

「医療に向けた自己組織化等の分子配列制御による機能性材料・システムの創製」
平成14年度採択研究代表者

徳永 史生

(大阪大学大学院理学研究科 宇宙・地球科学専攻 教授)

「分子配列による蛋白モジュールの開発と展開」

1. 研究実施の概要

生体組織は特定の分子、分子集合体、細胞が特定の配置をすることによって形成されている階層構造を持って機能を発現している。そこで、本事業では、生体組織の人工的構築を目指し、細胞組織化の各階層をモデル化しモジュールを作製する。これらモジュールとは、蛋白質をクラスター化した蛋白モジュール、蛋白モジュールを高度集積化したサブセルラーモジュール、サブセルラーモジュール上で蛋白や細胞が機能性組織として機能するティッシュモジュールである。これら全ての階層をレーザープロセッシング技術によりつなぎ分子制御を行い、ナノ自己組織化からマイクロ自己増殖を実現する。

本年度は、1)新規蛋白質結晶化技術の実用化、2)カイコウイルス由来の蛋白質多角体結晶の細胞増殖誘導、3)レーザーを用いた蛋白モジュール配列、4)モデル蛋白質の分光による蛋白モジュール機能検証、において研究の進展をみた。

2. 研究実施内容

生体組織においては特定の分子、分子集合体、細胞が固有の配置、階層構造を持って機能を発現している。本研究では生体組織の人工的構築をはかるため、ナノ自己組織化からマイクロ自己増殖への展開を可能にする技術の開発を目指している（右図1）。各階層をモデル化し、蛋白、サブセルラー、ティッシュの各モジュールを作製する。これらをレーザープロセッシングを用い自由に操り各階層をつなぐことにより機能集積チップ、自己増殖誘導型チップの実現、細胞工学や再生医療といった分野で



図1 本プロジェクトのイメージ図

の基盤技術提供を目指している。

これまで蛋白モジュール開発に重点を置き研究を進めてきた。蛋白モジュール開発では、新規蛋白質結晶化法の開発に成功し蛋白モジュール作製班の佐々木グループを母体とした大学発ベンチャーが誕生する予定である。さらに有望な蛋白モジュールとしてカイコウイルス由来の蛋白質を利用した多角体結晶（図2）の研究が進んだ。細胞増殖誘導グループと共同で実際に生理活性蛋白質を封入し、細胞の増殖誘導実験が行われ、細胞増殖が多角体結晶からのシグナルによって誘引されることが確認された。この結果は、多角体結晶が蛋白モジュールとして蛋白質の機能を保持したまま自由に運べる能力を有していることを示したものであり、サブセルラーモジュール開発への道を開いたといえる。現在モジュール作製グループが多角体結晶を並べた基板開発を行っており、自由に配列制御できる系を開発中である。一方モジュール機能発現グループでは、多角体結晶の物性に焦点をあて分光学的見地から多角体結晶における蛋白質の生理機能発現

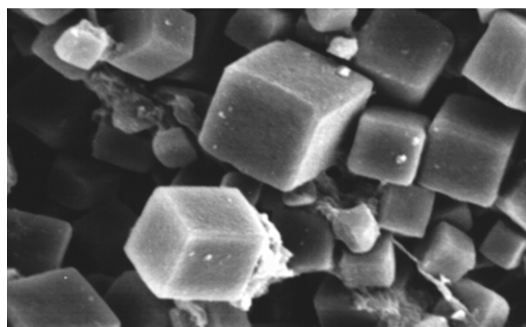


図2 多角体結晶の電顕写真

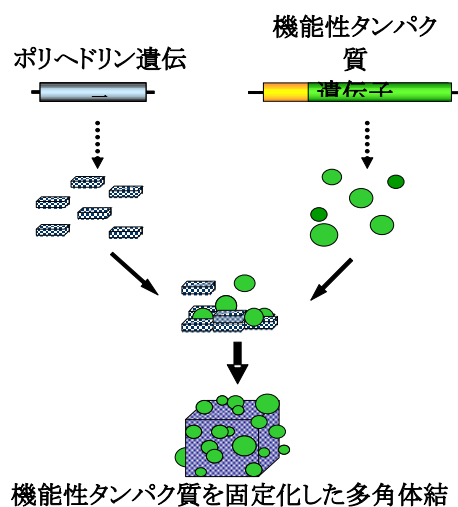


図3 多角体結晶の作製方法

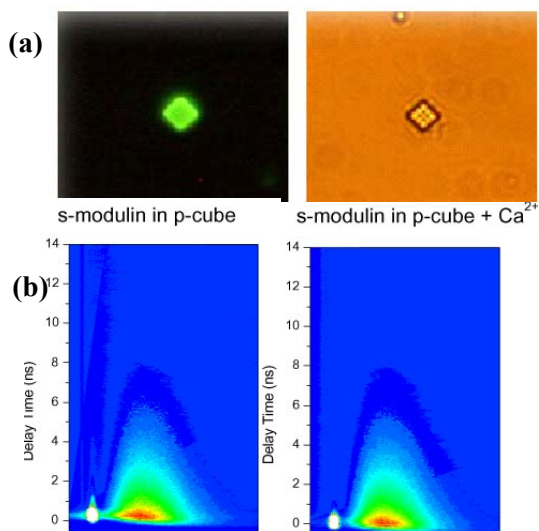


図4 多角体結晶の分光データ

- (a) GFPを封入した多角体、左が蛍光像で右が透過像
- (b) S-モジュリンを封入した多角体の時分割蛍光データ、左がカルシウムなし、右がカルシウムを加えたもの

とその機構について研究を行っている。多角体結晶は、標的蛋白質の遺伝子が入手できればどのような蛋白質も封入し、昆虫細胞内ではあるが自己組織化過程を経て、固定化できる可能性を持っており（図3）、GFPなどの分光学的によく知られたモデル蛋白質を封入し研究を進めている（図4）。これら知見から多角体結晶の構造形成や封入された蛋白質の構造・機能などの情報が明らかにされるものと期待している。今後、蛋白質の種類を増やしデータの蓄積をさらに進める予定である。さらにモジュール機能発現班では細胞増殖誘導班と共同で細胞からのシグナル伝達過程追跡を目的とした、分光技術開発も進めている。

また他のグループとの共同研究に関して

も当グループ蛋白モジュール作製班では、藤田グループが合成した化合物を結晶化するという形で共同研究を推進している。

3. 研究実施体制

蛋白モジュール作製グループ：

①研究グループ長：佐々木 孝友（大阪大学大学院工学研究科 教授）

②研究項目：シグナル因子である蛋白質の微結晶の作製

モジュール作製グループ：

①研究グループ長：増原 宏（大阪大学大学院工学研究科 教授）

②研究項目：光圧特有の蛋白質集合体の形成と配列制御およびレーザー操作による細胞・蛋白質の空間制御

モジュール機能発現グループ：

①研究グループ長：徳永 史生（研究代表者・大阪大学大学院理学研究科 教授）

②研究項目：モジュールの高度な機能評価

細胞増殖誘導グループ：

①研究グループ長：開 祐司（京都大学再生医科学研究所 教授）

②研究項目：細胞を用いたマイクロ自己増殖誘導

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- “Nondestructive isolation of single cultured animal cells by femtosecond laser-induced shockwave”
Yoichiroh Hosokawa, Jyun-ichi Takabayashi, Shigenori Miura, Chisa Shukunami, Yuji Hiraki, Hiroshi Masuhara
Applied Physics A, Vol. 79, pp. 795-798 (2004)
- “Structure of photoactive yellow protein (PYP) E46Q mutant at 1.2 Å resolution suggests how Glu46 controls the spectroscopic and kinetic characteristics of PYP”
M. Sugishima, N. Tanimoto, K. Soda, N. Hamada, F. Tokunaga and K. Fukuyama
Acta Cryst. D60, 2305-2309 (2004)
- “Resonance Raman spectroscopy reveals the origin of an intermediate wavelength form in photoactive yellow protein”
Samir F. El-Mashtoly, Masashi Unno, Masato Kumauchi, Norio Hamada, Kimiyo Fujiwara, Jun Sasaki, Yasushi Imamoto, Mikio Kataoka, Fumio Tokunaga and Seigo Yamauchi
Biochemistry, Vol. 43, pp. 2279-2287 (2004)
- “Effects of Solution Stirring on Protein Crystal Growth”

Mari Yaoi, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Hiroyoshi Matsumura, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori and Takatomo Sasaki,

Japanese Journal of Applied Physics 43 (2004) L686 - L688

- "Generation of Protein Crystals Using a Solution-Stirring Technique"
Hiroaki Adachi, Ai Niino, Hiroyoshi Matsumura, Kazufumi Takano, Takayoshi Kinoshita, Masaichi Warizaya, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori and Takatomo Sasaki,
Japanese Journal of Applied Physics 43 (2004) L762 - L764
- "Effect of Stirring Method on Protein Crystallization":
Mari Yaoi, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Hiroyoshi Matsumura, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori and Takatomo Sasaki,
Japanese Journal of Applied Physics 43 (2004) L1318 - L1319
- "Membrane Protein Crystallization Using Laser Irradiation"
Hiroaki Adachi, Satoshi Murakami, Ai Niino, Hiroyoshi Matsumura, Kazufumi Takano, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori, Akihito Yamaguchi and Takatomo Sasaki,
Japanese Journal of Applied Physics 43 (2004) L1376 - L1378
- "Control of Protein Crystal Nucleation and Growth Using Stirring Solution"
Ai Niino, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Hiroyoshi Matsumura, Takayoshi Kinoshita, Masaichi Warizaya, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori and Takatomo Sasaki,
Japanese Journal of Applied Physics 43 (2004) L1442 - L1444
- "Phosphorylation of teleost phosphatases and its effect on the affinity to G-protein beta gamma subunits"
Yuko Kobayashi, Osamu Hisatomi and Fumio Tokunaga
Biochim. Biophys. Res. Commun. 322, pp.477-482 (2004)
- "Vibrational relaxation in the 1B_u state of carotenoids as determined by Kerr-gate fluorescence spectroscopy"
Ryosuke Nakamura, Ritsuko Fujii, Hiroyoshi Nagae, Yasushi Koyama and Yasuo Kanematsu
Chemical Physics Letters, Vol.400, pp. 7-14 (2004)
- "Resonance Raman evidence for two conformations involved in the L intermediate of photoactive yellow protein"
Masashi Unno, Masato Kumauchi, Norio Hamada, Fumio Tokunaga, and Seigo Yamauchi
J. Biol. Chem., 279 (23), pp.23855-23858 (2004)
- "Low-frequency vibrations and their role in ultrafast photoisomerization reaction dynamics of photoactive yellow protein"

Haik Chosrowjan, Seiji Taniguchi, Noboru Mataga, Masashi Unno, Seigo Yamauchi, Norio Hamada, Masato Kumauchi and Fumio Tokunaga

J. Phys. Chem. B 108, pp.2686-2698 (2004)

- “Protein Microarrays by Laser Patterning and Fixation of Single Protein Microcrystals: Implication for Highly Integrated Protein Chip”

Yoichiroh Hosokawa, Satoshi Matsumura, Hiroshi Masuhara, Keiko Ikeda, Ai Shimo-oka, Hajime Mori

Journal of Applied Physics, 2004, Vol. 96, pp. 2945-2948 (2004)

- “Protein Crystallization by Combining Laser Irradiation and Solution-Stirring Techniques”

Hiroaki Adachi, Ai Niino, Satoshi Murakami, Kazufumi Takano, Hiroyoshi Matsumura, Takayoshi Kinoshita, Masaichi Warizaya, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori and Takatomo Sasaki,

Japanese Journal of Applied Physics 44 (2005) 1365 - 1366

- “Femtosecond spectral snapshots based on electronic optical Kerr effect”

R. Nakamura and Y. Kanematsu

Review of Scientific Instruments, Vol 75, No. 3, pp.636-644 (2004)

- “創晶プロジェクト～新しいタンパク質結晶育成技術の開発～”

安達宏昭, 新納愛, 北野博史, 村上聡, 高野和文, 松村浩由, 井上豪, 森勇介, 佐々木孝友,

構造生物 Vol.10 No.2 (2004) 41-54

- “短パルスレーザーを用いた有機分子・蛋白質の結晶化”

細川陽一郎, 安達宏昭, 森勇介, 佐々木孝友, 増原宏

化学と生物 42 (2004) 802-805

- “レーザー照射による蛋白質結晶成長制御”

安達宏昭, 高野和文, 松村浩由, 井上豪, 森勇介, 佐々木孝友,

日本結晶学会誌 46 (2004) 238-242

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：9件（CREST研究期間累積件数：10件）