

令和元年5月14日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K20066

研究課題名(和文)天然アミノ酸を用いた低環境負荷型イオン回収ペプチドの開発

研究課題名(英文)Development of low environmental load type-ion adsorption peptides

研究代表者

野瀬 健(Nose, Takeru)

九州大学・基幹教育院・教授

研究者番号：10301334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：環境を汚染する有害物質を水中から簡便かつ安全に除去する方法が必要とされている。これに対応するための、取扱が簡便で、環境中に散布しても生物毒性等の二次汚染が生じない汚染物質回収用の素材の開発をめざし、生体分子由来のペプチド配列を素材の原料として用いた機能性素材の開発を本研究では実施した。

その結果として、複数の温度依存的自己凝集性ペプチドに金属結合部位を導入した合成ペプチドアナログの性質と、それらの金属結合性を明らかとした。また、それらのペプチドアナログは環境水中で一定期間安定であった。さらに、ペプチド合成の過程で新規の高機能性温度依存的自己凝集アミノ酸配列を見いだすことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミノ酸は自然界に豊富に存在する物質であり、アミノ酸から構成されるペプチドは極めて環境にやさしく、多くの機能性分子の素材として利用されている。今回の研究では、温度変化に応じて溶液状態と凝集状態にその状態を変化させるペプチドをさらに低濃度でもその状態変化を可能とすることを見いだすとともに、金属結合性を明らかとした。従って、それらペプチドが新しい環境汚染物質の除去素材のシードとなることが期待された。

研究成果の概要(英文)：There is a need for simple and safe methods for removing toxic substances from the environmental water. To develop such a method, we developed peptide-based raw materials for removing metal ions as pollutants that are easy to handle and do not cause secondary contamination even if dispersed into the environment.

As results, we clarified the coacervation properties of synthetic peptide analogues in which metal binding sites were introduced into temperature-dependent self-aggregating peptides, elastin-like peptides (XPGVG)n. We also found their metal binding properties. In addition, these peptide analogues were stable in environmental water for a certain period of time. Furthermore, we successfully obtained novel temperature-dependent self-aggregation amino acid sequences in the peptide analogues.

研究分野：環境科学

キーワード：ペプチド 自己凝集 金属結合性 環境汚染物質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、自然災害や工業化に起因する環境破壊から生じた放射性同位元素や重金属などの環境汚染物質を吸着・回収することが可能で、かつ環境負荷の小さい素材が必要とされている。例えば、福島第一原子力発電所の汚染水問題は、膨大なトリチウム水の量と合わせ、経年劣化したタンクや接続部からの原発汚染水の環境中への漏出、および、排出が大きな課題、問題とされて注目されている。現在、多核種除去装置(汚染水から放射性物質を除去する装置)により汚染水からの放射性核種の除去が進んでおり、汚染水を漏らさないためのタンクの二重化や遮水壁の整備も進められているが、一方で、環境中に漏出した放射性核種の回収や拡散防止のための仕組みの確立は、これからの課題である。特に、降雨時や地下水上昇に伴う漏水に対する対策は喫緊の課題とされている。また、最近では、近隣の淡水域、湖、沼などや建屋における滞留水への放射性同位元素の蓄積が大きな環境問題として報道された。これらに対応するためのさまざまな方法、材料、装置は、すでに開発が進んでいるものもあるが、取扱いが簡便で環境負荷が小さく即応性が効く素材は、専門の技術者や科学者が普段は常駐していない環境で特に必要とされている。そのような素材は、環境中に散布しても毒性等の悪影響が生じないことが、環境保護の観点から重要であった。

(2) このような素材としては、通常、石油を原料として作られる合成高分子が用いられる。それらは、概ね大量に調製することが可能で経済性にも優れ、また、多様な反応性を有する官能基を搭載可能で高機能である。しかし、一度環境中に放出されれば、それ自身が環境中では代謝されない廃棄物となり蓄積、残留したり、その分解物が有害性を呈することなどがある。従って、それらを代替可能な環境負荷の小さい生体分子由来の素材開発が求められている。そのような生体分子由来の素材原料として、アミノ酸の重合体であるタンパク質はその極めて高い安全性から有力な候補である。しかし、タンパク質は一般に大量調製が困難でしかも高価であることから、大量に使用する用途には不向きである。そこで、本研究では、安価に調製可能で、かつ、高い機能性を有するペプチドの開発に着手することとした。すなわち、生体を構成するいわゆる天然アミノ酸、特に、側鎖に官能基を持たないアミノ酸を原料として機能性ペプチドが調製できれば、新規な環境汚染対応可能なバイオマテリアルが開発可能となると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、我々が、これまでに研究してきた疎水性アミノ酸からなる繰り返し配列(Xaa-Pro-Gly-Val-Gly)(Xaa:任意の疎水性アミノ酸)を基盤としたペプチドを母体とし、これのアミノ酸配列および鎖長を改変したものについて、簡便かつ低価格で調製する方法を確立し、有益な機能、ここではイオン吸着能を搭載することを目的とする。すなわち、塩溶液中で温度依存制自己凝集活性を持つペプチド配列のアミノ酸配列の改変、環状化により、特定の金属イオン、もしくは、陰イオンとの親和性を有し、4~40℃の範囲で溶液状態とゲル状態とに形状を変化させる新規機能性ペプチドの調製法を開発する。

3. 研究の方法

本研究では、まず、ペプチドの設計として、アミノ酸配列の検討、及び、その立体構造についての検討を実施した。ペプチドの合成は脱水縮合剤を用いた方法、フラグメント縮合法、NPCアミノ酸を用いる方法を検討した。これらにより様々なアミノ酸配列、鎖長を有するペプチドを調製し、それらの2次構造をCDスペクトル、分子動力学計算(MD)により調べた。また、合成したペプチドについて、温度依存的濁度測定を行い、コアセルベーション能を調べた。凝集したコアセルベートは、光学顕微鏡、DLS(動的光散乱測定)、レーザー回折、走査電子顕微鏡(SEM)、MDにより解析を行った。金属結合性は、比色分析および誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)により実施した。また、環境水中でのペプチドの安定性を検討した。

4. 研究成果

本研究で得られた主な成果を以下に列記する。

1)(Trp-Pro-Gly-Val-Gly)の2量体ペプチドの温度依存的自己凝集機能の解明

(Xaa-Pro-Gly-Val-Gly)を母体としてデザインされたペプチドにおいて、化学合成されたTrp-Pro-Gly-Val-Gly)の2量体((C(WPGVG)₃)₂と略)は、強い温度依存的自己凝集特性を発揮することが明らかとなった。(C(WPGVG)₃)₂は、水溶液中0.5 mg/mLの希薄な濃度で相転移温度が39と低温域で相転移を起こし、コアセルベーション(凝集)を引き起こした(図1)。また、蛍光プローブやDLS、MDを用いた検討を行い、このペプチドの凝集は、まず、微小な凝集体(Microaggregates)が生じた後に、温度上昇と共に大きな凝集体を生じる機構によることを明らかとした(図2)。

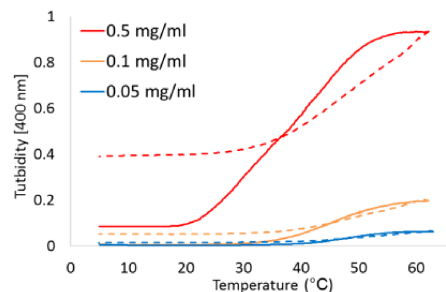


図1 C(WPGVG)₃)₂の温度依存的濁度変化

2) ペプチドの環状化がもたらすコアセルベーション能の向上

(Xaa-Pro-Gly-Val-Gly) を母体としてデザインされたペプチドにおいて、(Phe-Pro-Gly-Val-Gly)_n は、強いコアセルベーション能を有するペプチドとして見いだされ、その後の研究発展の基礎となったペプチドである。(参考文献 1) 本研究においては、このペプチドを環状化したアナログを合成し、その機能を調べた(図 3)。その結果、くり返し数(n)が 3 以上のアナログにおいてコアセルベーションが観測され、従来の直鎖型アナログより短い鎖長でコアセルベーションを引き起こすことが見いだされた。また、この n =

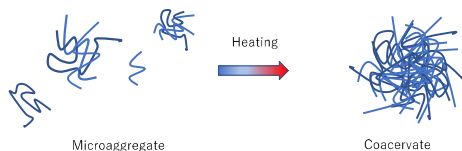


図 2 C(WPGVG)₃)₂ の温度依存的凝集メカニズム (推定図)

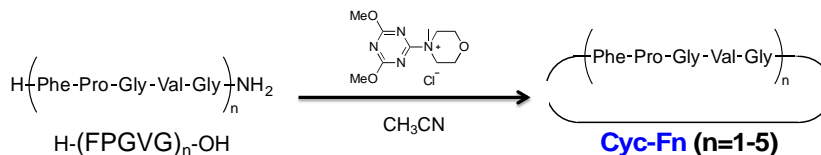


図 3 (Phe-Pro-Gly-Val-Gly)_n を母体としたペプチドの環状化

3 のくり返し数を持つ環状ペプチドは 1.0 mg/mL の濃度において 24.9 という低い相転移温度を示し、低分子量で、かつ、低濃度において低い相転移温度を持つことが明らかとなった。

3) 3 量体ペプチドアナログの金属結合性

本研究では、環状、及び、2 量体ペプチドアナログに対する研究に引き続き、3 量体ペプチドについての検討を実施した。ニトリロ 3 酢酸をリンカーとして(Phe-Pro-Gly-Val-Gly)₃ および (Phe-Pro-Gly-Val-Gly)₅ を 1~3 分子縮合させたアナログを調製した。その結果、3 量体化は、直鎖ペプチドのコアセルベーション能を著しく増強させることが明らかとなった。しかし、同時に疎水性も強くなり、水溶性が低下することが判明した。(Phe-Pro-Gly-Val-Gly)₃ を 2 分子縮合させたアナログは、1.0 mg/mL の濃度において 11.7 という低い相転移温度を示した。また、その 2 次構造は、直鎖アナログと同等であることを CD 測定により明らかとした。また、(Phe-Pro-Gly-Val-Gly)₅ を 1 分子縮合したアナログは、銅イオン、ニッケルイオンとともに 2:1 の比で結合することを比色分析と IPC-MS により明らかとした。この試験においては、イオンを結合後にコアセルベーションを起こさせ、溶液中からペプチドを除去し、残った溶液中のイオン濃度を定量することでペプチドに吸着したイオン濃度を算出した。また、このペプチドは海水中、水道水中で 1 週間のインキュベーションを経ても分解を受けなかった。

これらの研究により、複数の温度依存性自己凝集ペプチドを見いだすとともに、今回合成したペプチドアナログを用いて、水中からイオンを吸着した状態でコアセルベーションを起こさせることでペプチドを分離し、金属イオンを水中から吸着除去できることを示した。

参考文献 1 I. Maeda *et al.*, *Protein Pept. Lett.* 2015, **22**, 934-939. DOI: 10.2174/092986652210150821170703.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Keitaro Suyama, Daiki Tatsubo, Suguru Taniguchi, Iori Maeda, Takeru Nose, Development of Self-assembling Short Elastin-derived Peptide Analogs: Linear and Nonlinear (FPGVG)_n Analogs, 2019, *Peptide Science 2018*, 117、査読有

Daiki Tatsubo, Keitaro Suyama, Iori Maeda, Takeru Nose, Structure and Function of the Elastin-like Short Peptide Analogs with Shuffled Sequences Based on (FPGVG)₅, 2019, *Peptide Science 2018*, 65、査読有

Keitaro Suyama, Daiki Tatsubo, Wataru Iwasaki, Masaya Miyazaki, Yuhei Kiyota, Ichiro Takahashi, Iori Maeda, Takeru Nose, Enhancement of Self-Aggregation Properties of Linear Elastin-Derived Short Peptides by Simple Cyclization: Strong Self-Aggregation Properties of Cyclo[FPGVG]_n, Consisting Only of Natural Amino Acids, 2018, *Biomacromolecules*, 2018, **19**, 3201-3211、査読有
DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00353>

Daiki Tatsubo, Keitaro Suyama, Masaya Miyazaki, Iori Maeda, Takeru Nose, Stepwise Mechanism of Temperature-Dependent Coacervation of the Elastin-like Peptide Analogue Dimer, (C(WPGVG)₃)₂, *Biochemistry*, 2018, **57**, 1582-1590、査読有
DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01144>

Daiki Tatsubo, Misako Kodama, Keiji Sato, Keitaro Suyama, Iori Maeda, Takeru Nose, Effects of Salts and pH on Coacervation of Short Elastin-Like Peptide (FPGVG)₅, 2018, *Peptide Science 2017*, 62-63、査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

巢山慶太郎、田坪大来、谷口卓、前田衣織、野瀬 健、Development of Self-assembling Short Elastin-derived Peptide Analogs: Linear and Nonlinear (FPGVG)_n Analogs, 10th International Peptide Symposium, 2018

田坪大来、巢山慶太郎、前田衣織、野瀬 健、Structure and Function of the Elastin-like Short Peptide Analogs with Shuffled Sequences Based on (FPGVG)₅, 10th International Peptide Symposium, 2018

坂本直樹、田坪大来、巢山慶太郎、前田衣織、野瀬 健、エラスチン様ペプチド(FPGVG)₅ の脂肪酸付加アナログを用いたリポソーム様凝集体形成、第 55 回化学関連支部合同九州大会、2018

Keitaro Suyama, Daiki Tatsubo, Iori Maeda, Takeru Nose, The self-assembly properties of elastin-derived (FPGVG)_n peptide analogs aiming for development of basic materials as pH and temperature-responsive hydrogels、日本化学会第 9 8 春期年会、2018

Mika Mawatari, Daiki Tatsubo, Keitaro Suyama, Iori Maeda, Takeru Nose, Self-association and metal binding properties of novel trimeric analogs of elastin-derived peptide (FPGVG)_n、日本化学会第 9 8 春期年会、2018

Daiki Tatsubo, Misako Kodama, Keiji Sato, Keitaro Suyama, Iori Maeda, Takeru Nose, Effects of salts and pH on coacervation of short elastin-like peptide (FPGVG)₅, 第 5 4 回ペプチド討論会, 2017

馬渡弥佳、田坪大来、巢山慶太郎、野瀬 健、温度依存的自己凝集性ペプチド(FPGVG)_n の三量体合成と凝集性の解析、第 54 回化学関連支部合同九州大会、2017

田坪大来、児玉美佐子、巢山慶太郎、前田衣織、野瀬 健、エラスチン由来ペプチド(FPGVG)₅ アナログの自己集合における塩および pH の影響、平成 29 年度日本生化学会九州支部例会、2017

巢山慶太郎、田坪大来、袈裟丸仁志、前田衣織、野瀬 健、環状合成ペプチド・Cyc-(FPGVG)_n の自己集合特性の解析、平成 29 年度日本生化学会九州支部例会、2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：自己集合能を有するペプチド

発明者：前田衣織、野瀬 健

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2018-225513

出願年：2018

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：巢山慶太郎

ローマ字氏名：Keitaro Suyama

研究協力者氏名：松島綾美

ローマ字氏名：Ayami Matsushima

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。