

「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

これまで、蛋白モジュール、サブセラーモジュール、ティッシュモジュールという各階層を設定し、対応する要素技術に関する研究を実施してきた。最終局面に入り、カイクウィルス由来の多角体蛋白モジュールの物性評価、機能発現と細胞増殖・分化への適用、ならびにレーザープロセスによる細胞の増殖・分化制御の新しい方式に関する研究に集中している。多角体蛋白結晶の結晶構造が決定され、タイトな三量体を基本とした含水率の極めて低い特異な構造が明らかにされる、という注目すべき成果を得た。今後、多角体結晶の結晶化メカニズム解明や蛋白モジュールの性能を向上させる新たな結晶の作出に取り組む。多角体中に固定化された蛋白の機能発現に関しては、線維芽細胞増殖因子 FGF2に加えて、二量体形成が作用機構として必須となる増殖因子も含め、蛋白モジュールとして機能可能な固定化蛋白の広がりを見いだした。また、時間分解レーザー分光により、固定化蛋白の運動性が溶液中と比べ大きな違いがないという、機能発現のための環境が存在することを裏付ける結果を得た。今後、軟骨分化モデル細胞である ATDC5 や血管内皮細胞 HUVEC などを用い多角体を用いた細胞生物学的研究を進める一方で、多角体への固定化量の検討、さらには多角体からのリリースがあるのかなど多角体の物理化学的性質の解明を進める。さらに、レーザープロセスによる多角体結晶、ならびに細胞の配列制御に関する技術を開発し、多角体の配列形状をミクロンオーダーで制御することを可能にした。今後、レーザープロセスによる多角体蛋白モジュールのパターニングにより、多角体から細胞への情報伝達様式をさらに詳細に明らかにしていく。

### 2. 研究実施内容

多角体蛋白モジュールの物性評価に関して注目すべき成果を得た。ニュージーランド・オークランド大学と進めていた構造解析が完了し、多角体の結晶構造を報告した(Nature, 446: 97-101(2007))。多角体は、図 1 右c, dのようなタイトな三量体構造をとっており、結晶中の水分子含有量が、19%程度しかない。結晶構造形成メカニズムの解明ならびに多角体を利用した新たな結晶体の作製へと研究を進展させた。

細胞増殖・分化誘引タンパク質を固定化した多角体でも新たな知見が得られた。これまで細胞

増殖因子 FGF2 を固定化した多角体を用い、細胞培養を行い、細胞増殖が起こることが確認されていた。これは多角体中に固定化されたタンパク質が生理活性を有した状態で固定化されていることを示している。固定化できるタンパク質の適応範囲を確認する目的で、細胞増殖に関わるタンパク質(サイトカイン)を 20 種類選

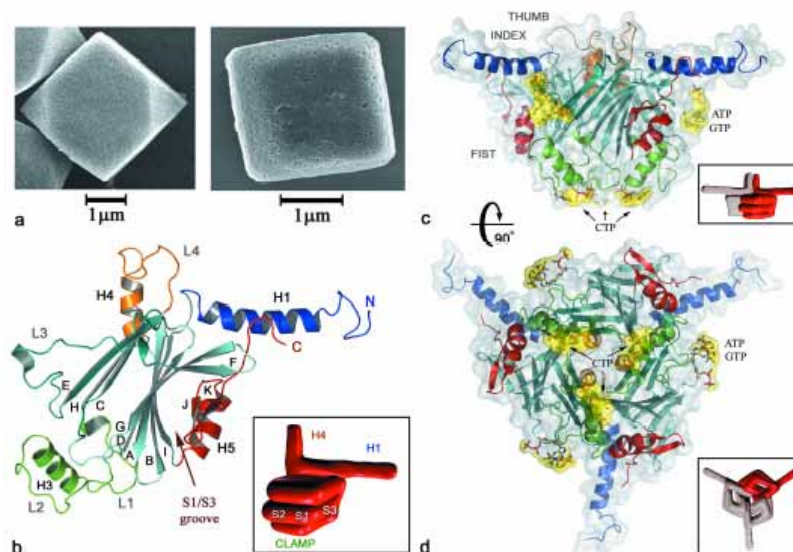


図 1. 多角体の立体構造

体への固定化を実施しサイトカイン固定化多角体ライブラリを作製した。その中で PDGF、IGF、TGF  $\alpha$  を固定化した多角体を用い、細胞増殖実験を行った。それぞれのタンパク質は結晶構造解析がなされており、例えば PDGF では、二量体形成時に活性があることが分かっているなど、多角体への固定化様式についても知見が得られるものと考え選ばれたものである。これら三種類の多角体を用い、細胞増殖実験を行った。図 2 に典型的データを示す。

図 2. で FGF2 がポジティブコントロールで CP-H がネガティブコントロールである。図からも分かるように TGF  $\alpha$  で FGF2 様の結果が得られ、生理活性が確認された。その他の PDGF、IGF についてもリン酸化アッセイにおいてリン酸化が確認されたため、これら三種類の多角体について、生理活性を保持した状態で固定化されているものと考えられる。

軟骨分化モデル細胞である ATDC5 や血管内皮細胞 HUVEC などを用い多角体を用いた細胞生物学的研究を進める一方で、多角体への固定化量の検討、さらには多角体からのリリースがあるのかなど多角体の物理化学的性質の解明も進めている。多角体結晶に固定化された蛋白質の表面密度推定、ダイナミクスおよび外来分子との相互作用を、蛍光相関測定、回転緩和測定などの顕微蛍光測定法により評価した。多角体に固定化された蛍光蛋白質の回転緩和時間は約 30 ナノ秒であり、これは溶液中に比べてわずか2倍程度にしかなっていない。

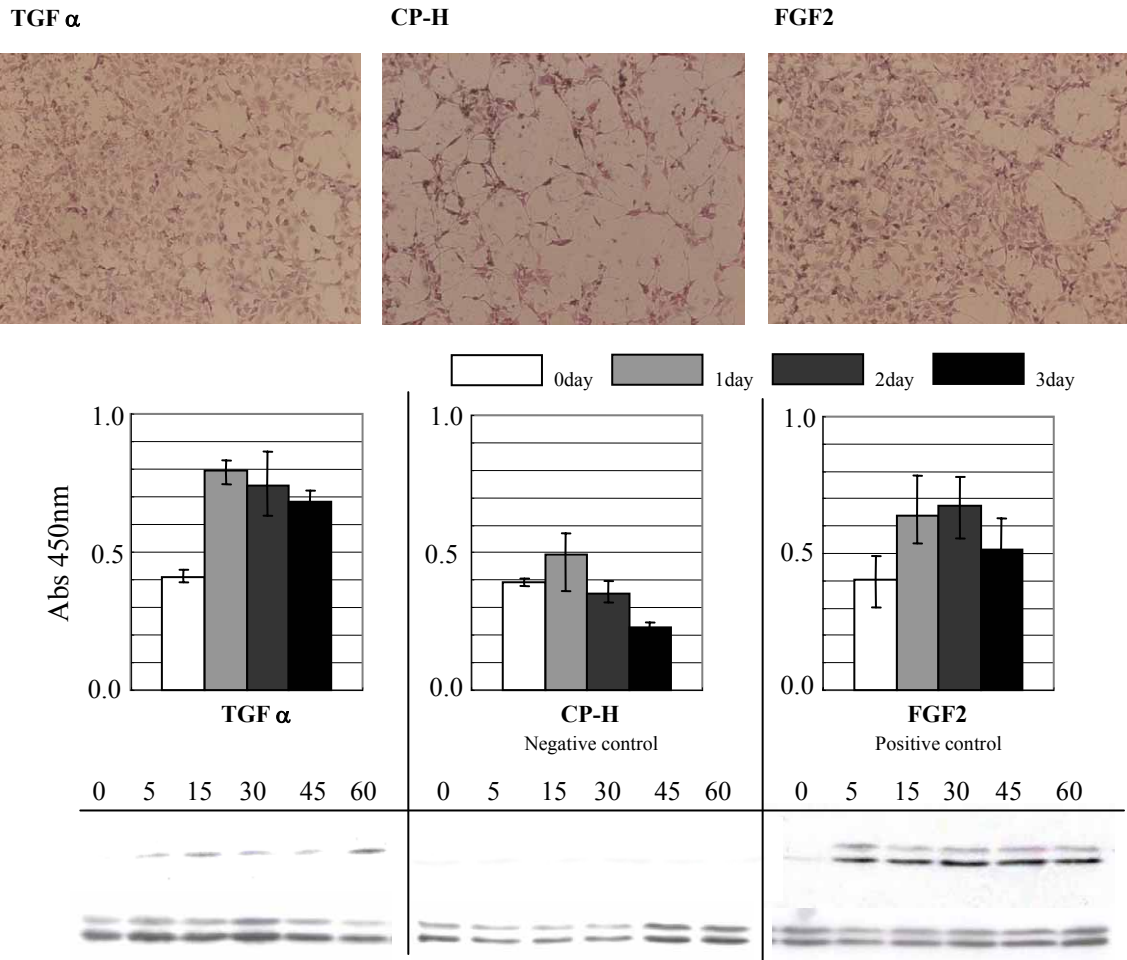


図 2. 細胞増殖実験結果：

上段：細胞染色図、増殖実験後の細胞を染めた図

中段：増殖アッセイ。CCK4 による増殖アッセイ結果

下段：リン酸化アッセイ。MAPkinase のリン酸化を時系列で見た結果。

固定化された蛋白が機能性を保持しているということは、これまでも抗原・抗体反応や細胞増殖実験から明らかにされてきたが、今回の結果は、蛋白の運動性の面から、固定化された蛋白の機能性保持を裏付けるものである。

さらに、フェムト秒レーザープロセスにより多角体をパターニングし、その上で細胞を培養し、微細パターン上での細胞増殖挙動について調べた。その結果、レーザープロセスを駆使した多角体のパターニングにより、多角体の配列形状をマイクロオーダーで制御でき、多角体から細胞への情報伝達様式をさらに詳細に明らかにできるとにらんでいる。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 徳永・兼松グループ

##### ①研究者名

徳永 史生(大阪大学大学院理学研究科 教授)

##### ②研究項目

- ・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

概要：多角体蛋白モジュールにおいて、機能する蛋白の表面密度推定、蛋白ダイナミクスおよび外来分子の相互作用の評価を、蛍光相関測定、回転緩和測定、過渡消光測定などの蛍光測定法により実施した。また、多重分光情報(励起スペクトル、時間プロファイル、蛍光スペクトル、光誘起変化等)イメージング装置を用い、自家蛍光と蛍光マーカーを併用して、細胞増殖・分化のその場評価を試みた。

#### (2) 森グループ

##### ①研究者名

森 肇(京都工繊大学繊維学部応用生物学科 教授)

##### ②研究項目

- ・多角体モジュール作製および評価

概要：多角体結晶の有効利用を目指し、立体構造に基づいた変異導入を試み、多角体結晶の安定性の改変、さらに外来タンパク質の新規固定化法の開発を進める。細胞増殖・分化因子を上記性質改変した多角体に固定化し、タンパク質固定化多角体の有用性を高める。

#### (3) 開・増原グループ

##### ①研究者名

開 祐司(京都大学再生医科学研究所 教授)

##### ②研究項目

- ・細胞増殖・分化制御とレーザーマニピュレーション法の適用

概要：これまで、多角体蛋白モジュールによる細胞増殖・分化の時空間的配列制御をめざして研究を進めている。本年度、その成果として細胞増殖促進を促す因子を導入した多角体を配置することで、細胞増殖を空間的に制御できることを実証した。さらに、レーザーを利用したパターンニング法を駆使し、細胞増殖の空間制御をデモンストレーションした。

#### 4. 研究成果の発表等

##### (1) 論文発表(原著論文)

- F. Coulibaly, E. Chiu, K. Ikeda, S. Gutmann, P. W. Haebel, C. Schulze-Briese, H. Mori and P. Metcalf  
"The molecular organization of cypovirus polyhedra" *Nature*, 446 (2007) 97-101
- S. Kondo, C. Shukunami, Y. Morioka, N. Matsumoto, R. Takahashi, J. Oh, T. Atsumi, A. Umezawa, A. Kudo, H. Kitayama, Y. Hiraki, and M. Noda  
"Dual effects of the membrane-anchored MMP regulator RECK on chondrogenic differentiation of ATDC5 cells" *J. Cell Sci.*, 120(5) (2007) 849-857
- H. Masuhara, T. Asahi and Y. Hosokawa  
"Laser Nano Chemistry", *Pure and Applied Chemistry* (2007) in press
- Y. Jiang, Y. Wang, Y. Matsumoto, Y. Hosokawa and H. Masuhara  
"Spatial Light Modulating and Multi-trapping with a DMD", *Modern Physics Letters B*, 2007 in press
- Y. Hosokawa, T. Kaji, C. Shukunami, Y. Hiraki, E. Kotani, H. Mori and H. Masuhara  
"Nondestructive Micro-Patterning of Proteinous Occlusion Bodies in Water by Femtosecond Laser-Induced Mechanical Force", *Biomedical Microdevices*, (2007) in press
- M. Kashii, Y. Hosokawa, H. Kitano, H. Adachi, Y. Mori, K. Takano, H. Matsumura, T. Inoue, S. Murakami, K. Sugamoto, H. Yoshikawa, T. Sasaki and H. Masuhara  
"Femtosecond Laser-induced Cleaving of Protein Crystal in Water Solution" *Applied Surface Science*, (2007) in press
- K Nakamura, Y Sora, H. Y. Yoshikawa, Y. Hosokawa, Y. Mori, T. Sasaki and H. Masuhara  
"Femtosecond Laser-induced Crystallization of Protein in Gel Medium"  
*Applied Surface Science*, (2007) in press
- R. Yasukuni, J.-A. Spitz, R. M.-Renault, T. Negishi, T. Tada, Y. Hosokawa, T. Asahi, C. Shukunami, Y. Hiraki and H. Masuhara  
"Realignment Process of Actin Stress Fibers in Single Living Cells Studied by Focused Femtosecond Laser Irradiation", *Applied Surface Science*, (2007) in press
- K. Nakamura, Y. Hosokawa and H. Masuhara  
"Anthracene Crystallization Induced by Single-shot Femtosecond Laser Irradiation: Experimental Evidence for the Important Role of Bubbles", *Crystal Growth & Design*, (2007) in press
- Y. Jiang, Y. Matsumoto, Y. Hosokawa, H. Masuhara and I. Oh  
"Trapping and manipulation of a single micro-object in solution with femtosecond laser-induced mechanical force", *Applied Physics Letter*, (2007) in press
- R. Nakamura, N. Hamada, H. Ichida, F. Tokunaga and Y. Kanematsu,

- ”Double-Gated Spectral Snapshots for Biomolecular Fluorescence” J. Lumin., 122-123 (2007) 297-300
- Y. Imanishi, O. Hisatomi, S. Yamamoto, S. Satoh, S. Kotaka, Y. Kobayashi and F. Tokunaga  
 “A third photoreceptor-specific GRK found in the retina of *Oryzias latipes* “ (Japanese killifish), Zoological Science 24, (2007) 87-93
  - M. Unno, M. Kumauchi, F. Tokunaga and S. Yamauchi  
 “Vibrational assignment of 4-hydroxycinnamyl chromophore in photoactive yellow protein” J. Phys. Chem., B111, (2007) 2719-2726
  - N. Hamada, R. Nakamura, H. Ijiri, Y. Takeda, F. Tokunaga, Y. Kanematsu and H. Mori  
 “Protein Modules: Functional Proteins Incorporated in Viral Polyhedra”, Handai Nanophotonics Series Vol. 3, Eds., H. Masuhara, S. Kawata, and F. Tokunaga, Elsevier, Amsterdam, (2007) 311-323
  - C. Matsubara, Y. Hosokawa, Y. Wang, H. Masuhara, K. Ikeda and H. Mori  
 “Individual Bonding of Biological Micromaterials in Water by UV Laser-Induced Polymerization of a Resin Layer in Water”, Indian Journal of Radiation Research, Vol. 3, (2006) 94-98
  - Y. Hosokawa, T. Kaji, Y. Hiraki, H. Mori and H. Masuhara  
 “Non-destructive micro-patterning of protein crystals by focused femtosecond laser” Proceeding of SPIE, Vol. 6108, (2006) 610805
  - Y. Takahashi, H. Adachi, T. Taniuchi, M. Takagi, Y. Hosokawa, S. Onzuka, S. Brahadeeswaran, M. Yoshimura, Y. Mori, H. Masuhara, T. Sasaki and H. Nakanishi  
 “Organic nonlinear optical DAST crystals for electro-optic measurement and terahertz wave generation” Journal of Photochemistry and Photobiology A, Vol. 183, (2006) 247-252
  - R. Nakamura, P. Wang, R. Fujii, Y. Koyama, H. Hashimoto and Y. Kanematsu,  
 “Vibrational relaxation pathways in the electronic excited state of carotenoid”, Journal of Luminescence. 119-120, (2006) 442-447
  - N. Hamada, K. Matsumoto, K. Soda, R. Nakamura, H. Ichida, F. Tokunaga, Y. Kanematsu  
 “Inhomogeneity observed in the photocycle of photoactive yellow protein”, Journal of Luminescence. 119-120, (2006) 122-126
  - H. Mizuta, Satoshi Kudo, E. Nakamura, K. Takagi and Y. Hiraki  
 “Expression of the PTH/PTHrP Receptor in Chondrogenic Cells During the Repair of Full-Thickness Defects of Articular Cartilage” Osteoarthritis Cartilage, 14(9), (2006) 944-952

## (2) 特許出願

平成18年度特許出願:0件(CREST 研究期間累積件数:11件)