

論文の内容の要旨

論文題目 アゾベンゼン含有ポリマーを認識するペプチド
の探索、評価及び応用

氏名 陳 璟

【緒言】

近年、外部刺激をもとに反応結合などの人工制御することを目指した研究が盛んに行われている。外部刺激として光、温度、pH、電場などが用いられる。これらの外部刺激の中で、反応系を汚染せずに、場所と制御のタイミングを自由に選択できるという意味で光刺激が特に有効である。光制御において光異性化分子は重要な役割を果たしている。なかでも、光照射によりトランス体あるいはシス体に異性化するアゾベンゼン分子がよく注目されて研究されている。

一方、ファージディスプレイ法に代表されるコンビナトリアルケミストリーによって、いくつかの有機、無機材料を認識するペプチドが得られている。無機材料においては金属、酸化物、半導体、それぞれに特異的に結合するペプチドが得られており、有機材料においては炭素結合のみで構成されるカーボンナノチューブ、カーボンナノホーン、フラーレンにそれぞれ特異的に結合するペプチドが得られている。さらに最近では、クロロドープしたポリピロロールやポリメタクリル酸メチルなどに結合するペプチドが得られている。これらの得られたペプチドは金属結晶の生成触媒、ナノ粒子の集積、半導体基板のパターニング、水に溶けにくいターゲット材料の分散剤及び修飾剤などといった様々な応用に適用可能である。このように、人工材料に結合するペプチドは現在、さらなる発展段階に入りつつある。

合成ポリマーは、官能基が限定されているという構造的な特性から分子認識の標的として非常に魅力的な材料である。我々は合成ポリマーが有する一次構造、

立体規則性、らせん状高分子の巻き方法方向及びそれらの集合構造に着目し、それらを識別可能なペプチドの創製と応用を目指している。光刺激に応答するポリマーとして、アゾベンゼン含有

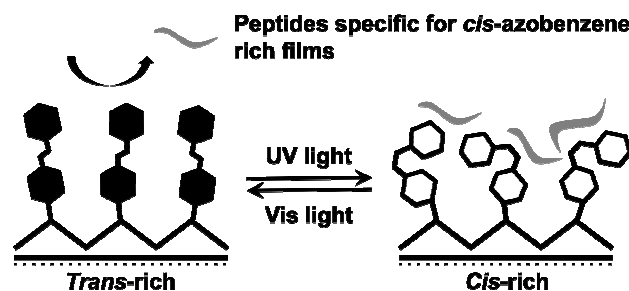


Figure 1. Schematic representation of peptides that show affinities for the *cis*-form of azobenzene groups on the polymer-film surface.

ポリマーがよく研究されている。ポリマーの側鎖にアゾベンゼンを導入する場合、モノマーの構造が自在に設計でき、またポリマー鎖上のアゾ基の密度も制御できる。さらに、ポリマーはそのものを材料としての利用できる。そこで本研究では、新たに合成した Azo-HEMA 共重合体をファージディスプレイ法のターゲットとして用い、ポリマーの側鎖に導入したアゾ基の光異性に基き結合特性がスイッチング可能なペプチドの同定を目指した (Figure 1)。

【結果・考察】

1. Azo-HEMA共重合体の合成及び評価

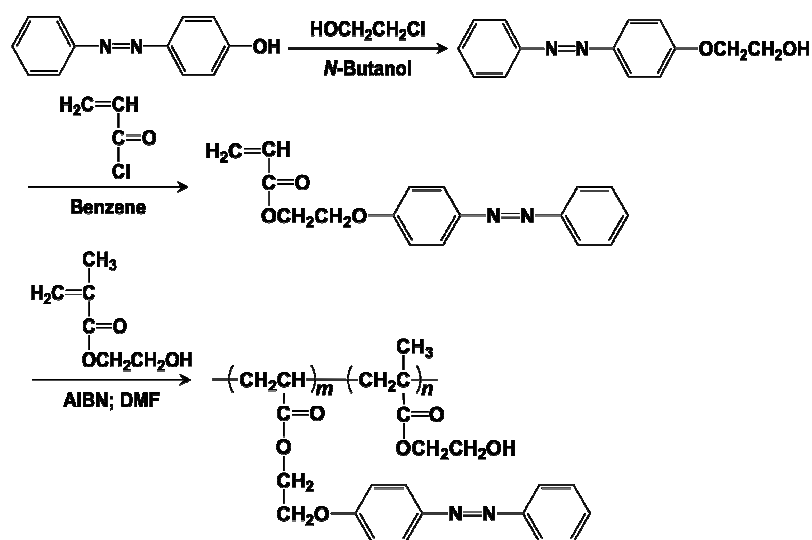


Figure 2. Synthesis of azobenzene monomer and azobenzene polymer

アゾ基の密度を疎にするため、HEMA (2-hydroxyethylmethacrylate) と共重合した (Figure 2)。選んだHEMAはアゾモノマーと共重合しやすく、構造がシンプル、親水的である。合成した Azo-HEMA共重合体はGPC (gel permeation chromatography) により分子量 (M_n) が21200で、分子量分布 (M_w/M_n) が1.69であることが分かった。 $^1\text{H NMR}$ により、ポリアゾベンゼンとポリHEMAの比率は1:2であることが分かった。Azo-HEMA共重合体のクロロホルム溶液をスピンコート (2000 rpm) により厚さが40 nmのフィルムを調製した。このフィルムにUV照射すると異性化できることをUV吸収測定により確認した。

Table 1: Air in water contact angles of azobenzene polymer under visible (Vis) and ultraviolet (UV) light

	Vis (°)	UV (°)
Mean Value	141.5	143.4
Deviation	1.3	1.5

UV照射前後のポリマーフィルムの水中空気の接触角をTable 1に示す。UV照射したフィルムの接触角は可視光下でのフィルムより大きかった。この結果はシス体アゾベンゼンがトランス体アゾベンゼンより親水的であるという報告と一致した。異性化による接触角の変化はフィルムの表面にアゾ基が出ていることが示唆された。

RP-HPLCの結果から、アゾモノマーは可視光下、アセトニトリルと水の混合溶液中では可視光下、トランス：シス=78:22で、UV照射後にはトランス：シス=27:73に変わった。可視光で、ファージ水溶液を用いて探索するため、Azo-HEMA共重合体フィルム表面にトランス体とシス体の割合はモノマーと同じだ（トランス：シス=78:22）と仮定した。

2. Azo-HEMA共重合体を認識するペプチドの探索及びクローン評価

Table 2: Characterization of phage clones.

Clone	Freq. ^[a]	Sequences ^[b]	$K_{app,vis}/10^{10}M^{-1}$	$K_{app,UV}/10^{10}M^{-1}$	$K_{app,vis}/K_{app,UV}$ ^[c]
c05	12/27	WPTPPYA	1.50	1.22	1.2
c03	3/27	WHAVPKP	1.21	0.63	1.9
c02	2/27	SQSIMRL	1.45	0.85	1.7
c04	2/27	MHQGSNT	1.01	0.52	1.9
c06	1/27	TTPNGVH	2.02	1.15	1.8
c07	1/27	SPSWLIQ	2.89	1.33	2.2
c11	1/27	HLHYALP	1.51	0.89	1.7
c12	1/27	WPTPPNP	3.68	1.30	2.8
c16	1/27	WHTLPNA	2.43	1.19	2.0
c19	1/27	ASTLPKA	1.58	1.19	1.3
c21	1/27	MHQGPNT	1.28	0.54	2.4
c23	1/27	WHTAPYA	1.36	0.78	1.8
Lib.	-	-	0.46	0.14	3.2

[a] Frequencies for the same clone in 27 isolated clones. [b] The most abundant amino acids at each position are highlighted in gray. [c] K_{app} values under visible light ($K_{app,vis}$) are divided by K_{app} values under ultraviolet light ($K_{app,UV}$)

可視光の下でAzo-HEMA共重合体フィルムをターゲットとして、ファージディスプレイ法を用いてスクリーニングを行った。7-merのランダムなペプチド配列を提示するファージライブラリーを用いた。Biopanningを四ラウンドまで行ったところ、ファージの回収率が上がった。四ラウンドのファージクローンの配列を27個読んだ結果をTable 2に示す。ペプチド配列の相同性から考えると、WHTXPNA (Xは疎水的なアミノ酸) がAzo-HEMA共重合体フィルムに特異的な結合するモチーフであることが示唆された。ペプチドc16はモチーフとよく一致した。

ELISAs (Enzyme-linked immunosorbent assays) により、Azo-HEMA共重合体フィルムに対するファージクローンの結合を評価した。クローンの濃度を10~200 pMの間で変化させ、各濃度におけるトランス体、シス体フィルムに対する結合量を定量した。結合量は濃度に対して飽和型の曲

線を示した。曲線をLangmuir型の結合等温式を仮定してフィッティングし、見かけの結合定数 (K_{app}) を決定した (Table 2)。得られた見かけの結合定数は10の10乗と非常に大きな値を示した。この値はペプチドのみの値と考えると大きすぎる値である。これはファージ末端に提示する5コピーのペプチドの特異的な結合及び巨大なファージボディがAzo-HEMA共重合体との非特異的な吸着、二つ影響によるものと考えた。

トランスとシスフィルムに対する見かけの結合定数の比を選択性の指標として計算した。ファージライブラリーを含む、全てのファージクローンは可視光下のフィルムと高い親和性を示した。しかし、全てのファージクローンの選択性はライブラリーの3.2より小さかった。つまり、ファージボディはトランス体アゾベンゼンと吸着しやすく、ペプチドはシス体アゾベンゼンに相対的に強く結合することを示唆した。

3. 合成ペプチドとAzo-HEMA共重合体フィルムの結合評価

ペプチドの結合を正しく評価するために、ペプチドを化学的に合成して、QCM (quartz crystal microbalance) 及びSPR (surface plasmon resonance) により評価した。QCM測定の精度を上げるため、ペプチドのC末端にbiotinつきリシンを導入して、biotinとstreptavidinの相互作用により結合量を拡大した。ペプチドc11 (モチーフと一致しない), c04 (モチーフと二つアミノ酸が同じ), c05 (モチーフと四つアミノ酸が同じ), c16 (モチーフ) 各1 μ M、1 h でUV照射前後のフィルム

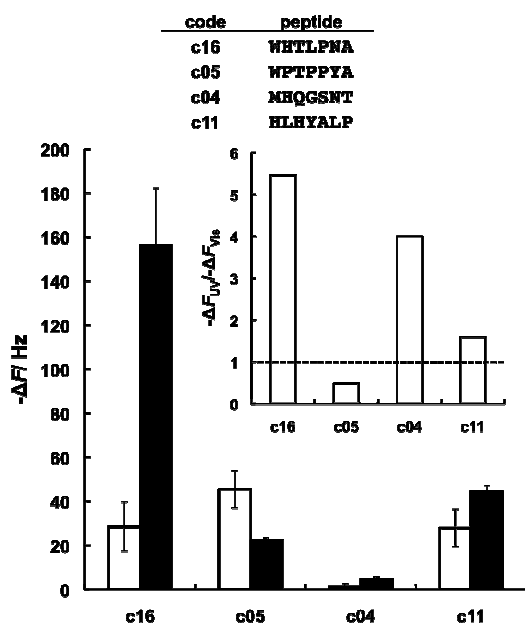


Figure 3. Frequency changes of streptavidin at 50 nM for polymer films precoated with the C-terminally amidated c16, c05, c04 and c11 peptides at 1 μ M for 1 h under visible (white) and UV light (black). The inset shows the ratios of the frequency changes under UV light to that under visible light.

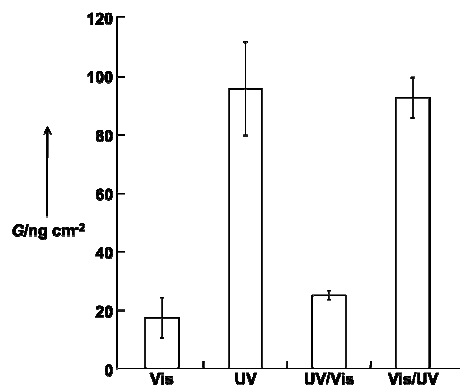


Figure 4. Saturated binding amounts of streptavidin at 50 nM for polymer films pre-bound with the c16 derivative peptide at 1 μ M for 1 h under visible (Vis) and ultraviolet (UV) light, initially under ultraviolet and subsequently visible light (UV/Vis), and the reversed combination (Vis/UV).

Table 3. SPR kinetic parameters for the c16 peptide

Polymer film	$k_1(M^{-1}s^{-1})$	$k_{-1}(10^{-4}s^{-1})$	$K_a(10^6M^{-1})$
Under visible light	37	2.8	1.3
Under UV light	760	5.5	14

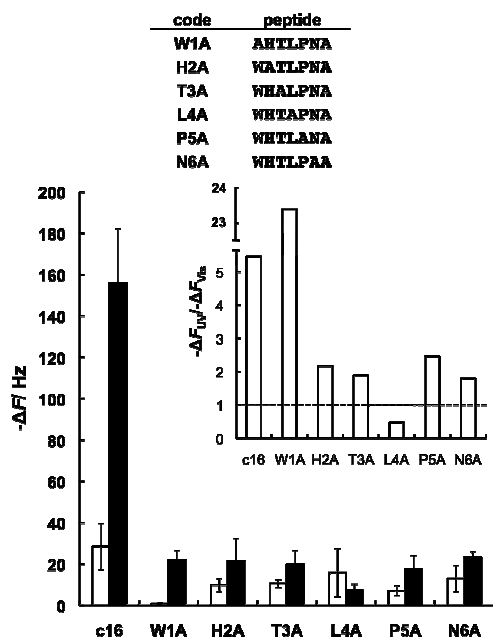


Figure 5. Frequency changes of streptavidin at 50 nM for polymer films precoated with the mutant peptides of W1A, H2A, T3A, L4A, P5A, and N6A at 1 μ M for 1 h under visible (white) and UV light (black). The inset shows the ratios of the frequency changes under UV light to that under visible light. The peptides are C-terminally amidated.

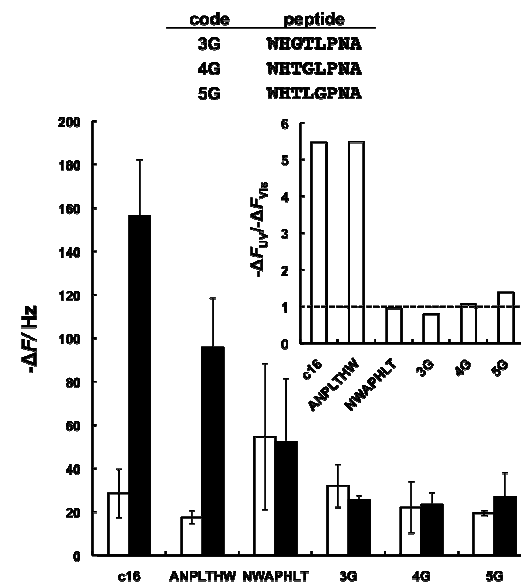


Figure 6. Effects of insertion of a G between H2-T3, T3-L4 and L4-P5 of the c16 peptide on the binding to the polymer films. The binding activity was assayed as described in Figure 5. The inset shows the ratios of the frequency changes under UV light to that under visible light. The peptides are C-terminally amidated.

に結合させた後に streptavidin を結合させた結果を Figure 3 に示す。Insert 図は UV 照射したフィルムが可視光フィルムとの割合でペプチドの選択性を見なした。モチーフを持つ c16 はもともとシス体フィルムと多い結合量、高い選択性を示した。ペプチド c16 に注目し、振動数変化を結合量に計算した結果を Figure 4 に示す。フィルムをシス体からトランス体へ異性化させると、結合量は減少した (Figure 4)。逆にフィルムをトランス体からシス体へ異性化すると、結合量は増加した。ペプチド c16 と Azo-HEMA 共重合体フィルムの結合は光照射により可逆的に制御できることが示唆された。

SPR により UV 照射前後のフィルムに対する c16 ペプチドの結合速度定数 (k_1)、解離速度定数 (k_{-1})、結合定数 (K_d) を決定した (Table 3)。ペプチド c16 はトランス体アゾベンゼンよりシス体アゾベンゼンとの結合速度が速く、シス体アゾベンゼンとの結合定数はトランス体アゾベンゼンとの 10 倍以上の値を示した。

ペプチド c16 のシス体アゾベンゼン結合モチーフを詳細に検討するため、構成アミノ酸をアラニン (Figure 5) に変え、同様に QCM により評価した。ペプチド W1A はほとんどトランス体 Azo-HEMA 共重合体フィルムと結合しないことから、c16 より高い選択性を示した。アラニンに変えると、全ての変異ペプチドはシスアゾベンゼンとの結合量が落ちた。さらに、構造が似ているアミノ酸に変えても選択性及びシス体フィルムとの結合量が落ちた (data not shown)。このように全てのアミノ酸は重要であることを示した。

グリシンをリンカーとしてc16配列の2,3位、3,4位、4,5位の間を導入して、同じQCM法により評価した (Figure 6の3G, 4G and 5G)。しかし、シス体フィルムとの結合量も選択性も落ちた。配列の連続性も重要だと示唆した。

C16ペプチドをシャッフル (Figure 6のNWAPHLT) すると選択性はなくなった。意味深いのは逆の配列 (Figure 6のANPLTHW) も高いシス体選択性及び多い結合量を示した。シス体フィルムとの認識はモチーフの一次構造に由来することが示唆された。

4. C16-GFPとAzo-HEMA共重合体フィルムの結合評価

ペプチドc16をリンカー (GGGSGGGG) 介して蛍光蛋白質GFPのN末端に導入し (c16-GFP)、大腸菌により発現し、精製した。Wild typeのGFP (wGFP) はUV照射前後のAzo-HEMA共重合体フィルムに50 nMの濃度で非特異的に吸着しないことがQCMにより観察した (Figure 7)。C16-GFP融合蛋白質は50 nMの濃度で可視光下でのフィルムとほとんど結合しなかったがUV照射したフィルムの場合に振動数が約90 Hz減少した (Figure 7)。ペプチドは大きい蛋白質に融合してもシス体ポリマーフィルムを認識することが分かった。

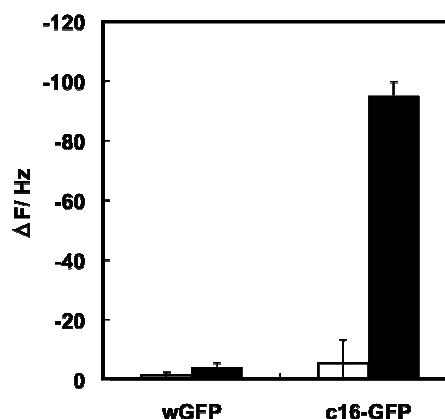


Figure 7 Frequency changes of wGFP and c16-GFP at 50 nM for polymer films after 30 min under visible (white) and UV light (black).

【結論】

Azo-HEMA共重合体に特異的に結合するペプチドをファージディスプレイ法により探索した。シス体Azo-HEMA共重合体フィルムを認識するモチーフはWHTLPNA (ペプチドc16) であることが分かった。C16ペプチドはAzo-HEMA共重合体フィルムとの結合が光の照射により制御できた。モチーフの全てのアミノ酸は重要で、他のアミノ酸で置き換えるはできないことが分かった。配列の連続性も重要であり、認識は一次構造で決まることが示唆された。さらに、ペプチドc16融合蛍光蛋白質 (c16-GFP) もシス体Azo-HEMA共重合体フィルムを認識することが分かった。

本研究により光をスイッチとして生体分子と合成ポリマーフィルムの結合を制御することに成功し、光制御できる新しいバイオシステムの構築に関する新たな基礎的知見を提供することができた。