

平成16年3月 16 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15年度リサーチ・アシスタント報告書

ふりがな 氏名	くりはら ひろゆき 栗原 宏征	生年月日
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 長棟研究室	
所在地	東京都文京区本郷7-3-1	
申請時点での 学年	博士2年	
研究題目	繰り返し配列を有する人工細胞外マトリクスの設計と組織再生医療への利用	
指導教官の所属・氏名	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)

## 1. 繰り返し遺伝子作製手法の開発

繰り返し DNA は、これまでモノマー DNA 分子をライゲーションすることにより作製されていた。しかしながら、この手法には、比較的長いモノマー DNA を反応に必要とすることや、濃い濃度のモノマーが必要であると言った欠点があった。そこで、我々は耐熱性 DNA ポリメラーゼを用いた繰り返し DNA 伸長反応を開発した。繰り返し DNA 鎖は 5' 側にスライドした形でアニールし、ポリメラーゼによって伸長されることにより繰り返し DNA 鎖が伸長・増幅される (2003 生物工学会, YABEC 2003, Biothech. Prog. 投稿中)。さらに、この反応は 3' および 5' 側の相補配列を減らしても可能であり、より短いモノマー DNA においても繰り返し DNA 伸長を可能とした (Biotech lett. 投稿準備中)。

## 2. 人工細胞外マトリクス分子の設計

## a) RGD ポリマーの作製

RGD (Arg-Gly-Asp) モチーフはインテグリンのリガンド分子として同定され、種々の細胞親和性バイオマテリアルの設計に導入される配列である。そこで、本手法を用い、RGD をコードする繰り返し DNA ライブラリーを作製した。作製したライブラリーから、RGD を 21 回、43 回コードする DNA を発現ベクターに組み込み大腸菌にて発現した。このタンパク質分子は、マウス 3T3、ヒト HeLa 細胞を用いた実験により、高い細胞接着性を有する分子であることが示された。また、RGD 43 は乾燥状態で、繊維状構造を形成することが SEM 観察にて明らかとなった (COEworkshop in tront 2003, Biomacromol. 投稿中)。

## b) 刺激応答型 RGD ポリマーの設計

さらに、RGD ポリマーの水溶性、及び形状を酵素反応にて制御するために RGD 配列に加えトランスグルタミナーゼ (TGase) 架橋化認識配列 (LLQG) を導入した。TGase はグルタミン (Q) 残基とリジン (K) 残基を架橋化する酵素で、常温にてタンパク質の重合反応が可能である。先に述べた手法を用い (LLQG RGD)<sub>n</sub> をコードする繰り返し DNA を作製し、大腸菌にて発現した。得られたタンパク質は TGase の添加により、LLQG のグルタミンと C、N 末端の発現タグ部位に存在するリジン残基と架橋化し、不溶性の沈殿を生成することが明らかとなった。さらに、得られた沈殿上で細胞培養も可能であり、再生医療における足場材料としての利用が期待される (APChe 2003 発表予定)。

## 3. 今後の予定

神経細胞の増殖の足場として、今回作製した人工マトリクスが利用可能か検討する。

氏 名 栗原宏征

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)

Hiroyuki Kurihara, Teruyuki Nagamune  
DNA Polymerase-catalyzed Elongation of Repetitive Hexa-nucleotide Sequences:  
Application to Creation of Repetitive DNA Libraries. Biotech. Prog. Submitted.

氏 名 栗原宏征

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)

栗原宏征、長棟輝行  
新規繰り返し DNA ライブラリーの作製法とその機構  
日本生物工学会 (熊本, H15 年 9 月)

Hiroyuki Kurihara, Teruyuki Nagamune  
In vitro expansion of long DNA repeat from the short oligo-nucleotide which encode simple amino acid repeat sequences: the application to the creation of polyamino acids biosynthesis  
YABEC2003 (Korea, H15 年, 11 月)

Hiroyuki Kurihara, Teruyuki Nagamune  
The Mechanism of Isothermal Expansion of the Simple DNA Repeats  
: Application to the Synthesis of the Various Biomaterials  
COE workshop 2003 (Canada, toront, H15 年, 11 月)