

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07794

研究課題名(和文) 遺伝子組換えカイコによるプロテインモジュールの作製

研究課題名(英文) Protein modules by recombinant silkworms

研究代表者

森 肇 (Mori, Hajime)

京都工芸繊維大学・その他部局等・副学長

研究者番号：80201812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：PC12細胞は、神経成長因子 (NGF) に反応して、交感神経細胞様に分化する。このため、神経細胞分化のモデルとして広く使用されている。NGF固定化多角体をコラーゲンコートしたカバーガラスにスポットし、その上でPC12細胞を培養した所、PC12細胞は多角体スポット周縁部に沿って軸索状の突起を伸ばし、整列することが分かった。NGF多角体スポット周辺には、可溶性のNGFではなしえなかったPC12細胞を分化と整列に導くNGFの濃度勾配が形成されていた。本研究により、多角体を用いることで、サイトカインが保持され分泌される生体内の微小環境、つまり細胞外マトリックスを模倣することが出来ると示唆された。

研究成果の概要(英文)：PC12 cells have been widely used as a model for neural differentiation. When PC12 cells are cultured in a medium containing nerve growth factor (NGF), neuronal differentiation is known to be induced. NGF-encapsulated polyhedra were spotted onto a collagen-coated cover slip and PC12 cells were seeded and cultured for 5 days without medium exchange. Then, interestingly, alignment of PC12 cells along the periphery of the polyhedron spot field was observed. Also, axons were extended from PC12 cells and each cell was connected via the extended axons. These phenomena were not seen with a commercially supplied soluble NGF and normal polyhedra. The alignment of PC12 cells was suggested to be induced by a gradient of NGF concentration from a spot of NGF-encapsulated polyhedra. This study suggested that NGF-encapsulated polyhedra mimic the extracellular matrix in which NGF are retained and secreted and finally contribute to nerve regeneration.

研究分野：組織工学、タンパク質工学

キーワード：カイコ ウイルス 多角体 細胞増殖因子

## 1. 研究開始当初の背景

未分化の細胞が増殖し、それぞれの機能を持った細胞に分化していく過程はまさに連続した生命現象である。現状では、細胞の増殖・分化制御において1段階毎に試験管内で再現することはできる。しかし、それらを1つの容器内で連続して行うためには細胞の増殖や分化に必要な各種細胞増殖因子や細胞内の様々な反応を制御する酵素などのタンパク質分子の放出や活性制御を時間的、空間的にコントロールできるこれまでにはない新規な徐放剤・固定化剤の開発が必要である。多角体と呼ばれる昆虫ウイルスが作るタンパク質微結晶は、生体内で形成される結晶 (*in vivo* クリスタル) であり、その溶解性やあらたな空間の導入によって、複数種類の細胞増殖因子や酵素などのタンパク質を1個のプロテインモジュールに固定化できると考えた。

## 2. 研究の目的

1) *in vivo* クリスタルエンジニアリング: プロテインモジュールの崩壊 (徐放性) を意のままに制御し、なおかつソフトな細胞表面に相互作用しやすく、ナノスケールの分子設計からメソスケールで機能を発揮し、マイクロスケールないしはそれ以上の範囲で物質のリリースをコントロールできる全く新規な細胞増殖因子徐放剤の開発と様々な酵素の固定化方法の確立とその安定化の飛躍的な向上を目指す。このために、プロテインモジュールからの細胞増殖因子の徐放速度の調節、複数種類の細胞増殖因子を固定化したプロテインモジュールの開発とその細胞増殖因子の差次的徐放化の実現を行う。

2) 神経ネットワークの構築: 神経細胞増殖因子 (NGF) を固定化した多角体を用いることで、NGF により交感神経細胞様に分化するモデル細胞である PC12 細胞を一行に並べることができるという知見を得ている。この NGF を固定化したプロテインモジュールを用いて二次元レベルでの神経回路の構築を目指す。

3) プロテインモジュールによる単一細胞の増殖・分化制御: プロテインモジュールが動物細胞よりもはるかにサイズが小さいため、単一細胞に対してシグナルを与えることができるという特徴を有している。そこで、一つの細胞に対して複数種類のプロテインモジュールを与え、例えば増殖と分化のシグナルを同時に入れた場合にその細胞はどのような挙動を示すかなど、従来の細胞と液相に添加した増殖因子の実験系では観察できない新たな細胞生物学の現象を解析する。

## 3. 研究の方法

### 1) 徐放機能の制御

多角体は昆虫の消化管の中の高い pH 条件 (>pH10) で溶解するが、これは多角体の X 線結晶解析の結果から、多角体タンパク質であるポリヘドリンの N 末にある  $\alpha$  ヘリックス (H1) と分子内にあるチロシンクラスター間での相互作用がポリヘドリン分子間で生じることによるものであることがわかった。これまでの結果から、チロシンクラスター内のチロシン残基に変異を入れた場合、ほとんど多角体を形成しなくなるのに対して、H1 内のアミノ酸配列の一部を改変することで、多角体を pH8.5 で溶解することができるようになった。この H1 内あるいはその周辺のアミノ酸配列を改変することで多角体の pH による溶解条件をさらに変化させる。

2) 多層構造プロテインモジュールの作製上記の溶解性の異なるポリヘドリンを用いた多層構造多角体の作製に加えて、固定化するタンパク質の発現時期を変えることで、多角体の内層と外層に別のタンパク質を固定化する方法についても検討する。具体的には、ポリヘドリンの発現の 20 時間前から 0 時間 (この場合、固定化するタンパク質とポリヘドリンの発現時期は同じ) の範囲で、ポリヘドリンと固定化するタンパク質の発現を行い、タンパク質が多角体にどのように固定化されるかを観察する。

### 4. 研究成果

#### 1) 多角体タンパク質への変異の導入と多角体の溶解性の変化

野生型 (WT) の多角体では pH9.5 以上で溶解するのに対して、多角体タンパク質の N 末から 13 番目のアルギニン残基をアラニン (R13A) もしくはリジン (R13K) に置換することで、pH8.5 から溶解するようになった。この溶解性が変化した仕組みを X 線結晶解析で明らかにした。次に WT 多角体、R13A 多角体、R13K 多角体に EGFP を内包化した後、pH と EGFP の放出を調べたところ、WT 多角体では pH9 から 9.5 の所から EGFP の放出が見られたのに対して、R12A 多角体と R13K 多角体では pH8 から 8.5 の所から EGFP の放出が見られた。

#### 2) NGF 多角体による神経細胞の整列化

PC12 細胞は、神経成長因子 (NGF) に反応して増殖を停止し、神経突起を伸長させ、形態学的、また機能的に交感神経細胞様に分化する。このため、神経細胞における分化機構の解明や NGF の作用機構解明など、神経細胞のモデルとして広く使用されている。一方、生体内における NGF の反応は非常に微小な環境でおこる現象であり、培養条件下でそれを再現することは困難であった。そこで、カイコサイポウイルスが作り出す多角体という、高い安定性を持ったタンパク質微結晶に

着目した。この多角体に NGF のような液性因子を固定化することで、長時間、一定の濃度で局所的に細胞に供給することが出来れば、生体内の微小な環境でおこる NGF の反応を培養条件下で模倣し、PC12 細胞を取り巻く微小環境と神経細胞への分化を制御できるのではないかと考えた。

NGF 固定化多角体をコーゲンコートしたカバーガラスにスポットし、その上で PC12 細胞を培養した。すると、興味深いことに、PC12 細胞は多角体スポット周縁部に沿って軸索状の突起を伸ばし、互いに手をつなぐ様に付着し合い整列することが分かった。これは可溶性の NGF では見られなかった現象である。本研究では、NGF 固定化多角体を用いて、培養条件下で生体内の微小環境、すなわち細胞外マトリックスを模倣し、PC12 細胞の配列の空間制御を行い、方向性を持った神経分化を促すことで、神経再生や神経ネットワーク構築を目指した。この整列化した PC12 細胞において Neurofilament の発現が顕著に確認された。Tau protein はそれに比べると発現が弱かった。対照区として空多角体をスポットし、同様に培養した PC12 細胞ではどちらも検出されなかった。さらに、伸長した軸索の先端に見られる growthcone あるいは varicone 様の突起先端部でアクチン重合が起こっていることがわかった。また、GAP-43 の発現を確認できた。GAP-43 の発現は、異なる細胞から伸長した片方の突起先端部で強かった。

3) PC12 細胞の整列と分化の仕組み、軸索突起先端部間での連結部分の観察

ImageJ で多角体スポットエリアから整列した PC12 細胞までの EGFP の蛍光輝度値を測ったところ、多角体スポットの中心部から整列した細胞の外側に向かって、濃度勾配が形成されていることが分かった。また、軸索突起連結部分には突起先端から多数の微小な糸状構造物を伸ばして、互いに握手するように接触したり、樹状突起様の構造物と繋がっているように観察された。さらに、神経ネットワークが形成されているか調べたところ、微量ながら Synaptophysin の発現を確認することが出来た。また、Connexin36 の発現が確認されたことから、ギャップ結合の形成が確認された。

#### 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 1 1 件)

Otsuki, R., Yamamoto, M., Matsumoto, E., Iwamoto, S., Sezutsu, H., Suzui, M., Takaki, K., Wakabayashi, K., Mori, H.,

Kotani, E.

Bioengineered silkworms with butterfly cytotoxin-modified silk glands produce sericin cocoons with a utility for a new biomaterial.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 114, 6740-6745 (2017)

Abe, S., Ijiri, H., Negishi, H., Yamanaka, H., Sasaki, K., Hirata, K., Mori, H., Ueno, T. Design of enzyme-encapsulated protein containers by in vivo crystal engineering. Adv. Mater. 27, 7951-7956 (2015) DOI: 10.1002/adma.201503827

[学会発表](計 件)

[図書](計 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称: Delivery Method

発明者: 森 肇、松崎佑佳、Michael Jones  
権利者: 京都工芸繊維大学、Cell Guidance Systems

種類: 特許

番号: P103954GB01

出願年月日: 2017 年 4 月 13 日

国内外の別: 外国出願

○取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

森 肇 (Mori, Hajime)

京都工芸繊維大学・法人本部・副学長

研究者番号: 80201812

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

( )