

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K12902

研究課題名(和文) バイオ直交化学による無機・金属材料結合性成長因子の創成

研究課題名(英文) Creation of growth factors binding on inorganic and metal materials by bioorthogonal Chemistry

研究代表者

伊藤 嘉浩 (Ito, Yoshihiro)

国立研究開発法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・主任研究員

研究者番号：40192497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯科インプラントや人工関節のような金属や無機材料表面に、細胞成長促進能や分化誘導能のような生物学的活性を付与することは臨床応用のための機能性材料を開発するうえで重要である。しかしながら、金属や無機材料の上へのタンパク質の固定化法は限られていた。そこで、本研究では、贍貝を模倣して、3,4-ジヒドロキシフェニルアラニンを含む遺伝子組み換えインシュリン様成長因子-1を組み換えDNA工学とチロシナーゼ修飾を組み合わせて設計し、チタン結合性を付与することを期待した。このように調製した成長因子は期待通りチタンに高い親和性を持ち、NIH3T3細胞の成長を顕著に高めることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The generation of metal surfaces with biological properties, such as cell-growth-enhancing and differentiation-inducing abilities, could be potentially exciting for the development of functional materials for use in humans, including artificial dental implants and joint replacements. However, currently the immobilization of proteins on the surfaces of the metals are limited. In this study, we have used a mussel-inspired bioorthogonal approach to design a 3,4-hydroxyphenylalanine-containing recombinant insulin-like growth-factor-1 using a combination of recombinant DNA technology and tyrosinase treatment for the surface modification of titanium. The modified growth factor prepared in this study exhibited strong binding affinity to titanium, and significantly enhanced the growth of NIH3T3 cells on the surface of titanium.

研究分野：生体材料学

キーワード：成長因子 生体材料 バイオ直交化学

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の急速な進行に伴い、現在日本国民の10-15人に1人は人工臓器を用いた治療の恩恵にあずかっていると推計される。人工臓器用の材料には、昔は汎用材料が選ばれるのみであったが、材料工学の発展に伴い、生体適合性を考慮して材料設計が行われるようになってきた。生体材料の中でも有機材料ベースの場合は生体分子と組み合わせ様々な生体機能が付与できるようになってきた。一方、金属やセラミックスのような無機材料は、人工関節、歯科インプラントなどの硬組織の置換に用いられているものの、本来生体機能がない構造材料であるため、生着まで時間がかかり、感染症を引き起こされたり、長期の安定性が保持できなかったり等の課題がある。

2. 研究の目的

このような課題を解決する方法として、生着を促進する生体分子やタンパク質を無機材料表面に固定化することが考えられる。しかし、有機材料と異なり、その方法論は非常に限られている。そこで本研究では、ムラサキイガイ(別名ムール貝)などが水中で岩場などに接着する際に分泌するタンパク質の接着性アミノ酸配列を成長因子タンパク質に移植し、無機材料表面に細胞成長促進活性を付与することを試みた。

3. 研究の方法

ムラサキイガイは、糸足から分泌される接着タンパク質により、濡れた岩場にも自身を固定することができる。さらに岩だけでなく、ガラス、金属、木材、テフロン、ポリプロピレンを含むプラスチック、生体成分の歯、骨など、ほぼあらゆる素材に、強力かつ可逆的に接着することが可能であり、細胞毒性もないために、医療用接着剤としての応用が期待されてきた。接着タンパク質の主成分は、イガイ接着タンパク質(mefp)であり、少なくとも現在までに、mefp-1~mefp-10の10種類が確認されている。その接着性は、リシン(K)と3,4-ジヒドロキシ-L-フェニルアラニン(X=L-DOPA)を多く含む配列によって生じると考えられている。L-DOPAは、含まれているチロシン(Y)が酸化されることにより得られ、接着性を獲得することが知られている。その水中での接着機構としては、L-DOPAに付加された水酸基により、チロシンと比較して物質に対する水素結合が強まり、物質表面に吸着した水分子に打ち勝って水素結合を形成することにより、水中でも結合力を発揮するようになると考えられている。

こうした性質を持つ化学合成接着剤は存在しておらず、生物模倣性の観点から、接着タンパク質の工業や医工学分野への応用を目指し、L-DOPAおよびその誘導体による接着機構を利用した材料表面修飾法が近年盛んに研究されるようになってきている。たとえば、L-

DOPAを高分子に導入したり、その誘導体であるドーパミンを、チタン、ステンレスおよびセラミックスのような無機材料表面等に塗布したりして、有機化して表面処理することが報告されている。成長因子タンパク質の上皮細胞成長因子、血管内皮細胞成長因子、繊維芽細胞成長因子等の固定に成功したことも報告されている。

しかし、このような従来からの化学固定化では、タンパク質の固定化の際の結合箇所が厳密に制御されない、すなわち生物直交性(bioorthogonality)が確保されておらず、固定化後に元来の活性が十分に保持されているかも不明であった。そこで、結合箇所が一定になるように厳密に制御するため、L-DOPAを直接、成長因子タンパク質に導入できるようにした。

L-DOPAはセントラル・ドグマにおいてコードされる20種類のアミノ酸には含まれず、遺伝子組み換えによるタンパク質工学では導入困難である。そこで、これを導入するために、これまでにソルターゼを用いてL-DOPA含有ペプチドを結合させる方法や、チロシナーゼという水酸化酵素により天然アミノ酸であるチロシンを水酸化することにより調製できることが知られている。ここでは、遺伝子組換えで、チロシンをあらかじめタンパク質へ導入し、それをチロシナーゼで処理して、貝の接着機構を使った接着性のタンパク質をデザインした。全体のスキームを図1に示す。

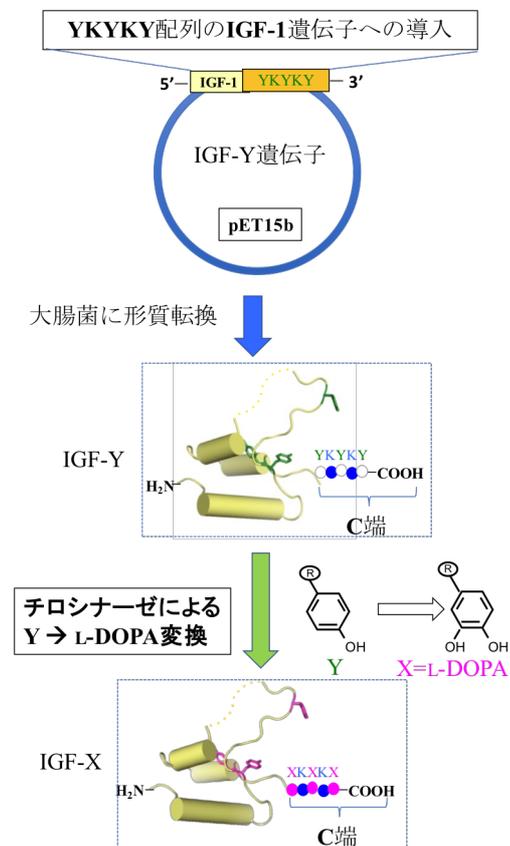


図1 結合性成長因子の合成スキーム

4. 研究成果

接着性を導入するタンパク質としてインスリン様成長因子 (Insulin-like Growth Factor-1: IGF-1) を選んだ。IGF-1 は、広く細胞増殖促進作用を示す成長因子タンパク質の一種である。一方、接着タンパク質 mpf の接着配列を生物模倣し、人工接着性配列モチーフとして最終的に -X-K-X-K-X- (X=L-DOPA) 配列を導入することを考えた。そのためにまず、接着性ペプチド配列の前駆体である -Y-K-Y-K-Y- 配列を、IGF-1 の C 末端に遺伝子組換えにより導入した IGF-Y を調製し、そのうえで Y をチロシナーゼで -X-K-X-K-X- に変換した (IGF-X)。チロシナーゼでチロシンを L-DOPA に変換する際には、IGF-1 にもともと存在するチロシン (Y24, Y31, Y60) も変換されるが、これらは IGF-1 受容体との相互作用には関与しないため、IGF-1 の活性には影響がないことを確認した。

このような指針のもと調製した IGF-X のチタンに対する吸着力を、水晶発振子マイクロバランス (QCM) により測定したところ、IGF-Y の解離定数 $29.6 \mu\text{M}$ に対して、IGF-X では $5.96 \mu\text{M}$ となり、吸着力が約 5 倍増加したことが分かった。さらに、生理食塩水でチタン表面を洗浄後でも、IGF-Y が吸着量の半分程度洗い流されてしまうのに対して、IGF-X ではほとんど吸着量に変化がないこともわかった (図 2)。L-DOPA によって付与されたこうした性質は、ムラサキイガイが水中の岩場に強固に吸着する姿を彷彿させる。

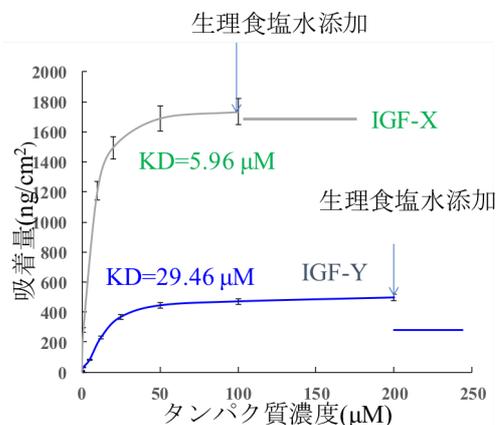
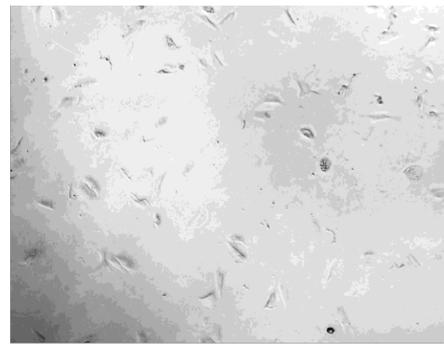


図 2 QCM による結合性評価。

最終的に、この IGF-X の固定化により、通常の IGF-1 を溶解状態で培養液に添加する場合よりも細胞成長促進活性が増加することがわかった (図 3)。培養液中とチタン基板上に同量の IGF-1 が存在する場合に比べても、顕著な相違が現れた。図 4 に示すように、チタン上に結合した IGF-X が IGF-1 レセプター (IGFR) と相互作用して細胞に刺激を伝達しているものと推測された。

さらに固定化により、溶解状態の IGF-1 より顕著に高い細胞増殖促進活性が観測されるようになった。この固定化による成長因子タ



非固定化 IGF-Y
100 μM



固定化 IGF-1 (IGF-X)
100 μM

図 3 IGF-Y、IGF-X 共存下での細胞増殖の様子。

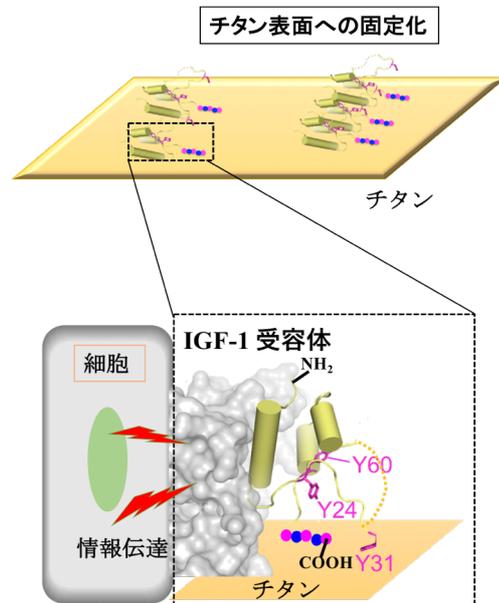


図 4 固定化 IGF-X が細胞へ情報伝達する分子機構。

ンパク質の活性増強機構を解明するために、IGF-1 と IGFR 間の情報伝達機構を解析した。IGF-1 が結合すると IGFR は構造変化し、リン

酸化を受け、これにより情報が伝達されることが知られている。このリン酸化の経時変化を調べたところ、固定化された IGF-X の方が、固定化されていない場合に比べて、長時間持続することがわかった (図 5)。すなわち、固定化されていない IGF-1 の刺激は、2 時間程度で急速に減衰するのに対して、固定化されている場合には、12 時間以上持続した。

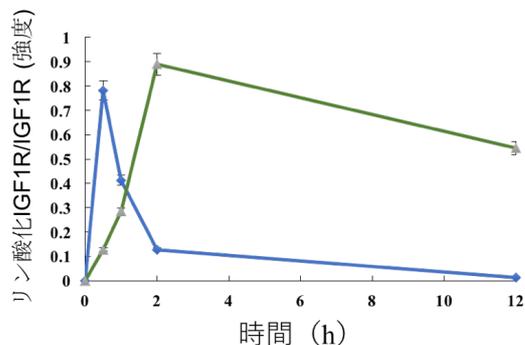


図 5 IGF-1、IGF-X 共存下での細胞情報伝達タンパク質の活性化 (リン酸化) の経時変化。

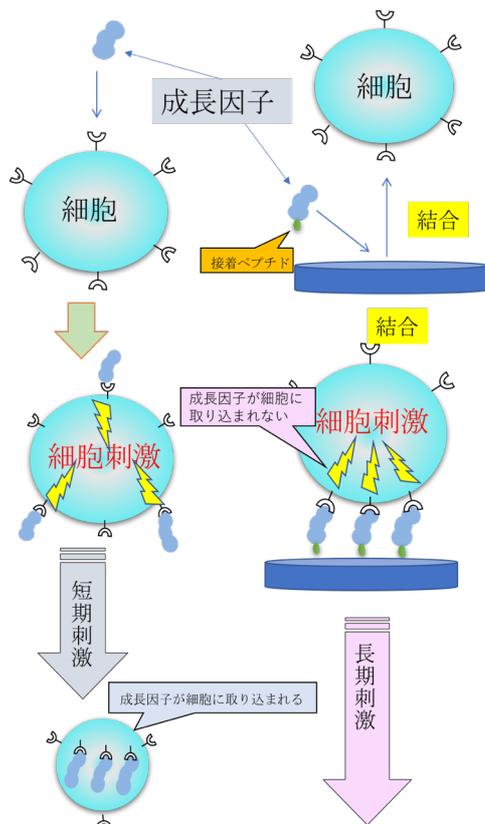


図 6 溶解状態成長因子 (左) と固定化状態成長因子 (右) の細胞との相互作用過程の相違。

これは、固定化されていない IGF-1 は、細胞表面の IGF1R に結合後、細胞内部に取り込まれてダウンレギュレーションが起こるのに

対し、固定化されている場合には取り込まれず、長期間細胞に対して刺激を与え続けるためであると考えられる (図 6)。固定化された成長因子の活性が増強する現象は、すでに幾つかの例が報告されている。以上より、接着性を付与された IGF-X は、長期間チタン表面に固定され、その活性自身も固定化前より増加することにより、より強い細胞増殖促進活性を示すという分子機構が明らかになった。

水中接着タンパク質の接着機構を、遺伝子工学と酵素修飾法を併用して別のタンパク質へ導入可能であることがわかった。そして、これまでは一般的に困難とされたチタン、ステンレス、アパタイトといった無機材料系の人工臓器素材にタンパク質を容易に固定化できるようになることから、これら人工臓器の生着性の向上につながり、インプラントの成功率の向上が期待できる。

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 3 件)

1. 宮武秀行、伊藤 嘉浩、「バイオ直交タンパク質工学による接着性成長因子の創成」、酵素工学ニュース、77、17-20 (2017) 査読無
2. Chen Zhang, Hideyuki Miyatake, Yu Wang, Takehiko Inaba, Yi Wang, Peibiao Zhang, and Yoshihiro Ito, "A bioorthogonal approach for the preparation of a titanium-binding insulin-like growth factor-1 derivative using tyrosinase", *Angew. Chem. Int. Edn.*, **55**, 11447-11451 (2016) 査読有
3. 宮武秀行、張 晨、伊藤嘉浩、「ムール貝の接着機構に学ぶ医療用材料の表面修飾」、コンバーテック、523、90-92 (2016) 査読無

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 1 件)

1. Chen Zhang, Hideyuki Miyatake, and Yoshihiro Ito, "Adhesive growth factors inspired by underwater adhesive proteins", in "Advances in Bioinspired and Biomedical Materials" ed by Yoshihiro Ito, Xuesi Chen, and Inn-Kyu Kang, American Chemical Society, in press (2017) 査読有

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.riken.jp/nano-med.eng.lab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 嘉浩 (ITO, Yoshihiro)

国立研究開発法人理化学研究所

伊藤ナノ医工学研究室・主任研究員

研究者番号：40192497