



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.57

2005年7月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

<http://peptide-soc.jp>

ペプチドを使ったコラーゲン研究

超メジャー蛋白質，コラーゲン

「コラーゲン」，蛋白質の名称としてこれほど有名なものは他にないでしょう。幼稚園の子供（少なくとも私の娘）から年配の方（少なくとも私の祖母）まで，「コラーゲン」という言葉をきくと，それぞれにイメージするものがあるようです。これにはおそらく，最近の健康食品ブームと化粧品のCMがずいぶん貢献しています。コラーゲンは，その名前だけでなく，量的にも最も豊富な蛋白質です。ヒトの総蛋白質量の1/4から1/3はコラーゲンです。ですから，コラーゲンは超メジャー蛋白質と言えます。

本稿のタイトルのように「ペプチドを使ったコラーゲン研究」と書くと，多くの読者には，次のような内容を想像させてしまうようです。「この著者は，コラーゲンの加水分解物から新しい生物活性ペプチドを同定しようとしているんだろう・・・」。実際このような研究は，特にサプリメントの付加価値向上をねらって多くの企業が行っており，現在日本においてはコラーゲン研究のメジャートレンドと言えます。しかし，これからお話しする私たちのコラーゲン研究はこのような流れとは大きく異なります。私たちの研究に入る前に，まずはコラーゲン研究の現状と問題点について以下に述べます。

コラーゲンの苦難，メジャーだけど外れ者

通常，ライフサイエンスに携わる科学者は，未知の蛋白質に遭遇した場合に次のようなことをします。①一次構造を決める，②発現の局在，発現の制御機構を調べる，③細胞にふりかけて活性をみる，④結合蛋白

質との相互作用を調べる（あわよくば相互作用に重要な部位を決定する），⑤立体構造（あわよくば結合蛋白質とドッキングした状態）を決める。このようにして，蛋白質の機能や構造が明らかになっていきます。

さて，これらをコラーゲンに当てはめるとどうなるのでしょうか？

- ①一次構造は既に決まっています。プロリンやリジンの水酸化や糖鎖修飾，鎖間の架橋形成も古くから解析が続いています。
- ②各タイプのコラーゲンの発現パターンはよく調べられていますし，現在もこのような研究は精力的におこなわれています。
- ③コラーゲンを細胞にふりかけることはできないので，コラーゲンの上，あるいはコラーゲンのゲル内で細胞を飼います。すると細胞は，その種類によって様々な振る舞いをするのがわかっています。すなわちコラーゲンが多様なシグナルを細胞に入力していることは明らかです。
- ④コラーゲンは蛋白質を含む数十種類の生体高分子と結合していることが知られています。しかし，コラーゲンのどこのどの配列にどのように結合しているのかについての情報は極めて poor な状況です。
- ⑤コラーゲンは，特徴的な3本らせん構造をとっています。しかし，これまでにコラーゲンそのものの結晶構造やNMR構造の解析は成功していません。これは，タンパク3000プロジェクトがタンパク30万になっても無理でしょう。

つまりコラーゲンは超メジャーな蛋白質であるのに，その構造と機能の詳細が未だに明らかになっていないのです。いろいろな生化学の教科書においても，「コラーゲンは細胞外マトリックス成分として組織に物理的な強度を与え，細胞の接着，運動，分化などに関する多彩な機能を有する，云々」の類いの曖昧な記述がほとんどです。機能蛋白質としてのコラーゲンは



小出 隆規

外れ者として見捨てられた感すらします。

さて、コラーゲンが機能蛋白質として注目を浴びてこなかった原因は何なのでしょう？私が考えるに、①でかい、②溶けない、③見えない（活性測定ができない）、の三重苦です。逆に言うと、現在普通に用いられている蛋白質科学の方法論は、丸くて、溶けて、容易に見える（活性が検出できる）蛋白質をターゲットとして開発されてきた、ということです。

コラーゲン救い隊、武器はペプチド

私たちの研究グループは、コラーゲンを超多機能蛋白質としてとらえ、その機能の実体を高い精度で解析することを目標としています。外れ者蛋白質をメジャーに復帰させたい、「コラーゲン救い隊」です。私たちの武器は、コラーゲン様3本らせん構造をとる化学合成ペプチドです。コラーゲン様ペプチドは、榊原らにより1968年に初めて合成されて以来¹、多くのバリエーションが合成されました。これらペプチドはコラーゲン3本らせん構造の解析、その物理化学的性質の解析に威力を発揮してきました。私たちは、うまくデザインした3本らせん型コラーゲン様ペプチドを用いることによって、様々なコラーゲン結合蛋白質とコラーゲンの相互作用を調べることができます。つまり、コラーゲンは3本らせんという「金太郎飴的」構造を持っているため、3本らせんペプチドは可溶性の「コラーゲンもどき」として扱えるのです。これはちょうどDNAと転写因子の結合を解析するために、2重らせん型の合成DNA断片が用いられるのと同じです。

このようなストラテジーを用いていくつかのコラーゲン結合蛋白質とコラーゲンの相互作用が詳細に明らかになっています。例えば、 $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンとコラーゲンの結合様式は3本らせんペプチドとの共結晶の構造解析により詳細に明らかになりました。また、コラーゲンを分解するマトリックスメタロプロテイナーゼの基質認識機構にもコンフォメーションを固定したコラーゲン様ペプチドが威力を発揮しています（詳細は最近の総説を参照ください²）。私たちも、いろいろな仕掛けを施したコラーゲン様ペプチドを用いて、コラーゲン特異的分子シャペロンHsp47³や細菌コラーゲナーゼのコラーゲン結合の詳細を明らかにしています。

一旦、コラーゲンの機能部位（すなわち他の蛋白質

と特異的に相互作用する部位）のペプチド配列が明らかになれば、合成ペプチド（コラーゲンもどき）を用いて、nativeな不溶性コラーゲンを用いては不可能な、様々な実験ができるのです。

コラーゲン上の機能単位の探索、COIDE法

では、長い（0.3 μm におよぶ）コラーゲン3本らせん分子から、その機能部位構造を抽出するにはどうしたらいいのでしょうか？これがまた結構難しいのです。通常は、コラーゲンをCNBrで分解した断片（CBフラグメント）を調製し、機能配列を絞り込んでいきます。あるいは、電子顕微鏡で結合状態を観察し、「C末端からXXnmの部位に蛋白質が特異的に結合している」といった解析がなされています。しかし、効率よく、高いデータ解像度でコラーゲン3本らせん上の蛋白質結合部位を決める方法がなかなか見当たりません。また、残念ながら、現在よく行われている変性コラーゲン（ゼラチン）加水分解物からの活性ペプチドの探索方法では、3本らせん構造が壊れてしまっているため、ペプチドの活性からはnativeなコラーゲンの機能を議論できません。

私たちは、この技術的問題を解決するために、新しい方法論を開発しています。コラーゲン結合蛋白質によってコラーゲン3本らせん上に「足跡」をつける方法です。Collagen Interactive-site Determination法（COIDE法）と名付けたこの方法では、コラーゲン分子と、化学的に修飾したコラーゲン結合蛋白質とを光架橋し、引き続き還元反応によって、コラーゲン3本らせん上にチオール基の「足跡」をつけることができます⁴。多くのタイプのコラーゲンはシステインをもっていないので、このチオールによる足跡は、蛋白質結合部位の目印として用いることができます。実際、私たちはこの方法を用いて、血管新生阻害蛋白質PEDFがコラーゲンのC末端1/4の領域に特異的に結合していることを明らかにしています⁴。現在、そのペプチド配列の同定を急いでいます。最近になってPEDFの*in vivo*での血管新生阻害活性の発現には、特異的なコラーゲンとの結合が極めて重要であることが分かってきました⁵。したがって、PEDFが結合するコラーゲン上の部位は、血管新生にかかわる何らかの機能をもっているものと期待しています。

その他にも、コラーゲンには興味深い機能をもったいろんな蛋白質が結合します。例えば、血液凝固因子

である von Willebrand 因子は、コラーゲンとの特異的な結合によりその機能が制御されていますし、Discoidin domain receptor は、3本らせんコラーゲンを直接のリガンドとするチロシキナーゼ型受容体です。これらコラーゲン結合蛋白質が認識するコラーゲン上の部位は、言い換えるとコラーゲンの多彩な機能を担っている個々の機能単位です。私たちがめざしている、コラーゲン上の個々の機能単位の構造の同定と、それを再構築した合成コラーゲンもどきを利用した機能の解析は、これまで曖昧なまま放置されていたコラーゲンの特異な機能に光をあてるものになると考えています。

その先には・・・将来への展望

「わかった」のあとには、かならず「制御したい」が待っています。研究者の性といえるでしょう。もし、ここまで書いてきたような、コラーゲンの詳細な機能がわかったら・・・やはり、その機能を自在に操って、特定の機能を発揮するコラーゲンをつくりたい、と思います。

私たちは、コラーゲン様3本らせんペプチドを使って「溶けるコラーゲンもどき」のみならず「溶けない人工コラーゲン」もできないか、と考えています。紙面の都合で内容をほとんど書くことができませんが、ペプチドのデザインをうまく工夫することで、ペプチド性コラーゲン様超分子集合体をつくることができそうです。3本らせんをとらせたペプチド性人工コラーゲンのテンプレート上に、機能が明らかなペプチド配列を導入することができれば、それは、特定機能人工コラーゲンとして、生命科学や医療の様々な場面で応用できる可能性を秘めています。

これまでも、コラーゲンの構造や機能に関わる fine な解析は、デザインされたコラーゲン様ペプチドを活用して行われてきました。今日までに、3本らせんコラーゲンペプチドをデザインするための手段は、おおよそ出揃った感があります。今後、このペプチド科学の知の蓄積をいかにバイオロジーに生かしていくのか、私は、ここに今後のコラーゲン研究の key があると考えています。

筆を置くにあたり、本稿を書く機会を与えていただきました、野水基義先生に感謝いたします。私が、コラーゲンの研究を始めた当時、野水先生はばりばりラミニンペプチドをつくって次々と活性ペプチドを同定

されていました。それを見ていて「ペプチドは使いよう」と思ったのが、私の現在の研究につながっているのだな、と原稿を書きながら改めて感じました。本稿を読んでいただいて、「ほう。ここにもペプチドの使い道が・・・」と思っていただけたらこの上ない幸です。また、研究を進めるにあたってご支援、ご協力いただいている、新潟薬大の北川幸己教授をはじめとする共同研究者の方々に感謝いたします。

文献

- 1) S. Sakakibara, Y. Kishida, Y. Kikuchi, R. Sakai, K. Kakiuchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **41**, 1273 (1968).
- 2) T. Koide, *Connect. Tiss. Res.*, in press (2005).
- 3) 小出隆規, 蛋核酵増刊, **49**, 870-874 (2004).
- 4) N. Yasui, T. Koide, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 15728-15729 (2003).
- 5) J. Hosomichi, N. Yasui, T. Koide, K. Soma, I. Morita, *submitted* (2005).

こいで たかき
新潟薬科大学薬学部
koi@niigata-pharm.ac.jp

エラスチン由来ポリペプチドの バイオマテリアルへの応用・展開

血管・靱帯・肺・皮膚・子宮等の弾性組織の主要成分として、代謝回転が非常に遅く、耐久性のある不溶性タンパク質のエラスチンが1902年に発見されました。エラスチンはコラーゲンについて量的に多く結合組織に存在し、たとえば、項靱帯の場合エラスチンが約75%、コラーゲンが約17%、大動脈の場合エラスチンが約30%、コラーゲンが約18%とエラスチンがコラーゲンよりも多く、アキレス腱の場合エラスチンが約4%、コラーゲンが約85%、皮膚の場合エラスチンが約2%、コラーゲンが約70%とコラーゲンがエラスチンより多いです。エラスチン発見以来の数十年の空白後の50年代には不溶性エラスチンから可溶性エラスチンを調製する方法が開発され、可溶性エラスチンの一つである α -エラスチンが得られ



岡元 孝二

ました。また60年代にはエラスチン前駆体のトロポエラスチンが発見され可溶性タンパク質として得られました。次いで70年代にはトロポエラスチンの一次構造が明らかになるにつれてエラスチン由来ポリペプチドが化学合成されるようになりました。さらに90年代には遺伝子組み換え技術を駆使して大腸菌で大量に発現させてエラスチン由来ポリペプチドが数百グラムのオーダーで得られるようになりました。

これらの α -エラスチン、トロポエラスチン、エラスチン由来ポリペプチドはエラスチンに特異的なコアセルベーション (coacervation) という現象を示します。すなわち、これらの水溶液を加熱しますと、透明な均一溶液が白濁してコアセルベート液滴 (マイクロコアセルベート) を形成し、そのまま放置しますと分子が濃縮されたコアセルベート (マクロコアセルベート) からなる下層と分子をわずかに含む平衡液からなる2層に分離します。このプロセスは可逆的で、温度を室温以下に戻すとマイクロ及びマクロコアセルベートは元の均一溶液に戻ります。

コアセルベーションは、古くは1930年オランダのBungenberg de Jang及びKruytによって定義され、ラテン語のco-acervate (群れ集まる) より名付けられた言葉ですが、最近のGordon Conference「Elastin and Elastic Tissue」のホットなトピックスはコアセルベーションすなわち線維形成であることから、エラスチンの特異的な現象として新たに注目されています。

エラスチン中にはいくつかのペプチド繰り返し配列がありますが、主要な繰り返し配列はペンタペプチドGly-Val-Gly-Val-Pro (以下GVGVP) 及びヘキサペプチ

ドVal-Gly-Val-Ala-Pro-Gly (以下VGVP) の繰り返し配列であります。この2種類のペプチド繰り返し配列は性質が全く異なり、GVGVP繰り返し配列は弾性機能を有し、コアセルベーション性質を示しますが、細胞には認識されません。一方、VGVP繰り返し配列は弾性及びコアセルベーション性質を示しませんが、細胞膜上の受容体 (67 kDa EBP: エラスチン結合タンパク質) を介して、線維芽細胞、平滑筋細胞、軟骨細胞、腫瘍細胞、単球、マクロファージなどの細胞の遊走、増殖等を惹起します。これらの細胞応答は細胞で異なっていて、プロテインキナーゼCが関与する場合もあれば、cGMP依存性プロテインキナーゼが関与する場合もあります。さらに溶液状態で細胞を刺激する場合と固相状態で細胞を刺激する場合では細胞に与える影響が異なり、細胞から分泌するサイトカインやプロテアーゼの種類や分泌量も異なってきます。

弾性及びコアセルベーション性質を示すGVGVP繰り返し配列はバイオマテリアルとして有用であり、我々は液相法でpoly (GVGVP) 及びそのポリマー誘導体を化学合成しています。また共同研究先のUrry教授 (米国ミネソタ大学) から遺伝子組み換え技術で作製したpoly (GVGVP) 及びそのポリマー誘導体を提供してもらい、それらを用いても実験しています。上述しましたようにpoly (GVGVP) 及びそのポリマー誘導体の水溶液を加熱しますと白濁してコアセルベート液滴を形成しますが、この液滴のサイズは100~700 nmで、条件を検討することによりサイズを300~400 nmに揃えることも可能であります。現在、この液滴に基づく安定なナノ粒子を作製し、その応用を検討



しているところであります。

分子がコアセルベート液滴を形成するのは分子間（分子内）疎水結合により、分子が折り畳まれていない構造から折り畳まれた構造へと変化するためであり、このとき相転移が起こります。この相転移を起こす温度を T_t ($^{\circ}\text{C}$)、このときの疎水性会合 (hydrophobic association, HA) のためのギブスの自由エネルギー変化を ΔG_{HA} (kcal/mol) としますと、 ΔG_{HA} が大きな負の値をもつ程、相転移の温度は低温側に移動し、 ΔG_{HA} が大きな正の値をもつ程、相転移の温度は高温側側に移動します。pH 応答性のコアセルベーション特性をもつ poly (GEGVP) の場合、E の側鎖カルボキシル基の解離状態と非解離状態を調節することにより、約 200°C (理論上) の温度差の相転移温度を調節することが可能となります。また他の pH 応答性のコアセルベーション特性をもつ poly (GKGVP) の場合、K の側鎖アミノ基の解離状態と非解離状態を調節することにより、約 60°C (理論上) の温度差の相転移温度を調節することが可能となります。さらに酸化還元基 NMeN (N-メチルニコチンアミド) を導入した酸化還元応答性のコアセルベーション特性をもつ poly (GK (NMeN) GVP) の場合、酸化状態と還元状態を調節することにより、約 250°C (理論上) の温度差の相転移温度を調節することが可能となります。また他の酸化還元基 NAD (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) を導入した酸化還元応答性のコアセルベーション特性をもつ poly (GE (NAD) GVP) の場合、約 150°C (理論上) の温度差の相転移温度を調節することが可能となります。これらの大きな相転移温度を利用して医療分野、工学分野への応用を検討しているところです。

最後に PNJ 編集委員の野水基義先生から、‘エラスチンペプチドを用いた応用研究’について日本ペプチド学会ペプチドニュースレター執筆依頼をいただき、有難うございました。短期間でまとめましたので、不十分ではありますが、「エラスチンとは？」にご理解いただけたら幸いです。

おかもと こうじ
九州工業大学情報工学部
生命情報工学科
okagen@bio.kyutech.ac.jp

細胞外マトリックス研究におけるペプチド利用

固形組織を構成するほとんど全ての細胞は、細胞外マトリックス (ECM) 分子に接着して存在している。細胞のこの接着現象は、古くは、組織の形態形成と維持に寄与するだけで個々の細胞の機能にはほとんど影響しないと考えられていた。しかし



深井 文雄

ながら、細胞の ECM 接着が、一群のファミリーをなす接着受容体インテグリンによって媒介されており、そしてインテグリンを介した接着によって様々なシグナル分子の活性化が大きく変動していること等が明らかにされるに従って、液性因子/受容体システムによる調節系と同様、ECM/インテグリン系も細胞機能制御の重要な一翼を担っていると考えられるようになった。正常細胞の生存、増殖、分化、遺伝子発現等の基本的な機能は、細胞がインテグリンを介して ECM 接着して初めて秩序よく進行するプロセスであり、細胞が ECM から脱着すると、細胞は正常な機能を発揮できないばかりかアポトーシスによって死滅する。言い換えれば、ECM 分子には細胞の生存、増殖、分化、遺伝子発現をコントロールする情報が書き込まれており、細胞は接着する事によってそれらの情報を読み取っていることになる。

ECM を構成する分子は極めて多彩で、様々なアイソフォームをもつコラーゲンやラミニン、選択的スプライシングによって多様性をもつフィブロネクチンやテネシン等の単純な糖蛋白質に加えてプロテオグリカン類も存在し、それらが組織の違いに応じて様々に分布している。更に、これらの ECM 分子の多くは高分子量の巨大かつ複雑な構造体を形成している。例えば、体内に広く豊富に存在するフィブロネクチンは、分子量二十数万のサブユニットの 2 量体として生合成されるが、ECM 中に取り込まれる際に自己会合して水に不溶性の巨大分子を形成する。また、それぞれのフィブロネクチン分子は、細胞機能に関与する機能部位としてインテグリンやプロテオグリカン結合部位を複数箇所もっているが、それらに加えて更に、コンフォーメーション変化やプロテアーゼ分解によって活性を発現する機能部位を分子内部に隠している。これらは ECM 分子に特有の性質で、他の ECM 蛋白質でも

認められ、特にラミニンに関しては本誌編集委員で東京薬科大学の野水基義教授のグループによって活発な研究が展開されているのは周知の通りである。ECM分子内に隠ぺいされた機能部位は“matricryptic site”と呼ばれ、特にプロテアーゼによって遊離してくる機能性ペプチド断片は障害局所で炎症反応の進展・終結に重要な役割を果たしていることから、テキサス A & M 大学の Davis 教授等はこれらの活性ペプチド断片を“matricryptin”と呼んでその重要性を強調している。このように、細胞接着の単なる足場と考えられていた ECM は、細胞機能を制御するための多様な情報を貯えた必要不可欠の構造体として機能しているのである。ECM を介した細胞機能制御の分子機構を統一的に理解するためには、個々の ECM 分子に付与されたこれらの情報の全体像を明らかにする必要がある。

筆者等は ECM 分子の接着機能部位を解析している過程で、フィブロネクチン分子中には、細胞接着を抑制する機能部位が matricryptic site として存在している事を見出した。即ち、フィブロネクチンの14番目のIII型リピート内の YTIYVIAL を含むペプチド FNIII 14 は、 β 1インテグリンを不活性化することによって細胞接着を抑制する。この機能部位と類似のアミノ酸配列を検索した結果、ECM 蛋白質分子内には意外に多くの類似配列が存在しており、少なくとも VII, XII 型コラーゲン由来のペプチドは FNIII 14 と類似の作用を示す。一方、反接着性 ECM として知られるテネシン C の類似配列を含むペプチド TNIII は、興味ある事に、前述のペプチド群とは逆に β 1インテグリンを活性化することが明らかになった。これらのペプチドは、細胞接着調節作用を示すだけでなく、接着を介した細胞機能発現、即ち、増殖、分化、遺伝子発現に多大な影響を及ぼす事が明らかになっている。

細胞外マトリックス分子内に存在する細胞機能調節部位について紹介した。ペプチドを使った解析は、生理条件下での蛋白質の高次構造をそれ程には考慮しないで行われるため、検出されるペプチドの活性は生理的には意味をもたないとの批判があったが、“matricryptin”の概念から明らかなように、少なくとも ECM 分子に関する限りはこの批判は当たらない。とは言え、巨大な ECM 分子の活性を短いペプチド単位で読み取って行くペプチド解析は、活性部位の絞り込みに多大な労力と時間を要するという欠点がある。しかし、機能部位がペプチドとして決定されるや否

や、その作用を媒介する受容体の同定やその構造解析等、議論は一足飛びに本質に向かう。また、対象とした蛋白質が病態現象に関与している場合には、そのペプチドはそのまま医薬品創製のためのリード化合物になりうる。ECM の複雑な生物活性の全容が、ペプチドレベルで表現しつくされることを期待している。

ふかい ふみお
東京理科大学薬学部分子病態学研究室
e-mail: fukai@rs.noda.tus.ac.jp

ペプチドをツールとした 人工細胞外マトリックスの構築

1. はじめに

近年、Tissue Engineering すなわち再生医工学（組織工学）が医学・工学・薬学分野において大変注目されています。再生医工学の目的は、大きく損傷したり失われたりした生体組織と臓器の治療のために、細胞を用いてその生体組織と臓器を再生あるいは再構築する技術を確認することにあります。これまでは医薬で治療出来ないほど大きくそして非可逆的に組織が欠損した場合、人工臓器と臓器移植による治療が行われてきました。しかし人工臓器には、構成材料に対する生体の異物化反応や十分な生体代償性の欠如、時間とともに進む機能低下などの問題が、また臓器移植にも供給臓器の不足や免疫系、倫理等に問題が山積しています。そういった背景から、人工臓器と臓器移植にある問題を解消し取って替わる治療法として再生医工学が注目を集め、数多くの研究が進められているのです。

再生医工学が成立するには、組織の元になる細胞と欠損した三次元構造での細胞から組織への再生の場、つまり細胞の増殖・接着のための足場が必要です。本来ならば細胞外マトリックスがその役目を果たしますが、組織の欠損によりその細胞外マトリックスが欠如した状態になるため、細胞自身によって細胞外マト



平野 義明

リックスを再構築するまで、人工の細胞外マトリックスを供給する必要が生じます¹⁻³⁾。

かつて細胞外マトリックス (Extracellular matrix: ECM) は、組織の充填材として物理的構造を保つだけと考えられていました。しかし研究が進むにつれて、細胞の接着・移動・分化・増殖など、細胞活性を細胞の外側から制御する因子群として重要視されるようになりました。細胞外マトリックスは、大きく分類すると、構造タンパク質・グリコサミノグリカン・細胞接着性タンパク質の3成分で構成されています。このうち細胞接着性タンパク質とは細胞と接着するタンパク質の総称で、フィブロネクチン・ラミニン・ビトロネクチンなど数十種類の存在が確認されています。これら細胞接着性タンパク質を細胞が認識し、細胞-細胞外マトリックス間の接着を形成しているのです。この細胞接着性タンパク質のアミノ酸配列が解明され、加えて細胞接着に関する活性部位のアミノ酸配列も明らかになったことは、細胞生物学の分野だけでなく、医学・薬学・工学の分野にも大きな影響を与えています。これらの配列は化学合成したもののでも細胞接着性を示すことが知られているので、これを材料に用いる組織工学を始め生医学用材料の開発まで数多くの研究者が取り組んでいます。

再生医工学には、『細胞』・『増殖因子』・『足場』の3つの要因が大切だと考えられています。再生する器官・臓器の種類・場所・再生方法によっては、必ずしも3つの要因が揃う必要はありませんが、『細胞』はどんな場合でも必要であり、再生医工学のキーとなります。その細胞は生体内では細胞外マトリックス内で接着し、その機能を果たしています。現在、細胞接着性タンパク質の細胞接着部位を利用して、本来の細胞外マトリックスに近い状態を創成するための研究が行われています。本稿では、人工細胞外マトリックスの構築 (再生医工学) に細胞接着性ペプチド (特に Arg-Gly-Asp (RGD) 配列) を利用した結果を中心に、現在展開されている研究を紹介したいと思います。

2. 細胞接着性ペプチド^{4,5)}

細胞接着性タンパク質の代表格であるフィブロネクチンの一次構造は、1980年代前半にタンパク質化学的手法によって研究され始めました。1986年にデンマークの研究グループがウシのフィブロネクチンの一次構造を決定し、3種類のよく似たユニットに区分しまし

た。そのユニットをモジュールと呼び、I型・II型・III型構造に分けられています。

1984年に Pierschbacher と Ruoslahti によって、細胞接着活性に関与している部位のアミノ酸配列のうち、-Arg-Gly-Asp-Ser-(RGDS) のわずか4残基が大変重要であると報告されました。その後もフィブロネクチンの第2, 第3の接着活性部位の解明が進み、1986年に -Arg-Glu-Asp-Val-(REDV) が、1990年に -Glu-Ile-Leu-Asp-Val-(EILDV) が確認されました。その後、-Tyr-Glu-Lys-Pro-Gly-Ser-Pro-Pro-Arg-Glu-Val-Val-Pro-Arg-Pro-Arg-Pro-Gly-Val-(YEKPGSPPREVVPRPRPGV) や、-Lys-Asn-Asn-Gln-Lys-Ser-Glu-Pro-Leu-Ile-Gly-Pro-Lys-(KNNQKSEPLIGPK) も報告されています。

フィブロネクチンの水溶液中の構造も徐々に解明され、1998年にはフィブロネクチンのタイプIII第10モジュールの RGD を含む部分の配列の10残基程度が、ループ構造を形成しタンパク質の表面より飛び出していると報告されました。その折り返し部分に存在する RGDS 配列を、細胞が認識し接着していると考えられています。

また、ビトロネクチンやコラーゲンなどの他の細胞接着性タンパク質でも同じように細胞接着部位のアミノ酸配列が明らかにされていますが、フィブロネクチンと共通のアミノ酸配列 Arg-Gly-Asp (RGD) が存在することが大変興味深いところです。これらのペプチドの合成に関する化学的記載については省略します。

ラミニンには、RGD 配列以外に -Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-(YIGSR) という特有の細胞接着活性部位が存在しています。東京薬科大学の野水らは、ラミニンのアミノ酸配列を10残基程度ずつ全て化学合成し細胞との相互作用をスクリーニングすることで、新たな細胞接着活性を有するアミノ酸配列を明らかにしました。(詳細は本誌野水先生の項を参照ください)

3. *in vitro* での細胞接着性ペプチドを用いた Tissue Engineering

細胞接着性オリゴペプチド RGDS などを高分子材料上に化学固定し、人工細胞外マトリックスや再生医工学用足場材料などに応用するための研究が進んでいます。実際にはテフロン、ポリエチレンテレフタレート、ポリアクリルアミド、ポリメチルメタクリレート (PMMA)、ポリウレタン、ポリビニルアルコール (PVA)、エチレン・アクリル酸共重合体 (PEA) など

のフィルム上に細胞接着性オリゴペプチドを化学修飾し、表面化学的解析を行った後、種々の細胞との相互作用を観察しています⁶⁾。

一般的には細胞接着活性部位は RGD と言われていますが、全ての研究において RGDS テトラペプチドかそれ以上の鎖長のペプチドが用いられています。その理由としては、テトラペプチドより鎖長を長くすると、第4番目のアミノ酸残基 S が RGDS などのテトラペプチドのコンホメーションを安定化させて、接着レセプターであるインテグリンとよく相互作用するからではないかと考えられます。そういった結果から総合的に判断すると、オリゴペプチドの中では RGDS が最も高い活性を有すると言えます。

近年バイオテクノロジーの進歩により、遺伝子組み換えが容易に行われるようになってきました。細胞接着配列 RGDS, YIGSR や IKVAV を、遺伝子組み換えによりシルクフィブロイン配列中 (Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser)₉ に組み込み、合成タンパク質に変換し ECM として利用する方法が開発されています。これは、(Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser)₉ 配列の折り返し部分に RGDS を13個有する、分子量11万の大腸菌による合成タンパク質プロネクチン[®]として市販されています。これらは合成タンパク質であるため熱・化学的に安定しており、オートクレーブ滅菌が可能で、無血清培地で各種細胞に高い接着活性を示しています。

朝倉・樋口らは同様に、シルクフィブロインモチーフの (Ala-Gly) の β -シートの折り返し部分に細胞接着性部位を組み込み、(Ala-Gly)₆RGD(Ala-Gly)₇ として、人工細胞外マトリックスとしての利用を試みています。これらをガラス板上にコートし、線維芽細胞 NB1-RGB を用いてインターロイキン- β の産出を評価したところ、(Ala-Gly)₆RGD (Ala-Gly)₇ が最も効率よいことを明らかにしました。

Cutler らは、これらと同様に遺伝子組み換え技術で RGDS と PHSRN の2つの細胞接着性配列を有するフィブロネクチン-タイプIII第7-10モジュール (FNII (7-10)) を作成しました。FNIII (7-10) 修飾した材料表面上で MC3T3-E1 骨芽細胞を培養したところ、FNIII (7-10) をコートした材料では、細胞接着・伸展・接着班などがフィブロネクチンと同等か全ての点で優れていると報告しています。これらの結果は、インテグリン $\alpha_5\beta_1$ に特異的に結合すると結論付け、インテグリン $\alpha_5\beta_1$ を介した細胞接着性材料の創成に有

望と述べています。

著者らはペプチドの液相合成を駆使することにより、先の遺伝子組み替えタンパク質より低分子でかつ容易に化学合成出来る配列を設計し、遺伝子組み替えタンパク質と同等の細胞活性を有していることを明らかにしました。このペプチドは、1992年に MIT の Zhang らにより Z-DNA 結合タンパク質の中から発見され、塩の存在下で自発的に β -シートからなる膜状構造を形成することが知られている (Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys)₂ (EAK16) を、RGDS の C, N 両末端 (EAK16RGDSEAK16) あるいは N 末端 (EAK16RGDS) に導入すれば、RGD 部分のターン構造を安定化できるものと期待し設計しました。著者らが設計したペプチド (EAK16RGDS) では、プロネクチン以上の顕著な細胞の伸展が観察されています。

その他、アルギン酸やコラーゲンなどの天然高分子・合成高分子ハイドロゲル上に修飾するなど、人工細胞外マトリックスや生医学用材料の創成を目指し、多数の研究者が各目的に向かって研究を展開しています。

4. *in vivo* での細胞接着性ペプチドを用いた Tissue Engineering

in vivo での細胞接着性ペプチドを用いた再生医学の報告例は数少なく、三次元の足場 (人工細胞外マトリックス) であるスポンジやハイドロゲルに RGDS ペプチドを修飾して用いた成果が殆どです。

ミシガン大学の Mooney らは、海草由来天然高分子であるアルギン酸カルシウムハイドロゲル上では細胞接着が見られないと指摘しています。その改善方法としてアルギン酸のカルボキシル基に細胞接着性ペプチド RGDS を導入すると、顕著に細胞接着性の向上が見られることを明らかにした上で、RGDS を導入したアルギン酸カルシウムハイドロゲルを硬組織の再生用足場としてデザインしています¹⁴⁾。Mooney と著者らはアルギン酸カルシウムゲル内にラット頭部より採取した骨芽細胞や、牛関節より採取した軟骨細胞さらには両者を混合し、SCID マウス背部にシリンジを用いてインジェクションした後の骨と軟骨の再生を観察しました。組織切片を採取し組織学的解析の結果から、RGDS 修飾アルギン酸の方が修飾していないアルギン酸より、顕著な骨組織や軟骨組織の再生が観察されました (図1)。なお、その際にはアルギン酸の分子量が重要であることも明らかになっています^{6, 14-15)}。

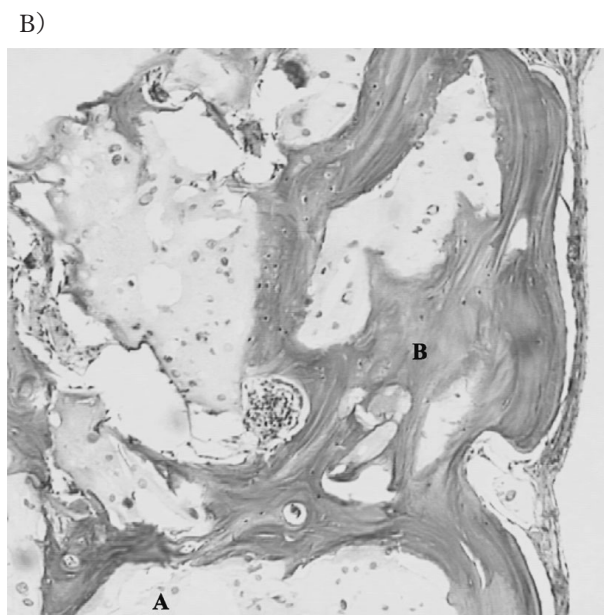
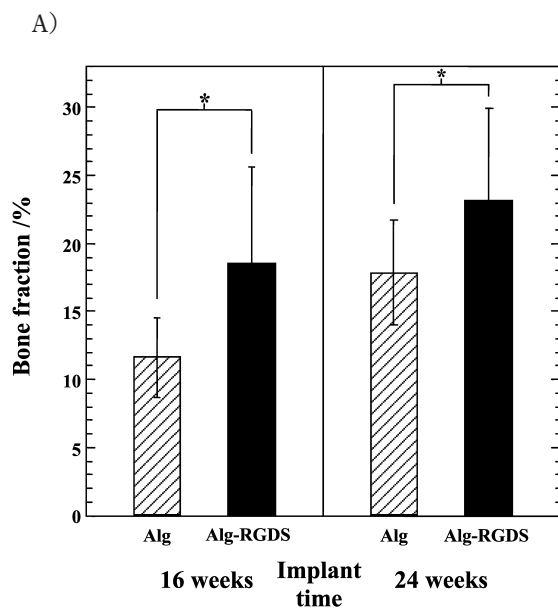


図1 RGDS 修飾アルギン酸と未修飾アルギン酸カルシウムハイドロゲルを用いた際の骨組織の再生
 A) RGDS 修飾アルギン酸 (Alg-RGDS) と未修飾アルギン酸 (Alg) を用いた際の骨組織の再生の割合比較
 B) RGDS 修飾アルギン酸を用いて骨組織を再生した際の組織切片 (24週後, 100×)
 A: アルギン酸, B: 骨組織

細胞接着性ペプチドを再生医工学材料に応用しようとする試みは *in vitro* の系において多数の研究が展開されていますが, *in vivo* で実際に三次元の足場材料に導入した研究例はまだ少数です。細胞接着性ペプチドが, 細胞との親和性や細胞機能のコントロールなどを向上させる一つのツールとして, 今後再生医工学の場で発展することを望みます。

参考文献

- 1) 筏 義人, 再生医学—失った体はとりもどせるか, 羊土社 (1998).
- 2) 筏 義人 [編], 再生医工学, 化学同人 (2001).
- 3) 田畑泰彦 [編], 再生医療の実際, 羊土社 (2003).
- 4) 林 正男, 細胞接着分子の世界, 羊土社 (1995).
- 5) 林 正男, 新 細胞接着分子の世界, 羊土社 (2001).
- 6) Hirano, Y., et. al., *Advanced Materials*, **16**, 17-25 (2004).
- 7) Hirano, Y., et. al., *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, **4**, 235-243 (1993).
- 8) Cappello, J., *Carl Hanser Verlag*, 34-92 (1994).
- 9) Cappello, J., *Harwood Academic Publishers*, Amsterdam, 1-32 (1997).
- 10) Asakura, T., et. al., *Biomacromolecules.*, **4**, 815-20 (2003).
- 11) Higuchi, A., et. al., *J Biomed Mater Res*, **65A**, 369-378 (2003).
- 12) Cutler S. M., et. al., *Biomaterials*. **24**, 1759-70 (2003).

- 13) 平野ら, バイオマテリアル, **22**, 219-225 (2004)
- 14) Alsberg, E, et. al., *J Dent Res.*, **80**, 2025-2029 (2001).
- 15) Alsberg, E, et. al., *Proc Natl Acad Sci USA.*, **99**, 12025-12030 (2002).
- 16) Alsberg, E, et. al., *J Dent Res.*, **82**, 903-908 (2003).

ひらの よしあき
 大阪工業大学工学部応用化学科
 yhirano@chem.oit.ac.jp

ペプチドを用いたラミニン研究

15年程前, 私は米国国立保健衛生研究所 (NIH) でポストドクとしてペプチドを使ってエイズやがんの治療薬の研究を行っていました。当時, NIH はエイズ研究の世界の中心であったためマスコミの出入りも多く緊張した時を過ごすことができました。



野水 基義

また, がんの治療薬の研究では当時としては斬新なアプローチで, 細胞内の情報伝達タンパク質のリン

酸化チロシンをターゲットにした阻害剤の開発を行っていました。ホットな研究テーマでとっても面白い研究を行っていましたが、ある日、たまたま頼まれ仕事で合成したラミニンの部分ペプチドが細胞接着活性を示しました。実際に自分の目で顕微鏡をとおして大きく広がった細胞をみてしまい、その感動で細胞接着といった生物活性に興味を持ち、ラミニンという細胞外マトリックスのタンパク質にはまっていきました。

細胞外マトリックス分野は、薬学部出身でペプチド合成屋の私にとって全く理解しにくい未知の分野でした。最初は細胞外マトリックスがどんなものか、コラーゲンやプロテオグリカンもラミニンの仲間だったのかなどと知らないことばかりでした。細胞外マトリックスは、日本ではあまりポピュラーな研究分野ではありませんが、欧米では盛んに研究されており、生命科学の中で重要な位置付けがされているといったことが次第にわかってきました。私がたまたま興味を持ったラミニンは、細胞接着、器官形成、神経網再生、血管新生やがんの増殖転移などの様々な生命現象や病態に深く関わっている多機能な巨大分子です。構造的にも大変興味深いヘテロ3量体分子です。まず、この3つの異なる鎖がどのように会合するのかを組換えタンパクと合成ペプチドを用いて解明しました¹⁾。ラミニン鎖の会合がC末端部分から始まり、2段階で3本鎖が形成されるといったことがわかりましたが、医薬分野への応用といった点で何かものたらないものを感じました。そこで、医薬分野への応用を目的に、この多彩な機能を持ったラミニンの機能ペプチドを探すことに興味が移っていきました。たまたま最初に合成したラミニンの部分ペプチドが細胞接着活性を示したことに気をよくしていたので、「ラミニン分子を網羅する部分ペプチドをシラミつぶしに合成したら、必ず有用な活性ペプチドを発見できる」と合成屋らしい考えで毎日ペプチドをつくっては細胞接着活性を測定しました。それから10年の歳月をアメリカ・カナダで過ごしてしまい、合成して活性を測定したペプチドも1000種類を超えてしまいました²⁾。1998年に北海道大学大学院地球環境科学研究科に赴任してからも相変わらず多くの学生さんと一緒にラミニンのペプチドをつくっては細胞接着活性を測定していました。また、動物細胞を用いて組換えタンパク質を作成し、それと合成ペプチドとの活性を比較することも始めました³⁾。昨年、東京薬科大学に移動し、薬への応用をめざして

さらに多くの合成ペプチド（すでに3000種類を超えました）と組換えタンパク質を用いたラミニンの機能部位の解析を続けています。

この15年で、数多くの細胞接着ペプチドを同定することができましたが、ラミニンにはいくつの活性部位が存在するのであるだろうか？といった疑問が常につきまっています⁴⁾。どうしてこんなにたくさんの活性配列が入っているのだろうか？また、最近の知見として、ラミニンがマトリックスメタロプロテアーゼなどの酵素によって切断され、その分解産物が生命現象に深く関与しているといったことがわかってきました。このような分解産物である部分ペプチドは「クリプティックペプチド」（タンパク質中に隠されている機能ペプチド）と認識され、これらクリプティックペプチドが細胞の機能をコントロールしているのではないかと考えられるようになってきています。そのように考えると我々が同定してきた数多くのラミニン活性ペプチドは生体内で実際にクリプティックペプチドとして作用している可能性があり、生理学的にも重要な働きをしているものかもしれません。この結論は、今後の研究の展開に期待したいと思っていますところです。

次に課題になってくるのが、同定したラミニンの活性ペプチドをどのように医薬分野に応用していくかということです。そこで、一つの方向性として最近はやりの再生医学への応用に向けた新たなチャレンジとして、人工基底膜の創製を目的に研究を行っています⁵⁾。この研究は北海道で大量に捨てられているカニ殻の有効利用を考えたことからはじまりました。カニ殻の成分はキチン・キトサンで、地球上でセルロースに次いで多い多糖で、地球環境を考えるとこの資源の有効利用は大きな課題です。実際には、細胞に対してサイレントな高分子多糖類であるキトサンの膜に様々なラミニン由来の活性ペプチドを固定化させたペプチド-キトサン膜を人工基底膜として応用するものです。キトサン膜に固定化することでペプチドの活性は増強され、細胞の分化も促進できることが明らかになってきました。さらに、目的の細胞あるいは組織に合わせて、活性の異なるペプチドを組み合わせることでキトサン膜に固定化させることにより、細胞接着のみならず細胞の分化をコントロールすることができる可能性を示すことができるようになりました。現在、このペプチド-キトサン膜を用いて動物実験が進行中ですが、細胞移植に有効であるといったことがわかってきつつあ

ります。

以上のように、ラミニンのシステマティックなペプチド解析により数多くの生物活性のあるペプチドを発見することができました。また、これらの医薬品への応用研究が進行しつつあります。私がラミニンの研究を始めた当初は1種類だったラミニンも、今では15種類ものラミニンファミリーが発見され、ますます複雑なものになってきてしまいました。いつの日かラミニンの活性ペプチドが医薬品につながることを信じてついても、いつまでラミニンペプチドの合成を続けるのか終わりのない戦いに不安を感じる今日この頃です。

参考文献

- 1) 野水基義, 宇谷厚志:「ラミニンサブユニットのヘリックスを介した会合機構」蛋白質核酸酵素, 41: 2542-2551, 1996.
- 2) 野水基義:「細胞外マトリックス蛋白質・ラミニンの機能部位の解明」薬学雑誌, 118: 566-580, 1998.
- 3) 鈴木喜晴, 野水基義:「ラミニン同族体の活性部位の多様性と相同性」生化学, 73: 1215-1220, 2001.
- 4) 野水基義:「ラミニンにはいくつの活性部位があるのか?」蛋白質核酸酵素, 45: 2475-2482, 2000.
- 5) 望月麻友美, 門谷裕一, 野水基義:「人工基底膜の創製ーラミニン活性ペプチドの新たなチャレンジャー」蛋白質核酸酵素, 45: 2475-2482, 2005.

のみず もとよし
東京薬科大学薬学部病態生化学教室
e-mail: nomizu@ps.toyaku.ac.jp

第42回ペプチド討論会

主 催 日本ペプチド学会

共 催 日本化学会, 日本薬学会, 日本農芸化学会

会 期 平成17年10月27日(木)~10月29日(土)

会 場 千里ライフサイエンスセンター

(豊中市新千里東町1丁目4番2号)

発表申込・アブストラクト締切 8月31日(水)

(今回は、発表申込・アブストラクト締切が同日と
なっていますのでご注意願います)

受諾通知 9月15日頃

討論主題 1) アミノ酸・ペプチドの化学

2) 生理活性ペプチドの単離精製, 構造決定および合成

3) ペプチド合成の新規な戦略と方法論

4) ペプチドの構造ー機能相関

5) ペプチドの医学・薬学的研究

6) ペプチドのコンホメーション

7) ペプチドの de novo 設計

8) その他 広くペプチド科学に関する研究

発表形式 A) 口頭発表: 日本語あるいは英語による
一般講演(討論を含めて20分, 液晶プロジェクター使用)。約1/3は英語発表のセッションといたします。

B) ポスター発表

注: プログラム編成により発表形式の変更をお願いすることがあります。口頭発表は英語発表を優先します。同じ研究室から2件以上の発表を希望される場合, 2件目以上は英語発表としていただきます。

発表申込方法 討論会ホームページより入力フォームをダウンロードし, 電子メールおよび郵送の両方をお願いします。

事前参加登録 10月1日(土) 締切
参加申込は電子メール(42jps@life.kindai.ac.jp)でお願いします。

参加登録料 10月1日まで(一般参加料にはプロシーディング代が含まれます) 一般: (学会員) 5,000円, (非会員) 11,000円。学生: (学会員) 1,500円, (非会員) 4,500円。なお, 10月1日以降は一般会員で1000円, 学生会員で500円高くなります。また, 今回より共催学会員枠を廃止いたします。プロシーディング代 2,000円。

懇親会 千里阪急ホテル。参加費: 一般 8,000円, 学生 4,000円

討論会世話人 若宮建昭 近畿大学理工学部理学科
電話 06-6721-2332 (内線4126)

E-mail: wakamiya@chem.kindai.ac.jp

討論会事務局 〒577-8502 東大阪市小若江3-4-1
近畿大学理工学部生命科学科
日高雄二

TEL 06-6721-2332 (内線4482)

E-mail: 42jps@life.kindai.ac.jp

討論会ホームページ

<http://www.chem.kindai.ac.jp/jps42>

(日本ペプチド学会ホームページからもリンクできます)

京都薬科大学21世紀 COE プログラム

プロテオーム支援室開設記念シンポジウム

「天然・伝承薬物とプロテオーム科学」

日 時：平成17年 7 月16日(土) 13:00～18:30

場 所：京都薬科大学 愛学館 愛学ホール

詳 細：<http://www.kyoto-phu.ac.jp/coe/>

【学会より】

第6回オーストラリアペプチドカンファレンスへの若手研究者の参加支援 (JPS Travel Award) について

平成17年(2005年)10月に開催される第6回オーストラリアペプチドカンファレンス(APC)に参加し、研究発表する2005年4月1日現在で35歳以下の若手研究者2名程度に参加支援金5万円/人を支給します。希望者は、2005年8月19日(金)までに、必要事項(氏名、会員番号、所属および身分、生年月日、提出したアブストラクト、受理通知先電話番号あるいはメールアドレス、推薦者の名前、会員番号、所属および連絡先)を書き、e-mail (shimoscc@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp, RTF ファイルとして提出したアブストラクトを添付)で庶務担当下東康幸理事に申し込んでください。やむを得ない場合は郵送でも結構です。選考は学会賞等選考委員会で行い、9月中旬までに結果をお知らせします。

なお、旅費の支援が決定された後、参加を取りやめた場合には支援金を返却していただきます。また、APCからの助成金との重複受領はできません。

PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

編集・発行：日本ペプチド学会

〒562-8686 箕面市稲4-1-2

(財)蛋白質研究奨励会内

編集委員

三原 久和 (担当事務)

(東京工業大学大学院生命理工学研究科)

TEL 045-924-5756, FAX 045-924-5833

e-mail: hmihara@bio.titech.ac.jp

大高 章

(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部)

TEL 088-633-7283, FAX 088-633-9505

e-mail: aotaka@ph.tokushima-u.ac.jp

坂口 和靖 (北海道大学大学院理学研究科)

TEL 011-706-2698, FAX 011-736-2074

e-mail: kazuyasu@sci.hokudai.ac.jp

前田 衣織 (九州工業大学情報工学部)

TEL 0948-29-7830, FAX 0948-29-7801

e-mail: iori@bse.kyutech.ac.jp

野水 基義 (東京薬科大学薬学部)

TEL 0426-76-5662, FAX 0426-76-5662

e-mail: nomizu@ps.toyaku.ac.jp

(本号編集担当：野水 基義)