

最近のJAXAにおける宇宙実験 の状況

2004.8.

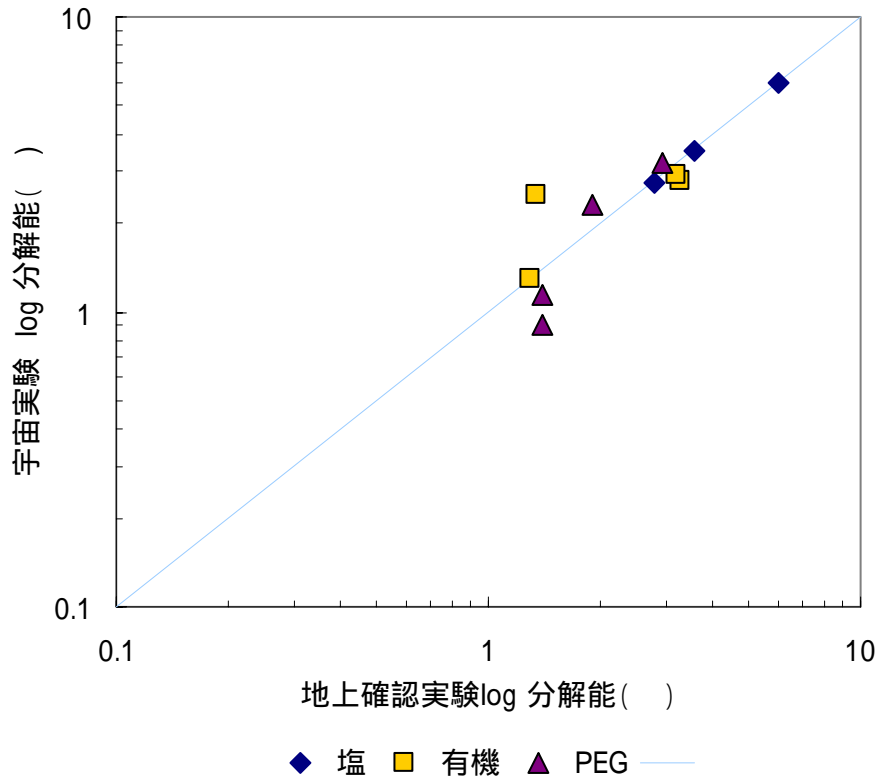
独) 宇宙航空研究開発機構

JAXA-GCF#1~#3の総括

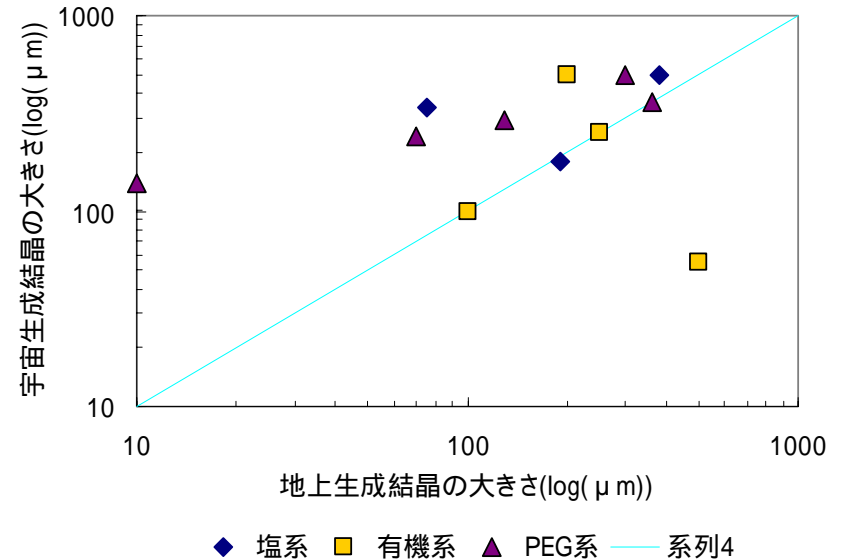
- 技術開発搭載蛋白質の結果から、宇宙実験はさまざまな技術的問題を解決することで、有用性を十分に発揮させることが出来ることがわかった。結果としてチャンピオンデータの取得に成功した
- JAXA-GCF#1~#2の利用者試料に関しては、さまざまな要因により、最終的にPDB登録もしくは論文発表につながりそうなものは現状では少ない
- 問題点については把握できている。対策は一部JAXA-GCF#3に反映。結果として有用なX線回折データセットの取得率向上につながりつつある
- JAXA-GCF#4以降については、より積極的に蓄積したノウハウをつぎ込む

宇宙実験と地上実験で得られた結晶の分解能と大きさの比較 (NASDA-GCF#1)

NASDA-GCF#1宇宙及び地上で得られた結晶の分解能

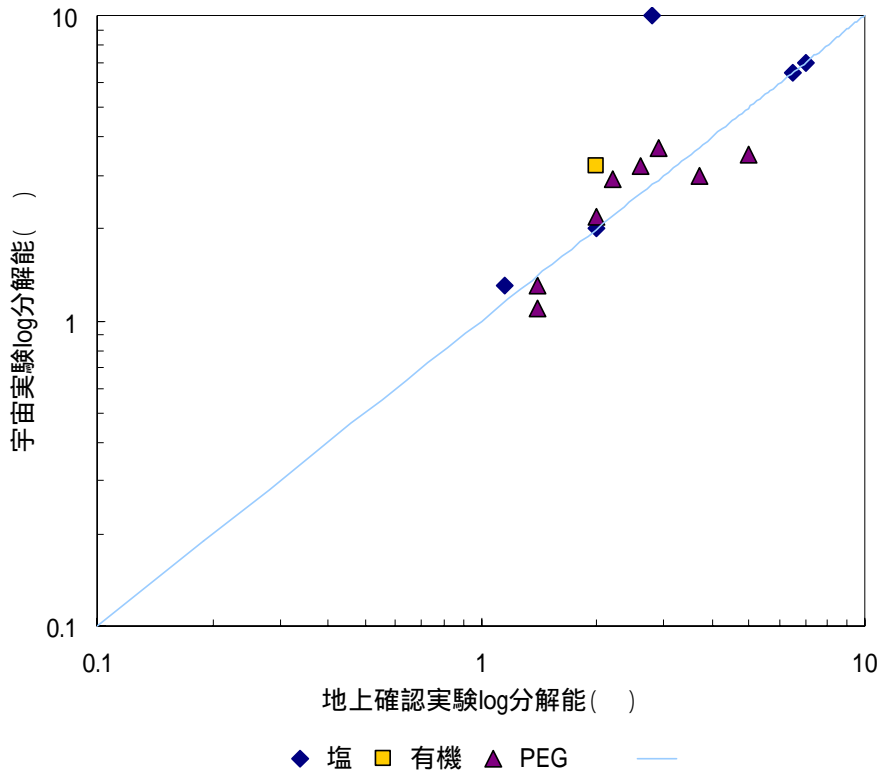


NASDA-GCF#1宇宙および地上で得られた結晶の大きさ

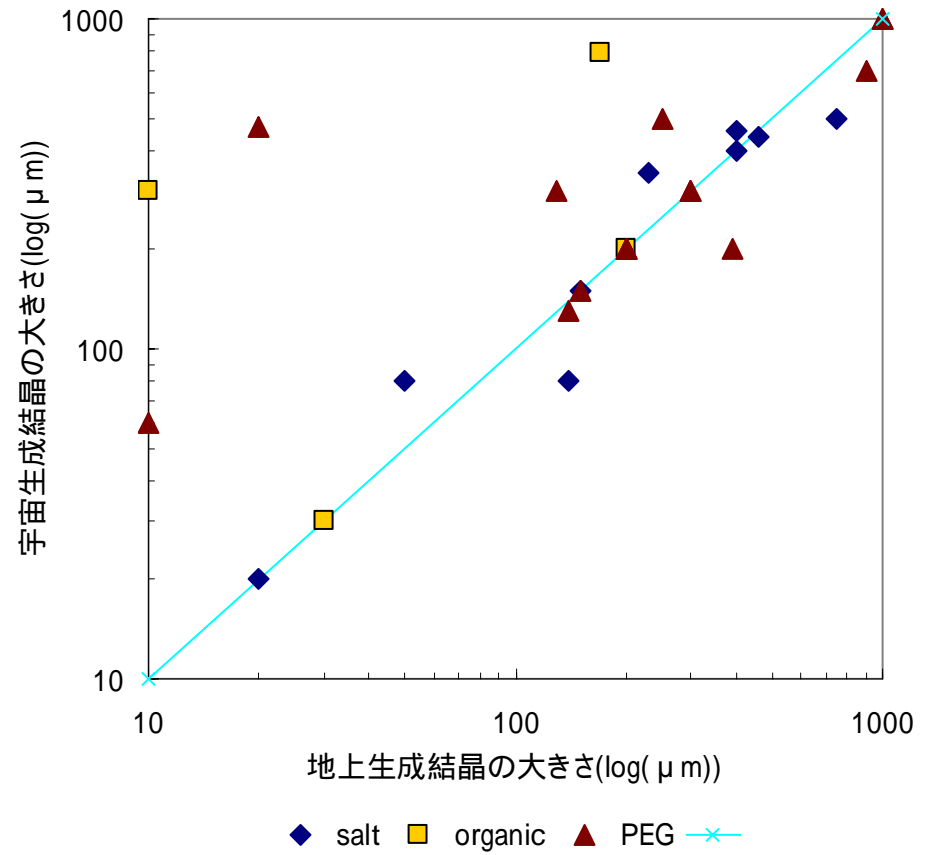


宇宙実験と地上実験で得られた結晶の分解能と大きさの比較 (NASDA-GCF#2)

NASDA-GCF#2宇宙及び地上で得られた結晶の分解能

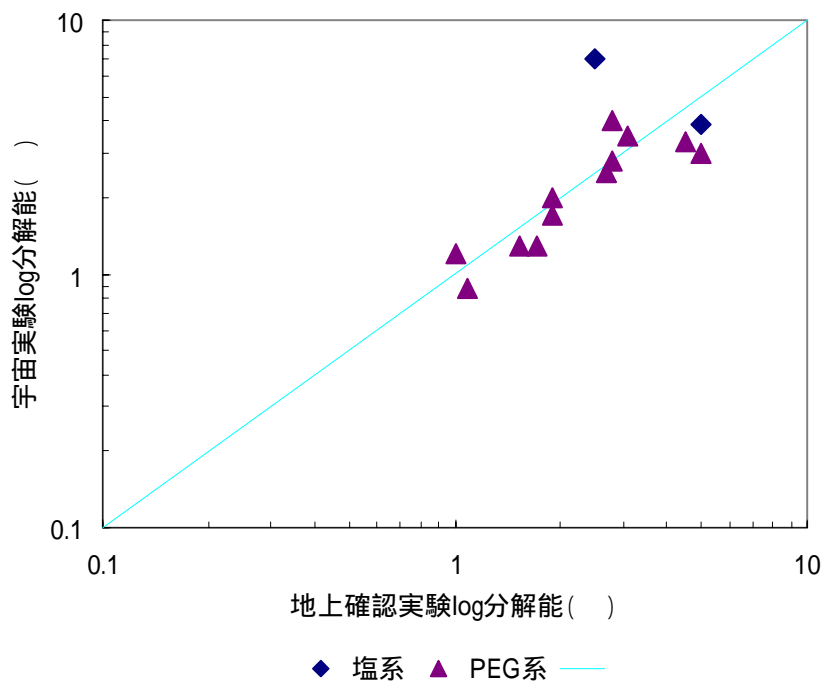


NASDA-GCF#2宇宙および地上で得られた結晶の大きさ

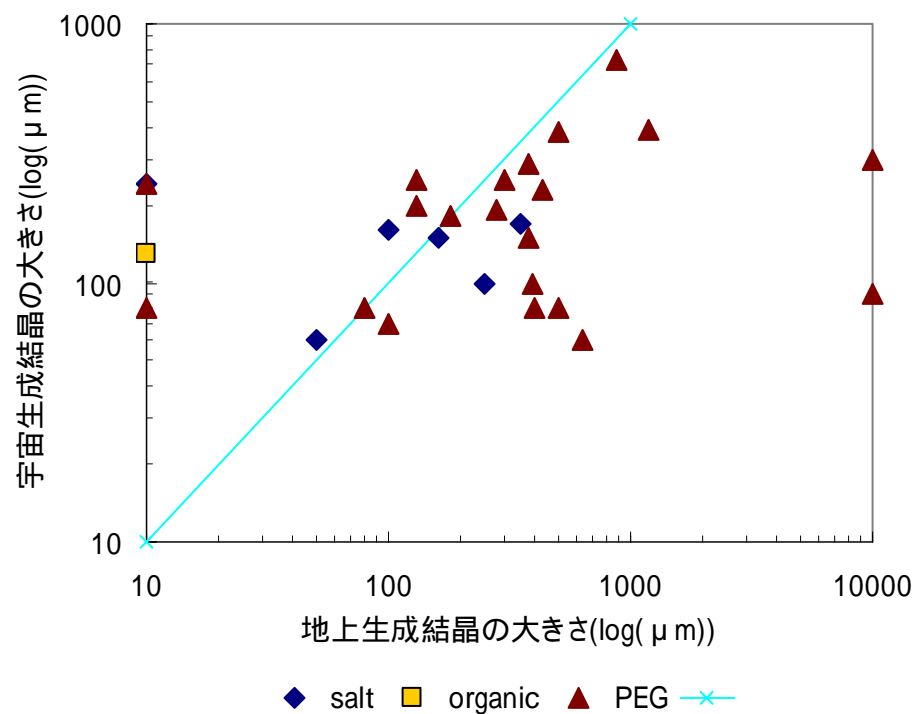


宇宙実験と地上実験で得られた結晶の分解能と大きさの比較 (JAXA-GCF#3)

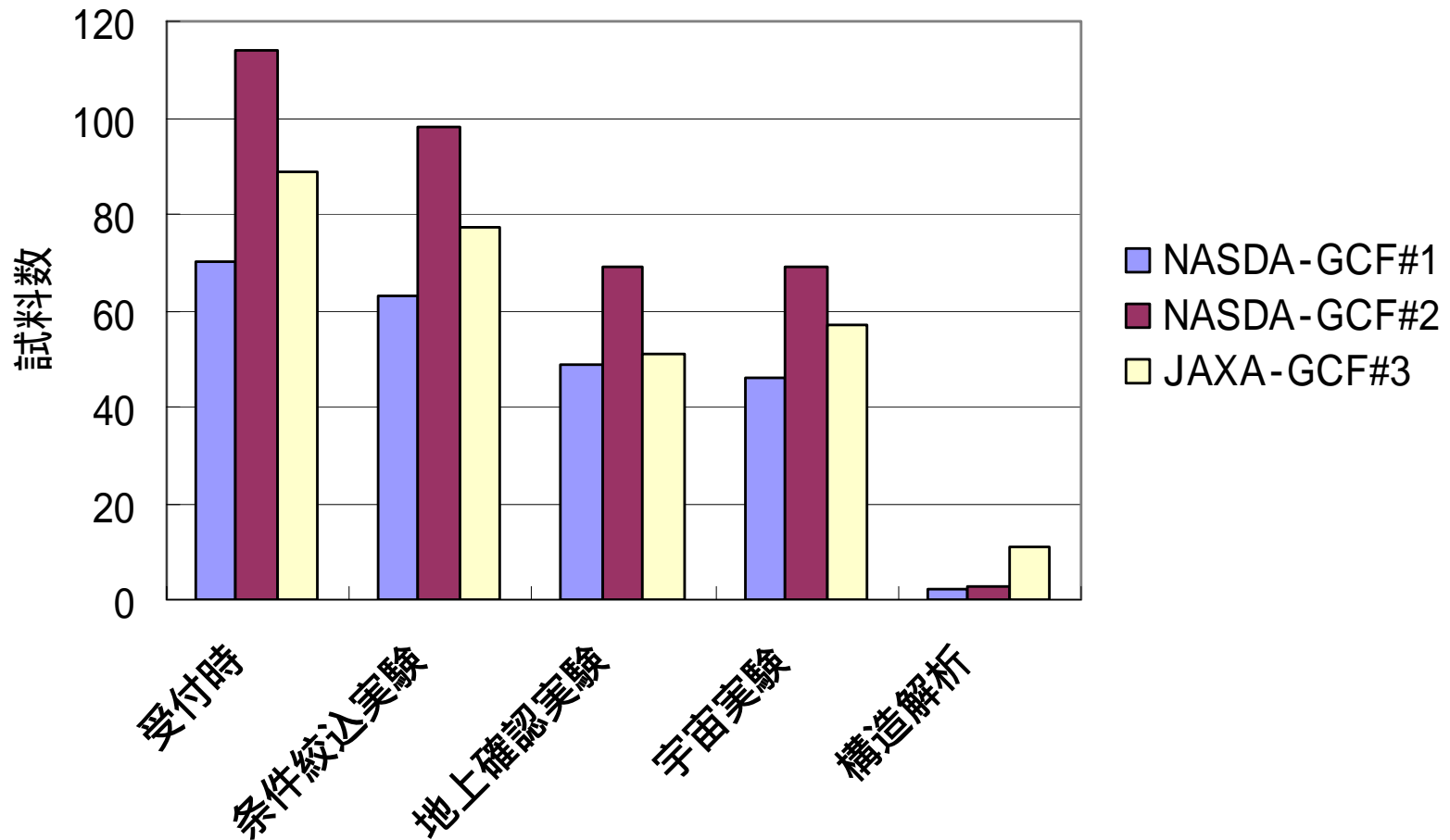
JAXA-GCF#3宇宙及び地上で得られた結晶の分解能
(040601現在)



JAXA-GCF#3宇宙および地上で得られた結晶の大きさ



各フライトにおける実験経過



先導的応用化研究テーマの条件絞込み実験は各PIにより実施

利用者試料で有用性が低かった理由と対策(1)

- もともと地上実験で課題のある試料がかなり持込まれている
 - 課題: 微、針状、板状、クラスター状結晶しか出来ないといった例
 - 宇宙実験で課題解決が出来るかもしれないという利用者の期待
 - JAXA/JSUPとしてはとりあえず広く受け入れた
- 実際に宇宙実験で、微結晶が十分に大型化した例、クラスター状結晶が単結晶になる例があるので可能性の低い試料でも排除しにくい
 - ただし、地上での条件絞込み実験の状況から、感覚的にうまくいきそうなものは分かるようになってきている
- 一方、利用者側で解決すべき試料もかなりあることが分かってきた(抜き取り調査等で)
 - 変性、低純度、アグリゲーション
- もともと利用者の試料に注文はつけにくいが、試料品質の問題はJAXA-GCF#4以降、チェックと問題点の改善を利用者
にお願いしているところ

条件絞込実験実施状況

(条件絞込実験を行ったもののみカウントしている)

計63サンプル

NASDA-GCF#1		条件絞込実験(ゲルチューブ法)			
		変化なし 11	沈殿・アモルファス・オイル 13	回折データ取得には供 せないが結晶生成 19	X線に供することが可 能な結晶生成 20
受付 (主に蒸気拡散法)	変化なし 0	0	0	0	0
	沈殿・アモルファス・オイル 1	0	0	0	1
	回折データ取得に至らず(針・微・薄板・球 状等、少なくとも1辺が50 μm以下) 26	6	5	12	3
	回折データ取得に至らず(3辺とも50 μm以 上) 9	2	2	3	2
	分解能が低い単結晶・既に十分な構造解 析がなされているもの 27	3	6	4	14

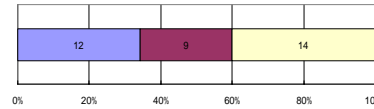
43%

62%

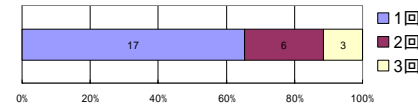
13%

計67サンプル

NASDA-GCF#2		条件絞込実験(主にゲルチューブ法)			
		変化なし 7	沈殿・アモルファス・オイル 28	回折データ取得には供 せないが結晶生成 9	X線に供することが可 能な結晶生成 23
受付 (主に蒸気拡散法)	変化なし 4	0	4	0	0
	沈殿・アモルファス・オイル 1	1	0	0	0
	回折データ取得に至らず(針・微・薄板・球 状等、少なくとも1辺が50 μm以下) 28	3	15	3	7
	回折データ取得に至らず(3辺とも50 μm以 上) 25	3	8	1	13
	分解能が低い単結晶・既に十分な構造解 析がなされているもの 9	0	1	5	3



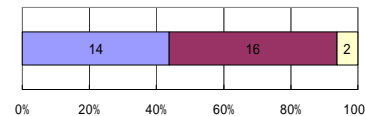
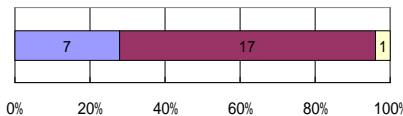
48%



計57サンプル

JAXA-GCF#3		条件絞込実験(主にゲルチューブ法)			
		変化なし 10	沈殿・アモルファス・オイル 15	回折データ取得には供 せないが結晶生成 28	X線に供することが可 能な結晶生成 4
受付 (主に蒸気拡散法)	変化なし 0	0	0	0	0
	沈殿・アモルファス・オイル 1	0	1	0	0
	回折データ取得に至らず(針・微・薄板・球 状等、少なくとも1辺が50 μm以下) 17	2	5	8	2
	回折データ取得に至らず(3辺とも50 μm以 上) 12	4	3	5	0
	分解能が低い単結晶・既に十分な構造解 析がなされているもの 27	4	6	15	2

47%



56%

条件絞込実験の回数

条件絞込実験で結晶性に問題があった試料の状況

- # 2・# 3フライトでは、何回かの条件絞込実験で結晶が生成しなかったものについて抜き取りで性状確認実験 (SDS-, Native-PAGE)を行った。
- # 4フライト用試料に関しては1回の条件絞込実験で結晶生成がなかったものに関して性状確認実験を行った。

フライト	試料	条件絞込実験の状況	問題点
#2		1 1, 2回目変化なし	不純物または分解
		2 沈殿 (8条件検討)	不純物
		3 1, 3回目変性、2回目変化なし	不純物
		4 1, 2回目変化なし	不純物
		5 1回目変性、2回目沈殿	蛋白質の分解
#3		1 結晶らしきもの生成 (2回)	アグリゲート
		2 うすい沈殿 (2回)	アグリゲート
		3 変化なし (3回)	蛋白質の分解
		4 変化なし (2回)	蛋白質の分解
		5 変化なし (2回)	アグリゲート
		6 針微結晶クラスター (1回)	表面電荷の不均一
		7 変化なし (2回)	蛋白質が検出されない
		8 沈殿 (2回)	アグリゲート
		9 沈殿 (2回)	蛋白質の分解
#4		1 沈殿	表面電荷の不均一
		2 変化なし	蛋白質が検出されない
		3 変化なし	蛋白質が検出されない
		4 変化なし	表面電荷の不均一
		5 変化なし	表面電荷の不均一
		6 変化なし、沈殿	表面電荷の不均一
		7 沈殿	表面電荷の不均一
		8 沈殿	表面電荷の不均一
		9 変化なし	表面電荷の不均一
		10 変化なし	表面電荷の不均一
		11 変化なし	蛋白質が検出されない
		12 沈殿	表面電荷の不均一
		13 変化なし	不純物
		14 変化なし	表面電荷の不均一
		15 沈殿	アグリゲート
		16 沈殿	蛋白質が検出されない
		17 変化なし	表面電荷の不均一
		18 変化なし	表面電荷の不均一
		19 変化なし	不純物
		20 沈殿	表面電荷の不均一
		21 変化なし	問題なし
		22 変化なし	問題なし
		23 変化なし	問題なし
		24 変化なし	問題なし
		25 変化なし	問題なし
		26 沈殿	問題なし
		27 沈殿	問題なし
		28 変化なし	問題なし
		29 沈殿	問題なし
		30 変化なし	問題なし
		31 変化なし	問題なし
		32 変化なし	問題なし
		33 変化なし	問題なし

利用者試料で有用性が低かった理由と対策(2)

- Counter Diffusion法に簡単に移行できない試料がある
 - 利用者側からの過去の結晶化情報は主にVapor Diffusion法またはBatch法のもの。Counter Diffusion法への移行は理論的にはOK。シミュレータを作成し、条件絞込みで運用
 - しかし、実際には単純ではない
 - 蛋白質濃度は基本的に上げにくい
 - 必要とする沈殿化剤濃度が飽和濃度を上回ってしまう例
 - 低分子沈殿化剤の場合、蛋白質の拡散が想定より早いと思える例
 - キャピラリー中の蛋白質試料が不安定(VD等では大丈夫)な例
 - 試料、沈殿化剤の組成が複雑で簡単に移行できない例
 - これまではケース・バイ・ケースで対応
- 一般にPEG系沈殿化剤の方が問題少ない。JAXA-GCF#3以降、利用者説明等でPEG系を推奨。比率上昇
- Counter Diffusion法に適した溶液条件がありそう：低分子沈殿化剤 + PEGの系・・・検討中

利用者試料で有用性が低かった理由と対策(3)

- 蛋白質試料の安定性が不十分な例がある
 - 20℃で長期間安定でない(数ヶ月間軌道上実験。安定性は必須)
 - 凍結保存品が融解時に変性してしまう
- JAXA-GCF#3以降では、直前に調製した試料にも対応
- JAXA-GCF#4以降では、試料安定性を利用者に要望
 - 調製方法で解決できる場合もある
 - 不安定な試料は搭載しない
 - 凍結保存品は融解時の問題が多いので対応しない
- 将来的には低温(4℃付近ならびに12℃付近)での結晶化が可能となることが望ましい

利用者試料で有用性が低かった理由と対策(4)

- 宇宙実験の特長を生かす結晶化条件がある
 - これまでは基本的に利用者から得た結晶化条件をベースに条件検討。結晶化試薬は変えず
- しかし、理論検討ならびにJAXA-GCF#1～#3の結果から考えると、宇宙実験の特長を生かす(PDZ、IDZ形成の促進)には高粘度の結晶化条件(=PEG系)が良い
- 一般に結晶化試薬の利用比率は、PEG:塩:有機系 = 5~6:4~3:~1
- JAXA-GCF#1~#3では単結晶が生成した例のうち、主にPEGで分解能が向上

- JAXA-GCF#3以降利用者説明等でPEG系を推奨。比率やや上昇
- JAXA-GCF#4以降では、塩、有機系 + PEGの結晶化条件をJAXA/JSUPで独自検討し結晶化試薬を最適化して搭載

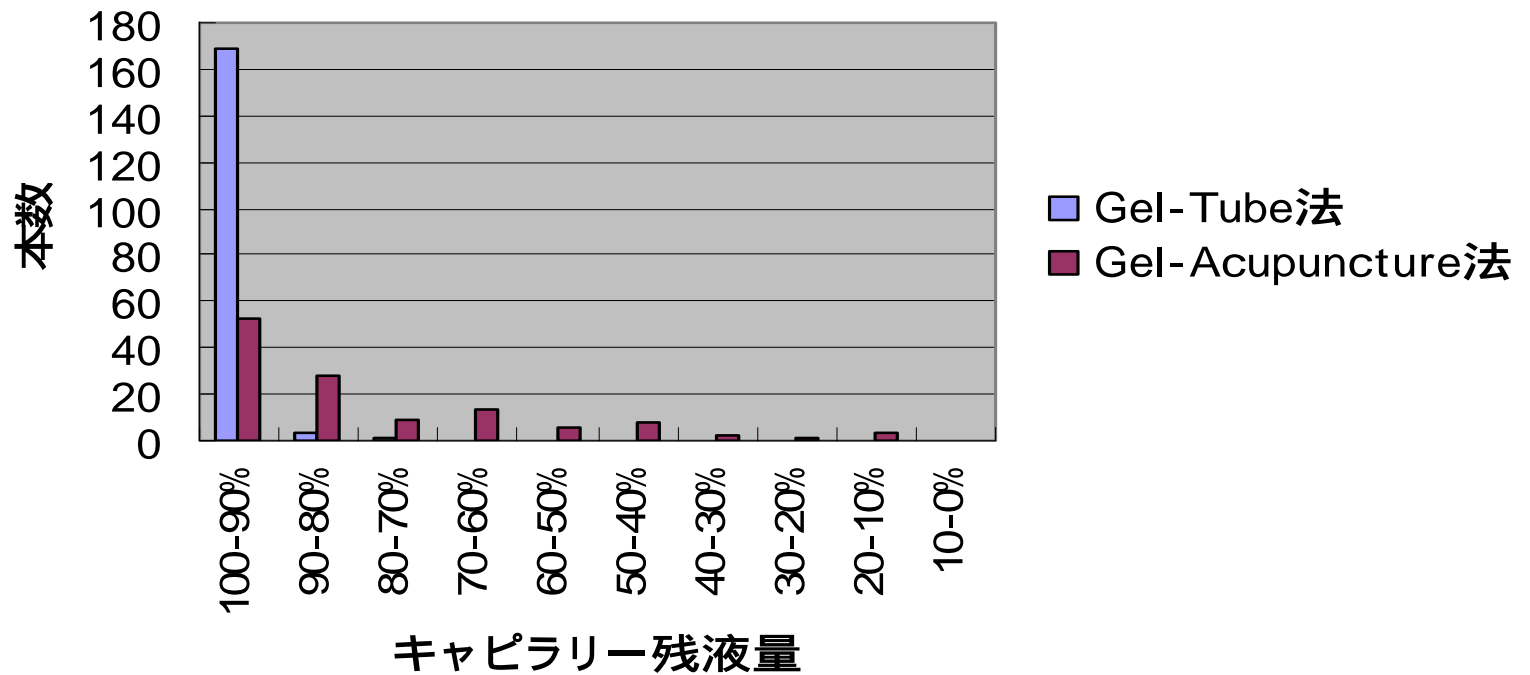
利用者試料で有用性が低かった理由と対策(5)

- **キャピラリーからの溶液漏出の問題**
 - GCBオリジナルの方法(Gel Acupuncture法)では、ある程度の頻度で溶液が漏出。確定的原因は？
 - ただし大量に漏出した数例以外、結晶化への影響は大きくなかったかもしれない
 - JAXA/JSUPで開発のGel-Tube法では問題ほぼなし
 - JAXA-GCF#3以降、Gel-Tube法を中心に利用することで対応
- **環境温度、特に帰還時の温度上昇の問題**
 - 打ち上げ時の温度低下は結晶生成前なのであまり問題ない？
 - JAXA-GCF#2以降、軌道上ではインキュベータ使用で安定に
 - JAXA-GCF#2では帰還時の温度上昇大。生成結晶が溶けたと思われる例が複数あり。結晶品質が今一だったこととも関連？
 - JAXA-GCF#3では一部アルカン搭載(12サンプルの搭載見送り)。有効性あり。ソユーズの運用変更もあり
 - JAXA-GCF#4以降では真空断熱材、デュワー型容器でより安定化

キャピラリーからの液漏れ状況

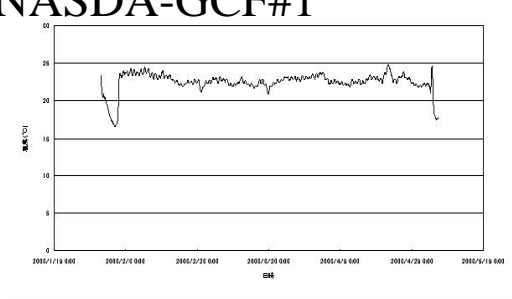
#3フライト(GT法とGA法)

溶液残量とキャピラリー本数

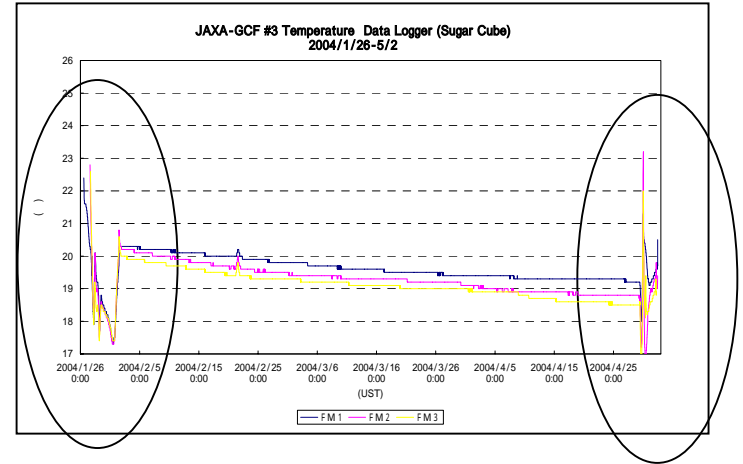


宇宙実験中の温度経過

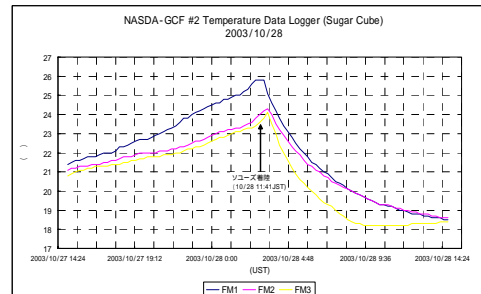
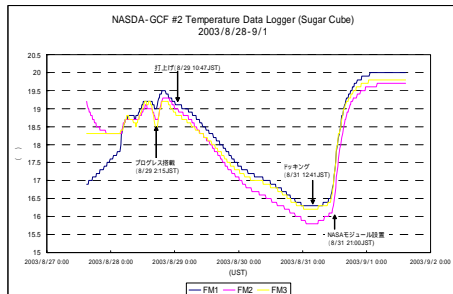
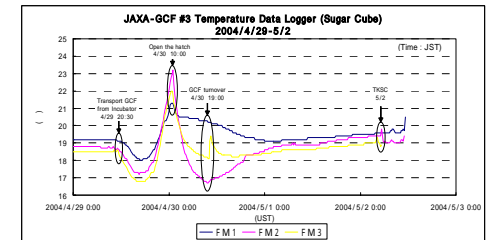
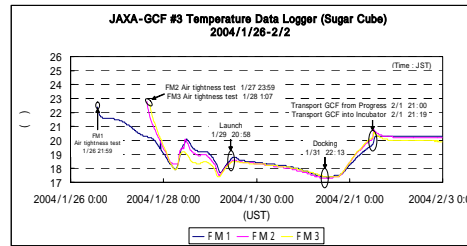
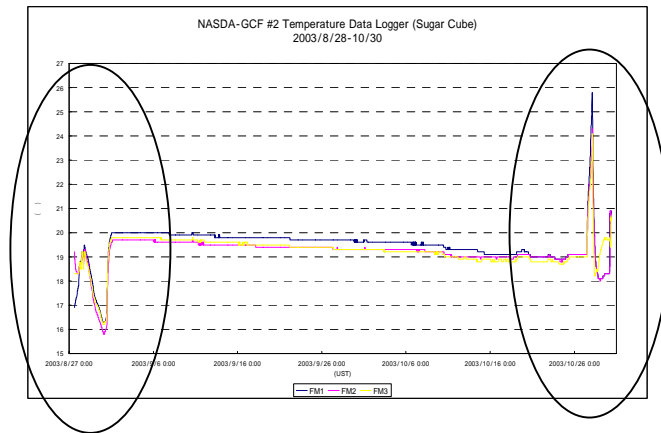
NASDA-GCF#1



JAXA-GCF#3



NASDA-GCF#2



条件絞込実験と宇宙実験結果の比較

計46サンプル

(条件絞込実験を行ったもののみカウントしている)

NASDA-GCF#1		宇宙実験			
		変化なし	沈殿・アモルファス・オイル	回折データ取得には供せないが結晶生成	X線に供することが可能な結晶生成
条件絞込実験	変化なし 4	1	14	11	20
	沈殿・アモルファス・オイル 6	0	2	1	1
	回折データ取得には供せないが結晶生成 16	0	6	0	0
	X線に供することが可能な結晶生成 20	1	5	7	3
		0	1	3	16

:22%

計49サンプル

NASDA-GCF#2		宇宙実験			
		変化なし	沈殿・アモルファス・オイル	回折データ取得には供せないが結晶生成	X線に供することが可能な結晶生成
条件絞込実験	変化なし 3	9	11	12	17
	沈殿・アモルファス・オイル 15	1	1	0	1
	回折データ取得には供せないが結晶生成 9	6	5	4	0
	X線に供することが可能な結晶生成 22	1	0	4	4
		1	5	4	12

:35%

•JAXA-GCF#3
フライトでは条件絞込実験より宇宙実験結果が劣ったものは格段に少ない。

計30サンプル

JAXA-GCF#3		宇宙実験			
		変化なし	沈殿・アモルファス・オイル	回折データ取得には供せないが結晶生成	X線に供することが可能な結晶生成
条件絞込実験	変化なし 1	2	3	8	17
	沈殿・アモルファス・オイル 3	1	0	0	0
	回折データ取得には供せないが結晶生成 24	0	3	0	0
	X線に供することが可能な結晶生成 2	1	0	8	15
		0	0	0	2

:3%

16

地上確認実験と宇宙実験との比較

計46サンプル

NASDA-GCF#1		宇宙実験			
		変化なし 1	沈殿・アモルファス・オイル 14	回折データ取得には 供せないが結晶生成 7	X線回折に供すること が可能な結晶生成 24
地上 確認 実験	変化なし 6	1	4	1	0
	沈殿・アモルファス・オイル 9	0	8	0	1
	回折データ取得には 供せないが結晶生成 14	0	2	6	6
	X線に供することが 可能な結晶生成 17	0	0	0	17

•JAXA-GCF#3では宇宙実験により結晶生成状況が改善されたものが格段に多い。

17%

NASDA-GCF#1	
GA法	46

4%

計69サンプル

NASDA-GCF#2		宇宙実験			
		変化なし 12	沈殿・アモルファス・オイル 18	回折データ取得には 供せないが結晶生成 13	X線回折に供すること が可能な結晶生成 26
地上 確認 実験	変化なし 11	5	3	1	2
	沈殿・アモルファス・オイル 19	5	11	2	1
	回折データ取得には 供せないが結晶生成 22	2	2	10	8
	X線に供することが 可能な結晶生成 17	0	2	0	15

NASDA-GCF#2

20%

NASDA-GCF#2	
GA法	49
GT法	20

16%

計48サンプル

JAXA-GCF#3		宇宙実験			
		変化なし 3	沈殿・アモルファス・オイル 8	回折データ取得には 供せないが結晶生成 8	X線回折に供すること が可能な結晶生成 29
地上 確認 実験	変化なし 5	1	1	1	2
	沈殿・アモルファス・オイル 6	1	3	2	0
	回折データ取得には 供せないが結晶生成 28	1	4	5	18
	X線に供することが 可能な結晶生成 9	0	0	0	9

JAXA-GCF#3

48%

JAXA-GCF#3	
GA法	15
GT法	35

13%

利用者試料で有用性が低かった理由と対策(6)

- キャピラリーからの結晶取り出しは、一般的でない技術。通常の利用者は経験ない
- 特にPEGの場合、数ヵ月後でもキャピラリー中の濃度は平衡に達していない。不用意に通常VD法で使用するハーベスト溶液に取り出すと、浸透圧ショックで崩壊してしまう
- JAXA/JSUPでは利用者説明会で問題点を説明するとともに、帰還時のキャピラリー内沈殿化剤濃度を計算し、利用者到手渡し。しかし、利用者の手技、技量は期待できないかもしれない。利用者はかなり苦労している印象
- JAXA-GCF#3帰還時対応以降、JAXA/JSUPで開発した取り出し技術の検証として、一部利用者につき技術支援

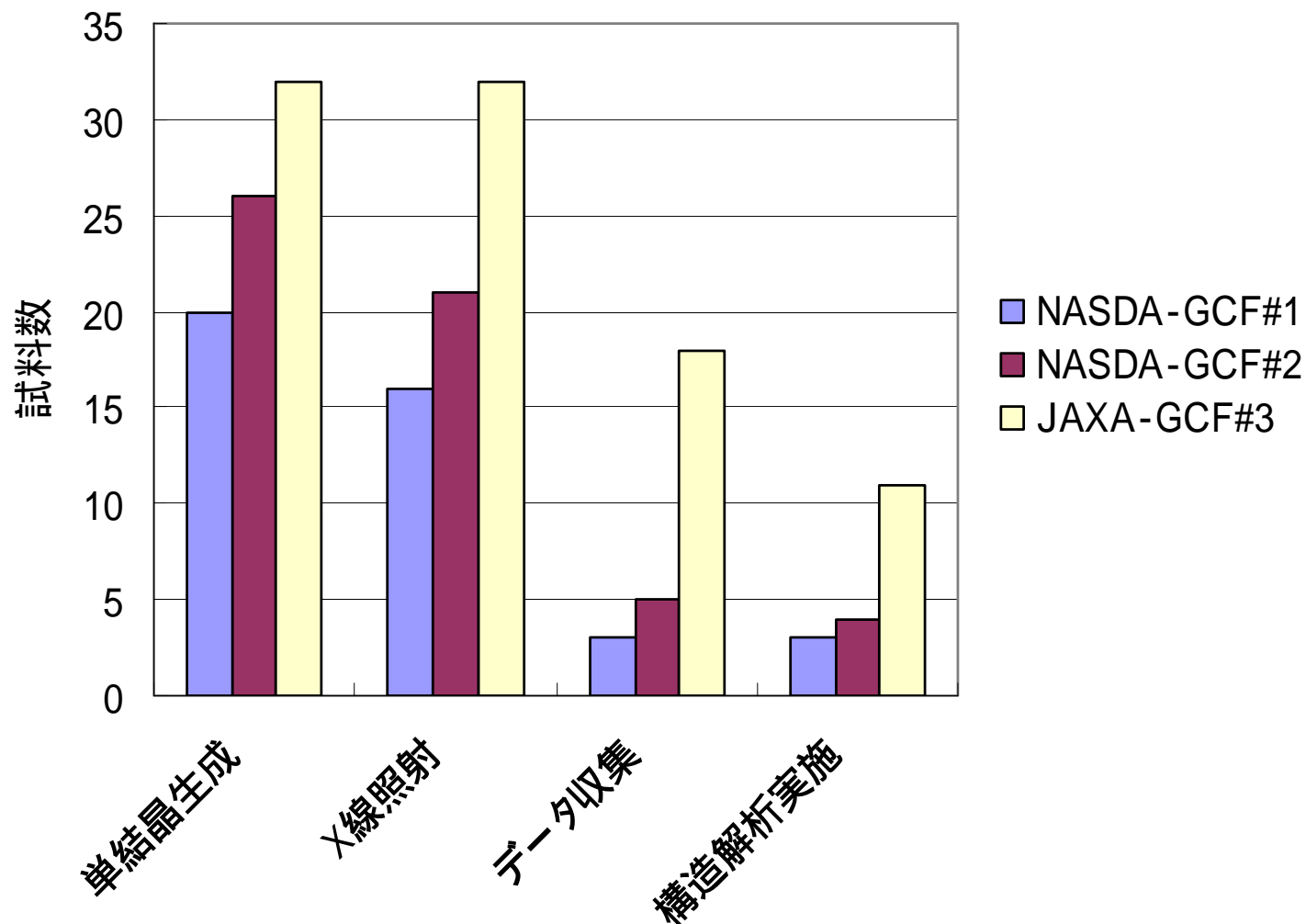
利用者試料で有用性が低かった理由と対策(7)

- 放射光でのX線回折実験では結晶の凍結が必要。この際、氷晶が出来ることによる損傷を防ぐ必要あり
- 抗凍結技術はこれまで研究者ごとの技の世界。明らかに技量に差がある印象。JAXA-GCF#1~#2で明らかに凍結に問題があると思われる例多い
- JAXA/JSUPでは過去Acta Dに掲載された論文約500例について分析。標準的手技、方法を検討
- 結果として、非常に歩留まりの良い方法を開発。利用者説明会等で説明
- JAXA-GCF#3帰還時対応以降、JAXA/JSUPで開発した凍結技術の検証として、一部試料につき技術支援

利用者試料で有用性が低かった理由と対策(8)

- 宇宙実験と平行して利用者が行っていた地上での結晶化実験で先に結晶が出来てしまい、単結晶が生成できたにもかかわらず、解析、PDB登録、論文投稿に宇宙実験が間に合わなかった例が数例あり
- 宇宙実験の申し込みから帰還までの期間(約7ヶ月)は短縮できない。このため可能性があるものを申し込み、搭載までに試料の準備と結晶化条件が絞り込めたものを搭載することで対応
- JAXA-GCF#4以降、「迅速対応コース」を新設
 - 約4ヶ月前:安全性データ提出のためエントリーのみ
 - 約1ヶ月前まで:利用者側で条件検討
 - 約3週間前:搭載決定

単結晶生成後の解析状況の推移



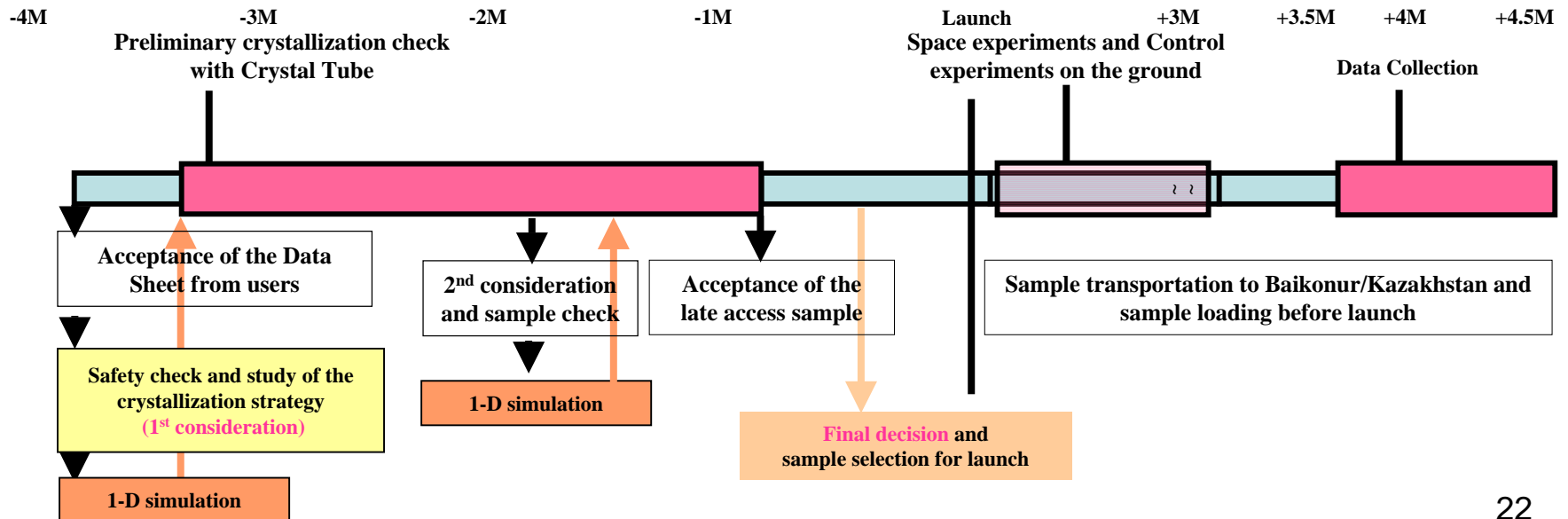
JAXA-GCF#3 : 2004. 7.21.現在

構造解析実施は構造解析実施あるいは今後さらに検討

今後の対応案(1)

- 利用目的に応じた対応をする

- 超高分解能を狙うケース: JAXA/JSUPで特別チームを編成し、利用者と協力して対応(JAXA技術開発の一環)
- 結晶性の問題解決を狙うケース: 従来の対応に準ずる。ただし、試料の性状確認、結晶化条件の宇宙実験向け最適化等で踏み込む。結晶の取り出し、凍結、データコレクション等で支援
- 迅速対応のケース: 宇宙実験以外すべて利用者側に任せる



今後の対応案(2)

- 利用者の拡大
 - － 従来:タンパク3000関連機関、蛋白質コンソーシアムを対象
 - － 今後(#5,#6):将来の民営化を想定し、個別研究者、企業(サービスプロバイダを含む)も対応
 - － ユーザーニーズの発掘
- 技術開発の継続
 - － CD法向け結晶化条件最適化等
 - 複合系での拡散係数データの蓄積
 - それに基づくシミュレータの改良
 - 条件絞込み方法の検討
 - CD法に適する結晶化試薬の検討
 - 膜蛋白質等への適用検討
 - － 結晶の取り出し、凍結等
 - 専用治具の開発
 - 凍結データの蓄積
 - 取り出し、凍結手技の改良
 - － 結晶生成容器の高密度化等
 - 容器の改良
 - 運用方法最適化検討
 - 高密度容器向けシミュレータの改良
 - － 総合技術としての実運用検討

今後の対応案(3)

- **宇宙実験関連技術の普及**
 - 説明会等の実施
 - 国内外の学会等への発表
 - 国内各種研究会との連携
 - 各種情報発信
- **サービスプロバイダ化の検討**
 - 利用者に過度の負担は期待できない
 - これまでJAXA/JSUPが開発・蓄積した技術を移転し、宇宙実験に関連する上流から下流までの技術を一貫して提供することが必要
- **その他**
 - ESA、Granada大との継続的情報交換、連携
 - 国際協力の推進