

機関番号： 82401
 研究種目： 若手研究(A)
 研究期間： 2008～2010
 課題番号： 20681013
 研究課題名（和文）
 生体分子/無機材料異種界面の動的制御を実現する第二世代のペプチドアプタマーの創製
 研究課題名（英文） Creation of the 2nd generation peptide aptamer which dynamically controls interface between biomolecule and inorganic surface.
 研究代表者
 佐野 健一（SANO KEN-ICHI）
 独立行政法人理化学研究所・分子情報生命科学特別研究ユニット・副ユニットリーダー
 研究者番号： 80321769

研究成果の概要（和文）：

本研究は、生体分子であるペプチドと無機材料の結合・乖離の動的制御を実現する生体分子素子の創製を目指し、フェージディスプレイ法を用いたコンビナトリアルエンジニアリングによる動的制御可能な第二世代のペプチドアプタマーを探索するためのZn-fingerモチーフ骨格を保存するライブラリーの作製と、従来のペプチドアプタマー・無機材料間相互作用の詳細な構造解析に成功し、その構造情報を元に人工ペプチド・人工タンパク質のデザイン合成をおこなった。

研究成果の概要（英文）：

The present study aims at the creation of a biomolecular element that achieves the dynamic control of binding and the unbinding between an artificial peptide and an inorganic material. I succeeded in making the phage library where the Zn-finger motif frame to screen by combinatorial engineering for the 2nd generation peptide aptamer. I also successfully analyzed in a detailed interfacial structure between a peptide aptamer and inorganic surface. Based on this structure, the design synthesis of the artificial peptide and the artificial protein was carried out.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	19,000,000	5,700,000	24,700,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノバイオ、分子認識、ナノ・マイクロデバイス、バイオテクノロジー、アプタマー、ソフト界面

1. 研究開始当初の背景

ナノテクノロジー分野において、タンパク質やDNAなどの生体高分子の持つ自己組織化能力を利用した、ナノ構造構築法の研究・開発が盛んにおこなわれている。その中でも無機・有機材料表面に特異的に結合する人工ペプチドアダプターは、生体高分子と材料をインターフェースする分子として注目が集まっている。ペプチドアダプターとは、抗体のように特定の材料表面を認識し、特異的に結合するペプチドであり、フェージ提示法などの分子進化学によって取得される。現在までに、貴金属類・金属酸化物材料・金属化合物材料・カーボンナノ化合物材料や合成高分子材料など工業的に重要な材料を標的にしたペプチドアダプターについてほぼ一通りの取得が完了している。

研究代表者は、2003年にチタンを標的にしたペプチドアダプター、TBP-1の取得に成功している。遺伝学・生化学的なアプローチから、TBP-1とチタン表面の相互作用は、Pro4における主鎖構造の折れ曲がりを通してArg1の側鎖がチタン表面水酸基の負電荷と、Asp5の側鎖と表面の正電荷が、それぞれ静電相互作用を形成するモデルを構築した。これらの実験結果から明らかになったことは、TBP-1とチタンの界面構造は、タンパク質・タンパク質やタンパク質・DNA間の界面構造と極めて類似していることであった。また研究者らのTBP-1を含め、現在までに報告のあるペプチドアダプターと材料間の相互作用は、すべてLangmuir吸着、すなわち濃度平衡による「静的」な界面形成あるいは、分子の変性を伴う不可逆的な吸着であった。

研究代表者らは、このTBP-1の特異的結合能を利用して、電子線リソグラフィーによってチタンをパターン化した基板上に、半導体ナノ粒子を配置することに成功している。また、海外の研究グループも同様のパターンングに成功していることから、いわば第一世代のペプチドアダプターによる「静的」異種界面形成は、微細加工分野において一定の成果を挙げているといえる。しかしながら、ナノテクノロジー研究におけるバイオの必然性、すなわち生体分子を利用することで初めてなし得るような機能発現・高次ナノ構造構築が要求される分野において、「動的」な分子認識機構を包含しない第一世代のペプチドアダプターには自ら限界がある。この問題を解決するためには、「静的」な界面形成に代わって「動的」な界面を形成する、時空間制御可能な分子による、生体分子・無機材料異種界面創製が必要となる。一方、提案者らが明らかにした、TBP-1とチタン界面形成には、「動的」な側面が内包されていることが分かる。すなわち図1のモデルにおいて、Pro4は

その異性化反応によって主鎖構造を変化させ、Arg1, Asp5の側鎖によるTBP-1とチタン表面との相互作用を惹起している。この事実には、TBP-1にプロリンの異性化反応にかかわるような構造制御のメカニズムを導入することによって、制御可能な動的界面創出の可能性を強く示唆するものであった。

2. 研究の目的

そこで本研究提案では、生体分子と無機材料が造る異種界面の動的制御を可能にするインターフェース分子である第二世代のペプチドアダプターの創製を目的とした。

3. 研究の方法

ペプチド-無機材料動的制御界面の創出のために、(I)進化分子工学の手法を用いたコンビナトリアルエンジニアリングによる動的制御可能な第二世代のペプチドアダプターの探索をおこなった。これと並行して、(II)第一世代のペプチドアダプター・無機材料界面構造についてより詳細な情報を取得し、構造情報をベースにした人工ペプチド・人工タンパク質のデザイン合成をおこなった。

3-(I) コンビナトリアルエンジニアリングによる動的制御異種界面の創出

生物界のタンパク質による動的界面制御は、タンパク質構造の動的変換を通しておこなわれる。そこで、生体内で亜鉛イオンに応答して構造変換を惹起することが知られているZn-fingerモチーフに注目し、この構造変換骨格を利用したフェージライブラリーを作製し、フェージ提示法による金属イオン応答性の第二世代ペプチドアダプターの創製を目指した。

標的となる無機材料は、取り扱いに習熟しているチタンおよび、取得後の界面構造解析研究が進めやすいと考えられる金について実施した。

3-(II) 第一世代ペプチドアダプター・無機材料界面構造情報によるデザイン合成

研究代表者らによるTBP-1・チタン異種界面の構造解析は、分子レベルの界面モデルを構築するに留まっている。しかしながら、サブナノメートルレベルでの構造に関する議論までにはいたっておらず、動的異種界面のデザイン合成における大きな妨げとなっている。これまでの遺伝学・生化学的解析に加え、プローブ顕微鏡による力学計測をおこない、TBP-1・チタン界面構造解析をもう一段階進め、その結果をもとに、TBP-1・チタンの動的制御界面のデザイン合成を進めるのと同時に、TBP-1・チタン界面構造のさらなる解明、他の第一世代ペプチドアダプター・無機材料界面構造情報の取得をおこない、動的制御界面のデザイン合成の可能性について検討をおこなった。

4. 研究成果

ペプチド-無機材料動的制御界面の創出を目指して、(I) 進化分子工学の手法を用いたコンビナトリアルエンジニアリングによる動的制御可能な第二世代のペプチドアダプター探索および、(II) 第一世代のペプチドアダプター・無機材料界面構造解析と人工タンパク質のデザイン合成の二つの方向から研究を進めた。これらと並行して(III) 動的界面分子の検出法の構築をおこなった。

4-(I) コンビナトリアルエンジニアリングによる動的制御異種界面の創出

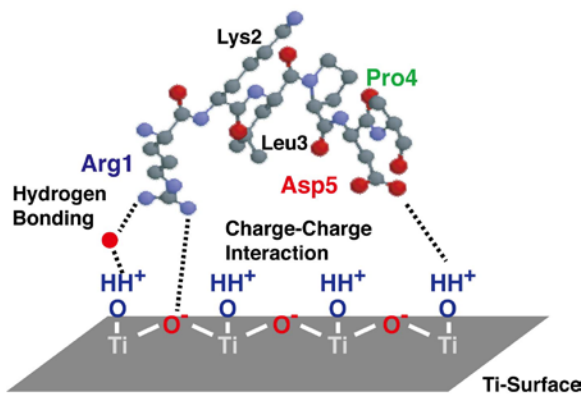
研究代表者は、DNA 結合モチーフなどに広く見られる生体内で亜鉛イオンに反応して構造変換を惹起する Zn-finger モチーフに注目し、この構造変換骨格を利用したファージライブラリーの作製をおこなった。ライブラリーの作製に先だて、Zn イオンの有無、点変異の導入に依る Zn-finger モチーフの二次構造情報の変化を、円二色性偏光測定によって検出し、Zn-finger 骨格に必要なモチーフの抽出と変異の影響について調べた。

続いて Zn-finger モチーフのコンセンサス配列以外をランダム化したライブラリーおよび、Znf268 と呼ばれる Zn-finger 配列における可変部位である分子認識配列をランダム化したライブラリーの二種類のファージライブラリーの作製をおこなった。このとき、一般的に使われている手法を用いてファージライブラリーを作成したが、十分なライブラリーサイズを得られなかった。しかしながら、これらのライブラリーからスタートして、バイオパニングを繰り返したが、顕著なファージの結合能上昇が見られなかった。一般に広く使われている直鎖状の 12mer のライブラリーや環状 7mer のライブラリーでは 10^9 オーダーのサイズを持つ。そこで再度、Znf268 骨格を持つライブラリーに焦点を絞って、スケールアップしたライブラリーの作製をおこなった結果、一桁程のライブラリーサイズの向上が見られたが、以前 10^7 オーダーに留まるものであった。実際にこのライブラリーを用いてチタンや金に対してパニング操作を繰り返したが、ファージの結合活性は上昇しなかった。

Zn-finger モチーフは、22 アミノ酸残基を数え、またアミノ端・カルボキシル端側に数残基のばしてやる必要があり、実際に M13 ファージの pIII タンパク質に挿入される配列としては大きなものであると考えられる。このため、作成したライブラリーに生物学的なバイアスがかかり、結果としてライブラリーサイズが小さくなってしまったと考えている。

4-(II) 第一世代のペプチドアダプター・無機材料界面構造解析と人工タンパク質のデザイン合成

最も構造解析が進んでいる TBP-1 とチタンの異種界面について、より詳細な構造情報を取得するために、これまでの遺伝学・生化学的解析に加え、プローブ顕微鏡による力学計測を組み合わせた解析をおこなった。その結果、これまで電荷相互作用に関係していると考えられてきた Arg1 の側鎖は、電荷相互作用だけでなく、チタン表面の水酸基あるいは、表面に結合している水分子との間で、複数の水素結合を形成し、接着力に重要な役割を果たしていることを明らかにした (図 1)。



また同じく第一世代のペプチドアダプターであ

図 1 TBP-1 とチタンが造る界面構造

るカーボンナノ材料結合ペプチド NHBP-1 について、Nottingham Trent University の Patwardhan 博士 (当時)、広島大学松尾博士の協力で、分子動力学計算や真空紫外円二色性偏光による構造解析を実施した。その結果、NHBP-1 分子が β シート構造を取ることで、NHBP-1 の側鎖の π 電子が並んで存在することになり、結合に重要な役割を果たすことが示唆された。このことは、すなわち界面による induced fit が起こる可能性が高いことを意味している。ペプチドアダプターと無機材料表面との相互作用において、induced fit が重要であると考えられてきた。今回の NHBP-1 の結果は、induced fit の存在を完全に証明にするまでには至っていないが、極めて重要な知見を与えるものである。

次に、得られた精密構造情報を元に、キネシタンパク質を用いて人工タンパク質のデザイン合成をおこなった。キネシンは、細胞内の微小管とよばれるレールタンパク質である微小管の上で貨物輸送に従事するタンパク質ナノマシンである。キネシンの一連の ATP 加水分解サイクルによって生じた構造変化が、微小管相互作用部位である L11 ループ領域の構造変化を誘起し、微小管との相互作用を「動的に」制御することで微小管上での滑り運動を実現している。またキネシンは、モータータンパク質の中で数少ない、組換えタンパ

ク質作成技術が確立されていることから、最適なタンパク質であると考えた。そこで、このX線結晶構造を元に、キネシンの微小管相互作用部位であるL11のアミノ酸残基をコードするDNA配列に、TBP-1配列をデザインした変異キネシンを遺伝子工学的に作製した。この変異キネシンは、チタン表面への親和性を獲得していた。一方、変異キネシンはモータータンパク質であることから、ATPの添加によるチタン表面での滑り運動が期待されたが観察できなかった。これはタンパク質と基板表面との間で一般的に見られるsurface induced conformational changeの影響によるものであると考えられる。そこでsurface induced conformational changeの実時間計測をフェリチンタンパク質をモデルタンパク質に用いて、水晶発振子質量分析計により測定したところ、基板表面の疎水性と変性速度の間に高い相関が示すことを明らかにした。

4-(III) 動的界面分子の検出法の構築

界面における生体分子の結合乖離、言い換えると単一分子の運動検出に向けて、タイムラプスイメージング蛍光顕微鏡システムの構築と改良をおこなった。装置の評価には、超高分子階層性ハイドロゲルを用いた。超高分子階層性ハイドロゲルは、細胞骨格タンパク質をPEGリンカーで化学架橋したハイドロゲルである。例えば、細胞骨格タンパク質の一つである、アクチンを架橋したアクチンゲルは、その弾性率が剪断ひずみによる破壊から自己修復したり、弾性率そのものが自励振動する。また分子レベルでのダイナミクスを抑制する薬剤を添加すると、弾性率の自励振動が抑制されるなど、マイクロレベルの動的な振る舞いが、マクロレベルでの運動に直結することから、装置評価には格好の材料である。そこで、超高分子階層性ハイドロゲルの運動解析に、今回構築したタイムラプス顕微鏡を用いたところ、超高分子階層性ハイドロゲルの分子レベルとマクロレベルの運動解析をそれぞれおこなうことに成功した。このことは、界面における単一生体分子の運動検出が可能であることを意味するものと考えられる。

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7件)

① Sano K., Kawamura R., Tominaga T., Nakagawa H., Oda N., Ijro K., Osada Y. "Thermoresponsive Microtubule Hydrogel with High Hierarchical Structure" *Biomacromolecules*, 印刷中 (査読有)

② 佐野健一、芝 清隆 『バイオミネラルゼーション研究の新展開-ミネラルの形成と溶解を制御する』 バイオサイエンスとインダストリー 68, 336-340 (2010) (査読無)

③ Sano K., Minamisawa, T., Shiba K. "Autonomous Silica-Encapsulation and Sustained-Release of Anti-Cancer Protein" *Langmuir*, 26, 2231-2234 (2010) (査読有)

④ Hayashi T., Sano K., Shiba K., Iwahori K., Yamashita I., Hara M. "Critical amino acid residues for the specific binding of the Ti-recognizing recombinant ferritin with oxide surfaces of titanium and silicon" *Langmuir*, 25, 10901-10906 (2009) (査読有)

⑤ Matsukawa N., Nishio K., Sano K., Shiba K., Yamashita I. "Hexagonal close-packed array formed by selective adsorption onto hexagonal patterns" *Langmuir*, 25, 3327-3330 (2009) (査読有)

⑥ Sano K., Shiba K. "Stepwise accumulation of layers of aptamer-ornamented ferritins using Biomimetic Layer-By-Layer" *J Mater Res*, 23, 3236-3240 (2008) (査読有)

⑦ Sano K., Shiba K. "In aqua manufacturing of three-dimensional nanostructure using a peptide aptamer" *MRS Bulletin* 33, 524-529 (2008) (査読無)

[学会発表] (計19件)

① 佐野健一、『高次の階層構造を持つ細胞骨格タンパク質の材料化』 新規材料創製を目指した合成生物学, 2010年11月19日 (和光) 招待講演

② 佐野健一、『高次の階層構造を持つ細胞骨格タンパク質ハイドロゲルの創発機能』 統合バイオナノシステム研究がもたらすイノベーション基盤の新展開, 2010年8月7日 (和光)

③ Sano K., Kawamura R., Tominaga T., Oda N., Ijro K., Osada Y. "Reversible Gel-Sol transition of Actin gel" in Polymer Physics 2010, 2010年6月7日 (Ji-nan)

④ Sano K., Kawamura R., Tominaga T., Oda N., Ijro K., Osada Y. "Towards developing a novel biomachine with reversible 3D-crosslinked 'bio-hydrogel'" in 4th Conference on Artificial Muscles / 5th World Congress on Biomimetics, Artificial Muscles and Nano-Bio, 2009年11月27日 (大阪)

⑤佐野健一、『人工ペプチドの機能と半導体メモリーの接点』CREST「生体超分子援用フロンティアプロセスによる高機能化ナノシステム」研修会 2009年8月11日（湯河原）招待講演

⑥佐野健一、長田義仁、佐々木博之、加瀬大介、芝清隆『ペプチドアダプターの自己組織化を利用した球状タンパク質の繊維化』平成21年度繊維学会年次大会 2009年6月11日（東京）

⑦佐野健一『生体分子の自己組織化能を利用したデバイス開発における分子生物学の役割』BMB2008 シンポジウム“分子生物学からポストナノテクノロジーに向けて” 2008年12月9日（神戸）

⑧Sano K. “Utilization of Biological Molecular Recognition Enables Biomimetic Nanofabrication of Metal Oxide Semiconductor Transistor Device” 10th RIES symposium 2008年12月8日（札幌）（招待講演）

⑨佐野健一、芝清隆、『マテリアルとバイオをインターフェイスするペプチドアダプター』日本生物工学会年会 2008年8月28日（仙台）（招待講演）

⑩佐野健一、『人工ペプチドの分子認識はデバイス開発にどこまで使えるか？』分子研シンポジウム 2008年8月8日（岡崎）（招待講演）

⑪佐野健一、『ナノバイオテクノロジーにおけるQCM-D技術の利用』QCM-D ユーザーミーティング 2008年6月9日（東京）（招待講演）
他

〔図書〕（計2件）

①佐野健一、川村隆三、長田義仁、『バイオアクチュエータとしての細胞骨格トレッドミルマシ』未来を動かすソフトアクチュエータ-高分子・生体材料を中心とした研究開発-、シーエムシー出版 p332-339（分担）（2010）

②佐野健一、『ゲノムからナノバイオへの取り組み』実践ゲノムの最前線、六然社：p128-139（分担）（2009）

〔その他〕

ホームページ

<http://www.riken.jp/msls/member/Sano.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 健一（SANO KEN-ICHI）

独立行政法人理化学研究所・分子情報生命科学特別研究ユニット・副ユニットリーダー
80321769