

生体内利用を意識した自己組織化 starPEG ヒドロゲルの合成と評価

日大生産工(院) ○青柳 那美
日大生産工 柏田 歩

1 緒言

人工血管や人工臓器などの生体材料の基材には、柔軟性と強度を持ち合わせたポリエチレンテレフタレートや柔軟性に乏しいが抗血栓性に優れ、比較的細い血管にも使用可能なテフロンなどが用いられている。そして、これらの基材に対して、血液や体液との接触界面を提供するためにポリエチレングリコール(PEG)のグラフト化などによる表面修飾が有効であることが知られている。PEG 鎖は水和性、柔軟性、排除体積効果という特徴を有し、血液や体液中のタンパク質の吸着を抑制できる働きがあることが PEG が生体適合界面を提供する根拠となる。したがって、高分子量 PEG の合成、PEG と他の高分子とのブロック化やブレンド化、さらに、PEG 自体を組織化することは新たなバイオマテリアルの創出に有意義であると考えられる。このような考え方から、PEG 鎖の特徴を活かした、ヒドロゲルの設計と合成、さらに生体内での利用可能性についての検討に関する研究が盛んに行われている。特に、分岐ポリエチレングリコール(starPEG)をネットワークの基盤として用いたヒドロゲルが注目されている。

Sakai らは 4 分岐末端にそれぞれアミノ基と *N*-ヒドロキシスクシンイミドエステルを有する starPEG 間での共有結合を介したヒドロゲルの合成を行った¹⁾。合成により得られたゲルネットワークは欠陥がなく応力集中が起こりにくいことから、強度と耐久性を考慮した生体内材料への応用が可能である。

本研究では、生体吸収性や生分解性を備えた材料として観点から架橋点に非共有結合を有する starPEG ヒドロゲル利用することを考えた。そして、架橋点形成のための、非共有結合セグメントには生体内で見出されるコイルドコイルを用いた。コイルドコイルは代表

的なタンパク質の構造モチーフであり、複数のヘリックス鎖が会合することにより形成する。このコイルドコイルの自己組織的な会合を架橋点形成要因として用いることで、自己組織化 starPEG ヒドロゲルを得ることが可能となる。そこで、コイルドコイルポリペプチドと starPEG とを結合させたコンジュゲートを合成し、コンジュゲート間の自己組織化にもとづくヒドロゲル化について検討を行った。また、架橋点に用いられているコイルドコイルポリペプチドは pH や金属イオン応答性を付加させることが可能であることから、目的となる外部刺激に応じ、自己組織化における駆動力を変化させることができる、そのため、ヒドロゲルに薬物の担持および放出機能を持たせることで薬物輸送担体としての利用も期待できる。

2 実験操作

2-1 ポリペプチドの合成

ポリペプチドは 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逐次縮合させ、ポリペプチド鎖を伸長させた。伸長したポリ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/エタレンジオール混合溶液と反応させること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い、さらに、HPLC による粗生成物の精製を行った。HPLC 分析は、Inertsil C-18 (4.6×150 mm, GL Sciences) 逆相カラムを備えた Hitachi L-7000 システムを用いて行った。そして、検出波長: 280 nm, 溶媒: A 液(1%のTFAを含む純水)と B 液(0.1%のTFAを含むアセトニトリル)の2溶離液による直線グラジエント(A 液 80% (0 min) ~ A 液 20% (30 min))の条件下で分析および分取を行った。

Synthesis and Characterization of Self-Assembled StarPEG Hydrogels

for Constructing Novel Biomaterials

Nami AOYAGI and Ayumi KASHIWADA

2-2 ポリペプチド - starPEG コンジュゲートの合成

末端にマレイミド基を有する4分岐starPEG (SUNBRIGHT® PYE 100MA) とポリペプチドのN末端に導入したシステインのチオール基との間をマイケル付加反応を通して3種類のポリペプチド - starPEG コンジュゲートを合成した²⁾。はじめに, starPEG とポリペプチドをモル比1:4.5で純水に溶解し, 窒素置換後, 室温で1日反応させた。なお, コンジュゲートの合成の確認はHPLC分析におけるポリペプチドの溶出時間の変化を追跡することにより行った。HPLC分析および分取は, ポリペプチドの合成時と同様に, Inertsil C-18 (4.6×150 mm, GL Sciences) 逆相カラムを備えたHitachi L-7000 システムを用いて行った。さらに, MALDI TOF - MS による分析を行いコンジュゲートの合成を確認した。

2-3 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) 中でのポリペプチドおよびコンジュゲートの会合の基礎となるコイルドコイル構造の形成を確認するためにCD スペクトル測定を行った。測定装置は円二色性分散計J-820(JASCO) を使用し, 測定は200~240 nm の波長範囲で行った。

2-4 ヒドロゲルの合成

合成した3種類のコンジュゲートを0.3, 0.6, 1.2 mM になるように純水に溶解させ, 試料を調製した。そして, 調製した試料を単独で(ホモ系), または1:1で混合し(ヘテロ系), 4℃で2日間静置することによりヒドロゲルの合成を行った。

2-5 ヒドロゲルの架橋点形成要因の評価

2-4に記した方法により合成したヒドロゲルを0~40℃の範囲で徐々に加温し, 温度変化に伴うヒドロゲルの形状変化について観察した。さらに, 4℃において5M グアニジン溶液をヒドロゲルに添加した際のヒドロゲルの形状変化について観察した。

3 結果と考察

3-1 ポリペプチドの設計

本研究では, starPEG を基本とするヒドロゲルの架橋点として用いる3種類ポリペプチド(HCC, ECC, KCC)を設計した。HCCはロイシンジッパー効果に基づくホモ2量体コイルドコイルを形成するポリペプチドのア

ミノ酸配列を参考にして³⁾, コイルドコイル形成時に疎水性コア形成に寄与する a・d 位に疎水性アミノ酸として Ile (I) と Leu (L) を配置した。さらに, ヘリックス間における静電相互作用による安定化に寄与する e・g 位には塩基性アミノ酸である Lys (K) および負の酸性アミノ酸である Glu (E)を適切に配置した。

一方, ECCおよびKCCはそれぞれ単独ではコイルドコイル構造を形成せず, 1:1でのヘテロ2量体を形成する設計とした。ロイシンジッパー効果に基づく2量体コイルドコイル構造形成を考慮し, a・d 位にそれぞれ疎水性アミノ酸として Ile (I) と Leu (L) を配置した点については, HCC と同様の設計方針である。そして, ECCの1,3周目の e・g 位には Glu (E) を配置することにより負電荷優勢に, そして, KCCには Lys(K) を配置することにより正電荷優勢になるように設計した。

Fig. 1 に設計した3種類のポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

	abcde	fg	abcde	fg	abcde	fg
HCC: NH ₂ -CGGW	IAALEKK	IAALQKQ	IAALKKE	G-COOH		
ECC: NH ₂ -CGGW	IAALEKE	IAALQKQ	IAALEKE	G-COOH		
KCC: NH ₂ -CGGW	IAALKEK	IAALQKQ	IAALKEK	G-COOH		

Fig. 1 Amino acid sequences of coiled-coil forming polypeptides designed in this study.

3-2 CD スペクトル測定による

ポリペプチドの二次構造の確認

設計, 合成したポリペプチドが目的とするヒドロゲルの架橋点に適したコイルドコイルを形成するかについて検討を行うために, CD スペクトル測定を行った。その結果, Tris-HCl 緩衝液中でHCC 単独系とECC およびKCC の1:1 混合系はいずれも208 nm 付近と222 nm 付近にヘリックス構造に起因する負の極大が観測された。この結果から, いずれの系においてもコイルドコイル形成が示唆された。このことから, 設計, 合成したポリペプチドを用いたホモおよびヘテロコイルドコイル会合系はヒドロゲルの架橋点としての利用が期待できる。

3-3 ポリペプチド - starPEG

コンジュゲートの合成

2-2に記した方法に従い, 3種類のポリペプチド - starPEG コンジュゲートの合成を行った。原料となるポリペプチドに相当するHPLCのピーク強度の減少とポリペプチド -

starPEG コンジュゲートの生成に伴う新規のピークの増大による確認を行った。HPLC 分析の結果、HCC, ECC および KCC いずれのポリペプチドを原料とした際にもコンジュゲートの生成を示唆する HPLC 溶出ピークが確認できた。さらに、MALDI TOF-MS を用いてコンジュゲートの分子量の測定を行った結果、いずれのコンジュゲートについても、starPEG の 4 末端にポリペプチドが結合していることを示す分子量域に分布が認められた。このことから、目的とする 3 種類のコンジュゲートの合成が確認できた。

3-4 ポリペプチド - starPEG

コンジュゲートの会合体形成評価

HCC - starPEG を Tris - HCl 緩衝液に溶解させたホモ系および ECC - starPEG と KCC - starPEG と 1:1 で溶解させたヘテロ系がコンジュゲート間におけるコイルドコイル形成に伴い会合する際の成長過程に関する検討を行った。ホモ系およびヘテロ系いずれも 5, 10, 20 μM のコンジュゲート濃度の溶液を調製し、CD スペクトル測定を行った。その結果、ホモ系では、いずれの濃度においてもポリペプチド濃度に相当する CD 強度が観測されなかった。これは、コイルドコイル形成に必須のヘリックス間の相互作用が極めて強いため、コンジュゲート間で会合体を形成した後、さらに会合が促進した結果、凝集し、均一分散できなくなったと考えられる。

ヘテロ系においても 20 μM で調製した試料に関しては、ポリペプチド濃度に相当する CD 強度が測定されなかった。この結果から、より高いコンジュゲート濃度である 20 μM の系ではホモ系と同様に、コイルドコイル形成に必須のヘリックス間の相互作用が極めて強いため、コンジュゲート間で会合体を形成した後、さらに会合が促進した結果、凝集し、均一分散できなくなったと考えられる。また、低濃度の系では、ヘリックス形成を示すシグナルが観測された。これは、コンジュゲート間で形成した低次の会合体が溶液中に溶解しコロイド状に分散しているためであると考えられる。

このことから、低濃度の系ではコンジュゲート間でコイルドコイルにもとづく会合が確認できた。さらにコンジュゲートを高濃度にするによりコイルドコイルによるコンジ

ュゲート間の会合が進行すると考えられることから、さらに、高濃度ではコンジュゲート間において緻密なネットワークを形成すると考えられる。

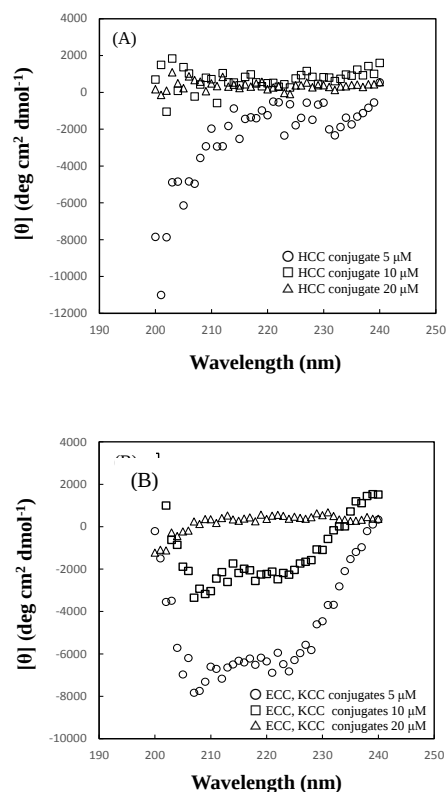


Fig. 2 CD spectra of HCC - starPEG conjugate (A), and a 1:1 mixture of ECC and KCC - starPEG conjugates in 0.1 M Tris - HCl buffer solution (pH 7.0) at 20 $^{\circ}\text{C}$ (B)

3-5 ポリペプチド - starPEG コンジュゲートによるヒドロゲルの合成

3-4 に記したように、水系においてより高いコンジュゲート濃度では緻密なネットワーク形成ができ、ヒドロゲルの合成が可能であると考えた。そこで、ホモおよびヘテロ系を 0.6 mM になるように純水に溶解させヒドロゲルの合成を試みた。ホモ系では調製した溶液を 4 $^{\circ}\text{C}$ で 2 日間静置することにより、ヒドロゲル化が確認できた。また、ヘテロ系においても 4 $^{\circ}\text{C}$ で 2 日間静置することにより、ヒドロゲル化が確認できた。したがって、3-4 で考察したように、濃度を高くすることで会合が進行し、凝集することにより緻密なゲルネットワーク形成を可能とした。このことから、コンジュゲート間による会合体形成にホモおよびヘテロ 2 量体コイルドコイルからなる自己組織化が寄与していることが示唆される。

3-6 ヒドロゲルの架橋点形成要因

に関する評価

3-6-1 ヒドロゲル形成におけるコンジュゲート濃度および温度依存性の評価

得られたヒドロゲルの架橋点がコンジュゲート間によるコイルドコイル形成によるものかを検討するためにヒドロゲル形成における濃度依存性および温度依存性の評価を行った。ホモ系とヘテロ系をそれぞれ 0.3, 0.6, 1.2 mM になるように調製し 4 °C で静置したところ、ホモ系はいずれの濃度においてもヒドロゲル化が認められた。しかし、20 °C まで昇温させたところ、0.3 mM 系ではゾル化し、0.6 および 1.2 mM 系ではヒドロゲル状態が維持されることがわかった。さらに、40 °C まで昇温したところ、いずれの系においてもゾル化が確認された。なお、いずれの系も冷却すると再びヒドロゲル化することがわかり、温度依存性的なゾル-ゲル転移挙動を示していることが確認できた。

また、ヘテロ系では、4 °C で静置したところ 0.3 mM 系ではゾル化し、0.6 および 1.2 mM 系ではヒドロゲル化が認められた。温度依存性の検討では、ホモ系と同様に、20 °C まで昇温させたところ、0.6 および 1.2 mM 系ではヒドロゲル状態が維持されることがわかった。さらに、40 °C まで昇温したところ、いずれの系においてもゾル化が確認された。なお、いずれの系も冷却すると再びヒドロゲル化することがわかり、温度依存性的なゾル-ゲル転移挙動を示していることが確認できた。Fig. 3 に温度変性によるヘテロ系の様子を示す。

以上、濃度依存性の検討から、より濃度のコンジュゲートにおいて、安定なヒドロゲルを形成することができた。さらに、温度依存性の検討結果から、ヒドロゲルは、コイルドコイル形成を含む分子間相互作用による非共有結合的な会合から成っており、コンジュゲート間の逐次的な会合と組織化がヒドロゲル形成に寄与していることが示された。

3-6-2 グアニジン水溶液中での変性実験

合成したホモおよびヘテロ系ヒドロゲルの形成に温度依存性があることから、設計どおりコイルドコイルポリペプチドがヒドロゲルの架橋点に寄与していると示唆された。そこで、コイルドコイルを形成するヘリックス鎖

内の水素結合の変性に十分な濃度(5 M) のグアニジン水溶液をホモおよびヘテロヒドロゲルに添加した。その結果、いずれの系においてもグアニジン水溶液(10 °C) を加えることにより、系の粘性が低下し、ゾル化が認められた。Fig. 3 にはグアニジン添加前後のヘテロ系の様子を示す。

このことから、ヒドロゲルの架橋点であるコイルドコイルポリペプチドのもととなるヘリックス鎖形成において重要な分子内水素結合が寄与していることが確認できた。

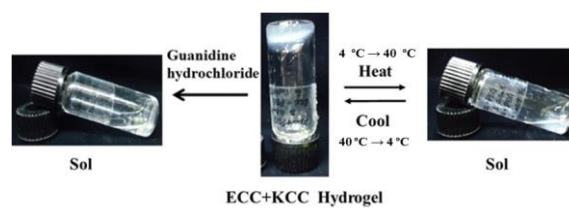


Fig. 3 Photograph presentation of the guanidine hydrochloride and the thermally induced phase transition of the hydrogel from ECC-, and KCC - starPEG conjugates.

4 結言

本研究では、架橋点にコイルドコイルを用いることにより自己組織化 starPEG ヒドロゲルの合成を可能とした。今後は、生体内での利用を考慮するために、必要最低限の熱安定性ととも機械的強度の付加が課題である。さらに、生体内の種々の刺激に応答する新規機能性ヒドロゲルを目指すため、コンジュゲート中のコイルドコイルポリペプチドに pH 応答性を付与し、自己組織能の駆動力を変化系においても設計を行う。このような系の設計が実現できれば、薬物の担持と放出の制御が可能となるヒドロゲル合成につながると考えられ、薬物輸送担体などへの利用が期待できる。

[参考文献]

- 1) T. Sakai, T. Matsunaga, Y. Yamamoto, C. Ito, R. Yoshida, S. Suzuki, N. Sasaki, M. Shibayama, U. Chung, *Macromolecules* **2008**, 41, 5379-5384
- 2) R. Wieduwild, W. Lin, A. Boden, K. Kretschmer, Y. Zhang, *Biomacromolecules* **2014**, 15, 2058-2066.
- 3) E. B. Hadley, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 16444-16445.