

論文内容の要旨

新規人工細胞外マトリクス作製技術開発と機能評価

栗原 宏征

1. 緒言

細胞外マトリクス (Extracellular matrix, ECM) は、細胞間に存在する繊維状タンパク質の総称であり、細胞の支持体として機能している。接着依存性細胞は、ECM のアミノ酸配列情報をインテグリンと呼ばれる膜受容体により認識し、この ECM 上に接着することで初めて生存・増殖が可能となる。インテグリンはリガンド存在下で α/β のヘテロ 2 量体を形成し、種々の G タンパク質を活性化し細胞骨格の再構成、細胞周期の活性化を促進する。このインテグリンのリガンド分子として初めて同定されたのが Arg-Gly-Asp (RGD) モチーフと呼ばれるトリペプチド配列である。RGD モチーフは、この短いペプチド配列のみでインテグリンと相互作用することから、種々の細胞親和性材料に頻繁に導入されている配列である。近年、遺伝子工学的手法により RGD モチーフを人為的に導入した組み換えタンパク質の研究が多くなされており、コラーゲン等に代わる人工 ECM 分子としての利用が検討されている。例えば、絹糸タンパク質やエラスチンなどの天然タンパク質に見られる繰り返し構造モチーフを人工設計し、そこに RGD モチーフを導入することで、構造・機能を併せ持つ全く新しいプロテインポリマーの設計が報告されている。本論文では、このようなプロテインポリマーの鋳型となる繰り返し DNA 配列を手軽に作製する新規手法を提案した。また、本手法を用い RGD モチーフを含む繰り返し配列を組み換えタンパク質として大腸菌にて生産し、その人工細胞外マトリクス分子としての機能を評価した。

2 新規繰り返し DNA 配列作製手法の開発

2-1 伸長機構

プロテインポリマーを設計する際、微生物発現の鋳型となる繰り返し DNA が必要となる。従来、繰り返し DNA はモノマー DNA 分子の Head-to-tail ライゲーション法により作製されていた (Fig. 1A)。しかしながら、ライゲーション反応は、反応効率が低く、非常に繰り返しモノマー DNA を必要とする。そこで、DNA ポリメラーゼを用いたライゲーション反応を提案した (Fig. 1B)。まず、任意のアミノ酸配列をコードする塩基配列の 2 回繰り返し DNA 配列を用意し、増幅鋳型が存在しない条件下で PCR 反応を行う。モノマー DNA 分子は、2 回任意の同じ配列が繰り返されているため、5' 側にずれた形で二本鎖 DNA を形成可能である。形成した 5' 突出末端 DNA 分子は、DNA ポリメラーゼによる伸長反応により、5' 末端が補完され、繰り返し DNA 配列が伸長した平滑末端 DNA が生成する。さらに、この反応が繰り返されることにより、種々の長さを有する繰り返し DNA ライブラリーが作製される。この PCR 反応を Overlap Elongation PCR と名付けた。

2-2 モデル実験-ヘキサヌクレオチドの伸長

種々の GC 含量を有する任意のヘキサヌクレオチド配列を設計

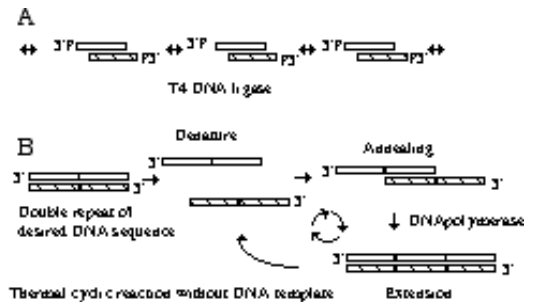


Fig. 1 Preparation repetitive DNA templates for microbial expression. Conventional head-to-tail ligation method by T4 DNA ligase (A), and PCR mediated ligation method proposed in this study, namely overlap elongation PCR (B).

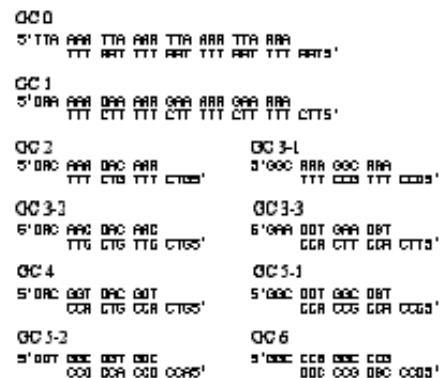


Fig. 2 Summary of model repetitive duplexes used in this study. Names were assigned to the model duplexes based upon the number of GC residues within their hexa-nucleotide sequences.

し、これを2回繰り返したモノマーDNAを用意した(Fig. 2)。これらのDNA分子を鋳型の存在しない条件下でPCR反応を行った結果、GC含量が多いモノマー配列(GC5, GC6)に関しては伸長産物の蓄積がほとんど見られなかったが、それ以外幅広いサイズ長のDNA産物が蓄積することが示された(Fig. 3A)。これらのDNA産物の塩基配列を解析したところ、モノマーDNA配列が繰り返された産物であることが明らかとなった(データ不掲載)。また、5'リン酸化したモノマーDNA分子(ポリグルタミン酸をコードするヘキサヌクレオチド)のライゲーション反応と、本手法によって得られる産物を比較したところ、本手法では、少ないモノマー濃度で、非常に長いDNA産物(10kbp以上)が得られることが示された(Fig. 3B)。

2-2 Overlap elongation PCR 変法

任意の塩基配列の2回繰り返しDNAでは、作製したいアミノ酸配列が長くなったとき、結果として長いモノマーDNA分子を必要とする。この点を改善するためにOverlap Elongation PCRのための新しいヌクレオチド設計を提案した。プライマーダイマーは増幅鋳型が存在しないとき非常に形成しやすく、5'末端1塩基の相補性でダイマー由来産物が蓄積することが知られている。Overlap Elongation PCRに関しても一種のプライマーダイマー形成反応が繰り返り起きることにより伸長産物が蓄積しているものと言える。そこで、伸長可能な二本鎖DNAを形成に参与する相補配列部位を短くすることができないか検討した。例えばVPGVGの繰り返し配列を作製するために、センス鎖としてVPGVGをコードするヌクレオチドを用意する。それに対しアンチセンス鎖はVPGをコードする配列分だけ5'側にずらした形で設計する。この2本のヌクレオチドを用いPCRを行うことで、VPGをコードする5' GTTCCGGGTの部位が二本鎖形成の起点となり、繰り返しDNA配列の伸長が可能になると考えた(Fig. 4A)。実際、このヌクレオチド設計でもPCRを行うことで伸長産物が生成可能であることが確認された(Fig. 4B)。これにより、長いモノマーDNA配列に関しても、望んだDNA配列+数塩基という短いヌクレオチドを初発のモノマー分子として繰り返しDNAライブラリー作製を可能とした。

3 RGD ポリマーの大腸菌生産、機能評価

これまで、人工細胞外マトリクスとしての利用を目指し、絹糸構造モチーフ配列GAGAGSとRGD配列を交互に導入した組み換えタンパク質が大腸菌にて作製されており、優れた細胞接着基質として機能することが報告されている。またRGDモチーフをタンデムに繰り返したポリマーは、ペプチド合成手法により作製されており(平均分子量10kDa)、腫瘍転移抑制物質として機能することが報告されている。しかしながら、人工の細胞外マトリクス分子としては評価しておらず、また組み換えタンパク質としての生産も検討されていない。そこで本手法を用いRGDポリマーの組み換えタンパク質として設計し、その人工細胞外マトリクス分子としての機能を評価した。

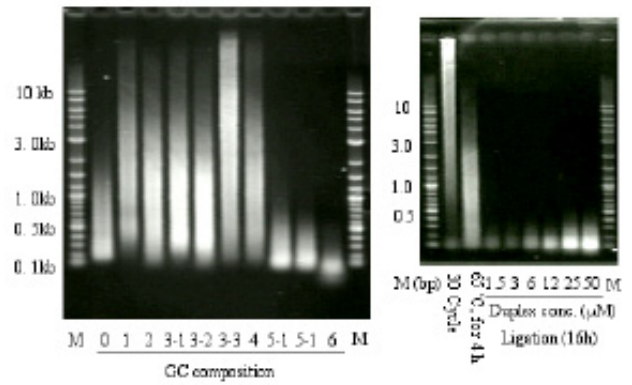


Fig. 3 Thermal cyclic extension of model repetitive duplexes(A). Elongation efficiencies of the poly-glutamate-encoding short duplex by the thermal cyclic reaction, isothermal expansion, and the T4 ligase-catalyzed ligation method (B). The starting duplex concentration for the isothermal or thermal cyclic reaction mixtures was 1 μM. For the ligation reaction, 15 to 50 μM starting duplex was used.

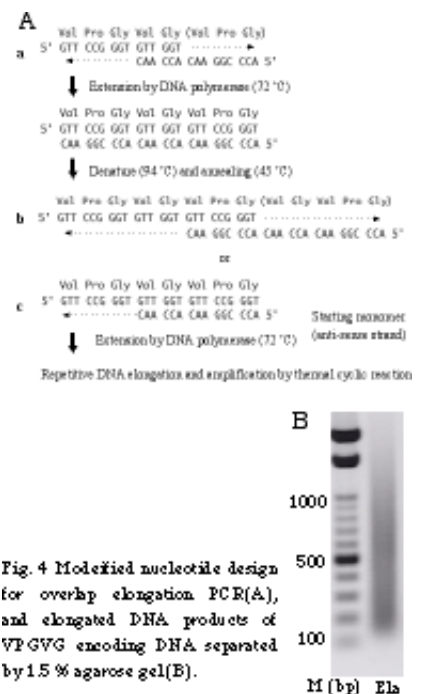


Fig. 4 Modified nucleotide design for overlap elongation PCR(A), and elongated DNA products of VPGVG encoding DNA separated by 1.5% agarose gel(B).

3-1 RGD ポリマーの大腸菌での発現

RGD ポリマーの鋳型となる繰り返し DNA 配列を Overlap elongation PCR 法にて作製した。RGD をコードする 2 回繰り返し DNA (18-bp) を出発 DNA モノマーとして調製し、PCR を行った。その結果、サイクル数の増加に伴って、伸長産物が蓄積することが明らかとなった (Fig. 4A)。また、得られた DNA 産物を PAGE にて分離したところ、9bp 間隔のラダーが確認された (Fig. 4B)。すなわち、PCR 反応により、RGD をコードする DNA 部位が 5' 側にずれ、DNA ポリメラーゼによって補完されることで、繰り返し DNA 配列の伸長、蓄積が起きていることを示している。この反応により得られた DNA ライブラリーから、RGD を 21 回、43 回コードする DNA を単離し、大腸菌にて発現を行った。その結果、チオレドキシシン融合タンパク質として大腸菌にて発現可能であることが示された (Fig. 4C)。RGD の 43 回繰り返しは分子量 14kDa であり、先に報告されている合成 RGD ポリマー (約 10kDa) より大きな分子サイズのポリマーに関しても大腸菌発現系にて生産可能であることが示された。

3-2 RGD ポリマーの高次構造

大腸菌にて得られたチオレドキシシン融合タンパク質を変性条件下金属アプティ精製した後、透析を行ったところ、RGD43 は水溶液中で繊維状の沈殿を形成することが明らかとなった。組み換えタンパク質の水溶解性は、チオレドキシシン (TRX)、RGD2 (TRX+RGD 2 回) で 10mg/mL 以上、RGD21 で 2.5mg/mL であるのに対し、RGD43 は約 100 μ g しか溶解しない。そこで、RGD のアルギニン をイソロイシンに置換した IGD の繰り返し配列も同様に作製し、チオレドキシシン融合タンパク質として発現したが、IGD の 44 回繰り返しを有するチオレドキシシンの水溶性は 5mg/mL 以上あった (データ不掲載)。このことから、RGD43 分子はアルギニンとアスパラギン酸残基の静電相互作用にて組織化した超高次構造を形成していることが示唆された。これまでに、(RADA) をモノマー配列とする繰り返しペプチド (4 回繰り返し) が有機合成にて作製されており、自己組織化した繊維状構造体を形成することが報告されている。これらの RGD 組み換えタンパク質の CD スペクトルを測定したところ、RGD43 分子に関して特に、ランダムコイル、 β シート構造が増加していることが示された (Fig. 5)。さらに RGD43 沈殿物を SEM にて観察したところ、数十から数百ナノメートル径の繊維からなる枝分かれした超高次構造を形成していることが明らかとなった (Fig. 6)。

これら RGD43 分子はアルギニンとアスパラギン酸残基の静電相互作用にて組織化した超高次構造を形成していることが示唆された。これまでに、(RADA) をモノマー配列とする繰り返しペプチド (4 回繰り返し) が有機合成にて作製されており、自己組織化した繊維状構造体を形成することが報告されている。これらの RGD 組み換えタンパク質の CD スペクトルを測定したところ、RGD43 分子に関して特に、ランダムコイル、 β シート構造が増加していることが示された (Fig. 5)。さらに RGD43 沈殿物を SEM にて観察したところ、数十から数百ナノメートル径の繊維からなる枝分かれした超高次構造を形成していることが明らかとなった (Fig. 6)。

これらのタンパク質の細胞外基質としての機能を評価するために精製した TRX、RGD2、RGD21、RGD43 をポリスチレンプレートに吸着させ、マウス繊維芽細胞 (NIH3T3) を無血清条件下で培養した。TRX をコートしたプレートでは、TRX 中にインテグリンリガ

3-3 RGD ポリマーの細胞接着性の評価

これらのタンパク質の細胞外基質としての機能を評価するために精製した TRX、RGD2、RGD21、RGD43 をポリスチレンプレートに吸着させ、マウス繊維芽細胞 (NIH3T3) を無血清条件下で培養した。TRX をコートしたプレートでは、TRX 中にインテグリンリガ

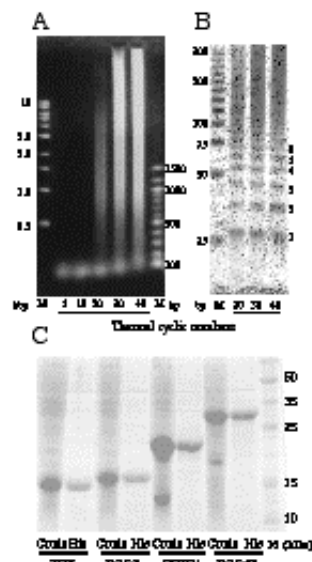


Fig. 4 Elongated DNA products separated in an agarose gel (A) and a non-denatured acrylamide gel (B). SDS-PAGE of expressed and His-tag-purified proteins (C). The samples designated crude and His are the whole cell extract and the protein purified by the His-tag/metal affinity resin, respectively (C).

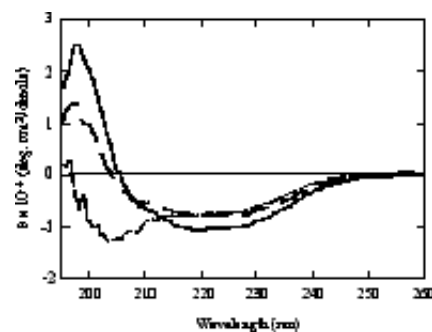


Fig. 5 Far-UV circular dichroism spectra analysis of recombinant proteins, RGD 2 (—), RGD 21 (---) and RGD 43 (· · ·) in water. The conditions were 2 nm bandwidth, 1 s averaging times, and ten scans over a wavelength range of 190–260 nm at room temperature.

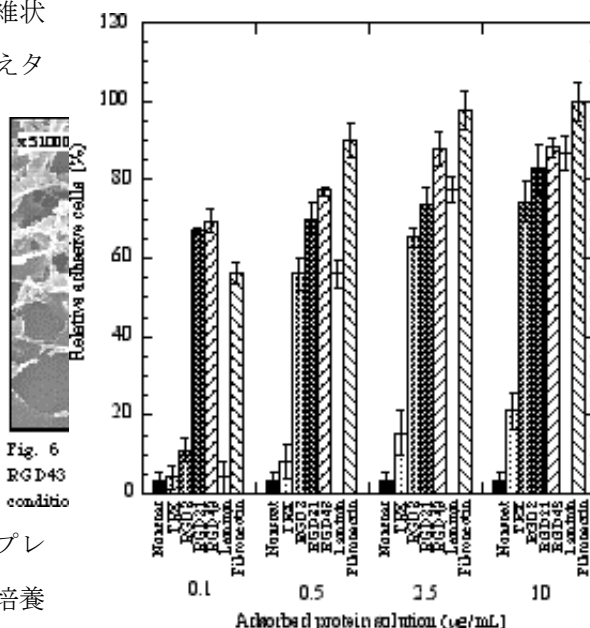


Fig. 6 RGD43 condition

Fig. 7 Relative cell adhesion after 3 hours incubation on RGD recombinant proteins and natural ECMs, fibronectin and laminin coating plates. Each protein solution was adsorbed on polystyrene plate and fibroblast NIH3T3 cells (5×10^4 cells/well) were seeded and incubated for 3h. Relative cell adhesive cells number was estimated as the standard of that on fibronectin at 10 μ g/mL.

ンドを含まないため細胞はほとんど接着せず、その多くは浮遊状態で存在していた。一方、RGD を含む組み換えタンパク質では、すべての RGD を含む組み換えタンパク質 (RGD2, RGD21, RGD43) に関して、有意な細胞接着性が認められた (Fig. 7)。特に低濃度条件下における RGD43 および RGD21 の細胞接着能は非常に優れており、ウシ血清由来フィブロネクチンよりも優れた細胞接着能を有することが示された (Fig. 7)。また、他の細胞株 (PC12, HEK293 等) に関しても RGD43 は優れた細胞接着性を示した (データ不掲載)。RGD43 上に接着・伸展している細胞を固定化し、アクチン、ビンキュリン抗体にて染色したところ、ストレスファイバー (Fig. 8A)、接着斑 (Fig. 8B) の形成が確認された。このことから、細胞はインテグリンを介したシグナル活性化により細胞骨格の再構成を行い、RGD ポリマーに接着していることが示された。

3-4 RGD43 プロテインシートの作製

RGD43 は非常に高い細胞接着能を有し、かつユニークな繊維状構造を形成する。しかしながら、RGD43 を繊維上沈殿のまま用いると、細胞はプレート上に不均一に接着し、また沈殿密度の高いところには比較的接着細胞数が少ないといった現象が見られた (Fig. 9A)。そこで、RGD43 を有機溶媒 (HFIP) に可溶化し、ガラスプレート上で乾固することにより、RGD43 プロテインシートを作製した (Fig. 9C)。このシート上で神経芽細胞 PC12 を無血清培養したところ、非常に均一にシート上に接着・伸展した (Fig. 9B)。また、このプロテインシートは 24 時間培養後もフィルム状の性状を保っており、種々の細胞工学への利用が期待される。SEM 観察の結果、このプロテインシートは多孔性の構造を有しており、RGD43 繊維状沈殿の構造とは大きく異なっていることが示された (Fig. 9 C)。

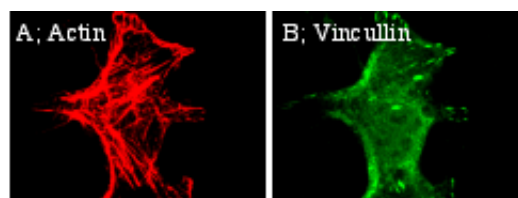


Fig. 8 Actin and focal contacts observation in adhered cells on RGD43. The fixed cells after 3h incubation on RGD43 were stained by rhodamine-phalloidin (A, Red). Focal contacts in the cells were detected by the immunoblotting by the vincullin anti-body, and detected by FITC-labeled mouse IgG anti-body (B, Green).

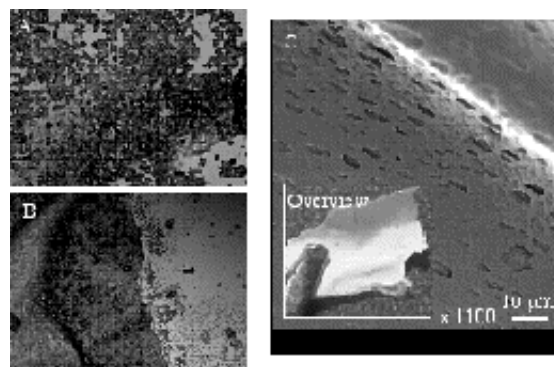


Fig. 9 PC12 cells adhered on RGD43 fibrous scaffold (A) and the protein sheet (B) under serum-free condition. SEM image of RGD43 protein sheet (C).