

ハイドロゲルを用いた固相中タンパク質結晶化技術

育成研究：JSTイノベーションプラザ大阪 平成20年度採択課題
「溶液構造制御によるタンパク質結晶化技術の開発」



代表研究者：大阪大学大学院工学研究科 准教授 松村浩由

■ 研究概要

X線結晶解析で必須のタンパク質結晶化と結晶取扱における課題を克服すべく、ハイドロゲルを用いた固相中タンパク質結晶化技術を開発し、固相中タンパク質結晶化キット、結晶取り出しツール、マイクロナイフの開発を行った。

■ 研究内容、研究成果

プロテオーム研究により創薬ターゲットとなる疾患関連タンパク質が次々と同定されている。これらのタンパク質の立体構造を解明すれば、タンパク質の働きを制御する化合物を設計でき、創薬プロセスが大幅に短縮できる。そのため、X線結晶解析によるタンパク質立体構造決定が盛んに行われている。近年、シンクロトン放射光や大型計算機の発展によってX線構造解析は加速したが、その解析に必須であるタンパク質の結晶化やマウント操作においては技術的進展が見られず、未だ試行錯誤による不確実な方法で行われている。

これらの技術課題を解決する目的で、我々はハイドロゲルを用いた固相中タンパク質結晶化技術を開発した。この手法は、通常溶液中で行うとされてきたタンパク質結晶化を固相（アガロースゲル中）で行うというものである。本研究では、まず本技術の適用可能性を検証すべく、性質の異なるタンパク質（9種）において結晶化試験を行い、この技術が様々なタンパク質において有効であることを示した（図1）。さらに、この研究の過程において、アガロースゲルの濃度上昇とともに結晶化確率が増加し、高品質の結晶が得られるといった想定外の成果を得ることができた（図2）。

次に、本技術をさらに高度化する目的で、フェムト秒レーザー加工と固相中タンパク質結晶化技術を組み合わせた。このレーザー加工は、過去に我々が溶液中のタンパク質結晶を加工するために開発した技術であるが、結晶を加工する際に結晶が移動したり壊れたりするという課題があった。本研究で新たにレーザー加工システムを構築し、固相中タンパク質結晶の切断を行ったところ、固相中タンパク質結晶は移動しないため、効率良く加工できることがわかった（図3）。このシステムを用いてタンパク質結晶に直接接触することなく結晶がマウントできることも確認できた。

さらに上述の研究成果を踏まえ、結晶化キット GEM プレート (Gel Enhanced crystallization Method、図4)、結晶取り出しツール(図5)、マイクロナイフを開発した。これらのキットを用いると、従来よりも良質なタンパク質結晶が得られるケースも確認でき、今後市販化を推し進めていく予定である。

■ 今後の展開、将来の展望

本研究の成果によって、X線構造解析の技術課題を克服することができ、今後のタンパク質の構造解析ならびに創薬研究の加速が期待できる。また、本研究を推進してきた過程において、想定外の新たな研究シーズを発見することができ、今後、これらの研究シーズをさらに発展すべく研究を進めていく予定である。

市販化を目指す結晶化キットや結晶取り出しツール等については、試作品レベルでの技術的問題点は本研究課題で解決できた。そのため、結晶取り出しツールとマイクロナイフは市販化に至っている。ただし、量産レベルでの技術的問題点はまだ未着手であり、今後の課題である。まずは全開発品を市販化させ、その後、売り上げ状況を見極め、課題解決に向けた取り組みを行う予定である。



図1 固相中で得られたタンパク質結晶

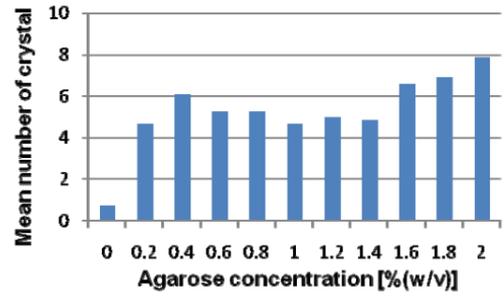


図2 アガロースゲル濃度とタンパク質結晶の数の相関

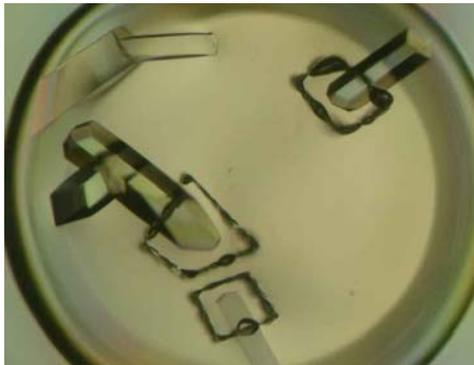


図3 フェムト秒レーザーで加工したタンパク質結晶



図4 固相中結晶化ツール GEM プレート



図5 結晶取りだしツール クリスタルキャッチャー

■ 研究体制

- ◆ 代表研究者
大阪大学大学院工学研究科 准教授 松村浩由
- ◆ 研究者
廣瀬未果（大阪大学大学院工学研究科）、井上豪（大阪大学大学院工学研究科）
- ◆ 共同研究機関
（株）創晶

■ 研究期間

平成20年4月 ～ 平成23年3月