

新しい生体親和性材料としてのペプチド性人工コラーゲンゲル

早稲田大学理工学術院

小 出 隆 規

We have developed a peptide-based collagen-like gel utilizing the self-assembling property of collagen-like peptides, *i.e.* (Pro-Hyp-Gly)_n. In order to functionalize the hydrogel, we incorporated Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg sequence, which is recognized by integrin, to the peptide building blocks. When human fibroblasts are cultured on the material, integrin-dependent cell attachment and spreading are observed.

1. 緒 言

これまでの多くの研究から、数十種におよぶタンパク質が、長さ 300 nm におよぶコラーゲン 3 重らせん領域に多数結合していることが知られている。その中には、直接コラーゲン 3 重らせんを認識して細胞内に直接シグナルを入力するインテグリン、Discoidin domain reseptor (DDR) のような膜レセプターや、コラーゲンに結合して機能が制御されるコラーゲン結合タンパク質（例えば、Pigment epithelium-derived factor (PEDF) など）が含まれる。それぞれのコラーゲン結合タンパク質は、3 重らせん上に提示された特異な配列（コラーゲンの機能エピトープ）に結合し、その機能を発揮する。したがって、天然のコラーゲンは、多数の機能エピトープと多数のコラーゲン結合タンパク質との結合によって惹起される多様なシグナルを、様々なターゲット細胞に入力している。また、個々のターゲット細胞は、コラーゲンより直接的・間接的に複数のシグナル入力を受け、それらシグナルの総和としてのレスポンスを示す。

しかし現状において、コラーゲンは常に「バルク材料」として利用されており、コラーゲンが分離可能な多数の機能的アミノ酸配列を内包した多機能タンパク質であるという認識は、生命科学に携わる研究者においても低い。また、天然のコラーゲンをソースとしている限り、コラーゲンの個々の機能を分離して利用することは原理的に困難である。

そこで本研究では、細胞膜上のレセプターを活性化するための特定のアミノ酸配列を組み込んだ人工コラーゲンを作成し、これを新規な機能性生体材料として応用するための技術基盤を築くことを目的として研究を行った。

用いた人工コラーゲンは、デザイン・合成したヘテロ 3 量体コラーゲンペプチドの自発的な分子間フォールディングを利用して作製した。採用したペプチドは、コラーゲン様 Gly-Pro-Hyp (Hyp, 4-Hydroxyproline) 繰り返し配列を持つ 3 本のペプチド鎖を、ジスルフィド結合によって相互にずらして架橋した 3 量体ペプチドである。このペプチドは、自発的な分子間フォールディングにより、3 重らせん構造が長軸方向に伸長し、コラーゲン様超分子となる (Yamazaki CM, Asada S, Kitagawa K, **Koide T**, *Biopolymers*. 2008;9(6):816-23)。

2. 実 験

2-1 3 量体ペプチドのデザイン

細胞表面に存在するコラーゲンレセプターのひとつである $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンは、コラーゲン 3 重らせん構造上の Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg (GFOGER) 配列を認識して結合することがすでに知られている。この GFOGER 配列を含む 3 量体ペプチドをデザインした。しかし、この GFOGER 配列を 3 量体ペプチドのコラーゲン様 Gly-Pro-Hyp 繰り返し配列中に組み込むことで、そのペプチドが形成する 3 重らせん構造の熱安定性の低下が懸念される。そこでまず、経験的パラメータをもちいたコンピュータプログラムを利用して、コラーゲン様配列中の一部を GFOGER 配列に置換することで 3 重らせん構造の熱安定性をどれくらい変化させるかについて解析した。この結果を基に、3 量体ペプチド中のどの位置に GFOGER 配列を組込むか、また、3 量体ペプチドを構成する 3 本のペプチド鎖の長さを決定し、機能化人工コラーゲンの原料となる 3 量体ペプチドを考案した。

2-2 $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンの結合配列を組み込んだ 3 量体ペプチドの合成

3 量体ペプチドを構成する 3 本の各ペプチド鎖は、Fmoc 固相法により合成した。次いで、分子中に導入したシステインのチオール基を利用した段階的かつ位置選択的なジスルフィド結合形成反応を用いることで、各ペプチド



A peptide-based collagen-like gel as a novel biomaterial

Takaki Koide

Faculty of Science and Engineering,
Waseda University

鎖を3量体化した (Figure 1)。合成したペプチドは、逆相HPLC分析およびMALDI-TOF MS測定により同定した。合成した3量体ペプチドの3重らせん構造の形成およびその熱安定性を、円二色性 (CD) 測定により確認した。

2-3 機能性人工コラーゲンへの細胞接着の顕微鏡観察

3量体ペプチドをコーティングした96 well dish-plate上でヒト皮膚繊維芽細胞 (HDF) を培養し、細胞接着の有無を顕微鏡で観察した。ペプチド水溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を各 well に入れ4℃で12時間静置し、ペプチドをプレートにコーティングした。BSAで各wellをブロッキングした後、ヒト皮膚繊維芽細胞 (HDF) を播種し、37℃でインキュベートした。2時間後、細胞を4% *p*-formaldehydeで固定、2% crystalvioletで染色し、細胞接着の有無を顕微鏡にて観察した。

3. 結果と考察

3-1 デザインと合成

デザインした3量体ペプチドを純度良く得た。CDスペクトル測定の結果、合成した3量体ペプチドがコラーゲン様3重らせん構造を形成することを確認した。また、3重らせん構造の変性温度を測定したところ、細胞培養温度である37℃においてその3重らせん構造を安定に維持できることを確認した。

3-2 人工コラーゲンの機能化

3量体ペプチドでコーティングしたプレート上でのHDFの接着を、コラーゲン、またはBSAをコーティングしたプレート上での接着と比較した。

GFOGER配列を組み込んだ3量体ペプチドをコーティングしてあるプレート上では、コラーゲンの場合と同様にHDFは接着した。一方、

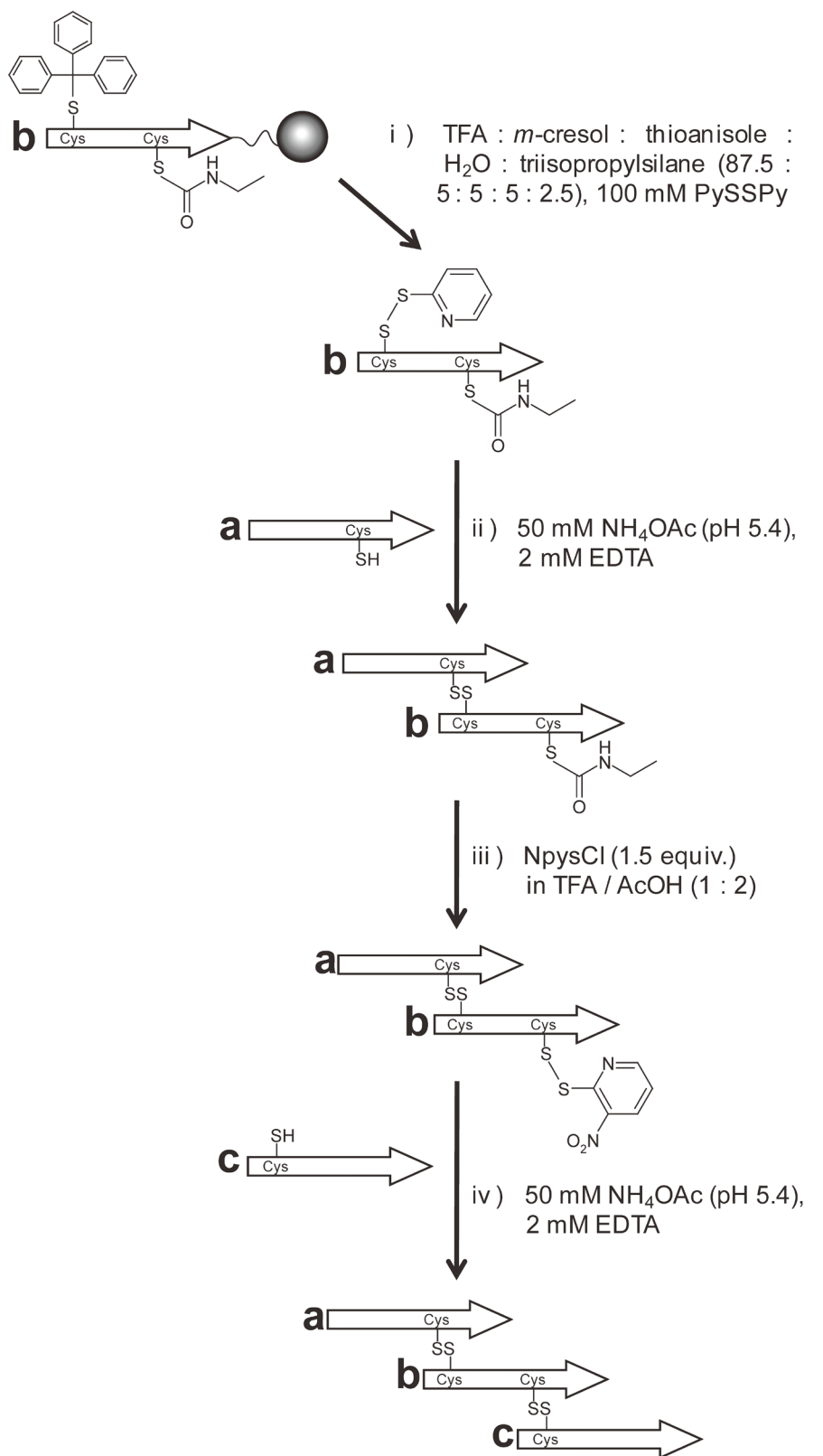


Figure 1 位置選択的なジスルフィド結合形成反応を利用したペプチドの3量体化
矢印は、コラーゲン様 Gly-Pro-Hyp の単純繰り返し配列を示す。

- i) 固相合成用ビーズからの切り出し、脱保護、およびチオール基のピリジルスルフェニル化 (活性化) 反応。
- ii) ジスルフィド結合形成反応 (2量体化)。
- iii) アセトアミドメチル基 (保護基) からニトロピリジルスルフェニル基 (活性化基) への変換反応。
- iv) ジスルフィド結合形成反応 (3量体化)

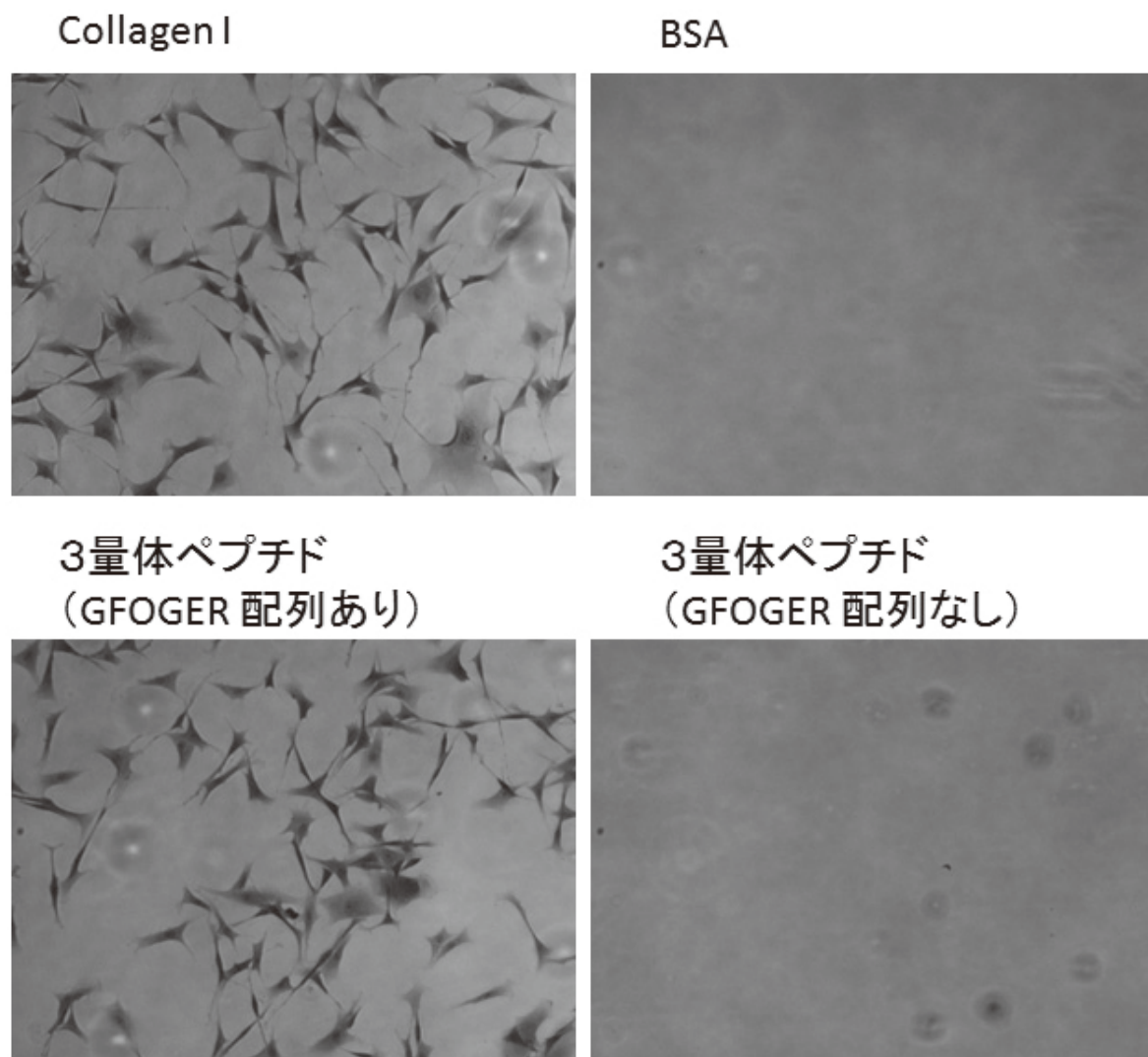


Figure 2 プレートにコーティングした基質依存的な HDF の接着
プレートのコーティングに要した Collagen I, BSA, 3量体ペプチド、各水溶液の濃度は、いずれも 10 μ g/ml。

GFOGER 配列をもたない 3 量体ペプチドでは接着が見られなかった。本実験で示した細胞接着が、GFOGER 配列依存的に起こるものであることを明らかにした。

コラーゲンの 3 重らせん上における GFOGER 配列は、

α 2 β 1 インテグリンの認識配列であるが、今回確認した HDF の接着が α 2 β 1 インテグリンによるものかどうかを示すには至っていない。今後解析していく必要がある。