

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：34416

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15644

研究課題名（和文）弾性タンパク質を模倣したペプチドエラストマーの化学酵素合成と機能評価

研究課題名（英文）Chemoenzymatic synthesis of peptide-based elastomers that mimicking elastomeric proteins

研究代表者

曽川 洋光 (Sogawa, Hiromitsu)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号：90709297

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：化学酵素重合法により、グリシン-プロリン-グリシンのトリペプチド骨格ならびにチロシンからなるポリペプチドを合成した。得られたポリペプチドをシルクタンパク質の架橋剤として利用したところ、チロシン残基の導入量に応じて架橋時間が、トリペプチドの導入量に応じて得られるゲルの復元力が変化することが明らかとなった。ポリペプチドに含まれるアミノ酸配列がネットワークポリマーの特性に影響を及ぼすことが明らかとなり、化学酵素合成法によってペプチドエラストマーを得る基礎的知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境問題に対する国民の関心の高まりも相まって、環境への負荷が少ないサステナブル高分子材料の創出が望まれている。化学酵素重合法では水中で反応が進行し、目的とするポリペプチドがアルコール以外の副生成物を生じずに得られることから、環境に優しい重合法といえる。大量合成への展開も容易であり、本研究で得られたペプチド由来はこれに貢献するものと言える。また化学酵素重合法で得られたポリペプチドに含まれる配列が得られるゲルの特性に影響を及ぼすことが明らかになったため、今後益々高機能なペプチド由来エラストマー材料の創出が期待される。

研究成果の概要（英文）：Polypeptides containing glycine-proline-glycine tripeptide sequence and tyrosine unit were synthesized via chemoenzymatic polymerization. The obtained polypeptides were used as the crosslinker to form silk fibroin gel. As results, the amount of tyrosine unit affected the gelation time, whereas the amount of tripeptide affected the resilience of the formed gel. In short, we found the sequences of formed polypeptides affected to the network polymers.

研究分野：高分子化学・超分子化学

キーワード：ポリペプチド 酵素重合 架橋 シルク ゲル エラストマー

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ポリペプチドは分子設計に優れたバイオ高分子であり、その高次構造に起因し、様々な機能を発現する。ポリペプチドを構造材料に組み込んだ例は数多くあり、例えば天然のシルクや蜘蛛糸といった『結晶性部位を多く含むタンパク質を模倣』した高分子材料は多く研究され、その構造と物性の相関が明らかになりつつある(K. Numata, *Polym. J.* **2020**)。一方で、有機化学的アプローチからエラストチンやレジリン等の『弾性タンパク質を模倣』した高分子を合成し、エラストマー材料へと展開した例は少ない。その合成の困難さがこの領域の研究発展を抑制していたと推測されるが、その合成技術を確立し、構造・力学特性の相関を明らかにすることは、次世代のサステイナブル材料開発に繋がる重要なものである。

### 2. 研究の目的

本研究では、弾性タンパク質を模倣した高機能ペプチドエラストマー合成技術を確立し、機能性ペプチド複合材料を創出することを目的とする。この目的達成のために、I.弾性タンパク質中に頻出する鍵アミノ酸配列を模倣したポリペプチドの化学酵素合成、II. 得られたポリペプチドの力学的性質（強度、伸び、弾性率等）と構造（分子量、アミノ酸配列、架橋密度）の関係性評価を行う。これらの検討を通じ、ミクロなペプチド構造とマクロな物性相関の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

#### ・弾性タンパク質モデルペプチド合成と構造の同定

弾性タンパク質をモチーフとしたトリペプチド (GPG) および架橋点部位として導入したチロシン (Y) の仕込み比を変化させ、プロテアーゼの一種であるパパインを触媒に用いる化学酵素触媒重合を行う。

#### ・ネットワークポリマー合成

本項目では、酵素を用いた Y 部分の自己二量化反応による架橋点の形成ならびにネットワークポリマー合成を検討する。

#### ・物性、力学特性評価

合成したネットワークポリマーの熱物性を DSC, TGA 測定により明らかにする。またその力学特性を引張試験、動的粘弾性試験により評価する。

### 4. 研究成果

まず、弾性タンパク質をモチーフとしたトリペプチドエチルエステル (GPG:グリシン-プロリン-グリシン) を合成し、これとチロシンエチルエステル (Y) をモノマーに用い、パパインを触媒に用いた化学酵素共重合により、対応するポリペプチドを得た (図1)。得られたポリペプチドは反応溶液であるリン酸緩衝溶液から濾別することで簡単に回収可能であった。その構造は <sup>1</sup>H NMR, MALDI-TOF MS, FT-IR により確認した。得られたポリペプチド中に含まれる GPG と Y の成分比は、重合時における仕込比とほとんど一致していた。次いで、得られたポリペプチドを蚕由来シルク (シルクタンパク質: SF)

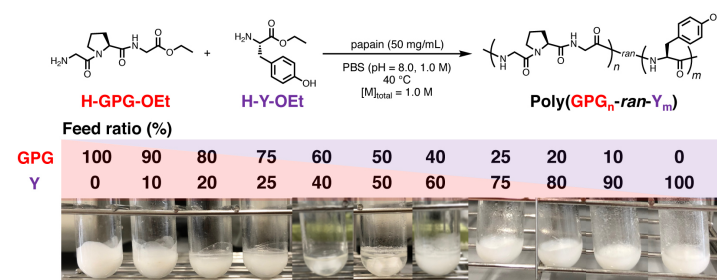


図1. 化学酵素重合によるポリペプチド合成

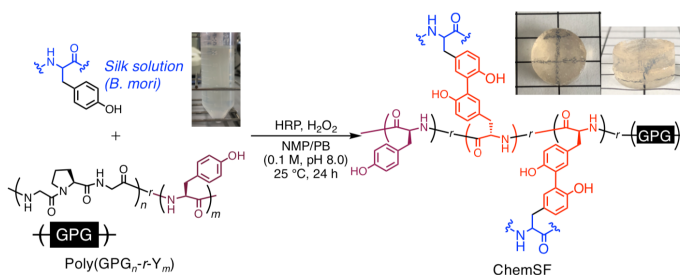


図2. 得られたポリペプチドを架橋剤として用いるシルクゲル (ChemSF) の調製

の化学ゲル合成の架橋剤に利用した。シルク水溶液 ( $c = 6$  wt%) と NMP/PBS に溶解したポリペプチドを混ぜ合わせ、さらに酸化酵素であるペルオキシターゼ (HRP) と過酸化水素水を加えて攪拌した後、静置することで対応するゲル (ChemSF) を得た (図 2)。SF にもチロシン残基が含まれていることから、酵素重合により合成したポリペプチドに Y を含まない poly(GPG) からも不溶のゲルが得られた。しかしながら、そのゲルが生成する速度 ( $t_{gel}$ ) をレオメータを用いて評価したところ、架橋剤として用いたポリペプチドに含まれる Y の含有量が増えるに従い、 $t_{gel}$  が速くなることが明らかとなった (図 3)。最も Y 含有量が多い poly(GPG<sub>20-r</sub>-Y<sub>80</sub>) では、0.25 wt% 以上のポリペプチドを架橋剤に用いた場合は、HRP を添加後すぐにゲル化が起これ、 $t_{gel}$  を正確に求めることが困難であった。次いで、ChemSF の復元力を調査したところ、poly(GPG<sub>40-r</sub>-Y<sub>60</sub>) および poly(GPG<sub>20-r</sub>-Y<sub>80</sub>) を架橋剤に用いた ChemSF では、そのレジリエンスが未添加系に比べて向上する傾向がみられた (図 4)。特に GPG 含有率の多い poly(GPG<sub>40-r</sub>-Y<sub>60</sub>) を添加した場合にその効果がより顕著に観測され、架橋剤に用いたポリペプチドの配列が得られるゲルの特性に影響を及ぼすことがわかった。今回の poly(GPG<sub>n-r</sub>-Y<sub>m</sub>) では、得られる ChemSF の  $t_{gel}$  と復元力といった異なるパラメータを同時に調節可能であった。今後さらなる分子配列や共重合モノマーのチューニングによって、多様なペプチド由来エラストマーの創出が可能になると期待される。

上述の内容に加え、将来的に合成した弾性モデルペプチドを既存ゴム材料と複合化することを見据え、その構造が詳細に研究されている SF と天然ゴム (NR) の複合材料を調製し、その力学強度や構造に関して調査した。ラテックス (NR 含有率 62%) とシルク水溶液を 30 分間攪拌した後ダンベル試験片にくり抜いたモールドへ流し込み、室温で乾燥させることで所定の割合で二種類を混合した複合材料を得た (図 5)。その力学強度を評価したところ、NR のみのサンプルと比較し、SF を添加した系ではヤング率と破断応力が大きく増加し、SF が天然ゴムの補強材として機能することが明らかとなった (図 6)。今後、化学酵素重合により得られた弾性モデルペプチドを添加することで、既存ゴム材料への機能の付与や物性制御も可能になると期待される。

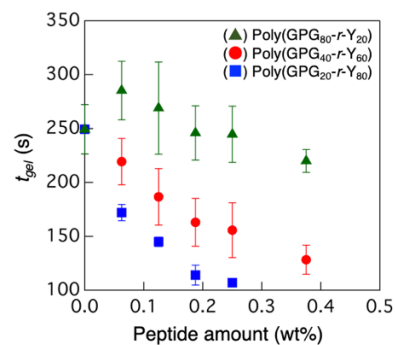


図 3. 添加したポリペプチドとゲル化速度 ( $t_{gel}$ ) の関係

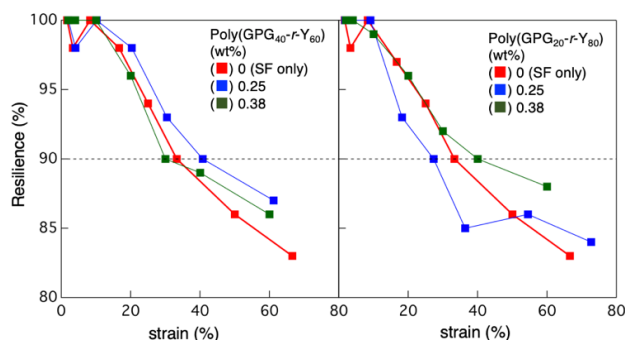


図 4. ChemSF の復元力

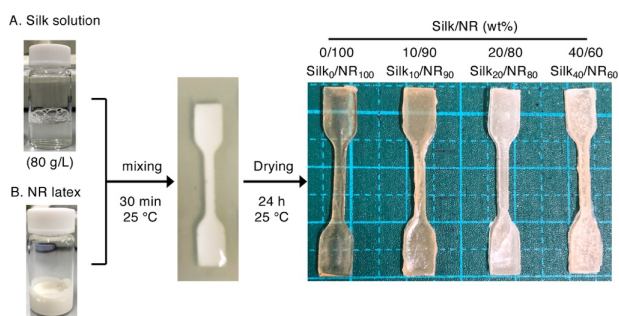


図 5. SF/NR 複合材料の調製

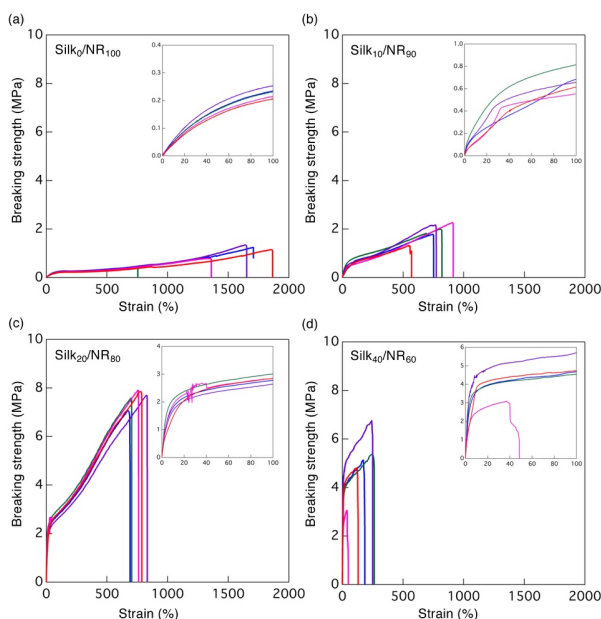


図 6. SF/NR 複合材料の応力-ひずみ曲線 (伸長速度: 10 mm/min)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 曾川洋光	4. 巻 55
2. 論文標題 シルク由来材料の表面特性と接着性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 塗装工学	6. 最初と最後の頁 366-373
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hiromitsu Sogawa, Takuya Katashima, Keiji Numata	4. 巻 11
2. 論文標題 A covalently crosslinked silk fibroin hydrogel using enzymatic oxidation and chemoenzymatically synthesized copolypeptide crosslinkers consisting of a GPG tripeptide motif and tyrosine: control of gelation and resilience	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Polymer Chemistry	6. 最初と最後の頁 3152 ~ 3161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D0PY00187B	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hiromitsu Sogawa, Treratanakulwongs Korawit, Hiroyasu Masunaga, Keiji Numata	4. 巻 25
2. 論文標題 Silk/Natural Rubber (NR) and 3,4-Dihydroxyphenylalanine (DOPA)-Modified Silk/NR Composites: Synthesis, Secondary Structure, and Mechanical Properties	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 235 ~ 235
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules25010235	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hiromitsu Sogawa, Shohei Takatamatsu, Toyokazu Tsutsuba, Toshikazu Takata	4. 巻 52
2. 論文標題 Nitrile N-oxide-terminated poly( -benzyl L-glutamate) (PBLG): synthesis and catalyst-free grafting onto polybutadiene (PBD) and natural rubber (NR)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 165~171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41428-020-0370-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 曾川 洋光・Gudeangadi Prashant・土屋 康佑・沼田 圭司
2. 発表標題 化学酵素重合によるシルクタンパク質を模倣したマルチブロックペプチドの合成とその二次構造解
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiromitsu Sogawa・Takuya Katashima・Keiji Numata
2. 発表標題 Chemo enzymatic synthesis of polypeptides with tyrosine moiety and its application to chemical crosslinking of silk fibroin
3. 学会等名 第68回高分子年次大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------