

IIII 特集：小型衛星・実験装置 その2 IIII  
(解説)

## 蛋白質結晶生成装置及び 高品質蛋白質結晶生成実験用セルユニットの開発について

永島 貴穂<sup>1</sup>・岡 利春<sup>1</sup>・松本 邦裕<sup>2</sup>

### Development of the Protein Crystallization Research Facility (PCRF) and High Density Protein Crystallization Cell unit (HDPCC)

Takao NAGASHIMA<sup>1</sup>, Toshiharu OKA<sup>1</sup> and Kunihiro MATSUMOTO<sup>2</sup>

#### Abstract

IHI AEROSPACE Co.,Ltd (IA) had been developed the Protein Crystallization Research Facility (PCRF) and High Density Protein Crystallization Cell unit (HDPCC) under the Japan Aerospace Exploration Agency (JAXA). PCRF is one of the two facilities in Solution/Protein Crystal growth Facility (SPCF) for Japanese Experiment Module (JEM), called "Kibo". PCRF has been launched using Shuttle at STS-123 mission in March 11, 2008. HDPCC is one of component for JAXA high-quality protein crystal growth experiment (JAXA PCG). HDPCC has been launched and returned by Progress and Soyuz spaceship from 2009 to 2013, high-quality protein crystal growth experiment was performed six times so far, and various high important results are provided.

**Keyword(s):** SPCF, PCRF, JAXA PCG, HDPCC, IA

#### 1. 緒言

(株) IHI エアロスペース (以下, IA と記す) は, 独立行政法人宇宙航空研究開発機構 (JAXA) のもと, 応用利用研究の一つとして実施されている蛋白質結晶生成装置 (PCRF) を用いた JAXA 高品質蛋白質結晶生成実験 (JAXA PCG プロジェクト) に参画している. 本実験のうち, IA は PCRF 及び実験を行うためのセルユニット (HDPCC) の開発及び帰還後の再フライト化整備を担当してきた. これまで, 2009 年から 2013 年にかけて, プログレスまたはソユーズにて計 6 回の打上げ, Kibo での軌道上実験, ソユーズでの帰還を行い, 多数の大型且つ高分解能の高品質蛋白質結晶の生成に成功している. 本稿では, PCRF 及び HDPCC について開発の視点から述べ, JAXA PCG で使用している蛋白質結晶化ユニット, 軌道上実験の概要, 実験成果について紹介する.

#### 2. 実験装置

##### 2.1 蛋白質結晶生成装置 (PCRF)

###### 2.1.1 概要

蛋白質結晶生成装置 (PCRF) は, 溶液結晶化観察装置 (SCOF) と共に溶液/蛋白質結晶成長実験装置 (SPCF) を構成する装置の 1 つであり, JEM 船内実験室 (JEM-PM) の流体実験ラック (RYUTAI ラック) に搭載されている. PCRF は RYUTAI ラック搭載状態で JEM 船内保管室 (ELM-PS) に搭載され, STS-123 (2008 年 3 月) で打上げられた. STS-124 (2008 年 6 月) による船内実験室 (JEM-PM) 打上げ後, ELM-PS から JEM-PM へ移設, 2008 年 8 月に初期検証が実施された. 運用期間が初期検証から約 5 年経過した JEM 装置の中では, 第一世代の装置である. RYUTAI ラックの設置位置を Fig. 1 に示す. PCRF の搭載位置を Fig. 2 に示す. PCRF 外観図を Fig. 3 に示す.

1 株式会社 IHI エアロスペース 宇宙技術部 宇宙利用技術室 〒370-2398 群馬県富岡市藤木 900 番地  
Space System Department, Space Utilization Office, IHI AEROSPACE Co.,Ltd, 900 Fujiki, Tomioka, Gunma, 370-2398 Japan  
2 独立行政法人宇宙航空研究開発機構 宇宙科学研究所 ISS 科学プロジェクト室 〒305-8505 茨城県つくば市千現 2-1-1  
Japan Aerospace Exploration Agency (JAXA), 2-1-1 Sengen, Tsukuba, Ibaraki, 305-8505 Japan  
(E-mail: t-nagashima@iac.ihico.jp)

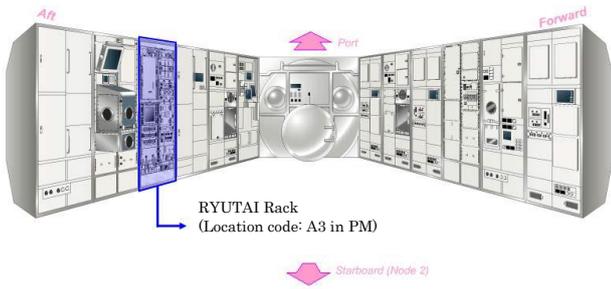


Fig. 1 Location of RYUTAI Rack

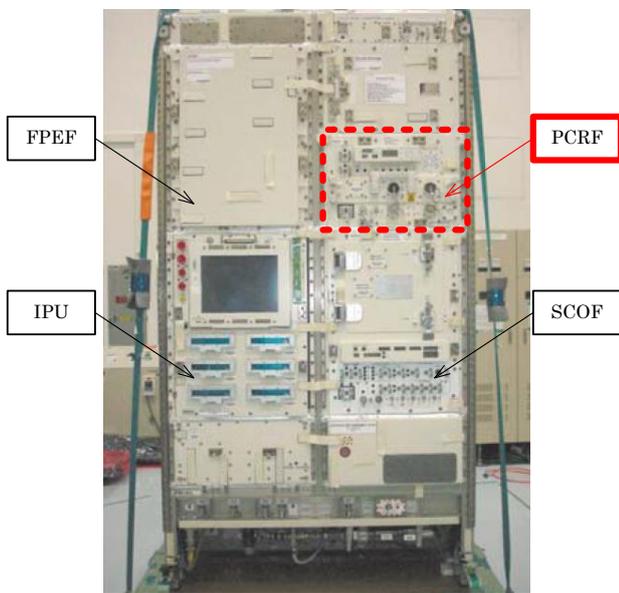


Fig. 2 RYUTAI Rack



Fig. 3 Photo of PCRf

## 2.1.2 主要機能

PCRf の概要図を Fig. 4, Fig. 5 に示す. PCRf は微小重力環境下における蛋白質等の結晶生成と結晶成長のその場観察を実施することができる装置である. 主に高品質な蛋白質結晶の生成を目的とし, 結晶成長条件が不明確な試料に対し, 可能な限り多くの条件での結晶生成実験を提供することができる. PCRf 内には最大 6 式のセルユニットを搭載することで, セルユニットは, 操作パネル前面から宇宙飛行士による軌道上交換が可能であり, 1 度のフライトアクセスで, 多数の実験機会を提供できる.

実験ユーザ側で利用可能な機能として, 温度計測・制御機能, 観察機能, 観察位置制御機能, ステッピングモータ制御機能, 位置検出機能, オプション電源供給機能を持つ. PCRf のユーザインタフェースを Table 1 に示す.

大型の高品質な蛋白質結晶を得る確率を高くするためには, 結晶化条件 (温度, 濃度, 試料純度, 結晶化方法等) を適切に制御, 選定する必要がある. これまでの実験成果から, 蛋白質溶液と結晶化剤 (沈殿剤) の溶解度特性に基づく過飽和度の制御を最適化することが重要

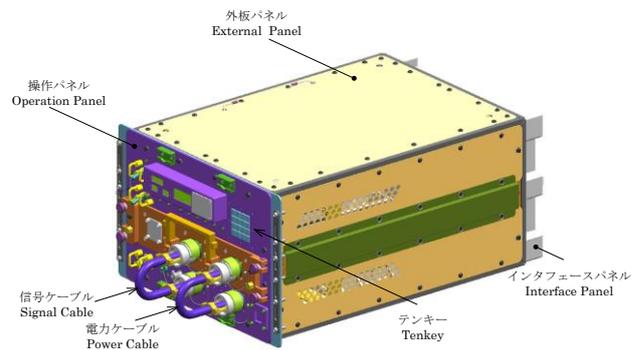


Fig.4 General View of PCRf

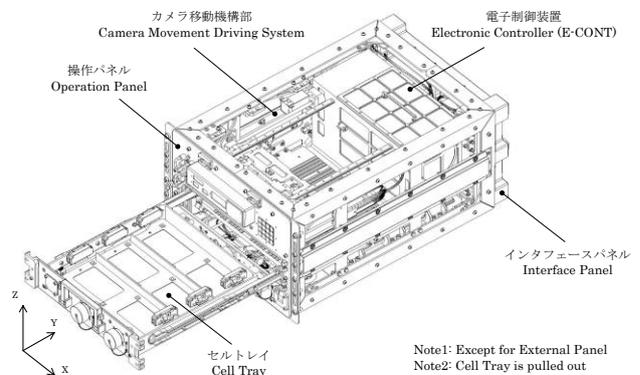


Fig.5 General View of PCRf (External panels are Removed and Cell tray is pulled out)

といわれている<sup>1-3)</sup>。PCRf では、結晶化条件の一つである温度及び濃度条件について、セルユニット側で制御に必要な部品あるいは機構を準備することで、以下のような制御が可能な仕様となっており、結晶化条件の最適化による高品質結晶生成を実現可能としている。結晶化方法については、セルユニットの許容エンベロープを満足すれば、液-液拡散法、蒸気拡散法、バッチ法等を実験ユーザ側で自由に選定できる。

(1) 温度条件

セルユニット側で加熱・冷却装置及び温度センサを搭載し、PCRf 側の温度計測・制御機能を使用して実験供

試体内部を 0～35 [°C] の温度範囲で温度制御することが可能である。温度制御は、電子制御装置 (E-CONT) に搭載されたソフトウェアを使用し、温度計測点のフィードバックによる PID 制御を行う。また、セルユニット 6 式を独立して制御可能である。

(2) 濃度条件

セルユニット側で溶液注入機構を製作し、PCRf 側のステッピングモータ制御機能、位置検出機能を使用して結晶化剤 (沈殿剤) 等の注入による濃度制御を行うことができる。モータのステップ数及びスピードを制御することで、微量注入も可能である。

(3) 結晶化条件変更タイミング

PCRf 側の観察機能及び観察位置制御機能を使用して、観察位置の座標指定により、試料を指定して結晶の成長状態を確認することができるため、結晶成長に合わせて、最適なタイミングで温度または濃度条件の変更を行うことができる。CCD カメラによる観察のイメージを Fig. 6 に示す。

実験は、ユーザが制御目標の温度や観察位置座標等を予め実験パラメータに設定し、設定されたパラメータに従って実験シーケンスを実行することで行われる。観察系に使用される CCD カメラの制御設定調整や観察位置座標等、変更可能な実験パラメータについては、実験中に地上からのアップリンクコマンド及びにより変更でき、操作パネルのテンキー操作により、観察位置の微調整が可能である。

Table 1 PCRf User interface

Function		Specification
General	Usable Value	6 cellunit
	Crystallization Method	1) Vapor diffusion 2) Liquid-liquid diffusion 3) Membrane 4) Batch
Temperature Control	Control Target	Thermo module (TM1~6)
	Usable Channel	1 ch/1 cellunit
	Control Method	Heating/Cooling, Ampere Control, PID Control
	Ampere Supply	4.2 Amax/ch, 20Amax/6ch
	Range	0~35 degree C
Temperature Measurement	Measurement Method	Thermistor (TS1~12)
	Usable Channel	2 ch/1 cellunit
Motor Control	Control Target	Stepping motor (MT1~6)
	Usable Channel	1 ch/1 cellunit
	Phase	5 Phase (Bipolar method)
	Ampere Supply	0.75A/1 Phase
	Voltage Supply	15 VDC
Position Detection	Detection Target	Photo sensor (PM1~6)
	Usable Channel	1 ch/1 cellunit
	Ampere Supply	10 mA
Option Power Supply	Ampere Supply	12VDC
	Voltage Supply	2.0 Amax
Observation System	Camera	1/2 inch CCD
	Lighting Source	LED ( $\lambda = 660 \text{ nm}$ )
	Resolution Power	More than $40 \mu \text{ m}$
Observation Position Control	Position Coordinates	X axis: 0~175.000 mm (0~175000 pulse) Y axis: 0~265.000 mm (0~265000 pulse)

2.2 高品質蛋白質結晶生成実験用セルユニット (HDPCC)

2.2.1 概要

HDPCC は JAXA 高品質蛋白質結晶生成実験 (JAXA PCG プロジェクト) の構成品の一つであり、PCRf に搭載され、蛋白質結晶生成実験を行う供試体で

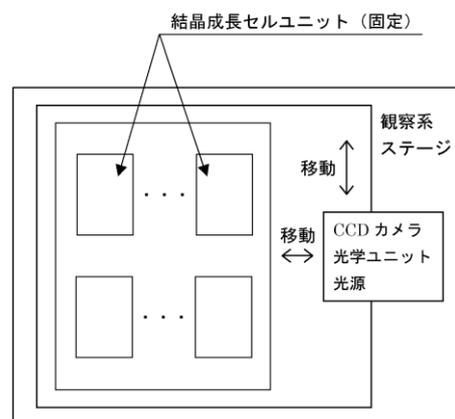


Fig.6 Image of PCRf Observation Function

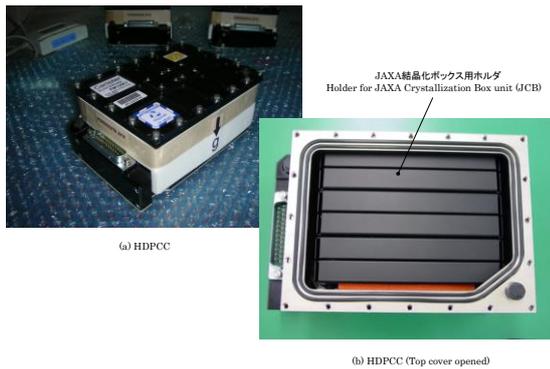


Fig.7 General View of HDPCC

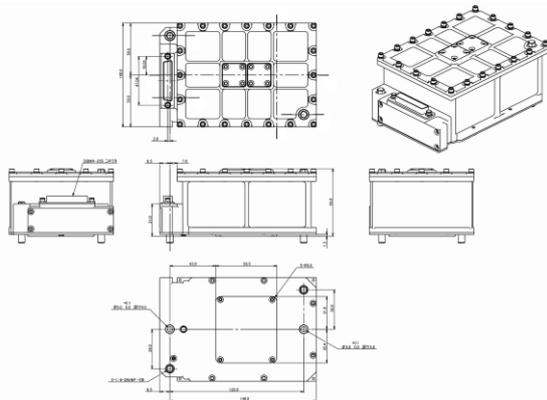


Fig.8 Drawing View of HDPCC

ある。これまで実施されてきた蛋白質結晶生成実験は、シャトル利用による「基本的な結晶生成技術とプロセスの構築」を目的とした第 1 フェーズ（2003～2005 年, JAXA-GCF プロジェクト）、ISS ロシアサービスモジュール利用による「超精密立体構造解析技術の検証」を目的とした第 2 フェーズ（2007～2008 年, JAXA-New GCF プロジェクト）がある<sup>4)</sup>。これらを受けて第 3 フェーズとして、「JEM 利用による戦略的な成果の創出」に向けた JAXA PCG プロジェクトとして 2009 年 7 月から 2013 年 5 月にかけて、計 6 回のフライト、軌道上実験、帰還運用を行い、多数の大型且つ高分解能の高品質蛋白質結晶の生成が実施された<sup>5) 6)</sup>。IA は、JAXA PCG プロジェクトのうち、HDPCC の開発、維持整備、射場支援、実験運用支援を行い、JAXA PCG プロジェクトの一端を担っている。

尚、HDPCC は JAXA PCG プロジェクトにて新規開発されたセルユニットであり、JAXA-GCF プロジェクト、JAXA-New GCF プロジェクトでは使用していない。HDPCC の概要図を Fig.7, Fig.8 に示す。

### 2.2.2 主要機能

JAXA PCG では、実験ユーザが比較的多いと言われていた約 20 °C で結晶生成を行う蛋白質をターゲットとし、

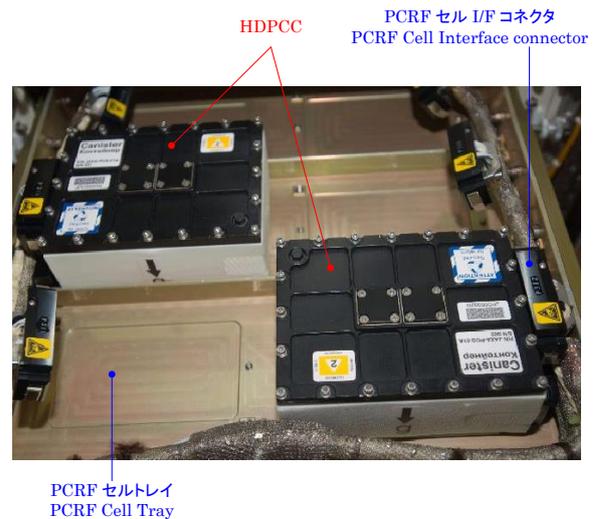


Fig.9 HDPCC is set on PCRf Cell Tray

PCRf の温度制御機能を利用して、セルユニットに設置したサーモジュール及びサーミスタにて結晶化ユニット内部の温度を  $20 \pm 2$  °C に制御することができる。また、HDPCC 内に搭載する結晶化を行うための結晶化ボックスは、JAXA 結晶化ボックスユニット（JCB: JAXA Crystallization Box unit）やマイクロチップ、グラナダ結晶化ボックスユニット（GCB: Granada Crystallization Box unit）を搭載でき、JCB 及び GCB をホルダに格納し、実験を行う。JAXA PCG 実験では、1 セルユニットに JCB を最大 12 ユニット搭載できるため、最大 144 本/1 セルユニットのキャピラリが搭載可能であり、セルユニットを 2 式使用できるため、144 本×2 式 = 288 本のキャピラリを使用した蛋白質実験を提供可能である。また、内部には、温度データロガーを 3 式搭載することができ、セルユニット内部の温度環境は、フライトから回収までの間の温度記録により確認することができる。HDPCC の PCRf 搭載図を Fig.9 に示す。

#### (1) 構造部

構造部は、PCRf と機械的インタフェース、熱的インタフェースを確保する役割を果たしている。安全設計の観点から、気密構造としている。搭載する蛋白質結晶はある程度の危険性のある物質（Toxic Hazard Level (THL) : 2) も搭載されることを想定し、2 重シールド構造のシールドコンテナ設計（結晶化ボックスの 1 重シールドと合わせて、3 重シールド設計）としている。

#### (2) ホルダ部

ホルダ部は、JCB 及び GCB をセルユニット構造に固定するためのホルダであり、セルユニット 1 式あたり、JCB を 3 パック（JCB 4 ユニットで 1 パック）、GCB を 9 パック（GCB 1 ユニットで 1 パック）搭載することができる。

(3) 温度計測・制御部

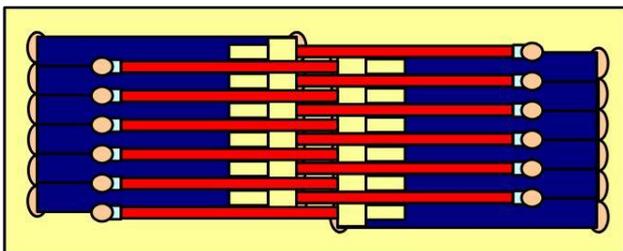
JCB 及び GCB の温度制御を行うため、サーミスタ (NTC 型) を 2 チャンネル使用し、セルユニット内部温度の計測を行い、サーモモジュールを 1 チャンネル使用して、PCRf のフィードバック制御により、目標を 20 °C として温度制御を行う。

2.3 結晶化ユニット

HDPCC に搭載する結晶化ユニットについては、JAXA あるいは ESA/グラナダ大で開発されたユニットであり、高品質蛋白質結晶生成実験の中核を成すものである。主に使用される JCB 及び GCB について概要を簡単に紹介する。

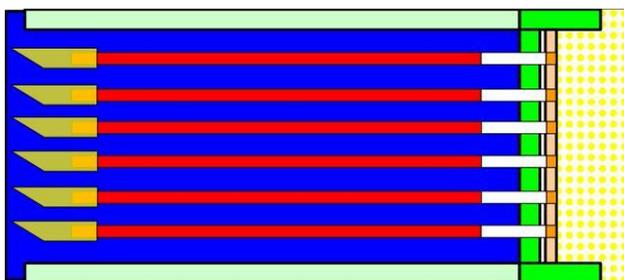
2.3.1 JAXA 結晶化ボックス (JCB)

JCB の概要図を Fig.10 に示す。JAXA 結晶化ボックスユニット (JCB: JAXA Crystallization Box unit) は、JAXA が開発した結晶化容器である。沈殿化剤溶液充填セルに区画を設け、それぞれのキャピラリごとに独立した沈殿化剤セルがあるため、各キャピラリで異なる条件を用いて結晶化実験を行うことができる。JCB 1 ユニットにつき、キャピラリ 12 本を搭載でき、最大 12 種類、12 条件の蛋白質を搭載可能である。JCB は GCB を高密度化し、最大 12 倍の種類の蛋白質を同時に実験可能としており、ゲルチューブ法 (GT 法) を使用し、GT



(Note) Red: Protein solution, Blue: precipitant solution, Yellow: Gel

Fig.10 JAXA Crystallization Box Unit (JCB)



(Note) Red: Protein solution, Blue: precipitant solution, Yellow: Gel

Fig.11 Granada Crystallization Box Unit (GCB)

法を高密度化して実装できるシリンジケースを使用する結晶化方法は、JCB 法と呼ばれている<sup>4, 7)</sup>。

2.3.2 グラナダ結晶化ボックス (GCB)

GCB の概要図を Fig.11 に示す。欧州宇宙機関 (ESA) とグラナダ大学 (スペイン) が開発した結晶化容器である。GCB 1 個につき、キャピラリ 6 本を搭載でき、1 種類、1 条件の蛋白質を搭載可能であり、広い範囲での結晶化条件を設定可能である。GCB を使用する結晶化方法は、GCB 法と呼ばれている<sup>7)</sup>。

3. 実験方法

3.1 実験の目的

JAXA で実施してきた JAXA PCG 実験の目的は、結晶生成に特化して考えると、高品質な結晶を生成することである。即ち、結晶構造が高い分解能で観察できる高品質な結晶の生成である。実験で高品質な結晶を生成することができれば、Spring-8 等の高放射光施設を利用して X 線回折実験に供し、高分解能 X 線回折像を得ることができる。これにより結晶構造解析にて蛋白質結晶の構造を分子レベルで明らかにすることができ、蛋白質の反応部位を正確に把握し、反応を抑制する化合物の開発、あるいは酵素、触媒等の開発に繋げていくことで、産業や地上への暮らしへ貢献することが可能となる。

3.2 実験方法

JAXA PCG 実験のうち、軌道上実験は、PCRf, HDPCC, 結晶化ユニット (JCB/GCB) を使用して実施される。フライト後、PCRf セルトレイに搭載され、結晶化ユニットは、PCRf 及び HDPCC 機能により、20 °C に温度制御され、1.5~4 ヶ月かけて、ゆっくりと結晶化が行われる。微小重力環境では、地上に比べ結晶化溶液の密度差による対流や重力による沈降等の外乱が抑制され、濃度勾配の維持や分子配列に乱れの少ない結晶格子を生成することができると考えられており<sup>4, 7)</sup>、より高品質な結晶生成に適した環境であるといえる。また、本実験での結晶化方法は、液-液拡散法 (カウンターディフュージョン法: CD 法)<sup>4, 7)</sup> を採用しており、ゲル層を介して、蛋白質溶液と結晶化溶液がキャピラリ内で反対方向に拡散する方法である (Fig.12)。蛋白質がキャピラリ外へ、結晶化溶液はキャピラリ内へ拡散し、キャピラリ内にそれぞれの濃度勾配が形成され、その勾配が経時的に変化することによって結晶化に適した条件になった位置・時間で結晶化が開始される。

これまでに JAXA で実施してきた結晶化実験で得られた知見から、本結晶化方法のメリットは、蛋白質溶液と結晶化剤溶液がそれぞれ拡散のみで濃度変化していくため、拡散係数などの物性値がわかっているれば計算で予測が可能なことや、蒸気拡散法 (VD 法) に比べ、結晶

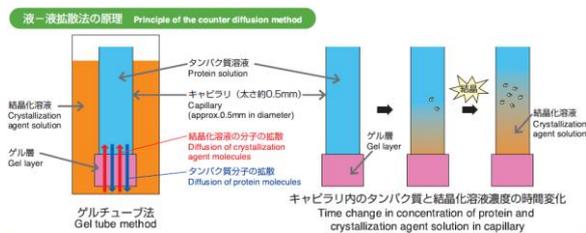


Fig.12 The counter diffusion method (CD method)

が移動する自由空間がほとんど無いため、マランゴニ対流による結晶への影響がほとんど無く<sup>4, 8)</sup>、結晶の高品質化のための制御が可能といわれており、高品質な結晶生成に適した手法であるといえる。また、フライト及び帰還時の温度環境については、JAXA で開発した専用バッグ内及びセルユニット内にアルカン（ヘプタデカン）を設置し、外部からの熱流入を遮断し、セルユニット内部温度の上昇を抑制する仕様となっている。

### 3.3 実験成果

これまでに JAXA で実施してきた蛋白質結晶生成実験にて得られた成果は多岐にわたる。実験で生成された蛋白質結晶から得られた詳細な構造データを用い、今後の研究開発により、産業や地上での暮らしへの貢献が期待できる分野について、代表的な事例を簡単に紹介する<sup>4,6)</sup>。

(1) 医薬品（医療用・一般用薬）・特定健康食品開発病気を引き起こす蛋白質の反応部位の反応を抑制する化合物（＝医薬品）の開発が可能になる。

(2) エネルギー開発  
食糧とならない草やわらを分解する蛋白質を利用し、糖を得ることでエネルギーを生産する。食糧を使用しないバイオエネルギー開発が可能になる。また、燃料電池の触媒として蛋白質を利用する。

(3) 廃棄物処理  
自然分解されにくい人工繊維やプラスチックを分解し、原料に戻す酵素の開発により、自然環境保護への貢献が可能になる。

## 4. 結言

高品質蛋白質結晶生成実験は、今後も JAXA の応用利用分野における宇宙実験として継続的に実験が計画されており、大きな成果を期待されているプロジェクトの一つである。これまでの実験装置及び実験供試体開発で得られた経験や知見を現在、開発中の高品質蛋白質結晶生成用セルユニット II 型 (HDPCC II 型) 開発 (セルユニット組立に関する利便性の向上) や今後の実験装置、実験供試体開発に活かし、引き続き、宇宙実験の成功に向けて研究開発を進めて行く所存である。

## 謝辞

蛋白質結晶生成装置 (PCRF) 及び高品質蛋白質結晶生成実験用セルユニット (HDPCC) の開発に当たり多くのご指導とご協力をいただいた、独立行政法人宇宙航空研究開発機構 (JAXA) 及び関連メーカの関係各位に対し、深く感謝の意を表します。

## 参考文献

- 1) S. Takahashi, B. Yan, N. Furubayashi, M. Masaki, K. Ohta, K. Inaka, H. Tanaka, T. Kobayashi, Y. Yoshimura: Jpn. Soc. Microgravity Appl., **29** (2012) 111-119.
- 2) N. Furubayashi, H. Tanaka, K. Ohta, K. Inaka: Jpn. Soc. Microgravity Appl., **29** (2012) 120-124.
- 3) G. Sasaki, K. Nakajima: The structural biology, **8** (2003).
- 4) M. Sato: Jpn. Soc. Microgravity Appl., **25** (2008) 117-122.
- 5) タンパク質結晶生成実験の現状と展開～第 1 回実験の実施結果/第 2 回実験の実施状況～, 第 12 回きぼう利用勉強会資料 (2010).
- 6) 「きぼう」を利用したタンパク質結晶生成実験の実施状況, 第 8 回宇宙開発委員会資料 (2010).
- 7) S. Sano, H. Tanaka, S. Takahashi, K. Inaka, S. Shinozaki, M. Sato, T. Kobayashi, T. Tanaka: Jpn. Soc. Microgravity Appl., **25** (2008) 157-160.
- 8) H. Tanaka, S. Takahashi, N. Furubayashi, M. Yamanaka, B. Yan, E. Hirota, S. Sano, M. Sato, K. Inaka, T. Kobayashi, T. Tanaka: Jpn. Soc. Microgravity Appl., **27** (2010) 104-112.

(2013 年 9 月 4 日受理, 2013 年 10 月 2 日採録)