

ヒドロゲル形成におけるコイルドコイル構造の寄与に関する評価

日大生産工(院) ○花倉 優 日大生産工 柏田 歩

1 緒言

ヒドロゲルは三次元ポリマーネットワークに大量の水分子を保持できることから柔軟性と弾性を有した材料である。また、ヒドロゲルは内部と外部において物質のやり取りが可能な開放系であるためコンタクトレンズや細胞工学で応用される足場材料などのバイオマテリアルとして応用可能な材料として用いられている。そのことから、ヒドロゲルの骨格や架橋点をペプチドなどの生体関連分子に置き換えることにより、さらなる生体適合性や生分解性の向上が期待できる。

タンパク質中に見出される基本的な会合形態であるコイルドコイルをヒドロゲルの架橋点に用いた例として、Petkaらは高分子電解質の両末端にコイルドコイル形成ペプチドを結合させ、系のpH変化や温度変化によるコイルドコイル形成をトリガーとしたヒドロゲルの合成を行った¹⁾。この合成のアプローチからゲルの基材となる高分子電解質部位と架橋点となるコイルドコイル部位の双方において、高分子セグメントの長さおよび高分子電解質およびペプチドの構成要素である極性や会合特性の制御が可能となった。機能性材料としての観点から、このような制御はゲルの物理的・生化学的設計において有意義であるといえ、この研究を皮切りにペプチドを用いたヒドロゲルの研究が盛んに行われるようになった。

これまでわれわれは基本骨格にアクリルアミドを、架橋点にコイルドコイルを用いたヒドロゲルの合成に成功した。しかし、このヒドロゲルの合成に関してはモノマー仕込み濃度など同じ重合条件での合成にも関わらずゲル化における再現性が得られなかった。これは重合後のアクリルアミド領域およびコイルドコイル領域の組成の違いによるものと考えられる。

本研究ではヒドロゲルの合成および架橋点であるコイルドコイルのゲル化に対する寄与に関する評価および重合後における組成について評価することを目的とする。

2 実験

2-1 ペプチドの合成

ペプチドはFmoc固相合成法により合成した。活性化試薬であるHBTU, HOBt, DIEAを用いてFmoc-Gly Wang resin上に目的のアミノ酸を伸長させた。伸長させたペプチドはトリフルオロ酢酸 / 純水 / トリイソプロピルシラン混合溶液によって脱樹脂を行った。その後、分画分子量1000のセルロース膜を用いた透析処理により精製を行った。

2-2 円偏光二色性(CD)スペクトル測定

0.1 M Tris-HCl緩衝液(pH 7.0)および0.1 M 酢酸緩衝液(pH 4.41, pH 5.0)中におけるペプチドの構造をCDスペクトルにより評価した。ペプチドの濃度が20, 50, 100 μM になるように試料を調製した。測定装置は円二色性分散計J-820(JASCO)を使用し、200～240 nmの波長範囲で測定を行った。

2-3 Trpを用いた末端定量法によるペプチドの数平均分子量の同定

0.1 M Tris-HCl緩衝液(pH 7.0)および0.1 M 酢酸緩衝液(pH 4.41, pH 5.0)およびそれぞれの緩衝液にポリペプチドの変性剤であるグアニジン塩酸を添加した際の緩衝液中におけるTrpの濃度が20, 50, 75, 100, 200 μM になるように試料を調製し、Trpの検量線を作成した。測定装置は分光光度計V-630BIO型(JASCO)を使用し、200～400 nmの波長範囲で測定を行った。

作成したTrpの検量線の傾きから得たモル吸光係数を用い、以下の式からペプチドの数平均分子量を求めた。

$$M_n = \frac{w}{V} \cdot \frac{\epsilon l}{A}$$

Mn : 数平均分子量(g/mol)

w : ペプチドの質量(g)

V : 緩衝液の添加量(dm³)

ϵ : Trpのモル吸光係数(mol⁻¹ dm³ cm⁻¹)

l : セル長(cm)

Characterization of contribution of coiled coil cross-linker to formation of hydrogel network
Yu KEKURA and Ayumi KASHIWADA

A : Trpの吸光度

2-4 ヒドロゲルの合成

脱気した純水(250 μ L)にアクリルアミドとアクリル酸結合ペプチドを97.5:2.5のモル比で採取し、重合促進剤のペルオキソ二硫酸アンモニウム(APS)と重合開始剤であるテトラメチレンジアミン(TEMED)を添加し合成した。

3 結果と考察

3-1 ペプチドの設計

本研究では水溶液中において二量体コイルド構造を形成するようにペプチド(HM)を設計した(Fig. 1)。HMはロイシンジッパー効果により二量体形成を基本とし²⁾、ヘリックス間での静電相互作用を適切に調整することにより逆平行二量体コイルドコイル構造を形成するような設計にもとづいている。さらに、Trpを配列に1残基導入することにより末端定量によるペプチド自身およびアクリルアミドとの共重合後におけるアクリルアミドの重合度が定量可能な設計となっている。なお、ポリペプチドをヒドロゲルの架橋点として高分子鎖中に導入するためにN末端にはアクリル酸を導入した。

HM
 $\text{AA-} \text{GGWEE LKKLEKE LKKLEKK LEELKEK LEELKGG}$
 AA- : Acrylic acid

Fig. 1 Amino acid sequence of designed coiled-coil forming polypeptide (HM).

3-2 CDスペクトル測定による二次構造の評価

設計、合成したHMの水溶液中における構造について調べるためにCDスペクトル測定を行った。その結果をFig. 2に示す。HMは計算上の等電点であるpH 4.41、弱酸性であるpH 5.0、そして中性のpH 7.0いずれの条件においても208 nm付近と222 nm付近に負の極大が観測されコイルドコイル構造の形成が示された。

3-3 末端定量法による数平均分子量の同定

これまで、2-4に示した組成でヒドロゲルの合成を行ったが再現性よくヒドロゲルが得られなかった。そこで、アクリルアミドとの共重合した際のペプチド領域の評価として2-4に示した組成でヒドロゲル化に至らなかった共重合体を用いてCDスペクトル測定を行った。その結果、ヒドロゲル化の有無にかかわらず208 nm付近と222 nm付近に負の極大が観測されコイルドコイル構造形成が示された。したがって、ヒドロゲル化には重合後のアクリルアミド領

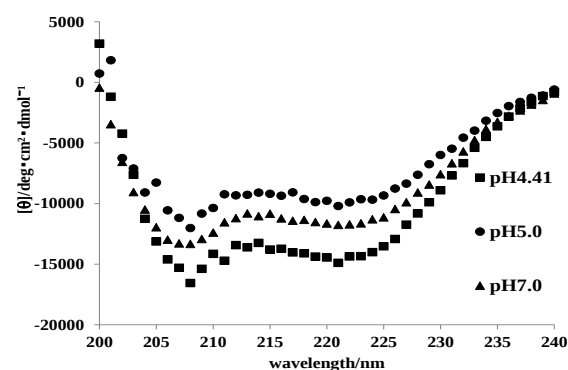


Fig. 2 CD spectra of HM in 0.1 M Tris-HCl buffer solution (pH 7.0) and Acetic acid buffer solution (pH 4.41 and pH 5.0) at 20 °C. The concentration of polypeptides were 20 μ M.

Table 2 Results of end-group analysis of Tryptophan

変性剤なし	275.5nm モル吸光係数			数平均分子量(g/mol)		
pH4.41	5138.5	5488.5	5801.9	3198.475546	3416.3342	3611.41097
pH5	5267.3	5561.5	6185.7	2953.469165	3118.4324	3468.43244
pH7	5367.2	5488.2	5681.5	2957.188026	3023.8559	3130.35918
変性剤あり	276.5nm モル吸光係数			数平均分子量(g/mol)		
pH4.41+Gnd	5022.1	5588.3	5896.1	2501.874633	2783.9402	2937.27784
pH5+Gnd	5410.2	5610.1	5797.1	3251.579827	3371.7216	3484.11028
pH7+Gnd	5409.8	5599.9	5633.9	3122.466868	3232.1901	3251.8145

域とコイルドコイル領域の組成比が起因すると考えた。

共重合体におけるペプチド1分子に対するアクリルアミドの重合度を決定するために、はじめにTrpによる末端定量法を用いてペプチドの数平均分子量の決定を行った。重合のためにペプチドの末端にはアクリル酸が結合しており、このC=CがTrpのインドール基由来のピークに影響を及ぼさないことを確認した後に、末端定量を行った結果をTable 2に示す。合成したペプチドの数平均分子量は約3000~3500 g/molと安定した数値が得られた。さらに、共重合体においても同様に数平均分子量を求め、共重合体のユニットにおけるアクリルアミドの重合度を決定する。そこから、アクリルアミド領域がゲル化に及ぼす影響の評価を行う。

4 展望

Trpを用いた数平均分子量からヒドロゲル化の有無におけるペプチド1本鎖に対してのアクリルアミドの重合度の違いについて検討する。さらに、その結果からヒドロゲル化の最適化に関する検討を行う予定である。

[参考文献]

- 1) W. A. Petka, J. L. Harden, K. P. McGrath, D. Wirtz, D. A. Tirrell, *Science*, **1998**, 281, 389-392.
- 2) P. B. Harbury, T. Zhang, P. S. Kim, T. Alber. *Science*, **1993**, 262, 1401-1407.