

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008 年～2009 年
 課題番号：20750174
 研究課題名(和文)骨誘導モチーフを導入した絹フィブロインキメラタンパクの開発と骨再生材料への応用
 研究課題名(英文) Development of chimeric protein based on the silk fibroin and high calcium binding motifs for bone regeneration.
 研究代表者
 中澤 靖元 (NAKAZAWA YASUMOTO)
 東京農工大学・工学部・助教
 研究者番号：20456255

研究成果の概要(和文): 本研究課題では、絹フィブロインと BSP のキメラタンパク質材料を創製することで、新たな歯・骨再生材料に向けた材料の提案をすることを最終的な目標とし、BSP のカルシウム結合部位であるポリグルタミン酸と家蚕絹フィブロインの結晶部位である(AGSGAG)を組み合わせたモデルペプチドを合成し、種々の固体 NMR 法による、詳細な構造的知見を取得した。分子設計を NMR により得られた構造情報を基にした緻密な設計手法を取り入れたことで、優れた骨再生材料の基盤となる分子の提案を行うことができた。

研究成果の概要(英文):

For bone tissue engineering, we produced a new silk-like peptide, $E_n(AGSGAG)_m$. This model peptide consists of the crystalline region of the silk fibroin from *Bombyx mori*, (AGSGAG), and a poly-glutamic acid region to improve the water solubility and Ca^{2+} binding ability. In this study, we performed structural and functional analyses for the molecular design of biomaterials for bone regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：高分子・繊維材料

キーワード：絹フィブロイン・骨再生・核磁気共鳴法・キメラタンパク質

1. 研究開始当初の背景

事故等によって骨が欠損した場合、欠損部が幅 5mm 程度であれば、自己再生能により自然治癒が可能である。しかしながら、欠損部が大きい場合、移植が必要となる。骨欠損部の治療法として、患者自身の骨を用いる自家骨移植、他人の骨を用いる同種骨移植や金属・バイオセラミクス・高分子材料のバイオマテリアルを用いた組織工学的治療が行われている。通常、免疫反応が起きず、骨形成促進能がみられる自家骨や入手しやすさから同種骨の使用が検討される。しかし自家骨の場合、骨の採取量には限界があり、健康な部分にメスを入れるため患者の肉体的な負担は非常に大きく、また同種骨の場合、移植によるウィルス感染の恐れがある。そのため、自家骨や同種骨に代わる骨代替材料の開発が強く望まれている。

そこで本研究課題では、新規有機基盤材料の開発を目的として、コラーゲンに代わり、同じ構造タンパク質で、ポリ乳酸やコラーゲンと同等の生体適合性をもち、高強度として知られる家蚕絹フィブロインに着目した。天然の構造タンパク質の一つである絹フィブロインは、熱や圧力等の刺激に対して比較的高い安定性を示すため、オートクレーブ滅菌が可能で、上述のように様々な形状に加工が可能であることから、近年では、非繊維分野での新しい用途の開発が期待されている。

絹フィブロインで作製したスポンジの基礎的物性に関しては、申請者が所属する研究グループにおいて物理学的、生理学的評価を行っている。実験は絹フィブロインで作製したスポンジを用い、生体組織工学において要求される 3 次元多孔性足場材料としての有用性を検討するため、走査型電子顕微鏡での形態観察、力学強度測定など各種物性の評価を行った。圧縮強度の評価においては、絹水溶液から作製したスポンジの圧縮強度は HFIP に再溶解したスポンジの約 7 倍に達し、一方 HFIP 系はより高い弾性を示した。この値は他の生体吸収性合成高分子材料と匹敵する値であり、再生医療材料として十分な可能性を有していると考えられる。今後は、本材料を骨再生材料として最適化するため、絹フィブロインにカルシウム結合性を持たせることが必要であると考え、新たな絹フィブロインの開発を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究では、絹フィブロインの繰り返しモチーフに機能性配列を導入し、新たな骨再生用絹フィブロインの開発を行なう。

本研究の目的を達成するためには、家蚕絹フィブロイン自身の精密な構造情報が必要である。申請者の研究グループでは、これまでに、絹フィブロインの構造について、固体 NMR 法を用いた詳細な解析を行ってきた。その結果、絹フィブロインの繊維化前構造は“Type-II 型の繰り返し β -turn 構造”、繊維化後の構造はラメラ構造様の β -sheet 構造であることが明らかとなっている。

そこで本研究では、これらの構造情報を基盤とし、BSP のカルシウム結合部位であるポリグルタミン酸と家蚕絹フィブロインの結晶部位である (AGSGAG) を組み合わせたモデルペプチド、(AGSGAG)₄E₄ および (AGSGAG)₄E₈ を合成した。これらのペプチドについて、種々の部位特異的安定同位体ラベルペプチドにおいて、¹³C CP/MAS NMR 法、二次元スピン拡散 NMR 法等の固体 NMR 法を用い、徹底的な局所構造解析を行った。

3. 研究の方法

本研究において合成したモデルペプチドは表 1 の通りである。まず、Glu 領域の連鎖長の違いにおける構造変化を追跡するため、Glu 領域の異なるペプチドを Fmoc 固相合成法により合成した。ペプチド #1 ~ 5 に関しては Glu 領域の連鎖長を変化させたモデルペプチドであり、各々の構造を固体 NMR 法により評価した。また、局所的なアミノ酸残基の内部回転角を決定することが可能な二次元スピン拡散 NMR 法による解析を行うため、適宜安定同位体ラベルを施したペプチドも合成を行った。固体 NMR 装置は 400MHz の Chemagnetics 社製、Infinity 400 および Varian Inova 400 を用いて測定した。

表 1 合成した骨再生モデルペプチド

1: (E) ₄ (AGSGAG) ₄
2: (E) ₅ (AGSGAG) ₄
3: (E) ₆ (AGSGAG) ₄
4: (E) ₇ (AGSGAG) ₄
5: (E) ₈ (AGSGAG) ₄
6: (E) ₈ AGSGAGAGS[2- ¹³ C]GA [1- ¹³ C]G[1- ¹³ C] AGSG AG[3- ¹³ C]AGSGAG
7: (E) ₈ AGS [1- ¹³ C]G [1- ¹³ C] AGAGSGAG[3- ¹³ C]AGSGAGA[2- ¹³ C]GSGAG
8: (E) ₈ AGS[2- ¹³ C]G [3- ¹³ C]AGAGSGAGAGSGA[1- ¹³ C]G[1- ¹³ C] AGSGAG
9: (E) ₄ AGSGAGAGSGA [1- ¹³ C]G [1- ¹³ C]AGSGAG [3- ¹³ C]AGSGAG
10: (E) ₄ AGS [1- ¹³ C]G [1- ¹³ C]AGAGSGAG [3- ¹³ C]AGSGAGAGSGAG
11: (E) ₄ AGSG [3- ¹³ C]AGAGSGAGAGSGA [1- ¹³ C]G [1- ¹³ C]AGSGAG

4. 研究成果

本研究を進めるにあたり、家蚕絹フィブロイン結晶部位 (AGSGAG)₅ のみの固体 NMR 構造解析および水素結合に安定化エネルギーから、モデルペプチドの構造を導いた。その結

果、図1のように、ターン構造が2箇所存在する、「ラメラ構造」を示唆する確率が高いことが明らかとなった。

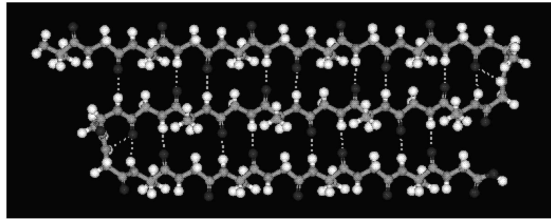


図1 家蚕絹フィブロイン結晶部モデルペプチド (AGSGAG)₅ の繊維化後の構造の一例

この構造情報を基に、表1に示したようなモデルペプチドを設計し、バイオマテリアルとしての応用を図った。

この配列はラメラ構造を形成する結晶部の末端に Glu 連鎖領域を配置している。Glu 残基は側鎖にカルボン酸を有しているため、カルシウムイオンとの結合促進が期待される。加えて本ペプチドは、pH をコントロールすることで、これまで絹フィブロインにおいて困難とされてきた水に対する溶解性を制御することも可能となった。医療材料という分野での絹フィブロインの利用を考えた場合、水溶液系での構造制御が可能となることは非常に有効である。

本ペプチドをバイオマテリアルとして応用する際、必要な構造情報は、スキャフォールドの骨格構造となりうる絹フィブロイン結晶領域および Glu 領域の微細構造である。Glu 領域と絹フィブロイン結晶領域のバランスによって、構造が異なることが十分に予想される。スキャフォールドとして最適な物性と機能の両者を有したデバイスを開発するために、固体 NMR 法は有益な情報を与える。

図2には Glu 領域の連鎖長を4から8まで変化させたモデルペプチドの ¹³C CP/MAS NMR スペクトルを示す。(Glu)₄ のペプチドの場合、16.7 ppm、51.1 ppm には非常にシャープなピーク成分が観測されており、これらはそれぞれ、Ala C β 、C β と帰属される。これらのピーク成分は Glu 領域の増加とともに、顕著な変化を示している。特に Ala C β ピークを見ると、(Glu)₅ から (Glu)₆ において顕著にブロード化し、低磁場側に新たな成分が認められる。(Glu)₆ における 16.7ppm のブロードな成分は、構造分布を有した β -turn 構造、すなわち「distorted β -turn 構造」である。また 19.2ppm 付近の成分は β -sheet 構造と帰属される。さらに、各々のペプチドにおける Glu 残基の構造も異なっていることがわかる。(Glu)₄ では Glu C β 、C β 共に非常にブロードなピークを与えている。化学シフト値は 27ppm 付近であり、Glu C β のランダムコイル値と一致する。しかしながら、Glu 残基の増加に伴

い、徐々に低磁場シフトを引き起こしており、(Glu)₇₋₈ では、 β -sheet 構造の化学シフト値を与えている。

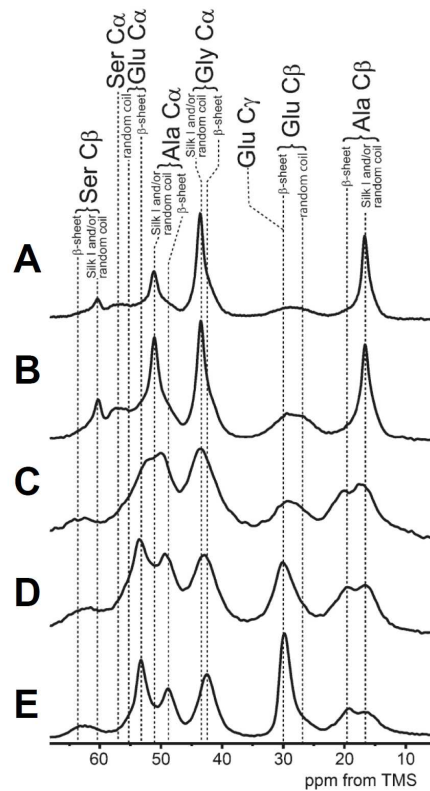


図2 骨再生モデルペプチドの ¹³C CP/MAS NMR スペクトル。(A) # 1 (B) # 2 (C) # 3 (D) # 4 (E) # 5 (番号は表1に対応))

以上の結果から、水溶性領域である Glu 連鎖領域が比較的少ないモデルペプチドにおいては絹フィブロイン結晶領域が秩序性の高い Silk I 型構造を形成し、Glu 領域は比較的自由度が高い領域でランダムコイルを形成していることが推測される。また、Glu 領域の連鎖長が長くなるにつれて β -turn 構造は崩れ、一部 β -sheet 構造へと転移することが本研究から明らかとなった。

これらの構造変化を詳細に検討するため、本研究では二次元スピン拡散 NMR 法による局所的な内部回転角の決定を行った。二次元スピン拡散法とは、*i* 番目と *i*+1 番目の2つの連続したアミノ酸残基のカルボニル炭素を安定同位体ラベルを施し、分子座標軸の間の相対的配向を相互作用テンソルの相対的配向の変化として NMR で観測することで、*i*+1 番目の残基の内部回転角 (ϕ , ψ) を決定する手法である。本研究では、(Glu)₄ と (Glu)₈ について、各々のペプチドの N 末端側、中央部、C 末端側の Ala 残基に着目し、局所構造について検討を行った。

図2において、Glu 領域の増加に伴い β -sheet 構造が増加することが明らかとなったが、(Glu)₈ のペプチド中に存在する Ala 残基には、

そのピークパターンに部位特異的な差異が確認された。図3にはノンラベルのスペクトルに加え、Ala¹²、Ala²⁰、Ala²⁶のC β 部位に安定同位体ラベルを施した¹³C CP/MAS NMR スペクトルを示した。

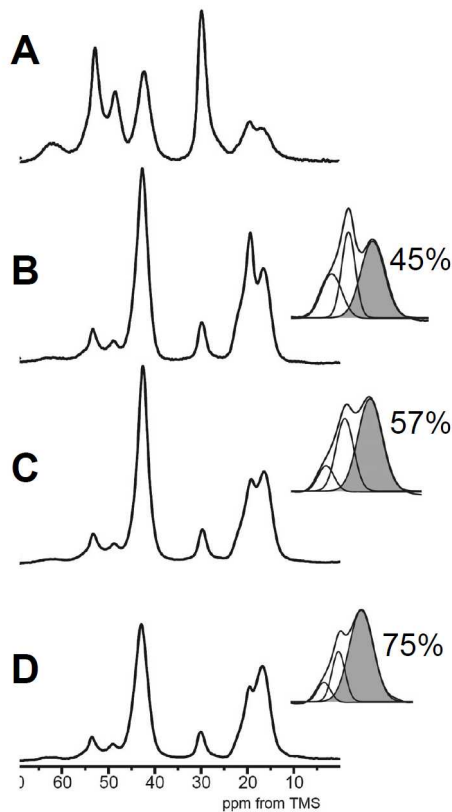


図3 骨再生モデルペプチドの¹³C CP/MAS NMR スペクトル(高磁場領域の拡大図)。 (A) #1 (B) #9 (C) #10 (D) #11 (番号は表1に対応)

この結果、AlaC β はN末端側のGlu領域に近い残基ほど β -sheet構造の成分が少なく、C末端側になるほど、その成分は増加しており、分子内で均一な構造を形成していないことが明らかとなった。Glu領域の増加により、絹フィブロイン骨格構造を乱し、不均一構造を増加させている。

一方、図4には、二次元スピン拡散NMR法によるスペクトルとシミュレーションを示した。

ここでは示していないが、¹³C CP/MAS NMR スペクトルにおいては、ノンラベルのペプチドとAla残基を部位特異的安定同位体ラベルしたペプチドにおいて、ピークパターンの変化はない。また、二次元スピン拡散NMRスペクトルにおいても、パターンに差異が見られないため、ペプチド鎖中において、おおむね均一なSilk I型構造を形成していることが明らかとなった。

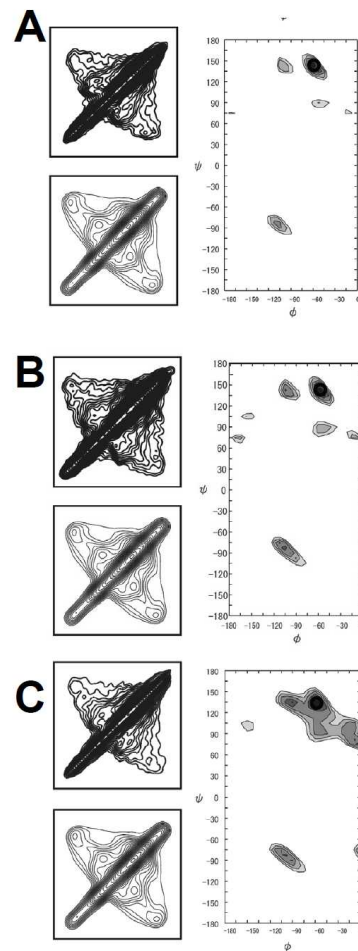


図4 骨再生モデルペプチドの二次元スピン拡散NMRスペクトル(A) [1-¹³C]G²²[1-¹³C]A²³ ペプチド#11, (B) [1-¹³C]G¹⁶[1-¹³C]A¹⁷ ペプチド#9, (C) [1-¹³C]G⁸[1-¹³C]A⁹ ペプチド#10

また、二次元スピン拡散NMRの実測スペクトルとシミュレーションスペクトルのRMSDによる角度の相関をラベル部位ごとに検討すると、ペプチド鎖中の全てのサイトにおいて、Alaの内部回転角は $(\phi, \psi) = (-60^\circ, 135^\circ)$ と決定された。この内部回転角は以前報告した(AG)₁₅におけるAla残基の内部回転角 $(\phi, \psi) = (-62^\circ, 125^\circ)$ と近似している。以上より、E₄(AGSGAG)₄の結晶部は、部位特異的な構造変化をしているわけではなく均一であり、Glu連鎖領域の影響を受けることなく骨格構造を形成することが可能であることが示唆された。

以上の様に、本研究課題では設計したモデルペプチドの構造を詳細に検討することができた。これらの構造情報を基盤とし、我々はバイオマテリアルへの応用を現在始めている。本研究課題で検討したものはモデルペプチドであるため、マテリアルとしての物性や機能を十分に果たすものではない。そこで、

本研究では引き続き、遺伝子工学的手法を用い、高分子量化した絹様タンパク質の発現・生産を開始している。

また、カルシウム結合性評価を行い、ポリグルタミン酸を絹フィブロインに導入してもカルシウム結合能を示すことを明らかにした。さらに生体材料としてフィルムやスポンジへの加工を容易にするために、トランスジェニックカイコ技術を利用する試みも行っている。

以上より、本研究課題では、絹フィブロインにポリグルタミン酸を導入することでカルシウム結合能を有する新規材料の創製を行い、骨形成を促す硬組織用生体材料としての可能性を示した。分子設計には、NMRにより得られた構造情報を基にした緻密な設計手法を取り入れ、今後、これまでにない優れた骨再生材料の提案が期待される。

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2件)

中澤靖元 「固体 NMR 法を用いた絹フィブロインの精密構造解析および生体材料への展開」高分子論文集 (2010) 印刷中 査読有り

Aya Nagano, Yuka Kikuchi, Hirohiko Sato, Yasumoto Nakazawa and Tetsuo Asakura; Structural Characterization of Silk-Based Water-Soluble Peptides (Glu)_n(Ala-Gly-Ser-Gly-Ala-Gly)₄ (n = 4-8) as a Mimic of *Bombyx mori* Silk Fibroin by ¹³C Solid-State NMR. *Macromolecules*, **42**, 8950-8958 (2009) 査読有り

[学会発表](計5件)

Yasumoto Nakazawa, Yumi Tanioka, Tetsuo Asakura 「Development of Silk Fibroin from *Bombyx mori* with High Calcium Binding Ability and Application to Regenerated Materials for Bone.」 Third International Conference on Mechanics of Biomaterials & Tissues (2009年12月13日・Clearwater Beach, Florida, USA)

Tetsuo Asakura, Chikako Tanaka, Yasumoto Nakazawa 「Structure of silk fibroins and application to biomaterials.」 NIMSWeek09(2009年6月22日・つくば国際会議場)

谷岡 由望, 中澤 靖元, 立松 謙一郎, 朝倉 哲郎「骨・歯再生へ向けた高機能化絹タンパクの開発と評価」

第 57 回高分子討論会

(2008年9月24日・大阪市立大学)

山口 恵理香, 中澤 靖元, 朝倉 哲郎「絹様タンパク質とモデルペプチドの固体 NMR 構造解析とその応用」 第 57 回高分子討論会

(2008年9月24日・大阪市立大学)

佐藤 博彦, 菊池 有加, 中澤 靖元, 朝倉 哲郎 「グルタミン酸連鎖を付与した新規絹様ペプチド、(E)_n(AGSGAG)_m の固体・溶液構造とバイオマテリアルへの応用指針」 第 57 回高分子学会年次大会 (2008年5月29日・パシフィコ横浜)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中澤 靖元 (NAKAZAWA YASUMOTO)

東京農工大学・工学部・助教

研究者番号：20456255

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし