

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： プログラマブル人工蛋白質からの組織体構築
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

芝 清隆 ((財)癌研究会 癌研究所 蛋白創製研究部 部長)

主たる共同研究者

高岡 裕 (神戸大学 大学院医学研究科 特務准教授)

3. 研究内容及び成果

3 - 1 研究課題全体

本研究は、複数のモチーフをコンビナトリアルに重合する人工タンパク質創出システムである「MolCraft」法を用いて、チタン結合能力、骨化誘導能力、ヒドロキシアパタイト誘導能力などの機能モチーフをもつ多機能人工タンパク質の作製を目指し、(1)人工タンパク質の創製、(2)人工タンパク質の評価、(3)人工タンパク質のデザインプログラムに関する研究を進めた。

人工タンパク質の創製では、「MolCraft」法の進化として、鎖置換活性を持ったDNAポリメラーゼと特殊なヘアピン構造を形成するプライマーを組み合わせることで、DNAの6つの翻訳読み枠をフルに利用するLa-MolCraft法を確立した。また、読み枠の乗り換えが連結部を中心におこるという制限を、一塩基欠失が起こりやすいY-ファミリーDNAポリメラーゼを用いた変異導入で回避する、フレーム・シャッフリング法を開発した。さらに、1つの試験管内で確率的に複数のマイクロ遺伝子を形成させる、プログラムできるモチーフ数の制限を受けないMolCraft 2.0を完成した。

モチーフ・プログラミングに用いるモチーフとして、チタン結合モチーフ、カーボンナノ化合物結合モチーフ、BMP受容体結合ペプチドを進化分子工学的手法で取得した。また、炭酸カルシウム、リン酸カルシウムの結晶化に関係したモチーフ、細胞接着モチーフ、BMP活性をもつモチーフ、信号伝達系因子に偏在するモチーフ、タンパク質形質導入モチーフなどを天然タンパク質の配列から採取した。これらのモチーフを用い、「MolCraft」法を用いて、人工タンパク質製剤、タンパク質研究材料、バイオミネラリゼーション研究材料を作製した。

上記したチタン結合ペプチドのチタン認識機構の解明を行い、該ペプチドがチタンに結合する重要な役割を果たしている残基を明らかとし、チタン表面結合モデルを提唱した。また、該ペプチドがチタン以外の金属としてはシリカ、銀に結合することも明らかとした。

人工タンパク質の評価では、骨化誘導能力を有するBMP-2のN末にチタン結合能力をもつ人工タンパク質を融合したタンパク質がチタン表面にBMP-2活性を賦与できることを培養細胞で確認した。また、細胞接着能力を有する人工タンパク質、リン酸カルシウムの結晶制御ができる人工タンパク質、骨誘導人工タンパク質を作製し、その能力を評価した。

チタン結合ペプチドの特異的結合能とバイオミネラリゼーション活性を利用したBioLBL法を開発した。すなわち、チタン結合ペプチドを表面提示したナノ粒子を基板上に結合させ、次ぎに無機物前駆体溶液を加え、チタン結合ペプチドが有するバイオミネラリゼーション活性を利用して無機物層を重層する。これを繰り返すことで多層薄膜を形成させる。

人工タンパク質のデザインプログラムでは、cgi版デザインプログラムを作成し、直感的に操作できるプログラムに改良した。

上記したカーボンナノ化合物結合モチーフは他の研究チームに活用されている。例えば、山下チームは、

外表面に該モチーフを付加したフェリチンタンパク質を用いて、フェリチンタンパク質中に生成させた化合物半導体等のナノ粒子の2次元配列、3次元配列をアルカリイオンフリーで行えることに成功している。

3 - 2 グループ毎

(1) 芝グループ

このグループでは、人工タンパク質の創製・評価を担当した。

人工タンパク質の創製では、「MolCraft」法の次世代版として、鎖置換活性を持ったDNAポリメラーゼと特殊なヘアピン構造を形成するプライマーを組み合わせることで、DNAの6つの翻訳読み枠をフルに利用するLa-MolCraft法を確立した。また、読み枠の乗り換えが連結部を中心におこるという制限を、一塩基欠失が起こりやすいY-ファミリーDNAポリメラーゼを用いた変異導入で回避する、フレーム・シャッフリング法を開発した。さらに、1つの試験管内で確率的に複数のマイクロ遺伝子を形成させ、プログラムできるモチーフ数の制限を受けないMolCraft 2.0を完成した。

モチーフ・プログラミングに用いるモチーフとして、チタン結合モチーフ、カーボンナノ化合物結合モチーフ、BMP受容体結合ペプチドを進化分子工学的手法で取得した。また、炭酸カルシウム、リン酸カルシウムの結晶化に関係したモチーフ、細胞接着モチーフ、BMP活性をもつモチーフ、信号伝達系因子に偏在するモチーフ、タンパク質形質導入モチーフなどを天然タンパク質の配列から採取した。これらのモチーフを用い、「MolCraft」法を用いて、人工タンパク質製剤、タンパク質研究材料、バイオミネラリゼーション研究材料を作製した。

上記したチタン結合ペプチドのチタン認識機構の解明を行い、該ペプチドがチタンに結合する重要な役割を果たしている残基を明らかとし、チタン表面結合モデルを提唱した。また、該ペプチドがチタン以外の金属としてはシリカ、銀に結合することも明らかとした。

人工タンパク質の評価では、骨化誘導能力を有するBMP-2のN末にチタン結合能力をもつ人工タンパク質を融合したタンパク質がチタン表面にBMP-2活性を賦与できることを培養細胞で確認した。また、細胞接着能力を有する人工タンパク質、リン酸カルシウムの結晶制御ができる人工タンパク質、骨誘導人工タンパク質を作製し、その能力を評価した。

チタン結合ペプチドの特異的結合能とバイオミネラリゼーション活性を利用したBioLBL法を開発した。すなわち、チタン結合ペプチドを表面提示したナノ粒子を基板上に結合させ、次ぎに無機物前駆体溶液を加え、チタン結合ペプチドが有するバイオミネラリゼーション活性を利用して無機物層を重層する。これを繰り返すことで多層薄膜を形成させる。

(2) 高岡グループ

このグループでは、計算科学分野の作業を担当した。

具体的には、cgi版デザインプログラムを作成し、直感的に操作できるプログラムに改良した。

4. 事後評価結果

4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文 (原著)		口頭 (ポスター)		招待講演		その他 (著作など)	特許出願	
国際	国内	国際	国内	国際	国内	国際&国内	国際	国内
34	2	54	96	8	30	44	5	11

論文、口頭発表数はほぼ妥当である。特許出願数はやや少ないが妥当である。

2つのモチーフの結合手法を確立し、この手法を利用した金属結合モチーフの研究で大きな成果が見い

だされているなど、この応用範囲は広いと思われる。また、研究手法も大変手堅いことから、本研究成果は発展性があると思われる。

チタン結合性蛋白質(TBP-1)のモチーフを発見し、この蛋白質のチタン結合能力とミネラルゼーション能力を交互にスイッチしながらナノ多層構造を形成していく「BioLBL 法」と名付けた独自技術を開発したことは優れた成果である。この研究成果は平成 18 年に JST からプレス発表された。

山下チームとのコラボレーションにおいて、フェリチン中に生成させた化合物半導体等のナノ粒子の2次元配列をアルカリイオンフリーで行えることに成功している。

4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

多機能人工タンパク質の創製技術の進化、TBP-1 の発見、BioLBL 法の創出は、いずれも生物と材料科学のつながりを先導したものであり、科学的・技術的インパクトは大きい。

無機材料に結合するペプチドの単離・取得が多々報告されているが、TBP-1 ほど性質解析が行われた研究例はまだ無く、その利活用を含めると本研究で得られた成果レベル、重要度はぬきんでいる。

進化した人工蛋白質の創製技術は第三世代の分子工学システムの確立を目指して、また、BioLBL 法はメディカル・デバイス分野での新たな応用に向かって発展することが期待できる。

4 - 3 . その他特記事項(受賞歴など)

(1) 主な受賞

2002年 東京テクノ・フォーラム 21 ゴールドメダル受賞 芝 清隆 部長

2006年 癌研究会学術賞受賞 芝 清隆 部長

2006年 4th Peptide Engineering Meeting Award for Young Investigator Symposium 受賞 佐野健一 研究員

(2) 今後の展開

人工蛋白質・ペプチドを利用して、松下電器産業株式会社先端技術研究所の山下一郎主幹研究員とバイオナノプロセスによるデバイス開発を進めている。また、いくつかの企業、研究所と医療用途展開を目指した共同研究を進めている。