

## ヒドロゲルの自己組織化過程制御を可能とするコイルドコイル架橋点の設計

日大生産工(院)           ○青柳 那美  
日大生産工                柏田 歩

## 1 緒言

近年、薬物の放出過程を制御するための方法論として担体を利用した薬物送達システム(DDS)が注目されている。代表的な DDS 担体としてリポソームや高分子ミセル、ヒドロゲルが挙げられる。特に、ヒドロゲルは三次元網目構造を有し、構成する網目環境を変化させることで種々の薬物の担持と放出の制御が可能であることから、広く研究が行われている。

現在、われわれは種々の外部刺激による薬物の放出制御を想定したヒドロゲルの設計、合成を行っている。DDS 担体の基本設計にあたり、担持薬物のサイズに応じたゲル網目孔径の均一化が要求される。そこで、均一な網目構造形成に有利な 4 分岐鎖ポリエチレングリコール(starPEG)を骨格とし、ポリペプチドの自己組織化によるコイルドコイルを架橋点に用いることでヒドロゲルの合成が実現できた。このようにして得られたヒドロゲルを DDS 担体として展開するためには、架橋点の形成と解離の人為的な制御が必要である。

そこで、われわれはヒドロゲルの架橋点形成と解離における動的な要因としてコイルドコイルを構成するポリペプチドと外部から添加した新たなポリペプチドとの交換反応(ドメインスワッピング)に注目した<sup>1)</sup>。そして、本発表では架橋点構築のための基礎研究として、安定性の異なるコイルドコイルによるドメインスワッピングの評価を行い、ヒドロゲル架橋点の動的制御における可能性について言及する。

## 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。そ

して、トリフルオロ酢酸/純水/トリイソプロピルシラン/フェノール混合溶液を用いた脱樹脂操作により、ポリペプチド粗生成物を得た。ポリペプチドの精製は、分画分子量1000のセルロース膜を用いた透析処理および逆相HPLCにより行った。

## 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) 中におけるポリペプチドの構造を確認するためにCDスペクトル測定を行った。測定装置として、円二色性分散計J-820(JASCO)を使用し、200~240 nmの波長範囲でスペクトル測定を行った。

## 2-3 コイルドコイル形成ポリペプチドの

## ドメインスワッピング評価

ドメインスワッピング評価のためのアフィニティー分析には HIS-Select コバルトアフィニティーゲルを用いた。0.3 M 塩化ナトリウム, 10 mM イミダゾールを含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)中、N末端に His タグを有したポリペプチドと相補ポリペプチドによるコイルドコイル形成の後、アフィニティーゲルにインキュベートさせた。相補ポリペプチドとのスワッピングが期待されるポリペプチドを添加後、上澄みを採取し、成分の分析を行った。そして、0.3 M 塩化ナトリウム, 100 mM イミダゾールを含む 0.1 M Tris-HCl の溶出緩衝液(pH 8.0)を添加することで、アフィニティーゲルと結合していたコイルドコイルを溶出させ、再度、成分の分析を行った。なお、ポリペプチド成分の分析は逆相HPLCとCDスペクトル測定によって行った。

## 3 結果および考察

## 3-1 ポリペプチドの設計

コイルドコイルの形成はヘリックス間における疎水性相互作用に大きく依存するが、形成したコイルドコイルの安定性はヘリックス間の静電相互作用にもとづく塩橋により制御が可能である。このことから、塩橋の強さが異なると予

**Design and Characterization of Coiled-Coil Crosslinker  
for Modulation of Self-Assembly Process of Hydrogels**  
Nami AOYAGI and Ayumi KASHIWADA

想される2組のコイルドコイルを設計した。

はじめに塩橋形成部位に塩基性アミノ酸 Lys(K)を配置した KCC3 を設計した。そして、KCC3 との相補ポリペプチドとして塩橋形成部位に酸性アミノ酸である  $\alpha$ -アミノアジピン酸 (Aad)を配置した AadEC を設計した。一方、塩橋形成部位に Aad より短い側鎖を有する Asp(D)を含む Epep も設計した。設計した2種類のポリペプチド AadEC と Epep とでは側鎖長の違いから KCC3 との間に形成したコイルドコイルの安定性に大きな差が出ると考えられる。そのため、より安定性の低いコイルドコイル形成が予想される KCC3/Epep の系に AadEC を添加することにより、安定性の高いコイルドコイルである KCC3/AadEC が形成することが期待される。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。

		a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	a	b	c	d	e	f	g	
KCC3	H <sub>2</sub> N-GGW	I	A	A	L	K	K	K	I	A	A	L	K	K	K	I	A	A	L	K	K	K	I	A	A	L	K	K	K	G-COOH
Epep	H <sub>2</sub> N-GGW	I	A	A	L	E	E	E	I	A	A	L	E	E	E	I	A	A	L	D	E	D	I	A	A	L	E	E	E	G-COOH
AadEC	H <sub>2</sub> N-GGW	I	A	A	L	X	E	X	I	A	A	L	X	E	X	I	A	A	L	X	E	X	I	A	A	L	X	E	X	G-COOH

X=Aad

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の水溶液中での構造はCDスペクトル測定により評価した。その結果、AadECおよびEpepはいずれもKCC3との1:1混合により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、ヘテロ二量体コイルドコイルの形成が確認できた(Fig. 2)。

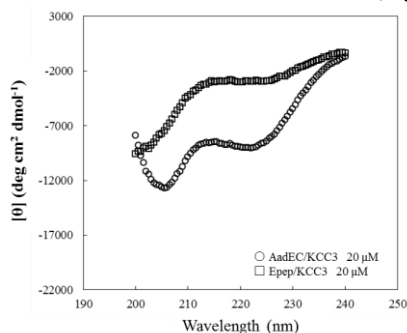


Fig. 2 CD spectra of 1:1 mixture of AadEC and KCC3, and a 1:1 mixture of Epep and KCC3 in 0.1 M Tris-HCl buffer solution (pH 7.0) at 20 °C.

さらに Fig. 2 から AadEC/KCC3 からなるコイルドコイルにおいてはより高いヘリックス性が確認できたことから、予想通り側鎖の長い酸性アミノ酸である Aad を塩橋として用いることに

より、コイルドコイルの安定性が向上することがわかった。

### 3-3 ドメインスワッピング過程評価

CD スペクトル測定による評価から、静電相互作用にもとづく塩橋の強さがコイルドコイルの安定性に寄与していることが示された。そこで、より低い安定性である KCC3/Epep からなるコイルドコイルに対し、AadEC を添加することで相補ポリペプチドのドメインスワッピング、すなわち Epep と AadEC との交換により KCC3/AadEC からなるコイルドコイル形成が期待できる。

ドメインスワッピング過程の評価は 2-3 に示したとおりである。N 末端に His タグを有している KCC3 と Epep とのコイルドコイルをアフィニティーゲルにインキュベートさせ、AadEC を添加した際の上澄みを HPLC により分析した結果、Epep に匹敵するピーク成分を確認することができた。このことから、AadEC とのドメインスワッピングが生じたと考えられる。そして、溶出緩衝液の添加後の上澄みを CD スペクトル測定したところ、コイルドコイル形成を示すシグナルが確認できたとともに、HPLC 測定の結果、AadEC と KCC3 に匹敵するピーク成分を確認することができた。

以上の結果は KCC3/Epep から KCC3/AadEC へのドメインスワッピングを示すものであり、このようなドメインスワッピング現象をヒドロゲルの架橋点に展開できれば DDS 担体における薬物の担持と放出において重要なヒドロゲルの自己組織化過程制御が可能となりうる。

## 4 結言

本研究では、ヘテロ二量体コイルドコイルの安定性は塩橋を形成する酸性アミノ酸の側鎖長に依存することが確認できた。さらに、塩橋を形成する酸性アミノ酸の改変によりポリペプチドのドメインスワッピングを確認することができた。今後は、ドメインスワッピング能を有するポリペプチドを架橋点としたヒドロゲルの合成を行い、ドメインスワッピングを利用した薬物の放出制御の可能性について検討を行う。

### [参考文献]

- 1) S. J. Ryan, A. J. Kennan, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10255-10260.