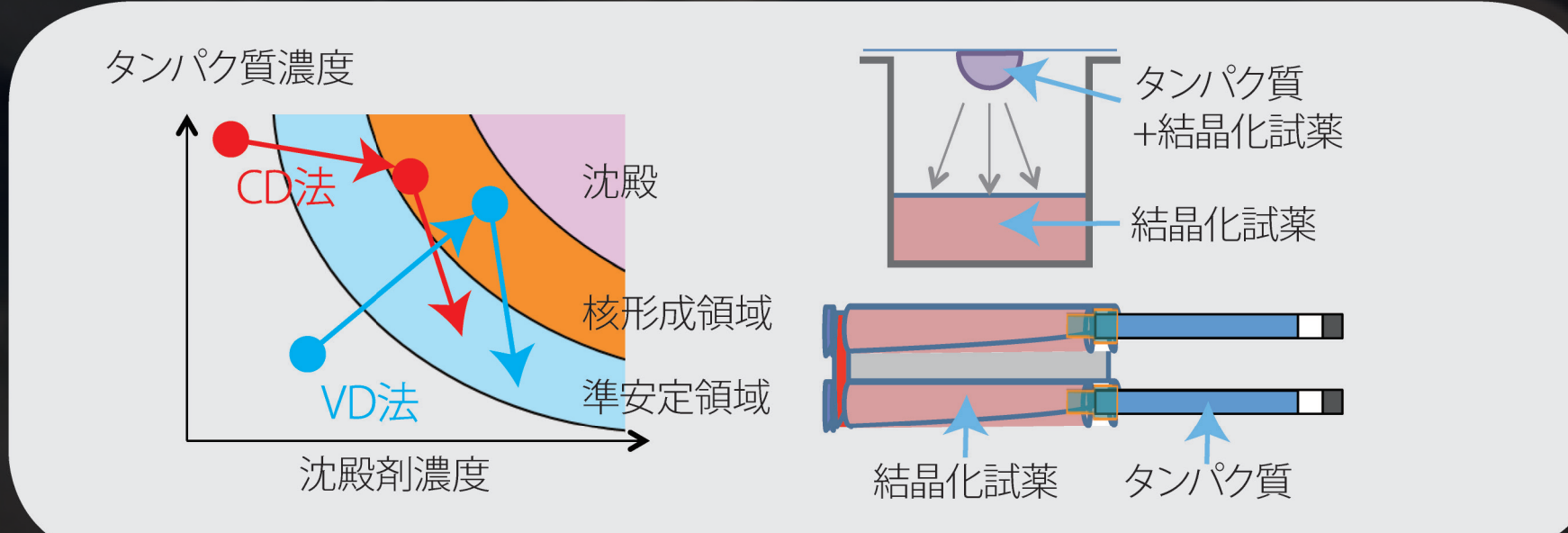
キャピラリとゲルチューブの間に透析膜を配することで、透析法として利用することも可能に。キャピラリからのタンパク質の漏出が起らないため、結晶化時にタンパク質濃度を下げたくない場合に有効。



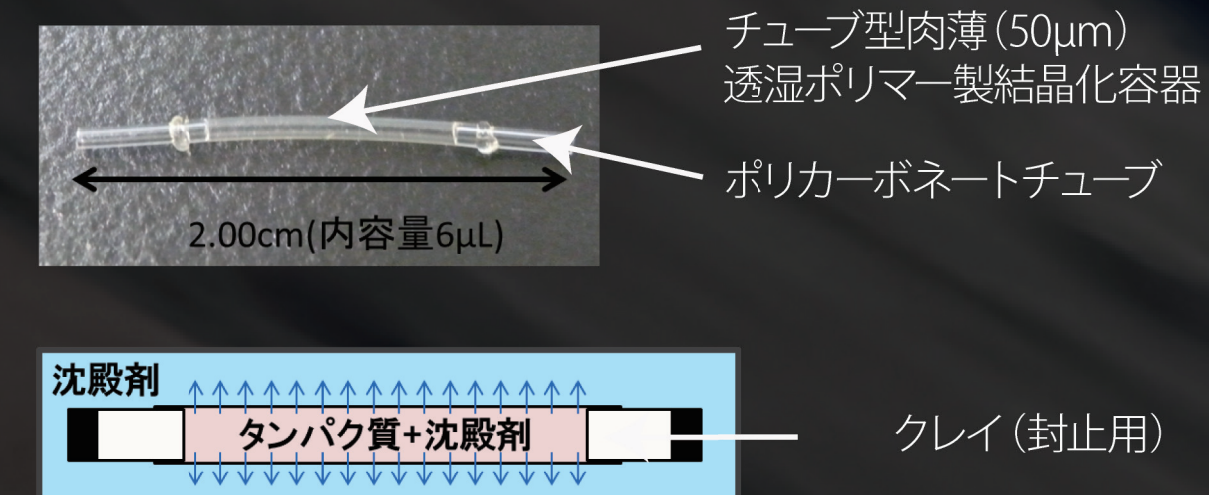
技術開発2 / 条件検討作業の短期化・簡略化

浸透チューブ法(OT法)

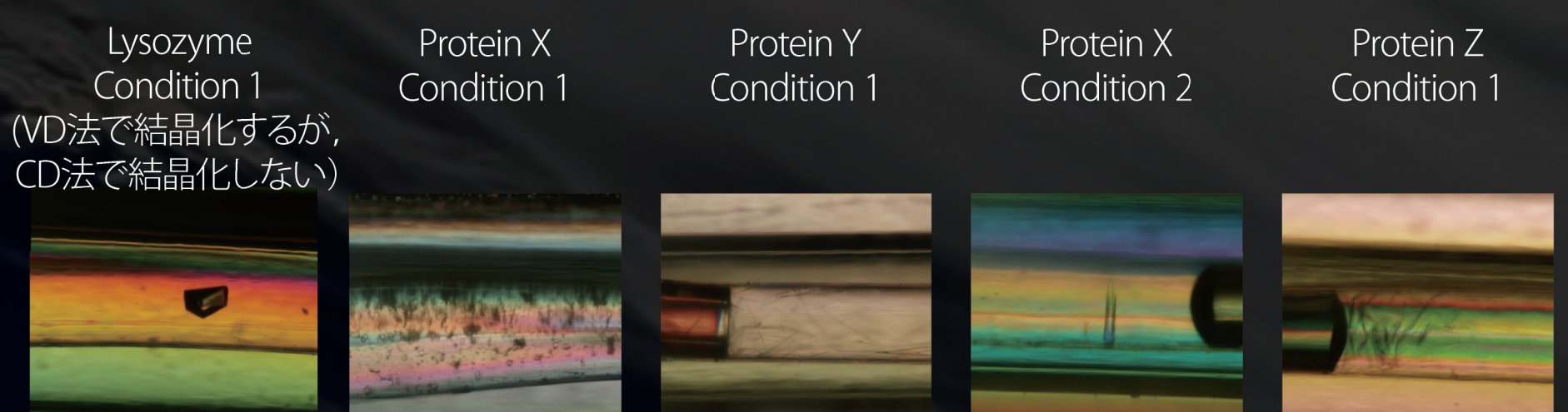
カウンターディフュージョン法と蒸気拡散法の溶液濃度変化



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)



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。

