

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550068

研究課題名(和文)自己凝集性ペプチドを基材とした金属イオン回収材の開発

研究課題名(英文)Development of the metal ion recovery material using the self-aggregating peptides as base materials

研究代表者

野瀬 健 (Nose, Takeru)

九州大学・学内共同利用施設等・教授

研究者番号：10301334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：原発事故で生じた汚染水の処理や希少金属の捕集のため、合成エラスチンペプチド分子およびその修飾体、ジスルフィド結合で二量体化したダイマー、さらにアミノ酸置換したアナログ等を用いて、合成、温度依存性自己凝集能測定および金属塩との相互作用に関する検討を行った。

これらのペプチドは簡便に合成することが可能で、海水中、淡水中で分解されることはなかった。各種金属塩の存在下で自己凝集能を検討したところ、イオン価数の増大とともにペプチドの凝集温度が低下し、凝集能が向上したことが明らかとなった。この結果は、エラスチン由来ペプチドがイオンと相互作用することで低温、低濃度で凝集し溶液から分離可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：For development of functional materials possessing metal and radioactive pollutant binding characteristics, various kinds of elastin-derived peptides with chemical modification, amino acid substitution or dimerization were synthesized. Synthesized peptides were analyzed by temperature-dependent coacervation properties with and without a series of metal salts. These peptides were easily synthesized and were stable in seawater and freshwater. When coacervation property of peptides was examined with various kinds of metallic salts, it was observed that coacervation temperature was decreased as increasing of valence of ion. These results indicated that the elastin-derived peptides interacting with ions could be separated from solution phase at low temperature and at low peptide concentration.

研究分野：環境科学

キーワード：機能性分子 合成ペプチド コアセルベーション

### 1. 研究開始当初の背景

福島第一原子力発電所の汚染水処理が、大きな問題となっている。遮水壁の設置も遅れから、地下水(約300~1,000 t/day)が施設内に流れ込み、冷却水と合わさって膨大な量の汚染水となり敷地内のタンクに保管されている。しかし、タンクからの汚染水の漏出事故が続く、環境中に高線量の放射性汚染水が放出されてしまった。既に、汚染水処理装置として「多核種除去設備」(Advanced Liquid Processing System: ALPS)が設置され稼働が試みられているが、様々な問題から順調に稼働し続けてはいない状況があった。

ところで、我々は天然アミノ酸からなるペプチド・(C-(FPGVG)<sub>5</sub>)<sub>2</sub>が、温度依存的に自己凝集するコアセルベーション能を持つことを見出した。このペプチドは、低温では水に可溶で、温度を上昇させると次第に溶液が白濁し、ペプチド分子が自己凝集(コアセルベーション)して、最終的には相分離を起こして沈殿する。この自己凝集は可逆であり、温度を下げると次第に再溶解を起こす。一般に知られているように、ペプチドやタンパク質は2価の金属と結合する。このため、このペプチド単体でも放射性ストロンチウムなどの金属イオンを結合する担体として働くことが強く期待された。

### 2. 研究の目的

上記のように、原発事故で生じた汚染水の処理や希少金属の捕集のために、また、水中に溶けている金属を回収する方法の開発、改良が、必要とされている。そこで、我々が開発した合成エラスチンペプチド分子(C-(FPGVG)<sub>5</sub>)<sub>2</sub>は、10℃~30℃の範囲で温度依存的に凝集するコアセルベーション能を有することから、これを用いて汚染水を処理することが可能な温度依存性自己凝集能を有するポリマーの開発を試みた。一般に、ペプチドやタンパク質は金属イオンと相互作用する。そこで、(C-(FPGVG)<sub>5</sub>)<sub>2</sub>やそのアミノ酸置換体、化学修飾体は、温度変化に伴う自発的コアセルベーションにより凝集、沈殿する性質により汚染水から容易に分離することができる性質を備えた金属回収能を持った機能性分子になり得ると考えた。このペプチドは、水中から金属を、ほぼ常温、常圧で回収可能で、さらには、原料がアミノ酸であるため自然環境における安全性が非常に高く、大規模かつ簡便に使用可能な金属回収機能性分子となると期待された。

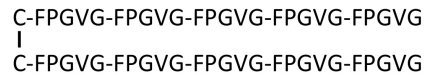
### 3. 研究の方法

本研究における主な取組として、エラスチン由来ペプチド(C-(FPGVG)<sub>5</sub>)<sub>2</sub>の広範な利用を可能にするための簡便な合成法の開発、ペプチドの改良、および、金属結合性の解析を実施した。

#### (1) エラスチン由来ペプチドの合成法の開

#### 発・改良

生体の持つ弾性タンパク質・エラスチンのアミノ酸配列中に含まれる部分ペプチドは、エラスチンと同様に自己凝集活性を持つ。我々はこれに注目し、部分ペプチドの誘導体(FPGVG)<sub>5</sub>を作成したところ、低分子量のペプチドでも体温付近でコアセルベーションを示すことを見出している。そこで、従来法によるペプチド合成法によりダイマーペプチドを調製したところ、簡便、迅速にペプチドが調製できた。そのダイマーペプチドのアミノ酸配列を下に示す。



さらに、モノマー・FPGVGのF(フェニルアラニン)をW(トリプトファン)にしたペンタマー(5mer)およびトライマー(3mer)を調製して諸性質を検討した。

#### (2) 金属結合性の解析

合成したペプチドを用いて、様々な塩の影響評価を実施した。特に、コアセルベーション時のペプチド濃度、溶液温度等を濁度法を用いて検討した。

#### (3) 環境中での安定性の検討

合成したエラスチンペプチドの環境中での挙動を解析するために、貯水池や海から採取した淡水や海水中でのペプチドの安定性を調べた。各時間毎にUPLC-MSにインジェクトして分解状況をクロマトグラムと分子量から確認した。

#### (4) ペプチドの能力向上

ペプチドの凝集能力、金属結合力を増強する目的で、化学修飾実験を行った。特に、N末端アミノ基においては、種々のカルボン酸をアミド結合で導入してペプチドの疎水性を増大させることによる必要濃度が低減可能か検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) エラスチン由来ペプチドの合成法の開発・改良

本研究でデザインし、調製したエラスチンペプチドの特徴の一つとして合成の容易さがあげられる。実際、本研究の遂行中にコンベンショナルな合成法を用いる限りにおいては、ペプチド合成に問題を生じることは無かった。これは、特有のペプチド配列、すなわち側鎖保護を要しないFPGVGという構造に起因する。一方で、トリプトファンを搭載したペプチドでは、トリプトファンの側鎖インドールを無保護、もしくは、Boc保護して合

成に用いた。この場合には、インドール保護のためにスカベンジャーを添加する必要があることから、合成反応後に用いたトリフルオロ酢酸を主成分とする脱樹脂・脱保護試薬の除去操作でのスカベンジャーの除去が必要となり、操作自体が煩雑となった。ペプチドダイマーの調製においては、システイン含有フラグメントの合成において、同様の困難さがあった。一方で、通常法の空気酸化を用いる方法で容易にダイマーペプチドが調製可能であった。フラグメント縮合を用いる調製では、希望する鎖長の最終物を得ることが困難で、短鎖長のペプチドや環状ペプチドの生成が確認され、これらについては今後のさらなる検討が必要であると判断された。

## (2) 金属結合性の解析

合成したペプチドが金属塩とどのような相互作用をするか検討を行った。本研究では、エラスチンペプチドが持つコアセルベーション能を用いてペプチドがゲル状となり沈殿する。まずは、この沈殿現象に塩がどのように相互作用するかについて検討した。

まずは、1価から3価のアルカリ金属、アルカリ土類金属、アルミニウムの塩化物のコアセルベーションに対する影響を調べた。ペプチド溶液の温度を連続的に変化させることでコアセルベートを生じさせると濁りを生じる。この濁りを分光光度計で測定するが、この濁りが最大に達する1/2の濁り度(濁度)をTransition Temperatureとしてコアセルベーション能の尺度とした。(FPGVG)<sub>5</sub>-NH<sub>2</sub>を用いた試験では、数に示す様に陽イオンの種類には寄らず、イオン価数に正比例してコアセルベーション開始温度が低下することが明らかとなった。

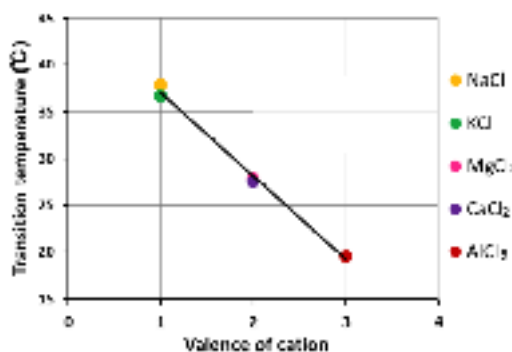


図 陽イオンの価数と(FPGVG)<sub>5</sub>-NH<sub>2</sub>のコアセルベーション温度の関係

この、直線性についてさらに調べるため、アミノ末端をアセチル化することで陽電荷を無くしたアナログ体 Ac-(FPGVG)<sub>5</sub>-NH<sub>2</sub>を調製して、同じ実験に用いたところ、傾きが1/4に小さくなった。これは、N末端のアミノ基がイオンとの相互作用に強く関与していることを示していると考えられた。

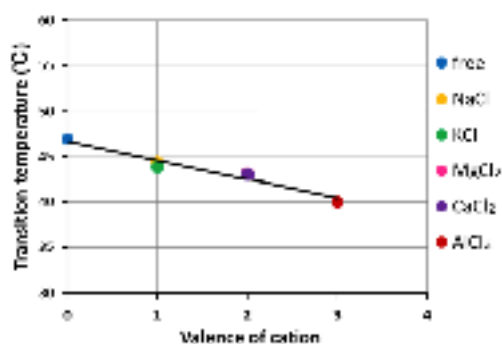


図 陽イオンの価数とAc(FPGVG)<sub>5</sub>-NH<sub>2</sub>のコアセルベーション温度の関係

これらの結果から、今回用いたペプチドではN末端アミノ基を無保護(フリー)で用いたときは溶液中の陰イオンの数に相関してコアセルベーション能を著しく増大させることが判明した。これは、純水中に塩が漏出した場合には、純水中よりも強力にペプチドがコアセルベーションを起こして凝集し、ゲル状となって沈殿するというを示しており、本研究で目的とした望ましい物性を持つことが明らかになった。また、陰イオンに関しては、ヨウ化物イオンによりコアセルベーション能が上昇した。

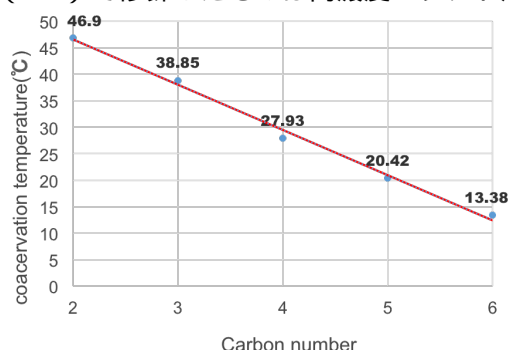
## (3) 環境中での安定性の検討

本ペプチドを環境中で用いる場合、簡単に分解を受けてペプチド鎖長が短くなると、必要なコアセルベーション能力を喪失することが懸念される。そこで、環境水中におけるペプチドの安定性を検討したが、今回用いた海水中、淡水中(貯水池から採取)においては顕著な分解を受けなかった。本研究で用いているエラスチンペプチドの母体となっているタンパク質・エラスチンは、通常、エラスチンを特異的に分解する酵素エラターゼ以外では分解を受けにくい。このことから、エラスチン様配列を持つペプチドの有用性が指摘された。

## (4) ペプチドの能力向上

本研究においては、エラスチンペプチドを実際に金属収集単体として使用する場合の最も特徴的な性質となり、単体回収時に重要な凝集能(コアセルベーション能)を増強するための能力向上について検討を行った。まず、エラスチンペプチドがどのようなメカニズムで温度依存的な凝集を示すかの検討を、蛍光測定、粒径測定、分子動力学計算で検討を行った。その結果、エラスチンペプチドはコアセルベーションを起こさない低温下でも微小凝集体を形成していることが明らかとなった。この微小凝集体形成には、ペプチドの疎水性が大きく寄与していると考えられたことから、ペプチドN末端のアミノ基を脂肪酸で化学修飾することでアミノ基の親水性を打ち消し、アルキル基の鎖長で疎水性

を調整することとした。その結果、N末端を修飾したペプチドは、アルキル鎖長に正比例して Transition Temperature が低下することが判明した。特に、アルキル鎖長1 ( $n=1$ )のアセチル体に比べ、同濃度でカプロン酸 ( $n=5$ )で修飾したものは同濃度ペプチド溶



液において、Transition Temperature が約34度低下することが判明した。

図 修飾したカルボン酸の炭素数とコアセルベーション温度の関係

#### (5) まとめ

以上の様に、本研究ではエラスチン由来ペプチドが金属塩溶液中において強いコアセルベーション能を示すこと、分子疎水性を増強することで、そのコアセルベーション能が増強されることが明らかとなった。これらの研究成果は、今後、実用的なペプチド性、温度依存的自己凝集性金属結合担体開発の実施する端緒を開いた。

#### 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4件)

- (1) Suguru Taniguchi, Noriko Watanabe, Takeru Nose, Iori Maeda, Development of short and highly potent self-assembling elastin-derived pentapeptide repeats containing aromatic amino acid residues, JOURNAL OF PEPTIDE SCIENCE, (査読有り) 22(1), 36-42 (2016). DOI: 10.1002/psc.2837
- (2) Keitaro Suyama, Suguru Taniguchi, Daiki Tatsubo, Iori Maeda and Takeru Nose, Dimerization effects on coacervation property of an elastin-derived synthetic peptide (FPGVG)<sub>5</sub>, JOURNAL OF PEPTIDE SCIENCE, (査読有り) 22(4), 236-243 (2016). DOI: 10.1002/psc.2876
- (3) Daiki Tatsubo, Keitaro Suyama, Takeru Nose, Fluorescence Analysis Using a Molecular Probe 1,8-ANS for Elucidation of the Molecular Mechanisms Underlying Coacervation of a Tryptophan-containing Elastin

derived Dimeric Peptide, Peptide Science 2015, (査読有り) 95-96 (2016).

- (4) Coacervation property and structural analysis of synthetic dimer peptides of aromatic amino acid containing elastin-derived peptides Peptide Science 2014, (査読有り) 323-324 (2015).

[学会発表](計14件)

- (1) 兒玉美佐子、他、無機塩水溶液中におけるエラスチン由来ペプチド(FPGVG)<sub>n</sub>アナログのコアセルベーション特性、日本化学会第96春季年会、平成28年3月27日、同志社大学京田辺キャンパス(京都府・京田辺市)
- (2) 田坪大来、他、エラスチン由来ペプチド(C(WPGVG)<sub>3</sub>)<sub>2</sub>の段階的微小凝集体形成機構、日本化学会第96春季年会、平成28年3月26日、同志社大学京田辺キャンパス(京都府・京田辺市)
- (3) 佐藤圭治、他、エラスチンペプチドアナログ(FPGVG)<sub>5</sub>の自己集合特性にN末端修飾がおよぼす影響、日本化学会第96春季年会、平成28年3月26日、同志社大学京田辺キャンパス(京都府・京田辺市)
- (4) 巢山慶太郎、他、エラスチン由来ペプチド(FPGVG)<sub>5</sub>の蛍光標識アナログの凝集特性および立体構造解析、日本化学会第96春季年会、平成28年3月27日、同志社大学京田辺キャンパス(京都府・京田辺市)
- (5) 巢山慶太郎、他、蛍光標識したエラスチン由来ペプチドの自己凝集および蛍光特性の解析、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会、平成27年12月1日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
- (6) Daiki Tatsubo、他、Fluorescence Analysis Using a Molecular Probe 1,8-ANS for Elucidation of the Molecular Mechanisms Underlying Coacervation of a Tryptophan-containing Elastin derived Dimeric Peptide、第52回ペプチド討論会、平成27年11月16日、平塚中央公民館(神奈川県・平塚市)
- (7) 巢山慶太郎、他、エラスチン由来ペプチド(FPGVG)<sub>n</sub>ダイマーの自己集合特性および構造解析、日本化学会第95春期年会、平成27年3月27日、日本大学理工学部(千葉県・船橋市)
- (8) 巢山慶太郎、他、Effects of Dimerization of the Synthetic Peptide (FPGVG)<sub>n</sub> on Its Coacervation Property、第87回日本生化学会、平成26年9月12日パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
- (9) 巢山慶太郎、他、Coacervation property and structural analysis of synthetic dimer

peptides of aromatic amino acid containing elastin-derived peptides, 第51回ペプチド討論会、平成26年10月22日、徳島大学(徳島県・徳島市)

- (10) 田坪大来、他、エラスチン配列由来芳香族アミノ酸含有合成ペプチドの温度依存的な自己集合凝集特性の解析、第51回化学関連支部合同九州大会、平成26年6月28日、北九州市国際会議場(福岡県・北九州市)

他 4件

[その他]

ホームページ等

<http://biomolchem.artsci.kyushu-u.ac.jp/>

/

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

前田 衣織 (MAEDA Iori)

九州工業大学・情報工学研究院・准教授

研究者番号：50311858

巢山 慶太郎 (SUYAMA Keitaro)

九州大学・基幹教育院・助教

研究者番号：60707222