

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07800

研究課題名(和文) 非天然アミノ酸導入による機能・強度・形態を制御したシルク材料の創製研究

研究課題名(英文) Control of the properties of silk materials by the introduction of unnatural amino acids

研究代表者

寺本 英敏 (Teramoto, Hidetoshi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門 新産業開拓研究領域 新素材開発ユニット・上級研究員

研究者番号：60391562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アジド基をもつ非天然型アミノ酸(AzPhe)を導入したシルクタンパク質に対し、細胞接着性RGDペプチド、あるいは、細胞接着性を低下させるポリエチレングリコール(PEG)をクリック反応で結合させ、シルクタンパク質への繊維芽細胞(NIH3T3)の接着挙動がどのように変化するかを調べた。その結果、RGDペプチドを結合させたシルクタンパク質では接着数に有意な変化は見られなかったものの、伸展形態の細胞がより多く観察された。PEGを結合させた場合では、細胞の接着数が有意に減少した。紫外線を照射して部分的にアジド基を破壊した後にPEGを結合させることにより、細胞のパターニングが可能であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Adhesion of fibroblasts (NIH3T3) on silk fibroin, incorporated with an azide-bearing unnatural amino acid (AzPhe), was investigated after being modified with cell adhesive RGD peptides or cell repulsive polyethylene glycols (PEG). When the RGD peptide was ligated on silk fibroin, fibroblasts with extended forms became abundant although number of adhered cells did not increase. When the PEG chain was ligated on silk fibroin, number of adhered cells significantly decreased. It was demonstrated that cell patterning on silk fibroin is possible by partially destroying azide groups by UV irradiation.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：バイオテクノロジー 非天然アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

シルク(絹)はカイコ(*B. mori*)が作る繊維性タンパク質であり、その糸は百年以上前から現在でも手術用の縫合糸として利用され続けているほど、安全性と強度に優れた天然素材である。その特徴を生かしつつ、さらにフィルム・スポンジ・ナノファイバーなどへ加工することで、皮膚・骨・軟骨・神経・角膜など様々な組織を再生するための細胞足場材料(スキャホールド)として利用する研究が進んでいる。

材料が安全であることは絶対的な要件であるが、強度や機能(細胞の接着・増殖・分化の制御など)、微細形態(=細胞が生育する環境)などは、用途によって要求性能が異なる。したがって、用途に応じてそれらを制御する手法が求められる。これまでシルクの改変手法として、「遺伝子組換え(GM)」と「化学修飾」が用いられてきた。GMは、細胞接着配列などの機能成分を遺伝子レベルで融合できる手法である。ただし、融合できるのはペプチド・タンパク質成分に限られる。化学修飾では融合させる成分に限定はないが、反応部位・反応量の制御は容易でない。反応条件によっては、分子量の低下・予期しない副反応・残存毒性の懸念がある。

申請者らは上記に相補的な手法として、「非天然アミノ酸導入法」を提案してきた。最近、アジド基(-N=N⁺=N⁻)をもつ非天然アミノ酸(4-アジドフェニルアラニン: AzPhe)をシルクタンパク質中に導入することに成功した。AzPheは、天然ではあり得ない3つの特性を与える:「クリック反応性」「生体直交性」(生体分子にアジド基は存在しないため、細胞の共存下でも選択的に反応させられる)「光反応性」(AzPheのアジド基は紫外線照射で架橋を形成する)。しかし、これらの特性をどこまで実用的に利用できるかは未知である。

2. 研究の目的

本研究では、AzPhe等の非天然アミノ酸導入によってシルク材料の機能・強度・形態を制御できることを実証すると同時に、手法の限界を探り、実用化ターゲットを決定する。そのために、3年の研究期間では以下の3点について明らかにする。

(1) 非天然アミノ酸の“クリック反応性”を利用し、シルク材料の自在な機能改変が可能か?

(2) 非天然アミノ酸の“生体直交性”を利用し、細胞の共存下でシルク材料を修飾できるか?

(3) 非天然アミノ酸の“光反応性”を利用し、シルク材料の強度向上やパターンニング(微細形態の構築)が可能か?

上記の検討を通して、研究期間の終了までには、民間企業と協同して実用化研究を始められる状態にまで知見と技術を蓄積する。

3. 研究の方法

AzPheが導入されたシルクタンパク質は、文献[1]にしたがって生産した。すなわち、AzPheを認識するフェニルアラニル-tRNA合成酵素(PheRS)変異体を絹糸腺で発現する遺伝子組換えカイコ(H06系統)を飼育し、5齢期にAzPheを乾燥飼料に対して0.05%含む人工飼料を投与し、繭層を回収した。

AzPhe導入シルクタンパク質フィルムは、以下のように調製した。まず、AzPheを投与して得られたH06系統の繭層を0.02 M Na₂CO₃で精練してセリシンを除去した。精練後の繭層を8 M LiBr水溶液に溶解した後、透析によってLiBrを除去し、AzPheシルクタンパク質水溶液を得た。この水溶液を0.1 wt%に希釈して培養シャーレにキャストして乾燥後、不溶化処理を行った。

<引用文献>

[1] Teramoto H, Nakajima K, Kojima K, Azide-Incorporated Clickable Silk Fibroin Materials with the Ability to Photopattern, ACS Biomater. Sci. Eng., Vol. 2, No. 2, 2016, pp. 251-258.

4. 研究成果

「研究の目的」に記載した3点について検討した結果の概要を以下にまとめる。

(1) クリック反応性の検証

AzPheを導入したシルクタンパク質では、クリック反応を用いて様々な機能分子を簡単に結合できると考えられる。本研究では、シルクタンパク質と細胞との相互作用を制御する目的で、細胞接着ペプチド(RGDペプチド)およびポリエチレングリコール(PEG)の結合を行った。

アジド基と特異的に反応するジベンジルシクロオクテン(DBCO)基を分子の両末端に有するDBCO-PEG4-DBCOをAzPhe導入シルクタンパク質フィルムとまず反応させ、シルクタンパク質上のアジド基をDBCO基へ変換した。次いで、アジド基を有する環状RGDペプチドを反応させ、RGDで修飾されたシルクタンパク質フィルムを得た。作出したRGD修飾シルクタンパク質フィルムへの繊維芽細胞(NIH3T3)の接着性を評価したところ、AzPheが導入されていないサンプルとの間で接着細胞数には有意差は見られなかった。一方、細胞の形態に着目すると、AzPhe導入シルクタンパク質フィルムにおいて伸展形態の細胞が多く見られた(図1)。これは、修飾されたRGDペプチドを細胞が認識したためと考えられ、クリック反応によってシルクタンパク質の細胞接着性を制御できる可能性を示している。一方、シルクタンパク質フィルムはもともと培養シャーレと同程度の良好な細胞接着性を示すため、細胞数では有意な差が見られなかったと考えられる。

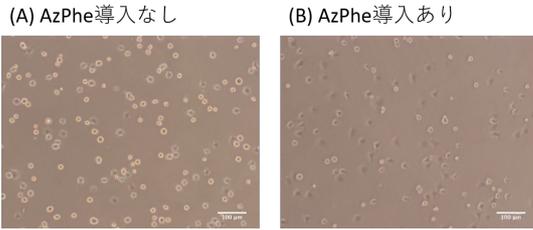


図1 .RGD ペプチドをクリック反応させたシルクタンパク質フィルムへの繊維芽細胞 (NIH3T3) の接着状態 (無血清下 1 時間培養)
AzPhe が導入されたシルクタンパク質フィルム(B)では、導入されていないサンプル(A)と比較して伸展形態の細胞がより多く観察された。

次に、RGD ペプチドとは逆に細胞の接着性を低下させると考えられる PEG の修飾を検討した。異なる鎖長 (5, 10, 20, 30 kDa) をもつ DBCO 基含有 PEG を AzPhe 導入シルクタンパク質フィルムと反応させたところ、いずれの鎖長であっても反応が進行することが分かった。PEG を修飾したシルクタンパク質フィルムへの NIH3T3 細胞の接着性を評価したところ、20 kDa および 30 kDa の PEG を反応させた場合に接着細胞数が大きく減少することが分かった (図 2)。

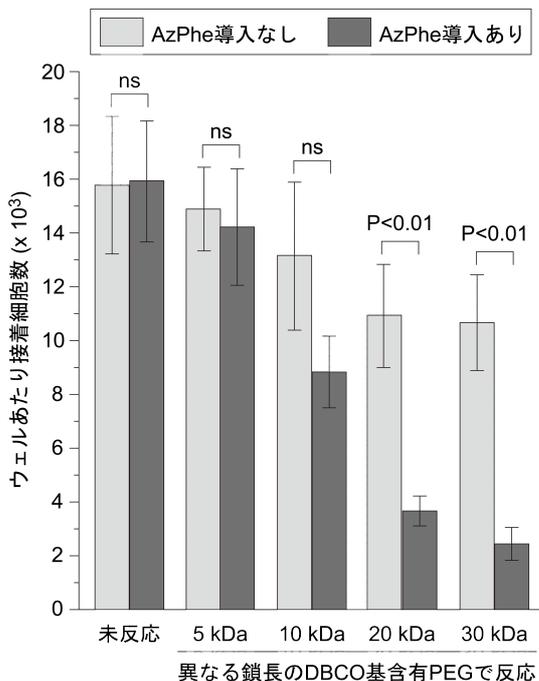


図2 .PEG をクリック反応させたシルクタンパク質フィルムへの繊維芽細胞 (NIH3T3) の接着数 (無血清下 1 時間培養)

未反応の場合と比較して、AzPhe 導入の有無にかかわらず接着細胞数が減少する傾向が見られた。20 kDa および 30 kDa の鎖長の PEG を用いた場合、AzPhe が導入されたシルクタンパク質フィルムにおいて AzPhe が導入されていないサンプルよりも有意に低い接着数が観察された。ns は有意差がないことを

示す。

(2) 生体直交性の検証

上記 (1) での結果から、細胞接着性に関与する機能分子をアジド基選択的に結合させられることが明らかになった。このことから、タンパク質等の他の生体分子が共存した環境下でも、シルクタンパク質のみを選択的に修飾できると考えられる。しかしながら、RGD ペプチド結合条件の検討が長引いたため (1) の検証実験が遅れ、細胞共存下でのシルクタンパク質の修飾実験は実施できていない。今後、(1) でより明確な結果を示した PEG による修飾について、細胞共存下での結合実験を検討したい。

(3) 光反応性の検証

AzPhe のアジド基は、紫外線照射によって分解することが知られている。そこで、AzPhe 導入シルクタンパク質フィルムに部分的に紫外線 (254 nm) を照射した後に DBCO 基含有 PEG (20 kDa) を反応させ、その後、NIH3T3 を接着させた。その結果、紫外線を照射した部分には細胞が接着し、紫外線を照射していない部分 (= PEG が修飾される部分) には細胞がほとんど接着せず、細胞のパターニングが可能であることが分かった (図 3)。

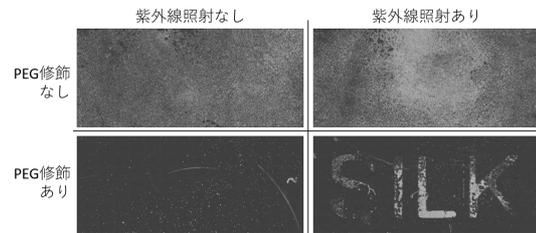


図3 部分的に紫外線を照射した AzPhe 導入シルクタンパク質フィルムへの繊維芽細胞 (NIH3T3) の接着挙動

紫外線を照射したサンプルに PEG を修飾した場合のみ、「SILK」の文字が明瞭に観察された。白く見える部分に細胞が接着している。

上記の結果から、クリック反応を用いて AzPhe 導入シルクタンパク質に機能分子を結合させることができること、RGD ペプチドや PEG を修飾することによってシルクタンパク質の細胞接着性を改変できること、紫外線照射を組み合わせることによってシルクタンパク質上で細胞をパターニングできること、が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Teramoto H, Amano Y, Iraha F, Kojima K, Ito T, Sakamoto K, Genetic Code Expansion of

the Silkworm *Bombyx mori* to Functionalize Silk Fiber, ACS Synth. Biol., 査読有, Vol. 7, 2018, pp. 801-806, <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssynbio.7b00437>

Teramoto H, *In vivo* Incorporation of an Alkyne-Bearing Amino Acid into *Bombyx mori* Silk Fibroin, J. Insect Biotechnol. Sericol., 査読有, Vol. 86, No. 3, 2017, pp. 113-121, https://www.jstage.jst.go.jp/article/jibs/86/3/86_3_113/_article/-char/ja

寺本 英敏, 非天然型アミノ酸の導入によるシルクの改変: クリックアブルシルクの創製, 蚕糸・昆虫バイオテック, 査読無, Vol. 86, No. 1, 2017, pp. 25-38 <http://jglobal.jst.go.jp/public/201702267140707722>

寺本 英敏, クリック反応を用いたフィブロイン分子間での架橋形成, 日本シルク学会誌, 査読有, Vol. 25, 2017, pp. 17-25, https://www.jstage.jst.go.jp/article/silk/25/0/25_17/_article/-char/ja/

Teramoto H, Inhibitory effects on silk fibroin production by the expression of phenylalanyl-tRNA synthetase mutants in posterior silk glands of *Bombyx mori*, J. Insect Biotechnol. Sericol., 査読有, Vol. 85, No. 2, 2016, pp. 31-37, https://www.jstage.jst.go.jp/article/jibs/85/2/85_2_031/_article/-char/en

寺本 英敏, 佐々木 瑞樹, 玉田 靖, 小島 桂, クリック反応によるアジド基導入フィブロインフィルムの修飾, 日本シルク学会誌, 査読有, Vol. 24, 2016, pp. 33-36, https://www.jstage.jst.go.jp/article/silk/24/0/24_33/_article/-char/ja

Teramoto H, Nakajima K, Kojima K, Azide-Incorporated Clickable Silk Fibroin Materials with the Ability to Photopattern, ACS Biomater. Sci. Eng., 査読有, Vol. 2, No. 2, 2016, pp. 251-258, <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsbomaterials.5b00469>

〔学会発表〕(計16件)

Teramoto H, Amano Y, Iraha F, Shirakawa M, Kojima K, Ito T, Tamada Y, Sakamoto K, Genetic code expansion of the silkworm *Bombyx mori* to enhance the utility of silk for biomedical applications, 2018 Genetic Code Expansion Conference, 2018 (オレゴン州立大学、コーバリス、米国)(発表予定)

寺本 英敏, 白川 美徳, 玉田 靖, クリッ

ク反応によるフィブロインフィルムの表面修飾と細胞付着性評価, 第65回日本シルク学会研究発表会, 2018(桐生市市民文化会館, 群馬県桐生市)

寺本 英敏, 小島 桂, 坂本 健作, 天野 芳美, 伊良波 史枝, 伊藤 拓宏, アジド基をもつ非天然型アミノ酸を効率よくフィブロインに導入できる遺伝子組換えカイコの作出, 平成30年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 2018(名古屋大学, 愛知県名古屋市)

寺本 英敏, クリックアブルシルク: 「結合の手」をもつシルク素材の開発, アグリテクノフェア in 北海道, 2018(ホテルエミシア札幌, 北海道札幌市)

寺本 英敏, 白川 美徳, 玉田 靖, クリック反応によるシルク基盤上への細胞パターンニング, つくば医工連携フォーラム 2018, 2018(産業技術総合研究所つくばセンター, 茨城県つくば市)

坂本 健作, 天野 芳美, 伊良波 史枝, 伊藤 拓宏, 小島 桂, 寺本 英敏, シルク・フィブロインの化学修飾を目的としたカイコ *Bombyx mori* における遺伝暗号の拡張, 第12回無細胞生命科学研究会, 2017(岐阜大学, 岐阜県岐阜市)

寺本 英敏, 佐々木 瑞樹, 白川 美徳, 玉田 靖, クリック反応によるフィブロインへのRGDペプチド固定化条件の検討, 第64回日本シルク学会研究発表会, 2017(つくばイノベーションプラザ, 茨城県つくば市)

寺本 英敏, アルキン基を有する非天然型アミノ酸を導入したフィブロインの作出, 平成29年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 2017(農林水産技術会議筑波産学連携支援センター, 茨城県つくば市)

寺本 英敏, クリックアブルシルク: 望みの機能を簡単に付加できる次世代バイオ繊維, アグリビジネス創出フェア 2016, 2016(東京ビッグサイト, 東京都江東区)

寺本 英敏, 小島 桂, 中島 健一, フィブロインに導入したアジド基を起点とする架橋形成の試み, 第63回日本シルク学会研究発表会, 2016(東京農工大学工学部, 東京都小金井市)

Teramoto H, Sasaki M, Tamada Y, Nakajima K, Kojima K, Clickable silk: novel silk materials containing azide reactive groups, 10th World Biomaterials Congress, 2016 (Montreal Convention Center, モントリオール, カナダ)

寺本 英敏, クリックアブルシルク: 望む機

能を自在に付加できるタンパク質材料、SATテクノロジー・ショーケース 2016、2016（つくば国際会議場、茨城県つくば市）

寺本 英敏, 佐々木 瑞樹, 玉田 靖, 中島 健一, 小島 桂, クリックプルシルク: アジド基導入によりクリック修飾と光パターンニングが可能なシルクタンパク質材料、つくば医工連携フォーラム 2016、2016（産業技術総合研究所つくばセンター、茨城県つくば市）

寺本 英敏, 小島 桂, 玉田 靖, クリック反応によるアジド基導入フィブロインフィルムの修飾、第 62 回日本シルク学会研究発表会、2015（岡谷商工会議所、長野県岡谷市）

寺本 英敏, 小島 桂, 中島 健一, アミノ酸認識能を拡張したフェニルアラニル-tRNA 合成酵素を後部絹糸腺で発現する遺伝子組換えカイコの性状、平成 27 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2015（北海道大学農学部、北海道札幌市）

Teramoto H, Kojima K, Transgenic silkworms expressing phenylalanyl-tRNA synthetase mutants in their silk glands produce silk fiber incorporated with unnatural amino acids, 10th International Symposium on Aminoacyl-tRNA Synthetases, 2015（Casa Convalescencia、バルセロナ、スペイン）

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：トランスジェニックカイコ、および該カイコを用いた非天然アミノ酸含有タンパク質の製造方法

発明者：寺本英敏、小島 桂、坂本健作、木村史枝、山口芳美

権利者：農業・食品産業技術総合研究機構、理化学研究所

種類：特許

番号：PCT/JP2018/015039

出願年月日：2018 年 4 月 10 日

国内外の別：外国

〔その他〕

プレスリリース

機能分子を簡単につなげられる「結合の手」をもつシルクの高効率生産を実現、農研機構プレスリリース（2018 年 3 月 1 日）

ホームページ

<http://www.naro.affrc.go.jp/nias/introduction/chart/0204/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺本 英敏（TERAMOTO, Hidetoshi）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門新産業開拓研究領域新素材開発ユニット・上級研究員

研究者番号：60391562

(2) 研究分担者

玉田 靖（TAMADA, Yasushi）

信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号：70370666

(3) 連携研究者

小島 桂（KOJIMA, Katsura）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門新産業開拓研究領域新素材開発ユニット・上級研究員

研究者番号：40370655

中島 健一（NAKAJIMA, Ken-ichi）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門新産業開拓研究領域新特性シルク開発ユニット・主席研究員

研究者番号：70391563