

「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

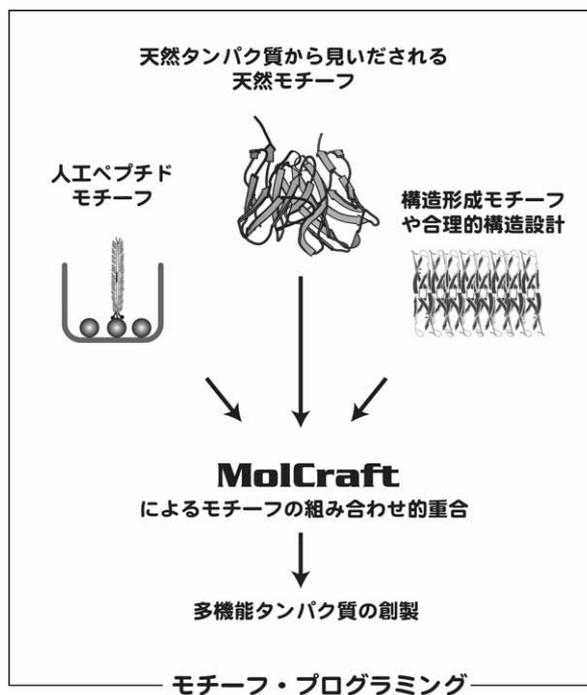
(財) 癌研究会癌研究所蛋白創製研究部 部長)

「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

「モチーフ」とは、何らかの機能や構造と関連付けられた短い配列を意味する。ペプチド・モチーフの場合は、ペプチド配列となる。機能性ペプチド・モチーフを組み合わせる事により、天然にはない組み合わせの機能をもった人工タンパク質を作製することができる。われわれはこの操作を「モチーフ・プログラミング」と呼んでいる。モチーフ・プログラミングで問題となるのが、生体高分子の場合、単純な加算性が必ずしも成り立たない事である。すなわち、機能 A と関連付けられたモチーフと、機能 B で関連付けられたモチーフを連結しても、必ずしも機能 A+B もった二重機能ポリペプチドとはならないのである。しかしながら、われわれのこれまでの研究から、モチーフが、タンパク質内で、あるコンテキストで提示された場合には、機能 A+B の二重機能人工タンパク質が得られる事がわかってきた。「あるコンテキスト」がどのようなものなのかは今のところわからない。したがって、現時点では、多機能人工タンパク質を機能性モチーフ単位から創製するには、埋め込んだモチーフがいろいろな順番、いろいろな数で連結した「組み合わせ的」な重合体ライブラリーをまず作製し、その中から目的とする多機能人工タンパク質を選択する戦略が大きな力をもつ。

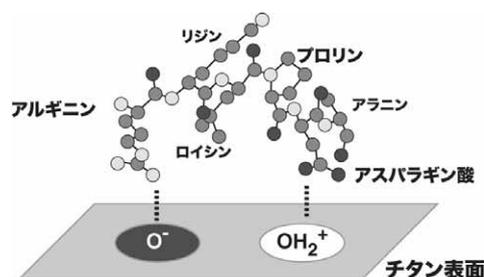
われわれは、組み合わせ的にモチーフ重合体を作製する手法として、すでにわれわれが開発した人工タンパク質創製手法、MolCraft を利用している。本研究では、MolCraft を用いて、生物機能などに関連した「天然モチーフ」と、無機物結合、無



機物結晶化能力などをもつ「人工モチーフ」を合理的にプログラムし、生物学と材料科学を橋渡しするような新しい人工タンパク質を創製するプラットフォームの確立をその目的としている。具体的な出口として、歯科領域で広く利用されているチタン表面に各種生物機能を付与する人工タンパク質の創製を念頭において研究を開始したが、その過程で創製した「人工チタン結合モチーフ(TBP-1)」を医療分野に留まらず、デバイス作製にも広く大きな力を発揮する事がわかってきた。すなわち、TBP-1 を提示したナノケージタンパク質を利用する事により、ナノ半導体ドット等の位置特異的な配置を可能にした。さらには、TBP-1 がもつ、チタン酸化物等のミネラル化活性化能力に注目し、TBP-1 の結合能力とミネラル化能力を交互にスイッチングしながらナノ多層薄膜を形成していく「BioLBL 法」と名付けた独自の技術を開発しており、プログラマブルなナノ構造体形成法として注目を集めている。現在、医療応用と共に、ナノデバイス分野での応用も視野に入れた人工タンパク質研究を進めている。

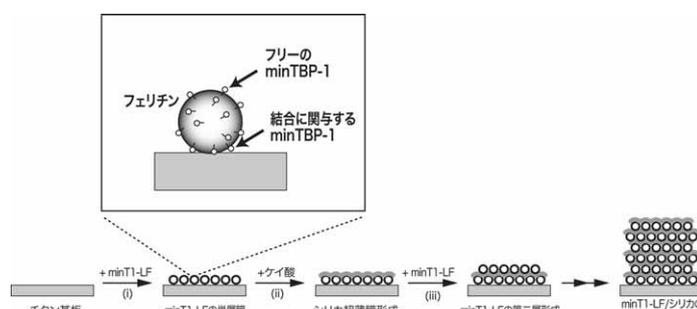
## 2. 研究実施内容

(1) チタン結合ペプチドを利用して **BMP 活性**をその表面に賦与したチタンの作製：われわれはこれまでの研究で、チタンの表面に特異的に結合する人工ペプチド、TBP-1 を進化分子工学的手法で取得している。その後の解析から、全長 12 残基の TBP-1 の前半部分 6 残基 (minTBP-1) で、チタン結合能力を発揮することができることがわかっている。しかしながら、TBP-1 や minTBP-1 だけでは、十分なチタン結合能力が得られず、これらのペプチドを多価で働かせる必要がある。骨誘導活性因子として中心的な役割を持つ **BMP2** をチタン表面に固相化することは、チタンインプラントの早期骨化形成につながると考えられる。従来の金属表面との疎水的な結合を利用した固相法では、吸着にともなうタンパク質変性が誘導され、**BMP2** のもつ骨化誘導能力も失われてしまう。そこで、**BMP2** に minTBP-1 を融合させ、疎水的結合によらない **BMP-2** のチタン表面への固相化法を試みた。minTBP-1 を **BMP-2** の N 末に、1 コピー、2 コピー融合した場合には十分なチタン結合能力を **BMP-2** に賦与することはできなかった。十分な結合を得るには minTBP-1 を 3 コピー以上連結する必要があると考え、N 末に 3 コピー minTBP-1 を融合した **BMP-2** を構築したが、今度はその翻訳効率が著しく低減してしまった。そこで、MolCraft を用いて、minTBP-1 モチーフをいろいろな数、いろいろな順番もつ人工タンパク質を作製し、その中から、チタン結合能力をもつものを選び、これを **BMP-2** の N 末に融合させた。得られた人工タンパク質融合 **BMP-2** は期待どおりにチタン表面に **BMP-2** 活性を賦与できる事を、レポーター遺伝子や ALPase 活性の誘導などを指標に培養細胞で確認した。



(2) チタン結合ペプチドを利用して細胞接着活性をその表面に賦与したチタンの作製：チタンインプラント上部での、上皮組織との封鎖性を向上させるために、チタン表面に細胞接着活性を賦与する事のできる人工タンパク質の創製を進めた。チタン結合ペプチドと上皮細胞接着モチーフをプログラムした人工タンパク質ライブラリーを作製し、その中から、両モチーフをいろいろな数、いろいろな順番でもつくつかのクローンを得た。現在、これらのタンパク質でコートしたチタン上での細胞増殖能力を評価している。

(3) リソグラフィーと **BioLBL** を組み合わせた 3 次元アドレッシング法の開発：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との発見し、これを「**BioLBL** 法」と名付けた。フェリチンの内部にいろいろな金属、半導体のナノドットを内包させ、これらを 10nm レベルの薄さで思い通りの順番で積層できる。この **BioLBL** 法をリソグラフィーと組み合わせ、3 次元レベルでのナノ構造体形成手法を開発している。そのため



に、酸化シリコン基板上にチタン薄膜を二次元的にパターニングし、このチタン上に金属内包フェリチンを **BioLBL** 法で多層化していく実験を開始した。これまで薄いシリカ層をはさんだ多層膜を作製していたが、デバイス応用を考えて、酸化チタンの薄膜層をはさんで **BioLBL** 反応条件を確立する事に成功し、現在 3 次元レベルでのナノ構造体形成を進めている。

(4) **BioLBL** 法を用いたデバイス開発：**BioLBL** 法が実際にデバイス作製に利用できることをデモンストレートする実験として、太陽電池として動作するフェリチン多層体の構築を開始した。ここでは、従来のシリカを間層として用いる **BioLBL** ではなく、酸化チタンを間層に利用する方法を利用している。酸化チタンを間層として用いた場合も、シリカの場合と同じように **BioLBL** がおこなえることを確認した。

(5) ヒドロキシアパタイト、シリカのミネラル化を制御する人工タンパク質の作製：象牙質タンパク質である **DMP** 由来の天然モチーフのもつヒドロキシアパタイト形成能力、あるいは **TBP-1** モチーフのもつシリカ形成能力は、**MolCraft** やフェリチン上への多価提示を利用し強化することができる。これらミネラル化能力をもつ人工タンパク質を用いて、生体高分子によるバイオミネラル化活性化能力の分子機構を探っている。

る。既に、DMP 由来の天然モチーフを埋め込んだ人工タンパク質が試験管内でのヒドロキシアパタイト形成を抑制する事を明らかにしている。同時に、チタン表面にこれら人工タンパク質をコートし、チタン上でのヒドロキシアパタイトの形態形成に影響をもつ人工タンパク質をいくつか同定した。

(6) 人工タンパク質デザインツールの改良： MolCraft 実験の取り扱い単位となる多機能マイクロ遺伝子は、複雑な計算でデザインされる。MolCraft の汎用性を高めるため、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へと改良した。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「創製グループ」グループ

##### ①研究者名

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

#### (2)「評価」グループ

##### ①研究者名

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

### 4. 研究成果の発表等

#### (1) 論文発表(原著論文)

##### 【国際】

- Yamashita I, Kirimura H, Okuda M, Nishio K, Sano K, Shiba K, Hayashi T, Hara M, Mishima Y. **Selective nanoscale positioning of ferritin and nanoparticles by means of target-specific peptides.** *Small* 2(10): 1148-1152 (2006)
- Matsui T, Matsukawa N, Iwahori K, Sano K, Shiba K, Yamashita I. **Realizing a two-dimensional ordered array of ferritin molecules directly on a solid surface utilizing carbonaceous materials-affinity peptides.** *Langmuir* 23(4): 1615 -1618 (2007)
- Sano K, Sasaki H, Shiba K. **Conversion of a monodispersed globular protein into an amyloid-like filament by appending an artificial peptide at the N-terminal.** *Protein Eng Des Sel*, in press (2007)
- Saito H, Minamisawa T, Shiba K. **Motif programming: A microgene-based method for creating synthetic proteins containing multiple functional motifs.** *Nucl Acid Res*, in press

(2007)

- Kulp JL III, Minamisawa T, Shiba K, Tejani M, Evans JS. **Structural properties of an artificial protein that regulates the nucleation of inorganic and organic crystals.** *Langmuir*, in press

(2007)

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願:0 件 (CREST 研究期間累積件数:9 件)