

論文要約

Evaluation of a peptide motif designed for protein tethering to polymer surfaces

(高分子表面へのタンパク質固定化のために設計されたペプチドモチーフの評価)

Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2020, in press.

医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻

中野綾菜

細胞培養基材や組織工学足場材料のように細胞の接着基質として使用される高分子材料表面へのタンパク質の固定化に焦点を当て、タンパク質の構造を維持しながら、種々の高分子材料表面へタンパク質を安定に固定化するための方法について検討した。特に本研究では、生理的環境下において高分子表面に親和性のあるペプチドモチーフを設計し、そのペプチドを遺伝子工学の手法によってタンパク質に融合することで、温和な条件下でタンパク質が高分子表面へ吸着することを期待した。一般に合成高分子材料の表面は疎水性が高く、水中では塩化物イオン等の表面吸着によって負の表面電位を持つことが知られている。そこで、ペプチドモチーフを構成するアミノ酸として、疎水性アミノ酸であるロイシン(L)及び塩基性アミノ酸であるリシン(K)に着目し、ジペプチドKLが5回繰り返されたペプチドKLKLKLKLKL (KL5)を設計した。またKL5のタンパク質固定用モチーフとしての特性を評価した。

まず、性状の異なる3種類のタンパク質(EGF、bFGF、SDF-1 α)のC末端にKL5を融合したキメラタンパク質を大腸菌を用いた遺伝子組換え法により作製した。それらの二次構造を円二色性分光(CD)分析法で調べ、三次構造を*ab initio*法によって予測した。また、KL5融合タンパク質の高分子表面への吸着について表面プラズモン共鳴(SPR)法によって分析した。このとき、高分子にはポリスチレン(PS)、表面親水化PS及びポリカプロラクトン(PCL)のスピンコート薄膜を用いた。これらの実験結果をもとに、KL5の融合がタンパク質の立体構造及び高分子表面との相互作用に及ぼす影響について検討した。さらに、それらの結果、KL5はEGFと融合した場合にペプチドモチーフとしての効果が最も顕著であったことから、EGF-KL5融合タンパク質を表面固定したポリスチレン製組織培養プレート(TCP)及びPCLフィルム上でヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)を培養し、経時的に細胞数を測定した。

以上の実験の結果、まず、大腸菌発現系を用いることによって、KL5 を融合した EGF、bFGF、及び SDF-1 α を作製することが可能であった。

CD 分析及び *ab initio* 法によるコンピュータシミュレーションの結果、KL5 の融合は、パートナーである EGF、bFGF、及び SDF-1 α の立体構造に大きな影響は与えないことがわかった。また、融合タンパク質の KL5 領域は、融合パートナーの種類によって、それぞれ異なる二次構造を取る傾向にあることがわかった。しかし、いずれの場合も KL5 は融合タンパク質の外側に露出しており、高分子表面へのアクセシビリティの点で有利であることが示唆された。

SPR 法による吸着実験の結果をもとに、各融合タンパク質の高分子表面への吸着速度定数及び飽和吸着量を求めた。それらのデータを比較した結果、KL5 による吸着促進効果はパートナータンパク質とポリマー表面の特性に影響されることが明らかになった。中でも酸性タンパク質である EGF では、塩基性タンパク質である bFGF 及び SDF-1 α に比べて、融合した KL5 のペプチドモチーフとしての効果が発揮されやすことが明らかとなった。また、その効果は比較的極性の高い親水化 PS 及び PCL 表面で顕著であった。

最後に、KL5 融合 EGF を吸着させた TCP 及び PCL フィルムの表面で hMSC を培養した。その結果、KL5 融合 EGF を吸着させた表面では、未処理の表面及び KL5 を持たない EGF が物理吸着した表面に比べ、7 日後の細胞数が有意に多かった。それらの表面における融合タンパク質の吸着試験及び細胞骨格の免疫染色による分析結果と合わせて考察した結果、KL5 を介して表面提示された EGF が細胞膜に発現する EGF 受容体を効果的に活性化し、それによって細胞増殖が促進されたものと考えられた。

以上の結果から、KL5 は融合するタンパク質の物理化学的性質や基材となる高分子の表面性状を適切に選択することによって、ペプチドモチーフとしての効果を発揮するものと考えられ、細胞機能制御を目的とした高分子表面修飾に効果的であると結論する。