

# エラスチン類似ポリペプチドの合理的設計による 温度応答性ゲルの創製

名古屋大学大学院工学研究科応用物質化学専攻

鳴瀧 彩絵

Elastin-like polypeptides (ELPs) are functional polymers that show elasticity and lower critical solution temperature (LCST) as native elastin. We have developed a novel class of “double-hydrophobic” block ELPs named GPG and its derivatives with added functional motifs. A series of GPG comprises proline-rich (VPGXG)<sub>25</sub> and glycine-rich (VGGVG)<sub>5</sub>, both of which dehydrate at higher temperature but form distinct secondary structures,  $\beta$ -turn and  $\beta$ -sheet respectively. GPG initially assembles into nanoparticles, which further connect into beaded nanofibers. In this study, a new derivative GPPG, where (VPGXG)<sub>25</sub> is repeated twice via a short linker sequence, has been constructed for the purpose of obtaining a physical gel of ELP. The longer proline-rich sequence of GPPG might bent more freely than that of GPG, resulting in the formation of branching nanofibers. GPPG (20  $\mu$ M, 0.034 wt%) assembled into nanoparticles and aggregates of nanoparticles while GPG (20  $\mu$ M, 0.055 wt%) organized into nanofibers in water at 37 °C. When the concentration of polypeptides was increased to 0.3 wt%, both GPG and GPPG precipitated from aqueous solution. However, when GPG and GPPG was mixed at 9:1 weight ratio the mixture formed a physical gel at the polypeptide concentration of 0.3 wt%. The gel formation at such a low concentration is unprecedented in the field of ELP. The homogeneous nanofiber formation with suitable branching might be responsible for the gelation. This work will open up the possibility of ELPs for use in the cosmetology and biomedical research fields.

## 1. 緒言

エラスチンは、その名のとおり elasticity (弾性) に関与する細胞外マトリクスタンパク質であり、皮膚・血管・靭帯などにおいて線維状の弾性組織を形成し、組織に伸縮性を与える<sup>1)</sup>。そのユニークな力学特性や生体適合性から、エラスチンは化粧品や医療材料への応用が期待されるが、他の細胞外マトリクス成分であるコラーゲンやヒアルロン酸に比べ、その利用は大幅に遅れている<sup>2)</sup>。これは、生体由来エラスチンが高度に架橋され不溶化しており、均質で扱いやすい素材を得るのが困難なためである。

本研究は、使いやすく、制御性のよいエラスチン材料を生み出すことで Cosmetology の発展に寄与することを大きな目的とする。エラスチン由来のアミノ酸配列を含み、人工的に作製されるエラスチン類似ポリペプチド (Elastin-Like Polypeptide: ELP) は、天然エラスチンの特色であるエントロピー弾性と下限臨界共溶温度 (LCST) を再現できる機能性高分子として注目されている<sup>3)</sup>。筆者らはこれまでに、エラスチン由来の2種類の配列モチーフを組み合わせた新規なブロック ELP である GPG (図1(a)) を作製し、これが水中で温度刺激によって自己集合し、生体エラスチンのような線維構造(ナノファイバー)を形成することを報

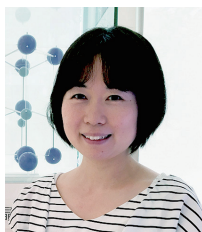
告した (図1(b))<sup>4,8)</sup>。ナノファイバーは粒子が数珠状に連結したユニークな構造を持ち、分岐をほとんど持たない。GPG は、プロリンに富む P 配列を分子中央部に、グリシンに富む G 配列を分子両末端に有する。20°C 付近に LCST を持つ P 配列が疎水的に凝集してナノ粒子を形成したのち、G 配列が粒子間で  $\beta$ -sheet 構造を形成して数珠状ファイバーを形成するモデルをこれまでに提案している (図1(c))<sup>1)</sup>。ナノファイバーが分岐を生じない理由は、P 部位の剛直性にあると考えられる。つまり、P 部位は  $\beta$ -turn 構造が集積した  $\beta$ -spiral というらせん構造をとりやすく、ランダムコイル状の分子鎖と比較して長い持続長を持つ。このため P 部位に連結した G 部位は粒子の両極に位置しやすくなる。

ナノファイバーに適切な絡み合いを持たせて自立性のあるゲルへと展開できれば、エラスチンの粘弾性特性を活かした細胞培養基材や創傷治療剤の開発につながる。本研究では、ELP 配列の合理的なデザインを通じて自己集合性ナノファイバーに分岐構造を導入することを目的とした。本研究で新しく作製するポリペプチドである GPPG のアミノ酸配列を図1(a)に示す。GPPG は GPG にさらに P 配列を挿入し、P 配列間をフレキシブルなリンカー配列 (KLGSG) で連結している。リンカーの効果により、GPPG では P 配列の接続部分で分子鎖の柔軟な折れ曲がりが可能となり、分岐構造を生じると予想した。

## 2. 実験

### 2. 1. GPPG の合成と精製

GPG をコードするプラスミド DNA である pET22b (+)-GPG<sup>4)</sup> の BamHI 制限酵素サイトに P 配列をコードする DNA 断片をライゲーションし、pET22b (+)-GPPG を得た。



Development of temperature-responsive gels through the rational design of elastin-like polypeptides

Ayae Sugawara-Narutaki

Department of Materials Chemistry,  
Graduate School of Engineering, Nagoya  
University

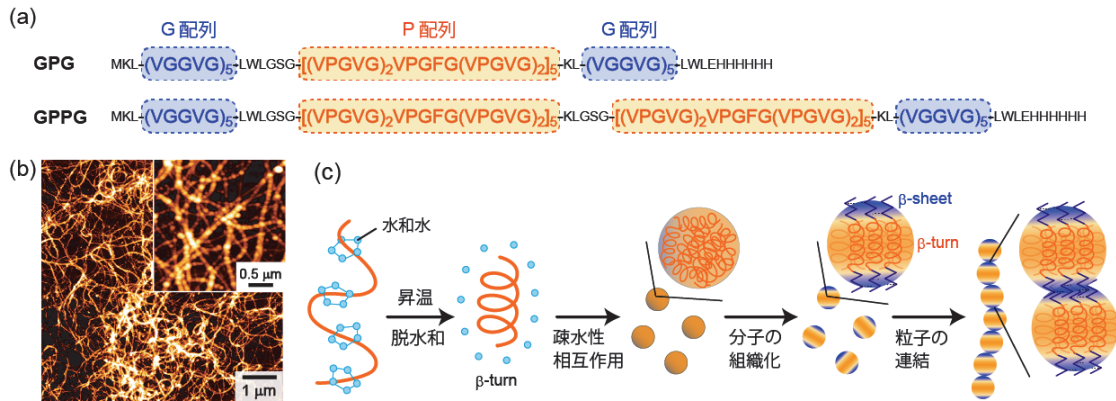


図 1 (a) GPG および GPPG のアミノ酸配列, (b) GPG ナノファイバーの原子間力顕微鏡 (AFM) 像<sup>1)</sup> (アメリカ化学会より許可を得て転載), (c) 予想される GPG 自己集合のモデル図.

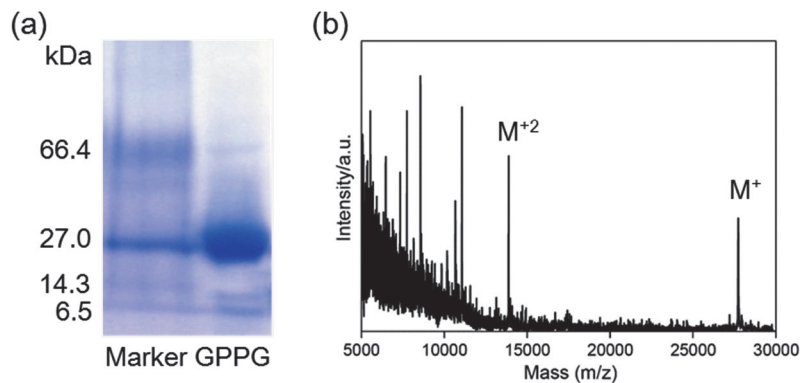


図 2 GPPG の(a) SDS-PAGE および(b) MALDI-TOF-MS の結果.

DNA シーケンサーを用いた配列解析により GPPG をコードする遺伝子の存在を確認した。pET22b(+)-GPPG を用いて大腸菌 BLR 株を形質転換し、GPPG タンパク質を発現させた。タンパク質を金属アフィニティークロマトグラフィーにより回収し、純水に対して透析して塩類を除去したのち、凍結乾燥して試料粉末を得た。ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) とマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF-MS) により精製を確認した。

## 2. 2. 自己集合体の形成

GPG と GPPG をそれぞれ 20 μM (それぞれ 0.034 および 0.055 wt%) となるように冷水に溶解させたのち、37℃で 7 日間インキュベートした。この間、円二色性 (CD) 分散計で 190 ~ 260 nm の吸光度を測定することにより、タンパク質二次構造の変化を調べた。7 日後の試料溶液をマイカ基板に滴下し、37℃で自然乾燥したのちに、原子間力顕微鏡 (AFM) で形態を観察した。

さらに、ポリペプチド濃度を 0.3 あるいは 0.4 wt% に増加させて 37℃に昇温し、1 日後に溶液の外観の変化を観察した。総ポリペプチド濃度を 0.3 wt% に固定し、GPG と GPPG を所定量混合した試料についても観察を行った。

## 3. 結果

### 3. 1. GPPG の合成と精製

DNA シーケンサーを用いた配列解析の結果、pET22b(+)-GPPG には GPPG をコードする遺伝子が正しく挿入されていた。発現したポリペプチドについての SDS-PAGE および MALDI-TOF-MS の結果を図 2 に示す。GPPG の理論分子量は 27,700 Da である。SDS-PAGE において分子量 27 kDa のマーカー付近に最も濃いバンドが出現し、そのほかに複数本の薄いバンドが観察された。MALDI-TOF-MS で観測された生成物の分子量は 27,732 Da であった。以上のことより、GPPG を主成分とする生成物が得られたと言える。

### 3. 2. 自己集合体の形成

GPG および GPPG を、濃度が 20 μM となるように冷水に溶解させた。15℃の条件で CD スペクトルを測定したところ、どちらのポリペプチドにおいても 200 nm に負のバンド、224 nm 付近に負のショルダーが現れた (図 3)。これらはそれぞれ、ランダムコイル構造および β-turn 構造に由来しており、(VPGXG)<sub>n</sub> 配列を有する ELP に特徴的なスペクトルである<sup>4,9)</sup>。この溶液を 37℃に加温すると、スベ

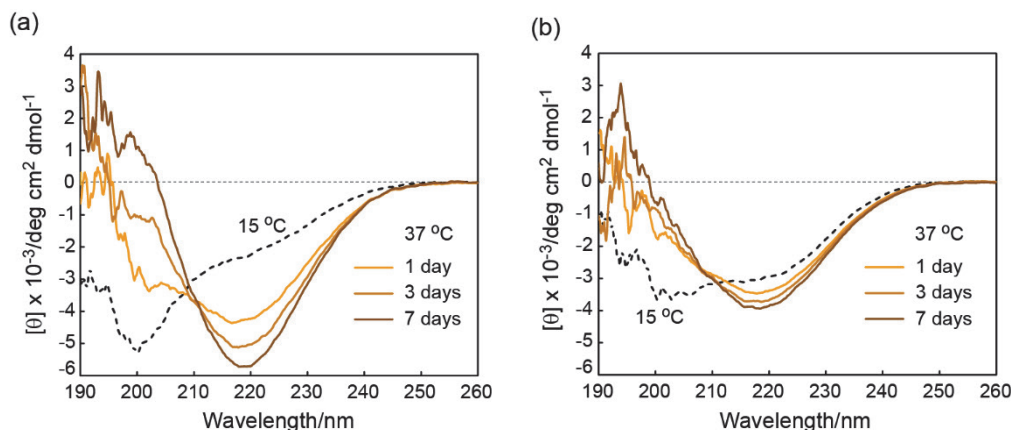


図3 (a) GPG および (b) GPPG の CD スペクトル。

クトルは経時的に変化した。どちらの場合にも、198 nm の楕円率が正の方向へ増大する一方、218 nm の楕円率は負の方向に増大した。これらは、 $\beta$ -sheet 構造の割合が1週間にわたり増加し続けていることを示している。1モル残基当たりの楕円率を比較すると、 $\beta$ -sheet 構造に由来する楕円率の強度はGPGのほうがGPPGよりも大きかった。

37 °C で1週間静置したサンプルをマイカ基板に滴下したのち乾燥させ、AFMで観察した結果を図4に示す。GPGはナノファイバーへと組織化しており、ファイバー径は  $42.3 \pm 7.5$  nmであった。45 °C で自己集合させた場合<sup>4)</sup>と比較するとやや不明瞭ではあるが、数珠状のモルフォロジーを有していた。これに対し、GPPGは直径  $25.6 \pm 7.4$  nmのナノ粒子を形成しており、その凝集体も多く見られた。

ポリペプチド濃度を0.4 wt%に上昇させ、37 °Cで1日間インキュベートすると、GPGは半透明のハイドロゲルを形成した。一方、GPPGは同じ条件で沈殿を生じた。ポリペプチド濃度を0.3 wt%として37 °Cに昇温すると、GPG、GPPGの両方において沈殿を生じた。これに対し、総ポリペプチド濃度を0.3 wt%に固定した条件でGPGとGPPGを9:1(w/w)の割合で混合すると、1日後に半透明のハイドロゲルを形成した(図5)。GPGとGPPGを8:2、7:3で混合した場合には、粘調な液体が得られた。

#### 4. 考察

ポリペプチド濃度が20  $\mu$ Mの条件におけるCDスペクトル測定の結果から、GPGとGPPGはともに37 °Cの水中で、経時的に $\beta$ -sheet構造を形成することがわかった(図3)。GPPGにおいて1モル残基当たりの $\beta$ -sheet構造形成割合が低いのは、 $\beta$ -sheet構造を形成するG配列が分子中で占める割合が、GPG(26%) > GPPG(15%)であることに起因すると考えられる。両ポリペプチドが、生理学的温度に応答して分子間自己集合の駆動力となる $\beta$ -sheet構造を形成したものの、GPGはナノファイバーへと組織化し、GPPGはナノ粒子およびナノ粒子の凝集体へと自己集合し

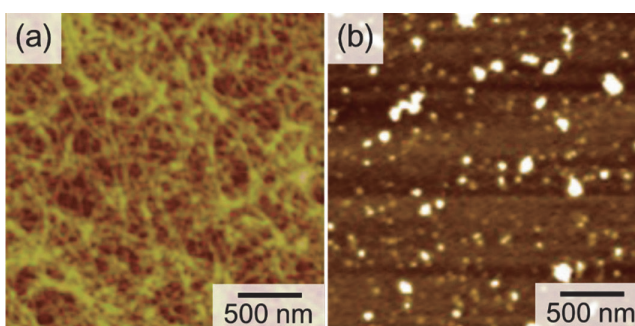


図4 (a) GPG および (b) GPPG が形成する集合体の AFM 像。



図5 GPGとGPPGを9:1(w/w)で混合して得られるハイドロゲルの写真(ポリペプチド濃度0.3 wt%)。

た(図4)。GPGにおいては、分子中央のP配列が $\beta$ -turnの集積構造である $\beta$ -spiral構造をとるため、棒状分子として振る舞うと推測される。疎水的なP配列は水中で集合してナノ粒子を形成するとともに、棒状の形態により互いに配列する。P配列に結合したG配列は粒子の両極に位置するようになり、他の粒子と $\beta$ -sheet構造を形成して数珠状ナノファイバーへと組織化すると考えられる。一方、GPPGにおいてはP配列がフレキシブルなリンカー配列で接続されており、容易に曲がることのできる。このため、G配列は粒子中でよりランダムに配置し、粒子内部で $\beta$ -sheet構造を完結させたり、あらゆる方向に粒子間 $\beta$ -sheet構造を形成することが可能となる。この結果、GPPGはナノ粒子

状、あるいはナノ粒子の凝集体へと自己集合したと考えられる。今回検討を行った 20  $\mu\text{M}$  の濃度において、GPPG は当初の狙いであった分岐を持つナノファイバーへと組織化することはなかったが、高度に分岐した極端な状態としてナノ粒子の凝集体を形成したとも言える。

GPG が分岐の少ない数珠状ナノファイバーへ、GPPG がナノ粒子凝集体へと集合するのであれば、両者を適切な割合で混合することにより、分岐構造を持つナノファイバーが得られるのではないかと考えた。ファイバーの分岐構造は、マクロスコピックな溶液の粘弾性に影響を与えると予想し、ポリペプチド濃度を増加させて溶液のゲル化の有無を調べた。ポリペプチド濃度を 0.4 wt% (GPG : 238  $\mu\text{M}$ , GPPG : 144  $\mu\text{M}$ ) とし、37  $^{\circ}\text{C}$  で 1 日インキュベートしたところ、GPG を含有する水溶液は流動性を失って半透明のゲルを形成した。GPPG は同じ条件で沈殿を生じた。濃度 20  $\mu\text{M}$  のときの結果から類推すると、GPG ではナノファイバーの絡み合いによってゲルを生じ、GPPG は凝集体を生じたと考えられる。ポリペプチド濃度を 0.3 wt% に低下させた場合、GPG でも沈殿を生じ、水溶液のゲル化には至らなかった。しかし、GPG と GPPG を重量比が 9 : 1 となるように混合した場合、ゲルを形成した (図 5)。8 : 2, 7 : 3 で混合した場合には粘調な液体となり、いずれも GPG または GPPG 単独の場合と異なる結果が得られた。GPG と GPPG の混合により、GPG が単独で形成するナノファイバーと比較して分岐構造が導入されてネットワーク構造を構築し、より低濃度でのゲル化が達成された可能性を考えている。

これまでに、架橋剤を用いて化学架橋されたエラスチン ELP ゲルは報告されているものの<sup>10-12)</sup>、疎水性が高く不均一に凝集しやすいエラスチンを均一なゲルとすることは根本的に難しく、報告例は少ない。また、化学架橋ゲルでは刺激に対するゾル-ゲル転移を示さない。エラスチンの LCST を利用して温度応答性の物理ゲルを作製するアイデアは以前より存在していたが、実現は容易ではなかった。エラスチンや ELP を LCST 以上に加熱すると、ゲル化ではなく相分離を起こして沈殿してしまうからである。Conticello らは、ELP ゲルの創製に向けて親水性を高めたブロックポリペプチドを合成したが、ゲル形成には 25 wt% もの高濃度の ELP が必要であった<sup>13)</sup>。近年では Olsen らが、 $([I_{0.6}V_{0.4}] \text{ PAVG})_n$  の配列を持つ ELP が相分離せずに均一なゲルを形成することを報告しているが、この場合にもゲル化には 10 wt% 以上のポリペプチドを要する<sup>14)</sup>。エラスチン配列に、シルク由来配列<sup>15)</sup> や金属イオン結合配列<sup>16)</sup> などの機能性配列を結合させた融合ペプチドからなる刺激応答性の物理ゲルも作製されている。この場合、架橋点となるのはエラスチン以外の配列であり、エラスチンの LCST は分子の局所的な濃度を高めるために補

助的に利用されているにすぎない。シルクエラスチンの場合、ゲル形成に必要な濃度は 4 wt% と報告されている<sup>15)</sup>。いずれにしても、1 wt% 以下での物理ゲル形成は ELP 研究では報告されておらず、本研究にて達成された 0.3 wt% でのゲル化は画期的であると言える。本 ELP ゲルは、均一なナノファイバーであり、水との接触界面積が大きい数珠状のモルフォロジーを持つことが、低濃度でのゲル化につながったと考えられる。本研究で開発した ELP は制限酵素サイトや精製用タグ配列を除けば、all-elastin 由来であるため、エラスチンが本来有する力学特性を最大限に再現できる材料となることが期待される。今後、GPG と GPPG の混合比を変化させることで、粘弾性特性を連続的に変化させることを試みる予定である。

## 5. 総括

本研究では、新規な ELP である GPPG を遺伝子工学の手法を用いて合成した。GPPG は、GPG がナノファイバー化する温度条件においてナノ粒子状およびナノ粒子の凝集体へと自己集合し、当初予想した分岐ナノファイバーは得られなかった。しかし、凝集体は数珠状ナノファイバーが多数の分岐を生じた極端な状態であると考え、GPG と GPPG を混合することにより GPG ナノファイバーへ分岐を導入することを試みた結果、GPG と GPPG を 9 : 1 (w/w) で混合することで、0.3 wt% という低濃度でハイドロゲルを得ることができた。筆者らはこれまでに、GPG の C 末端に様々な機能性モチーフを付加することより、化学架橋可能なナノファイバー<sup>6)</sup>、あるいは抗菌性<sup>7)</sup> や細胞接着性を有するナノファイバーの創製に成功してきた。これらの GPG 誘導体を適宜混合したり、さらに新しい GPG 誘導体と組み合わせることで、様々な機能性ゲルが得られるであろう。生理食塩水やリン酸緩衝液等を溶媒とするハイドロゲル形成など、まだ課題は残されているものの、本研究で得られた温度応答性 ELP ゲルは、体温でゲル化する創傷被覆材や、各種細胞の 3 次元培養の担体、幹細胞の分化制御、人工血管の構成要素をはじめとする幅広い応用展開が期待される。

## 謝辞

AFM 観察でご協力をいただいた名古屋大学関隆広先生、永野修作先生、北村一晟氏に深く感謝申し上げます。

## (引用文献)

- 1) Mithieux SM, Weiss AS: Elastin, *Adv. Protein Chem.*, 70, 437-461, 2005.
- 2) Rnjak J, Wise SG, Mithieux SM, Weiss AS: Severe burn injuries and the role of elastin in the design of dermal substitutes, *Tissue Eng. B Rev.* 17, 81-91, 2011.

- 3) Urry DW,: Molecular machines: How motion and other functions of living organisms can result from reversible chemical changes, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32, 819-841, 1993.
- 4) D. H. T. Le, R. Hanamura, D.-H. Pham, M. Kato, D. A. Tirrell, T. Okubo, A. Sugawara-Narutaki, *Biomacromolecules*, 14, 1028-1034, 2013.
- 5) Le DHT, Okubo T, Sugawara-Narutaki A.: "Beaded nanofibers assembled from double-hydrophobic elastin-like block polypeptides: Effects of trifluoroethanol, *Biopolymers*, 103, 175-185, 2015.
- 6) Le DHT, Kawakami R, Teraoka Y, Okubo T, Sugawara-Narutaki A.: Cross-linking assisted stabilization of beaded nanofibers from elastin-like double hydrophobic polypeptides, *Chem. Lett.*, 44, 530-532, 2015.
- 7) Anh TTH, Xing M, Le DHT, Sugawara-Narutaki A, Fong E.: Elastin-based silver-binding proteins with antibacterial capabilities, *Nanomedicine*, 8, 567-575, 2013.
- 8) 鳴瀧彩絵,: 生体模倣ブロックポリペプチドの段階的自己集合, *Colloid & Interface Commun.*, 40(2), 12-14, 2015.
- 9) Urry DW, Shaw RD, Prasad KU.: Polypentapeptide of elastin: Temperature dependence of ellipticity and correlation with elastomeric force, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 130, 50-57, 1985.
- 10) Lim DW, Nettles DL, Setton LA, Chilkoti A.: Rapid cross-linking of elastin-like polypeptides with (hydroxymethyl)phosphines in aqueous solution, *Biomacromolecules*, 8, 1463-1470, 2007.
- 11) Trabbic-Carlson K, Setton LA, Chilkoti A.: Swelling and mechanical behaviors of chemically cross-linked hydrogels of elastin-like polypeptides, *Biomacromolecules*, 4, 572-580, 2003.
- 12) Zhang YN, Avery RK, Vallmajo-Martin Q, Assmann A, Vegh A, Memic A, Olsen BD, Annabi N, Khademhosseini A.: A highly elastic and rapidly crosslinkable elastin-like polypeptide-based hydrogel for biomedical applications. *Adv. Funct. Mater.*, 25, 4814-4826, 2015.
- 13) Wright ER, McMillan RA, Cooper A, Apkarian RP, Conticello VP.: Thermoplastic elastomer hydrogels via self-assembly of an elastin-mimetic triblock polypeptide, *Adv. Funct. Mater.*, 12, 149-154, 2002.
- 14) Glassman MJ, Olsen BD.: Arrested phase separation of elastin-like polypeptide solutions yields stiff, thermoresponsive gels, *Biomacromolecules*, 16, 3762-3773, 2015.
- 15) Dandu R, Von Cresce A, Briber R, Dowell P, Cappello J, Ghandehari H.: Silk-elastinlike protein polymer hydrogels: Influence of monomer sequence on physicochemical properties, *Polymer*, 50, 366-374, 2009.
- 16) Ghoorchian A, Simon JR, Bharti B, Han W, Zhao X, Chilkoti A.: Bioinspired reversibly cross-linked hydrogels comprising polypeptide micelles exhibit enhanced mechanical properties, *Adv. Funct. Mater.*, 25, 3122-3130, 2015.