

## 研究課題別事後評価結果

### 1. 研究課題名： タンパク質完全結晶創成

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

研究代表者

森 勇介（大阪大学大学院工学研究科 教授）

主たる共同研究者

村上 聡（東京工業大学・大学院生命理工学研究科 教授）

安達 宏昭（株式会社創晶 代表取締役社長）

### 3. 研究実施概要

本研究では、グループで開発した新しいタンパク質結晶化技術である①フェムト秒レーザー照射による結晶核発生技術、及び②溶液攪拌による高品質化技術に関しての高度化を行うとともに、③膜タンパク質や水溶性タンパク質をはじめとする難結晶化タンパク質の高品質大型結晶育成技術の確立と汎用化を目的としていた。

フェムト秒レーザー照射による結晶核発生技術においては、レーザー集光点からのキャビテーション発生が結晶核発生の促進に重要であることが明らかとなった。キャビテーションは膨張と収縮を繰り返しながら最後には崩壊するが、その収縮時に、キャビテーション周辺に数倍程度タンパク質濃度が高まる領域が生じ、この高濃度化が結晶核発生を促進することが示唆された。一方で、キャビテーションの“崩壊”は、生成されたタンパク質高濃度化領域の崩壊に繋がる懸念される。そこで、溶液の高粘性化を試みたところ、キャビテーションの収縮を保ちつつ、その崩壊を抑制することに成功し、結晶核発生確率が向上する結果が得られた。さらに、レーザー集光点が壁等に近いと、キャビテーションは壁側に移動することを利用し、キャビテーション周囲に形成された高濃度タンパク質を壁面に塗布したゲル中に注入するという新しいタンパク質高濃度化技術を提案し、実際に結晶核発生確率の向上を確認した。

溶液攪拌による大型高品質結晶育成技術においては、溶液流れは成長表面へのタンパク質分子供給、及び吸着を促進することを確認した。様々な成長機構のリゾチーム成長表面におけるステップ成長速度の計測から、ステップ成長速度は溶液の流速に依存し、経験的に得られていた最適な溶液攪拌条件での流速領域においては、流速の増加とともに、ステップ成長速度が増す傾向であることが分かった。このことから適切な溶液攪拌は不純物の影響による結晶性の低下が抑制されることが示唆された。膜タンパク質 AcrB 等、幾つかのタンパク質結晶の転位密度、及びマイクロ欠陥密度とX線構造解析分解能の評価から、溶液攪拌により、結晶中の転位密度が増加し、マイクロ欠陥密度が減少することが、X線構造解析分解能が向上することに繋がるという結果が得られた。

膜タンパク質や各種複合体、水溶性タンパク質をはじめとする、難結晶化タンパク質の結晶化に関しては、汎用性の高い溶液条件下での試行を行うとともに、添加試薬等の検討も含めた幅広い溶液条件探索による結晶化を試みた。

難結晶化タンパク質高品質結晶化に関しては、中性子回折測定用大型 HIV protease -KNI272 複合体、RNA アプタマー-IgG 複合体、Tomato mosaic virus 130K、機能性 Biotin 誘導体-Avidin 複合体等の結晶化と構造解析の成功など、14 個の成功例を示せたとともに、新しい結晶化技術の有効性が実証出来た。

また、開発したタンパク質結晶化技術を有機低分子化合物にも展開したところ、BODIPY 系蛍光プローブ分子、ダブルカリックスアレーン系有機レジスト材料の結晶化と構造解析にも成功している。レーザー照射によってアザ環状化合物の異なる結晶形が析出することが分かり、本技術が結晶多形のスクリーニングに活用できることが示唆された。

これまでの研究開発によって、①フェムト秒レーザー照射による結晶核発生技術、及び②溶液攪拌による高品質化技術に関して、原理解明と技術の高度化を実現するとともに、本結晶化技術は、様々な難結晶化タンパク質、及び難結晶化有機低分子化合物においても、高い確率で大型化・高品質化を実現できることを実証出来き、技術の汎用化・実用化に関しても知見が得られた。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

フェムト秒レーザー照射による核発生技術という独創的な方法を駆使して、これまで結晶化が難しかった膜タンパク質や水溶性タンパク質など重要タンパク質分子について、技術利用の有効性が示された。多数の難結晶化タンパク質の結晶化に成功した点は高く評価できる。さらに、レーザー照射によるキャビテーション、攪拌効果の解析がかなり進み、これらの成果に基づいて、ゲルを用いた新たなタンパク質高濃度化技術による結晶化を試み、その効果を確認した。また攪拌法の改善及びその理論的背景の解明を行った。中性子結晶解析用の大型結晶の作成が可能となるまでに溶液攪拌による高品質結晶作成技術の高度化が実現し、また大型タンパク質結晶育成キットの実用化を目指した。タンパク質以外に有機低分子化合物の高品質結晶化に取り組み、数種の化合物で結晶化と構造解析に成功し、フェムト秒レーザー照射、溶液攪拌による高品質結晶化技術の汎用性を示すことができた。

論文発表(原著論文;国内3件、国際49件)など適切に行われ、結晶の高度化に関する論文をコンスタントに発表している。多数の学会発表、総説や新聞発表などのマスコミを通して報道(46件)も多く、本方法を広く公表されている。種々の学会から多数の受賞(17件)を受けていることは、成果の独創性、重要性を示している。

##### 4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

タンパク質の結晶構造は、生命現象の理解への重要な情報であり、本研究で確立した結晶化技術は当該分野においてインパクトが高く、構造生物学さらには生命現象の解明に大きな貢献をするものである。本研究で開発されたフェムト秒レーザー、溶液攪拌を用いた結晶育成技術の開発は内外において類似研究はほとんどなく、オリジナリティーの高い技術である。

共同研究を通してこれまで結晶化が難しかったタンパク質について数多くの結晶を得る事に成功したことは、個々の研究を底上げすることであり、結晶に馴染みの少ない研究室にも構造生物学的裾野を広げることになり、共同研究を通してより広範な領域で構造生物学を基盤とした生命科学研究の進展に貢献した。

具体的な社会的・学術的貢献も多い。大型結晶育成キットや結晶育成ツールなどを実用化した。日本が世界をリードしているタンパク質の中性子結晶構造解析で、結晶の大型化技術は、日本の優位性をさらに高めるのに貢献している。

領域内外のグループと共同研究をうまく進めており、リーダーシップは適切であると判断できる。結晶化ニーズを的確に掴みつつ研究を進めることができた。特に同じ領域の中村チームが進めているIgGに対するアプタマーの構造解析は特筆に値する。また、チーム内では異なる分野の研究者がお互いの長所を十分に生かしながらか運営され、「人の手」を活用しつつ研究成果が上げられた。

##### 4-3. 総合的評価

レーザー照射による核発生技術、溶液攪拌による高品質結晶育成技術により、これまで不可能であった難結晶タンパク質の結晶化に成功したことは、世界的にも追従を許さず、高く評価される。

今後、この技術について更なる展開と普及には原理的・科学的な解明が強く望まれる。また、より広範な範囲への技術の普及には、常に戦略の検討も重要である。装置の低価格化、どのようなタンパク質の結晶化が可能か性能の明確化、結晶生成の安定化なども必要であろう。その上で、この方法が難結晶化タンパク質の結晶化に適用され、更に技術の改善が進められることにより、創薬や生命現象解明の分野の進展に貢献することが大いに期待される。