

平成 17 年 3 月 日

氏名

栗原宏征



21世紀COEプログラム

拠点：大学院工学系研究科

応用化学専攻、化学システム工学専攻、

化学生命工学専攻、マテリアル工学専攻

“化学を基盤とするヒューマンマテリアル創成”

平成16年度リサーチ・アシスタント報告書

ふりがな	くりはら ひろゆき	生 年 月 日
氏 名	栗原 宏征	
所属機関名	東京大学大学院 工学系研究科化学生命工学専攻	
所在地	東京都文京区本郷7-3-1	
申請時点での 学 年	博士3年	
研究題目	新規人工細胞外マトリクス作製手法の開発と機能評価	
指導教官の所属・氏名	東大院工・長棟輝行	

I 研究の成果 (1000 字程度)

(図表も含めて分かりやすく記入のこと)

本研究では、繰り返し DNA 配列を得る手法として Overlap elongation PCR を提案した。従来のライゲーション反応を用いた繰り返し DNA 調製法では、比較的長いオリゴヌクレオチドを出発材料として用意する必要があった。本手法を用いると、自分が望む繰り返しアミノ酸配列をコードするセンス鎖、そしてセンス鎖に対し数塩基だけ 5'側にずらしたアンチセンス鎖を用意し、PCR を行うだけで様々な長さの繰り返し DNA 鎖が作製可能である。本研究では Overlap elongation PCR を用いてエラスチン様配列、コラーゲン様配列、RGD リピート、機能性アミノ酸配列をタンデムに連結したリピート配列等をコードする繰り返し DNA 鎖を作製し、実際にこれらが*E. coli*発現系で生産可能であることを示した。タンパク質・ペプチドのデノボ設計を行う際、フォールディングフィールドが存在する様に、組換えタンパク質生産に関しても、ポリペプチド鎖の発現フィールドが存在するであろう。すなわち設計できる一次配列はほぼ無限であるが、宿主の発現可能な配列は非常に狭いと考えられる。本研究では、種々の繰り返し配列の発現に成功したが、一方で、繰り返し DNA 配列は作製できるが、*E. coli*での発現ができない配列も多く存在した。本手法は、繰り返し DNA 配列を容易に作製できることから、人工設計した繰り返しペプチド配列の生産を試験的に検討可能な手法であるといえる。

本研究では人工細胞外マトリクス分子の作製を目指し、RGD を含む繰り返しアミノ酸配列の設計を行った。繰り返し RGD 配列に関しては、RGD が 43 回繰り返したもので効率的に*E. coli*生産可能であることを示した。RGD43 は、幅広い細胞種に関し高い細胞接着活性を有していた。また RGD43 はその長い繰り返し RGD 配列により、組織化した構造を形成することを示した。このように、RGD43 は高い細胞接着能を有し、また水溶性が低い為、種々の細胞工学分野への利用が期待された。本研究では、プロテインシート、3次元ヒドロゲルを RGD43 を用いて作製し、その有用性を示した。また、RGD43 のマイクロスポットをスライドガラス上に作製することで、細胞マイクロアレイへの利用展開も示した。

さらにトランスグルタミナーゼ(MTG)架橋可能な人工細胞外マトリクス分子を設計した。MRQ12 は、マトリクスメタロプロテアーゼ切断配列、MTG 架橋化配列、そして RGD 配列を有しており、これらの配列を直列に連結し、繰り返した配列を有している。この分子は MTG 添加により、コラーゲン繊維束とほぼ同直径の繊維状構造体を形成することが示された。MTG の非常によい基質として知られるカゼイン分子に対し MTG を反応させても、このような沈殿物は形成されないことから、MRQ12 は非常によい基質として機能していることが考えられる。作製した MTG 架橋産物は架橋前に比べ細胞接着活性が 3 倍以上増加し、酵素応答的に接着活性制御可能な人工細胞外マトリクスであると言える。このような人工細胞外マトリクス分子はこれまで報告されておらず、今回が初めての報告である。この活性が増加した要因として MMP に対する分解にあると考察している。実際に MRQ12 を MMP で処理すると配列中の切断部位で切断されたペプチド断片が生成する。細胞接着には、安定な ECM 表面が必要であることが報告されており、細胞は MRQ12 上では安定な接着、伸展ができなかったためだと考えている。

II (1) 学術雑誌等に発表した論文A (掲載を決定されたものを含む.)

共著の場合、申請者の役割を記載すること。

(著者、題名、掲載誌名、年月、巻号、頁を記入)

Hirovuki Kurihara, Masashige Shinkai, Teruyuki Nagamune, 2004, Microbial expression of proteins containing long repetitive Arg-Gly-Asp cell adhesive motifs created by overlap elongation PCR. *Biochemistry Biophysics Research Communications* 321, 988-993.

Hirovuki Kurihara, Teruyuki Nagamune, 2004, DNA Polymerase-catalyzed Elongation of Repetitive Hexa-nucleotide Sequences: Application to Creation of Repetitive DNA Libraries. *Biotechnology Progress* 20. 1855-1860.

Hirovuki Kurihara, Masashige Shinkai, Teruyuki Nagamune, 2004, Protein polymers containing repetitive cell adhesive motifs RGD created by overlap elongation PCR. APPChE (Proceeding)

Hirovuki Kurihara, Tetsuaki Morita, Masashige Shinkai, Teruyuki Nagamune, 2005, Recombinant extracellular matrix-like proteins with repetitive elastin or collagen-like functional motifs. *Biotechnology Letters in press*.

Hirovuki Kurihara, Teruyuki Nagamune, 2005, Cell Behaviors on Artificially Designed Proteins Mimicing Extracellular Matrix Features: Cell-binding, Cross-linking and Biodegradation. *Biomacromolecules submitted*.

Hirovuki Kurihara, Teruyuki Nagamune 2005. Cell Adhesion Ability of Artificial Extracellular Matrix Proteins Containing a Long Repetitive RGD Sequence. *Journal of Bioscience and Bioengineering: Advances in Biomedical Science and Bioengineering submitted*.

Ⅱ（２）学会において申請者が口頭発表もしくはポスター発表した論文
（共同研究者（全員の氏名）、題名、発表した学会名、場所、年月を記載）

国内学会

栗原宏征、新海政重、長棟輝行 2004. 日本生物工学会（名古屋）
コラーゲン様プロテインポリマーのデノボ設計

栗原宏征、新海政重、長棟輝行 2004. 化学工学会秋田大会（秋田）
繰り返しアミノ酸配列を用いた人工細胞外マトリクスの設計および利用

新海政重、栗原宏征、長棟輝行 2004. バイオイメージング学会（京都）
繰り返しアミノ酸配列を使った人工細胞外マトリクスの設計

国際学会

Hiroyuki Kurihara, Masashige Shinkai, Teruyuki Nagamune 2004. APCChE (福岡)
Protein polymers containing repetitive cell adhesive motifs RGD created by overlap
elongation PCR. (Oral presentation)