

高品質タンパク質結晶生成実験プロジェクト 中間報告について

平成16年9月1日



JAXA
宇宙基幹システム本部
宇宙環境利用センター
センター長 吉富 進

高品質タンパク質結晶生成実験プロジェクトの目的と目標

プロジェクトの目的

- 宇宙環境利用の有効性の実証
- ISSを利用したタンパク質結晶生成技術開発とそのプロセス整備
- 宇宙環境利用成果の早期創出(ポストゲノム時代への貢献)

プロジェクトの目標

- 高品質タンパク質結晶生成技術の確立
- ISS・JEM利用に向けた応用利用プロセスと効率的な利用支援体制を整備

プロジェクト前半(第1回～3回)での目標達成に向けた展開

- GCF(グラナダ結晶生成セル)の基本性能の検証
- GCFを利用した結晶化技術の確立
- 液液拡散法対応のためのノウハウ習熟と、GCF技術の改良
- 作業手順の短縮化とルーチン化(利用支援プロセス整備)

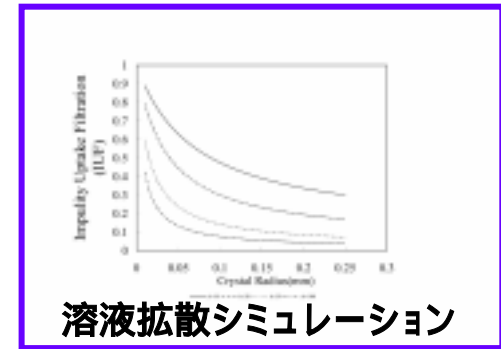
第1回～第3回宇宙実験の総括

- ◆ 液-液拡散法(いくつかあるタンパク質結晶化手法の1つ)によるGCF結晶化の基本的技術を検証し、固有の技術課題を克服すると共に、JAXAによる新たな技術開発を行い、宇宙でのGCF結晶化技術を確立した。
- ◆ 技術開発搭載タンパク質の結果から、宇宙実験は様々な技術的問題を解決することで、有用性を十分に発揮させることが出来ることがわかった。結果として同種のタンパク質で世界最高分解能の取得に成功した。
- ◆ 利用機関のタンパク質では、一部のタンパク質で品質の改善が見られた。
- 一連の結晶化技術及びプロセスにおいて発生した問題点に対しては、第3回及び第4回実験に対応策を適用している。結果として有用なX線回折データセットの取得率向上につながりつつある。
- 第5回及び第6回宇宙実験では、より積極的に蓄積したノウハウを活用する。

技術開発成果の概要

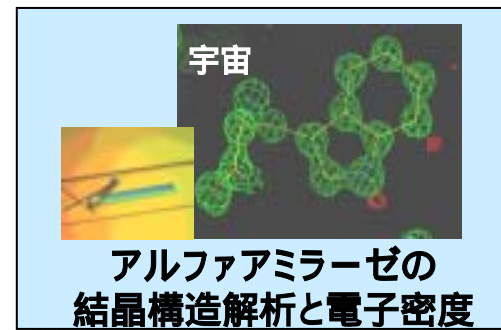
1. CD法対応のための基本技術の開発・整備

- CD (Counter Diffusion) 法に対応するための「溶液拡散シミュレーション技術」の開発・整備
- 新規の結晶生成方法である「ゲルチューブ法」を開発
- 宇宙実験用日本製ユニット(JCB)を開発
- 「結晶化条件絞り込みプロセス」を開発・整備
(試料純度評価、シミュレーション、溶液条件選択など)
- PEG (Polyethylene-Glycol) 系結晶化溶液適用技術を整備
- ガラス細管からの結晶の取出し・凍結技術を開発



2. 世界最高クラスの分解能達成

- アルファアミラーゼで世界最高分解能(0.89 Å)の結晶を取得し、超精密な構造解析結果を提示。(第1回)
- リゾチームで世界最高分解能(0.88 Å)の結晶を取得し、構造解析実施中。(第3回)



3. 利用支援プロセス・体制の整備

- 支援企業育成、作業手順短縮化、ルーチン化等

4. その他の成果(波及効果など)

- ゲルチューブ法のキット化による市販(業務委託先)
- 地上ベースでの結晶化支援受託開始(業務委託先)



第1回～第3回の実験結果概要

● X線回折データ取得が可能な単結晶生成結果

試料受付時の状況 数値はタンパク質の種類			宇宙実験 X線回折に供することが可能な単結晶生成		
			第1回 36種類搭載	第2回 53種類搭載	第3回 39種類搭載 (ESAタンパク質を除く。)
受付時の状況	構造解析が行われていないタンパク質	結晶生成に至らず (沈殿、アモルファス・オイル発生等)	1	0	0
		結晶は得られたが、 回折データ取得に至らず	4	11	6
		分解能が低い単結晶	2	5	11
	既にある程度の構造解析が行われているが、さらに精緻な構造解析が必要	7	3	5	

- 世界最高クラスの分解能を達成： 2 (アルファアミラーゼ、リゾチウム)
- 具体的な応用利用に向けた成果： 3

(注) 第3回目実験については、引き続きデータ取得、データ解析を継続中

本プロジェクトの今後の進め方

本プロジェクト遂行方針の主要見直し点

従来の方針



今後の方針

- タンパク3000等の国家プロジェクトに参加する大口ユーザを想定
- 地上で単結晶が得られない、又は十分な分解能が得られないタンパク質を対象
- 宇宙実験に係わる部分はJAXA、実験試料準備と回折データ取得は利用機関側の分担
- 資金授受を伴わない共同研究(宇宙実験経費はJAXA負担)

- 従来に加え、宇宙実験準備(高純度試料生成、結晶化条件検討等)に積極的に対応可能な個別ユーザも対象
- 超高分解能結晶生成も視野(1 Å以下の分解能を目指す)
- 試料準備や回折データ取得において従来の役割分担を超えた評価、支援を含む共同作業を実施
- 第6回終了後については検討中。(第6回までは従来どおり)

今後の課題

- タンパク質試料の準備からX線回折データ取得までのトータルなシステム技術の確立
- 上記技術に基づく、タンパク質機能・構造解析分野への貢献（更なる高品質結晶育成事例の創出）
- 宇宙での高品質結晶生成達成のための民間企業による支援業者（サービスプロバイダー）育成とJAXAからの技術移転
- 本プロジェクト終了後、JEM利用開始前における継続的な実験機会の確保

日本のタンパク質結晶生成宇宙実験の経緯と今後の展開

	1990	1995	2000	2005	2010
スペースシャトル	▲ 1992 STS-47 (5種類)	▲ 1997 STS-84 (15種類)	▲ 2003 STS-107 (17種類)		
宇宙ステーション ロニアサービス モジュール			▲ 2002 ESAの実験機会 を使用した実験 (2種類)	▲▲▲▲▲ 2003 ~ 2005 本プロジェクト	実験機会の継続!
きぼう					きぼう利用フェーズ (創薬等本格利用)

ESAとの協力に基づくトライアル

GCF利用結晶生成システム(技術と体制)の整備

創薬等への本格的利用

参 考 资 料

<参考1> プロジェクトの特徴と概要

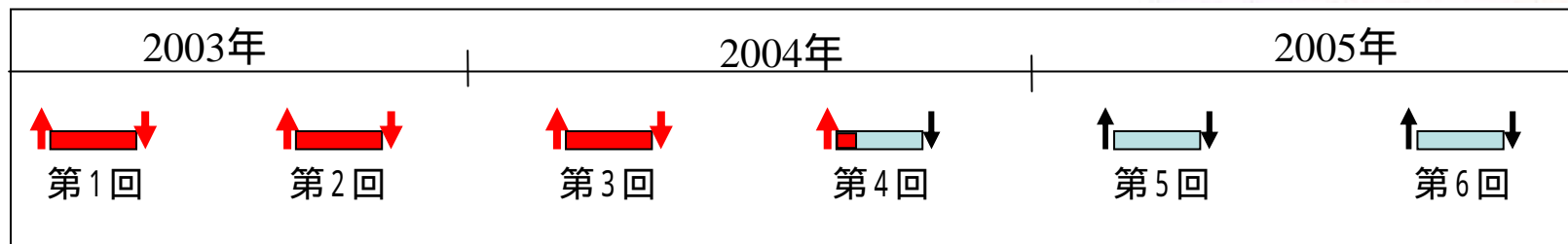
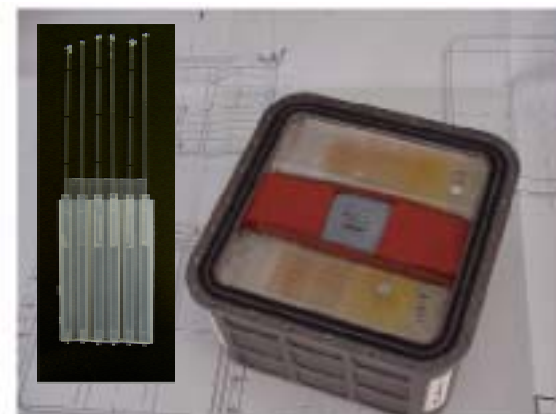
プロジェクトの特徴

- ロシアとの商業利用契約とESAとの技術協力
- 継続的、安定的な宇宙実験機会の確保
- ポストゲノム時代への貢献



プロジェクトの概要

- 実験実施場所: 国際宇宙ステーション ロシアサービスモジュール等
- 打上げロケット: プログレス無人貨物船
- 回収宇宙船: ソユーズ宇宙船
- 実験実施回数: 2003年以降3年間で、合計6回
- 実験実施期間: 2~4ヶ月
- 実験装置:
GCF(グラナダ結晶生成装置)
JCF(JAXA結晶生成装置)



< 参考2 > 経 緯

- 平成11年から開始した産業応用を目指した宇宙実験テーマ募集(先導的応用化研究制度)のなかで、産業界からの有望なテーマ提案が続出し、継続的な実験機会の確保の必要性が顕在化
- 国においても重点4分野の中で、ポストゲノム時代の創薬等を目指したプロジェクト(「タンパク3000」や、「イネゲノム」)がスタートする等、タンパク質結晶生成に基づいたタンパク質の機能・構造解析研究が本格化
- JEMの打上げが遅延する中で、我が国の宇宙実験機会は単発的な設定を余儀なくされてきたが、ロシアとの協力により、半年毎の実験機会が定期的且つ確実に確保できる見通しが得られ、平成15年～17年の3年間に合計6回の実験機会を確保
- これまでに、第1回(平成15年2月～5月)、第2回(平成15年8月～10月)、第3回(平成16年1月～4月)を実施。本年8月、第4回目の実験試料を打上げ、現在宇宙実験を実施中(10月回収予定)
- 第1回及び第2回については、回折データ取得・構造解析がほぼ完了しており、第3回については、データ取得・解析を継続中

<参考3> 本プロジェクト遂行方針(当初設定)

- 利用機関としては、「タンパク3000プロジェクト」を担う理化学研究所や大学拠点、タンパク質結晶の構造・機能解析により創薬等を目指す企業連合である「タンパク質コンソーシアム」、「イネゲノム研究」を推進する農業生物資源研究所等、**主に、大口ユーザを想定**
- 理化学研究所をはじめとする「タンパク3000プロジェクト」や、タンパク質コンソにおいて、
 - 地上の結晶化がうまくいかず、単結晶が得られない
 - 結晶は得られるが、十分な分解能が得られないという**「問題を抱えた試料」**を中心に集めて、無重力の特徴を活かした宇宙実験での結晶化で問題解決を目指す
- JAXAと利用機関との**役割分担は従来どおり**、宇宙実験に係わる部分はJAXAが担当し、その前後(実験試料準備と回折データ取得)は、利用機関側の分担
- 互いに資金授受を伴わない共同研究(**宇宙実験経費はJAXA負担**)

< 参考4 > 本プロジェクトにおける主要利用機関

宇宙航空研究開発機構

協力協定・共同研究

共同研究

共同研究

共同研究

民間企業等

蛋白質構造解析
コンソーシアム
(参加企業 22社)

■ 個別企業、研究所

文部科学省

< タンパク3000 >
理化学研究所
大学拠点

■ 個別の大学

経済産業省

< 膜タンパク質研究 >
生物情報解析研究
センター

(調整中)

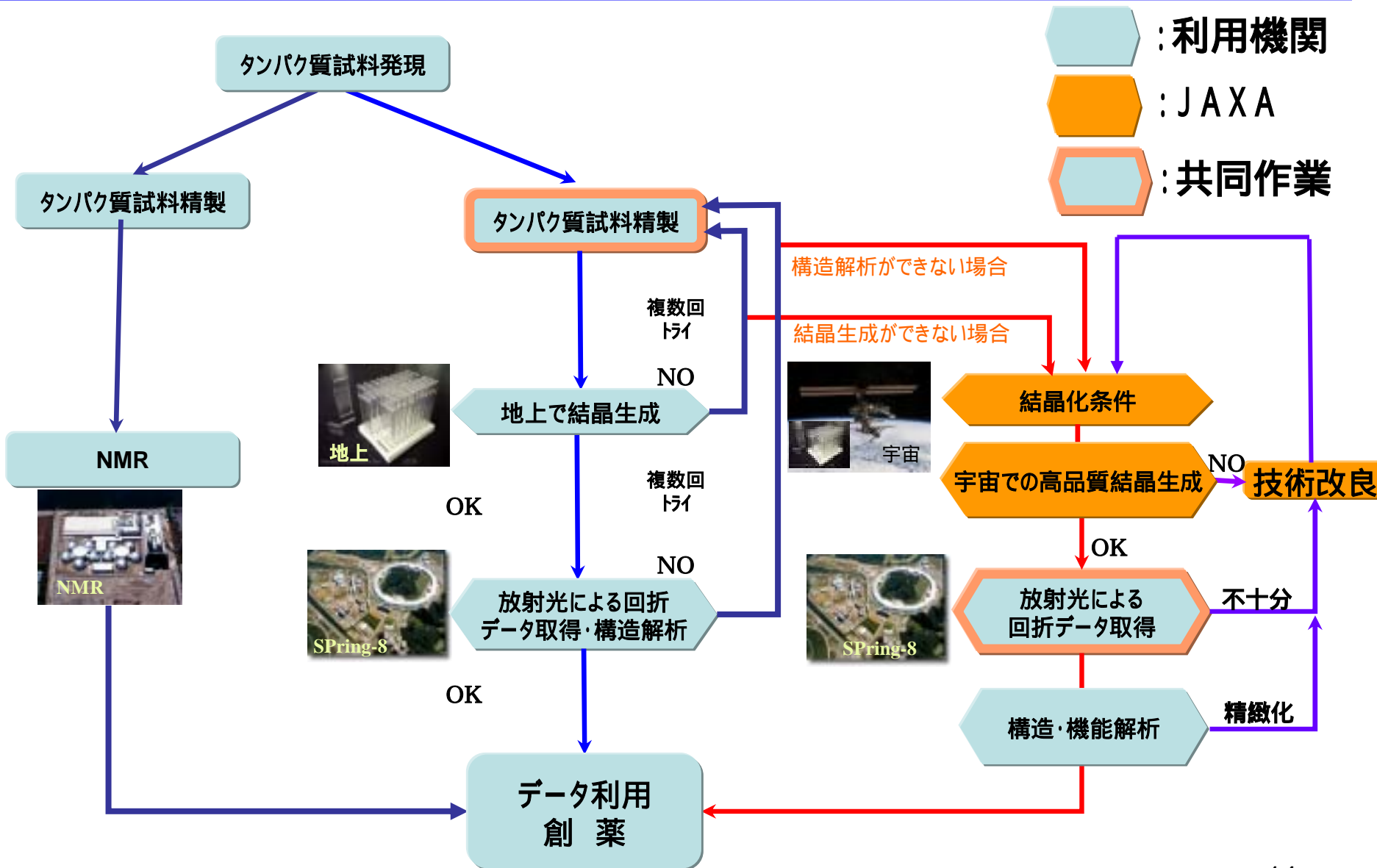
農林水産省

< イネゲノム研究 >
農業生物資源
研究所

	NASDA-GCF#1		NASDA-GCF#2		JAXA-GCF#3	
	受付数	搭載数	受付数	搭載数	受付数	搭載数
理研	55	38	50	36	34	18
資源研			9	6	5	3
製薬協			8	4	10	6
大学拠点					13	5
先導的応用化	9	3	34	20	16	16
STS-107科学研究	4	3				
ESA			8		7	7
技術開発	2	2	4	3	4	2
計	70	46	113	69	89	57

< 参考5 >

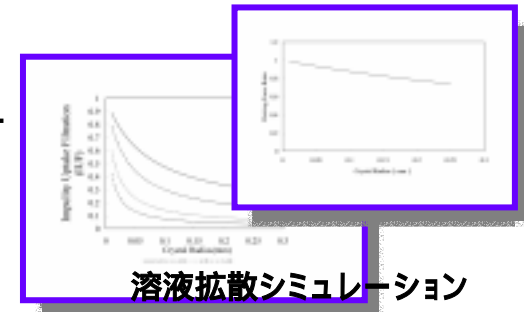
JAXAと利用機関の役割分担



< 参考6 - 1 > CD法に対応するための基本技術の開発・整備

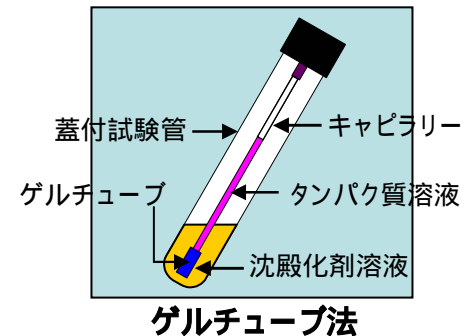
● 溶液拡散シミュレーション技術の開発・整備

地上で広く利用されている手法(蒸気拡散法・バッチ法など)での結晶化条件をCD法向きに再設定するため、シミュレーション技術を開発。



● 新規の結晶生成法「ゲルチューブ法(GT法)」の開発

シミュレーションで再設定した条件の妥当性を確認するため、簡易なCD手法を開発。



● PEG系結晶化溶液適用技術を整備

微小重力効果を引出すため、高粘性のPEG結晶化溶液の適用技術を開発。

(第3回実験でPEG適用有効性をリゾチームで確認)

● ガラス細管からの結晶取出し・凍結技術を開発

ガラス細管からの結晶の取出し技術と取り出した結晶の保護技術を開発。

また、凍結データベースの利用による凍結技術を整備。
(http://idb.exst.nasda.go.jp/english/home_e.html)

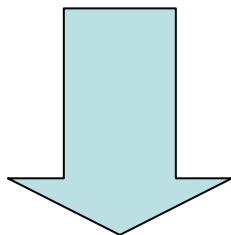


凍結データベース

< 参考6 - 2 > 高密度化容器 (JCB) の開発

これまでのGCB

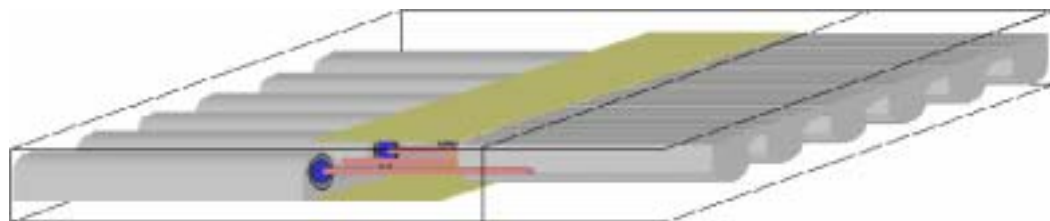
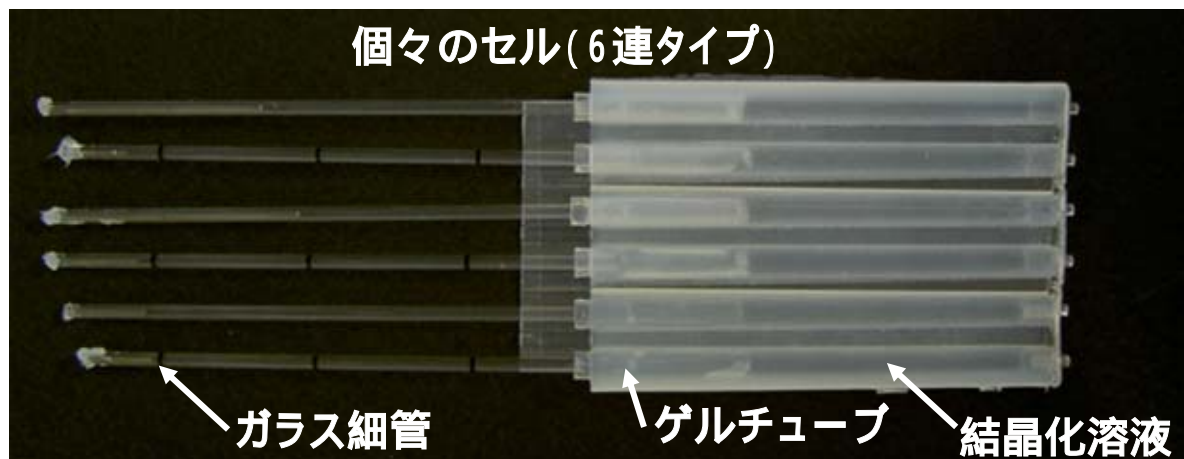
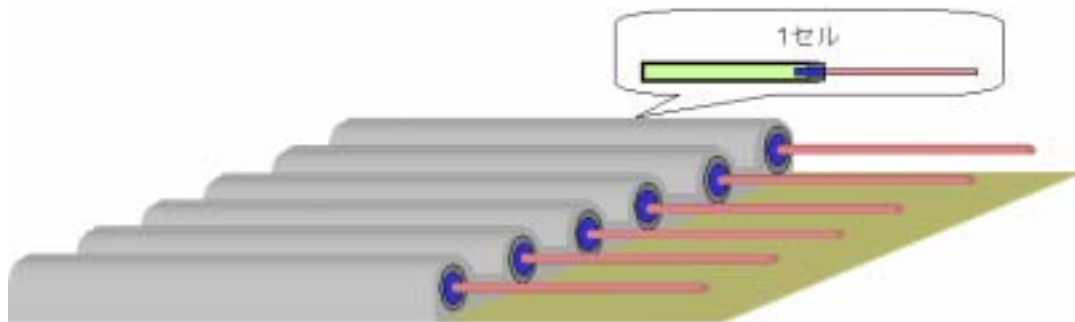
タンパク質: 1種類
実験条件: 6条件
GCB 1箱当り



新規開発のJCB

タンパク質: 11種類
実験条件: 11条件
(JCB 1箱当り)

従来方式の2~11倍

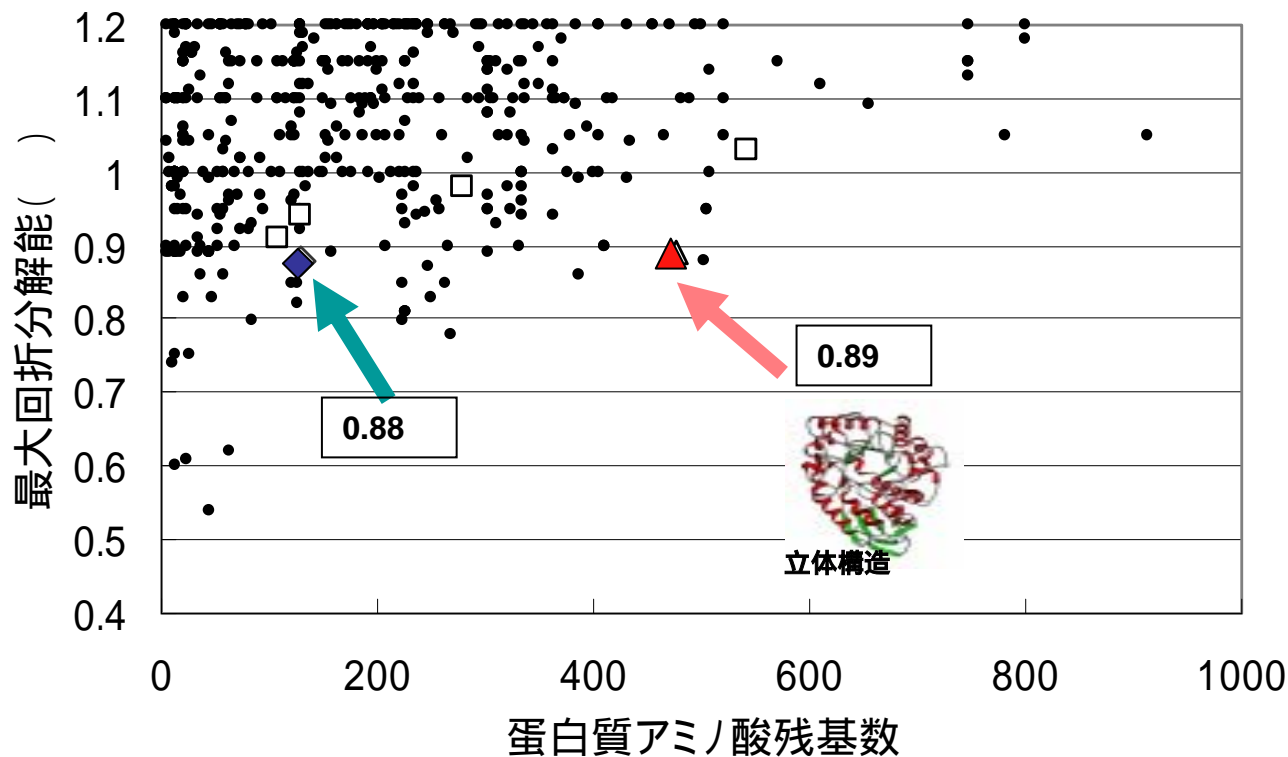


JCB容器への収納状態

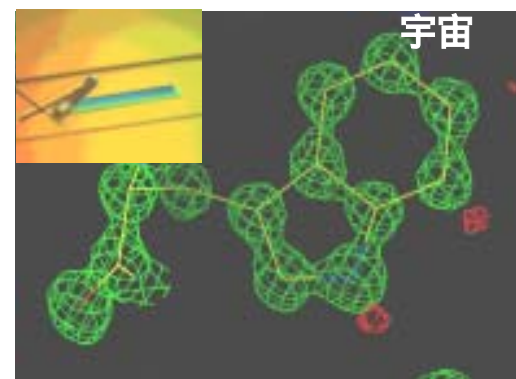
(注) GCB及びJCBともに、外側のプラスチック容器体積は同じ

<参考7> 技術開発タンパク質で世界最高クラスの分解能達成

タンパク質アミノ酸残基数と生成結晶の最大分解能の相関



- 地上実験 □ 宇宙実験 ▲ アミラーゼ ◆ リゾチーム (NASA)



アルファ・アミラーゼ結晶とその電子密度図

- ・宇宙の結果では、電子密度図に水素(赤色部分)が見えている。
- ・水素結合が見えることで、より詳細なタンパク質機能解析が可能

< 参考8 > 利用支援プロセス・体制の整備

- **高品質タンパク質結晶生成システムの確立**
受付から宇宙実験を経て、結晶取得に至るまでの一連の作業を定常的に運用できる基本的な手順及び体制を整備。
- **同システムのスリム化**
 - ・開発・整備した基本技術を効率的に組み合わせることにより、地上準備作業を標準化・省力化。
 - ・準備期間短縮や必要試料量の見直しによる手順のスリム化。
- **産業界にも対応できるプロセス整備**
 - ・利用機関との明確な役割分担(下表)のもとで、知的財産権の取扱いを明確化。
 - ・秘密保持及び技術上・営業上の情報の取り扱いを徹底し、高い信頼性を獲得。
- **支援企業育成**
JAXAを中心とした関連機関・企業への技術蓄積。

利用機関	・タンパク質の発現・精製法 ・タンパク質結晶の構造及び座標データ
JAXA	・結晶化条件の検討システム技術 ・軌道上結晶生成システム技術

<参考9> 実用に向けた成果 (タンパク質の構造・機能解析への貢献)

- 寄生虫感染症に関連するタンパク質で、宇宙でこれまでの最高分解能の回折データを取得。(現在、地上結晶の回折データと併せて、構造解析を実施中)
(東京大学大学院医学系研究科及び京都工芸繊維大学繊維学部応用生物学科)
<新規の抗寄生虫薬の開発>
- 睡眠物質及びアレルギー物質合成酵素の宇宙結晶による構造解析で初めて、酵素反応の反応機構に水分子が関連していることが判明。(論文発表準備中)
(財団法人大阪バイオサイエンス研究所)
<居眠り防止薬や抗アレルギー薬等の開発>
- 高機能な酵素に関するタンパク質において、宇宙でこれまでの最高分解能な回折データを取得。(現在構造解析を実施中)
(味の素株式会社)
<高機能な酵素を設計・開発し、近未来の食糧、生活必需品、医薬、環境等の分野への貢献>

<参考10 - 1> プロジェクト遂行方針見直しの具体策

第3回宇宙実験終了後、外部有識者を委員とした第2回プロジェクト評価委員会、及びJAXA内部の中間審査会を開催し、第1回から第3回までの成果が評価され、勧告・提言を受けた(参考12-1、12-2参照)。これを受け、以下のとおり、プロジェクト遂行方針を見直した。

有効な構造解析結果を取得するための利用者支援の強化

従来のJAXAと利用機関間の役割分担を見直し、タンパク質試料の精製及び結晶のハンドリングと回折データ取得の利用機関への支援・協力を強化し、有効な成果に至る例数を増やす。(これまでの利用機関に対して)

精密な構造データのタンパク質の反応機構解明への有用性 例示

疾患や構造生物学上重要なタンパク質をJAXA自らが技術検証タンパク質として設定し、高品質な結晶を利用した精密な構造データの取得により、タンパク質の反応機構の解明を利用者と共同で実施し、新たな利用者に提示できる有効な成功事例を構築。(新規の個別共同研究を設定)

(1) 宇宙実験準備

- ・不純物が結晶化・結晶の高品質化を阻害するため、可能な限り試料純度を向上させる必要がある。

試料純度の評価と評価結果の利用者へのフィードバック。

(2) 宇宙実験実施

- ・微小重力下では、溶液の粘性が高い方が高品質化する傾向にある。

粘性の高い結晶化溶液の使用を推奨。粘性の低い結晶化溶液(低分子溶液)の使用が不可欠な場合には、低分子溶液に高粘性物質を混在させる。

- ・帰還時の温度上昇により結晶が溶解する例があった。

真空容器、真空断熱材、温度緩衝剤を結晶生成装置に搭載。

- ・ガラス細管のタンパク質溶液が減少し、結晶生成に影響があった。

溶液減少がほとんど発生していないGT法(Gel Tube法)を採用し、かつガラス細管の封止方法の強化。

(3) 実験終了後

- ・ガラス細管からの結晶の取出し、及び結晶の凍結作業において、結晶への損傷が見受けられた。

JAXAで確立した結晶取出し技術・手順をGCB講習会やパンフレットを通じて普及。また、JAXAによる技術支援を実施。

宇宙実験以外の問題

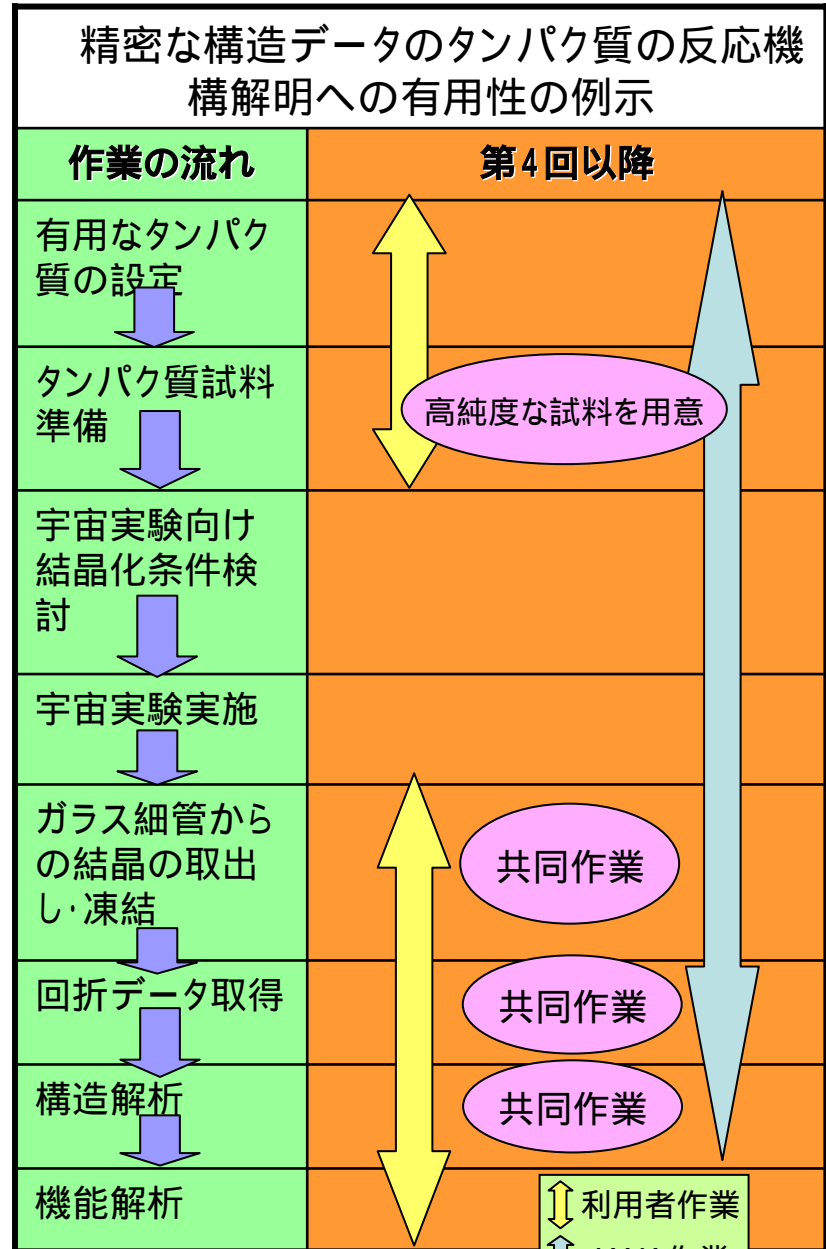
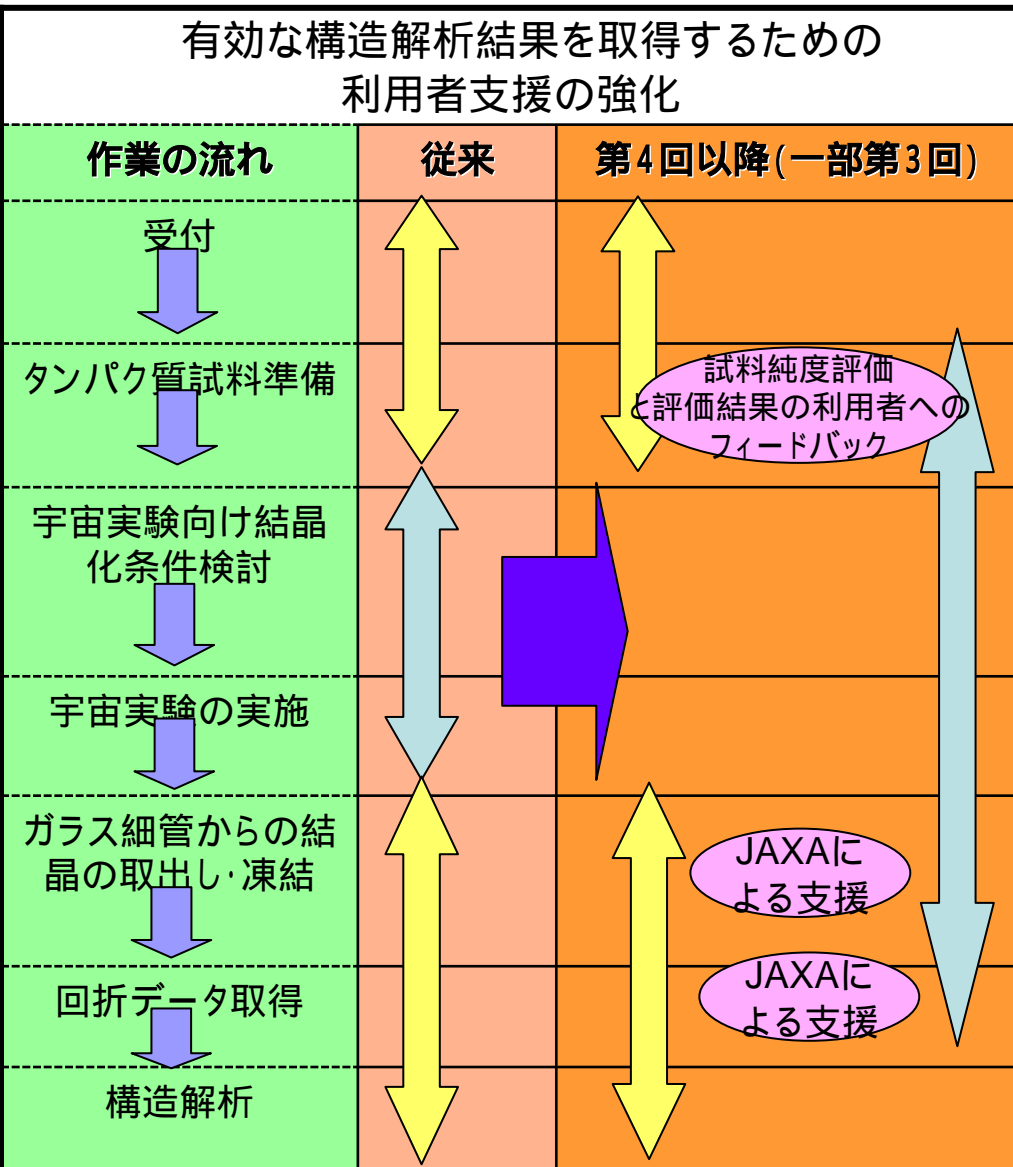
宇宙実験の問題

宇宙実験以外の問題については、結晶化と構造解析に関する総合的技術力(純度の向上、蒸気拡散法等での結晶化条件最適化、結晶ハンドリング、回折実験)が今後必須である。

以下のタンパク質を新たな技術検証タンパク質として設定し、宇宙環境を利用した高品質結晶の取得により、タンパク質の機能解明を目指す。

種類	分子量	機能	成果
可溶性 蛋白質	2万	細胞内にあるミトコンドリア外膜上の膜透過装置。	細胞内の蛋白質輸送機構の解明。
		大腸菌の染色体複製に関与。停止したDNA複製を開始させ、細胞の個としてそして種としての存続をもたらす。	DNA複製・修正機構の解明。
		酵母の液胞蛋白質の輸送に欠損を示す変異株。	細胞内の蛋白質輸送の機構解明。液胞の機能解明。
		骨基質中に豊富に存在し、骨形成を促進。この他、胚発生や細胞増殖の促進にも関与。	胚形成・細胞増殖・分化の機構の解明。発生生物学への応用。
	5万	アフリカ型トリパノソーマ症(睡眠病)を引き起こす寄生虫に特異的な蛋白質。	睡眠病治療薬・ワクチンの開発。
		リーシュマニア症を引き起こす寄生虫に特異的な蛋白質。上記TbPGFSに対する抗体に対して免疫交差性を示す。	感染症治療の特効薬の開発。
		睡眠病を引き起こす寄生虫に特異的な蛋白質。	睡眠病治療薬・ワクチンの開発。
10万	胃腸で植物組織を加水分解する消化酵素。	消化機構の解明。	
膜蛋白質		寄生虫のエネルギー代謝系で重要な役割を担う、コハク酸脱水酵素の複合体。	抗感染症薬の開発。

<参考11> プロジェクト遂行方針見直しの具体策



宇宙実験を中心とした上流(準備)から下流(結晶ハンドリング)までの一貫したサービスの提供。

<参考12 - 1> プロジェクト外部評価委員会委員

	氏 名	所 属
委員長	中嶋 暉躬	星薬科大学 学長（東京大学名誉教授）
委員	大島 泰郎	東京薬科大学 教授
委員	勝部 幸輝	大阪大学 名誉教授
委員	田中 勲	北海道大学大学院 教授
委員	新村 信雄	宇宙航空研究開発機構 宇宙基幹システム本部 宇宙環境応用利用グループ アドバイザ
委員	西島 和三	日本製薬工業協会研究開発委員会 専門委員 蛋白質構造解析コンソーシアム 幹事長
委員	廣田 洋	理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター タンパク質構造・機能研究グループ プロジェクト副ディレクター
委員	水野 洋	農業生物資源研究所 生体高分子研究グループ 蛋白質機能研究チーム長
委員	渡辺 公綱	産業技術総合研究所 生物情報解析研究センター長

< 成果の評価 >

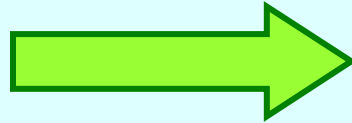
結晶化技術開発	<ul style="list-style-type: none"> ・ESA/グラナダ大開発の結晶化技術を習得。 ・『ゲルチューブ法』の開発や必要試料量の削減、結晶のハンドリング技術等を開発。
宇宙実験利用プロセスの整備	<ul style="list-style-type: none"> ・利用者説明会の開催から、結晶の引渡、結晶凍結等、一連の手順を標準化。
体制整備	<ul style="list-style-type: none"> ・関連機関・企業における技術蓄積により、民間移転を睨んだ体制整備が進行。
繰り返し利用者の確保と拡大	<ul style="list-style-type: none"> ・国家プロジェクトや製薬企業等の利用者の拡大と繰り返し利用。
結晶化成功事例の創出	<ul style="list-style-type: none"> ・JAXA技術検証用タンパク質における世界最高レベルの構造解析の実施と微小重力効果の向上に成功。 ・利用機関においても、一部で良好な結果を取得。
実験事例としての対象タンパク質	<ul style="list-style-type: none"> ・様々な性状・分子量の計134種類のタンパク質実験を実施し、多くの経験・知見を蓄積。

< 勧告・提言 >

成功事例の創出	<ul style="list-style-type: none"> ・試料の精製から結晶の凍結技術まで、宇宙実験前後の技術支援を実施。 ・有用なタンパク質を特定し、宇宙環境利用の有効性を示す成果を発表。
利用プロセスの整備	<ul style="list-style-type: none"> ・利用者ニーズに応じた手順(スピード重視、品質重視)を提示。
最終結果の有用性の認知	<ul style="list-style-type: none"> ・地上実験の進展等により回折データ取得以降の進捗がないものに関して、JAXA側で継続してデータ解析を実施し、宇宙実験の有効性を提示。
継続的な実験機会の確保	<ul style="list-style-type: none"> ・本プロジェクト終了後の宇宙実験機会について検討。 (結晶生成分野の宇宙環境利用の有意性に対し、国内研究諸機関・企業は大きな期待を寄せている)
世界をリードする成功事例の創出	<ul style="list-style-type: none"> ・高品質結晶に対応できる、高強度ビームラインと高精度検出器を速やかに利用できる環境の整備が必要。

< 参考13 > 本プロジェクトで利用する結晶生成装置(GCF)

< 結晶生成装置の概要 >



GCBをGCFに組み込む



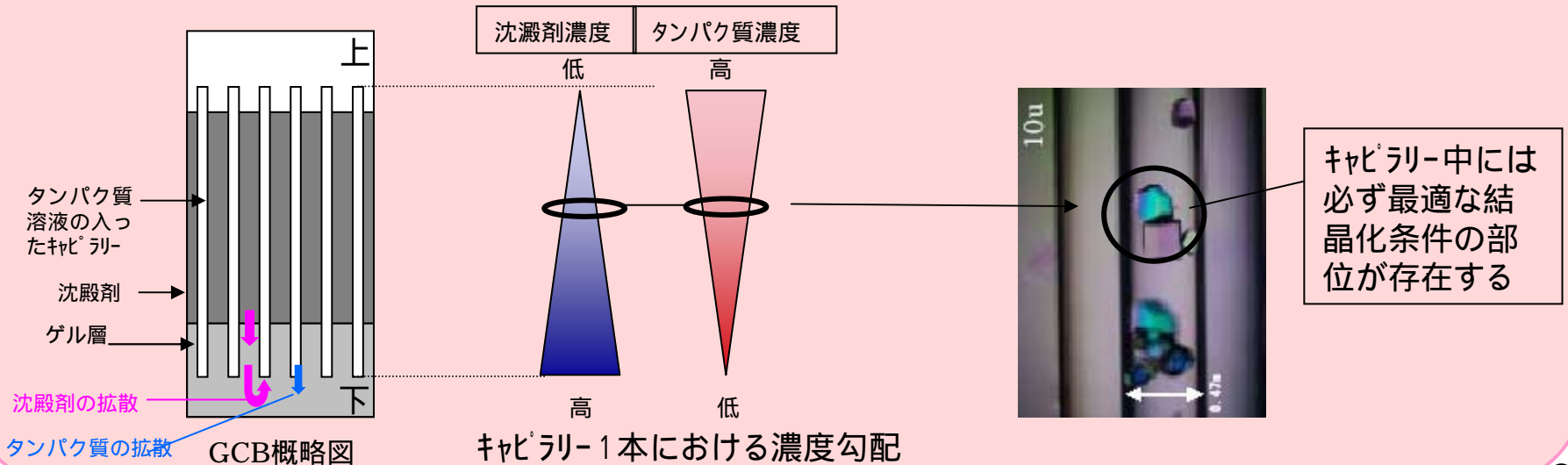
GCB: Granada Crystallization Box

- ・ 寸法: 3.3cm x 10cm x 0.7cm
- ・ 特徴: 1GCBあたり1種類のタンパク質で6つの条件で実験が可能。

GCF: Granada Crystallization Facility

- ・ 寸法: 13cm x 13cm x 8cm
- ・ 重量: 1.02Kg
- ・ 特徴: 23個のGCBを収納

< GCBの原理 (Counter-Diffusion (液液拡散) 法 >



< 参考14 > 結晶の品質を示す分解能について

分解能; 結晶中のタンパク質分子の配列の均一性を示す代表的な指標の一つ(一般的に使用されている機器の性能を示す「分解能」とは異なる。)。分解能の数値が小さい程分解能が高く、タンパク質分子がより均一に配列しているといえる。

タンパク質構造データの精度の違いによる特徴

・分解能3.5 の結晶:

タンパク質の分子内のヘリックスやシート等は検出することができるが水素結合の配向性等は検出することができない。(地上での結晶は、2 後半台より分解能の悪い場合が多い)

・分解能2.0 の結晶:

リガンドがタンパク質に結合するときのエネルギー論に基づく分子間相互作用の様子がわかり、構造のカタログデータとしては有効。

・分解能1.5 の結晶:

炭素-炭素の原子間距離を見ることができるレベルになることから、構造決定の正確さも非常に高くなり、活性部位の構造も明確になる。医薬分子設計はこの程度の精度が必要。

・分解能1.0 の結晶:

個々の水素原子が識別されることになり、活性部位と化合物(薬剤)の結合状態が判別できる。これにより詳細な医薬分子設計が可能となる。(宇宙のチャンピオンデータは0.9)