

機関番号：34413

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590023

研究課題名（和文） β アミノ酸導入によるエラスチンフラグメントの医療基剤への応用研究課題名（英文） Development of dosage form using elastin fragments by incorporation of β -amino acids

研究代表者

土井 光暢 (DOI MITSUNOBU)

大阪薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：10183500

研究成果の概要（和文）：エラスチンフラグメント(EF) VAPGVG はヘキサペプチドでありながら、エラスチンにみられる性質をいくつか継投している。EF に β アミノ酸を導入することで、構造や特有の性質がどのように変化するか検討した。その結果、CDスペクトルで 220 nm 付近に観測された負のコットンは、 β アミノ酸導入によって反転したスペクトルをえた。このことは、 β アミノ酸の導入は、EF に大きな構造変化をもたらすことを示した。さらに、もう一つの EF である(PVGVG)₄ はペンタペプチドがくり返す配列であり、CDスペクトルでは顕著な構造の存在は示唆されなかった。しかし、3位の Gly を β することで、大きな構造変化を誘導することを明らかにした。また、関連ペプチドである Boc-Pro-Hyp-OMe の結晶構造を明らかにし、主鎖コンホメーション (ϕ , ϕ') の値が、コラーゲン 3 重鎖の値と類似していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Physicochemical properties of elastin fragment (EF) VAPGVG reflect those of elastin itself. We attempted to incorporations of β -amino acids to EF. In CD spectra, a positive Cotton observed at 220 nm was reversed to negative by incorporation of β -amino acids. This spectrum changes suggested β -amino acids caused the structural change f EF. On the other hand, the PVGVG repeating peptide (PVGVG)₄ shows no typical CD spectrum. The replacement Gly³ of this 20mer with β Gly lead a CD spectrum change indicating a structural formation. Moreover, X-ray analysis of Boc-Pro-Hyp-OMe shows the structural characteristics of this tripeptide resemble to those collagen model peptide.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：化学系薬学

科研費の分科・細目：生体関連物質

キーワード：構造活性相関・ β アミノ酸・CD・結晶化・ゲル化

1. 研究開始当初の背景

エラスチンフラグメント Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly (E F) はヘキサマーであり、エラスチンに見られる繰り返し配列の開始アミノ酸が1残基ずつスライドしている。E Fにはエラスチンと類似した chemotactic 性を示すが、コアセルベーションはおこさない。これに対してペンタマー誘導体 Gly-Val-Gly-Val-Pro はコアセルベーションをおこす。このように僅かな違いで全く異なる物性をもつ E F の性質は興味深い。

関連ペプチドであるコラーゲンは -X-Y-Gly- と表されるトリプレットの繰り返しで3本鎖ヘリックスを形成することで力学的な強度を得ることができる。申請者らはトリプレットの最小単位である

Boc-Ala-Hyp-Gly-OBzl や Boc-Pro-Hyp-Gly-OBzl の3本鎖ヘリックスをとらない構造を考察することで、Pro などの5員環側鎖が Gly 位置の凹型にはまり込み、安定性の向上に寄与していることが推測された。

このように側鎖を有しない Gly は隣接分子との空間配置によってエラスチンやコラーゲンの持つ弾性繊維マトリックスの性質の一因であるという考えに至った。

2. 研究の目的

エラスチンフラグメント誘導体を作成し、粘弾性に関する物性がどのように変化するかを解析し、あたらしいバイオマテリアルとして医療基剤などへの応用を目的とする基盤研究を行う。

E F 誘導は Gly の構造的意義に注目し、E F に2残基存在する Gly を1つ除去する。これによって、3原子-2結合分が欠落するが、かわりにβアミノ酸を3カ所導入することで、全長の原子数をも元の E F と同様になるように設計する。

3. 研究の方法

構造変化もモニターするために CD スペクトルを測定する。この際、溶媒環境に影響を与えるトリフルオロエタノール (TFE) を濃度を変えながら加え、CD 変化も測定した。また、エラスチンモデルペプチドに Ca イオンが結合することも知られているので、Ca イオン添加による CD 変化も測定した。

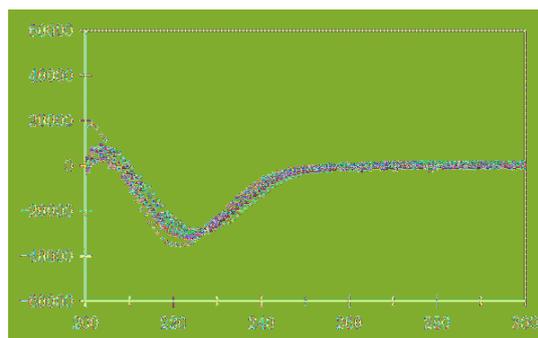
4. 研究成果

Boc-VAPGVG-OMe (1) を親ペプチドとして、6位 Gly を1つ欠損させ、βアミノ酸を3カ所に導入した誘導体と、4位 Gly を欠損させた誘導体を液相法により合成した。誘導体配列は次の6種類：

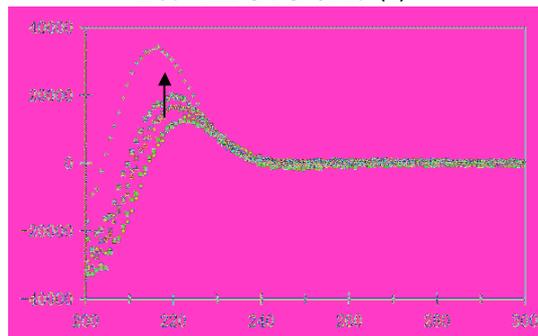
- Boc-V bA bP bG V-OMe (2)
 - Boc-VA bP bG bV-OMe (3)
 - Boc-bV bA bP GV-OMe (4)
 - Boc-VA bP bV bG-OMe (5)
 - Boc-V bA bP bVG-OMe (6)
 - Boc-bV bA bPVG-OMe (7)
- (* βアミノ酸はbAなどで表す)

これら誘導体を蒸気拡散法で結晶化を行ったが、一部からは微小針状結晶を得られるものの、X線回折に適した結晶は得られていない。また、疎水性を付与するために導入した Boc 基と OMe 基を除去し、水溶性を高めた誘導体も結晶化を試みたが結晶を得るに至っていない。

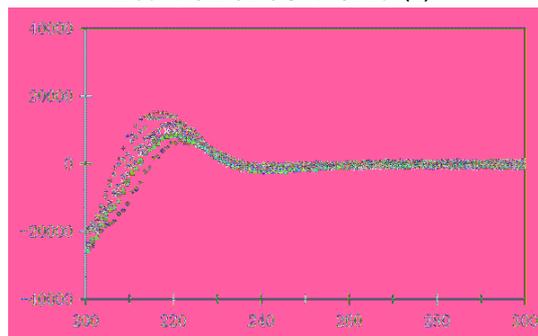
次に CD スペクトルを示す。ペプチド濃度は 0.05 mmol/L 付近なるよう調整した。また、溶媒には MeCN を使用し、TFE は 0, 10, 20, 30, 40, 50, 100% とした。グラフの横軸は波長 nm、縦軸はモル楕円率 deg cm² dmol⁻¹ を表す。



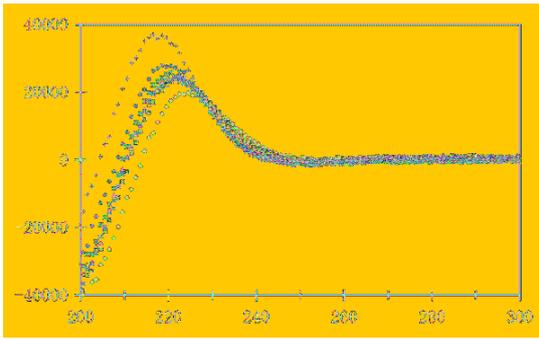
Boc-VAPGVG-OMe (1)



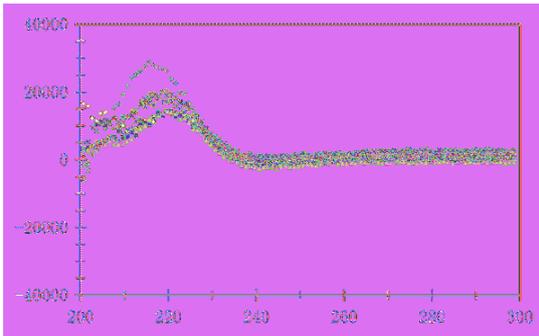
Boc-V bA bP bG V-OMe (2)



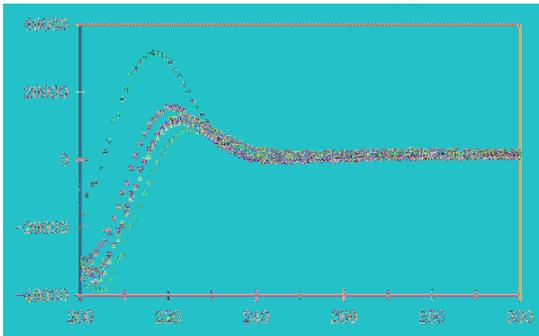
Boc-VA bP bG bV-OMe (3)



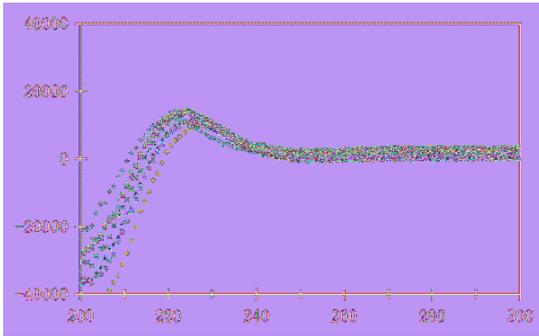
Boc-bV bA bP GV-OMe (4)



Boc-VA bP bV bG-OMe (5)



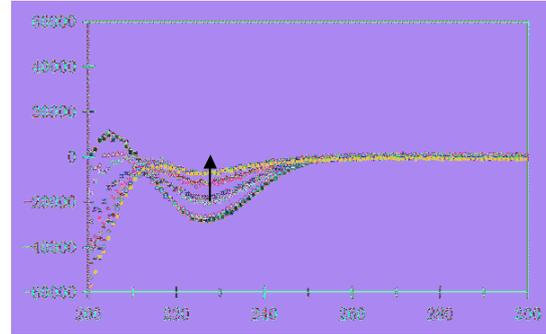
Boc-V bA bP bV bG-OMe (6)



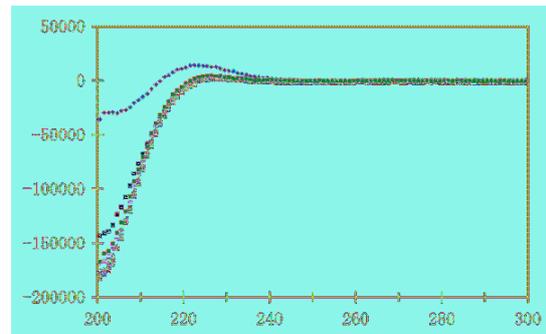
Boc-bV bA bP VG-OMe (7)

親ペプチド(1)は225 nm 付近に負のコットンを示し、TEFの影響を受けない安定した溶液構造であることが示された。これに対して、 β アミノ酸を導入した全ての誘導体では、220 nm 付近で正のコットンを示した。これによって、 β アミノ酸の導入はEFの構造大きく変化させることが判明した。また、全ての誘導体においては TEF の影響は小さく、安定した構造であり、それぞれ類似した構造であることが推察される。

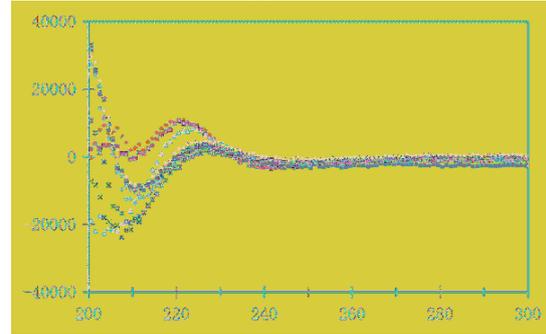
古くからエラスチンフラグメントはカルシウムイオンとの相互作用が報告されている (Biochim. Biophys. Acta 342, 281-289, 1974) いるので、EFの β 化誘導体についてもカルシウムイオン存在化のCDスペクトルを(1), (3), (5), (6), (7)について測定した。ペプチド濃度は0.05 mmol/L 付近に調整し、カルシウム濃度を0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.24, 0.30, 0.36, 0.48, 0.60, 0.72 μ mol/L で変化させ、観測したスペクトルを次に示す。



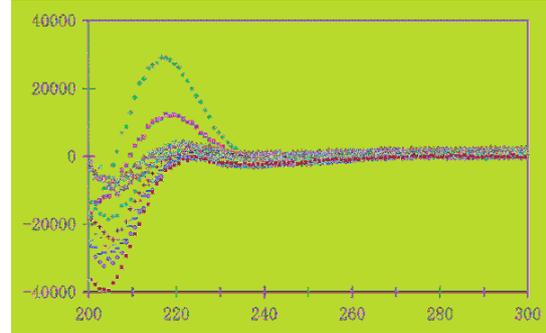
Boc-VAPGVG-OMe(1) 0.04 \rightarrow 0.72mmol/L CaCl₂



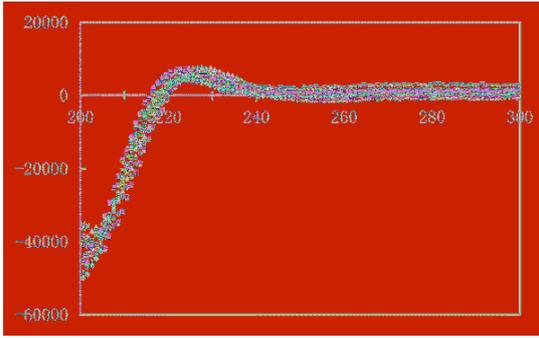
Boc-VbAbPbGV-OMe(3)0.04 \rightarrow 0.72mmol/LCaCl₂



Boc-VAbPbVbG-OMe(5)0.04 \rightarrow 0.72mmol/LCaCl₂



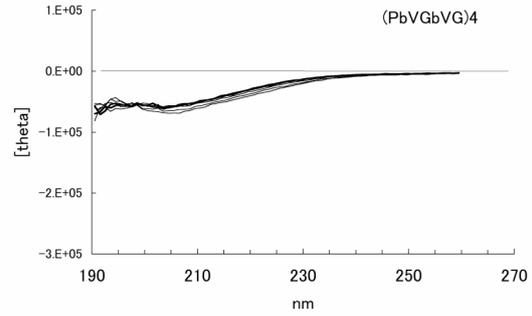
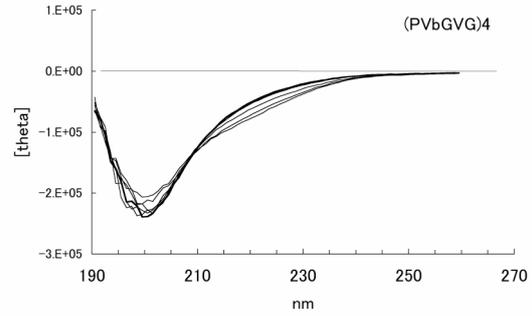
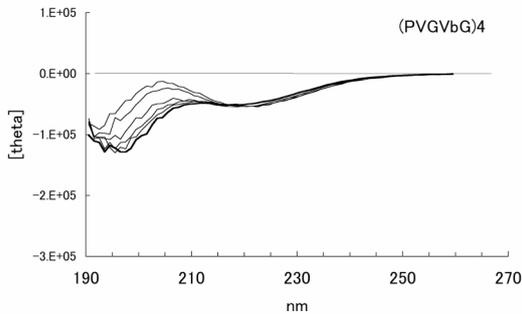
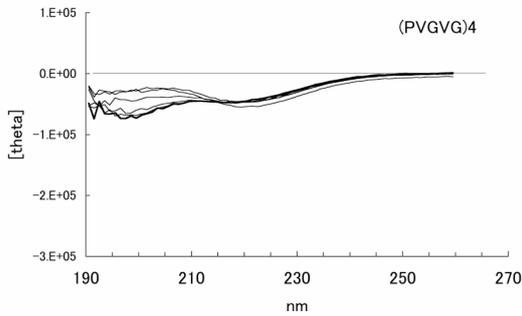
Boc-VbAbPbVG-OMe(6)0.04 \rightarrow 0.72mmol/LCaCl₂



Boc-bVbAbPVG-OMe(7)0.04→0.72mmol/LCaCl₂

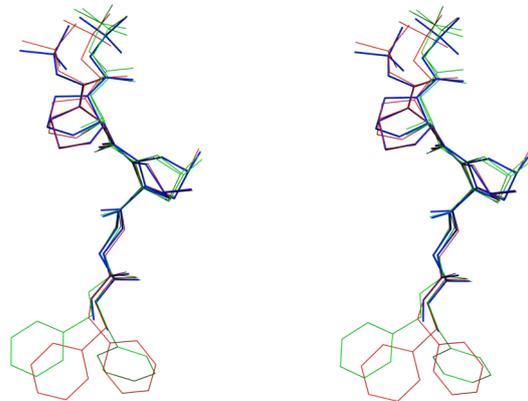
カルシウムの添加により(1)は負のコットンが減弱し、構造変化が起こっていることが示された. 誘導体(5), (6)は220 nm付近のコットンが減少し、カルシウムに添加によって(3), (7)に近いスペクトルを示すようになった. 従って、β化した誘導体はカルシウム添加によって1つの類似した構造に収斂すると考えられる.

次に、PVGVGが4回繰り返す16残基ペプチド(8)と、βアミノ酸を導入した(9)–(11)を合成しCDスペクトルを測定した. ペプチド濃度は0.02 mmol/L付近とし、TFE濃度を0, 5, 9, 17, 23, 29%と変化させた.



(8)は20残基のペプチドであるが、きわだった構造の存在を示すスペクトルは得られなかった. これに対して、2位のValをβ化した誘導体(10)においては、明瞭な構造の存在が示唆された. ところが、4位のValをβ化した誘導体(9)では、若干の変化はみられるものの、(10)ほどの変化は得られなかった. このことから、2位のValは構造形成の上で重要な残基であることが判明した.

エラスチンの関連ペプチドとしてコラーゲンがある. コラーゲンはPro-Pro-GlyまたはPro-Hyp-Glyという3残基が繰り返す、3重鎖ヘリックスを形成する. この最小限のユニットであるPro-Hyp-Glyに注目し、両末端保護による疎水性を上げたBoc-Pro-Hyp-Gly-OMeのX線構造解析を行った(下図).



その結果、3重鎖は形成していなかったが、主鎖のコンホメーションの角度を示す (ϕ, ψ) がコラーゲンの値と類似していた。これは、3残基の基本単位は3重鎖を取ることで特定の構造になるのではなく、元々、基本単位として取りやすい構造がコラーゲンの基本構造であることを示している。また、Hypにはupとdownと呼ばれる5員環のパックリング構造が存在するが、この3残基では両方の構造がみられた。これは、以前に報告されている誘導体 Boc-Ala-Hyp-Gly-OBzl などでも観測されており、コラーゲンの安定構造を考える上で興味深い。

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 1 件)

- 1) Asano, A., Imori, K., Sakaguchi, N. & Doi, M. (2010) Crystal Structure of t-Butyloxy-carbonyl-L-prolyl-L-hydroxyprolyl-glycine methyl ester (Boc-Pro-Hyp-Gly-OMe). *Anal. Sci., X-Ray Structure Analysis Online*, **26**, 53-54.

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計◇件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://msc.oups.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土井光暢 (DOI MITSUNOBU)

大阪薬科大学・薬学部・教授

研究者番号 : 1 0 1 8 3 5 0 0

(2) 研究分担者

浅野晶子 (ASANO AKIKO)

大阪薬科大学・薬学部・助教

研究者番号 : 4 0 2 9 1 8 0 1

(3) 連携研究者

山本大助 (YAMAMOTO DAISUKE)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 5 0 2 4 0 1 0 6