

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350552

研究課題名(和文) 新奇バイオマテリアルを目指したUCST型温度応答性ポリペプチドの設計

研究課題名(英文) Design of polypeptide showing UCST-type phase transition behavior

研究代表者

嶋田 直彦 (Shimada, Naohiko)

東京工業大学・生命理工学研究科・助教

研究者番号：10423972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生理的条件下においてLCST型挙動を示す高分子は多く存在するが、UCST型挙動を示す高分子は非常に珍しい。本研究ではさらに珍しい生分解性を示すUCST型ポリシトルリンペプチドの光学活性がUCST挙動に与える影響を調べた。その結果、ポリシトルリンペプチドはヘリックス構造を有しており、相転移に伴ってバンドル構造を形成することが示された。また疎水基の導入により相分離温度を上昇させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：There are many polymers showing LCST-type phase transition behavior under physiological conditions. However, there is few polymers showing UCST-type phase transition behavior under the conditions. We have reported that poly citrulline polypeptide showed UCST-type behavior. In this study, we estimated effect of optical activity of the polypeptide on UCST-type solution behavior. CD spectra indicated that the polypeptide adopted α -helix conformation and form a bundle structure below phase separation temperature.

研究分野：生体高分子化学

キーワード：UCST ペプチド

1. 研究開始当初の背景

生理的条件下で低温溶解型 (LCST 型) の相転移挙動を示す温度応答性高分子は数多く報告されている。特にポリイソプロピルアクリルアミド (PNIPAm) の発見は、医工学分野に革新的な進歩をもたらし、近年ではバイオマテリアルやバイオテクノロジーへの応用がなされている。さらに、PNIPAm 以外にも生分解性を併せ持つ poly(organo)phosphazenes やエラスチン様ポリペプチド等の LCST 型高分子も開発され、タンパク質等の薬物デリバリー基剤として応用されている。

一方で、生理的条件下で LCST 型とは逆の温度応答性を示す高温溶解型 (UCST 型) 合成高分子は、冷却により相分離することから、加熱変性の恐れのある生体分子を分離するための基剤としてや、加熱に適さない炎症部位などへの冷却集積ドラッグデリバリー基剤として適用可能であると考えられる。このように従来の LCST 型高分子では実現困難であったシステムを UCST 型高分子によって構築できるにも関わらず、数例しか報告がない。さらに、これらの高分子の相転移温度は 30 °C 以下であるため、バイオマテリアルとしての応用が限定されてしまう。そのため、幅広くバイオマテリアルとして使用するには生理的条件下において、体温付近に相転移温度を持つ UCST 高分子が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究者はウレイド基を有する高分子であるポリアリルウレア共重合体 (図 1A) が生理的条件下において体温付近で UCST 挙動を示すことを世界で初めて報告した (図 1B)。また、アリルウレアの含有率や主鎖の分子量を変えることでその相分離温度を 5 -65 °C の幅広い範囲でコントロール可能であることもわかっている (図 1C)。さらにモノマーであるアリルアミンのアミノ基をサクシニル化やアセチル化することで大きく相分離温度が変化したことから、分子全体の親疎水性バランスが相分離温度を決める重要なファクターであることが示唆されている。同時に、申請者はウレイド基を有するシトルリンとオルニチンのランダム共重合ポリペプチド (図 2) が UCST 挙動を示すことも報告した。ポリアリルウレア共重合体と同様にシトルリン含有率並びに分子量が相分離温度に大きく影響することが示された。さらに、このポリシトルリン共重合体は天然のアミノ酸で構成されていることから生分解性を示し、分解に伴う分子量の減少により、相分離温度が低下することも分かっている。

すなわち UCST 型ポリシトルリン共重合体は分解がトリガーとなる相転移現象を上手く使うこともできる優れたバイオマテリアルになると考えられる。しかし、相分離温

度は 31 °C が上限であり、幅広くバイオマテリアルとして使用するには、今以上に様々な温度 (体温付近を含む) で UCST 挙動を示す必要がある。

本研究では、様々な相分離温度を有する生分解性 UCST 型ポリペプチド設計指針を確立することを目的とする。

本研究によって、生分解性 UCST 型ポリペプチドの設計指針が確立されたならば、医工学分野へのさらなる発展が予想される。また、これらのポリペプチドは生化学的手法によって合成可能になることが予想されることから、広い分野において応用可能になると思われる。

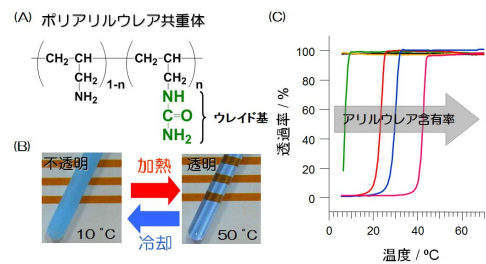


図 1 ポリアリルウレア共重合体の UCST 挙動

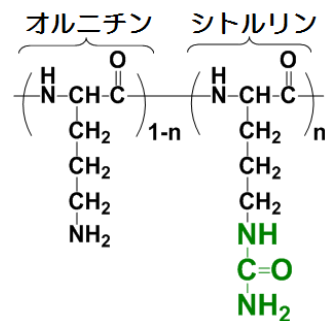


図 2 ポリ(オルニチン-co-シトルリン) (POC) の化学構造式

3. 研究の方法

(1) L 体あるいは DL 体のポリオルニチンに対して、シアン酸カリウムを適量加え、ポリ(オルニチン-co-シトルリン) (POC) を合成した。精製は透析によって行い、シトルリン含有率は ¹H-NMR によって求めた。生理的緩衝液 (10 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 150 mM NaCl) 中で 1 mg/mL の濃度で POC を懸濁させ、様々な温度における 500 nm の透過率を測定した。また二次構造については 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl 中、0.5 mg/mL の濃度で様々な温度における CD スペクトルを測定した。

(2) ポリアリルアミンに対して、シアン

酸カリウムを適量加え、ポリ(アリルアミン-co-アリルウレア) (PAU) を合成した。精製およびキャラクタリゼーションは POC と同様の方法で行った。PAU、いくつかの酸無水物(無水酢酸、プロピオン酸無水物、イソ酪酸無水物、ピバル酸無水物、)を DMSO 中に加え 25 で 24 時間反応させた。透析により精製を行い、凍結乾燥後、NMR によって各酸無水物の導入量を決定した。POC と同様、生理的緩衝液(10 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 150 mM NaCl) 中で 1 mg/mL の濃度で POC を懸濁させ、様々な温度における 500 nm の透過率を測定した。

4. 研究成果

(1) POC はアミノ酸で構成されていることから二次構造を形成することが予想される。二次構造が UCST 挙動に与える影響を評価するために、L 体の POC だけでなく、ラセミ体の DL 体の POC を合成した。シトルリン含有量を 81~97 mol% になるように調製した。図 3 に示すようにシトルリン含有率が 92% 程度有する L 体 POC (L_{30k}92.4) が 16.2 の相分離温度(T_p)であったのに対し、DL 体の POC (DL_{30k}93.5) は 7 低い 9.4 の T_p であった。その他の POC を比較してもラセミ体である DL 体の方が低い T_p を示していた。CD スペクトル測定の結果、L 体 POC はアルファヘリックス構造を形成しており、T_p 以下でコイルドコイル様にバンドル形成していることが示唆された。DL 体は特別な二次構造を形成しづらいことが予想されることから、光学活性を有する POC の UCST 型相転移挙動は二次構造のコントロールによって制御できることが分かった。

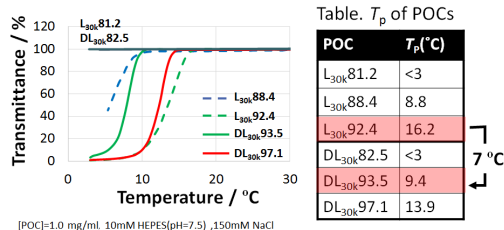


図 3 光学活性が異なる POC の UCST 型挙動

(2) 上述のように二次構造のコントロールによって、T_p を制御できる可能性が示されたが、体温付近よりも低い温度であった。バイオマテリアルとして応用するには体温付近で UCST 挙動を示す POC の設計が不可欠である。そのため、次に疎水

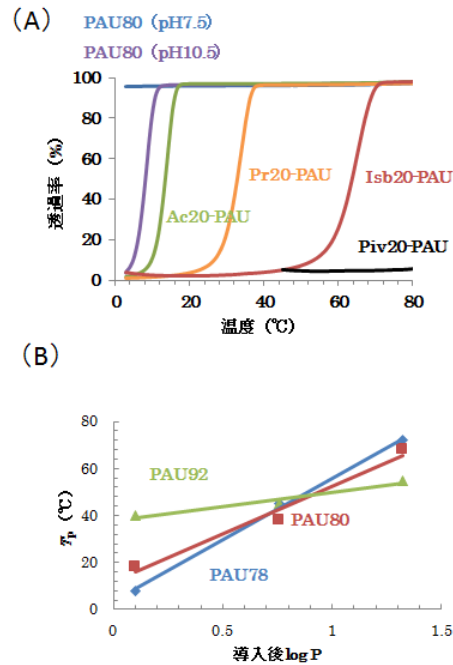


図 4 PAU への疎水基導入の効果

性の官能基の導入によって、T_p の上昇を狙った。POC への疎水基の導入の前に、PAU に疎水基を導入することで、T_p に与える影響を評価した。図 4 に示すように導入した疎水基の疎水性が大きいほど T_p が上昇することが示された。また、疎水基の logP 値と T_p には強い相関性が示されたことから、合理的な設計が可能である。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 3 件)

1. A. Fujihara, N. Shimada, A. Maruyama, K. Ishihara, K. Nakai, S. Yusa, Preparation of upper critical solution temperature(UCST) responsive diblock copolymers bearing pendant ureido groups and their micelle formation behavior in water, *Soft Matter*, 11, 5204-5213 (2015), DOI:10.1039/c5sm00499c
2. N. Shimada, S. Kidoaki, A. Maruyama, Smart hydrogels exhibiting UCST-type volume changes under physiologically relevant conditions, *RSC Advances*, 4, 52346-52348 (2014), DOI:10.1039/c4ra10612a
3. N. Shimada, A. Maruyama, Thermoresponsive Polymers with Functional Groups Selected for Pharmaceutical and Biomedical Applications, *ACS symposium series*, 1135, 235-241, (2013),

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Naohiko Shimada, Minako Saito, Atsushi Maruyama, Ureido-functionalized polymers exhibiting UCST-type phase separation under physiological conditions, 2015 International Chemical congress of Pacific Basin Societies, 15, Dec., 2015, Hawaii Convention center(USA)
2. 嶋田 直彦、畔柳 奏太郎、原田敦史、丸山 厚, UCST 型挙動を示すポリペプチドの合成と評価, 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会, 2015 年 11 月 9 日, 京都テルサ (京都府・京都市)
3. 畔柳 奏太郎、嶋田 直彦、丸山 厚, 生理的バッファ中で UCST 型挙動を示すシトルリンポリペプチドの合成と評価, 第 64 回高分子討論会, 2015 年 9 月 16 日, 東北大学(宮城県・仙台市)
4. 畔柳 奏太郎、嶋田 直彦、丸山 厚, 感温性ウレイドポリペプチドの合成と評価, 第 4 回医用高分子シンポジウム, 2015 年 7 月 27 日, 産業技術総合研究所臨界副都心センター別館 11 階会議室, (東京都・港区)
5. 嶋田 直彦, 新たな生命工学を拓く感温性高分子, 第 65 回医用高分子研究会, 2015 年 3 月 9 日, 東京理科大学森戸記念館(東京・新宿区)
6. 河野 貴国、嶋田 直彦、丸山 厚, UCST 型感温性高分子を利用したタンパク質の迅速かつ選択的な捕獲, 第 36 回バイオマテリアル学会大会, 2014 年 11 月 17 日, タワーホール船堀(東京・江戸川区)
7. 嶋田 直彦、齊藤 美奈子、丸山 厚, ウレイド高分子が培養細胞に与える影響, 第 36 回バイオマテリアル学会大会, 2014 年 11 月 17 日, タワーホール船堀(東京・江戸川区)
8. 嶋田 直彦、三宅 大翔、齊藤 美奈子、丸山 厚, ウレイド高分子からなるハイドロゲルの体積相転移, 第 63 回高分子討論会, 2014 年 9 月 25 日, 長崎大学(長崎県、長崎市)
9. 嶋田 直彦、齊藤 美奈子、丸山 厚, バイオマテリアルとしての UCST 型ウレイド高分子の設計, 第 35 回バイオマテリアル学会大会, 2013 年 11 月 25 日, タワーホール船堀(東京・江戸川区)
10. 嶋田 直彦、生体高分子の高次構造制御と温度応答性高分子, バイオマテリアル若手研究会, 2013 年 11 月 8 日, 八王子セミナーハウス(東京都・八王子市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

発明者: 丸山 厚、嶋田 直彦、遊佐 真一
権利者: 国立大学法人東京工業大学、兵庫県
種類: 特許
番号: 特願 2014-053966
出願年月日: 2014 年 3 月 17 日
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
<http://mlab.bio.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋田 直彦(Naohiko Shimada)
東京工業大学・生命理工学研究科・助教
研究者番号: 10423972

(2) 連携研究者

丸山 厚(Atsushi Maruyama)
東京工業大学・生命理工学研究科・教授
研究者番号: 40190566