

国際宇宙ステーション「きぼう」での
**高品質タンパク質
結晶生成実験**

基盤研究利用コース

搭載タンパク質募集要項(共通編)
実験の手引き



この搭載タンパク質募集要項(共通編)実験の手引きは、国際宇宙ステーション「きぼう」日本実験棟でのタンパク質結晶生成実験に向けた、搭載タンパク質の募集に関する情報をまとめたものです。

日本国内の大学および公的研究機関に所属する研究者の方から、宇宙実験を行うタンパク質(試料)を広く募集します。

プロジェクト全体の流れ



目次



本プロジェクトについて

高品質タンパク質結晶生成実験の概要	04
プロジェクト参加のメリット	06
これまでの成果事例	08



参加のお申込み・審査

応募概要・お申込み方法	10
審査における評価のポイント	11
テーマ提案書の記入例	12



実験に向けた準備

実験の準備	18
実験準備に関する注意事項	20



宇宙実験の実施

実施内容と実験装置について	22
---------------	----



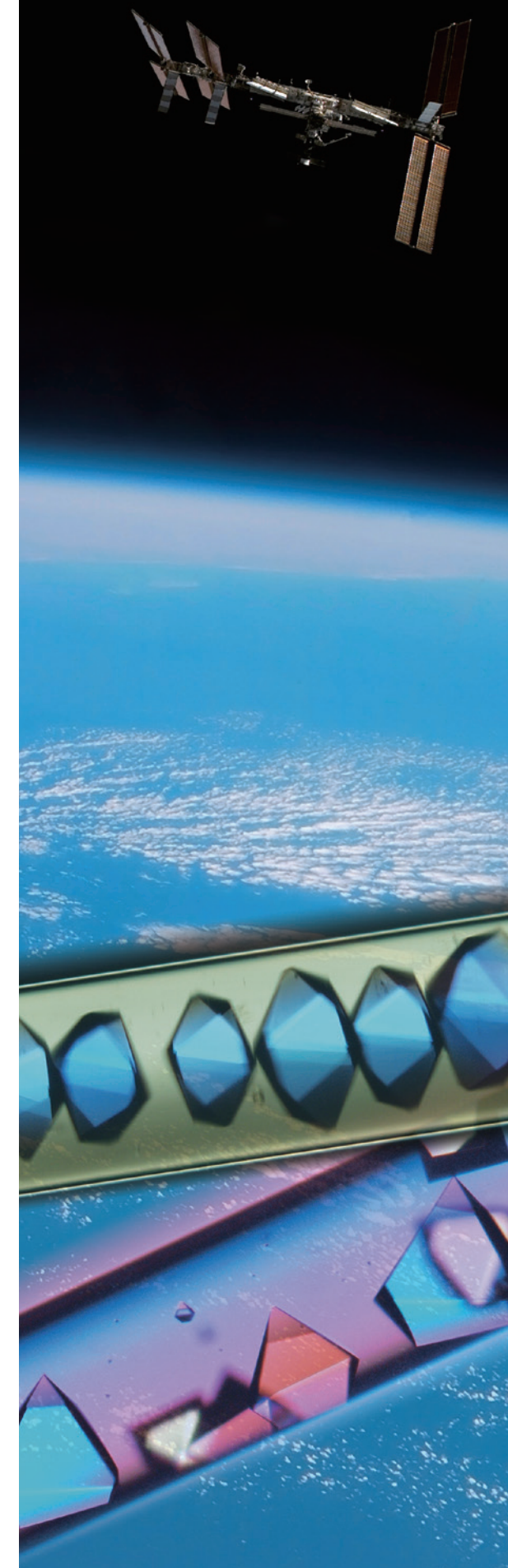
成果発表・情報の取り扱いについて

成果の取り扱いと発表時のお願い	24
情報の取り扱いについて	25



その他・参考資料

実験室バイオセーフティ指針抜粋	26
-----------------	----





高品質タンパク質結晶生成実験の概要

高品質タンパク質結晶生成実験プロジェクトとは

国際宇宙ステーション「きぼう」日本実験棟において、
タンパク質の結晶生成実験を行います。

微小重力環境下でタンパク質結晶化を行うことにより、対流や沈降の影響を排除し、地上より高い確率で高品質な結晶を生成することが出来ます。
JAXAでは2009年から2016年にかけて第1期・第2期実験シリーズとして計12回の実験を実施し、得られた結晶からターゲットタンパク質とリード化合物との結合様式を初めて解明するなど、着実な成果を挙げてまいりました。
2017年から新たに第3期実験シリーズを開始し、JAXAがこれまでに蓄積してきた技術と経験を活かして、試料の性状確認、結晶化条件の検討・最適化、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。
また、高品質タンパク質結晶生成に不可欠な技術要素の開発を継続的に実施し、日本のタンパク質研究の発展に貢献します。

募集するタンパク質について

日本国内の大学・公的研究機関に所属している方を対象として、
主に学術的な成果を狙うテーマでの募集を行います。

本プロジェクトでは、様々な研究テーマを幅広く受け付けています。
「宇宙での結晶生成実験をやってみたい」「宇宙実験を試すことで研究がもう一步進まないだろうか？」など少しでも興味のある方は、ぜひご応募ください。
また「こういう実験はできるのかな？」など、ご提案・ご質問事項があればお気軽にお問い合わせください。

一方、重点化領域として、下記のようなテーマを設定することになりました。
該当するテーマについては、宇宙実験での搭載リソース等が優先的に配分されます。

- ・国の戦略的テーマ（JST: CREST、ERATO、さきがけ等）
- ・科学技術イノベーション総合戦略に掲載されるクリーンエネルギー関連や国の創業事業テーマ（創業支援ネットワーク等のテーマ）、オーファンドラッグに係わるテーマ等
- ・JAXAの技術開発に協力頂けるテーマ（膜タンパク質結晶化技術、大型結晶生成技術等）

記載情報の開示

データシート記載情報の開示について

実験実施の手続き上、お預かりした情報の一部を米国NASAやロシアの宇宙機関に対して限定的に開示します。予めご了承ください。

それ以外の情報については、提案者の了承を得ないで開示することはありません。

※必要に応じて、秘密保持契約を別途締結することも可能です。

- ・タンパク質の略称
- ・タンパク質の生物学的機能
- ・タンパク質の由来、発現系等
- ・タンパク質の安全性の提案者による保証
- ・タンパク質の特記すべき特徴

宇宙実験搭載の安全性判断のため米国NASAおよびロシアの宇宙機関へ提出します。
なおタンパク質の略称については、他との識別が可能な程度の略号でも結構です。

・結晶化溶液の組成の概略

安全性判断のため米国NASAおよびロシアの宇宙機関へ提出します。
またタンパク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に使用します。

・輸出に当たって戦略物資に該当しないことの提案者による証明

タンパク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に使用します。

お問い合わせ先

本プロジェクトに関するご質問・お問い合わせはメールでお気軽に

E-mail: Z-crystal@ml.jaxa.jp

JAXAきぼう利用センター JAXA PCG募集担当 宛



プロジェクト参加のメリット

宇宙実験参加のメリット

「結晶化に成功したが、結晶品質が低いため構造を決定できない。」
「構造解析に成功したが、分解能が低いため詳細な構造を決定できない。」
「構造解析ができれば研究・開発が進展するが、結晶解析の技術がない。」

宇宙での結晶生成実験を行うことで、そのような問題が解消されるかもしれません。
宇宙の微小重力環境では、密度差対流が抑制され、タンパク質の濃度勾配が維持されます。
そのため不純物が少なく分子配列の揃った高品質な結晶が生成される可能性が高まります。
ぜひこの機会をご活用ください。

プロジェクト参加までは未知だったタンパク質の構造が10個明らかになりました！

ターゲットタンパク質と阻害剤との結合が20個以上明らかになりました！

参加費用無料

本プロジェクトへの応募および
宇宙実験の実施に関する費用は**全て無料**です。

JAXAからの技術支援

試料の性状確認や結晶化条件の最適化など、
広く技術支援を行います。

簡易結晶化診断サービスを始めました！

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。
まだ結晶が得られていないタンパク質や、結晶化に興味はあるものの結晶化技術を有していない方でも
ご応募頂くことが可能です。

サービス内容

タンパク質試料をJAXA宛にお送り頂ければ、利用者に代わり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。

詳細については以下をご覧ください。

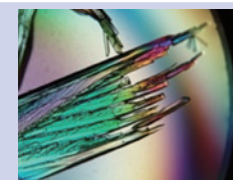
簡易結晶化診断について

<http://iss.jaxa.jp/user/opp/pcg/1-3.html>

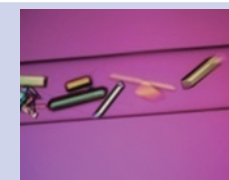
微小重力環境の効果

クラスター化の抑制

地上実験



宇宙実験



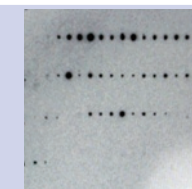
モザイシティの改善

地上実験



0.523

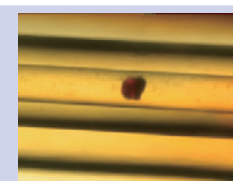
宇宙実験



0.209

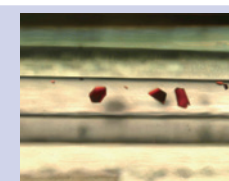
分解能の改善

地上実験

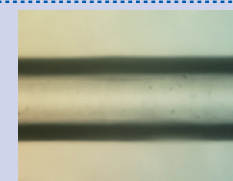


2.80Å

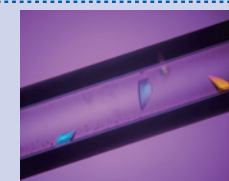
宇宙実験



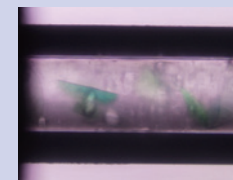
1.46Å



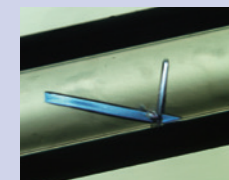
沈殿



1.50Å

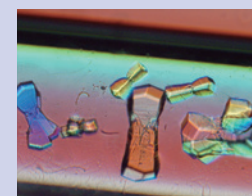


1.30Å

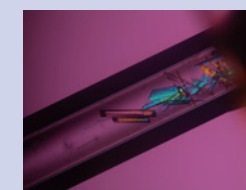


1.06Å

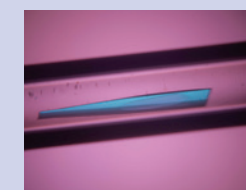
ツイン結晶の解消



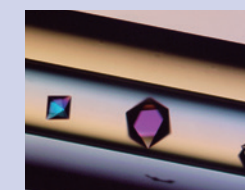
異なる空間群の結晶の生成



$P2_1$
65.5, 102.2, 75.4,
103.8



$P2_12_12_1$
50.2, 66.1, 131.9



$P4_32_12$
67.0, 67.0, 270.0

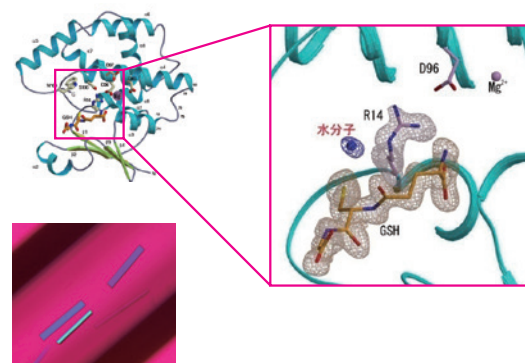


これまでの成果事例

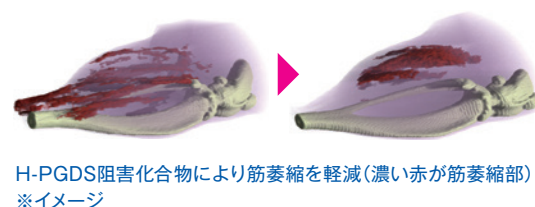
H-PGDS

筋ジストロフィーに関連するタンパク質

薬物候補化合物の設計への応用 筑波大学／(公財)大阪バイオサイエンス研究所



- ・高品質な結晶による構造解析の結果から、機能に関与する水分子の存在が判明
- ・タンパク質の反応部位の形(鍵穴)が明確化
- ・鍵穴に合致する薬物候補化合物(鍵)が設計可能に

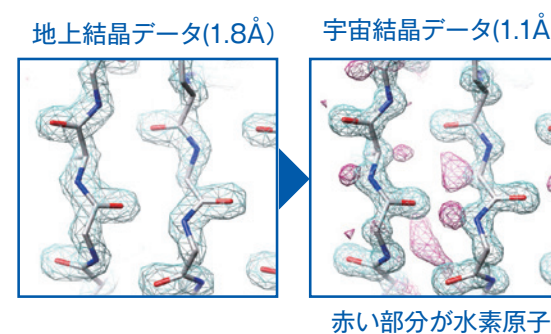


H-PGDS阻害化合物により筋萎縮を軽減(濃い赤が筋萎縮部)
※イメージ

- 化合物とタンパク質の結合状況を宇宙実験で得られた結晶により、詳細に確認。
- 筋ジストロフィーに有効な薬物候補化合物の開発への貢献が期待される。

ナイロンオリゴマーを分解するタンパク質

工業的な機能性触媒への応用 兵庫県立大学／大阪大学



ナイロンオリゴマー分解酵素:
ナイロンオリゴマー(プラスチック)を、
触媒反応により分解する酵素及び同酵素の
変異体と基質との複合体の詳細な構造を解明

工業的な機能性触媒としての 応用が可能に

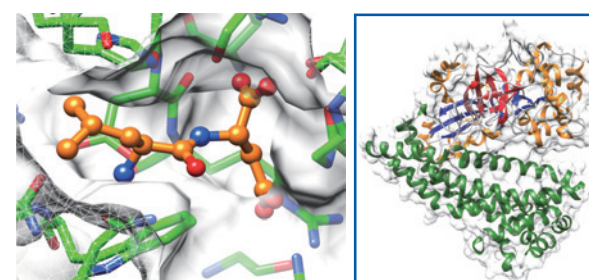
触媒機能の向上を図り、
3年程度での実用化を目指す

- 加水分解の逆反応を利用し、短時間(5分程度)の反応で有用なナイロンオリゴマーを合成することが可能。
- アシル化アミノ酸の化学合成に関して、効率的で環境負荷の少ない化学合成系への応用が可能。

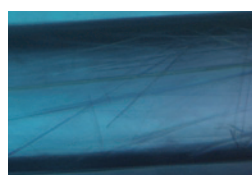
DPP11

歯周病原菌の生育に重要なタンパク質

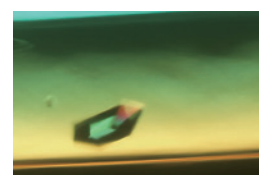
薬剤候補化合物の設計への応用 岩手医科大学／昭和大学／長岡技術科学大学



新たな歯周病治療薬の設計が可能に 薬の候補となる分子の探索、 合理的な開発に必要な詳細構造を解明



地上で得られた結晶



宇宙で得られた結晶

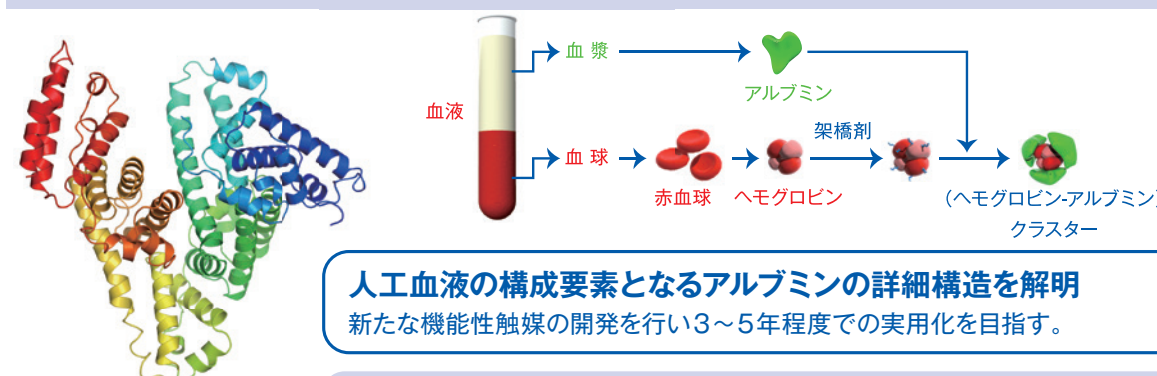
- ・宇宙実験により構造の精度が向上
- ・基質認識に関与するポケット構造、触媒残基の位置を確認

- 歯周病原菌の生育に重要なタンパク質DPP11の高品質な結晶を作成。詳細構造が明らかに。
- DPP11が基質であるペプチドを認識する仕組みが解明。
- 明らかになった詳細を詳細構造を基盤とした、薬剤候補化合物の合理的設計を開始

rCSA

血液関連タンパク質

人工血液開発への応用 中央大学／JAXA



人工血液の構成要素となるアルブミンの詳細構造を解明 新たな機能性触媒の開発を行い3～5年程度での実用化を目指す。

- ・イヌ由来血清アルブミンの立体構造を解明
- ・ヒト由来アルブミンとの構造比較が可能に

- 第1期実験では、結晶化・構造解析は利用者側で行うことを前提としていたところ、第2期実験からの新たな試みとして、結晶化・構造解析をJAXAが主体的に実施する共同研究の締結を可能とした。その第一弾として人工血液開発研究の共同研究を中央大と締結。
- イヌおよびネコ由来血清アルブミンの構造を明らかにした。その他、ヒト用人工血液の構成要素となるタンパク質の構造解析も実施中(一部完了)。
- ヒト用人工血液の開発完了を見据え、先行してイヌおよびネコ用人工血液の上市を目指す。



審査における評価のポイント

評価のポイント

下記について総合的に判断し、選定を行います。

評価項目		評価のポイント
大項目	中項目	
実施の妥当性	社会・産業界・学界の発展への貢献	◆ 学術的・社会的・産業的に意義があるか(いずれかでも可) ◆ 外部(学界・産業界・行政)からの具体的なニーズがあるか ◆ 別途定める宇宙実験の重点化領域に関連性のある研究テーマか
	「きぼう」実験の必要性	◆ 宇宙での実験が地上研究のどの部分に寄与するのか、または必要なのか
提案の優位性	類似または競合する研究・技術との比較	◆ 提案者の研究・技術は他提案者等の研究・技術に対して優位性があるか
	波及効果	◆ 得られる成果は当該分野の発展に貢献するか(マイルストーンとなり得るか)、他分野への波及効果はあるか ◆ 得られる成果が、将来的な外部資金獲得につながるか ◆ 社会・産業界へつながる成果となるか
提案の実現性・妥当性	目標の妥当性	◆ 最終目標および、そこに至るまでの工程が明確な理由に基づき定量的に設定されているか(「…のために、分解能を～Åから～Åにあげたい」、「…のために、～の構造を～Åの分解能で明らかにしたい」、「…のために、中性子解析が可能な大きさ(～mm角など)の結晶を作成したい」等の具体的な記述)
	研究課題の妥当性	◆ 現状を的確に把握し、各工程における研究課題が明確な理由に基づき具体的に抽出されているか ◆ 継続テーマの場合は上記に加えて、過去の宇宙実験の課題が適切に抽出されているか。また、その解決法が具体的に提案されているか
	研究方法の妥当性	◆ 目標達成のために必要な研究要素を取り上げており、確実に課題解決につながる研究方法であるか
	研究実施体制	◆ 課題を解決するために、適切な人員、設備等が配置されているか ◆ タンパク質試料の安定的な供給が可能か(ロット間の精製度の差が少ない試料調製法が確立されているか、試料提供を要請された場合に、迅速な対応が可能な人員、予算等の確保がされているか) ◆ 民間企業との連携があるか
	実施スケジュール	◆ 成果創出、目標達成のために妥当なスケジュールが組まれているか

◇ JAXA技術課題(膜タンパク質結晶化技術、大型結晶生成技術等)の解決に貢献いただける試料については、JAXA技術課題枠として採択する場合があります。



提出資料について

① テーマ提案書

提案タンパク質に係る基本的な事項を記載した書類です。

1つのテーマ提案に関連するものであれば、複数種類のタンパク質であっても1つのファイルに記入ください。

(例) ネイティブタンパク質、変異体タンパク質1、変異体タンパク質2、その他テーマに関連する異種のタンパク質など

同一のタンパク質に対して、多種類のリガンド化合物を結合させた複合体結晶の生成を想定する場合は、1種類として記載してください。

② 申込データシート

提案タンパク質に関する安全性の確認、輸出時の戦略物資非該当証明、ならびに宇宙実験に向けた結晶化条件検討実験に利用するための書類です。申込データシートの記入に関しては、以下の点にご注意ください。

専用のシートを用い、記入例を参考の上、提案タンパク質に関わる事項、データ等を記入してください。

提案タンパク質名が表示されているシートに、対応するタンパク質の調製状況、および結晶化状況についての詳細をご記入ください。

結晶の写真を貼付ください。

同一タンパク質試料の場合、結晶化条件は最良の条件を1つだけ記載してください。

複数の結晶化条件や複数の阻害剤との複合体結晶の生成を希望する場合には、申込データシート最下段の「その他」欄にその旨をご記入ください。

受付後の試薬の追加はできません。

申込後に溶液組成を変更する可能性がある場合には、申込時点で想定される試薬すべてについて記載してください。

以下の4点の安全性を確認の上、「タンパク質試料の安全性の確認」欄にご記入ください。

宇宙実験には毒性・病原性のある試料は搭載できません。

- I タンパク質の安全性: 当該タンパク質にはヒトへの毒性または病原性はない
- II 原材料の安全性: 当該タンパク質の原材料とした生物種はヒトへの毒性または病原性を獲得する可能性がない
- III 製造工程の安全性: 当該タンパク質の製造には毒性または病原性微生物の混入のない製造工程が保証されている
- IV そのための品質の要件: 当該タンパク質は、以上の安全性の保証、原材料の安全性の保証、製造工程の安全性の保証、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、毒性または病原性物質の混入がないことが確認されている

「WHO安全アセスメントレベル」はP30-31の

「実験室バイオセーフティ指針抜粋(WHO第3版)」を参照の上、記入してください。

※詳細については以下のホームページを参照してください。

英語版: <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>

日本語版: http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety3_j.pdf

「外為法／輸出貿易管理令による戦略物資に該当の有無」欄は、以下のホームページで「輸出貿易管理令別表第1 3の2(1)軍用細菌製剤の原料」を確認の上、ご記入ください。

<http://www.meti.go.jp/policy/anpo/law02.html>



テーマ提案書の記入例

※以下は、2018B期の様式です。今後変更される可能性があります。

JAXA PCG 実験 (2018B) テーマ提案書 基盤研究			
区分	項目		記入欄
基本情報	テーマ名		タンパク質結晶成長因子の高分解能結晶構造解析
	提案日		西暦 2018 年 12 月 15 日
	提案機関名		○○大学○○研究科
	研究代表者名 / 役職		蛋白太郎 / 研究開発員
	研究代表者名 / 所属機関 英文表記		Taro Tanpaku / ○○ University
	E-mail アドレス		xxxx@jaxa.jp
提案タンパク質	提案タンパク質 名称 1	提案タンパク質 1 正式名称 (英数文字)	Protein Crystal Growth factor 1
		略称 (英数文字 15 字以内)	PCG1
	提案タンパク質 名称 2	提案タンパク質 2 正式名称 (英数文字)	Protein Crystal Growth factor 2
		略称 (英数文字 15 字以内)	PCG2
	提案タンパク質 名称 3	提案タンパク質 3 正式名称 (英数文字)	
		略称 (英数文字 15 字以内)	
	提案タンパク質 名称 4	提案タンパク質 4 正式名称 (英数文字)	
		略称 (英数文字 15 字以内)	
	提案タンパク質 名称 5	提案タンパク質 5 正式名称 (英数文字)	
		略称 (英数文字 15 字以内)	
研究体制	提案テーマの実務担当者 / 役職		蛋白四郎 / 学生 (D1)
	実務担当者所属機関		
	共同研究者 1 / 役職		蛋白二郎 / 教授
	共同研究者 1 所属機関		○○大学○○研究科
	共同研究者 1 分担概要		PCG1 の構造研究の主導
	共同研究者 2 / 役職		蛋白三郎 / 特任准教授
	共同研究者 2 所属機関		○○大学○○研究科
	共同研究者 2 分担概要		PCG1 の結晶化試料調製の協力
	共同研究者 3 / 役職		
	共同研究者 3 所属機関		
	共同研究者 3 分担概要		
	共同研究者 4 / 役職		
	共同研究者 4 所属機関		
共同研究者 4 分担概要			
□ 宇宙実験搭載決定後，「機関名・提案者名・テーマ名・タンパク質名」を JAXA ホームページ等で公開することに <u>ご了承頂けない</u>場合は，左欄にチェックを入れてください。			

1 . 提案研究について

提案研究の概要	
(書ききれない分は自由フォーマットで結構ですので別紙を用意して記載して下さい (以下同様))	
研究の意義および目的	
現在の研究状況	
研究の背景や実績を踏まえて現在の研究状況を記載して下さい。	
提案研究の進展によって期待される成果・波及効果	
* 提案者の研究対象外でも構いませんので，本宇宙実験の目的が達成された後に社会に与える影響および波及効果について自由に記載して下さい。 本項目の文章は，宇宙実験への搭載が決定した後に，JAXA ホームページで使用させて戴く場合があります。 一般の人でも分かるように，平易な言葉での作成にご協力下さい。	
提案テーマのキーワード	テーマを表すのに相応しいと思われるキーワードを記載して下さい (複数可) 。例) 産業用酵素，未利用バイオマスの活用，抗ウイルス薬など
キャッチフレーズ	例) 生命機能の重要な未解決問題に迫る，世界最小の分子モータ，など
外部発表状況 (申請タンパク質関連)	
論文・学会発表，特許等について記載して下さい。 また，過去の宇宙実験の成果を含むものについては，先頭に"○"を付けてください。 Tanpaku T, et al., ○○○ revealed by X-ray crystallography. <i>JBC</i> . 1XX, 10XX-10XX, (20XX), DOI: ○ Tanpaku T, et al., Crystal structure of ○○○. <i>Biochemistry</i> . 4XX, 5X-5X, (20XX) 記載頂いた情報は本公募審査の参考情報として使用します。それ以外の目的で使用することはありません。	
外部資金獲得状況 (本提案テーマに関連しないものでも可)	
平成 29 - 31 年度 日本科学学術振興機構 さきがけ 「○○○」領域 研究題目「○○○な手法による原理解明」 平成 XX 年度 科研費 (若手 B)	
外部機関等連携先 (外部機関または企業等と連携がある場合は，記載して下さい。JAXA からの委託業者が，業務委託の範囲で実施することについては記載しないでください)	
○○研究所・○○博士 (計算科学) ○○大学・○○教授 (化合物合成) ○○製薬 (阻害剤設計)	



テーマ提案書の記入例

2. 過去の宇宙実験について

過去に宇宙実験に参加したことがあり、かつ、その際の関連あるいは継続テーマとして応募される方が対象です。新規提案者または新規テーマの場合は記入頂く必要はありません。

過去の実験結果
過去の宇宙実験で得られた知見・成果を記載してください。
識別された課題
過去の実験結果により識別された課題があれば記載してください。
今後の見通し
過去の実験で課題が明らかになっている場合は、課題解決に向けた方策として考えていることを具体的に記載してください。 過去の宇宙実験成果を基に新たな取組を開始する場合には、その内容について記載してください。

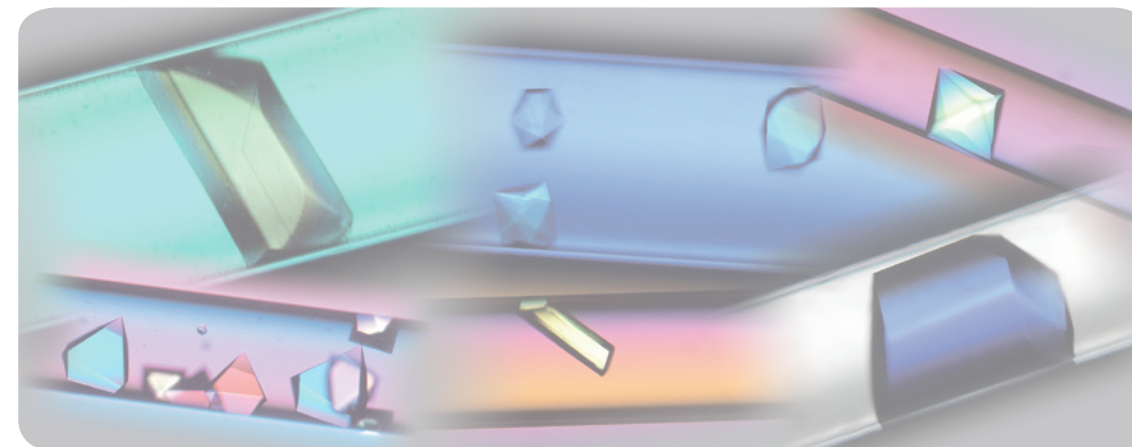
3. 宇宙実験について

宇宙実験の必要性
宇宙実験が地上研究のどの部分に寄与するのか、または必要になるのかが分かるように記載して下さい。
宇宙実験の目的・目標
現在の課題、結晶の準備状況を踏まえて、研究目的における宇宙実験の目標を、設定の根拠が明確となるように記載して下さい。 (例:「すでに〜Å分解能で構造解析済みである・・・を明らかにするためには〜Å程度の分解能が必要であるが、結晶化条件の最適化を実施しているものの、これまでのところ結晶品質の向上に成功していない・・・のために、分解能を〜Åから〜Åに上げたい」 「結晶はすでに得られており、結晶化の再現性も高いものの、これまで得られたデータセットの最高分解能は 4 Å 程度と低く、構造解析には至っていない・・・のために、一の構造を〜Åの分解能で明らかにしたい」 「・・・のために、中性子解析が可能な〜mm 角程度の大きさの結晶を作成したい。目標を達成するためには・・・を解決する必要があるが、・・・の方法を用いることで、解決可能であると考えている。」など)
宇宙実験の実施体制・環境・課題について
(例:本研究には一名の学生および職員が従事しており、常にタンパク質試料を調製している。そのため、宇宙実験に必要なタンパク質試料は即時供給可能である。 一方、結晶はすでに得られているものの、構造解析には至っておらず、最適条件は決定していない。宇宙実験の条件検討を開始する前に、結晶化条件の最適化段階から JAXA と協力して実施したい。)



申込データシートの記入例

JAXA PCG実験(2018B)申込データシート				
区分	項目	記入欄		
提案タンパク質名称1略称(英数字15字以内)		PCG1		
申し込み記入日	平成30年12月20日	受付番号		
研究代表者	所属機関	〇〇大学〇〇系研究科		
	研究代表者氏名/役職	蛋白太郎 / 研究開発員		
	研究代表者氏名の英文表記	Taro Tanpaku	所属機関の英文表記	〇〇 University
	E-mailアドレス	xxxx@jaxa.jp		
担当者	実験担当者(コンタクトポイント)/役職	蛋白太郎 / 研究開発員		
	実験担当者氏名英文表記	Taro Tanpaku		
	連絡先住所(郵便番号も記入)	〒305-8505	茨城県つくば市千現X-X-X	
	連絡先電話番号/ファックス番号	029-XXXX-XXXX / 029-XXXX-XXXX		
	E-mailアドレス	xxxx@jaxa.jp		
タンパク質の物理化学的情報	分子量(計算値)	25234	UniProt / refseq / GenBank Accession Number	KW-xxxx
	分子量(実測値、サブユニット等の泳動位置も含む)	25000	PDB IB	1xyz
	等電点(計算値、実測値の別も記入)	6.5		
	タンパク質基本情報	タンパク質の性質	水溶性タンパク質	タンパク質の局在
タンパク質の安全性情報	タンパク質試料の安全性の確認		Yes	
	WHO安全アセスメントレベル		Risk Group 1 (no or low individual and community risk)	
	外為法/輸出貿易管理令による戦略物資非該当の確認		非該当	
	生物学的機能(英文)		hydrolase	
	天然タンパク/組換タンパクの別		recombinant protein	
	対象タンパク質の由来となる生物種		Aspergillus oryzae	
	タンパク質試料の生成系	生物種名	Escherichia coli	
		株名	JM109	
		メーカー	TakaraBio	
		ATCCナンバー	69905	
タンパク質溶液搭載想定最大濃度		100.00	mg/ml	
毒性化合物		なし		





申込データシートの記入例

JAXA PCG実験(2018B)申込データシート							
区分	項目			記入欄			
提案タンパク質名称1略称 (英数字15字以内)				PCG1			
申し込み記入日		平成30年12月20日	受付番号				
これまでの結晶化実験の条件、状況	(1) タンパク質試料(溶液)の調製状況について						
	タンパク質濃度	75 (mg/ml)	pH (数値)	7	濃度 (数値)	濃度単位	
	組成 1	Tris-HCl			50	(mM)	
	組成 2	Calcium chloride			2	(mM)	
	組成 3						
	組成 4						
	組成 5						
	組成 6						
	組成 7						
	組成 8						
	組成 9						
	組成 10						
	タンパク質調製	タンパク試料調製実施者/役職	蛋白太郎 / 研究開発員				
		タンパク質調製量	数~10mg	当面の提供可能量	数~10mg		
		調製頻度	数ヶ月に1回	調製に要する日数	数日~1週間		
		調製の再現性	あまり高くない (30~80%)				
		品質の確認方法/その状況	SDS-PAGE				
		再現性の状況	ばらつきはない				
		溶液での保存性	2週間~2か月は可能				
		長期保存方法	溶液を凍結				
		保存試料での結晶化	可能。結晶品質への影響なし				
	保存試料結晶化の実験操作	必要 遠心分離					
	(2) 結晶生成状況について						
	リザーバ溶液組成、濃度、pH		pH (数値)	6.5	濃度 (数値)	濃度単位	
	組成 1	PEG8000			20	(%)	
	組成 2	Sodium acetate			100	(mM)	
	組成 3	Calcium chloride			2	(mM)	
	組成 4						
	組成 5						
	組成 6						
	組成 7						
	組成 8						
	組成 9						
	組成 10						
結晶化関連試薬の入手状況		入手困難なものはない					
結晶化方法の実験操作	結晶化方法	ハンギングドロップ					
	具体的な実験操作	タンパク質溶液とリザーバ溶液を1:1混合してドロップを作成					
	シーディングの有無	なし					
	特殊操作、結晶化に関する特記事項	4℃, 20℃ともに結晶が得られるが4℃のほうが結晶品質が高い					
	結晶化温度	4℃, 20℃					
結晶生成の再現性	ロットごとの再現性	低い					
	同一ロット試料の再現性	高い					
結晶成長	結晶が生成し始めるまでの日数	1週間~2週間					
	結晶成長の速さ	2~7日					
	結晶の大きさ (mm)	0.1*0.05*0.05					
生成結晶の安定性	生成結晶の経時安定性	安定					
	生成結晶の温度安定性	わからない					
複合体結晶	複合体結晶調製方法	共結晶					
	複合体結晶実験操作	結晶化開始時にタンパク質溶液と化合物溶液を混合					

JAXA PCG実験(2018B)申込データシート			
区分	項目		記入欄
提案タンパク質名称1略称 (英数字15字以内)			PCG1
申し込み記入日		平成30年12月20日	受付番号
(3) 回折実験状況			
過去の文献またはPDB登録 (もしある場合)	結晶化方法方法/容器	ハンギングドロップ	
	回折実験状況分解能 (Å)	3.2	
受付時以前利用者での結晶化状況	結晶化方法方法/容器	ハンギングドロップ	
	評価分類	6.既に構造解析済	
	結晶寸法(mm)	0.1*0.05*0.05	
	性状	柱状単結晶	
	回折実験状況	既に構造解析済み	
	ビームライン/施設名	PF AR-NW12A	
	回折実験実施取得日	2017年11月10日	
	回折実験実施温度(K)	100	
	目視で確認した最高分解能(Å)	3.4	
	データセットの統計値から判断した最高分解能(Å)	3.2	
	構造解析で利用した最外殻回折分解能(Å)	3.2	
	空間群	P1	
	格子定数	95.0, 98.5, 120.3, 89.3, 90.4, 92.2	
	Mosaicity	0.25	
	Rmerge	0.23	
	Completeness	99.8	
I/σ(I)	8.8		
結晶の多型について	P212121の結晶が得られる場合がある		
希望実験条件	結晶化試薬であるPEG8000の濃度を振ったいくつかの結晶化条件での結晶化を希望します。 また、本酵素の阻害剤 (2種) との複合体結晶作成を希望します。		
その他、特記事項、留意点	本酵素は、同一ロットでは性状が安定しているが、ロット間の違いが大きい。 一度の精製で得られるタンパク質量が少ないため、ロット間の差を少なくする方法を検討する必要がある。		



実験の準備

※以下は、カウンターディフュージョン法の利用を想定しています。その他の結晶化法の利用を希望される方は、個別にご相談ください。

選定後から実験実施までの流れ

提案タンパク質が搭載候補に選定されてから実験実施までの流れは次のようになります。

搭載する溶液の準備

搭載候補に選定されたタンパク質について、タンパク質溶液・結晶化溶液等をご用意いただきます。

宇宙実験に向けた条件検討

結晶化条件について、提案者側・JAXA側の両方で検討を行います。

搭載判断

最終的な搭載の可否および搭載する数量等を決定します。

宇宙実験の実施

搭載が決定した数量分の溶液を送付いただき、実験を実施します。

JAXAから提案者への技術支援

宇宙実験を円滑に実施するため、JAXAから提案者へ技術支援を行います。初めて参加される場合でもJAXAができる限りサポートしますので、どうぞご安心ください。不明な点などがあればいつでもご相談ください。

実験実施前

結晶生成の再現性確認

提案者と同等の方法でJAXAが結晶生成の再現性およびタンパク質試料の性状について確認します。

タンパク質試料の精製

提案者と調整の上、必要に応じてタンパク質試料の精製をJAXAで行います。

ゲルチューブ法による結晶化実験

ゲルチューブ法による結晶化実験を実施し、宇宙実験で行うカウンターディフュージョン法に適した結晶化条件を絞り込みます。

結晶の品質確認

必要に応じて、条件検討の過程で生成した結晶について品質確認を行います。

実験実施後

キャピラリーからの結晶取り出しと凍結保存

宇宙実験帰還後の結晶取り出しと凍結保存を実施します。
輸送および引き渡しについては細心の注意を払って行います。

結晶の凍結保存および経時変化チェック

必要に応じて、地上実験で生成した結晶を定期的に凍結保存し、結晶品質の経時変化を確認します。

宇宙実験に向けた結晶化条件検討

宇宙実験という限られた機会を活かして実験成果を挙げるため、**結晶生成条件を十分に検討することがとても重要です。**

提案者については、

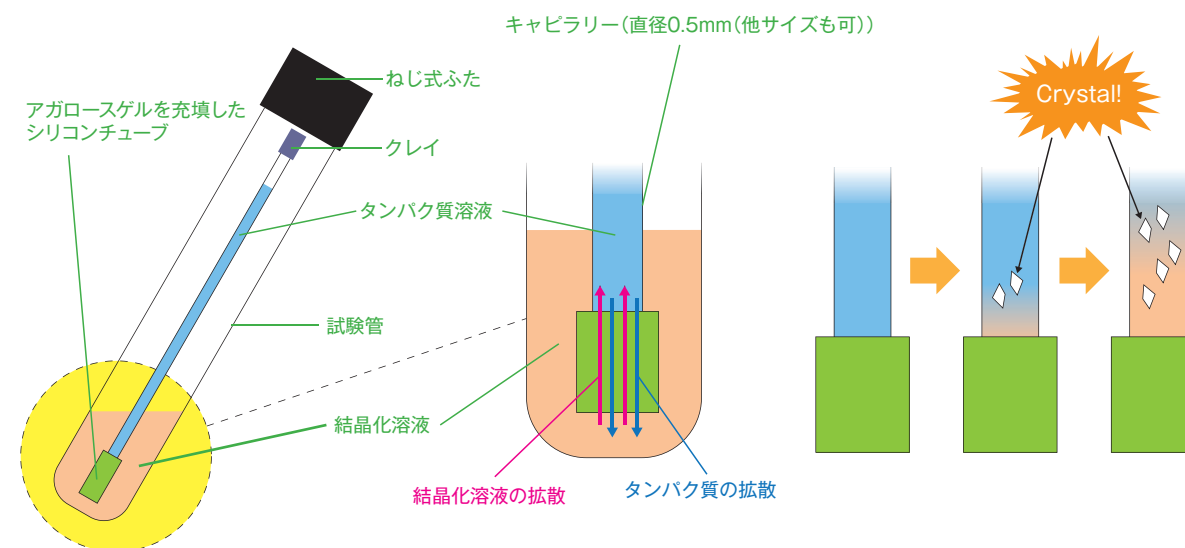
事前の地上実験を必ず行い、結晶化条件を絞り込むことをお願いしています。

また送付いただいた溶液を用いて、JAXAでも条件検討実験を行います。

条件検討の方法

条件検討の地上実験は、ゲル充填済みのシリコンチューブを用いた「ゲルチューブ法」で実施してください。その際、宇宙実験と同等の溶液充填条件となるよう留意してください。
ゲルチューブ法による結晶化作業に不安がある場合は、JAXAが技術支援を行います。
*宇宙実験で適用する結晶化手法によって条件検討の内容は異なります

ゲルチューブ法



結晶化条件の範囲

結晶化条件の検討は、提出した申込データシートの範囲内で行ってください。
特に、新たな試薬の追加は決して行わないでください。
安全性判断等の承認手続きに問題が生じ、宇宙実験を実施できなくなる可能性があります。

検討状況の確認

JAXAによる搭載判断の前に、結晶化条件の検討状況を伺います。
提案者側の検討結果とJAXAでの検討結果の両方を踏まえて、最終的な搭載判断を行います。



実験準備に関する注意事項

溶液の送付 ①

搭載決定前

搭載候補に選定された後、タンパク質試料、結晶化溶液、ならびにバッファ溶液を送付いただきます。送付いただいた試料を用いて搭載判断を行いますので、タンパク質試料ならびに結晶化溶液は、できる限り事前に結晶生成が確認できている試料と同じロットのものを送ってください。

標準的に必要な溶液量

タンパク質溶液	50 μ l以上	結晶化濃度の溶液をご準備ください
結晶化溶液	10ml以上	
バッファ溶液	10ml以上	

また、凍結品としての送付が可能な場合には、セラムチューブをこちらからお送りします。調製後、50 μ Lずつ計3本程度に分注保管したセラムチューブを返送頂ければ、条件検討から宇宙実験まで、同一ロットで実験することが可能です。ご検討下さい。

溶液の送付 ②

搭載決定後

搭載決定後に、改めて宇宙実験および地上対照実験（バックアップを兼ねる）に必要な溶液を送付いただきます。必要な溶液量については、個別に調整させていただきます。なお宇宙実験には少なくとも以下の溶液量が必要です。

宇宙実験に最小限必要な溶液量

タンパク質溶液		標準品	オプションで利用可能			
	使用するキャピラリー内径(mm)	0.5	0.3	0.7	1.9	3.0
	推奨溶液量(μ L)	25	9	48	63	150
※上記はタンパク質溶液とリザーバ溶液を1:1混合してキャピラリーに充填した場合に必要な溶液量です。タンパク質溶液をそのまま充填する場合には、上記推奨溶液量の2倍量が必要になります。						
結晶化溶液	4ml					
ゲル浸漬溶液	5ml					

※各種溶液量は、状況に応じて減じることが可能な場合もありますので、個別にご相談下さい。

また、結晶の取り出しと凍結保存作業をJAXAが行う場合、以下の溶液の提出をお願いすることがあります。

クライオプロテクタントを添加した結晶化溶液	数 ml
クライオプロテクタントを添加したバッファ溶液	数 ml

結晶生成の再現性情報の提供

結晶生成の再現性情報を提供してください。

宇宙実験の機会および1回の搭載量は限られたものですので、有用な成果を得るためには、結晶生成の再現性についての正確な情報が重要です。

試料・溶液類の提出量および提出期限

試料・溶液類の提出については、必要な量および提出期限を守っていただくようお願いします。

精密な条件検討を行うためですのでご協力ください。
提出量が少なかったり、提出時期が遅くなったりすると、精密な条件検討が実施できなくなる可能性があります。なおタンパク質試料の純度、安定性、精製ロットごとの結晶性の違い等については提案者側で管理してください。

事前の地上実験

事前に地上実験を行い、結晶生成条件を十分に検討してください。

提出いただいた結晶化条件を基にして、JAXAで宇宙実験のための条件検討を行います。その際、大幅な溶液条件の変更を行うことはできませんので、できる限り結晶生成条件を絞り込んでおいてください。

結晶生成温度

宇宙実験の温度環境は20 $\pm$ 2 $^{\circ}$ Cまたは4 $\pm$ 2 $^{\circ}$ Cです。

この温度での結晶生成が見込めない試料は、現在のところ受け付けることができません。ただし他の温度環境についてご要望がある場合には、将来に向けてご一報ください。

タンパク質安定性

宇宙実験では試料の充填から回折実験まで2～4.5か月かかります。

このため、長期にわたり20 $^{\circ}$ Cまたは4 $^{\circ}$ C近傍でタンパク質試料が変性しないことが求められます。タンパク質の安定性に不安がある場合は、お知らせください。

カビ等の発生防止

防カビ措置として、溶液のフィルター滅菌を推奨します。

結晶化条件に影響を与えないのであれば、防腐剤の添加でも結構です。

宇宙実験の中止および実施スケジュール変更の可能性

輸送機の打ち上げ時期の遅延等、諸般の事情により、やむを得ず宇宙実験が中止またはスケジュールが変更されることがあります。あらかじめご了承ください。

お問い合わせ先

宇宙実験に関するご質問は下記宛先までお気軽にお問い合わせ下さい。

E-mail: Z-crystal@ml.jaxa.jp

JAXAきぼう利用センター JAXA PCG募集担当 宛



実施内容と実験装置について

宇宙実験の概要

JAXA PCG第3期実験

	ロシア便	アメリカ便
打上げ	打上げ射場	カザフスタン バイコヌール宇宙基地
	打上げ宇宙船	ソユーズ宇宙船 またはプログレス補給船
結晶生成実験	結晶化場所	国際宇宙ステーション(ISS)日本実験棟「きぼう」
	実験期間	約4〜8週間
	結晶化温度	20℃ 4℃または20℃
回収	帰還地点	カザフスタン中部 太平洋上
	帰還宇宙船	ソユーズ宇宙船 ドラゴン補給船
試料充填	充填場所	バイコヌール宇宙基地 日本国内(筑波宇宙センター または支援業者所在地)
	充填時期	打ち上げ日の2〜3日前 打ち上げ日の2週間前
	結晶化手法	SGT法, SLC法, OT法 SGT法, OT法, 透析法 *軌道上通液開始技術を適用することで、 打上遅延にも対応
搭 載 数	1回あたり96条件	1回あたり36条件から 72条件

SGT法：
詳細は次ページ実験装置の紹介
および、P.19「宇宙実験に向けた
結晶化条件検討」の項を参照く
ださい。

SLC法：
SGT法をベースに、より内径の
大きなキャピラリーを使用できるよ
うに改変した手法です。大型の
結晶を必要とされる場合にご利用
頂けます。

OT法(浸透チューブ法)：
技術実証中の手法です。蒸気拡
散法の結晶化条件がそのまま適
用可能です。タンパク質セルか
らの溶質の漏出がないため、希
少な化合物等の使用量が従来に
比べて大幅に減少可能です。

透析法：
技術実証中の手法です。キャピ
ラリーからのタンパク質の漏出が
ないため、結晶化時のタンパク
質濃度を下げたくない場合に有
効です。

なお、嫌気環境下での結晶化に
も対応していますので、必要に
応じてお申し出ください。



実験装置の紹介

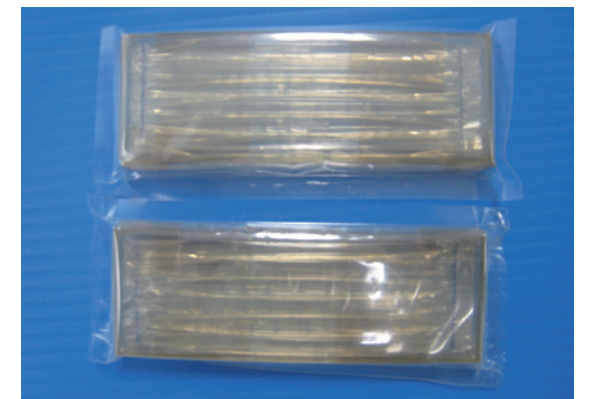
宇宙実験では、主としてゲルチューブ法を用いて結晶生成を行います。
そのほか、浸透チューブ法(OT法)や透析法、バッチ法にも対応可能な容器も使用可能です。

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。

※ JAXA Crystallization Box - Sealbag Gel Tube



結晶化容器「PETIT」

PETITは、米国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。



宇宙実験と地上対照実験

宇宙実験用と地上対照実験用を1セットとして実験を行います。
宇宙実験用の容器にトラブルが発生した場合は、地上対照実験用の容器を宇宙実験に使います。

結晶の引渡し

- 宇宙実験から帰還した結晶は、JAXAが日本に輸送します。外観検査、光学観察等を行った上で、結晶生成状況
をご連絡します。結晶の引渡しは、基本的に支援業者所在地またはJAXA筑波宇宙センターとなります。地上対
照実験で生成した結晶も併せてお渡しします。郵送を希望される方は別途ご相談下さい。
- キャピラリーからの結晶取出し支援は支援業者所在地で実施します。支援を希望される方は、別途日程調整のう
え、上記所在地までお越し頂くこととなります。また、結晶取り出し後の凍結保護作業も同時に支援業者所在地
で実施頂けます。
- X線回折実験ビームタイム取得でお困りの場合、支援業者所在地で凍結保存した結晶に限り、JAXAで取得する
ビームタイムを供与出来る可能性がありますので、ご相談下さい。
- 宇宙実験の貢献により研究の進展や成果創出があった場合は、当該結晶引渡し後、原則2年以内に、査読付き論
文や学会発表等の形態で研究成果の公表をお願いします。



成果の取り扱いと発表時のお願い

結晶品質情報の提供

宇宙実験および地上対照実験で得られた結晶を用いて回折データを取得した際には、JAXAまでご連絡ください。
所定の「結果取り纏めシート」に必要事項を記載の上、回折データ取得日から60日以内にご提出ください。

「結果取り纏めシート」に記載していただく結晶品質情報

- ・ 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

この際、宇宙実験で生成された結晶と地上対照実験で生成された結晶との比較が明確にできるよう、
できる限り同一のX線回折実験条件での測定・解析をお願いします。

結晶品質情報の取り扱い

回折データの結晶品質情報については、目的達成基準の判定、
ならびに今後の宇宙実験に必要な基礎データとして利用させていただきます。
また、以下の情報も合わせて保管させていただきます。

- ① タンパク質の分子量
- ② 地上での結晶化条件
- ③ ②の条件で結晶化を行った際の結晶生成状況
- ④ 宇宙実験に向けた結晶化条件検討結果、地上での結晶生成時間経過、光学観察像、結晶化状況
- ⑤ 宇宙実験での結晶化状況、光学観察像
- ⑥ 提案試料の宇宙生成結晶に対する微小重力効果についての所見

※④⑤の情報はJAXAから提案者に無償でご提供します。

これらの情報を提案者のご了承なく公開することはありません。
ただデータの一部もしくは統計値については、タンパク質名や提案者が特定されない形で、
学会、展示会、他の宇宙機関との情報交換等で発表する場合がございます。その点はあらかじめご承知おきください。

成果発表時のお願い

宇宙実験で得られた成果を公表する場合には、「きぼう」日本実験棟を利用した成果であること、
ロシア連邦宇宙局のプログレス／ソユーズ宇宙船を輸送手段として利用したこと、ヨーロッパ宇宙機関および
グラナダ大学が開発した技術を利用していることを謝辞として入れていただくようお願いいたします。

〔謝辞文例〕

本研究の一部は、国立研究開発法人 宇宙航空研究開発機構が実施している[「きぼう」利用高品質タンパク質結晶生成実験]を利用して行ったものである。また、ロシア連邦宇宙局との協力によりプログレス／ソユーズ宇宙船を利用している。宇宙実験でのタンパク質結晶生成技術の一部は、ヨーロッパ宇宙機関とスペインのグラナダ大学が共同で開発したものである。

This study is contributed by a part of "High-Quality Protein Crystal Growth Experiment on KIBO" promoted by JAXA (Japan Aerospace Exploration Agency). Russian Space craft "Progress" or/and "Soyuz" provided by Russian Federal Space Agency were used for space transportation. A part of space crystallization technology had been developed by European Space Agency and University of Granada.

※以上は、ロシアとの国際協力による20℃での宇宙実験の例です。
その他の結晶化法あるいはアメリカ輸送便を利用された方は、文例が異なりますので、個別にお問い合わせください。



情報の取り扱いについて

提出時期	源泉	情報項目	公開 非公開 (※1)	公開時期
提案受付時	提案書	提案者名	公開	搭載決定時
		提案機関名	公開	搭載決定時
		提案テーマ名	公開	搭載決定時
		タンパク質正式名称	公開	論文投稿等成果公開時(※5)
		Uniprot等番号	非公開	
		タンパク質略称	非公開	
		達成目標	非公開	
		実験目的	公開	宇宙実験終了から6カ月後 論文投稿等成果公開時(※5)
		提案研究の概要	公開	論文投稿等成果公開時(※5)
		研究の具体的内容	公開	論文投稿等成果公開時(※5)
		研究業績	非公開	
		外部資金獲得状況	非公開	
	申込 データシート (※変更があれば 再提出して下さい)	タンパク質基本情報(※3)	限定公開 (※2)	宇宙実験終了から6カ月後
		タンパク質安全性情報	非公開	
		結晶化関連溶液情報	非公開	
		宇宙実験前地上 実験成果(※4)	公開	宇宙実験終了から6カ月後 論文投稿等成果公開時(※5)
		結晶化、回折実験状況	非公開	
実験で得られた 結晶の回折データ 取得日から 60日以内	成果 取り纏め シート	地上実験を含む 宇宙実験成果(※4)	公開	宇宙実験終了から6カ月後 論文投稿等成果公開時(※5)

(※1)公開とは不特定多数の人が閲覧できる状態を指します。非公開とはJAXA、支援業者、外部選考評価委員だけが
閲覧できる状態を指します。ただし例外として、安全性判断に係る情報については、米国NASAおよびロシア宇宙
局が上記に加わります。なお情報を公開する場合でも、対象タンパク質や提案者を特定できるような情報の場合
には、提案者の了承を得ずに公開することはありません。

(※2)限定公開とは、統計データとしての公開、または提案者、タンパク質名を特定できない状態として公開すること
を指します。統計データの具体的な例としては、地上よりも分解能が上がった試料を実験機会毎に集計する場合に、
数に含めて計算するということを指します。

(※3)由来生物や発現系、タンパク質の局在、等電点、分子量等の基本的な情報

(※4)Full sphereとhighest sphereのresolution range、R merge value、R symm value、completeness(%）、
I/sigma(I)およびMosaicity

(※5)提案者了承の上、JAXA HPを含む機構の各種メディアに掲載させて頂く可能性があります。



実験室バイオセーフティ指針抜粋

表1 感染性微生物のリスク群分類

リスク群1	(個体および地域社会へのリスクは無い、ないし低い) ヒトや動物に疾患を起す可能性の無い微生物。
リスク群2	(個体へのリスクが中等度、地域社会へのリスクは低い) ヒトや動物に疾患を起す可能性はあるが実験室職員、地域社会、家畜、環境にとって重大な災害となる可能性のない病原体。実験室での曝露は、重篤な感染を起す可能性はあるが、有効な治療法や予防法が利用でき、感染が拡散するリスクは限られる。
リスク群3	(個体へのリスクが高い、地域社会へのリスクは低い) 通常、ヒトや動物に重篤な疾患を起すが、通常の条件下では感染は個体から他の個体への拡散は起こらない病原体。有効な治療法や予防法が利用できる。
リスク群4	(個体および地域社会へのリスクが高い) 通常、ヒトや動物に重篤な疾患を起し、感染した個体から他の個体に、直接または間接的に容易に伝播され得る病原体。通常、有効な治療法や予防法が利用できない。

表2 リスク群分類と、BSレベル分類の関連、主な作業方式、機器

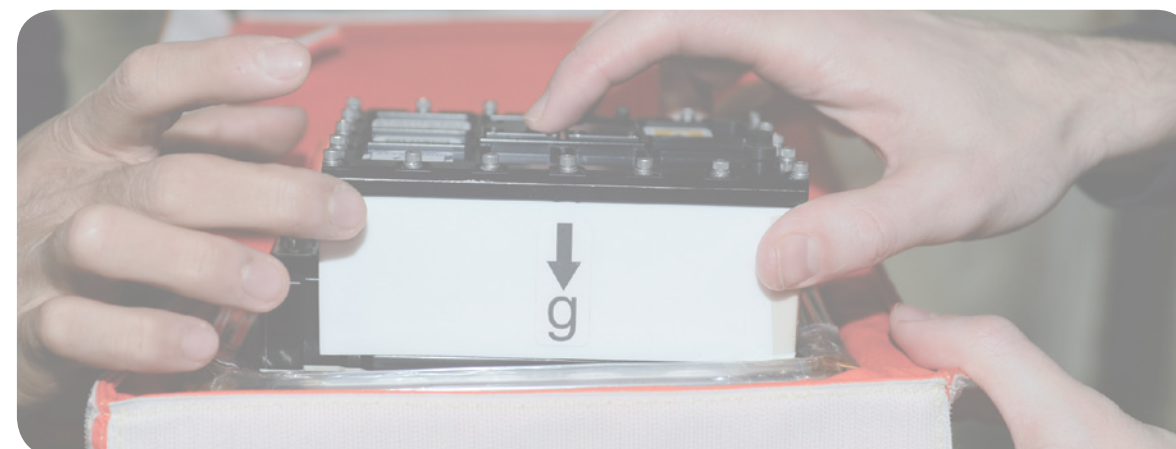
	BSレベル	実験室の型	作業方式	安全機器
リスク群1	基本- BS レベル1	基本教育、研究	GMT	特に無し；開放型作業台
リスク群2	基本- BS レベル2	一般医療、診断 検査、研究	GMT+ 保護衣、 バイオハザード標識	開放型作業台+ エアロ ゾル発生の可能性ある 場合はBSC
リスク群3	封じ込め- BS レベル3	特殊診断検査、 研究	BS レベル2 + 特別 な保護衣、入域の 制限、一定気流方向	全操作をBSC/ ないし、 その他の封じ込め機器 を用いて行う
リスク群4	高度封じ込め 実験室- BS レベル4	特殊病原体施設	BS レベル3 + 入口 部はエアロック、 出口にシャワー、 特別な廃棄物	クラスⅢ BSC または 陽圧スーツ+ クラスⅡ BSC、(壁に固定した) 両面オートクレーブ； 給排気は濾過

略語：BSC = 生物学的安全キャビネット；GMT = 基準微生物実験技術(本指針第IV部参照)

表3 BSレベル別施設基準要約

	BSレベル 1	BSレベル 2	BSレベル 3	BSレベル 4
実験室の隔離 ^a	不要	不要	要	要
汚染除去時の実験室気密封鎖性能	不要	不要	要	要
換気	内側への気流	不要	望ましい	要
	制御換気系	不要	望ましい	要
	排気のHEPA濾過	不要	不要	要/不要 ^b
入口部二重ドア	不要	不要	要	要
エアロック	不要	不要	不要	要
エアロック+シャワー	不要	不要	不要	要
前室	不要	不要	要	—
前室+シャワー	不要	不要	要/不要 ^c	不要
排水処理	不要	不要	要/不要 ^c	要
クオ レ ー ト ブ	現場処理	不要	望ましい	要
	実験室内	不要	望ましい	要
	両面オートクレーブ	不要	望ましい	要
生物学的安全キャビネット	不要	望ましい	不要	要
職員安全モニタリング設備 ^d	不要	不要	望ましい	要

- a：一般交通より、環境的、機能的に隔離。
b：排気系の位置による(第4章参照)。
c：実験室内で取り扱われる病原体による。
d：例、覗き窓、有線テレビ、2方向通信系。



国際宇宙ステーション「きぼう」での

高品質タンパク質 結晶生成実験

基盤研究利用コース

搭載タンパク質募集要項(共通編)
実験の手引き

国立研究開発法人
宇宙航空研究開発機構

筑波宇宙センター

〒305-8505 茨城県つくば市千現2丁目1-1

E-mail : Z-crystal@ml.jaxa.jp

高品質タンパク質結晶生成実験ホームページ

<http://iss.jaxa.jp/kiboexp/theme/first/protein/>

宇宙実験ホームページ

<http://iss.jaxa.jp/kiboexp/>



○この冊子で使用している写真、イラストの著作権およびその他の権利はJAXA/NASAまたはJAXA/NASAに使用を認めた権利者に帰属します。

平成30年5月31日発行

リサイクル適性 
この印刷物は、印刷用の紙へ
リサイクルできます。