

研究代表者

和歌山工業高等専門学校物質工学科 准教授 土井 正光

共同研究者

和歌山工業高等専門学校物質工学科 教授 野村 英作

和歌山工業高等専門学校物質工学科 准教授 森田 誠一

近畿大学生物理工学部 准教授 仲 幸彦

合成ペプチドを利用したフィッシュコラーゲンの分離・精製

要旨

コラーゲンは、その特徴である弾力性や保湿性などから、医薬品、化粧品そして食品分野で広く利用されている。従来、商品化されているコラーゲンの供給源は、牛や豚のような動物が多いが、ゼラチンアレルギーや狂牛病問題が取りざたされるようになり、各業界において供給源の見直しが急務となっている。最近では、動物由来のものに比べ、安全で多くの優れた性質を持つ、海産物由来のフィッシュコラーゲンが注目されているが、効率的な分離・精製は未だ困難な状況である。本研究は、付加価値の高いフィッシュコラーゲンの効率的な分離・精製に関わる新技術の開発を目的として行った。

まず、センサーの官能基となるペプチドを液相法や固相重合の方法で、三重らせん構造を形成する事が分かっているコラーゲンモデルペプチド（(Pro-Pro-Gly)₁₀）をはじめ4種のペプチドを合成した。今回確立したペプチド合成法は、スケールアップが容易で、さらに他のコラーゲンモデルペプチドの合成へも応用できる。従って、今回開発した合成法を用いれば、任意のスケールで種々のコラーゲンモデルペプチドを独自に合成できる可能性がある。

また、今回合成したペプチドと金属表面への結合能を持つ硫黄化合物との縮合反応を4通り行い、その内2通りの反応でペプチドと硫黄化合物が縮合した化合物を得た。さらに、それらを実際に水晶振動子の電極表面へ固定化する条件検討を行い、その固定化量を制御できる可能性を示した。

今後は、ここで得た知見を基に三重らせんを形成する種々のコラーゲンモデルペプチドを大量に合成し、それらをセンサーの官能基として利用して、実際にフィッシュコラーゲンのセンシングに応用した実験を行う予定である。また、マイクロ粒子にペプチドを固定化する接合実験も既に開始しており、そこで得られる情報はフィッシュコラーゲンの高度な分離精製を目的とした新規素材の開発につながる事が予想される。

研究代表者

和歌山工業高等専門学校物質工学科 准教授 土井 正光

共同研究者

和歌山工業高等専門学校物質工学科 教授 野村 英作

和歌山工業高等専門学校物質工学科 准教授 森田 誠一

近畿大学生物理工学部 准教授 仲 幸彦

合成ペプチドを利用したフィッシュコラーゲンの分離・精製

1 目的

コラーゲンは、生体の様々な部分に存在するタンパク質の一種で、三本のポリペプチド鎖からなる三重らせんと呼ばれる特徴的な構造を持っている。その三重らせんを構成するポリペプチド鎖が、加熱により変性したものはゼラチンと呼ばれている。ゼラチンを含めコラーゲンは、その特徴である弾力性や保湿性などから、医薬品、化粧品そして食品分野での応用が広く注目されている。従来、商品化されているコラーゲンの供給源は、牛や豚のような動物が多い。しかし、ゼラチンアレルギーやBSE（狂牛病）問題が取りざたされるようになり、各業界において供給源の見直しが必要になっている（服部俊治、バイオポリマー、第17号、1～4頁、1999年）。そして、最近では動物由来のものに比べ、水への溶解度も高く無臭である事など多くの優れた性質を持つ、海産物由来のフィッシュコラーゲンが注目されている。

フィッシュコラーゲンの商品化は、鳥取県とその協賛企業が先行している。しかし、魚のウロコから抽出されるフィッシュコラーゲンは、夾雑物が多く存在するため精製が困難で、具体的には「鯛約160匹からわずか100グラム」（読売新聞、平成18年5月12日、大阪本社発行19148号）と言う様に生産量が限定されている。コラーゲンは、酵素のようなタンパク質とは異なり特定の活性部位を持たないため、その特異性に基いた吸着や分離は不可能である。従って、コラーゲンだけを特異的に吸着し分離するような技術は現状では見当たらない。

一方、コラーゲンモデルと呼ばれる合成ペプチドは、低温では三重らせん構造を形成し高温では一本鎖へ転移するという、コラーゲンと同様の性質を示す事が既に分かっている。また、その構造転移が可逆的である事も分かっている（M. Doi *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 9922-9923, 2003）。さらに、アミノ酸配列の異なる合成ペプチド間での、三重らせん構造の形成が最近報告された（J. A. Hodges & R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 15923-19532, 2005）。これらの事から、我々は合成ペプチドがフィッシュコラーゲンとも三重らせんを形成する可能性が高く、合成ペプチドを担体に固定化できればフィッシュコラーゲンと他のタンパク質などの夾雑物との分離が可能であると考えた（図1）。

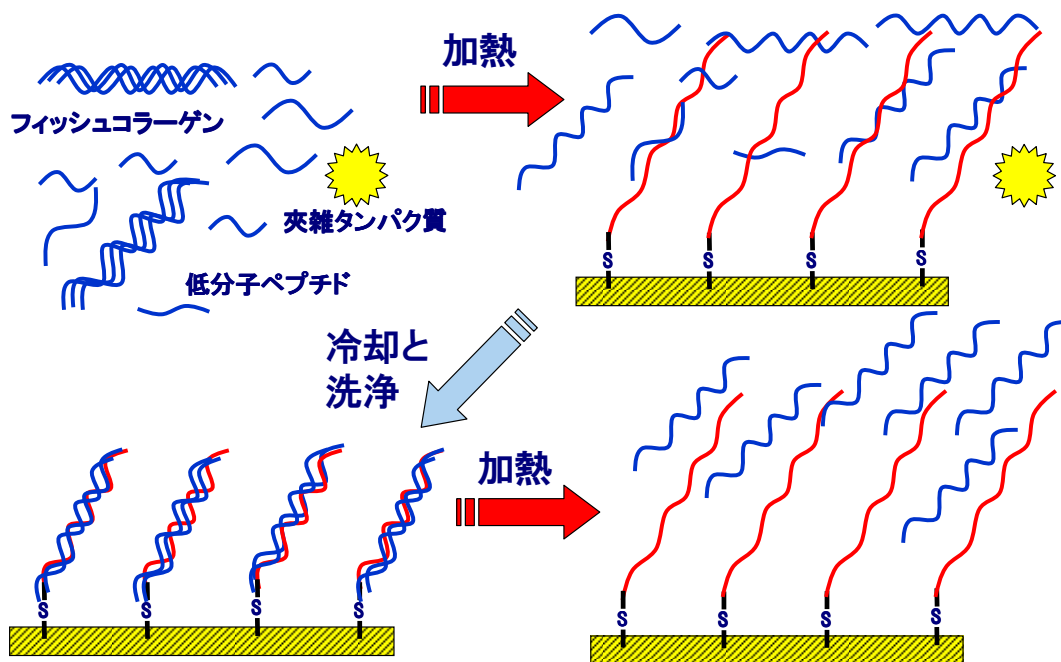


図1 合成ペプチドを利用したフィッシュコラーゲンの分離・精製の概念図

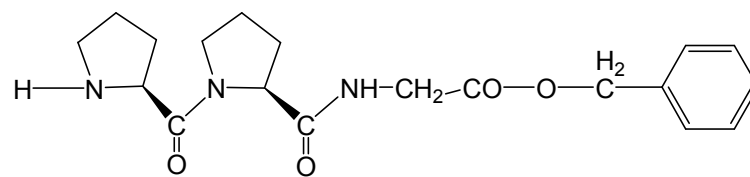
我々は、これまでに種々のモデルペプチドをシリーズで合成し、コラーゲンのアミノ酸配列と熱安定性の関係を調べるという基礎的な研究を行って来た (M. Doi *et al.*, *J. Pept. Sci.*, **11**, 609-616, 2005)。また、一方で人工の脂質二分子膜 (リポソーム) とペプチドとの相互作用についての研究も行っている (S. Morita *et al.*, *J. Colloid Interface Sci.*, **298**, 672-678, 2006)。

そこで、本研究ではコラーゲンの中でも付加価値の高いフィッシュコラーゲンの効率的な分離・精製に関わる新技術の開発を目的に、種々のモデルペプチド (図2) を合成し、それらをセンサーとして利用した場合のフィッシュコラーゲンとの相互作用を検討する。さらに、合成ペプチドを固定化するための基材としてアクリル系マイクロ微粒子を合成し、フィッシュコラーゲンの実用的で効率的な分離精製についても検討する。

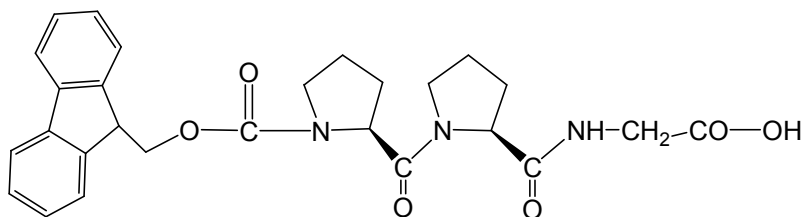
2 実施方法

(1) ペプチド合成および硫黄化合物の検討

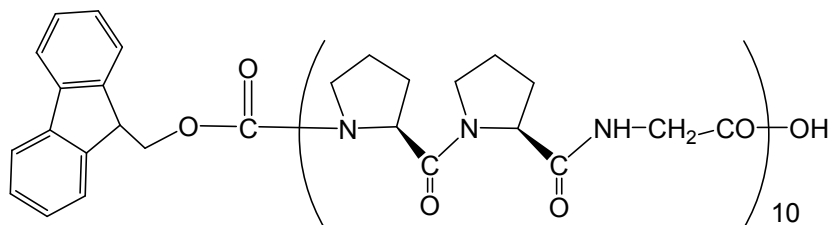
これまでに三重らせん構造を形成する事がわかっている、L-プロリン (Pro) およびグリシン (Gly) 残基を含むコラーゲンモデルペプチド ((Pro-Pro-Gly)₁₀) とそのアナログ (図2) を化学的に合成した。また、ペプチドをセンサー基板へ結合させるための硫黄化合物として、リポアミン (T. Morita *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 2850-2859, 2000) を用いた例はあるが、今回は入手が容易なリポアミド、リポ酸そしてチアゾリジン (図3) についてモデルペプチドとのカップリング反応の検討を行った。



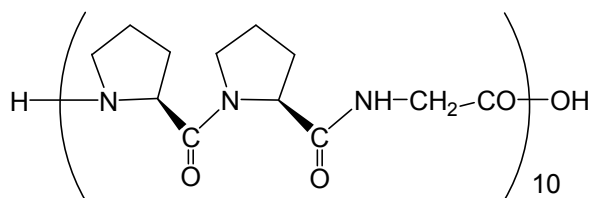
H-Pro-Pro-Gly-OBzl (peptide 1)



Fmoc-Pro-Pro-Gly-OH (peptide 2)



Fmoc-(Pro-Pro-Gly)₁₀-OH (peptide 3)



(Pro-Pro-Gly)₁₀ (peptide 4)

図2 (Pro-Pro-Gly)₁₀ とそのアナログの構造

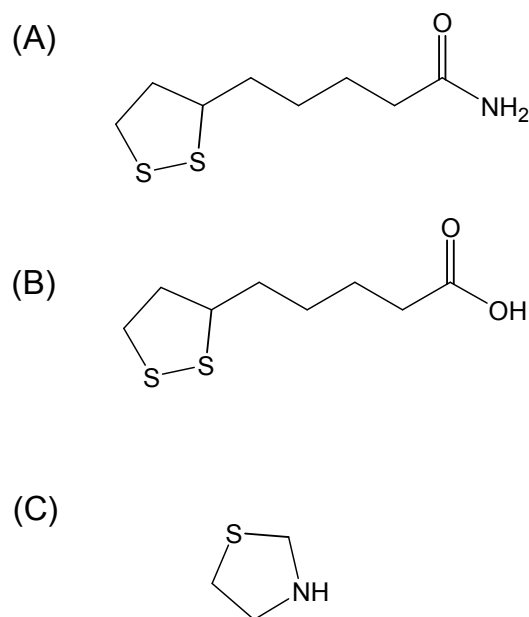


図3 リポアミド (A)、リポ酸 (B) およびチアゾリジン (C)

(1) - 1 一般的な実験の方法

薄層クロマトグラフィー (TLC)

シリカゲル 70 F254 Plate-Wako (5×20 cm) に、メタノールなどに溶かした化合物をスポットし、展開溶媒 (クロロホルム/メタノール/水 (90:10:1, v/v)) を用いて反応の進行をモニターした。

シリカゲルカラム

ガラスフィルターに Wakogel C-300 を充填し、ベンゼン/酢酸エチルの混合溶媒を用いて化合物を展開し、目的物の精製を行った。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

日本分光社製 HPLC 装置 (LC-Net II) に、Agilent 社製 ZORBAX SB-C18 カラム (4.6φ×150 mm) を装着し、水/アセトニトリル (0.05% TFA) を溶離液とし、流速 1 mL/分、波長 220 および 260 nm で化合物の分析を行った。また、同装置に分取用 Agilent 社製 ZORBAX SB-C18 カラム (20φ×250 mm) を装着し、流速 9.5 mL/min の条件で分取精製を行った。合成したペプチドは、アセトニトリルまたは水に溶解させ注入用試料を調製した。peptide 4 については、水に溶解させた試料を 90 °C の湯浴中で 5 分間加熱した後、試料注入を行った。

¹H-核磁気共鳴 (NMR)

Varian UNTY-plus300 を用いて、室温で重クロロホルム (CDCl₃) 等の各種重水素化溶媒で化合物を溶解させ、300MHz ¹H NMR スペクトルを測定した。テトラメチルシラン (TMS) を内部標準(0 ppm)としてプロトンピークの帰属を行った。

質量分析スペクトル (MS)

Applied Biosystems Mariner™ instrument を用いて、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法で測定を行った。

ペプチド固相合成樹脂へのアミノ酸置換量の算出

乾燥させた一定量の固相樹脂を秤量し、50%ピペリジン/ジメチルホルムアミド (DMF) 溶液を加え、室温で30分間攪拌した。溶液をDMFで50倍に希釈し、樹脂をろ過した後に、ろ液の吸光度を島津 UV スペクトロメーター (UV mini 1240) により波長 301 nm で測定し (1) 式によりアミノ酸置換率を求めた (日本化学会編, 第5版実験化学講座, 丸善, 第16巻, pp 284-302, 2005)。

$$\text{アミノ酸置換率 (mmol/g-Resin)} = \frac{1000 \times b \times c}{\epsilon \times a} \quad (1)$$

a : 樹脂量 (mg) b : 液量 (mL) c : 吸光度 (a.u.)

ϵ : モル吸光係数 ((mol/L)⁻¹·cm⁻¹)(7800((mol/L)⁻¹·cm⁻¹))

ニンヒドリン試験

メタノール (MeOH) で洗浄した樹脂を少量ガラス製のマイクロ試験管に取り、試薬 A (フェノール/エタノール)、試薬 B (ニンヒドリン/エタノール)、試薬 C (1 mmol/L KCN 水溶液/ピリジン) を3滴ずつ加え、沸騰水中で5分間加熱し、呈色の有無により残存アミノ基量を評価し反応の進行を確認した。

(1) - 2 液相法によるペプチド合成

グリシンベンジルエステル・*p*-トルエンスルホン酸塩 (Gly-OBzl×Tos) の合成

1L ナス型フラスコにグリシン (15.0 g, 200 mmol)、*p*-トルエンスルホン酸・一水和物 (45.6 g, 240 mmol)、ベンジルアルコール (100 mL, 0.97 mol)、ベンゼン (400 mL) を入れ、Dean-Stark 装置を用いて油浴 (100 ~ 110 °C) 中で5時間加熱した。反応混合物を放冷した後、ジエチルエーテル (80 mL) とヘキサン (80 mL) を加えて結晶化させた。結晶をろ過し、エタノール/ジエチルエーテル (50 mL/140 mL) で再結晶させた。収量 64 g、収率 98%、融点 132~134 °C。

t-ブトキシカルボニル (Boc) -Pro-Gly-OBzl の合成

500mL ナス型フラスコに Gly-OBzl×Tos (13.0 g, 38.7 mmol)、ジクロロメタン (CH₂Cl₂) (200 mL)、トリエチルアミン (3.92 g, 38.7 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) (6.28 g, 46.5 mmol)、Boc-Pro-OH (10.0 g, 46.5 mmol) を入れ、アイスバス中で十分に冷却しながらジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) (7.21 g, 46.5 mmol) を加え、アイスバスを除去し室温で5時間反応させた。TLC を用いて反応の進行を確認した。反応終了後、不溶性のウレア (DCU) をろ過し、ろ液の溶媒

を減圧下で留去した。残渣を酢酸エチルに溶解させ、水、10%クエン酸水溶液、5%炭酸水素ナトリウム水溶液そして飽和食塩水の順で分液洗浄を行った。酢酸エチル層を硫酸ナトリウム (Na₂SO₄) で脱水し、ろ過後溶媒を減圧下で留去した。残渣にジエチルエーテルを加えて DCU を析出させろ過し、ろ液を減圧下で濃縮後、真空下で乾燥させた。収量 14.0 g、収率 97.0 %。

Boc-Pro-Pro-Gly-OBzl の合成

300mL ナス型フラスコに Boc-Pro-Gly-OBzl (14.0 g, 38.5 mmol)、30%トリフルオロ酢酸 (TFA) / CH₂Cl₂ (30 mL/ 70 mL) を加え、1 時間反応させた後、減圧下で溶媒を留去した。残渣をジエチルエーテルにより結晶化させた。(収量 8.95 g、収率 60.0 %) 得られた Pro-Gly-OBzl×TFA (8.95 g, 23.8 mmol) を 300mL ナス型フラスコに入れ、CH₂Cl₂ (150 mL)、N-メチルモルホリン (NMM) (2.41 g, 23.8 mmol)、HOBt (3.86 g, 28.5 mmol)、Boc-Pro-OH (6.14 g, 28.5 mmol) を入れ、氷冷却しながら DCC (5.89 g, 28.5 mmol) を加え、室温で一晩反応させた。TLC を用いて反応の終了を確認後、DCU をろ過し、減圧下で溶媒を留去した。残渣を酢酸エチルに溶解させ、水、10%クエン酸水溶液、5%炭酸水素ナトリウム水溶液そして飽和食塩水の順で分液洗浄を行った。残渣に酢酸エチル/ヘキサンを加えて DCU を析出させてろ過し、ろ液を減圧下で濃縮した。残渣をベンゼンで溶解させ、シリカゲルカラムで精製した。収量 5.30 g、収率 44.0 %。

H-Pro-Pro-Gly-OBzl × TFA (peptide 1) の合成

200 mL ナス型フラスコに Boc-Pro-Pro-Gly-OBzl (5.30 g, 11.5 mmol)、30% TFA/CH₂Cl₂ (8 mL/27 mL) を加え、1 時間反応させた後、減圧下で溶媒を留去した。その後、残渣を真空下で乾燥させた。収量 5.08 g、収率 93.0%。

9-フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) -Pro-Pro-Gly-OBzl の合成

peptide 1 (5.08 g, 10.7 mmol) に CH₂Cl₂ (80 mL)、NMM (1.09 g, 10.7 mmol)、Fmoc-O-Su (3.80 g, 11.3 mmol) を加え、室温で 5 時間反応させた。溶媒を減圧下で留去し、残渣を酢酸エチルに溶解させ、水、10%クエン酸水溶液そして飽和食塩水の順で分液洗浄した後、エタノールで再結晶を行った。収量 5.43 g、収率 87.0 %。

Fmoc-Pro-Pro-Gly-OH (peptide 2) の合成

200mL ナス型フラスコに Fmoc-Pro-Pro-Gly-OBzl (5.43 g, 9.09 mmol) を入れ、メタノール (60 mL) で溶解させ、パラジウム/カーボン (0.50g) を加えて H₂ ガスを吹き込み、一晩反応させた。TLC を用いて反応の進行を確認し、反応終了後パラジウム/カーボンをろ過し、溶媒を減圧下で留去した。残渣をシリカゲルカラムにより精製した。収量 3.50 g、収率 63.8 %。ESI-TOF-MS (*m/z*): 492.1 [M+Na]⁺ (理論値 492.2)、1005.4 [2M+Na]⁺ (理論値 1005.1)。

(1) - 3 固相法によるペプチド合成

既存の手法（日本化学会編，第5版実験化学講座，丸善，第16巻，pp 284-302，2005）に従い、Fmoc-固相法の基本操作（図4）により、目的ペプチドの配列に沿って図5の通りアミノ酸およびトリペプチドを順次縮合させた。

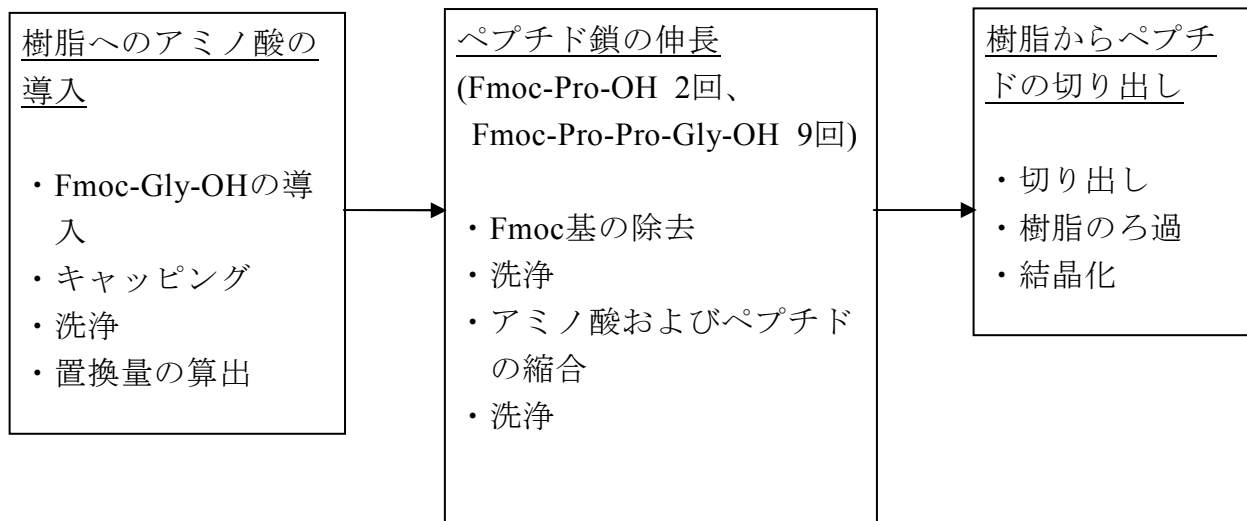


図4 固相合成の基本操作

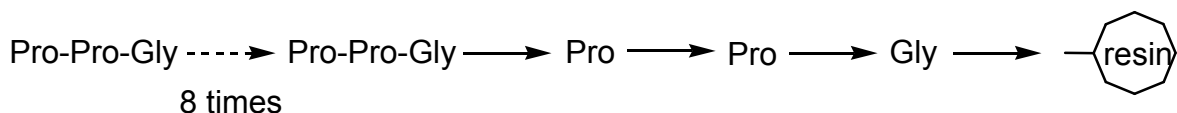


図5 固相法による $(\text{Pro-Pro-Gly})_{10}$ の合成

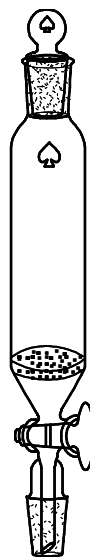


図6 ペプチド固相重合容器

樹脂へのアミノ酸の導入

固相重合用 (2-クロロトリチルクロライド) 樹脂 (286 mg, 0.40 mmol) をペプチド固相重合容器 (図 6) へ入れ、 CH_2Cl_2 (7 mL) で膨潤させ、Fmoc-Gly-OH (71.0 mg, 0.24 mmol) とジエチルアミン (DIEA) (104 mg, 0.80 mmol) を加え 60 分間攪拌した。 CH_2Cl_2 をろ過により除去した後、 CH_2Cl_2 : MeOH:DIEA (17:2:1, v/v) を 10 mL 加え 1 分間反応させ、溶液をろ過した。同様の操作を 3 回行うことにより未反応端のキャッピングを行った。その後、樹脂を CH_2Cl_2 、DMF、 CH_2Cl_2 、MeOH の順に各 10 mL で 2 回ずつ洗浄を行った後、樹脂へのアミノ酸置換量を求めた。前述の手法により、301 nm での吸光度が 0.91 であるため、式 (1) からアミノ酸置換量は 0.43 mmol/g であることが分かった。

ペプチド鎖の伸長

先に得た Fmoc-Gly-樹脂へ 5% ピペリジン/DMF を 10 mL 加えて 10 分間、さらに 25% ピペリジン/DMF (10 mL) を加え 15 分間反応させ、Fmoc 基の除去を行った。その後、MeOH (10 mL) で 3 回洗浄し、真空下で乾燥させ H-Gly-樹脂を 232 mg 得た。そこへ、DMF を加え、Fmoc-Pro-OH (135 mg, 0.40 mmol)、water soluble DCC (WSCD) (62.0 mg, 0.40 mmol) そして HOBt (54.0 mg, 0.40 mmol) を入れて 60 分間反応させた。その後、DMF (10 mL) で 6 回、MeOH (10 mL) で 3 回洗浄した後に、ニンヒドリンテストで反応の進行度をモニターして Fmoc-Pro-Gly-樹脂の生成を確認した。同様の手順と手法で、Fmoc-Pro-OH を 1 回、続いて Fmoc-ProPro-Gly-OH を 9 回反応させ Fmoc-(Pro-Pro-Gly)₁₀-樹脂を得た(278 mg)。

樹脂からペプチドの切り出し (peptide 3 および 4 の合成)

50mL のナス型フラスコに Fmoc-(Pro-Pro-Gly)₁₀-樹脂 (278 mg) を入れ、TFA/H₂O (9.5 mL/0.5 mL) を加えた後アイスバスを除去し、室温で 1 時間半反応させた。その後、不溶性の樹脂をガラスフィルターでろ過し TFA (1 mL) と CH_2Cl_2 (10 mL) で樹脂を洗浄した。ろ液と洗液を合わせ、減圧下で 1~2 mL まで溶媒を留去し、残った溶液に冷ジエチルエーテルを大量に加えて結晶化した。沈殿物を細孔のガラスフィルターでろ過し、真空下で乾燥させ Fmoc-(Pro-Pro-Gly)₁₀-OH (peptide 3) を 46 mg 得た。HPLC による分析及び分取による精製を行った後、DIEA/DMF (1.0 mL/4.0 mL) を加えて室温で 1 時間攪拌し、溶媒を減圧下で完全に留去した。その後、HPLC による分取精製を行い、(Pro-Pro-Gly)₁₀ (peptide 4) を 20 mg 得た。分析の結果、95%以上の純度であることが確認できた。目的物であることの確認は、市販品 (株式会社ペプチド研究所) との HPLC と MS スペクトルの比較で行った。ESI-TOF-MS (*m/z*): 858.8 [(M+2Na+H)/3]⁺ (理論値 858.8)、1276.8 [(M+Na+H)/2]⁺ (理論値 1276.6)。

(1) - 4 合成ペプチドと硫黄化合物との縮合反応

Peptide 1 とリポ酸との縮合反応 (Peptide1-SS の合成)

Peptide 1 (0.14 g, 0.30 mmol) をジクロロメタン (1 mL) に溶解し、リポ酸 (67 mg, 0.33 mmol) を加え、ジクロロメタン (0.5 mL) に溶解したトリエチルアミン (30 mg, 0.30 mmol) とジクロロメタン (0.5 mL) に溶解した WSCD (51 mg, 0.33 mmol) をそ

れぞれ滴下し、24 時間室温で攪拌した。反応後、反応混合物を酸性水溶液で 2 回洗浄し、ジクロロメタン溶液を硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤をろ過し、溶媒を留去した。残渣を分取 TLC により精製して生成物を得た。反応は TLC でモニターし、目的物であることの確認は $^1\text{H NMR}$ で行った。収量 53 mg、収率 28 %。

Peptide 2 とチアゾリジン (Peptide 2-S の合成) またはリポアミド (Peptide 2-SS の合成) との縮合反応

Peptide 2 (80 mg, 0.16 mmol) とチアゾリジン (10 mg, 0.18 mmol) との縮合反応を、前述の Peptide 1-SS の合成方法と同様に行い、Peptide 2-S を収量 90 mg、収率 77 % で得た。しかしながら、Peptide 2 とリポアミンとの反応では目的とする Peptide 2-SS は得られなかった。

Peptide 3 とリポアミド (Peptide 3-SS の合成) との縮合反応

Peptide 3 とリポアミドとの縮合反応を、前述の Peptide 1-SS の合成方法と同様に行ったが、目的とする Peptide 3-SS は得られなかった。

(2) センサーの作製

合成したコラーゲンモデルペプチドを利用した分離や精製を行う際、合成ペプチドの固定化密度が小さすぎると分離の効率が悪く、逆に固定化密度が大きすぎると合成ペプチド間で三重らせんを形成してしまい、フィッシュコラーゲンと三重らせんの形成が進行しない可能性がある。そこで、適切な固定化密度の制御が必要であると考えられる。ここでは、水晶振動子微量天秤を用い、合成ペプチドの固定化条件の検討を行った。コラーゲンモデルペプチドの最小単位である合成ペプチド Pro-Pro-Gly-OBzl に、水晶振動子の電極表面にチオール吸着させるためリポ酸を縮合したものを peptide 1-SS を使用した。

(2) - 1 水晶振動子微量天秤 (QCM)

水晶振動子は水晶片に金を蒸着した電極を持つ電子デバイスであり、電圧をかけることにより特定の振動数で振動する。このとき、電極上の質量変化に応じて、振動数が変化することが知られており、その関係は次の Sauerbrey 式 (G. Sauerbrey, *Z. Phys.*, **155**, 206-222, 1959) で表される。

$$\Delta f = -\frac{2f_0}{A\sqrt{\mu_q\rho_q}}\Delta m \quad (2)$$

Δf : 振動数変化

ρ_q : 水晶密度 (2650 kg/m³)

μ_q : 水晶のせん断応力 (2.947×10¹⁰ kg/(m·s²))

A : 電極面積

Δm : 質量変化

今回使用した水晶振動子は、基本振動数 8 MHz、16.6 mm² の金電極を有しており、単位面積当たりの質量変化 (ng/mm²) と振動数変化 (Hz) の関係は次式で表される。

$$\frac{\Delta m}{A} = -0.069 \text{ ng}/(\text{mm}^2/\text{Hz}) \times \Delta f \quad (3)$$

(2) - 2 合成ペプチドの固定化量測定

合成ペプチドのエタノール溶液中に水晶振動子を浸漬し、合成ペプチドを吸着、固定化した。吸着量におよぼす、溶液浸漬時間 (吸着時間) および溶液濃度の影響について調べた。操作の概要を以下に示す。

水晶振動子の洗浄

水晶振動子の電極表面全体にピラニア溶液 (硫酸と過酸化水素を体積比 7:3 で混合) を滴下して表面の有機物を除去した。ピラニア溶液を水洗後、純水中で 6 分間、続いてエタノール中で 6 分間超音波照射 (周波数 28、45、100 MHz でそれぞれ 20 秒間 6 回ずつ) した後、乾燥させた。

初期振動数測定

洗浄した水晶振動子を電気化学水晶振動子微量天秤 (ビー・エー・エス社製 モデル 410) に接続し、25.0 °C の恒温槽内で空気中の振動数を測定した。振動数変化が $\Delta f \leq \pm 1 \text{ Hz/h}$ となったときの振動数を f_1 として記録した。

振動数変化の測定

所定濃度の合成ペプチド溶液に所定時間浸漬した水晶振動子をエタノール、純水の順に洗浄した後、乾燥させ空気中 (25.0 °C) で振動数を測定、振動数変化が $\Delta f \leq \pm 1 \text{ Hz/h}$ となったときの振動数を f_2 として記録した。振動数の減少量 $f_1 - f_2$ から式 (3) を用いてペプチドの吸着量を計算した。

(3) マイクロ粒子の合成とペプチドの固定化

直径が 1.0~1.5 μm で、アミノ基を表面にもつ共重合高分子微粒子をもとに、リンカーを用いて合成したポリペプチドを接合する。共重合は、モル比で 0.4 程度まで可能であることがわかっている。したがって、われわれの微粒子は、粒子 1g あたり、1~10 μmol のポリペプチドを導入することができると見積もっている。現在、コーゲンモデルペプチドを用いる際の予備実験として、D, L-プロリンを使って、マイクロ粒子との接合実験を行っている。

3 結果

(1) ペプチド合成および硫黄化合物の検討

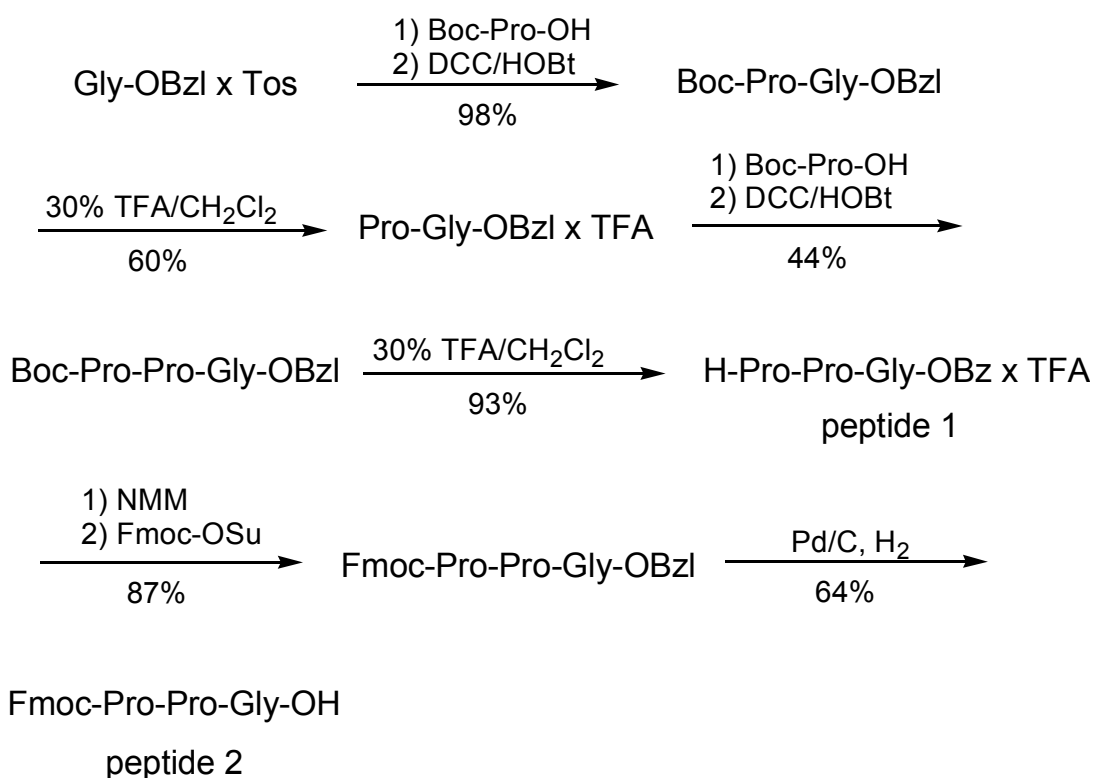


図7 peptide 1 および 2 の合成経路

液相法および固相法によるペプチド合成

既に三重らせん構造を形成する事がわかっているコラーゲンモデルペプチド ((Pro-Pro-Gly)₁₀) のアナログ (図 2) を化学的に合成した。トリペプチド誘導体 (peptide 1 および 2) は、通常の液相法で合成した。図 6 に示した通り、Boc-Pro-OH と Pro-Gly-OBzl の縮合反応による Boc-Pro-Pro-Gly-OBzl の合成では収率が 44% と低かったが、その他の化合物は比較的高収率で得る事ができた。peptide 2 の HPLC、¹H-NMR および MS スペクトルを、それぞれ図 8、9 および 10 に示した。

peptide 2 を固相重合のユニットとし、Fmoc-固相法により樹脂上で Fmoc 基のついた peptide 3 および完全に保護基を除去した peptide 4 の合成を行った。粗精製のペプチドは、それぞれ HPLC による分取・精製を行い、高純度 (>95%) で目的物を得た。なお、図 11 に固相重合が完了し、樹脂からペプチドを切り出した状態の粗精製の peptide 3 の HPLC スペクトルを示した。また、図 12 と図 13 に、それぞれ peptide 4 の精製後と peptide 4 と市販品 (株式会社ペプチド研究所、H-(Pro-Pro-Gly)₁₀-OH) との混合物の HPLC スペクトルを示した。peptide 4 は、室温では三重らせんと一本鎖の平衡関係にありピークが複雑になる事が分かっていたので、ここでは試料を 90°C で 5 分間加熱して熱変性させた一本鎖状態での分析を HPLC で行った。

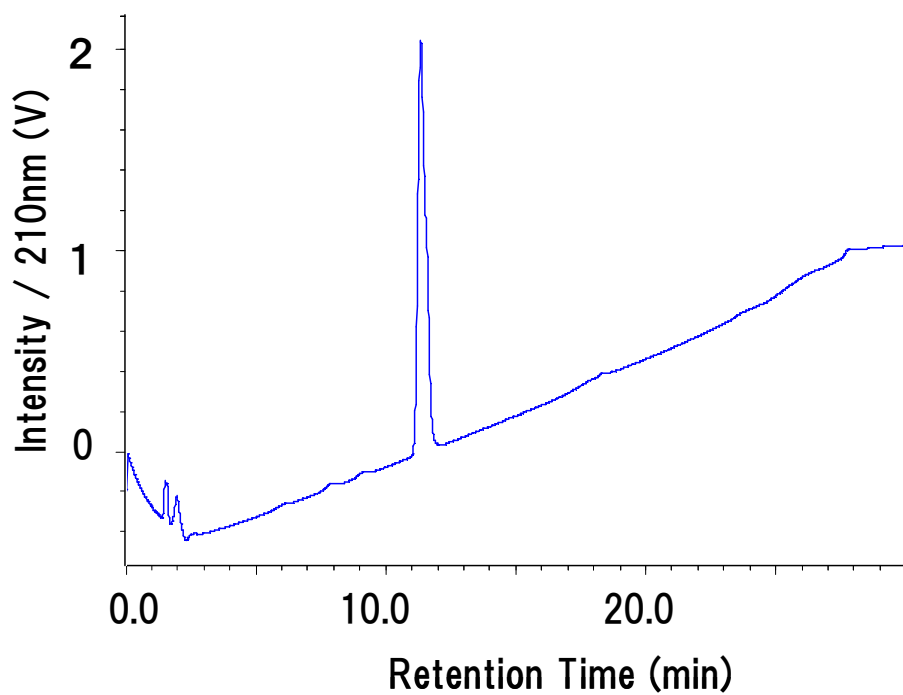


図 8 peptide 2 の HPLC スペクトル (流速 1mL/min、検出 210 nm、30—80% アセトニトリル(0.05% TFA)/25 min、30 °C)

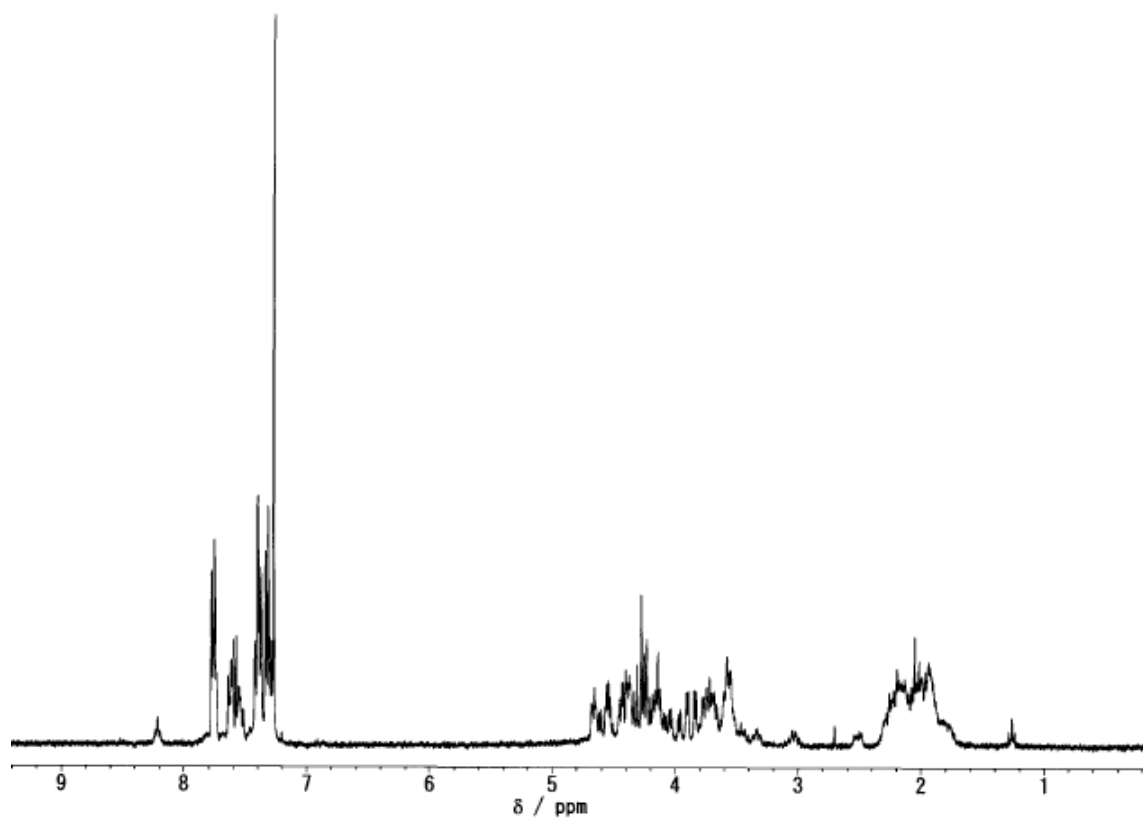


図 9 peptide 2 の 300MHz $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (CDCl_3 , 室温)

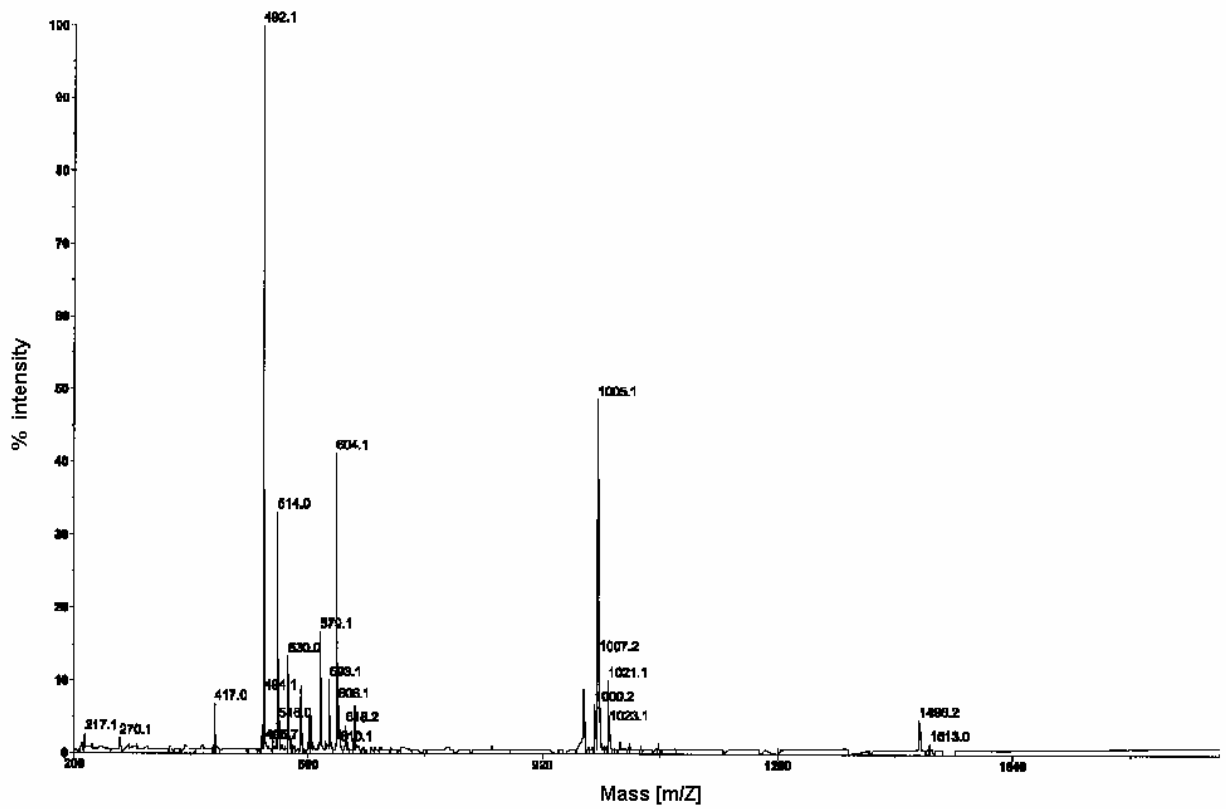


図 10 peptide 2 の TOF-MS スペクトル

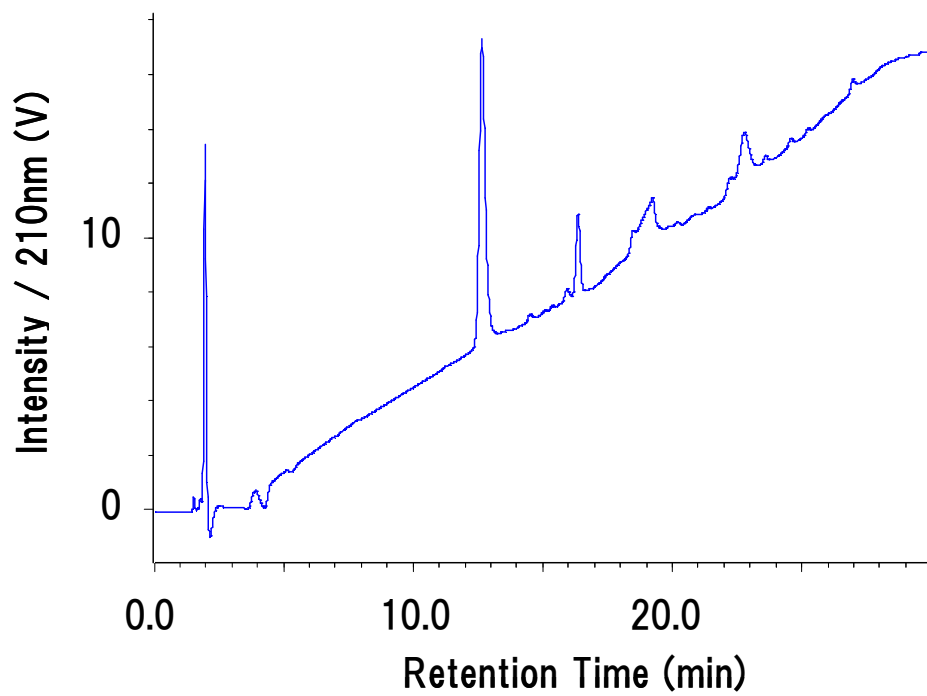


図 11 粗精製 peptide 3 の HPLC スペクトル (流速 1 mL/min、検出 210 nm、10—80%アセトニトリル (0.05% TFA) /25 min、30 °C)

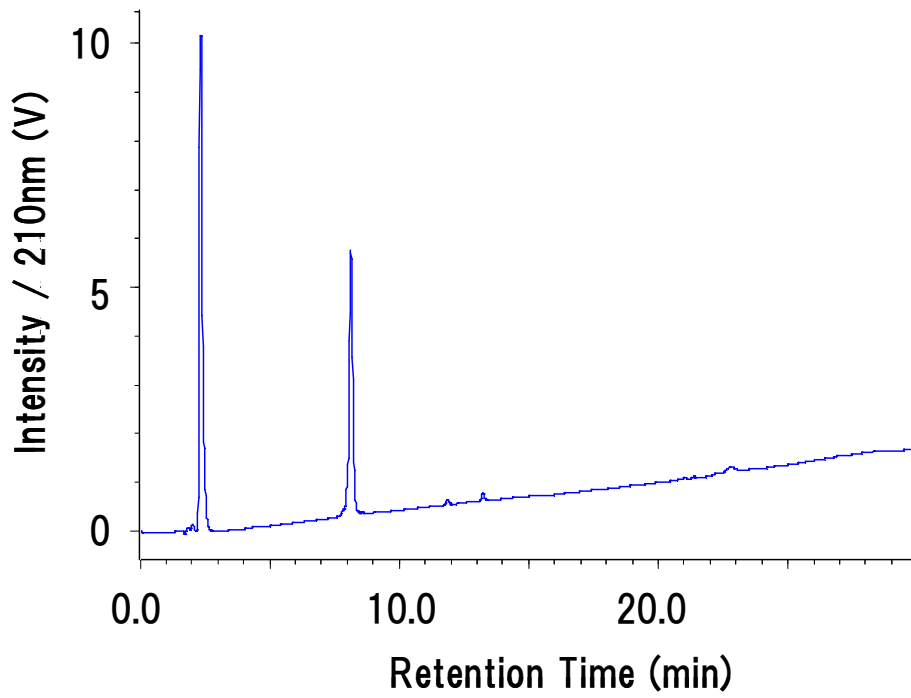


図 12 peptide 4 の HPLC スペクトル (流速 1 mL/min、検出 210 nm、10—80% アセトニトリル (0.05% TFA) /25 min、30 °C)

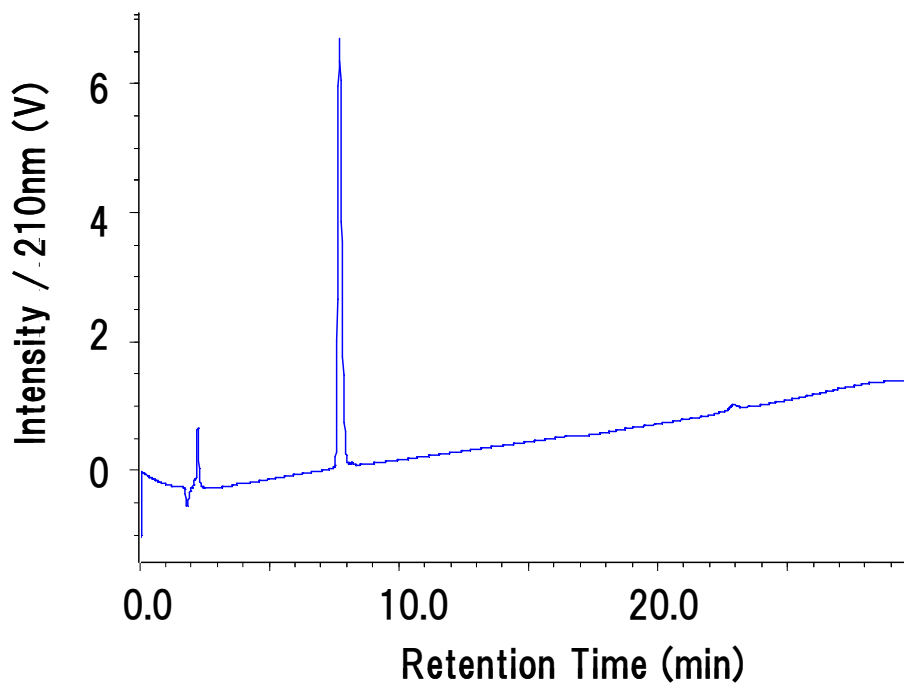


図 13 peptide 4 と市販品 ((Pro-Pro-Gly)₁₀) の混合物の HPLC スペクトル (流速 1 mL/min、検出 210 nm、10—80%アセトニトリル (0.05% TFA) /25 min、30 °C)

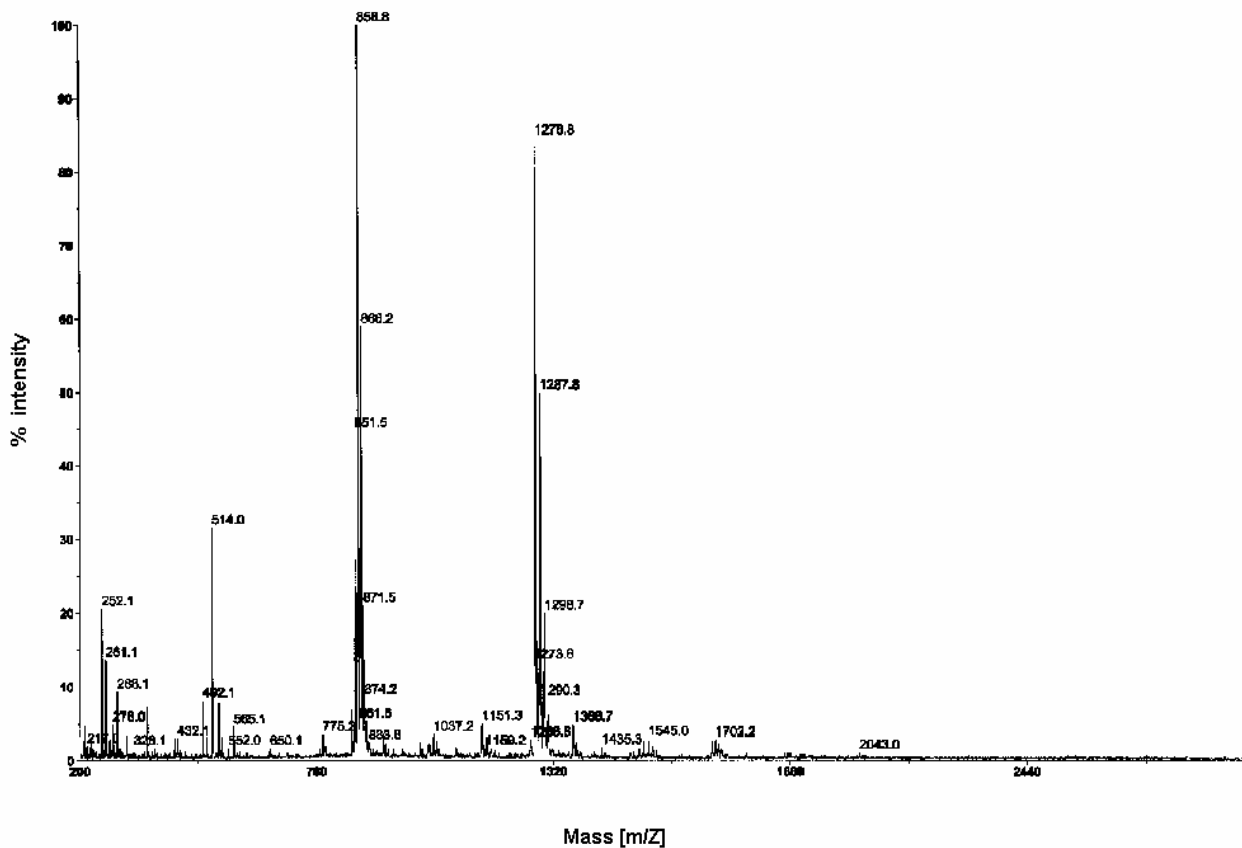


図 14 peptide 4 の TOF-MS スペクトル

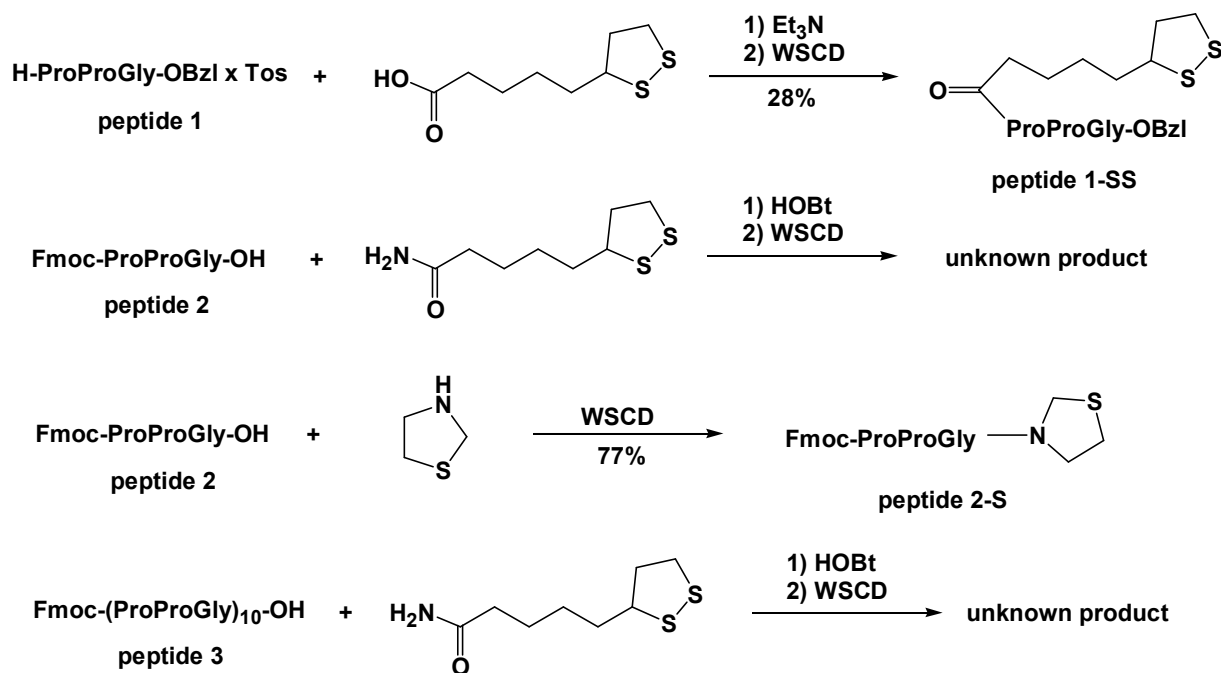


図 15 peptide 1, 2 および 3 と各種硫黄化合物との縮合反応

合成ペプチドと硫黄化合物との縮合反応

ペプチドをセンサー基板へ結合させるための硫黄化合物として、これまでに報告例のあるリポアミン (T. Morita *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 2850-2859, 2000) がある。しかし、リポアミンは市販されておらずリポアミドから誘導する必要があり、しかも前例ではその反応の収率は低い (43%)。そこで、今回は入手が容易なリポアミド、リポ酸そしてチアゾリジン (図 3) について peptide 1、2 そして 3 との縮合反応を行った (図 15)。

peptide 1 とリポ酸の反応では、収率は低い (28%) ものの目的物 (peptide 1-SS) が得られた。目的物であることの確認は、NMR スペクトルで行った。図 16 に peptide 1-SS の 300MHz $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示した。同様に、peptide 2 とチアゾリジンの反応では目的物 (peptide 2-S) が得られた (77%) が、リポアミドとの反応では目的物は得られなかった。また、peptide 2 を固相重合して得た peptide 3 とリポアミンの反応でも、目的物は得られなかった。従って、含硫黄化合物としてリポ酸およびチアゾリジンを用いた反応では今回はそれぞれ成功したが、リポアミドとペプチド (peptide 1 および 2) の反応では目的物が得られなかった。リポアミンとペプチドでは、反応が進行することが報告例から分かっている。従って、リポアミンの反応端であるアミノ基とリポアミドのアミド基では、反応性が異なるものと考えられる。

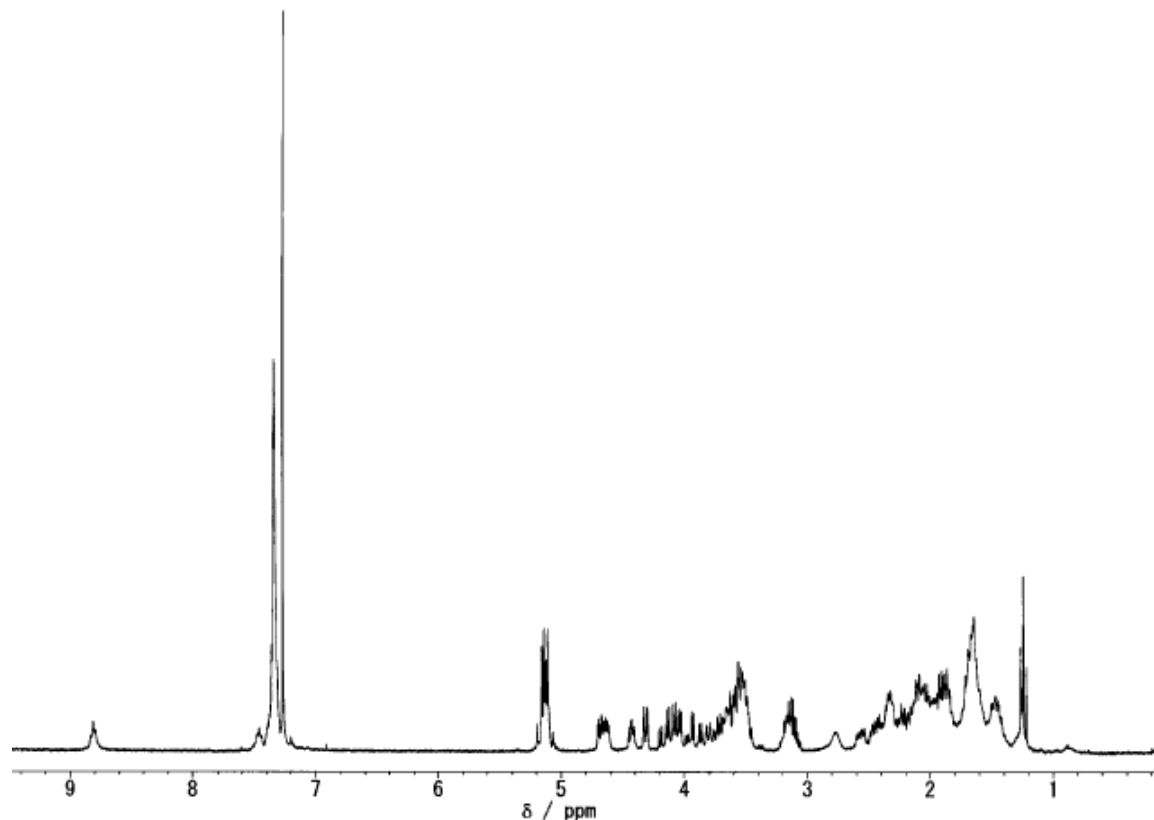


図 16 peptide 1-SS の 300MHz $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (CDCl₃, 室温)

(2) センサーの作製

合成ペプチド吸着量の吸着時間依存性

水晶振動子を 1mM 合成ペプチド溶液に浸漬した時間（吸着時間）と吸着量の関係を図 17 に示した。吸着時間が 300 分までは、時間経過と共に、合成ペプチドの吸着量は増加した。一方、吸着時間が 300 分を越えても吸着量は増加せず、飽和吸着量に達したと考えられる。合成ペプチドが直立した状態での分子占有断面積は $3.14 \times 10^{-2} \text{ nm}^2$ と見積もられる (Baum, J. and Brodsky, B., In Pain, R. H. (ed.), *Mechanisms of Protein Folding (2nd Edition)*, Oxford Univ. Press, Oxford, pp.330-351, 2000)。水晶振動子の電極面積は 16.6 mm^2 であり、この電極上に最も密に吸着したと仮定すると、 5.29×10^{14} 個のペプチドが吸着することになる。今回の実験で使用した合成ペプチドの分子量は 503 g/mol であり、理論的な最大吸着量は 26.6 ng/mm^2 に相当する。この値は実験で得られた飽和吸着量 3.17 ng/mm^2 の 8.4 倍になる。したがって、表面に均等に吸着しているとするならば十分な間隔を保って吸着していることになる。

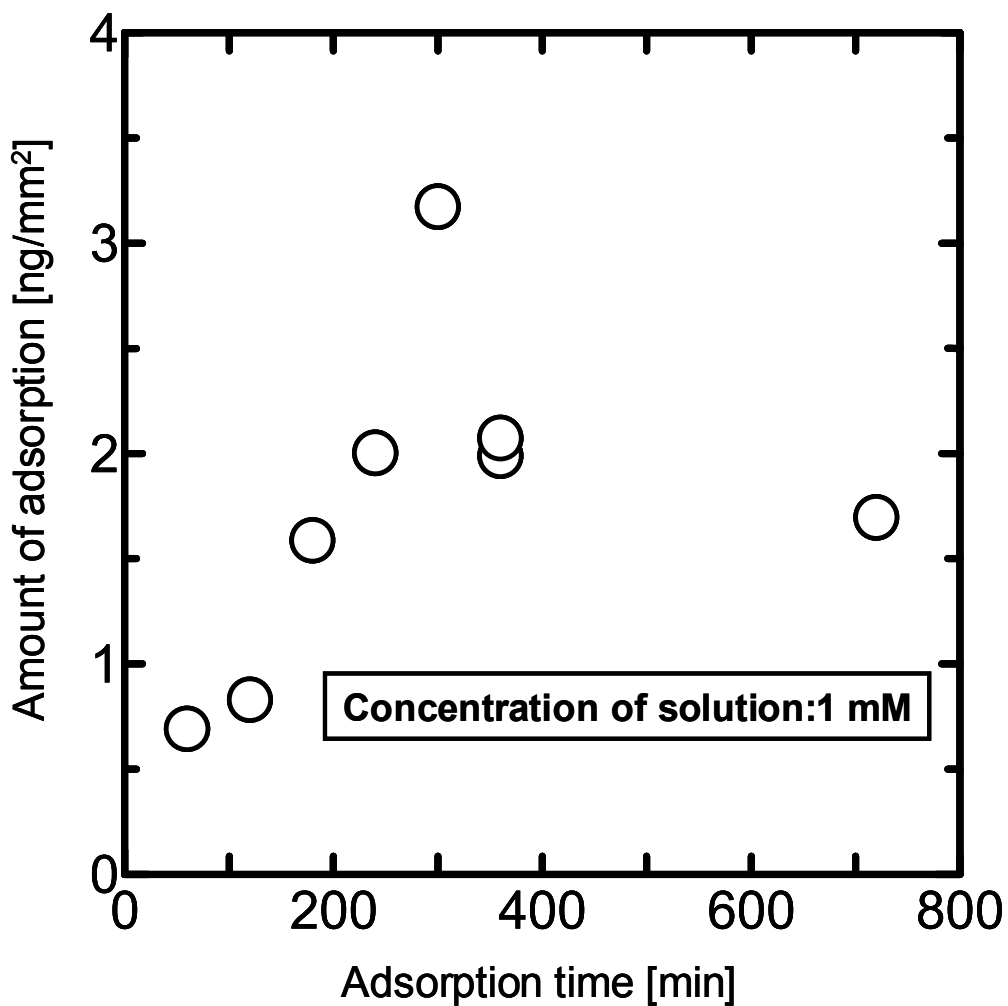


図 17 合成ペプチド吸着量の吸着時間依存性

合成ペプチド吸着量の濃度依存性

合成ペプチド溶液の濃度と吸着量の関係を図 18 に示した。合成ペプチドの吸着量は溶液濃度の増加に伴って増加し、0.1 mM 付近で最大値となった後、大きく減少した。高濃度域で吸着量が減少する理由は現在のところ明らかでないが、合成ペプチドの凝集によりチオール吸着が妨げられている可能性がある。

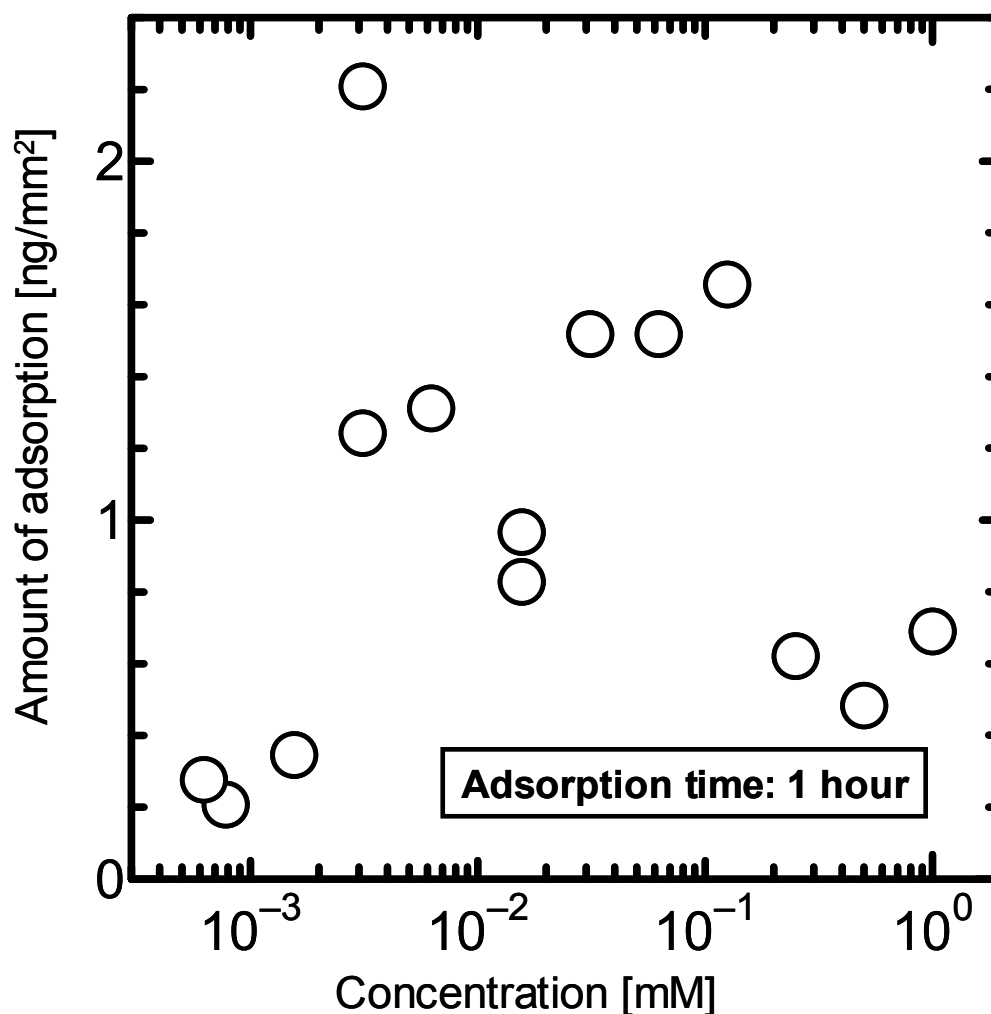


図 18 合成ペプチド吸着量の濃度依存性

合成ペプチド吸着量の制御

今回使用した水晶振動子の電極面積は 16.6 mm^2 である。一方、コラーゲンが三重らせんを形成した時の断面積は 0.785 nm^2 となる (Baum, J. and Brodsky, B., In Pain, R. H. (ed.), *Mechanisms of Protein Folding (2nd Edition)*, Oxford Univ. Press, Oxford, pp.330-351, 2000)。電極上に最も密に充填したと仮定すると、三重らせんを形成したコラーゲンは電極表面に 2.11×10^{13} 個存在できる。今回の実験における合成ペプチドの吸着量に換算すると $1.07 \times 10 \text{ ng/mm}^2$ となり、濃度 1 mM で吸着時間が 120~180 分のときの吸着量に相当することが分かった。

(3) マイクロ粒子の合成とペプチドの固定化

直径が 1.0~1.5 μm で、アミノ基を表面にもつ共重合高分子微粒子をもとに、リンカーを用いて合成ペプチドを接合する。現在、実際に合成ペプチドを用いる際の予備実験として、D, L-プロリンを使ってマイクロ粒子との接合実験を行っている。今後は、フィッシュコラーゲンの実用的で効率的な分離精製を視野に入れた分離素材の開発を予定している。

4 その他

研究のまとめ

- 1) センサーの官能基となるペプチドを、液相法により 2 種類のトリペプチド (peptide 1 および 2)、また固相重合による方法では三重らせん構造を形成する事が分かっているコラーゲンモデルペプチド (peptide 4) とその誘導体 (peptide 3) の 2 種類の計 4 種類合成した。peptide 3 および 4 の様に、アミノ酸残基数が 30 個と言うような高分子量のポリペプチドは一般に合成困難で、市販されていても非常に高価 (株式会社ペプチド研究所、peptide 4 ; 7,300 円/25mg) である。今回確立した合成法は、スケールアップが容易に行え、さらに peptide 4 と類似のアミノ酸配列を持つコラーゲンモデルペプチドであれば応用が可能である。従って、今回の合成法を応用すれば、任意のスケールで種々のコラーゲンモデルペプチドを独自に合成でき、コラーゲンセンサーや新規分離素材の開発に大きく貢献できるものと考えられる。
- 2) 合成ペプチドと金属表面への結合能を持つ硫黄化合物との縮合反応を 4 通り行い、その内 2 通りの反応でペプチドと硫黄化合物が縮合した化合物 (peptide 1-SS および peptide 2-S) を得る事が出来た。ここでは、硫黄化合物としてリポ酸とチアゾリジンが合成ペプチドとの縮合に適していることが分かった。
- 3) コラーゲンセンサーの開発を目的に、水晶振動子の電極表面への合成ペプチドとリポ酸が縮合した化合物 (peptide 1-SS) の吸着 (固定化) 条件を検討し、その吸着量を制御できる可能性が示された。今後は、peptide 4 の様に三重らせん構造を持つことが知られている種々のコラーゲンモデルペプチドをセンサーの官能基として利用し、その構造変化をセンシングに応用する実験を行う予定である。
- 4) マイクロ粒子の合成とペプチドの固定化では、現在コラーゲンモデルペプチドを用いる際の予備実験として、D, L-プロリンを使ってマイクロ粒子との接合実験を行っている。今後は、フィッシュコラーゲンの実用的で効率的な分離精製を目的に新規素材の開発を予定している。

今後の展開

コラーゲンは、医薬品、化粧品そして食品分野で幅広く利用され、中でも狂牛病等の問題とは無縁で安全性の高いフィッシュコラーゲンの需要は増す一方である。しかし、元来不溶性のコラーゲンを可溶化し均質なコラーゲンを抽出するのは未だ困難で、現行の商品の質（分子量）にもばらつきがあり、その上高価なものになっている。本研究では、今年度は水晶振動子に化学合成した1つのペプチドを結合させる事、つまり1つのセンサーの作製に成功した。今後は、今年度合成したものとは異なるペプチドを合成し、新たなセンサーを作製して個々のセンサーの実用性を評価して行く予定である。その結果は、より高感度に、より高効率でコラーゲンの質が判断できるセンサーの作製だけに留まらず、コラーゲンと最も相互作用の強い合成ペプチドの選択につながる。そこで選択された合成ペプチドを、カラム等の充填剤であるマイクロ粒子に接合すれば、付加価値の高いフィッシュコラーゲンが効率的に分離・精製できるものと考えられる。今後は、多種類のセンサーの作製と並行し、マイクロ粒子への合成ペプチドの接合実験も行う予定である。

和歌山県は、フィッシュコラーゲンの原料となる魚のウロコ、皮そして骨などには事欠かない環境にあり、本研究によりフィッシュコラーゲンの新しい分離・精製に関する技術が開発できれば、現状では廃棄物でしかない魚のウロコなどから、希少なフィッシュコラーゲンが効率よく生産できるものと思われ、需要が見込まれる健康食品、化粧品そして医薬品などに関連した地域産業の発展そして高度化が予想される。

成果発表

講演および学会発表 4件

- 1) 第7回いずみニューテックフォーラム（和泉市、07年6月7日）へのテーマ提供
土井正光、コラーゲンの新しい分離・精製技術
- 2) わかやまテクノ・ビジネスフェア07'（和歌山市、07年12月6日）において講演。土井正光、フィッシュコラーゲンの精製と評価
- 3) 第46回NMR討論会（札幌、07年9月11～13日）においてポスター発表
河原一樹、根本暢明、元岡大祐、西義則、土井正光、内山進、中沢隆、西内祐二、吉田卓也、大久保忠恭、小林祐次、¹⁹F-NMR を用いたコラーゲンモデルペプチドのフォールディング機構の研究
- 4) 「20th American peptide symposium」（Montreal、07年6月26-30日）
においてポスター発表
K. Kawahara, T. Yoshida, T. Ohkubo, S. Uchiyama, N. Nemoto, M. Doi, T. Nakazawa, Y. Nishi and Y. Kobayashi, ¹⁹F-NMR Study of Collagen Model Peptides containing 4(R)-fluoroproline.

論文 2 報

- 1) Kazuki Kawahara, Yoshinori Nishi, Susumu Uchiyama, Masamitsu Doi, Yuji Nishiuchi, Takashi Nakazawa, Tadayasu Ohkubo, Yuji Kobayashi, Effect of hydration on the thermal stability of the collagen triple helical structure, *Peptides* 2006, 584-585 (2007)

- 2) Yoshinori Nishi, Kazuki Kawahara, Susumu Uchiyama, Masamitsu Doi, Yuji Nishiuchi, Takashi Nakazawa, Tadayasu Ohkubo, Yuji Kobayashi, Effect of Hydration on the Thermal Stability of the Collagen Model Peptide Containing 4(S)-Hydroxyproline, *PEPTIDE SCIENCE* 2006, 169-170 (2007)

謝辞

本研究に使用した合成ペプチドの MS スペクトルは、和歌山県工業技術センター繊維皮革部の中村 允博士にお願いし、測定していただきました。

以上