

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 分子配列による蛋白モジュールの開発と展開

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

徳永 史生(大阪大学 大学院理学研究科 教授)

主たる共同研究者

兼松 泰男 (大阪大学 先端科学イノベーションセンター 教授 )

増原 宏 ((財)濱野生命科学研究財団 主席研究員)

開 祐司 (京都大学 再生医科学研究所 教授)

森 肇 (京都工芸繊維大学 繊維学部 教授)

佐々木 孝友 (大阪大学 大学院工学研究科 教授)平成18年3月まで

3. 研究内容及び成果

### 3 - 1 研究課題全体

本研究は、蛋白モジュールをナノレベルからマイクロレベルで自在に操ることにより、生体組織に対応するティッシュモジュール、あるいは、新しい機能を発現するティッシュモジュールの構築を目指し、ナノ自己組織化からマイクロ自己増殖を実現することを目的に、(1)蛋白モジュール候補の絞り込み(2)多角体蛋白モジュールの機能発現、(3)細胞の増殖・分化制御の新しい方式の提案に関する研究を進めた。

蛋白モジュール候補の絞り込みでは、カイコウイルス由来の蛋白質からなる多角体を用いて目的の蛋白質を固定化する法が蛋白モジュールとして最も適していることを見いだした。また、派生研究としてフェムト秒レーザーを用いた結晶核発生、溶液攪拌による大型高品質化という新しい原理を用いた新規蛋白質の結晶化技術開発に成功した。この結晶化技術を用いて、平成17年7月にベンチャー企業「創晶」を起業した。

多角体モジュールの機能発現では、多角体の結晶構造解析に基づき、多角体の立体構造を明らかにすることに成功した。この立体構造情報に基づき、N末端部分配列を用いた蛋白質固定化法の開発に成功した。また、固定化したサイトカインの生理活性を調べ、4種類のサイトカインに生理活性が認められた。また、多角体蛋白モジュールにおいて、包埋蛋白質が十分に運動の自由度を保持しており、機能性発現の基礎となる構造変化が可能であることを顕微時間分解蛍光分光によって明かとした。さらに、生理活性の確証を得るために、FGF2固定化多角体の細胞増殖と分化を調べ、EGF2多角体と接触する空間的に限定された位置の細胞群のみが増殖応答を示すことを見いだした。

細胞の増殖・分化制御の新しい方式の提案では、レーザーマニピュレーション技術を利用したモジュールの構築手法を検討し、レーザーとラッピングによる蛋白質モジュールの配列、フェムト秒レーザー誘起衝撃波による単一細胞操作による新しいマイクロパターンング手法を確立した。この手法でマイクロパターンングしたFGF2固定化多角体上での細胞培養を実施し、培養パターン制御の可能性を見いだした。

また、細胞増殖・分化のその場評価法として、細胞内外の生体関連分子の自家蛍光をターゲットとし、その消長や時間的・空間的挙動を追跡するイメージング法を開発した。

### 3 - 2 グループ毎

#### (1) 徳永・兼松グループ

このグループでは、レーザー分光法による多角体および細胞増殖・分化の評価を担当した。

多角体蛋白モジュールにおいて、包埋蛋白質が十分に運動の自由度を保持しており、機能性発現の基礎

となる構造変化が可能であることを顕微時間分解蛍光分光によって明かとした。

また、細胞増殖・分化のその場評価法として、細胞内外の生体関連分子の自家蛍光をターゲットとし、その消長や時間的・空間的挙動を追跡するイメージング法を開発した。

#### (2) 森グループ

このグループでは、多角体モジュール作製および評価を担当した。

蛋白モジュール候補の絞り込みでは、カイコウイルス由来の蛋白質からなる多角体を用いて目的の蛋白質を固定化する法が蛋白モジュールとして最も適していることを見いだした。

多角体モジュールの機能発現では、多角体の結晶構造解析に基づき、多角体の立体構造を明らかにすることに成功した。この立体構造情報に基づき、N末端部分配列を用いた蛋白質固定化法の開発に成功した。また、固定化したサイトカインの生理活性を調べ、4種類のサイトカインに生理活性が認められた。

#### (3) 開・増原グループ

このグループでは、細胞増殖・分化制御とレーザーマニピレーション法を担当した。

生理活性の確証を得るために、FGF2固定化多角体の細胞増殖と分化を調べ、FGF2多角体と接触する空間的に限定された位置の細胞群のみが増殖応答を示すことを見いだした。

細胞の増殖・分化制御の新しい方式の提案では、レーザーマニピレーション技術を利用したモジュールの構築手法を検討し、レーザーとラッピングによる蛋白質モジュールの配列、フェムト秒レーザー誘起衝撃波による単一細胞操作による新しいマイクロパターニング手法を確立した。この手法でマイクロパターニングしたFGF2固定化多角体上での細胞培養を実施し、培養パターン制御の可能性を見いだした。

#### (4) タンパク素子作製グループ(平成14年11月～平成18年3月)

このグループでは、シグナル因子であるタンパク質の微結晶の作製を担当した。

フェムト秒レーザーを用いた結晶核発生、溶液攪拌による大型高品質化という新しい原理を用いた新規蛋白質の結晶化技術開発に成功した。この結晶化技術を用いて、平成17年7月にベンチャー企業「創晶」を起業した。

### 4. 事後評価結果

#### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

| 論文<br>(原著) |    | 口頭<br>(ポスター) |     | 招待講演 |    | その他<br>(著作など) | 特許出願 |    |
|------------|----|--------------|-----|------|----|---------------|------|----|
| 国際         | 国内 | 国際           | 国内  | 国際   | 国内 | 国際&国内         | 国際   | 国内 |
| 63         | 13 | 61           | 146 | 27   | 35 | 26            | 6    | 8  |

論文、口頭発表数はほぼ妥当であるが、基礎的研究のため、招待講演数、出願数が少ない。また、多角体の結晶構造解析結果を記載した論文がNatureに掲載された。

当初の壮大なる計画は、中間評価で修正され、ユニークな多角体蛋白モジュールに研究対象を絞り込んだが、生物の階層性をモジュール化によって模倣する試みは成功しなかった。しかし、要素技術として、蛋白モジュールおよび細胞操作に関し、フェムト秒レーザーを用いたマイクロパターニング法を見だし、派生的研究成果であるが、蛋白質の結晶化方法として画期的な手法を開発したことは特筆できる成果である。

#### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

要素技術として見いだした、レーザー核発生による蛋白質の結晶化手法、集光フェムト秒レーザーを利用した多角体および生細胞のマイクロパターニング手法などはインパクトのある研究成果である。

蛋白質の新規結晶化手法は、創薬などに必要な構造解析のための実用技術になっており、今後生命科学領域の大きな発展に貢献が期待できる。フェムト秒レーザープロセッシングによる細胞オーダーのマイクロパターンニングは、従来空白域にあった空間サイズのパターンニング技術として拡がり期待できる。

#### 4 - 3 . その他特記事項(受賞歴など)

##### (1) 主な受賞

2005年 光産業技術振興協会 櫻井健二郎記念賞受賞

増原宏 教授、佐々木孝友 教授、森勇介 教授、細川陽一郎 研究員

2006年 日本化学会賞受賞 増原 宏 教授

2006年 Porter Medal 2006 受賞 増原 宏 教授

##### (2) 今後の展開、実用化に向けた展開

研究成果が評価され、CREST 研究「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」の「タンパク質完全結晶創成」(研究代表者 森勇介)の研究に、平成 19 年度地域新生コンソーシアム研究開発事業「増殖因子徐放化担体を固相化した細胞培養基材の開発」(代表者 森 肇 教授)に繋がった。

また、蛋白質の結晶化研究で見いだした画期的な手法を基盤にして、平成 17 年 7 月にベンチャー企業(創晶)を立ち上げ、タンパク質、低分子化合物の結晶化受託事業を進めている。

また、森肇教授を中心として、サイトカイン固定化多角体を用いた臍帯血幹細胞増殖と心筋修復(先端医療振興財団との共同研究)、角膜再生(京都府立医科大学、同志社大学との共同研究)、再生医療への応用と細胞培養器材の開発(住友ベークライトとの共同研究)を進めている。