<研究論文>

(受理：平成 20 年 1 月 24 日)

合成ポリペプチド設計と生体材料としての応用 (第 1 報)
荷電型コポリペプチドの合成と in vitro 酵素加水分解

林 隆紀*・淀谷 真也**・古田 雅一***・林 壽郎****

要 旨

負電荷をもつ L-グルタミン酸残基と正電荷をもつ L-リシン残基を、それぞれ適量含有する N-ヒドロキシエチル-L-グルタミンとの三元ランダム共重合体を調製し、分子鎖コンホメーション、側鎖末端部分での電荷が、プロテアーゼによる酵素加水分解性にどのような効果を及ぼすかについて実験的評価を行った。それぞれの荷電型ランダム共重合体および単独重合体は、いずれもブロメラインにより主鎖がランダムに加水分解を受けることが示された。試料ポリマーの酵素加水分解の速度論的考察は溶液粘度の変化を経時的に測定し、既存の粘度式を適用して分子量低下の時間依存性から行った。試料の酵素分解挙動はミカエリス-メンテン則に従うことが明らかとなった。また、側鎖の荷電状態が酵素加水分解速度に大きく影響し、負荷電型ポリペプチドは非荷電型および正荷電型ポリペプチドに比べて酵素加水分解を受けにくいことが明らかとなった。

1. 緒 言

近年、地球温暖化、酸性雨など地球規模での環境悪化が加速の一途をたどり、これら地球環境問題は我々の将来に暗い影を落とし始めている。医療用材料の分野においても環境調和型材料としての生分解性材料開発の重要性が益々高まってきた。天然ポリペプチドであるコラーゲンやゼラチンおよびタンパク質は、生体内で酵素の作用を受けて消化吸収される、いわゆる天然由来生分解性材料である¹⁾。これらはすでに、軟組織用接着剤、薬剤徐放用担体、あるいは再生医療用吸収性足場材料などとして、臨床応用あるいは開発研究が進められてきた²⁾。一方、合成ポリペプチドは、タンパク質と同様に L-アミノ酸から構成され同じ骨格鎖をもつため、適当な親水性を付与させれば酵素分解型の有用な生分解性医用材料として、軟組織接合剤、軟組織修復材料、および薬剤徐放用担体などの医療応用が期待

されるが、生体内での安全性評価や合成手法の問題、および高コストなどの未解決の課題が残され、残念ながらこれまで開発研究が遅れてきた。しかし、合成ポリペプチドに関する基礎的知見を精力的に集積することによって、その安全性・有用性が明らかになれば医療用材料として大きな発展が期待される。

われわれは、種々のタイプの親水性の合成ポリペプチドの単独あるいは共重合体を合成し、主に軟組織修復材などへの応用の可能性について実験的考察を進めてきた³⁻⁸⁾。

他方、多くの天然タンパク質は、同一分子内にアニオン性およびカチオン性のアミノ酸残基を含有しており、一種の両性高分子電解質とみなすことができる。そこで同一分子鎖内に適当量の正および負電荷を側鎖にもつような親水性の荷電型ポリペプチドを合成し、その生分解挙動を調べることは興味深いものがある。本研究では、負電荷をもつ L-グルタミン酸残基と正電荷をもつ L-リシン残基を、それぞれ適量含有する N-ヒドロキシエチル-L-グルタミンとの三元ランダム共重合体を調製し、分子鎖コンホメーション、側鎖末端部分での電荷が、プロテアーゼ酵素による生分解性にどのような効果を及ぼすかについて実験的な評価を行なった。さらに、対応する二元ランダム共重合体および単独重合体を合成して比較評価を行った。

* 佛教大学社会学部公共政策学科
京都市北区紫野北花ノ坊町 96 〒603-8301

** 鈴鹿高等工業専門学校生物応用化学科
三重県鈴鹿市白子 〒510-0294

*** 大阪府立大学理学部生物科学科
堺市中区学園町 1-2 〒599-8570

**** 大阪府立大学名誉教授
京都市北区西賀茂南川上町 25 〒603-8814
(原稿受付日：平成 19 年 11 月 12 日)

2. 実験方法

2.1 試料の合成

母試料となるコポリ (L-グルタミン酸- γ -ベンジル/ ϵ -N-カルボベンジロキシ-L-リシン/L-グルタミン酸- γ -メチル) [BKM], コポリ (L-グルタミン酸- γ -ベンジル/L-グルタミン酸- γ -メチル) [BM], コポリ (ϵ -N-カルボベンジロキシ-L-リシン/L-グルタミン酸- γ -メチル) [KM], およびポリ (L-グルタミン酸- γ -メチル) [M] はそれぞれトリホスゲンを用いた NCA 法により合成した⁹⁾。共重合体では, 分子鎖中の共成分配列分布の不均一性をできるだけ抑えるために, 重合収率を 50%以下に抑制した。反応進行は生成する二酸化炭素の容積測定から求めた¹⁰⁾。分子鎖中の共成分配列分布を推定するためのモノマー反応性比について, 本研究の三元系共重合体については実験的な評価が困難であるが, 対応する二元系共重合体についてはすでにモノマー反応性比が実験的に評価され, BM 系¹¹⁾では, $r_B = 1.40/r_M = 0.70$, KM 系¹²⁾では, $r_K = 0.5/r_M = 2.0$ と報告されている。これらの値から, 本実験の三元系でも比較的ランダム性の高い共重合体が得られていると推定することができる。

親水性荷電型アミノ酸共重合体の合成は Fig. 1 に示されるような二段階反応により行った。L-グルタミン酸の

Fig. 1 Schematic diagrams of the preparation of water-soluble copolypeptides

メチルエステル基は無水 HBr 処理では脱エステルされないことに着目し¹³⁾, 先ず, それぞれのコポリマー母試料をジオキサン/塩化メチレン混合溶媒に溶解させ, 無水 HBr を作用させることにより, L-グルタミン酸- γ -ベンジルおよび ϵ -N-カルボベンジロキシ-L-リシン残基の側鎖脱保護基反応を行なわせ, それぞれ L-グルタミン酸および L-リシンとした後, 再度共重合体を析出させ, 洗浄, 乾燥を行った。次いで第二段階として, L-グルタミン酸- γ -メチル残基へのアミノアルコール置換反応を行った。本研究では, 2-アミノ-1-エタノール (E) を用いた。その結果, いずれも水溶性ポリマーが得られた。一般に両性電解質ポリマーにおいては, 電荷密度が高いと分子間および分子内ポリイオンコンプレックスを形成して水不溶性となるが, 本研究で得られた系では, 比較的電荷密度が低いため CD 測定が困難となるような濁りは見られなかった。

2.2 測定

2.2.1 固有粘度と分子量測定

母試料の固有粘度 $[\eta]$ の測定はウベローデ粘度計を用い, ランダムコイル溶媒であるジクロロ酢酸 (DCA) 中で 25°C で行った。測定結果を Table 1 にまとめた。水溶性試料の固有粘度は, ウベローデ粘度計により, pH 7.4, 37°C の条件下で PECF¹⁴⁾ 中で測定した。PECF (pseudo-extracellular fluid) は, 細胞外液と同等の電解質を含む人工模擬体液のことであり, 各イオン濃度は, Na^+ (145meq/L), K^+ (5meq/L), Cl^- (118meq/L), HCO_3^- (30meq/L), および HPO_4^{2-} (2meq/L) である。分子量の算出には, ポリ (N-ヒドロキシエチル-L-グルタミン) [M (E)] について既に報告された粘度式を用いた¹⁵⁾。それぞれの水溶性試料の固有粘度の値および分子量の算出結果を Table 2 にまとめた。

Table 1 Copolymerization data of starting copolypeptides

Sample Code	(mol%)			$[\eta]$ (dl/g) (DCA, 25°C)
	B	K	M	
M-1	0.0	0.0	100.0	1.33
BM-1	12.0	0.0	88.0	1.55
KM-1	0.0	12.5	87.5	1.67
BKM-1	6.5	6.5	87.0	0.98

Table 2 Preparative data of water-soluble copolypeptides

Sample Code	Starting Polymer	$[\eta]$ (dl/g) (PECF, 37°C)	Mw
M (E)-10	M-1	0.36	82,200
BM (E)-10	BM-1	0.38	86,600
KM (E)-10	KM-1	0.40	96,200
BKM (E)-10	BKM-1	0.32	72,800

各試料の分子量分布を求めるため GPC 測定を行った。ここでは、東洋ソーダ製高速液体クロマト HLC-803D 装置を使用した。

2.2.2 酵素分解の動力学的検討

ブロメラインによる酵素分解の動力学的検討は、PECF 中で、改良型ウベローデ粘度計を用いて行った。ブロメライン酵素試料は天野製薬(株)から恵贈されたものをそのまま使用した。すなわち、酵素分解の初期分解速度 V は、本実験系では便宜上、高分子鎖の分子量が初期の半分になるのに要する時間の逆数で定義した。実験操作は所定濃度の高分子 PECF 溶液 10ml を粘度計に入れ、溶液の比粘度 (η_r) を測定する。次いで、所定濃度のブロメライン PECF 溶液 0.2ml を加え、緩やかにかきまぜながら、一定時間毎に比粘度を測定する。測定した個々の比粘度から還元粘度 ($\eta_{sp} = \eta_r - 1$) を求め、Huggins 式 ($\eta_{sp}/C = [\eta] + k'[\eta]^2C$) を用いて固有粘度を算出した。ここで、Huggins 定数 k' は測定の濃度範囲内では一定とし、0.4 を使用した。

3. 結果および考察

3.1 固有粘度と分子量との相関 (粘度式)

本研究に用いるための固有粘度と分子量との相関 (粘度式) は、次式を用いて近似的に算出した¹⁵⁾。

$$[\eta] = 2.29 \times 10^{-4} M_w^{0.65} \quad (\text{PECF, pH} = 7.4, 37.0^\circ\text{C})$$

すなわち、共重合体試料に関しては、全く同じ共重合組成、共成分配列分布、および分子量分布を持ち、分子量だけが異なるような試料を合成することは実質上不可能であるため、本研究においては、全ての試料について、上式で与えられる固有粘度と分子量との相関直線を近似的に取扱うことにより、分子量算出を行った。

3.2 酵素分解の型

本研究の水溶性ポリペプチドがブロメライン酵素によって加水分解される場合、それが主鎖のランダムな分解 (エンドペプチダーゼ型) で進行していくのかどうかを実験的に検討するため、部分分解生成物の GPC 分析を試みた。Fig. 2 は、BKM (E)-1 試料について、未反応時および所定時間、酵素加水分解した後の試料についての GPC 曲線を求めた結果を示す。酵素によって主鎖がランダムに切断されて分解が進行していくことが示唆された。その他の全ての試料について同様の傾向が示された。

3.3 酵素分解速度

Fig. 3 は、それぞれの試料の酵素分解で得られる分子量の逆数 ($1/M$) と反応時間との相関プロットを実測した例を示す。ここで、固有粘度の値から分子量に換算するためには分解の進行に伴って分子量分布が基本的に変化しない

Fig. 2 GPC elution curves for reaction products of BKM (E)-10 in PECF solution by bromelain for; (1) original, (2) 40 min, and (3) 120 min of bromelain digestion. $[E] = 5.0 \times 10^{-5}$ mol/L.

Fig. 3 Typical plots of $1/M$ for samples vs. bromelain digestion time at pH 7.4 and 37.0°C in PECF for; (1) (○) M (E)-10, (2) (◆) BM (E)-10, (3) (▲) KM (E)-10, and (4) (●) BKM (E)-10. $[E] = 2.5 \times 10^{-5}$ mol/L.

という条件が必要となるが、実際には母試料の側鎖脱保護基化反応に際して分子量分布が増大するという報告もあり、本研究の水溶性ポリペプチドも、ランダムまたはガウス分布で近似されるような分子量分布を示すと考えられる。初期段階においてランダム分布をもつ高分子鎖が、主鎖のランダム切断によって分解が進行していく場合には、 $1/M$ と分解時間との相関が直線で表されることになる¹⁶⁾。一方、ランダム分布をもつ高分子鎖がランダム分解された場合には、主鎖の 1 カ所が切断されると、その平均の分子量は初

期の半分になると考えられる。Fig. 3 において、 $1/M$ と酵素反応時間との相関性が初期段階では直線関係となっていることから主鎖がランダム分解を受けていることが示唆された。しかしながら、酵素分解反応がさらに進行するにつれて次第に直線性からはずれ、見掛けの分解速度が低下している。これは、酵素活性が経時的に次第に低下していくためであると推定される。

3.4 酵素分解の型

一般に酵素による分解の型は Michaelis-Menten 型であらわされることが報告されている。すなわち、基質の加水分解速度は酵素濃度 $[E]$ と 1 次の相関をもつことが期待される。そこで、種々の異なる酵素濃度において高分子基質の分子量がもとの半分になるまでの反応時間の逆数で定義される分解速度 V を求めた。Fig. 4 は一連の水溶性ポリペプチドについての分解速度の酵素濃度 $[E]$ 依存性を実測した結果を示す。明らかに、それぞれの場合について V と $[E]$ との間には 1 次の相関が得られ、エンドペプチダーゼ型の分解型を示している。負荷電型ポリペプチドの分解速度 V は同一分解条件下における非荷電型および両性荷電型ポリマーに比較して小さくなることが示された。これは、酵素分子の反応活性部位に存在するカルボキシル基 ($-\text{COOH}$) などの負荷電位残基と基質分子のもつカル

Fig. 4 Dependence of the reaction rate V (mol/L.min) on bromelain concentration $[E]$ (mol/L) at pH 7.4 and 37.0°C in PECF for; (1) (○) M(E)-10, (2) (◆) BM(E)-10, (3) (▲) KM(E)-10, and (4) (●) BKM(E)-10. $[E] = 2.5 \times 10^{-5}$ mol/L.

ボキシル基との間の反発作用により、酵素-基質相互作用が弱まることも一つの原因と考えられる。

次に、酵素による基質の分解速度 V は、基質濃度 $[S_0]$ の関数で表されることが知られている。Fig. 5 は、分解速度 V の高分子基質濃度 $[S_0]$ 依存性について、酵素濃度一定における各共重合体の測定結果を示す。また、Fig. 5 で得られた実測値から、 V と C_s との関係を適当な方法でプロットし直すことにより、Michaelis-Menten 型におけるミカエリス定数 (V_m と K_m) を評価することができる。Fig. 6 は、Fig. 5 で得られた実験結果について Lineweaver-Burk プロットした結果を示す。Fig. 6 において、 $1/V$

Fig. 5 Plots of the reaction rate V (mol/L.min) vs. the concentration of samples for; (1) (○) M(E)-10, (2) (◆) BM(E)-10, (3) (▲) KM(E)-10, and (4) (●) BKM(E)-10. $[E] = 2.5 \times 10^{-5}$ mol/L.

Fig. 6 Lineweaver-Burk plots with the data obtained in Fig. 5 for; (1) (○) M(E)-10, (2) (◆) BM(E)-10, (3) (▲) KM(E)-10, and (4) (●) BKM(E)-10. $[E] = 2.5 \times 10^{-5}$ mol/L.

Table 3 Michelis parameters for samples at pH 7.4 and 37.0°C in PECF

Sample Code	[E] (mol/L)	K_m (mol/L)	V_m (mol/L · min)
M (E)-10	2.5×10^{-5}	6.9×10^{-2}	1.7×10^{-2}
BM (E)-10	2.5×10^{-5}	9.8×10^{-2}	0.5×10^{-2}
KM (E)-10	2.5×10^{-5}	4.2×10^{-2}	2.0×10^{-2}
BKM (E)-10	2.5×10^{-5}	5.5×10^{-2}	1.1×10^{-2}

と $1/[S_0]$ との相関プロットが直線で表され本実験系の分解過程が Michaelis-Menten 型に従うことが示唆される。ここで、高分子基質濃度は、高分子鎖の数に対応するものであり、高分子のモル濃度ではなく、高分子中におけるモノマー繰り返し単位の数であることを注意すべきであり、ミカエリス定数は、高分子中のモノマー残基に対して算出されるものである。Table 3 には、一連の試料について同様の方法で算出されたミカエリス定数をまとめた。但し、本実験系の V は、高分子の分子量が初期の半分になるのに要する時間の逆数で定義したものであり、真の分解速度とは異なるため、ミカエリス定数の絶対値は真の値とは考えられない。従って、Table 3 の値は見かけのミカエリス定数として、相対的を大小関係を議論する場合に有効とされる。Table 3 から明らかなように、負荷電型ポリマーは、他の場合に比べて K_m が大きく V_m が小さくなっており、酵素分解を受けにくいことを示している。

4. 結 論

それぞれの荷電型コポリペプチドおよびそれぞれの単体重合体は、いずれもブロメラインにより主鎖のランダムな加水分解を受けることが明らかとなった。酵素分解の速度論的考察を加えるために、試料ポリマーの主鎖切断を、溶液粘度測定から、すでに報告された粘度式を適用して、分

子量低下の時間依存性を求めた。その結果、試料ポリペプチドの酵素分解挙動は Michaelis-Menten 型に従うことが明らかとなった。また、側鎖の荷電状態が酵素分解速度に大きな影響を及ぼすことが示され、負荷電型ポリペプチドは非荷電型および正荷電型ポリペプチドに比べて、酵素分解を受けにくいことが明らかとなった。

謝辞

本研究の遂行にあたり、アミノ酸モノマーを頂いた味の素(株)中央研究所に謹んで謝意を表します。

引 用 文 献

- 1) 森村正博, 日本接着学会誌, 42(11), 481 (2006)
- 2) Y. Tabata and Y. Ikada, Biomaterials, 20(22), 2169 (1999)
- 3) T. Hayashi, M. Iwatsuki, and M. Oya, J. Appl. Polym. Sci., 39, 1803 (1990)
- 4) T. Hayashi, Y. Iizuka, H. Oya, and W. Iwatsuki, Polymer J., 25, 481 (1993)
- 5) T. Hayashi, Prog. Polym. Sci., 19, 663 (1994)
- 6) Y. Miyachi, K. Jokei, M. Oka, and T. Hayashi, Eur. Polym. J., 35(3), 395 (1999)
- 7) K. Jokei, M. Oka, T. Hayashi, and Y. Miyachi, Eur. Polym. J., 35(5), 945 (1999)
- 8) T. Hayashi, N. Furuta, W. Oka, and T. Hayashi, Eur. Polym. J., 37(12), 2483 (2001)
- 9) S. Yodoya, T. Takagi, W. Kurotani, T. Hayashi, N. Nagata, M. Oka, and T. Hayashi, Eur. Polym. J., 39(10), 2059 (2003)
- 10) A. Patchomik and Y. Shalitin, Bull. Res. Council. Isr. Sect. A. Chem., 5, 300 (1956)
- 11) T. Hayashi, K. Itoh, and A. Nakajima, Polymer J., 1, 524 (1970)
- 12) T. Hayashi and A. Nakajima, Polymer, 14, 535 (1973)
- 13) T. Hayashi, E. Nakanishi, and A. Nakajima, Kobunshi-Ronbunshu, 43, 633 (1986)
- 14) C. A. Homsey, J. Biomed. Mater. Res., 4, 341 (1970)
- 15) T. Hayashi, Y. Tabata, and A. Nakajima, Polym. J., 17, 463 (1985)
- 16) W. G. Miller, J. Amer. Chem. Soc., 83, 259 (1961)

<Original Paper>

Synthesis of Charged Copolypeptides and Enzymatic Hydrolysis in vitro

Takanori HAYASHI*, Shinya YODOYA**, Masakazu FURUTA*** and Toshio HAYASHI****

*Department of Public Policy, School of Sociology, Bukkyo University
96 Kitahananobo-cho, Murasakino, Kita-ku, Kyoto 603-8301, JAPAN**Department of Chemistry and Biochemistry, Suzuka National College of Technology
Shirako, Suzuka, Mie 510-0294, JAPAN***Department of Biological Science, Osaka Prefecture University
1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai-shi, Osaka 599-8570, JAPAN****Emeritus Professor of Osaka Prefecture University,
25 Nishigamo Minamikawakami-cho, Kita-ku, Kyoto 606-8814, JAPAN

(Accepted for publication : January 24, 2008)

Abstract

Multi-component random copolypeptides consisting of N-hydroxyethyl-L-glutamine, L-glutamic acid, and L-lysine, related two component random copolymers and homopolymers, were synthesized by N-carboxyamino acid anhydride (NCA) method following deblocking of the benzyl as well as benzyloxy units of side chains by anhydrous HBr, and then aminolysis reaction with 2-amino-1-ethanol (E) of methyl unit. All the water soluble copolypeptides were found extensively degraded by random chain fracture with bromelain. Degradation data for these samples followed the Michaelis-Menten rate law, being of the first order to the enzyme concentration. It was found that the rate of enzymatic hydration for negative charged polypeptides was smaller than those for non-charged and amphoteric polypeptides.

Key words : multi-component random copolypeptide, N-hydroxyethyl-L-glutamine, L-glutamic acid, L-lysine, bromelain, the Michaelis-Menten reaction kinetics

(Received : November 12, 2007)