

戦略的創造研究推進事業
ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ

研究領域「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」

研究課題「ゲノムレベルの生体分子相互作用探索
と医療に向けたナノレゴ開発」

研究終了報告書

研究期間 平成 14年 11月～平成 20年 3月

研究代表者：林崎 良英

((独)理化学研究所 林崎生体分子機能研究室 主任研究員)

1 研究実施の概要

生命が40億年の歳月をかけて創り出してきた特異的に相互作用する生体内タンパク質を「結合素子(ナレゴ素子)」という新しい概念で捕らえ、それらの複数個の素子から人工融合タンパク(ナレゴ)を設計・作製し、制御可能な秩序ある自己組織化能力をもった新しい機能性材料を開発する。従来の試みは、自己組織化する分子に変異や修飾を加えた分子を用いて新規構造体を創出する研究が主であり、自己組織化して一定の構造形成を成す分子の応用研究である。一方、我々の研究では、自己組織化能を持つ新規分子をナレゴとして新たに創出し、これを用いて新規構造体の作成を目指すものであり、自然界に存在する自己組織化能を応用した既存の研究とは一線を画している。

新しい機能性材料(ナレゴ)を開発するためには、まず、その構成要素であるナレゴ素子(タンパク質相互作用ペア)をできる限り多く見出し、その中からナレゴとして用いるのに有用と思われる特徴あるナレゴ素子を多く選択する必要がある。これについては主に理研グループが研究を進めた。我々が既に開発済みの動物細胞 2-ハイブリッド法を用いたタンパク質相互作用スクリーニングシステムを活用して新規相互作用を調べた(初年度-3年度)。また、特徴ある相互作用(ナレゴ素子候補)についてはその解析を、従来の生化学的実験法に加えて表面プラズモン共鳴(SPR)を用いて行った(初年度-3年度)。次に、選択したナレゴ素子を用いて人工融合タンパク質であるナレゴを設計して発現精製した。また、このナレゴを用いた構造体の創出を試みるとともにナレゴ構造体の特性解析を行った(3年度—5年度)。

上記したナレゴ素子のスクリーニング、特性解析、ナレゴの設計と構築と並行して、九大グループでは、ナレゴについて、それらの自己秩序分子集合体の構築とその構造解析・構造制御を主目的とした。すなわち、(1)タンパク質間の相互作用力の精密測定に基づく、ナレゴ分子集合体構築・制御のための分子間相互作用の物理化学的・力学的基礎理解の拡充、および(2)ナレゴタンパク質の三次元アーキテクチャーの構築・構造解析のためのタンパク質単分子観察およびタンパク質分子集合体構造解析、の二課題に取り組んだ。具体的には、従来実施中の分子間力測定技術および単分子観察技術についてさらなる精密化を行った(初年度—2年度)。その段階で確立された、グラフト重合鎖を用いるタンパク質のソフトハンドリング式分子間力測定技術、全反射蛍光顕微鏡法または超微弱光検出蛍光顕微鏡法と原子間力顕微鏡のカップリングシステムによるタンパク質集合体の構造解析技術の各技術を応用し、次段階として、理研グループにて開発された新規のナレゴタンパク質についてそれらの分子間相互作用力解析および分子集合体の構造解析を進めた(3年度-5年度)。また、4年度に九大グループから分離した金沢工大グループではナレゴの人工細胞外マトリクスの機能性パーツ(ナレゴゲル)としての応用研究を実施した(4年度—5年度)。

以下、研究成果を簡潔に記す。

- 1) ナレゴ素子の拡充と解析のための基礎研究
 - a) 有用な相互作用ペア(ナレゴ素子)を効率良く抽出するために、タンパク質相互作用閲覧データベースを作成し、論文発表。
 - b) 上記閲覧データベースにより選択した相互作用ペア28組の発現実験を実施した。
 - c) 熱耐性タンパク質ペアのナレゴへの応用を図るべく、超好熱古細菌(*Pyrococcus*)における世界初のタンパク質相互作用の系統的解析を行い、論文発表。
 - d) SPR 法を用いたマクロレベルでの結合物性解析により、接着素子として有用な PDZ-PDZpeptide ペアを同定。
 - e) 超好熱古細菌由来 CutA タンパク質と PDZ-PDZpeptide ペアを用いたナレゴの試作実験。想定どおりの構造体は創出できず、コンピュータシミュレーション導入のきっかけとなった。
 - f) 相互作用を *in vitro* で迅速に確認する必要性から超迅速 *in vitro* プルダウン法を新規開発し、論文発表。
 - g) 多項関係の相互作用についてそのナレゴへの応用を図るべく、生体超分子(自己組織化分子集合体)としての SMN 複合体の解析を行った。新規の相互作用 Gemin2-Gemin2 を発見し、この相互作用が SMN 複合体安定化に寄与していることと、そのメカニズムを明らかにして、論文発表。
- 2)パイロコッカス DNA ブックの作成: DNAブックは遺伝子リソースを関連する情報と共に利用者に簡便かつ迅速に提供するとともに保管にも便利な常温流通システムの媒体として開発された新しい技術である。超好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 の遺伝子クローンを収載したパイロコッカス DNA ブックを発刊し、研究領域内の研究者に使用してもらおうべく、無料頒布を行った。
- 3)グラフト重合鎖を用いるタンパク質のソフトハンドリング式分子間力測定技術の開発: 原子間力顕微鏡(AFM)プローブ表面にグラフト重合層を形成しそのグラフト鎖の自由末端にタンパク質を固定して力測定を行う技術を開発した。この方法では、非特異的相互作用力の混入やタンパク質の機械的変性を抑制することができ、分子間力測定の質・精度を向上させることが可能となった(論文発表済、特許申請済)。
- 4)Dynamic Force Spectroscopy(DFS)によるレゴ素子間相互作用の特性解析: AFM により測定されるリガンドーレセプタ対等の特異的相互作用の強制解離力は一般に、力測定時のプローブ引離し速度に依存し、その速度依存性の解析から相互作用の自由エネルギープロファイルの概形を推定することが可能である(DFS 解析)。ナレゴ素子 TIP-1 および PDZ-pep 間相互作用に対し DFS 解析を行い、それらの相互作用に、他の測定法では検出困難な二段階の解離速度過程が含まれることを見出し、論文発表。
- 5)ナレゴの概念の整理とそれを用いた新規構造体の創出: ナレゴ作成のための予備実験を通じて、新規構造体を創出する戦略として、接着素子、骨格素子からなるナレゴの新規概念を得た(特許出願済・総説にて発表済)。この概念に基づき、PDZ/PDZpeptide ペアを接着素子として、また、4 量体タンパク質 SOR を骨格素子としたナレゴを作成した。構造設計ではコン

コンピュータシミュレーションを導入した。作成した SOR ナノレゴは混ぜ合わせにより白濁が認められ、新規構造体の創出が示唆された。白濁は SOR-PDZ と SOR-PDZpep が 1:1 の比率で生じており、また、塩濃度により接着素子間の結合親和性をコントロールすることが可能であることが明らかとなった。

6) SOR ナノレゴ集合体の基本結合構造と、階層的集合体形成過程の観察：透過型電子顕微鏡を用い、SOR ナノレゴ集合体の基本結合構造が線形の鎖状構造であることを明らかにするとともに、超微弱光検出蛍光顕微鏡と AFM のカップリングシステムを用いてナノレゴの集合体の階層的形成過程(線状基本構造→粒状集合体→不定形凝集体)を確認した。

7) ロック付き SOR ナノレゴによる制御された構造体の創出：規定した数の SOR ナノレゴがつながった安定な線状構造体を自由自在に創出するために、接着素子 PDZ および PDZpep に Cys 残基を導入して S-S 結合でロックがかかる SOR ナノレゴ_(Cys)を構築した。SOR-PDZ_(Cys) および SOR-PDZpep_(Cys)を発現精製し、SPR 法による積み上げ実験を試みた結果、規定の数のナノレゴを伸長させた線状構造体を創出することができた。(5-7の結果について論文投稿中)

8) キャップナノレゴ、マルチ結合型ナノレゴの開発：伸展末端を制御するナノレゴとしてキャップナノレゴを開発し、その発現精製方法を確立した。また、この方法を応用して異なった接着素子からなるマルチ結合型ナノレゴを開発した。両ナノレゴにより、基板上で配向性をもって構造体を伸展させることが可能となり、さらに重要なこととして溶液中で伸展を制御し、規定数のナノレゴがつながった構造体を自在に創出する道が開けた。

9) 条件付きナノレゴを用いた新規構造体の創出：SOR-Cohesin および SOR-Dockerin からなるナノレゴを構築し、Ca イオン存在下においてのみ、自己組織化により高次構造体が形成することを水晶発振子マイクロバランス法 (QCM)を用いて示した。さらに SPR 法により Ca イオン存在下でナノレゴの積層化に成功した。

10) ナノレゴゲルの創出：CutA ナノレゴタンパク質と PDZ ドメイン認識ペプチドを末端に導入した PEG とのハイブリッド型ハイドロゲルの作製に成功した。さらに細胞接着モチーフ RGD を CutA タンパク質に導入した CutA(RGD)-TIP1 を用いてハイドロゲルを作成したところ、軟骨細胞との接着および伸展において非常に有効であることがわかった。

当研究においてナノレゴの基礎研究、SOR ナノレゴを用いた制御された高次構造物創出研究を通じて、人工タンパク質(ナノレゴ)をナノマテリアルとして利用するための概念の体系化と基本技術の確立を達成することができた。また、その応用例について示すことができた。我々が確立した概念と技術は、目的とする高次構造物を完全制御下で自在に創出することが可能であり、人工タンパク質を用いたナノテクノロジー分野へ広く貢献するものと思われる。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

研究開始時に我々は大きく2つの目標を設定し、各目標に具体的な研究計画を立てて研究を進めた。

目標1:ゲノムレベルのタンパク相互作用の収集と、その情報を基盤とした人工融合タンパク質(ナレゴタンパク質)の作出

1. ナレゴ接着素子の生体内からのスクリーニング

我々が収集してきたゲノム資源(cDNA)をフルに活用してアッセイサンプルを作成し、タンパク質相互作用の大規模スクリーニングを行う。(初年-2年度)

2. ナレゴ素子間(タンパク質間)相互作用データベースの作成 (初年度)

3. ナレゴ素子確定のための相互作用部位の同定 (2年度-3年度)

ナレゴ素子として有望なタンパク質について欠失ミュータントを系統的に作成し、大規模アッセイ系に用いた培養細胞タンパク質間相互作用解析法を適用する。特異性および相互作用強度を保持する最小タンパク質ドメインをこのアッセイにより得る。

4. ナレゴタンパク質発現用コンストラクトの作成、発現および精製 (3年-5年度)

様々な組み合わせのナレゴタンパク質発現用コンストラクトを作成する。次にナレゴタンパク質を大量発現させる方法の検討を行う。無細胞系での発現系が最も適していると思われるのでこの方法を中心に検討する。発現したタンパク質は精製を行ない、高純度のナレゴタンパク質を得る。

目標2:ナレゴタンパク質の分子配列および自己組織化技術

1. ナレゴ素子の一分子操作および特性解析(リガンド-レセプタ力の定量)(初年-2年度): ナレゴ素子の一分子操作技術の確立、およびリガンド-レセプタ力の強度と作用距離の実測を行う。

2. ナレゴ素子を用いたナノ秩序集合体の構築 (2年度-4年度): ナレゴタンパク質の一分子操作によって、ナレゴタンパク質対の形成および多分子ナレゴタンパク質の秩序集合体のナノ配置による構築に取り組む。

3. ナレゴタンパク質を用いたナノ秩序三次元アーキテクチャー(3年度-5年度)

よく分子設計され、秩序化されたナレゴタンパク質構造体の構築法の基礎技術を確立し、機能性の付与を検討する。人工細胞外マトリクスの機能性パーツとしての応用も検討する。

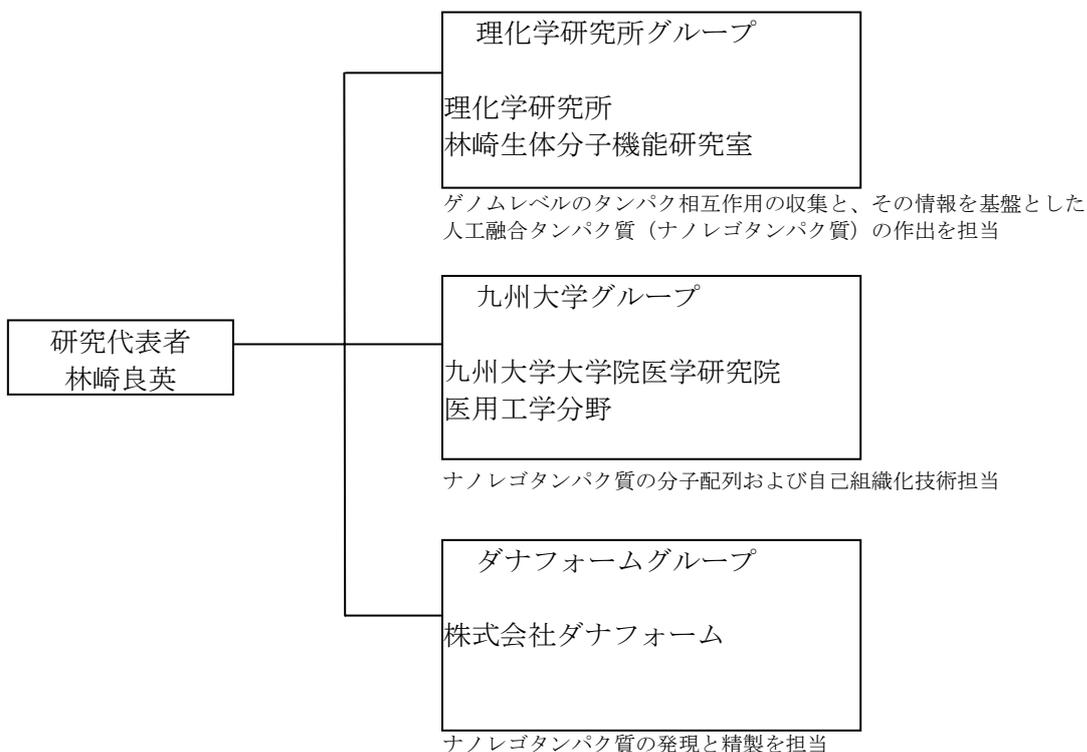
研究計画を進めてゆくうちに、ナレゴにより新規構造体を構築するためには、A)非常に緻密なナレゴ設計、B)設計したナレゴのマクロレベルでの特性解析、C)得られたナレゴ新規構造体の可視化が重要であることがわかり、研究目標に加えた。

研究グループの役割は、理研グループが「ゲノムレベルのタンパク相互作用の収集と、その情報

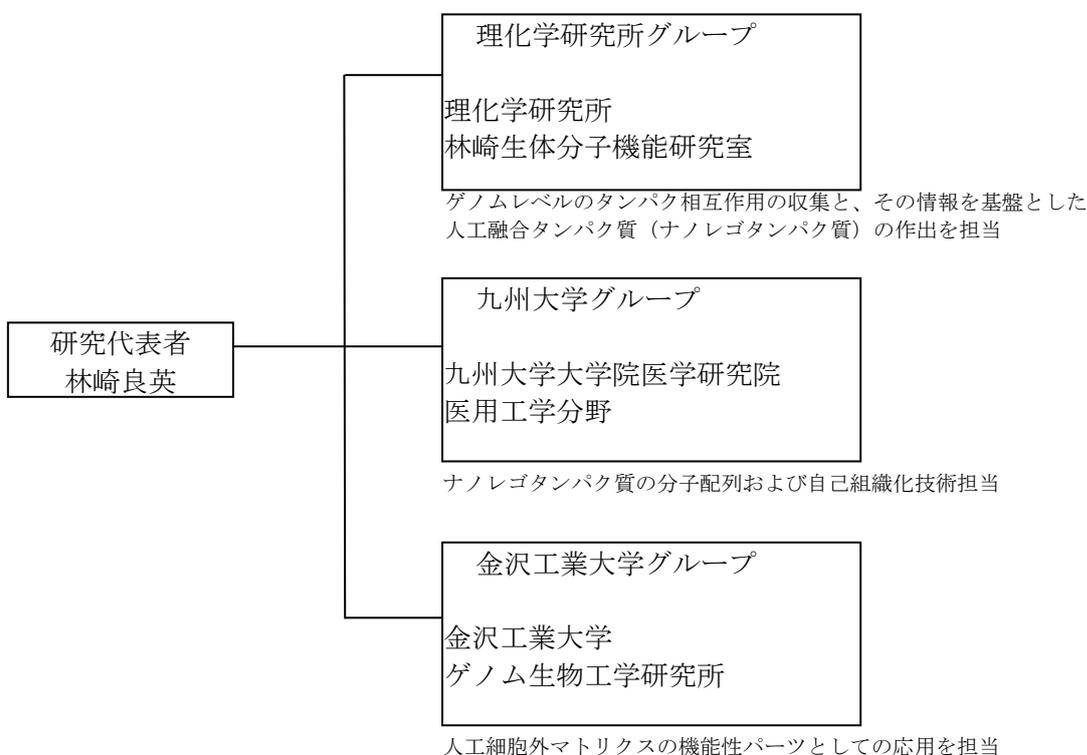
を基盤とした人工融合タンパク質(ナノレゴタンパク質)の作出」を、九大グループは「ナノレゴタンパク質の分子配列および自己組織化技術」を、ダナフォームグループが「無細胞系でのナノレゴの発現精製」を担当した。また、4年度以降に九大グループが九大グループと金沢工大グループに分かれ、九大グループは上記および追加目標 C)「得られたナノレゴ新規構造体の可視化」を、金沢工大グループは「人工細胞外マトリクスの機能性パーツとしての応用」を担当した。追加目標 A)「非常に緻密なナノレゴ設計」、B)「設計したナノレゴのマクロレベルでの特性解析」は理研グループが担当した。

(2)実施体制

平成14年11月-平成18年3月 *(株)ダナフォームは平成17年12月に脱退



平成18年4月-平成20年3月



3 研究実施内容及び成果

3.1 ゲノムレベルのタンパク相互作用の収集と、その情報を基盤とした人工融合タンパク質(ナノレゴタンパク質)の作出 (理化学研究所 林崎グループ)

(1)研究実施内容及び成果

理化学研究所・林崎グループでは、上記のテーマに基づき、まずナノレゴのための基礎研究(3.1.1-3.1.7)を十分に行い、概念と戦略を整理(3.1.8)したのちナノレゴを用いた高次構造体の本格的な研究を行った。以下、研究内容および成果を具体的に記述する。

3.1.1 Protein-protein interaction (PPI) network viewer の開発

生体のタンパク質相互作用を基盤としてナノレゴ研究を開始する際、ナノレゴとして活用可能な相互作用を迅速かつ効率的に抽出することが必要である。我々は哺乳動物細胞 2-ハイブリッド法をベースとしてタンパク間相互作用を迅速に調べるアッセイシステムを開発し、このシステムを用いて既に 6,000 個の理研 cDNA から 500 以上の相互作用を見出している。これらタンパク質間相互作用を詳細に解析するために”Protein-protein interaction (PPI) network viewer”を開発した。このソフトでは予想相互作用信頼度を線の太さで表示することにより、主要な相互作用ネットワークが一目でわかるようになっている。さらに viewer はマウス完全長 cDNA のアノテーション情報である FANTOM2 viewer と相互リンクしており、興味深いタンパク質について配列情報、染色体上のマップ情報、マイクロアレイによる遺伝子発現情報を容易に得ることが可能となっている。

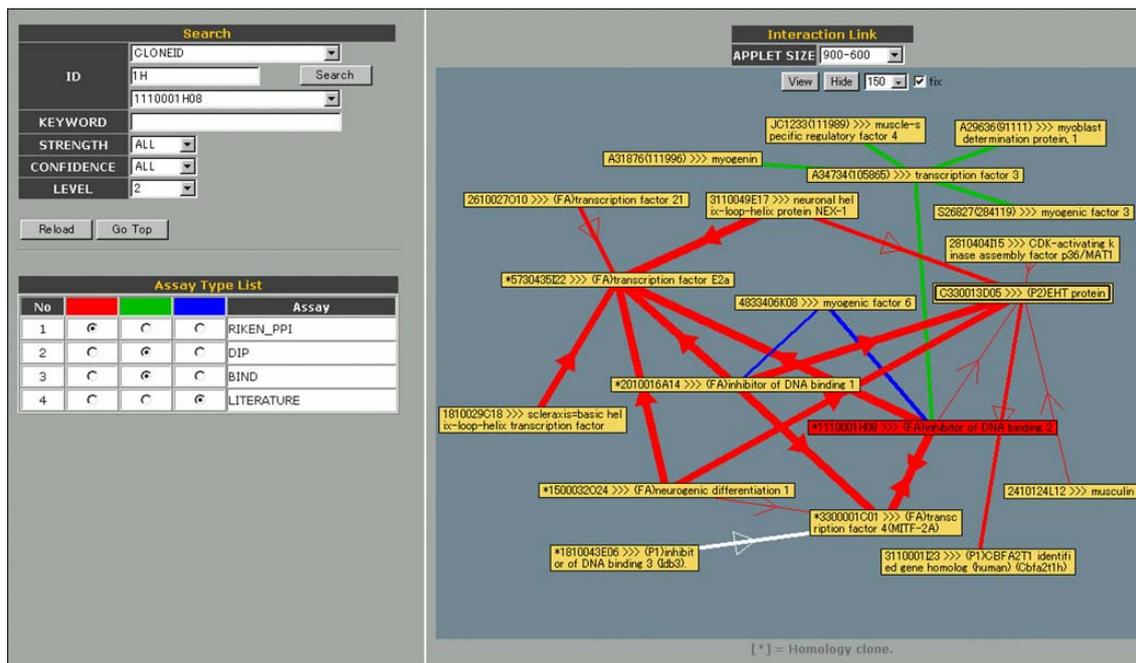


図1 Protein-protein interaction (PPI) network viewer

相互作用の信頼度、データソースが色表示されており、また相互作用するタンパク質の諸情報が FANTOM2 viewer と相互リンクしている。ナルゴに適した相互作用タンパク質対の抽出に活用した。

3.1.2 ナルゴ素子拡充の試み

ナルゴを作成するためには、様々なナルゴ素子が必要であると考えた。そこで哺乳動物細胞 2-ハイブリッド法によるタンパク質相互作用アッセイで得られたマウスタンパク質の相互作用から、上記の viewer を用いて分子量 30 kDa 以下の比較的小さいタンパク質同士の相互作用を 28 組抽出し、組換え大腸菌発現系を利用し、GST 融合タンパク質として発現させることを試みた。想定されたナルゴ (融合タンパク質) の不溶化問題を避けるべく、比較的小さいタンパク質をターゲットとしたのにも関わらず、融合タンパク質の不溶化や発現不良が観察され、相互作用ペア間でどちらも良好な発現と可溶性を示し、かつ十分な収量の精製タンパク質が得られたものはわずか 4 組のみであった (図2)。多種のナルゴ素子を得ることは容易でないことがわかった。

| Protein1 | | | Protein2 | |
|----------|---------------|---|---------------|---|
| No. | FANTOM ClonID | Anotation | FANTOM ClonID | Anotation |
| 1 | 1110020 E15 | FKSG20 | 1810038N03 | hypothetical protein |
| 2 | 0610010J21 | unclassifiable protein | 1110003H18 | hepatitis B virus x-interacting protein |
| 3 | 0610011F08 | senrin (ubiquitin-like protein 1 [UBI1]) | 2610104C23 | FLASH (caspase 8 associated protein 2) |
| 4 | 1110014N10 | anticodon-binding domain of Class II aaRS structure containing protein | 2810409K22 | EAP30 subunit of ELL complex |
| 5 | 1110038O14 | TAF11 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor | 1810004N01 | TAF13 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor |
| 6 | 1110059M19 | hypothetical protein | 2310046A13 | latent TGF-beta binding protein 4 (fragment) |
| 7 | 1600012B22 | similar to brain cDNA, clone MNCB-2386, similar to CG13867 gene product (D. melanogaster) | 2610043 E24 | RNA polymerase II elongation factor SIII, p15 subunit |
| 8 | 1700021C22 | synaptonemal complex protein 3 (fragment) | A930038B11 | ELL-associated factor 1 homolog |
| ★ | 1700029M23 | hypothetical protein | 1700080O16 | hypothetical MAGE family containing protein (similar to melanoma antigen family A. 5) |
| 10 | 1810012B10 | similar to Zn finger protein | A930038B11 | ELL-associated factor 1 homolog |
| ★ | 1810012J15 | SNAPIN, synaptonemal-associated protein, 25 kDa, binding protein | 2410089B13 | hypothetical protein |
| 12 | 1810015M21 | survivor of motor neuron protein interacting protein 1 (SIP-1), Gemin2 | 2400008I04 | hypothetical protein |
| 13 | 1810027I20 | hypothetical protein | 2900001F22 | similar to DC44 |
| 14 | 2010107G23 | hypothetical protein | 0610042A16 | calcium modulating ligand |
| ★ | 2010301O03 | PA28a, proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, alpha | 2810002H09 | proteasome activator PA28 beta, proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, beta |
| 16 | 2310047L21 | hypothetical protein | 1110014J03 | vacuolar sorting protein 28 homolog |
| ★ | 2400006H24 | Ran-interacting protein MOG1, Ran guanine nucleotide release factor | 1700026B03 | similar to GTPase (Ran) |
| 18 | 2400008I04 | hypothetical protein | 2610019B15 | Gemin6 |
| 19 | 2400008I04 | hypothetical protein | A130027H22 | hypothetical protein |
| 20 | 2410089B13 | hypothetical protein | 1110002P15 | X-linked lymphocyte-regulated 3a |
| 21 | 2810004B13 | proteasome activator 28-gamma, proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, 3 | E430029E18 | NEFA-interacting nuclear protein NIP30 homolog |
| 22 | 3110079O15 | hypothetical protein | E430013F16 | CD45-associated Protein |
| 23 | 3830421C21 | small nuclear ribonucleoprotein E (snRNP E) | 2810433M12 | small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G (snRNP G) |
| 24 | 6530403D07 | hypothetical protein | 0610008A10 | hypothetical protein |
| 25 | 6530403D07 | hypothetical protein | 2610016H24 | R-RAS2 |
| 26 | 8430420C20 | Promethin | A930038B11 | ELL-associated factor 1 homolog |
| 27 | C430015F12 | Apoptosis regulator Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2) | F530013M17 | phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 |
| 28 | E430032C10 | hypothetical Immunoglobulin structure containing protein | A930038B11 | ELL-associated factor 1 homolog |

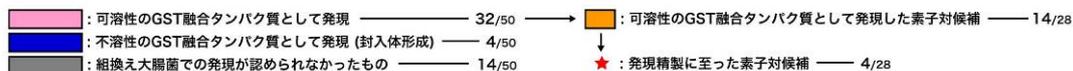


図2 ナレゴ素子候補タンパク質の発現・可溶性評価

タンパク質相互作用を有する 50 種のタンパク質(28 相互作用対)について GST 融合タンパク質の発現系を構築し、大腸菌における発現挙動と可溶性について調べた。

3. 1. 3 超好熱古細菌 *P. horikoshii* 遺伝子を用いた大規模相互作用スクリーニング

沖縄トラフ沖海底噴出孔より単離された *Pyrococcus horikoshii* OT3 は、98°Cでの最適生育温度を示す超好熱古細菌である。同菌株は、全ゲノム解析が完了し、2061 遺伝子がゲノム上にコードされているものと推定されているが、半数以上の遺伝子の機能が明確にされていない。一般に超好熱古細菌のタンパク質は熱耐性で安定なものが多いため、ナレゴ素子として有益であると考えられた。そこで、*P. horikoshii* OT3 の各 ORF から発現するタンパク質について、哺乳動物細胞 2-ハイブリッド法を用い、タンパク質-タンパク質間相互作用 (PPI) 解析を行った。さらにその相互作用の結果と他の生物種との比較ゲノム解析により、各 ORF から発現するタンパク質の機能を予測した。

クローニングされている 1,390 個の中から細胞内タンパク質と予測された *P. horikoshii* OT3 の 980 ORF の相互作用解析の結果、107 の相互作用が検出され、その内 54 の相互作用が hetero-interaction を示した。これは超好熱古細菌のタンパク質相互作用を系統的に調べた初めての報告である。相互作用が見出された ORF のゲノム上の位置について調べたところ、隣接し且つ同方向にコードされている ORF から発現したタンパク質同士の結合が、高い割合で検出されていることが明らかとなった。それらの ORF に関して、他生物種との比較ゲノム解析を行った結果、オペロンを形成している遺伝子に相同性を示すものが存在した。よって *P. horikoshii* においても、上記 ORF 間ではオペロンが形成されており、互いの ORF から発現されるタンパク質は機能的に関連性が高いものと推測された。

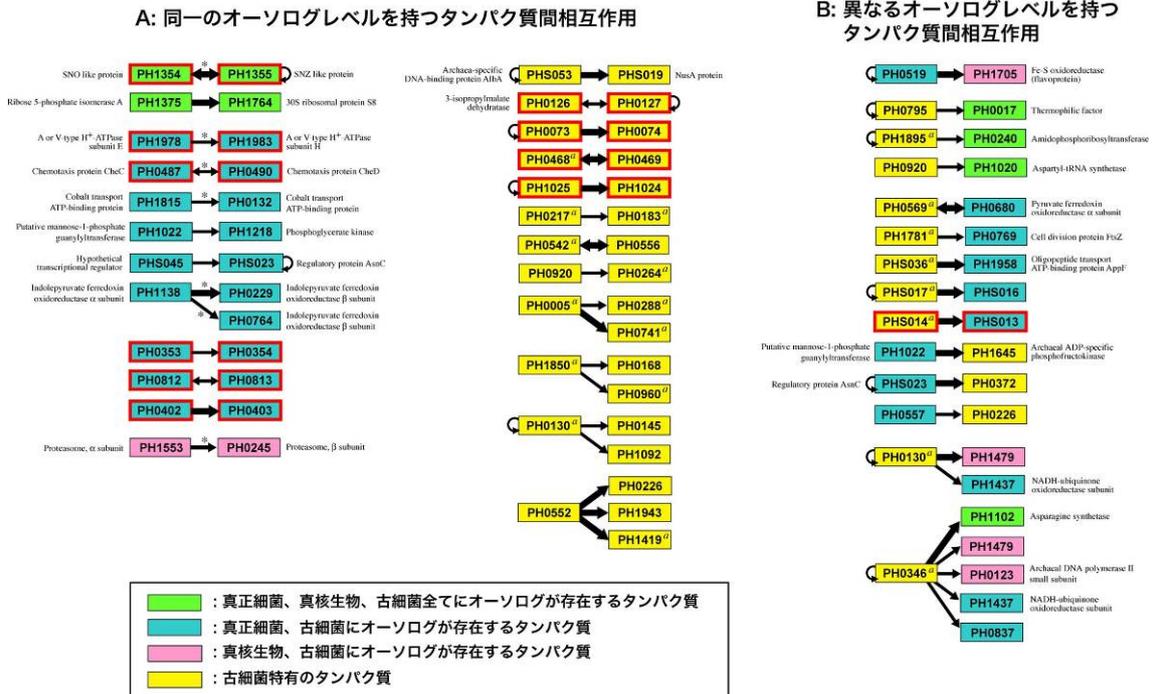


図3 動物細胞 2-ハイブリッド法を用いた超好熱古細菌 *P. horikoshii* OT3 のタンパク質間相互作用解析結果

それぞれのタンパク質は、*P. horikoshii* OT3 のゲノムデータベースにおける geneID (PHXXXX) で標記した。赤枠で示した相互作用するタンパク質は、ゲノム上でオペロンとしてコードされているタンパク質である。アスタリスクは、他の生物種において類似したタンパク質同士の相互作用が存在するもの (インターログ) を示している。また、“a” で付記されたタンパク質は、*P. horikoshii* に特有のタンパク質である。

3. 1. 4 ナノゴ接着素子の解析

我々は、マウス PDZ ドメインタンパク質の一つである TIP-1 がベータカテニンの C 末端に結合することを明らかにした (*J Biol Chem.* **278**, 38758 (2003))。TIP-1 は、分子量 12 kDa と比較的小さく、GST 融合タンパク質 (GST-TIP1) とした場合においても十分な発現と可溶性を示した。PDZ ドメインは数アミノ酸程度のペプチド配列を認識して結合することが知られている。そこで筆者らは、ベータカテニンの C 末端 10 残基 (Pep) をペプチド合成し、TIP-1 との結合特性解析を SPR (Surface Plasmon Resonance) 法により行った (図 2A)。TIP-1 は 10^{-7} M オーダーの解離定数 (K_D 値) でペプチドと結合した。面白いことに GST-TIP1 と Pep との相互作用では、 10^{-10} M のオーダーを示し、結合力が増大しているように観察された。これは GST が溶液中でホモ 2 量体の分子として安定に存在するため、融合タンパク質 GST-TIP1 では 2 つの TIP-1 があたかも 1 分子としてふるまっている結果を反映している。TIP-1 とその結合ペプチドの特性は原子間力顕微鏡を用いた 1 分子レベルでの相互作用の引き剥がし実験でも詳細に解析した (九大グループ報告参照)。

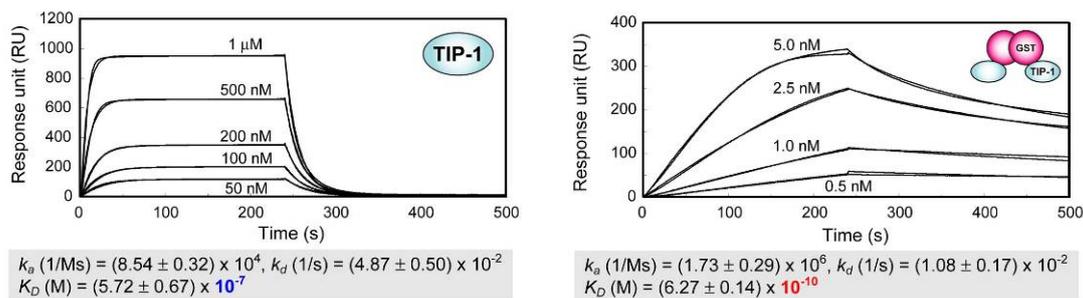


図4 SPR法 (BIACORE) によるPDZ-ペプチド間相互作用のキネティクス解析
 固定化リガンドとしてビオチン化ペプチドを用い、ストレプトアビジン固定済みセンサーチップ (SA chip) にリガンドを捕捉させた。アナライトとしてマウス由来 PDZ ドメインの一種 TIP-1 (左)又は GST を融合した TIP-1 (GST-TIP1, 2 量体)をグラフ上の各濃度で送液した。

3.1.5 ナノゴ設計のための基礎実験

超好熱古細菌 *P. horikoshii* において系統的タンパク質間相互作用解析を行ったことは前述した。次に *P. horikoshii* のタンパク質を用いてナノゴ設計を試みた。金属結合タンパク質 CutA は分子量 12 kDa からなる小タンパク質であり、非常に安定なホモ3量体を形成する。既に解析されているX線結晶構造解析をみると、CutA の3量体は正3角形の板状の構造をしており、各単量体のC末端は正3角形の頂点付近に存在している。そこで、CutA のC末端にPDZあるいはPDZ結合ペプチドを融合させた3つの接着素子をもったCutA ナノゴ (CutA-TIP-1, CutA-Pep) を各々発現精製した後 (図5A)、混合することによって相互作用による自己組織化を利用して構造体の創出を試みた。3つの結合素子によって高次構造体が創出されることを期待したが、それを示唆する沈殿物の形成は全く観察されなかった。そこで混合物をゲルろ過クロマトグラフィーで解析してみると、CutA ナノゴ2量体に相当するピークのみが観察された (図5B)。すなわち、結合素子同士が3つの相互作用を形成することにより、最も少ないナノゴ分子数で構造体が収束したものと考えられた (図5C)。ナノゴによる新規構造体の創出には (意図的な場合を除き) 収束を阻害することが重要であることを学んだ。

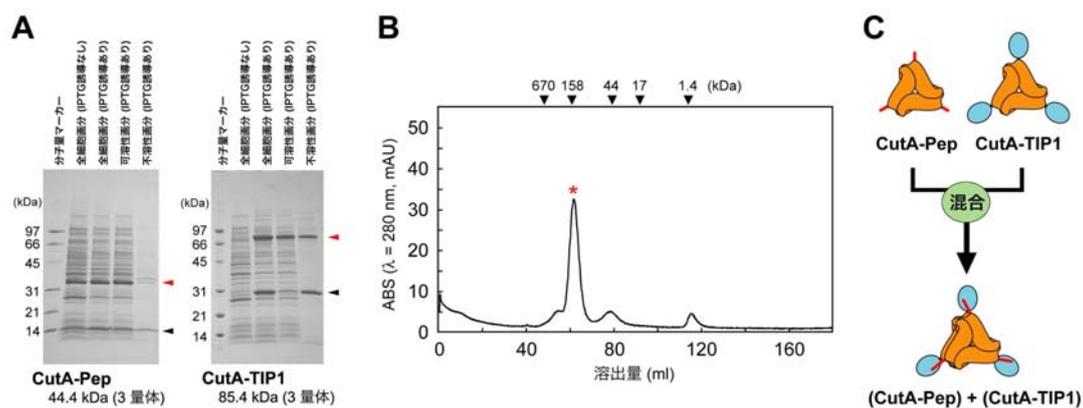


図5 CutA ナノゴのバルク溶液中における会合実験

A: CutA 融合タンパク質を発現させた大腸菌抽出液の SDS-PAGE 結果。各融合タンパク質をコードする遺伝子を pET30a(+) にクローン化して T7 プロモータ制御下に置き、IPTG 添加により発現誘導した。培養した組換え大腸菌を集菌後、超音波破碎し、細胞画分毎に電気泳動した。
 B: CutA-Pep 及び CutA-TIP1 混合溶液のゲルろ過クロマトグラフィー結果。上部に分子量マーカーの溶出位置を示した。*で示されたピークが主要産物であり、各融合タンパク質の分子量から判断すると、CutA-Pep 及び CutA-TIP1 の各 3 量体が 1:1 で結合したものに相当していた。
 C: CutA ナノゴ混合により生成した構造物の想定図。

3. 1. 6 相互作用の *in vitro* 迅速確認法の開発

タンパク質間相互作用のスクリーニング、特にハイスループットなスクリーニングにおいて2-ハイブリッド法は最も頻用されている重要な技法である。しかしながら、得られた相互作用には多くの偽陽性が含まれておりデータの生物学的解釈を複雑化させる要因となっている。GST 融合タンパク質を用いた *in vitro* プルダウンアッセイ法は、2-ハイブリッド法で得られた相互作用データの実験的確認手段として定評ある手法である。しかしこの手法では、GST 融合タンパク質発現用のコンストラクトを構築する必要があり、また大腸菌で発現させた GST 融合タンパク質が高頻度で不溶化するなどの問題点があるので、ハイスループットに得られた相互作用の確認法として効率的ではない。そこで我々はもっと簡単でかつ迅速に行うことが可能な *in vitro* プルダウンアッセイ法の開発を行った。我々の手法では *in vitro* 転写/翻訳キットを用いて作成した RI ラベルタンパク質とビオチンラベルタンパク質とを単純に混合インキュベートしたのち、ストレプトアビジンビーズを用いてプルダウンを行う。サンプル作成から結果の解析まで1日以内に終了する。GST 融合タンパク質を用いて相互作用が検出できている相互作用 10 組以上について我々の手法を適用したところ、ほとんどの相互作用が確認できた。よって我々が開発した方法は GST プルダウンアッセイ法と同様に相互作用の確認法として使用することが可能であると考えられる。

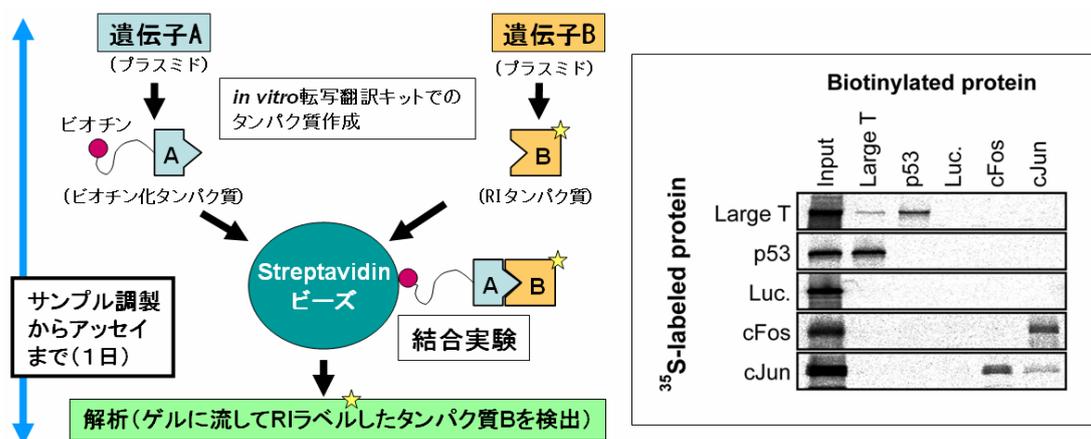


図6 超迅速 *in vitro* プルダウンアッセイ法の概要(左図)と、この方法を用いた LargeT-P53 および cFos-cJun 相互作用の検出(SDS-PAGE)。

3. 1. 7 多項からなるナログ素子候補の諸性質の解明

多項からなるナログ素子候補として、SMN (survival motor neuron) タンパク質複合体をモデルにして解析を行った。この複合体は RNA splicing に必須である snRNP 生成に関わっている。新規の相互作用である Gemin2 間相互作用が Gemin2-SMN 相互作用において SMN タンパク質間のアミノ末側の相互作用の安定化に寄与すること、この作用が複合体オリゴマーの安定化に寄与すること、複合体のオリゴマー化が snRNP 生成に重要であることを示した。さらに神経疾患である SMA を発症する変異 SMN タンパク質のひとつにおいて、Gemin2-SMN 間の相互作用が減弱していることを発見し、この変異 SMN タンパク質による SMA 発症機構を示唆する結果を得た。生物学的知見に加え、ナログ設計原理において複数の相互作用を用いて構造物を創製するアイデアをこの研究より得た。

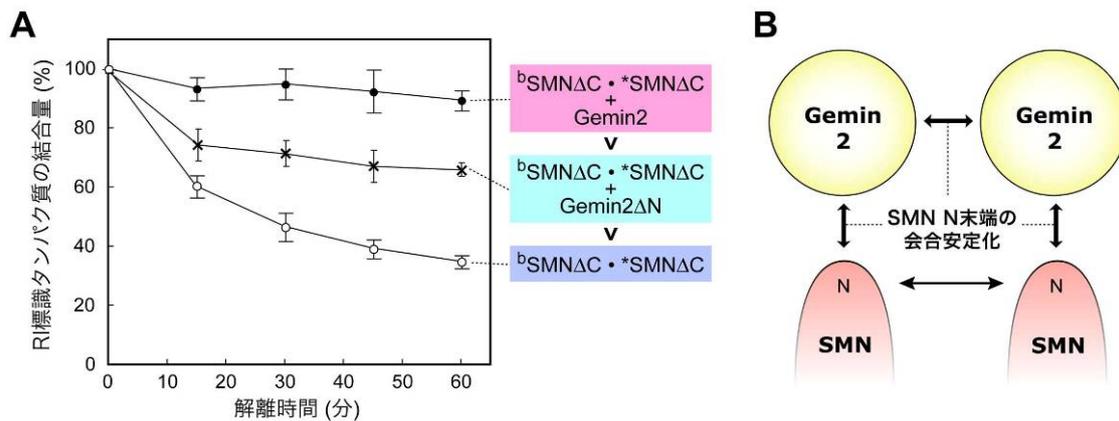


図7 Gemin2 による SMN の N 末端領域におけるホモ結合部位の安定化

A, SMN-Gemin2 複合体の *in vitro* 解離分析結果。ストレプトアビジンが架橋された磁性ビーズを用いて、ビオチン化した C 末端欠失型 SMN ($^b\text{SMN}\Delta\text{C}$) が固定されたビーズを作成後、各種 Gemin2 (全長型, N 末欠損型) を添加/非添加した条件で、 ^{35}S メチオニンでラベルされた RI 標識 C 末端欠失型 SMN ($*\text{SMN}\Delta\text{C}$) を同ビーズの磁気集積によって共沈させた。共沈後、緩衝液に浸して懸濁させ、経過時間毎に再度ビーズを集積し、ビーズ上に結合した状態で残存していた $*\text{SMN}\Delta\text{C}$ の結合量をシンチレーションカウンタによって測定した。B, *in vitro* 解離分析の結果に基づく SMN-Gemin2 複合体の会合モデル。

3. 1. 8 ナルゴの新規概念

基礎実験から得られた結果から、ナルゴの概念と戦略を再構築した。接着素子については発現精製が容易なものを少数選択し、多様性を出すための戦略として接着素子に変異を加えることを考えた。PDZ のような小分子量ドメインは、ナルゴ構築において非常に有用だと考えられた。結合の相手方がペプチドであり、融合タンパク質を作成しても分子量の増大がほとんど起きないこと、また、PDZ 結合ペプチドに変異を加える事により、様々な特性や結合強度を持ったナルゴ素子として使用できることによる。

ナルゴ設計では超好熱古細菌由来のホモオリゴマータンパク質を用いることは有用と思われた。ホモオリゴマータンパク質は、複数の同一分子のサブユニットから形成されており、相互作用する部位を同一分子で補う必要があることから対称性を取る傾向が高い。また、超好熱古細菌由来のホモ会合体は非常に安定なので、大腸菌内で発現させた場合、ホモオリゴマータンパク質として精製が可能である。よって、接着素子が表面に提示されるようにホモオリゴマータンパク質との融合タンパク質を設計すると、接着素子がサブユニットの個数分導入され、且つ接着素子が対称性を有して配向するナルゴが出来あがる。ナルゴ設計においてホモオリゴマータンパク質は目的とする構造体構築で骨格を形成する新たな素子であることから、「骨格素子」と名付けた(図8右)。しかしながら自己組織化により新規構造体を創出するためにはホモオリゴマータンパク質に単純に接着素子を加えたナルゴを作成してもうまく行かないことは前述の CutA を用いた実験で記したとおりである。そこで我々はナルゴ設計においてコンピュータによる構造シミュレーションを用いる戦略を加えた。

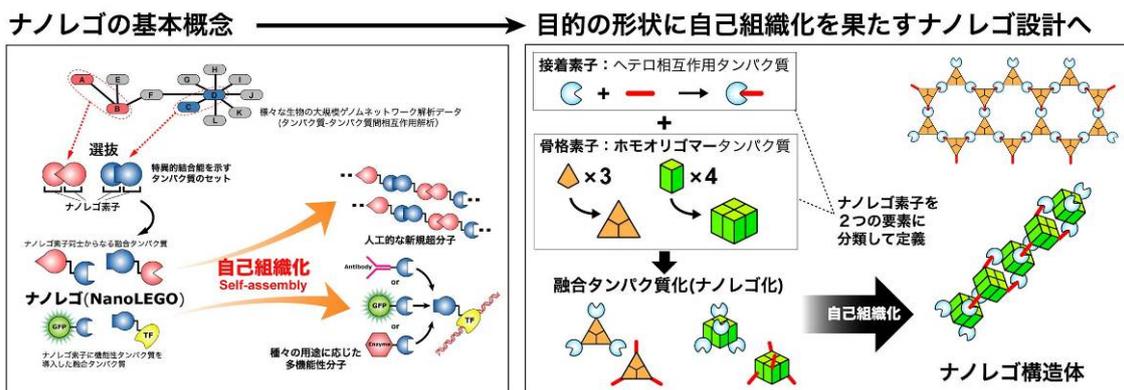


図8 ナノレゴの基本概念(左)と新奇自己組織化構造体を目指した設計戦略(右)

3. 1. 9 ナノレゴによる線状構造体の形成

新規概念に基づいて、超好熱古細菌 *Pyrococcus* 由来 Superoxide reductase (SOR) を骨格素子に、マウス TIP-1 由来の PDZ ドメインと PDZ 結合ペプチドを接着素子に用いるナノレゴの設計と、それを用いた構造体の創出を試みた。骨格素子、接着素子ともにすでにタンパク質高次構造が解明されている(図9)。SOR はホモ4量体を形成するタンパク質で、アミノ末端及びカルボキシル末端共にタンパク質の表面に位置している。立方体の形状を示す頂点にはカルボキシル末端が位置しているため、結合素子 PDZ と PDZpep を各々 SOR のカルボキシル末端に導入したナノレゴを設計した。SOR ナノレゴにおける接着素子と骨格素子間の最適スペーサー配列を知るため、スペーサーの長さを変化させた場合の接着素子の配向性を分子動力学計算を用いてシミュレーションした。結果、各素子の構造ドメイン以外のアミノ酸配列を完全に除去したものでは、接着素子が安定して4方向に突き出ることが予測された(図10)。さらにシミュレーションにより得られた構造から、骨格素子に対して特定方向に位置する2組の接着素子を選ばれることで線状構造を形成することが予測された。さらにナノレゴ間の相互作用をシミュレーション解析した結果、4つの接着素子のうち二組を用いて隣接するナノレゴと会合しうるものが予測された。

設計した SOR ナノレゴ (SOR-PDZ 及び SOR-PDZpep) をおのおの大腸菌で発現し、精製した。作成した2つのナノレゴを混ぜ合わせた結果、白濁形成が認められた(図11)。ここで生じた白濁物は、SOR-PDZ と SOR-PDZpep が 1:1 の比率で構成されていることが明らかとなった。さらに、透過型電子顕微鏡を用いた解析により、SOR ナノレゴ集合体の基本結合構造が線形の鎖状構造であることを明らかとなり(九大グループ報告参照)、設計したナノレゴを用いて自己組織化による新規線状構造体の創出に初めて成功した。

超微弱光検出蛍光顕微鏡を用いて SOR ナノレゴ集合体の形成過程を解析すると、線状基本構造→粒状集合体→不定形凝集体と移り変わってゆく階層的な形成過程が確認された(九大グループ報告参照)。この現象は混ぜ合わせるタイミングを選択できるという点では制御可能であるが、ひとたび混合してしまえば SOR ナノレゴ集合体が不定形凝集体を形成してしまうという点では制御された線状構造体とは言えない。SOR ナノレゴを新しい機能性材料として用いるためには、伸長が完全に制御され、規定した数の SOR ナノレゴが繋がった線状構造体が自由自在に創出されることが望ましい。これは、一方の SOR ナノレゴを固定した後、もう一方の SOR ナノレゴを添加して1ステップの伸長を達成させた後に余分な SOR ナノレゴを洗い流すという操作を繰り返すことで達成できると考えた。そこで、SPR 法を用いて、SOR ナノレゴの積み上げ伸長実験を試みた。SOR-PDZpep を SPR チップ上に固定し、SOR-PDZ を添加すると、第1段階目の線状構造体の伸長がレスポンスユニット(RU)の増加として観察されたが、次に SOR-PDZpep を添加すると、逆に RU の減少が観察された。これは、大量に加えた SOR-PDZpep が SPR チップ上に形成された2量体ナノレゴである-(SOR-PDZpep)-(SOR-PDZ)から、SOR-PDZ を奪い取ってしまうためであると考えられた(図12)。

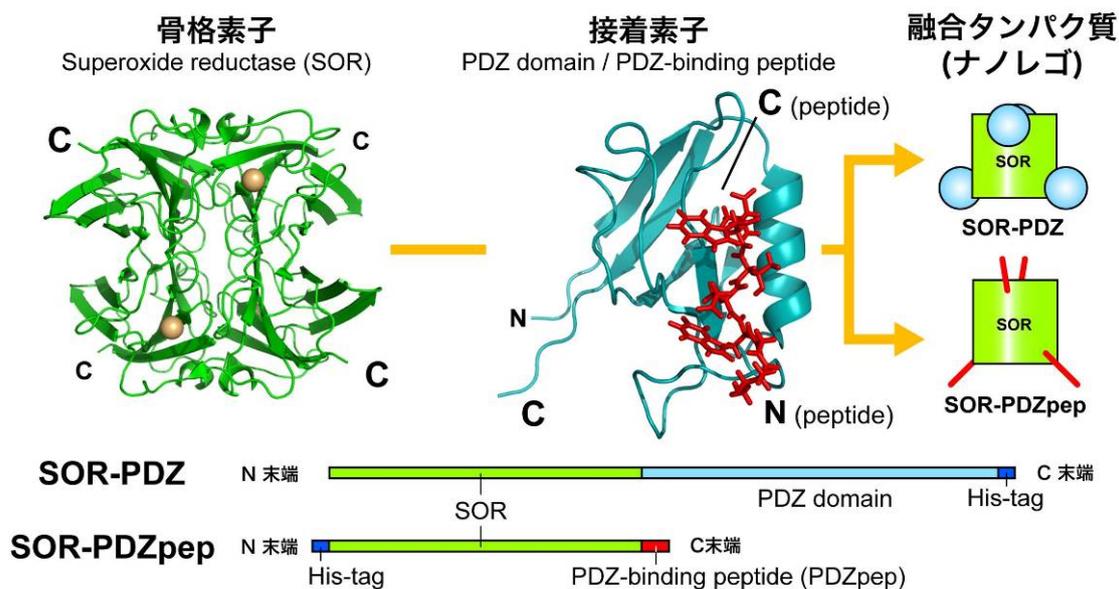


図9 SOR ナノレゴ構築の概略図

SOR 及び PDZ domain/PDZ-binding peptide の構造は, Protein data bank の登録データ(1DQI 及び 1N7T)を用いた。各構造図中 N 及び C は, アミノ末端及びカルボキシル末端を示す。

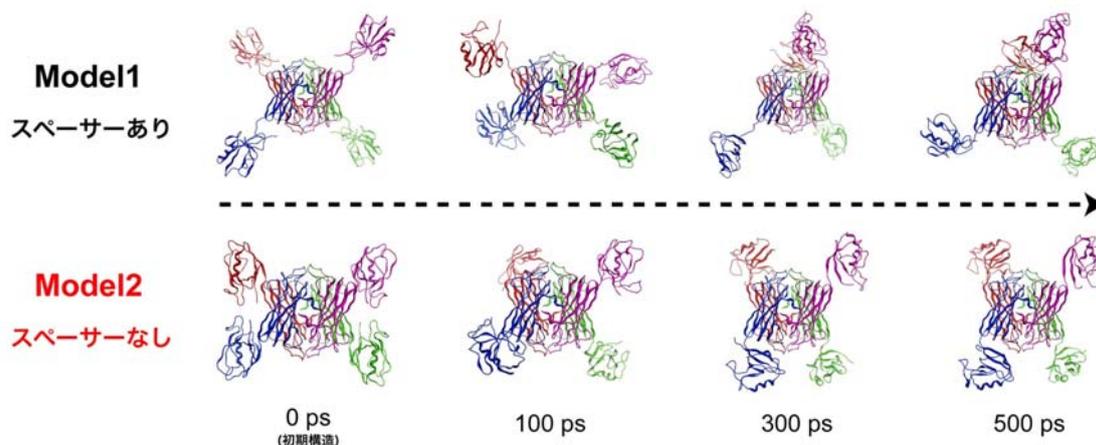


図10 MD シミュレーションを用いた SOR ナノレゴの接着素子配向性の予測

骨格素子 SOR と接着素子 PDZ ドメインの融合部位において, 12 アミノ酸残基のスペーサー配列存在型 (Model 1) とスペーサー排除型 (Model 2) のモデル構造を構築し, Simulated annealing 法を用いて MD 計算を実施した。結果は, 0-373 K の範囲内で温度を上昇及び下降させて得られた 500 ピコ秒後までの経過時間毎の構造を示した。スペーサー排除型に比べ, スペーサーの存在により接着素子の位置が大きく揺らいでいることが分かる。

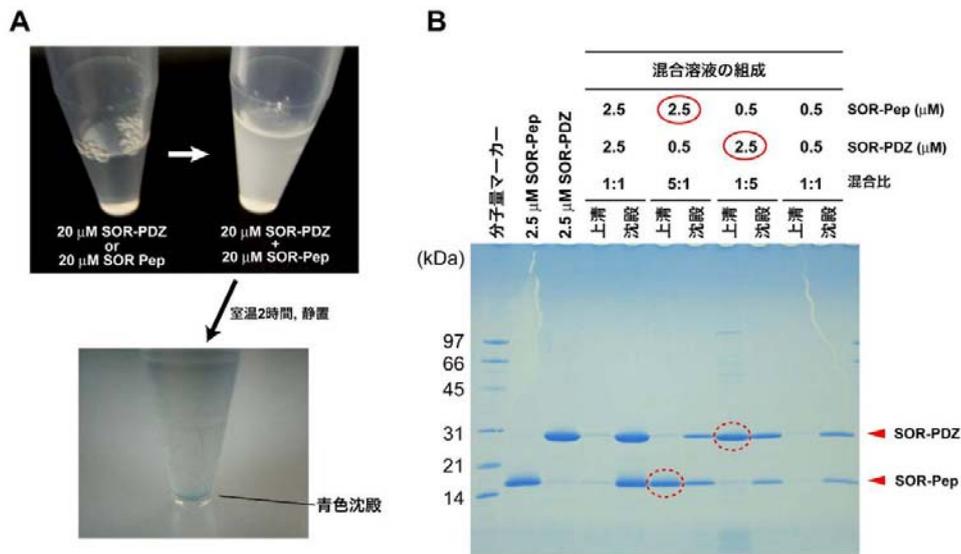


図11 SOR ナノレゴのバルク溶液中における会合実験

A, 2種のSOR ナノレゴの混合による溶液変化。20 μMの各ナノレゴ精製産物を25°Cにて混合した直後、白濁が析出した。さらに室温で2時間静置させた場合、白濁は減少し、青色の沈殿が生じる結果となった。B, SDS-PAGEを用いた白濁を呈した高分子成分の組成分析。2種のSOR ナノレゴの混合によって生じた白濁成分を遠心分離し、その上清および沈殿画分をSDS-PAGEに供した。白濁を呈した高分子成分は、混合時のSOR ナノレゴの濃度比を変化させた場合に置いてもほぼ1:1の組成であり、高濃度側のSOR ナノレゴに対応したタンパク質が上清に残存することが明らかとなった。

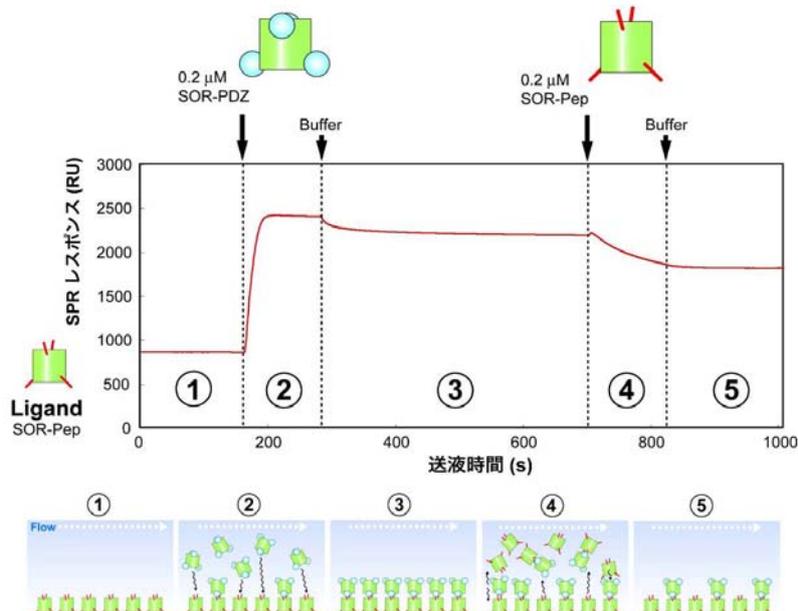


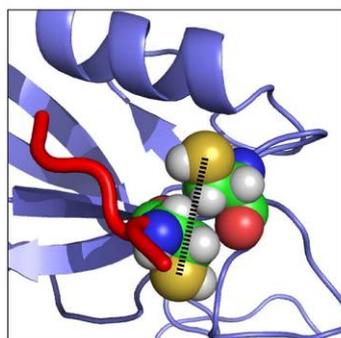
図12 BIACOREを用いた固定化したSOR ナノレゴ分子への会合実験

リガンドにSOR-Pepをアミンカップリング法によって固定し、SOR-PDZを会合させた。ランニング緩衝液(10 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20)による洗浄後、さらにSOR-Pepを添加した。サンプル送液前(①)サンプル送液時(②,④)、及びランニング緩衝液による洗浄時(③,⑤)における、センサーチップ上での分子会合状態の想定図を下図に示した。

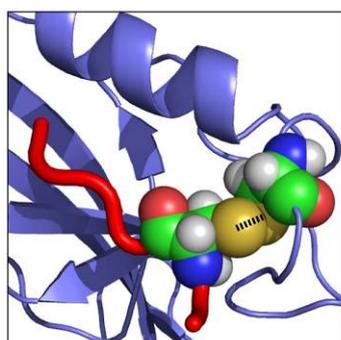
3. 1. 10 ロック付接着素子を用いたナノレゴ線状構造体

形成される SOR ナノレゴ線状構造体は結合素子間の相互作用する親和性の強度に応じた平衡関係を保つことになる。言い換えると、形成したナノレゴ構造体を分離精製しても、時間の経過とともに線状構造体の長さの分布は新たな平衡関係へと移行する。よって規定した数の SOR ナノレゴがつながった安定な線状構造体を自由自在に創出するためには、伸長反応を起こした後に形成された結合素子間の相互作用を「ロック」して、ナノレゴの乖離が起きないようにする必要がある。そこで、接着素子 PDZ および PDZpep に Cys 残基を導入して、自然酸化によって形成される S-S 結合でロックがかかる Cys 導入型 SOR ナノレゴの構築を試みた。PDZ/PDZpep 複合体構造を基にしたコンピュータシミュレーションにより、接着素子 PDZ の 34 番目のアルギニン残基および PDZpep の 3 番目のトリプトファン残基をそれぞれシステイン残基に置換した場合、両システイン残基が S-S 結合を起こしうる距離および配向性を示すことが予測された(図13)。また、システイン残基導入部位は SOR ナノレゴ分子内の4つの接着素子間で S-S 結合を起こさないこともシミュレーションにより予測確認した。次に、システイン残基導入した SOR-PDZ_(Cys) および SOR-PDZpep_(Cys)を実際に発現精製し、相互作用後に S-S 結合が形成されるかどうかを確認した。両方にシステイン残基導入した SOR ナノレゴでは、導入前と比較して異なった結合解離曲線が得られた(図13B、赤線)。すなわち、PDZ/ペプチド間の結合の迅速平衡後、続いて S-S 結合形成と考えられる結合の不可逆化が起こる 2 段階の反応が観察された。その後に洗浄を行っても元のレベルまでに落ちないことから、S-S 結合形成によるロックがうまく行くことが明らかとなった。そこで、ロック化のための条件を模索して、効率よいロック化が達成される条件を明らかにした後、SOR-PDZ_(Cys) および SOR-PDZpep_(Cys)を用いて再び SPR による積み上げ実験を試みた(図14)。その結果、第 1 段階の積み上げのあと、洗い流しを行っても RU の減少はほとんど観察されなかった。結合と洗い流しを還元状態で行うとこの現象は見られないことから、相互作用後に S-S 結合による不可逆的な結合が形成されていると判断した。さらに、積み上げ実験を続けると、RU が定量的に増加することが観察され、線状構造体の制御された伸長が達成されていることが示唆された。

A



Cys 導入変異体 (-SH基)
初期構造モデル



Cys 導入変異体 (-SS形成)
MD計算 5000 ps 後の構造モデル

B

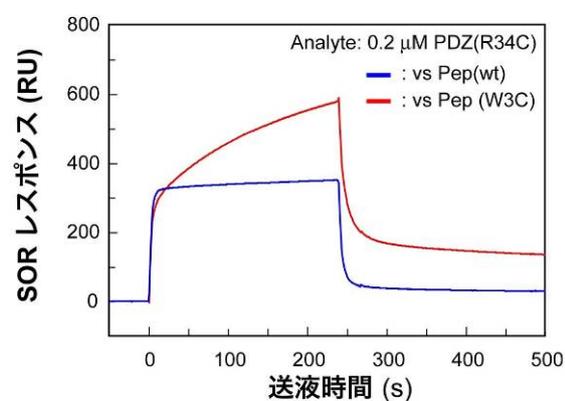
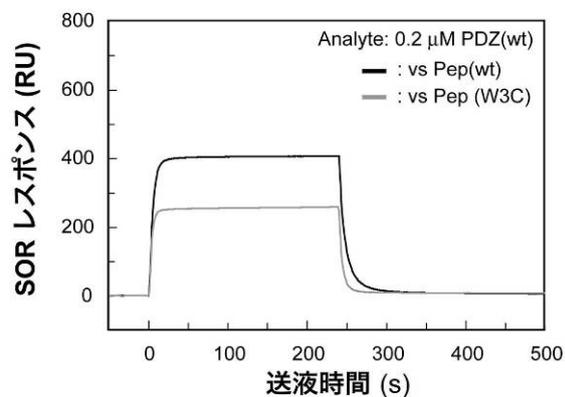


図13 PDZドメインおよび/結合ペプチドへのシステイン残基導入変異体の構築

A, PDZドメイン/結合ペプチドへのシステイン残基導入のシミュレーション結果。上図は、PDZの34番目のアルギニンと peptideの3番目のトリプトファン残基をシステイン残基に置換した初期構造を示す。下図は、システイン置換初期構造の2つのSH基をS-S結合に変換した場合の5000ピコ秒後のMD計算結果。ジスルフィド結合を形成させた場合にもPDZ domain (リボンモデル)及びPeptide (チューブモデル)の大きな構造変化は起きていないことが分かる。

B, PDZドメイン/結合ペプチドCys置換変異体の結合解析。野生型同士の結合(黒線)、PDZ又はペプチドのいずれかがCys置換変異体の結合(灰線、青線)においては、結合及び解離が速やかに起きる迅速平衡を示す可逆的な相互作用を示した。一方、PDZドメイン/結合ペプチドの両方がCys置換変異体の結合(赤線)においてのみ異なる結合様式が認められ、PDZ/ペプチド間の結合の迅速平衡後、続いてS-S結合形成による結合の不可逆化が起こる2段階の反応性を示す適合曲線が得られた。

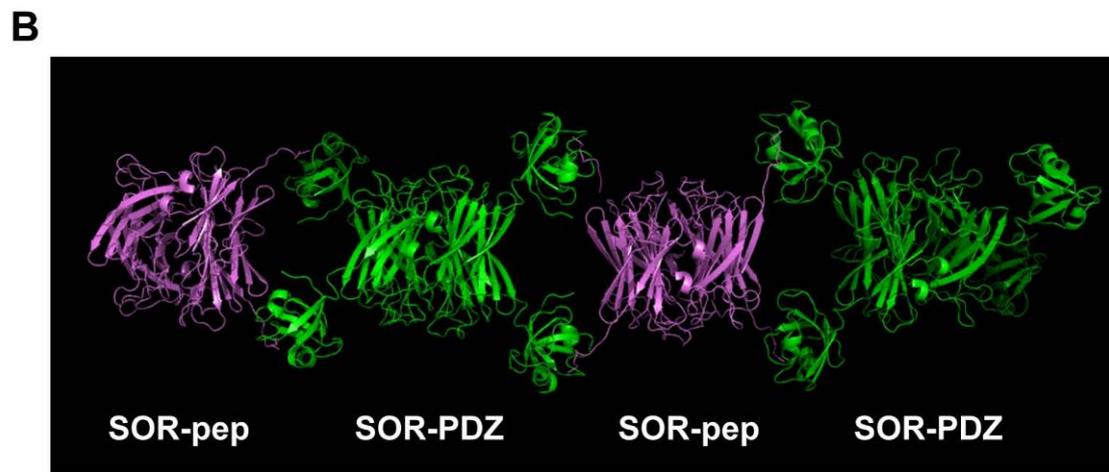
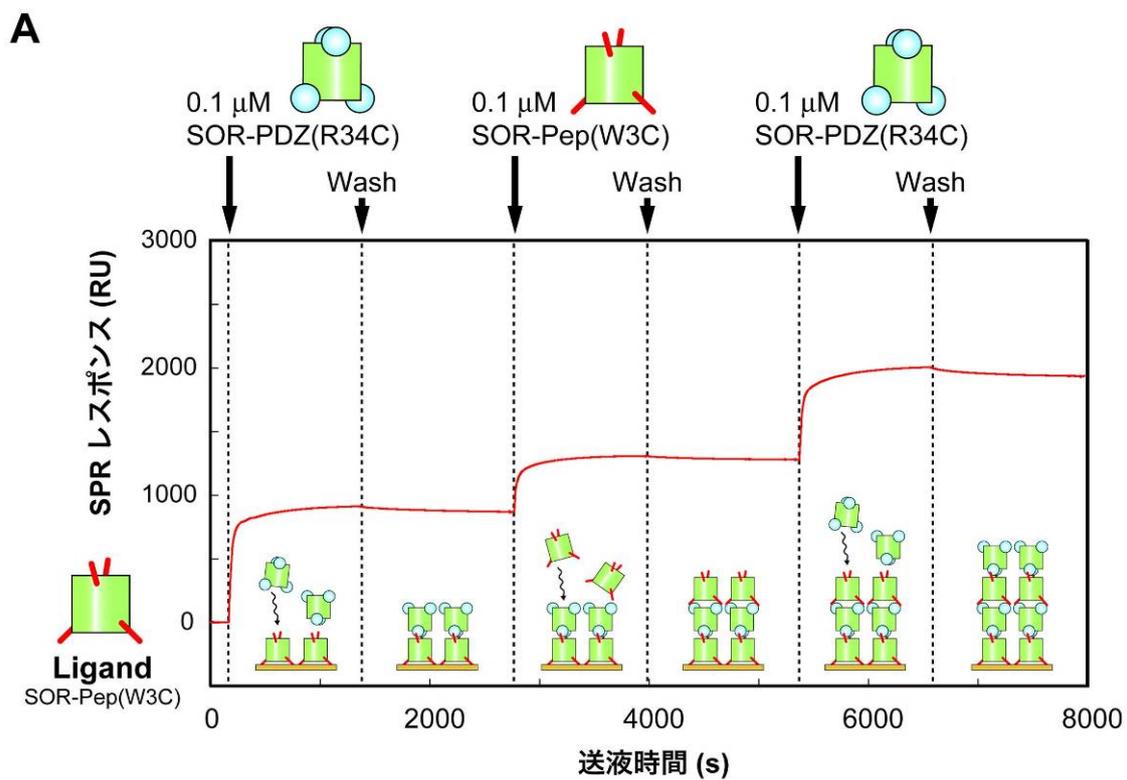


図14 システインを導入した SOR ナノレゴによる固定分子からの伸長

A, 野生型の PDZ 及び binding peptide による結果(図12)と比較すると、各ナノレゴの添加段階では、すべてセンサーグラムの上昇が認められ、添加後の洗浄過程に置いては、センサーグラムの減少がほとんど認められていない。B, SOR ナノレゴの繊維状構造体の予測モデル。

3. 1. 11 伸展末端を制御するナレゴの開発

SOR ナレゴにおける Cys 残基導入による S-S 結合の架橋化により、人為的な操作によって基盤上に固定したナレゴ分子から、一分子毎の単位で長さを制御できるナノ材料としての可能性が示唆された。ここで、バルク溶液中での会合反応を想定すると、これまでに作製した SOR ナレゴ分子のみの場合では、鎖状構造の末端には常に未結合の接着素子が存在することになる為、伸長数を制御することは不可能である。よって、伸長を制御する新たなナレゴ分子を導入することが必要になる。SOR ナレゴが接着素子 2 組ずつの会合によって伸長を達成し、骨格素子である SOR を中心に両方向に伸長する点を踏まえ、2 つの接着素子のみを含む SOR ナレゴの構築を検討し、伸長起点と終点に使用できる新たなナレゴ分子の開発を行った。我々は、これを Cap ナレゴと命名した。

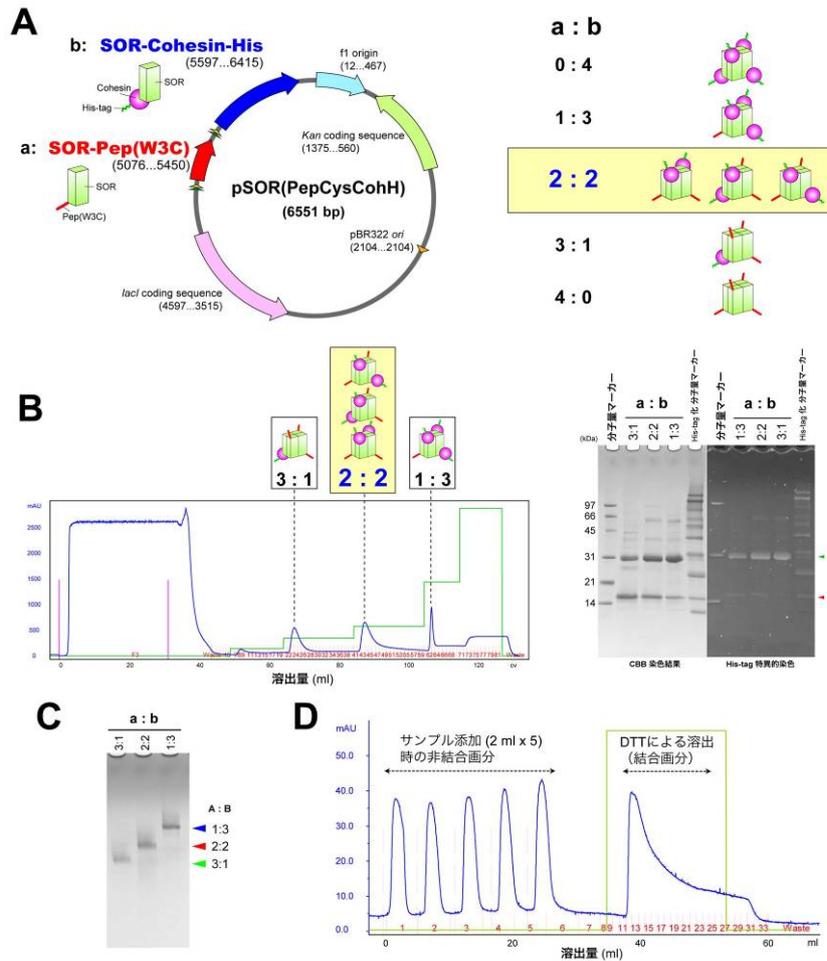


図15 マルチ結合型 SOR ナレゴ PepCys-SOR-Cohesin の構築

A, 共発現ベクター pSOR(PepCysCohH) のプラスミド地図と同ベクターの形質転換体において得られる SOR ナレゴのモデル。B, Ni²⁺金属アフィニティーカラムを用いた SOR ナレゴ分離結果。(左) クロマトグラム上、緑線はイミダゾールの段階的濃度勾配を示す。a:b = 2:2 の組成物は、100 mM イミダゾールによりカラムから溶出した。(右) a:b = 3:1, 2:2 及び 1:3 に相当するピークの SDS-PAGE 結果。C, ゲルろ過分離後の各 SOR ナレゴの Native-PAGE 結果。4 量体が保持された状態で泳動されたことで、移動度の差が認められた。D, SOR-PDZ(R34C) 固定化カラムによる a:b = 2:2 組成を示す SOR ナレゴのアフィニティー精製結果。同一の成分を持つにもかかわらず、サンプル添加時に顕著な非結合画分が認められ、接着素子の配向性に伴う選択がなされているものと示唆された。カラム結合画分は、10 mM DTT によって溶出した。

Cap ナルゴの構築手段として、まず接着素子 PDZ(R34C) を融合した SOR と、接着素子の代わりに His-tag を融合した SOR の 2 種類のタンパク質を発現する共発現ベクターを構築した(図15A)。同ベクターを大腸菌に形質転換し、上記 2 種類のタンパク質の組成比が異なる 7 種類の 4 量体を発現させ、この大腸菌の抽出液を金属アフィニティーカラムに供し、His-tag 依存的に SOR ナルゴをカラムに結合させた。ここで、接着素子のない SOR に融合した His-tag のタグ数によって、カラムへの結合力が異なることを利用し、溶出液であるイミダゾールの濃度を段階的に上昇させ、His-tag のタグ数が 2 本となる溶出ピークを分取し、接着素子を 2 つ有する SOR ナルゴを得た(図15B)。更に、2 つの接着素子の配向性に伴い 3 種のナルゴが存在すると想定されたことから、Cap ナルゴの接着素子 PDZ(R34C) に対となる 4 つの Pep(W3C) を有する SOR-Pep(W3C) の固定化カラムを作製し、同カラムに結合したタンパク質のみを還元剤である DTT を添加して溶出するアフィニティー精製を加え、目的の Cap ナルゴ CapSOR(PDZCys) を得ることに成功した(図15C)。

ここで、2 つの接着素子のみを導入する Cap ナルゴの構築手法を応用すれば、接着素子を導入していない部分に、新たな別の素子を導入することも可能である。実際に、骨格素子の SOR 4 量体に対し、PDZ 結合ペプチド Pep(W3C) と、Ca²⁺依存的に強い結合能を有する条件付き接着素子(次項参照)の一つである Cohesin とを 2 つずつ含んだマルチ結合性を有するナルゴ PepCys-SOR-Cohesin を構築することに成功した(図15)。このナルゴは、Cap ナルゴとして利用できるとともに、別の接着素子を有するナルゴとを連結するために使用できるものと考えられる。これにより、ホモ重合体である骨格素子に対して、複数種の接着素子を導入することが可能な新たなマルチ結合型ナルゴの構築手段が確立できた。

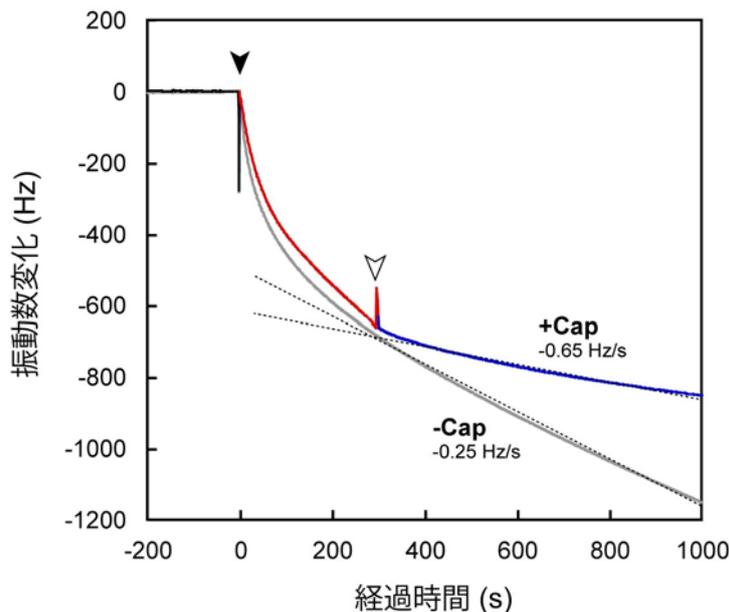


図16 QCM を用いたナルゴ会合体の伸長観察と Cap ナルゴによる伸長抑制効果

予め 0.05 μM SOR-Pep(W3C) を添加したバッチセル溶液中に、同ナルゴをリガンドとして固定した QCM センサーチップを浸した。伸長開始の為に 0.05 μM SOR-PDZ(R34C) を添加した時間を開始時間(黒矢頭)とし、QCM センサーチップの振動数変化を 300 秒間観察した(赤線)。その後、Cap ナルゴの一つである PepCys-SOR-Cohesin を最終濃度 0.25 μM となるようにバッチセル溶液中に添加し、振動数変化を観察した(青線)。灰色で示したセンサーグラムは、Cap ナルゴ添加なしの場合の挙動を表す。Cap ナルゴ添加(+Cap) および非添加(-Cap) の各条件における振動数変化の挙動を比較するため、300-1000 秒間の各センサーグラムから最小自乗法による近似曲線を作成し、その傾き(Hz/s)を比較した。

上記で作成した Cap ナレゴが、本来の目的であるナレゴ繊維状会合体の末端制御に寄与できるかについて調べるため、quartz crystal microbalance (QCM) を用いたバッチセル溶液中でのナレゴ伸長実験を行った(図16)。まず、QCM センサーチップの金表面に対して、SOR-Pep(W3C) を固定化し、0.05 μM SOR-Pep(W3C) をあらかじめ添加した緩衝液中にセンサーチップを浸し、振動数の変化が起きないことを確認した。その後、0.05 μM SOR-PDZ(R34C) を添加した結果、ナレゴ会合体の伸長を示すセンサーチップの振動数の継続的な減少が認められた。そこで、この伸長過程の途中で、2種のナレゴ濃度に対して過剰量(4倍)のCapナレゴを添加した結果、添加直後から振動数の減少の割合が低下した。このことから、センサーチップ上のナレゴから伸長していたナレゴ繊維状会合体の末端にCapナレゴが結合することにより、伸長抑制が起きているものと判断され、Capナレゴが会合体の末端制御に有効であることが示された。

次に、ナレゴ会合体末端での伸長抑制効果が認められたCapナレゴを用い、バルク溶液中での会合実験を実施した。まず、CapSOR(PDZCys)とPepCys-SOR-Cohesinを1:1の濃度比で混合し、ゲルろ過カラムに供した結果、予想通り両者が1分子ずつ会合した[CapSOR(PDZCys)]-[PepCys-SOR-Cohesin]が主要産物として得られた(図17)。また、PepCys-SOR-CohesinとSOR-PDZ(R34C)を5:1の濃度比で混合した結果、SOR-PDZ(R34C)の両側にPepCys-SOR-Cohesinが結合したナレゴ3量体に相当する主要産物が得られる結果となった(図17)。両者の混合において、未反応産物と思われるナレゴ単量体に相当するピークが顕著に観察されたが、4つの接着素子から成るSORナレゴの混合時に認められるような白濁を呈する高分子化は認められておらず、CapSOR(PDZCys)とPepCys-SOR-Cohesin両者が結合素子を2個しか有していないことによって、伸長抑制が起きているものと判断された。よって、新たに構築したCapSOR(PDZCys)とPepCys-SOR-Cohesinのナレゴの利用により、バルク溶液中における伸長制御が可能になることが示唆された。接着素子のバリエーションを増やしてマルチ結合型ナレゴの種類を増やし、更にCapナレゴを加えることで、バルク溶液中での単純な混合操作で規定の数のナレゴがつながった構造物作製の目処がたった。

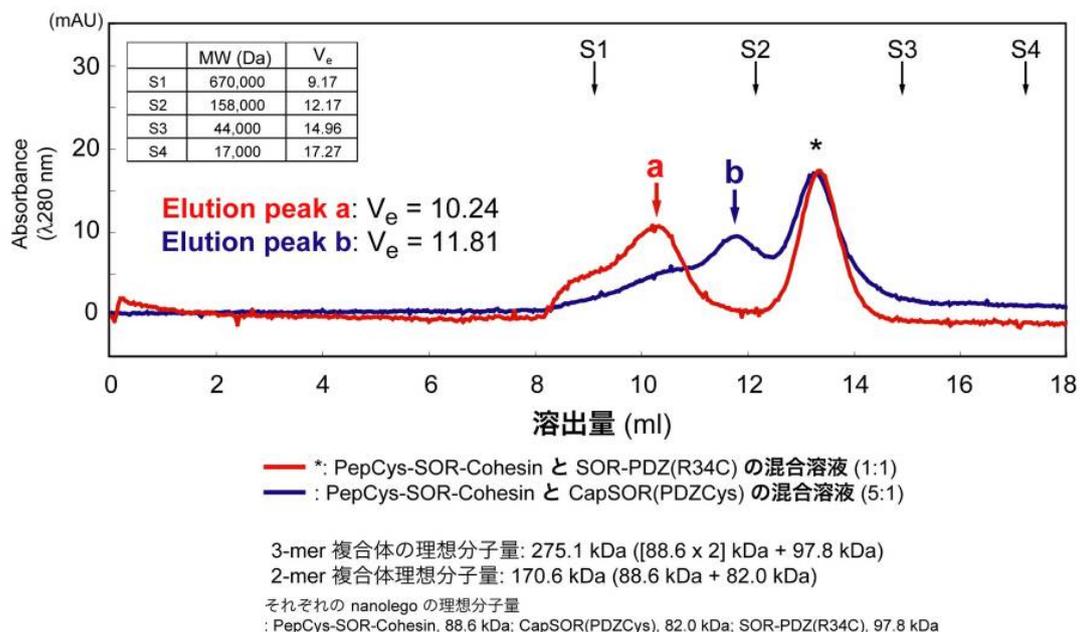


図17 Cap ナレゴとマルチ結合型ナレゴを利用したバルク溶液中の会合実験結果
アスタリスクは、未会合のモノマー成分 (SOR ナレゴ単量体) を示している。

前述の Cap ナノレゴを用いたバルク混合溶液のゲルろ過分離の結果においては、その溶出ピークから2,3量体に相当する分子量を呈する会合体が有意に存在することが明らかとなったが、立体構造モデルから想定されるような2カ所の接着素子を介した鎖状構造を有した会合体となっていることを確認するため、分取されたナノレゴ3量体相当画分について透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を実施した。その結果、野生型の接着素子で構成されたSOR ナノレゴ会合体のTEM観察で認められた会合体の鎖状構造 (後述3. 2. 3参照) よりも明らかに単分子化したロッド状構造が散見された (図18)。この観察結果より、Cap ナノレゴの2カ所の接着素子がSOR ナノレゴの両端に会合しているものと判断され、Cap ナノレゴの会合によって、それ以上の伸長が起きていないこと、またCys導入によるS-S固定が、会合体の安定化に寄与し、ロッド状の形態が保たれていることが示唆された。

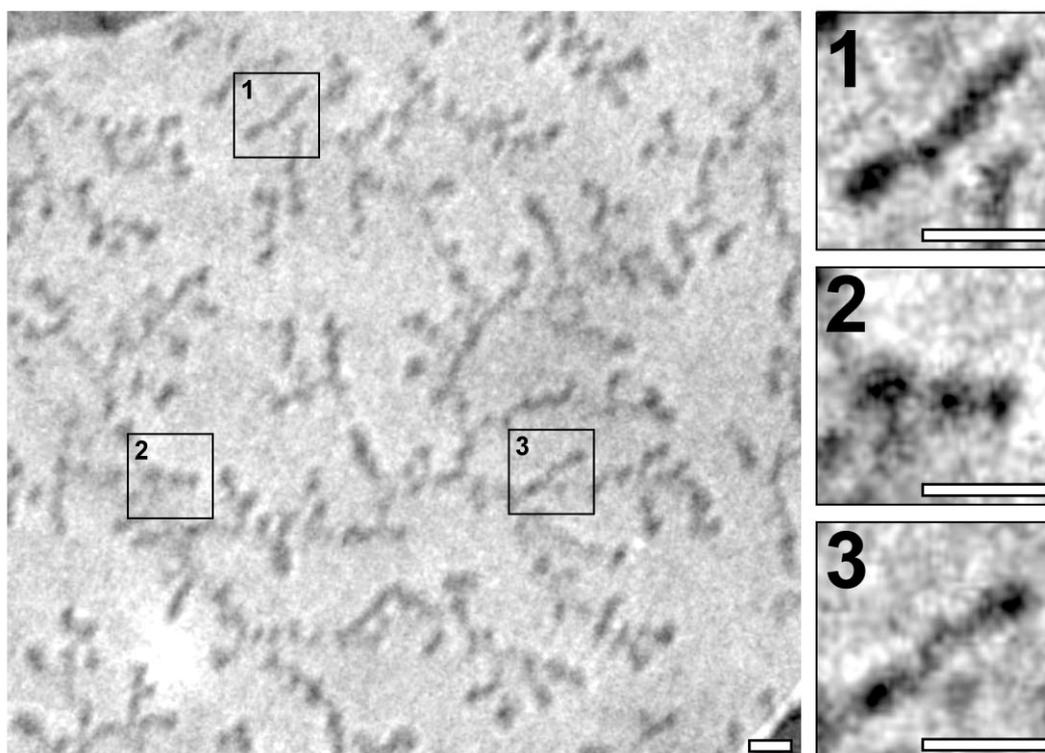


図18 SOR ナノレゴ3量体相当画分のTEM観察結果

本実験では、低分子会合体の構造をより明瞭に観察するため、目的試料を氷包埋法によってグリッド化するCryo-TEM法を使用した。右側の写真には、高視野像(左)に示した3つの領域の強拡大増を示した。各写真のスケールバーは、10 nmに相当する(九大グループでの観察)。

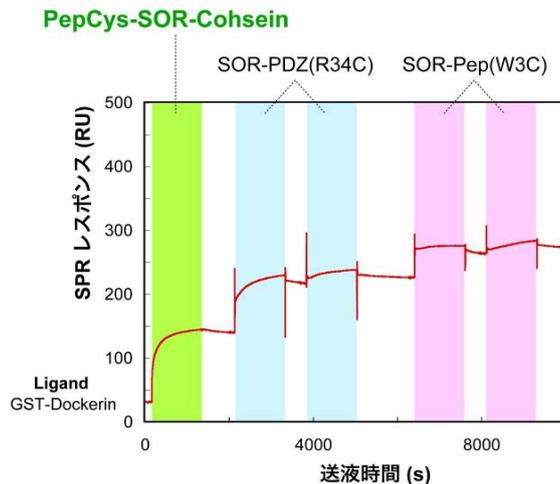


図 19 Dockerin-Cohesin 相互作用によって BIACORE センサーチップ上に固定した PepCys-SOR-Cohesin からの SOR ナノゴ伸長実験結果

緩衝液には、10 mM CaCl₂を添加した HBS buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20, pH 7.4) を使用した。なお本実験では、SOR ナノゴ伸長反応の際、20 分 × 2 回の添加を行った。2 回目の添加時には、ほぼ上昇は起こっておらず、結合部位が飽和に至っているものと判断された。

さらに我々は、マルチ結合型ナノゴ PepCys-SOR-Cohesin を利用した基盤表面からの伸長実験についても実施した。Cohesin の相互作用対である Dockerin を基盤上で固定し、Ca²⁺を添加した緩衝液を用いることで、PepCys-SOR-Cohesin を基盤上に Dockerin-Cohesin 相互作用を介して安定に固定できた。更にその PepCys-SOR-Cohesin を固定化リガンドとして、PDZ/pep 間相互作用 + Cys ロックによる SOR ナノゴの伸長反応を問題なく達成できた (図19)。先に述べた 2 種の Cys 導入型 SOR ナノゴのみを用いた基盤上からの伸長反応では、リガンドから 1 段階目の伸長においてのみ顕著な SPR レスポンス上昇率の増大がしばしば認められており、次段階からの定量的な レスポンス上昇との関連性が失われていた。この理由として、SOR ナノゴの基盤への固定化手法がアミンカップリング法による為、固定された SOR ナノゴの配向性が不規則になっていることが要因であると考えられる。マルチ結合型ナノゴは、基盤からの伸長起点として配向性を制御する技術としても利用が期待できるものと考えられる。

3. 1. 12 条件付きナノゴを用いた新規構造体の創出

「ある条件」を加えた時にのみ自己組織化が起こり、ナノゴが構築することができないか考えた。そこで、ナノゴコンセプト中の接着素子部分に焦点をあて、「ある条件」を加えた時にのみ接着が起こり、自己組織化により高次構造体が創製されることを試みた。具体的には、Ca イオン存在下で相互作用を持つことが知られている *Clostridium thermocellum* 由来の Cohesin ドメインと Dockerin ドメインを接着素子に選択して SOR ナノゴを作成し、検討を行った。

好熱嫌気性セルロース分解細菌 *Clostridium thermocellum* は、セルロース分解能力の高い細菌として知られている。この菌がセルロースを分解する時に分泌するタンパク質は、高分子の酵素複合体を形成しており、その骨格を担っているタンパク質に Cohesin ドメインと Dockerin ドメインと呼ばれるものがある。このドメインは、Ca イオン存在下で K_D 値が 10^{-9} M 程度の比較的強い相互作用を持つことが知られている (図20(A))。そこで、Cohesin ドメインと Dockerin ドメインを条件付き接着素子として用い、骨格素子として SOR タンパク質を用いて SOR ナノゴを作成した。図20 (B) および(C)が、SOR-Cohesin ナノゴおよび SOR-Dockerin ナノゴのモデルを Simulated annealing 法によって構築した結果である。

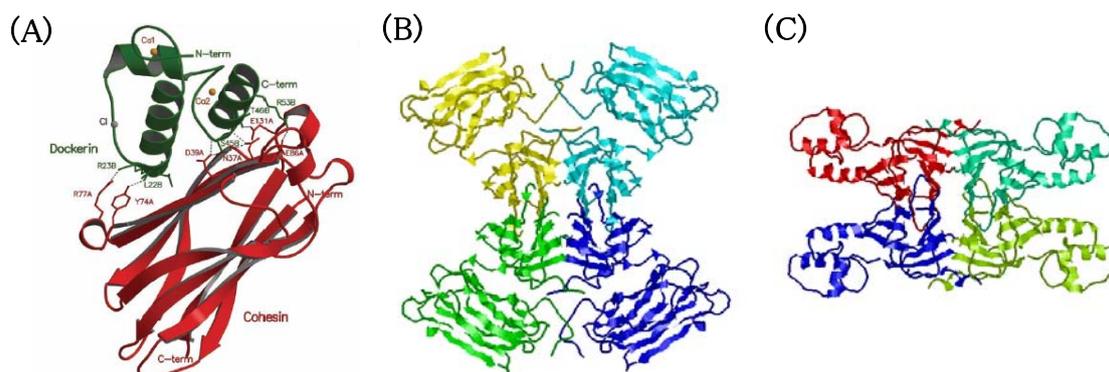


図20 条件付き SOR ナノレゴ構築のための材料

(A): Cohesin-Dockerin complex (B): SOR-Cohesin (C): SOR-Dockerin

得られた SOR ナノレゴを1:1のモル比で混合したところ、Ca イオンが存在しない緩衝液中では透明な溶液のままであったが、Ca イオン存在下では、白濁沈殿が形成された。そこでナノグラムレベルで分子認識やその後の反応追跡を重量変化で捉えることが可能な水晶発振子マイクロバランス法 (QCM)を用いて、分子反応をリアルタイムに測定した(図21)。まず金のセンサーチップ上に SOR-Cohesin を固定化し、Ca イオン有りの Buffer 中に浸し、その中に SOR-Cohesin および SOR-Dockerin を等モル量ずつ添加したところ、センサーグラムが低下が急激に一定時間起こり、高分子化している様子が観察できた(図21 (A))。さらに、Ca イオン無しの Buffer 中にセンサーチップを浸し、SOR-Cohesin および SOR-Dockerin を等モル量添加したところ、センサーグラムは若干低下するものの、すぐに平衡状態になった。そこに Ca イオンを添加すると、再びグラフは急激に低下し、高分子化が起こる様子が観察できた(図21(B))。Ca イオンを添加するという条件により、SOR ナノレゴを用いて自己組織化により、高次構造体を形成することに成功した。

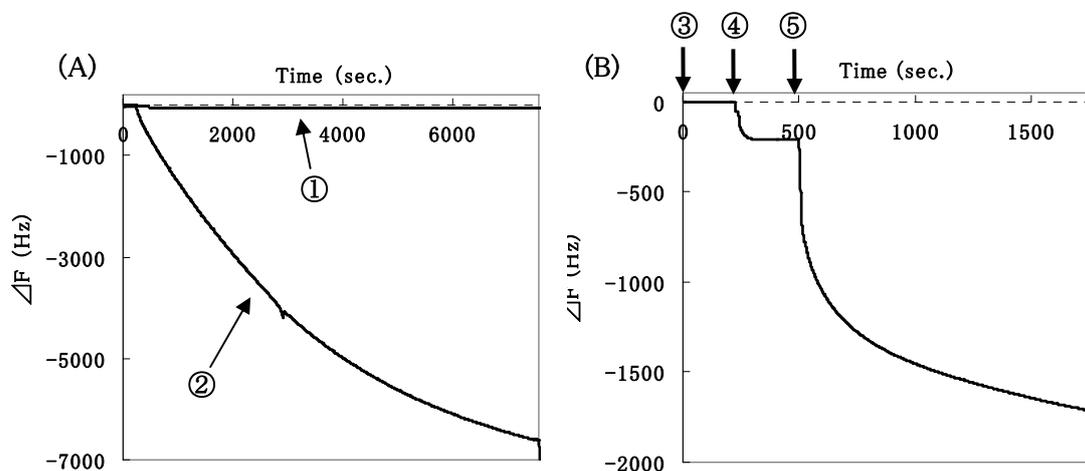


図21 QCM による条件付き SOR ナノレゴの高分子化の測定

(A) HBS-P (10 mM HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005% Tween20) Buffer + 10 mM CaCl₂
 ① 0.2 μM SOR-Cohesin のみ添加 ② 0.2 μM SOR-Cohesin と 0.2 μM SOR-Dockerin 添加
 (B) HBS-EP (10 mM HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% Tween20) Buffer
 ③ 0.2 μM SOR-Cohesin 添加 ④ 0.2 μM SOR-Dockerin 添加 ⑤ 50 mM CaCl₂ 添加

次に、SPR 分析装置を用いて相互作用解析を行ったところ、両者は非常に安定に結合している様子が認められた ($K_D \geq 10^{-9}$)。また SOR ナノレゴを順番に添加していくと、階段状のセンサーグラムを描くことができ(図22)、センサーチップ上に固定された SOR ナノレゴ素子から1分子ごとに積層化が起こり、高分子化していく様子が観察できた。積層化が進行するにつれて、RU の増大が観察された。また、積み上げた SOR ナノレゴを EDTA などのキレート剤を添加することによって約 8 割程度解離することができた。

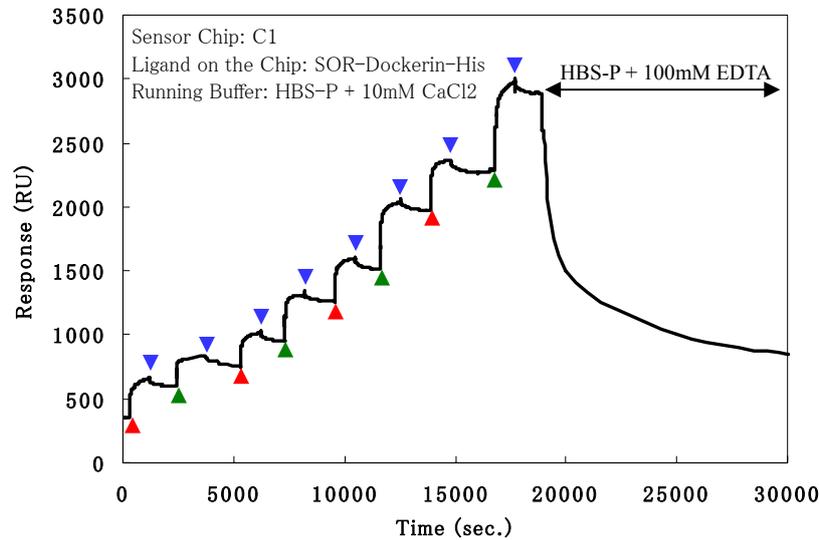


図22 SPR 法による SOR ナノレゴ積層化観察

赤矢頭: SOR-Cohesin 添加、緑矢頭: SOR-Dockerin 添加、青矢頭: Running Buffer

条件付き SOR ナノレゴを用いた高次構造体の形状を推測するために、構造シミュレーションを行った。その結果、SOR-PDZ と SOR-Pep による伸展様式とは異なり、1本の結合素子によってナノレゴ同士が結合すること、すなわち SOR-Cohesin ナノレゴ単量体と、SOR-Dockerin ナノレゴ 4 量体(図23) を基本ブロックとして、これらがさらに相互作用し、外側に向かう高次構造体を作っている可能性が示唆された。

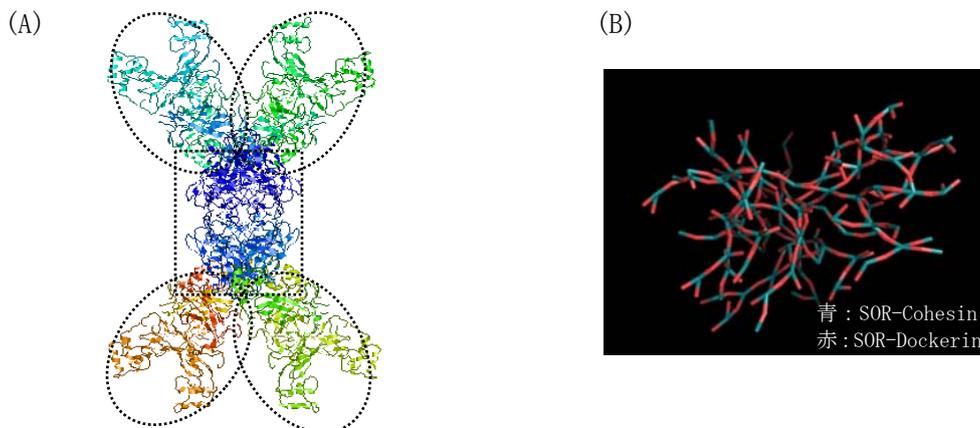


図23 SOR-Cohesin と SOR-Dockerin を用いて創出した高次構造体のシミュレーション
(A) 長方形 : SOR-Cohesin 楕円 : SOR-Dockerin (B) 確立モデル

(2)研究成果の今後期待される効果

これまでもタンパク質を用いた構造体構築の報告は何例か報告されている。たとえば、“Nanohedra”と命名されたPadillaらの方法は、二量体、三量体等のホモオリゴマータンパク質を利用し、それらを組み合わせた融合タンパク質を大腸菌等で発現させることにより、ホモオリゴマータンパク質が連結した構造が得られ、繊維状分子や籠状分子の作成に成功している。しかしながら、Nanohedraを含めて報告されている構造体のほとんどは生体が保有する自己組織化ユニットの単純利用であり、また単一分子から構成されるホモ重合体である。すなわち、組換え大腸菌でタンパク質を合成した直後に会合が起こりうるため、構造化が起こるタイミングを人為的に制御すること、構造体形成の度合いを詳細に制御することはほぼ不可能である。一方、我々が研究したナレゴは、タンパク質相互作用を利用して自己組織化能を持つ新奇分子を新たに創出し、これを用いて制御下で新奇構造体の作成を目指すものであり、自然界に存在する自己組織化能を応用した既存の研究とは一線を画している。

当研究においてナレゴの基礎研究、SOR ナレゴを用いた制御された高次構造物創出研究を通じて、人工タンパク質(ナレゴ)をナノマテリアルとして利用するための概念の体系化と基本技術の確立を達成することができた。以下に、確立した概念と基本技術を箇条書きする。

ナレゴの概念

- 1) 骨格素子、接着素子からナレゴを構築する。骨格素子にはホモオリゴマータンパク質を用いることが有利である。また、特定の機能を持った素子(機能素子)もナレゴに加える。
- 2) 構造体作製のためには接着素子は比較的弱い結合を複数用いる。
- 3) 接着素子間の相互作用が安定化する仕組みが必要。
- 4) 構造物の末端を規定するためのキャップナレゴの利用。
- 5) 基板上からの伸展配向性の制御、伸展の完全制御のためのマルチ結合型ナレゴの利用。
- 6) 一定条件下での高次構造物形成のための条件付きナレゴの利用。

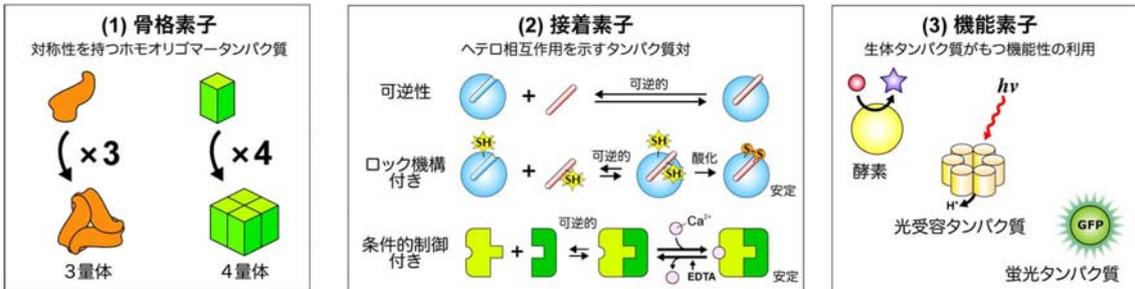
確立した基本技術

- 1) ナレゴ設計のためのシミュレーション技術
- 2) 接着素子間の相互作用を安定化するための S-S 結合導入技術
- 3) 構造物末端を規定するためのキャップナレゴの発現精製技術
- 4) マルチ結合型ナレゴの発現精製技術

図24に SOR ナレゴを例にとってナレゴの体系をまとめた。今後はこの概念と技術を基盤として、様々なナレゴ構造物の創出、また創製されたナレゴ構造物の応用への展開が見込まれる。さらに我々が確立した概念と技術を用いることにより、目的とする高次構造物を完全制御下で自在に創出することが可能であり、人工タンパク質を用いたナノテクノロジー分野へ広く貢献するものと思われる。

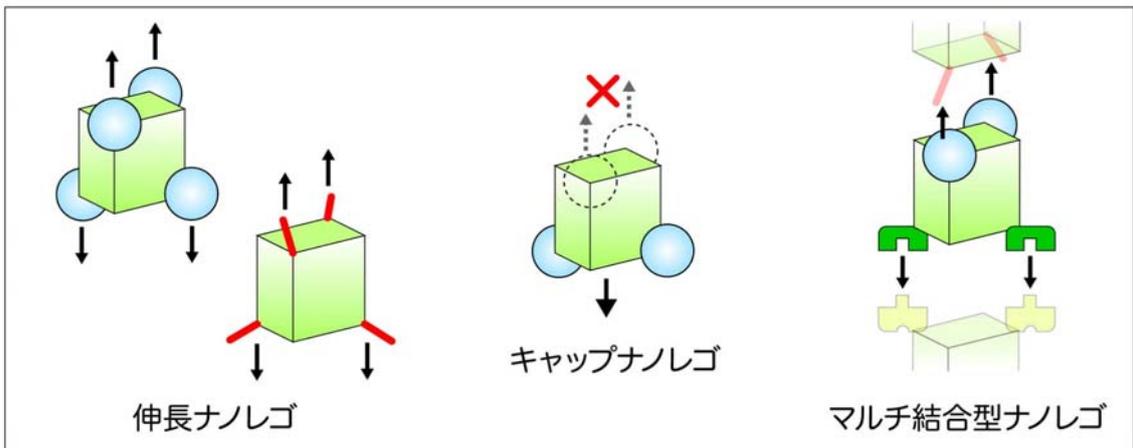
ナノレゴ素子の分類

ナノレゴ構築のための要素を定義



構造化のためのナノレゴ

4量体骨格素子 SOR を用いたナノレゴ構築例



ナノレゴ自己組織化構造体の創出

ナノレゴの組み合わせによって自己組織化を制御

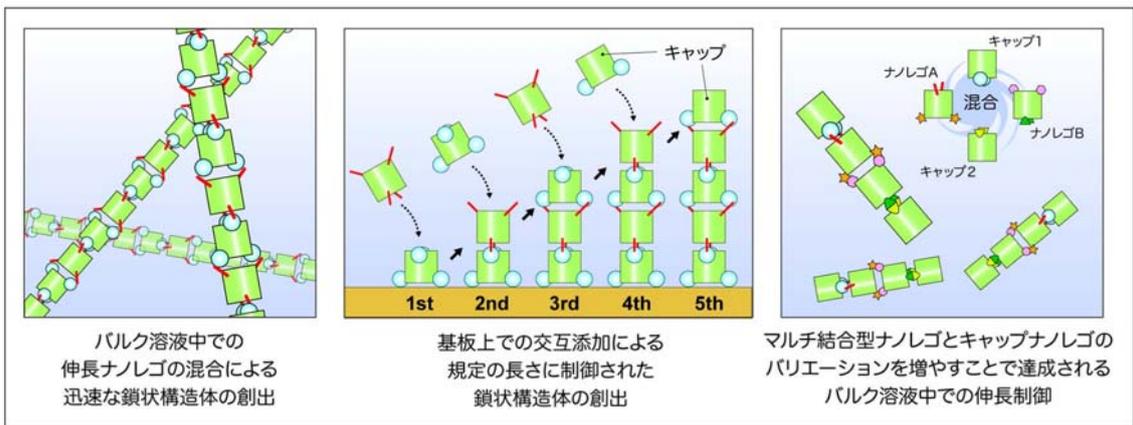


図24 ナノレゴの体系

3つの要素に分類された素子の組み合わせと構築技術の選択により、様々な分子ブロックとしてのパターンを有したナノレゴ設計する。それらパターン化されたナノレゴの選択と会合環境について考慮し、ナノレゴの有する自己組織化能に人為的な制御を加え、目的となる構造体を創出する。

3.2 ナノレゴタンパク質の物性解析およびナノ秩序アーキテクチャーの構築(九州大学 松田・木戸秋グループ)

(1)研究実施内容及び成果

九大グループは、(1)タンパク質間の相互作用力の精密測定に基づく、ナノレゴ分子集合体構築・制御のための分子間相互作用の物理化学的・力学的基礎理解の拡充、および(2)ナノレゴタンパク質の三次元アーキテクチャーの構築・構造解析のためのタンパク質単分子観察およびタンパク質分子集合体構造解析、の二課題について研究を実施した。前者の課題では、理研グループが大規模スクリーニングにより既得の特異的相互作用タンパク質ライブラリーから選定されたナノレゴ素子候補タンパク質間の相互作用力を原子間力プローブ顕微鏡法によって解析し、ナノレゴ蛋白質の開発の上での基礎データとしてのレゴ素子間相互作用力の精密実測・決定を行った。分子集合体構築に適した相互作用強度の特性を確認するとともに、ナノレゴ蛋白質の設計指針の拡充を進めた。後者の課題では、それらの分子レベルでの物理化学的知見を踏まえ、ナノレゴタンパク質の会合・集合体形成の効果的手法を検討し、自発的集合化したタンパク質ナノ秩序アーキテクチャーの構築とその構造解析・構造制御の研究を実施した。

上記の二課題を高度なレベルで遂行するため、H14-15 の期間において、まず当グループにて従来より立ち上げていた分子間力測定技術および単分子観察技術についてさらなる精密化を行った。具体的には、ナノレゴ素子間のリガンドレセプタカの高精度定量法の開発およびナノレゴ素子一分子観察・解析・操作法の確立を行った。原子間力顕微鏡(AFM)プローブチップ上にナノレゴ素子を化学固定して、基材側に固定したもう一方のナノレゴ素子との間で力測定を行う際、チップ上あるいは基材上での固定の状態によっては、ナノレゴ素子自体の構造変性やリガンドレセプタカ間の正常な結合様式の阻害が起り、力測定の信頼性・精度を顕著に減ずる事態が生じる。このような問題は AFM によるタンパク質分子間力測定の従来法では未解決の問題であったが、本研究ではこの問題に対しナノレゴ素子間相互作用力の高精度データベース作成のため、新しい高精度力定量法の開発に取り組む必要があった。新技術として、AFM チップ上および基材表面上にポリマーのグラフト重合層を作成し、その自由端にナノレゴ素子を固定する方法を開発した(特許出願済)。この技術によって、ナノレゴ素子の運動性を保存し、かつ力測定時の高次構造変化を抑えた、タンパク質のソフト・ハンドリングができ、ナノレゴ素子のリガンドレセプタカの高精度定量が可能となった。

H16 年度は、ナノレゴタンパク質による分子集合体の構築・設計の際に重要となる物理化学的・力学的基礎情報を拡充した。具体的には多くのナノレゴ素子についての相互作用力データ収集・解析を進めた。H14-15 年度に確立した、高分子プローブを用いるタンパク質のソフトハンドリング方式による精密相互作用力測定法を応用し、理研側より提供される種々のナノレゴ素子についてそれらの相互作用力を決定し、力のデータベース化・カライブラリーの作成を進めた。

H17 年度からは、H16 年度までに選定されてきている複数のナノレゴ素子の候補対について、原子間力顕微鏡法による素子間相互作用力の精密定量を続行するとともに、その物理化学的および力学的特性の理解を強化するため、以下 3 点の課題を詳細に検討した。(a)相互作用力の分子構造依存性、(b)相互作用力の測定時分子引き離し速度依存性、(c)レゴ素子間の平衡定数および速度論定数との比較。これらの解析を進める上で新たな測定技術として、Dynamic Force Spectroscopy (DFS 解析)を導入し、ナノレゴ素子間相互作用のエネルギーランドスケープの情報に基づいた相互作用強度の理解を可能とした。この解析法から、ナノレゴタンパク質の三次元アーキテクチャーの構築における、要素間相互作用の設定・設計のための原理的指針を得ることが可能となった。

さらにプロジェクト後半の H17~19 年度では、選定されたナノレゴ素子を組み合わせさせて作製されたナノレゴ分子についてその分子集合体の構築法を検討した。各々のナノレゴ分子の構造と相互作用特性を踏まえて、線状、環状、平面状等の秩序構造体の構築を目指し、ナノレゴ分子集合体の可視化を行った。この際、秩序集合体形成の有無および構造の特徴の結果をフィードバックし集合体形成により効果的なナノレゴ分子側の構造・相互作用特性を考察し設計に活かすとともに、秩序集合体の形成を効率的に誘導し得る自己集合性足場分子の活用も検討した。形成された構

造体について、透過型電子顕微鏡、原子間力顕微鏡および全反射型蛍光顕微鏡等を併用し、高分解能観察・解析を行った。

3. 2. 1 グラフト重合鎖を用いるタンパク質のソフトハンドリング式分子間力測定技術の開発

ナノスケール相互作用力解析およびその分子集合体構築の検討の前段階として、高分子プローブを応用したタンパク質のソフトハンドリング方式によるリガンドレセプタ力の高精度測定法の開発を行った。

分子間力顕微鏡プローブチップにタンパク質を固定し、プローブのナノスケールでの位置制御によりタンパク質を操作する技術は、抗原—抗体相互作用力の解析やタンパク質のコンフォメーションのメカニクス解析などに応用されている。従来の方法におけるタンパク質の固定方法としては、(1)プローブチップ上および基材表面上への直接固定、(2)スペーサー分子を用いる固定、が試みられているが、タンパク質の表面付着に伴う変性や力測定時の機械的変性等の問題点があり、高精度力測定の妨げとなっていた。本研究ではこれらの問題を解決する固定法として(3)チップ上・基材表面上に形成した高分子グラフト層の自由末端への固定技術を開発した。この方法では、非特異的相互作用力の混入やタンパク質の機械的変性を抑制することができ、分子間力測定の質・精度を向上させることが可能となった。

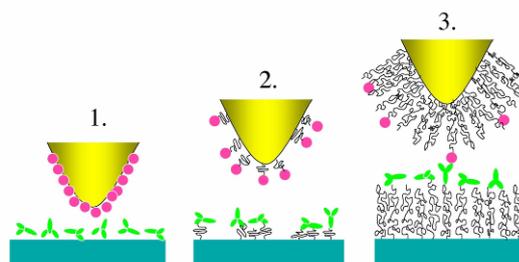


図 2 5. 分子間相互作用力測定実験における蛋白質の 3 種類の固定方式。(1) 表面への直接固定。(2) スペーサーを介する固定。(3) 高分子グラフト層上への固定。

プローブチップ上および基材表面上への高分子グラフト層の作製とグラフト層上への蛋白質固定

プローブチップ上および基材表面上への高分子グラフト層の作製は、それぞれの表面に重合開始剤としてカルボキシル基を有する光イニフィアタを化学固定したのち、ビニルモノマー溶液中で UV 照射することにより行った。光イニフィアタは照射の間のみ重合鎖を伸長する特性を持つため、照射条件の調節により重合鎖長を制御することができる。UV 照射強度・照射時間を変えて重合反応を行うことにより、蛋白質のソフトハンドリング方式力測定において適切なグラフト重合鎖長・層厚の検討を行った。グラフト層上への蛋白質固定は、グラフト重合鎖自由末端のイニフィアタ分子に含まれるカルボキシル基と、蛋白質表面上のアミノ基を、水溶性カルボジイミドによる縮合反応により結合して行った。

分子間力プローブ顕微鏡によるソフトハンドリング式蛋白質間力測定

プローブおよび基材表面への抗原(ヒト血清アルブミン:HSA)およびその抗体(anti-HSA)の固定は下記の 3 通りの方式で行った(図25)。(1)表面への直接固定法。表面に化学固定したマレイミドあるいはスクシンイミド架橋剤により蛋白質を固定。(2)スペーサーを介する固定法。自由末端にマレイミドあるいはスクシンイミド基を有するポリエチレングリコール鎖を利用。(3)高分子グラフト層上への固定法。抗原—抗体対について、XYZ3 軸クローズドループ型分子間力プローブ顕微鏡を用いて力測定を行い、得られるフォースカーブのかたち、結合力値の比較を行った(図26)。

表面直接固定法(1)では抗原—抗体結合力の他に非特異的付着力のピークが顕著であり、スペーサーを介する固定法(2)では、そのような非特異的付着力ピークの出現は抑制されたが、全測定中 15%の出現は避けられなかった。グラフト重合層上での固定法(3)では非特異的付着力ピークは 2%の出現率と大幅に抑制され、タンパク質の機械的変性を示す鋸型カーブの消失、力の分布のばらつきが減少が見られた一方、力を検出できているフォースカーブの出現率が A、B に比べ低下し 40%程度となった。グラフト重合層を活用したタンパク質のソフトハンドリング方式による力測定法は測定精度の向上には有効であることが確認されたが、力測定効率のさらなる向上の必要性が今後の課題となるものと考えられる。

3. 2. 2 Dynamic Force Spectroscopy (DFS)によるナレゴ素子間相互作用の特性解析およびナレゴ素子対間 PPI 諸特性の理解の強化

ナレゴ素子間結合強度の分子構造的基礎の理解の強化および分子構造設計からの結合強度制御の基礎指針の確立を目的とし、ナレゴ接着素子対として選定された PDZ タンパク質 TIP-1 およびその認識ペプチド (PDZ-pep) 間の相互作用力の精密解析の総仕上げとして、PDZ 認識ペプチドのアミノ酸残基配列改変による素子間結合力・平衡定数・速度論定数への影響の系統的解析を行った。特に、それらリガンドーレセプタ対間相互作用の Dynamic Force Spectroscopy 解析を新たに取り入れ、TIP-1/PDZ-pep 間相互作用のエネルギーランドスケープ情報を明らかにした。ナレゴ素子間の結合強度の設定・選択を行う上では、エネルギーランドスケープ上でどの結合・解離経路へ誘導するかが本質的であり、その具体的な調節はタンパク質の立体構造およびナレゴ集合体内での立体配置に依存することを明確にした。

AFM により測定されるリガンドーレセプタ対等の特異的相互作用の強制解離力は一般に、力測定時のプローブ引離し速度に依存し、その速度依存性の解析から相互作用の自由エネルギープロファイルの概形を推定することが可能である (DFS 解析)。当グループでは、ナレゴ素子 TIP-1 および PDZ-pep 間相互作用に対し DFS 解析を行い、それらの相互作用に、他の測定法では検出困難な二段階の解離速度過程が含まれることを見出した。

ナレゴ素子対間相互作用力の実測

選定された 4 種類のナレゴ素子対 (PDZ ドメインを有するタンパク質 TIP-1 と PDZ ドメインの異なる認識配列を有する 4 種類の合成ペプチド (PDZ-pep) との各対) についての結合力の決定を行った。TIP-1 および PDZ-pep を、高分子スペーサーを介して原子間力顕微鏡プローブおよび基材の表面に固定し、プローブの昇降による結合の強制解離の力を測定した結果、初回の引き離し速度条件下 (500 nm/s) では、結合力はいずれのペプチドの場合でも 60 pN 程度と決定され (図 27)、過去に報告のあるビオチン-アビジン間の結合力にも匹敵する強度であることがわかった。TIP-1

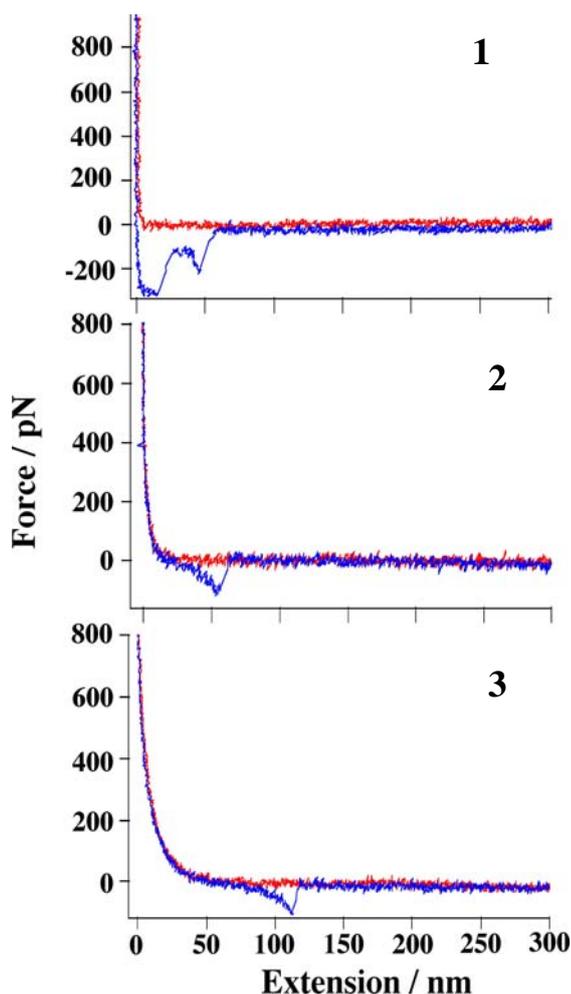


図 26. 3 種類の異なる方法でプローブチップ・基材表面に固定した抗原-抗体間の相互作用フォースカーブ。A. 表面直接固定法。B. スペーサーを介する固定法。C. ソフトハンドリング方式固定法

と PDZ-pep の組み合わせは、その機械的強度の強さからナノレゴ集合体を形成させるための素子として有効であることが示唆された。一方、4 種類のペプチド間で結合力の差異は認められなかったが、タンパク質相互作用の強制解離力は引き離し速度に依存することが知られており、差の現れない速度条件であった可能性も考えられた。結合力への引き離し速度条件の影響とともに、ペプチド配列の寄与の詳細を調べ、結合強度の異なるレゴ素子の拡充を進める必要が考えられた。

Dynamic Force Spectroscopy 解析の導入

タンパク質やペプチド等の生体分子リガンドーレセプター間の特異的相互作用の特性解析において、分子間力値の決定は、平衡論および速度論的解析とともに相互作用の基礎理解のための重要なアプローチの一つである。リガンドーレセプター間力の実測には、これまでに、一対の相互作用対に働く分子間力を同定可能な原子間力顕微鏡(AFM)による力測定法が応用されている。AFM により測定される特異的相互作用力は、リガンドーレセプター複合体を機械的に強制解離させる際の結合破断力として得られるが、その値は強制解離下の引き離し速度に依存することが知られている。近年、そのような結合破断力の引き離し速度依存性のデータから、解離速度定数と自由エネルギープロファイルの概形の解析法(Dynamic Force Spectroscopy ; DFS)が提唱され、種々のリガンドーレセプター対について DFS 解析が行われている。九大グループでは、ナノレゴ接着素子候補として選定されたタンパク質内結合モチーフ PDZ ドメインと、その認識ペプチド間相互作用に対して DFS 解析を行った。その結果、PDZ ドメインー認識ペプチド間結合の解離には二段階の速度過程が含まれることが見出された。

PDZドメインを有する Tax-interacting protein-1 (TIP-1) および、 β -catenin の C 末端側 10 残基から成る PDZドメイン認識ペプチド PDZ-Pep (CQLAWFDTDL ; 下線部が特異的認識配列)を、それぞれガラス基材表面とカンチレバー先端に PEG cross-linker (M.W = 3400) により固定し、Asylum Research 社製 AFM、MFP-3D を用いて force-distance (f - d) カーブを測定した。DFS 測定は、ばね定数を校正したカンチレバー ($17.20 \sim 25.99 \text{ pN nm}^{-1}$) を使用し、PBS 溶液中、室温下、8 条件のカンチレバー引き上げ速度 ($V_{\text{ret}} = 20, 50, 200, 500, 1500, 3000, 5000, 12000 \text{ nm s}^{-1}$)にて行った。各速度条件下での測定は、基板上の 1 位置 10~30 回、100 位置程度行い、全体で数千の f - d カーブを得て、その中で特異的解離のピークが見られる数百カーブを選び自動解析プログラム(自作)にて解析した。測定された解離力ヒストグラムに対して、多重ガウス分布フィッティングを行い、その第一のピークを一対の PDZ ドメインと PDZ 認識ペプチド間の結合解離力とした。

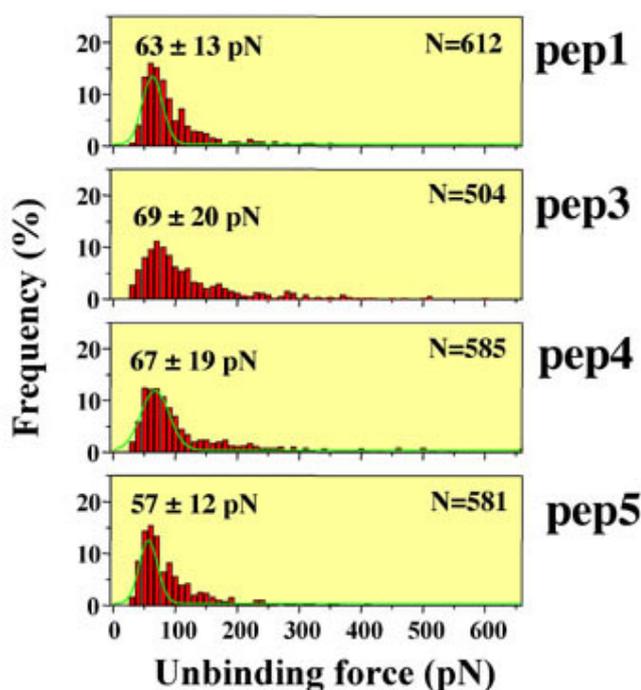


図 2.7. TIP1 と 4 種類の PDZ-pep 間の結合力分布

AFM カンチレバーの異なる引き上げ速度条件下で測定された TIP-1 と PDZ-Pep 間の強制解離力の分布を図28に示す。各速度条件下での力分布は、低値領域に最頻値が偏っており、高値領域には幾つかのピークの重なりが見られるブロードな形を呈した。多重ガウス関数を用いてフィッティングを行ったところ高値領域の各ピーク値は第一ピーク値に対してほぼ整数倍に増加した。このことより第一ピーク値を TIP-1 と PDZ-pep 一対間の解離力と帰属した。各速度における一分子間解離力値は引き離し速度の上昇につれ増大した($V_{\text{ret}} = 20 \sim 12000 \text{ nm s}^{-1}$ で $36 \sim 206 \text{ pN}$)。

一分子対解離力 (f^*) を、各引き離し速度 V_{ret} とその結合解離時の $f-d$ カーブの傾きの積により求められる loading rate (r_f) の対数値に対してプロットした (図29)。 f^* の $\log(r_f)$ に対する増加率は高速引き上げ領域 ($V_{\text{ret}} = 1500 \sim 12000 \text{ nm s}^{-1}$) と低速引き上げ領域 ($V_{\text{ret}} = 20 \sim 500 \text{ nm s}^{-1}$) で顕著に異なっており、各々の領域で良い線形近似直線を引くことができた。DFS 理論によれば、 f^* vs. $\log(r_f)$ プロットの傾き (f_β) と X 切片 (r_f^0) から、反応座標上における結合位置から活性化エネルギーのピーク位置までの距離 x_β 、および解離速度定数 k はそれぞれ、 $x_\beta = k_B T / f_\beta$ 、 $k = r_f^0 / f_\beta$ により与えられる。図5の結果に対しては、高速引き上げ領域から $x_{\beta 1} = 0.05 \text{ nm}$ 、 $k_1 = 3.13 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、低速引き上げ領域から $x_{\beta 2} = 0.22 \text{ nm}$ 、 $k_2 = 2.25 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ が求められた。図30にこれらの解析値に基づいて推定された TIP-1 と PDZ-pep 間結合の解離における自由エネルギーのプロファイルの概形を示す。以上の結果より、TIP-1 と PDZ-pep 間結合の解離過程には二つの活性化状態が存在し、二段階の解離速度過程が含まれている可能性が示唆された。

3. 2. 3 SOR ナルゴ集合体の基本結合構造と、階層的集合体形成過程の観察

タンパク質の自己秩序集合体は一般に、細胞や組織等の構造形成および機能発現において広範かつ重要な役割を担っており、そのような分子集合体のナノスケールでの構造構築・制御法の確立は生体模倣ナノマテリアル研究における重要課題の一つである。九大グループでは、理研グループにて開発

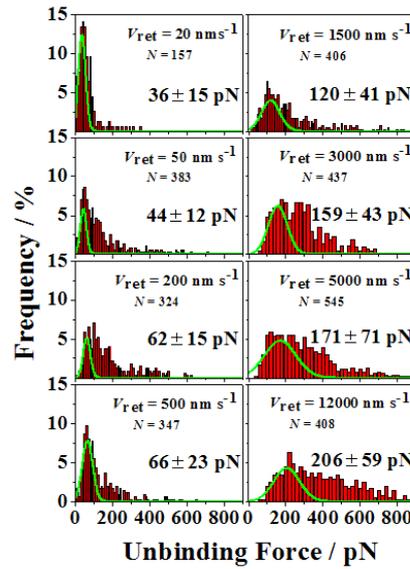


図 28. 解離速度を変化させた場合の、TIP-1 vs. PDZpep 間相互作用力のヒストグラム変化

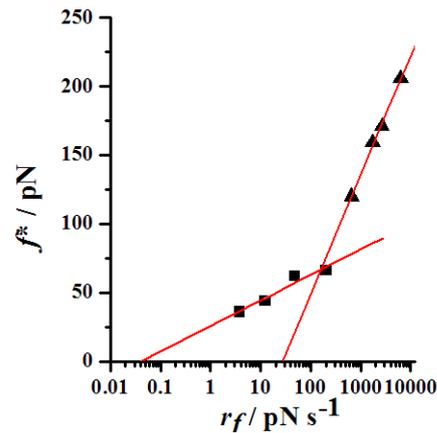


図 29. TIP-1 vs. PDZpep 間相互作用の Dynamic Force Spectrum

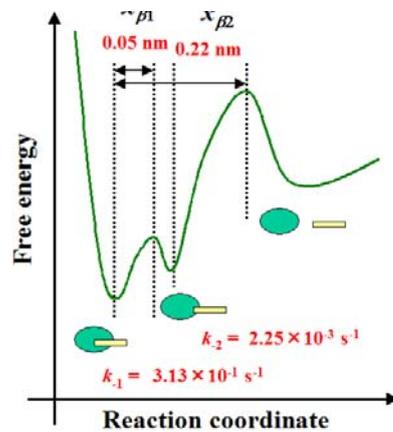


図 30. 推定された TIP-1 vs. PDZpep 間相互作用のエネルギーランドスケープの概形

されたナレゴ分子 SOR ナレゴおよび CutA ナレゴについて、その秩序集合体の構築および構造解析法の確立を検討した。各々のナレゴ分子の構造と相互作用特性を踏まえ、SOR ナレゴについては鎖状集合体の形成(一次元秩序構造体)とその鎖長制御の方法論・条件の探索を行った。CutA ナレゴについては、気液界面上での単分子膜形成を活用し膜状集合体(二次元秩序構造体)の構築を検討した。気液界面を活用した膜状秩序集合体の構築技法についても、タンパク質の変成防止脂質膜と下層グルコース溶液を導入することで、安定した膜構造構築の基礎を確立した。タンパク質一分子レベルでの可視化を行うにあたり、タンパク質の透過電子顕微鏡観察における凍結技法を導入し、独自に観察試料の調製法を工夫することにより、再現性が良く安定した観察像の取得法の確立に近づけた。

構築された SOR ナレゴは、立方体に近い形状をした SOR の上面および下面頂点の互いにねじれの位置に TIP-1 と PDZ-pep をそれぞれ二組配置した構造となっていることが、SOR の立体構造データ(参照: *Pyrococcus furiosus* SOR, PDB code: 1DQI)より推定され、SOR NanoLEGO の集合においてはそれら接着素子の二組の結合によって連結された線状集合体や、一組の結合による分岐構造、あるいはそれらの共存によるネットワーク構造などの形成の可能性が考えられた。これらの可能性を検証するため、二種の SOR NanoLEGO を混合した場合の相互作用力の特性、自己集合体の集合過程、および集合体の微視的構造の各々について調べた。

各 SOR ナレゴ溶液を混合すると透明であった溶液は数分で白濁した。濁度は経時的に増大し、15 分程度で一定となった。位相差顕微鏡観察および蛍光標識したナレゴを用いた蛍光顕微鏡観察から、SOR ナレゴ集合体が経時的に成長し、15 分程度で数ミクロン程度の不定形凝集体を形成することがわかった。SOR ナレゴ集合体の微視的形態を透過電顕により観察した。SOR-TIP1 と SOR-PDZ-pep それぞれ単独では凝集しないが、混合により数分以内で線状の構造体形成が確認され、更に 15 分程で不定形な塊状集合体が多数見られた(図31)。この不定形集合体の表面を詳細に観察すると、蛇行した線状構造を有することが分かった。これは伸長した SOR ナレゴ線状集合体どうしが束となって凝集し塊状になったものと考えられる。また、この集合体についてトモグラフィー透過電顕により三次元観察を行うと、垂直に観察した場合には顕著な構造の特徴の見られない表面にも観察角度に依存して線状構造が顕在化することがわかった。

以上のことから SOR ナレゴは、2 組の接着素子を交互に連結することで線状構造を形成し、さらにそれらが互いに束となることでより大きい集合体を生成させることが明らかとなった。

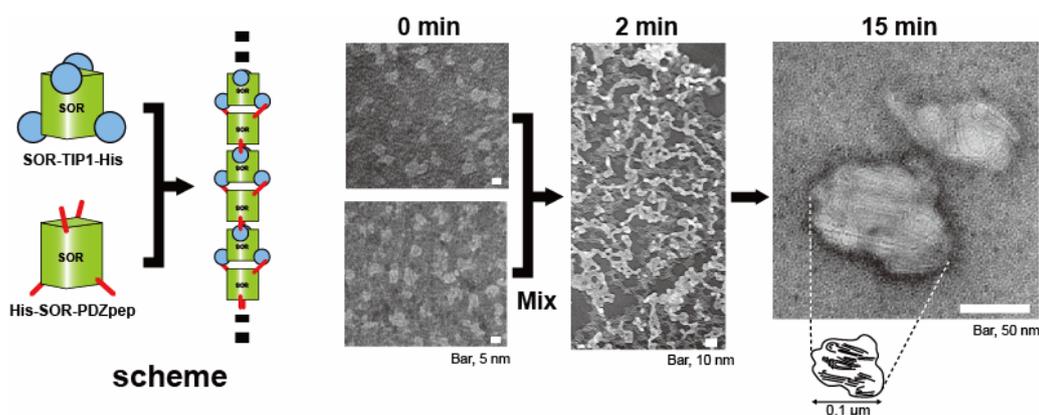


図 3 1 . SOR ナレゴの線状自己集合体形成過程の透過電子顕微鏡観察

図31に示す構造物は、SOR ナレゴの線状連結体であることは確認されたが、一方で集合体の微細構造をよく観察するとタンパク質の変成によると考えられる線状構造の顕著な変形が認められた。SOR の連結数を制御した線状構造体の観察に際しては、このような構造変形を可能な限り除去することが重要となる。この課題に対して、電子顕微鏡観察において、溶液中での対象物の構造を非破壊的に捉えることに可能な、Cryo-TEM 観察を導入した。観察用マイクログリッドの細孔に形成される薄液膜中の SOR ナレゴ集合体を、液体窒素温度で急速凍結した後、同温度を維持した

TEM 鏡筒内部に導入し、薄氷層中の構造体を観察した。この際、氷層の厚みを制御し、適切に電子線の透過が起こるよう調節するために、グリッドを冷却条件下で保持する Cyro ホルダの温度を通常よりやや高温側で操作し氷層を適度に昇華させることによって、再現性のよい観察を可能にした。個々の SOR ナレゴの変成を抑制し連結数を制御した線状構造体のクリアな構造観察に成功した(図18)。

(2)研究成果の今後期待される効果

九大グループで担当した二課題、ナレゴ設計および集合体構築の基礎としての蛋白質間相互作用力の精密実測、および蛋白質ナノ秩序アーキテクチャー構築法の開発と構造観察、において得られた成果には、各々以下のような今後の展開や科学技術・社会への波及効果が含まれる。

まず、前者の力測定研究の成果についてであるが、今回のプロジェクトを通じ明らかになった最も重要な知見は、解析法に依存して同じリガンドレセプタ対に対しても異なる速度論が観測され、このような差は測定手法に特徴的な解離過程の違い(強制解離:DFS 解析、自然解離:SPR 解析)に依存して、系が相互作用のエネルギーランドスケープ上の異なる経路を通過することに起因することが示唆されたことである。このような比較は、いずれの手法も実は同一のエネルギーランドスケープ上の異なる或る断面を解析していることを示唆する。この知見は、特に特異的相互作用を駆動力とする分子集合体形成の理解において本質的な再認識を供する面を含んでいる。すなわち、相互作用対が集合体中に組込まれているか、あるいは運動自由度の保証された溶液中での一対一相互作用か、の状況の違いにより相互作用の速度論が異なることを再認識させる。前者における速度論は、後者における一対一相互作用対の自然解離過程を経過するとは限らず、無視できない摂動を受けている。そして、当然その解離過程は AFM 力測定法におけるような強制解離過程とも異なる。自己集合体形成に際しての分子間相互作用とは、集合体形成のダイナミクスと密接に関係しつつ定まるエネルギーランドスケープ上において指定される経路を持って厳密に定義されることになる。この意味で、分子集合体の構築における分子間力の選択・設定には、単純に結合力の強弱を考慮するのみでは不十分であり、エネルギーランドスケープの考察が重要であることが明確となった。今後蛋白質の自己秩序集合体形成のナノ科学領域において、原理的な知見を提供し得た意義が大きいものと考えられる。

後者の、蛋白質ナノ秩序アーキテクチャー構築法の開発と構造観察研究では、上述の原理的知見とも深く関わるが、蛋白質秩序集合体の設計構築に際しては蛋白質間相互作用のみを制御するのでは充分ではなく、蛋白質を取り巻く周囲環境、いわば集合体構築のための“足場”の設計が必要であることがわかった。SOR ナレゴの線状集合体は溶液中での自発的成長が起こりやすく、比較的制御の可能な系であったが、CutA ナレゴに期待された平面状集合体形成は、気液界面のような足場環境の導入を不可欠とすることが総括された。すなわち、ここにおいても蛋白質間相互作用のエネルギーランドスケープの制御が根本的要請である。

本プロジェクトにおいて九大グループの実施した研究から得られた成果は、蛋白質の自己秩序集合体構築・設計の原理的指針を拡充し、今後の当該ナノ科学の発展の重要な基礎を提供するものであると言える。蛋白質間相互作用のエネルギーランドスケープの制御に基づく蛋白質ナノ秩序アーキテクチャー構築科学の今後の発展に大きな貢献を為したものと評価される。

3.3 CutA ナレゴを用いた自発的ハイドロゲル形成と再生医療への応用 (金沢工業大学 松田武久グループおよび理研 林崎グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

PDZドメインとPDZ認識ペプチド間の特異的相互作用を表面プラズモン共鳴による解離定数測定および原子間力顕微鏡による結合力の力学強度測定をした結果から、この相互作用を用いると、自発的なハイドロゲルの形成が予想され、再生医療への応用が考えられた。具体的には、本研究プロジェクトで開発されたナレゴ CutA ナレゴ(骨格素子:CutA、接着素子:PDZドメインを有す

る TIP-1) は、予備試験において非常に安定な骨格構造を保ちながら PDZ 認識ペプチドと相互作用することがわかっている。そこで、この CutA ナルゴと PDZ 認識ペプチドを末端に有するポリエチレングリコール (PEG) を用いると、自発的にハイブリッド型ハイドロゲルが形成できるものと考えた。軟骨細胞を分散したハイドロゲルで軟骨組織に注入できる injectable ゲル形成の可能性を検討した。

3. 3. 1 ハイドロゲル作成

PDZ タンパク質 TIP-1 を CutA タンパク質 (ホモ 3 量体) に融合させたものと N 末端にシステイン残基を有する PDZ 認識ペプチド (CQLAWFD TDL) を末端にマレイミド化した線状および 4 分岐のポリエチレングリコール [線状 (2 アーム PEG と命名) および 4 分岐 (4 アーム PEG と命名)、ともに分子量 2×10^4] を常温で反応させて PDZ ペプチド PEG を作成した (図 32)。

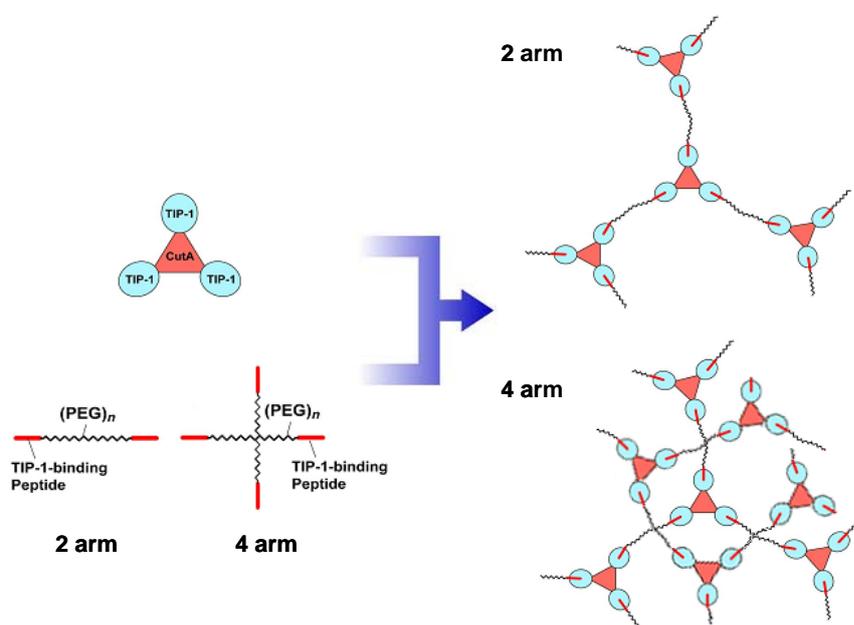


図 32. CutA ナルゴを用いたハイドロゲル化模式図

両者 (CutA-TIP1 と 2 アームまたは 4 アーム PEG) の緩衝液を室温で混合させると、2 アーム PEG を用いたときには粘度上昇は極めて少なかったが、4 アーム PEG では、混合した瞬間に白濁が起こり、さらに混合を続けると透明で粘性のあるゲルが 1~2 分以内に形成した。粘性の経時変化は認められなかった。またこの時の混合モル比は、CutA タンパク質 : 4 アーム PEG = 4 : 3 で最も粘性のあるゲルができた。接着素子間の相互作用が急速に起こりハイドロゲル化したものとみなせる。

3. 3. 2 細胞接着モチーフの導入と細胞接着

ナルゴゲルに細胞接着サイトを持たせて細胞包埋ゲルとして利用することを考えた。細胞接着サイトを持たせるため、CutA タンパク質のループ部分 3 箇所インテグリンレセプターの共通細胞接着モチーフである RGD ペプチドを組み込ませた変異体 CutA(RGD)-TIP1 タンパク質を作成した (図 33)。

この変異体 CutA(RGD)-TIP1 タンパク質は CutA-TIP1 タンパク質同様、大腸菌を用いて大量に合成することができ、PDZ 認識ペプチドと安定に相互作用することが確認できた。そこで軟骨細胞を用いて、CutA-TIP1 タンパク質と CutA(RGD)-TIP1 タンパク質それぞれに対する細胞接着能の比較実験を行った (図 34)。培養皿にそれぞれのタンパク質をコーティングし、そこへ軟骨細胞を播種し、1 時間後、6 時間後で観察をおこなった。図 34 (A) および (B) は、CutA-Tip1 タンパク質

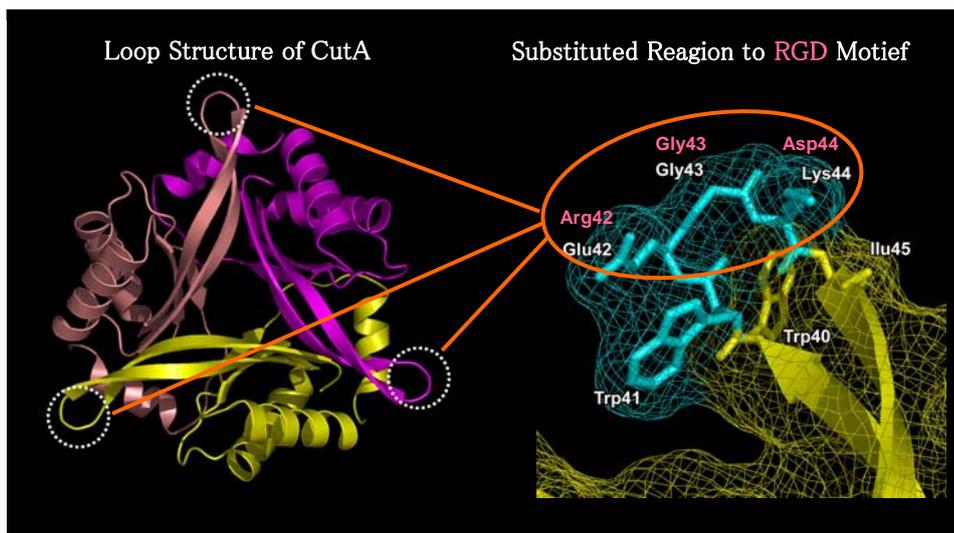


図33 CutA タンパク質のループ構造と RGD モチーフ導入部

をコーティングさせたもの、(C)および(D)は CutA(RGD)-TIP1 タンパク質をコーティングさせたものへの軟骨細胞の様子を位相差顕微鏡で観察した写真である。CutA-TIP1 への細胞接着は、1時間後においてほとんど観察できず、その後伸展はほとんど確認出来なかった。一方、CutA(RGD)-TIP1 タンパク質では、1時間後ではほぼ全ての細胞が接着し、一部伸展が見られた。その後、6時間後では、シャーレ全体に伸展している様子が確認できた。強力なる接着蛋白質であるフィブロネクチンと比べると少し低い接着能ではあるが、RGD モチーフを組み込むことによって、CutA(RGD)-TIP1 タンパク質への細胞接着および伸展が可能であることがわかった。

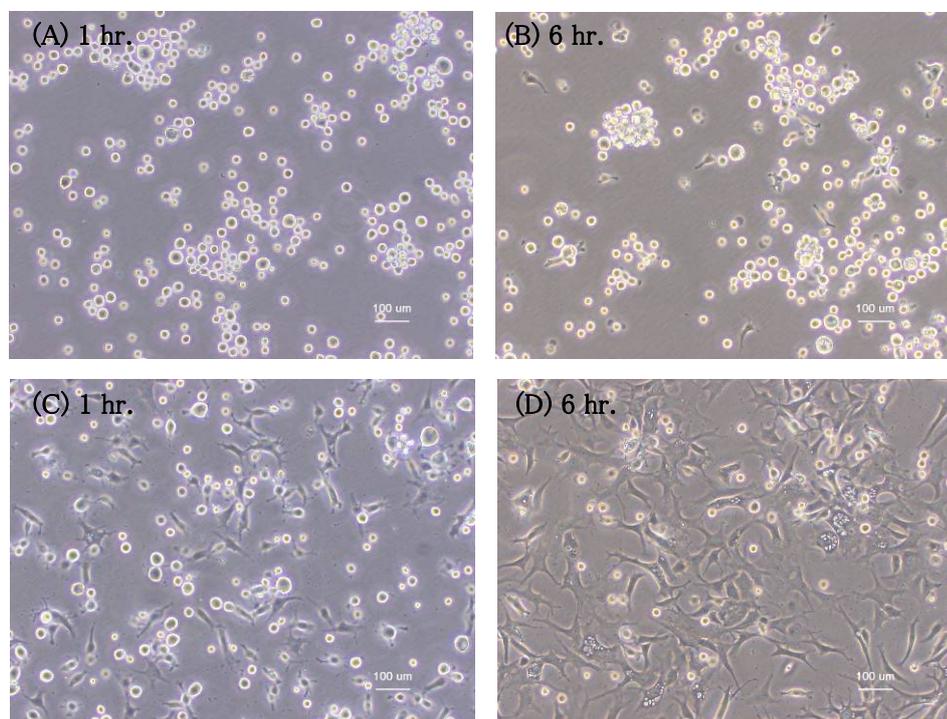


図34 CutA-TIP1 および CutA(RGD)-TIP1 への軟骨細胞接着・伸展の経時変化
 (A), (B) : CutA-TIP1 コーティング、(C), (D) : CutA(RGD)-TIP1 コーティング
 (A), (C) : 細胞播種1時間後、(B), (D) : 細胞播種6時間後

3.3.3 細胞包埋

RGD モチーフ入りの CutA(RGD)-TIP1 タンパク質と PDZ 認識ペプチドを導入した PEG を使ってハイドロゲル化させ、細胞が包埋できるかの検討をおこなった。軟骨細胞 (DiO 蛍光緑色染料で着色) を用い、CutA (RGD)-TIP1 : 4 アーム PEG = 4 : 3、および CutA (RGD)-TIP1 : 2 アーム PEG = 2 : 3 のモル比で 3 つの溶液をすばやく混合した。その後、位相差蛍光顕微鏡 (図35)、共焦点顕微鏡 (図36)、走査型電子顕微鏡 (図37) を用いてそれぞれ観察を行った。

まず位相差蛍光顕微鏡で観察すると、2 アーム PEG を用いた場合には、細胞が比較的混合溶液の底面に局在又は沈降している状態が観察できた (図35、(A))。 (これは低粘度のため沈降したためと考えられる。) しかしながら、4 アーム PEG を用いると、細胞が底面に多いものの、3 次元的に分散していた。 (図35、(B))。

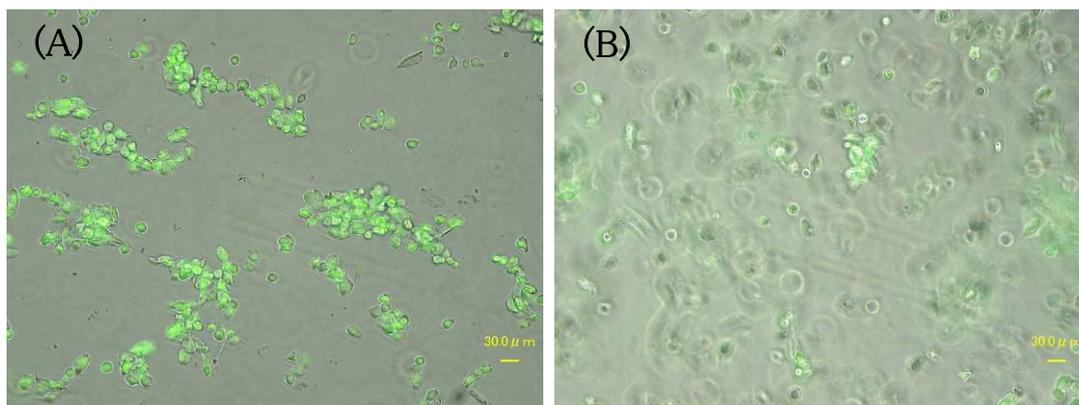


図35 位相差蛍光顕微鏡による細胞包埋 CutA ナノゴゲルの観察
(A) : 2 アーム PEG を使った場合、(B) : 4 アーム PEG を使った場合、緑: 軟骨細胞

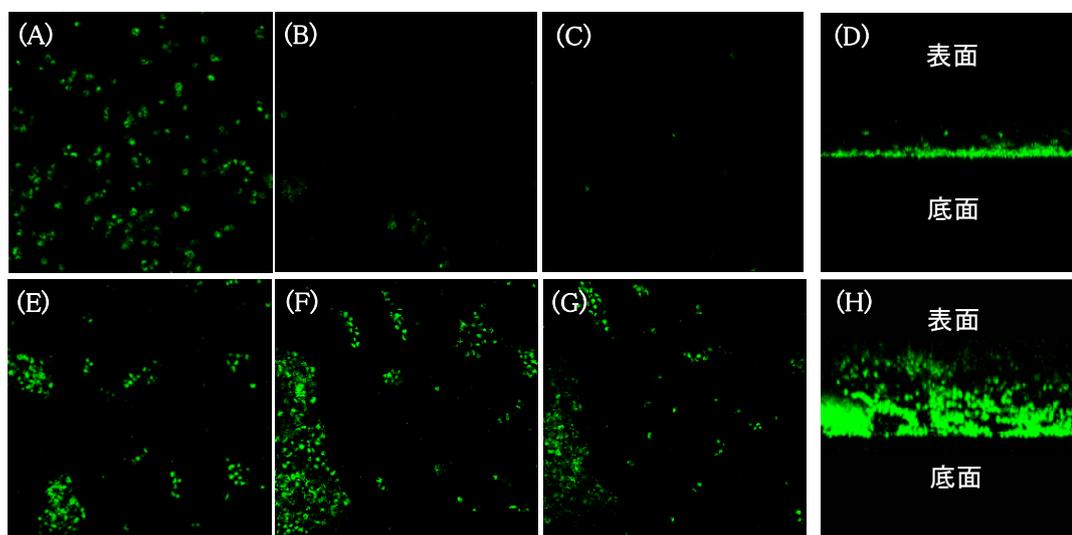


図36 細胞包埋ナノゴゲルの共焦点顕微鏡写真
(A)~(D) : 2 アーム PEG を使った場合、(E)~(H) : 4アーム PEG を使った場合。(A)~(C), (E)~(G) : (A)および(E)は底面、(B), (C), (E), (F)は 150 ミクロン毎の上層部の各深さでの共焦点イメージング。(D), (H) : ゲル断面図。 緑: 軟骨細胞

次に共焦点顕微鏡を用いて、z軸方向への各深さ(150 ミクロン毎)での共焦点イメージングを行い、さらに断面図のイメージングをおこなった (図36)。2 アーム PEG を用いた場合、2 次元的に細

胞が広がっている様子が観察でき、z軸(深さ)方向への細胞の分散は確認できなかった(図36、(A)～(D))。一方、4 アーム PEG を用いた場合、各深さにおいて細胞が観察され、断面図でも 3 次元的に分散している様子が確認できた(図36、(E)～(H))。

さらに、この細胞包埋ナノゴゲルをグルタルアルデヒドを用いて化学固定させ、エタノール脱水処理の後に、それぞれ表面と切片走査型電子顕微鏡による観察を行った(図37)。2 アーム PEG を用いた場合が、図37(A)、(B)、4 アーム PEG を用いた場合が、図37(C)、(D)である。2 アーム PEG を用いた場合、表面観察において、均一な規則性を持った様子は観察できなかった。また断面では、薄い層が幾層も圧縮したような形で重なっている様子が観察された。細胞は、ゲル中よりも片側表面に固まって存在しており、位相差や共焦点顕微鏡の結果と符合していた。(図37(B)矢印)。一方4アームPEGの場合、表面観察では、ある規則を持った構造化が起こっている様子が観察できた。また断面においても、高分子が密に詰まっている中に空洞があり、その中にほぼ円形の軟骨細胞が存在している様子が観察された。深さ方向全体に細胞が観察されたことから、3次元的にゲル化が起こり、細胞が包埋されていることがわかった。

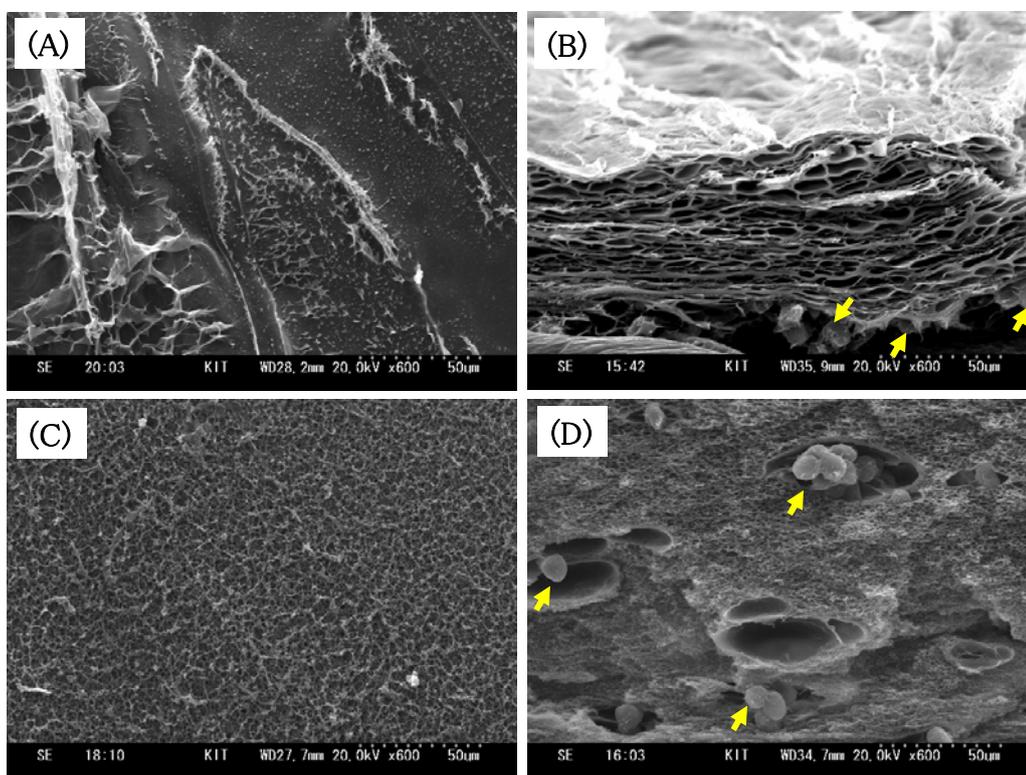


図37 細胞包埋ナノゴゲルの走査型電子顕微鏡写真

(A), (B) : 2アーム PEG を使った場合 (C), (D) : 4アーム PEG を使った場合。(A), (C) : ゲル表面の写真。(B), (D) : ゲル断面の写真。矢印:軟骨細胞。

3.3.4 まとめ

我々はナノゴコンセプトを利用した CutA ナノゴタンパク質と PDZ ドメイン認識ペプチドを末端に導入した PEG とのハイブリッド型水素ゲルの作製に成功した。4アーム型の PEG を用いると、ゲル化は 1~2 分以内に自発的に起こり、粘性のあるゲルが出来上がった。さらに、細胞包埋ゲルとして応用し得る可能性として、細胞接着能を持たせた CutA(RGD)-TIP1 を作成した。これは、細胞接着モチーフ RGD を CutA タンパク質に入れたもので、軟骨細胞との接着および伸展において非常に有効であることがわかった。このタンパク質を用いることで、細胞が3次元的に分散する粘性

ゲルの形成が確認された。包埋細胞は、正常軟骨と同様な円型を示した。

以上、遺伝子工学技術と合成高分子の技術を組み合わせて、全く新しい概念と設計思想による細胞を包埋できる自発的ゲル形成技術のプロトタイプを作成した。再生医療のスカーフォールド (Scaffold) として有用と考えている。現在、次の 2 点の研究を行っており、終了次第論文化を行う。

1) ゲル内での増殖能の有無および長期培養による軟骨組織の再生(自己産生マトリックスおよび形質変換)の検証。

2) ゲルの動的粘弾性を測定し、2 アームと 4 アーム PEG によるゲルの物理的性質を明確にする。また、ゲルの物性の制御パラメータ(濃度、混合比)を検討。

(2) 研究成果の今後期待される効果

化学試薬を用いない、分子認識による自発性ゲル形成技術は、細胞に障害を与えないため、再生医療の基盤技術としての可能性が高い。細胞を包埋したナログゲルを注射器で損傷した軟骨へ注入して軟骨組織工学の再生医療への応用が期待される。

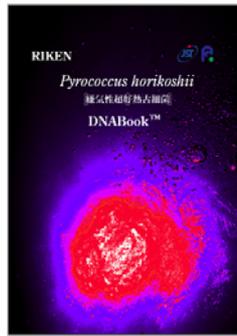
3. 4 *Pyrococcus* DNA ブックの作成 (ダナフォーム、林グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

我々は当初、「無細胞系でのナログの発現精製」の担当を計画した。近年に報告された無細胞大量発現系を用いて実験に供するレベルのナログタンパク質を得る予定であったが、予備実験において十分量のナログタンパク質を得ることが非常に困難であることが判明した。そこで、遺伝子材料の運搬手段である DNA ブックの作成にテーマを切り替えた。*Pyrococcus horikoshii* OT3 は、沖縄海溝内の熱水鉱床付近から単離された超好熱古細菌で絶対嫌気性、硫黄の存在下で 88°C から 104°C (至適生育温度: 98°C) の温度範囲で生育する。*P. horikoshii* OT3 のゲノムは環状 DNA で 1.74 メガ塩基対の長さからなり、既にその全塩基配列が独立行政法人製品評価機構により決定されており、その解析結果から 2061 遺伝子が推定されている。DNA ブックは DNA を水溶紙にスポットして書籍として綴じたものであり、遺伝子リソースを関連する情報と共に利用者に簡便かつ迅速に提供するとともに保管にも便利な常温流通システムの媒体として開発された新しい技術である(*Genome Res.* 13, 1488 (2003))。そこで DNA ブックの 6 冊目として超好熱細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 の遺伝子クローンを収載したパイロコッカス DNA ブックを作成した(図 38)。これは単細胞生物の遺伝子を収載した最初の DNA ブックとなる。スポットされている遺伝子は耐熱性タンパク質をコードしており、研究はもとより産業上の有用性も高い。さらに収載した遺伝子を用いた *Pyrococcus* タンパク質間相互作用実験の結果もブック内に記載することで、天然プロテオーム資源の頒布手段として有用を増すものと期待される。

理研、遺伝子構造・機能研究グループおよびハイスループットファクトリーの協力の下に modified pET11-a ベクターにクローニングされた 1,702 個の遺伝子(全遺伝子の 82.6%)を使用した。まず、提供されたクローンをリアレイシシーケンスの確認を行い、プラスミド精製を行った。プラスミド DNA 精製にはキアゲン社のプラスミド DNA 精製キットを使用した。次に本文の編集および校閲を行い、プラスミド DNA のスポットを行った。製本は株式会社トッパンに依頼した。製本後に品質を確認する為、全てのスポットを PCR にて増幅確認した。1,702 個のスポットの内 1,678 個のクローンが増幅に成功し(歩留まり 96.8%) 増幅物の長さも正しいものであった。また、10 クローンの形質転換についても確認を行い全てのクローンで成功した。さらに、理研と協力の下、DNA ブック用のデータベースを作成し、ホームページを通じて提供した(<http://genome.gsc.riken.jp/DNA-Book/Pyrococcus/>)。

Pyrococcus DNABook™ - A Revolution in Clone Distribution



- ✓ 遺伝子クローンを水溶紙の上にスポット（固相化）
- ✓ 通常の書籍と同様に室温で保管、輸送が可能（-80℃冷蔵庫、ドライアイスが不要）
- ✓ クローンと同時に**情報**も提供（アノテーション、PPIや構造解析の情報）
- ✓ 必要なクローンを切り取り、直接PCRや形質転換に使用可能

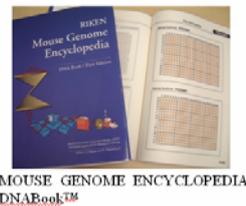


図38 パイロкокカスDNAブック

(2)研究成果の今後期待される効果

DNAブックは、遺伝子資源を常温で運搬し保管するための技術として開発された。当研究によって作製した *Pyrococcus* DNA ブックは研究領域内の研究者に使用してもらおうべく、無料頒布を行った。また、希望する研究機関にも配布しており、これら遺伝子資源を用いた研究の一助となることが期待される。

4 研究参加者

①理化学研究所グループ(ゲノムレベルのタンパク相互作用の収集と、その情報を基盤とした人工融合タンパク質(ナレゴタンパク質)の作出の研究)

| 氏名 | 所属 | 役職 | 研究項目 | 参加時期 |
|----------------|--------|--------|------------------------|------------------|
| 林崎良英 | 理化学研究所 | 主任研究員 | グループ研究全体の統括 | 平成14年11月～平成20年3月 |
| 河合純 | 理化学研究所 | 副主任研究員 | アドバイザー | 平成14年11月～平成20年3月 |
| 伊藤昌可 | 理化学研究所 | 先任研究員 | ナレゴ素子のスクリーニング、PPI-DB作成 | 平成14年11月～平成20年3月 |
| CARNINCI Piero | 理化学研究所 | 先任研究員 | アドバイザー | 平成14年11月～平成20年3月 |
| 柴田一浩 | 理化学研究所 | 技師 | 相互作用DB作成と作用部位の同定 | 平成14年11月～平成17年8月 |

| | | | | |
|----------|--------|-----------|----------------|------------------------------|
| 鈴木治和 | 理化学研究所 | 副PD | ナノレゴタンパクの設計 | 平成 14 年 11 月～ 平成 20 年 3 月 |
| 小川ちひろ | 理化学研究所 | 横浜市立大学 D1 | ナノレゴ開発業務 | 平成 16 年 9 月～ 平成 20 年 3 月 |
| 鈴木正則 | 理化学研究所 | 研究員 | アドバイザー | 平成 14 年 11 月～ 平成 20 年 3 月 |
| 相澤克則 | 理化学研究所 | 上級研究員 | ナノレゴ素子のスクリーニング | 平成 14 年 11 月～ 平成 15 年 3 月 |
| 金森睦 | 理化学研究所 | 研究員 | アドバイザー | 平成 14 年 11 月～ 平成 20 年 3 月 |
| 秋山純一 | 理化学研究所 | 上級技師 | アドバイザー | 平成 14 年 11 月～ 平成 18 年 2 月 |
| 荒川貴博 | 理化学研究所 | 上級技師 | ナノレゴ開発業務 | 平成 14 年 11 月～ 平成 20 年 3 月 |
| 臼井健悟 | 理化学研究所 | CREST 研究員 | ナノレゴ開発業務 | 平成 15 年 4 月～ 平成 20 年 3 月 |
| 笛木(伊藤)吹夕 | 理化学研究所 | CREST 研究員 | ナノレゴ開発業務 | 平成 17 年 4 月～ 平成 20 年 2 月 |
| 安西亜矢子 | 理化学研究所 | CREST 技術員 | ナノレゴ開発業務 | 平成 14 年 11 月～ 平成 18 年 3 月 |
| 青木 誠 | 理化学研究所 | CREST 技術員 | ナノレゴ開発業務 | 平成 15 年 8 月～ 平成 17 年 3 月 |

②九州大学グループ(ナノレゴタンパク質の分子配列および自己組織化技術の研究)

| 氏名 | 所属 | 役職 | 研究項目 | 参加時期 |
|-------------|------|-----------|---------------------------------|--|
| 松田武久 | 九州大学 | 教授 | グループ研究全体の統括 | 平成 14 年 11 月～ 平成 18 年 3 月 *平成 18 年 4 月より 金沢工業大学グループ研究統括 |
| 木戸秋悟 | 九州大学 | 教授 | グループ研究全体の統括/ナノレゴ分子マニピュレーション法の確立 | 平成 14 年 11 月～ *平成 18 年 4 月より グループ研究統括 |
| アリムジャン・イデリス | 九州大学 | CREST 研究員 | ナノレゴ分子相互作用の分子間力解析 | 平成 15 年 4 月～ 平成 16 年 5 月 |
| 井原 真紀 | 九州大学 | CREST 研究員 | ナノレゴ分子観察および基材への吸着固定法の検討 | 平成 15 年 4 月～ 平成 16 年 3 月 |
| 牧 禎 | 九州大学 | CREST 研究員 | ナノレゴ分子相互作用の分子間力解析 | 平成 16 年 5 月～ 平成 19 年 11 月 |

③ダナフォームグループ(ナルゴタンパク質の発現と精製の研究)

| 氏名 | 所属 | 役職 | 研究項目 | 参加時期 |
|--------------------|----------------|-------|-------------|-------------------------------|
| 林利蔵 | 株式会社 ダナフォーム | 会長 | グループ研究の統括 | 平成 14 年 11 月～ 平成 17 年 12 月 |
| 神谷守 | 株式会社 ダナフォーム | 主幹研究員 | タンパク質の発現・精製 | 平成 14 年 11 月～ 平成 17 年 12 月 |
| HARBERS Mattias | 株式会社 ダナフォーム | 研究員 | タンパク質の発現・精製 | 平成 14 年 11 月～ 平成 17 年 12 月 |
| 柴田裕子 | 株式会社 ダナフォーム | 研究員 | タンパク質の発現・精製 | 平成 15 年 4 月～ 平成 17 年 12 月 |

④金沢工業大学グループ(人工細胞外マトリクスの機能性パーツとしての応用の研究)

| 氏名 | 所属 | 役職 | 研究項目 | 参加時期 |
|-------------------|--------|-----|-------------|-----------------------------|
| 松田武久 | 金沢工業大学 | 教授 | グループ研究全体の統括 | 平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月 |
| エリアナ・ニヤ タウィジャヤ | 金沢工業大学 | 研究員 | ナルゴの医療応用 | 平成 18 年 5 月～ 平成 18 年 6 月 |

5 招聘した研究者等

| 氏名(所属、役職) | 招聘の目的 | 滞在先 | 滞在期間 |
|-----------|-------|-----|------|
| なし | | | |
| | | | |

6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 16 件)

1. Kawai J. and Hayashizaki Y., DNA Book, *Genome Research*, **13**, 1488-1495, (2003)
2. Suzuki H., R. Saito, Kanamori M., Kai C., Schönbach C., Nagashima T., Hosaka J, and Hayashizaki Y., The mammalian protein-protein interaction database and its viewing system that is linked to the main FANTOM2 viewer, *Genome Research*, **13**, 1534-1541 (2003)
3. Harukazu Suzuki, Chihiro Ogawa, Kengo Usui, and Yoshihide Hayashizaki, In vitro pull-down assay without expression constructs. *Bio techniques*, **37**, 918-920 (2004)
4. Miriam Barrios-Rodiles, Kevin R. Brown, Barish Ozdamar, Zhong Liu, Robert S. Donovan, Fukiko Shinjo, Yongmei Liu, Rohit Bose, Joanna Dembowy, Ian W. Taylor, Valbona Luga, Natasa Przulj, Mark Robinson, Harukazu Suzuki, Yoshihide Hayashizaki, Igor Jurisica, Jeffrey L., Wrana, High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells, *Science*, **307**, 1621-1625 (2005)
5. Hiromi Nishida, Takahiro Suzuki, Yasuhiro Tomaru, Yoshihide Hayashizaki, A novel replication-independent histone H2a gene in mouse. *BMC Genetics*, **6**, 10 (2005)
6. Alimjan Idris, S. Kidoaki, K. Usui, T. Maki, H. Suzuki, M. Ito, M. Aoki, Y. Hayashizaki, T. Matsuda. Force measurement on antigen-antibody interaction by atomic force microscopy using photograft-polymer spacer, *Biomacromolecules*, **6**, 2776-2784 (2005)
7. Kengo Usui, Shintaro Katayama, Mutsumi Kanamori-Katayama, Chihiro Ogawa, Chikatoshi Kai, Makiko Okada, Jun Kawai, Takahiro Arakawa, Piero Carninci, Masayoshi Itoh, Koji Takio, Masashi Miyano, Satoru Kidoaki, Takehisa Matsuda, Yoshihide Hayashizaki, Harukazu Suzuki, Protein-protein interactions of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3, *Genome Biology*, **6**, R98 (2005)
8. Alistair Forrest, Darrin Taylor, Mark Crowe, Alistair Chalk, Nic Waddell, Gabriel Kolle, Geoffrey Faulkner, Rimantas Kodzius, Shintaro Katayama, Christine Wells, Chikatoshi Kai, Jun Kawai, Piero Carninci, Yoshihide Hayashizaki, Sean Grimmond, Genome wide review of transcriptional complexity in mouse protein kinases and phosphatases, *Genome Biology*, **7**, R5 (2006).
9. Martin C Frith, Alistair R Forrest, Ehsan Nourbakhsh, Chikatoshi Kai, Jun Kawai, Piero Carninci, Yoshihide Hayashizaki, Timothy L Bailey, Sean M Grimmond. The Abundance of Short Proteins in the Mammalian Proteome. *PLoS Genetics*. **2**(4):e52 (2006)
10. Melissa J. Davis, Kelly A. Hanson, Francis Clark, J. Lynn Fink, Fasheng Zhang, Takeya Kasukawa, Chikatoshi Kai, Jun Kawai, Piero Carninci, Yoshihide Hayashizaki, Rohan D. Teasdale. Differential Use of Signal Peptides and Membrane Domains Is a Common

Occurrence in the Protein Output of Transcriptional Units. *PLoS Genetics*. **2**(4):e29 (2006)

11. Aturaliya RN, Fink JL, Davis MJ, Teasdale MS, Hanson KA, Miranda KC, Forrest AR, Grimmond SM, Suzuki H, Kanamori M, Kai C, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, Teasdale RD. Subcellular localization of mammalian type II membrane proteins. *Traffic*. **7**(5):613-25 (2006)
12. Fink, J. L., R. N. Aturaliya, et al. (2006). "LOCATE: a mouse protein subcellular localization database." *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue): D213-7.
13. Masayoshi Itoh, Ayako Yasunishi, Kengo Imamura, Mutsumi Kanamori, Harukazu Suzuki, Masanori Suzuki, Piero Carninci, Jun Kawai, Yoshihide Hayashizaki, Constructing ORFeome resources with removable termination codons, *BioTechniques* **41**(1) 44-48 (2006).
14. Harukazu Suzuki, Protein-protein interactions in the mammalian brain, *The Journal of Physiology*, **575**(Pt 2): 373-377 (2006).
15. Chihiro Ogawa, Kengo Usui, Makoto Aoki, Fuyu Ito, Masayoshi Itoh, Chikatoshi Kai, Mutsumi Kanamori-Katayama, Yoshihide Hayashizaki, Harukazu Suzuki, Gemin2 plays an important role for stabilization of the SMN complex, *Journal of Biological Chemistry*, **282**(15):11122-34 (2007)
16. T. Maki, S. Kidoaki, K. Usui, H. Suzuki, M. Ito, F. Ito, Y. Hayashizaki, and T. Matsuda, Dynamic Force Spectroscopy of the Specific Interaction between the PDZ Domain and Its Recognition Peptides, *Langmuir* **23**, 2668-2673 (2007).

(2)その他の著作物（総説、書籍など）

【国内】

1. 鈴木治和, 片山慎太郎, 林崎良英, ゲノムレベルの生体分子相互作用検索とナノブロック開発, 化学工業, Vol.54, No.5, p23-29 (2003)
2. 中村光江, 河合純, 林崎良英, DNA ブック, 医学の歩み, 医歯薬出版株式会社, 実験医学, 羊土社, Vol.21, No.12, p875-876 (2003)
3. 青木誠, 伊藤昌可, 生体分子相互作用の動的解析—BIAcore・原子間力顕微鏡、蛋白質核酸酵素「ゲノムネットワーク」増刊号(共立出版) **49**, 2780-2785 (2004)
4. 臼井健悟, プロテオーム解析に向けた蛋白質リソース開発, 蛋白質核酸 酵素「ゲノムネットワーク」増刊号(共立出版) **49**, 2635-2641 (2004)
5. 鈴木治和, 網羅的かつ信頼性の高い蛋白質ネットワーク構築のための種々の実験手法、蛋白質核酸酵素「ゲノムネットワーク」増刊号(共立出版) **49**, 2792-2797 (2004)
6. 渡辺幸彦, 河合純, 林崎良英, DNA ブック:ゲノムリソースの新規流通媒体, BIO INDUSTRY **22**, 76-84 (2005)
7. CREST: Hayashizaki Team, *Pyrococcus* DNA ブック (2005)
8. 鈴木治和, 臼井健悟, 林崎良英, ナノレゴプロジェクトー豊富な天然プロテオーム

資源を活用し、構造単位の組み合わせから新しいタンパク質素材を開発するポストゲノム計画一、BIO INDUSTRY 22,7-14 (2005)

9. 小川ちひろ、鈴木治和、林崎良英、発現ネットワーク、実験医学増刊、羊土社、p573-543 (2005)
10. 臼井健悟、鈴木治和、林崎良英、ナレゴタンパク質、フロンティアテクノシリーズ No.9 自己組織化ナノマテリアル(フロンティア出版)、(2007)
11. 甲斐誓利、鈴木治和、哺乳類細胞ツーハイブリッド法、分子相互作用ハンドブック、羊土社、p30-34 (2007)
12. 臼井健悟、林崎良英、ナレゴ生体分子の自己会合性を利用したナノオーダーの分子制御を目指して、高分子、56(10)、824-827(2007)

【海外】

1. Hayashizaki Y. Kawai J., A new approach to the distribution and storage of genomic resources, Nature Review Genetics, 5, 223-228 (2004)
2. Thomas Weaver, Johannes Maurer, Yoshihide Hayashizaki, Sharing genomes: an integrated approach to funding, managing and distributing genomic clone resources. Nature Reviews: Genetics 5, 861-866 (2004)
3. Ayako Yasunishi, Miki Nishikawa, Yoshihide Hayashizaki, Genetic code to nanotechnology, Communications on BioSystems, 1, 23-26 (2005)

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 24 件、国際会議 13 件)

○国内

1. 鈴木治和、ゲノムネットワークプロジェクトとインタラクティブ、日立ライフサイエンス講演会、宇都宮、2004年5月14日
2. 林崎良英、人間一人分の遺伝子が1つの本になった、第47回21世紀構想研究委員会、東京、2004年6月4日
3. 鈴木治和、ゲノムネットワークプロジェクトとインタラクティブ解析、第77回日本生化学会大会、横浜、2004年10月15日
4. 林崎良英、自己組織化の本質について、戦略的創造研究推進事業(CREST)ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ 第1回公開シンポジウム、東京、2005年2月1日
5. 林崎良英、DNAと生命情報、ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ領域横断企画「DNAワークショップ」、熱海、2005年3月10日
6. 林崎良英、Functional RNA、理研内合同リトリート、熱海、2005年5月9日
7. 林崎良英、機能性RNA研究の最前線、第4回国際バイオ EXPO、東京、2005年5月20日

8. 鈴木治和、ゲノムネットワークプロジェクトとインタラクトーム、日立ライフサイエンス講演会、宇都宮、2004年5月14日
9. 林崎良英、細胞内分子計測法とセルマップ、X線自由電子レーザーシンポジウム、東京、2005年5月20日
10. 林崎良英、人間一人分の遺伝子が1つの本になった、第47回21世紀構想研究委員会、東京、2004年6月4日
11. 林崎良英、急発展をとげるトランスクリプトーム解析と医学応用、日本ヒトプロテオーム機構第3回大会、横浜、2005年8月2日
12. 林崎良英、ゲノム解析新時代を拓く「RNA大陸」の発見～生命原理、疾患遺伝子発現の解明に期待～、東京テクノフォーラム21第87回研究交流会、東京、2005年10月14日
13. 鈴木治和、ゲノムネットワークプロジェクトとインタラクトーム解析、第77回日本生化学会大会、横浜、2004年10月15日
14. 林崎良英、ゲノミクス・トランスクリプトミクス、第56回日本電気泳動学会総会、東京、2005年11月11日
15. 林崎良英、急発展をとげるトランスクリプトーム解析と医学応用、第3回RCGMフロンティアシンポジウム、埼玉、2005年11月23日
16. 林崎良英、FANTOM3とトランスクリプトーム解析、第15回アンチセンスシンポジウム、群馬、2005年11月24日
17. 林崎良英、ゲノム科学新時代に向けて、北キャンセミナー、北海道、2005年12月1日
18. 林崎良英、遺伝子の常識がひっくりかえった～RNA新大陸の発見～がらくた遺伝子はがらくたではなかった、山梨県立科学館第6回サイエンス講演会、山梨、2005年12月3日
19. 林崎良英、機能性RNA研究の新展開、第28回日本分子生物学会年会、福岡、2005年12月8日
20. 林崎良英、The new phase of transcriptome analysis, Symposium on Genome Diversity and Function, 福岡、2005年12月11日
21. 林崎良英、ゲノムを超えて生命をどう解明していくか、生命のシンポジウム、東京、2006年3月10日
22. 林崎良英、トランスクリプトーム解析の新展開、薬物動態談話会、東京、2007年1月31日
23. 河合純、完全長cDNA解析とトランスクリプトーム研究の現状、平成19年度水産育種研究会、東京、2007年3月28日
24. 林崎良英、RNA大陸の発見～新たな生命観構築への布石～、第6回国際バイオEXPO国際バイオフィォーラム、東京、2007年6月20日

○国際

1. Hayashizaki Y., Dynamic Transcriptome of mouse, 19th International Congress of genetics, Australia, July 6-11, 2003
2. Hayashizaki Y., From beans to Human and Mouse Genes – The challenges of the next generation of Genome Research., KAROLINSKA INTERNATIONAL FORUM., Sweden, October 22, 2003
3. Yoshihide Hayashizaki, Dynamic transcriptome of mouse analyzed in FANTOM3, Molecule-Based Information Transmission and Reception-Application of membrane protein biofunction (1st MB-ITR2005), New Delhi, 15 April 2005
4. Yoshihide Hayashizaki Genome Network Project and FANTOM3, 10th Humane Genome Meeting (HGM2005), Kyoto 20 April 2005.
5. Yoshihide Hayashizaki, Genome Network Project in Japan, 13th NA ISSX / 20th JSSX meeting, Hawaii/USA, 24 October 2005
6. Yoshihide Hayashizaki, The decade of mouse transcriptome, 19th International Mouse Genome Conference, Strasbourg/France, 5 November 2005
7. Harukazu Suzuki, Yoshihide Hayashizaki, GNP cluster workshop; toward the main meeting, Institute for Molecular Bioscience (IMB) internal Seminar, University of Queensland, Brisbane, Australia, May 18 2006.
8. Yoshihide Hayashizaki, Genome network project in Japan, The 7th International Conference on Systems Biology, Yokohama, Japan, October 8-13 2006.
9. Yoshihide Hayashizaki, Transcriptome analysis - a way to illuminate the genome network, Methodological Challenges of the Post-Genomic Era, Kaisei, Hakone, Japan", November 27 2006.
10. Yoshihide Hayashizaki, The RNA impact on the central dogma: The road to knowledge goes through the RNA continent, 6th Annual ORFeome Meeting, Harvard, Boston, MA, USA, November 15-18 2006.
11. Yoshihide Hayashizaki, The New Phase of Transcriptome Analysis, A special Thursday WALD Director's Lecture, Bethesda, Maryland, USA, November 16 2006.
12. Yoshihide Hayashizaki, What are the new issues and challenges presented by \$1000 genome technologies? Science and Technology in Society (STS) Forum Third Annual Meeting, Kyoto, September 10 2006.
13. Yoshihide Hayashizaki, The RNA Impact on the central dogma: The road to knowledge goes through the RNA continent, 21st International Mammalian Genome Conference, Kyoto Terra, Kyoto, Japan, October 31 2007

② 口頭発表 (国内会議 20 件、国際会議 2 件)

○ 国内

1. 河合純, 中村光江, 林崎良英, DNA ブック, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2002 年 12 月 11 日

2. 鈴木治和, 斎藤輪太郎, 金森睦, 甲斐誓利, Christian Shoebach, 長嶋剛史, 保坂順子, 林崎良英, マウス完全長 cDNA を用いたタンパク質間相互作用データと外部データの統合, 第 25 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2002 年 12 月 11 日
3. 臼井健悟, 鈴木治和, 林崎良英, *Pyrococcus horikoshii* のタンパク質相互作用の網羅的解析, 超好熱細菌の構造ゲノムミックスのためのワークショップ, 理化学研究所播磨研究所, 2003 年 11 月 17-19 日
4. 荒川貴博, *Pyrococcus horikoshii* のクローニングとシーケンス, 超好熱細菌の構造ゲノムミックスのためのワークショップ, 理化学研究所播磨研究所, 2003 年 11 月 17 日
5. 木戸秋悟, アリムジャン・イディリス, 井原真紀, 松田武久, 林崎良英, 蛋白質分子挙動の直接観察とソフトハンドリング: 全反射蛍光およびプローブ顕微鏡による蛋白質分子間・蛋白/材料間相互作用のナノメカニクス解析, 第48回顕微鏡学会シンポジウム, 東京, 2003 年 12 月 6 日
6. 鈴木治和, 林崎良英, 完全長 cDNA を基盤としたタンパク質相互作用の網羅的解析, 第 26 回日本分子生物学会, 神戸, 2003 年 12 月 10 日
7. Yidiresi A., 木戸秋悟, 松田武久, 臼井健悟, 鈴木治和, 林崎良英, 高感度 AFM によるタンパク質のソフトハンドリング: 高分子プローブの設計及び微弱相互作用力の測定, 第 25 回日本バイオマテリアル学会, 大阪, 2003 年 12 月 16 日
8. 林崎良英, 鈴木治和, 伊藤昌可, カルニンチ ピエロ, 金森睦, 柴田一浩, 臼井健悟, 安西亜矢子, 青木誠, 片山慎太郎, 松田武久, 木戸秋悟, アリムジャン イディリス, 井原真紀, 林利蔵, 神谷守, ゲノムレベルの生体分子相互作用探索と医療に向けたナノレゾ開発, 東京, 2004 年 2 月 18 日
9. 鈴木治和, ゲノムネットワークプロジェクトとインタラクトーム, 日立ライフサイエンス講演会, 宇都宮, 2004 年 5 月 14 日
10. 林崎良英, 人間一人分の遺伝子が1つの本になった, 第 47 回 21 世紀構想研究委員会, 東京, 2004 年 6 月 4 日
11. 鈴木治和, ゲノムネットワークプロジェクトとインタラクトーム解析, 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, 2004 年 10 月 15 日
12. 林崎良英, 自己組織化の本質について, 戦略的創造研究推進事業 (CREST) ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ 第1回公開シンポジウム, 東京, 2005 年 2 月 1 日
13. 林崎良英, DNA と生命情報, ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ領域横断企画「DNAワークショップ」, 熱海, 2005 年 3 月 10 日
14. 牧 禎・木戸秋 悟・松田 武久・臼井 健悟・鈴木 治和・伊藤 昌可・林崎 良英, Dynamic Force Spectroscopy による PDZ ドメインー認識ペプチド間相互作用の特性解析, 第 54 回高分子討論会 山形, 2005 年 9 月 20 日
15. 臼井健悟, 片山慎太郎, 金森-片山睦, 小川ちひろ, 甲斐誓利, 岡田真紀子, カルニンチ ピエロ, 河合純, 荒川貴博, 伊藤昌可, 青木誠, 安西亜矢子, 柴田一浩, 木戸

秋悟, 牧禎, 松田武久, 瀧尾擴士, 宮野雅司, 林崎良英, 鈴木治和, Mammalian 2-hybrid 法による超好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 のタンパク質間相互作用解析、第 28 回日本分子生物学会年会、福岡、2005 年 12 月 7 日

16. 牧 禎・臼井 健悟・木戸秋 悟・鈴木 治和・伊藤 昌可・伊藤 吹夕・松田 武久・林崎 良英、『リガンドーレセプター相互作用力を利用したタンパク質の自発的秩序集合体形成: NanoLEGO タンパク質間の相互作用力・集合特性解析』、第 55 回高分子討論会、富山大学五福キャンパス、平成18年9月19-22日
17. 鈴木治和、臼井健悟、伊藤吹夕、伊藤昌可、牧禎、木戸秋悟、松田武久、林崎良英、ナノレゴ(NanoLEGO); タンパク質相互作用に基づく自己組織化能を有する新規バイオマテリアル、第 9 回マリンバイオテクノロジー学会大会、東京、2006 年 5 月 27 日
18. 伊藤昌可、臼井健悟、伊藤吹夕、牧禎、木戸秋悟、鈴木治和、林崎良英、『人工タンパク質の創出と集合化』、第 2 回バイオ医工学シンポジウム、埼玉理化学研究所、口頭発表、2007 年 3 月 9 日
19. 牧禎、木戸秋悟、臼井健悟、伊藤吹夕、鈴木治和、伊藤昌可、林崎良英、松田武久、『Dynamic Force Spectroscopy による PDZ ドメインー認識ペプチド間相互作用の特性解析』、第 24 回 九州分析化学若手の会夏季セミナー、福岡県北九州市門司区めかり山荘、2007 年 8 月 3-4 日
20. 牧禎、臼井健悟、伊藤吹夕、木戸秋悟、伊藤昌可、鈴木治和、松田武久、林崎 良英、nanolego 構造体構築のための環境設計、第 20 回九州電子顕微鏡技術研究会、福岡、2007 年 9 月 8 日

○ 国際

1. Harukazu Suzuki, Yoshihide Hayashizaki, Protein-protein interactions of mammalian transcription factors, Joint Cold Spring Harbor Laboratory/Wellcome Trust Conference on Interactome Networks, *Cold Spring Harbor/New York/USA*, 31 August 2006
2. Chihiro Ogawa, Kengo Usui, Makoto Aoki, Fuyu Ito, Masayoshi Itoh, Chikatoshi Kai, Mutsumi Kanamori-Katayama, Yoshihide Hayashizaki, Harukazu Suzuki, Gemin2 plays an important role in stabilizing the survival of moter neuron complex, 21st International Mammalian Genome Conference, Kyoto Terra, Kyoto, Japan, 28 October-1 November 2007

③ ポスター発表 (国内会議 13 件、国際会議 9 件)

○国内

1. 臼井健悟, 鈴木治和, 金森睦, 伊藤昌可, 安西亜矢子, 片山慎太郎, 柴田一浩, Piero Carninci, 木戸秋悟, Alimjan Idris, 松田武久, 林崎良英, タンパク質間相互作用に基づいた自己組織化能を有するナノレゴ(NanoLEGO)素子の探索, 第 26 回日本分子生物学会, 神戸, 2003 年 12 月 10 日
2. 青木誠, 臼井健悟, 鈴木治和, 金森 睦, 伊藤昌可, 片山慎太郎, 柴田一浩, 安西亜矢子, カルニンチ ピエロ, 河合 純, 牧 禎, 木戸秋 悟, 松田 武久, 林崎 良英, 自己組織化能を有するナノレゴ(NanoLEGO)素子の探索及び評価, 第 27 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2004 年 12 月 8 日

3. 臼井健悟, 鈴木治和, 片山慎太郎, 金森睦, 甲斐誓利, 岡田真紀子, 河合純, 荒川貴博, 林崎良英, Mammalian 2-hybrid 法による超好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* OT3 のタンパク質間相互作用解析、第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004 年 12 月 8 日
4. 小川ちひろ, 臼井健悟, 鈴木治和, 青木誠, 伊藤昌可, 金森睦, 甲斐誓利, 岡田真紀子, 林崎良英, タンパク質間相互作用を利用した SMN 複合体の解析、第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004 年 12 月 8 日
5. 鈴木治和, 小川ちひろ, 臼井健悟, 林崎良英, 超迅速 *in vitro* プルダウンアッセイ法の開発、第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004 年 12 月 8 日
6. 牧 禎・木戸秋 悟・松田 武久・臼井 健悟・鈴木 治和・伊藤 昌可・林崎 良英, Dynamic Force Spectroscopy による PDZ ドメインー認識ペプチド間相互作用の特性解析、第 54 回高分子討論会、山形、2005 年 9 月 20 日
7. 伊藤 吹夕, 臼井健悟, 鈴木治和, 金森 睦, 伊藤昌可, 片山慎太郎, 柴田一浩, 安西亜矢子, カルニンチ ピエロ, 河合 純, 牧 禎, 木戸秋 悟, 松田 武久, 林崎 良英 タンパク質間相互作用に基づいた自己組織化能を有するナレゴ(NanoLEGO)の構築 第 28 回日本分子生物学会、福岡、2005 年 12 月 7 日
8. 小川 ちひろ, 臼井 健悟, 青木 誠, 伊藤 吹夕, 伊藤 昌可, 甲斐 誓利, 金森 睦, 林崎 良英, 鈴木 治和 Gemin2 による SMN 複合体の安定化 第 28 回日本分子生物学会、福岡、2005 年 12 月 7 日
9. 神谷 守, 臼井 健悟, 田邊 陽一, 鈴木 治和, 荒川 貴博, 河合 純, 田上 道平, 村田 光義, 林田 賢吾, 甲斐 誓利, 瀧尾 擴士, 栗原千登勢, 林 利蔵, 林崎 良英 パイロコッカス DNA ブック 第 28 回日本分子生物学会、福岡、2005 年 12 月 7 日
10. 牧禎、臼井健悟、木戸秋悟、鈴木治和、伊藤昌可、伊藤吹夕、松田武久、林崎良英、リガンドーレセプタ相互作用力を利用したタンパク質の自発的秩序集合体形成:ナレゴタンパク質間の相互作用力・集合特性の解析、第 55 回高分子討論会、富山、2006 年 9 月 20 日
11. 臼井 健悟, 伊藤 吹夕, 牧 禎, 伊藤 昌可, 木戸秋 悟, 末永 敦, 泰地 真弘人, 松田 武久, 林崎 良英, 鈴木 治和 タンパク質由来自己組織化分子「ナレゴ」によるナノ構造体形成 — 可逆的ヘテロ接着素子へのジスルフィド結合導入によるナレゴ線状構造体の伸長制御、第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会合同大会、横浜、2007 年 12 月 14 日
12. 伊藤 吹夕, 臼井 健悟, 牧 禎, 小川 ちひろ, 木戸秋 悟, 鈴木 治和, 松田 武久, 林崎 良英, 伊藤 昌可 タンパク質由来自己組織化分子「ナレゴ」によるナノ構造体形成 — Ca^{2+} 依存的接着素子 (Cohesin-Dockerin) の利用、第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会合同大会、横浜、2007 年 12 月 14 日
13. 小川 ちひろ, 臼井 健悟, 青木 誠, 伊藤 吹夕, 伊藤 昌可, 甲斐 誓利, 片山(金森) 睦, 林崎 良英, 鈴木治和 Gemin2 plays an important role in stabilizing the survival of moter neuron complex、第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会合同大会、横浜、2007 年 12 月 14 日

○ 国際

1. Harukazu Suzuki, Chihiro Ogawa, Kengo Usui and Yoshihide Hayashizaki, Gemin2 plays an important role for stabilization of the SMN complex. 19th International Mouse Genome Conference, November 5-8, 2005
2. Chihiro Ogawa, Kengo Usui, Makoto Aoki, Fuyu Ito, Masayoshi Itoh, Chikatoshi Kai, Mutsumi Kanamori-Katayama, Yoshihide Hayashizaki, Harukazu Suzuki. Gemin2 stabilizes the SMN complex through novel interactions. *20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress*. Kyoto 18-23 July 2006.
3. Kengo Usui, Tei Maki, Satoru Kidoaki, Fuyu Ito, Masayoshi Itoh, Harukazu Suzuki, Takehisa Matsuda, Yoshihide Hayashizaki. Self-assembly of Nanolego: Temporally controlled formation of protein filament. *20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress*. Kyoto 18-23 July 2006.
4. Fuyu Ito, Kengo Usui, Harukazu Suzuki, Masayoshi Itoh, Shintaro Katayama, Kazuhiro Shibata, Ayako Yasunishi, Piero Carninci, Jun Kawai, Tei Maki, Satoru Kidoaki, Takehisa Matsuda, Yoshihide Hayashizaki. Construction of nanolego, the self-assembling proteins based on protein interactions. *20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress*. Kyoto 18-23 July 2006.
5. Tei Maki, Satoru Kidoaki, Kengo Usui, Masayoshi Ito, Harukazu Suzuki, Yoshihide Hayashizaki, Takehisa Matsuda. Dynamic force spectroscopy of specific interaction between PDZ-domain and its recognition peptide. *20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress*. Kyoto 18-23 July 2006.
6. Piero Carninci, Albin Sandelin, Boris Lenhard, Shintaro Katayama, Kazuro Shimokawa, Jasmina Ponjavic, Colin Semple, Martin Taylor, Vladimir Bajic, David Hume, Yoshihide Hayashizaki. Promoting mammalian transcription. *20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress*. Kyoto 18-23 July 2006.
7. Masayoshi Itoh, Ayako Yasunishi, Kengo Imamura, Mutsumi Kanamori-Katayama, Harukazu Suzuki, Masanori Suzuki, Jun Kawai, Yoshihide Hayashizaki, Double vector exchangeable clone constructions with non-PCR mediated removable termination codon by type IIS restriction endonuclease, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, June 18-23 2006.
8. Tei Maki, Satoru Kidoaki, Kengo Usui, Harukazu Suzuki, Masayoshi Ito, Fuyu Fueki, Takehisa Matsuda, Yoshihide Hayashizaki. Ligand-receptor interaction-induced self-assembled architectures of proteins: characterization of the interaction forces and manner of assembly of NanoLEGO proteins. MMC-12, the IUPAC International Symposium on MacroMolecular Complexes. Fukuoka 27-31 August 2007.
9. Chihiro Ogawa, Kengo Usui, Makoto Aoki, Fuyu Ito, Masayoshi Itoh, Chikatoshi Kai, Mutsumi Kanamori-Katayama, Yoshihide Hayashizaki, Harukazu Suzuki, Gemin2 plays an important role in stabilizing the survival of moter neuron complex, 21st International Mammalian Genome Conference, Kyoto Terrsa, Kyoto, Japan, 28 October-1 November 2007.

(4)特許出願

①国内出願 (2件)

1. 発明の名称「高分子修飾探針を用いる蛋白質分子のハンドリング法」
出願番号:特願 2003-407973
出願日:2003.12.5
出願人:科学技術振興機構、理化学研究所
発明者:松田武久、林崎良英、木戸秋悟、アリムジャン・イディリス、
出願人:(独)科学技術振興機構、(独)理化学研究所
2. 発明の名称「新規なナノ構造体およびその構築方法」(特願 2005-284926 ,2005.9.29)
出願番号:特願 2005-284926
出願日:2005.9.29
発明者:林崎良英、鈴木治和、臼井健悟
出願人:(独)理化学研究所

②海外出願 (1件)

- 1.海外出願(1件)
出願番号:PCT/JP2006/319279
出願日:2006.09.28
発明名称:新規なナノ構造体及びその構築方法
出願人:(独)理化学研究所
発明者:林崎良英、臼井健悟、鈴木治和

(5)受賞等

①受賞

- 1) 平成 16 年 4 月 文部科学大臣賞 林崎良英
- 2) 平成 17 年 12 月 科学技術への顕著な貢献in2005 林崎良英
- 3) 平成 19 年 4 月 紫綬褒章 林崎良英

②新聞報道

③その他

2007年4月より、つくばエキスポセンターにて、常設展示コーナー「ナノロゴの実験」が公開された。

7 研究期間中の主な活動(ワークショップ・シンポジウム等)

| 年月日 | 名称 | 場所 | 参加人数 | 概要 |
|----------|-------------|----------------|------|-------------|
| H15.3.26 | キックオフミーティング | 理化学研究所 | 26人 | 林崎チーム立上げの会議 |
| H15.6.23 | チームミーティング | ホテル法華クラブ 藤澤 | 8人 | 研究戦略会議 |
| H15.10.9 | チームミーティング | 理化学研究所 | 7人 | 研究戦略会議 |

| | | | | |
|--------------|-------------------------------|----------|------|------------------|
| H15.11.6 | チームミーティング | 理化学研究所 | 9人 | 研究戦略会議 |
| H16.11.9 | チームミーティング* | 理化学研究所 | 7人 | 研究戦略会議 |
| H16.12.24 | チームミーティング* | 理化学研究所 | 6人 | 研究戦略会議 |
| H.17.4.21 | チームミーティング* | 九州大学 | 4人 | 研究討議 |
| H.17.5.16 | チームミーティング* | 九州大学 | 7人 | 研究討議 |
| H.17.7.10 | チームミーティング* | 理化学研究所 | 4人 | 研究討議 |
| H17.8.11 | アト'ハイサイ'ミーティング* | 岡崎統合BSC | 2人 | 研究討議 |
| H17.9.13 | チームミーティング* | 理化学研究所 | 8人 | 研究戦略会議 |
| H17.10.12 | チームミーティング* | 小野町ビル 1F | 6人 | 研究討議 |
| H17.10.28 | チームミーティング* | 九州大学 | 4人 | 研究討議 |
| H17.11.26 | チームミーティング* | 芝パークホテル | 7人 | 研究討議 |
| H17.12.6 | チームミーティング* | 九州大学 | 7人 | 研究戦略会議 |
| H18.1.19-21 | チームミーティング* | 理化学研究所 | 4人 | 研究討議 |
| H18.2.22 | チームミーティング* | 九州大学 | 4人 | 研究討議 |
| H18.4.18 | チームミーティング* | 理化学研究所 | 8人 | 研究戦略会議 |
| H18.5.22 | 第1回 Research exchange meeting | 理化学研究所 | 120人 | 林崎グループ内の研究発表会に参加 |
| H18.7.4 | チーム別進捗報告会 | 理化学研究所 | 12人 | 進捗報告 |
| H18.8.31-9.1 | チームミーティング* | 金沢工業大学 | 4人 | 勉強会 |
| H18.10.24 | つくば EXPO センター取材 | 理化学研究所 | 4人 | 取材対応 |
| H18.10.30 | チームミーティング* | 金沢工業大学 | 4人 | 勉強会 |
| H18.12.20 | 第2回 Research exchange meeting | 理化学研究所 | 120人 | 林崎グループ内の研究発表会に参加 |
| H19.6.8 | 第3回 Research exchange meeting | 理化学研究所 | 120人 | 林崎グループ内の研究発表会に参加 |
| H19.6.3 | チームミーティング* | 理化学研究所 | 9人 | 研究討議 |

| | | | | |
|------------|-----------|-------|----|---------------------|
| H19.11.6-7 | 研究課題終了報告会 | 日本青年館 | 7人 | ナノバーチャルラボ 茅研究領域 報告会 |
|------------|-----------|-------|----|---------------------|

8 研究成果の展開

(1)他の研究事業への展開

具体的な展開はまだ無い。しかしながら、ナノレゴの概念の体系化および、ナノレゴ研究の基本技術の完成がなされた今、競争的資金の獲得や研究事業へ展開について熟考している。

(2)実用化に向けた展開

ナノレゴの概念の体系化、ナノレゴ研究の基本技術の完成に努めたため、具体的に実用化に向けた展開は行っていない。

9 他チーム、他領域との活動とその効果

(1) 領域内の活動とその効果

領域会議を通じて積極的に領域内研究者との交流を深め、研究のアイデアや概念、ナノテクノロジーの問題点などについて多くの意見交換を行った。オンサイトミーティング等へも積極的に参加に勤めた。また、領域内の若手研究者を集めて結成された若手研究会へも積極的に参加し、研究成果を紹介するとともに、研究手法、研究のアイデアなどを積極的に交換した。これら領域内での活動は領域内での研究コラボレーションへとは発展しなかったが、当研究を進めてゆく上で非常に有意義なアイデア、概念の提供を受けた。

(2)領域横断的活動とその効果

領域横断的活動についてもシンポジウムや領域横断ワークショップ等へ積極的に参加し、我々の研究成果を発表するとともに、他の研究グループの成果を学び、また多くの意見交換を行うことができた。研究コラボレーションへとは発展しなかったが、領域内活動同様に当研究を進めてゆく上で非常に有意義なアイデア、概念の提供を受けた。

10 研究成果の今後の貢献について

(1)科学技術の進歩が期待される成果

人工タンパク質をナノマテリアルとして用い、自己組織化を利用して新規の構造体を創出する研究において、我々はナノレゴの基礎研究、SOR ナノレゴを用いた制御された高次構造物創出研究を通じて、概念の体系化と基本技術の確立を達成することができた。この概念と基本技術はナノマテリアルとしてタンパク質をターゲットとしている多くの研究者にとって非常に有用な情報を与えものと考えている。また、力測定研究の成果として解析法に依存して同じリガンドレセプタ対に対しても異なる速度論が観測され、このような差は測定手法に特徴的な解離過程の違い(強制解離:DFS解析、自然解離:SPR解析)に依存して、系が相互作用のエネルギーランドスケープ上の異なる経路を通過することに起因することが示唆された。この知見は、特に特異的相互作用を駆動力とする

分子集合体形成の理解において本質的な再認識を供する面を含んでいる。すなわち、相互作用対が集合体中に組込まれているか、あるいは運動自由度の保証された溶液中での対一相互作用か、の状況の違いにより相互作用の速度論が異なることを再認識させる。蛋白質の自己秩序集合体形成のナノ科学領域において、原理的な知見を提供し得た意義は大きいと考えている。

(2)社会・経済の発展が期待される成果

ナレゴの概念と基本技術が確立したことにより、今後は様々なナレゴ構造物を完全制御下で比較的容易に創出する道が開けた。創製されたナレゴ構造物の応用研究を通じて、種々の実用化を図ってゆくことは可能と考えている。そのひとつとして、ナレゴゲルの研究は、化学試薬を用いない、分子認識による自発性ゲル形成技術であり、細胞に障害を与えないため再生医療の基盤技術としての可能性が高い。また、DNA ブックを用いた遺伝子資源の頒布は他研究者の研究の一助となることが期待される。

11 結び

本研究プロジェクトは、当チームが研究開始時点で有していた独自のデータおよび技術をそれまでとは全く異なる新領域に展開するものであり、ナレゴの作製コンセプトの洗練、作製の方法論の開拓、物性解析・構造解析の徹底した精密化等の、土台づくりから始まった。このナレゴの基礎研究を十分に行い土台を確立することができたので、後年度のナレゴを用いた新規構造体の創出研究を進展させることができた。応用研究については十分に手が回らなかった点もあるが、ナレゴの概念の体系化、ナレゴの基本技術を確立することができた点は意義があったと考えている。概念と基本技術を用いれば、様々な新規のナレゴおよびそれを用いた構造体の創出を比較的容易かつ短時間で達成することができる。その際には創製されたナレゴ構造物の応用を十分に考慮したうえでの展開が重要と考えている。

当研究は、分子生物学をベースとした研究室と医療工学をベースにした研究室とのコラボレーションにより達成された。研究分野が大きく異なるため、お互いに良い刺激下で研究することができた。異なった研究分野での相手方の思考の仕方などは、おのおのの本来の研究分野においても、十分に参考になるものと考えている。こういった環境下で、若手の研究者も多くの知識やスキルを得ることができ、人材育成面でも大変意義が大きな研究であったと考えている。

最後に、会議やシンポジウムを通じて、適切なアドバイスや御意見をいただいた研究領域代表の茅先生をはじめ、アドバイザーの諸先生、そして領域内の研究者の皆様に深謝したい。また、このような研究の機会を与えていただいた JST 戦略的創造研究推進事業、およびお世話になった JST 職員の皆様に感謝したい。