

The study on short elastin-like peptides: sequence, condition of solution, and structures influenced self-assembly of the peptide

田坪, 大来

<https://hdl.handle.net/2324/2236031>

出版情報 : 九州大学, 2018, 博士 (理学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :



氏 名 : 田坪 大来

論 文 名 : The study on short elastin-like peptides: sequence, condition of solution, and structures influenced self-assembly of the peptide
(短鎖エラスチン様ペプチドに関する研究: 配列、溶液条件、構造がペプチドの自己集合に与える影響)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

エラスチン様ペプチド(ELP)は、弾性タンパク質であるエラスチンに由来する疎水性残基によって構成された、 $(GGVP)_n$ 、 $(VPGVG)_n$ 、 $(GVGVAP)_n$ などの繰り返し配列を有する。そしてこの ELP の最たる特徴は、エラスチンの前駆体であるトロポエラスチンと同様に、高温で自己集合し、低温で解離するという、温度依存的に可逆的な自己集合を示すことである。ELP はこの特徴のため、ペプチド由来の、生体適合性を有する機能性材料として注目されている。ここで、典型的な $(VPGVG)_n$ の ELP 配列が生理的な温度で自己集合を示すためには、200 残基を超えるポリペプチドが必要であり、その機能の発現には一定の鎖長が必要である。このため、ELP の応用は遺伝子工学手法を用いて発現された長鎖 ELP を用いたものに専ら限られており、その大量調整が応用における一つの課題となっている。他方で、このような温度依存的に可逆な自己集合は、生体由来の分子が示す性質として大変珍しく、その分子機構の解明を試みる研究が展開されている。なぜ可逆的な自己集合が得られるのかが明らかになれば、ELP の応用におけるより効率的な分子設計も可能になると考えられる。しかしながら、プロリンとグリシンに富む ELP は一般に不定形な構造をとるとされており、その構造と機能の関係についてはいまだ不明瞭な点が多い。このような背景のなかで、先行研究は自己集合特性を再現する化学合成可能な短い ELP を開発した。これまでに、芳香族性アミノ酸を有する ELP、 $(FPGVG)_n$ および $(WPGVG)_n$ がそれぞれ $n = 5, 3$ の比較的低鎖長で自己集合を示すことを明らかにしている。このような短鎖の ELP は、大量合成において従来の長鎖 ELP よりも有利である。加えて、短鎖 ELP の構造解析は長鎖 ELP のものと比較して容易であると予想され、ELP の自己集合機構解明のためのモデルペプチドとしての利用も期待される。本研究はこの先行研究を踏まえて、ELP の更なる低分子化に有益な知見と可逆自己集合に必要な要素の二点を提示することを目指し、短鎖 ELP の自己集合特性をより強固にする環境要因、構造的要因を明らかにすることとした。なお、本博士論文では以下のような章立てに従って、研究の経緯および結果を記述した。

第一章では、ELP の起源となったエラスチンとトロポエラスチン、ELP 自身が有する機能について、そしてその機能を制御する要因について概説した。ELP は配列長や残基の疎水性、多量体化などの分子設計によって自己集合特性が制御可能であること、pH や塩といった環境要因もまた、自己集合を制御する要素となることが示されており、本研究の着想に至る背景が示されている。加えて本章では、2015 年から 2018 年中頃までの ELP に関する論文を網羅的に列挙した。ここでは、ELP の自己集合に関する最新の理解を提示するとともに、ELP 応用の実際が示されている。本章は、現代の ELP 応用のほとんどが長鎖 ELP によって構成されていることを示しており、短鎖 ELP

をターゲットとする本研究の新規性を暗示している。

第二章では、自己集合特性を強める要因として、ダイマー化が短鎖 ELP の自己集合特性に与える影響を調査した。本研究では、N 末端にシステイン残基を有するトリプトファン含有 ELP を、簡便な空気酸化でダイマー化することで(C(WPGVG)₃)₂を合成した。加えて、その自己集合特性をモノマー体(WPGVG)₃ および同分子量のリニア体 C(Cys)(WPGVG)₆と比較したところ、空気酸化による簡便なダイマー化がペプチドの水溶性を保ちつつ、自己集合特性を大いに向上させることが明らかになった。近年、ELP の自己集合特性を変化させる手法として ELP の多量体化を取り扱った文献が多く報告されており、短鎖 ELP においても、ダイマー化が自己集合特性を制御する有用な手段であることが示された。

第三章で、pH と塩が短鎖 ELP の自己集合に与える影響を調査した。pH と塩は、溶液における使用を前提とした ELP において考慮すべきポピュラーな環境要因であり、長鎖 ELP においてその影響がよく調べられている。しかしながら短鎖 ELP ではその影響はまだ詳しく調べられてはいない。本研究では、配列末端の保護状態が異なる 4 つの(FPGVG)₅ ペプチドアナログを合成し、それらペプチドの自己集合特性における塩と pH の影響を比較した。結果として、pH に依存したペプチド末端の電離は、ペプチドの水和を促進し、疎水性効果によって駆動される自己集合を妨げることが示された。加えて塩は、ペプチドに対してホフマイスター系列に従った塩析と塩溶の効果を示すことが明らかになった。しかしながら、従来塩溶の効果を示すカオトロピックなアニオンは、(FPGVG)₅の電離した N 末端の正電荷に相互作用を示すことが示唆され、ペプチドの自己集合特性を著しく向上させることが分かった。これらの pH 応答性と電離した N 端とアニオン間に生じる特異な効果は、従来の長鎖の ELP には見られない現象であり、短鎖 ELP の自己集合における新たな特性を発見することができた。

第四章では、ELP の繰り返し配列を構成する一次構造と自己集合特性の関係を調査した。繰り返し配列において、アミノ酸配列は特定の周期で周回する。このため、円順列のように一つの残基を固定し、残りの残基を交換することで、異なる一次構造のパターンを有する繰り返し配列をデザインすることができる。本研究ではこの方法を用いて、(FPGVG)₅ 基づく 11 のシャッフル配列アナログを作成した。これらの自己集合特性を比較したところ、8 つのアナログが従来の ELP と同じように温度依存的に可逆的な自己集合を示した。また、これら 8 つのペプチドは異なる構造的特徴を有していたことから、自己集合特性の発現自体には、特定の一次構造や二次構造よりもむしろ繰り返し配列を構成するアミノ酸組成が重要であることが示唆された。他方で、上記の 8 つのペプチドの自己集合特性の強さは異なっており、また、残りの 3 つのアナログは水溶性が極端に乏しかった。各ペプチドアナログの一次構造と性質の比較の中で、PG 配列を有するペプチドは水に十分に溶けること等から、自己集合特性の強さとペプチドの水溶性は繰り返し配列の一次構造に依存することが示唆された。このような ELP の一次構造と自己集合特性の関係性についての知見は、今後の ELP の応用における合理的な分子設計に貢献すると考えられる。加えて本研究は(FPGVG)₅ よりも強固な自己集合特性を示す 2 つのペプチドアナログを発見した。新たに発見された強い自己集合特性を示すペプチドモチーフは、より短鎖な ELP の作成に役立つものと考えられる。

本論文は上記の四章を通じて、短鎖 ELP の自己集合特性に影響を与える構造要因、環境要因に新たな知見を提示した。多量体化および一次構造のデザインは短鎖 ELP の自己集合特性を変化させること、また短鎖 ELP は pH や塩に対して、長鎖 ELP とは一部異なる応答性を示すことが本研究により明らかになった。