特集:ペプチド科学と生化学の接点

細胞接着分子のペプチド科学

片桐文彦,野水基義

ペプチドは、「タンパク質の断片」とも言える機能性分子である. 巨大なタンパク質の 機能解析を行う場合、フラグメント化することで多機能分子の機能を分解することにより 機能解析が単純化できる. またフラグメントとして合成ペプチドを用いることは、調製が 容易であることに加え、安定で長期保存が可能であることなど、ハンドリングの面からも 利点が多い. また、合成ペプチドは、非天然アミノ酸の導入や構造変換・修飾が比較的容 易なことから、構造活性相関研究や医薬品・細胞工学材料への応用が可能である. ここで は、細胞接着分子に着目し、基底膜の主役的構成タンパク質であるラミニンを例に、合成 ペプチドライブラリーを用いたスクリーニングによる機能解析、ラミニン配列由来ペプチ ドを用いた構造活性相関研究、さらには医用材料への応用について概説する.

1. はじめに

ヒトに限らず,生命機能のほとんどはタンパク質が担っ ており、タンパク質の機能を解析することは、生命現象の 解明のみならず病因の解明や新薬開発など多くの有用な情 報をもたらす.しかし、タンパク質そのものを用いてタン パク質の機能解析を行うのは困難な場合が多い.例えば、 タンパク質は多機能性の高分子であり、ある単一の現象を 対象に機能解析を計画しても、他の機能が相補的にはたら くため、解明に至るまでには時間も手間もかかる.一方、 ペプチドはタンパク質の断片ともいえる機能性分子であ り、デザイン次第では、タンパク質の特定の機能を再現す ることが可能である.タンパク質の特定の機能を再現す ることが可能である.タンパク質とペプチドはその分子量 の違いに起因する表1に示したような性質・操作上の違い がある.ペプチドホルモンの発見以降、比較的短いペプチ ドに関しては、天然物質と遜色ない生理活性を有する各種 ホルモンの全合成が報告され¹¹、また、ペプチドをリード

東京薬科大学薬学部病態生化学教室(〒192-0392 東京 都八王子市堀之内1432-1)

Peptide science for cell adhesive molecules

Fumihiko Katagiri and Motoyoshi Nomizu (Laboratory of Clinical Biochemistry, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 1432–1, Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192–0392, Japan)

化合物とした医薬品開発も盛んに行われてきた²⁰. しかし, タンパク質の機能解析に関しては,高分子ペプチドの合成 が困難であったことから,組換えタンパク質を用いた研究 が専らであった.近年,固相合成法の進歩³⁰,ライゲー ション法の開発⁴⁰,構造活性相関研究や各種化学合成法の 発展に伴って,ペプチド合成が簡便になり,長鎖のペプチ ドが化学合成可能になったとともに,ペプチド科学を用い たケミカルバイオロジーが展開されるようになってきた. また,環状ペプチドなど,タンパク質の立体構造をミミッ クした化合物が合成可能になるなど,機能単体としてのペ プチドが様々な分野から注目されている.本稿では,著者 らが行っているペプチドを用いた細胞接着分子の機能解析 を中心に,そこから得られた知見および様々な分野への応 用について概説する.

2. 基底膜構成タンパク質ラミニンの機能解析

基底膜は薄い膜状の細胞外マトリックスで、個体の発生 や分化、組織の修復、あるいはがんの増殖転移に深く関与 していることが明らかとなりつつあり、構成成分の機能や 作用メカニズムの解明が注目されている。ラミニンは基底 膜の主要な構成成分で、α、β、γ鎖のヘテロ三量体からな る糖タンパク質であり、様々な生物活性を有している⁵⁾. 現在までに5種類のα鎖、3種類のβ鎖、3種類のγ鎖が 同定され、それらの組み合わせによりラミニン-111から

性質・操作	タンパク質	ペプチド
側鎖修飾,非天然アミノ酸導入	困難	容易
長鎖調製	一般的	困難
純度確認,精製	電気泳動	高速液体クロマトグラフィー
安定性	比較的不安定	比較的安定
遺伝学的アプローチ	一般的	困難
機能ユニット	ドメイン,モチーフ	アミノ酸
立体構造	剛直	柔軟

表1 タンパク質とペプチドの違い

表 2	ラミ	ミニ	ンア	イ	ソ	フ	オーム	と	KO	マウ	ゥス	0)	表現系
-----	----	----	----	---	---	---	-----	---	----	----	----	----	-----

ラミニン α 鎖	ラミニンアイソフォーム	KOマウスの表現型
α1	ラミニン-111 (α1β1γ1) ラミニン-121 (α1β2γ1)	基底膜の形成不全で胎生初期(~E6.5) に死に至る
α2	ラミニン-211 (α2β1γ1) ラミニン-221 (α2β2γ1) ラミニン-213 (α2β1γ3)	胎児は出生するが筋ジストロフィー症を 発症し,早期に死に至る
α3	ラミニン-311 (α3β1γ1) ラミニン-321 (α3β2γ1) ラミニン-3A32 (α3Aβ3γ2) ラミニン-3B32 (α3Bβ3γ2)	胎児は出生するが,四肢・口内に水疱が 発生し,出生 2~3 日後に死に至る
α4	ラミニン-411(α4β1γ1) ラミニン-421(α4β2γ1) ラミニン-423(α4β2γ3)	胎児は出生するが,後肢・頭部などに内 出血が発生し,出生直後に死に至る
α5	ラミニン-511 (α5β1γ1) ラミニン-521 (α5β2γ1) ラミニン-523 (α5β2γ3)	胎盤形成,神経管閉塞,腎臓・四肢形成 などの不全により胎生中後期(E13.5~) に死に至る

ラミニン-532の15種類のラミニンアイソフォームが報告 されている(**ま**2). ヘテロ三量体構造のラミニンは十字 架またはY字型構造をしており,その両手に当たるβ及 びγ鎖のショートアーム部分がラミニン同士または他のタ ンパク質と結合し,基底膜構造を構築していると考えられ ている(図1).α鎖の足の部分にあたるC末端部分には 様々な細胞表面受容体と結合する五つの球状モジュール (LGモジュール)からなるGドメインが存在している.G ドメインは細胞膜上の様々な受容体と結合することが知ら れており,基底膜と細胞の相互作用に大きな役割を果たし ていると考えられている.また,α鎖は組織特異的,発生 段階特異的に発現し,各α鎖のノックアウト(KO)マウ スはそれぞれ異なる表現型を示すことが報告されている (表 2)⁶.

ラミニンは細胞接着,器官形成,神経網再生,血管新 生,創傷治癒やがんの増殖転移など,複雑で多彩な生物活 性を有する巨大分子のため⁷⁾,ラミニンの生物活性メカニ ズムを詳細に解明するには,個々の機能部位にわけて解析 していくことが重要と考えられている.以前より,ラミニ ンの酵素消化によって得られる分解フラグメント,組換え

タンパク質、合成ペプチドなどを用いた方法でラミニンの 生物活性部位の探索が行われてきた⁸. 著者らは最も古く から研究されているラミニンアイソフォームであるラミニ ン-111のアミノ酸配列を網羅した673種類のペプチドを 合成し,種々の細胞を用いて細胞接着活性を測定すること により、図1に示した約20種類の活性ペプチドを同定し た^{9~12)}.活性のあったペプチドのなかには細胞特異的に接 着活性や細胞遊走を促進するもの、またインテグリンや膜 貫通型プロテオグリカンのシンデカンに特異的に結合する ものが見つかってきている. 例えば, α1 鎖 G ドメインの 110 種類のペプチドを用いて, α1 鎖 G ドメインの組換え タンパク質のヘパリン結合への影響をみたところ, LG4 モジュールのAG73 (RKRLQVQLSIRT:マウスラミニン α1 鎖 2719-2730), AG75 (GLIYYVAHONOM:マウスラ ミニン α1 鎖 2735-2746) で阻害活性がみられたことから, これらの部位のヘパリン結合への関与が示唆された¹³. ラ ミニン-111の活性ペプチドの中で AG73 は、特に強い細胞 接着活性を示し、細胞の遊走・浸潤やマトリックスメタロ プロテアーゼの放出を促進させること、ヒト唾液腺由来細 胞に作用して腺様構造を形成させ、神経細胞に作用して神



図1 ラミニン-111 配列の中の細胞接着ペプチドの同定

ラミニン-111 配列を網羅するペプチドライブラリーより細胞接着活性を示した代表的なペプチド 21 種の配列を右ボックスに示した. 中でも,特徴的な活性を示した種の特徴を下ボックスに示した.

経突起伸長を促進させること, ex vivo で器官形成を抑制 するなど様々な生物活性を持つことが分かってきた¹⁴⁻¹⁷. さらに, AG73 がシンデカンを介して細胞に作用すること が解明され¹⁶), AG73 部位がラミニン分子中において発生 や分化に関する生理作用に深く関与していることが示唆さ れた¹⁷⁾. また, ラミニン α1 鎖 G ドメインからは α2β1 イ ンテグリンと特異的に結合する EF1 (DYATLQLQEGRLH FMFDLG:マウスラミニン α1 鎖 2747-2765) も同定され た¹⁸⁾. AG73 と EF1 の活性を比較したところ, AG73 は非 常に強い細胞接着活性を示すが細胞伸展活性を示すごさ が分かった. これらの結果を変異導入した組換えタンパク 質を用いて検証したところ, AG73 と EF1 はそれぞれ G ドメインの細胞接着活性と細胞伸展活性に重要な機能部位 であることが分かった¹⁹⁾.

最近, ラミニン-111の発現はかなり限定された組織に 局在することが分かってきており,基底膜は組織特異的に 様々なラミニンアイソフォームを発現していることが明ら かとなってきている. 例えば, ラミニン-211, -221 は神経 組織に特異的に, ラミニン-332, -311, -321 は皮膚に多 く, ラミニン-411, -421 は血管内皮に多く存在する. これ らの機能部位の研究を行うことで,全てのラミニンに共通 に保存されている機能部位や,神経や血管内皮などの組織 特異的に作用する機能部位の同定が期待される. ラミニ ン-111 の研究でも示されたように,多彩な生物活性を有 している α 鎖 G ドメインには様々な活性部位の存在が考 えられる. 著者らは,組織特異的に存在する α 2, α 3, α 4, α 5 鎖の G ドメインに注目し,活性部位の解明を行っ た²⁰⁻²³⁾.

著者らは神経や筋組織に多く存在する α2 鎖中の α-ジス トログリカン結合配列について α2 鎖 LG4-5 モジュールの 組換えタンパク質 rA2LG4-5 と,そのアミノ酸配列を網羅 する 42 種類の合成ペプチドを用いて探索を行った²⁰⁾. α2 鎖は筋肉あるいは末梢神経などに多く発現しており,イン テグリン,へパラン硫酸,ジストログリカンとの相互作用 が知られている.筋基底膜において,ラミニン α2 鎖は, α-ジストログリカンの糖鎖と相互作用し,筋細胞の正常な 機能維持をコントロールしていることが知られており, LG4-5 モジュールにα-ジストログリカンの結合部位が存 在することが示唆されている.著者らは,ペプチドと組換 えタンパク質を用いた評価によって,rA2LG4-5のヘパリ ン結合を阻害し,ヘパリン結合能を有する A2G78 (GLLF YMARINHA:マウスラミニン $\alpha 2$ 鎖 2796-2807)を見出した.さらにペプチド結合セファロースビーズを用いた評価系によって、 α -ジストログリカンと結合し、rA2LG4-5の α -ジストログリカン結合を阻害する A2G78と A2G80 (VQLRNGFPYFSY:マウスラミニン $\alpha 2$ 鎖 2812-2823)を同定した²⁰⁾.変異導入タンパク質を用いた研究より、ラミ



図 2 α2 鎖 LG4-5 モジュールの分子表面 3D モデル α2 鎖 LG4-5 モジュール組換えタンパク質の分子表面 3D モデルにおける Arg²⁸¹³, Arg²⁸¹⁵の位置を矢印で示した.α-ジストログリカンとの結合に必要 とされる Arg²⁸⁰³, Arg²⁸¹⁵ は組換えタンパク質の表面に位置していることが分 かった.



図3 α3 鎖Gドメインの活性部位の解析スキーム

へパリン結合,細胞接着活性を示したヒトラミニン α3 鎖 LG4 モジュール配列を網羅する 22 種類の合成ペプチド(A3G67-A3G88) を矢印で示した.シンデカンを介した強い細胞接着活性を示す A3G75 を見出した. ニン α2 鎖 LG4-5 モジュールの α-ジストログリカン結合 活性には Arg²⁸⁰³ が重要なアミノ酸残基であることが報告 されている²⁴⁾. Arg²⁸⁰³ は A2G78 に含まれるアミノ酸残基で あり, A2G78 の Ala 置換体を用いた実験からも, Arg 残基 の重要性が示唆された(図 2).

 $\alpha 3$ 鎖 G ドメインの活性部位の解析は、図 3 に示したス キームに従って行った²¹⁾. 著者らは、組換えタンパク質 rA3LG1-5, rA3LG1-2, rA3LG3, rA3LG4, rA3LG5 を, ヒト尿細管上皮細胞を用いて発現させ、それらの生物活性 を評価した. rA3LG4 が細胞接着活性とヘパリン結合活性 を示したことから、この LG4 モジュールに注目し、LG4 モジュールを網羅する 22 種類のペプチドを合成した. そ れらの細胞接着活性および rA3LG4 の細胞接着やヘパリン 結合に及ぼす影響を調べたところ、A3G75 (KNSFMALY LSK:ヒトラミニン $\alpha 3$ 鎖 1411-1422) が細胞接着活性を 示すとともに、rA3LG4 の細胞接着やヘパリン結合を阻害 した. また、A3G75 の活性に重要な働きをしているアミ ノ酸を同定するため、Ser 置換ペプチドを用いて検討した ところ、C 末端側の Lys がこれらの活性に重要であること が分かった.次に、ヘパリチナーゼIで処理した細胞の rA3LG4 と A3G75 に対する接着活性が減少したことから、 この細胞接着にヘパラン硫酸プロテオグリカンが関与して いることが示唆された.そこで、rA3LG4を用いたアフィ ニティーカラムクロマトグラフィーで線維芽細胞の可溶化 画分を分析したところ、 膜貫通型プロテオグリカンのシン デカン-2がrA3LG4と強く結合することが示された.ま た、シンデカン-2はA3G75とも結合した、さらに、シン デカン-2をトランスフェクトした細胞は, rA3LG4 タンパ ク質や A3G75 に対し強く接着することが分かった.同様 な実験を、グリピカン-1をトランスフェクトした細胞で も行ったが、シンデカン-2をトランスフェクトしたとき のような接着活性の増強はみられなかった. これらのこと から, α3 鎖 LG4 モジュールの A3G75 部位は、シンデカ ン-2を介した細胞接着に深く関与していることが分かっ た.また A3G75 ペプチドは神経細胞に作用して神経突起 伸長を促進し、さらに、シンデカンに結合することにより 細胞内の p38 MAP キナーゼのリン酸化を促し、細胞遊走 を促進することも示された25~27).



図4 α4 鎖Gドメインの活性部位の同定

マウスラミニン α4 鎖 G ドメイン配列を網羅する 116 種類の合成ペプチド(A4G1-A4G166)を矢印で示した. これらのペプチ ドからシンデカンに結合する 4 種のペプチドを見出した.



図5 ラミニンα鎖Gドメインの生物活性部位 α1 鎖−α5 鎖Gドメインの主な活性部位の位置を矢印で示した.同定されている受容体を〇:インテグリン,□: シンデカン,△:α-ジストログリカンで示した.

α4 鎖 G ドメインの生物活性部位の解析は、このドメイ ンを網羅した 116 種類のペプチドと、G ドメインの組換え タンパク質 (rA4LG1-5) を用いて行った (図 4)²²⁾. ペプ チドの細胞接着活性、rA4LG1-5 タンパク質の細胞接着と ヘパリン結合に対する阻害活性の測定を行ったところ、 LG1 モジュールの A4G6 (LAIKNDNLVYVY:マウスラミ ニン α4 鎖 891-902) と A4G20 (DVISLYNFKHIY:マウス ラミニン α4 鎖 1008-1019)、LG4 モジュールの A4G82 (TLFLAHGRLVFM:マウスラミニン α4 鎖 1514-1525) と A4G83 (LVFMFNVGHKKL:マウスラミニン α4 鎖 1522-1533) が細胞接着とヘパリン結合に重要な部位であること が示された²⁸⁾.

また、α5 鎖のGドメインの生物活性部位の解析におい ても、組換えタンパク質を用いた実験より、LG4モ ジュールが細胞接着やヘパリン結合に重要な働きをしてい ることが分かった²³⁾.Gドメイン全体を網羅する113種類 のペプチドを用いた細胞接着部位のスクリーニングより, LG4 モジュールに存在する A5G77(LVLFLNHGHFVA: マウスラミニン q5 鎖 3307-3318) が細胞接着活性を示す とともに、唾液腺の分化に関与していることを示唆する結 果が得られている²⁰⁾. α5 鎖 LG4-5 モジュールを網羅する 46 種類のペプチド (A5G68-113) を用いて、 ヘパリンと 組換えタンパク質 rA5LG4-5 の結合に対するペプチドの影 響を調べたところ、A5G71 (GPLPSYLOFVGI:マウスラ ミニン α 5 鎖 3259-3270), A5G77, A5G81 (AGQWHRVS VRWG:マウスラミニン α5 鎖 3337-3348), A5G94 (KMP YVSLELEMR:マウスラミニン α5 鎖 3454-3465) がヘパ リンとrA5LG4-5との結合を阻害したため、ヘパリン結合 部位が4箇所存在することが示唆された300.

以上の α1-α5 鎖 G ドメインの活性部位の解析より,細胞接着や受容体結合に重要な部位が示された(図 5). ラ ミニンはインテグリン,シンデカン,ジストログリカンな ど,20種類以上の受容体と結合することが知られている。 細胞は、細胞外マトリックス中のラミニン分子、あるい は、その分解フラグメントなどのリガンドの種類に応じ て、細胞表面の受容体の種類の使い分けを行い、様々なシ グナルを受容していることが考えられる。

3. ラミニン配列由来ペプチドの構造活性相関研究を 介した受容体認識配列の探索

ラミニンの機能を担っており、多数の活性部位が発見さ れた LG モジュールは、A から N の 14 本の B ストランド がサンドウイッチ構造をとることが報告されている(図 6)³¹⁾.過去に著者らが行った生物活性スクリーニングにお いても、活性配列ペプチドの多くがEFストランドとそ れをつなぐループ領域から同定されていることから、マウ スラミニンα鎖のLG4モジュールのループ領域を含み E.Fストランド配列を網羅するペプチドをデザイン・合成 しそれらの生物活性を評価した¹⁸⁾. すると, α1 鎖 LG4 モ ジュール配列由来で α2β1 インテグリンに特異的に結合す る EF1 を筆頭に, 五つのペプチド (EF1-EF5) は鎖特異的 で、それぞれ細胞表面の異なる受容体と相互作用している ことが明らかとなった. さらに EF1 の短縮ペプチド,修 飾ペプチドを合成し、EF1 の活性中心配列 EF1Xm 配列を 見出した. EF1Xm ペプチドは EF1 と比べて細胞接着活性 は低下したが、環化すること (cyclo-EF1Xm) で活性は EF1 と同程度まで向上した(図6).環状ペプチドはタンパク 質内でのループ構造をミミックしていると考えられ、タン パク質の機能発現、インテグリンの特異的結合にはループ 構造が重要であることが示唆された。また、以前に著者ら が見出した A3G756 は, ヒトラミニン α3 鎖 LG4 モジュー ルのE-Fループ領域に位置していることが判明した (hEF3)³²⁾. 短縮ペプチドを合成し, A3G756 中の活性中心 配列はループ部分を中央に配する hEF3A であることを見



図 6 ラミニンα鎖LGモジュール配列由来ペプチドの構造活性相関 LGモジュールの結晶構造を基に多くの活性ペプチドが見出された E-F ループ領域由来のペプチドの構造活性相関を解析した. 活性中心配列を環化することで活性の向上が認められ,ループ構造の重要性が示唆された.

出した. さらに hEF3A を環化し、ループ構造をミミック させた cvclo-hEF3A は鎖状ペプチド hEF3A よりも強い活 性を示したことから,その生物活性においてもループ構造 の重要性が示された(図6).上記の知見から、マウスラ ミニンα鎖 LG4 以外の LG モジュール (LG1-3, LG5)の E-F ループ領域を網羅する 20 種類のペプチド (G1EF1-G5EF5)をデザイン・合成し、 生物活性を評価した(表3). 評価に用いた17種類のペプチドのうち、13種類のペプチ ドが細胞接着活性を示した. ラミニンの持つ様々な生物活 性は、いずれも細胞表面の受容体との結合とそれに共役し た細胞内へのシグナル伝達に基づいている. ラミニン受容 体の主なものとして、インテグリンやヘパラン硫酸プロテ オグリカンであるシンデカンなどが知られている. インテ グリンは二価陽イオンによって活性化されてシグナル物質 と結合するため、キレート剤である EDTA を共存させる とその細胞接着活性が阻害される.一方、シンデカンは細 胞外のヘパラン硫酸鎖を介して様々な分子が結合するた め、ヘパリンを共存させるとその細胞接着が阻害される.

13 種類の細胞接着ペプチドにヘパリン, EDTA を共存さ せて、その阻害効果を評価したところ、4種類がヘパリン によって阻害され、プロテオグリカン過剰発現細胞を用い た実験によって、その全てがシンデカンと結合することが 示唆された.13種類中6種類の細胞接着活性が EDTA で 阻害され、抗インテグリン抗体を用いた実験によって、4 種類がインテグリンと結合することが示唆された.これら のペプチドの配列を解析すると、インテグリンと特異的に 結合したペプチドはループ領域、すなわち配列の中心に 「酸性側鎖アミノ酸」-Glv-「塩基性側鎖アミノ酸」モチー フが含まれているものが多く、シンデカンと特異的に結合 したペプチドの全てが「塩基性側鎖アミノ酸」-Gly-「塩 基性側鎖アミノ酸」モチーフを有していることが明らかと なった (表 3). 本結果は先述の EF1, A3G756 (hEF3) の 結果にも合致し、インテグリン、シンデカンへの特異的結 合には,①ループ構造を維持した立体構造,および②中心 配列にそれぞれ、「酸性側鎖アミノ酸」-Gly-「塩基性側鎖 アミノ酸」、「塩基性側鎖アミノ酸」-Gly-「塩基性側鎖ア

ペプチド	配列	細胞接着	阻害効果	受容体
G2EF3 (α3 鎖)	NFISLNIEDGNLMVKYKLN	+	EDTA	ND
G3EF1 (α1 鎖)	VPFFSIMLLEGRIEVHVNSG	+	EDTA	ND
G3EF3 (α3 鎖)	SSLLVTLE DGH IALSTRDS	+	EDTA	α2β1 インテグリン
G5EF1 (α1 鎖)	DAIGLEIV DGK VLFHVNNG	+	EDTA	α2β1 インテグリン
G5EF3 (α3 鎖)	GEHLSVYMEAGKVTTSMNSE	+	EDTA	α2β1 インテグリン
G5EF5(α5 鎖)	TPYMQLKVLT EQV LLQANDG	+	EDTA	β1 インテグリン
G1EF4 (α4 鎖)	KEYMGLAIKNDNLVYVYNLG	+	EDTA/へパリン	シンデカン
G3EF4 (α4 鎖)	SDVFSISLDNGTVVMDVKG	+	EDTA/へパリン	ND
G5EF4 (α4 鎖)	GEYLNVHMRNGQVIVKVNNG	+	EDTA/へパリン	ND
G1EF1 (α1 鎖)	DFLAVEMR RGK VAFLWDLG	+	ヘパリン	シンデカン
G1EF2 (α2 鎖)	DFLAIEMR KGK VSFLWWVG	+	ヘパリン	シンデカン
G2EF1 (α1 鎖)	DFLSIELV RGR VKVMVDLG	+	ヘパリン	シンデカン
G3EF2 (α2 鎖)	AYYAIFLN KGR LEVHLSSG	+	ヘパリン	シンデカン
G1EF5 (α5 鎖)	DYMGVSLRNQKVHWVYRLG	—		
G2EF2 (α2 鎖)	DFMSVELSDGHVKVSYDLG	—		
G3EF5 (α5 鎖)	GPYQVSLREGHVTLRFMNQ	—		
G5EF2 (α2 鎖)	DGMGIEMIDEKLMFHVDNG	—	_	_

表3 受容体特異的結合配列の探索

ND: not determined

ミノ酸」モチーフを含むことが必要であることが示唆された(論文準備中).

ラミニン同様基底膜タンパク質成分である、フィブロネ クチン由来の Arg-Gly-Asp (RGD) モチーフは ανβ3 イン テグリンと特異的に結合することが知られており、医薬品 や種々の生物活性評価のスタンダードとして利用されてい る³³. さらに RGD モチーフはターン構造を形成すること が強力な活性を示すために必要であることが報告されてお り³⁴,ペプチドの生物活性発現には、配列だけでなく、立 体構造も考慮する必要が示唆されている.配列の欠失や挿 入、非天然型アミノ酸の導入、側鎖修飾の容易さはタンパ ク質と比べた場合、ペプチドの大きな利点である.ペプチ ドを用いたタンパク質の機能解析研究に、配列活性相関や 構造活性相関研究を追加することによって、細胞膜受容体 特異的結合モチーフを探索することも可能である.特異的 結合モチーフの開発は生命現象や疾患原因の解明や医薬品 への応用などに寄与することが期待される.

4. ラミニン配列由来ペプチドの細胞・組織工学への応用

基底膜においてラミニンは、細胞接着活性をはじめ様々 な生物活性を有し、基底膜機能の重要な役割を果たしてい る.細胞・組織工学において基底膜機能を有する理想的な 材料として汎用されている「マトリゲル」は、マウスがん 組織から抽出された可溶化基底膜で、ラミニン-111を主 成分としている.「マトリゲル」はマウスがん組織由来で あるため安全性に問題があり、医用材料としての応用は不 可能であるが、基底膜機能を模倣した高分子材料は、理想 的な医用材料として期待されている.ここでは,前述のラ ミニン活性ペプチドを高分子多糖に結合させ,基底膜分子 の働きを再現し,人工基底膜の創製を目指した著者らの取 り組みを紹介する.

これまで述べてきたラミニンの活性ペプチドは様々な活 性を有することから組織工学分野への応用が期待できる が、ペプチドはそのままでは分解されやすく、組織に長く とどめることは困難である. すなわち, これらのペプチド を組織工学分野へ応用するためにはペプチドの活性を効率 良く細胞に作用させることが重要になってくる. そこで著 者らは、ラミニンの活性ペプチドを高分子多糖のキトサン の膜に固定化することを検討した(図7)^{35,36)}.キトサンは 生分解性であり、人工皮膚などの形ですでに臨床応用され ている. 無血清状態で細胞接着活性を測定したところ未修 飾のキトサン膜にはヒト皮膚由来線維芽細胞は接着しな かった. AG73 及び EF1 ペプチドをそれぞれキトサン膜に 固定した膜を作成し、これらの膜に細胞を加えたところ、 AG73-キトサン膜上で細胞は強く接着しラフリング構造を とること、EF1-キトサン膜上ではアクチンストレスファイ バーを形成し強く伸展することが分かった. これらの結果 から,細胞特異的な接着活性の違いはキトサン膜に固定さ れたペプチドが結合する細胞膜受容体に依存することが示 唆された.次に、ラット副腎髄質由来褐色細胞(PC12細 胞)を用いてペプチド-キトサン膜の神経突起伸長に及ぼ す影響を検討した、その結果、AG73、A99(AGTFALRG DNPQG: ラミニン α1 鎖 1141-1153) を固定化したキトサ ン膜上において神経系細胞の神経突起伸長が促進されるこ



図7 ラミニン活性ペプチドを固定化したペプチド-キトサン膜 ペプチド-キトサン膜は、キトサンに結合させたペプチド由来の生物活性を再現できた.



図8 ペプチド-キトサン膜を用いた細胞移植実験

ペプチド-キトサン膜上で培養したヒト表皮細胞をヌードマウスに移植したところ、生着し、マウス筋膜上で角化した.

とが分かった.このことは、キトサン膜に神経突起伸長活 性を有するペプチドを固定化することで神経突起伸長を促 進する機能性膜の作成が可能なことを示している.

ラミニン-111のC末端の五つの球状モジュールの中で も4番目のLG4モジュールはAG73部位でシンデカンと EF1部位でα2β1インテグリンに作用し、様々な生物活性 を有している¹⁹⁾.そこで、このLG4モジュールの機能を 模倣した医用材料を作成する目的でAG73とEF1を様々 な比で混合しキトサン膜に結合させた膜を調製した. AG73とEF1の混合比によって細胞接着の強さや接着した 細胞の形態が変化することが分かった。AG73とEF1の混 合比が1:9のとき、LG4モジュールと同程度の強い細胞 接着・伸展と神経突起伸長活性を示した。キトサン膜上で AG73とEF1の混合比を変化させることにより、シンデカ ンとインテグリンの作用をコントロールできることが分 かった³⁷⁾.以上の実験から、受容体の異なる複数の細胞接 着活性ペプチドをキトサン膜に固定化することにより、複 雑な機能を有する基底膜タンパク質の機能を模倣すること が可能であることが示された.この方法をさらに発展させ ることにより、複数の受容体に作用する「人工マトリゲル」 ともいえる多機能性医用材料の開発が期待される.

また,ペプチド-キトサン膜が細胞移植に有効であるこ とが実際の動物を用いた実験から分かった^{38,39}.図8に示 したように,AG73-キトサン膜にヒト表皮細胞を接着させ て表皮細胞組込み型創傷被覆材とし,ヌードマウスの側腹 部に皮膚欠損創を作成し,表皮細胞組込み型創傷被覆材を 移植して経時的に組織学的所見を観察した.3日後のヌー ドマウス側腹部にヒト表皮細胞が生着し,角化しているこ とが観察された.以上のように,ペプチド-キトサン膜の 細胞移植への応用の可能性が示された.以上のように,ペ プチドを固定化した高分子多糖複合体を人工基底膜として 開発を行うことにより,創傷治癒や神経再生を目的とした 細胞移植や再生医療の分野での応用が期待される.



図9 ラミニンの分子解剖と医薬分野への応用

5. おわりに

本稿で紹介した研究の流れを図9に示した.巨大な細胞 接着タンパク質であるラミニンの分子解剖,すなわち網羅 的スクリーニングと機能ペプチドの詳細な生物活性の解 析,さらにはそれらの医薬分野への応用といった流れで, 「細胞接着分子のペプチド科学」を展開している.現在, 著者らは,先述の手法を用いて,全てのラミニンアイソ フォームの網羅的スクリーニングを行っている.これまで に2,000 種類以上の合成ペプチドから約 50 種類の活性ペ プチドを同定した^{40,41}. 今後は,各々の相同部位に対する 抗体やラミニンアイソフォームの変異体を作成することに より,生体内でのこれらの部位の作用メカニズムの解析, 医薬品,生体材料への応用が期待される.

一方, ヒトゲノムプロジェクトが完了し, 今後様々なタ ンパク質が遺伝子・タンパク質レベルで発見されることが 予想される. これらのタンパク質の解析に組換えタンパク 質は重要なツールとなりうるが, 詳細な活性部位の解析は 困難であり, 合成ペプチドを用いた機能解析は大きく貢献 できると考えられる. また, ペプチドは比較的低分子であ り, その安定性から保存や取り扱いが容易で, 抗原性も低 いため,機能解析を介して発見された機能性ペプチドは, ヒトを対象とした医療分野での応用も可能である.実際 に,インテグリンやシンデカンに結合する細胞接着ペプチ ドを分子プローブとしてリポソームに付加することにより 標的がん細胞をターゲティングするなど,ドラッグデリバ リーシステム (DDS)の分野でも実用化に向けた研究が盛 んに行われている⁴².タンパク質とペプチド,その性質の 違いを利用し,効率的な生体機能の解明,医薬品・生体材 料開発が望まれる.

文 献

- (1) 矢島治明,瀬川富朗(1983) 生体化学情報伝達物質,同朋舎,京都.
- 2)寒川賢治,南野直人編(2007)ペプチドと創薬,メディカ ルドゥ,大阪.
- 3) Albericio, F. (2004) Curr. Opin. Chem. Biol., 8, 211-221.
- Hackenberger, C.P.R. & Schwarzer, D. (2008) Angew. Chem. Int. Ed., 47, 10030–10074.
- Kleinman, H.K. & Hoffman, M.P. (2003) Current Opin. Biotech., 14, 526–532.
- Miner, J.H. & Yurchenco, P.D. (2004) Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 20, 255–284.

- Colognato, H. & Yurchenco, P.D. (2000) Dev. Dynam., 218, 213–234.
- Yamada, Y. & Kleinman, H.K. (1992) Current Opin. Cell Biol., 4, 819–823.
- Nomizu, M., Kim, W.H., Yamamura, K., Utani, A., Song, S.-Y., Otaka, A., Roller, P.P., Kleinman, H.K., & Yamada, Y. (1995) J. Biol. Chem., 270, 20583–20590.
- 10) Nomizu, M., Kuratomi, Y., Song, S.-Y., Ponce, L.M., Hoffman, M.P., Powell, S.K., Miyoshi, K., Otaka, A., Kleinman, H. K., & Yamada, Y. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 32198–32205.
- Nomizu, M., Kuratomi, Y., Malinda, K.M., Song, S.-Y., Miyoshi, K., Otaka, A., Powell, S.K., Hoffman, M.P., Kleinman, H.K., & Yamada, Y. (1998) J. Biol. Chem., 273, 32491– 32499.
- Nomizu, M., Kuratomi, Y., Ponce, L.M., Song, S.-Y., Miyoshi, K., Otaka, A., Powell, S.K., Hoffman, M.P., Kleinman, H.K., & Yamada, Y. (2000) Arch. Biochem. Biophys., 378, 311–320.
- 13) Suzuki, N., Ichikawa, N., Kasai, S., Yamada, M., Nishi, N., Morioka, H., Yamashita, H., Kitagawa, Y., Utani, A., Hoffman, M.P., & Nomizu, M. (2003) *Biochemistry*, 42, 12625–12633.
- 14) Richard, B.L., Nomizu, M., Yamada, Y., & Kleinman, H.K. (1996) *Exp. Cell Res.*, 228, 98–105.
- 15) Kim, W.H., Nomizu, M., Song, S.Y., Tanaka, K., Kuratomi, Y., Kleinman, H.K., & Yamada, Y. (1998) *Int. J. Cancer*, 77, 632–639.
- 16) Hoffman, M.P., Nomizu, M., Roque, E., Lee, S., Jung, D.W., Yamada, Y., & Kleinman, H.K. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 28633–28641.
- 17) Kadoya, Y., Nomizu, M., Sorokin, L.M., Yamashina, S., & Yamada, Y. (1998) Dev. Dyn., 212, 394–402.
- 18) Suzuki, N., Nakatsuka, H., Mochizuki, M., Nishi, N., Kadoya, Y., Utani, A., Oishi, S., Fujii, N., Kleinman, H.K., & Nomizu, M. (2003) J. Biol. Chem., 278, 45697–45705.
- 19) Hozumi, K., Suzuki, N., Nielsen, P.K., Nomizu, M., & Yamada, Y. (2007) J. Biol. Chem., 281, 32929–32940.
- 20) Suzuki, N., Hozumi, K., Urushibata, S., Yoshimura, T., Kikkawa, Y., Gumerson, J.D., Michele, D.E., Hoffman, M.P., Yamada, Y., & Nomizu, M. (2010) *Matrix Biol.*, 29, 143–151.
- 21) Utani, A., Nomizu, M., Matsuura, H., Kato, K., Kobayashi, T., Takeda, U., Aota, S., Nielsen, P.K., & Shinkai, H. (2001) J. Biol. Chem., 276, 28779–28788.
- 22) Yamaguchi, H., Yamashita, H., Mori, H., Okazaki, I., Nomizu, M., Beck, K., & Kitagawa, Y. (2000) *J. Biol. Chem.*, 275, 29458–29465.
- 23) Nielsen, P.K., Gho, Y.S., Hoffman, M.P., Watanabe, H., Makino, M., Nomizu, M., & Yamada, Y. (2000) J. Biol. Chem., 275, 14517–14523.
- Wizemann, H., Garbe, J.H., Friedrich, M.V., Timpl, R., Sasaki, T., & Hohenester, E. (2003) J. Mol. Biol., 332, 635–642.

- 25) Kato, K., Utani, A., Suzuki, N., Mochizuki, M., Yamada, M., Nishi, N., Matsuura, H., Shinkai, H., & Nomizu, M. (2002) *Biochemistry*, 41, 10747–10753.
- 26) Utani, A., Momota, Y., Endo, H., Kasuya, Y., Beck, K., Suzuki, N., Nomizu, M., & Shinkai, H. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 34483–34490.
- 27) Araki, E., Momota, Y., Togo, T., Tanioka, M., Hozumi, K., Nomizu, M., Miyachi, Y., & Utani, A. (2009) *Mol. Biol. Cell*, 20, 3012–3024.
- 28) Okazaki, I., Suzuki, N., Nishi, N., Utani, A., Matsuura, H., Shinkai, H., Yamashita, H., Kitagawa, Y., & Nomizu, M. (2002) J. Biol. Chem., 277, 37070–37078.
- 29) Kadoya, Y., Mochizuki, M., Nomizu, M., Sorokin, L., & Yamashina, S. (2003) Dev. Biol., 263, 153–164.
- 30) Hozumi, K., Suzuki, N., Uchiyama, Y., Katagiri, F., Kikkawa, Y., & Nomizu, M. (2009) *Biochemistry*, 48, 5375–5381.
- 31) Hohenester, E., Tisi, D., Talts, J.F., & Timpl, R. (1999) Mol. Cell, 4, 783–792.
- 32) Kato-Takagaki, K., Suzuki, N., Yokoyama, F., Takaki, S., Umezawa, K., Higo, J., Mochizuki, M., Kikkawa, Y., Oishi, S., Utani, A., & Nomizu, M. (2007) *Biochemistry*, 46, 1952–1960.
- 33) Meyer, A., Auernheimer, J., Modlinger, A., & Kessler, H. (2006) Curr. Pharm. Des., 12, 2723–2747.
- 34) Gottschalk, K.E. & Kessler, H. (2002) Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 41, 3767–3774.
- 35) Mochizuki, M., Kadoya, Y., Wakabayashi, Y., Kato, K., Okazaki, I., Yamada, M., Sato, T., Sakairi, N., Nishi, N., & Nomizu, M. (2003) FASEB J., 17, 875–877.
- 36) Mochizuki, M., Yamagata, N., Philp, D., Hozumi, K., Watanabe, T., Kikkawa, Y., Kadoya, Y., Kleinman, H.K., & Nomizu, M. (2007) *Biopolymers*, 88, 122–130.
- 37) Hozumi, K., Yamagata, N., Otagiri, D., Fujimori, C., Kikkawa, Y., Kadoya, Y., & Nomizu, M. (2009) *Biomaterials*, 30, 1596– 1603.
- 38) Ikemoto, S., Mochizuki, M., Yamada, M., Takeda, A., Uchinuma, E., Yamashina, S., Nomizu, M., & Kadoya, Y. (2006) J. Biomed. Mater. Res. A, 79, 716–722.
- 39) Masuda, R., Mochizuki, M., Hozumi, K., Takeda, A., Uchinuma, E., Yamashina, S., Nomizu, M., & Kadoya, Y. (2009) Wound Repair Regen., 17, 127–135.
- 40) Urushibata, S., Katagiri, F., Takaki, S., Yamada, Y., Fujimori, C., Hozumi, K., Kikkawa, Y., Kadoya, Y., & Nomizu, M. (2009) *Biochemistry*, 48, 10522–10532.
- 41) Suzuki, N., Yokoyama, F., & Nomizu, M. (2005) Connect. Tissue Res., 46, 142–152.
- 42) Negishi, Y., Omata, D., Iijima, H., Takabayashi, Y., Suzuki, K., Endo, Y., Suzuki, R., Maruyama, K., Nomizu, M., & Aramaki, Y. (2010) *Mol. Pharm.*, 7, 217–226.