〔総 合 論 文〕

自己集合性ペプチドナノファイバーを用いたナノバイオ材料の創製

堤 浩^{*1}・澤田 敏樹^{*2}・三原 久和^{*1}

(受付 2016 年 12 月 20 日・審査終了 2017 年 1 月 17 日)

(早期公開 2017 年 3 月 16 日・DOI:10.1295/koron.2016-0065)

要 旨 自己集合性ペプチドは自在な設計が可能であり、高い生体適合性を備えることから、ナノ材料やバイオ材料の創製において魅力的な素材である。筆者らは、水中でファイバーをはじめとしたナノ構造に自己集合するペプチドを設計・合成し、ナノバイオ材料へと展開してきた。これまでに、自己集合性ペプチドの化学修飾やペプチドナノファイバー上へ特異的に結合するアンカー分子によるナノファイバーの機能化に成功し、ファイバー上へタンパク質などの機能分子を集積したナノ材料や、ペプチドナノファイバーから成るヒドロゲルを用いた細胞培養のためのバイオ材料の創製に成功している。独自の分子設計に基づいて自己集合性ペプチドのナノ構造を構築する手法と化学修飾・分子認識を利用したナノ構造の機能化法を組合せたアプローチによる成果は、高機能性のナノバイオ材料の創製に有用である。

1 はじめに

自己集合化はさまざまな相互作用を介して分子が自発的に規則正しく集合化して特定の構造体を形成する現象の一つである。とくに、低分子(モノマー)が非共有結合により組織化した集合体が高分子のような特性を示す場合は超分子ポリマーと呼ばれ、ナノ～マイクロメートルサイズのファイバー・膜・球体などのさまざまな構造体を構築できることから、ボトムアップ的アプローチによるナノ構造体・材料の創製において注目を集めている^{1),2)}。近年では、ペプチド^{3)~9)}、糖^{10)~13)}、核酸^{14)~16)}などの水に親和性のある生体分子をベースにして、静電相互作用、疎水性相互作用、水素結合形成、ファンデルワールス力などの弱い相互作用を複数組合せることにより、水中でさまざまな超分子構造体を形成する自己集合性材料の開発が精力的に行なわれている。とくに、ペプチドは α -ヘリックスや β -シートといった特徴的な二次構造形成に基づいて分子を設計することができ、ファイバー(後述)、リング^{17),18)}、チューブ^{19)~21)}、ベシクル^{22)~25)}などのナノ構造体を構築することができ、自己集合性材料のための分子素子として広く用いられている。

自己集合性ペプチドが作る構造体の中で、ファイバー状の構造体はナノ材料としてさまざまな応用が検討されている。一例として、カーボンナノチューブを水中で安定かつ機能を保ったまま分散・可溶化する²⁶⁾、光捕集色素と金属ナノ粒子をナノファイバー上に配置して光駆動型の酸化・還元システムを構築する²⁷⁾、シリカナノチューブやハイドロキシアパタイト、金属酸化物結晶などを効率的に合成するための鋳型となる²⁸⁾、水中で金属ナノ粒子を調製・集積化して環境調和型触媒を構築するための足場となる²⁹⁾、などが挙げられる。

水中において、ファイバー状の構造体は複雑にからみ合うことで水分子を安定に保持したヒドロゲルを形成することができる。生体内では、細胞接着の足場や成長因子などを保持・提供する空間として、コラーゲンやヒアルロン酸などの生体高分子が複雑に組織化して構築される細胞外マトリックス(extracellular matrix: ECM)と呼ばれるヒドロゲル環境が重要な役割を担っている。近年、細胞工学・組織工学の進展に伴い、生体内に近い環境を人工的に再現したヒドロゲル材料、すなわち人工のECM材料の開発が行われている³⁰⁾。生体適合性が高く、生理活性配列との複合化による機能化が可能な自己集合性ペプチドは、細胞工学や再生医療のためのバイオ材料の有力な候補として期待されている。

筆者らはこれまでにさまざまな自己集合性ペプチドを設計し、ナノ材料およびバイオ材料としての応用展開を行ってきた。本報では、おもに自己集合性ペプチドを用

^{*1} 東京工業大学生命理工学院 (〒226-8501 横浜市緑区長津田町 4259)

^{*2} 東京工業大学物質理工学院 (〒152-8550 東京都目黒区大岡山 2-12-1)

いたナノファイバーの構築とナノファイバー上へのタンパク質集積化法および人工ECMの創製に関する取り組みを紹介する。

2 自己集合性ペプチドの設計原理とナノファイバー構造

自己集合性ペプチドの基本的な設計原理は、親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸から構成される両親媒性構造を有し、 α -ヘリックスや β -シートといった二次構造をとることである。 α -ヘリックス構造の自己集合性ペプチドの場合、コイルドコイルと呼ばれる α -ヘリックスペプチドの二量体構造を基に設計が行われる (Figure 1a)。コイルドコイルを形成するペプチドの基本配列は $\bullet\circ\circ\bullet\circ\circ\circ$ ($\circ$ は親水性アミノ酸, $\bullet$ は疎水性アミノ酸)の7残基の繰返しから構成される。 α -ヘリックス構造をとる場合、疎水性アミノ酸と親水性アミノ酸が分離して並び、疎水面を向けあうようにして二量体(コイルドコイル)を形成する。この二量体構造は疎水面の近傍にある電荷性の親水性アミノ酸の静電的相互作用により安定化されている。コイルドコイル構造を形成する二組の α -ヘリックスペプチドAとA', BとB'をそれぞれつなぎ合わせたA-BとB'-A'というペプチドは、AとA'がコイルドコイル構造を形成して二量体となり、逆方向の末端に突出したBとB'が軸代となって二量体を重合するように連結することで細いファイバー状の集合体へと組織化する³¹⁾。一方、 β -シート構造の自己集合性ペプチドの場合、親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸が交互に

並んだ繰返し配列 $\circ\bullet\circ\bullet\circ\bullet\circ\bullet$ からなる両親媒性構造をもつように設計される (Figure 1b)。 β -ストランド構造は親水面と疎水面を有しており、水中では疎水性相互作用により疎水面どうしを向け合せて集合化する。この集合体は親水面側の電荷性アミノ酸間の静電相互作用やペプチド主鎖間の水素結合の形成により安定化され β -シート構造となり、ファイバー状の集合化構造体が形成される³²⁾。

筆者らのグループでは、二次構造に基づいてさまざまな両親媒性構造をもつペプチドを設計しており、これまでに水中で α -ヘリックス構造から β -シート構造へと自発的に構造転移し、アミロイド様のファイバー状集合体を与える種々の自己集合性ペプチドを報告してきた^{33)~37)}。また、プロリンをN末端およびC末端に配置したペプチドFI (H-PKFKIIEFEP-OH)が特徴的なモルフォロジーをもつナノファイバー構造へと自己集合することを見いだしている (Figure 2)³⁸⁾。末端のプロリン残基が水素結合ネットワークの形成を制御し、また中央で親水面と疎水面が反転するという独自のデザインにより、FIペプチドはリボン状のナノ構造へと集合化し、このリボンが螺旋を巻いて整列化することによりクリアなエッジをもつ幅80-130 nmのファイバー構造を形成することがわかっている。このような精緻な高次構造を有するナノファイバーを利用することで、タンパク質や核酸などのさまざまな機能性分子を集積化し、高機能性のナノ材料の創発が可能になると期待されている。次章では、このFIナノファイバー上へのタンパク質集積化法

Figure 1. Schematic illustration of (a) self-assembling peptides with α -helical structure and (b) β -sheet structure.

について紹介する。

3 自己集合性ペプチドFIを基盤としたナノ材料の創製

自己集合性ペプチドが形成する構造体をナノ材料として利用するためには、さまざまな機能性基により構造体を機能化することが必須である。明確な構造をもつFIナノファイバーを機能化してナノ材料として利用することを目指し、ナノファイバーへの機能性基の導入による修飾を検討した。ナノファイバーの構成要素であるFIペプチドの末端にリンカーを介してビオチン基を導入したペプチドを新たに合成し、前章と同様に自己集合させた。オリジナルのFIナノファイバー構造は、ビオチン基の導入により外径50–70 nm、内径20–35 nmのナノチューブ構造へと変化するものの、機能性基を導入したFIペプチドを用いても確かに自己集合によりナノ構

Figure 2. (a) Illustration of a designed β -strand and an assembled β -sheet structure of β -strands. Black balls (X1 and X2) represent hydrophobic residues and white balls represent hydrophilic residues. (b) TEM image of self-assembled nanofiber of FI peptide. Scale bar is 100 nm. (c) AFM image of self-assembled nanofiber of FI peptide. Scale bar is 100 nm. (reproduced in part from ref 38).

造体が形成されることがわかった (Figure 3a). ナノチューブ表面を機能化するため、金ナノ粒子がコンジュゲートした抗ビオチン抗体によるナノチューブの修飾を検討した (Figure 3b). 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察の結果、ナノチューブ表面に金ナノ粒子が観察され (Figure 3c), また抗体濃度依存的に修飾される金ナノ粒子の数も増大した。すなわち、ビオチンのような比較的疎水的な機能性分子を自己集合するペプチドに導入しても、自己集合化の過程で内部に包埋されることなく、ナノ構造体表面に提示されることがわかった。それにより、表面に提示された機能性基に対応するタンパク質を用いることで、ナノチューブ表面上に望みのタンパク質を修飾・集積化できることが明らかとなった³⁹⁾。

次に、FIペプチドが形成するナノファイバー構造を維持したまま機能化することを目指し、ナノファイバーに結合する分子を介した非共有結合的な修飾を目指した。筆者らはナノファイバーへの結合部位と機能性基を併せもつアンカー分子によるナノファイバーの修飾を検討した (Figure 4a)⁴⁰⁾。さまざまな機能性基をもつアンカー分子を用いることにより、ナノファイバー上へ自在にタンパク質を集積化できるものと期待できる。機能性基には同様にビオチン基を用い、ナノファイバーへの結合部位には疎水的なアルキルを用いるアンカー分子を新たに設計した。合成したアンカー分子存在下でFIペプチドを自己集合させた結果、FIペプチド単独と同様のモルフォロジーをもつナノファイバーが形成された。金ナノ粒子がコンジュゲートした抗ビオチン抗体を用いてナノファイバーの修飾を検討した結果、金ナノ粒子がナノファイバー上に観察され設計したアンカー分子によりナノファイバーを非共有結合的に修飾できることがわかった (Figure 4b)。次いで、より特異的にナノファイバーに結合するアンカー分子の構築を目指し、FIペプチドの疎水性アミノ酸であるフェニルアラニン (Phe) ならびにイソロイシン (Ile) をアンカー分子の結合部位として利用することを検討した。すなわち、PheもしくはIle

Figure 3. (a) TEM image of biotinylated FI nanotube. (b) Illustration of surface modification on biotinylated FI nanotube. (c) TEM image of gold nanoparticle-conjugated antibodies assembled on FI nanotubes. Scale bar is 100 nm. (reproduced in part from ref 39 and 40).

Figure 4. (a) Illustration of surface modification on FI nanofiber using designed anchor molecules. (b) TEM images of gold nanoparticles-conjugated antibodies assembled on FI nanofibers using alkyl anchors (left) and dipeptide anchors (right). Scale bar is 100 nm. (reproduced in part from ref 40).

からなるジペプチド (Phe-Phe ならびに Ile-Ile) を結合部位として用い、機能性基には金属イオンと錯体を形成するイミノジ酢酸 (Ida) を用いたアンカー分子を新たに設計・合成した。新たなアンカー分子存在下で FI ペプチドを自己集合させた後にニッケルイオンを Ida に配位させ、ビオチン基がコンジュゲートした His タグペプチドと相互作用させた。さらに金ナノ粒子がコンジュゲートした抗ビオチン抗体を用いてナノファイバーを修飾した。その結果、いずれのアンカー分子を用いた場合にもナノファイバー表面には金ナノ粒子が観察され、狙い通りナノファイバー表面を修飾できることがわかった (Figure 4b)。とくに Ile-Ile を結合部位として用いた場合には FI ナノファイバー表面の微細構造に沿うように金ナノ粒子が観察され、FI ナノファイバー上の特定部位にタンパク質を配置できることを見いだした。このことは見方を変えると、FI ナノファイバー表面には特徴的な微細構造に由来する疎水性部位が存在していると推察される。

前述のとおり、アンカー分子を用いた修飾法は FI ナノファイバー上でのタンパク質のレイアウトに有効な手法である。そこで、FI ナノファイバー表面の自在な機能化を目指し、FI ナノファイバーに特異的に結合するアンカー分子を新たに獲得するための研究を展開することとした。望みの標的に結合する分子を獲得する手法として、ランダムな分子ライブラリーからのスクリーニング手法が広く知られている。中でもファージディスプレイ法により構築されたペプチドライブラリーを適切に利用することで、人工材料に特異的に結合するペプチドアンカー分子を獲得することが可能である。筆者らはこの手法を FI ナノファイバーに適用し、FI ナノファイバー表面の微細構造に特異的に結合するペプチドアンカー分子の探索と機能化を検討した⁴¹⁾。ガラス上に固定化した FI ナノファイバーを標的とし、ランダムな 7 残基が提示

Figure 5. (a) Illustration of surface modification on FI nanofiber using specific anchor peptide screened by phage display method. (b) TEM images of ordered gold nanoparticles-conjugated antibodies assembled on FI nanofibers using anchor peptide. Scale bar is 100 nm. (reproduced in part from ref 41).

されたファージ提示ペプチドライブラリーを用いてスクリーニングした。スクリーニングの結果、8 種のペプチド配列が同定され、ナノファイバーに対する結合をそれぞれ解析した結果、最も出現頻度の高かったペプチド (TGVKGP) が FI ナノファイバーに最も強く結合することがわかった。興味深いことに、疎水性アミノ酸の種類や配置の異なるナノファイバーと比較しても FI ナノファイバーに特異的に結合し、ファージディスプレイ法を利用したスクリーニングにより、FI ナノファイバーのみ特異的に結合するアンカーペプチドを獲得することがわかった。さらに同じ FI ペプチドであっても、十分に繊維成長したナノファイバーに対する結合定数 ($3.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) と比較すると、インキュベーション前のモノマー状態やインキュベーション過程の短いファイバー状態に対する結合定数はそれぞれ結合が弱く、繊維構造の FI ペプチドに特異的に結合することも見いだした。多角的に構造解析を行った結果、アンカーペプチドは溶液中ではランダムコイル構造であるのに対し、FI ナノファイバーと結合する際には β -シート構造に転移し、平行 β -シート構造を形成しながらナノファイバーと結合することにより特異性を獲得していることがわかった (Figure 5a)。これらの結果は、獲得したアンカーペプチドは自己集合性ペプチドが形成するナノ構造体固有の構造を厳密に識別していることを示しており、望みのナノ構造体に特異的に結合する分子を得ることができると可能性も示した。

このアンカーペプチドによりナノファイバー表面を修飾することを目指し、ペプチドの C 末端にビオチンを導入したビオチン化アンカーペプチドを用い、FI ナノファイバーと相互作用させ、金ナノ粒子がコンジュゲートした抗ビオチン抗体で修飾した。TEM 観察の結果、金ナノ粒子がナノファイバーのエッジに 10 nm 程度の間隔で規則正しく配列する様子が観察され

(Figure 5b), アンカーペプチドにより部位特異的な高密度修飾が達成できることがわかった。このことは、獲得したアンカーペプチドがナノファイバーのエッジに存在する特徴的な微細構造を厳密に認識していることを示しており、多様なアンカーペプチドを獲得することにより自己集合により構築される構造体を自在に修飾できる可能性を示している。また、筆者らが見いだしたFIナノファイバー結合性アンカーペプチドTGVKGPGを生分解性ポリエステルの一つであるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)を合成する酵素PhaCに融合することにより、PhaCをFIナノファイバー上に集積させ、ナノファイバー上で酵素反応を進行させてPHAでコーティングされたナノファイバーを調製可能であることが他グループにより報告されている⁴²⁾。

4 自己集合性ペプチドY9の創製とバイオ材料応用

筆者らのグループでは、FIペプチド以外にもさまざまな両親媒性 β -ストランドペプチドを設計・合成している。その中から優れた自己集合能を有するペプチドのスクリーニングを行い、自己集合性ペプチドY9 (Ac-YEYKYEYKY-NH₂)を見いだした。Y9ペプチドは疎水性残基のチロシンと親水性残基のグルタミン酸およびリジンが交互に配置された構造をもち、 β -ストランド間でのチロシンの疎水性相互作用およびグルタミン酸とリジンの静電相互作用により逆平行の β -シート構造を形成すると考えられる(Figure 6)。実際、赤外吸収(IR)スペクトル測定において β -シート構造に帰属される1620–1625 cm⁻¹および逆平行 β -シート構造に帰属される1692 cm⁻¹付近にピークが観測され、Y9ペプチドは設計通り逆平行の β -シート構造を形成していることがわ

かった。また、TEMによる観察の結果、Y9ペプチドは幅が10–20 nm程度の均一なネットワーク構造をもつナノファイバーを形成することが明らかとなった(Figure 6)⁴³⁾。さらに、Y9ペプチドのN末端にビオチンを導入したペプチドbY9CもY9ペプチドと同様のナノファイバーへと自己集合することから、Y9ナノファイバー上への機能分子の導入が可能であることが示された⁴⁴⁾。

次に、前章で紹介したファージディスプレイの手法を用い、Y9ナノファイバーに結合するアンカーペプチドのスクリーニングを行った。その結果、Y9ナノファイバーに高選択的に結合するペプチドTYLPWPAを獲得することができた。TYLPWPAペプチドのY9ナノファイバーおよびビオチン結合したbY9Cナノファイバーに対する結合定数はそれぞれ $2.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、 $7.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ であり、Y9ナノファイバーに対する選択性は340倍である。同様にbY9Cナノファイバーに対するスクリーニングで得られたペプチドYQTHPQRは、Y9ナノファイバーおよびbY9Cナノファイバーに対してそれぞれ $7.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 、 $4.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ の結合定数を示し、bY9Cナノファイバーに対する選択性は52倍であった。これらの結果から、ファージディスプレイ法を用いて、FIペプチドだけでなくY9ペプチドやその誘導体から構築されるナノファイバーの微細構造を見分けて高選択的に結合するアンカーペプチドを獲得できることが示された。また、獲得したアンカーペプチドを介してY9ナノファイバーおよびbY9Cナノファイバー上に金ナノ粒子を配置することにも成功している。蛍光色素TAMRAで標識したアンカーペプチドTYLPWPAをY9ナノファイバーに相互作用させ、抗TAMRA抗体を介して金ナノ粒子がコンジュゲートした抗IgG抗体をナノファイバー上

Figure 6. (a) Sequence and chemical structure of Y9 peptide. (b) Schematic illustration on self-assembly of Y9 peptide and nanofibrous structure observed by transmission electron microscopy.

Figure 7. (a) Illustration of surface modification on Y9 nanofiber using TAMRA-conjugated anchor peptide. (b) TEM image of gold nanoparticles assembled on Y9 nanofibers. Scale bar is 100 nm.

Figure 8. (a) Illustration of cell adhesion on Y9 nanofibers modified with RGDS-conjugated anchor peptides. (b) and (c) Bright field microscope images of HeLa cells adhered on substrates coated with Y9 nanofibers in the absence and presence of RGDS-conjugated anchor peptide, respectively. (d) Cell adhesion analysis using RGDS-conjugated anchor peptides on Y9 nanofibers. White bar, light gray bar, gray bar, dark gray bar and black bar represent RGDS peptide (500 μ M), TYLPWPA peptide (500 μ M), TYLPWPA-RGDS peptide (1 μ M), TYLPWPA-RGDS peptide (25 μ M) and TYLPWPA-RGDS peptide (500 μ M). Higher absorbance represents higher amount of adhered cells. (reproduced in part from ref 44).

に集積させることにも成功した (Figure 7)⁴⁴⁾.

自己集合性ペプチドナノファイバーに結合するアンカーペプチドの応用として、筆者らは細胞培養のための足場材料の機能化について検討を行った。Y9 ナノファイバーに対するアンカーペプチド TYLPWPA に細胞接着を促進する生理活性ペプチド RGDS を導入した TYLPWPA-RGDS ペプチドを用いることにより、Y9 ナノファイバー上へ TYLPWPA ペプチドを介して RGDS ペプチドを提示し、Y9 ナノファイバー上への細胞接着の向上を試みた (Figure 8a)。Y9 ナノファイバーで 96 ウェルのマイクロプレートにコーティングし、TYLPWPA-RGDS ペプチドで処理した後、HeLa 細胞を播種して 12

時間培養し顕微鏡観察を行った。TYLPWPA-RGDS ペプチドで処理していない Y9 ナノファイバー上では細胞は丸い状態でほとんど接着していないのに対して、TYLPWPA-RGDS ペプチドで処理した Y9 ナノファイバー上ではほとんどの細胞が接着・伸展している様子が観察された (Figure 8b, 8c)。接着細胞数は TYLPWPA-RGDS ペプチドの濃度依存的に増大し、また bY9C ナノファイバーとの比較から Y9 ナノファイバーに対して選択的であった (Figure 8d)。これらの結果から、ファイバー結合ペプチドをアンカーとして Y9 ナノファイバー上に生理活性分子を提示することができ、Y9 ナノファイバーを細胞培養のためのバイオ材料として機能化できることが明らかとなった⁴⁴⁾。

5 カルシウムイオン応答能を有する自己集合性ペプチド E1Y9 の創製と細胞足場材料への応用

前章で、ネットワーク性のナノファイバー構造体を形成する自己集合性ペプチド Y9 の創製と細胞培養のためのバイオ材料としての応用について述べた。しかしながら、Y9 ペプチド単独では安定なヒドロゲルを形成することが難しい。より高度な機能をもった人工の細胞足場材料には生体環境に近いヒドロゲル材料が望ましいことから、筆者らは Y9 ペプチドをベースとしてヒドロゲルを形成可能な自己集合性ペプチドの創製に取り組んだ。Y9 ナノファイバーのネットワークを強化することによりヒドロゲル形成能を付与することができると考え、Y9 ペプチドの N 末端側に 1~4 つのグルタミン酸残基を導入し (En-Y9 ペプチド)、側鎖のカルボン酸と二価の無機イオンであるカルシウムイオンとの相互作用によるナノファイバーの架橋形成について検討した (Figure 9a)。カルシウムイオン非存在下では、E1Y9, E2Y9, E3Y9, E4Y9 のいずれも β -シート構造を形成し Y9 と同様のネットワーク性ナノファイバーへと自己集合したことから、N 末端へのグルタミン酸残基の導入は母骨格とした Y9 ペプチドの自己集合能に影響を与えないことがわ

Figure 9. (a) Illustration of cross-linking of EnY9 peptide nanofibers via Ca^{2+} ion. (b) TEM images of EnY9 nanofibers in the absence and presence of Ca^{2+} ion. (c) Photograph of Ca^{2+} ion-responsive hydrogelation of E1Y9. Scale bar is 100 nm. (reproduced in part from ref 43).

かった。一方、カルシウムイオン存在下では、Y9は均一なネットワークファイバー構造を保持しカルシウムイオン非存在下と比べてほとんど変化がないのに対し、E1Y9およびE2Y9は直径が30–90 nm程度に増大したテープ状構造、E3Y9およびE4Y9はファイバーおよびテープが局所的に凝集した構造を形成した (Figure 9b)。これらの結果から、導入したグルタミン酸残基とカルシウムイオンが相互作用しファイバー間を架橋していると考えられる。次にカルシウムイオン添加によるゲル化試験を行った結果、E1Y9のみが自立可能な強度をもったヒドロゲルを形成し、E2Y9、E3Y9およびE4Y9は部分的にゲル化するのみであった。TEM観察においてグルタミン酸残基の数が増加するに伴ってファイバー間の架橋が強くなる傾向があることから、ヒドロゲル形成にはカルシウムイオンとの相互作用による適度なファイバー間架橋によるネットワークの強化が重要であり、E1Y9ペプチドがカルシウムイオン応答的にヒドロゲルを形成可能な自己集合性ペプチドとして機能することがわかった⁴³⁾。

次に、E1Y9ペプチドゲル上で3T3-L1細胞の培養について検討を行った。E1Y9ペプチドゲルはRGDSなどの

細胞接着促進ペプチドがなくても良好な細胞接着性を示し、ペプチドゲル上で細胞が増殖していく様子が観察された (Figure 10a)。前章で述べた通り、Y9ナノファイバーでコーティングした培養基材上では細胞の接着は弱かったが、カルシウムイオン添加により調製したE1Y9ペプチドゲル上では細胞の接着が強いことから、ファイバー間の架橋により強化されたナノファイバーネットワーク構造をもつヒドロゲル環境が細胞の接着・増殖に重要であると考えられる。さらに、筆者らはE1Y9ペプチドのカルシウムイオン応答的ヒドロゲル形成能を利用して、紐状ヒドロゲルの成形と細胞足場材料としての機能評価を行った。E1Y9ペプチド溶液を高濃度のカルシウムイオン溶液にマイクロピペットを用いてインジェクトすることにより、500 μm 程度の太さをもった紐状のヒドロゲルを成形することができる (Figure 10b)。成形した紐状ヒドロゲル上でも3T3-L1細胞の接着および培養が可能であった (Figure 10c)。興味深いことに、複数の紐状ヒドロゲル存在下で細胞培養を継続的に行うと、ヒドロゲルどうしが接合し、ヒドロゲルがない空間にも細胞が密に存在している様子が観察された (Figure 10d)。これらの現象は、ヒドロゲル上に接着し

Figure 10. (a) Fluorescence microscope image of 3T3 L1 cells cultured on E1Y9 hydrogel for 3 days. (b) Bright field microscope image of string-shaped E1Y9 hydrogel. (c) Fluorescence microscope image of 3T3 L1 cells cultured on string-shaped E1Y9 hydrogel for 3 days. (d) Fluorescence microscope image of 3T3 L1 cells cultured on string-shaped E1Y9 hydrogel for 7 days. Arrows show proliferated cells between string-shaped E1Y9 hydrogels.

Figure 11. (a) Illustration of self-assembly of E1Y9 peptide functionalized with a bioactive peptide and photographs of disk- and string-shaped hydrogels. (b) and (c) Concentration dependent adhesion of 3T3 L1 cells and differentiation of PC12 cells on substrates coated with E1Y9 functionalized with RGDS peptide and IKVAV peptide, respectively. (d) Fluorescence microscope image of PC12 cells differentiated on disk-shaped E1Y9/E1Y9-IKVAV (75/25 wt%) mixed hydrogel. (e) Fluorescence microscope image of PC12 cells differentiated on string-shaped E1Y9/E1Y9-IKVAV (75/25 wt%) mixed hydrogel. Arrow indicates long axis direction of string-shaped hydrogel. (reproduced in part from ref 45 and 46).

た 3T3-L1 細胞の細胞間接着を介してヒドロゲルどうしの結合が起こり、また細胞由来の細胞外マトリックスの分泌やそれに伴う細胞の移動および細胞間接着によるものと推察される。E1Y9 ペプチドを利用して、紐状だけではなく、さまざまな形をもったヒドロゲルを成形してレイアウトすることにより、高度な細胞組織体の構築が可能になるものと期待される⁴³⁾。

6 生理活性配列の導入による自己集合性ペプチド E1Y9 の機能化と細胞足場材料への応用

前章で、自己集合性ペプチド E1Y9 がカルシウムイオン応答的にヒドロゲルを形成し、E1Y9 ペプチドゲルは良好な細胞接着性を有する足場材料として機能することを述べた。また、4 章ではペプチドナノファイバー上に細胞接着を促進する RGDS ペプチドを提示することにより、ペプチドナノファイバーを優れた足場材料として機

能化できることを示した。そこで、筆者らは E1Y9 ペプチドゲルに生理活性を有するペプチドを組み込むことにより、さらなる高機能性の細胞足場材料を創製することを試みた。前章で母骨格となる Y9 ペプチドが複数のグルタミン酸を導入しても安定な自己集合能を示したことから、より直接的な方法として E1Y9 の C 末端側にリンカー配列を介して RGDS ペプチドまたは神経細胞への分化を促進するペプチド IKVAV を共有結合により導入することとした (Figure 11a)。E1Y9-RGDS と E1Y9-IKVAV の自己集合能を評価した結果、いずれのペプチドも β -シート構造を取り E1Y9 と同様のナノファイバーへと自己集合し、カルシウムイオン応答能を保持していることがわかった。次に、さまざまな濃度の E1Y9-RGDS ナノファイバーでコーティングした基材上への 3T3-L1 細胞の接着率を調べた結果、細胞接着率は E1Y9-RGDS ペプチドの濃度依存的に増大し、1 mg/mL の条件でコー

ティングした基材は、天然の細胞接着タンパク質であるフィブロネクチンでコーティングした基材と同等の高い接着率を示した (Figure 11b). また、神経様細胞に分化することが知られている PC12 細胞をさまざまな濃度の E1Y9-IKVAV ナノファイバーでコーティングした基材上で培養し分化誘導を行った結果、分化誘導率は E1Y9-IKVAV ペプチドの濃度依存的に増大し、1 mg/mL の条件でコーティングした基材は、天然の細胞外マトリックスタンパク質であるラミニンでコーティングした基材と同等の高い誘導率を示した (Figure 11c). これらの結果は、E1Y9 ペプチドに種々の生理活性ペプチドを組み込むことにより、E1Y9 ペプチドを基盤とした自己集合性材料にさまざまな生理活性を付与できることを示している⁴⁵⁾.

次に、E1Y9-RGDS および E1Y9-IKVAV を用いたヒドロゲルを調製し、細胞の接着および分化に与える効果を評価した。ヒドロゲルは 96 ウェルのマイクロプレートまたはシリコンリングで自作したマイクロウェル中で調製を行った (Figure 11a). E1Y9 ペプチドと E1Y9-RGDS の混合比を変えたヒドロゲルを調製し、ヒドロゲル中の RGDS ペプチドの提示密度と 3T3-L1 細胞の接着率の関係を調べた結果、E1Y9-RGDS の割合の増加に伴って接着率が増大し、20% の E1Y9-RGDS を含有するヒドロゲルはフィブロネクチンでコーティングした基材より高い細胞接着率を示した⁴³⁾. 同様に、E1Y9 ペプチドと E1Y9-IKVAV の混合比を変えたヒドロゲルを調製し、IKVAV ペプチドの提示密度と PC12 細胞の神経様細胞への分化率の関係を調べた結果、25% の E1Y9-IKVAV を含有するヒドロゲル上で分化率が最大となり、また長い神経突起を多くもつ細胞へと分化誘導できることがわかった (Figure 11d)⁴⁶⁾. これらの結果から、ヒドロゲル中の生理活性ペプチドの提示率は 20~25% 程度が最適であることが示唆された.

PC12 細胞については、紐状に成形した E1Y9/E1Y9-IKVAV 混合ゲル (E1Y9/E1Y9-IKVAV=75/25 wt%) 上での培養および分化誘導についても検討を行った (Figure 11e). 紐状ヒドロゲル上でも PC12 細胞の分化誘導が促進されたが、興味深いことに紐状ヒドロゲルの長軸方向に沿って神経突起が伸長している様子が観察された. 紐状ヒドロゲルを成形する際、マイクロピペットを用いた射出により E1Y9 ナノファイバーの配向が揃って整列化された微細構造が形成され、それに沿って神経突起が伸長したものと推察される. マイクロ加工技術を利用して E1Y9 ペプチドゲルの微細構造を制御することにより、高機能性の細胞足場材料の創製が可能になるものと考えられる⁴⁶⁾.

7 おわりに

本報ではペプチドの自己集合現象を利用したナノ材料およびバイオ材料の創製について紹介した. ペプチドを巧みに設計することにより、特徴的なモルフォロジーやネットワーク構造、カルシウムイオン応答能などをもつナノファイバーを構築できることを示した. また、化学修飾や分子認識を利用することによりナノファイバー表面を機能化し、タンパク質などの機能分子をナノファイバー上に集積することに成功した. とくに、ファージディスプレイ法により見いだされたナノファイバー特異的なアンカーペプチドは、ナノファイバー上への機能分子の精密配置に有用であることを示した. さらに、生理活性分子の導入によるナノファイバーの機能化により、さまざまな細胞の培養のための足場材料を構築できることを示した. とくに、カルシウムイオン応答的にヒドロゲルを形成する自己集合性ペプチドはさまざまな形に成形可能であり、立体的な細胞の集合構造の形成や細胞の分化における組織構造の配向制御などに有効であることを見いだした. 筆者らの独自の分子設計に基づいて自己集合性ペプチドのナノ構造を構築する手法と化学修飾・分子認識によるナノ構造の機能化法を組合せたアプローチは高機能性のナノバイオ材料の創製が可能であり、将来のナノテクノロジーやバイオロジー、組織工学などの研究の発展に貢献できるものと考えている.

文 献

- 1) T. Aida, E. W. Meijer, and S. I. Stupp, *Science*, **335**, 813 (2012).
- 2) S.-L. Li, T. Xiao, C. Lin, and L. Wang, *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 5950 (2012).
- 3) M. Zelzer and R. V. Ulijn, *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 3351 (2010).
- 4) A. M. Kushner and Z. Guan, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **50**, 9026 (2011).
- 5) A. Lakshmanan, S. Zhang, and C. A. E. Hauser, *Trends Biotechnol.*, **30**, 155 (2012).
- 6) H. Tsutsumi and H. Mihara, *Mol. Biosyst.*, **9**, 609 (2013).
- 7) K. Matsuura, *RSC Adv.*, **4**, 2942 (2014).
- 8) B. E. I. Ramakers, J. C. M. van Hest, and D. W. P. M. Löwik, *Chem. Soc. Rev.*, **43**, 2743 (2014).
- 9) E. D. Santis and M. G. Ryadnov, *Chem. Soc. Rev.*, **44**, 8288 (2015).
- 10) P. K. Vemula and G. John, *Acc. Chem. Res.*, **41**, 769 (2008).
- 11) M. Ikeda, R. Ochi, and I. Hamachi, *Lab Chip*, **10**, 3325 (2010).
- 12) S. Datta and S. Bhattacharya, *Chem. Soc. Rev.*, **44**, 5596 (2015).
- 13) M. Delbianco, P. Bharate, S. Varela-Aramburu, and G. H. Seeberger, *Chem. Rev.*, **116**, 1693 (2016).
- 14) T. Tørring, N. V. Voigt, J. Nangreave, H. Yan, and K. V. Gothelf, *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 5636 (2011).

- 15) Y. H. Roh, R. C. H. Ruiz, S. Peng, J. B. Lee, and D. Luo, *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 5730 (2011).
- 16) O. I. Wilner and I. Willner, *Chem. Rev.*, **112**, 2528 (2012).
- 17) Y. Lim, E. Lee, and M. Lee, *Macromol. Rapid Commun.*, **32**, 191 (2011).
- 18) I.-S. Park, Y.-R. Yoon, M. Jung, K. Kim, S. Park, S. Shin, Y. Lim, and M. Lee, *Chem. Asian J.*, **6**, 452 (2011).
- 19) S. Vauthey, S. Santoso, H. Gong, N. Watson, and S. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 5355 (2002).
- 20) M. Wang, L. Du, X. Wu, S. Xiong, and P. K. Chu, *ACS Nano*, **5**, 4448 (2011).
- 21) S. Zhang, *Acc. Chem. Res.*, **45**, 2142 (2012).
- 22) S. Ghosh, M. Reches, E. Gazit, and S. Verma, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **46**, 2002 (2007).
- 23) K. Matsuura, K. Watanabe, T. Matsuzaki, K. Sakurai, and N. Kimizuka, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **49**, 9662 (2010).
- 24) Q. Meng, Y. Kou, X. Ma, Y. Liang, L. Guo, C. Ni, and K. Liu, *Langmuir*, **28**, 5017 (2012).
- 25) J. E. Noble, E. D. Santis, J. Ravi, B. Lamarre, V. Castelletto, J. Mantell, S. Ray, and M. G. Ryadnov, *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 12202 (2016).
- 26) M. Sheikholeslam, M. Pritzker, and P. Chen, *Langmuir*, **28**, 12550 (2012).
- 27) J. H. Kim, M. Lee, J. S. Lee, and C. B. Park, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **51**, 517 (2012).
- 28) K. Tomizaki, S. Kubo, S.-A. Ahn, M. Satake, and T. Imai, *Langmuir*, **28**, 13459 (2012).
- 29) M. A. Khalily, O. Ustahuseyin, R. Garifullin, R. Gene, and M. O. Guler, *Chem. Commun.*, **48**, 11358 (2012).
- 30) I. M. El-Sherbiny and M. H. Yacoub, *Global Cardiol. Sci. Pract.*, **3**, 316 (2013).
- 31) M. J. Pandya, G. M. Spooner, M. Sunde, J. R. Thorpe, A. Rodger, and D. N. Woolfson, *Biochemistry*, **39**, 8728 (2000).
- 32) C. J. Bowerman and B. L. Nilsson, *Biopolymers*, **98**, 169 (2012).
- 33) Y. Takahashi, A. Ueno, and H. Mihara, *Chem. Eur. J.*, **4**, 2475 (1998).
- 34) Y. Takahashi, A. Ueno, and H. Mihara, *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 177 (1999).
- 35) Y. Takahashi, T. Yamashita, A. Ueno, and H. Mihara, *Tetrahedron*, **56**, 7011 (2000).
- 36) Y. Takahashi, A. Ueno, and H. Mihara, *ChemBioChem*, **1**, 75 (2001).
- 37) Y. Takahashi, A. Ueno, and H. Mihara, *ChemBioChem*, **3**, 637 (2002).
- 38) S. Matsumura, S. Uemura, and H. Mihara, *Chem. Eur. J.*, **10**, 2789 (2004).
- 39) S. Matsumura, S. Uemura, and H. Mihara, *Mol. Biosyst.*, **1**, 146 (2005).
- 40) A. Miyachi, T. Takahashi, S. Matsumura, and H. Mihara, *Chem. Eur. J.*, **16**, 6644 (2010).
- 41) T. Sawada, T. Takahashi, and H. Mihara, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 14434 (2009).
- 42) S. Sangiambut, K. Channon, N. M. Thomson, S. Sato, T. Tsuge, Y. Doi, and E. Sivaniah, *Adv. Mater.*, **25**, 2661 (2013).
- 43) T. Sawada, M. Tsuchiya, T. Takahashi, H. Tsutsumi, and H. Mihara, *Polym. J.*, **44**, 651 (2012).
- 44) T. Sawada and H. Mihara, *Mol. Biosyst.*, **8**, 1264 (2012).
- 45) K. Fukunaga, H. Tsutsumi, and H. Mihara, *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **100**, 731 (2013).
- 46) K. Fukunaga, H. Tsutsumi, and H. Mihara, *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **106**, 476 (2016).

[Comprehensive Papers]

Development of Nano- and Bio-Materials Using Nanofibers Fabricated from Self-Assembling Peptides

Hiroshi TSUTSUMI^{*1}, Toshiki SAWADA^{*2}, and Hisakazu MIHARA^{*1}

^{*1}*School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology (4259 B-40 Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama 226-8501, Japan)*

^{*2}*School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology (2-12-1 Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8550, Japan)*

Self-assembling peptides have attracted much attention as nano- and bio-materials because they have promising properties such as flexible molecular design and biocompatibility. We have developed self-assembling peptides that can form various nanostructures including fibers in aqueous media, and applied them to nano/biomaterials. Functionalization of self-assembling peptides and their assembled nanostructures was successfully achieved by chemical modification methods and molecular recognition of anchor molecules for assembled nanostructures. In particular, specific anchor peptides for assembled nanostructures enabled arranging proteins along nanofibers to yield unique structures of nanofibers. Furthermore, calcium ion-responsive hydrogel materials were constructed by chemical modification of a self-assembling peptide. These hydrogel materials allowed culturing various cells by promoting cell adhesion and differentiation. We report that our original self-assembling peptides functionalized by combination of chemical modification and molecular recognition are useful to develop highly functional nano- and bio-materials.

KEY WORDS Peptide / Self-Assembly / Nanomaterial / Biomaterial / Chemical Modification / Molecular Recognition / Hydrogel / Cell Culture /

(Received December 20, 2016; Accepted January 17, 2017; Advance Publication March 16, 2017) [*Kobunshi Ronbunshu*, **74**, 162—171 (2017)]

©2017, The Society of Polymer Science, Japan