

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：14303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26620102

研究課題名(和文) ポリマー界面でナノ繊維化する細胞接着ペプチドの規則的配置と神経細胞増殖制御

研究課題名(英文) Nerve cell growth control by cell adhesion peptide nanofibers that regularly arranged on a polymer interface

研究代表者

田中 直毅 (Tanaka, Naoki)

京都工芸繊維大学・分子化学系・教授

研究者番号：60243127

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)：水晶体の熱ショック蛋白質 クリスタリンの基質結合部分でに相当するペプチド AC (71-88) は熱処理によって蛋白質を吸着する機能をもつナノファイバーを形成する。本課題では AC (71-88) のアミノ酸配列について培養基板である親水化ポリスチレンと細胞表面に親和性を持つリジンとアルギニンを導入して、細胞と基板を接着する細胞接着するナノファイバーを設計した。このペプチドに配列IKVAVを組み込んだペプチドを混合することで、神経細胞モデルであるPC12の細胞増殖を促進するペプチドナノファイバーを得ることが出来た。

研究成果の概要(英文)：A peptide sequence corresponding to the substrate binding site heat shock protein -crystallin (AC (71-88)) form a nano fiber that has the ability to adsorb the protein by heat treatment. In this study, new peptide nano fiber with an affinity for hydrophilic polystyrene and cell surface by introducing a lysine and arginine for the amino acid sequence of AC (71-88). It was designed to cell adhesion to bond the cell and the substrate. By mixing a peptide incorporating the peptide in sequence IKVAV, peptide nanofibers could be promote cell proliferation of PC12, a neuronal cell model.

研究分野：高分子化学

キーワード：熱ショック蛋白質 ペプチド 細胞培養 ポリスチレン 神経細胞

1. 研究開始当初の背景

細胞を生体外環境で生育させる細胞培養技術は、創薬や再生医療の分野の研究において欠かせない技術である。動物細胞の多くは浮遊状態では生存できない足場依存性細胞であり、培養には接着性表面をもつ基板が必要がある。現在、細胞培養基板にはポリスチレンにコラーゲンやラミニンなどの細胞外マトリクス (ECM) をコーティングした基板が用いられているが、動物由来 ECM の利用は感染症の安全性の問題や品質維持のために保管条件の問題がある。そのため、安全性が高く品質管理が容易な人工の足場材料の開発が求められている。

本課題では合成ペプチドが形成するナノファイバーを細胞培養基板の材料に応用する研究をおこなった。天然の蛋白質が形成するアミロイド線維とよばれる凝集体は、蜘蛛の糸やバイオフィルムを構成する機能性ナノ繊維としてとして利用される。近年アミロイド線維の逆平行βシート積層構造を利用して、機能性分子を表面に配置した人工の機能性ナノ線維の開発が試みられている。

本課題では哺乳類の水晶体タンパク質の主成分のα-クリスタリンのペプチド断片が形成するナノファイバーを材料に用いた。α-クリスタリン小型熱ショックタンパク質ファミリーの一つであり、水晶体内のタンパク質凝集を抑制することによって、透明度を維持するシャペロン様活性をもつ。α-クリスタリンの A 鎖の 71-88 残基のアミノ酸配列は基質結合部位として特定されている。さらにこの配列に対応するペプチドαAC (71-88)は FVIFLD 配列を核として図 1 に示すナノファイバーを形成することが判っている。

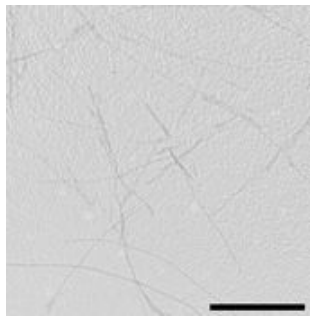


図 1: αAC (71-88)ナノファイバーの TEM 像

ナノファイバーの表面には疎水性領域が集積されており、タンパク質を疎水性相互作用により吸着させることが示されている。本課題ではこの性質を利用して、αAC (71-88) ペプチドに細胞接着機能性を付与することで細胞培養基板に応用する研究を行った。

培養細胞に対する接着機能はラット副髄質由来親クロム性細胞腫 PC12 細胞を用いて評価した。PC12 は神経細胞のモデル細胞として広く用いられており、神経成長因子 (NGF)により神経突起を伸長して交感神経様細胞へと分化する。基底膜の主要タンパク質

ラミニンの細胞接着配列 IKVAV は PC12 の細胞接着および神経突起伸長のための活性部位であり、PC12 細胞の接着を誘導する。

2. 研究の目的

αAC(71-88) ペプチドが形成するナノファイバーを用いて、機能性人工 ECM を開発する。αAC(71-88) ペプチドは我々の生体内に備わっているものであるため、安全性が高いと考える。さらに、ECM の作製に比べ、ペプチド合成のコストは低いといったメリットがある。そこで細胞培養基板に一般的に使用されている親水化ポリスチレン基板および細胞表面の双方に親和性をもつように改変したペプチドを設計した。ナノファイバー化させることで、機能性をもつ部位が密になって親和性が高くことが期待される。

設計したペプチドを用いてナノファイバーを作製しその形態を TEM 観察、AFM 観察およびゼータ電位測定により解析するとともに、親水化ポリスチレン基板に対するナノファイバーの吸着評価と神経細胞の分化実験を行い解析する。さらに細胞の接着性および分化能を向上させるため、IKVAV を導入したペプチドと混合し、ナノファイバーを作製した。そのナノファイバーが神経細胞にどのような影響を与えるのかを検討する。

3. 研究の方法

細胞培養基板によく用いられる親水化したポリスチレンは負電荷であり、塩基性アミノ酸が親和性を有することが報告されている。また、Arg 残基の側鎖に存在するグアニジウム基は、細胞表面に存在するカルボキシル基やリン酸基との間に 2 個の水素結合や静電的相互作用を介して効果的に相互作用することも報告されている。そこで、αAC (71-88) のアミノ酸配列にリシンやアルギニンを導入した新たなペプチドを設計する。これまでの研究ではαAC の 71-76 の FVIFLD は線維形成に関与することが明らかになっている。そのため 77-88 のなかでαAC ファミリーで保存されていないアミノ酸を Arg ないし Lys に置換した K4、K5、R2K3、R3K2、R4K1、R5 を用いた (Table 1)。

Table 1 αAC (71-88)誘導体のアミノ酸配列

peptide	Mw [g/mol]	sequence
αAC	2134.48	F V I F L D V K H F S P E D L T V K
K5	2201.70	F V I F L D V K H F K P K D L K V K
K4	2160.61	F V I F L D V K H F S P K D L K V K
R5	2341.79	F V I F L D V R H F R P R D L R V R
R4K1	2313.76	F V I F L D V R H F R P R D L R V K
R3K2	2285.75	F V I F L D V K H F R P R D L R V K
R2K3	2257.73	F V I F L D V K H F K P R D L R V K

ペプチドのナノファイバー化は 50 mM リン酸 (pH 7.5)100 mM NaCl 緩衝液中で 60 で

24 時間インキュベートして行った。透過型電子顕微鏡 (TEM) によりナノファイバーの形態を観察した。さらにその TEM 画像から、ナノファイバーの長さを評価した。ナノファイバーの表面電荷を、顕微鏡電気泳動方式ゼータ電位測定により決定した。親水化ポリスチレンはポリスチレンの UV-O₃ 処理によって作成した。ポリスチレン基板に対するナノファイバーの吸着を全反射蛍光顕微鏡 (TIRF) によって行った。TIRF 観察のためにはスピコート法によりカバーガラスにポリスチレンをコートすることで、厚さ 50 nm 程度の平坦なポリスチレン薄膜の形成させた。

4. 研究成果

(1) 基板と細胞に親和性をもつペプチドナノファイバーの設計

親水化ポリスチレン基板および細胞の双方に親和性をもつペプチドを設計し、設計したペプチドがナノファイバーを形成するかどうかを調査した。さらに作製したナノファイバーの長さや高さ、表面電荷について解析した。全てのペプチドにおいて、ナノファイバーを形成していることを確認した。

線維形態は Lys に置換した K4、K5 は α AC(71-88) と類似のナノファイバーを形成した。一方、Arg で置換したナノファイバーの形態は大きく変化していた。R3K2 および R2K3 は α AC(71-88) とは異なりリボン状の凝集体を形成した。また R4K1 は湾曲したナノファイバーを形成した。R5 はナノファイバー化しなかった。

調製したナノファイバーの表面電荷を顕微鏡電気泳動方式ゼータ電位測定により求めた。 α AC ナノファイバーは表面電荷が -34.1 mV と負電荷を帯びているのに対し、改変ペプチドである K5 ナノファイバーは +28.6 mV、K4 ナノファイバーは +29.7 mV、R4K1 ナノファイバーは +28.4 mV、R3K2 ナノファイバーは +25.6 mV、R2K3 ナノファイバーは +35.4 mV と全て正電荷を帯びていることがわかった。ゼータ電位の値は Arg や Lys の量に依存していなかった。この結果より、改変ペプチドの形成するナノファイバーは表面が負である親水化ポリスチレンおよび細胞表面に対して吸着しやすいと考えられる。

(2) 親水化ポリスチレン基板に対するナノファイバーの吸着評価と細胞培養

ナノファイバーの親水化ポリスチレン基板に対する吸着挙動および吸着量の定量について評価するとともに、ナノファイバー上での細胞培養を試みた。具体的には、ナノファイバーを吸着させる親水化ポリスチレン基板を作製し、その基板上にナノファイバーを吸着させ TIRF により評価した。改変ペプチドナノファイバー (K5、K4、R4K1、R3K2、

R2K3) は基板により多く吸着していることが確認できた。これはナノファイバーの表面電荷が関係すると考えられる。

α AC ナノファイバーは表面電荷が -34.1 mV と負電荷を帯びているのに対し、改変ペプチドである K5 ナノファイバーは +28.6 mV、K4 ナノファイバーは +29.7 mV、R4K1 ナノファイバーは +28.4 mV、R3K2 ナノファイバーは +25.6 mV、R2K3 ナノファイバーは +35.4 mV と全て正電荷を帯びている。親水化ポリスチレン基板は表面が負電荷となっているので、負電荷を帯びている α AC ナノファイバーと親水化ポリスチレン基板は電気的な反発が働き吸着しにくいことが考えられる。一方で、正電荷を帯びている改変ペプチドナノファイバー (K4、K5、R2K3、R3K2、R4K1) と HPS1 基板の間には静電的相互作用が働き吸着しているため、吸着量が多くなったと示唆される。

(3) ナノファイバーの細胞増殖への影響

神経細胞モデルである PC12 細胞を、ナノファイバー吸着基板上で培養させることで、細胞にどのような影響があるのか位相差顕微鏡を用いて評価した。実際にナノファイバーを吸着させた基板上での PC12 細胞の接着および分化能評価を行った。まず、各ナノファイバー吸着基板上での初期接着を確認した (図 2)。

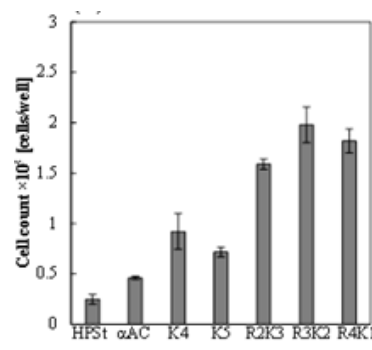


図 2 : α AC (71-88) ナノファイバーによる PC12 の初期接着

図 2 からナノファイバーを吸着させた基板に対する細胞接着数は親水化ポリスチレン基板と比較して有意に多いことが判る。ナノファイバーごとに比較すると、表面電荷が負である α AC ナノファイバーより、表面電荷が正である改変ペプチドナノファイバーに対する細胞接着数が多かった。さらに Arg を含むペプチドナノファイバーに対する細胞接着数が顕著に多かった。これは Arg のグアニジウム基が細胞膜と相互作用しているためであると考えられる。R2K3 < R4K1 < R3K2 の順で細胞接着数が多いことから、Arg の数に依存しないことが示唆された。そこでナノファイバーのゼータ電位と細胞接着数の関係性について考えた。Arg を含むペプチドナ

ノファイバーはゼータ電位の正電荷が大きくなるほど細胞接着数が減少した。以上のことから、初期接着において表面電荷は正電荷を帯びる必要があることがわかった。さらに、Arg が含まれていることが重要であると考えられる。

NGF を添加することで、 α AC、R2K3、R3K2 ナノファイバー上では PC12 の分化が確認された。一方で K4、K5、R4K1 ナノファイバー上では細胞の死が確認された。K5 ナノファイバーにおいて細胞の死が確認された原因として、表面の親水性が関係あると考えている。一般に細胞接着には基板表面の接触角が 55~70 であることが良いとされている。K5 ナノファイバーを吸着した基板のみ超親水性となっていることから、親水性が高すぎることで細胞接着が抑制された可能性がある。

K4 の細胞死の原因として考えられるのは細胞接着タンパク質との相互作用である。一般に、細胞は材料表面に直接接着することではなく、材料表面に吸着した接着性タンパク質との相互作用により接着している。PC12 細胞は接着性タンパク質に接着する前に正電荷を帯びた K4 ナノファイバーに対して接着したことで、細胞膜と強く相互作用してしまい、細胞が死に至ってしまっただけではないかと考える。

R2K3、R3K2 ナノファイバーに関しては、Arg のグアニジウム基が細胞膜と水素結合を介して相互作用することで、結合していると考えられる。しかしながら R4K1 ナノファイバーは多くのグアニジウム基を有しているにもかかわらず細胞の死が確認された。カチオン性アミノ酸が細胞膜との吸着が強くなると、細胞膜が損傷し毒性を示すことが報告されている。よって、R4K1 ナノファイバー吸着基板では細胞が死に至ってしまっただけと考えられる。

α AC ナノファイバーは負電荷であるが、血清中に含まれる正電荷のタンパク質が結合することで、表面が正電荷となり細胞が接着したのではないかと考えられる。一方、細胞の死が確認されたナノファイバーは細胞接着を阻害しているもしくは、細胞毒性を与えていると考えられる。

位相差顕微鏡の画像から神経突起の長さを 10 点測り、比較したものを示す。ナノファイバーを吸着させていない親水化ポリスチレン基板に比べ、ナノファイバーを吸着させた親水化ポリスチレン基板上での PC12 細胞の神経突起が長いことが分かった。各ナノファイバーで神経突起の長さは α AC < R3K2 < R2K3 の順で長くなっており (図 3)、PC12 細胞に対して神経突起を長くする機能が賦与されている。

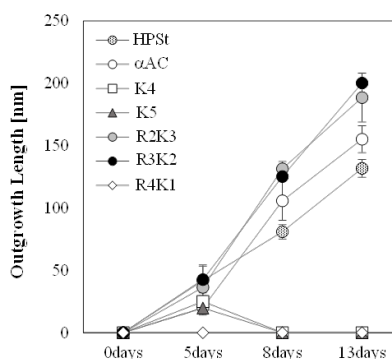


図 3 : α AC (71-88)ナノファイバー上で培養した PC12 細胞の神経突起の長さ

親水化ポリスチレン基板に対するナノファイバーの吸着について評価した。TIRF による観察で作製した親水化ポリスチレン基板に対して改変ペプチドナノファイバーの吸着が確認できた。さらにナノファイバー吸着基板上で実際に細胞を培養し、ナノファイバーが PC12 細胞に与える影響について評価を行った。その結果、NGF を添加することで、 α AC、R2K3、R3K2 ナノファイバー上では PC12 の分化が確認された。

一方、K4、K5、R4K1 ナノファイバー上では細胞の死が確認された。さらに、ナノファイバーを吸着させた基板は高い親水性を示したことから、細胞接着には基板表面の親水性が重要であると示唆された。これらの結果より、PC12 細胞の分化が確認された α AC、R2K3、R3K2 ナノファイバーについては、培養基板として利用できる可能性があると結論した。

(4) IKVAV 導入ペプチドとの混合ナノファイバーによる細胞接着評価

PC12 細胞に対する接着能をもつ IKVAV ペプチドを α AC に挿入したペプチドを設計した。 α AC ペプチドの可溶化部位である α AC(71-84)の末端に IKVAV 配列を挿入したペプチドを IKVAV とした (Table 2)。この IKVAV ペプチドと α AC、R3K2、R2K3 を混合することで、さらに細胞接着性の高い混合ナノファイバーを作製した。IKVAV ペプチドとの混合ナノファイバーを作製した。R2K3 および R3K2 と IKVAV をモル比 2:1、3:1 で混合することで正電荷に帯びたナノファイバーを得ることができた。

Table 2 α AC (71-88)誘導体のアミノ酸配列

peptide	Mw [g/mol]	sequence
α AC	2134.48	F V I F L D V K H F S P E D L T V K
R3K2	2285.75	F V I F L D V K H F R P R D L R V K
R2K3	2257.73	F V I F L D V K H F K P R D L R V K
α AC (71-84)	1692.93	F V I F L D V K H F S P E D
IKVAV	2203.59	F V I F L D V K H F S P E D I K V A V

これらのナノファイバーの親水化ポリスチレンへの吸着挙動を調査した。IKVAV 含有ナノファイバーでは、従来のナノファイバーよりも吸着量が減少していた。これは親水化ポリスチレン基板のカルボキシル基と Arg の静電結合が原因であると推測される。混合によってナノファイバーに含まれる Arg のうち細胞と結合できる残基の割合が減ることで結合量が減ったと考えられる。親水化ポリスチレン基板に対して、ナノファイバーを吸着させた基板の接触角を測定すると、ナノファイバーを吸着させた基板は接触角が UV-O₃ 処理のみのもものと比較して、小さくなっていた。さらに R2K3 を含むナノファイバーの接触角、R3K2 を含むナノファイバーの接触角に関して IKVAV の含有量増加につれて、接触角が大きくなっていた。これらの結果から、IKVAV の含有量増加につれて、ナノファイバー吸着基板表面の親水性は低下することが示唆された。

IKVAV 混合ナノファイバーをコートした基板上で PC12 の培養を行い、コラーゲンコート基板をコントロールとしてその挙動を観察した。培養 3 時間後において、コラーゲン上の細胞数は播種数の倍程度に増加し接着したが、親水化ポリスチレン基板上の細胞接着数は播種数の 10% 程度にであった。播種 1 日後の測定では、IKVAV 混合ナノファイバー上の細胞数が単独ナノファイバーの細胞数に比べ 2 倍以上増加した。これらの結果は、混合ナノファイバーにおいて IKVAV の細胞接着能が発現したことを示している。

播種から 3 日後の測定では、ポリスチレン基板上の細胞接着数は播種数の半分程度に減少したが、他の基板上においてはいずれも細胞接着数が増加した。増加率についてはコラーゲン上の細胞数は播種数の約 5 倍細胞播種 3 日後の結果については、R2K3、R3K2 とともに、単独ナノファイバー <3:1 <2:1 の順で細胞接着数が多かった。この結果から、IKVAV の割合が多くなるほど細胞接着数が増えることが分かった。これは混合ナノファイバーに組み込まれた IKVAV 配列を細胞が認識することによると考えられる。

播種から 1 週間後の測定について、ポリスチレン基板上以外の細胞数はいずれも増加し、コラーゲン上の細胞数は播種数の約 2.5 倍、各ナノファイバー上では、1.2~2.0 倍程度であった。1 週間後の結果については、R2K3、R3K2 のいずれについても、混合ナノファイバーの方が単独ナノファイバーよりも高い細胞増加率を示しており、特に混合比 3:1 のナノファイバーにおいてより顕著であった。以上の結果より、作製した混合ナノファイバーは PC12 細胞の培養基板として利用できると結論した。

(5) 総括

本研究ではαAC(71-88)の配列を改変した 8

種類のペプチドが形成するペプチドナノファイバーについて親水化ポリスチレン基板および細胞表面の双方に対する親和性を調査した。正電荷をもつナノファイバーは細胞培養によく使用される親水化ポリスチレン基板に対し顕著な吸着を示した。また PC12 細胞における接着および神経突起の評価よりαAC、R2K3、R3K2 ナノファイバーは細胞培養基板に利用できることが判った。さらに細胞接着配列である IKVAV を組み込んだペプチドナノファイバーとの混合ナノファイバーは、IKVAV を含まないナノファイバーに比べ接着性、増殖性、伸展性をもつことが確認され、作製したナノファイバーはバイオナノ材料として応用できることが示された。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

田中直毅、基質認識配列を置換したナノファイバー化シャペロンペプチドによる培養細胞の分化制御、高分子学会、2015年5月27日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0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0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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 直毅 (TANAKA, Naoki)
京都工芸繊維大学・分子化学系・教授

研究者番号：60243127

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：