

モチーフ・プログラムド人工タンパク質の医療分野での応用

芝 清隆

Applications of the Motif-programmed Proteins in Medical Area

Kiyotaka SHIBA

Division of Protein Engineering, Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research,
3-10-6 Ariake, Koto-ku, Tokyo 135-8550, Japan

(Received June 17, 2009)

Motif-programming is a method for creating artificial proteins by combining functional peptide motifs in a combinatorial manner. Motifs are often short amino acid sequences within natural proteins that are associated with particular biological functions. Motifs also can be created *de novo* using molecular engineering. In particular, peptide aptamers, which have been isolated as specific binders against various targets, are believed to be promising motif blocks for creating novel biomaterials through motif-programming. It is now known, however, that simple arithmetic addition does not always work with motif-programming—*e.g.*, simple conjugation of motifs-A and -B does not always result in a bifunctional peptide-AB. To solve this nonlinearity in motif-programming, we have been employing a combinatorial approach, which we called MolCraft. In MolCraft, we prepare a library of artificial proteins that contain multiple motifs in various numbers and orders, from which clones having the desired functions are selected. In MolCraft, a microgene is first rationally designed so that the encoded peptides contain motifs, and then tandemly polymerized with insertion or deletion mutations at the junctions between microgene units. Because of junctional perturbations, proteins translated from a single microgene polymer are molecularly diverse, originating from the combinatorics of three reading frames, and are thus combinatorial polymers of three peptides. By embedding functional motifs into different reading frames of a single microgene, combinatorial polymers of functional motifs are easily prepared. Notably, repetitiousness retained in the overall structure of proteins contributes to the formation of ordered structures, and enhances the chances of reconstituting biological activity. This method is particularly well suited for developing liaison molecules that interface between cells and inorganic materials. Examples of multifunctional artificial proteins created from this method will be introduced.

Key words—evolutionary engineering; peptide aptamer; artificial protein; combinatorial engineering

1. モチーフとは

「モチーフ」という言葉は、いろいろな学問分野で使われています。使われる分野において、その言葉の定義も微妙に異なっており、例えば同じ生物分野でもタンパク質の立体構造を主に研究している人たちの間と、タンパク質の配列構造を研究している人たちの間では、モチーフの意味するところも異なってきます。しかしながら、その分野においても「モチーフ」という言葉が共通して意味するところは、「繰り返しシステム内に出現する」とことと「何

かを move する力を持っている」ということです。私の話の中では、「モチーフ」を「タンパク質の一次構造の中に出現する短い配列」と定義しておきます。すなわち、いろいろなタンパク質配列の中に繰り返し出現し、なんらかの機能に関連したアミノ酸配列を意味します (Fig. 1)。

私の研究の中で扱う「モチーフ」は、天然タンパク質の配列由来のものだけに限定されません。人工的なモチーフも扱います。人工的なモチーフが何ものかと言いますと、いわゆる「ペプチド提示フェージ系」から得られるペプチド・アプタマーです。

2. ペプチド提示フェージ系

ここで少しペプチド提示フェージ系について紹介します。ペプチド提示フェージ系は、いわゆる「進化分子工学」「実験進化学」「試験管内進化実験」と

勸癌研究会癌研究所蛋白創製研究部 (〒135-8550 東京都江東区有明 3-10-6)

e-mail: kshiba@jfc.or.jp

本総説は、日本薬学会第 129 年会シンポジウム S05 で発表したものを中心に記述したものである。

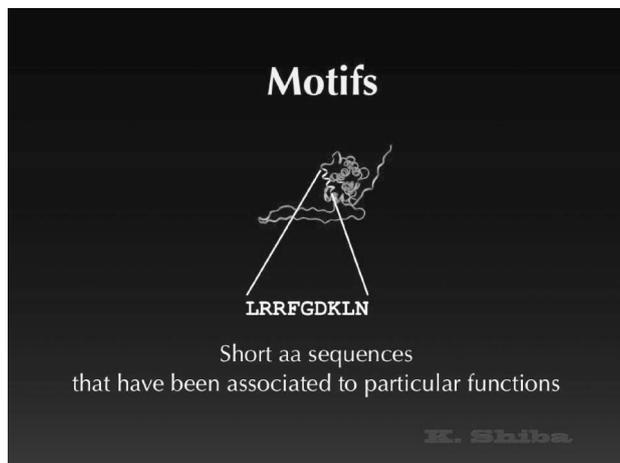


Fig. 1. “Motifs” are Short aa Sequences That Have Been Associated to Particular Functions

呼ばれる研究分野で生まれた手法です。「進化分子工学」は、試験管の中で、ダーウィンの進化を再現し、それを工学的に応用しようとするものです。ダーウィンの進化とは、つまり「変異集団」に「選択」をかければ、生物が進化する、というものです。ペプチド提示ファージ系では、「変異集団」は、ランダムなペプチド配列集団が用いられます。「選択」は、ある標的分子に結合するものを選ぶ、という操作になります。「進化」は、ここでは、「ある標的分子に特異的に結合するペプチドを提示するファージが選ばれる」ということが相当します。

Figure 2 に沿って、もう少し詳しく説明していきましょう。例えば、「チタン」という標的に特異的に結合するペプチドを試験管内進化させたいとします。最初のステップは、ランダムな配列を持ったファージ集団を調製するわけですが、現在、このようなペプチド提示ファージが市販されています。ファージとは、大腸菌に感染するウイルスなのですが、その中でも繊維状ファージ (M13, fd) がペプチド提示ファージによく用いられます。このファージは、自分のゲノムを一本鎖 DNA としてファージ粒子の中に保持しています。このファージゲノムを改変し、ファージ粒子の一方の端にあるファージタンパク質の N 末部分に、うまい具合にランダムペプチドを提示させたライブラリーが市販されています (7 残基から 12 残基のペプチドが提示されたライブラリーがよく使われます)。ライブラリーとしてはランダムなペプチドを提示しているわけです。

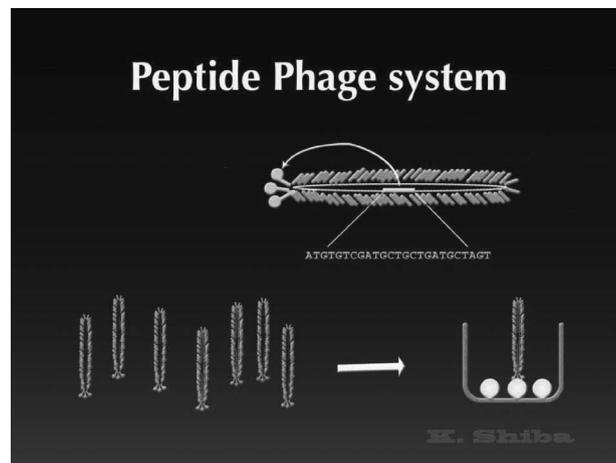


Fig. 2. Peptide Phage System is Able to Create Artificial Peptides That Bind to Certain Targets

が、それぞれのファージが提示しているペプチドの遺伝子は、そのファージ粒子が保持するファージゲノムに由来します。すなわち、どのような配列のペプチドが提示されているかは、そのファージのゲノム上の該当部分をシーケンシングすれば簡単に予想できます。

チタン粒子とファージライブラリーを混合しますと、チタンに結合するペプチドを提示するファージはチタン粒子に結合しますが、ほかのファージは結合しません。結合しなかったファージを洗い流し、結合したファージを回収し、回収されたファージのゲノムをシーケンシングすれば、どのようなペプチド配列がチタンに結合する能力を持つかがわかります。

実際には、非特異的に結合するファージがバックグラウンド結合として問題となってきますので、結合→洗浄→回収に引き続き、再度大腸菌に感染させてサブライブラリーを調製し、これを用いて、結合→洗浄→回収を繰り返します。この一連のサイクルを何回か繰り返すことにより、サブライブラリー中で占める、求める結合性ペプチドを提示したファージの割合が増えていきます。このようにして進化させた、特定の標的に結合するペプチドのことを「ペプチド・アプタマー」と呼びます。

ペプチド提示ファージ系を用いたペプチド・アプタマーの取得方法は、1990年に完成された方法です。¹⁾当初、抗体や受容体などの生体高分子をターゲットとして、これら生体分子に特異的に結合する

ペプチドが取得されていましたが、2000年頃からは、非生体分子である無機材料にもペプチド提示ファージ系が用いられるようになりました。²⁾既に数多くの無機材料結合ペプチドが取得されており、われわれのグループもチタン³⁾やカーボンナノ化合物⁴⁾に結合するペプチド・アダプターを取得しています。

3. モチーフ・プログラミング

ペプチド提示ファージ系を用いて取得したペプチド・アダプターも、特定の機能（この場合、特異的な結合活性）に関連したアミノ酸配列ですので、いわゆる「モチーフ」の仲間です。

今、チタンに結合するモチーフ（これを TBP-1 と呼びます）とカーボンナノ化合物に結合するモチーフ（これを NHBP-1 と呼びます）を連結したような配列を持つペプチドを合成するとします。すると、この連結ペプチドは、「チタンに結合し、同時にカーボンナノホーンにも結合する」といった二重機能を持つことが予想されます。そして、実際にこの連結ペプチドは「チタンに結合しカーボンナノホーンにも結合する」活性を持ちます（未発表データ）。このように、機能に関連したモチーフを、必要に応じて組み合わせるというのが「モチーフ・プログラミング」の基本概念です（Fig. 3）。

上記の例のように、モチーフをどんどん連結していき、それに伴い多機能ポリペプチドがどんどんできれば、「モチーフ・プログラミング」は非常に簡単で、ある意味、とりたてて主張することもない基本技術に過ぎなくなるわけですが、実際にはモチーフの足し算は、かならずしも単純に多機能ポリペプチドを生み出すわけではありません。ペプチド提示ファージ系でよく経験するのが、ペプチドがファージに提示された状態では確かに設定した標的分子に強く結合するのですが、ペプチドをファージから切り離れた時、すなわち、呈されているペプチドを化学合成して用いると、途端に結合活性が消失するか、あるいは極端に弱くなってしまふことをしばしば経験します。「なんだ、ペプチドには結合活性がないのか」と思っている、そのペプチドをほかの分子に移植した場合、強い結合活性を取り戻すことがあります。すなわち、ペプチド・モチーフの持つ機能は、そのペプチドがおかれている環境（コンテキスト）に大きく依存するようです。

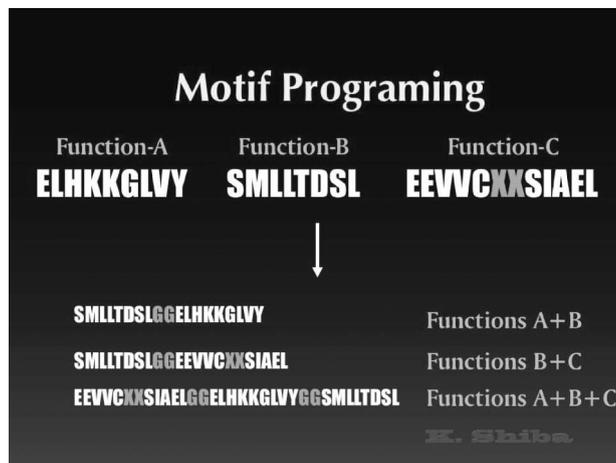


Fig. 3. The Fundamental Principle Underlying Motif Programming is Quite Simple, That is, to Make New Combinations of Functions from New Combinations of Motifs

4. モチーフの気まぐれ性

モチーフ・プログラミングにおいて、モチーフに対応づけられた機能の発揮が、モチーフが存在する環境に大きく作用されそうだとすることを述べました。モチーフの存在する環境を、「タンパク質の中の位置」に絞り、モチーフ・プログラミングのコンテキスト効果をもう少し詳しく紹介します。

Figure 4には2つの天然タンパク質に由来するモチーフが示してあります。1つは HIV ウイルスが持つ tat タンパク質から由来するモチーフで、tatモチーフ、PTDモチーフなどと呼ばれ、細胞移入活性を持つモチーフです。⁵⁾あるタンパク質などを、細胞の外から中に自動進入させたい時に広く用いられているモチーフです。もう1つは、アポトーシス（細胞死）の信号伝達系因子のいくつかが共通して持つ「BH3」モチーフです。⁶⁾このBH3モチーフを含むペプチドだけで、アポトーシスが誘導できることが示されていますが、⁷⁾われわれの実験では、配列保存領域のコアである9残基という短いモチーフを用いています。

tatモチーフとBH3モチーフをプログラムし、細胞外に添加することにより、細胞内に自動進入し、アポトーシスを誘導する人工物が合成できると考えられます。しかしながら、実際にtatモチーフとBH3モチーフを連結させたペプチドを合成してみても、この連結ペプチドは細胞内に進入するものの、アポトーシスは誘導できません。⁸⁾BH3に対応づけられた機能が発揮できないわけです。あるいは、

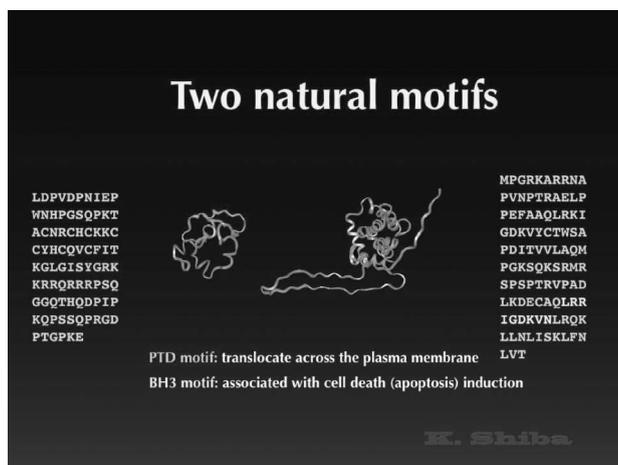


Fig. 4. Two Motifs Found in Natural Proteins

PTD and BH3 motifs are respectively associated with protein translocation and induction of apoptosis.

9 残基の BH3 モチーフだけでは、アポトーシスを誘導できないのかもしれない。

5. MolCraft によるモチーフ・プログラミング

単純なモチーフの足し算が成り立つ場合はそれでよいのですが、モチーフの連結体が期待した多機能を示さない場合はどうしたらよいのでしょうか？ 1 つはモチーフの間のリンカー配列や、あるいは N 末、C 末にエキストラ配列を加え、期待した機能を発揮する改変体を試行錯誤しながら探していく方法があります。

これに対して、われわれが採る方法は、「モチーフをいろいろな数、いろいろな順番で持つ人工タンパク質ライブラリー」をまず調製し、その中から期待した活性を持つクローンを選ぼうとする進化分子工学的な手法で問題を解決しています。これを MolCraft と呼びます。⁹⁾ 最初に紹介したペプチド提示ファージ系が、アミノ酸をブロック単位とし、そのコンビナトリアルな重合体から狙った機能体を探す、といったアプローチなのに対し、MolCraft では、ブロック単位に「モチーフ」を用い、モチーフのコンビナトリアルな重合体の中から機能体を選ぼうとするものです。モチーフ単位としては、ペプチド提示ファージ系で進化されたペプチド・アダプターなども使えるわけですので、ペプチド提示ファージ系より階層が 1 つ上がったコンビナトリアル・エンジニアリング系、と考えてもよいでしょう。

上述の細胞内に自動進入する tat モチーフと、アポトーシスを誘導する BH3 モチーフを例にとり、

MolCraft による人工タンパク質作製の手順を以下に紹介していきます (Fig. 5)。

MolCraft の最初のステップは「マイクロ遺伝子のデザイン」です。プログラムしたいモチーフをコードできる DNA 配列をデザインするわけですが、多くの場合、複数のモチーフをプログラムするわけですが、マイクロ遺伝子のデザイン時には、わざとこれらのモチーフを異なる読み枠にコードします。DNA の配列情報は、3 塩基を 1 つとしてアミノ酸に翻訳されます。したがって、1 つの DNA 配列が、翻訳読み枠をずらすことにより 3 つのペプチドをコードすることができます。DNA 分子としては 1 つなのですが、遺伝子としては 3 つ分の能力を持つと考えてください。この 3 つの異なる読み枠に、プログラムしたいモチーフを埋め込みます [Fig. 5 (a)]。

次に、このデザインしたマイクロ遺伝子をブロック単位として、そのタンデムな重合体を作製します。この重合体作製には MPR (microgene polymerization reaction) 法と呼ぶ、特殊な反応条件を用います。MPR 法は、鋳型のない、プライマーだけの PCR に似た方法ですが、プライマーの設計と反応条件を最適化することで、マイクロ遺伝子のタンデム重合体が簡単に調製できます。¹⁰⁾ また、この MPR 法の特徴として、マイクロ遺伝子の連結部位に、ランダムに塩基の挿入や欠失が起こります [Fig. 5 (b)]。

もし MPR 法が、単純なマイクロ遺伝子重合体のみを反応産物として産生するならば、その重合体から合成される人工タンパク質も、単純な繰り返し構造を持ったものが 1 種類 (正確には翻訳読み枠を変えた場合を考え 3 種) しかできません。しかしながら、実際は連結部でのランダムな塩基の挿入・欠失により、重合体の持つ読み枠は、マイクロ遺伝子が持つ 3 つの翻訳読み枠のコンビナトリアルな重合体となります。プログラムするモチーフをあらかじめ、異なる読み枠に埋め込んでいたので、MPR で調製されるマイクロ遺伝子重合体は、埋め込んだ複数のモチーフをいろいろな順番で、いろいろな数を持つ人工タンパク質ライブラリーとして扱うことができます [Fig. 5 (c)]。

このようにして調製した、複数のモチーフの組合せ重合体の中から期待する活性を持ったものを選択

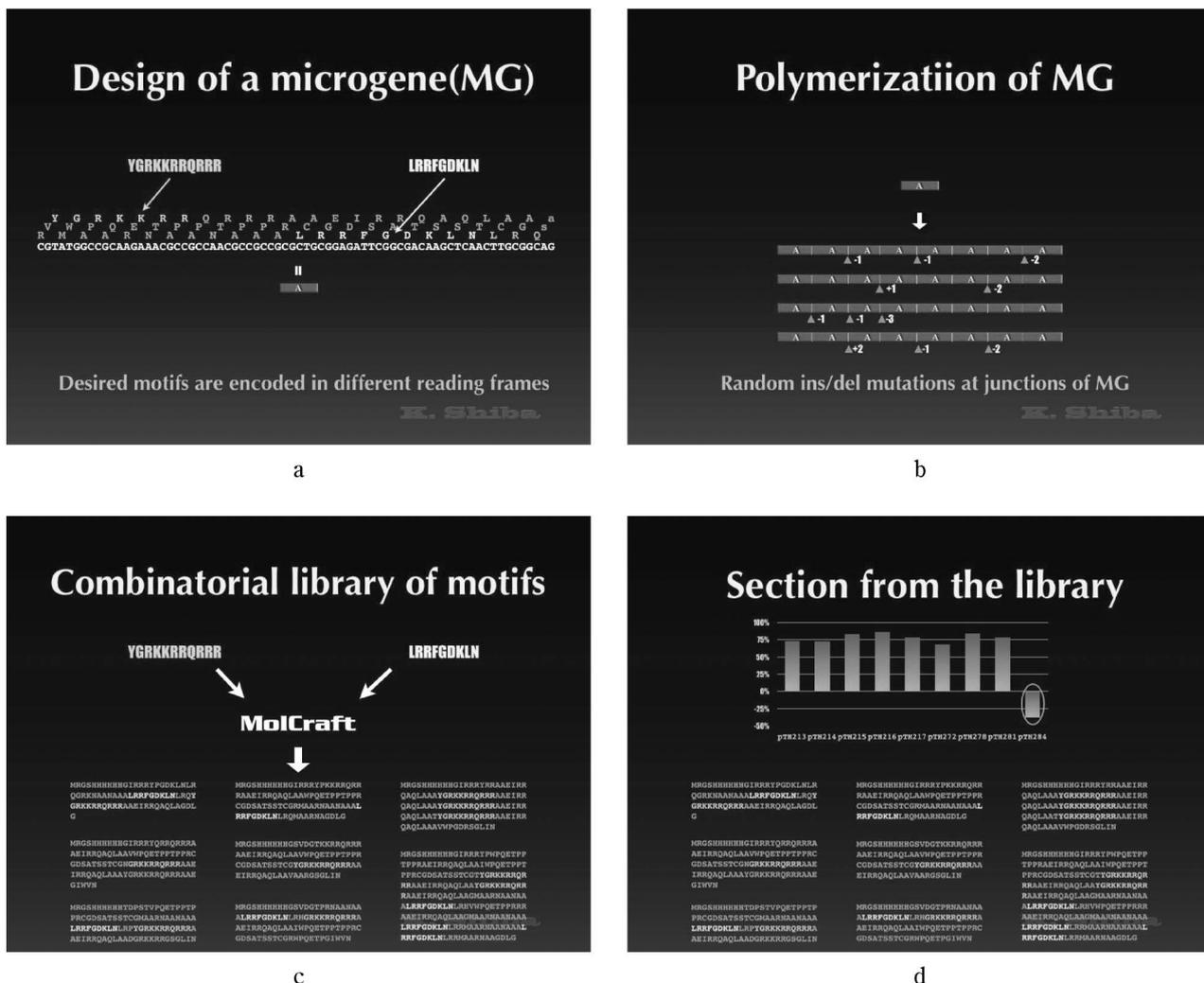


Fig. 5. Outline of MolCraft

(a) Microgene is designed so that it could code for motifs in its different reading frames. (b) The designer microgene is tandemly polymerized using the MPR (microgene polymerization reaction) conditions, which allows random insertions and/or deletions at junctions of a microgene unit. (c) The translational products of the microgene polymers make up a library of artificial proteins that contain the embedded motif in combinatorial manners. (d) From the library, the clones that show expected functions are selected.

します。今の例では、「細胞の中に自動進入し、アポトーシスを誘導する」活性を持ったタンパク質クローンを探します。ペプチド提示ファージ系のような、ナイーブなライブラリーの場合は、 $10^9 \sim 10^{11}$ といった、大きなサイズのライブラリーをスクリーニングしないとはいけません。MolCraftの場合は、数十個のクローンをスクリーニングすれば、おおかたの場合は、欲しいクローンが見つかります。これは、MolCraftで用いるライブラリーが、あらかじめ、特定の方向に大きくバイアスのかかったものであるためです。ある意味、MolCraftによる人工タンパク質創製は、蛋白工学的な合理的側面と、進化分子工学的な側面を併せ持つ、と言ってよいで

しょう。この例では、20個の精製した人工タンパク質を用いたスクリーニングから、そのうちの1つが、「細胞の中に自動進入し、アポトーシスを誘導する」活性を持っていることが分かりました [Fig. 5(d)].⁸⁾

MolCraftで調製される人工タンパク質は、3つのペプチドのコンビナトリアルな重合体ではありませんが、全体としては「繰返し性」の高いタンパク質集団になっています。われわれは、この「繰返し性」が、ある程度のタンパク質構造をMolCraft産物に与えるのではないかと考えています。¹¹⁾ただし、MolCraftで作られる人工タンパク質が、天然タンパク質のように構造特異性の高い、硬い構造を

持つわけではありません。¹²⁾ 逆に言えば、生物機能を発揮するためには、すべての場合、天然タンパク質のように硬い構造を持つ必要はないと言えるでしょう。

マイクロ遺伝子には、読み枠が3つしかないので、MolCraft では、プログラムできるモチーフの数が3つに限られてしまうのか？といった疑問が起るでしょうが、われわれは既に、埋め込むモチーフの数に制限を持たない、「MolCraft II」も開発しています。¹³⁾ また、特殊なポリメラーゼを用いて、高頻度に読み枠をずらす「フレーム・シャッフリング法」も開発しています。¹⁴⁾

6. モチーフ・プログラムド人工タンパク質の医療分野での応用開発

上で紹介した「細胞の中に自動進入し、アポトーシスを誘導する」活性を持ったタンパク質は、例えばがん細胞にアポトーシスを誘導するタンパク質製剤として展開する可能性があります。実際、ここで創製された人工タンパク質クローンも、特定のがん細胞株に対して、より強いアポトーシスを誘導することが分かっています。¹⁵⁾ プログラムした BH3 モチーフが作用する信号伝達系の状態が、細胞株間で異なっているからなのかもしれません。より積極的に、がん細胞に特異性を持たせるようなモチーフを、追加してプログラムすることも、1つの方法でしょう。

プログラムするモチーフに、最初に紹介した「無機材料に結合する」ペプチド・アダプターを用いることもできます。例えば、「チタンに結合するモチーフ」と「細胞に結合するモチーフ」をプログラムすることにより、「チタン表面上に細胞接着活性を与える」ような人工タンパク質を作製することができます。チタンは、人工歯根などの材料として広く用いられていますが、骨との一体化や、上皮細胞との接着が不十分などの、改良すべき点も残っています。「チタン表面上に細胞接着活性を与える」人工タンパク質の研究は、このようなチタンの機能化をめざした研究として始めています。

Figure 6 には用いたマイクロ遺伝子が示されていますが、異なる読み枠に、「チタンに結合するモチーフ」³⁾と「細胞に結合するモチーフ」¹⁶⁾がプログラムされています。このマイクロ遺伝子から出発し、MolCraft で人工タンパク質を3種類作ってみたいと

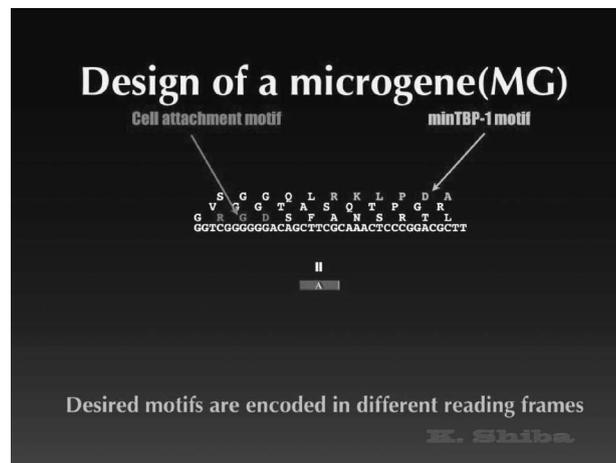


Fig. 6. The Microgene That was Programmed with the Cell Attaching Motif and the Titanium Binding Motif

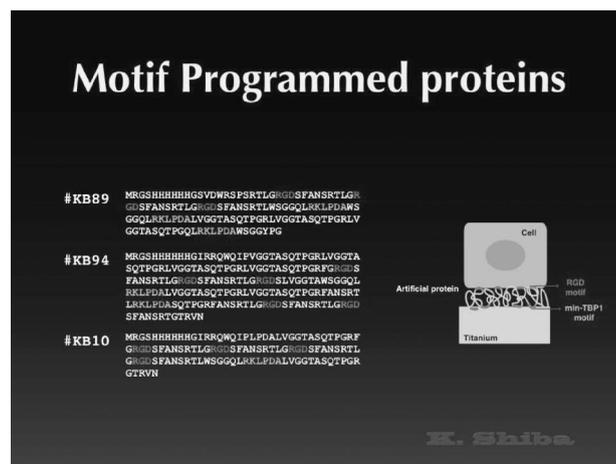


Fig. 7. Artificial Matrix Proteins That Were Created by the Designer Microgene in Fig. 6

ころ、そのうちの1つはチタン上で、強い細胞接着活性を示しました (Fig. 7).¹⁷⁾ この結果は、モチーフ・プログラミングにより、いろいろな生物活性を持った人工マトリックスを、チタン上に構成できる可能性を示しています。今回の例では、細胞接着といった単純なモチーフしかプログラムしていませんが、いろいろなシグナリング活性を持ったモチーフをプログラムすることで、より高機能の人工マトリックスを作製できる可能性を示しています。

チタンインプラントの骨との融合をよくするためには、チタン表面上に骨化誘導能力を持ったサイトカインを担持させる方法が考えられます。骨化誘導に係わるサイトカインとしては、BMP-2が有名です。¹⁸⁾ チタン表面上でのローカルな BMP-2 の濃度

を高めるための1つの方法としては、天然のBMP-2に、チタンへの結合能力を賦与することが考えられます。BMP-2のN末端は、その生理活性には重要でないことが分かっていたので、われわれはまず、BMP-2のN末にチタン結合モチーフを組換式的に融合してみました。残念ながら、1個、2個とモチーフを結合してみましたが、有意なチタンへの結合活性は観察されませんでした。モチーフを3個タンデムに連結してみましたが、今度は融合タンパク質そのものの翻訳効率が極端に悪くなってしまいました。そこで、ペプチドレベルの融合ではなく、あらかじめチタンへの結合能力があることが分かっていた、人工タンパク質を融合してみました。これは、チタン結合モチーフをプログラムして、MolCraftで作製した人工タンパク質です。この人工タンパク質融合BMP-2の場合、確かにチタンへの結合が観察され、また、チタン上での骨化誘導も有意に上昇しました。¹⁹⁾ この実験で得られた興味深い観察は、「チタン結合モチーフをプログラムした人工タンパク質」と「チタン結合モチーフは持たないが非特異的にチタンに結合する人工タンパク質」のそれぞれをBMP-2に融合した場合、前者ではチタン上での骨化誘導がみられましたが、後者では有意な上昇が観察されませんでした。もちろん、両方のタンパク質ともチタンには結合しています。この結果が示唆するのは、基板上への固相化方法の違いにより、サイトカインなどの生物機能の発現に大きな差がでるかもしれないということです。一般的に非特異的な無機材料との結合は疎水結合を中心とする非可逆的なものです。²⁰⁾ これに対して、チタン結合ペプチドのチタンへの結合は静電引力を中心とした可逆的な結合です。³⁾ ちょっと考えると、固相化には不可逆的な強い結合の方がよさそうにも思えますが、われわれの結果は、かならずしもそうでもないらしいことを示しています。生物活動が生体高分子間の弱い結合を中心形成されていることを考えると、このような可逆的で特異的な弱い結合を利用した界面研究が、今後注目されていくのではないかと考えています。

7. 人工タンパク質によるバイオミネラリゼーション制御

バイオミネラリゼーションは「生物による鉱物化」を意味します。²¹⁾ われわれの歯や骨はバイオミネラ

リゼーションで形成されているものですが、常温、常圧、水溶液中で起こるこの無機物の結晶化は、生物分野のみならず工学分野からも注目を集めています。工学分野からの注目は、微細で複雑な構造を持った無機結晶構造体を、低環境負荷条件で作ることができるのでは、という期待からです。

バイオミネラリゼーションにはタンパク質などの生体高分子が係わっているのですが、どの生体高分子がどのような機構で係わっているのかは、実はあまりよく分かっていません。われわれはバイオミネラリゼーションの基礎・応用研究にもモチーフ・プログラムド人工タンパク質を利用する試みを進めています。^{22,23)} 上で紹介した、チタン表面の機能化といった目標に対しても、「チタン表面にリン酸カルシウムの結晶を整列」させるような人工タンパク質の開発を進めています。既に、チタン表面にリン酸カルシウムの結晶をコートすることがチタンと骨との融合を促進するというデータが出されています。複雑な構造を持ったチタン材料に対して、人工タンパク質水溶液にディッピングするだけでリン酸カルシウムの結晶をコートさせようというのが狙いです。

このため、骨髄のマトリックスタンパク質である「DMP-1由来のペプチド(2種類)」²⁴⁾と「チタン結合モチーフ」³⁾をプログラムした人工タンパク質を作製し、まずその中から、水溶液中でリン酸化カルシウムの結晶化を促進するものを選択しました(Fig. 8)。²³⁾ 次に、チタン上でリン酸化カルシウム

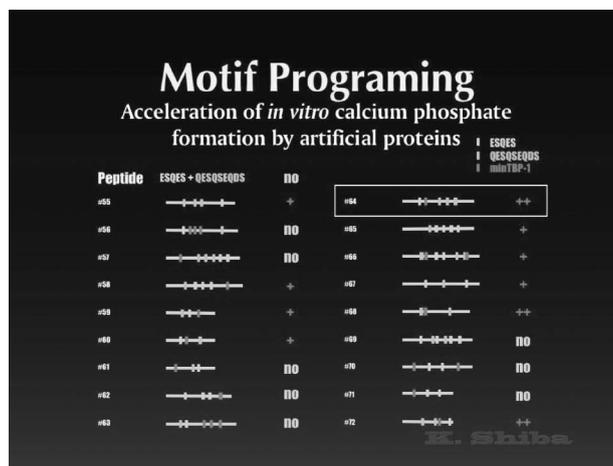


Fig. 8. Artificial Proteins That Carried Different Numbers of the Titanium Binding Motif and the Mineralization Motif in Various Orders

の結晶化を促進するものを探すと、期待通りの活性を持つクローンが選ばれてきました。

8. おわりに

ここではモチーフ・プログラムド人工タンパク質の歯科領域での応用展開研究を中心に紹介しましたが、われわれは現在、人工タンパク質のがん領域での利用についての研究を進めています。がん診断、がん治療につながる人工タンパク質の利用です。ペプチド提示フェージ系は、悪性腫瘍細胞に特異的に結合するペプチドの取得にも用いられていますので、²⁵⁾ これらががん特異的モチーフと、天然に存在するがん関連信号伝達系のモチーフ、さらには、診断デバイスの材料に特異的なペプチド・アプタマーなどをうまくプログラムし、例えば血中を循環する腫瘍細胞 (CTC) などを効率よく捕捉し、²⁶⁾ がん診断に利用しようとするものです。

このようにモチーフ・プログラムド人工タンパク質は、分子生物学、進化学、材料科学といった異なる分野を橋渡しする分子として活躍が期待されています。

REFERENCES

- 1) Scott J. K., Smith G. P., *Science*, **249**, 386–390 (1990).
- 2) Whaley S. R., English D. S., Hu E. L., Barbara P. F., Belcher A. M., *Nature*, **405**, 665–668 (2000).
- 3) Sano K., Shiba K., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 14234–14235 (2003).
- 4) Kase D., Kulp J. L., III, Yudasaka M., Evans J. S., Iijima S., Shiba K., *Langmuir*, **20**, 8939–8941 (2004).
- 5) Vocero-Akbani A., Chellaiah M. A., Hruska K. A., Dowdy S. F., *Methods Enzymol.*, **332**, 36–49 (2001).
- 6) Opferman J. T., Korsmeyer S. J., *Nat. Immunol.*, **4**, 410–415 (2003).
- 7) Letai A., Bassik M. C., Walensky L. D., Sorcinelli M. D., Weiler S., Korsmeyer S. J., *Cancer Cell*, **2**, 183–192 (2002).
- 8) Saito H., Honma T., Minamisawa T., Yamazaki K., Noda T., Yamori T., Shiba K., *Chem. Biol.*, **11**, 765–773 (2004).
- 9) Shiba K., *J. Mol. Catal. B*, **28**, 145–153 (2004).
- 10) Shiba K., Takahashi T., Noda T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 3805–3810 (1997).
- 11) Shiba K., Takahashi Y., Noda T., *J. Mol. Biol.*, **320**, 833–840 (2002).
- 12) Shiba K., Shirai T., Honma T., Noda T., *Protein Eng. Des. Sel.*, **16**, 57–63 (2003).
- 13) Saito H., Minamisawa T., Shiba K., *Nucl. Acids Res.*, **35**, e38 (2007).
- 14) Kashiwagi K., Isogai Y., Nishiguchi K., Shiba K., *Protein Eng. Des. Sel.*, **19**, 135–140 (2006).
- 15) Saito H., Minamisawa T., Yamori T., Shiba K., *Cancer Sci.*, **99**, 398–406 (2008).
- 16) Hynes R. O., *Cell*, **110**, 673–687 (2002).
- 17) Kokubun K., Kashiwagi K., Yoshinari M., Inoue T., Shiba K., *Biomacromol.*, **9**, 3098–3105 (2008).
- 18) Wozney J. M., Rosen V., Celeste A. J., Miotsock L. M., Whitters M. J., Kriz R. W., Hewick R. M., Wang E. A., *Science*, **242**, 1528–1534 (1988).
- 19) Kashiwagi K., Tsuji T., Shiba K., *Biomaterials*, **30**, 1166–1175 (2009).
- 20) Roach P., Farrar D., Perry C. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 3939–3945 (2006).
- 21) Mann S., “Biomaterialization-principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry”, Oxford University Press, 2001.
- 22) Shiba K., Minamisawa T., *Biomacromol.*, **8**, 2659–2664 (2007).
- 23) Tsuji T., Onuma K., Yamamoto A., Iijima M., Shiba K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 16866–16870, (2008).
- 24) He G., Dahl T., Veis A., George A., *Nat. Mater.*, **2**, 552–558 (2003).
- 25) Arap W., Pasqualini R., Ruoslahti E., *Science*, **279**, 377–380 (1998).
- 26) Nagrath S., Sequist L. V., Maheswaran S., Bell D. W., Irimia D., Ulkus L., Smith M. R., Kwak E. L., Digumarthy S., Muzikansky A., Ryan P., Balis U. J., Tompkins R. G., Haber D. A., Toner M., *Nature*, **450**, 1235–1239 (2007).