

ポリマー結合ペプチドのビルドアップと機能探索

芹澤 武

東京大学先端科学技術研究センター

【はじめに】タンパク質や核酸は、アミノ酸やヌクレオチドの1次配列の違いによって個々の構造情報を有する。生体中ではこれらの違いが互いに認識され、結合・解離を繰り返すことで精密な生命活動が維持される。果たして生体分子が認識する相手は生体分子だけなのか？その答えは生体分子の構造多様性から類推できる。100 残基のアミノ酸からなるタンパク質の場合、天然アミノ酸が 20 種類であることから、その1次構造には 20^{100} 通りの組み合わせがある。翻訳後修飾やコンホメーションの違いを考えると、その構造はさらに多様となる。生体がすべてを有効利用しているとは思えない。化学構造が明記できる材料であれば、その表面は生体分子の特異的なターゲットとなり得る。

しかしながら、それぞれの人工材料に特異的に結合する生体分子を合理的に分子設計することは困難である。よって、最近では生体分子からなるライブラリーを効率よく調製し、ターゲットとの親和性の違いから、特異的に結合する生体分子を同定するランダム・セレクション法が注目されている。中でも、生物学的に構築されたペプチド・ライブラリーを利用するファージディスプレイ (PD) 法や細胞表面ディスプレイ法は、その手法の簡便さから多くの研究者により採用され、様々な人工材料に結合するペプチドの同定に利用されている。特に、酸化物などの無機化合物がこれらの手法に適用されているが、ポリマー結合ペプチドに関する報告はほとんどなかった。

そこで本研究では、汎用性高分子に特異的に結合するペプチドを PD 法により探索し (図 1)、それらを目的に応じて分子設計・分子集積 (ビルドアップ) することによる新規な機能の探索について検討した。

【結果と考察】材料結合ペプチドの取得には、外殻タンパク質の一部に外来ペプチドが提示された M13 バクテリオファージライブラリーが最もよく用いられる。本研究では、7 残基のランダムペプチドが提示された M13 ファージを高分子フィルムに適用した。我々は、本研究を補足する基礎的な情報を得るために、ポリメタクリル酸メチル (PMMA) やそれらが形成するステレオコンプレックスのフィルム表面とタンパク質との非特異的な相互作用について検討している¹⁻³。そこで最初のターゲットとしてイソタクチック (it) PMMA を選択した⁴。

所定条件下における5回のバイオパニングの後に得られた7残基ペプチドのアミノ酸配列と、ファージ濃度 50 pM における ELISA の結果を図 2 に示す。ファージをクローニングした際に複数の同一クローンが観察されたことから (頻度の増加)、一定の方向にライブラリーが濃縮していることが示唆された。ELISA より、リファレンスであるアタクチック (at) ならびにシンジオタクチック (st) PMMA に比べて、より多くのクローンが it-PMMA フィルムに結合することが分かった。クローン濃度依

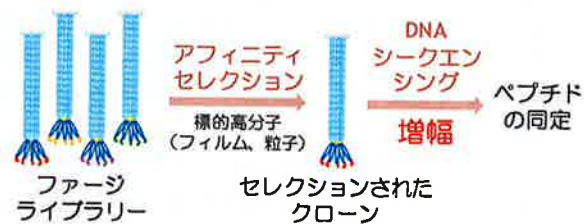


図 1. PD 法の模式図

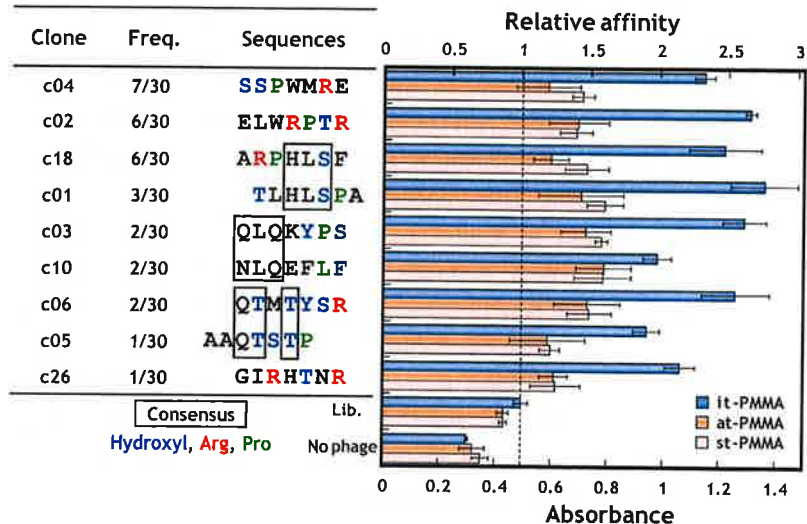


図 2. It-PMMA に対して選択した 7 残基ペプチドと ELISA

存在的な ELISA により求めた見かけの結合定数もまた it-PMMA に対して大きな値を示した。得られたペプチドの構成アミノ酸を観察した結果、側鎖に水酸基を有するセリンやスレオニン、アミノ基を有するアルギニンが多く出現していることから、得られたペプチドは水素結合を主な駆動力として it-PMMA と相互作用していることが示唆された。また、ペプチドに剛直な折れ曲がり構造を付与するプロリンも多く見られたことから、それにより側鎖官能基の空間配置が決まり、it-PMMA を認識することが示唆された。

次に化学合成したペプチドの結合活性を評価した。表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いた定量解析の結果 (図 3)、it-PMMA フィルムに特異的に結合することを明らかにした⁵。なかには、it-PMMA に対する結合定数が st-PMMA に対する値よりも 2 オーダー (値にして 40 倍以上) 大きいペプチドも見出された。最も高い特異性を示した c02 ペプチド (ELWRPTR) の結合定数の温度依存性は、水素結合を駆動力として相互作用していることを支持し、その熱力学的パラメータは両者が誘導適合して結合することを示唆した。アラニンスキャニングや最小化実験より、C 末端側の 4 残基が結合に重要であることが分かった。RPTR ペプチドの結合について検討した結果、c02 ペプチドと同等の特異性を示した。走査型プローブ顕微鏡を用いた c02 ペプチドと PMMA フィルム間の接着力測定もまた C 末端側が必須モチーフであることを示した⁶。

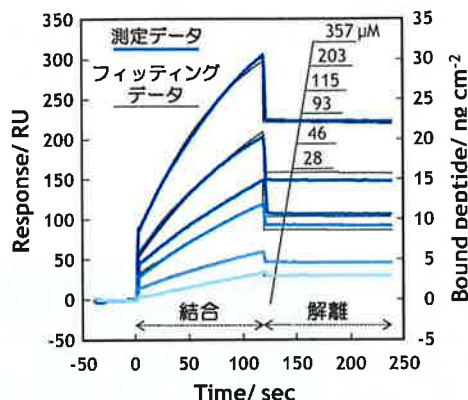


図 3. SPR センサーグラム

先の研究ではリファレンスであった st-PMMA をターゲットにすると、st-PMMA に特異的なペプチドが得られた⁷。ポリ L-乳酸の結晶化膜をターゲットとしたときには、同じポリ L-乳酸であっても非晶化膜には弱く結合した⁸。st-ポリスチレン (PS) のトルエン溶液から調製した多孔膜をターゲットとしたときには、他の PS には弱く結合した⁹。バイオエタノールの原料としても注目されるセルロースに特異的な 7 残基ペプチドの取得にも成功した¹⁰。これら以外の高分子に結合するペプチドも見出しており、高分子とペプチドが特異的に相互作用する組み合わせが一般に存在することを明らかにした。

得られたペプチドの機能も探索した。ブロッキング剤として注目されるタンパク質に c02 ペプチドを融合したところ、吸着定数を 2 オーダー上昇させることに成功した。ポリマー結合ペプチドの融合により、任意のタンパク質の吸着安定性を劇的に改善できることが分かった。また、非共有結合を介したリンカーとしてペプチドを利用することにより、高分子表面を目的に応じて処理できることが分かった。煩雑な表面処理過程を経ることなく表面改質できる点に意味がある。さらに、自己組織化法により調製した高分子微粒子により¹¹、ペプチド混合物から特定の (特異的な) ペプチド成分のみを選択的に吸着・濃縮できることが分かった。質量分析を利用したペプチドドーム解析に向けた新しい濃縮技術に利用できる可能性が高い。

【おわりに】本研究では、汎用性高分子に特異的に結合する新規ペプチドを生物学的なライブラリー技術により選択し、それらをナノ材料としてビルドアップし、新規機能を探索した。本研究が人工物である合成高分子と生体分子の新しいインターフェイスの構築をもとにした斬新なナノ材料系の創製に結びつくものと確信している。

発表論文

1. T. Serizawa *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 355-362.
2. H. Matsuno *et al.*, *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 2174-2179.
3. H. Matsuno *et al.*, *Chem. Lett.* **2007**, *36*, 1238-1239.
4. T. Serizawa *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13780-13781 (*Science Editor's Choice*).
5. T. Serizawa *et al.*, *Langmuir* **2007**, *23*, 11127-11133.
6. T. Date *et al.*, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 4536-4538.
7. T. Serizawa *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 723-726.
8. H. Matsuno *et al.*, *Langmuir* **2008**, *24*, 6399-6403.
9. T. Serizawa *et al.*, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 989-993.
10. T. Serizawa *et al.*, *Chem. Lett.* **2007**, *36*, 988-989.
11. K. Zhang *et al.*, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2009**, in press.