

新規生物活性ペプチドの取得を基盤とした医薬・マテリアルの開発

研究代表者 小出 隆規
(先進理工学部 化学・生命化学科 教授)

1. 研究課題

生物活性を有するペプチドは、その高い標的特異性から医薬品のリード化合物として有用である。だが一方で、生体への吸収性および体内での安定性における問題の克服が課題である。ペプチド性リード化合物には天然由来のものが多く、天然物は創薬資源として枯渇しつつある。このような状況下、人為的に構築されたコンビナトリアルなランダムペプチドライブラリは、創薬資源として有望である。

本研究では、ペプチド性リード化合物の新規探索戦略の立案と方法論の開発を行なっている。すなわち、①優れた生体安定性を有するペプチドの骨格をあらかじめ選定し、②その骨格に固定されたランダムペプチドライブラリを化学的あるいは遺伝子工学的な方法で構築し、③そのライブラリの中から高スループットで医薬品リードたり得るペプチドを取得することを目標としている。

また、コラーゲン3重らせん構造を模倣するペプチドの理論的な分子デザインから、新しいアイデアに基づく創薬研究を展開する。加えて、天然由来のコラーゲンあるいは化学合成により構築できるコラーゲン様3重らせんペプチドの高分子化、あるいは超分子化によって、ハイドロゲルを形成するバイオマテリアルを創製し、医療への応用を目指す。

2. 主な研究成果

2.1 3重らせん型ランダムペプチドライブラリからの新規タンパク質結合ペプチドの探索

酵母細胞内に構築した3重らせん型ランダムペプチドライブラリから2-ハイブリッド法によって標的タンパク質に結合するペプチドを選択する方法をほぼ確立し、それを複数のコラーゲン結合タンパク質（あるいはドメイン）に対するリガンドの取得に応用した。

インテグリン $\alpha 2\text{I}$ ドメインに結合するペプチドの探索から、これまで結合に必須とされていた Glu 残基を持たない新規な3重らせんペプチドを取得している。このペプチドはインテグリン $\alpha 2\beta 1$ の活性化に必須とされる2価金属イオンの非存在下においても特異的な結合を示し、かつそれを活性化し細胞接着を誘導することが明らかになった。またこの3重らせんペプチドとインテグリン $\alpha 2\text{I}$ ドメインとの共結晶化にも成功し、Spring8による結晶構造解析を行った。このペプチドはこれまで不活性型とされていた close 構造の I ドメインに結合することが判明した。これらの結果は、インテグリン $\alpha 2\beta 1$ の活性化に新しい経路があることを示唆している。

インテグリン $\alpha 1\text{I}$ ドメインについても同様のスクリーニングを実施し、そのリガンドとなる新しい3重らせんペプチドが複数得られている。 $\alpha 10$ および $\alpha 11$ のIドメインについても同様の検討を進めている。コラーゲン受容体として知られているインテグリン $\alpha 1\beta 1$ 、 $\alpha 2\beta 1$ 、 $\alpha 10\beta 1$ 、 $\alpha 11\beta 1$ それぞれに対する特異的なリガンドが取得できれば、これまで明らかにされていなかった個々の受容体機能の解明と機能制御につながるものと期待できる。

吸血蚊の唾液腺から分泌されるコラーゲン結合タンパク質であるエジプチンを標的とするスク

リーニングを実施し、それに結合する複数のアミノ酸配列を同定した。本タンパク質は、コラーゲン上で競合するとされている血液凝固因子である von Willebrand 因子よりも 3 重らせん上のアミノ酸配列について広い結合特異性を有しているようである。また、新規な複数のコラーゲン結合タンパク質（あるいはドメイン）を標的としたスクリーニングにも着手し、進行中である。

2.2 人工コラーゲン様ポリマーの開発と医療への応用

次世代型の人工コラーゲンとして、インジェクタブルな性質をもつコラーゲン様ペプチド超分子の開発を進めている。昨年度までに開発した分岐状コラーゲン様ペプチドに加え、ペプチド主鎖の柔軟性（屈曲性）を制御したペプチドを新たに考案し、その超分子化能について検討した。このペプチドは、前者同様枝分かれ状に 3 重らせんを形成してハイドロゲルを形成することを明らかにした。

2.3 金属配位によりクロスリンクされたコラーゲンマテリアルの開発

今年度は、天然コラーゲンを金属錯体で架橋して得られる高分子ゲルの実用的検討を進めた。シスプラチンをジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解することで生成する白金錯体 $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{Cl})(\text{DMSO})]^+$ がコラーゲンに 3 重らせん上のアミノ酸側鎖に配位して分子間を架橋することで高い透明度をもつゲルを形成することを見出した。この金属錯体架橋コラーゲンゲルは通常のコラーゲンゲルよりも高い物理強度をしめした。また、使用したプラチナ錯体が細胞に対してほとんど毒性を示さないことを明らかにした（図 1）。さらに、白金錯体で架橋したコラーゲンは pH に応答性してそのゲル化特性が制御できることも明らかにした。さらに細胞と混合したのちにゲル化させることで 3 次元細胞培養に適用できることも示した（図 2）。

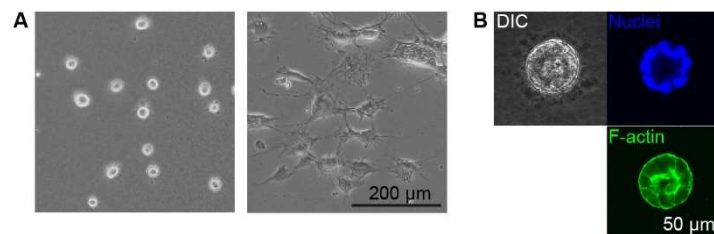


図 1. 白金錯体で架橋したコラーゲンゲルを利用した細胞培養

(A) 通常のコラーゲンゲル上（左）、白金錯体で架橋したコラーゲンゲル上（右）で 1.5 時間培養したヒト線維芽細胞の位相差観察像。白金錯体で架橋したコラーゲンゲル上で優れた細胞接着および伸展が見られた。(B) 白金錯体で架橋したコラーゲンゲル中で 6 日間培養したイヌ腎尿細管（MDCK）細胞の蛍光染色像。細胞の極性化に伴うシスト形成が観察された。

3. 共同研究者

増田 亮（理工総研 次席研究員）

市瀬慎一郎（理工総研 招聘研究員）

能勢 博（理工総研 招聘研究員）

4. 研究業績

4.1 学術論文

R. Masuda, K.P.P. Thant, K. Kawahara, H. Oki, T. Kadonosono, Y. Kobayashi, T. Koide
A Yeast Two-hybrid System to Obtain Triple-helical Ligands from Combinatorial Random Peptide Libraries.

bioRxiv **567114** (2023), doi: 10.1101/2023.11.14.567114.

S. F. Ichise, T. Koide

A Transparent and Injectable Biomaterial Prepared by Mixing Collagen and Anti-cancer Platinum Derivatives.

Macromol. Biosci. e2300553 (2024), doi: 10.1002/mabi.202300553.

4.2 特許

市瀬慎一郎, 小出隆規

「白金錯体で架橋されたコラーゲンからなるハイドロゲル」特願 2023-084525, 2023 年

4.3 学会および社会的活動

日本結合組織学会 評議員

日本ペプチド学会 理事

日本薬学会関東支部 幹事

5. 研究活動の課題と展望

本プロジェクトでは、コンビナトリアル化学により構築した 3 重らせん型ランダムペプチドライブラリから高いスループットで標的タンパク質に結合するリガンドを取得できるシステムを構築し、その有用性を示した。今後、薬効としての **efficacy** がより高いペプチドを取得し、その創薬応用を目指す。コラーゲン結合性インテグリンについては、各サブタイプに選択的な 3 重らせん型リガンドの取得が実現できそうである。

上記システムを用いて得られた 3 重らせん型機能ペプチドは、すでに開発している化学合成人工コラーゲンマテリアルのプラットフォームに組み込むことができるので、テイラーメイド細胞外マトリックスとしての応用が期待できる。