

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 歯学 ）	氏名	阿部 文香
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項 2 項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主 査 教授 吾郷 由希夫 印			
審査委員 教授 宮内 睦美			
審査委員 教授 加治屋 幹人			
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>【目的】 近年，口蓋裂や歯周病などを始めとした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技術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いて，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，生物学的機能を有するタンパク質を組み込んだ足場材料の設計に注目が集まっている。申請者らの所属研究グループは，骨形成の促進を目的として，細胞成長因子やケモカインを組み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。その一環として，細胞遊走促進作用を有する stromal cell-derived factor-1α (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検討した。</p> <p>【方法】 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) を大腸菌を用いた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 のみからなるタンパク質も作製した。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) により評価した。また，AlphaFold2 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。キメラタンパク質に含まれる SDF ドメインの機能を評価するため，SDF 受容体である CXCR4 を発現するヒト間葉系幹細胞を用いて，Boyden チャンバー法による細胞遊走アッセイを行った。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 法を用いて解析し，CBD ドメインの機能を評価した。</p> <p>【結果と考察】 SDS-PAGE の結果より，4 種類のタンパク質は明瞭な単一のバンドとして分離され，それらの移動度は分子量から予測される移動度に一致していたことから，目的通りの試料が得られたものと判断された。CD 分析においては，融合順序の異なる 2 つのキメラタンパク質が波形の類似したスペクトルを示したことから，ドメインの融合順序が構造に与える影響は小さいものと考えられた。しかしながら，205 nm 付近における負のコットン効果が小さくなったことから，SDF ドメイン構造の変性が示唆された。一方，AlphaFold2 による立体構造予測では，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 RMSD はいず</p>			

れも 1.0 Å 前後と小さかった。このことから、ドメインの融合やその順序は、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。本結果は、CD 分析で α ヘリックスの変性が示唆された点と矛盾している。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可能性を示すものと考えられるが、タンパク質のリフォールディング条件をさらに最適化して検討する必要性も示唆する。

次に、機能面での評価において、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である SDF と比較すると減弱していた。これは、ドメインの融合により SDF-CXCR4 結合を介した機能が低下したことを示し、上記の構造変化と関連があると考えられた。また、CBD に基づくコラーゲン結合性アッセイは、SDF-CBD と CBD は同程度の結合性を示したが、CBD-SDF ではコラーゲン結合性が顕著に低下していた。上記の CD 分析や構造予測では、CBD ドメインの変性の存在を示す直接的なデータが得られなかったことから、この結合性の低下は SDF ドメインが近傍に存在することにに基づく立体障害による可能性が考えられた。

以上の結果より、SDF と CBD の融合は SDF の構造変化によりその機能の低下を引き起こすが、融合順序によらずある程度の促進効果は期待することができると考えられる。一方、コラーゲン結合性は融合順序の影響を受けたため、CBD の N 末端に SDF を融合することが望ましいといったキメラタンパク質の設計指針を得ることができた。

これらの研究成果は、歯科矯正学や生体材料学をはじめ歯科医学分野の発展に寄与する新知見であると高く評価される。

よって審査委員会全員は、本論文が阿部文香に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値を有するものと認めた。