

コラーゲン様三重らせんペプチドを利用した生化学研究

小 出 隆 規

コラーゲンは我々のからだの総タンパク質量の約3割を占めるタンパク質である。I型に代表される線維形成コラーゲンでは、ポリペプチドの三重らせんがさらに束ねられて線維を形成する。コラーゲン線維は、組織形態の維持と機械的強度の付与に不可欠な役割を果たしている。一方、コラーゲンは接着した細胞の機能や運命を制御したり、血管損傷部位で血液凝固を惹起するといった、多細胞動物の高次の営みを制御するシグナリング分子としても重要な役割を担っている。これまでにコラーゲンの三次構造やその特異な生物機能についての研究には、化学的に合成された三重らせんペプチドが有効に利用されてきた。コラーゲンの構造を模倣するペプチドを、いかにデザインし、何のためにどのように用い、そして何が明らかになったかについて最近の知見を含め解説したい。

1. はじめに

一万人を超える本誌読者の中で、本稿のキーワードである「コラーゲン」、「ペプチド」という言葉をご存じない方はいないであろう。いや、この二つの言葉ほど、生化学の専門用語としてわが国の人口に膾炙（かいしゃ）しているものは他にないのではなからうか。近年はしばしばこの二つの単語はつながって、「コラーゲンペプチド」となる。そして、そのように呼ばれる物質を皮膚に塗布、あるいは経口摂取（字義どおり「人口に膾炙」）することによって、人々は美しくなったり、健康になったりするらしいと聞く。このコラーゲンペプチドと呼ばれる物質は、動物由来のコラーゲンを変性、断片化したもの、すなわちゼラチンを消化して得られるペプチドの総称である。

本稿で述べる内容は、上記のようなコラーゲンペプチドと呼ばれる物質がヒト身体に及ぼす生理的効果に関するも

のではないことをまずはお断りしておく。ここで用いる「コラーゲン様ペプチド」という言葉は、コラーゲン分子を特徴づけている特異な三重らせん構造を模倣するようにデザインされた化学合成ペプチドを指す。精緻にデザインされたコラーゲン様ペプチドを利用することによって、動物の組織から抽出された天然コラーゲンそのものを用いては知ることができなかった、コラーゲンの精密な構造や多彩な生物機能が次々と明らかになってきた。また最近では、コラーゲン様ペプチドの超分子集積体を作成することによって細胞の振る舞いを制御しようとする、バイオマテリアルの開発を指向した試みも盛んになってきた。

2. コラーゲン

細胞外マトリックス（ECM）は、多糖とタンパク質からなる超分子複合体であり、多細胞動物の細胞同士を結びつけることによって組織構造を維持するのに役立っている。ECMを構築するタンパク質の中で最も多量に存在するのがコラーゲンである。

コラーゲンは、Gly-X-Y（X、Yは様々なアミノ酸。X位にはPro、Y位には4-ヒドロキシプロリン（4-Hyp）が多い）の繰り返しからなるポリペプチドが同じ向きに3本寄り集まって形成された三重らせん構造の存在によって特徴づけられるファミリータンパク質の総称である。コラーゲン三重らせん構造の詳細は、コラーゲン様ペプチドのX

早稲田大学先進理工学部化学・生命化学科（〒169-8555 新宿区大久保3-4-1）

Application of collagen-like triple-helical peptides to biochemical studies elucidating the collagen structure and functions

Takaki Koide (Department of Chemistry and Biochemistry, School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, 3-4-1 Okubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan)

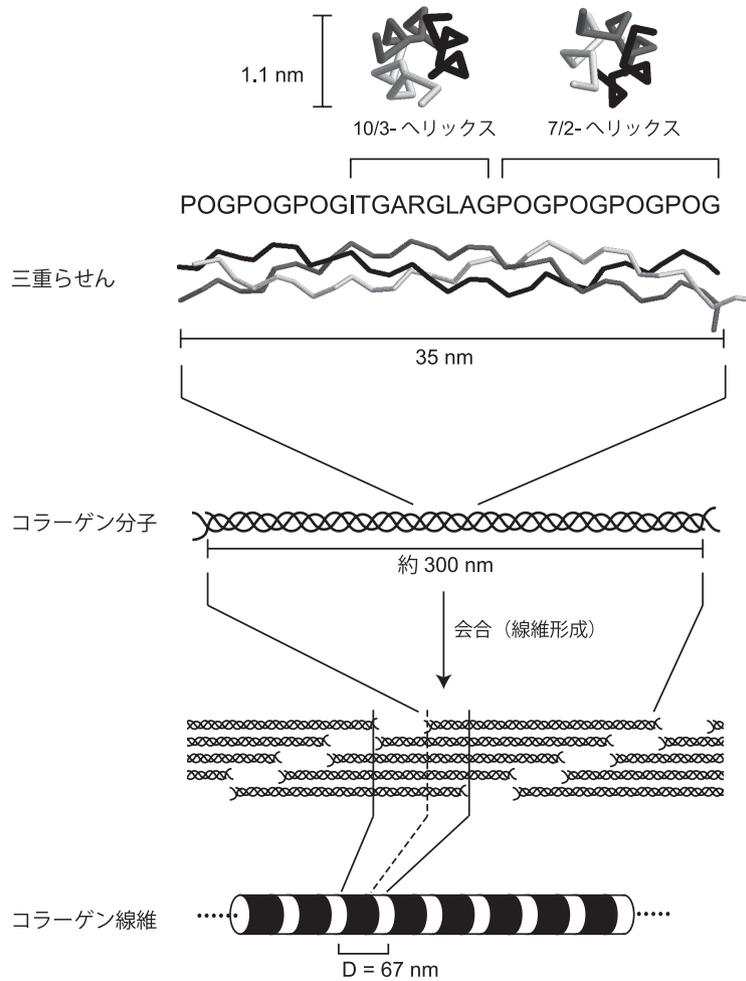


図1 コラーゲンの階層構造

(上段) コラーゲン三重らせんの構造. T3-785 ペプチドの X 線結晶構造 (1BKV). 一次構造中の O は 4-ヒドロキシプロリン (4-Hyp) を示す. (中段) I, II, III 型のような線維形成コラーゲンの三重らせん分子. (下段) コラーゲン分子はさらに自己集合して周期 (D-period) をもつ線維を形成する.

線結晶構造解析により明らかになったものである¹⁾. 図1上段にはヒト III 型コラーゲンの 785-796 配列を含むペプチド T3-785 の X 線結晶構造を示した²⁾. コラーゲン三重らせんは、左巻きポリプロリン II 型ヘリックスが緩く右巻きにより合わさった超らせんで、3 アミノ酸毎に配置される Gly 残基が中央に寄り集まって芯を形成している。らせんのピッチはアミノ酸配列に依存し、イミノ酸が豊富な部位は強く巻きついた超らせん (7/2 ヘリックス), Pro や 4-Hyp の少ない部分は緩い超らせん (10/3 ヘリックス) を形成する。I, II, III 型のような線維形成コラーゲンでは、300 回以上の Gly-X-Y 配列の繰り返しが、長さ 300nm のコラーゲン分子を形成している (図1, 中段)。さらに、コラーゲン分子は、長軸方向に約 1/4 ずつずれながら自己集合し、67nm の周期 (D-period) をもつ線維となる (図1, 下段)。

ヒトではこれまでに I 型～XXIX 型が同定されている³⁾。

ECM 中でコラーゲンの三重らせん分子は、さらに自己集合し超分子構造体を形成している。その超分子の形態によって、コラーゲンファミリーは、線維形成型 (I, II, III, V 型など), ネットワーク形成型 (IV 型など), FACIT (fibril-associated collagens with interrupted triple helices) 型 (IX, XII 型など), 膜貫通型 (XIII 型など), その他の型に分類される。コラーゲンの中で、最も多量に存在するのは線維形成型に分類される I 型であり、全コラーゲン量の約 9 割を占めるとされている。

I 型コラーゲンは、骨や腱の主成分であるだけでなく、ほとんどの結合組織に分布し、多細胞動物のからだの形態と強度を維持している。III 型コラーゲンは血管壁の強度を維持するのに重要である。また、基底膜の主要な構成成分である IV 型コラーゲンは、上皮系と間葉系細胞との境界面を形成している。

このような構造タンパク質としてのコラーゲンの重要性

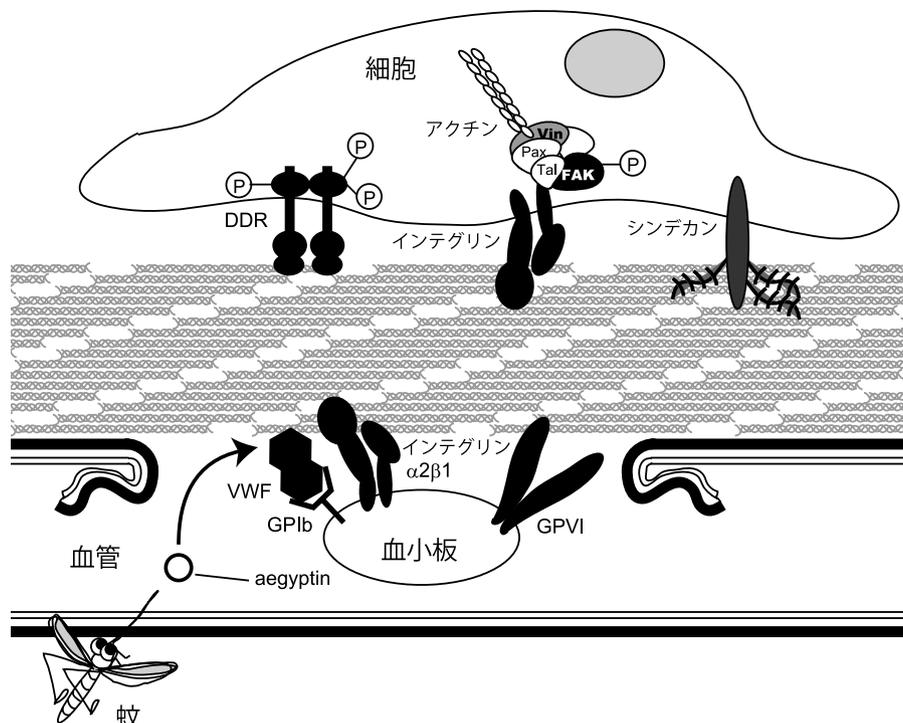


図2 さまざまなタンパク質との相互作用を介したコラーゲンの機能

DDR, discoidin domain receptor-1 or -2; FAK, focal adhesion kinase; Tal, talin; Pax, paxillin; Vin, vinculin; VWF, von Willebrand factor; GPIb, glycoprotein I-b; GPVI, glycoprotein VI.

は、コラーゲンの生合成に必須の分子シャペロンである Hsp47 (heat-shock protein 47) の遺伝子を両アレルで欠失させたマウスの表現系を見れば容易に理解できる⁴⁾。このマウスは胎生 11.5 日で死に至るが、その胎児は、あらゆる結合組織が脆弱であり、直接の死因は大血管の破裂による失血死であるものと推定された。

しかし、コラーゲンは単に多細胞動物組織の骨組みとして働くだけではない。たとえば、細胞の分化・運命決定、創傷治癒、血液凝固、血管新生など高等動物の高次の営みを直接的あるいは間接的に制御するシグナリング分子としても重要な役割を担っている。このような生物活性は、コラーゲンと生体高分子（タンパク質や多糖）との相互作用によって引き起こされる。これまでに数十のコラーゲン結合タンパク質が同定され、その機能を探ることによってコラーゲンが果たすシグナリング分子としての役割が明らかになりつつある⁵⁾。

図2に示したように、ECMに埋め込まれた細胞は、discoidin domain 受容体-1 および 2 (DDR-1, -2) や、コラーゲン結合型インテグリン、シンデカンなどのプロテオグリカンなどを介してコラーゲンと結合し、細胞内へシグナルが伝達される。

また、血液凝固は、少なくとも3種のコラーゲン結合タンパク質とコラーゲンとの結合が引き起こす生理的過程である。血清タンパク質であるフォンビルブラント因子

(VWF)は、血管損傷により露出したコラーゲンに結合し、glycoprotein Ib (GPIb) を介した血小板との相互作用を引き起こす。血小板にはインテグリン $\alpha 2\beta 1$ と glycoprotein VI (GPVI) の2種のコラーゲン受容体が存在し、これらがコラーゲンと結合することによって、血小板が活性化される⁶⁾。また、興味深いことに、吸血性蚊の唾液は aegyptin というタンパク質を含み、これがコラーゲンに結合することにより、VWFとコラーゲンとの相互作用を妨げ、吸血時の血液凝固を防いでいるらしい⁷⁾。

ここで強調しておきたいのは、これらのコラーゲン結合タンパク質は、コラーゲン三重らせん構造上に提示されたアミノ酸配列を特異的に認識して結合し、タンパク質の構造変化や、細胞の反応を引き起こしているということである。

3. コラーゲン様三重らせんペプチド

主要な型のコラーゲンは家畜等の動物組織から比較的容易にかつ多量に精製することができ、市販品も入手しやすい。しかし、コラーゲン三重らせんの構造解析や、機能の解析、特にタンパク質との相互作用などの研究において、天然のコラーゲンをそのまま実験に使用することは、しばしば困難を伴う。なぜなら、コラーゲンは、他のECMタンパク質同様巨大な分子サイズの多機能タンパク質であり、かつ生理的バッファー中で容易にゲル化するからであ

る。さらに、一般のタンパク質化学では第一選択である、細菌や酵母を宿主とした遺伝子組換えタンパク質産生系も、コラーゲンの研究にはあまり役には立たなかった。コラーゲン三重らせんドメインの Gly-X-Y の繰り返し配列中にある、Y 位 Pro 残基は翻訳後修飾により水酸化され、そのほとんどが 4-Hyp となっているためである。このような困難は、化学的にペプチドを合成し、それを利用することによって解決できる。

コラーゲンの三重らせん構造を模倣するペプチドの利用は、今から約 40 年前の榊原らの (Pro-Pro-Gly)_n および (Pro-4-Hyp-Gly)_n の合成にはじまる^{8,9)}。それ以降、類似の構造をもつ多数のペプチドが合成され、活用されてきた。これまでに得られたコラーゲン三重らせんに関する詳細な構造情報はほとんど合成ペプチドを用いた解析から得られたものであると言ってよい¹⁾。

ここで、化学合成するコラーゲン様ペプチドの分子デザインについて解説する。例えば天然コラーゲンの三重らせん構造中のある特定の一部の構造を模倣したペプチドが実験上必要であるとする。この場合、目的とするアミノ酸配列に対応するペプチドを合成しても、大抵の場合それが三重らせんを形成することは期待できない (図 3A)。様々な X,Y アミノ酸をもつコラーゲン様三重らせんペプチドをデザインするときにまず考えなければならないのは、三重らせん構造を安定化させることである。このために現在最もよく採用されているのは、(Pro-4-Hyp-Gly)_x(X-Y-Gly)_y(Pro-4-Hyp-Gly)_z およびこれに類似した「ホスト-ゲスト型ペプチド」と呼ばれる分子デザインである¹⁰⁾ (図 3B)。この分子デザインでは興味ある (しかしほとんどの場合三重らせん安定性が低い) 中央のアミノ酸配列を、コラーゲン三重らせんの安定性を向上させるトリペプチドである Pro-4-Hyp-Gly などの繰り返しで挟み込むことによって、合成したペプチドの三重らせんに実験に耐えうるだけの熱安定性を付与できる。このタイプのペプチドをデザインするにあたっては、Brodsky グループの一連の研究結果が役に立つ^{11,12)}。彼女らは、様々なゲスト配列をもつホスト-ゲスト型ペプチドの三重らせん変性温度を測定し、ゲストとして導入したアミノ酸配列の三重らせん安定性に対する寄与の度合いをパラメータ化した。そしてこの情報をもとにしてホスト-ゲスト型コラーゲンペプチドが形成する三重らせんの変性温度を予測する経験式を導きだした。この安定性予測プログラムはホスト-ゲスト型ペプチドの分子デザインを決める上で有用である¹³⁾。

また、末端にバクテリオファージ T4 由来 fibritin 中の foldon ドメイン (27 アミノ酸) のような三量体化ドメインを連結することによっても、短いペプチドのコラーゲン三重らせんを安定化することができる¹⁴⁾ (図 3C)。

ホスト-ゲストペプチドに代表される open-chain ペプチ

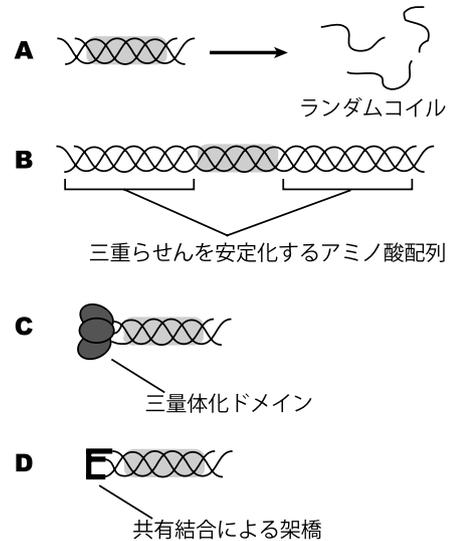


図 3 コラーゲン様三重らせんペプチドのデザイン

A. コラーゲン一次構造の一部を模倣するペプチドは、多くの場合三重らせん構造をとることができない。

B-D. 安定化した三重らせんペプチドのデザイン。

ドのデザインは、比較的合成が容易であるのでよく用いられるが、これらは自己集合により三量体化するため、ペプチド鎖がそれぞれ異なった配列からなるヘテロ三重らせんをつくるのが困難である。最近 Hartgerink らは、負電荷をもつ (Glu-4-Hyp-Gly)_n、正電荷をもつ (Pro-Arg-Gly)_n と電荷をもたない (Pro-4-Hyp-Gly)_n の 3 者を混合し高温で変性したのちに低温でアニールすると、静電的相互作用によってヘテロ三重らせんがつけられることを報告した¹⁵⁾。このペプチドデザインは、ヘテロな三重らせん構築の新しいツールとなりつつある¹⁶⁾。

ヘテロな三重らせん構造を模倣するコラーゲン様ペプチドの分子デザインとして、ペプチド末端を位置選択的な共有結合形成反応を用いて結束した三量体ペプチドが利用される (図 3D)。この中でも、Cys 側鎖間での段階的かつ位置選択的なジスルフィド結合形成反応を利用した cystine-knot ペプチドは、ヘテロな三重らせんモデルとして最も実績がある^{17,18)}。また鎖間での共有結合の導入は、三重らせん構造の安定化にも寄与する。

以上述べたように Gly-X-Y の繰り返しを基本とする三重らせんペプチドの分子デザインとして様々なものが提案されており、研究用途に応じて使い分けることができる。

4. コラーゲン様ペプチドとタンパク質との相互作用

タンパク質とコラーゲンの相互作用そしてそれによって引き起こされる生物作用を研究する上で、そのタンパク質に結合するコラーゲン三重らせん上の構造を模したペプチドを適切にデザイン・合成し、それを利用することは有益である。なぜなら、サイズを小さくすることによって可溶

表1 コラーゲン結合分子が認識するコラーゲン三重らせん上のアミノ酸配列

| コラーゲン結合分子 | 結合配列/結合モチーフ | 文献 |
|--------------------------|--|-----|
| VWF | <u>RGQOGVMGF</u> | 23 |
| DDR-2 | <u>GVMGFO</u> | 24 |
| SPARC/BM-40/osteonectin | <u>GPOGSPGRGQOGVMGFOGPKGNDGAO</u> | 25 |
| aegyptin | <u>RGQOGVMGF</u> | 7 |
| LAIR-1 | <u>GAOGLRGGAGPOGPEGGKGAAGPOGPO</u> * ¹ <u>GPRGRSGETGPAGPOGNOGPOGPOGPO</u> * ² | 26 |
| GPVI | <u>GAOGLRGGAGPOGPEGGKGAAGPOGPO</u> * ³ | 27 |
| PEDF | <u>KGxRGE_xGL</u> | 投稿中 |
| ヘパリン | <u>KGHRGF</u> | 29 |
| Hsp47 | G(T/P) _x GxR* ⁴ | 30 |
| インテグリン $\alpha 2\beta 1$ | GxxGER* ⁵ | 21 |

コラーゲン様ペプチドを用いた実験から、結合配列が明確になっているもののみを挙げた。配列の重複部分については下線を施した。挙げた配列のすべてが必ずしも結合に必要な最小構造を表しているわけではない。Oは4-ヒドロキシプロリン(4-Hyp)を表す。xは任意のアミノ酸を示す。

*¹ III型コラーゲン中の配列。

*² II型コラーゲン中の配列。

*³ この他にクロスリンクにより高分子量化した(GPO)_nはGPVIアゴニストとして用いられている。

*⁴ 高アフィニティーモチーフのみを記載。

*⁵ 高アフィニティーモチーフのみを記載。最も高いアフィニティーを示すのはGFOGER。

性になることで、結合の特異性やアフィニティーの定量的測定、分光学的測定が容易になるとともに、NMRや結晶構造解析にも応用できるようになるからである。

4-1 タンパク質結合配列の同定

三重らせん構造を構築できるペプチドのデザインについては前節で述べたが、まず重要なのは目的とするタンパク質に結合するコラーゲン上の配列を知ることである。(線維形成コラーゲンの場合)それぞれ約1,000のアミノ酸残基からなるポリペプチド鎖によって形成された三重らせんドメインから、いかにすれば十アミノ酸残基程度のタンパク質結合配列を同定できるだろうか？

古典的にはコラーゲンのCNBr切断フラグメントを精製し、目的タンパク質との結合実験を行うことで配列を絞り込んだり、タンパク質とコラーゲン分子との複合体の電子顕微鏡観察から結合部位を推定したりといった方法がとられていた。筆者らは、酵母ツーハイブリッドシステムを用いてランダムなコラーゲン様ペプチドからタンパク質結合配列を探す方法¹⁹⁾や、タンパク質に光架橋基を導入してコラーゲン上のタンパク質結合部位にフットプリントを導入する²⁰⁾といった手法を開発したが、一般的に利用されるには至っていない。

タンパク質が結合するコラーゲン三重らせん上の配列を

決定する上でのブレイクスルーは極めてシンプルなアイデアにあった。英国のFarndaleらのグループは、II型やIII型のような線維形成コラーゲンの全長を互いにオーバーラップする57個の断片に分け、それらを網羅する三重らせん型ペプチドのライブラリーを構築したのである^{21,22)}。このように、巨大タンパク質を合成可能な短いペプチドに区分してライブラリーを構築するというコンセプトは、ラミニンにおける野水らの研究(本号、片桐、野水の稿を参照)のように巨大タンパク質から活性のあるアミノ酸配列を同定する上で効果的な方法であるが、Farndaleらはコラーゲンの部分配列を、それぞれ約60アミノ酸残基からなり、かつ両端をジスルフィド結合で束ねたホスト-ゲスト型三重らせんペプチドとして合成した。彼らがこのペプチドライブラリー(彼らはコラーゲン toolkitと呼んでいる)を構築してからは、さまざまなタンパク質が結合するコラーゲン三重らせん上の配列が同定されるようになった。これまでに同定された主なコラーゲン上のタンパク質あるいは多糖と結合する配列を表にまとめた。

一見して気づくのは配列の重複が多いことである。VWFに結合するIII型コラーゲン上の配列RGQOGVMGF²³⁾は、DDR-2²⁴⁾、secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC, 別名BM40/osteonectin)²⁵⁾、aegyptin結合配列⁷⁾と重複している。aegyptinの血液凝固阻害はVWFとの競合

であると考えるのは容易であるが、はたして内在性の3者間でのコラーゲン上での競合は、生体内で機能的なものなのだろうか。タンパク質が認識する結合配列の重複は、単核球や胸腺細胞に発現する leucocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1)²⁶⁾と血小板膜上の GPVI²⁷⁾でも見られる。これら二つのコラーゲン受容体は類縁タンパク質であり、よく似たコラーゲン認識をしていることがX線結晶構造解析からわかった²⁸⁾。また、血管新生阻害タンパク質である色素上皮由来因子 (PEDF) は、三重らせん上の KGxRGFxGL 配列を認識していた (関谷・小出ら, 投稿中)。この配列はヘパリン/ヘパラン硫酸プロテオグリカン結合配列である KGHRGF とオーバーラップしており²⁹⁾, 実際に PEDF のコラーゲンへの結合はヘパリンによって競合障害を受けることが明らかになった。さらに, PEDF は Hsp47 と同じセリンプロテアーゼインヒビター (SERPIN) ファミリーに属するタンパク質であるが, PEDF が結合するコラーゲン上のモチーフと Hsp47 が認識するモチーフ (T/P)xGxR³⁰⁾とは大きく異なっていた。同じファミリーに属するタンパク質が進化の過程で独自にコラーゲン結合能を獲得したことは興味深い。

このように、いったん目的とするタンパク質が結合するコラーゲン上の配列が明らかになると、その配列を含んだコラーゲン様ペプチドを合成できるようになるので、さまざまな生化学的解析を実施できる。NMR や結晶構造解析を用いたコラーゲン様ペプチド-タンパク質複合体の詳細な構造解析の実例については、西田と嶋田による最近の本誌総説を参照されたい³¹⁾。この総説では、合成コラーゲン様ペプチドと VWF や、インテグリン $\alpha 2\beta 1$, GPVI, DDR に存在するそれぞれのコラーゲン結合ドメインとの相互作用についてタンパク質構造の観点からまとめられている。

4-2 情報基を導入したコラーゲン様ペプチドの生化学研究への利用

化学合成ペプチドを用いることによって、蛍光基、光架橋基など、さまざまな情報基を導入でき、コラーゲンとタンパク質との相互作用を研究することができる。このような「細工物」のコラーゲン様ペプチドの利用は、ターゲットタンパク質との共結晶化といった順当な手段を講じることが困難な場合に効果的である (図4)。

Moroder ら³²⁾, および Fields ら³³⁾はコラーゲンを基質とするマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) の酵素化学的性質や、基質特異性を検討するために、fluorescence resonance energy transfer (FRET) ペアを導入した三重らせんペプチドをデザイン・合成し、それらを利用した。いずれの分子も、三重らせんをとったインタクトな状態では消光していた蛍光基が、MMP によるペプチドの切

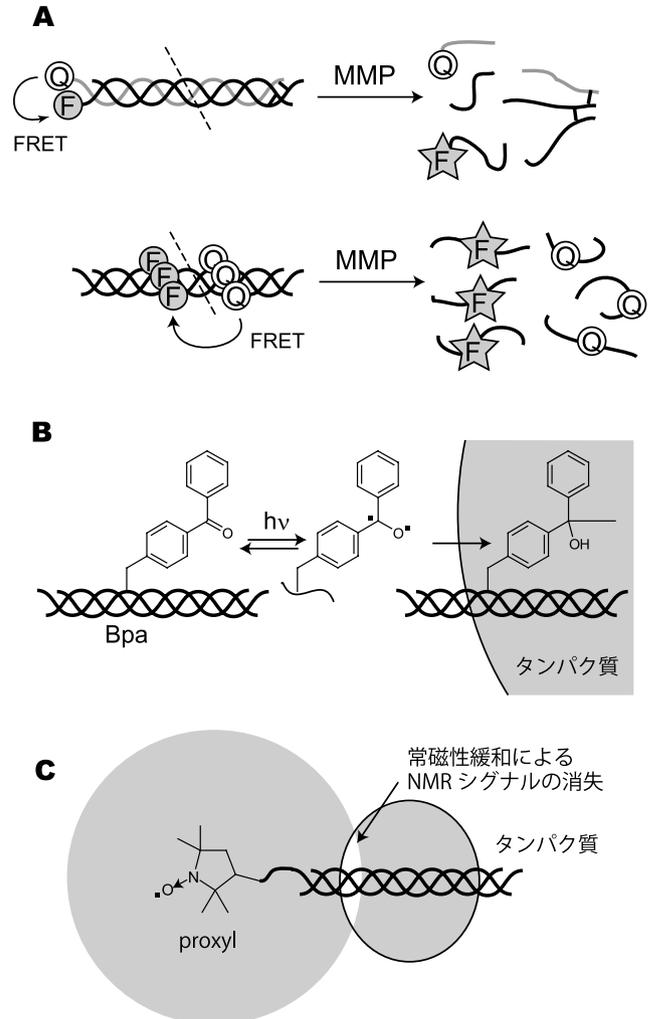


図4 さまざまな情報基をもつコラーゲンペプチド

- A. マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) のコラーゲン分解活性を測定するための蛍光基質。
 B. 光架橋基を導入したコラーゲン様ペプチド。タンパク質との光アフィニティーラベリングに利用される。
 C. スピンラベル基を導入したコラーゲン様ペプチド。proxyl 基などの常磁性基を導入したペプチドはタンパク質との複合体の NMR による解析に有用である。

断により三重らせん構造が不安定化することで FRET が解消し、蛍光強度が増大するという巧妙な分子設計となっている (図4A)。

Hsp47 はプロコラーゲンの小胞体内での正しい構造形成に必須の分子シャペロンである。これまでさまざまな合成ペプチドを用いて Hsp47 とコラーゲン三重らせんの相互作用が研究されてきたが、いまだ複合体の直接的な構造解析は実現していない。筆者らは、Hsp47 と結合する三重らせんペプチドの様々な部位に、光架橋基を側鎖にもつ *p*-benzoylphenylalanine (Bpa) 残基を組み込んだペプチドを作製し、Hsp47 の光アフィニティーラベリングを行った。その結果、Hsp47-コラーゲン複合体における分子の配向が明ら

かになった³⁴⁾。

コラーゲン三重らせんに結合するタンパク質の複合体中での分子の配向は、スピラベルしたコラーゲン様ペプチドを用いても調べることができる。最近 Sakon らは筆者らとともに、細菌性コラゲナーゼのコラーゲン結合ドメインがコラーゲン三重らせんの方向を区別して結合していることを示した³⁵⁾。ここではタンパク質由来の NMR シグナルが、ペプチドに導入した proxyl 基によって常磁性緩和を受けることを利用して、タンパク質上の特定の部位とスピラベル部位との距離情報を得た。(図 4C)

4-3 コラーゲン線維上の機能部位マップモデル

2006 年, Orgel らはネイティブなコラーゲン線維の X 線回折データから, I 型コラーゲン線維中の三重らせんコラーゲン分子の配置モデルを発表した³⁶⁾。同様に, 2010 年には II 型コラーゲン線維のモデルも報告した³⁷⁾。これらのモデルでは, コラーゲン線維は剛直な三重らせん分子が単純に 4 分の 1 ずつずれて集合したものではなく, 互いにゆるく絡み合ったマイクロフィブリル小線維の束であるとされている。さらに, コラーゲン線維表面において, 他のコラーゲン結合分子が相互作用しうる領域と, 線維中に埋もれて他の分子がアクセスできない領域についても議論できるようになった。このモデルにより, コラーゲン様ペプチドとタンパク質との複合体の構造解析によって得られた詳細な情報を, ネイティブなコラーゲン線維上で再構築して考察することが可能となった。Herr と Farndale は, Orgel の線維モデル上に, ペプチドを用いて明らかにされたタンパク質—三重らせん複合体の結晶構造を配置することによって, VWF, インテグリン $\alpha 2\beta 1$, GPVI の連続的なコラーゲンとの相互作用が, 線維表面でいかにして起こり, 血小板を活性化するのかについて空間的考察を含めた興味深い議論をしている³⁸⁾。また, San Antonio らは, 同様のコラーゲン線維モデル上にこれまでに同定された多数の機能配列をマップすることにより, コラーゲン線維上では, タンパク質結合領域と他の ECM 成分と結合する領域とが分かれて存在するという仮説を提唱した³⁹⁾。新しいコラーゲン線維モデルの妥当性については, 今後さらなる検証が必要である⁴⁰⁾が, この野心的な研究の波及効果は大きい。

5. コラーゲンを模倣するペプチド超分子マテリアル

ここまでは, 巨大なコラーゲン分子を, ペプチドを用いることで小さな構造単位に切り分け, それら個々について構造や機能を詳細に明らかにしようとする研究について述べてきた。このような「分子解剖」によって, コラーゲンがもつさまざまな機能配列とその実際の機能が理解されるようになった。また, コラーゲン線維上での機能配列の空間的配置についてもモデル化が可能となってきた。

さて, 今度はコラーゲンの部分構造を模倣するペプチドを実際に巨大な超分子として再構築し, 天然物に匹敵する人工コラーゲンを作り上げようとする試みについて述べる。天然のコラーゲンのような長い三重らせん構造を構築するためのひとつのアイデアは, 短い三重らせんペプチドを head-to-tail で多数連結するというものである。Cejas らは, コラーゲン様ペプチドの末端に結合させたフェニル基とペンタフルオロフェニル基とのスタッキングを利用して三重らせんペプチドを超分子化した(図 5A)。この超分子はマイクロメートルオーダーの線維として観察された^{41, 42)}。Pires と Chmielewski は, Pro-4-Hyp-Gly の繰り返しペプチドの N 末端にニトリロ三酢酸, C 末端に His-His を導入した分子を作成し, これを三重らせん形成させた後に, 金属イオンを配位させることによって head-to-tail に連結した。このデザインでは, 球状や花びら状の超分子が形成された⁴³⁾(図 5B)。

筆者ら^{44, 45)}および Raines ら⁴⁶⁾は, Pro-4-Hyp-Gly を基本とするコラーゲン様ペプチド鎖 3 本を互いに長軸方向に大きくずらして固定した三量体ペプチドをデザインした。ペプチド鎖を結ぶ共有結合には, Cys 側鎖間での位置選択的なジスルフィド結合形成法を利用した。このようなペプチドは, 分子内で三重らせんを形成できないため, 分子間の相補的なフォールディングにより伸長し, 三重らせん超分子を形成した(図 5C)。また, 同様の三量体ペプチドの配列中にインテグリン $\alpha 2\beta 1$ と結合するコラーゲン上の配列である Gly-Phe-4-Hyp-Gly-Glu-Arg (GFOGER) を組み込み, これを自己集合させた超分子を細胞培養基材として利用した⁴⁷⁾。この超分子をコートしたディッシュ上に播種した線維芽細胞には, コラーゲンをコートしたディッシュ上と同様の接着と伸張が観察された。この接着, 伸張は, インテグリン $\alpha 2\beta 1$ と超分子上に提示された機能配列との特異的な相互作用によるものであり, 接着斑の形成, フォーカルアドヒージョンキナーゼ (FAK) の活性化, アクチンストレスファイバーの再構築が引き起こされていた。

以上のように, 合成コラーゲン様ペプチドを超分子化することによって, 天然コラーゲンに匹敵する長い三重らせんを構築でき, さらに天然コラーゲン配列から抽出された機能配列をその超分子に組み込むことが可能となってきた。しかし, 天然の線維形成コラーゲンがもつゲル化能や強い物理的強度を模倣できるまでには至っていない。天然の線維型コラーゲンは長い三重らせん分子が lateral (側方的) に自己集合し, さらに高次の線維を構築する(図 1)のに対し, これまで作成されたコラーゲン様超分子にはその性質が欠けていることがその理由であると考えられる。しかし, これまでに少数ではあるが, 三重らせんペプチドの lateral な自己集合を実現した例が報告されている。Kar らは, (Pro-4-Hyp-Gly)₁₀ のような単純な三重らせんペプチ

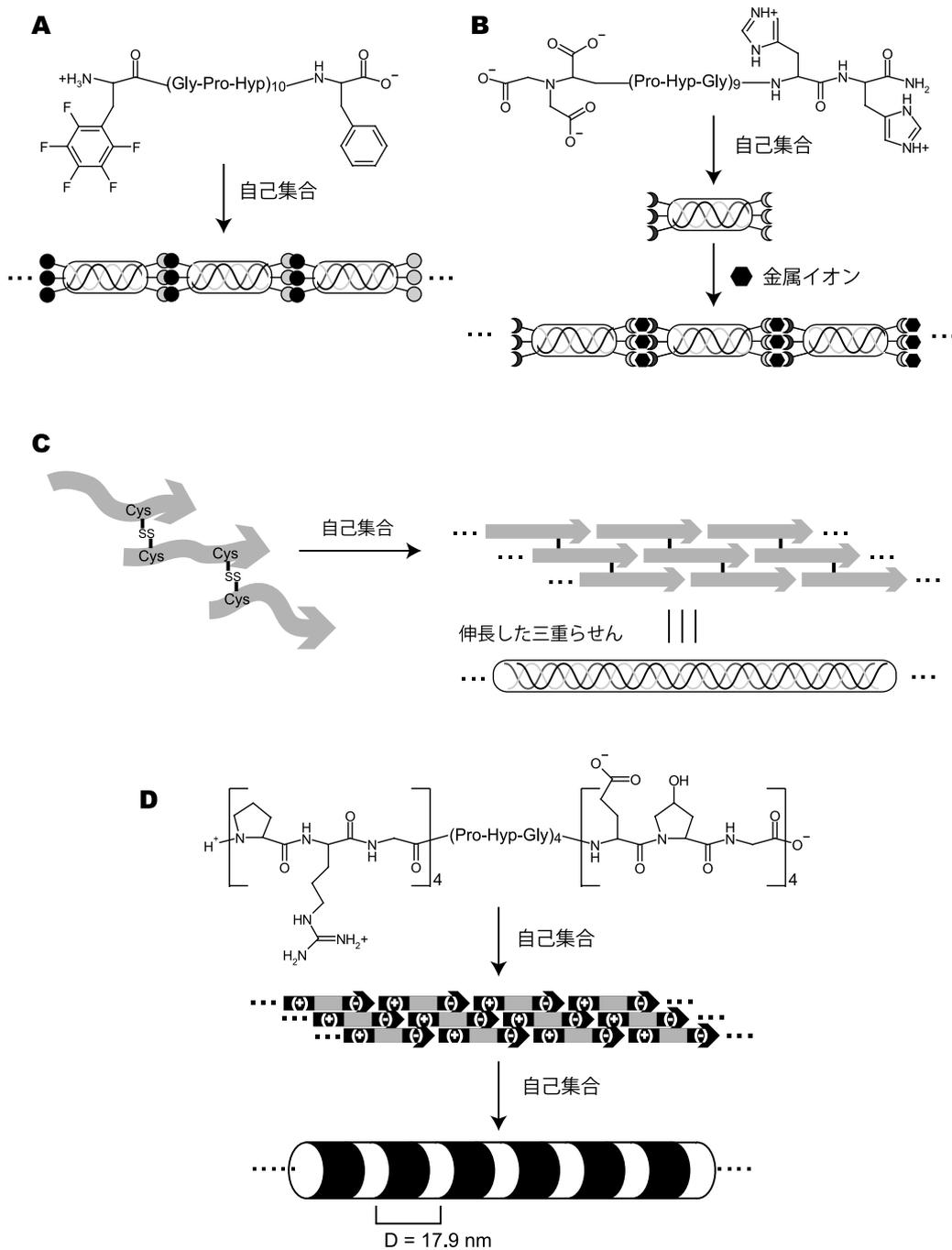


図5 コラーゲン様超分子のデザイン

- 芳香環の相互作用を利用した head-to-tail 型三重らせんの伸長。
- 金属イオンの錯体形成による head-to-tail 型三重らせんの伸長。
- 互いにずらした三量体ペプチドの自己相補的な分子間三重らせん形成による超分子化。
- 三重らせんペプチド間での静電的相互作用による線維形成。

ドが高濃度では lateral な相互作用により線維を構築しうることを示した⁴⁸⁾。また Rele らは、三重らせんペプチド上にアミノ酸側鎖の電荷を偏在させることによって、三重らせん分子同士を静電的相互作用により集合させ線維化させることに成功している⁴⁹⁾(図5D)。このような、ペプチドを用いた三重らせんの lateral な集合に関する研究は、いま

だ謎の多い、天然コラーゲン分子による規則正しい線維形成メカニズムの解明にもつながる有用な情報を提供するものと思われる。ペプチドの三重らせん構造を伸長させ、同時にそれを lateral に集合させることが可能となれば、特定の機能をもった人工コラーゲンの創製も夢ではない。

6. おわりに

Ruoslahti らによってフィブロネクチンからインテグリンに結合する Arg-Gly-Asp (RGD) 配列ペプチドが同定されて以来⁵⁰⁾, 巨大タンパク質中に存在する機能配列を含む合成ペプチドは, 生化学の基礎研究や創薬を目指した応用研究において盛んに利用されるようになった. 特に, 多機能な ECM タンパク質は, 機能性ペプチドの宝庫といっていだらう. いまや, ペプチドの固相合成は自動化され, 受託合成も行われるようになった. これによって, 必ずしも化学を専門としてない研究者が所望のペプチドを容易に入手できるようになった. 生化学のさまざまな分野の中でも, コラーゲンの構造や機能に関する研究ほど, 合成ペプチドが必須のツールとして利用されてきた分野は珍しいだらう. これは, 組換えタンパク質発現系では作製することが困難な, 4-Hyp を含む三重らせんペプチドが化学合成により得られたからである.

本稿では取り上げなかったが, 3-Hyp^{51,52)}などの天然修飾アミノ酸や, 4-フルオロプロリン^{53,54)}などの非天然アミノ酸がコラーゲン様ペプチドの中に組み込まれ, その三重らせんの安定性に対する寄与が調べられている. 今後コラーゲンに特有の修飾アミノ酸であるヒドロキシリジンなどについても, コラーゲンの構造や機能との関連が同様のアプローチによって明らかにされるものと思われる.

人工コラーゲンの研究分野は, まだ始まったばかりであり, 今後天然コラーゲンと同じような物性と強度をも付与できるような分子デザインコンセプトの開発が待たれる. コラーゲンのさまざまな機能のうち特定のものをもち人工コラーゲンは, 幹細胞工学を含む再生医療や組織工学の分野で有用なマテリアルとなるものと期待される. また, コラーゲン三重らせんペプチドは, ほとんどのプロテアーゼに耐性で, かつ低抗原性であるため, DDS 基材としての応用も考えられている^{55,56)}.

冒頭でも触れたように, 一般的にコラーゲンペプチドと呼ばれる混合物は美容や健康増進に役立つものと思われている. コラーゲンの分解によって生じる短いペプチドの細胞に対する作用についてはいくつかの論文が報告されているが⁵⁷⁾, いまだに経口摂取したコラーゲンが期待されるような好ましい機能を果たしうるのでどうかに関してははっきりしない. コラーゲンの吸収, 代謝, 排泄に関する情報もいまだ少ない⁵⁸⁾. このような研究分野においても, コラーゲン様ペプチドをプローブとして用いることは, 近年の質量分析技術の向上とあいまって, 有益な情報をもたらすであろう.

謝辞

本稿で紹介したコラーゲンにかかわる筆者らの研究

は, 17年前に大学院生であった筆者がもぐりこんだ永田和宏研究室で Hsp47 関連の研究テーマを与えられたことに始まっています. 永田先生 (現, 京都産業大学) の京都大学御退職の記念として本稿を捧げます. また, その後の研究を支えてくれた京都大学再生医科学研究所永田研究室, 徳島大学工学部生物工学科, 新潟薬科大学北川研究室, 早稲田大学小出研究室の共同研究者諸氏に感謝します. コラーゲン様超分子に関して述べた筆者らの研究は, 山崎ちさと氏の早稲田大学博士学位論文の一部です. また彼女には図の作成に協力をいただきました.

文 献

- 1) Okuyama, K. (2008) *Connect. Tissue Res.*, 49, 299-310.
- 2) Kramer, R.Z., Bella, J., Mayville, P., Brodsky B., & Berman, H.M. (1999) *Nat. Struct. Biol.*, 6, 454-457.
- 3) Gordon, M.K. & Hahn, R.A. (2010) *Cell Tissue Res.*, 339, 247-257.
- 4) Nagai, N., Hosokawa, M., Itoharu, S., Adachi, E., Matsushita, T., Hosokawa, N., & Nagata, K. (2000) *J. Cell Biol.*, 150, 1499-1506.
- 5) Di Lullo, G.A., Sweeney, S.M., Körkkö, J., Ala-Kokko, L., & San Antonio, J.D. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 4223-4231.
- 6) Nieswandt, B. & Watson, S.P. (2003) *Blood*, 102, 449-461.
- 7) Calvo, E., Tokumasu, F., Mizurini, D.M., McPhie, P., Narum, D.L., Ribeiro, J.M., Monteiro, R.Q., & Francischetti, I.M. (2010) *FEBS J.*, 277, 413-427.
- 8) Sakakibara, S., Kishida, Y., Kikuchi, Y., Sakai, R., & Kakiuchi, K. (1968) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 41, 1273.
- 9) Sakakibara, S., Inouye, K., Shudo, K., Kishida, Y., Kobayashi, Y., & Prockop, D.J. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, 303, 198-202.
- 10) Shah, N.K., Ramshaw, J.A.M., Kirkpatrick, A., Shah, C., & Brodsky, B. (1996) *Biochemistry*, 35, 10262-10268.
- 11) Persikov, A.V., Ramshaw, J.A., Kirkpatrick, A., & Brodsky, B. (2000) *Biochemistry*, 39, 14960-14967.
- 12) Persikov, A.V., Ramshaw, J.A., & Brodsky, B. (2000) *Biopolymers*, 55, 436-450.
- 13) Persikov, A.V., Ramshaw, J.A.M., & Brodsky, B. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 19343-19349.
- 14) Frank, S., Kammerer, R.A., Mechling, D., Schulthess, T., Landwehr, R., Bann, J., Guo, Y., Lustig, A., Bächinger, H.P., & Engel, J. (2001) *J. Mol. Biol.*, 308, 1081-1089.
- 15) Gauba, V. & Hartgerink, J.D. (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 2683-2690.
- 16) Brodsky, B. & Baum, J. (2008) *Nature*, 453, 998-999.
- 17) Ottl, J. & Moroder, L. (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 653-661.
- 18) Koide, T., Nishikawa, Y., & Takahara, Y. (2004) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 125-128.
- 19) Koide, T., Aso, A., Yorihiuzi, T., & Nagata, K. (2000) *J. Biol. Chem.*, 275, 27957-27963.
- 20) Yasui, N. & Koide, T. (2003) *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 15728-15729.
- 21) Raynal, N., Hamaia, S.W., Siljander, P.R., Maddox, B., Peachey, A.R., Fernandez, R., Foley, L.J., Slatyer, D.A., Jarvis, G.E., & Farndale, R.W. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 3821-3831.

- 22) Farndale, R.W., Lisman, T., Bihan, D., Hamaia, S., Smerling, C.S., Pugh, N., Konitsiotis, A., Leitinger, B., de Groot, P.G., Jarvis, G.E., & Raynal, N. (2008) *Biochem. Soc. Trans.*, **36**, 241–250.
- 23) Lisman, T., Raynal, N., Groeneveld, D., Maddox, B., Peachey, A.R., Huizinga, E.G., de Groot, P.G., & Farndale, R.W. (2006) *Blood*, **108**, 3753–3756.
- 24) Konitsiotis, A.D., Raynal, N., Bihan, D., Hohenester, E., Farndale, R.W., & Leitinger, B. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 6861–6868.
- 25) Giudici, C., Raynal, N., Wiedemann, H., Cabral, W.A., Marini, J.C., Timpl, R., Bächinger, H.P., Farndale, R.W., Sasaki, T., & Tenni, R. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 19551–19560.
- 26) Lebbink, R.J., Raynal, N., de Ruiter, T., Bihan, D.G., Farndale, R.W., & Meyaard, L. (2009) *Matrix Biol.*, **28**, 202–210.
- 27) Jarvis, G.E., Raynal, N., Langford, J.P., Onley, D.J., Andrews, A., Smethurst, P.A., & Farndale, R.W. (2008) *Blood*, **111**, 4986–4996.
- 28) Brondijk, T.H., de Ruiter, T., Ballering, J., Wienk, H., Lebbink, R.J., van Ingen, H., Boelens, R., Farndale, R.W., Meyaard, L., & Huizinga, E.G. (2010) *Blood*, **115**, 1364–1373.
- 29) Sweeney, S.M., Guy, C.A., Fields, G.B., & San Antonio, J.D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **23**, 7275–7280.
- 30) Koide, T., Nishikawa, Y., Asada, S., Yamazaki, C.M., Takahara, Y., Homma, D.L., Otaka, A., Ohtani, K., Wakamiya, N., Nagata, K., & Kitagawa, K. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 11177–11185.
- 31) 西田紀貴, 嶋田一夫 (2008) *生化学*, **80**, 483–492.
- 32) Müller, J.C.D., Ottl, J., & Moroder, L. (2000) *Biochemistry*, **39**, 5111–5116.
- 33) Lauer-Fields, J., Broder, T., Sritharan, T., Cung, L., Nagase, H., & Fields, G.B. (2001) *Biochemistry*, **40**, 5795–5803.
- 34) Koide, T., Asada, S., Takahara, Y., Nishikawa, Y., Nagata, K., & Kitagawa, K. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 3432–3438.
- 35) Philominathan, S.T.L., Koide, T., Hamada, K., Yasui, H., Seifert, S., Matsushita, O., & Sakon, J. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 10868–10876.
- 36) Orgel, J.P., Irving, T.C., Miller, A., & Wess, T.J. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **103**, 9001–9005.
- 37) Antipova, O. & Orgel, J.P. (2010) *J. Biol. Chem.*, in press.
- 38) Herr, A.B. & Farndale, R.W. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 19781–19785.
- 39) Sweeney, S.M., Orgel, J.P., Fertala, A., McAuliffe, J.D., Turner, K.R., Di Lullo, G.A., Chen, S., Antipova, O., Perumal, S., Ala-Kokko, L., Forlino, A., Cabral, W.A., Barnes, A.M., Marini, J.C., & San Antonio, J.D. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 21187–21197.
- 40) Okuyama, K., Bächinger, H.P., Mizuno, K., Boudko, S., Engel, J., Berisio, R., & Vitagliano, L. (2009) *Acta Cryst.*, **D65**, 1007–1008.
- 41) Cejas, M.A., Kinney, W.A., Chen, C., Leo, G.C., Tounge, B. A., Vinter, J.G., Joshi, P.P., & Maryanoff, B.E. (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 2202–2203.
- 42) Cejas, M.A., Kinney, W.A., Chen, C., Vinter, J.G., Almond, H. R. Jr., Balss, K.M., Maryanoff, C.A., Schmidt, U., Breslav, M., Mahan, A., Lacy, E., & Maryanoff, B.E. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **105**, 8513–8518.
- 43) Pires, M.M. & Chmielewski, J. (2009) *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 2706–2712.
- 44) Koide, T., Homma, D.L., Asada, S., & Kitagawa, K. (2005) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 5230–5233.
- 45) Yamazaki, C.M., Asada, S., Kitagawa, K., & Koide, T. (2008) *Biopolymers*, **90**, 816–823.
- 46) Kotch, F.W. & Raines, R.T. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, **103**, 3028–3033.
- 47) Yamazaki, C.M., Kadoya, Y., Hozumi, K., Okano-Kosugi, H., Asada, S., Kitagawa, K., Nomizu, M., & Koide, T. (2010) *Biomaterials*, **31**, 1925–1934.
- 48) Kar, K., Amin, P., Bryan, M.A., Persikov, A.V., Mohs, A., Wang, Y.H., & Brodsky, B. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 33283–33290.
- 49) Rele, S., Song, Y., Apkarian, R.P., Qu, Z., Conticello, V.P., & Chaikof, E.L. (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 14780–14787.
- 50) Pierschbacher, M.D. & Ruoslahti, E. (1984) *Nature*, **309**, 30–33.
- 51) Jenkins, C.L., Bretscher, L.E., Guzei, I.A., & Raines, R.T. (2003) *J. Am. Chem. Soc.*, **28**, 6422–6427.
- 52) Schumacher, M.A., Mizuno, K., & Bächinger, H.P. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 27566–27574.
- 53) Holmgren, S.K., Taylor, K.M., Bretscher, L.E., & Raines, R.T. (1998) *Nature*, **392**, 666–667.
- 54) Doi, M., Nishi, Y., Uchiyama, S., Nishiuchi, Y., Nakazawa, T., Ohkubo, T., & Kobayashi, Y. (2003) *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 9922–9923.
- 55) Kojima, C., Tsumura, S., Harada, A., & Kono, K. (2009) *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 6052–6053.
- 56) Banerjee, J., Hanson, A.J., Muhonen, W.W., Shabb, J.B., & Mallik, S. (2010) *Nat. Protoc.*, **5**, 39–50.
- 57) Shigemura, Y., Iwai, K., Morimatsu, F., Iwamoto, T., Mori, T., Oda, C., Taira, T., Park, E.Y., Nakamura, Y., & Sato, K. (2009) *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 444–449.
- 58) Ichikawa, S., Morifuji, M., Ohara, H., Matsumoto, H., Takeuchi, Y., & Sato, K. (2010) *Int. J. Food. Sci. Nutr.*, **61**, 52–60.