

# 特異的に生体コラーゲンに結合するペプチドの分子設計・合成と応用

早稲田大学先進理工学部化学・生命化学科

小出 隆規

Many collagen-binding peptides have been reported to date. However, most of them seem to be below a practical level. Some do not possess enough affinity to detect collagen, and the others show little binding-specificity to collagen. We report here novel collagen-binding peptides that hybridize to denatured portions of collagen. They are parallel dimers of collagen-like peptides both ends of which are tethered by covalent linkages. The peptides, named cyclic collagen-mimetic peptides (cCMPs), showed approximately two orders of magnitude higher collagen-binding affinity than single-chain counterparts reported by Yu and co-workers. The collagen-detecting sensitivity of cCMPs was comparable to commercially available anti-collagen polyclonal antibodies in western blotting, and fluorescent staining of cultured cells. No collagen type selectivity was found, and the peptide recognized all types of collagen tested. In contrast, the peptides showed strong preference to denatured collagen. The results strongly support the common hybridizing mechanism targeting unfolding strands of collagen triple helix. Molecular dynamic simulations of the hybridized products suggested that the cCMP-collagen hybrid has higher stability than that of the corresponding hybrid with single-chain CMP. Some diseases such as osteoporosis and malignant cancer are suggested to be accompanied by collagen denaturation and/or degradation. It is also suggested that inflammation and mechanical stress also induce collagen denaturation. We expect practical applications of cCMPs to detecting conformational status of collagen *in vivo*.

## 1. 緒言

コラーゲンは動物体内のいたるところに豊富に存在するタンパク質である。コラーゲンに特異的に結合する分子は、生体内でのコラーゲンの検出や描出あるいは、薬物をコラーゲンリッチな組織に停留させるといった目的で有用であると期待されている。これまでに多くのコラーゲン結合ペプチドが様々なソースから探索されてきたが、実用に耐える特異性あるいは親和性を有するものはほとんどなかった。その中で、Yu (ユタ大学) らのグループは、Gly-Pro-Hyp (Hyp: 4-ヒドロキシプロリン)の繰り返し構造を持つ、典型的なコラーゲンモデルペプチド (CMP) が、変性コラーゲンに結合することを見出し、これを上記のような用途に利用しようとする研究を展開している。CMPはコラーゲンの三重らせん構造がほどけた部位を認識し、ハイブリッド三重らせんを形成することで結合すると考えられている (図1a)。彼らはこのCMPを用いて、周辺でコラーゲンの分解が亢進していると考えられている悪性腫瘍を埋め込んだマウスの *in vivo* 蛍光イメージングに成功している<sup>1)</sup>。また彼らは、マウスの尾の腱を引っ張ることによって腱のコラーゲンが変性することを定性的に評価することに成功している<sup>2)</sup>。しかしながら、CMPは、古くからコラーゲン

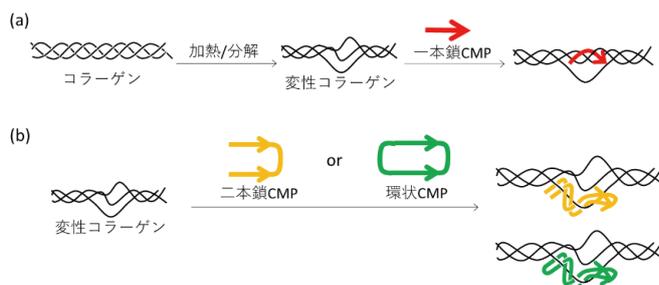


図1 CMPの変性コラーゲン結合モデル  
a) 一本鎖、b) 二本鎖および環状CMP

モデルとして利用されてきたことからわかるとおり、水溶液中で容易に自己集合して、三重らせんを形成してしまう。そして、一旦三重らせんを形成したCMPは、コラーゲン結合能を失うという問題点がある。

今回私たちはコラーゲン結合ペプチドとしてのCMPの能力を格段に向上させることを目的として、CMPを二本平行に束ねた二本鎖CMPを設計した。一本鎖のCMPは変性コラーゲン中の二本のポリペプチド鎖と三重らせんを形成する (1+2 hybrid) と考えられる。その一方で二本鎖CMPは変性コラーゲンの一本のポリペプチド鎖と三重らせんを形成する (2+1 hybrid) と期待できる (図1b)。私たちは三重らせん分子内部のペプチド間を共有結合で架橋させると三重らせん構造が安定化する<sup>3-6)</sup> ことから、2+1 hybridの方が1+2 hybridよりも安定であり、結果として二本鎖CMPは一本鎖CMPよりも高い結合能を持つと考えた。また、二本鎖CMPのもう片方の末端も束ねた環状CMPも同時に合成し、これらのコラーゲン結合能を評価した。



Molecular design, synthesis and application of the peptides that specifically recognize collagen

Takaki Koide

Department of Chemistry and Biochemistry,  
School of Advanced Science and Engineering,  
Waseda University

## 2. 方法

### 2.1. 環状CMPの合成

ペプチド鎖はFmoc固相法を用いて構築した。C末端側にチロシン残基を導入し、ペプチド溶液の濃度を吸光度から求められるようにした<sup>7)</sup>。枝分かれ部分にはFmoc-Lys (Fmoc)-OHを用い、ペプチドを二本に分岐させた。分岐部分のスペーサーとして6-アミノヘキサン酸 (Ahx) を導入した。コラーゲン様配列としては三重らせんモデルして最も典型的なPro-Hyp-Glyを採用し、トリペプチドの繰り返し数が4回ものから7回ものまでを合成した。また、N末端側にCys (Acm) 基を導入し、ジスルフィド結合を用いて環化できるようにした。N末端はピリジンと無水酢酸を用いてアセチル化した。ペプチド鎖は脱保護カクテル (TFA : H<sub>2</sub>O : *m*-cresol : thioanisole : ethanedithiol = 82.5 : 5 : 5 : 5 : 2.5, v/v) を用いて脱保護すると同時に樹脂から切り離した。

二本鎖ペプチドは6Mグアニジン塩酸塩下においてヨウ素で処理することによりジスルフィド結合を形成させることで環化した。得られた粗ペプチドは、逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて精製した。環状CMPは検出のため、ビオチンまたはフルオレセインを標識した。

### 2.2. enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)によるコラーゲン結合能の評価

コラーゲン溶液 (AteloCell I-PC, 高研) を10mM酢酸水を用いて10μg/mLに希釈し、溶液を95℃で5分間加熱処理を加えたもの(変性コラーゲン溶液)と、加えてないもの(コラーゲン溶液)の二種類を用意した。96-well plateにこれらの溶液を50μLずつ添加し、2日間放置することでそれぞれをコートした。0.5%スキムミルク溶液を用いてブロッキング処理を施した後、5μg/mLに調整したビオチン標識環状CMP溶液を添加した。その際、CMP溶液を使用直前に95℃で5分間処理し4℃で1分間冷却したものと、加熱処理を施さないものの2種類を用いた。西洋わさびペルオキシダーゼを結合させたストレプトアビジンをさらに結合させたのち、ABTSと反応させて発色させ、405nm

における吸光度を測定することでコラーゲン結合能を評価した。

### 2.3. 環状CMPを用いたコラーゲンの検出(western blotting)

コラーゲン検出能の比較においては、サンプルとしてI型コラーゲンを用いた。I-V型コラーゲンの検出においては、300ngのI-V型コラーゲンに対してタンパク質分子量マーカーを混合したのを用いた。これらサンプルを8% SDS-PAGEにより分離したのち、ニトロセルロース膜上に転写した。その後5%スキムミルク溶液を用いてブロッキングし、20μg/mLのビオチン標識環状CMP7、一本鎖CMP溶液または抗コラーゲン抗体を添加し、室温で1時間放置した。環状CMP7および一本鎖CMPは使用直前に95℃で5分間加熱した。続いてCMPを添加したものに対してはビオチン-ストレプトアビジン相互作用を用いてalkaline phosphatase (AP) を標識し、抗体を添加したのものに対してはgoat anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody-AP conjugatesを添加して30分間結合させた。続いてAP-conjugate substitute kit (BioRad) を用いてバンドを検出した。また、コラーゲンを転写したニトロセルロース膜は同時に、CBB溶液を用いて染色した。

### 2.4. コラーゲンの蛍光染色

マウス線維芽細胞(MEFs)はL-グルタミン酸、フェノールレッド含有DMEM (low-glucose) に2% FBS、100units/mLペニシリン-ストレプトマイシンおよび200μM L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩を添加した培地で3日間培養したのを用いた。

線維芽細胞が分泌したコラーゲンの検出に際し、コラーゲンの変性を目的として95℃に加熱したPBSを添加した。細胞は4%パラホルムアルデヒドで15分間処理することで固定し、3% BSA溶液で1時間処理することでブロッキングした。その後、蛍光標識した一本鎖CMP、環状CMP7を95℃で5分間加熱し氷上で1分間冷却したもの、または抗I型コラーゲン抗体を添加し1時間室温で結合させた。抗体を添加した細胞に関してはさらに、goat anti-rabbit

表1 合成したCMPの構造

名称	構造	n
一本鎖	Ac-(Pro-Hyp-Gly) <sub>n</sub> -Ahx-Tyr-Lys-NH <sub>2</sub>	10
二本鎖CMP4		4
二本鎖CMP5	Ac-(Pro-Hyp-Gly) <sub>n</sub> -Ahx \	5
二本鎖CMP6	Ac-(Pro-Hyp-Gly) <sub>n</sub> -Ahx-Lys-Tyr-Lys- NH <sub>2</sub>	6
二本鎖CMP7		7
環状CMP4		4
環状CMP5	Ac-Cys-Ahx-(Pro-Hyp-Gly) <sub>n</sub> -Ahx \	5
環状CMP6	Ac-Cys-Ahx-(Pro-Hyp-Gly) <sub>n</sub> -Ahx-Lys-Tyr-Lys- NH <sub>2</sub>	6
環状CMP7		7

IgG (H+L) secondary antibody-FITC conjugates を 30 分間結合させた。細胞は共焦点顕微鏡で観察した。

細胞内のコラーゲンの染色に際しては、細胞を固定した後に 0.5% Triton X-100 で 5 分間透過処理を施し、上記の方法でブロッキング処理を施した。その後蛍光標識した環状 CMP7 および抗コラーゲン抗体 (ラビット) を anti-GM130 (Mouse) antibody (ゴルジ体マーカー)、または anti-KDEL (Mouse) antibody (小胞体マーカー) 存在下で上記の方法で添加し、1 時間結合させた。続いて細胞に goat anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody-FITC conjugates および goat anti-mouse IgG (H+L) secondary antibody, Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 conjugates を添加し、30 分結合させた。細胞は共焦点顕微鏡で観察した。

### 3. 結果

#### 3.1. 環状 CMP7 は変性コラーゲンに対して強い結合能を示す

水溶液中 4℃ で保存しておいたビオチン標識 CMP の I 型コラーゲンに対する結合能を ELISA により評価したところ、これらはほとんどコラーゲンに結合しなかった (図 2a)。そこで一本鎖 CMP に関する先行研究<sup>1)</sup>を参考に CMP 溶液を使用直前に加熱変性させたところ、CMP のコラーゲンに対する有意な結合が検出された (図 2b)。3 種の分子デザイン中では環状 CMP がもっとも結合能が高く、CMP 内部の Pro-Hyp-Gly 繰り返し数が多いほど顕著な結合能を示した。また、これら CMP はコラーゲンよりも変性コラーゲンに強く結合した。この結果は CMP が変性コ

ラーゲンの三重らせん構造がほどけた部分に結合していることを示唆している。さらに環状 CMP7 と一本鎖は、コラーゲンに対して濃度依存的な結合を示した (図 2c)。この結果から環状 CMP7 のコラーゲンおよび変性コラーゲンに対する解離定数 ( $K_D$ ) を算出したところ、変性コラーゲンに対して  $6.6 \times 10^{-8} M$ 、コラーゲンに対して  $1.1 \times 10^{-7} M$  と求められた。また、一本鎖 CMP は最大結合量が環状 CMP7 と同じだと仮定することで、変性コラーゲンに対して  $9.5 \times 10^{-6} M$  と算出されたが、コラーゲンに対しては求めることができなかった。これらの結果から環状 CMP7 は既報の一本鎖 CMP よりも 100 倍以上結合能が高いことが示された。

これらの CMP の 4℃ における二次構造を円偏光二色性 (CD) スペクトル分析したところ、225 nm における正のコットン効果が観測された<sup>8)</sup>。この結果から CMP は 4℃ において自己集合して三重らせん構造を形成していると考えられ、図 2a と合わせて考えると自己集合産物はコラーゲン結合能をもたないことが示唆された。よって以降の実験では CMP 溶液を使用直前に加熱してペプチド同士の自己集合を解消させてから使用した。

#### 3.2. 環状 CMP7 は western blotting でコラーゲンを検出することができる

環状 CMP7、一本鎖 CMP および市販の抗コラーゲン抗体を用いて、I 型コラーゲンの検出感度を western blotting で比較した (図 3a)。結果環状 CMP7 は一本鎖よりも高い検出感度を示し、30 ng を泳動したコラーゲンの  $\alpha 1$  鎖と

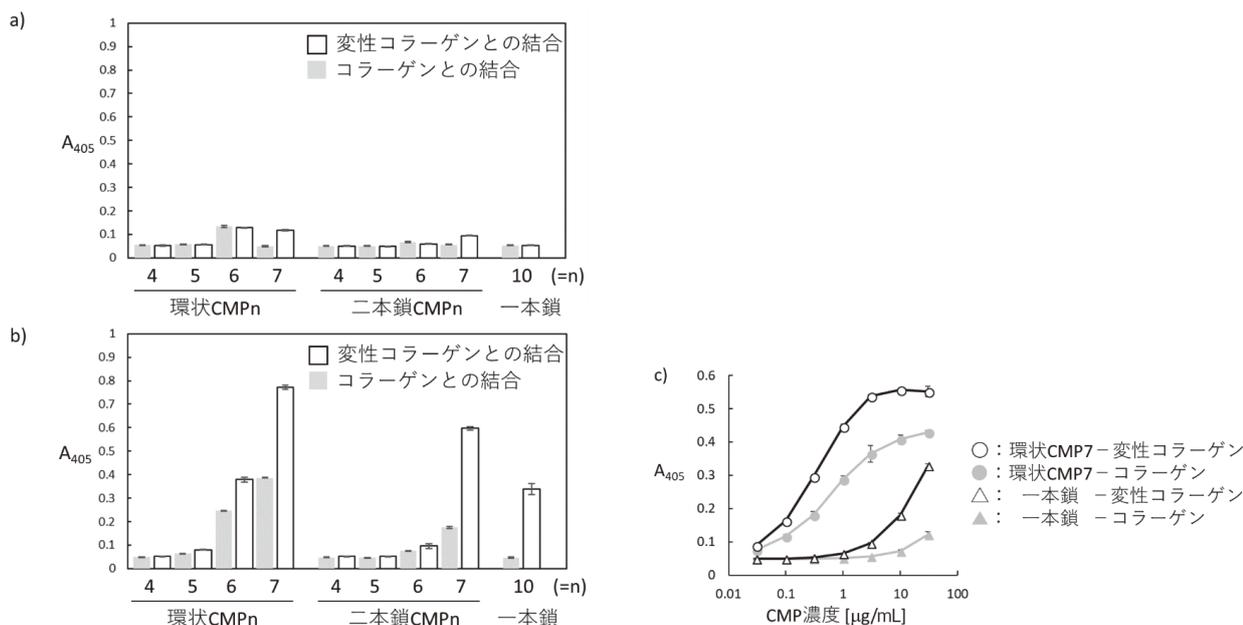


図 2 4℃ における CMP のコラーゲン結合能評価 (mean ± SD, n=3)  
 a) CMP 溶液非加熱、b) CMP 溶液を使用直前に 95℃ で 5 分間加熱、c) 環状 CMP7 と一本鎖の濃度依存的な結合

$\alpha 2$ 鎖をとともに見出し、 $\alpha 1$ 鎖に関しては10ngまで見出された。これは推奨濃度(1/1000倍希釈)の抗コラーゲン抗体よりも高い見出し感度であり、1/200濃度の抗コラーゲン抗体に匹敵した。また、環状CMP7は分子量マーカーとコラーゲンの混合溶液中からI-V型のコラーゲンを特異的に見出した(図3b)。この結果は環状CMP7がコラーゲン型間に共通するグリシンが三残基ごとに繰り返すアミノ酸配列を認識して結合していることを強く示唆している。

### 3.3. 環状CMP7は線維芽細胞が分泌したコラーゲンを検出することができる

蛍光標識した環状CMP7と一本鎖CMPを用いて線維芽細胞が分泌したコラーゲンの見出しを試みた。その際、分泌されたコラーゲンを熱変性させることを目的として、細胞固定処理前に95°Cに加熱したPBSを添加したサンプルを用意した。結果として30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の環状CMP7は、熱変性した場合のみコラーゲン線維を強く見出し、その見出し感度はCMP濃度依存性であった(図4a)。それに対して、

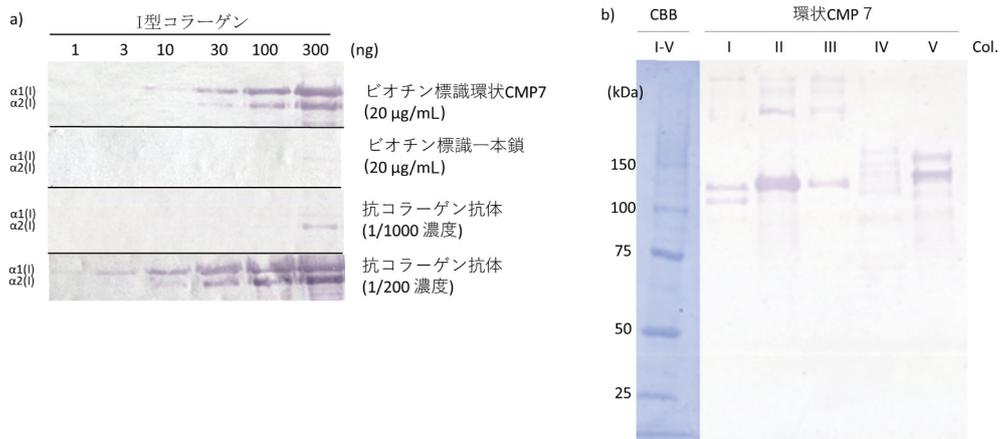


図3 環状CMP7を用いたコラーゲンの見出し

a) 環状CMP7、一本鎖、抗コラーゲン抗体の、コラーゲン見出し感度の比較; b) 環状CMP7を用いたI-V型コラーゲンの見出し

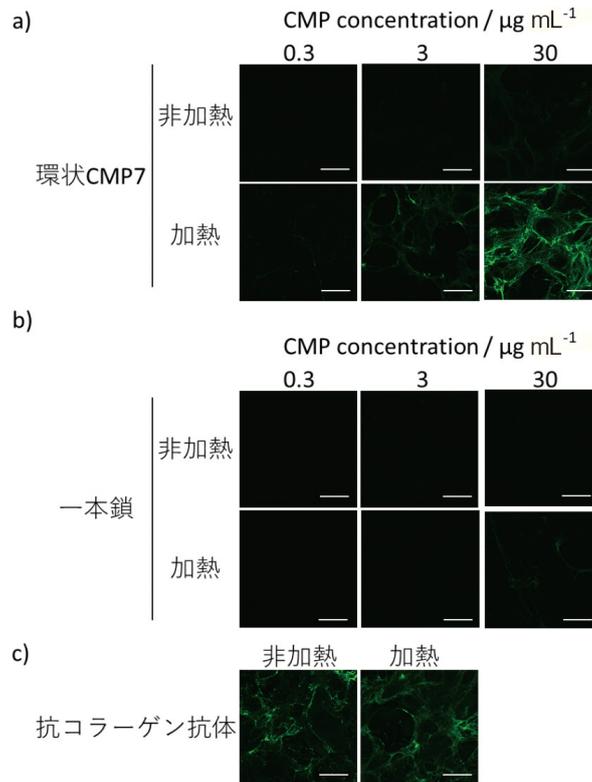


図4 線維芽細胞が分泌したコラーゲンの見出し (scale bar : 50 $\mu\text{m}$ )  
a) 環状CMP7、b) 一本鎖CMP、c) 抗コラーゲン抗体

30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の一本鎖CMPは同濃度環状CMP7の1/100程度のシグナルしか観測されなかった (図4b)。この結果は *in vitro* で環状CMP7は一本鎖CMPよりも100倍程度変性コラーゲンの検出能が高いことを示している。また、抗コラーゲン抗体は熱変性の有無に関わらずコラーゲン線維を検出した (図4c)。以上の結果から環状CMP7は変性したコラーゲンを高感度で描出できることが示された。

### 3. 4. 環状CMP7を用いて線維芽細胞の小胞体に存在するプロコラーゲンのフォールディング中間体を検出することができる

フルオレセイン標識した環状CMP7と抗コラーゲン抗体を用いて、細胞固定処理および透過処理を施した線維芽細胞内部のプロコラーゲンの検出を試みた。図5aに示したように、環状CMP7で検出した際のシグナルは抗KDEL抗体が検出した小胞体のシグナルと重なった。一方、抗コラーゲン抗体で検出した際は抗GM130抗体が検出したゴルジ体のシグナルと重なった (図5b)。この結果は、環状CMP7が抗コラーゲン抗体と異なる特異性をもってプ

ロコラーゲンを認識していることを示している。また、プロコラーゲンが小胞体内部で三重らせんにフォールディングされ、その後ゴルジ体に輸送されることを踏まえると<sup>10)</sup>、環状CMP7は、抗体では検出することが難しい小胞体内部の三重らせん中間体の特異的に検出したと考えられる。

### 3. 5. 環状CMPとコラーゲンのハイブリッド三重らせんは、一本鎖CMPとコラーゲンのそれらよりも安定である

環状CMPが、一本鎖CMPよりもなぜ高い変性コラーゲン結合能を示すのかを調べるために、Ac-(Pro-Hyp-Gly)<sub>7</sub>-OH (一本鎖CMP7) と環状CMP7、二本鎖CMP7または一本鎖CMP7の複合三重らせんをモデル化した。そしてこれらのモデルが三重らせんを形成している場合とほどけている場合のエネルギー差 ( $\Delta G_{\text{bind}}$  score) を、分子動力学 (MD) を用いて *in silico* で求めることで、それぞれのCMPの結合エネルギーを評価した。結果として環状CMP7の  $\Delta G_{\text{bind}}$  scoreは3つのモデルの中で最も小さかった ( $\Delta G_{\text{bind}}$  (環状CMP7) :  $-147.43 \text{ kcal mol}^{-1}$ ,  $\Delta G_{\text{bind}}$  (二本鎖CMP7) :

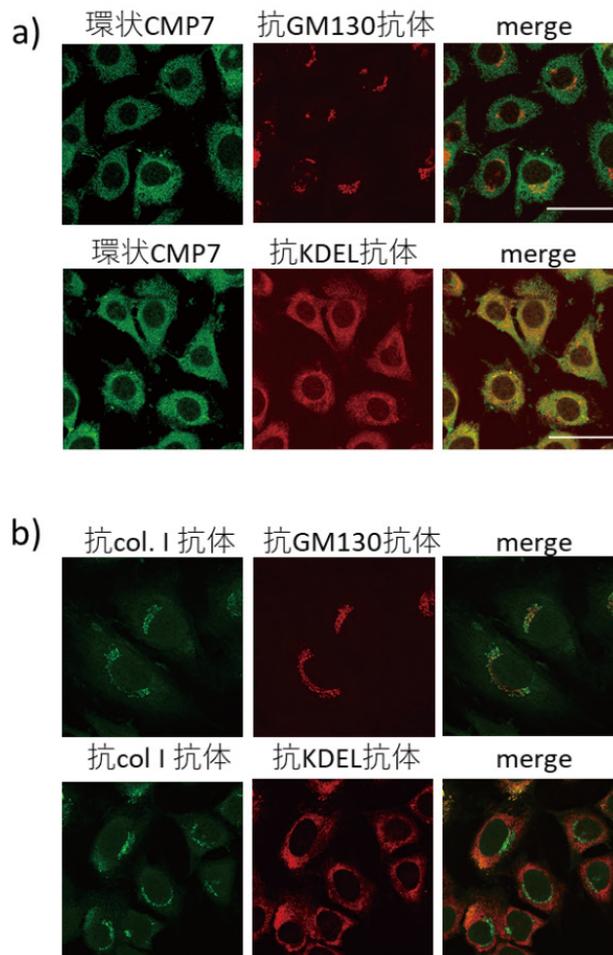


図5 線維芽細胞内部のプロコラーゲンの検出  
 a) 環状CMP7、b) 抗コラーゲン抗体

$-138.90 \text{ kcal mol}^{-1}$ ,  $\Delta G_{\text{bind}}$  (一本鎖CMP7) :  $-128.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ )。これは環状CMPが、当初の期待どおり、他の2つのCMPよりも安定な三重らせんハイブリッドを形成することを示唆している。

#### 4. 総括

私たちは、コラーゲンに特徴的な Gly-Pro-Hyp 繰り返し配列を持つペプチドを二本平行に束ねて環化することで、変性コラーゲンに対して特に高い結合能を持つ新規化合物を開発した。その結合能はELISAとwestern blottingにより既報の一本鎖CMPよりも100倍程度高いことが示された。このペプチドを用いて、western blottingではI-V型までの全てのコラーゲンを検出できることから、環状CMPの認識配列はコラーゲンに共通の Gly-Xaa-Yaa の繰り返し配列であることが示唆された。環状CMPは細胞が分泌したコラーゲンの蛍光染色にも利用できることが示され、抗コラーゲン抗体では評価することができなかったコラーゲンの三重らせん変性の度合いを検出できる可能性が示された。また、環状ペプチドは抗コラーゲン抗体では検出することが難しい小胞体内部のプロコラーゲンを検出することができた。さらにMD計算により、環状CMPは他の2種類のCMPよりも安定なコラーゲン複合体を形成することが示された。これらの結果から環状ペプチドは*in vitro*で変性コラーゲンを検出できる有用な化合物であることが示されたと考える。また、ペプチドの内部配列を最適化することでコラーゲンの型特異性などを付与できる可能性がある。

今回我々が開発した新規ペプチドは、生体中のコラーゲンの蛍光イメージングや薬物のターゲッティングに応用できることが期待され、今後実験動物を用いた*in vivo*での検討を進めていく予定である。

#### 謝辞

本研究の遂行に協力いただいた瀧田講(早稲田大学)、藤井一徳(同)、増田亮(同)、門之園 哲哉(東京工業大学)の各氏に感謝する。また、本研究は公益財団法人コスメトロジー研究振興財団からの援助を得て実施された。

#### (引用文献)

- 1) Y. Li, C. A. Foss, D. D. Summerfield, J. J. Doyle, C. M. Torok, H. C. Dietz, M. G. Pomper, S. M. Yu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *109*, 14767-14772, 2012
- 2) J. L. Zitnay, Y. Li, Q. Zhao, B. H. San, B. Depalle, S. P. Reese, M. J. Buehler, S. M. Yu, J. A. Weiss, *Nature Communications*, *8*, 14913, 2017
- 3) G. Melacini, Y. Feng, M. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.*, *118*, 10339-10364, 1996
- 4) J. C. Horng, A. J. Hawk, Q. Zhao, E. S. Benedict, S. D. Burke, R. T. Raines, *Org. Lett.*, *8*, 4735-4738, 2006
- 5) I. C. Tanrikulu, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.*, *136*, 13490-13493, 2014
- 6) N. B. Hentzen, L. E. J. Smeenk, J. Witek, S. Riniker, H. Wennemers, *J. Am. Chem. Soc.*, *139*, 12815-12820, 2017
- 7) C. N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, T. Gray, *Protein Sci.*, *4*, 2411-2423, 1995
- 8) C. G. Long, E. Braswell, D. Zhu, J. Apigo, J. Baum, B. Brodsky, *Biochemistry*, *32*, 11688-11695, 1993
- 9) A. Miki, S. Inada, T. Baba, K. Kihira, H. Fukada, M. Oda, *Biosci. Biotech. Biochem.*, *79*, 1603-1607, 2015
- 10) S. Ito, K. Nagata, *Sem. Cell Dev. Biol.*, *62*, 142-151, 2017