

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)

構造解析向けタンパク質結晶化宇宙実験に必要な実験技術

伊中 浩治¹・高橋 幸子²・田仲 広明²

Essential Techniques for Growing High-quality Protein Crystals for Structural Analysis in Microgravity

Koji INAKA¹, Sachiko TAKAHASHI² and Hiroaki TANAKA²,

Abstract

For successful protein crystallization in microgravity environment, the following four points are essential: high-quality protein samples and well-optimized crystallization conditions with high reproducibility, crystallization conditions which are optimized for counter-diffusion method, and crystallization conditions which enhance microgravity effects. To meet these points, we have a strategy that we first evaluate the protein samples and crystallization conditions by charge-density calculation, SDS-PAGE, Native-PAGE, high-performance ion-exchange column chromatography, DLS and preliminary crystallization experiment by vapor-diffusion method. Then according to the results of these evaluation, we make a trial of improvement of the protein samples and crystallization conditions. If the results of the evaluation are consistent with the charge density, good protein crystals grow in most cases. For the crystals grown in JAXA PCG (protein crystal growth) space experiment, harvesting and cryocooling of the crystals from capillaries require some skills. In this review, we introduce these techniques for users who have already participated or will participate in JAXA PCG.

Keyword(s): JAXA PCG, Protein crystal, High quality, Counter diffusion, Evaluation test

Received 11 January 2017, Accepted 17 January 2017, Published 31 January 2017

1. はじめに

宇宙実験を利用した構造解析向けタンパク質の結晶化実験は、Littke らのスペースラブを利用した最初の実験¹⁾以降、米国を中心に 1990 年代には盛んに行われてきた。実際、打ち上げられたスペースシャトルのほぼ半数には、米国のタンパク質結晶化装置が搭載されていた。しかしながら、それまでの宇宙実験の成果が期待していたほどではなく、構造生物学への寄与が限定的といった評価や^{2,3)}、スペースシャトルの事故の影響もあって、2000 年頃から米国では暫くタンパク質結晶化実験を中断するに至った。

我が国では、1992 年の STS-47 (FMPT; First Material Processing Test) での森田らによる先駆的な結晶化実験⁴⁾や、1997 年の STS-84 を利用した実験機会⁵⁾などでの経験を踏まえ、NASDA (JAXA) が中心となって 1990 年代後半より応用利用の観点で役に立つ実験機会の構築を目指

すに至った。基本的な考え方としては、(1) 微小重力環境をより生かす結晶成長メカニズムの検討、(2) 低コストで信頼性が高く、運用しやすい実験装置開発、(3) 利用者が使いやすい実験機会の提供、(4) 条件検討から回折実験までの地上実験部分を含めた一貫した実験の技術支援の確立、等により、さらに宇宙実験の有用性が高まり、構造解析結果を利用した医薬品の分子設計や、構造生物学に実質的に寄与することを目指した⁶⁾。

我々はこの JAXA の宇宙実験機会の構築に、初期の段階から参画し、我々が独自に開発、蓄積した技術と JAXA での技術開発を融合、発展させることにより、現在の実験機会の提供に至っている。ロシアのロケット打上げ機会を利用した、JAXA の高品質タンパク質結晶化実験 (以下、JAXA PCG と総称する) は、当初グラナダ大学の García-Ruiz らが開発した Granada Crystallization Box (GCB)^{7,8)} を結晶化容器に用いて 2003 年から始まった。その後、逐次結

1 株式会社 丸和栄養食品 〒639-1123 奈良県大和郡山市筒井町 170-1

Maruwa Foods and Biosciences Inc., 170-1, Tsutsui-cho, Yamatokoriyama, Nara 639-1123, Japan.

2 株式会社 コンフォーカルサイエンス 〒101-0023 東京都千代田区岩本町 2-12-2 第 2 早川ビル 7 階

Confocal Science Inc., Hayakawa 2nd Bldg. 7F, 2-12-2, Iwamoto-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0032, Japan.

(E-mail: tanakah@confsci.co.jp)

晶化容器やその他の改良を積み重ね、2016年10月までに21回の実験実績がある。この間、様々な技術的改良と蓄積がなされてきたが、本稿では特に、上記の(4)に関わる技術を紹介する。

2. 宇宙実験を成功させるポイント

これまでの経験から、我々は現在、宇宙実験で回折実験に向けた良好な結晶を生成し、有用な回折データセットを取得するためには、以下の4点が重要であろうと考えている。

2.1 再現性の良いタンパク質試料と結晶化条件

JAXA PCG では、利用者が自らの研究開発の中で確実に実施できるよう、年1~2回のスケジュールで宇宙実験機会を提供しているが、通常の研究室での実験に比べれば、はるかに少ない機会である。このため、この少ない実験機会を生かすには、あらかじめ結晶生成の確実性が高くなるよう、試料の調製、ならびに結晶化条件の最適化を行っておく必要がある。

タンパク質試料によっては、溶液中での保存で変性や酸化が進むなど、経時的な安定性の保持が不十分であったり、調製ロットごとに結晶化の再現性に問題があるものも少なからずあるため、これらのマイナス要因を事前に改善しておくことが望ましい。またタンパク質分子の物理的・化学的均一性が高くない試料もしばしば見受けられるが、経験的には試料の均一性が高いほど、宇宙実験での結晶化の再現性の向上やクラスター化の抑制が見られ、良好な回折データの取得につながるケースが多い。このため、試料の均一性を事前に高めておくことが望ましい。我々は、後述するようにこの試料の評価について、標準的なプロトコルを考案し、JAXA PCG に提案いただいている多くの試料に適用している。

一方、試料によっては、均一性や安定性に問題がないが、結晶化条件の最適化が不十分なために再現性が低かったり、回折分解能が高くないといった場合も時々見受けられる。事前に、より適した結晶化条件に絞り込まれていることが望ましい。

2.2 宇宙実験容器との適合性：CD法への最適化

JAXA PCG では、一部の例外を除き、標準的にはカウンターディフュージョン(CD)法を利用した結晶化実験機会を提供している⁹⁾。通常の研究室でのタンパク質結晶化実験では蒸気拡散(VD)法が利用されているが、VD法とCD法の結晶化条件には以下のような違いがあることから、CD法向けの結晶化条件の最適化が必要な場合が多い。

1つ目の違いは、結晶化条件が両者ではかなり異なるということである¹⁰⁾。VD法では通常、タンパク質試料とリ

ザーバ溶液を混合して結晶化実験をセットアップし、リザーバ溶液に対して蒸気拡散させる。結果として、タンパク質試料の濃度やリザーバ中の主たる結晶化試薬の濃度が高まるだけでなく、タンパク質試料に元々共存している、塩類やリガンド化合物などの成分も濃縮され、結晶化に好条件となっていることは少なくない。一方CD法では、キャピラリー中にはリザーバ溶液の成分が拡散により入ってくるが、同時に元々のキャピラリー中の溶液成分はキャピラリー外に拡散により漏出する。タンパク質分子は分子量が大きく、拡散が遅いため漏出は少ないが、共存する低分子量の成分は失われる。すなわちタンパク質分子周辺の溶液条件は時間とともに、ほぼリザーバ溶液に置き換わる。結果として結晶化にとって好ましくない状況となり得る。このため、CD法ではこれら塩類やリガンド化合物などが結晶化にとって必須の場合には、予め補っておく必要がある。一般に、タンパク質の結晶化では、主たる結晶化試薬(例えばPEG類、硫酸などの塩類、あるいはMPDといった有機溶媒類)の働きのみに着目される傾向があるので、要注意である。

2つ目の違いは、核形成の確率がCD法ではかなり低いことである。おそらくVD法の場合には、セットアップ時のタンパク質試料とリザーバ溶液の混合という実験操作の際に、高濃度のタンパク質試料溶液とリザーバ溶液が直接接触する場面が必ずあるが、このとき核形成が促進される効果があると思われる。一方、従来のCD法の充填方法では、タンパク質分子はリザーバ溶液の成分と拡散によってのみ遭遇するため、その効果は期待できない。このため、我々はVD法と同じように、タンパク質試料溶液とリザーバ溶液を事前に1:1といった混合比で混合してから充填することを多くの試料で実施し、核形成に関する問題を概ね解決している。なおタンパク質試料や溶液条件によっては、VD法でもシーディングが必須の場合がある。我々はCD法向けのシーディング方法を開発し、このような試料に対応している。

なおCD法での結晶化では、キャピラリー中のタンパク質と結晶化試薬の拡散時間経過の把握が重要である。我々は1次元シミュレーションプログラムを開発し、結晶化過程の把握に利用している⁹⁾。

2.3 微小重力効果の促進

微小重力環境でのタンパク質の結晶化で、クラスター化が抑制されて単結晶が得られやすくなるとか、回折分解能等が改善する、といった結晶の品質が向上する主たる原因は、成長中の結晶周辺にタンパク質欠乏層(PDZ: protein depletion zone)ならびに不純物欠乏層(IDZ: impurity depletion zone)ができるためと考えられている¹¹⁻¹⁴⁾。こ

のため、もしこれら欠乏層の形成を促進できれば、宇宙実験の効果を高めることが可能となる。一方、これら欠乏層の形成は、結晶成長中の溶液の粘度を高めて、タンパク質分子の拡散を抑制し（拡散は拡散定数 D : Diffusion Constant (mm^2/hr)で表される）、あるいはタンパク質試料の均一性を高めて、その結晶の成長に関わるカイネティック定数 β : Kinetic Constant (mm/hr) を高めることで促進される^{15,16)}。我々の経験では、X線回折実験向けの結晶の場合、 D/β の値が3 mm程度以下の場合、宇宙実験の効果は期待できると考えている。

2.4 その他の留意点

宇宙実験で、例えば一見良好な結晶が得られたとしても、最終的に良好な構造解析結果が得られるとは限らない。しばしば以下の様な問題を経験するが、事前に地上実験で得られた結晶を用い、問題を解決しておくことが望ましい。

- 1) JAXA PCG で標準的に利用している CD 法キャピラリーから結晶を取り出す際に、結晶が損傷する。予め、実験手技の習熟と適切なハーベスト溶液の準備が必要である。
- 2) 取り出した結晶を凍結する際に結晶が損傷する。予め、実験手技の習熟と適切な凍結保護溶液の準備が必要である。
- 3) 回折実験の際に、結晶の品質等に見合ったビームラインで回折データを取得できない。予め、然るべきビームライン/ビームタイムを確保する必要がある。
- 4) 結晶化実験の期間が最低でも月単位と長時間に及ぶので、結晶の経時劣化が早く進んでしまう場合は良好な回折データを取得できない。このため結晶の劣化を抑止する方法の検討も必要である。予め、然るべきビームタイムを確保しておき迅速に回折実験を実施する必要がある。
- 5) 結晶の単位格子や空間群の問題で、適切な構造解析に供用できる回折データセットを得られない。予め、回折実験好ましい結晶であるか確認し、場合によっては結晶化条件を見直すことも必要である。

3. 宇宙実験向け結晶化試料・条件の評価

JAXA PCG 宇宙実験は、基本的にテーマ提案者は予め何等かの方法（多くの場合は VD 法）で結晶化が確認できているタンパク質試料を対象にしている。しかし、そもそもテーマ提案者が最適化した結晶化条件での結晶化の成功率が低いといった事例はしばしば経験するところである。その原因としては、タンパク質試料に原因がある場合と、結晶化条件に原因がある場合があり、それらを切り分けて対策する必要がある。以下では、宇宙実験向けタンパク質

試料ならびにその結晶化条件の標準的な評価と考え方を説明する。

3.1 電荷密度の pH 依存性計算

結晶化向けのタンパク質試料の評価では、その物理化学的な性質が、想定される値と実験結果とで整合するかが重要である。そこで最初に、調製されているタンパク質試料のアミノ残組成を基に、分子量、電荷数を推定格子体積で割った電荷密度¹⁷⁾の pH 依存性を計算する。この結果は、以下の評価の際に参照するデータとなる。

3.2 SDS-/Native-PAGE による分析

SDS-PAGE (ポリアクリルアミドゲル電気泳動, Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis) による分析は、結晶化試料として調製されたタンパク質試料溶液の純度検定に最も頻繁に用いられる手法である。目的タンパク質の計算で推定した分子量に相当する位置にバンドがクリアに検出できることを確認する。SDS-PAGE の結果、マイナーバンドが多数見えるとか、メインバンドが 2 重に見える、という結果が確認できた場合は、調製試料に分子量の不均一な成分が存在する事を示しており、良好な試料とは言い難い。この現象の原因は様々だが、目的とするタンパク質以外のタンパク質を不純物として含んでいる場合だけでなく、発現したタンパク質がなんらかの修飾を受けていて、その結果、分子量が不均一になっている場合や、発現・精製過程で目的タンパク質が部分的に分解した場合、などが考えられる。

一般にタンパク質分子は、存在する溶液の pH に応じた電荷を帯びていることが知られている。Native-PAGE による分析を実施すると、この電荷に起因する不規則性を検討することができる。ここでいう Native-PAGE は、SDS-PAGE 分析の際の溶液やゲルから SDS を取り除いた単純な PAGE 分析の事である。分析に供用するタンパク質試料も、SDS 処理や煮沸処理をする前のものをそのまま用いている。経験的には、SDS-PAGE では非常にきれいなシングルバンドを示す試料でも、Native-PAGE では複数のバンドに分離されることがしばしば観察される。

このような現象は、分子量的にはほぼ同一の試料成分であっても、分子全体の電荷を指標とした場合には不均一であることを示している。タンパク質結晶の中では、近接したタンパク質分子同士が静電的な双極子モーメントによる相互作用を有しているため、分子の電荷の不均一性は、そのまま結晶中の分子の並び方の乱れにつながり、結晶の生成の可能性やその品質に重大な影響を及ぼすことは容易に考えられる。

さらに Native-PAGE ではバンドが広がったり、梯子状になったり、あるいはゲルに入らないといったことがしば

しばしば観察される。また、3.1項の計算から見積もられる電荷数と移動度が整合しないこともある。おそらくこれらの現象は、溶液中のタンパク質分子が何らかの予期せぬ会合体を形成しているからと考えられ、経験的には結晶の生成の可能性やその品質に重大な影響がある。

電荷の均一性を確認するもう一つのPAGEとしては、等電点電気泳動あるいは等電点電気泳動とSDS-PAGE等を組み合わせた二次元電気泳動がある。蛋白質分子の等電点により分離したものをさらにSDS-PAGEで展開する手法を用いれば、さらに細かく蛋白質分子の均一性を確認することができる。分子量が同一でも、等電点が少しずつ異なる複数の点にフォーカスするような試料も時々経験するが、結晶生成に問題があるケースが多い。

3.3 高分解能カラムによる電荷分布の均一性確認

Native-PAGEや二次元電気泳動の結果から、電荷の不均一性が確認された場合、高分解能イオン交換カラムを用いて、溶出溶液の塩濃度やpH、さらには樹脂の種類を細かく検討することで電荷均一性を高める分離・分析実験系を組み立てることが可能になる。高品質結晶の取得を目指す場合はぜひ試みてみなくてはならない手法である。イオン交換樹脂は官能基（4級アンモニウム基やカルボキシメチル基）の違いによってさまざまな種類があることを利用して、サンプルの表面電荷の違いを見分け、分離する事が可能になる。PAGE分析では分子全体の電荷の不均一性を確認できるのに対し、カラムを用いた分析では、樹脂に特有の官能基と蛋白質分子の相互作用の違いから、蛋白質分子表面における電荷の均一性を確認できる。なお、前項で述べたNative-PAGEや二次元電気泳動の結果、複数のバンドやスポットが確認できた場合、高分解能クロマトグラフィーで複数のピークを検出できる場合が多い。

イオン交換クロマトグラフィーは多くの場合、試料のカラムへの保持と溶出にはNaClのグラジエントを用いるが、経験的には目的タンパク質がシャープな1本のピークとなつて、かつ計算により求めた電荷密度の値と概ね整合するNaCl濃度の辺りに溶出する試料は、良好な結晶を与えるケースが多い。一方この整合性が大きくはずれている場合には、試料に想定外の問題が起こっている場合が多く、結晶化は困難となりやすい。

3.4 DLSによる粒径分布の均一性確認

もう一つ確認しておくべき特性は、溶液中における蛋白質分子の粒径分布である。溶液中で分子の大きさがどのように分布をしているかを確認するもので、動的光散乱（Dynamic Light Scattering: DLS）の測定を実施すればその確認が可能である。得られた結果から確認すべき点は、

蛋白質の分子量の整数倍のところに、なるべく狭い範囲に分布が収まっているか（Broad Distributionではないか）、モノマー付近のみならず大きな粒径のところに分布がないか（Monomodalか）といった点である。経験的には、粒径の分布幅は20%台の後半以下の試料が良好な結晶を生成するケースが多い。また粒径に関しては、分子量が50 kDa程度（450残基程度）のタンパク質の場合、構造解析結果からすると分子の大きさは最大径で4-5 nm程度である。DLS測定の結果から50 nm以上の粒径成分の存在が確認される場合は、蛋白質分子が水溶液中では不規則な会合状態で存在していることを疑うべきである。経験的にはこのようなサンプルからは良好な結晶を得ることは難しい。

3.5 蒸気拡散法による結晶化の確認

JAXA PCG宇宙実験では、CD法で結晶化条件を最適化する必要がある。しかし、宇宙実験にエントリーされたタンパク質は、ほとんどの場合、汎用されているVD法で結晶化が行われているため、まずはVD法で結晶化の再現性を確認しておく必要がある。

しばしば経験することとして、VD法をセットアップしてすぐに、沈殿を生じて全く結晶を生成しないといった事例が少なくない。あるいは結晶を生成してもクラスター化するとか、全く結晶化溶液に変化が起きないといった事も少なくないが、前項までのタンパク質試料の評価で問題があるケースが多い。タンパク質試料の調製にロットごとのばらつきや、経時変化で劣化が早い、といったことで良好な性状の試料が得られないケースであり、別途対策が必要となる。

一方、試料に問題が無い場合には、結晶化の過程に問題があるケースが考えられる。ここで留意すべき点としては、セットアップ後、沈殿になるのか、あるいは結晶になる場合にはどのくらいの時間経過で結晶が現れるかという点、さらに得られた結晶がどの程度の速さで成長していくかという点である。結晶化条件、特に温度にもよるが、一般的にVD法での結晶化の場合、ドロップ溶液の結晶化試薬濃度の上昇はかなり早く、硫酸などの塩類を用いて20°Cで結晶化を実施している場合、ほぼ7から10日で最終濃度の90%以上まで上昇する。しかしながら、対象のタンパク質試料とその結晶化条件によっては、セットアップ後1か月以上経過したドロップ、すなわち既にしっかりと飽和点に達しているドロップでも何も変化が起きないとか、ある日突然結晶が出ていた、しかも結晶化の確率が50%以下といった事例がある。

このような場合に注目したいのは、結晶化ドロップ溶液中に存在する、タンパク質の電荷を効率的に中和するカウンターイオン（陽イオンではNa⁺、陰イオンではCl⁻）の

量である¹⁸⁾。経験的には、このカウンターイオンの量が電荷密度の計算値より少ないと結晶は出にくくなり、多いと沈殿やオイル状になりやすくなる。しかし、この量を最適化しても結晶生成の確率が高くないこともしばしば経験する。このような場合、結晶化の際の核形成過程に何らかの問題があると考え、シーディング法などの適応を考慮する必要がある。

3.6 試料評価の考え方

以上、宇宙実験に用いるタンパク質試料や結晶化条件をどのように評価するかを述べたが、どの項目が特別に重要というのではなく、多くの場合は総合的な判断が必要となる。すなわち、SDS-PAGE, Native-PAGE (酸性と塩基性条件の 2 種を通常検討する)、二次元電気泳動、高分離能クロマト、DLS の結果を総合的に評価し、電荷密度の計算値との整合性が良い試料は、経験的には宇宙実験で良好な結晶を得られる可能性が高い。

問題がある試料に関しては、改善の方策を検討する必要がある。例えば、Native-PAGE や二次元電気泳動の結果、複数のバンドやスポットが確認できた場合、高分解能クロマトグラフィーで複数のピークを確認できる場合が多い。あるいはピークに分離できなくても、ピークに「肩」がある、ピークの形状が左右対称ではない(テーリングやリーディング)等の現象が確認できた場合は、試料中のタンパク質分子の電荷均一性が確保できていないことを示唆している。しかしこのような現象が確認できた場合には、様々な樹脂やカラム、pH や溶出溶液の塩濃度を検討して精製を進めることで、各成分を分離でき、試料の均一性の向上が図れることが多い。

一方、不規則な会合状態で存在している試料の場合、対応策はかなり厄介である。分子が不規則会合を起こした原因を探って精製過程を遡り、途中で無理な操作をしていないか(粗精製の段階での濃縮や硫酸沈殿)、といった事を再考する必要がある。運が良ければ、高分解能クロマトグラフィーで会合の原因になっている夾雑成分を除くことができ、劇的に改善することもある。しかし、場合によってはコンストラクトの再構築を考える必要がある場合も少なくない。

4. 結晶取り出しの実際

4.1 ハーベスト溶液の最適化

既に述べたように JAXA PCG 宇宙実験で標準的に用いられている CD 法は、ガラスキャピラリー内部での拡散現象によって結晶を得る手法である。このため、時間の経過とともにキャピラリーの内部で、結晶化試薬の濃度とタンパク質の濃度に変化が起きる。高分子量 PEG を試薬に用

いた場合などはこの傾向が特に著しい。例えば PEG 20000 を使用した場合、宇宙実験から帰還し、回折実験向けの結晶を取り出す時点、すなわち充填後 2~3 か月経過した後でも、キャピラリー内部の結晶化試薬濃度が均一になっていない。しかもキャピラリーの場所によってその濃度が異なる。この現象を考慮せずに結晶を取り出して、VD 法と同じ考え方で安易にリザーバ溶液に浸漬すると、結晶が存在していた場所の試薬濃度と異なることによる浸透圧ショックで、せっかく得られた結晶が破壊もしくはダメージを受け、結晶の質が著しく低下してしまう。

この現象を回避するには、あらかじめキャピラリー内部の各点における試薬濃度の時間変化を 1 次元シミュレーションプログラムで計算し、実際に結晶が得られた場所とセットアップ後の経過時間から、結晶化試薬濃度を予測したうえでハーベスト溶液を調製し、結晶を取り出す必要がある⁹⁾。このように書くと随分面倒な作業と思われるかもしれないが、キャピラリー内部の各点における試薬濃度の時間変化を JAXA PCG では計算して利用者に提供しており、これを活用するのがよい。

4.2 結晶の取り出し

当然のことながら、回折実験の際には結晶を取り出す必要がある。JAXA PCG 宇宙実験で標準的に用いているキャピラリーは、内径 0.5mm である。このため、結晶を無傷で取り出すためには、かなり細かな作業を実体顕微鏡下で、しかも上述のハーベスト溶液の中で実施する必要がある。この作業のためには、いくつかの道具とそれらを使いこなすための練習が必要である。

主な道具は、くぼみガラス、ガラスカッター(やすり)、マイクロピペットおよび各種ピンセット、細いワイヤーであろう。筆者は通常、先が極細の X 型(逆作動型)ピンセットと、50 μ m 径のタングステンワイヤーを用いている。まず、結晶ができていないキャピラリーを子細に観察し、取出しを目指す結晶を決める。その結晶を中心に前後 5 mm 程度の範囲でキャピラリーを切断する。切断されたキャピラリー(内部に目指す結晶が入っている)をハーベスト溶液に浸漬する。ハーベスト溶液は、くぼみガラス上に約 50-100 μ L 程度である。実体顕微鏡下では結晶がよく視認できるはずである。溶液中でピンセットを用いてキャピラリーを保持する。マイクロピペットでキャピラリーの一方から溶液を流し込んでみる。うまくすると、結晶が管壁からはがれて外に押し出されてくる。この場合、この結晶をループ等ですくってやればよい。残念ながらたいていの場合は、結晶はキャピラリーの内壁についていて、少々溶液を送り込んでも出てこない。この場合は、細いワイヤーで結晶をさわり、管壁からはがしてやる必要があるが、この作業が、結晶を

物理的に破壊してしまう危険性が最も高く、取出し作業の中でも緊張する瞬間である。結晶をワイヤーで押し出す必要はなく、軽く触れて管壁からはがれたら、あとはマイクロピペットによる溶液流で押し出してやればよい。

この作業には練習が必要だが、最もお勧めする練習はニワトリリゾチーム (HEWL) の結晶を用いたものである。HEWL の結晶は CD 法で簡単に、短時間で、かつたくさん作成が可能である。しかも、結晶は管壁に固着している場合が多いので、キャピラリーからの結晶の取出しの練習にはうってつけである。HEWL 結晶を無傷で、しかも短時間で取り出せるようになれば、ほぼすべての場合に対応できる技量は備わったと考えてよい。

5. 最後に

本稿では、JAXA PCG 宇宙実験を中心に、宇宙実験に臨むにあたってのタンパク質試料の品質や結晶化条件の考え方、さらには得られた結晶の取り扱い方について、日頃から宇宙実験の利用者に説明してきた内容をとりまとめたものである。これらの技術は、現在も様々な改良、改善の余地があり、日々検討を進めている。より使いやすく、役に立つ宇宙実験機会の実現につながることを期待したい。

謝辞

本報告で紹介した技術の一部は、JAXA 高品質蛋白質結晶生成実験(JAXA PCG)の技術開発成果です。JAXA PCG 宇宙実験に試料を提供してくださった日本国内の研究者の皆様に感謝いたします。

参考文献

- 1) W. Littke and C. John: *J. Cryst. Growth*, **76** (1986) 663.
- 2) <http://www.nap.edu/books/0309069750/html>
- 3) A. Lawler: *Science*, **287** (2000) 1728.
- 4) S. Aibara, K. Shibata and Y. Morita: *Biological Sciences in Space*, **11(4)** (1997) 339.
- 5) スペースシャトル及びミール利用宇宙実験結果報告会予稿集, 宇宙開発事業団(1998).
- 6) 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.
- 7) J.M. García-Ruiz and A. Moreno: *Acta Cryst.*, **D50** (1994) 484.
- 8) J.M. García-Ruiz, L.A. Gonzalez-Ramirez, J.A. Gavira and F. Otálora: *Acta Cryst.*, **D58** (2002) 1638.
- 9) H. Tanaka, K. Inaka, S. Sugiyama, S. Takahashi, S. Sano, M. Sato and S. Yoshitomi: *J. Synchrotron Rad.*, **11** (2004) 45.
- 10) S. Takahashi: 15th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules Abstract book (2014) 58.
- 11) A.A. Chernov, J.M. García-Ruiz and B.R. Thomas: *J. Cryst. Growth*, **232** (2001) 184.
- 12) H. Tanaka, K. Inaka, S. Sugiyama, S. Takahashi, S. Sano, M. Sato and S. Yoshitomi: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1027** (2004) 10.
- 13) K. Inaka, H. Tanaka, S. Takahashi, S. Sano, M. Sato, M. Shirakawa and Y. Yoshimura: *Defect and Diffusion Forum*, **323-325** (2012) 565.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) K.D. Collins: *Methods*, **34** (2004) 300.