

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**

第2期実験シリーズ 後期(2015-2017年度)
基盤研究利用コース

搭載タンパク質 募集要項





従来実験との変更点について

テーマについて

高品質タンパク質結晶生成実験では、将来のシーズ探索・実験技術向上・国の戦略研究への貢献に向けて、提案タンパク質の研究テーマを幅広く募集致します。特に、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、さがけ等)

科学技術イノベーション総合戦略2015に掲載されるクリーンエネルギー関連や国の創薬事業テーマ(創薬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の技術開発として協力頂けるテーマ(膜タンパク質結晶化技術、大型結晶生成技術等)

第2期実験シリーズ後期実験の基本的な考え方

- 今回は、従来実施してきた打上げ機会ごとの募集とは異なり、2015年度後半～2017年度に予定されている複数回の宇宙実験を対象(最大3回)として募集を実施します。申込み時に希望する実験回数を記載ください。
- 初回の実験機会は、2016年3月です。具体的な実験機会提供スケジュールについては、採択後に各実験テーマ毎に調整させて頂きます。現在の想定スケジュールは下記に示すスケジュール案を参照下さい。

募集・実験スケジュール	2015～2017年度	2015	2016	2017
2015後期募集(今回)	～8月20日	■		
搭載候補タンパク質選考評価委員会	9月下旬	▲		
共同研究有効期間	～2017年度末	■	■	■
第4回実験条件検討	～2016年1月中旬	■		
搭載可否判断選考評価委員会	2016年1月下旬		▲	
第4回実験打上げ	2016年3月18日頃(予定)		▲	
第4回宇宙実験	3月18日～5月5日(予定)		■	
第4回実験回収	5月5日(予定)		▲	
タンパク質結晶構造解析	5月中旬～11月中旬頃		■	
第5回実験条件検討	1月下旬～7月上旬		■	
第5回実験打上げ～回収	9月下旬～11月中旬		▲▲	
タンパク質結晶構造解析	11月下旬～2017年5月下旬		■	
ロシア宇宙機による実験機会	第6回実験打上げ予定			▲
米国宇宙機による実験機会	計画中		▲	▲

結晶化温度の多様化

従来は20℃での結晶化実験機会のみの提供でしたが、今回の募集からは、米国の打上げ・回収機を利用することで、4℃での結晶化実験も可能となります。詳細についてはお気軽にお問い合わせ下さい。

新規技術

JAXAでは、現在、下記の新規技術を開発中です。
当技術の利用を希望される方はお気軽にご相談下さい。

結晶化手法： 浸透チューブ(OT)法^(*)、透析法(@4℃)、LCP法(膜タンパク質)

軌道上での結晶化開始(@4℃)

実験後のタンパク質結晶の高圧環境下での凍結

(*)：蒸気拡散法の結晶化条件がそのまま適用可能なため、実験条件の検討時間を大幅に短縮可能です。
また、タンパク質セルからの溶質の漏出が無いため、希少な化合物等の使用量が従来のカウンターディフュージョン法と比べて大幅に減少可能で、溶液量も少量で済みます。

結晶の引き渡しについて

- 宇宙実験から帰還した結晶の引渡しは、基本的に支援業者所在地(丸和栄養食品(奈良県大和郡山市))またはJAXA筑波宇宙センターとなります。
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またはJAXA筑波宇宙センターで実施します。
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上記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、上記所在地で凍結保護・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。

応募締め切り

2015年8月20日(木) 17時

選定結果

2015年9月下旬に開催される選考評価委員会での審議を経て、
すべての応募者に電子メールにて選定結果(内示)をお知らせします。

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@jaxa.jp

JAXAきぼう利用センター JAXA PCG募集担当 宛

この募集要項は、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

参加のお申込み・審査



搭載タンパク質・テーマ提案の応募

実験を行うタンパク質を広く募集します。応募に際していくつかの書類を提出していただきます。

審査による搭載候補の選定

試料の安全性や研究の実現性、期待される成果等に基づいて「きぼう」への搭載候補を選定します。

実験に向けた準備



結晶化条件の検討

選定されたタンパク質について、結晶化条件を絞り込むための地上実験を行います。

搭載タンパク質の最終決定

「きぼう」に搭載するタンパク質およびその数量等を決定します。

宇宙実験の実施



宇宙実験の実施

ロシアのソユーズ宇宙船などで「きぼう」へと運び結晶生成実験を行います。

結晶の回収・引き渡し

ソユーズ宇宙船で持ち帰った結晶を日本へと運び、提案者への引き渡しを行います。

実験後の成果発表



回収された結晶の回折実験

提案者によって回折実験を行い、その実験結果を報告していただきます。

成果発表

引き渡しから2年以内に、論文発表等で成果を公開していただきます。

目 次



本プロジェクトについて

本プロジェクトの概要・背景	06
プロジェクト参加のメリット	08
第一期実験シリーズでの実績	10



参加のお申込み・審査

応募概要・お申込み方法	12
審査における評価のポイント	14
提出資料について	15



実験に向けた準備

実験の準備	22
実験準備に関する注意事項	24



宇宙実験の実施

実施内容と実験装置について	26
---------------------	----



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	28
情報の取り扱いについて	29



その他・参考資料

実験室バイオセーフティ指針抜粋	30
-----------------------	----





本プロジェクトの概要・背景

本プロジェクトの背景

本プロジェクトは、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実施するものです。

2009年から2013年にかけて、第1期実験シリーズとして計6回の実験を行い、一定の成果を挙げることができました。それを受けて、2013年の後半から、新たに6回の実験を行う第2期実験シリーズがスタートしています。

JAXAがこれまでに蓄積してきた技術と経験を活かして、試料の受付から選定、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。

本プロジェクトを通じて、高品質タンパク質結晶生成技術の発展に不可欠な技術要素の開発を継続的に実施し、極めて広範な領域にまたがる日本のタンパク質研究の発展に貢献します。

本プロジェクトの目的

「きぼう」利用機会の拡大による、日本の科学技術力の向上

日本のタンパク質研究の発展に対する貢献

宇宙実験の継続的な実施による成果の創出

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。

提案タンパク質の研究テーマについては幅広く提案を受け付けます。

「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。

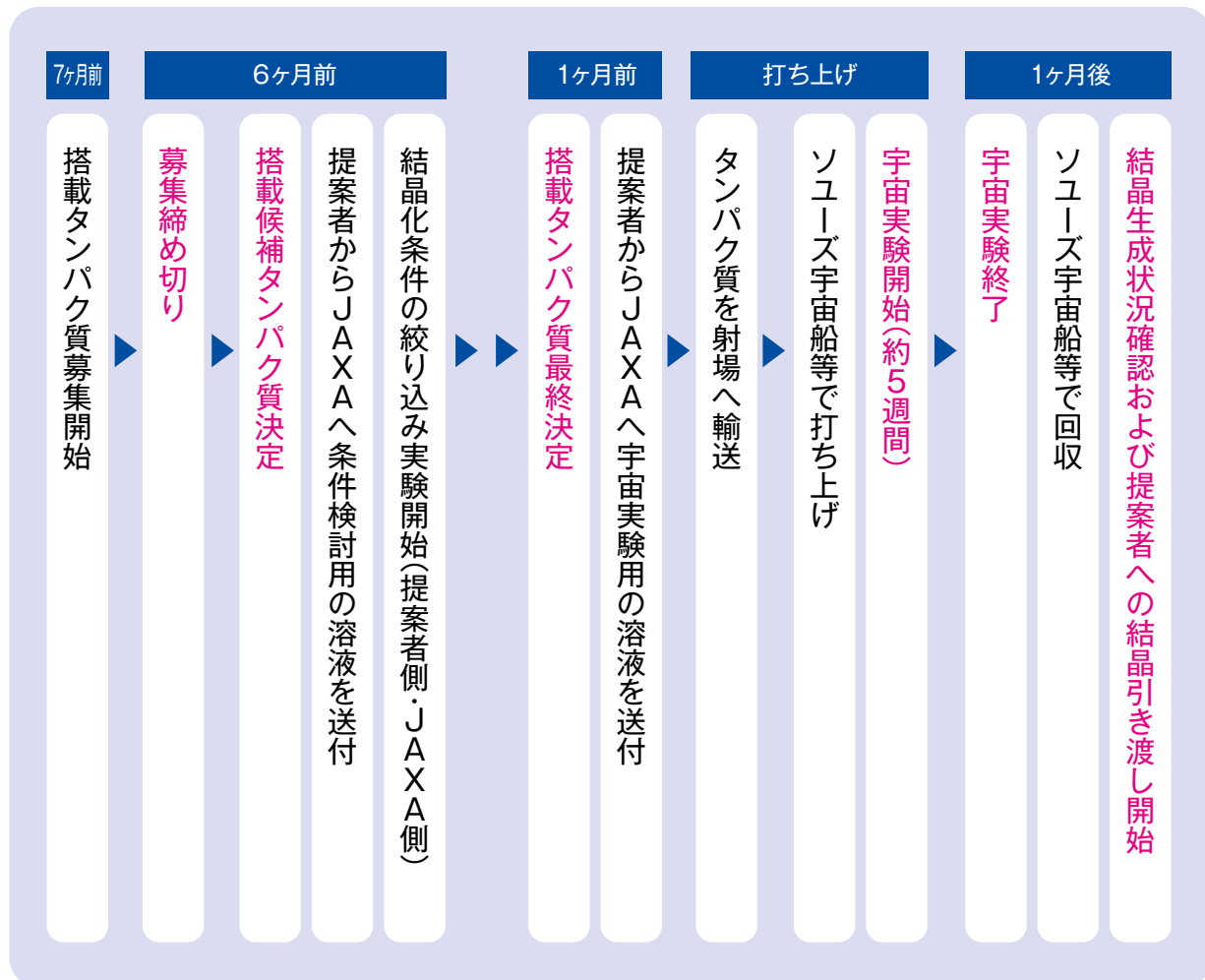
また「こういう実験はできるのかな?」など、ご提案・ご質問事項があればお気軽にお問い合わせください。

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2015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)

打ち上げ時期を起点とした標準的な全体スケジュール(月単位)



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@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。

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

JAXA側の事前実験によって生成された結晶を
提案者へ提供するなど、広く技術支援を行います。

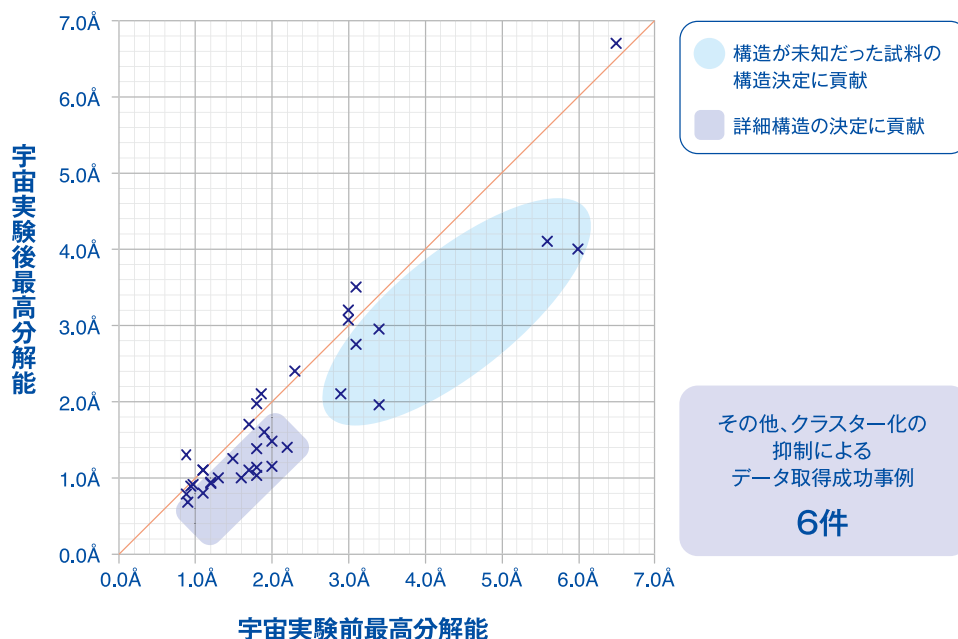
宇宙実験による分解能改善実績

第1期実験シリーズ第1回から第5回の成果のまとめ

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。

1Åを超える超精密構造解析に貢献することも可能です。

宇宙実験による分解能改善



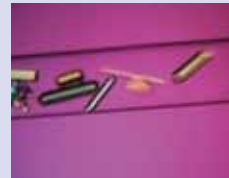
微小重力環境の効果

クラスター化の抑制

地上実験



宇宙実験



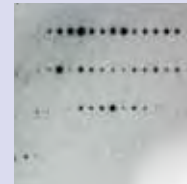
モザイクシートの改善

地上実験



0.523

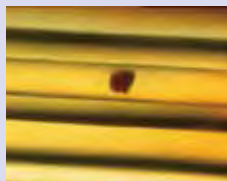
宇宙実験



0.209

分解能の改善

地上実験



2.80Å

宇宙実験



1.46Å



沈殿



1.50Å

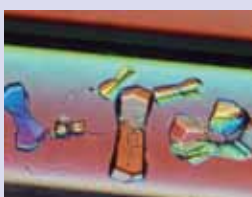


1.30Å



1.06Å

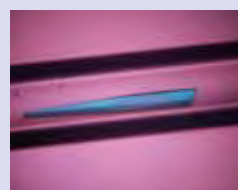
ツイン結晶の解消



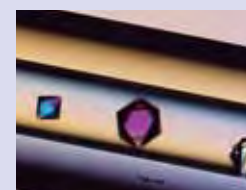
異なる空間群の結晶の生成



$P2_1$
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

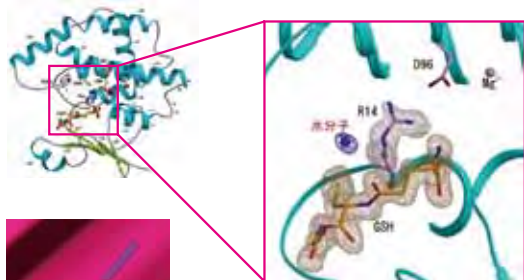


第1期実験シリーズでの実績

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



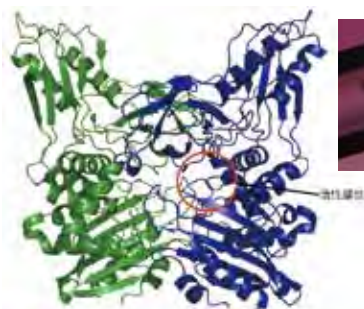
H-PGDS阻害化合物により筋萎縮を軽減(濃い赤が筋萎縮部)
※イメージ

- 製薬企業との協力により、筋ジストロフィーに有効な薬物候補化合物を開発し、動物による有効性・毒性の評価を実施中。5年程度で医薬品認証取得を目指す。
- 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。

インフルエンザ菌由来PBP4

抗生物質関連タンパク質

詳細な構造の薬物候補化合物の設計への応用 横浜市立大学／大阪大学



インフルエンザ菌のペニシリン結合タンパク質(PBP4):
インフルエンザ菌由来のペニシリン結合タンパク質の
詳細構造を解明



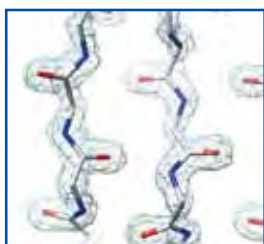
- ・宇宙実験により構造の精度が向上
- ・薬物候補化合物を製作し複合体での結合状況を確認

- 宇宙実験で詳細な構造データを取得。
- 小児の気道感染症の原因菌であるインフルエンザ菌に対する抗生物質として有効な複数の薬物候補化合物を開発し、有効性を確認中。
2年程度で動物実験への移行を目指す。
- 薬物候補化合物、抗菌作用に関する生化学データ及び立体構造データをセットにし、製薬企業へのライセンス化に向けた売込みを展開中。

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

地上結晶データ(1.8Å)



宇宙結晶データ(1.1Å)



赤い部分が水素原子

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。

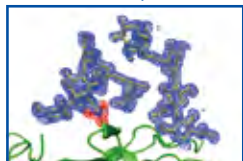
セルロースを分解するタンパク質

工業的な機能性触媒への応用 株式会社 丸和栄養食品／大阪大学

糖鎖の部分



結晶データ(0.92Å)



セルロースの分解酵素：
植物細胞の細胞壁や繊維の主成分である
セルロースを、触媒反応により分解する酵素の
糖鎖を含む詳細な構造を解明

食物を原料としないバイオ
エネルギーの生産に利用可能な
機能性触媒としての応用が可能に
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。

- 化学処理を行わず、環境負荷の少ない機能性触媒を利用した反応系でのバイオエネルギーの生産法の開発が可能。
- タンパク質工学の技術を適用し、より高効率で安定な機能性触媒の開発に着手。



応募概要・お申込み方法

応募資格

日本国内の大学または公的研究機関に所属していること。

JAXAとの間で利用契約(共同研究契約)の締結が可能であること。

本プロジェクトは、上記2つを満たす方であればどなたでもご応募いただけます。ぜひご検討ください。

応募の内容

「きぼう」への搭載を提案する試料について、いくつかの書類を提出していただきます。
外部委員で構成される選考評価委員会がそれをもとに、
試料の安全性、研究の実現性、社会的なインパクトや波及効果、期待される成果等についての評価を行い、
「きぼう」への搭載候補を選定します。

※評価基準についてはP14をご参照ください。

応募に際しては複数の種類の試料をご提案いただいても構いません。

提出書類

応募の際に提出していただく書類は以下の3種類です。

- ①基盤研究利用制度申込書
 - ②テーマ提案書
 - ③申し込みデータシート
 - ④タンパク質試料の安全性に関する保証書
- ①②④については、署名・押印後のカールスキャンをPDF形式にしたものを合わせてお送りください。

応募方法

前項の提出書類を電子メールに添付の上、下記メールアドレス宛に送付してください。

E-mail: Z-crystal@jaxa.jp

JAXAきぼう利用センター JAXA PCG募集担当 宛

共同研究契約

選定された場合、提案者とJAXAとの間で利用契約(共同研究契約)を締結させていただきます。
本制度においては、約款による契約締結方式を採用しています。提案者は約款に定める契約条件に同意のうえ、応募に必要な提出書類を提出してください。JAXAからの実施承諾書の発送をもって契約が成立します。
契約書(約款)は以下のURLを参照ください。

<http://iss.jaxa.jp/kiboexp/participation/application/#applied>

ただし、JAXA技術開発テーマとしての共同研究、JAXAがCI(研究分担者)として実験に参加する場合等についての利用契約(共同研究契約)は利用者と個別に調整させていただきます。

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下記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。



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	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 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	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 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	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 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	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 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	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 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	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 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
	研究方法の妥当性	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 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	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 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	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 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

※以下は第2期実験シリーズ第1回用の様式です。今後変更される可能性があります。

JAXA PCG 第2期後期実験 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		リボソームタンパク質Xの高分解能結晶構造解析	
	提案日		平成27年7月30日	
	研究代表者の自署/押印		印	
提案記号・番号				
研究代表者所属機関等	提案機関名		〇〇大学〇〇研究科	
	研究代表者名/役職		蛋白太郎 / 教授	
	研究代表者名/所属機関 英文表記		Taro Tanpaku / 〇〇 University	
	電話番号	029-XXXX-XXXX	連絡先住所	〒305-8505 茨城県つくば市千現2-1-1
	E-mailアドレス		xxxx@jaxa.jp	
提案タンパク質	提案タンパク質名1	提案タンパク質1正式名称(英数字)	ribosomal protein X	
		UniProt/refseq/GenBank Accession Number	UniProt Keywords; KW-xxxx	
		略称(英数字15字以内)	RPX	
	提案タンパク質名2	提案タンパク質2正式名称(英数字)		
		UniProt/refseq/GenBank Accession Number		
		略称(英数字15字以内)		
	提案タンパク質名3	提案タンパク質3正式名称(英数字)		
		UniProt/refseq/GenBank Accession Number		
		略称(英数字15字以内)		
	提案タンパク質名4	提案タンパク質4正式名称(英数字)		
		UniProt/refseq/GenBank Accession Number		
		略称(英数字15字以内)		
	提案タンパク質名5	提案タンパク質5正式名称(英数字)		
		UniProt/refseq/GenBank Accession Number		
		略称(英数字15字以内)		
研究体制	共同研究者1/役職		蛋白二郎 / 教授	
	共同研究者1所属機関		〇〇大学〇〇研究科	
	共同研究者1分担概要		RPX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		〇〇大学〇〇研究科	
	共同研究者2分担概要		RPX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			
提案研究の概要				
<p>本研究はタンパク質合成反応を担っているリボソームタンパク質X (ribosomal protein X; 以下RPX) を結晶構造に基づく構造化学的な観点から酵素反応を解明することを目指すものである。RPXは2001年に3.8Å分解能の結晶構造が報告されてから2011年までに1.9Å分解能の結晶構造が報告されている。現在、最高分解能の1.9Å分解能の結晶構造を我々の研究グループが報告し、活性中心に存在するMn₄CaO₅クラスターの分子構造を初めて明らかにしたが、0.1-0.2Å程度の微細な結合長の差異がRPXの触媒機構を理解する上で重要であることが計算化学的な解析から推定されており、このような精密な構造の議論をするためには、1.5Å以上の分解能でなければ測定誤差と判別をつけることができない。そのため、本提案研究は現在の1.9Å分解能を大幅に超える1.5分解能の結晶構造解析を目指すものである。RPXの触媒機構の理解は無尽蔵な水と光から電子エネルギーを作り出すクリーンなエネルギー生産システムを人工的に利用するテクノロジー開発の設計指針となるため、昨今の社会問題となっている温暖化による環境問題や石油エネルギーの枯渇問題の解決に繋がるエネルギーイノベーションの手がかりになると期待される。</p>				

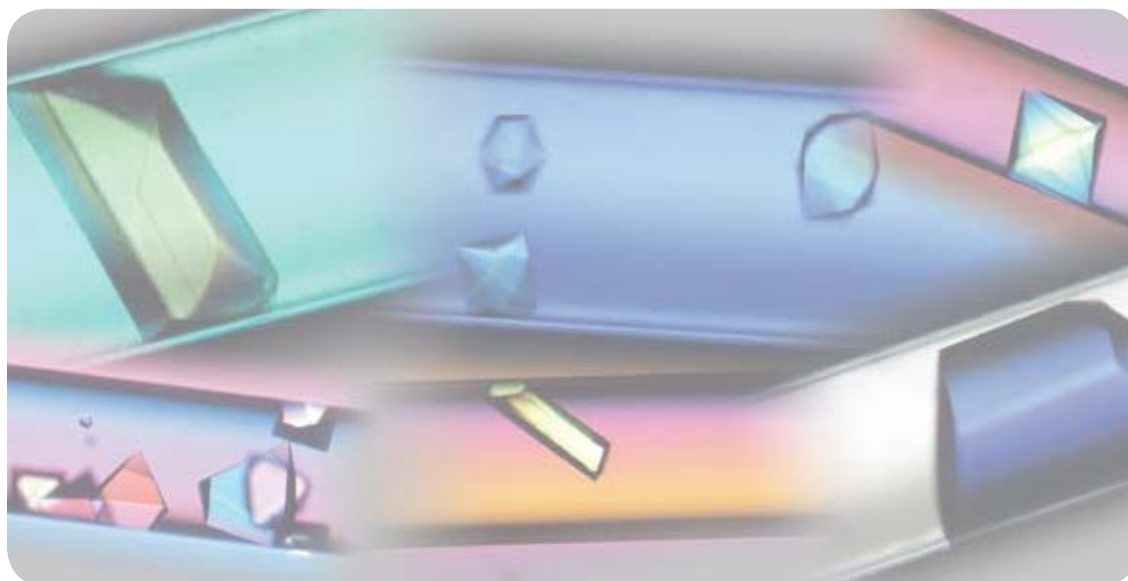
研究の具体的な内容
<p>研究の背景：</p> <p>我々はリボソームタンパク質X(RPX)の精密な結晶構造解析による触媒反応の理解と人工光合成を目指した触媒分子の設計指針の提案を目指した研究を行っている。現在の1.9Å分解能の結晶構造では構造誤差および測定誤差が大きいため触媒反応を正確に理解することが困難であるため、計算化学的な研究から指摘されている0.1-0.2Å程度の構造変化を十分に説明することができる1.5Å分解能の結晶構造解析を目指して結晶化条件の最適化を試みている。しかし、RPX結晶の巨大化に伴ってクラスター化や亀裂・分裂が起こるため、現状よりも高分解能な回折強度データが得られる良質な結晶を得ることができていない。</p> <p>研究の実績：</p> <p>我々の研究グループはこれまでRPXの結晶構造を複数回報告しており、2003年には3.7Å分解能の結晶構造(T. Tanpaku, et al., JBC, 2003)、2009年には水分解を阻害するヨウ素イオンとの複合体の結晶構造(T. Tanpaku, et al., PNAS, 2009)、2011年には世界で初めて水分解をおこなう活性中心と数千の水分子の存在を示した1.9Å分解能の結晶構造(T. Tanpaku, et al., Nature, 2011)を報告している。2011年の結晶構造は米国のScience誌が選ぶ"Breakthrough of the year"のトップ10に採択され、日本からは本成果と宇宙探査船「はやぶさ」の2つが選出された。</p> <p>研究の状況：</p> <p>現在、1.9-2.1Å分解能のRPX結晶を作製することが出来ており、複数の結晶から回折強度データを収集することで低い被曝線量の結晶構造を解析することでX線による還元作用を抑えた解析を目指している。しかし、多数の結晶がクラスター状に結合した状態や二つの結晶が張り付いた状態で析出することが多く、構造解析実験に利用できる単結晶の再現性は10-20%程度となっている。</p> <p>目標達成後の方針：</p> <p>現在のRPX結晶は析出後に抗凍結剤の濃度を徐々に上昇させた脱水処理後に回折強度測定を行っている。本提案研究で結晶が析出した場合、現在の条件での脱水処理を行う予定である。また、放射光施設SPring-8に設置している湿度制御装置による脱水処理法を用いると結晶化条件から直接脱水処理が行えるためこの抗凍結処理法も予定している。回折強度測定は2013年度に申請予定のSPring-8のBL38B1およびBL41XUで実施する予定である。測定はできるだけX線還元を抑えるために複数の箇所に照射位置を分散した測定モードで実施する。また、位相決定は1.9Å分解能の結晶構造を用いた分子置換法によって決定し、構造精密化を行う予定である。</p>
実験目的および宇宙実験によって実現したい成果
<p>実験目的</p> <p>光合成における水分解反応の理解を目指して、リボソームタンパク質X(RPX)の活性中心の精密な立体構造を特定することを目的としている。そのため、現在の1.9Å分解能では構造誤差のため議論が難しいMn₄CaO₅クラスターの分子構造を1.5Å分解能以上の結晶構造で解析し、周辺の水およびアミノ酸残基との相互作用から構造化学的な理解を目指す。RPXの酵素反応の理解は光合成が行っている光と水から作り出すクリーンで持続可能なエネルギー生産の原理解明に繋がるため、人工光合成エネルギー生産システムの設計指針になるものと期待される。</p> <p>宇宙実験に期待する実験成果</p> <p>以下の例示のうち、不要なものを削除し、目安となる数値を記入ください。</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 配位水の様態が明らかにできる程度の結晶を得たい（目安となる回折分解能 <u>1.5</u> Å） <input type="checkbox"/> マルチボーラリファインメントができる程度の結晶を得たい（目安となる回折分解能 <u>1.5</u> Å） <input type="checkbox"/> その他（目安となる回折分解能 <u>1.5</u> Å） <p>活性中心のMn₄CaO₅クラスターの原子間距離を0.1Å以下の誤差で解析できる分解能を得たい</p> <p>上記目標達成によって想定される展望</p> <p>以下の例示のうち、不要なものを削除し、記述できる範囲でそれぞれの概要を記入ください。</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 論文発表が期待できる（論文の内容：水分解の活性中心Mn₄CaO₅クラスターの精密な立体構造） <input type="checkbox"/> 外部資金の獲得が期待できる（外部資金の種類と概要：光を使った新しいエネルギー開発、または植物や藻類の光合成に関連する研究費および民間助成金。PSIIの原理解明は人工光合成の指針となり、また水分解反応は光合成における最後のブラックボックスとされている。）
提案研究の最終目標・期待される波及効果・応用展開
<p>* 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下さい。</p>
これまでの研究業績（申請タンパク質関連）
<p>* Tanpaku T, et al., ○○○○ revealed by X-ray crystallography. JBC. 106, 8567-8572, (2009)</p> <p>* Tanpaku T, et al., Crystal structure of ○○○○. Biochemistry. 473, 55-60, (2011)</p>
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）
<p>平成24年-平成27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」</p>

☐ 宇宙実験搭載決定後に「機関名・提案者名・タンパク質名」をJAXAホームページに公開することにご了承頂ける場合は左欄にチェックを入れてください。



申込データシートの記入例

JAXA PCG 第2期 申込データシート					
区分	項目			記入欄	
タンパク質名称				RPX	
コース	基盤研究		受付番号		
申込責任者	所属機関			〇〇大学〇〇系研究科	
	申込責任者/役職			蛋白 九郎 / 教授	
	申込責任者氏名英文表記			Prof. Shichiro Tanpaku	
	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			研究 七美/博士課程学生	
	実験担当者氏名英文表記			Dr. Nanami Kenkyu	
	連絡先住所(郵便番号も記入)	305-8505	茨城県つくば市千現2-1-1		
	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			xxx@jaxa.jp	
タンパク質の物理化学的情報	分子量(計算値)			25234	
	分子量(実測値、サブユニット等の泳動位置も含む)			25000	
	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	細胞外
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/組換えタンパクの別			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		
タンパク質溶液液搭載想定最大濃度			100.00	mg/ml	
毒性化合物			なし		



(1)タンパク質試料(溶液)の調製状況について					
蛋白質濃度	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	Sodium azide			0.04	(%)
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	航空 七太/研究員			
	タンパク質調製量	数~10mg			
	調製頻度	数ヶ月に1回			
	調製の再現性	あまり高くない(30~80%)			
	品質の確認方法	SDS-PAGE			
	再現性の状況	ばらつきはない			
	長期間の保存性	可能			
	長期保存方法	粉末を凍結			
	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	PEG 8000			40	(%)
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で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	特殊操作はありません			
	結晶化温度	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週間以上			
	結晶の大きさ(mm)	0.05*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	ある			
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	結晶化実験開始時にタンパク質溶液に化合物粉末を混合			

これまでの
結晶化実験の
条件、状況

結晶写真





申込データシートの記入例

(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)	2.0
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)	0.05*0.05*0.01
	性状	柱状単結晶
	回折実験状況	取得回折データで構造得られず
	ビームライン/施設名	SPring-8 BL41XU
	回折実験実施取得日	2012年8月8日
	回折実験実施温度(K)	100
	目視で確認した最高分解能 (Å)	1.9
	データセットの統計値から判断した最高分解能 (Å)	2.0
	構造解析で利用した最外殻回折分解能 (Å)	2.0
	空間群	P1
	格子定数	95.0, 98.5, 120.3, 89.3, 90.5, 92.2
	Mosaicity	0.13
	Rmerge	0.23
	Completeness	96.1
	I/σ(I)	8.8
結晶の多型について	P21の結晶が得られる場合があるが構造解析には至っていない。	
希望実験条件	<p>結晶化試薬であるPEG 8000濃度を振ったいくつかの結晶化条件(3条件くらい)での結晶化を希望します。 また、本酵素の阻害剤化合物(2種類)との複合体結晶作成を希望します。 ＊その他、希望する結晶化温度、結晶化法等がありましたら、自由に記載して下さい。</p>	
その他、 特記事項、 留意点	<p>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、質の良いロットを得るために、複数回の精製を行い、 ロット間の差をなくすようにする必要がある。</p>	



保証書の記入例

タンパク質試料の安全性に関する保証書

タンパク質名称:

RPX

- 上記タンパク質(以下当該タンパク質という)は、以下の点で安全性が保証されています。
 - 1)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
 - 2)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
 - 3)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
 - 4)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
- 当該タンパク質は、すべて実験用のものであり、以下に示す輸出貿易管理令、別表第1の1項(14)および別表1の3項(1)および別表1の3の2項(1)に該当するものではありません。

日付 平成26年10月10日

所属機関 ○○大学○○研究科

研究代表者/役職 蛋白 九郎 / 教授

署名 蛋白 九郎



輸出貿易管理令、同別表第1等は<http://www.meti.go.jp/policy/ampo/index.html>を参照ください。

(最終改正は平成23年12月26日公布、平成24年2月1日施行)。以下に、平成25年8月8日時点の抜粋を示します。

- 1)輸出貿易管理令 別表第1の1項(14)

軍用の化学製剤の探知若しくは識別のための生体高分子(*1)若しくはその製造に用いる細胞株又は軍用の化学製剤の浄化若しくは分解のための生体触媒(*2)若しくはその製造に必要な遺伝情報を含んでいるベクター(*3)、ウイルス若しくは細胞株

注: *1 生体高分子: 以下のいずれかに該当するものをいう。
イ、酵素 ロ、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗イデオタイプ抗体 ハ、レセプター
*2 生体触媒: 生体化合物のうち特定の物質に結合し、分解を促進するものであって、人為的な選択又は遺伝子操作を経て生産されたものをいう。
*3 ベクター: 遺伝物質を新細胞に組み込む媒体をいう。
- 2)輸出貿易管理令 別表第1の3項(1)

軍用の化学製剤の原料となる物質又は軍用の化学製剤と同等の毒性を有する物質若しくはその原料となる物質として経済産業省令で定めるもの

注: 詳細は上記ホームページを参照ください
- 3)輸出貿易管理令 別表第1の3の2項(1)

軍用の細菌製剤の原料として用いられる生物、毒素若しくはそのサブユニット又は遺伝子であって経済産業省令で定められるもの(次のいずれかに該当するものとする)

第一号 ウイルス(ワクチンを除く。)であって、アフリカ馬疫ウイルス、アフリカ豚コレラウイルス、アンデスウイルス、エボラウイルス、黄熱ウイルス、オーエスキー病ウイルス、オムスク出血熱ウイルス、オロボーチウイルス、ガナリトウイルス、キャサヌール森林病ウイルス、牛疫ウイルス、狂犬病ウイルス、クリミアコンゴ出血熱ウイルス、口蹄疫ウイルス、サビアウイルス、サル痘ウイルス、小反芻獣疫ウイルス、シンノンブレウイルス、水泡性口炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、ソウルウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、チクングニヤウイルス、チャバレウイルス、跳躍病ウイルス、テッセン病ウイルス、テュクロウイルス、デング熱ウイルス、痘瘡ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、ドブラバーベルグレドウイルス、トリインフルエンザウイルス(H5又はH7のH抗原を有するものに限定。)、豚コレラウイルス、ニパウイルス、日本脳炎ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、ハンタウイルス、ブタエンテロウイルス9型、フニンウイルス、ブルータンクウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、ヘンドラウイルス、ボット・アンデアン・ラテント・チモウイルス、ボット・スピンドル・チューバー・ウィロイド、ボワッサンウイルス、マチュボウイルス、マールブルグウイルス、マレー渓谷脳炎ウイルス、ヤギ痘ウイルス、羊痘ウイルス、ラグナナグウイルス、ラッサ熱ウイルス、ランピーキン病ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、ルヨウイルス又はロシオウイルス

第二号 細菌(ワクチンを除く。)であって、ウシ流産菌、オウム病クラミジア、ガス壊疽菌、Q熱リケッチア、牛肺疫菌(小コロニー型)、コレラ菌、壺壕熱リケッチア、志賀赤痢菌、炭疽菌、チフス菌、腸管出血性大腸菌血清型O157、発疹チフスリケッチア、鼻疽菌、ブタ流産菌、ペスト菌、ボツリヌス菌、マルタ熱菌、山羊伝染性胸膜肺炎菌F38株、野病菌、類鼻疽菌又はロッキー山紅斑熱リケッチア

第三号 毒素(免疫毒素を除く。)であって、アフラトキシン、アプリン、ウェルシュ菌毒素、HT-2トキシン、黄色ブドウ球菌毒素、コノトキシン、コレラ毒素、赤痢菌毒素、デアセトキシシルベノール毒素、T-2トキシン、テロドトキシン、ビスカムアルバムレクチン、ペロ毒素及び志賀毒素リボソーム不活化蛋白質、ボツリヌス毒素、ボルケンシン、ミクロシチン又はモデシン

第四号 前号に該当するもののサブユニット

第五号 細菌又は菌類であって、クラビバクター・ミシガネンシス亜種セバドニカス、コクシジオイデス・イミチス、コクシジオイデス・ボサダシ、コクリオボールス・ミヤベアヌス、コレトリウム・コファエナム・バラエティー・ビルランス、ザントモナス・アルビリネアンズ、ザントモナス・オリゼ・パソパー・オリゼ、ザントモナス・キャンベストリス・パソパー・シトリ、ピリキュラリア・オリゼ、ピリキュラリア・グリセア、プクシニア・グラミニス、プクシニア・ストリイフォルミス、ミクロシクルス・ウレイ又はラルストニア・ソラナセアルム・レース2及び3

第六号 第一号、第二号若しくは前号に該当するものの核酸の塩基配列のうち病原性を発現させるもの又は第三号若しくは第四号に該当するものを産生させる核酸の塩基配列を有する遺伝子(染色体、ゲノム、プラスミド、トランスポゾン及びベクターを含む。)

第七号 第一号、第二号若しくは第五号に該当するものの核酸の塩基配列のうち病原性を発現させるもの又は第三号若しくは第四号に該当するものを産生させる核酸の塩基配列を有するように遺伝子を改変した生物(微生物を含む。)



実験に向けた準備



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。

経時変化の検討

必要に応じてタンパク質試料の経時変化を検討します。

予測技術実験

一部試料については微小重力効果の予測技術実験を行います。

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

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

凍結保護

宇宙実験帰還後の結晶を凍結保護します。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

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。

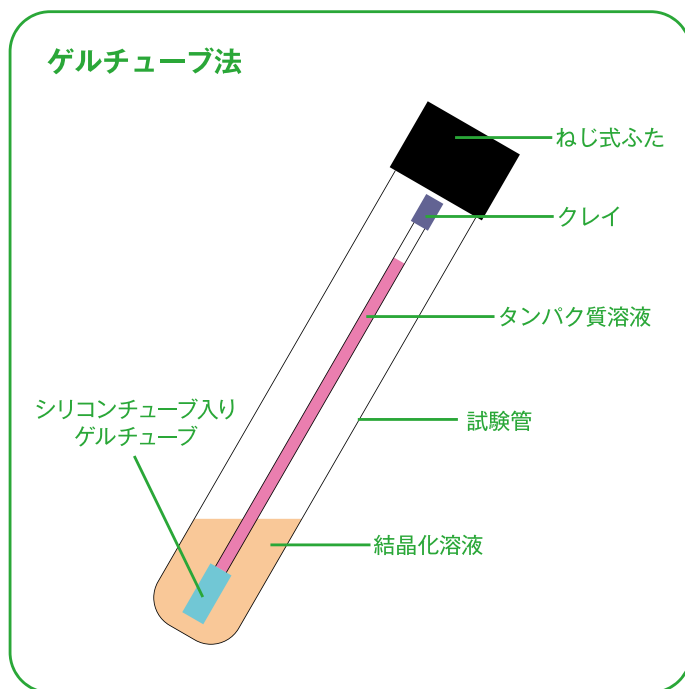
提案者については、

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。



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。



実験に向けた準備



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お送りください。

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)	50	18	95	125	300	
※上記はタンパク質溶液をそのままキャピラリーに充填した場合の溶液量です。 リザーバ溶液と1:1混合する場合には、送付溶液量は上記推奨溶液量の1/2となります。							
結晶化溶液	4ml						
ゲル浸漬溶液	4ml						

※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護作業を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 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ または $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 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°C または 4°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

溶液の調製に際しては、防カビのため若干の防腐剤の添加をお願いします。

なお防腐剤については溶液組成に記入する必要はありません。

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@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2期後期実験

		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	アメリカ ケネディ宇宙センター
	打上げ宇宙船	ソユーズ宇宙船 またはプログレス補給船	ドラゴン宇宙船
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4～6週間	
	結晶化温度	20℃	4℃
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	ドラゴン宇宙船

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。

提案者への結晶の引き渡しは、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合わせてお渡しします。

キャピラリーからの取り出しと凍結保護作業についても、JAXA が状況に応じて支援します。





実験装置の紹介

※以下は、ロシアとの国際協力による20℃での宇宙実験の例です。その他の結晶化温度や結晶化法を希望される方は、個別にご相談ください。

この宇宙実験では、**カウンターディフュージョン法**を用いてタンパク質結晶生成を行います。
結晶を生成する容器やその環境をコントロールする装置には先進技術が用いられ、
宇宙での安定的な実験を可能にしています。

タンパク質結晶生成実験装置「PCRF※」

最大144種類のタンパク質を搭載でき、
一度にさまざまな結晶の生成実験を行うことができる
先進の装置です。
結晶生成中の庫内温度が約20℃となるように制御されています。

※ Protein Crystallization Research Facility



セルユニット

PCRF内にセットされるセルユニットです。
各ユニットの中に結晶化容器を最大で12個搭載して使用します。
ユニットごとに温度をコントロールすることができます。
庫内の温度はリアルタイムで測定されており、地上で確認する
ことができるだけでなく、打ち上げから回収までの温度が
データとして記録されます。



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





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
		タンパク質正式名称	公開	搭載決定時
		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
		提案研究の概要	公開	
		研究の具体的内容	公開	
		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
		結晶化、回折実験状況	非公開	
		希望実験条件、その他	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

(*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、タンパク質WG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) 水溶性か膜タンパク質か。局在は細胞内か細胞外か。由来はヒトか、バクテリアか、ウイルスか。
その他、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



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1	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**

第2期実験シリーズ 後期(2015-2017年度)
基盤研究利用コース

搭載タンパク質 募集要項


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
TEL : 029-868-3074 (ISS広報代表)
FAX : 029-868-3950

タンパク質結晶生成宇宙実験ホームページ
<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。

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。