

「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、機能モチーフを単位として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モチーフ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。プログラムの単位となる機能モチーフは天然タンパク質から抽出するか、あるいは天然にはない活性を進化分子工学的手法で創出して用いる。

#### 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」を考えている。16年度は既に取得した「チタン認識モチーフ」の性質解析を進め、その特質を活かした新しいタイプのナノ分子、「TBP-1提示フェリチン」を山下Gとの共同研究で作製した。「骨芽細胞分化誘導モチーフ」については、引き続きその取得をめざした研究を進めているが、これらの機能モチーフを組み合わせた重合するMolCraftの可能性をさらに拡大するために、これまでの方法を改良して、組み合わせるモチーフの数に制限が無い新手法を開発した。

## チタン結合ペプチドの驚くべき機能の発見

佐野研究員は、すでに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ているが、平成16年度は、このペプチド（以下TBP-1と呼ぶ）の性質解析をおこなった。その結果、TBP-1はチタン、銀、シリカの表面に強く結合し、クロム、金、白金、鉄などを含む他の8種の金属には結合しないといった、明確な標的特異性を持つことが明らかとなった。無機物に結合する人工ペプチドは、しばしば標的無機物の鉱物化を促進する活性、バイオミネラリゼーション活性をもつことが明らかにされてきている。実際、TBP-1はシリカ、銀ナノ結晶の形成を強く促進する活性をもつことが佐野の研究で明らかとなった。すなわち、TBP-1は特異的な金属表面への結合と共に、バイオミネラリゼーション活性をあわせ持つ、多機能ペプチドであることが分かった。変異体を用いた解析からは、結合に重要なアミノ酸残基とバイオミネラリゼーション活性に関わる残基の間に相関があることがわかり、金属表面への吸着と、金属の結晶化が、原子レベルでは共通の分子機構を有することが示唆された。表面吸着、結晶成長機構に新たな知見を与える実験系としてもTBP-1が有用であることが分かる。

## チタン結合ペプチドを利用した新しいナノデバイスの開発研究の開始

以上のように、TBP-1は標的特異性とバイオミネラリゼーション活性をもつことが明らかとなった。TBP-1を用いてナノ構造の構築を考える場合、TBP-1が十分に強い結合能力を持つかどうかの問題となってくる。TBP-1は、ペプチドファージとして単離されてきたものであるが、しばしば、ペプチドファージの状態ですべての強い結合能力をもっているものでも、ファージから切り離して単独のペプチドにした場合に、結合能力を失うことがある。実際、合成したTBP-1を用いたペプチドの実験から、チタンへの結合はKdが $\mu\text{M}$ オーダーといった弱い結合しか観察されなかった。そこで、CRESTの山下グループとの共同研究で、TBP-1をその表面に発現した改変フェリチン分子の作製を試みた。フェリチン粒子は単一サブユニットが24個集り、ケージ状の構造体を形成する。サブユニットのN末が粒子表面に出ているので、N末部分にTBP-1をコードするように遺伝子を改変した。改変フェリチンは野生型フェリチンのように直径12nmのケージ状構造を形成した。さらに、このTBP-1提示フェリチンタンパク質は、KdがnMオーダーといった非常に強いチタンへの親和性を示した。TBP-1提示フェリチンタンパク質のもつこの強い結合能力と標的特異性を利用することにより、新しいタイプのナノ構造形成技術が生まれるものと期待される。

## 骨形成誘導活性をもつペプチドの創製に向けた実験と新しいモチーフシャッフリング法の開発

チタン表面の改質をめざした人工タンパク質の創製には、上記のチタン結合モチーフに加えて、骨形成誘導活性などの生物活性をもったモチーフの取得が必要である。このモチーフの取得に向けて、柏木研究員と村上研究員が実験を進めているが、今年度は論文発表・特許申請につながる成果はまだ得られていない。

人工タンパク質の創出には、モチーフの組合せ的な重合体を作製する技術、MolCraftが用いられる。MolCraftのさらなる進化も本プロジェクトの大きな目標である。昨年度は、フレームシャッフリング法と呼ぶユニークな方法を柏木研究員が確立したが、本年度は、齋藤研究員が埋め込むモチーフの「数」に制限を与えない、改良版MolCraftを考案し、特許申請にいたった。

### 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：高岡 裕（岩手医科大学、助手）
- 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

- Sano K, Sasaki H, Shiba K. **Specificity and biomineralization activities of Ti-binding peptide-1 (TBP-1).** *Langmuir* 21(7): 3090-3095 (2005)
- Kase D, Kulp III JL, Yudasaka M, Evans JS, Iijima S, Shiba K. **Affinity selection of peptide phage libraries against single-wall carbon nanohorns**

**identifies a peptide aptamer with conformational variability.** *Langmuir*  
20(20): 8939-8941 (2004)

- Saito H, Honma T, Minamisawa T, Yamazaki K, Noda T, Yamori T, Shiba K.  
**Synthesis of functional proteins by mixing peptide motifs.** *Chem Biol*  
11(6): 765-773 (2004)

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：3件（CREST研究期間累積件数：6件）