

高い細胞接着活性を有する絹様材料の NMR 構造解析

(¹農工大院・工, ²防衛大・応化, ³北大・先端生命科学院)

○¹吉田 愛, ^{1,2}田中 千香子, ³神谷 昌克, ³出村 誠, ¹朝倉 哲郎

NMR analysis of silk-like materials containing the cell adhesive sequence

¹Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology

²Department of Applied Chemistry, National Defense Academy

³Graduate School of Advanced Life Science, Hokkaido University

○ ¹Ai Yoshida, ^{1,2}Chikako Tanaka, ³Masakatsu Kamiya, ³Makoto Demura, ¹Tetsuo Asakura

Silk-like proteins which consist of alternative sequences of main sequences from *Bombyx mori* silk fibroin and the sequence TGRGDSPA in fibronectin with high cell adhesion ability were produced by *E.coli*. The cell adhesive ability of this protein was higher than those of only silk fibroin or fibroin plus RGD mixture. In order to clarify the origin, both the solid state NMR analysis of the ¹³C selectively labeled model peptides containing both silk fibroin sequences and TGRGDSPA, and solution NMR analyses of ¹³C, ¹⁵N-uniform labeled silk-like proteins and only ¹³C, ¹⁵N-uniform labeled (TGRGDSPA)₈ were performed.

[緒言]

絹フィブロインは機械的強度や生体適合性に優れ、高い形状加工性を持つため、骨や歯等の硬組織の再生医療材料として有力である。

我々は、このように優れた絹フィブロインの細胞接着性を一層向上させるために、フィブロネクチンの細胞接着配列である RGD を含む連鎖 TGRGDSPA を絹の一次構造中に含む絹様タンパク質と、比較用に TGRGDSPA の繰り返し

し配列のみから成る組換えタンパク質を作成した。骨芽細胞および歯髄細胞を用いた細胞接着活性の評価を行ったところ、絹様タンパク質が格段に高い細胞活性を示した (Figure.1)。絹様タンパク質のこのような高機能発現の原因を解明するために、絹の連鎖と RGD を含む ¹³C ラベルモデルペプチドを合成し、¹³C CP/MAS 測定による固体構造解析を行うとともに、安定同位体標識された絹様タンパク質を作成し、溶液 NMR 測定による構造とダイナミクス解析を行った。

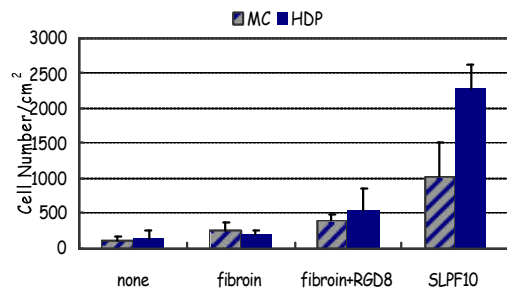


Figure 1. Adhesive experiments of MC3T3-E1 cells and HDP cells on three kinds of silk-based films by 2 hours cultivation.

NMR structure analysis/ RGD sequence/ cell adhesion ability/ silk-like materials

よしだ あい / たなか ちかこ / かみや まさかつ / でむら まこと / あさくら てつお

[実験]

1. モデルペプチドの合成と固体 ^{13}C CP/MAS NMR 測定

Table.1 のペプチド(b)~(f)を F-moc 固相法にて合成を行った。

Table 1. Several model peptides synthesized by solid-phase method for ^{13}C CP/MAS NMR experiments.

samples	
(a) (AG) ₁₅	<i>B.mori</i> silk fibroin
(b) (AG) ₃ [β - ^{13}C]AG(AG) ₃ AST[2- ^{13}C]GR[1- ^{13}C]GDSPAAS(AG) ₇	<i>Anaphe</i> silk fibroin + RGD
(c) (AAG) ₂ A[3- ^{13}C]AG(AAG) ₂ AST[2- ^{13}C]GR[1- ^{13}C]GDSPAAS(AAG) ₅	<i>Anaphe</i> silk fibroin + RGD
(d) (A) ₆ [3- ^{13}C]A (A) ₅ GGAASTGRGDSPAASDGG(A) ₁₂	<i>S.c. ricini</i> silk fibroin+ RGD
(e) AGSGAG[3- ^{13}C]AGSGAGAGSGGT[2- ^{13}C]GR[1- ^{13}C]GDSPAGG(GAGAGS) ₂ GAG	<i>B.mori</i> silk fibroin + RGD
(f) TSTGRGDSPASTST[2- ^{13}C]GR[1- ^{13}C]GDSPASTSTGRGDSPAS	(RGD) ₃

測定は CMX-400 および Bruker AVANCE-400 を用い、室温にて行った。

2. 安定同位体標識タンパク質の作成と溶液 NMR 測定

以下の ^{15}N または $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 安定同位体標識タンパク質を大腸菌にて発現させ、精製後、Bruker DRX500 を用いて 30°C、10%D₂O を含む 50mM リン酸バッファー中で測定した。

I : RGD8, His tag-(¹T²S³T⁴G⁵R⁶G⁷D⁸S⁹P¹⁰A¹¹S)₈-His tag

II : SLPF10, His tag-[TGRGDSPAGG(GAGAGS)₃]₁₀-His tag

[結果と考察]

一連のモデルペプチドの ^{13}C CP/MAS スペクトルを Figure 2 に示した。(b)~(f)の各ピークは ^{13}C ラベル部位の局所構造の情報を反映する。(b)では Ala C β ピークは、16.7ppm にシャープな主ピークを持つことから、絹連鎖部位は Type II 型 β -turn 構造が主であることがわかる。(c)-(e)では、Ala C β の主ピークはブロードであり、かつ、その化学シフト位置を考慮すると、絹連鎖部位は概ね distorted β -sheet 構造であると言える。一方 RGD 部位の局所構造を反映する Gly C α および Gly C=O ピークはブロードであることに加え、その化学シフトから、(b)~(f)のいずれも

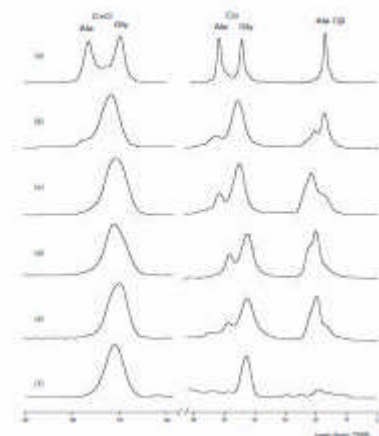


Figure 2. ^{13}C CP/MAS NMR spectra of model peptides (Tab 1).

random な構造をとると言える。

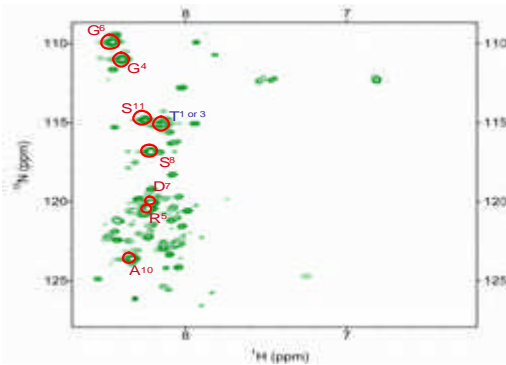


Figure 3. ^1H - ^{15}N HSQC spectrum of RGD8.

今後、細胞評価時

の環境を再現するため、含水状態で ^{13}C CP/MAS スペクトル測定を行い、RGD 部位の運動性について比較する予定である。また、RGD が絹連鎖中に導入された場合と単独の場合での、水溶液状態での RGD 部位の構造とダイナミクスを検討することを試みている。

Figure.3 は、一例として、安定同位体標識を行った RGD8 の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを示した。