

「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 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

本事業では、生体組織の階層構造による機能発現に倣い、蛋白モジュール、サブセルラーモジュール、ティッシュモジュールという各階層を設定してモデル化し、蛋白質およびそのクラスターレベルにおけるナノ自己組織化から細胞レベルのマイクロ自己増殖へと階層をつないで、機能発現を試みる。初年度から四年度にかけ、それぞれのモジュールに対応する要素技術の研究をグループに分かれ、連携を取りつつ研究を進めてきた。蛋白モジュールの作製に関しては、蛋白質結晶化技術の開発自体として進展があり、ベンチャー企業が設立されるとともに、新たなCREST事業も立ち上がった。ただし、細胞との相互作用という視点からは、適用へのハードルは高い。一方で、カイコウィルス由来の多角体結晶は、遺伝子操作により、自己組織化により数ミクロンサイズの機能蛋白を取り込んでモジュールとなる。従来法のような蛋白精製やモジュール製作などの工程を必要とせず、非常に有効かつ強力な方法である。重要な成果として、細胞増殖因子を包埋した多角体蛋白モジュールの細胞増殖誘導を検証した。さらに、多角体結晶ならびに細胞を水中で基板上に配列することを、フェムト秒レーザー誘起ショックウェーブを用いる独自の方法で達成し、サブセルラーサイズの空間パターン形成に成功し、サブセルラーモジュール構築への道を開いた。今後、「多角体蛋白モジュールによる細胞増殖・分化制御とレーザーマニピュレーションによる時空間的配列制御」の先導的な例を示すとともに多角体蛋白モジュールの作用機構の解明を試みる。本事業の到達点としては、細胞生物学の新規ツールとして、細胞の増殖・分化制御の新しい方式の提案を図ることである。

2. 研究実施内容

蛋白結晶化技術が格段に進展し、育成困難な蛋白質の結晶化や大型結晶育成に次々と成功し、起業に結実した。一方、年度当初、目標としてかかげた 4 点に関して研究実施し、以下の結果を得た。

(a) 多角体結晶の物性測定および解析

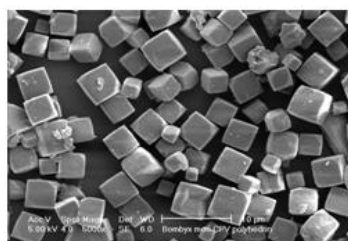
カルシウムイオン添加によるエスモジュリン構造変化を、トリプトファン蛍光スペクトル

をプローブとして顕微分光レベルで追跡し、多角体結晶中に包埋された蛋白として機能することを、検証した。蛍光相関法による測定を行い、溶液中で相互作用する蛋白分子の一方を多角体に包埋し、多角体結晶表面挙動分析により、相互作用の観点から蛋白質機能が保持されているという新たな証左を得た。

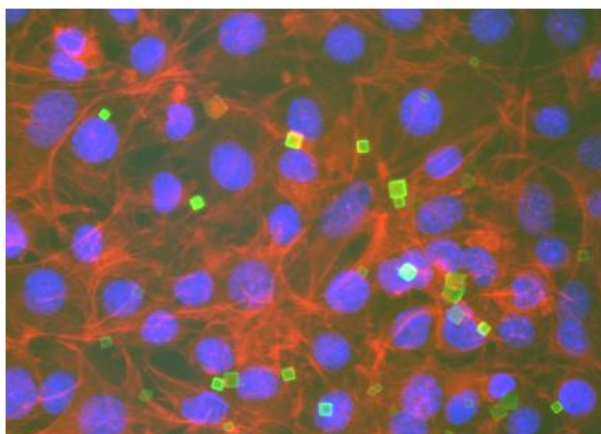
(b) 多角体結晶を用いた細胞分化制御

線維芽細胞増殖因子 FGF2 を包埋した多角体結晶が、線維芽細胞 NIH3T3 の増殖に効果があることを見出し、これを検証した。

線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast Growth Factor, FGF) の 1 つである FGF2 を固相化し、固相化された FGF2 の活性を調べるために NIH3T3 細胞への増殖誘導効果を調べた。



FGF2固定化多角体



EGFP固定化多角体をNIH3T3細胞に播種したところ

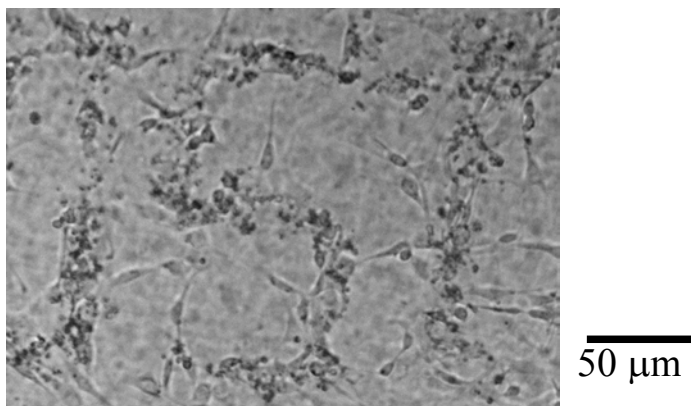
Hoechst 33258 を用いて DNA 量を定量化した場合においても、BrdU を取り込ませることで測定した DNA 合成速度においても、多角体固定化 FGF2 が細胞増殖を誘導する活性を有していることが確認できた。多角体固定化 FGF2 を添加した細胞では MAP kinase のリン酸化が確認され、DNA 量の増加や DNA 合成量の上昇は、多角体に固定化されている FGF2 によって誘導された現象であることが確認できた。以上の結果から、多角体固定化 FGF2 が本来の生理活性を保持していることが確認され、この細胞の増殖誘導は MAP kinase を介したシグナル伝達によるものであると結論付けられた。

(c) レーザーを用いた細胞操作と分化制御因子導入研究

多角体結晶ならびに細胞を基板上に配列することを、フェムト秒レーザー誘起ショックウェーブを用いる独自の方法で達成し、サブセルラーサイズの空間パターン形成に成功した。

多角体の配列を行なった結果、数 10 μ m 程度の分解能で多角体をターゲット基板に転写

することに成功した。また、この分解能で秒速 100 μm の速度で線状のパターンを描画することができた。本手法により多角体に含まれる蛋白質に大きなダメージを与えないことが、緑色蛍光蛋白質を含んだ多角体を転写した結果から確認できた。また、顕微鏡上に配置された 2 つの電動ステージを駆使することにより、2 種類の多角体をこの分解能で転写することにも成功し、本手法で多種類の多角体を転写できることが示された。さらに、ターゲット基板に転写した多角体の上で、細胞を育成した結果、多角体上で特異的に細胞を生育することに成功した。



多角体を”JST”の文字にパターンニングし、その上で細胞培養した結果。

配列した多角体上のみ細胞が育生する様子が観察された。

(d) 細胞内反応ならびに細胞分化過程追跡へ向けた分光技術開発

励起波長、時間特性、蛍光スペクトルを組み合わせることで、成分分離を高めた顕微イメージ分光システムを開発し、軟骨分化モデル細胞 ATDC5 の細胞分化制御への適用を試みた。時間分解蛍光スペクトル、励起スペクトルを瞬時に観測できる蛍光多元要素同時測定システムを開発した。色素混合溶液を用いた予備的実験において、得られた蛍光多元要素データに対して差分および特異値分解を適用することにより、精度の高い成分分離に成功した。軟骨分化モデル細胞 ATDC5 の、分化のステージに対応するコラーゲン組成の変化に対応すると推測されるスペクトル変化を見いだした。さらに、励起光を線上に集光・掃引する方式により高速のイメージ取得を可能にし、感染した植物葉の細胞イメージングにおいて葉緑体と分離し、感染産物の可視化に成功した。

3. 研究実施体制

蛋白質子作製グループ

①研究分担グループ長：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

概要：シグナル因子である蛋白質の微結晶の作製を行う。方法としては、昆虫ウイルス由来の多角体結晶を用いる方法（森肇グループ）とレーザーによる蛋白質結晶化法（佐々木グループ）がある。この二種類の方法を駆

使し、蛋白質モジュールの作製を行う。またこの手法を多様な蛋白質に用いる方法も開発する。このことによりあらゆる蛋白質をモジュール化することが可能になると考えている。本プロジェクトの最も基礎的な根幹をなすグループである。

モジュール作製グループ

①研究分担グループ長：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

概要：レーザーを用いた蛋白質モジュールならびに蛋白質の配列制御を行う。レーザーを用いた細胞・蛋白質の空間制御を行う。これら技術によりナノ自己組織化からマイクロ自己増殖への道を切り開けると考えている。本プロジェクトのモジュールという概念の階層構造を結びつける重要な役割を担うグループである。

モジュール機能発現グループ

①研究分担グループ長：徳永 史生（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

概要：レーザーによる観測技術開発を行い、蛋白モジュール、サブセルラーモジュールの高度な機能評価を行う。本プロジェクトの自己組織化制御ならびにマイクロ自己増殖制御のメカニズム解明を担うグループであり、必要不可欠である。

細胞増殖誘導グループ

①研究分担グループ長：開 祐司（京都大学・再生医科学研究所、教授）

②研究項目：マイクロ自己増殖誘導

概要：細胞のマイクロ自己増殖をサブセルラーモジュール上で行う。このことによりナノ自己組織化を利用したマイクロ自己増殖を完了させる。本プロジェクトの最終の仕事を決めるグループであり、このグループ抜きではプロジェクトの遂行は不可能である。

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Kengo Takeuchi, Hiroshi Kitano, Hiroaki Adashi, Yusuke Mori, Takatomo Sasaki, Hiroyoshi Matsumura, Tsuyoshi Inoue, Satoshi Murakami, Masaaki Doi,

Yuichi Koga, Kazufumi Takano, Shigenori Kanaya

「Protein Crystal Growth Using Laser-Processed Seed Crystals」 *Japanese Journal of Applied Physics*, Vol.44, No.5A, pp. 3177-3179

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

「Solution stirring initiates nucleation and improves the quality of adenosine deaminase crystals」 *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, ISSN 0907-4449

- Yoichiro Hosokawa, Hiroshi Masuhara,

「ソフトマテリアルのフェムト秒レーザー加工～レーザーアブレーションのメカニズムと加工への応用～」光アライアンス 5月号

- 細川陽一郎、松本由多加、山戸俊幸、林克明、大本剛、王勇、佐藤節哉、増原宏

「顕微鏡下に集光した高強度レーザーを用いた単一細胞の選別とスクリーニング」
日本レーザー医学会誌 Vol.26, No.1, 45-52

- Hiroaki Adachi, Ai Niino, Kazufumi Takano, Hiroyoshi Matsumura, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori, Takatomo Sasaki

「Temperature-Screening System for Determining Protein Crystallization Conditions」
Japanese Journal of Applied Physics, Vol.44, No.6A, pp. 4080-4083

- Masafumi Kashii, Hiroshi Kitano, Yoichiro Hosokawa, Hiroaki Adachi, Yusuke Mori, Takatomo Sasaki, Hiroshi Masuhara, Kazufumi Takano, Hiroyoshi Matsumura, Tsuyoshi Inoue, Satoshi Murakami, Kazuomi Sugamoto, Hideki Yoshikawa

「Femtosecond Laser Processing of Protein Crystals in Crystallization Drop」 *Japanese Journal of Applied Physics*, Vol.44, No.27, pp. L873-L875

- Masafumi Kashii, Hiroshi Kitano, Yoichiro Hosokawa, Hiroaki Adachi, Yusuke Mori, Takatomo Sasaki, Hideki Yoshikawa

「Femtosecond Laser Processing of Lysozyme Crystals」 *International Quantum Electronics Conference 2005 and the Pacific Rim Conference on Lasers and Electro-Optics 2005 (IQEC/CLEO-PR 2005)*

- Hiroshi Y. Yoshikawa, Yoichiro Hosokawa, Kenji Suzuki, Keiko Ikeda, Hajime Mori, and Hiroshi Masuhara

「Fluorescence Evaluation of Antigen-Antibody Reactivity on Surface of Proteinaceous Occlusion Body: Toward Application in Reusable Protein Chip」 *Japanese Journal of Applied Physics*, Vol.45, No.1A, pp. 323-327

- Hiroshi Y. Yoshikawa, Yoichiro Hosokawa, Hiroshi Masuhara

「Explosive Crystallization of Urea Triggered by Focused Femtosecond Laser Irradiation」
Japanese Journal of Applied Physics, Vol.45, No.1, pp. L23-L26

- Hiroshi Y. Yoshikawa, Yoichiro Hosokawa, and Hiroshi Masuhara

「Spatial Control of Organic Crystal Growth by Focused Femtosecond Laser Irradiation,」
Crystal Growth & Design, 2006, Vol. 6, pp. 302-305.

- Keiko Ikeda, Hiroshi Nakazawa, Ai Shimo-Oka, Kaoru Ishio, Seiji Miyata,
Yoichiro Hosokawa, Satoshi Matsumura, Hiroshi Masuhara, Serge Bellonci,
Robert Alain, Naoki Goshima, Nobuo Nomura, Kenichi Morigaki, Atsushi Kawai,
Toshihiro Kuroita, Bunsei Kawakami, Yaeta Endo, and Hajime Mori
「Immobilization of diverse foreign proteins in viral polyhedra and potential application for
protein microarrays,」 *PROTEOMICS*, 2006, Vol. 6, pp. 54-66.

(2) 特許出願

H17 年度出願件数：0 件（CREST 研究期間累積件数：10 件）