

## 研究課題別評価書

## 1. 研究課題名

ポリマー結合ペプチドのビルドアップと機能探索

## 2. 氏名

芹澤 武

## 3. 研究のねらい

近年のバイオテクノロジーの飛躍的な発展により、バクテリオファージあるいは細胞の表層タンパク質の一部に外来のペプチドを自在に融合する遺伝子工学が確立された。それにより異なるペプチドを網羅的に提示した生物学的なペプチドライブラリーが調製され、このライブラリーから特定のターゲットに特異的に結合するペプチドを選択するファージディスプレイ法や細胞表面ディスプレイ法が開発された。ペプチドの従来のターゲットは生体関連分子であったが、最近、無機化合物などの人工材料に特異的に結合するペプチドの探索に適用されるようになった。本研究では、ファージディスプレイ法を汎用性高分子に適用し、それらに特異的に結合するペプチドを同定すること、また得られたペプチドをナノ材料としてビルドアップし、機能探索することを目指す。

## 4. 研究成果

## (1) ポリマー結合ペプチドのビルドアップ

M13 バクテリオファージを用いたファージディスプレイ法(図 1)の最初のポリマータラゲットとして、本研究ではイソタクチックポリメタクリル酸メチル(it-PMMA)からなるフィルム表面を選択した。このねらいは、単純な化学構造を有する高分子をペプチドが厳密に識別できることを明示することにある。5回のバイオパニングの後に得られた7残基ペプチドのアミノ酸配列を表1に、ファージ濃度 50 pM におけるファージの結合量を酵素免疫測定法(ELISA)により評価した結果を図 2 にそれぞれ示す。リファレンスであるアタクチック(at)ならびにシンジオタクチック(st)PMMA に比べて、より多くのクローンが it-PMMA に結合した。ファージの濃度依存的な ELISA から求めた見かけの結合定数( $K_{app}$ )もまた、it-PMMA に対して大きな値を示した(表 1)。結合の強さや選択性にはアミノ酸の化学構造との相関が観察され、主な駆動力として水素結合が関与していることが示唆された。

化学合成したペプチドも it-PMMA フィルムに特異的に結合することを表面プラズモン共鳴 (SPR) 法により明らかにした(図 3、表 2)。例えば、c02 ペプチド (Glu-Leu-Trp-Arg-Pro-Thr-Arg) は it-PMMA に対して  $2.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  の結合定数を示し、st-PMMA に対するそれよりも 2 オーダー大きく、40 倍以上の値であった。結合定数の温度依存性は水素結合が駆動力であることを支持し、また it-PMMA に対して誘導適合により結合することを示唆した。c02 ペプチドの構成アミノ酸をアラニンによりそれぞれ

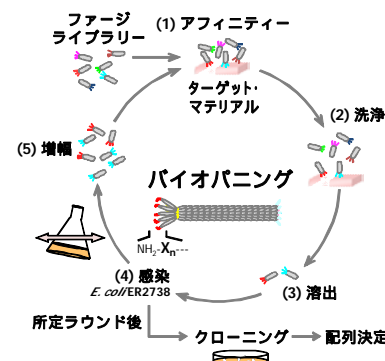


図1 ファージディスプレイ法(バイオパニング)の模式図

表1 it-PMMA に対して得られた7残基ペプチド配列とクローンの結合定数

Clone	Freq.	Sequences	$K_{app}/10^{10} \text{ M}^{-1}$		Ratio (it/st)
			it	st	
c02	6/30	ELWRFTR	10	1.6	6.3
c03	2/30	QLQKYP	8.5	2.9	2.9
c18	6/30	ARPHLSF	6.2	2.5	2.5
c01	3/30	TLHLSFA	5.4	2.9	1.9
c06	2/30	QMTYSR	5.0	2.0	2.5
c05	1/30	AAQTSTP	4.9	4.7	1.0
c04	7/30	SSPWMRE	3.5	1.1	3.2
c26	1/30	GIRHTNR	2.4	0.40	6.0
c10	2/30	NLQEFLE	0.69	0.76	0.9
Lib.	-	-	0.32	0.29	1.1

Hydroxyl, Arg, Pro

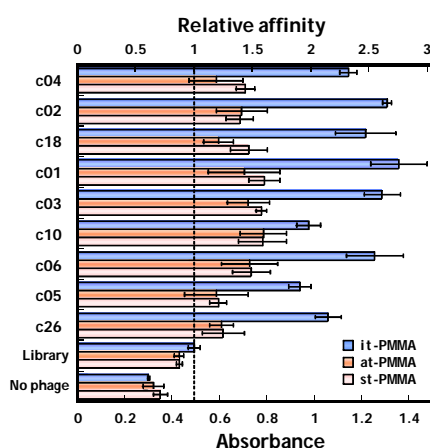


図2 it-PMMA に対して得られたクローンの ELISA ([phage] = 50 pM)

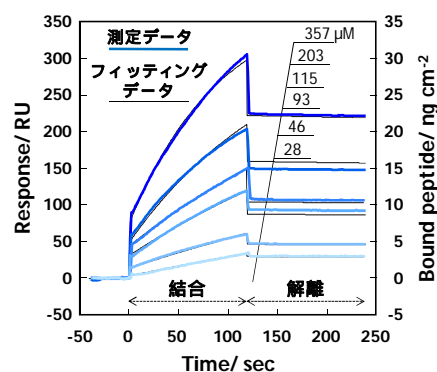


図3 it-PMMA に対する c02 ペプチドの結合挙動の SPR 解析

れ置換した結果、C 末端側の Arg-Pro-Thr-Arg が必須モチーフであることが分かった。その 4 残基ペプチドもまた、c02 ペプチドと同等の特異性を示した。一方、走査型プローブ顕微鏡を用いた c02 ペプチドと PMMA フィルムとの結合力の直接測定もまた、c02 ペプチドの高い特異性を支持した。このように、単純な化学構造をもつ PMMA の立体規則性をわずかに 7 残基のペプチドが厳密に見分ける能力をもつことを明らかにした。

分子力場計算による必須モチーフの立体構造の予測から、c02 ペプチドは it-PMMA のモノマーユニットにして、3-5 残基程度のエステル基間の距離を認識して結合することが示唆された。このことは、短鎖のペプチドを探索する場合、精密重合により

極限まで構造制御した高分子を必ずしも用いる必要はなく、所定の割合で高分子鎖中に存在するナノ構造がペプチドのターゲットとなることを示唆している。よって、様々な汎用性高分子が適用可能であることが分かった。

その他の汎用性高分子にもファージディスプレイ法を適用し、一般性の獲得をねらった。上記の研究ではリファレンスであった st-PMMA をターゲットにすると、st-PMMA に特異的なペプチドが得られた。その際、st-PMMA フィルム表面の両親媒性に基づく表面官能基の違いをペプチドが認識することも明らかにした。ポリ L-乳酸の結晶化膜では、同じポリ L-乳酸であっても非晶化膜には弱い結合しか示さなかった。st-ポリスチレン (PS) のトルエン溶液から調製した多孔膜では、at ならびに it-PS だけでなく、トルエンが残存した st-PS フィルムに比べて、ターゲット特異的に結合するペプチドが得られた。バイオエタノールの原料としても注目されるセルロースに特異的な 7 残基ペプチドの取得にも成功した。また代表的なエンジニアリングプラスチックとして知られるポリエーテルイミドに強固に結合するペプチドの取得にも成功した。このように、高分子とペプチドとの間に一般的な組み合わせが存在することを見出した。

さらに、アゾベンゼン基を側鎖に有するアクリレートと 2-ヒドロキシエチルメタクリレートの共

表2 it-PMMA に対して得られた 7 残基ペプチドの結合解析

Peptide Sequences	$K_d / M^{-1} s^{-1}$			$K_{(it)}/K_{(st)}$	
	it-PMMA 	(st-PMMA) 	Synthetic peptide 	Phage-displayed peptide 	
c02 ELW <b>R</b> PT <b>R</b>	31 (5.5)	0.11 (0.80)	280 (6.8)	40	6.3
c18 A <b>R</b> P <b>H</b> LS <b>F</b>	13 (2.0)	0.20 (1.3)	65 (1.5)	43	2.5
c04 S <b>S</b> P <b>W</b> M <b>R</b> E	15 (1.1)	0.24 (2.5)	64 (4.2)	15	3.2
c26 G <b>I</b> R <b>H</b> T <b>N</b> R	20 (1.6)	0.47 (1.5)	42 (1.1)	38	6.0
c03 Q <b>L</b> Q <b>K</b> Y <b>P</b> S	13 (0.22)	0.58 (0.19)	23 (1.2)	19	2.9
c10 N <b>L</b> Q <b>E</b> F <b>L</b> F <sup>a</sup>	n. d. (n. d.)	n. d. (n. d.)	< 1 (< 1)	-	0.9

<sup>a</sup>Hydroxyl, Arg, Pro in HBS containing 0.1% NH<sub>3</sub>

重合体に対してファージディスプレイ法を適用した結果、トランス体アゾベンゼンに比べて、シス体に特異的に結合する 7 残基ペプチドの取得に成功した。実際に WHTLPNA ペプチドの吸着を可視光および紫外光の照射によりスイッチングすることが可能であった(図 4)。ペプチドの共存下でアゾベンゼン分子の水中への可溶化実験を行ったところ、興味深いことに、トランス体よりもシス体アゾベンゼンをより可溶化した。つまり、得られたペプチドはアゾベンゼン基を厳密に識別し結合することが示唆された。また、低分子化合物に結合するペプチドを取得する方法として、高分子鎖へのコンジュゲーションが有用である可能性を見出した。

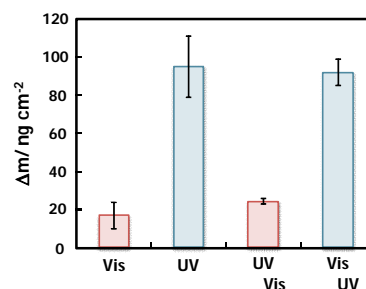


図4 ペプチド結合の光スイッチング(アゾベンゼン含有ポリマーに対するペプチドの結合をストレプトアビジンの結合により定量化)

## (2) ポリマー結合ペプチドの機能探索

### 1) ペプチド融合タンパク質の創製

ペプチドをタンパク質に融合することにより、特定の材料に対するタンパク質の吸着強度、安定性の向上をねらった。it-PMMA フィルムに対して  $5.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  の吸着定数を有するホモ二量体のタンパク質(分子量 46 kDa)に c02 ペプチドを融合した結果、吸着定数は 2 オーダー大きな  $4.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  に飛躍的に増大した。タンパク質をポリマー表面に安定に吸着させるための方法として、ポリマー結合ペプチドの融合が有用であることを明らかにした。

### 2) ペプチドによるポリマー表面処理

タンパク質や細胞が吸着しない表面をポリマー結合ペプチドにより得ることをねらった。ペプチドを吸着させた後、活性化したポリエチレングリコールを反応させた結果、得られた表面に対するタンパク質の吸着が抑制されることが分かった。このことは、ポリマー表面を処理する分子ツールとして、ポリマー結合ペプチドが有用であることを示している。

### 3) ペプチドによる無機ナノ粒子の表面処理

無機ナノ粒子の表面処理剤として、ポリマー結合ペプチドを利用することをねらった。末端をシステイン化した it-PMMA 結合性ペプチドの共存下で金ナノ粒子を調製すると、ペプチド鎖が表面に導入された金ナノ粒子が合成できた。得られたナノ粒子は st-PMMA に比べて、it-PMMA フィルムにより吸着することを明らかにした。有機-無機ハイブリッドを創製する分子ツールとして、ポリマー結合ペプチドが利用可能であることが分かった。

### 4) ポリマーナノ粒子によるペプチドの選択濃縮

ポリマー結合ペプチドの探索をもとに、高分子の新しい機能発掘をねらった。c02 ペプチドを含むペプチド混合液に、あらかじめ調製した it-PMMA あるいは st-PMMA ナノ粒子を添加し、所定時間後、ナノ粒子のみを遠心分離により回収し、そのまま質量分析した。その結果、it-PMMA ナノ粒子の場合にのみ c02 ペプチドを選択濃縮できることが明らかとなった。本研究で探索したいくつかのペプチドはある種のマーカータンパク質に含まれているものもあることから、ポリマーナノ粒子によるペプチドーム解析の新しい方向性を示すものである。

## 5. 自己評価

提案時は、単純な化学構造を有し、また疎水性も高い汎用性高分子を、短鎖のペプチドが識別できるか全く不明であり、当然ながらナノ材料としてペプチドを利用する発想もまさに想像の範囲であった。しかしながら、結果として、ビニル高分子やポリエステルなどの汎用性高分子のそれぞれに特異的に結合するペプチドの存在を明らかにすることができた。it-PMMA から研究をスタートさせ、立体規則性が異なる st-PMMA、より単純な構造かつ疎水性の st-PS を経て、より汎用性の高い高分子に適用した点は、適切な展開であったと考えている。また、研究が先

行した it-PMMA 系において、ペプチドレベルの結合特性を詳細に解析し、4 残基という極めて短い必須モチーフの同定に至った点も適切であったと考えている。アゾベンゼン基の光異性化によるペプチド結合のスイッチングは、提案時にはなかったものであり、有機低分子とペプチドとの複合体生成といった新しい領域の可能性を示したと考えている。このように、ペプチドの取得という点においては、提案時の目標を十分に達成したと考えている。一方、提案のすべてを達成したわけではないが、ペプチドの機能探索についても、有用な融合タンパク質が創製できたこと、ポリマー表面を処理する分子ツールとしてペプチドを利用したこと、金属ナノ粒子表面に導入したペプチドが機能したこと、提案時にはなかったペプチドの選択濃縮にポリマーを利用したことから、十分にペプチドの新たな可能性を明らかにしたと考えている。本研究課題は、提案時に全く基盤データがなく、新たに研究室を立ち上げる際に立案した萌芽段階の研究であり、まさに、さきがけ研究に適合した意義のある研究であったと思っている。

## 6. 研究総括の見解

合成高分子の化学構造を認識し特異的に結合するペプチドをファージディスプレイ法によりスクリーニングし、それらのナノ材料としての機能を探索することを目指して研究を行い、単純な化学構造を有する合成高分子に対して、高い特異性をもって結合するペプチドが存在すること、それらの新しい利用法について重要な知見を得た。合成高分子とペプチドの親和性を評価する新しい手法を開拓し十分な成果が得られている。今後の発展も期待できる。

## 7. 研究成果リスト

### A さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

#### (1) 論文(原著論文)発表

- 1) Takeshi Serizawa, Toshiki Sawada, Hisao Matsuno, Teruhiko Matsubara, Toshinori Sato, "A Peptide Motif Recognizing a Polymer Stereoregularity", *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 13780-13781 (2005).
- 2) Takeshi Serizawa, Toshiki Sawada, Tatsuki Kitayama, "Peptide Motifs that Recognize Differences in Polymer Film Surfaces", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 723-726 (2007).
- 3) Takeshi Serizawa, Toshiki Sawada, Hisao Matsuno, "Highly Specific Affinities of Short Peptides against Synthetic Polymers", *Langmuir*, **23**, 11127-11133 (2007).
- 4) Hisao Matsuno, Jun Sekine, Hirofumi Yajima, Takeshi Serizawa, "Biological Selection of Peptides for Poly(L-lactide) Substrates", *Langmuir*, **24**, 6399-6403 (2008).
- 5) Jing Chen, Takeshi Serizawa, Makoto Komiyama, "Peptides that Recognize Photo-Responsive Material Targets", *Angew. Chem. Int. Ed.*, in press.

この他、印刷中を含めて 8 報

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 2件

1) 発 明 者: 芹澤 武

発明の名称: セルロース結合性ペプチドおよびその製造方法

出 願 人: 東京大学

出 願 日: 2006 年 9 月 15 日

2) 発 明 者: 芹澤 武

発明の名称: タンパク質吸着阻害基材およびその用途

出 願 人: 科学技術振興機構

出 願 日: 2006 年 11 月 27 日

(3) 受賞

1) 平成 19 年度、若手科学者賞「高分子超薄膜のナノ構造制御と新機能創製の研究」、  
文部科学大臣

2) 平成 19 年 7 月 20 日、ヤングサイエンティスト講演賞「高分子と生体分子の相互作用  
制御に向けた新表面の設計と構築」、高分子学会関西支部

(4) 著書

芹澤 武, 松野寿生, “ナノバインダーとしての高分子結合性ペプチド”, バイオナノプロセス  
溶液中でナノ構造を作るウェット・ナノテクノロジーの薦め, シーエムシー, 112-120  
(2008).

Takeshi Serizawa, Mitsuru Akashi, “Assembly and Novel Functions of Polymer  
Stereocomplexes on Surfaces”, Bottom-up Nanofabrication (K. Ariga, H. S. Nalwa Eds.),  
American Scientific Publishers, 97-120 (2009).

(5) 総説

松野寿生, 芹澤 武, “疎水性ポリマー表面の構造制御に基づく吸着タンパク質の活性制  
御”, ケミカルエンジニアリング, 55, 521-526 (2007).

芹澤 武, 松野寿生, “マテリアルを認識するペプチド分子”, 未来材料, 7, 18-23 (2007).

松野寿生, 芹澤 武, “疎水性ポリマー表面の構造制御と吸着タンパク質の機能”, 表面,  
46, 249-257 (2008).

(6) 学会発表(口頭)

【国際】

Toshiki Sawada, Hisao Matsuno, Takeshi Serizawa, “Screening and Characterization  
of Polymer-Recognizing Peptides”, 11th Korean Peptide Symposium, 2007

Takeshi Serizawa, “Isolation and Characterization of Polymer-Recognizing Peptides”,  
2008 Spring Meeting (The Polymer Society of Korea), 2008

Takeshi Serizawa, “Peptides that Recognize Synthetic Polymers”, 3rd International  
Symposium on Integrated Molecular/Materials Engineering, 2008

Takeshi Serizawa, “Isolation, Characterization, and Application of



Polymer-Recognizing Peptides”, International Symposium on Engineering Micro-/Nano-Materials based on Self-Assembling and Self-Organization, 2008

Takaaki Date, Keiji Tanaka, Toshihiko Nagamune, Takeshi Serizawa, “Directional Affinity of Polymer-Recognizing Heptapeptides”, 3rd International Symposium on Integrated Molecular/Materials Engineering, 2008

【国内】

芹澤 武, “合成高分子と生体分子の新しいインターフェイスの構築”, オルガテクノ 2005 併設「有機ビジネステクニカルセミナー」, 2006

芹澤 武, “ポリマー結合ペプチドによるバイオナノインターフェイス”, 第 28 回日本バイオマテリアル学会, 2006

芹澤 武, “高分子と生体分子の相互作用制御に向けた新表面の設計と構築”, 第 53 回高分子研究発表会, 2007

芹澤 武, “ポリマー認識ペプチドの探索と機能”, 第 57 回高分子年次大会, 2007

芹澤 武, “マテリアルを認識する生体高分子”, 第 54 回高分子夏季大学, 2008

B. その他の主な成果

(1) 論文(原著論文)発表

- 1) Takeshi Serizawa, Keiko Yamashita, Mitsuru Akashi, “Unique Physical Adsorption of Proteins onto Double Stranded Stereocomplex Films Composed of Stereoregular Poly(methyl methacrylate)s”, *Polym. J.*, **38**, 503-506 (2006).
- 2) Takeshi Serizawa, Kyoko Iida, Hisao Matsuno, Kimio Kurita, “Prolonged Degradation of End-Capped Polyelectrolyte Multilayer Films”, *Polym. Bull.*, **57**, 407-413 (2006).
- 3) Takeshi Serizawa, Taishi Tateishi, Daisuke Ogomi, Mitsuru Akashi, “Deposition of Calcium Carbonate Disks on Polyelectrolyte Multilayer Matrices by the Alternate Soaking Process”, *J. Cryst. Growth*, **292**, 67-73 (2006).
- 4) Wanpen Techaboonyakiat, Daisuke Ogomi, Takeshi Serizawa, Mitsuru Akashi, “Evaluation of Cell Adhesion and Proliferation on a Novel Tissue Engineering Scaffold Containing Chitosan and Hydroxyapatite”, *J. Bioactive Compatible Polym.*, **21**, 579-589 (2006).
- 5) Takeshi Serizawa, Nami Kawanishi, Mitsuru Akashi, “Polyelectrolyte Multilayers of Poly(vinylamine hydrochloride-co-N-vinylformamide) with Variable Primary Amine Content and a Weak Polyacid Poly(acrylic acid)”, *J. Appl. Polym. Sci.*, **102**, 3927-3933 (2006).

(2) 著書

芹澤 武, 明石 満, “逐次積層膜を利用したテンプレート重合”, 機能物質の集積膜と機能展開, シーエムシー, 269-282 (2006).

Takeshi Serizawa, Mitsuru Akashi, “Stereoregular Polymerization within Template

Nanospaces”, *Polym. J.*, **38**, 311-328 (2006).

Takeshi Serizawa, Mitsuru Akashi, “Assembly and Novel Functions of Polymer Stereocomplexes on Surfaces”, *Bottom-up Nanofabrication*, Edited by K. Ariga and H. S. Nalwa, **4**, 97-120 (2009).

(3) 招待講演

Takeshi Serizawa, “Stereoregular Template Polymerization in Polymeric Nanospaces”, *Pacificchem 2005*, 2005