

「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

芝 清隆

((財)癌研究会 癌研究所 蛋白創製研究部 部長)

「プログラマブル人工蛋白質からの組織体構築」

1. 研究実施の概要

本課題研究では、「繰り返しを原理とした人工タンパク質創製手法」を用いて、「分子集合能力」「結晶成長制御能力」「細胞制御能力」等の機能を合理的にプログラムし、歯科領域での新しいインプラント素材や、無機材料のナノ整列に利用できる人工タンパク質を創製することがめざされている。「繰り返しを原理とした人工タンパク質創製手法」では、最初にいろいろな機能や構造を合理的に埋め込んだマイクロ遺伝子がデザインされ、次にこのマイクロ遺伝子の重合体の翻訳産物の中から目的の機能をもった人工タンパク質を選択する。研究は、「マイクロ遺伝子のデザイン」→「人工タンパク質創製」→「人工タンパク質評価」を1つのサイクルとして、人工タンパク質の性質解析から得られた情報をデザインにフィードバックする作業を繰り返す。「タンパク質創製」は癌研究を中心に進めている。「タンパク質評価」は、物理化学的性質解析や、培養細胞レベルでの生物活性評価は創製グループでもある癌研究を中心に進めるが、より応用的側面を重視した性質解析――例えばチタン上での間葉系細胞の分化――などは岩手医科大学の評価グループを中心におこなう。「デザイングループ」は、癌研究所にある計算機ホストを中心に、富士通九州システムエンジニアリングの協力を得ながらネットワーク上でのヴァーチャルラボで仕事が進めている。

2. 研究実施内容

最終目標である「歯科領域での新しいインプラント素材の開発」ではインプラント素材として利用されているチタンの表面を人工タンパク質でコーティングし、その生体適合性を高めるためようとするものである。人工タンパク質の創製には、「繰り返しを原理とした人工タンパク質創製手法、MolCraft」を利用する。この方法では、繰り返しの単位となるマイクロ遺伝子に、合理的に機能や構造を埋め込む作業が第一段階としておこなわれる。ここでは、埋め込む機能として、「チタン認識モチーフ」「骨芽細胞分化誘導モチーフ」「自己組織化能力」を考えており、15年度の研究では、「チタン認識モチーフ」を人工創製することに成功した。また、MolCraftの可能性をさらに拡大するために、フレームシヤッフリン法によるライブラリーの調整法を開発した。他にも、チタン認識モチーフと細

胞接着モチーフを連結したペプチドを合成し、チタン表面への細胞接着に与える影響を評価した。

チタン認識モチーフの取得とフレームシャッフリング法の開発

創製グループの研究者佐野健一は、ペプチドフェージ提示系を用いて、チタン表面に特異的に結合するペプチドの取得に成功した。変異体の解析から、このペプチドはプラス、マイナス電荷をもつアミノ酸側鎖を介して、チタン表面のプラス、マイナスにチャージされた構造を認識するものと思われる。チタン表面の人工タンパク質による改質には、MolCraftの繰り返し単位であるマイクロ遺伝子に埋め込み可能なチタン結合モチーフの取得が必要であったが、この目的を達成できたことになる。

次のステップとしては、マイクロ遺伝子に今回取得したチタン結合モチーフと他の生物活性をもつモチーフ（骨細胞分化モチーフなど）を同時に別々の読み枠に埋め込み、これを読み枠をずらしながらタンデムに重合してモチーフがランダムに重合したライブラリー作製する作業へと進める。創製グループの柏木健司は、マイクロ遺伝子の重合体ライブラリー多様性をさらに増加させる方法として、フレームシフト変異を高頻度に導入し読み枠の乗り換えを積極的におこさせる「フレームシャッフリング法」を開発した。これは、フレームシフト変異を高頻度に導入する性質をもつ最近見つかったYファミリーDNAポリメラーゼを用いたユニークな手法である。

チタン認識モチーフと細胞接着モチーフを連結したペプチドの性質解析

取得したチタン結合モチーフをMolCraftを用いて人工タンパク質に進化させていく前段階の実験として、もっとも簡単な実験であるペプチドを用いた実験を、評価グループに属する高岡裕が進めた。ここでは、細胞接着活性をもつペプチドモチーフを取得したチタン結合モチーフに単純に連結したペプチドを合成し、このペプチドでチタン表面を処理した後のチタンへの細胞接着能力を評価した。その結果、コントロールと比べて、たチタン結合モチーフ+細胞接着活性モチーフペプチドで処理したチタンは、細胞接着活性が高いことが示された。チタン結合モチーフを介して、生物活性がチタン表面に賦与されたと思われる。

3. 研究実施体制

創製グループ

- ① 研究分担グループ長：芝 清隆（財団法人癌研究会、癌研究所蛋白創製研究部、部長）
- ② 研究項目：
 1. 人工タンパク質の創製・解析

評価グループ

① 研究分担グループ長：佐藤 詔子（岩手医科大学、教授）

② 研究項目：

1. 人工タンパク質を利用した新しい顎口領域インプラント素材の開発

デザイングループ

① 研究分担グループ長：芝 清隆（財団法人癌研究会、癌研究所蛋白創製研究部、部長）

② 研究項目：

1. マイクロ遺伝子のデザイン

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Shiba K. **MolCraft: a hierarchical approach to the synthesis of artificial proteins.** *J. Mol Catal. C*, 28(4-6): 145-153 (2004)
- Kashiwagi K, Shiba K. **Combinatorics of peptide sextets encoded by a single microgene.** *J. Mol Catal. C*, 28(4-6): 215-221 (2004)
- Kashiwagi K, Fukami-Kobayashi K, Shiba K, Nishikawa K. **Construction and characterization of chimeric proteins composed of type-1 and type-2 periplasmic binding proteins MglB and ArgT.** *Biosci. Biotec. Biochem.* 68(4):808-813 (2004)
- Sano K, Shiba K. **A hexapeptide motif that electrostatically binds to the surface of titanium.** *J. Am. Chem. Soc.* 125(47): 14234-14235 (2003)
- Zhu J, Kase D, Shiba K, Kasuya D, Yudasaka M, Iijima S. **Binary nanomaterials based on nanocarbons: a case for probing carbon nanohorns' biorecognition properties.** *Nano Lett.* 3(8):1033-1038 (2003)
- Kashiwagi K, Shiba K, Fukami-Kobayashi K, Noda T, Nishikawa K, Noguchi H. **Characterization of folding pathways of the type-1 and type-2 periplasmic binding proteins MglB and ArgT.** *J. Biochem.* 133(3):371-376(2003)
- Shiba K, Shirai T, Honma T, Noda T. **Translated products of tandem microgene repeats exhibit diverse properties also seen in natural proteins.** *Protein Engn.* 16(1):57-63 (2003)
- Shiba K, Honma T, Minamisawa T, Nishiguchi K, Noda T. **Distinct macroscopic structures developed from solutions of chemical compounds and periodic proteins.** *EMBO Reports* 4(2):148-153 (2003)

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：2件（CREST研究期間累積件数：3件）