

平成 21 年 6 月 2 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18710164
 研究課題名(和文) エクソン・シャッフリング仮説に基づく新規多機能性タンパク質の創出
 研究課題名(英文) Creation of novel multi-functional proteins based on exon shuffling hypoth
 研究代表者
 辻 融(TSUJI TORU)
 東京大学・大学院工学系研究科・特任研究員
 研究者番号：40348850

研究成果の概要：骨や歯に発現する Dentin Matrix Protein 1 の石灰化反応機能モチーフと、Phage Display 法により取得されたチタン結合ペプチドを、MolCraft 法を用いて連結し、コンビナトリアルタンパク質集団を作成した。その集団の中から、チタン結合と石灰化反応促進作用を併せもつタンパク質を取得し、チタン表面をリン酸カルシウムでコーティングすることに成功した。また、結晶成長学的観点から詳しい解析を行ない、世界で初めてタンパク質が誘導するハイドロキシアパタイト結晶形成機構を解明することに成功した。これらの知見は、特に医工学生体材料分野の発展に貢献する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	3,400,000	300,000	3,700,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：自己組織化、タンパク質工学、ハイドロキシアパタイト、進化分子工学、ナノバイオ、移植再生医療、バイオマテリアル、結晶成長

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の階層的構造や多様性を考慮すると、小さな構造・機能単位の組み合わせにより、多様で複雑な機能を発現し得る上位の階層構造を、人工的に創出する戦略が重要であることがわかる。近年のゲノム科学の進展に伴い、タンパク質の機能中枢を担う機能モチーフの同定が進み、利用できる機能単位が増大している。これらの観点から、機能モチーフを building block として利用するエクソン・シャッフリング仮説をベースとしたタンパク質創出法は、新規の機能性タンパク質

を創出するうえで有用な戦略と考えられる。しかし、最近までこの戦略を実験室内で具現化する手法がなかった。MolCraft 法は、複数の機能モチーフをコンビナトリアル式に連結した遺伝子集団を構築できる数少ない方法である (Shiba et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 3805-3810 (1997))。

一方で display technology の進展に伴い、半導体などの無機材料に結合するペプチドを取得することが可能となっている。このような人工的な機能モチーフを MolCraft 法の building block として用いることにより、天

然タンパク質が進化の過程で獲得し得なかった機能を、MolCraft 法により構築した人工タンパク質に付与できる可能性がある。このような、天然あるいは人工の機能モチーフを building block として組み合わせたタンパク質の創出法が確立されれば、点突然変異を主体としたこれまでのタンパク質工学からは得られなかった、新規の多機能タンパク質の創出が可能になる。この戦略が確立されれば、医学・生物学分野のみならず、生体材料や材料科学分野への貢献も期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、上記戦略の概念実正例として、ハイドロキシアパタイト形成モチーフと、チタン結合モチーフをコンビナトリアルに連結したタンパク質集団を作製し、この集団の中から、ハイドロキシアパタイト形成促進能とチタン結合能を併せもつ多機能性タンパク質を取得する。

骨や歯の主要無機成分であるハイドロキシアパタイトは、人工骨・人工歯根などのインプラント素材、あるいはそれらのコーティング材料として利用されている。ハイドロキシアパタイト結晶の形態や大きさは、生体適合性や骨結合性に影響を及ぼすことが知られている。

生体内では、その機構は解明されていないが、ハイドロキシアパタイトの形成は、タンパク質などの生体高分子により制御されていると考えられている。したがって、タンパク質がハイドロキシアパタイト結晶の形成を制御する機構を理解し、タンパク質を用いてハイドロキシアパタイトの結晶形成を制御できれば、生体のハイドロキシアパタイトに近い結晶を人工的に合成することができ、生体適合性や骨結合性に優れた生体材料を構築できると予想される。

一方チタンは、軽く強靱で生体適合性に優れた金属として、インプラント素材として広く汎用されている。チタン自身は骨結合性をもたないため、表面をハイドロキシアパタイトでコーティングする必要がある。すでにプラズマ溶射法が実用されているが、超高温に曝されたハイドロキシアパタイトは溶融し、その後、チタン表面で冷却される過程で、その結晶性は不均一になる。また、生体のハイドロキシアパタイトとは結晶的性質が大きく異なってしまう。そのため、プラズマ溶射法により構築されたインプラント材料に於いては、ハイドロキシアパタイトが本来もつ生体適合性や骨結合性が十分に発揮されない問題点がある。

そこで、本研究で取得される人工タンパク質を利用し、生体に極めて近い穏やかな条件で、チタン表面をハイドロキシアパタイトでコーティングできれば、生体材料構築技術と

しての側面から、極めて有用な情報を提供できる。

上記に述べた理由から本研究の目的を整理すると以下の2点である。

- (1) タンパク質がハイドロキシアパタイト結晶形成を促進する機構を探る。
- (2) タンパク質を用いてチタン表面をハイドロキシアパタイトでコーティングすることができるか、検討する。

3. 研究の方法

骨や歯に発現し、ハイドロキシアパタイト形成に関与すると考えられている、Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) がもつ2つの機能モチーフをハイドロキシアパタイト形成モチーフとして用いた (He et al., Nat. Mater. 2003; Motif A = ESQES, Motif B = ESQSEQDS)。また、チタン結合モチーフとして、Phage display 方により取得されたペプチド配列を利用した (Sano & Shiba., JACS., 2003; minTBP -1 = RKLPGA)。これらのペプチドをコードする DNA 配列をもとに MolCraft 法によりコンビナトリアル DNA ライブラリーを得た (Shiba, PNAS., 2003)。DNA ライブラリーは大腸菌を用いてクローニングした。得られたコロニーを無作為に 18 個選定し (#55 -72)、人工タンパク質を得た。人工タンパク質は大腸菌を用いて発現した。変性条件下で His-tag 精製を行い、その後、透析により変性剤を除き、各種解析に用いた。透析に用いた溶媒は 2.16 mM KH_2PO_4 (pH 8.0) である。

CD スペクトルにより、タンパク質の主鎖の構造を調べた。動的散乱法によりタンパク質の流体力学的半径を調べ、それぞれのタンパク質の自己集合能を調べた。また、リン酸カルシウム結晶形成に伴う pH 変化を指標として各タンパク質のハイドロキシアパタイト結晶形成促進能を時間分割 pH 測定により求めた。得られた結晶の結晶系や形態は、走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡、エネルギー分散分光法、電子線回折法、X 線回折法などにより調べた。これらの解析は山本晃氏 (株ペンタックス)、飯島まゆみ博士 (朝日大学)、緒明祐也博士 (慶大) との共同研究により遂行した。また、ハイドロキシアパタイト形成の詳細な機構は産総研小沼一雄博士の協力により、時間分割静的光散乱法を用いて測定・解析した。本研究は、2006, 2007 年度は癌研究会癌研究所蛋白創製研究部 (芝清隆部長) にて、2008 年度は芝部長と連携を保ちつつ東京大学大学院工学系研究科化学生命工学加藤隆史研究室にて行なわれた。

4. 研究成果

MolCraft 法により構築された人工タンパク質をコードする DNA を大腸菌を用いて発現させたところ、調べた 18 個のクローン全て

の発現が確認された。それらは、His-tag を用いた精製により、ほぼ単一のバンドになることが SDS-PAGE により確認された。精製した 18 クローン全てのモチーフ構成を表 1 に示す。

表 1 人工タンパク質のモチーフ構成

Acidic peptide motifs				Ti binding motif			
name	structure	Molecular weight (kDa)	pI	name	structure	Molecular weight (kDa)	pI
#55		15.5	9.9	#64		16.0	6.4
#56		16.7	11.7	#65		16.9	11.8
#57		17.6	7.1	#66		18.0	11.2
#58		18.0	11.9	#67		18.4	11.8
#59		10.4	11.8	#68		15.0	10.6
#60		10.7	11.3	#69		16.2	10.7
#61		10.8	11.7	#70		16.1	12.2
#62		14.8	12.0	#71		12.6	11.9
#63		16.2	12.0	#72		12.8	10.4

表 1 から、3 種類の機能モチーフがコンビナトリアル的に組み合わせられていることが確認できる。これら人工タンパク質の分子量はおよそ 10 から 20 kDa 程度であった。

次に 18 種類 (#55-72) の人工タンパク質のハイドロキシアパタイト形成促進能を時間分割 pH 測定により調べた (図 1)。タンパク質の濃度は 0 (黒), 0.2 (水色), 1.0 (赤), 5.0 (青), 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (黄) の 5 通りの濃度で測定した。タンパク質は pH8.0 の KH_2PO_4 溶液に溶解しているため、溶液の pH は、はじめ 8.0 であったが、 CaCl_2 溶液を加えると瞬時に 7.6 程度に減少した。タンパク質非存在下 (黒線) では、その後、15 分程度まで緩やかに pH は減少し 7.55 程度に達し、その後 20 分程度まで急激に減少し、7.25 程度に達した。X 線結晶回折測定から、反応開始後 10 分程度までに生じる析出物はアモルファスリン酸カルシウム (ACP) 一方 25 分程度で得られた析出物はハイドロキシアパタイト (HAP) 結晶であることが確認された (結果は示していない)。したがって、15 分から 20 分の間の急激な pH の減少は、ACP \rightarrow HAP 転移に伴うプロトンの生成に起因すると考えられる。

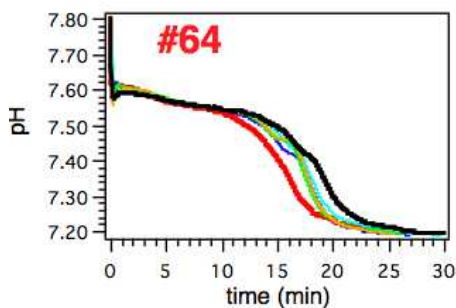


図 1. HAP 形成に伴う pH 変化

図 1 に #64 存在下での pH 変化曲線を示す。18 種類の人工タンパク質のうち、#64, 68, 72

の 3 種類の人工タンパク質には、明確な促進活性が認められた。中でも #64 は 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の低濃度で明確な促進活性を示した。そこで #64 に着目し、ACP \rightarrow HAP 転移に与える影響を調べた。

詳細な ACP \rightarrow HAP 転移機構の解析には、時間分割静的光散乱法を用いた。この方法は、溶液中のリン酸カルシウム粒子の相対分子量、慣性半径、また、粒子内部の規則的構造の指標となるフラクタル次元の時間依存的变化の測定を可能にする。#64 存在下で時間分割静的光散乱測定を行った結果を、図 2 に示す。

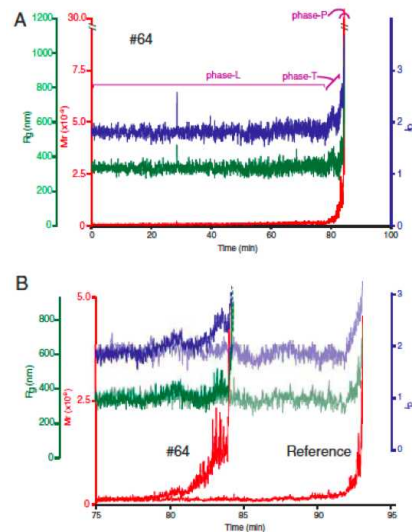


図 2. ACP \rightarrow HAP 転移の時間分割静的光散乱測定

#64 の有 (濃い線) 無 (薄い線) に関わらず、反応開始後瞬時に慣性半径 350 nm 程度のリン酸カルシウム粒子の生成が確認された。#64 存在下では、その後 80 分程度まで分子量 (赤)、慣性半径 (緑)、フラクタル次元 (青) ともに変化が起きなかった。透過型電子顕微鏡観察、電子線回折、およびラマン分光法による解析より、この段階で生成する粒子が ACP であることが確認された。80 分過ぎに急激な分子量の増大が認められた。その間、フラクタル次元も増大していることから、この間にアモルファス粒子の内部構造が緻密化し、ハイドロキシアパタイト結晶への転移が起きていることが推測された。実際、90 分過ぎの粒子を上記の方法で解析したところ、ハイドロキシアパタイト結晶であることが確認された。着目すべきは、この転移の間に、粒子の慣性半径、つまり大きさはほとんど変化しないことである。#64 非存在下ではこのような様式の変化は認められず、反応開始後

90 分過ぎに、粒子の分子量、フラクタル次元、慣性半径は同調して増大した。以上の結果を踏まえると、#64 はハイドロキシアパタイト形成を促進するのみでなく ACP→HAP 転移の機構そのものを変化させる性質があることが推測される(図3)。

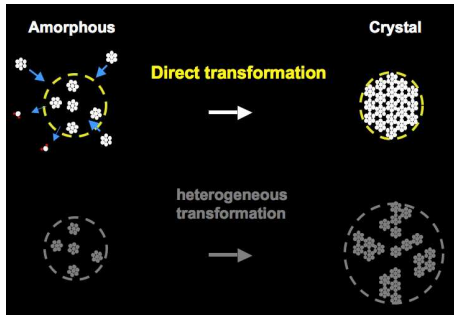


図 3. 人工タンパク質が誘導する ACP→HAP 直接転移のモデル

本研究により、タンパク質が無機結晶の転移機構そのものを変化させることを世界で初めて証明することができた (Tsuji et al., PNAS, 2008)。

また、#68 存在下でチタン表面がハイドロキシアパタイトの前駆体である Octacalcium phosphate によりコーティングできることが確認された(図4. 投稿準備中)。

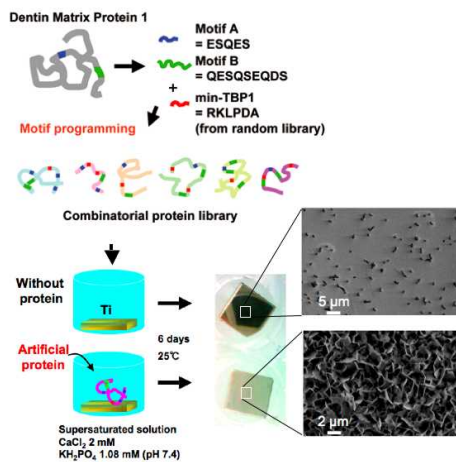


図 4. 人工タンパク質#68 を含むリン酸カルシウム水溶液にチタン板を浸しておくと表面がリン酸カルシウム結晶でコートされる。

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 4 件)

1. Kashiwagi K., Tsuji T., Shiba K., Directional BMP-2 for functionalization

of titanium surfaces. *Biomaterials*, 30, 1166-1175, 2009. (査読有り)

2. Tsuji T., Onuma K., Yamamoto A., Iijima M., Shiba K., "Direct transformation from amorphous to crystalline calcium phosphate facilitated by motif-programmed artificial proteins" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105, 16866-16870, 2008. (査読有り)

3. Tsuji T., Nagata T., Yanagawa H. N- and C-terminal Fragments of A Globular Protein Constructed by Elongation of Modules as A Units Associated for Functional Complementation. *J. Biochem.* 144, 513-521, 2008. (査読あり)

4. Tsuji T., Onimaru M., Yanagawa H., Towards the creation of novel proteins by block shuffling. *Comb Chem High Throughput Screen.* 9, 259-69, 2006. (査読有り)

[学会発表](計 11 件)

1. 柏木 健司、辻 融、芝 清隆, チタン結合人工タンパク質融合BMP-2によるチタン表面への骨分化誘導活性の賦与. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008. 平成20年11月18日(東京)

2. 辻 融、小沼 一雄、山本 晃、飯島 まゆみ、芝 清隆. 人工タンパク質を用いたバイオミネラルリゼーション. 生命の起原および進化学会第33回学術講演会 平成20年3月18日(東京).

3. 辻 融. 人工タンパク質によるリン酸カルシウムのバイオミネラルリゼーション. 平成19年度北海道大学低温科学研究所共同利用研究会 平成20年2月21日(札幌).

4. 辻 融、小沼 一雄、山本 晃、飯島 まゆみ、芝 清隆. ハイドロキシアパタイト結晶の形成を促進する人工タンパク質の構築. 日本生物物理学会第45回年会 平成19年12月21日(横浜).

5. 柏木 健司、辻 融、芝 清隆. チタン結合人工タンパク質を融合した骨分化誘導タンパク質(BMP-2)によるチタン表面への生物活性の賦与. BMB2007 平成19年12月14日(横浜).

6. 辻 融、小沼 一雄、山本 晃、飯島 まゆみ、
芝 清隆. 人工タンパク質を用いてバイオミ
ネラリゼーション機構を解明する. BMB2007
平成19年12月14日(横浜).

7. 辻 融、小沼 一雄、山本 晃、飯島 まゆみ、
芝 清隆. リン酸カルシウム結晶形成を促進す
る人工タンパク質の創出. バイオミネラリゼ
ーションワークショップ 平成19年12月1日(東
京).

8. 辻 融、小沼 一雄、山本 晃、飯島 まゆみ、
芝 清隆. 人工タンパク質によるリン酸カルシ
ウムの析出および形態の制御. 第29回日本バ
イオマテリアル学会大会 平成19年11月27日
(豊中).

9. 辻 融、山本 晃、芝 清隆. 人工タンパク質
を用いたチタン表面のハイドロキシアパタイ
トコーティング. 第28回日本バイオマテリア
ル学会大会 平成18年11月27日(東京)

10. Tsujii T, Yamamoto A, Shiba K. Creation
of artificial proteins that induce
hydroxyapatite crystallization on the
titanium surface. 43JPS・PEM4 November 5,
2006 (Yokohama).

11. 辻 融、山本 晃、芝 清隆
人工タンパク質を用いたリン酸カルシウムの
結晶成長制御
第36回結晶成長国内会議 平成18年(2006)11
月2日(大阪).

6. 研究組織

(1)研究代表者

辻 融(TSUJI TORU)

東京大学・大学院工学系研究科・特任研究員
40348850