



Title	タンパク質結晶育成における核発生制御技術の研究開発
Author(s)	村井, 良多
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57544
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	むら い りょう た
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学 位 記 番 号	第 23854 号
学 位 授 与 年 月 日	平成22年3月23日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科電気電子情報工学専攻
学 位 論 文 名	タンパク質結晶育成における核発生制御技術の研究開発
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 森 勇介 (副査) 教 授 井上 豪 准教授 吉村 政志 准教授 高野 和文 教 授 伊藤 利道 教 授 片山 光浩 教 授 杉野 隆 教 授 尾崎 雅則 教 授 栖原 敏明 教 授 谷口 研二 教 授 森田 清三 教 授 八木 哲也

論文内容の要旨

タンパク質の立体構造解明のため、高品質結晶の作製が求められているが、タンパク質は分子間相互作用が小さいため無機分子などと比較して結晶核発生が非常に困難である。また、結晶化するタンパク質でも、高過飽和度条件下でしか核発生が起こらないことが多く、急速な結晶成長による品質低下が問題になっている。そのため、新たな核発生制御技術の開発が求められている。本研究では、温度制御や溶液攪拌、レーザー照射など、無機・有機結晶の育成分野で培われた結晶育成技術を用いてタンパク質の核発生制御に取り組んだ。

本論文は、第1章序論を含めて本文6章と謝辞、研究業績により構成される。

第1章「序論」では、本論文に関する研究分野について概観し、本研究の意義と目的を明らかにした。

第2章「タンパク質結晶育成における核発生」では、タンパク質分子の性質と、核発生の一般的なメカニズムについて述べ、本研究にて取り組む核発生制御手法について明らかにした。

第3章「温度制御による核発生制御」では、タンパク質溶液に効率良く温度を振り分けるツールの開発を行い、温度がタンパク質核発生に及ぼす影響を調べた。その結果、結晶の析出数や成長速度を温度により制御可能であることが分かった。また、育成時に溶液攪拌を導入することにより、結晶析出数が減少し、結晶品質が向上することを明らかにした。

第4章「フェムト秒レーザー照射による核発生誘起」では、フェムト秒レーザー照射によりタンパク質核発生が誘起されるメカニズムの解明に取り組んだ。レーザー照射条件をパラメーターに核発生確率を調べた結果、核発生の促進にはキャビテーションの発生が必要であることが明らかになった。そこで、高速度カメラを用いてキャビテーション発生時の分子挙動を、マイクロ秒オーダーで観察した結果、キャビテーションの膨張・収縮がタンパク質分子を移動させ、局所的に高濃度領域を形成することで、核発生を促すことが明らかになった。

第5章「溶液のゲル化とレーザー照射による核発生効率化」では、レーザー照射による核発生誘起効率を高めるため、溶液にアガロースの添加を行いゲル化した。ゲル中では分子拡散速度が小さいため、タンパク質高濃度領域の緩和時間が長くなる。その結果、通常の低粘性溶液の1/5以下の過飽和度において核発生を誘起することに成功した。また、アガロースゲルそのものがタンパク質核発生を促進することを新たに見出した。

第6章「総括」では研究全体をまとめ、結論とした。

温度・溶液状態制御およびフェムト秒レーザー誘起核発生は、タンパク質核発生制御において非常に有用な技術であり、本研究により得られた成果は、高品質タンパク質結晶の作製に大いに貢献するものと考えられる。

結果から得られた知見は、これから難結晶化タンパク質の高品質結晶の作製に大いに貢献するものと考えられる。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。

論文審査の結果の要旨

タンパク質の機能は分子の立体構造から推測されるため、X線や中性子線を用いた立体構造解析が創薬研究、構造生物学、生命現象の解明などの目的で行われている。一般的な構造解析手法である、X線やシンクロトロン放射光を用いた構造解析では、結晶作製が不可欠である。しかしながら、タンパク質の結晶化は多くの手法により、様々な試みが施行されてはいるものの、結晶化が非常に困難なものが多く、構造解析のボトルネックとなっている。タンパク質の結晶化が他の材料にくらべ難しい理由の一つに、準安定領域が極めて大きく、過飽和度をかなり高くしないと自然核が発生しないというところにある。多くのタンパク質は高過飽和度にならないと核発生が起こらず、またアモルファス沈殿物となって結晶化しないタンパク質も少なくない。また、過飽和度の高い溶液中で結晶核が発生すると、高過飽和溶液中での結晶成長となるため、結晶品質の低下や結晶の大量析出による多結晶化などの問題が生じる。このため、従来法とは異なる、画期的な核発生制御技術の開発が求められている。本論文「タンパク質結晶育成における核発生制御技術の研究開発」は、非線形光学結晶や半導体結晶育成において研究開発された、レーザー照射や溶液攪拌技術などの新しい結晶育成技術を用いてタンパク質の核発生制御技術の開発に取り組んだものである。

本論文は、第1章序論を含めて本文6章と謝辞、研究業績により構成される。

第1章「序論」では、結晶を利用したタンパク質構造解析に関する研究分野について概観し、研究の意義と目的を明らかにしている。

第2章「タンパク質の結晶化」では、タンパク質分子の性質と、核発生の一般的なメカニズムおよび本研究にて取り組む核発生制御手法について述べ、研究方針を示している。

第3章「温度制御による核発生制御」では、結晶育成プレート上に温度勾配を生成することで、多量のタンパク質サンプルに効率良く温度を振り分けるツールの開発を行い、温度がタンパク質核発生に及ぼす影響を調べている。その結果、タンパク質の結晶育成においても無機・有機結晶と同様に、温度制御を行うことで結晶析出数や成長速度を制御可能であることを示している。また、攪拌台を用いて結晶育成プレートを振り動かしてタンパク質溶液を攪拌することで、結晶析出を抑制できること、結晶品質を向上させられることを明らかにしている。

第4章「フェムト秒レーザー照射による核発生誘起」では、フェムト秒レーザー照射によりタンパク質核発生が誘起されるメカニズムの解明に取り組んでいる。レーザー照射条件とタンパク質核発生確率の相関を調べることで、核発生を促進するためには、キャビテーションや衝撃波などの発生が必要であることが明らかにしている。さらに、高速度カメラを用いてキャビテーション発生時の分子運動をマイクロ秒オーダーで観察し、キャビテーションの膨張・収縮がタンパク質分子を移動させて、局所的に高濃度領域を形成することを明らかにしている。これにより溶液の一部が高過飽和度になることが、核発生を促進する要因であると考察している。

第5章「溶液のゲル化とレーザー照射による核発生高効率化」では、レーザー照射により形成される高濃度領域の緩和時間を長くして核発生確率を高めるため、溶液にアガロースを添加することでゲル化を行っている。その結果、モデルタンパク質であるニワトリ卵白リゾチームを用いて、1 wt%アガロースの添加により通常の低粘性溶液の5分の1以下の低過飽和度条件下で核発生を誘起することに成功している。また、細胞増殖必須因子SATや膜タンパク質AcrBといった、実際に構造解析が求められている難結晶化タンパク質においても、溶液をゲル化することにより、より低過飽和度で核発生を誘起できることを明らかにしている。さらに、アガロースゲルそのものがタンパク質核発生を促進することを新たに見出している。以上の結果から、溶液のゲル化とフェムト秒レーザー照射の組み合わせは、タンパク質の核発生誘起に大きく貢献する技術であると考えられる。

第6章「総括」では研究全体をまとめ、結論としている。

以上のように、本論文は、温度・溶液状態制御およびフェムト秒レーザー誘起核発生など、従来のタンパク質結晶育成には無かった新しい技術を導入することにより、タンパク質結晶の大型化、高品質化を実現しており、これらの