

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650276

研究課題名(和文) 転写因子タンパク質を固定化した新規バイオマテリアルの構築

研究課題名(英文) Construction of a tissue-specific transcription factor-tethered extracellular matrix protein

研究代表者

三重 正和 (Mie, Masayasu)

東京工業大学・総合理工学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40334528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞分化を制御する組織特異的な転写因子タンパク質を、細胞接着を担う足場タンパク質に固定化した新規細胞外マテリアルの構築を目的とした。はじめに、神経組織特異的な転写因子であるOlig2タンパク質が細胞膜透過能を有することを示した。次に、細胞接着を担う足場タンパク質を遺伝子工学的に作製し、その細胞接着能を評価した。最後に、転写因子タンパク質をコイルドコイル構造を形成するヘリックスペプチドを介して足場タンパク質に固定化し、固定化した転写因子タンパク質が細胞内に導入され、細胞分化を誘導可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, a novel strategy for the construction of biomaterials is introduced by tethering a tissue-specific transcription factor protein to an artificial extracellular matrix (ECM) protein. Here, oligodendrocyte and motor neuron specific transcription factor Olig2 was tethered to an artificial ECM protein via coiled-coil helix formation. The artificial ECM, is comprised of an elastin-like peptide as a structural unit, as well as the AG73 peptide sequence derived from laminin and the C3 peptide sequence which binds to neural cell adhesion molecules (NCAMs) derived from the synthetic peptide library, for cell adhesion and enhance neurite outgrowth. As a proof of concept, tethered Olig2 was internalized into mouse embryonic carcinoma P19 cells and the ability to induce neural differentiation was investigated.

研究分野：組織工学

キーワード：転写因子 タンパク質導入 バイオマテリアル

1. 研究開始当初の背景

再生医療を目的とした組織工学の三要素として、細胞・細胞足場材料・細胞機能を制御するシグナル因子が挙げられ、様々なバイオマテリアルの構築が盛んに行われている。一般にバイオマテリアルの構築では、細胞足場材料にシグナル因子として成長因子を付加する方法が採られている。これは、これまでのバイオマテリアル構築の方法論が、生体の模倣に立脚していることに起因する。そのため、バイオマテリアルにおけるシグナル因子は、成長因子に限定されていた。しかしながら、成長因子のシグナルが、細胞分化を制御する組織特異的転写因子の発現等に収束することを鑑みると、組織特異的な転写因子タンパク質を細胞内に導入可能であれば、成長因子に代わり転写因子タンパク質が、新たなバイオマテリアル構築に利用できるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、細胞分化を制御する組織特異的な転写因子タンパク質を、細胞接着を担う足場タンパク質に固定化した新規細胞外マテリアルの構築を目的とした。Fig. 1 に本研究の概念図を示す。ここでは、組織特異的な転写因子タンパク質として、神経組織特異的な転写因子である Olig2 タンパク質を利用し、Olig2 タンパク質の細胞膜透過能、更には細胞内に導入された Olig2 タンパク質が細胞分化を誘導可能であるかを検討した。また、エラスチン由来ペプチド、神経細胞の接着を担うラミニン由来ペプチド、neural cell adhesion molecule (NCAM) 結合性ペプチドを遺伝子工学的に融合させた足場タンパク質を構築し、その機能を評価した。最後に、転写因子タンパク質を足場タンパク質に非共有結合により固定化するために導入した helix ペプチドの機能評価を行い、転写因子タンパク質を固定化した足場タンパク質の機能評価をおこなった。

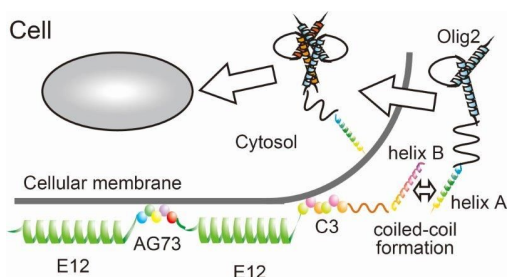


Fig. 1 本研究の概念図：helix ペプチド間に形成されるコイルドコイル構造を介して足場タンパク質に固定化した転写因子タンパク質 Olig2 は細胞内に導入された後、分化を誘導する。

3. 研究の方法

(1) Olig2 タンパク質導入による分化誘導

マウス脳組織由来 cDNA より Olig2 遺伝子をクローニングし、大腸菌内で発現させた。得られた Olig2 タンパク質を蛍光色素で修飾し、マウス由来 p19 細胞に添加し、レーザー共焦点顕微鏡によりタンパク質の細胞内導入を評価した。

次に、蛍光標識していない Olig2 タンパク質を細胞に添加し、細胞分化が誘導されるかを免疫蛍光染色により評価した。

また細胞足場タンパク質に固定化するためにヘリックスペプチドを導入した helixA-Olig2 タンパク質を構築し、同様の評価を行った。

(2) 足場タンパク質 EAEC の構築

足場タンパク質として、エラスチン由来 APGVGV ペプチドとラミニン由来 AG73 ペプチド、NCAM 結合能を有する C3 ペプチド、更には helixA-Olig2 タンパク質の helix A ペプチドとコイルドコイル構造を形成する helix B ペプチドを融合した EAEC-helixB タンパク質を遺伝子工学的に作製し、大腸菌に発現させた。精製した EAEC-helixB タンパク質は、細胞接着能の評価を行った後、helixA を融合した成長因子の固定化を行い、最後に helixA-Olig2 の固定化、および細胞分化誘導能を評価した。

4. 研究成果

(1) Olig2 タンパク質導入による分化誘導

一般に細胞へのタンパク質導入は困難である。しかしながら protein transduction domain (PTD) と呼ばれるペプチド配列を付加することにより、細胞内導入が可能になることが報告されている。そこで、本研究においても Olig2 タンパク質に PTD 配列を付加し、Olig2 タンパク質の導入を試みた。HIV ウイルス TAT 由来の PTD を Olig2 に融合した PTD-Olig2 と、PTD を融合していない Olig2 タンパク質を大腸菌内で発現させ、精製を行った。得られたタンパク質を蛍光標識した後、細胞に添加し、レーザー共焦点顕微鏡を用いて観察した。その結果、予想に反して PTD を付加していない Olig2 タンパク質を添加した細胞においても蛍光が観察され、Olig2 タンパク質の細胞内導入が確認された。この結果から、Olig2 タンパク質は、その配列内に独自の PTD を有することが示された。そこで、以降は Olig2 に PTD を付加することなく実験を行った。

次に、導入された Olig2 タンパク質により分化が誘導されるかを検討した。神経細胞への分化能を有するマウス胚性腫瘍細胞株で

ある p19 細胞に Olig2 タンパク質を添加し 5 日間培養を行った後、抗 チュープリン抗体を用いて、免疫蛍光染色を行った(Fig.2)。

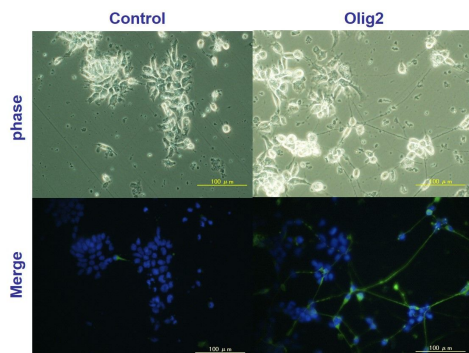


Fig.2 Olig2 タンパク質による分化誘導：Olig2 タンパク質を添加して 5 日間培養後、免疫染色を行った。Control; Olig2 タンパク質を添加せずに培養。緑： チュープリン、青：核

Olig2 タンパク質を加えていない control 細胞では、緑色の蛍光で示される チュープリンの発現は見られなかった。一方、Olig2 タンパク質を添加した細胞においては、神経突起が多数観察された。これらの結果から、細胞内に導入された Olig2 タンパク質が、神経細胞分化を誘導していることが示された。また、細胞足場タンパク質との固定化のためにペプチド配列を融合した helixA-Olig2 タンパク質においても、同様の結果が得られた。

(2) 足場タンパク質 EAEC の構築

足場タンパク質である EAEC は、足場タンパク質の基本骨格となるエラスチン由来 APGVGV 配列を 12 回繰り返し(E)と細胞接着、神経突起伸張の促進能を有することが報告されているラミニン由来 AG73(A)ペプチドと NCAM 結合ペプチドである C3(C)の融合タンパク質である。はじめに、この融合タンパク質の細胞接着能について検討した(Fig.3)。

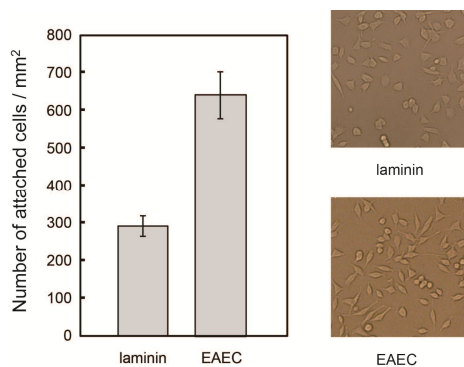


Fig.3 EAEC の細胞接着能：EAEC および laminin タンパク質を疎水性プレート上にコートし、細胞播種後、細胞数を計測。

その結果、構築した足場タンパク質 EAEC は、ラミニンよりも高い細胞接着能を有することが示された。

次に、EAEC タンパク質に Olig2 タンパク質を固定化するために、helix A ペプチドとコイルドコイル構造を形成する helix B ペプチドを融合した EAEC-helixB タンパク質を構築した。この EAEC-helixB タンパク質は、helixB を融合しても EAEC の細胞接着能を保持していた。そこで、EAEC-helixB がシグナル因子を固定化により提示可能であるかを helixA-FGF を利用し、PC12 細胞の神経様突起伸張を指標として検討した。その結果、EAEC-helixB は、コイルドコイル構造を介して FGF を固定化していること、さらに固定化された FGF の作用により突起伸張が促進されることが示された(Fig. 4)。

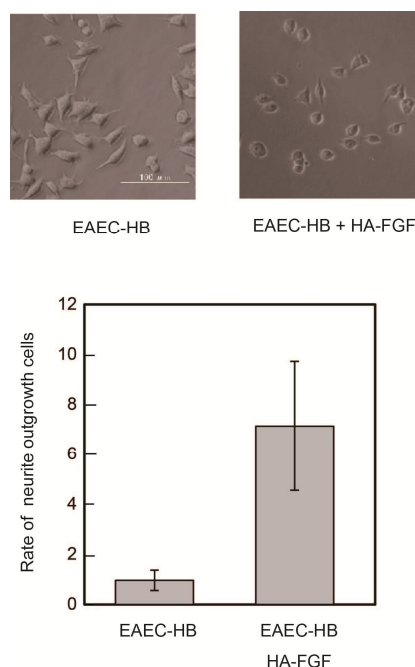


Fig.4 FGF 固定化足場上での神経様突起伸張誘導：EAEC-helixB(EAEC-HB)タンパク質で疎水性プレートをコートした後、helixA-FGF(HA-FGF)を添加し固定化。

これらの結果から、ヘリックスペプチドのコイルドコイル構造を介し、シグナル因子の EAEC 足場への固定化が可能であることが示された。そこで、最後に helixA-Olig2 固定化足場タンパク質上での分化誘導が可能であるかを検討した。FGF の固定化と同様に、EAEC-helixB タンパク質を疎水性プレート上にコートし、その後、helixA-Olig2 タンパク質を固定化し、細胞を培養した。培養後、Olig2 タンパク質による分化誘導評価と同様に免疫染色により、分化誘導能を評価した(Fig.5)。

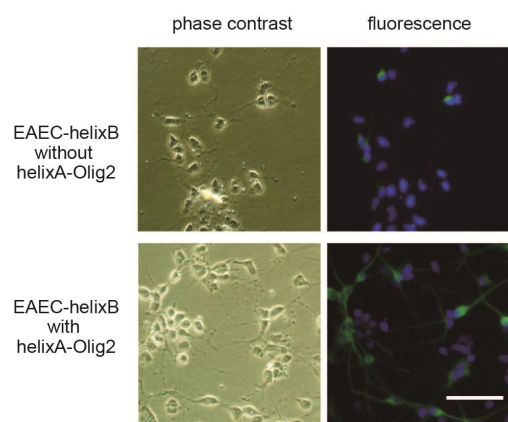


Fig.5 Olig2 タンパク質固定化 EAEC 上での分化誘導。

その結果、helixA-Olig2 タンパク質を固定化した EAEC 上において顕著な細胞分化の誘導が確認された。

以上、これらの結果より、細胞内導入能を有する組織特異的転写因子を固定化した細胞外マトリアルの構築が可能であることが示された。

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3件)

1: Mie M, Sasaki S, Kobatake E. Construction of a bFGF-tethered multi-functional extracellular matrix protein through coiled-coil structures for neurite outgrowth induction. *Biomed Mater.* 2014 9(1):015004. doi: 10.1088/1748-6041/9/1/015004. (査読有)

2: Assal Y, Mie M, Kobatake E. The promotion of angiogenesis by growth factors integrated with ECM proteins through coiled-coil structures. *Biomaterials.* 2013 34(13):3315-23. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.067. (査読有)

3: Mie M, Kaneko M, Henmi F, Kobatake E. Induction of motor neuron differentiation by transduction of Olig2 protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 427(3):531-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.09.090. (査読有)

[学会発表](計8件)

1: 水口佳紀・眞下泰正・三重正和・小島英理, 三次元組織構築を目的としたタンパク

質足場材料の開発, 日本化学会第 95 春季年会, 2015 年 3 月 26 日-29 日, 日本大学(千葉県船橋市)

2: 弘田裕介・三重正和・小島英理, 骨組織再生を目的とした新規細胞外マトリックスの構築, 第 36 回 日本バイオマテリアル学会大会, 2014 年 11 月 17 日-18 日, タワーホール船堀(東京都江戸川区)

3: 三重正和・金子真実・小島英理, 組織特異的転写因子タンパク質を固定化した新規細胞外マトリックスの構築, 第 36 回 日本バイオマテリアル学会大会, 2014 年 11 月 17 日-18 日, タワーホール船堀(東京都江戸川区)

4: 三重正和・橋本慎也・金子真実・小島英理, Transduction of Tissue-specific Transcription Factor Protein as a Tool for Tissue Engineering, 26th Annual Conference, European Society for Biomaterials, 2014 年 8 月 31 日- 9 月 3 日, BT Convention Center (Liverpool, 英国)

5: 小島英理・三重正和, Construction of Multifunctional Proteins by Integration of Scaffolds and Growth Factors, 26th Annual Conference, European Society for Biomaterials, 2014 年 8 月 31 日- 9 月 3 日, BT Convention Center (Liverpool, 英国)

6: 伯耆典子・三重正和・小島英理, 神経栄養因子 CNTF を提示した新規細胞外マトリックスタンパク質の構築, 日本化学会第 94 春季年会, 2014 年 3 月 27 日-30 日, 名古屋大学(愛知県名古屋市)

7: 水口佳紀・三重正和・小島英理, Triple helix を利用した新規細胞外マトリックスタンパク質の構築, 日本化学会第 94 春季年会, 2014 年 3 月 27 日-30 日, 名古屋大学(愛知県名古屋市)

8: 金載憲・三重正和・小島英理, 神経組織再生のための CNTF 融合 ECM の構築, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 3 月 22 日-25 日, 立命館大学(滋賀県草津市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

三重 正和 (MIE, Masayasu)

東京工業大学・大学院総合理工学研究科・准教授

研究者番号: 40334528