

# 論 文 内 容 要 旨

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.

主指導教員：谷本 幸太郎教授  
(医系科学研究科 歯科矯正学)

副指導教員：加藤 功一教授  
(医系科学研究科 生体材料学)

副指導教員：加来 真人教授  
(医系科学研究科 生体構造・機能修復学)

中野 綾菜

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

タンパク質を高分子表面に固定化した生体材料は、アフィニティー吸着、診断、標的薬物送達など様々な用途に応用することができる。さらに細胞成長因子のような生物学的活性をもつタンパク質の材料表面への固定化は、表面を介して細胞の生存、増殖、分化等に働きかけることが可能になるため、組織工学用足場材料の設計にとって有用なアプローチである。

タンパク質の材料表面への固定化には、共有結合、キレート結合、物理吸着など様々な材料表面-タンパク質間相互作用を利用することができる。その際重要なことは、固定化後もタンパク質が十分な活性を保持すると同時に、材料表面-タンパク質間相互作用が必要な期間にわたって安定に維持されることである。そのため、タンパク質の表面固定化反応には、従来、様々な工夫がなされてきた。

以上の背景を踏まえ、本研究では、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を試みた。このような融合タンパク質は、温和な条件下で高分子表面へ吸着することが期待される。

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) に着目した。本研究では、K 及び L からなるジペプチド KL が 5 回繰り返されたペプチド KLKLKLKLKL (KL5) を設計し、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 $\alpha$ ) 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。それらの構造を *ab initio* 法によって予測するとともに、円二色性分光 (CD) 分析法によって実験的に調べた。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 $\alpha$  を作製することが可能であった。

*ab initio* 法によるコンピュータシミュレーション及び CD 分析の結果、KL5 の融合は、パートナーである EGF、bFGF、及び SDF-1 $\alpha$  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  $\beta$  ストランド、コイル、 $\alpha$  ヘリックスのように異なる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 $\alpha$  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。