

整理番号:

研究会議事録 2004年8月30日作成	作成者 氏名	JSUP 宇宙実験推進部 高橋 幸子
件名	回折構造生物第169委員会 第1回高品質蛋白質向け宇宙実験に関する研究会	
日時	平成16年8月27日(金)10:30~16:45	
場所	(独)宇宙航空研究開発機構(JAXA)芝公園厚生施設	
参加者 (敬省略)	相原(京大農)、伊中(丸和)、川上(エーザイ)、小松(岩手県立大)、坂部貴	
	和子(国際科学振興財団)、坂部知平(高エネ研)、佐藤(JAXA)、新村(茨大	
	理工)、山根潤二(塩野義)、山根 隆(名大工)、篠崎、田仲、高橋(JSUP)	
<p>1. 研究会についての趣旨説明</p> <p>配布資料1-1に基づき、説明を行った。 【補足説明】 ・JAXAで実施中の「高品質蛋白質結晶生成プロジェクト」では、平成15年1月より国際宇宙ステーションを利用した宇宙実験を半年おきに6回実施している。これまでの結果から、条件を整えば非常に分解能の高い結晶を得られそうである。 【討論/コメント】 ・本研究会では、今後、より有意義に宇宙実験機会を利用できるよう議論を深めたい。(事務局) ・本委員会参加の方々の中からも、宇宙実験のための試料搭載を検討していただきたい。(事務局) ・第169委員会第2期は、小委員会をいくつか発足させて、活発にやりたい。その先発隊なので、模範となるように。(委員長)</p> <p>2. 微小重力環境での蛋白質結晶の高品質化と最近の技術開発成果</p> <p>配布資料1-2に基づき、説明を行った。 【補足説明】 ・アミラーゼ試料調製の際のSDS-PAGEで出ているダブルバンドは、分子量にしたら1000程度の違いがある。アミノ酸残基にしたら10~20の違いである。今回用いているアミラーゼは、Nativeのものである。調製試料の組成は、ロットにより異なる。</p>		

【討論/コメント】

・打ち上げる前に実験装置に試料をセットしているということは、打ち上げ前に結晶化が始まっているということか。(委員)

➤ 本プロジェクトで用いている実験装置(Granada Crystallization Box; GCB)は、シンプルで宇宙飛行士の操作がほとんど必要ないことが、特徴の1つである。微小重力環境に達してから結晶化が始まるように、ゲルの深さなどで結晶化が始まるまでの時間を調整することができる。(事務局)

・宇宙で生成した アミラーゼ結晶の X 線回折実験について、非常に高品質な結晶が得られたが、X 線回折装置側の限界で取得できるデータが制限されており、最高分解能までのデータを使用した構造解析ができていない。(事務局)

➤ 蛋白研ビームラインでも、film distance の限界があり、1 を少しきるくらいまでしかデータの取得範囲を上げられない。しかし、現在さらに上げられないか検討中。(委員)

➤ 検討中のスーパーギャラクシーが完成すれば、分解能の問題は解決する。(委員長)

➤ Scalepack はきれいなデータになりすぎて、かえって怪しい。(委員)

・蛋白質 / 不純物枯渇帯について

➤ 結晶が大きいほど不純物の取込が減少するということは、宇宙でいい結晶が大きくできると考えられるので、宇宙で大きなキャピラリーを使えば大きないい結晶ができるのではないか。(委員)

➤ 蛋白質枯渇帯について(配布資料 1-2 p19)、溶解度が 10mg/ml に対して成長中の結晶表面の蛋白質濃度は、核形成直後では 30mg/ml、また、結晶が 0.07mm に成長した際で約 25mg/ml である。これは、結晶の成長において蛋白質分子の輸送が律速ではなく、分子の取込が律速であることを示している。(委員)

・リゾチーム結晶化実験について

➤ リゾチームの拡散係数を実測すると、PEG8000 を結晶化溶液に加えても予想したほどは低下していない。リゾチーム分子は PEG8000 の隙間を自由に行き来しているらしい。現在拡散係数をさらに下げる方策を検討中。(事務局)

➤ PEG の分子量をかえた実験は未実施。複数の分子量の PEG を混合した溶液での実験は実施中。(事務局)

➤ 高粘度溶液を用いてキャピラリー内径を小さくすると地上でも対流がなくなると考えられるので、宇宙で実験する必要がなくなるのではないか。(しかし、0.1mm より小さい内径で対流が抑制されるという Rosenberger らのシミュレーションあり)(委員)。

➤ 径を小さくすると対流はなくなるが、結晶が小さくなるので X 線回折実験に供することができない。(事務局)

➤ 宇宙実験は否定しない。今後、宇宙における結晶化のメカニズムを解明していくことや、宇宙環境をより効果的に利用する技術の開発とともに、失敗した事例についての情報も大切である。(委員長)

➤ 3%NaCl に 20%PEG8000 を入れてリゾチーム結晶化を行うと、結晶化にかかる時間が短くてすむ。これは PEG の濃縮効果と考えられる。(事務局)

・溶液の流れのなかでの結晶化実験で、結晶の質が良くなったと聞いており、秋の 169 委員会に成果を発表いただく予定(阪大 安達氏)。(委員)

- ・X線トポグラフィーはどうか
- シリコンなどがいい結晶であるかどうかの評価には使えるが、蛋白質結晶としては、defectがあるかどうかは評価できるが構造解析にとっての評価に使えるかは分からない。(委員)
- ・本会の内容が盛りだくさん過ぎて、討論に時間が費やせない。(委員長)

3. 昼食 / 会議

配布資料 1-3 に基づくが、各々の席の周囲でも別々に討論が行われた。

【討論 / コメント】

- ・宇宙実験の事例が蓄積してくると、実験結果を基にした解析が可能になる。(委員)
- ・成功例を強調しないと参加者が集まらないので、今のようなプレゼンテーションのやり方でいいのではないか。(委員長)
- ・基礎的データをとるための実験は提案できるか。(委員)
- 今利用している結晶化装置 / 器具の基本的な形状は変えずに、若干の応用・改修の範囲でなら、対応が可能である。(事務局)
- ・GCB でない実験の提案はどこへ持っていけばよいのか。(委員)
- 現在、窓口はないが、国際宇宙ステーションに日本のモジュールが上げれば、窓口ができるのではないか。(事務局)
- 本プロジェクトでも、GCB 容器内での実験ならば可能である。(事務局)
- ・実験温度は変えられるか。4 とか、20 より上とか。(委員)
- 国際宇宙ステーション軌道上ではインキュベータの使用等で可能だが、プログレスでの打上 / ソユーズでの帰還の際の温度コントロールができない。(事務局)
- ・プロジェクトの今後のスケジュールは、来年2月、7月分の打上(#5、#6フライト)は確定している。来年2月打上分のデータシート締め切りは9月24日(17日)である。試料の取扱によって、締め切りが異なる。(事務局)
- ・最終的には、本委員会で議論された内容を印刷物にすると、尚、良い。今回は、議事録と資料をまとめて、次回配布してください。(委員長)
- ・次回の本委員会開催時期は第4回フライト実験の帰還後2ヶ月とすると、12~1月くらい。開催時間は、午後からを想定している。(事務局)

4. 最近の宇宙実験の状況について

配布資料 1-4 に基づき説明を行った。

【補足説明】

- ・宇宙実験のための条件絞込実験で結晶性に問題があった試料のうち、多くは試料側に問題があった。
- ・表面電荷の不均一というのは、native-PAGE でバンドがスミア(不鮮明)であったということである。

【討論 / コメント】

- ・宇宙実験にアプライするならば、1人何件くらいまで受け付けられるか。(委員)
- 複数 OK。ただし、20件や30件というのは無理である。(事務局)
- 本委員会の参加者からのアプライならば、条件検討は利用者側で行い、12月にその条件の結果で搭載判断ということになる。(事務局)

・針状結晶の改善

- 地上で生成する針状結晶が、細かい線のようなものの集まりである場合、宇宙に持っていても単結晶があまり期待できない。(事務局)
 - 地上で生成する針状結晶の1本1本が見えて、長さ方向 1mmくらいありそうなものならば、宇宙で単結晶の生成が期待できる傾向がある。(事務局)
- ・試料受付は、エッペンチューブで行う。(事務局)
- ・宇宙実験にはお金がかかっているのだから、利用者が試料を打ち上げた以上は構造解析までやってもらうことを義務付けてもいいのではないかと。(委員長)
- プロジェクト当初、利用者にはお願いモードで始まっているので、義務付けるのは難しい。(事務局)
- ・企業秘密等あり、試料名が出せないのではないかと。(委員長)
- 試料名は出していないものもある。ロシア側に安全性データとして提出する書類では、記号等でも良い。(事務局)
 - 試料の Biological function も提出するが、試料の詳細が特定できるようなものでなくて良い。(事務局)
- ・宇宙実験の状況を聞いた限りでは、積極的にネガティブなものはない。(委員長)
- ・将来的には、20 だけでなく、4 での実験も実現しないといけないと思う。(委員)
- ・ロシアのロケット打ち上げは punctual であり、値段もスペースシャトルと比べて 1/10 くらいである。(事務局)

5. Gel-Tube 法の紹介

配布資料 1-5 に基づき説明を行った。

【討論 / コメント】

- ・現在のシミュレーションプログラムは市販しているが、機能を落としたものを試用版として配布することを検討している。(事務局)
- ・結晶のハーベストソリューションについて
- 結晶を大量に作っておいて、端からハーベストソリューションを試したら一番確実なのではないかと。(委員)
 - 前記、たいていの場合、蛋白質試料量が大量にはないので難しい。(事務局)
 - ハーベストソリューションの選択は、経験によるところが大きい。(事務局)
 - 多数のキャピラリーで結晶化溶液を同じように拡散させて、同じ位置からハーベストソリューションを集め取るという方法もある。(委員)
- ・キャピラリーを曲げてななめにして地上で結晶化すると、結晶化溶液の拡散は実現しつつ蛋白質結晶化への重力の影響を減らすことが出来る。(委員)
- ・結晶中に PEG は入らないか。(委員)
- PEG が入った結晶として PDB に登録されているものがある。(委員)
- ・PEG 分子量について
- 分子量は平均であるので、ロットが変わると結晶化条件にも影響が出る。(委員)
- ・ゲル中での結晶化について
- 結晶にゲルの繊維が取り込まれているという論文あり。(Gavira & Garcia-Ruiz Acta Cryst. (2002). D58, 1653-1656.) (事務局)

- 蛋白質溶液にゲルを入れると結晶が出なくなることが多い(例: アミラーゼ)。これは、アガロースを溶かすときの温度に関係があると考えられる。(委員)
- ・実際、ゲルチューブを用いて結晶化実験を行ってみると、蒸気拡散法の準備をするよりもずっと単純である。(委員)

6. 第5回高品質蛋白質結晶生成プロジェクトの紹介

配布資料 1-6 に基づき説明を行った。

【補足説明】

- ・試料に関する情報の提示について;ロシアからの要求のため、搭載蛋白質に関する情報;ESA(欧州宇宙機関)からの要求のため、生成した結晶に関する統計値;JAXA のプロジェクト評価に利用のため、生成した結晶に関するデータを利用者から提示していただく。
- ・試料搭載確定後に JAXA と共同研究契約を締結する。前もって秘密保持契約を締結することも可能。
- ・ゲルチューブキットは、池田理化を通じて販売している。
- ・蛋白質性状のデータは、条件絞込実験の結果をお知らせするときに提出をお願いする。
- ・第5回高品質蛋白質結晶生成プロジェクトについてのアナウンスは、9月3日に JAXA ホームページに掲載する予定なので、実験申込みは9月3日以降をお願いする。
- ・特に、高分解能をねらう場合には別枠で、支援を強化した形で進めるので、個別に JAXA/田仲にご相談いただく。ただし、成果共有で、すみやかに成果を公開しアピールに使わせていただきたい。

7. 総合討論:今後の研究ならびに技術開発について

配布資料 1-7 に基づき、次回以降の話題提供として項目を挙げた。

【討論/コメント】

- ・precipitant を沈殿化剤と呼んでいるが、「結晶化剤」に統一して欲しい。(委員)
- ・宇宙で是非4 での実験も実現して欲しい。(委員)
 - 20 でも良いが4 でも良いという蛋白質はたくさんあるはずである。(委員長)
 - 魔法瓶タイプの容器1つ分(12サンプル)、サンプルが集まれば可能かもしれない。あるいは、4 に統一したミッションも考えられる。(事務局)
- ・SPring-8 に超高分解能用のビームラインを設けられると良い。(委員)
 - スーパーギャラクシーの予算が通れば可能である。最低1日100 サンプルのX線回折が可能である。0.5 くらいまでの分解能が可能である。短期で建設すれば9億、長期になれば10億かかる。(委員長)
- ・今回、来られなかった方には資料を郵送する。(事務局)
- ・また、今回は委員会開催の連絡が不十分でこられなかった方もおられるので、次回本委員会で簡単に今回の報告を行う。(事務局)

以上

配布資料

- 1-1: 研究会趣旨説明
- 1-2: 微小重力での蛋白質結晶の高品質化と最近の技術開発成果
- 1-3: 研究会の進め方について
- 1-4: 最近の宇宙実験の状況について
- 1-5: Gel-Tube 法の紹介
- 1-6: 第 5 回高品質蛋白質結晶生成プロジェクト説明資料
- 1-7: 今後の研究ならびに技術開発について