

		JSF-MSP-05-040
調整会議事録 2005年2月24日作成	作成者氏名	JSF 宇宙利用技術推進部 高橋 幸子
件名	回折構造生物第169委員会 第2回高品質タンパク質結晶向け宇宙実験に関する研究会	
日時	平成17年2月24日(木) 13:30~17:00	
場所	JAXA 東京事務所2階第3会議室	
参加者(略敬称)	大阪バイオサイエンス研究所 裏出良博	
	国際科学振興財団 坂部知平, 坂部貴和子	
	岩手県立大学 小松啓, 持田製薬 松末朋和, 東京大学 澤野頼子	
	JAXA 小林智之, 佐野智, JSUP 田仲広明, JSF 広田恵理華, 高橋幸子	
議題	1. JAXA-GCF 宇宙実験の成果例 (OBI 裏出先生) 2. JAXA-GCF#5 宇宙実験の実施状況 (JSUP 田仲) 3. JAXA-GCF#5 宇宙実験の経過説明 (JSUP 田仲) 4. 宇宙実験の有用性を高めるノウハウについて (JSUP 田仲) 5. 議論	
配布資料	ハンズアウト(JAXA-GCF#4 宇宙実験実施状況, JAXA-GCF#5 宇宙実験の経過説明, 宇宙実験の有用性を高めるノウハウについて) H. Tanaka <i>et al.</i> , 'Numerical Analysis of the Depletion Zone Formation Around a Growing Protein Crystal', <i>Ann. N.Y. Acad. Sci.</i> 1027 : 10-19 (2004) 高橋ら, 「宇宙環境を利用した高品質なタンパク質結晶の生成」, 日本結晶学会誌, 46 : 323-331 (2004) D.C. Rees <i>et al.</i> , 'Fragment-based Lead Discovery', <i>Nature Review</i> , Vol. 3 (August): 660-672 (2004)	

1. JAXA-GCF 宇宙実験の成果例 (OBI 裏出先生)

JAXA-GCF宇宙実験の成果例 プロスタグランジンD合成酵素の構造と機能

プロスタグランジンD2 (PGD2)およびその合成酵素について

- ・PGD2 は脂肪酸の一種であり, 睡眠と深いかわりがある. 動物に打つと睡眠がおこる. なぜ寝ないと頭が疲れるのか, 寝ている間に頭では何がおきているのか, 等未知のことが多い.
- ・裏出グループではPGD2合成酵素(PGDS)を単離精製, 遺伝子組換え酵素の発現, KOマウスの作製と機能解析を行っている.
- ・PG 生合成経路は, アラキドン酸(不飽和脂肪酸, 必須脂肪酸)からサイクロオキシゲナーゼ(インドメタシン, アスピリンで阻害)でPGH2が生成し, それから PGE2(痛みの元), PGF2alpha(陣痛促進剤), PGI2(血小板を固めない作用), TXA2(血小板を固める作用), および PGD2(睡眠, アレルギー反応と関係, PGDSynthase(PGDS)が合成)が生成する. この中で, PGD2の研究は遅れていた. 睡眠の作用が見つかったから研究が進歩し始めた.
- ・PGD合成酵素(PGDS)には2種類ある(Lipocalin-type PGDS, hematopoietic PGDS). L-PGDSはGSH-independentで, 脳および心臓に分布する. 一方, H-PGDSはGSH-requiringで, 肥満細胞, 抗原呈示細胞, Th2細胞(造血系)で生成する.
- ・PGD2レセプターには2種類あり発現している細胞が違う. その研究はすべて日本がリードしている. DP1にリガンドが結合すると, 細胞内cAMP上昇, 血小板凝集, 陣痛促進, 睡眠などの作用がある(1995~6年). CRTH2は, 細胞

内cAMP下降, Ca²⁺上昇, 造血系・免疫系細胞に作用する(リガンドが分からないオーファンリセプターだったがPGD2がリガンドであることが3年前にわかった).

PGD2 と睡眠

- ・ラット脳内で最も活発に合成されるプロスタグランジンは PGD2 である.
- ・ラット脳に PGD2 を打つとラットは動かなくなり、睡眠の時に出る特徴的な脳波がでる。(麻酔とは違い覚醒のシグナルははいる.たとえば地震が来たら起きるなど).これはサルでも同じ.
- ・人間でもアフリカ睡眠病等の病気において, PGD2 の脳脊髄や血中での濃度が上がっている.
- ・PGD2 は過投与しても目を覚ますことができる. Natural な覚醒は PGD2 では阻害できない(命を守るためだったら起きる).
- ・動物を眠らせる(麻酔ではない)作用のある物質は PGD2 以外知られていない.
- ・睡眠には 2 種類あり, non-REM(rapid eye movement)睡眠時は, 脳波は単純で眼球も動かない. 一方, REM 睡眠時は, 脳波は活発で眼球が動いている. PGD2 は non-REM 睡眠の比率を上げる.
- ・L-PGDS をノックアウトしたマウスの睡眠は野生型と同じパターンであったが, 昼間わざとマウスを起こしておくと寝不足を取り戻せない.
- ・L-PGDS ノックアウトマウスはボケも早いかも?
断眠ストレスに強いとも言える. KO マウスはストレスに弱いものは個体として成長して来なかったということかもしれない.

宇宙実験と水素原子の位置

- ・L-PGDS, H-PGDS の立体構造はわかってきている(Nature Structural Biology, 2003 等)
- ・H-PGDS は宇宙で結晶化している(ロシアミッション). L-PGDS はまだである.
- ・HQL-79(H-PGDS 特異的阻害剤)と H-PGDS の複合体の結晶構造解析(地上 1.7Å 宇宙 1.3Å)で創薬の方向性が決まりつつある.
- ・2.8Å, 2.0Å 程度の分解能ではベンゼン環の穴はみえない. 1.5Å でようやくベンゼン環の穴がみえる. 1.28Å でベンゼン環の角のふくらみがみえてきた. 水素の位置のいびつさを反映しているとも思われるがまだわからない. 水素の位置はそれまで類推だった.
- ・水素の位置を決めることがドラッグデザインに本当に必要なのか.
水分子の構造はドラッグデザインのうえでも重要である(シミュレーションは初期構造が正確でないという意味がない. 2Å の構造だと理論的な構造と同じ程度. 1Å に近づくとずっといい). 反応メカニズムをやっている人にとっても意味がある.
- ・水の構造を決めるのは良い結晶がとれて分解能が上がれば可能である. X 線で水素の位置を知るはその数倍の労力が要る. 本当に必要か.
例えば H-PGDS 内グルタチオンの S がマイナス化している. どのようにして SH の H がとれているのか, ぜひ知りたい. その情報は創薬にも生かせるし反応機構の解明にもつながるかもしれない.
- ・水素の位置が見えると合理的な創薬が可能になるのに, 高分解能結晶の有用性を知らない人が多いので, その情報をできるだけオープンにする必要がある. 水素を見ることの意味をうまく宣伝する必要がある.(これまでの世の中は, 3Å 程度でも良いから早くデータを出せという風潮だったが, 1.2Å 位をめざして最後まで情熱をもって水の位置を決めていけば構造がはっきりとわかる.)

その他のPG合成酵素に関わる疾患

- ・HQL79 投与による遺伝性筋ジストロフィーマウスの筋壊死の抑制
 - ・HQL79 投与による脳損傷由来の浮腫の抑制
 - ・HQL79 投与による遺伝性脱髄マウスのグリオーシスの抑制
 - ・病原性寄生原虫の PGF 合成酵素産生(アフリカ睡眠病, リーシュマニア症(LmPDF)(イラクのサンドフライ), シャーガス症)
- これら寄生虫に対する薬は高く売れない(必要とする人たちにお金がない)ので製薬会社は研究を進めないが, 利潤追求を目的としない団体がその薬の研究に携わることは, 社会的, 人道的にも非常に意味があることである.

ロシアミッションへの感想

- ・counter-diffusion 法による結晶生成, および, アルカンの利用は良かった. 誰にでも使いやすいトラブルが起りにくい. (蒸気拡散法で頑張っていたデルーカスも4~5年前に液液拡散法の収率がかなりいいと言っていた. 2005. 1. サンフランシスコで行われた Protein Crystallography Drug Discovery ではデルーカスたちのグループが自動化した液液拡散結晶化装置を紹介していた).
- ・宇宙実験は F1 のようなものである. 気合いを入れるにはとてもいい.
- ・バイコヌール射場は凸凹だが, 射場で日本側担当者が試料充填もできる(アメリカでは触らせてもらえなかった), など, ロシアのプロジェクトは参加しやすい印象がある.
- ・ロシアのプロジェクトは是非続けた方がよい.
- ・キャンペーン用にスライドやビデオを作ると良い(蒸気拡散, 地上, 宇宙の結晶生成写真など).
- ・臆することなく得られた成果をもっと宣伝した方がよい.

2. JAXA-GCF#4 宇宙実験の実施状況

- ・プロジェクトを進めるにつれ, 実験の実施状況はかなり安定してきた.
- ・#1から#3までで, 分解能の改善には PEG 系がよいことがわかった. また結晶の大型化も時々見られた. しかし最終的な効率が良くなかった(構造解析まで行けた物が少ない).
- ・#4は利用者から受け付けた試料のうち結晶性が悪いものについて SDS-PAGE と native-PAGE で試料の性状を確認した. 搭載タンパク質中32種類は地上でも結晶が出ていた. また, PEG 系沈澱化剤を推奨した. そのほか, ゲルチューブ法, JCF(JAXA crystallization facility), JCB(JAXA crystallization box)の説明を行った.
- ・#4の結果, 温度コントロールは良好であった(プログレス内での温度低下は, 結晶成長の前なので問題ないと考えられる). 27蛋白質(条件検討で良好な結晶が得られていたもの)中21蛋白質は宇宙でも良好な結晶が出た. 出なかったものは条件検討のときの試料とロットが異なることが後でわかった. また22蛋白質(前記21蛋白質+1蛋白質)中14種類にX線をあててそのうち11種類はデータコレクションできた. ユーザーの希望を聞き, キャピラリーから結晶の取り出し, および凍結のサポートを行った. このように様々な改良の結果, 有用な回折データが取得できる確率が向上した. しかし, 条件絞り込みにはまだ課題有る. また高密度容器は改良中である.
- ・結晶化条件の絞り込みは地上でやっていくのが望ましい. いきなり宇宙は無謀である.
- ・レーザーフラッシュをあてて核形成を促して宇宙で結晶かするのはどうか.
レーザーは特注品で7~8千万かかるらしい.

3. JAXA-GCF#5 宇宙実験の経過説明

- ・個別対応コースを設け、ユーザーの数を増やす工夫を行った。
- ・全数性状確認実験を実施した。
- ・条件絞り込み実験は始めから3～4条件で実施した。ユーザーからいただいた試料の質の向上が感じられる。
- ・JCBは主に技術開発品を搭載している。
- ・国内充填品を増やした(結晶生成に10日以上かかる試料が対象)。

4. 宇宙実験の有用性を高めるノウハウについて

試料について

- ・構造解析学者と生化学者の不純物の概念に対する認識の違いがある。高品質結晶の生成のためには分子の均一性が重要である。最終的に native PAGE や精製時の HPLC でシングルバンド(peak)であることが望ましい。
- ・温度(20)に対する蛋白質試料の安定性が重要である。

拡散について

- ・微小重力効果を高めるために結晶周辺の欠乏層を利用する。そのためにも、またカウンターディフュージョン法でキャピラリー内の濃度変化を知るためにも、拡散をきちんと知る必要がある。
- ・現在得られているアルファアミラーゼの拡散係数の動粘度依存性は実測値と理論値に差がある。リゾチームだとその差はもっと大きい。PEG 分子が大きくなると PEG 分子間の空隙がおおきくなってくるのが関係してくるせいかな。
- ・アルファアミラーゼは宇宙で 0.89A 分解能の結晶が得られている。電子密度図から水素まで見える。液の粘性を高めれば同様の効果が得られるのではないかと考え、リゾチームの結晶化溶液に 25%PEG を加えて良好な結果を得た。PEG の割合については検討の余地がある。
(リゾチームのデータに関して)よそのデータと比較する場合には、比較の基準を一定にしないといけな。

ゲルチューブ法について

- ・ゲルチューブ法では PEG 系のほうが安定な印象がある。
- ・ゲルチューブ部分の溶液組成が問題になる場合(白濁など)、ゲルをバッファあるいは沈殿化剤で置換するかゲルチューブを長くするなどの対処が必要である。
- ・ゲルチューブ長くし試料長を長くするとより緩和な条件で結晶化できるためより良好である。

溶液の粘性を高める方法について

- ・グリセリン添加では、グリセリン濃度を高くしても粘性はあまり変わらない。全ての拡散が遅くなる。
- ・PEG 添加では粘性は高くなるが、低分子の拡散は抑制しない。排除体積効果のため他の沈殿化剤と相乗効果がある。核形成を抑制しない。
- ・アガロース添加は今後の課題である。

キャピラリーからの結晶取り出し、凍結技術

- ・結晶がキャピラリーに固着している場合、結晶の取り出しに失敗して悪い結果になりがちである。
- ・結晶周辺の濃度に合わせたハーベストソリューションが必要である。(PEG は拡散が遅いのでまだ拡散を続けている)。
- ・抗凍結剤は適切な物を選んでやっても、万全を期してもうまくいかないこともある。ループにも問題があるかもしれない。蒸発しやすい有機溶媒は蒸発による条件変化がある。凍結に向けた沈殿化剤、抗凍結剤をはじめから結晶化溶液にいれておけると良い。

・全行程に適する試薬は PEG 系ではないか、理研ハイスルーブットファクトリーでは約 50%が PEG 系を用いており 25%が PEG + 塩、有機系である。

5. 議論

X線検出器について

・1A をきる分解能のデータを取得できる検出系がほとんどない。

残留Gについて (グラナダでおこなわれたミーティングでISSでキャピラリー内を移動する結晶の動画を見た)

・キャピラリー壁面からわざと成長させるのはどうか。(壁面にポリリジンを描くように塗るとか.)

・しかし、掬い方で結晶が損傷することもある。

・キャピラリーごと凍結する人もいるが超高分解能の場合良いかどうかかわからない。

・残留Gは宇宙飛行士が移動するにつれて(重量の移動)、それからISSの中心からそれるにつれてコリオリ力が働く。

・残留Gによる移動はPEGでどこまで押さえられるか分かっていない。動粘係数が問題である。地上で実験するときには45度? 帰還時には寝かせておくとうい。

抗凍結剤について

・Cryosolventをつかうとそのもの自身の熱容量などで上手く行かない。だから、まずオイルで結晶の水を除いてそのあとオイルを除く。オイルにつかった結晶は扱いやすい。

核形成について

・細かいX線をあてる、ガラスの細かい粉をいれる等。ポリリジンはリゾチームでうまく働いている。壁にぬるのではなくほそい糸のさきにリジンをつけて入れておくとうい。ポリリジンはふつうの水に溶かしている。

宇宙での結晶化実験について

・今のところ主力でやるのは、地上での分解能も高いがそれ以上の分解能の結晶を生成し、詳細な電子密度図を得られるような結晶を獲得することである。

・宇宙でないとできない結晶というものはないと思う。

・シードをつかって低い飽和度で結晶をつくる必要があるのではないか。

・残留Gから欠乏層を守る工夫が必要である。

・ロシアミッションにかかる費用を試料数で割り、採算が取れるかどうか最終的な問題である。

・一般に高い物とか飛ぶ物は好きである。

・ロシアとアメリカのミッションの方向性は逆である。ロシアミッションは予想以上の飛躍ができそうである。

・第2回研究会欠席の人にはプレゼン資料を後ほどお送りする。