

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19700400

研究課題名(和文)特異的ペプチドを用いた高機能性ポリ乳酸表面の創製

研究課題名(英文)Fabrication of functionalized poly(lactide) surfaces with the specific peptides

研究代表者

松野 寿生(MATSUNO HISAO)

東京大学・駒場オープンラボラトリー・助教

研究者番号:50736696

研究成果の概要：

ポリ L-乳酸(PLLA)結晶化表面に特異的に結合するペプチドのスクリーニングに成功した。PLLA に対する特異的な結合には、疎水性アミノ酸であるアラニンおよびロイシン残基、塩基性アミノ酸であるヒスチジンおよびアルギニン残基の寄与が特に大きいことを明らかにした。アミノ酸配列を同定したペプチドは、PLLA 結晶らせん構造の微細な違いを識別できることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	300,000	3,600,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオコンジュゲイト、生体適合性材料、生体機能材料、再生医工学材料

1. 研究開始当初の背景

ポリ乳酸(poly lactide, PLA)は、分解により生成する乳酸が代謝可能であり、加えて生体適合性、力学的強度に優れることから、吸収性縫合糸や骨固定剤として既に実用化されている代表的な合成ポリマーである。その一方で、PLAは結晶性が比較的高いため分解速度が極端に遅い、また反応性官能基を持たないことから化学修飾が容易でない、などの欠点があり、現状ではその用途はごく狭い範囲に限定されている。これまでに合成化学的手法あるいは低温プラズマ照射処理に代表される物理的手法により、PLA表面にカル

ボキシ基やアミノ基などの反応性官能基を導入する手法が報告されており、導入した官能基を介して生理活性物質を共有結合により担持することで、PLA表面への細胞接着性の向上を達成できることが示されている。しかしながら、PLA分子の化学構造を完全に維持したまま表面修飾を達成した例はなく、総じて、PLA表面の機能特性の向上を図ると、その一方でバルク特性の低下を回避できないなど、決定的な手法の確立には至っていない。

一方、研究代表者らは、生物学的コンビナトリアルケミストリーの一手法であるファ

ージディスプレイ法の適用により、生体適合性ビニルポリマーの一つであるポリメタクリル酸メチル(PMMA)に特異的に結合するペプチド配列の同定に成功した。同定したペプチドは PMMA の側鎖の立体規則性のわずかな違いを識別することが可能であり、合成ポリマーと生体分子であるペプチドを、特異的な非共有結合によりハイブリッド化できること、つまり、ポリマー表面と相互作用可能なペプチドを介してより反応性の高い官能基を導入することが可能であることを示した。

2. 研究の目的

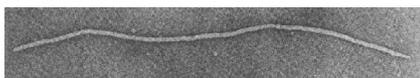
PLA 表面を特異的に認識し結合することが可能なペプチドをファージディスプレイ法を用いてスクリーニングすることを目的とした。認識ペプチドの種々の PLA 薄膜に対する結合特性を相互作用の動力学解析により評価した。

3. 研究の方法

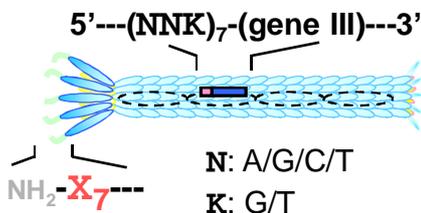
ポリ乳酸表面に特異的に結合するペプチド配列を、ランダムペプチドライブラリーからスクリーニングした。ランダムペプチドライブラリーは、大腸菌を宿主とするバクテリオファージ (M13 繊維状ファージ) のコートタンパク質上に提示したライブラリーを使用し、ペプチドの構造は、直鎖 (7 または 12 残基) または環状 (7 残基) とした (図 1)。スピコート法により調製したポリ L-乳酸 (poly(L-lactide), PLLA) の結晶化超薄膜フィルム (β -form) または交互積層法により調製した PLLA 結晶化超薄膜フィルム (α -form) を用い、親和性を指標とした選択によりそれぞれの PLLA 結晶化フィルムに結合するファージを濃縮した (図 2)。

M13 バクテリオファージ

(6.5 nm x 900 nm, 14 MDa)



ランダムヘプタペプチド提示ファージ



Diversity : $20^7 = 1.28 \times 10^9$

図 1 使用したペプチドライブラリー提示バクテリオファージの構造概略図

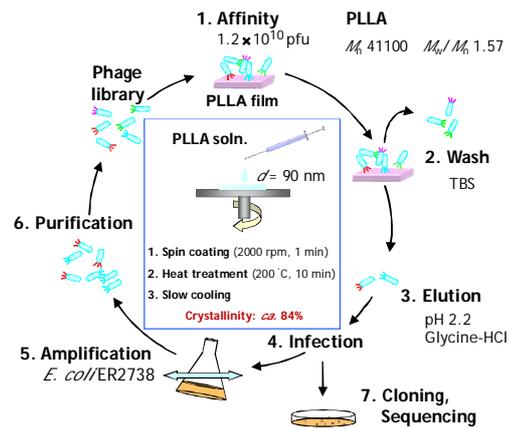


図 2 PLLA (β -form) スピコート膜の調製法およびペプチド提示ファージの濃縮操作方法の概略図

α -form) を用い、親和性を指標とした選択によりそれぞれの PLLA 結晶化フィルムに結合するファージを濃縮した (図 2)。

濃縮されたファージの PLA 結晶化膜に対する結合能を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により評価した。

ELISA により評価した相対的な結合特性が良好であった配列について、Fmoc 固相化学合成法によりペプチドを調製し、その結合能を表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いた相互作用の動力学解析により評価した。

4. 研究成果

PLLA (β -form) に対し、4 ラウンドのファージ濃縮操作の後、クローニング、遺伝子配列決定を行い、9 種類の直鎖状 7 残基ペプチドのアミノ酸配列を同定することに成功した (図 3)。

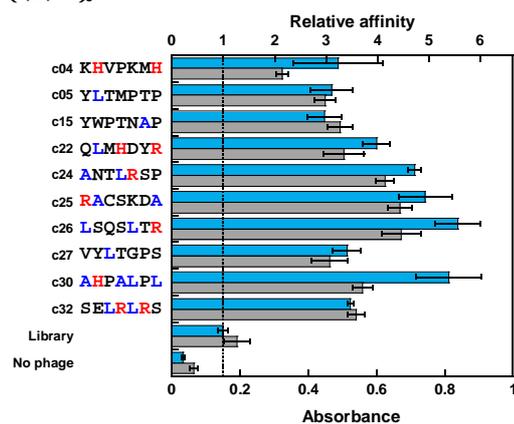


図 3 選択されたファージが提示するペプチド配列および ELISA 法により評価した選択ファージの PLLA (β -form) と PMMA フィルムに対する相対的な結合強度

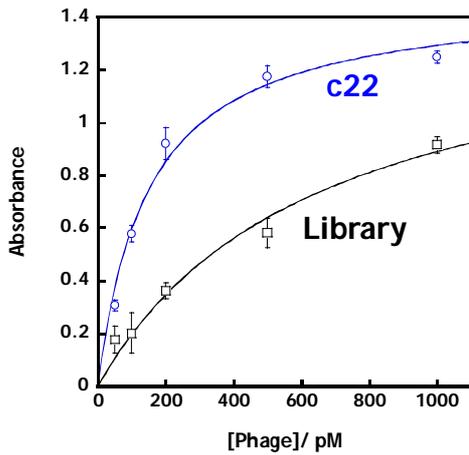


図4 Langmuir 吸着プロット

表1 ELISAにより決定した選択ファージの見かけの結合定数

Clone	Sequence	$K_{app}/10^9 M^{-1}$		K_{app} Ratio (clone/lib.)	Specificity index
		PLLA	PMMA		
c22	QLMHDYR	6.7	3.9	1.7	2.6
c26	LSQSLTR	5.7	5.2	1.1	1.6
c25	RACSKDA	5.1	4.4	1.2	1.8
c24	ANTLRSP	4.8	8.1	0.6	0.9
c04	KHVPKMH	4.6	3.7	1.3	1.9
c30	AHPALPL	3.9	2.2	1.8	2.7
c05	YLTMPPT	2.7	2.8	1.0	1.4
c27	VYLTGPS	2.7	2.9	0.9	1.3
Lib.	-	1.6	2.4	0.7	-

ELISA による評価から、選択されたすべてのペプチド提示ファージにおいて、Langmuir 吸着を仮定して算出した PLLA(α -form)膜に対する見かけの結合定数 (K_{app}) は $10^9 M^{-1}$ オーダーを示し、ランダムペプチド提示ファージと比較して大きいことが確認された (図3, 図4, 表1)。また2種類のファージクローン (c22: QLMHDYR, c30: AHPALPL) については、参照ポリマーとして使用した構造類似体であるアタクチックポリメタクリル酸メチル (PMMA) に対してよりも PLLA(α -form)膜に対して相対的に強い結合を示したことから、これらファージは PLLA(α -form)に対して特異性を有することを見出した (表1)。

選択されたファージが提示するペプチドに含まれるアミノ酸の頻度解析の結果から、PLLA(α -form)に対する結合においては、疎水性アミノ酸であるアラニン(A)およびロイシン(L)残基、塩基性アミノ酸であるヒスチジン(H)、アルギニン(R)残基、および水酸基を有するセリン(S)残基の寄与が重要であることを明らかにした (図5)。



図5 選択されたファージの結合特性に基づくアミノ酸の出現頻度解析

化学合成法により調製したモノメリックな c22 ペプチドの PLLA(α -form)フィルムに対する結合量を、10 mM HEPES 緩衝液, 150 mM NaCl (pH 7.4), 25 $^{\circ}C$ の条件下において、SPR 法を用いて観察したところ、c22 ペプチドは濃度依存的に結合量が増加することが分かった (図6)。

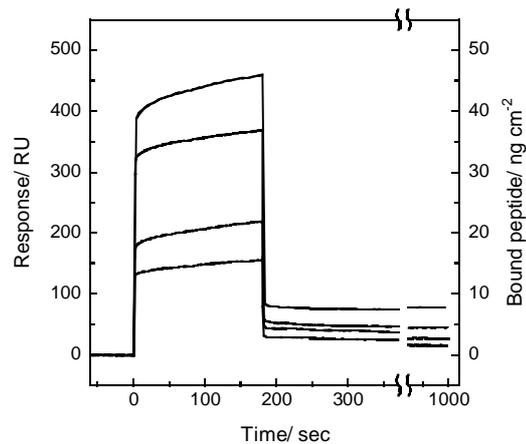
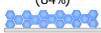
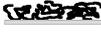
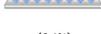


図6 SPR法を用いた c22 ペプチドの PLLA(α -form)フィルムに対する結合の観察

Langmuir 吸着を仮定した動力学解析から、c22 ペプチドは、PLLA(α -form)に対し $6.1 \times 10^4 M^{-1}$ の結合定数を示すことが分かった (表2)。これに対し、PLLAの β -form 結晶あるいはアモルファス膜に対する結合定数はそれぞれ 1/4, 1/9 に低下することが分かった。すなわち当該ペプチドは PLLA の結晶多形を識別し特異的に結合できることを明らかにした。一方、PLLA(α -form)の光学異性体である PDLA(α -form)に対しては、同程度の結合定数を示したことから、c22 ペプチドは、光学異性に基づく結晶形の識別はできないことがわかった。

表2 SPR法により決定したc22ペプチドの種々のポリマー膜に対する相互作用の動力学パラメータ

Polymeric polymorphs	k_1 /M ⁻¹ s ⁻¹	k_{-1} /10 ⁻³ s ⁻¹	K_D /10 ³ M ⁻¹	(Ratio)
PLLA(α)  (84%)	14	0.23	61	—
at-PMMA 	4.2	0.73	5.7	(1/11)
PLLA(a) 	4.0	0.59	6.8	(1/9)
PLLA(β)  (91%)	20	1.3	15	(1/4)
PDLA(α)  (84%)	26	0.54	48	(1/1.2)

これまで、ポリ乳酸に対してペプチドあるいはタンパク質は結合しにくいと言われてきたが、本研究でスクリーニングに成功したペプチドは、鎖長が7 merとペプチドとしても極めて短い部類にはいるが、それにもかかわらず、10⁴ M⁻¹オーダー後半の結合定数を示した。このようなペプチドの報告は、本研究が初めてである。さらには、当該ペプチドは、PLLA結晶多形(PLLAらせん構造のピッチの違い)を識別できることも見出したが、このような識別能を有する分子はペプチドのみならず、あらゆる有機低分子においても報告はなされていない。

一方、交互積層法を用いて調製した最外層がPLLAのβ-form結晶膜に対してファージディスプレイ法を適用し、4ラウンドのファージプールの濃縮操作の後、3種類のPLLA(β-form)結合性ペプチド配列を同定した。ELISA解析の結果、見かけの結合定数が10¹⁰ M⁻¹オーダーに達する極めて強い結合を示すペプチドを見出すことに成功した。

これらペプチドを機能性タンパク質に導入した組換え融合タンパク質を作製し、ポリマー膜に対する結合挙動を観察したところ、10⁸ M⁻¹オーダーの結合定数で、基板に対し極めて強くかつ大量にタンパク質を固定化できることを確認し、ポリ乳酸表面を機能性分子で修飾するための新規手法になることを見出した。本手法は様々なポリマー分子に適用可能であることから、ポリ乳酸のみならずポリマー表面の機能性分子の修飾法として汎用性の高い手法になることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Hisao Matsuno, Jun Sekine,

Hirofumi Yajima, and Takeshi Serizawa, Biological Selection of Peptides for Poly(L-lactide) Substrates, Langmuir, 24, 6399-6403, 2008.

Hisao Matsuno, Yuya Nagasaka, Kimio Kurita, and Takeshi Serizawa, Protein Adsorption is Dependent on Substrate Polymer Polymorphs, Chem. Lett., 36, 1238-1239, 2007.

[学会発表](計6件)

Hisao Matsuno, Isolation and Characterization of Peptides that Specifically Bind to Crystalline Poly(L-lactide)、日韓高分子若手シンポジウム、2008年10月24日、グリーピア津南

松野寿生、短鎖ペプチドによるポリ乳酸ステレオコンプレックス表面認識、第57回高分子学会年次大会、2008年5月28日、パシフィコ横浜

松野寿生、短鎖ペプチドによるポリ乳酸結晶多形認識、日本化学会第88春季年会、2008年3月28日、立教大学
松野寿生、構造制御されたポリ乳酸フィルムとタンパク質の相互作用、第56回高分子討論会、2007年9月19日、名古屋工業大学

Hisao Matsuno, Novel design of the interface between functional proteins and polymer materials, 12th IUOAC International Symposium on Macromolecular Complexes, 30th Aug 2007, Fukuoka International congress center.

松野寿生、構造制御されたポリ乳酸フィルム特異的に結合するペプチドの探索、第56回高分子学会年次大会、2007年5月30日、京都国際会館

[図書](計1件)

芹澤武・松野寿生、シーエムシー出版、バイオナノプロセス溶液中でナノ構造を作るウェットテクノロジーの薦め 第12章、2008年、112-120

6. 研究組織

(1)研究代表者

松野 寿生(MATSUNO HISAO)

東京大学・駒場オープンラボラトリー・助教
研究者番号：50736696

(2)研究分担者

(3)連携研究者