

「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

(癌研・蛋白創製、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、MolCraft」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、目的の機能をもった人工タンパク質を自由に創製する技術を確立し、バイオナノテクノロジー分野での新しいプラットフォームを形成することを大きな目標としている。具体的な出口として、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目標を設定している。これまでの研究から、プログラムする素材である人工ペプチドモチーフとして、チタン結合ペプチド(TBP-1)を取得しており、現在、これを MolCraft 法を用いて、他の機能モチーフと組み合わせる実験や、天然の骨化誘導能力をもったサイトカインに結合させ、チタン表面の骨化誘導能力を高める実験を進めている。また、TBP-1 を天然のナノ粒子タンパク質を組み合わせることにより、新しいナノドット多層膜形成法、「bioLBL 法」を開発しており、材料科学分野での派生研究も広がっている。今後さらに、リン酸カルシウムのバイオミネラリゼーション能力をもつ機能モチーフも加えた人工タンパク質を創製し、チタン表面の機能化を進めていく。

2. 研究実施内容

(1) **機能モチーフの採取** : チタン表面に特異的に結合する人工ペプチドモチーフ、TBP-1 の性質解析から、結合能力に加え、バイオミネラリゼーション能力をもつことが明らかにされている。すなわち、TBP-1 は「結合活性」と「触媒活性」をあわせもつ「多機能ペプチド」である。この多機能性は、下に述べる、新しいタイプのナノ構造形成手法の開発へとつながっている。

骨の主成分であるリン酸カルシウムの結晶、ヒドロキシアパタイトの結晶成長を誘導する能力をもったモチーフを探し出すために、骨髄基質タンパク質(DMP)の部分配列をもつ人工タンパク質ライブラリーを、MolCraft から調製し、現在、これらのタンパク質のバイオミネラリゼーション能力を調べている。

(2) チタン結合能力をもったフェリチン分子の作製：天然のナノ粒子であるフェリチン分子のサブユニットをコードする遺伝子を改変し、粒子表面上にチタン結合ペプチドを提示する改変フェリチン分子を作製した（山下Gとの共同研究）。この改変フェリチンはチタンに対して、 $k_d = nM$ オーダーの強い結合能力を獲得し、特異的吸着能力を利用したナノ粒子のパターニングに十分利用できる性質をもつ。この改変フェリチンの半導体素子作製への利用法を、山下Gと共同開発している。

(3) bioLBL 法の開発：チタン結合ペプチド、TBP-1 の「結合活性」と、「シリカ形成を触媒する能力」を交互に利用することで、チタン結合ペプチドを提示したフェリチン粒子を、薄いシリカ層をはさんで、一層ずつ積み重ねることができることを発見し、これを「Bio-LBL 法」（図1）と名付けた。フェリチンの内部に鉄、CdSe、酸化コバルトを別々に内包させ、これら3種の無機物ナノドットを10nmレベルの薄さで思い通りの順番で積層できることを示した）。現在、フェリチンではなく、高分子系のミセル粒子にチタン結合ペプチドを提示させ、金のナノドットを積層できるかどうかを確認中である。

(4) 4つ以上の機能性モチーフを組み合わせる人工タンパク質を作る方法の開発：現行の MolCraft 技術では、単一のマイクロ遺伝子を連結する際に生じる、連結部分での塩基の挿入、欠失を利用することで3つの翻訳読み枠を組み合わせたに連結し、分子多様性手段を作製しているの、3つ以上のモチーフの組み合わせから人工タンパク質を作製することができなかった。そこで、3つ以上の機能モチーフを組み合わせることのできる「モチーフ・シャフリング法」を開発した。「モチーフ・シャフリング法」では、3つ以上のモチーフを埋込んだオリゴヌクレオチドを確率的に相補鎖形成させることにより、試験管内で複数のマイクロ遺伝子を形成させる手法である。

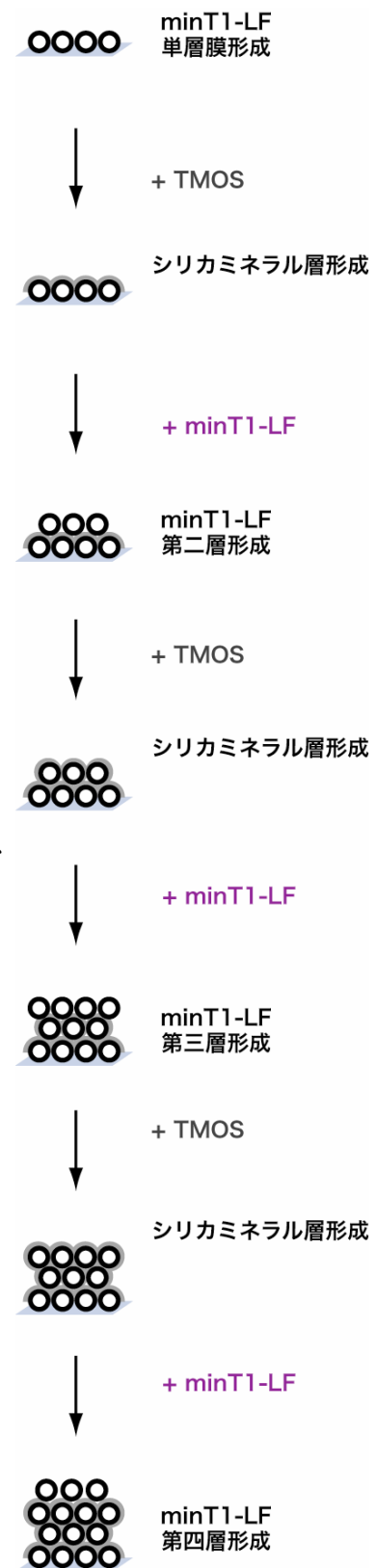


図1. BioLBLの概略

(5)チタン結合能力を持つ骨化誘導タンパク質の作製:天然の骨化誘導タンパク質 BMP-2 にチタン結合ペプチドを融合した改変 BMP-2 遺伝子を作製し、大腸菌内での発現、試験管内折畳み反応を利用して、BMP 活性をもった、「チタン結合ペプチド融合 BMP-2」の作製に成功した。現在、この改変 BMP-2 を用いて、チタン板上に骨化誘導能力を賦与できる条件を探索している。

3. 研究実施体制

「創製グループ」グループ

- ①研究分担グループ長：芝 清隆（癌研究所、部長）
- ②研究項目：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（神戸大学、助手）
- ②研究項目：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」グループ

- ①研究分担グループ長：芝 清隆（癌研究所、部長）
- ②研究項目：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（原著論文）発表

- 佐野健一、上塚 洋、大西 洋、芝 清隆「AFM と QCM-D を用いたチタン結合ペプチドのチタン表面への結合の観察」*表面科学*26(7): 428-431 (2005)
- Sano K, Sasaki H, Shiba K: **Utilization of the pleiotropy of a peptidic aptamer to fabricate heterogeneous nano-dot-containing multilayer nanostructures** *J Am Chem Soc* 128(5): 1717-1722 (2006)
- Kashiwagi K, Isogai Y, Nishiguchi K, Shiba K: **Frame shuffling: a novel method for in vitro protein evolution** *Protein Eng Des Sel* 19(3): 135-140 (2006)
- Sano K, Ajima K, Iwahori K, Yudasaka M, Iijima S, Yamashita I, Shiba K: **Endowing a ferritin-like cage protein with high affinity and selectivity for certain inorganic materials** *Small* 1 (8-9): 826-832 (2005)

(2) 特許出願

H17 年度出願件数：1 件（CREST 研究期間累積件数：8 件）