



ISSN 1349-113X  
JAXA-SP-07-022

# 宇宙航空研究開発機構特別資料 JAXA Special Publication

---

## FOTON—M3を用いたタンパク質 結晶成長実験

吉崎 泉, 塚本 勝男, 橘 勝, 小島 謙一

2008年 2 月

宇宙航空研究開発機構  
Japan Aerospace Exploration Agency



# FOTON-M3 を用いたタンパク質結晶成長実験

吉崎 泉\*<sup>1</sup>, 塚本勝男\*<sup>2</sup>, 橘 勝\*<sup>3</sup>, 小島謙一\*<sup>3</sup>

## Japanese Protein Crystal Growth Experiments on FOTON-M3 mission

By

Izumi YOSHIKAZAKI\*<sup>1</sup>, Katsuo TSUKAMOTO\*<sup>2</sup>, Masaru TACHIBANA\*<sup>3</sup>, Kenichi KOJIMA\*<sup>3</sup>

**Abstract:** Microgravity experiment was carried out on the FOTON-M3 spacecraft based on the collaboration between the Japanese and European crystal growth community. We used “GCB2” developed by the University of Granada for Protein Crystal Growth. GCB2 was on the FOTON-M3 spacecraft launched 14th September, 2007. The sample was retrieved 26th September. Here we will report the experiment overview.

**Key words:** Protein, Crystal Growth, FOTON, GCB, Microgravity

### 概 要

研究班ワーキンググループ「成長メカニズムに依存するタンパク質結晶の完全性」の活動の一環として、ヨーロッパ研究者グループとの協力により、FOTON-M3 を用いた宇宙実験を実施したので、概要を報告する。

#### 1. はじめに

宇宙航空研究開発機構宇宙環境利用研究委員会が所掌する研究班ワーキンググループ「成長メカニズムに依存するタンパク質結晶の完全性」（代表研究者：東北大学 塚本勝男教授）活動を2005年から開始している。

研究班 WG では、微小重力下での成長挙動を調べるために実験機会を独自に模索していたが、2006年夏に、当 WG とヨーロッパ研究者グループとの共同研究を開始することになり、2006年10月のトピカルチーム会合での打ち合わせの結果、2007年9月に打ち上げ予定のロシア回収衛星 FOTON-M3 を用いた微小重力実験に国際共同ミッションとして参画することが決定した（無償、11日間）。本報告では、実験の概要、結果の速報を示す。

#### 2. 実験の概要

##### 2.1 ミッション概要

FOTON-M3 ミッションは、ヨーロッパ宇宙機関（ESA）が実施するロシア回収衛星 FOTON を用いた宇宙実

---

\* 1 Japan Aerospace Exploration Agency, The Institute of Space and Astronautical Science (JAXA/ISAS), ISS Science Project Office

\* 2 Tohoku University

\* 3 Yokohama City University

験である。400kgのペイロードを搭載し、40種類の実験を実施する。この実験のひとつが、スペイン・グラナダ大学 Juan Manuel Garcia-Ruis 教授のとりまとめるタンパク質結晶成長実験であった。タンパク質結晶成長実験に関しては、Garcia-Ruis 教授が搭載するサンプルの決定権を有している。塚本教授を中心とする研究班ワーキンググループでは、かねてよりヨーロッパ研究者グループとの交流を進めており、ヨーロッパ研究者グループの代表者であった Garcia-Ruis 教授からの打診により、宇宙実験への参画が可能となった。FOTON を搭載した Soyuz U の打ち上げはカザフスタン バイコヌール宇宙基地から2007年9月14日に行われ、回収は9月26日であった。

#### 参考サイト

[http://www.esa.int/esaCP/SEMQDB13J6F\\_index\\_0.html](http://www.esa.int/esaCP/SEMQDB13J6F_index_0.html)

[http://www.trianatech.com/GCF-2\\_FOTON\\_M3/index.html](http://www.trianatech.com/GCF-2_FOTON_M3/index.html)

### 2.2 実験装置

搭載する実験装置は Granada Crystallization Facility 2 (GCF2) と呼ばれ、グラナダ大学が開発した。小さなプラスチックボックス (GCB) に試料を入れ、図1に示すようにトレイに並べる。このトレイを複数個、装置内に設置し、 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  で温度調節を行う。通常は GCB に細いキャピラリーを入れることになっているが、本実験では帰還後の観察や解析に適した、独自のセルを準備することとした (3.1項参照)。

### 2.3 実験目的

本実験では、沈降・対流が抑制される微小重力下におけるタンパク質 (リゾチーム) 結晶成長挙動、及びその結果としての結晶品質を評価する。結晶成長の様子は、光学的手段を用いてフライト前及び帰還後に解析する。結晶品質評価は光学観察、エッチング、X線トポグラフィー、ロッキングカーブ計測により行う。

結晶の成長に伴う欠陥の発生に重力は大きく関わると思われる。ミクロンサイズの不純物や3次元微結晶の取り込み、包有物の取り込みなどによって格子欠陥が発生するが、これらの現象は微小重力下では抑制されると予想される。

また、結晶成長初期表面に見られる歪み (凹凸) がモザイク構造と関係していると想定しており、これが重力の有無で緩和されるかどうかにも興味の対象である。(結晶周辺の過飽和度が低下すると想定されることから、結晶成長時の表面歪みが少なくなる可能性がある)。

この目的のために、帰還後の観察・解析に適したガラスセルを製作することとした。また、分解能のよいトポ

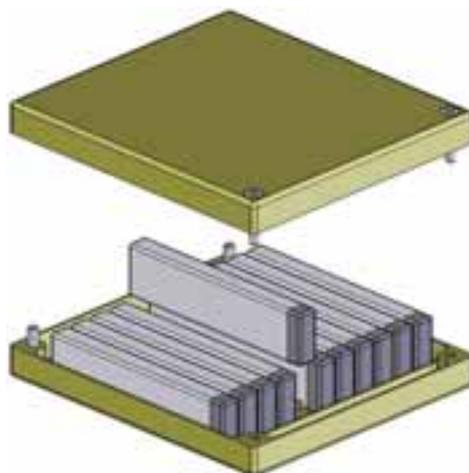


図1 トレイに設置した GCB の模式図 (グラナダ大学提供)

グラフィー像を取得するためには、厚み 1 mm 程度の結晶が必要であるため、種結晶を準備することとした。

### 3. 宇宙実験準備

#### 3.1. セルの製作，搭載検討

##### 3.1.1. 2種類のセル製作

東北大学のガラス工房にて、光学観察・トポグラフィー取得に適した平板状ガラスセルを製作した。穴を開けた厚み 1 mm のガラススペーサーを準備し、スペーサーの上下をカバーガラスで接着してセルとした (図 2)。GCB に 3 つ入れることが出来る。

一方、十分な実験数を確保するために、また溶液量の確保のために、キャピラリーも準備した。内径  $\phi$  2.5~3 mm, 肉厚 200 $\mu$ m のパイレックス製、長さは 3 cm のものと 6 cm のものを製作した。3cm のものは GCB に 6 本入れることができ、6 cm のものは 3 本入れることができる。



図 2 GCB に入れた平板状ガラスセル



図 3 GCB に入れた長さ 3 cm のキャピラリー

### 3.1.2. 振動試験の実施

日本で準備したガラスセル・キャピラリーが打ち上げ／着陸の振動・衝撃によって壊れないことを確認するために、JAXAの振動試験設備を用いて振動衝撃試験を実施した。同時に、種結晶がガラス面から脱落しないかどうかも確認した。

図4に、試験に供したセルを示す。図4左図は、平板状ガラスセルをGCBに入れ、動かないようにシリコンシートをスペーサーとしたものである。図4右図はキャピラリーが動かないようにゲルで接着させた状態である。

試験条件を以下に示す。

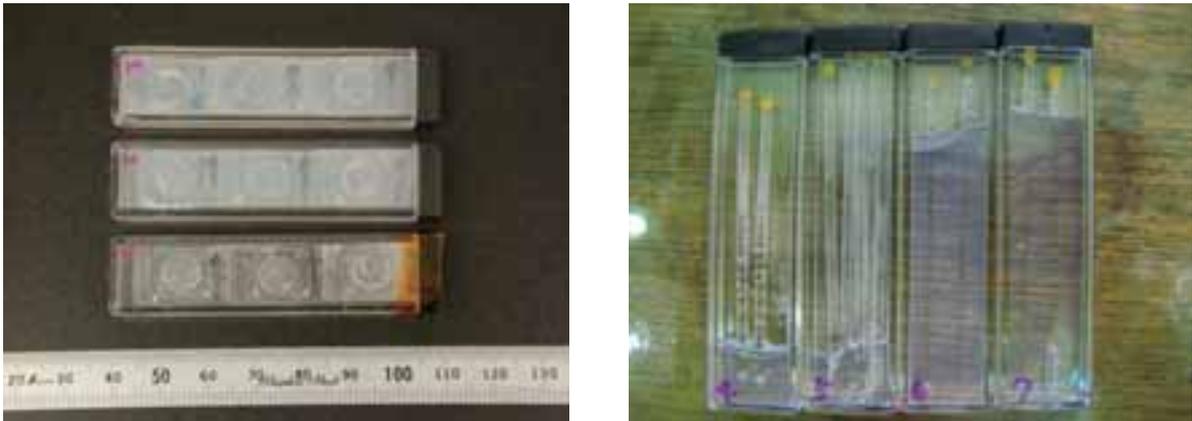


図4 左：平板状ガラスセル  
右：キャピラリー

#### ランダム振動条件 (QT レベル)

周波数	レベル	傾き
20Hz	0.020g <sup>2</sup> /Hz	—
100Hz	0.020g <sup>2</sup> /Hz	—
200Hz	0.050g <sup>2</sup> /Hz	+3.98dB/oct
500Hz	0.050g <sup>2</sup> /Hz	—
1000Hz	0.025g <sup>2</sup> /Hz	-3.01dB/oct
2000Hz	0.013g <sup>2</sup> /Hz	-2.84dB/oct
COMPOSITE	7.419grms	—
加振時間	600sec	—

#### 衝撃条件 (QT レベル)

項目	条件
印加衝撃	40G±0.8G
印加時間	3 msec
印加回数	連続2回

試験はクッション材を入れたアルミボックスにGCBを入れて行ったが、全く影響が見られなかったため、GCBを直接振動試験機の上に設置したが、平板状ガラスセル及びキャピラリーの破損はなかった。また、種結晶の脱落も見られなかった。このことから、日本で準備したセル・実験系に問題がないことがわかった。

### 3.2. 試料・種結晶の準備

実験試料としては、モデルタンパク質リゾチームを用いることとした。結晶化方法は原則としてバッチ法を用い、成長途中の塩濃度の変化がないようにした。

前述のとおり、分解能のよいトポグラフィ像を取得するためには、厚み1mm程度の結晶が必要である。宇宙実験期間は12日であるため、微小重力下での十分な成長を見込めない。そのため、最低でも700 $\mu$ mサイズの種結晶を準備することとし、東北大学・横浜市立大学・JAXAにて種結晶を成長させた。一部の結晶は、試料引渡しを行うオランダにて準備し、残りの結晶は日本から輸送した。

### 3.3. 予備実験

12日間の宇宙実験で解析に必要な成長量が得られ、微結晶が発生しないような結晶化溶液濃度の検討を行った。この予備実験の結果、以下の実験条件とした。一部のセルには種結晶を入れず、微小重力での結晶育成を試みることにした。

GCB	目的	結晶化条件	セル	条件設定の根拠	担当
GCB 1	トポ, 光学観察	Ly90mg/ml NaCl21mg/ml, 種結晶	キャピラリー 3 cm	微結晶形成せず、種結晶が大きくなる最適条件。メイン①とする。	東北大
		Ly90mg/ml NaCl21mg/ml, 種結晶			
		Ly90mg/ml NaCl21mg/ml, 種結晶			
		Ly90mg/ml NaCl21mg/ml, 種結晶			
		Ly95mg/ml NaCl21mg/ml, 種結晶			
		Ly50mg/ml NaCl25mg/ml, 種結晶			
GCB 2	トポ, 光学観察	Ly40mg/ml NaCl25mg/ml, 種結晶		温度変動（温度低下）の可能性があることから、①の安全策として濃度低めの条件とする。濃度勾配法の採用可否は未定。	東北大
		Ly40mg/ml NaCl25mg/ml, 種結晶			
		Ly45mg/ml NaCl25mg/ml, 種結晶			
		Ly45mg/ml NaCl25mg/ml, 種結晶			
		Ly45mg/ml NaCl25mg/ml, 種結晶			
		Ly50mg/ml NaCl25mg/ml, 種結晶			
GCB 3	トポ, 光学観察	Ly45mg/ml NaCl25mg/ml, 種結晶		微結晶形成せず、種結晶が大きくなる最適条件。メイン②とする。	東北大
		Ly50mg/ml NaCl25mg/ml, 種結晶			
		Ly50mg/ml NaCl25mg/ml, 種結晶			
		Ly55mg/ml NaCl25mg/ml, 種結晶			
		Ly55mg/ml NaCl25mg/ml, 種結晶			
		Ly55mg/ml NaCl25mg/ml, 種結晶			

GCB	目的	結晶化条件	セル	条件設定の根拠	担当
GCB 4	トポ, 光学観察	Ly45mg/ml NaCl25mg/ml, 種結晶		温度変動（温度低下）の可能性があることから, ②の安全策として濃度低めの条件とする.	東北大
		Ly55mg/ml NaCl25mg/ml, 種結晶			
		Ly60mg/ml NaCl25mg/ml, 種結晶			
		Ly60mg/ml NaCl25mg/ml, 種結晶			
		Ly60mg/ml NaCl25mg/ml, 種結晶			
		Ly60mg/ml NaCl25mg/ml, 種結晶			
GCB 5	トポ, 光学観察	Ly100mg/ml NaCl21mg/ml, 種結晶	平板セル	平板セルは観察に最適であるため, 観察専用のセルとする. トポにも使用可能.	東北大
		Ly95mg/ml NaCl21mg/ml, 種結晶			
		Ly55mg/ml NaCl25mg/ml, 種結晶			
GCB 6	トポ	Ly40mg/ml NiCl <sub>2</sub> 100mg/ml no gel,種結晶	キャピラリー 3 cm	GCB 8, 9の濃度拡散法で結晶ができない場合に備え, 種結晶を使った条件とする. 3 cm キャピラリーを使用するためゲルは入れない.	横浜市大
		Ly35mg/ml NiCl <sub>2</sub> 100mg/ml no gel,種結晶			
		Ly35mg/ml NiCl <sub>2</sub> 100mg/ml no gel,種結晶			
		Ly70mg/ml NiCl <sub>2</sub> 100mg/ml no gel			
		Ly70mg/ml NiCl <sub>2</sub> 100mg/ml no gel,種結晶			
		Ly80mg/ml NiCl <sub>2</sub> 100mg/ml no gel,種結晶			
GCB 7	トポ	Ly45mg/ml NiCl <sub>2</sub> 100mg/ml no gel,種結晶	キャピラリー 3 cm	GCB 8, 9の濃度拡散法で結晶ができない場合に備え, 種結晶を使った条件とする.	横浜市大
		Ly40mg/ml NiCl <sub>2</sub> 100mg/ml no gel,種結晶			
		Ly35mg/ml NiCl <sub>2</sub> 100mg/ml no gel,種結晶			
		Ly80mg/ml NiCl <sub>2</sub> 100mg/ml no gel			
		Ly35mg/ml NiCl <sub>2</sub> 100mg/ml no gel			
		Ly40mg/ml NiCl <sub>2</sub> 100mg/ml no gel			
GCB 8	トポ, ロッキング グカーブ	Ly50mg/ml NiCl <sub>2</sub> 100mg/ml 5% ゲル層	キャピラリー 6 cm	濃度拡散法を用いて, 宇宙でのみ成長した結晶を得る.	横浜市大
		Ly55mg/ml NiCl <sub>2</sub> 100mg/ml 5% ゲル層			
		Ly60mg/ml NiCl <sub>2</sub> 100mg/ml 5% ゲル層			
GCB 9	トポ, ロッキング グカーブ	Ly50mg/ml NiCl <sub>2</sub> 100mg/ml 5% ゲル層	キャピラリー 6 cm	濃度拡散法を用いて, 宇宙でのみ成長した結晶を得る.	横浜市大
		Ly55mg/ml NiCl <sub>2</sub> 100mg/ml 5% ゲル層			
		Ly60mg/ml NiCl <sub>2</sub> 100mg/ml 5% ゲル層			
GCB10	トポ, 光学観察	Ly50mg/ml NaCl25mg/ml no gel,種結晶	平板セル	微結晶形成せず, 種結晶が大きくなる最適条件.	JAXA
		Ly50mg/ml NaCl25mg/ml no gel,種結晶			
		Ly50mg/ml NaCl25mg/ml no gel,種結晶			
GCB11	トポ, 光学観察	Ly50mg/ml NaCl25mg/ml no gel,種結晶	平板セル	GCB10と同じ	JAXA
		Ly50mg/ml NaCl25mg/ml no gel,種結晶			
		Ly50mg/ml NaCl25mg/ml no gel,種結晶			

### 3.4. 結晶の輸送、引渡し

日本からオランダへの種結晶輸送時、オランダ・ナイメーヘンからノルドバイクへの輸送時などに種結晶が溶解しないよう、あるいは溶液中に微結晶が発生しないように温度管理を行った。23度に融点のあるヘプタデカン を袋につめ、事前に冷やして固体状態にしておき、発泡スチロールや魔法瓶内に入れたサンプルをヘプタデカン 袋で囲うように梱包することで、高温の室温においても長時間20度—22度の温度制御を行うことができた。

打ち上げは9月14日に予定されており、9月10日にESA がバイコヌール宇宙基地へサンプルを輸送することとなっていたため、9月9日にオランダ ノルドバイクにてグラナダ大学 Garcia-Ruis 教授のグループに日本のサンプルをセルごと引き渡した。日本のセルは9月11日にそのままトレイにセットされ、9月12日に装置にセットされて衛星に搭載された。回収衛星の打ち上げは予定通り9月14日に行われた。

## 4. 解析

回収衛星は9月26日に回収され、27日夜にオランダ ノルドバイクの ESTEC に到着した。我々は28日昼に ESTEC にて試料を引き取った。

その後すぐに結晶の写真撮影、表面観察、共焦点レーザー顕微鏡による内部観察を実施し、日本に帰国後、高エネルギー加速器研究機構、SPring 8 にて品質評価を行った。結晶成長速度、結晶中の欠陥等について新たな知見を得ているが、実験結果については改めてまとめることとする。

## 謝 辞

本実験の実施にあたり、多くの方にお世話になりました。実験機会を提供して下さったグラナダ大学 Juan Manuel Garcia-Ruis 教授、ミッション推進担当として多くの支援をして下さった Dr. Luis Antonio Gonzalez 氏及び Dr. Emilio Melero Garcia 氏、打ち上げ・回収前後に実験室を使用させて下さったナイメーヘン大学 Elias

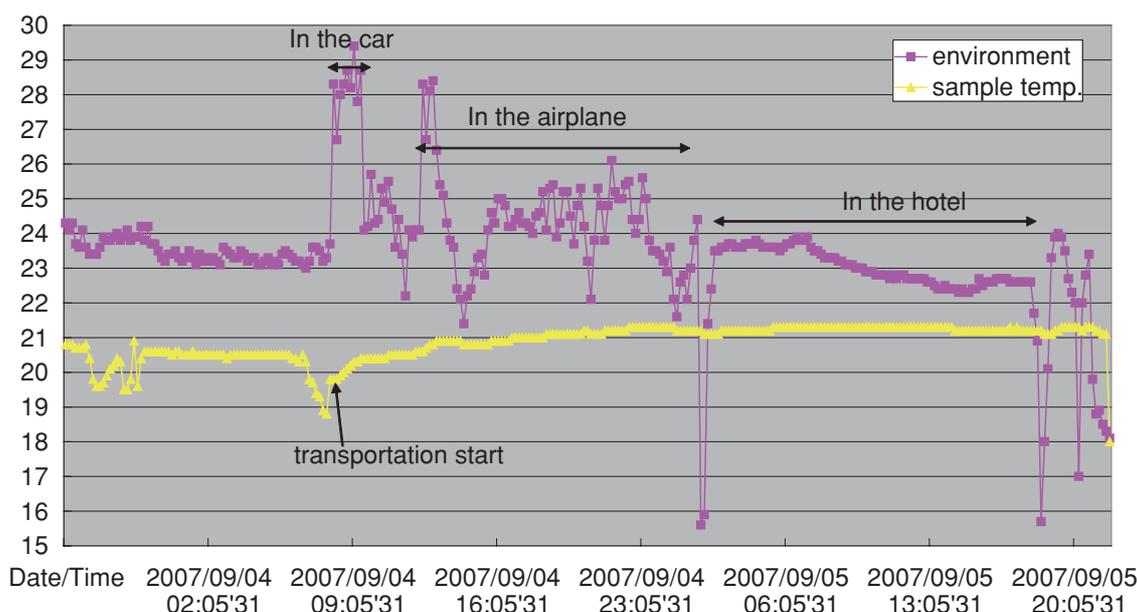


図5 日本からオランダへの輸送時の温度制御実績。縦軸は温度、横軸は時間。黄色がサンプル近辺の温度、ピンクが外部の環境温度を示す。

Vlieg 教授と研究室の皆様，試料の航空機内への持込に関して対応していただきました日本航空の皆様には感謝します。ワーキンググループ活動の支援，国際共同ミッションのための資金援助に関して，宇宙航空研究開発機構に感謝します。東北大学 小野えりか氏，横浜市立大学 小石真由美氏，大矢直希氏，北島菜津子氏，向林祐氏，山元悠氏，株式会社エイ・イー・エス 福山誠二郎氏の実験準備・解析における多大な支援に感謝します。解析には高エネルギー加速器研究機構（課題番号：2007G123），SPring 8（課題番号：2007B1464）を使用しました。ビームタイム配分と支援に感謝します。

宇宙航空研究開発機構特別資料 JAXA-SP-07-022

---

発行日 平成 20 年 2 月 29 日  
編集・発行 宇宙航空研究開発機構  
〒182-8522 東京都調布市深大寺東町 7-44-1  
URL : <http://www.jaxa.jp/>  
印刷・製本 藤原印刷株式会社

---

本書及び内容についてのお問い合わせは、下記にお願いいたします。  
宇宙航空研究開発機構 情報システム部 研究開発情報センター  
〒305-8505 茨城県つくば市千現 2-1-1  
TEL : 029-868-2079 FAX : 029-868-2956

---

©2008 宇宙航空研究開発機構

※本書の一部または全部を無断複写・転載・電子媒体等に加工することを禁じます。

