

β-アミノ酸から構築する人工コラーゲンの創製

芝浦工業大学システム理工学部生命科学科

須原 義智

We synthesized a collagen-mimetic peptide for the purpose of increasing of biological and physical stability. Collagen is one of the most important proteins in mammalian body that maintains structural integrity of the organs and tissues. It has been used for a biomaterial such as regenerative medicine because of excellent biological compatibility. The consensus sequence of a general collagen model peptide is known as (X-Y-Gly)_n (for X and Y, it corresponds to proline (Pro) or hydroxyproline (Hyp)), however, it is unstable to hydrolytic enzymes. Most collagen used as biomaterials derived from animals, which can be supplied inexpensively and in large quantities. But many problems such as immune reactions and contamination of pathogens are existed. In order to increase the stability to hydrolytic enzyme and its thermodynamic stability and overcome those problems, we synthesized a collagen mimetic by converting one of the basic sequence Pro-Hyp-Gly into β-amino acid. In short, our mimetic contains one of β-proline (βPro), β-hydroxyproline (βHyp) and β-alanine (βAla), which is substituted from one of Pro, Hyp, and Gly in the consensus sequence.

The synthetic strategy was following. First, three amino acid residues of the basic sequence Pro-Hyp-Gly containing β-amino acid such as Pro-βHyp-Gly, βPro-Hyp-Gly and Pro-Hyp-βAla were respectively synthesized, and then they were repeatedly elongated to 30 amino acids residues such as (Pro-Hyp-Gly)₁₀, (Pro-βHyp-Gly)₁₀, (βPro-Hyp-Gly)₁₀, and (Pro-Hyp-βAla)₁₀ by a solid-phase synthesis method. The resulting collagen mimetics were investigated the helical formation and stabilities for application to biomaterials. Furthermore, we also studied an anti-skin cancer activity of those tripeptide residue to apply for a biologically active agent.

1. 緒言

コラーゲンは腱、軟骨、骨の有機間質、眼の角膜のような結合組織や皮膚に見られる重要なタンパク質であり、人工臓器をはじめとした再生医療へ応用するための材料として注目されている。コラーゲンを構成するトリペプチド (Collagene Tripeptide: CTP) は、X-Y-Glyを基本配列としてもっている (XおよびYは通常ProかHypが相当する) (図1A)。このCTPが多数繋がることで螺旋構造をもつポリペプチド鎖を形成する。さらに、その左巻きのポリペプチド鎖が寄り集まって右巻きの3本鎖ヘリックス構造をとることで、線維組織や骨格の構造維持に必要な性質を示すことが知られており、化学的にも興味深い物質である。しかしながら、天然のコラーゲンはα-アミノ酸から形成されているため、コラゲナーゼをはじめとした体内の加水分解酵素に対する安定性の問題などが実用化への大きな障壁となっている。これまでにコラーゲン三重鎖ヘリックスの構造や化学的安定化をはかるための類縁体研究がHolmgrenらやGoodmanらを中心に世界中で行われている^{1,2)}。それらは主にコラーゲンを構成するα-アミノ酸で

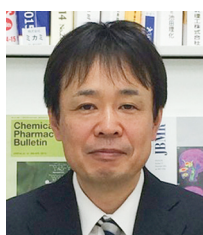
あるL-ヒドロキシプロリンの類縁体を合成して組み込むことが試みられているが未だ有効な手法は見つかっていない。

そこで我々はα-アミノ酸を、コラーゲンの元々の性質を保持しながら安定に存在できる人工コラーゲンの創製を目指した。体内の加水分解酵素に安定なペプチド化合物として、β-アミノ酸から構成されるβ-ペプチドが知られている。β-ペプチドは天然のα-ペプチドに最も近く、特有の堅いコンフォメーションをもっている。我々は、コラゲナーゼをはじめとする各種の加水分解酵素に耐性をもつ安定な人工コラーゲンの創製を目的として、コラーゲンを構成するα-アミノ酸をβ-アミノ酸に変換した化合物の創製を行った(図1B)。

2. 方法

2.1. コラーゲンペプチドに組み込むためのβ-アミノ酸の選択

本研究では、コラーゲンを構成する Pro-Hyp-Glyのそれぞれのα-アミノ酸を、β-アミノ酸に変換した人工コラーゲンを構築して天然のコラーゲンとの比較を行うことにした。これらβ-アミノ酸の中でグリシン (Gly) をβ-アミノ酸に変換したものは、市販のβ-アラニン (βAla) が相当する。一方、β-ヒドロキシプロリン (βHyp) やβ-プロリン (βPro) は、カルボン酸が環に沿って移動した1とカルボン酸側へ一炭素増炭した2の2種類が考えられる(図2)。本研究では合成の簡便さから、2の形式をとったβ-アミノ酸を合成して、Pro-Hyp-Gly に組み込んだβ-ペプチド化



Synthesis of artificial collagen-mimetic peptide derived from β-amino acids

Yoshitomo Suhara

Department of Bioscience and Engineering, College of Systems Engineering and Science, Shibaura Institute of Technology

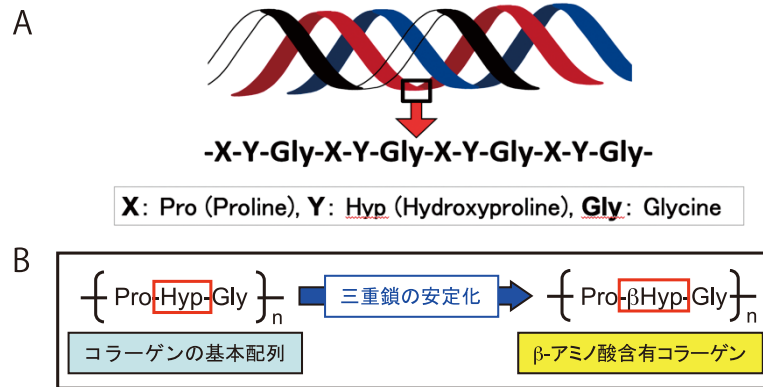


図1 コラーゲンの構造とβ-ヒドロキシプロリンを含む人工コラーゲンの創成

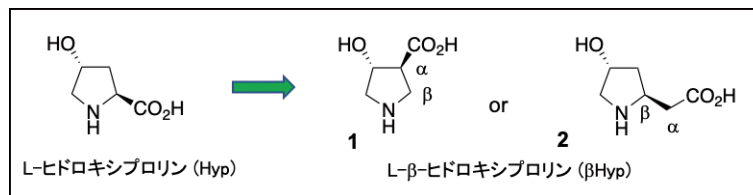


図2 α-アミノ酸からβ-アミノ酸へ変換した化合物

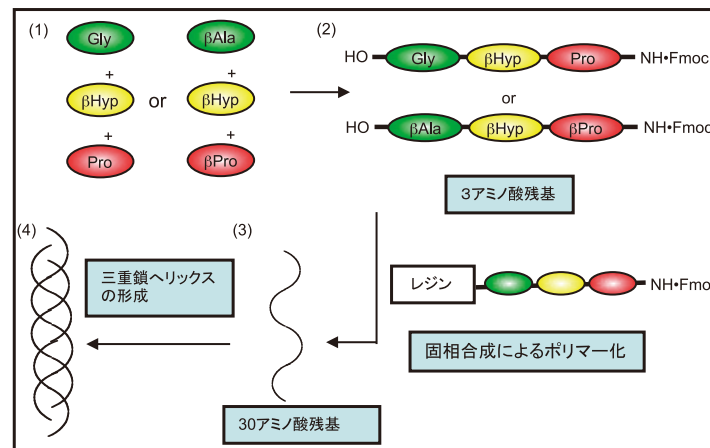


図3 人工コラーゲン(30mer)の合成方法

化合物を創製することにした。本研究では合成の簡便さから、2の形式をとったβ-アミノ酸を合成する。

2.2. コラーゲンペプチド鎖の合成方法

目的とするコラーゲンペプチド鎖の合成は図3に示す方法で行う。まず(1)上記で示したβ-アミノ酸を合成する。次に(2)Pro、Hyp、Glyもしくはそれらのβ-アミノ酸を液相法により順次カップリングして、N末端をFmocで保護したCTP残基(Fmoc•Pro-Hyp-Gly-OH、Fmoc•βPro-Hyp-Gly-OH、Fmoc•Pro-βHyp-Gly-OH、Fmoc•Pro-Hyp-βAla-OH)を得る。(3)無保護のC末端を樹脂に固定化し、自動ペプチド合成装置により上記のCTPとのカップリングを9回繰り返した後、樹脂からの切り離しと保護基の脱保護を同時に行い、HPLCで精製して目的とする

30merを得る。(4)得られたペプチド鎖から三重鎖ヘリックスを形成させる。以上で得られたコラーゲンペプチドの物理化学的性質を調べ、天然型とβ-アミノ酸を組み込んだペプチドの違いを検討した。

2.3. 扁平上皮がんにおけるCTPの生物活性解析

CTPは経口投与や皮膚塗布によって紫外線誘発性の皮膚障害が改善されたことが報告されている³⁾。しかし、CTPの作用メカニズムや紫外線が発症要因とされる皮膚がんの治療法は未だ報告されていない。現在の皮膚がんの治療法は副作用を起こすものが殆どであるため、低抗原性、低アレルギー性であるCTPと皮膚がんの関連を解明することができれば、低リスクの治療法開発への寄与が期待できる⁴⁾。そこで、本研究で合成したCTPに関して生理活

性物質への応用を検討する一助として、扁平上皮がん培養細胞株を用いて扁平上皮がんにおけるCTPの生物活性評価を行った。

3. 結果

3.1. ビルディングブロックとなるβ-アミノ酸 (βPro、βHyp) の合成

コラーゲンペプチドを合成するためのビルディングブロックとなるβHyp誘導体3は、図4に示すようなスキームで合成した。まず、Z-O-tert-butyl-L-hydroxyproline (5) を出発原料として、ジアゾメタン存在下でクロロギ酸エチルを反応させ、アゾ化合物6を80%収率で得た。次にトリフルオロ酢酸銀、トリエチルアミンによって転位反応により、60%収率で一炭素増炭したカルボン酸7に変換した。最後にアミノ基の保護基をZ基からFmoc基に付け替えることで目的とする3を得ることができた(図4)。

次にN末端をFmoc基で保護したβPro誘導体4は、図5に示すスキームで合成した。すなわち、(S)-pyrrolidin-2-ylmethanol (8) を出発原料として、そのヒドロキシ基にp-toluene sulfonyl基を導入して9とした後、KCNにより高収率でシアノ基に変換した10とした。その後、濃塩酸と酢酸の混合溶液によって、シアノ基を酸加水分解してカ

ルボン酸11とし、最後にアミノ基をFmoc基で保護することで、90%収率で目的とする4を得ることができた(図5)。

3.2. CTPの合成

上記のようにして合成したβ-アミノ酸をビルディングブロックとして、液相法によりN末端をFmocで保護したCTP残基(Fmoc•Pro-Hyp-Gly-OH、Fmoc•βPro-Hyp-Gly-OH、Fmoc•Pro-βHyp-Gly-OH、Fmoc•Pro-Hyp-βAla-OH)の合成を行った。

3.2.1. βProを組み込んだCTP(Fmoc•βPro-Hyp-Gly-OH) (12)の合成

βProを組み込んだCTP誘導体は、以下のように合成した。最初に、上記で合成したβPro(11)のアミノ基をZ基で保護した15を90%収率で得た。ペプチドカップリング試薬であるCOMUを用いて、15のカルボン酸残基とHyp(tBu-Hyp-Me)のアミノ基の間でカップリングさせ、74%の収率で二量体16とした。さらに16のメチルエステルを加水分解してカルボン酸17にした後、同様にGlyのアミノ基とカップリングさせて高収率で三量体18を得た。最後にN末端とC末端のZ基とBn基を脱保護して、N末端のみをFmoc基で保護することで、目的とするCTP(Fmoc•βPro-Hyp-Gly-OH) (12)を得ることに成功した(図6)。

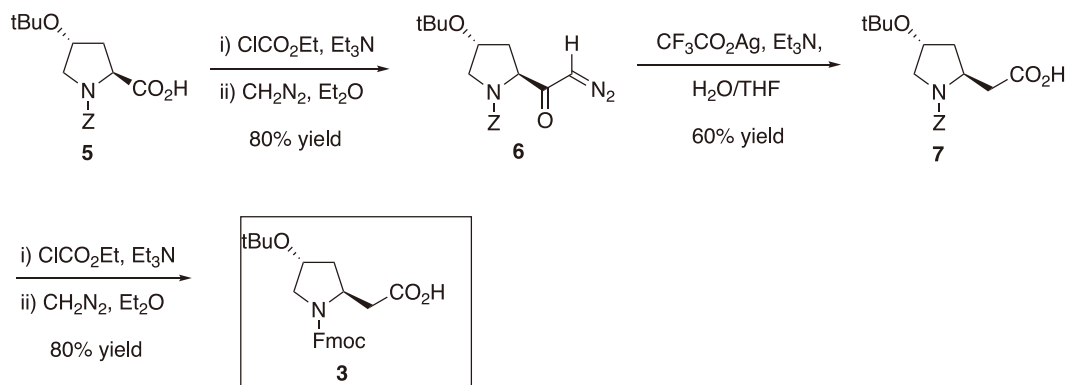


図4 βHyp誘導体の合成

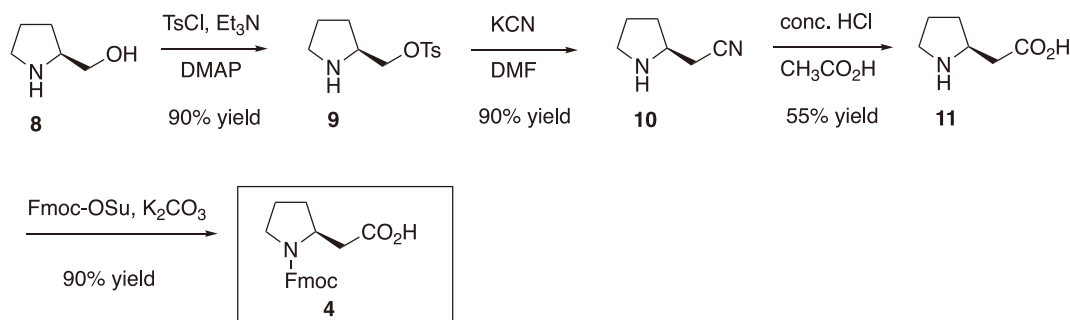


図5 βPro誘導体の合成

3. 2. 2. βHypを組み込んだCTP (Fmoc•Pro-βHyp-Gly-OH) (13)の合成

βHypを組み込んだCTP誘導体13の合成は、以下のような方法で行った。上記で合成した6をメチルエステル体19に変換した後、接触水素化により、アミノ基のみを無保護とした20を高収率で得た。この20のアミノ基をZ基で保護したPro (ZPro)のカルボン酸とカップリングさせ、60%の収率で二量体21とし、さらにアルカリ加水分解によりカルボン酸体22とした。22にC末端をベンジル基で保護したGlyをカップリングさせ三量体23を得た後、最

後にベンジル基とZ基の脱保護とN末端のFmoc化を行い、目的とするCTP (Fmoc•Pro-βHyp-Gly-OH) (13)を得ることができた(図7)。

3. 2. 3. βAlaを組み込んだCTP (Fmoc•Pro-Hyp-βAla-OH) (14)の合成

βAlaを組み込んだCTP誘導体14の合成は、以下のような方法で行った。まず、ZPro (24)を出発原料とし、これにHypをカップリングさせ、二量体25を得た。次にC末端のメチルエステルをアルカリ加水分解してカルボン酸体26とし、引き続きβAlaベンジルエステルとカップリン

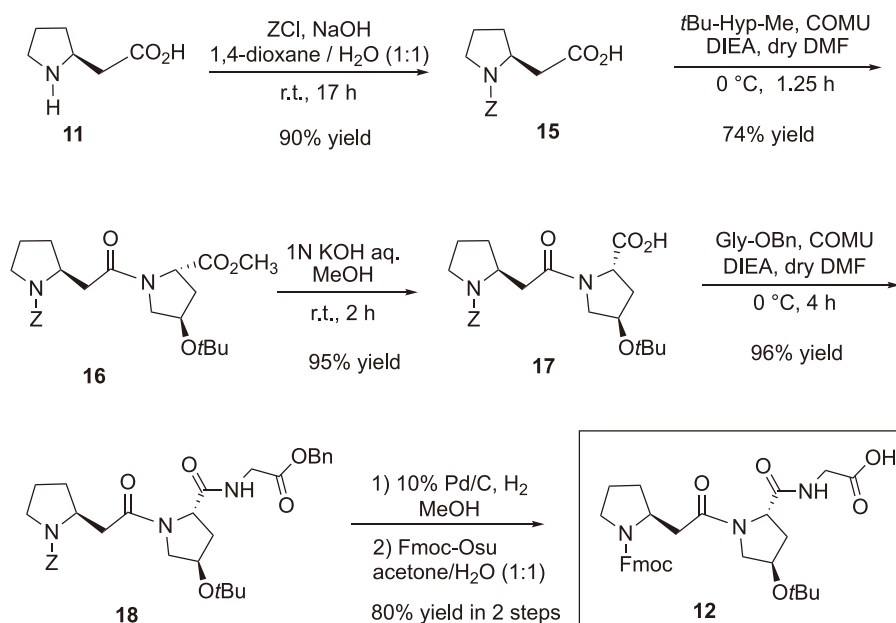


図6 βProを組み込んだCTP (Fmoc•βPro-Hyp-Gly-OH) (12)の合成

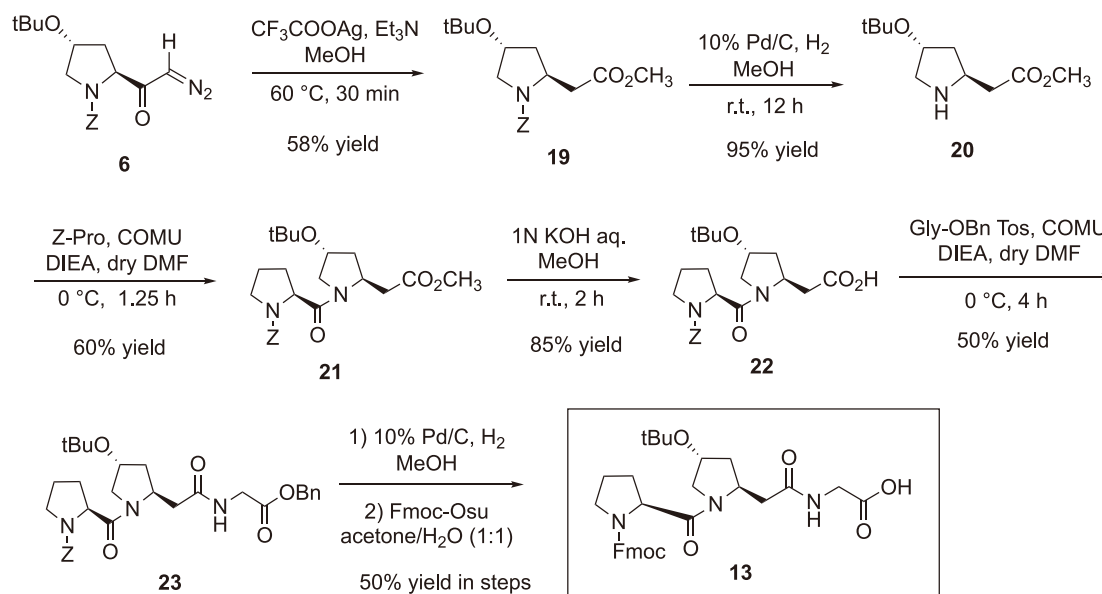


図7 βProを組み込んだCTP (Fmoc•Pro-βHyp-Gly-OH) (13)の合成

グすることで三量体 **27** とした。最後に接触水素化によりベンジル基と Z 基の脱保護を行い、N 末端の Fmoc 化を行うことで目的とする CTP (Fmoc•Pro-Hyp-βAla-OH) (**14**) を得ることができた(図 8)。

3. 3. 固相合成による 30mer の合成

上記で得られた CTP **13** は、上記の 2. 2. に示した方法に従って 30mer を合成した。それぞれレジンに固定し、固相合成法により 9 回繰り返してカップリングした後、レジンから切り離して、最後に HPLC 精製することで (Pro-βHyp-Gly)₁₀ を得ることができた。

3. 4. 合成した (Pro-βHyp-Gly)₁₀ の熱安定性

合成したコラーゲンペプチドの 30mer である (Pro-βHyp-Gly)₁₀ について、天然型の (Pro-Hyp-Gly)₁₀ と比較した。CD スペクトルにより熱安定性を調べたところ、(Pro-Hyp-Gly)₁₀ は 58℃ でヘリックス構造が壊れたものの、興味深いことに β-アミノ酸を組み込んだ (Pro-βHyp-Gly)₁₀ では 80℃ 以上でもヘリックス構造を維持していた。このことから今回我々が合成した人工コラーゲンは熱安定性が非常に高いことが示された。

3. 5. 計算化学により推定した立体構造

3. 5. 1. CPT の立体構造

このように合成したコラーゲン類縁体のうち、それらを構成する CTP である Pro-Hyp-Gly と Pro-βHyp-Gly の構造を、計算化学によって解析した。本研究では、合成した 30mer の Gly-Hyp-Pro の繰り返し構造であるトリペプチドについて最安定化構造を求めた。このとき、C-末端と N-末端はメチル基で置換し、計算方法は BLYP/DNP//MMFFs (COSMO in Water) で行った。その結果、天然のコラーゲンは Gly-Hyp-Pro で一回転し、Gly から Pro までの距離は 6.509 オームストロングであったのに対し、Hyp を β-アミノ酸に置換した Pro-βHyp-Gly では 6.970 オームストロングであった。この結果より、β-アミノ酸を組み込むことによって、ヘリックス構造の一回転あたりの距離はわずかに変化するものの、構造自体は天然のヘリックス構造に類似していると予想できた(図 9)。

3. 5. 2. (Pro-Hyp-Gly)₁₀ および (Pro-Hyp-βAla)₁₀ の立体構造

コラーゲンペプチドの 30mer について、計算化学の手法により (Pro-Hyp-Gly)₁₀ と β-アミノ酸を組み込んだ

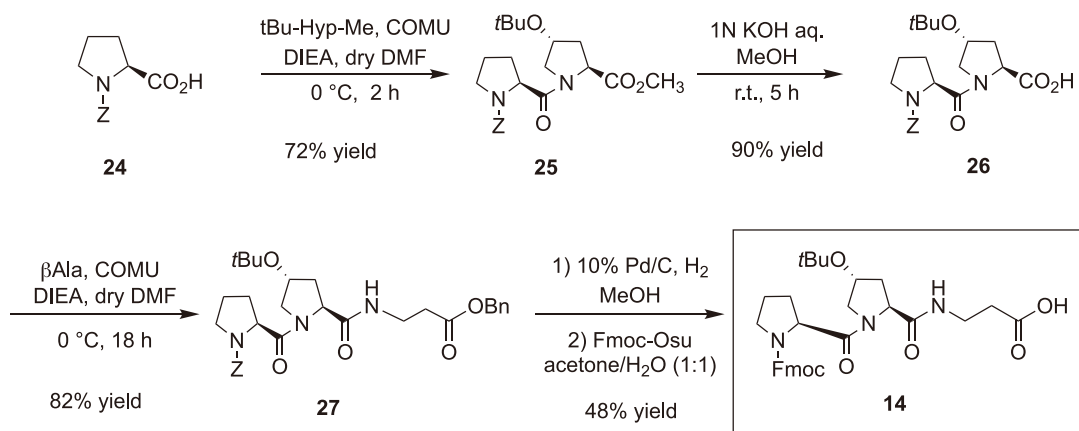


図 8 βAla を組み込んだ CTP (Fmoc•Pro-Hyp-βAla-OH) (**14**) の合成

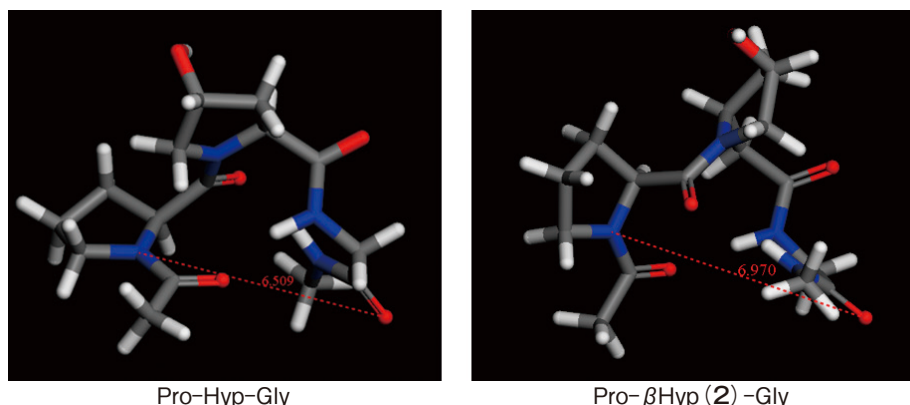


図 9 計算化学による CTP の推定構造
計算方法：BLYP/DNP//MMFFs (COSMO in Water)

(Pro-Hyp-βAla)₁₀を比較した(図10)。その結果、二つのペプチドは類似した立体構造を有していることが明らかとなった。また、β-アミノ酸を組み込んだペプチドのほうが安定に存在することも示唆された。

3.6. CTPの生物活性評価

次に、合成したCTP (Gly-Hyp-Pro)とその誘導体(Gly-βHyp-Pro)を様々な濃度でヒト扁平上皮がん細胞(A431)に添加して、その細胞生存率を調べることでがん細胞増殖抑制効果を評価した。さらにウエスタンブロット法により、タンパク質の発現量解析を行い、がん細胞に対するCTPおよびCTP誘導体の作用メカニズムの探索を行った。

その結果、それぞれを10μMおよび100μMの添加濃度では、がん細胞の生存率に有意な変化はみられなかった。そこで、CTPおよびCTP誘導体を高濃度の1000μMで曝露したところ、図11に示すように有意な生存率の減少が確認された。コラーゲンコート上で培養したヒト扁平上皮

がん細胞においても同様に、CTPおよびCTP誘導体の高濃度曝露による細胞生存率の有意な減少を確認したが、コラーゲンコートの有無による細胞生存率の変化はみられなかった。以上の細胞生存率測定では、CTPの違いによる細胞生存率の違いは観察されなかった。

CTPおよびCTP誘導体による細胞生存率減少のメカニズムを解明するために、ウエスタンブロットを行った。細胞周期制御に関与するタンパク質の一つであるp21の検出を行ったところ、CTPおよびCTP誘導体曝露によるp21の発現量の変化は観察されなかった。

4. 考 察

これまでにコラーゲンを模倣した化合物の研究が世界中で行われているが、その多くはHypを別の化合物に置き換えたものである。それに対し本研究では、CTP (Gly-Hyp-Pro)を基にして、構成するアミノ酸をβ-アミノ酸に変換したコラーゲンペプチドを創製したため、計算化学に

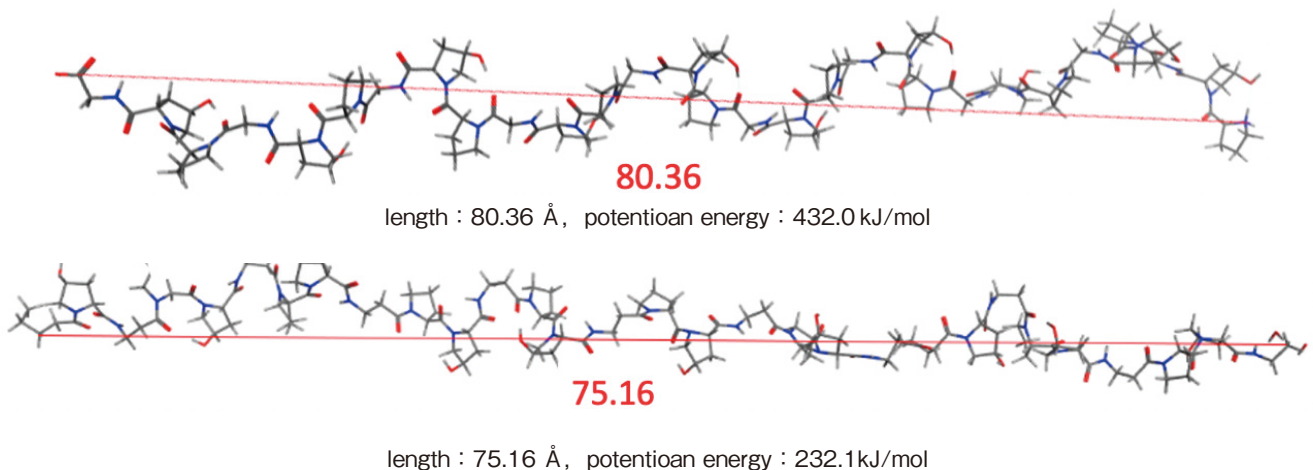


図10 計算化学による30merの立体構造

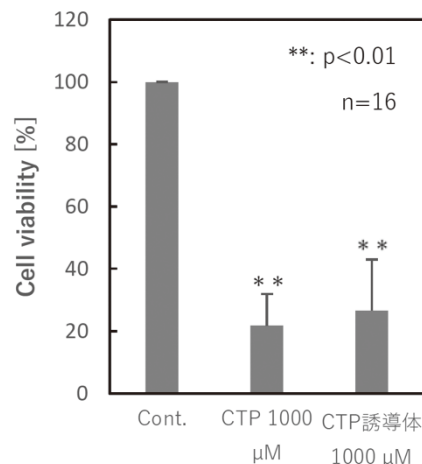


図11 CTP および CTP 誘導体 1000μM 曝露時の細胞生存率

よる構造解析の結果からも、天然に近い性質をもっていると考えられる。さらに、得られたペプチドは熱安定性の高い強固なヘリックス構造をもっていることが明らかとなった。このコラーゲンペプチドの加水分解酵素に対する安定性はまだ調べていないが、もしも天然のコラーゲンに比べて著しく高い安定性を有していれば、新しい機能性材料として生物化学分野に応用できる可能性がある。

また、創薬科学分野への応用の可能性についても検討した結果、今回は予備的な実験ではあるが、CTPおよびCTP誘導体はヒト扁平上皮がん細胞に高濃度で曝露することで細胞増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。CTPおよびCTP誘導体による細胞生存率減少のメカニズムとして、細胞周期やアポトーシスへの関与が考えられる。CTPにより細胞生存率が減少したのに対し、細胞周期制御タンパク質の一つであるp21はCTPによる影響がみられなかったため、今後他の細胞周期に関わるシグナルや、アポトーシス誘導タンパク質においても同様の実験が必要である。

5. 総括

β -アミノ酸を組み込んだ人工コラーゲンは、天然のコラーゲンと類似した立体構造をもち、さらに天然に比べて熱安定性が非常に高いことを見出した。またそれを構成するCTPは、生理活性物質に応用できる可能性も示された。

したがって、今後もさらに詳細に研究を続けることにより、再生医療やコスメトロジーの分野への新規の機能性材料へ応用可能な人工コラーゲンを創出することは、十分可能であると考えられる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、御援助を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Holmgren SK, Bretscher LE, Taylor KM, Raines RT. A hyperstable collagen mimic. *Chem. Biol.* 1999, 6, 63-70.
- 2) Goodman M, Bhuralkar M, Jefferson EA, Kwak J, Locardi E. Collagen mimetics. *Biopolymers*, 1998, 47, 127-142.
- 3) Pyun HB et al. Effects of Collagen Tripeptide Supplement on Photoaging and Epidermal Skin Barrier in UVB-exposed Hairless Mice. *Prev Nutr Food Sci.* 2012 Dec; 17 (4): 245-53.
- 4) Hakuta A et al. Anti-inflammatory effect of collagen tripeptide in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 2017 Dec; 88(3): 357-364