

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。天然由来のペプチド性リード化合物は創薬資源の枯渇により取得が困難になってきた。本研究では、独自設計のコンビナトリアルなランダムペプチドライブラリからの創薬リードの獲得を目指す。

我々は、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アミノ酸配列を同定する方法を確立した。現在、生物活性を有する3重らせんペプチドの探索を本格化させている。

本研究のもうひとつの課題は、バイオマテリアルとしてのコラーゲン誘導体あるいは人工コラーゲン様超分子の開発である。De novo デザインしたペプチドの超分子化と、天然コラーゲン分子の金属錯体による架橋という二つの異なるアプローチにより研究を進めた。

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

以下に示す様々なコラーゲン結合タンパク質に結合する3重らせんペプチドのアミノ酸配列の探索を行った。また、得られた配列を有する3重らせんペプチドを合成し、標的タンパク質との相互作用を解析している。

コラーゲン結合型インテグリン: コラーゲン受容体として働くインテグリン $\alpha1\beta1$ および $\alpha2\beta1$ においてコラーゲンの分子認識を担う各 α Iドメインに対して、結合する3重らせんペプチドのアミノ酸配列を探索した。昨年度までに得られていた $\alpha2$ Iドメインに結合する新規な3重らせんペプチドはインテグリン $\alpha2\beta1$ に選択的なりガンドであることが明らかになった。さらにこのペプチドと組換え発現した $\alpha2$ Iドメインとの共結晶 X 線構造解析により、この3重らせんペプチドは $\alpha2$ Iドメインの閉じたコンフォメーションに認識されていることが明らかになった。 $\alpha1$ Iドメインに対するスクリーニングからは、数十種類のアミノ酸配列が得られているが、それらはすべて金属イオンに配位するグルタミン酸残基が保存されていた。

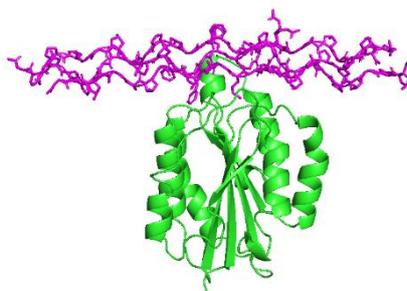


図1 インテグリン $\alpha2$ Iドメインと新規3重らせんペプチドとの複合体の結晶構造

吸血蚊唾液腺タンパク質：吸血蚊唾液腺から分泌される **aegyptin** はコラーゲン結合タンパク質であり、von Willebrand 因子 (VWF) とコラーゲンとの結合を競合阻害することで一次止血を阻害すると報告されている。**Aegyptin** 中のコラーゲン結合ドメインと目されている球状ドメインを標的としたスクリーニングから、多数の新規ペプチドが得られた。これらは総じて塩基性アミノ酸が豊富であり、比較的広い特異性をもってコラーゲン 3 重らせんを認識していることが示唆された。

VII 型コラーゲン：VII 型コラーゲンは表皮構造の維持に必須な繫留線維を形成する。この中に存在する VWF 様ドメイン 2 (VWF-2) は他の型のコラーゲンと結合する。このドメインを標的としたスクリーニングから、トリプトファンを含む非天然の 3 重らせんペプチドが得られた。このペプチドは VWF-2 に対して選択的な結合を示した。

マトリリン 1：軟骨マトリックス構造の維持に寄与するマトリリン 1 の VWF 様ドメインもまたコラーゲン結合タンパク質である。このドメインを標的としたスクリーニングから、新規かつ標的的特異的な 3 重らせんペプチドが得られた。

2.2 人工コラーゲン様超分子ゲルの開発

自在に物性や生物機能を調節でき、かつ安全なバイオマテリアルを目指して、コラーゲン様 3 重らせん構造を基盤とした超分子型ペプチドゲルの開発を行っている。化学合成にて調製できる数重アミノ酸残基の中に、3 重らせん構造を不安定化させる構造を導入することによって、3 量体の形成を抑制することで、超分子の形成を期待した。複数の分子デザインを検討し、このコンセプトが実証された。また、これら超分子はハイドロゲルを形成し、その物性もアミノ酸配列およびペプチド鎖長により改変可能であることが示された。さらに、このハイドロゲルは細胞培養系にも適用可能であることが示された。



図 2 作成したペプチド超分子型人工コラーゲンゲル

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

ジメチルスルフォキシド(DMSO)とシスプラチンあるいはトランスプラチンとを反応させて得られる白金錯体をコラーゲンと混合することにより、3 重らせん同士が架橋され、透明度の高いハイドロゲルを形成する。この架橋コラーゲンは pH 依存的なゾルーゲル転移を示し、酸性で架橋したのちに、透析により過剰の白金錯体を除去できる。この架橋コラーゲンゾルは、生理的 pH への変化によりゲル化させることができるという特徴を有している。

このような特徴を生かし、がん細胞の上皮-間葉転換(epithelium-mesenchymal transition, EMT)の研究を進めている。同じ架橋コラーゲンゲルを用いても、ゲル上(2D)培養とゲル内(3D)培養とでは、細胞の EMT に顕著な違いがあることが明らかになった。このことは、従来 2D 培養で研究されることが多かった EMT にかかわる研究に一石を投じるものとなる。

3. 共同研究者

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）

河原一樹（大阪大学大学院薬学研究科 助教）

沖 大也（大阪大学 微生物病研究所 特任研究員）

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.

Journal of Biological Chemistry, **300**, 107794 (2024), doi: 10.1016/j.jbc.2024.

4.2 特許

小出隆規

発明の名称は公開前なので非公表 特願 2025-086461

4.3 学会および社会的活動

日本結合組織学会 理事

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

本プロジェクトは、二つの異なる軸で研究がすすめられた。第一は、コラーゲン結合性をもったコラーゲン結合性タンパク質により認識される新規アミノ酸配列の取得である。このために、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を、酵母2-ハイブリッド法を用いてスクリーニングする方法を開発した。この方法を用いて、新規な3重らせんペプチドが連続々と得られている。第二は、生体材料として利用できる人工コラーゲンスキャフォールドのデザインである。複数の分子デザインを考案し、化学合成で調製できる、超分子あるいは高分子型人工コラーゲンを創製した。これらはハイドロゲルとして細胞培養系に応用可能である。

これら独創性の高い二つの研究軸を組み合わせることによって、物性および生物活性を任意に制御できる完全人工コラーゲンマテリアルの実現可能性が見えてきた。このようなマテリアルは現在動物由来コラーゲンに頼らざるを得ないコラーゲンマテリアルの現状を打破するブレイクスルーとなりうるものである。