

論文内容要旨

Structure and function of engineered
stromal cell-derived factor-1 α

(遺伝子組み換え技術により改変された
SDF-1 α の構造と機能)

Dental Materials Journal, 2023, in press.

主指導教員：谷本 幸太郎教授

(医系科学研究科 歯科矯正学)

副指導教員：加藤 功一教授

(医系科学研究科 生体材料学)

副指導教員：太田 耕司教授

(医系科学研究科 公衆口腔保健学)

阿部 文香

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

【緒言】

口蓋裂のような骨欠損を伴う疾患の治療を目的として、組織工学に基づく新たな治療法に関する研究が盛んに行われている。そのような組織工学的アプローチにおける重要な要素の一つは、新生組織形成のための空間を維持しながら細胞に適切な微小環境を提供する生体分解性足場材料である。近年、足場材料内に播種あるいは浸潤する細胞の挙動を生物学的に制御することの重要性が認識されるようになり、機能性タンパク質を組込んだ足場材料の設計に注目が集まっている。

所属研究グループでは、骨形成促進を目的として、細胞成長因子やケモカインを組込んだコラーゲン製足場材料に関する研究を進めてきた。その一環で、細胞遊走促進作用を有する stromal cell-derived factor 1 α (SDF) とコラーゲン結合性を有する von Willebrand 因子 A3 ドメイン (CBD) を融合させたキメラタンパク質の有用性について評価している。本研究では、この SDF と CBD からなるキメラタンパク質に焦点を当て、優れた性能を有するキメラタンパク質の設計指針を得ることを目的として、ドメイン間の融合が双方の立体構造及び機能発現に及ぼす影響について調査した。

【実験】

融合順序の異なる 2 種類のキメラタンパク質 (SDF-CBD 及び CBD-SDF) を大腸菌の遺伝子組換えにより作製した。また、コントロールとして SDF 及び CBD のみからなるポリペプチドも作製した。各々のタンパク質を大腸菌から変性状態で回収し、その後、段階的透析法によりリフォールディングさせた。

キメラタンパク質の純度及び分子サイズの分析はドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により行った。タンパク質に含まれる二次構造は円二色性分光分析 (CD 分析) により行った。また、AlphaFold 2 プログラムを用いてタンパク質の立体構造を予測した。最適予測構造と既報の立体構造データを比較するため、主鎖原子のずれを基に平均二乗偏差 (RMSD) を算出した。

キメラタンパク質の機能評価に関して、SDF 受容体である CXCR4 を発現するヒト間葉系幹細胞 (hMSC) を用いて、Boyden チャンバー法により細胞遊走アッセイを行い、SDF ドメインの機能を評価した。一方、コラーゲンコート表面へのキメラタンパク質の結合量を BCA 法を用いて調べることで CBD ドメインの機能を評価した。

【結果と考察】

SDS-PAGE の結果、キメラタンパク質 (SDF-CBD、CBD-SDF) 及びコントロールタンパク質 (SDF、CBD) のいずれも明瞭な単一バンドに分離され、それらの移動度は分子量から予測される値に一致した。このように 4 種類のタンパク質試料を目的通りに取得できた。

CD 分析の結果、SDF-CBD 及び CBD-SDF の CD スペクトルは波形が類似していた。SDF と CBD の等モル混合物の測定結果と比較して、キメラタンパク質のスペクトルでは、SDF 中の

α ヘリックスに由来する 205 nm 付近の負のコットン効果が小さかった。このことから、両キメラタンパク質では SDF ドメイン構造の変性が示唆されたが、ドメインの融合順序の影響は小さいものと考えられた。

一方、AlphaFold2 による構造予測では、キメラタンパク質を構成する SDF 及び CBD の最適予測構造と既報の立体構造との間の RMSD はいずれも 1.0 以下と小さかった。この結果から、SDF 及び CBD の融合及びその順序は、キメラタンパク質中での立体構造に大きな影響を及ぼさないことが示唆された。この結果は、CD 分析で α ヘリックスの変性が示唆された点と矛盾する。これは、複数のドメインからなるタンパク質の構造予測アルゴリズムに改良の余地があることに起因すると思われる。

細胞遊走アッセイでは、SDF-CBD 及び CBD-SDF のいずれも細胞遊走を同程度に促進したが、その効果はコントロール SDF と比較して有意に小さかった。これは、ドメインの融合によって SDF-CXCR4 結合を介した機能が低下したことを示しており、上述の構造変性と関連があると思われる。

CBD に基づくコラーゲン結合性は、SDF-CBD とコントロール CBD で同程度であった。一方、CBD-SDF では顕著に低下した。上記の CD 分析や立体構造予測では CBD の構造変化を示唆する情報が得られなかったことから、観測されたコラーゲン結合性の低下は、融合 SDF の存在に基づく立体障害によるものと考えられる。

【結論】

SDF と CBD の融合は、SDF の構造変化を通して細胞遊走促進作用の低下を招くが、融合順に因らずある程度の促進効果を期待することができる。一方、コラーゲン結合性は、融合順序の影響を受け、CBD の N 末端に SDF を連結する方が望ましい。