

自己組織化ペプチドを用いたナノマテリアルの設計

平 野 義 明*

Designing self-assembling peptide based nanomaterials

Yoshiaki HIRANO

1. はじめに

ナノテクノロジーは、ナノメートルのスケールで原子・分子を操作し、物質の構造と配列を制御することにより、ナノサイズ特有の物質特性を利用して新しい機能、優れた特性を発現させる技術である。ナノテクノロジーによって、電子工学、材料、化学、機械、生命科学などの領域において、常識を超えた新たな知見や新素子、新物質の創成が期待されている。

近年注目されているナノマテリアルを創出するには、「Top-down」法と「Bottom-up」法の2種類がある^{1,2)}。その概念図を図1に示す³⁾。原子・分子スケールにまで微細加工する技術 (Top-down) と、原子・分子を組み上げて物質、材料をつくる技術 (Bottom-up) の融合により、ナノテクノロジーの新しい世界が拓けつつある。Top-down 法は、バルク材料をリトグラフ法やレーザー、原子間力顕微鏡を用いてエッチングし、マイクロやナノオーダーのパターンを作製する方法である。主に電子材料や半導体材料の分野で利用されている。

一方、Bottom-up 法は、ナノサイズの単純なビルディングブロック (分子) を組み上げて、小さな集合体や組織を作成する方法である⁴⁾。自然界では、このような Bottom-up の原理により細胞や器官などの組織が形成されている。例えば、脂質分子が集合し細胞膜を形成する、核酸分子が高分子体となり遺伝情報を保存・修復する、アミノ酸の高分子体であるペプチドやタンパク質は生命活動を支える分子集合体となる、

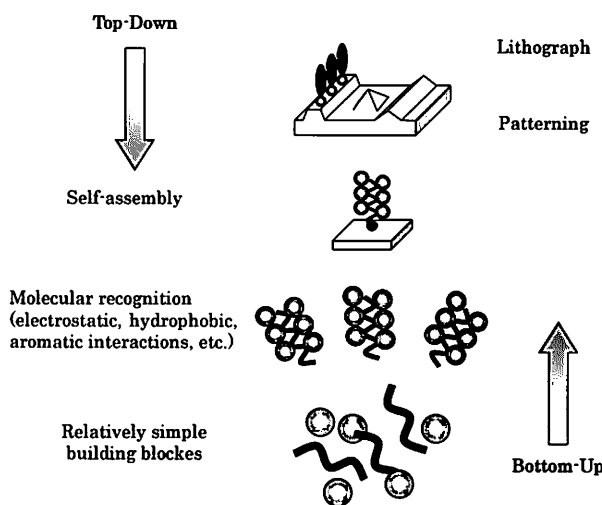


図1 Top-down 法と Bottom-up 法の概念図
(E. Gazit, *Chem. Soc. Rev.*, 36, 1263 (2007) より引用)

などである。これらビルディングブロック集合体間のさらなる相互作用によって、1次元から3次元へと自己組織化し構造体を形成する。加えて複数の相互作用によって組織集合体を形成し生命体へと変化する。このような自己組織化を形成するためには、ビルディングブロック間で、水素結合、疎水性相互作用、静電的相互作用、芳香族間の π - π 相互作用などの非共有結合性相互作用が不可欠であり、self-assembly, self-association, self-organization 等と表現され注目されている。また、化学の分野では「超分子化学」と呼ばれ、有機化合物間やホスト-ゲストのような非共有結合性相互作用によるナノスケールの複合体やナノ材料の研究が活発に行われている⁵⁾。

本稿では著者の研究分野であるペプチドの工学的利

用に注目し、Bottom-up テクノロジーを用いたペプチドナノ材料について解説する。

2. ペプチドナノ材料の設計

ペプチドやタンパク質とは、天然に存在する20種類のL-アミノ酸が多数縮合してできた高分子化合物であり、生物の重要な構成成分のひとつである(図2)。L-アミノ酸とは、アミノ基とカルボキシル基の両方の官能基を持つ有機化合物の総称で、狭義には、生体のタンパク質の構成ユニットとなる「 α -アミノ酸」を指す。縮合したアミノ酸の個数が少ない場合にはペプチド、ポリペプチド、タンパク質と呼ばれることが多いが、名称の使い分けを決める明確なアミノ酸の個数が決まっているわけではない。 α -アミノ酸とはカルボキシル基が結合している炭素(α 炭素)にアミノ基も結合しているアミノ酸であり、 $\text{RCH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ という構造を持つ。R が水素(H)であるグリシン以外のアミノ酸では、 α 炭素へのアミノ基やカルボキシル基などの結合様式が立体的に2通り可能で、それぞれD型、L型の光学異性体として区別される。タンパク質は α -アミノ酸の縮合体であるが、基本的にL型のものだけが構成成分となっている。D型は天然では細菌の細胞壁の構成成分や老化組織、ある種の神経細胞などに存在が見いだされている。ペプチドやタンパク質はほとんどの場合、図2に示すRで表記した側鎖の違いによる20種類のアミノ酸からなる。個々のアミノ酸はこの側鎖の性質によって、親水性・疎水性、酸性・塩基性などの異なった性質をもつ。構造内に2つのカルボキシル基を持つアミノ酸(Asp, Glu)は酸性を、2つ以上のアミノ基を持つアミノ酸(Lys, Arg, His)は塩基性を、その他のアミノ酸はほぼ中性を示す。中性アミノ酸は、カルボキシル基およびアミノ基以外の特徴的な官能基によって、いくつかに分類される。主に、アルキル鎖を持つAla, Val, Leu, Ile, Gly、ヒドロキシ基を持つSer, Thr、硫黄を含むCys, Met、アミド基を持つAsn, Gln、イミノ基を持つPro、芳香族基を持つPhe, Tyr, Trpに分類され、ペプチドやタンパク質の持つ性質やコンホメーションはこれらの分類を考慮しながら考察される。

ペプチド・タンパク質は特有の構造を構築し、その構造がナノ材料設計の上で大変重要となってくる。ペプチド・タンパク質は、1次構造から4次構造に分類されるが、今回紹介する材料設計には特徴ある2次構造がキーポイントとなる。1次構造とは特定の単位であるアミノ酸残基の正確な配列順序のことである。2次構造は、アミノ酸残基間の相互作用(水素結合)により、単なる直鎖であったペプチドが折りたたまれて

螺旋状の α -ヘリックス構造や β -シート構造などの2次構造をとり、さらにはタンパク質全体としての3次構造をとる。3次構造の中には2次構造の特定の組み合わせが見られ、このような単位を超2次構造と呼ぶ場合がある。タンパク質の中には、複数のポリペプチド鎖がまとまって複合体を形成しているものがあり、このような関係を4次構造と呼ぶ。ペプチド・タンパク質の立体構造(特に2次構造)は、そのアミノ酸配列(1次構造)で決定される。例えばGlu, Ala, Leuが連続すると α -ヘリックス構造を、Ile, Val, Metは β -シート構造をとりやすい。また各構造の継ぎ目の鋭角なターンの部分にはGly, Pro, Asnが配置されることなどが一般的である。 α -ヘリックスはアミノ酸が3.6残基で1回転する。アミノ酸のアミノ基は4残基離れたアミノ酸のカルボキシル基と水素結合を形成し、螺旋状態が安定化する。 α -ヘリックス以外のヘリックス構造はあまり見られないが、水素結合が3残基ごとに見られる 3_0 ヘリックスは α -ヘリックスの末端部で見られることがある。 α -ヘリックスによる、コイルドコイル(図2)はタンパク質の構造モチーフの1つで、2つから7つの α -ヘリックスがロープのように巻いた形をしている。コイルドコイルは、2つかそれ以上の α -ヘリックスが互いの周りを囲み、スーパーコイル構造を作って安定化した形である。コイルドコイルには HPPHPPPP という7残基の繰り返しを含んでおり、Hは疎水性アミノ酸、Pは極性アミノ酸である。1番目と4番目の残基は常に疎水性のアミノ酸で、螺旋の束の内部で密着している。5番目と7番目の残基は互いに反対の電荷を持ち、架橋されている。ヘリックス間で相互作用する領域にはロイシンジッパーなどの疎水性残基が多い。水溶液中で2つのヘリックスを結合させる簡単な方法は、疎水性残基同士を内側に向けて貼り合わせることである。これで疎水性の面がなくなることが、2量体への熱力学的な原動力になっている。すなわち、 α -ヘリックス構造を効率よくデザインすれば、自己組織化を利用したナノマテリアルを設計することが可能となる⁹⁾。

ペプチド・タンパク質のもう一つの特徴的な構造である β -シート構造は1951年にポーリングらによって提案された構造である。 β -シートは、隣り合ったペプチド鎖の間で、一方の主鎖のN-Hの部分と隣接する主鎖のC=Oの部分と水素結合を形成し、全体として平面構造を形成する。こうして形成される多くの水素結合により、 β -シート構造は安定で丈夫な構造となる。 β -シート構造には平行型と逆平行型が存在し、ペプチド鎖がほとんど伸びきっている。人工的に β -シート構造を設計する場合には、図2に示すアミノ酸

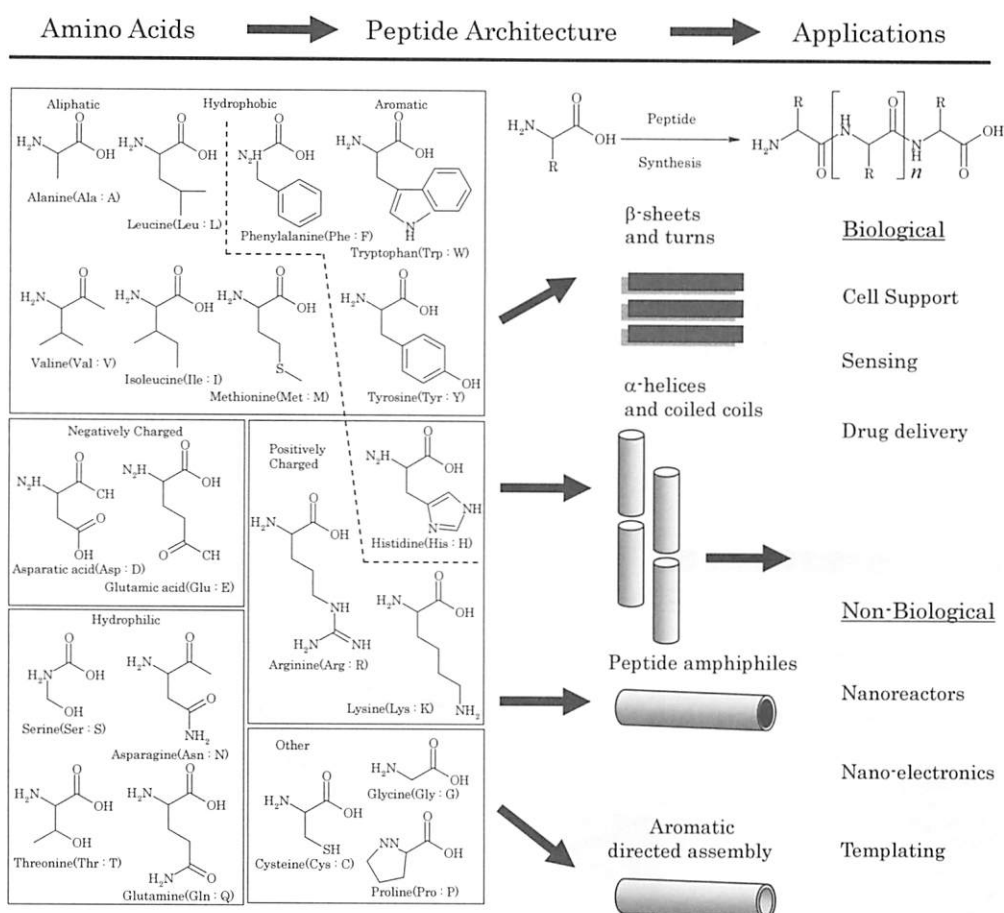


図2 20種類のアミノ酸の構造式と性質による分類、および、自己組織化により形成する集合体とその応用範囲 (R. V. Uljin et. al., *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 664 (2008) より引用)

を、親水性アミノ酸・疎水性アミノ酸と交互に配置することで、シートの片側が疎水性、他方が親水性のβ-シート構造が容易に構築できる。このことにより、疎水性相互作用とイオンを介した静電的相互作用が起り、自己組織化も容易に形成できる。すなわち、α-ヘリックスのコイルドコイルと同様、β-シート構造を効率よくデザインすれば、自己組織化を利用したナノマテリアルを設計することが可能となる⁶⁾。ちなみに、生体内においては、β-シート構造が集合することにより、アルツハイマー病などの神経系の病気を引き起こすことが知られている。

3. 自己組織化を利用したペプチドナノ材料

3.1 α-ヘリックスを用いたペプチドナノ材料

α-ヘリックスを用いたペプチドナノ材料は、コイルドコイルによる自己組織化を利用して材料設計している。コイルドコイルには *HPPHPPP* という7残基の繰り返しが必要と述べたが、*abcdefg* の7残基として設計する場合もある。Kajiva らは、人為的に設計した34残基の $Q_cL_dA_eR_fE_gL_a$

($Q_bQ_cL_dA_eR_fE_gL_a$)₄ のペプチドがコイルドコイルを形成し、さらに自己組織化しファイバー状の構造体を形成すると電子顕微鏡観察などから示している。その際に、α-ヘリックスが5本集まり1本のファイバーを形成し、さらにそれらが2本集まることにより、より太いナノファイバーを形成することを確認している⁷⁾。

Woolfson らは自己組織化繊維ペプチド SAF-1:K IAALKQK IASLKQE IDALEYE NDALEQ, SAF-2:K IRALKAK NAHLKQE IAALEQE IAALEQ を設計し、繊維状の集合体の形成を試みている⁸⁾。設計手法は、*g(abcdefg)₃abcdef* である。その結果、SAF-1とSAF-2を混合するとコイルドコイルを形成し、次第に自己組織化が起こり sticky end 構造を構築、繊維が伸長することを明らかにしている。この繊維は、繊維径と繊維長が不揃いであり分岐が無い。繊維形成に際しては、Glu と Lys 間での電荷による相互作用、および、ペプチド鎖中のアスパラギン残基がコイルドコイルを維持するための重要な相互作用役割を果たしていると指摘している (図3-I)。さらに、SAF-2のアミノ酸配列を SAF-3:K IRRLLKQK NARLKQE

IAALEYE IAALEQ に変化させ、SAF-1と混合し繊維を作製すると繊維径が均一でアスペクト比が大きい新たな繊維が得られた。この繊維は、平行痕を有する特徴を持つ。これは、コラーゲン線維やプリオンタンパク質で観察される2次元結晶様の明暗のあるパターンである。この繊維のX線回折測定を行ったところ、2量化したコイルドコイルがユニットとなり、図3-II、IIIに示すような集合体を形成することが明らかになった。また、平行痕のサイズや繊維径も、実験結果およびコンピューターシミュレーション結果ともよく一致している^{8,9)}。

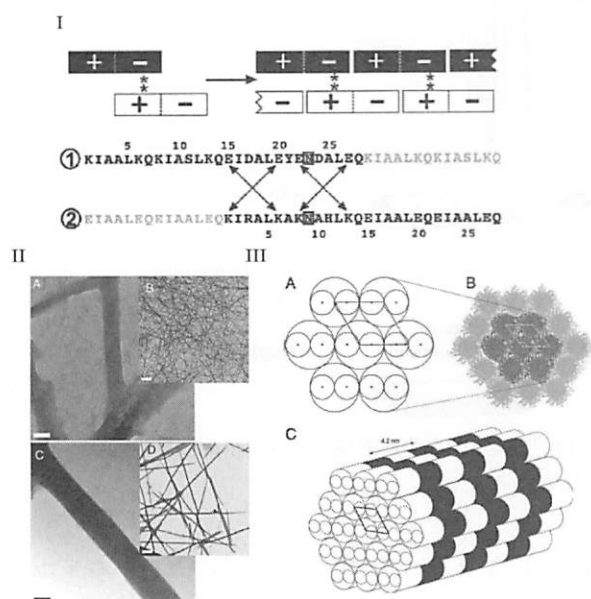


図3 コイルドコイルにより創出されたペプチドナノ材料
I：コイルドコイルを形成するペプチドのアミノ酸配列とコイルドコイルの形成メカニズム
II：コイルドコイルが自己組織化し形成された繊維の電子顕微鏡写真（A, B: SAF-1, SAF-2から作製した繊維、C, D: SAF-1, SAF-3から作製した繊維）
III：SAF-1, SAF-3から作製した繊維の構築メカニズム
(D. N. Woolfson, et. al., *Biochemistry*, **39**, 8728 (2000), *PNAS*, **104**, 10853 (2007) より引用)

3.2 β -シートを用いたペプチドナノ材料

β -シートは、ペプチド配列をデザインすることで、図4に示すように分子間相互作用によりテープ、リボン、線維、繊維へと組織化しナノ材料としての応用が可能となる。この構造のコントロールは、ペプチド濃度や塩濃度を制御することで可能である⁵⁾。蜘蛛の糸

や絹フィブロインに代表されるように生物学的ファイバーを構成するアミノ酸配列が明らかになった。 β -シート構造の自己組織化は、その配列などを効率的に利用して行われている。人工的に設計する際には、 β -ストランド極性基 (His, Lys, Asn, Asp, Gln, Glu) と無極性基 (Leu, Ile, Val, Phe) の配列パターンをコントロールすることにより不溶性タンパク質を構築できる。MITのZhangらは、これらの観点からRADARADARADARADA, AEAKAEAKAEAKAEAKのように疎水性アミノ酸および正電荷・負電荷を有するアミノ酸を交互に組み合わせ、 β -シート構造を構築するペプチド配列をデザインしている¹⁰⁻¹³⁾。

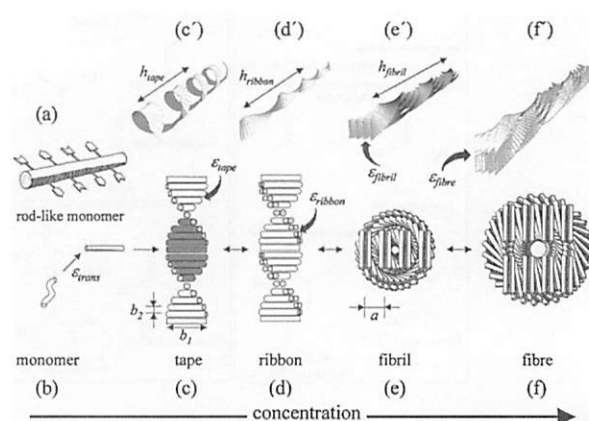


図4 β -シートペプチドの自己組織化により創出される繊維の種類
(R. V. Ulijn et. al., *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 664 (2008) より引用)

RADARADARADARADA に関しては、 β -シート構造の組織化によりゲル化することを明らかにしている^{14,15)}。また、他のペプチド配列はペプチドの自己組織化によりファイバーを形成することも明らかにしている。これら配列以外に網羅的に種々のアミノ酸配列を組み合わせ、それぞれの β -シート構造の有無について検討を行っている¹³⁾。

われわれの研究グループでは、細胞接着活性を有するペプチド配列RGDSと β -シート構造を取り得る配列RARADADARADARADAを組み合わせることで、バルク状のファイバー構造体の創出に成功した。本稿で示した繊維や論文等で紹介されている β -シート由来の繊維状・ファイバー状の集合体は、原子間力顕微鏡 (AFM) や透過型電子顕微鏡 (TEM) 画像より観察できるナノファイバーであるが、図5に示すようにバルクを形成するものである。

また、われわれは β -シート構造を有する刺激応答性ハイドロゲルとして、 β -sheet-turn- β -sheet構造を

取るペプチドを設計し、ターン部分に *dPro-Pro-Thr* を配置した Xaa-Lys-Xaa-Lys-Xaa-*dPro-Pro-Thr*-Lys-Xaa-Lys-Xaa (KX12) を合成した。Xaa 部分に疎水性アミノ酸である Val, Leu, Ile を導入し、Lys-Xaa 部分の鎖長を KX12, KX16, KX20 と変化させることによりハイドロゲルの特性を評価した。ペプチド水溶液の pH 変化および温度変化をさせた結果、KV16, KL16 および KI16 ペプチドはランダム構造から β -シート構造への構造変化が観察された (図 6-I)。KV, KL, KI タイプの温度による β -シート構造への

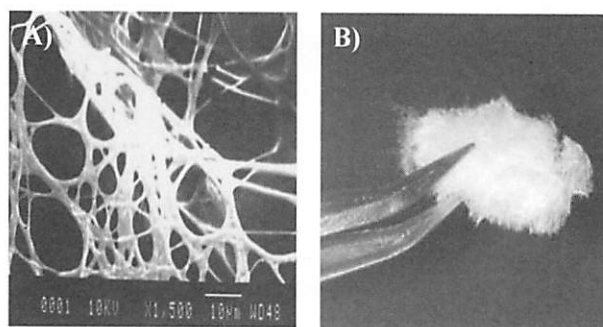


図 5 β -シートペプチドの自己組織化により創出したペプチドファイバー
A: 電子顕微鏡写真、B: 実体写真

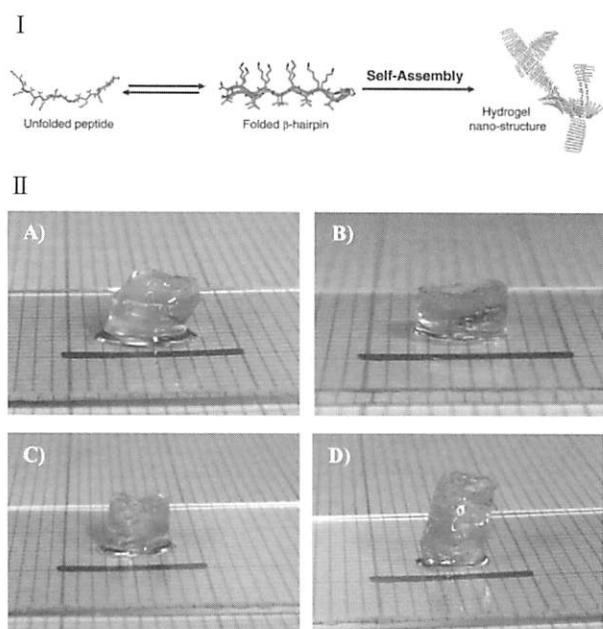


図 6 β -sheet-turn- β -sheet 構造を利用して作製した刺激応答性ハイドロゲル
I: β -sheet-turn- β -sheet の構造変化モデル図
(J. P. Schneider, et. al., *JACS*, **124**, 15030 (2002), **127**, 16692 (2005) より引用)
II: pH 変化を利用して作製した刺激応答性ハイドロゲル A: KV16, B: KL16, C: KV20, D: KL20

構造変化の違いを詳細に検討したところ、KL20>KV20>KL16>KV16 となり、残基数、疎水性相互作用による影響が明確になった。これらの結果から、Val, Leu, Ile を比較検討すると疎水性の強い Leu が、他に比べて低い温度 (39°C) で β -シート構造を形成することが明らかとなった。ペプチドハイドロゲル作製実験においても先の結果と同様、KL20 および KL16 から作製したハイドロゲルは KV20, KV16 に比較して安定してゲルの構造を保持することができた (図 6-II)。

さらには、アルツハイマー病をはじめとして透析アミロイドーシスに関与する、アミロイド β ペプチドや β 2 ミクログロブリンなども β -シート構造を形成することにより自己組織化し、非常にシャープなアミロイド線維を形成する。このアミロイド線維沈着が神経を刺激することにより、アルツハイマー病、プリオン病、透析アミロイドーシスなどの病状が現れる^{16,17)}。

4. まとめ

今回は、自己組織化ペプチドを用いたナノ材料についてのトピックスを記載したが、誌面の関係上、 α -ヘリックスを用いたペプチドナノ材料と β -シートを用いたペプチドナノ材料のみ紹介した。その他にも、両親媒性ペプチドによるペプチドナノ材料や芳香族アミノ酸の自己組織化によるナノ材料など興味深いものも多数あるが、詳細は総説などを参考頂ければ幸いである¹⁸⁻²²⁾。

本稿で紹介した研究成果は、再生医工学 (Tissue Engineering) 分野での細胞の足場材料や、ドラッグデリバリーシステム (DDS) 用担体など生医学材料への応用が期待されている。また、図 2 に示すように、ナノエレクトロニクス、センサー材料、ナノリアクターなど幅広い利用が考えられている。以上のように、ペプチドは、「ペプチド=生体関連のもの」ではなく「生体を模倣した材料設計手法や新規材料」として利用することが可能である。今後、人や地球に優しい材料として益々発展することを期待する。

参考文献

1. G.M. Whitesides, et. al., *Science*, **254**, 1312 (1991).
2. M. Lazzari, et. al., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **6**, 892 (2006).
3. E. Gazit, *Chem. Soc. Rev.*, **36**, 1263 (2007).
4. V. Berl, et. al., *Nature*, **407**, 720 (2000).
5. R.V. Ulijn et. al., *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 664 (2008).
6. 江口至洋, タンパク質工学の物理・化学的基礎,

共立出版 (1991).

7. A.V.Kajava, et. al., *J. Peptide Sci.* **10**, 291 (2004).
8. D.N.Woolfson, et. al., *Biochemistry*, **39**, 8728 (2000).
9. D.N.Woolfson, et. al., *PNAS*, **104**, 10853 (2007).
10. S.Zhang, et. al., *Macromol Biosci.*, **5**, 13 (2007).
11. S.Zhang, et. al., *J. Control. Release.*, **28**, 18 (2006).
12. S.Zhang, et. al., *PNAS*, **102**, 8414 (2005).
13. S.Zhang, *Biotech. Adv.*, **20**, 321 (2002).
14. S.Zhang, et. al., *PLoS ONE*, **2**, e190 (2007).
15. X.J.Zhao et. al., *J. Pept. Sci.*, **14**, 152 (2008).
16. 後藤祐児, *細胞工学*, **26**, 134 (2007).
17. 後藤祐児, *タンパク質・核酸・酵素*, **52**, 1445 (2007).
18. R.V.Ulijn, et. al., *Soft Matter.*, **2**, 822 (2006).
19. M.G.Ryadnov, *Biochem. Sco. Trans.*, **35**, 487 (2007).
20. G.Colombo et. al., *TRENDS Biotech*, **25**, 210 (2007).
21. I.W.Hamley *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 8128 (2007).
22. M.K.Baumann, et. al., *Langmuir*, **24**, 7645 (2008).