

高弾性タンパク質レシリンをモチーフとした強靱なヒドロゲルの創製

Strong and Tough Hydrogel Using Highly Elastic Resilin as a Motif

(高分子学会推薦)

代表研究者 富山県立大学 小山 靖人 Toyama Prefectural University Yasuhito KOYAMA
協同研究者 富山県立大学 アブビンイヘサン Toyama Prefectural University Abu Bin IHSAN

Natural structural proteins such as fibroin, collagen, elastin, and resilin have a specific repeating sequence, which exhibits fibrous functions. Resilin is an extraordinary natural repeating structural biopolymer that outperforms almost any synthetic material in its combination of strength and elasticity. However, the sequence-ordered polymerization technique for polypeptide has not been sufficiently developed. Although the polycondensation of oligopeptide as a monomer can afford the corresponding polypeptide with the repeating sequence, the preparation of oligopeptide monomer itself is highly challenging. We have reported a practical synthetic technique for alternating peptides via catalyst-free three-component polymerization exploiting an aldehyde, an alkyl ammonium salt, and an ambident molecule comprising isocyanide and potassium carboxylate as the reaction components. The great advantage of our development is that the alternating peptide structure can be flexibly modified by changing the starting components, so it is not restricted to the permutations of 20 natural amino acids. The elemental reaction of polymerization is Ugi four component condensation for catalyst-free dipeptide synthesis. As the applications of our invention, we investigated (i) the impact of polypeptide sequence on thermal properties, (ii) the structural scope of alternating peptides as an adhesive material, and (iii) the creation of hydrogel comprising collagen and alternating peptide.

研究目的

蚤（ノミ）は体長の 150 倍の高さまで跳躍できることが知られている。ヒトに例えると、六本木ヒルズや東京都庁のビルを、全くの助走無しで軽々と飛び越える程である。近年、蚤の脚の強さはレシリンと呼ばれる高弾性タンパク質に起因することが明らかとなり¹, その粘弾性は天然ゴムをも凌ぐため², ポリペプチドが次世代エラストマーの母骨格として特別な注目を集めるようになってきている。

レシリンは一次構造として **GGRPSDSYGAPGGGN** というアミノ酸配列を繰り返し構造として持つ。レシリン、あるいはその物性を凌駕するような新材料の創製を目指して、遺伝子組み換え微生物を用いて 20 種類の天然アミノ酸配列を最適化しようとする研究が盛んに行わ

れているが、その組み合わせは天文学的な数になるため、構造-物性相関の網羅的な理解は大変困難な作業である。また天然のアミノ酸骨格に限定されるため、物性値には必然的に上限があると考えられる。

一方で、我々はペプチド交互共重合体を僅か 1 段階で合成する手法を最近開発している (**Figure 1**)³。アミノ酸をモノマーとして用いない合成法であり、アルデヒド、アミン、及びイソシアニドとカルボン酸を併せ持つ分子（アンビデント分子）を混合すると **Ugi** 反応を素反応とする重縮合が進行し、構造に全く乱れの無い**完全な交互共重合体**が得られる。重合は触媒が不要なクリーンな反応であり、本手法によって得られるポリマーは繰り返し構造が単純な 2 元系でありながらも、天然骨格のみならず任意の骨格を側

鎖に組み込むことが可能である。材料としての利用についても研究を開始しており、これまでに Poly(Gly-Phe) をリード化合物としたバイオグルーの合成について検討し、粘弾性のファイバーを形成する構造を見出している (Figure 1)。

本研究では、こうしたペプチド交互共重合体を母骨格として用いた。レシリンの構造や基礎物性の因子 (共有結的な架橋部位, イオン間相互作用, 水素結合, 可逆な β -ターン転移, LCST&UCST など) をペプチド交互共重合体上の置換基に組み込みながら、高粘弾性ポリペプチドを合成し、それをを用いる強靱なヒドロゲルの創製を目指して検討を行った。

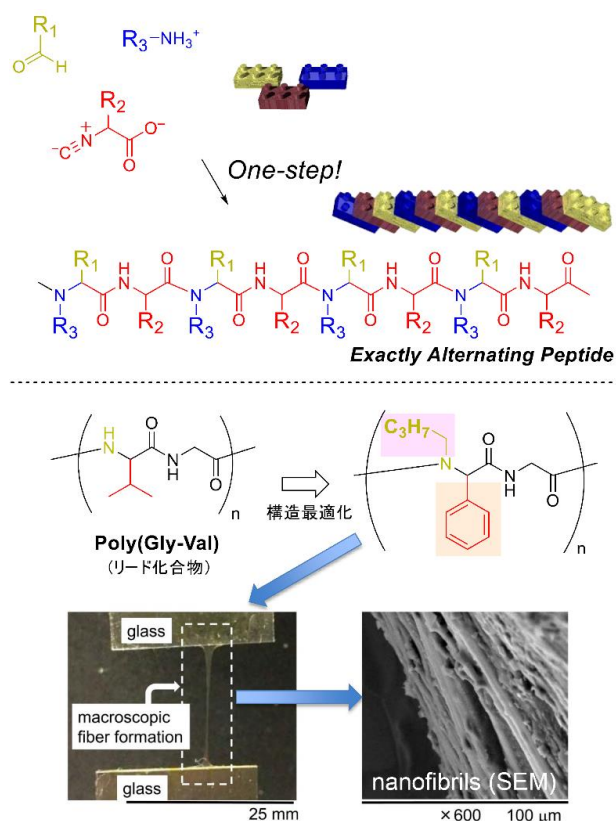


Figure 1. One-pot synthesis of alternating peptide via three-component polymerization and the fibrils of viscoelastic alternating peptide formed after a lap-shear test.

研究経過

研究は①ペプチド交互共重合体のライブラリー合成, ②ペプチド交互共重合体の力学特性と温度応答性の評価, 及び③皮膚を模倣したヒドロゲルの合成

と特性評価に分類して実施した。

ペプチド交互共重合体のライブラリー合成

まずポリマーの合成から研究を開始した。我々が開発した Ugi4 成分縮合反応を素反応とする 3 成分重合法を利用し、3 種類の重合コンポーネントの置換基構造を体系的に変化させ、多種多様なペプチド交互共重合体を合成した (Figure 2)。アルデヒド, アンモニウム塩 (X^- : 塩化物イオン, トリフラート), イソシアニド含有のカルボン酸塩 (アンビデント分子) を当モル量混合すると, 中和, イミン化, 重付加, アシル転位が一挙に起こり, 対応するペプチド交互共重合体を高収率で得た。アンビデント分子については, グリシンユニット, フェニルアラニンユニット, 及びロイシンユニットに該当する分子の合成手法を現時点までに確立している。

ペプチド交互共重合体の力学特性と温度応答性の評価

こうして得られたペプチド交互共重合体における置換基の構造と, 主鎖の剛直性, 熱物性, 分子鎖間の相互作用, 及び力学強度との関連性について評価した。

2 枚のガラス板を利用した重ね剪断試験によって合成したペプチド交互共重合体の接着力を評価した際, 偶然, 剪断応力によって接着強度が増加するようなペプチド交互共重合体を見出した (Figure 2, 下段)。Poly(Gly-Val) の骨格上にベンジル基を規則的に有するポリマーは応力を添加する度に接着強度が顕著に増加し, 最終的にはペプチド接着剤であるフィブリン糊の約 12 倍の接着強度を示すことが分かった。研究開始以前に見出していた粘弾性ポリマーと比べると 2 倍以上の接着強度であった。20 mg で 1.35 kg の荷重を軽々と支えることも可能であった。種々の解析の結果, 接着の応力依存性は①剪断応力によってポリマーが伸びきり鎖に変形することと, ②伸びきり鎖からランダムコイルへの構造緩和が遅いこと, ③伸びきり鎖間に強い相互作用が存在することに起因することが分かった。また規則的なベン

ジル基は伸びきり鎖の立体保護基として機能しており、構造緩和を速度論的に抑制する働きがあることが示唆された。

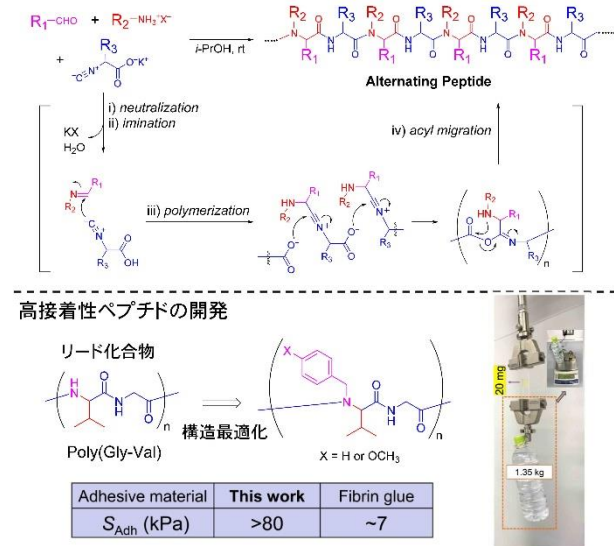


Figure 2. Ugi-4CC-based polymerization and shear-induced adhesion of alternating peptide.

一方で、ペプチド交互共重合体の温度応答性についても体系的に評価した。疎水性ユニットとしてバリン、親水性ユニットとしてグリシンを当モル量含み、且つ異なるアミノ酸配列からなる 3 種のポリマー（ジブロック、ランダム、交互共重合体）をそれぞれ合成した（Figure 3）。各種ポリマーの水中における温度応答性を評価したところ、アミノ酸組成比が全く同じであるにも関わらず、異なる温度応答性を示すことが分かった。ジブロックコポリマーは下限臨界溶液温度（LCST）型の挙動を示す一方、交互共重合体は上限臨界溶液温度（UCST）型の挙動を示した。ランダムコポリマーはポリマー中に交互共重合とブロックの両セグメントが含まれるため、UCST 及び LCST の両挙動を示した。親疎水性のバイナリーパターンと温度応答性の関連性について理論予想が報告されていたが⁴、実験結果とは逆であることが明らかとなった。

ここで用いたペプチド交互共重合体（Poly(Gly-*alter*-Val)）の親疎水性のコントラストが明確でないことが理論予想との違いの原因であるかと考え、

Poly(Gly-*alter*-Val)におけるバリンユニットのアミド窒素上に置換基（Me, Et, Pr, -CH₂CH₂OH）を導入した各種ポリマーを合成し、それらの温度応答性を評価した。しかしいずれのペプチド交互共重合体においても UCST 型の温度応答性を示すことが分かった。

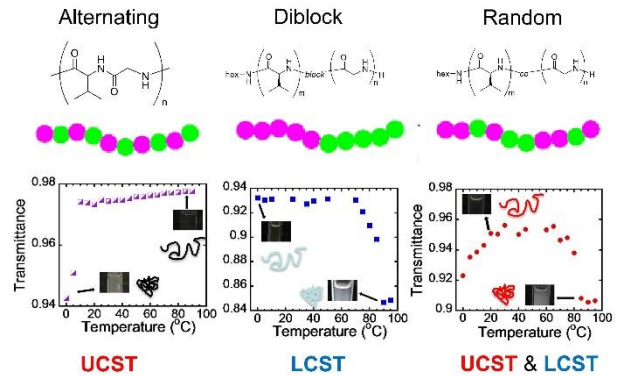


Figure 3. Thermo-responsive behaviors of alternating peptide, diblock copolypeptide, and random copolypeptide comprising a stoichiometric amount of glycine and valine units.

そこで次にバリンの置換基（*i*-Pr 基）をより疎水性な長鎖アルキレン基へと変更した。Figure 4 に示すポリマーにおいて、水溶液中で **Poly-C5-HE** は UCST, **Poly-C5-Pr** は LCST 型の温度応答性を示すことが分かった。一方、**Poly-C7-HE** は低温域では UCST と高温域では LCST を示した。**Poly-C7-Pr** は水に不溶であった。アルキレン鎖長と温度応答性の相関評価から、ペプチド交互共重合体の温度応答性は交互共重合体の親疎水バランスのみならず、疎水性置換基の分子サイズや分子鎖内相互作用の強さにも依存することが明らかとなった。

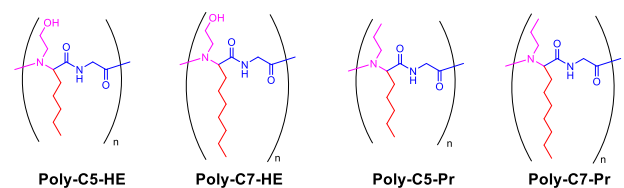


Figure 4. Structures of alternating peptides bearing hydrophobic alkylene chains.

皮膚を模倣したヒドロゲルの合成と特性評価

皮膚は構造タンパク質であるコラーゲンとエラスチンを構成成分として含んでいる。3重らせん構造からなるコラーゲンは剛直なコラーゲン繊維を形成して皮膚の形状を支え、粘弾性のエラスチン[(Val-Pro-Gly-Val-Gly)_n]がコラーゲン繊維間を連結することで、柔軟性の高い皮膚となる。そこで前項までで合成した各種ペプチド交互共重合体をエラスチン代替材料として見なし、市販のコラーゲンに添加して、物理架橋によるヒドロゲルの調製について検討した。特にペプチド交互共重合体の添加量やアミノ酸配列がヒドロゲルの力学特性に及ぼす影響を解明することを目的として研究を進めている。

現在 I 型コラーゲンに対するペプチド交互共重合体の添加効果について検証しており、現時点までに得られた成果について下記に述べる。Figure 5a に示すように、コラーゲン単独でもヒドロゲルを形成するが、ゲルは極めて脆い。このコラーゲンゲルに対し、少量のペプチド交互共重合体を加えると、顕著にゲルが強靱化することが分かった。サンプル瓶の倒置試験においても型崩れすることがないことから、ゲルが強靱化されたことが明らかである (Figure 5b)。コラーゲンに対して、ペプチド交互共重合体を 1.0~10 wt% 加え、添加量やペプチド交互共重合体の構造がゲルの力学特性に及ぼす効果について詳細に評価した。その結果、これまでに皮膚よりも 9 倍の引張強さを示すゲルを得ている。今後、ペプチド交互共重合体の構造を更に最適化するとともに、含水量の影響についても詳細に調査する予定である。

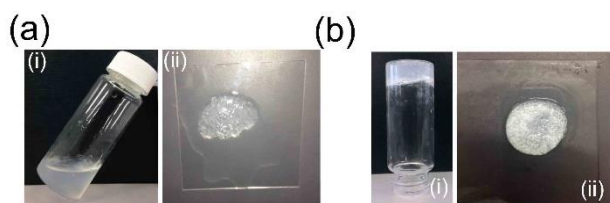


Figure 5. (a) Collagen hydrogel and (b) hydrogel consisting of collagen and alternating peptide.

考察

以上、我々が最近開発したペプチド交互共重合体のワンポット合成法を基盤とした機能性ポリペプチドの研究について、最近の研究成果について述べた。

現時点までに、応力駆動型接着剤という新たな機

能を発現するようなポリペプチドが得られたほか、ペプチド交互共重合体の精密な繰り返し構造を利用することでポリペプチドの温度応答性と構造との関連性を正確に理解することができるようになってきている。

ペプチド交互共重合体を添加した際にコラーゲンゲルが強靱化する理由をはっきりと分かっていないが、おそらくコラーゲンファイバー間の物理架橋によるものであろう。分子鎖間に導入された弱い結合は応力によって容易且つ可逆に分解する犠牲結合として機能し⁵、ゲルが強靱化されたものと推測している。

本研究で用いたペプチド交互共重合体は、定序配列ポリペプチドとしては最も単純な構造であると言える。しかし、我々が開発した重合法は、シークエンス制御されたポリマーを簡便且つ大量に合成することが可能であり、天然骨格のみならず人工骨格にも適用可能である。そのため、この合成手法の開発によって、本稿で示したように未踏領域であったアミノ酸配列と材料物性との相関解明に向けた研究を進めることが可能となった。将来、本手法を通して真に有用なポリペプチド型の生体材料を創製するよう、現在も関連研究を継続的に進めている。

参考文献

- 1) Elvin, C. M. *et al. Nature*, **2005**, 437, 999.
- 2) Qin, G. *et al. Nat. Commun.* **2012**, 3, 1003.
- 3) Koyama, Y.*; P. G. Gudeangadi, *Chem. Commun.* **2017**, 53, 3846.
- 4) Ashbaugh, H. S. *J. Phys. Chem. B.* **2009**, 113, 14043.
- 5) Fantner, G. E. *et al., Nat. Mater.* **2005**, 4, 612.

研究の発表

口頭発表

1. 小山靖人, Abu Bin Ihsan, 谷口将崇, 粘弾性タンパク質の機能を模倣したペプチド交互共重合体の合成と力学特性, 第 69 回高分子討論会, 岩手大学 (依頼講演, オンライン, 2020 年 9 月) .
2. Abu Bin Ihsan, 小山靖人, フォン・ヴィレブラン ド因子の特性を模倣した生体用接着剤の開発, 令和 2 年度富山県立大学研究協力会研究成果発表会 (オンライン, 2020 年 11 月) .
3. Abu Bin Ihsan, Masataka Taniguchi, Yasuhito

Koyama, Adhesion behaviors of bio-inspired alternating peptides, 第 69 回高分子学会北陸支部研究発表会 (オンライン, 2020 年 11 月) .

4. 小室波輝, 中島範行, 濱田昌弘, 小山靖人, LCST 型挙動を示すペプチド交互共重合体の設計と合成, 日本化学会第 102 春季年会(2022) (2021 年 3 月) .

ポスター発表

1. 谷口将崇, 小山靖人, フェニルアラニンを基質とするペプチド交互共重合体の合成と特性, 令和 2 年度北陸地区若手研究会 (オンライン, 2020 年 11 月) .

2. 小室波輝, 中島範行, 濱田昌弘, 小山靖人, LCST 型挙動を示すペプチド交互共重合体の設計と合成, 令和 3 年度北陸地区若手研究会(オンライン, 2021 年 12 月) .

誌上発表

1. Ihsan, A. B.; Taniguchi, M.; **Koyama, Y.*** Shear-induced adhesion of alternating peptides prepared by Ugi four-center three-component reaction, *Macromol. Rapid Commun.* **2020**, 200480/1-7. (Multi-component reaction in polymer science 特集号への招待論文)