

IIII 宇宙における高品質タンパク質結晶化技術の伝承と可能性 IIIII
(解説)

宇宙環境を利用したタンパク質結晶化実験の技術的背景

高橋 幸子・田仲 広明

Background of Protein Crystallization Technologies in Space

Sachiko TAKAHASHI and Hiroaki TANAKA

Abstract

High-quality crystals are expected to grow in microgravity environment. A protein depletion zone (*PDZ*) and an impurity depletion zone (*IDZ*) around a growing crystal are formed in microgravity environment because of the suppressions of convection flow. These depletion zones decrease concentrations of protein and impurities on the surface of the crystal, resulting in high quality crystal growth. Previously, we developed an easy method to estimate the effects of *PDZ* and *IDZ* in a steady state by using the combination of the diffusion coefficient and the kinetic constant of the protein molecule and the radius of the crystal, and have successfully applied it to increase microgravity effects on growing high-quality crystals. From this method, we learned that high-quality crystals could grow in microgravity if the crystals were larger, the protein sample was highly purified, and the crystallization solution was viscous. Recently, we introduced a numerical analysis of these depletion zones in a non-steady state and suggested that all the sections of the crystal are surrounded by different supersaturation levels of protein and different concentrations of impurity. Especially for the crystals grown on the ground, the concentration of impurity was higher in the center of the crystals. Our recent experimental results suggested that the cell dimensions of ground-grown crystals of lysozyme with some impurity were not uniform in a crystal. We speculated that it was because the disorder in the center of the crystal grown on the ground affected to the crystal lattice of the outer layer of the crystal. In this review, technical background of protein crystallization in space is reviewed.

Keyword(s): Protein crystallization, Microgravity, Protein depletion zone, Impurity depletion zone, Density-driven Convection, Large crystal

Received 10 January 2017, Accepted 12 January 2017, Published 31 January 2017

1. はじめに

宇宙環境を利用した回折実験向けタンパク質結晶生成実験は、1980年代初頭の Littke¹⁾らの先駆的な実験で、リゾチーム等の結晶の大型化や品質向上が認められたことから、1990年代には NASA (米国航空宇宙局) が中心となり多数の実験が行われてきた²⁻⁴⁾。しかし、その構造生物学への貢献は当初期待したほどではなかったことや^{5,6)}、スペースシャトル・コロンビア号 (STS-107) の不運な事故により、米国では約 10 年間中断することとなった。

一方、ESA (欧州宇宙機構) を中心とするグループでは、微小重力環境でのタンパク質結晶の成長に関わるメカニズムを探る実験が、主にスペースシャトルを用いて 1990 年代に行われ、(1)蒸気拡散法ではマランゴニ対流の影響により結晶の移動が起こり、成長中の結晶周辺の拡散場が乱

されて宇宙実験の効果は期待できないこと⁷⁾、(2)成長中の結晶周辺にはタンパク質欠乏層が形成されること⁸⁾、等がその場観察で明らかになった。また、結晶への不純物の取り込みが抑制されることも明らかにされている^{9,10)}。この結果に基づき、2001 年のアンドロメダミッション以降、マランゴニ対流の影響を受けにくいカウンターディフュージョン (CD) 法¹¹⁻¹⁴⁾を用いた結晶化装置が利用されるようになった。また、ソユーズ帰還時の温度変動の問題や、国際宇宙ステーション (ISS) の残留重力の影響 (その場観察で結晶の移動を観察) を排除するため、フォトンを利用した実験系での結晶化も実施されている¹⁵⁾。

JAXA (宇宙航空研究開発機構 (旧 NASDA)) では、1992 年の FMPT (First Material Processing Test) (STS-47) や、1997 年の STS-84 等で宇宙実験の経験を積んできた。また 1994 年以降のフロンティア共同研究や、その後の応

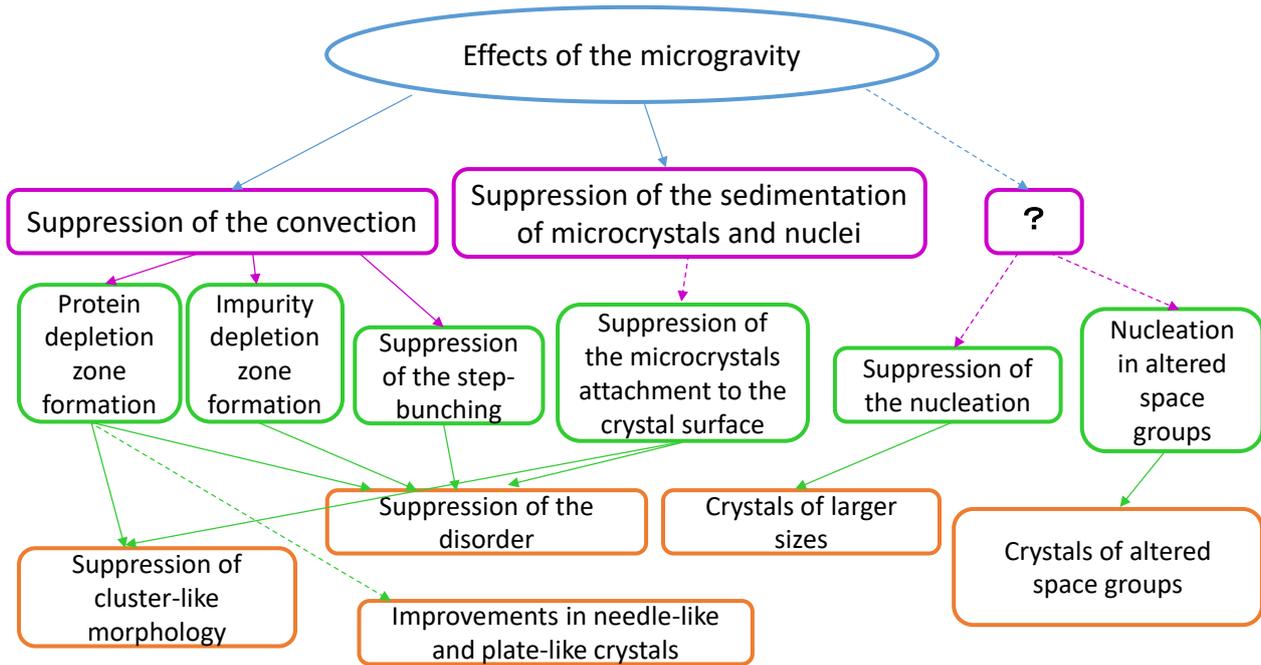


Fig. 1 Effects of the microgravity on crystal growth.

用的な利用をめざした 1999 年からの先導的応用化研究を推進し、宇宙での構造解析向けタンパク質結晶化実験に関わる研究分野の育成を図ってきた。STS-84 の経験を踏まえ、試料調製や結晶化条件を事前に最適化し、より再現性の高い結晶化を実現することで宇宙実験の有用性を高めることを期待し、技術的な支援体制を構築することとした。

一方、応用利用では定常的な打上げ機会の確保が重要であるが、STS-107 の度重なる打ち上げ延期から、より安定な実験機会の確保が必要であることが認識された。ESA では、2001 年のアンドロメダミッション以降 GCB (Granada Crystallization Box)¹⁴⁾/GCF (Granada Crystallization Facility) を利用し、ロシアの打ち上げ機会を利用して、低コストで定期的な宇宙実験を開始していた。そこで NASDA (JAXA) でも、2002 年より同様の方式で定期的な実験機会を提供することを開始した (NASDA-GCF)。この際、単にタンパク質試料調製や結晶化条件の最適化だけでなく、前述のような微小重力環境での結晶成長メカニズムに関する研究の知見を踏まえ、微小重力環境での実験条件を最適化して有用率を高めることに留意した¹⁶⁾。NASDA/JAXA による宇宙実験機会の提供は、その後、さまざまな技術的、ならびに運用面での改良を重ねながら現在に至っている。JAXA は 2016 年 12 月現在までに、ロシアの輸送手段 (プログレスもしくはソユーズ) を利用した通算 20 回と、米国の輸送手段 (SpaceX 社) を用いた 1 回の宇宙実験の機会を提供している。

本稿では、微小重力効果を生かした宇宙実験の技術的背景について説明し、さらに最近期待される宇宙実験での中性子線回折実験向け大型結晶の生成に関わる技術について述べる。

2. 微小重力効果のメカニズム

2.1 高品質タンパク質結晶生成と宇宙実験の効果

タンパク質の X 線や中性子線回折による結晶構造解析技術において、良好な回折データを与えるには高品質なタンパク質結晶の生成がボトルネックの 1 つとなっている¹⁷⁾。一般に、結晶化の際には、タンパク質試料の濃度、結晶化試薬の成分や濃度の最適化、結晶化温度や結晶化方法が検討される。しかし、クラスターとなって良好な単結晶にならない、結晶中の分子の配向の乱れ (ディスオーダー) が過大で高分解能の反射が得られない等の問題がしばしば起こる。

一方、宇宙実験におけるタンパク質の結晶化では、これらの問題が改善されることがある。すなわち、微小重力の効果により、密度差対流が抑制され、溶液中に生成した微小な結晶の降着が抑制されることにより²⁾、結果として、結晶のクラスター化やディスオーダーが抑制される、また理由は分からないものの、核形成が抑制されたり、結晶が大型化したり、場合によっては空間群の異なる結晶が生成する (Fig. 1)。

成長中の結晶周辺の溶液中では、タンパク質分子が結晶表面に取り込まれて溶液の密度が低下するが、重力のある環境ではこの密度の低下により流れが発生する。結果として溶液中では結晶から遠く離れたところから、この流れによってタンパク質分子が継続的に輸送されてくる。また、溶液中の不純物や、運ばれてきた微小な結晶も、結晶の表面に取り込まれる。一方、微小重力環境では、タンパク質分子、不純物、あるいは微小な結晶などは熱運動でのみ結晶表面に接近する。結果として、重力がある環境に比べ、それらの結晶表面での濃度は低下する。実際、Otálora⁸⁾らは1998年のスペースシャトルを用いた宇宙実験(STS-95)において、成長中のリゾチーム結晶の周辺で、タンパク質欠乏層(PDZ: Protein Depletion Zone)が形成されることを光干渉法により観察した。PDZの形成により、成長中の結晶表面のタンパク質濃度が低下すると、過飽和度が下がることにより成長速度が遅くなり、結晶に取り込まれた分子のディスオーダーは減少すると考えられている。Thomas⁹⁾らは、同じく1998年のスペースシャトルを用いた宇宙実験(STS-95)において、微小重力環境で成長したリゾチーム結晶では不純物の取り込みが大幅に抑制されることを明らかにした。結晶周辺に不純物欠乏層(IDZ: Impurity Depletion Zone)が形成されることによるものと考えられているが、結晶に取り込まれる不純物が減少すれば結晶のディスオーダーも減少すると考えられている。同様の理由により、微小な結晶の付着が減少すれば、ディスオーダーの低減だけでなく、クラスター化の抑制も期待できるかもしれない。

一方、Vekilov¹⁸⁾らは、密度差対流と結晶への分子の取り込み過程との相互作用により、結晶成長速度に揺らぎが生じることを見出している。結果としてステップバンチングによるディスオーダーを引き起こすことが考えられるが、密度差対流の抑制はこの問題も解決することができる。ちなみに、地上の実験室においても、過飽和度を低く抑えたり、逆に結晶表面に積極的に流れを与えてステップバンチングを抑制することにより、ディスオーダーの少ない結晶を成長させる方法や装置が考案されている¹⁹⁾。

2.2 タンパク質結晶成長に伴う密度差対流

密度差対流の発生の有無については、Grashof Number (Gr_N)を用いて評価できる。これは、浮力(buoyancy force)と粘性力(viscous drag force)の比である。この指標が1以上で浮力優位となり、密度差対流が発生すると評価される²⁰⁾。

$$Gr_N = \frac{\text{buoyancy forces}}{\text{viscous drag forces}} = L^3 \alpha \Delta c g \nu^{-2}$$

ここで、 L は特性長、 Δc は濃度差、 α は溶液の膨張率、

ν は動粘度である。実際のリゾチームの結晶化条件で、NaClを主たる結晶化試薬とするケースをあてはめて見ると、 $Gr_N=1$ となるのは概ね $L=0.2$ mmである。また、30% PEG 4000を主たる結晶化試薬とするケースでは、概ね $L=1.2$ mm程度となる。すなわち、この特性長よりも溶液の厚みが薄くなれば、密度の低い領域が結晶表面近くの溶液中に生じて、密度差対流は生じないと考えられる。

実際のX線回折実験向け結晶の場合、数 μm の微結晶でもデータ取得が可能なシステムも開発されているが、一般には、数十 μm 以上の大きさの結晶が望ましい。このような大きさの成長を期待する場合、生成する結晶の大きさは、容器の大きさの制約を受けるため、最低でも0.3 mm角程度のスケールの容器が必要である。このため、塩類等粘性が低い結晶化試薬を用いると、必然的に密度差対流は発生する。またバッチ法以外の結晶化方法では、結晶化試薬の濃度上昇に由来する密度差が必然的に容器内で発生する。例えば、CD法のキャピラリー中での結晶化試薬の密度差対流は、キャピラリーを縦にして、結晶化試薬をキャピラリー下部から拡散させれば結晶化試薬による密度差は抑制できるが、特性長は過大となる。一方、キャピラリーを横にすると、特性長を抑えることができるが、キャピラリー一端から拡散させた結晶化試薬は、キャピラリー底面を這うように流れ、良好な結晶化条件を実現することは容易でない。

アガロースを用いて結晶化溶液をゲル化することにより、密度差対流を抑制する試みも行われている。García-Ruiz²⁰⁾らは、このようにして得た地上実験での結晶と、宇宙実験での生成結晶との間には品質に差がないことを報告している。しかし筆者らの経験では、ゲル化した溶液内での結晶化では、核形成の確率が非常に高くなること、後述する結晶成長のカイネティック定数(β)が大きく低下すること、ゲルの繊維が結晶内に入る等²¹⁾、極限の高品質な結晶の生成を目指すには好ましくない問題もあり、現在のところ微小重力環境に代わるものとは言い難い。

2.3 濃度欠乏層の見積もり

Otálora⁸⁾らによるPDZの観察や、Thomas⁹⁾らによる不純物の取り込み抑制の検討は、モデルタンパク質を用いた実験系で行っている。一般的に、構造解析向けのタンパク質結晶化実験を普遍的にできるかどうかは、検討を要する問題である。以下では、数値モデルを用いた検討例を説明する。

成長中の結晶周辺に形成される拡散場については、結晶を球と仮定し、結晶からのタンパク質分子や不純物分子の乖離を無視した単純化モデルを用いることで、数値的に解析可能である。PDZの形成による効果はDFR (Driving Force

Ratio), *IDZ* の形成による不純物取り込み抑制の効果は *IR* (Impurity Ratio) として, 以下のように推測できる²²⁻²⁴⁾.

$$DFR = \frac{DFR_{0G}}{DFR_{1G}} = \frac{1}{1 + \frac{R \cdot \beta}{D}} \quad (1)$$

$$IR = \frac{IUR_{0G}}{IUR_{1G}} = \frac{1 + \frac{R \cdot \beta}{D}}{1 + A \cdot \frac{R \cdot \beta}{D}} \quad (2)$$

$$\text{ただし, } A = \frac{\beta_i \cdot D}{\beta \cdot D_i}$$

ここで, $C(\infty)$, $C(R)$, C_{el} は, 結晶から離れた位置, 結晶表面, および飽和溶液中でのタンパク質濃度. $C_i(\infty)$, $C_i(R)$ は結晶から離れた位置, および結晶表面での不純物濃度. β , β_i はタンパク質分子および不純物分子の結晶成長のキネティック定数. D , D_i はタンパク質分子および不純物分子の拡散定数. R は結晶半径. IUR は Impurity Uptake Ratio を表す.

(1) および (2) 式を, RB/D 値を横軸にしてグラフに表すと, 濃度欠乏層形成の効果は RB/D 値が大きくなるほど大きくなることからわかる. 詳細は文献²³⁾を参照いただきたい. かつて説明すると, R が大きくなるほど, また β が大きいほど, あるいは D が小さいほど, 効果が期待できる. したがって, 溶液中で拡散が遅く結晶成長が速いタンパク質であり, かつ結晶が大きく成長する場合, 宇宙実験の効果はより期待できることになる.

筆者らは, D を大まかに推定する近似式²⁵⁾, ならびに B を大まかに推定する実験方法を考案し^{24,26)}, D と β を簡便に見積もることができるようにした. JAXA での宇宙実験の結果をこの指標を用いて評価したところ, DB/β が 3 (mm) 以下で, 75% 以上の試料においてクラスター化の改善や回折分解能の向上といった微小重力の効果が見られた. 生成した結晶の大きさの平均値, D , β の値から RB/D を計算すると 0.035 以上である. これより, X 線回折実験に用いられる大きさの結晶では, 主に *IDZ* の効果 (不純物取込抑制) が優位と考えられる. 一方, 中性子線回折実験向けの結晶のように R が大きい (1 mm 程度以上) 場合には, *PDZ* と *IDZ* 両方の効果が期待できる.

2.4 宇宙実験効果の促進策

このような結晶周辺の濃度欠乏層の見積もりから, 積極的に宇宙実験効果を促進するためには, D を小さくし, β を大きくすればよいことがわかる. D は溶液の粘性に依存するため, PEG 等の高粘度の試薬の利用が考えられる.

PEG を含む結晶化条件に関しては, 筆者らは溶液中の塩濃度を最適化することで, より様々なタンパク質試料に適用できることを見いだしている²⁷⁾. 一方, β はタンパク質試料を精製し, 均一性を高めることで大きくなる. 例えば, リゾチームをイオン交換クロマトで精製し均一性を高めると, β が数倍大きくなる²⁶⁾. これらの結果から, 事前に D と β の値を把握することで宇宙実験の効果が期待できるかどうかを事前に判断できる. また, これらの促進策により, 宇宙実験試料の適性や結晶化条件を改善することで, 宇宙実験の有用性を高めることは可能である^{28,29)}.

2.5 過渡的な結晶成長過程の解析

実際のタンパク質結晶生成実験における結晶周辺の溶液濃度は, 結晶の成長にしたがって減少する過渡的な過程である. すなわち, 核が形成され結晶成長が開始した時には, 表面過飽和度は高いが, 結晶成長が終わる頃には, 溶液中のタンパク質濃度は溶解度の濃度まで低下する. 結果として得られた結晶は, 中心から表面に向かって, すべて異なる過飽和度の下で成長することになる. また, 不純物の取り込み量も結晶内の場所によって異なる.

筆者らは, 実際の結晶生成実験により近い結晶成長過程を理解するための数値計算モデルを考案した³⁰⁾. 簡易的に, 結晶は, ある仮想的な球体のタンパク質試料溶液中で 1 個析出するものとし, 結晶中ならびに溶液中のタンパク質量の総和は一定であるとした. また, 重力がある地上環境を想定する場合には, 結晶周辺の球体内の溶液領域のタンパク質濃度は, 対流によって均一になっているとみなして, 微分方程式を記述した. 一方, 微小重力環境においては, 結晶周辺の球体内の溶液領域にタンパク質および不純物濃度の拡散場が形成されるものとし, 仮想的な球体内の拡散過程と, 球の中心での結晶成長過程を, とともに記述する偏微分方程式を記述した. 詳細は文献³⁰⁾を参照いただきたい. このモデルに実際のリゾチームの結晶化過程の諸定数を当てはめると, 微小重力環境で生成した結晶では, 中心に近い部分では不純物濃度が低く, 結晶半径が 0.25 mm を過ぎたあたりからは, 逆に地上で生成する結晶よりも高くなっていった. 結晶成長が速く, *IDZ* がより形成される結晶成長の初期過程では, 微小重力環境で成長した結晶は地上環境で成長した結晶と比べて, 不純物の取り込みが抑制されるが, 結晶成長が終わりに近づくと結晶成長が遅くなって *IDZ* の効果が弱まるほか, 溶液中に取り込まれなかった不純物の量が増え, 地上で生成した結晶より逆に不純物量が多くなる. なお, このシミュレーションでは, β を一定の値としているが, 前述のように β は不純物濃度の低下に従い増大する. 実際, 塚本らの NanoStep プロジェク

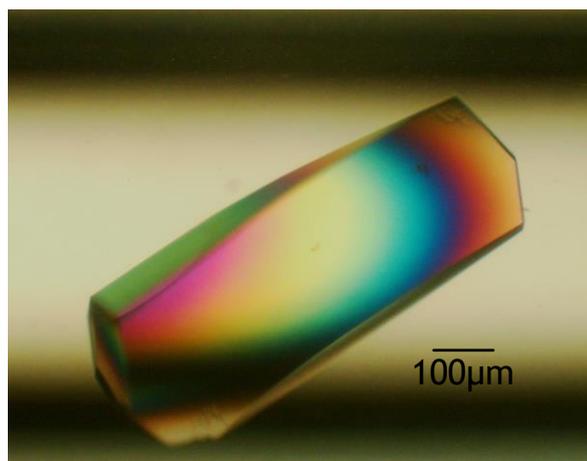


Fig. 2 A large Lysozyme crystal grown by capillary-dialysis method.

トのその場観察の結果からすると¹⁵⁾, *IDZ*が形成される微小重力環境では、不純物濃度の低下に伴い、結晶成長速度が地上環境よりも速くなり、*B*が大きくなることが示されている。したがって、*PDZ*ならびに *IDZ*の効果は、より促進されると思われる。

この結果からすると、結晶内の位置の違いにより、結晶の X 線回折像の質に違いがあることが示唆される。そこで筆者らは、不純物を若干含むリゾチーム試料から結晶を生成し、グリッドスキャンで結晶の局所に X 線を照射して、結晶の局所の反射状況を調べた。予備的な実験結果ではあるが、地上実験で得られた結晶からは、中心から外側に行くにつれ、結晶格子の *a*, *b* 軸が少し大きくなっていくことが観察された。一方、宇宙実験で得た結晶ではそのような現象は認められなかった。おそらく、地上で生成した結晶は、結晶の中心部周辺の不純物取り込み量が多く、この不純物が結晶の外側に向かって結晶の格子に対してより大きな影響を与えるためではないかと思われる³¹⁾。

2.6 大型結晶の作製

最後に、近年需要が高まっている中性子線回折実験向けの大型結晶の作製について触れたい。

中性子線回折実験は、反応機構の解明には不可欠な水素原子の座標を確実に把握できるなどの利点があり、構造生物学においては、重要な測定手段である。しかし、この実験には、今のところ、1 mm³以上の結晶が必要とされている。一般的な X 線回折実験向けの結晶と比較して 1 辺が 10 倍以上となるため、そのような大型結晶の作製がボトルネックの一つになっている。一方、前述したように、宇宙実験の効果は *RB/D* が大きい程期待できるので、宇宙実験の対象としては好適である³²⁾。

大型の結晶を得るには、単位容積当りに生成する結晶の数が少ない条件を見出し、かつ適切な結晶化条件の制御により、その結晶を成長させる必要がある。中村らは相図を用いて適切な結晶化条件を把握し、最適な結晶化条件下で大型結晶を得ることに成功している³³⁾。また CD 法を用いた JAXA PCG 宇宙実験にも搭載している³⁴⁾。新村らは、一旦生成した結晶を可逆的に溶解できる装置を考案し、結晶の数を減らすことで大型結晶を得ることに成功している³⁵⁾。

筆者らも、ゲルチューブ法³⁶⁾と透析膜を組み合わせたキャピラリー・透析法と、主たる結晶化試薬(PEG)濃度ならびにカウンターイオン(NaCl)濃度を変化させた3次元の相図を用いた結晶化条件の最適化により、長辺が 1 mm 程度のリゾチーム結晶の作製に成功している (**Fig. 2**)。詳細は今後発表予定である。

一方、Ng らは、CD 法を用いて 6 か月にわたり微小重力環境で結晶化を行い、内径 2 mm のキャピラリー内で、2 mm 角の結晶作製を報告している³⁷⁾。この実験では、Ostwald ripening, すなわち大きな結晶ほど溶解度が低く、結果として小さな結晶が溶解して大きな結晶に吸収されると考えられる現象が起きていた。構造解析向けの大型結晶の生成にこの現象がどの程度応用できるのか、またそのための最適な条件など、これからの検討が必要である。

大型結晶を目指した宇宙実験の試みは始まったばかりであるが、多くの研究者の助けになれば幸いである。

謝辞

本報告で紹介した国内研究者の微小重力環境での結晶化実験は主に、JAXA 高品質蛋白質結晶生成実験 (JAXA PCG) で行われたものです。本報告で紹介した成果の一部は JAXA PCG の技術開発成果、ならびに、ISS 応用利用研究拠点制度 (大阪大学中川敦史教授、兵庫県立大学樋口芳樹教授、横浜市立大学朴三用教授) によるものです。本報告で紹介した X 線回折実験データは、SPring-8 BL41XU (課題番号 2013A1563) および BL44XU (課題番号 2013A6803) で取得しています。X 線回折実験は、(株)丸和栄養食品伊中浩治博士、ならびに古林直樹研究員によるものです。

参考文献

- 1) W. Littke and C. John: *J. Cryst. Growth*, **76** (1986) 663.
- 2) A. McPherson: *Crystallization of Biological Macromolecules*, (1999) ch. 10, p. 435, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 3) E.H. Snell and J.R. Helliwell: *Rep. Prog. Phys.*, **68** (2005) 799.
- 4) A. Vergara, B. Lorber, C. Sauter, R. Giegé and A. Zagari:

- Biophys. Chem., **118** (2005) 102.
- 5) A. Lawler: Science, **287** (2000) 1728.
 - 6) <http://www.nap.edu/books/0309069750/html>
 - 7) N. E. Chayen and J. R. Helliwell: Nature, **398** (1999) 20.
 - 8) F. Otálora, M. L. Novella, J. A. Gavira, B. R. Thomas and J. M. García-Ruiz: Acta Cryst., **D57** (2001) 412.
 - 9) B.R. Thomas, A.A. Chernov, P.G. Vekilov and D.C. Carter: J. Cryst. Growth, **211** (2000) 149.
 - 10) A.A. Chernov, J.M. García-Ruiz and B.R. Thomas: J. Cryst. Growth, **232** (2001) 184.
 - 11) J.M. García-Ruiz and A. Moreno: Acta Cryst., **D50** (1994) 484.
 - 12) J.M. García-Ruiz: Methods Enzymol., **368** (2003) 130.
 - 13) F. Otálora, J.A. Gavira, J.D. Ng and J.M. García-Ruiz: Prog. Biophys. Mol. Biol., **101** (2009) 26.
 - 14) J.M. García-Ruiz, L.A. Gonzalez-Ramirez, J.A. Gavira and F. Otálora: Acta Cryst., **D58** (2002) 1638.
 - 15) K. Tsukamoto: J. Jpn. Soc. Microgravity Appl., **29(3)** (2012) 106.
 - 16) S. Takahashi, K. Ohta, N. Furubayashi, B. Yan, M. Koga, Y. Wada, M. Yamada, K. Inaka, H. Tanaka, H. Miyoshi, T. Kobayashi and S. Kamigaichi: J. Synchrotron Rad., **20** (2013) 968.
 - 17) N.E. Chayen and E. Saridakis: Nature Methods, **5(2)** (2008) 147.
 - 18) P. G. Vekilov, B. R. Thomas and F. Rosenberger: J. Phys. Chem. B, **102** (1998) 5208.
 - 19) H. Adachi, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, Y. Mori and T. Sasaki: J Synchrotron Rad., **11(1)** (2004) 121.
 - 20) J.M. García-Ruiz, M.L. Novella, R. Moreno and J. A. Gavira: J. Cryst. Growth, **232** (2001) 165.
 - 21) J.A. Gavira and J.M. García-Ruiz: Acta Cryst., **D58** (2002) 1653.
 - 22) A.A. Chernov: Acta Cryst., **A54** (1998) 859.
 - 23) K. Inaka, H. Tanaka, S. Takahashi, S. Sano, M. Sato, M. Shirakawa and Y. Yoshimura: Defect and Diffusion Forum, **323-325** (2012) 565-569.
 - 24) H. Tanaka, K. Inaka, S. Sugiyama, S. Takahashi, S. Sano, M. Sato and S. Yoshitomi: Ann. N. Y. Acad. Sci., **1027** (2004) 10.
 - 25) H. Tanaka, I. Yoshizaki, S. Takahashi, M. Yamanaka, S. Fukuyama, M. Sato, S. Sano, M. Motohara, T. Kobayashi, S. Yoshitomi and T. Tanaka: Microgravity sci. technol., **XVIII-3/4** (2006) 91.
 - 26) H. Tanaka, K. Inaka, N. Furubayashi, M. Yamanaka, S. Takahashi, S. Sano, M. Sato, M. Shirakawa and Y. Yoshimura: Defect and Diffusion Forum, **323-325** (2012) 549-554.
 - 27) M. Yamanaka, K. Inaka, N. Furubayashi, M. Matsushima, S. Takahashi, H. Tanaka, S. Sano, M. Sato, T. Kobayashi and T. Tanaka: J. Synchrotron Rad., **18** (2011) 84.
 - 28) H. Tanaka, T. Tsurumura, K. Aritake, N. Furubayashi, S. Takahashi, M. Yamanaka, E. Hirota, S. Sano, M. Sato, T. Kobayashi, T. Tanaka, K. Inaka and Y. Urade: J. Synchrotron Rad., **18** (2011) 88.
 - 29) K. Inaka, S. Takahashi, K. Aritake, T. Tsurumura, N. Furubayashi, B. Yan, E. Hirota, S. Sano, M. Sato, T. Kobayashi, Y. Yoshimura, H. Tanaka and Y. Urade: Cryst. Growth Des., **11** (2011) 2107.
 - 30) H. Tanaka, S. Sasaki, S. Takahashi, K. Inaka, Y. Wada, M. Yamada, K. Ohta, H. Miyoshi, T. Kobayashi and S. Kamigaichi: J. Synchrotron Rad., **20** (2013) 1003.
 - 31) S. Takahashi, A. Nakagawa, N. Furubayashi, K. Inaka, K. Ohta and H. Tanaka: JJACG, **43(2)** (2016) 110.
 - 32) Advanced Protein Crystallization Facility (APCF): ESF Review of the ESA Microgravity Programme APCF (2001)
 - 33) A. Nakamura, T. Ishida, S. Fushinobu, K. Kusaka, I. Tanaka, K. Inaka, Y. Higuchi, M. Masaki, K. Ohta, S. Kaneko, N. Niimura, K. Igarashi and M. Samejima: J. Synchrotron Rad., **20** (2013) 859.
 - 34) M. Tachioka, A. Nakamura, T. Ishida, S. Takahashi, B. Yan, H. Tanaka, N. Furubayashi, K. Inaka, K. Igarashi, M. Samejima: Int. J. Microgravity Sci. Appl., **34(1)** (2017).
 - 35) N. Niimura: Chemistry Today, **393** (2004) 26.
 - 36) H. Tanaka, K. Inaka, S. Sugiyama, S. Takahashi, S. Sano, M. Sato and S. Yoshitomi: J. Synchrotron Rad., **11** (2004) 45.
 - 37) J.D. Ng, J.K. Baird, L. Coates, J.M. García-Ruiz, T.A. Hodge and S. Huang: Acta Cryst., **F71** (2015) 358.