

藤森科学技術振興財団 研究実施概要報告書

(西暦) 2021年 4月 2日

公益財団法人藤森科学技術振興財団
理事長 藤森 明彦 殿

藤森科学技術振興財団の助成金による研究が終了しましたので、下記のとおり報告をいたします。

所属機関 富山県立大学

職 名 教授

氏 名 小山 靖人



【提出書類】

- (1)研究実施概要報告書(本紙)
添付書類(A4版3枚以内):研究状況を示す写真等の資料
- (2)収支報告書
添付書類:助成金を充当した経費の領収書

(1)テーマ

※スペースが足りない場合は、枠を追加いただいて構いません。

分子鎖のトポロジー制御による強靱なペプチド型生体材料の開発

(2)本研究の期間

(西暦) 2020年4月～2021年3月

(3)本研究の目的

研究の目的 新規な構造材料の母骨格として、ポリペプチドの利用に関心が集まっている。ポリペプチドは天然タンパク質に類似した超機能の発現が期待できるポリマー群であり、水を多く含む生体環境に良く適合し、また生分解性を示すためである。しかしながら、アミノ酸が規則的に配列したポリペプチドを量的に供給することが困難であり、汎用化されているペプチド材料は天然の抽出物のみである。また、ペプチド材料は物性が高次構造に大きく依存することが良く知られているため、新材料開発の観点で、合成ポリペプチドの高次構造を自由自在に制御するような手法の開発が望まれていた。

本研究では、我々が最近開発したペプチドの交互共重合法を基盤として、任意の人工骨格からなるポリペプチドを合成することを目標とした。本手法はアミノ酸配列を完全な交互共重合体に制御する前例のない合成法であり、アミノ酸をモノマーとして用いないため、材料開発を志向した超大量合成に適用可能である。合成したペプチド交互共重合体の高次構造を制御する手法について検討し、天然材料の物性を凌ぐ強靱なペプチド型生体材料の創製を目指した研究を実施した。将来的には高分子や医薬品工学の分野に「ペプチド交互共重合体の学理」を広く浸透させることも目標としている。

研究の意義 本研究はペプチドベースの実用化材料の創出を志向しており、将来的には産業構造に変革をもたらす技術になると考えている。実社会に利用される材料のための分子設計指針を確立し、機械的特性に優れながらも生分解性を示す医療用繊維・生体用接着剤や、強靱かつ生体適合性の優れたハイドロゲルなどが創出されるものと期待している。

ポリペプチドは様々な研究分野で取り扱われる標的分子であり、新材料を目指す研究だけでなく、基礎科学、医療、製薬分野において極めて重要な分子群である。そのため、本研究において合成したペプチド交互共重合体は、タンパク質を含めたポリペプチド関連の研究分野において縦断的に利用される有用なライブラリーになると期待される。例えば、高次構造の解明、物理的性質の測定、低分子との相互作用評価などにも利用可能であると考えている。今後必要に応じ、各分野の研究者へデータやサンプルを提供したい。

研究の特徴 ペプチド交互共重合体は新素材であり、そのポリマーから構成される材料もまた全て新物質であるため、新規性は極めて高い。繊維状タンパク質をリード化合物として、アミノ酸配列を改変する研究が盛んに行われているが、その労力は計り知れず、産業化までの道のりは長い。我々が開発したペプチドの交互共重法では任意の骨格を組み込むことができ、また分子配列と高次構造との関連性を体系的に研究できるため、力学特性を自在に制御した構造材料が創製できるだろうという研究構想に至った。分子配列が単純な2元系であるため、データベースや理論計算を駆使することで力学特性を事前に設計可能である。ポリマーはワンポットで簡便に調製できるので、最適構造が解明した時点で直ちに大量供給を実現できる点は、産業化に向けた重要な利点である。

(4) 本研究の概要

本研究はボトムアップ型の研究開発であり、我々が以前に開発したペプチドの交互共重合法を基盤として、まずはコンポーネントを系統的に変化させながら、ペプチド交互共重合体のライブラリー合成を行った。高次構造の戦略的な制御方法についても検討を進め、応力を添加すると接着性が向上するユニークな高接着性ポリマーを得た。その分子設計指針についても確立した。

今回得られた知見に基づいて、今後、機械的特性に優れながらも生分解性を示す医療用繊維や、強靱かつ生体適合性の優れたハイドロゲルを創出すべく研究を続けている。

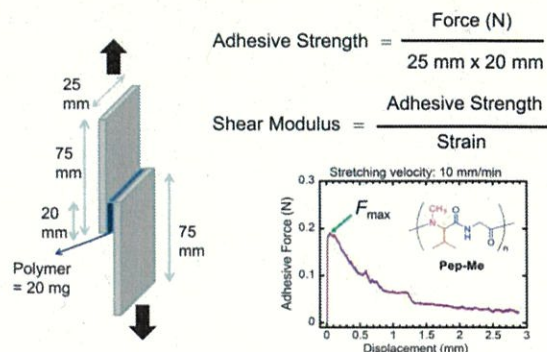
(i) ペプチド交互共重合体の1次配列制御

右式は我々が開発した3成分重合 (Ugi 重合) である。アルデヒド、アルキルアンモニウム塩、及びイソシアニド含有カルボン酸塩 (アンビデント分子) を当モル量混合すると、Ugi 反応を素反応とする重縮合が進行し、規則構造に乱れの無い完全な交互共重合体を得られる。重合には触媒が不要で、カルボン酸塩の中和、イミン化、重付加、アシル転位が一挙に進行し、ペプチド交互共重合体を得られる。本手法で得られるポリマー構造において、アミド窒素原子上に1つ置きに置換基が導入される点が特徴である。この重合法を利用し、ペプチド交互共重合体のライブラリー合成を行った。不斉点を含まないグリシン型のアンビデント分子のみならず、今回新規にフェニルアラニン型のアンビデント分子の合成に成功し、それをコンポーネントに用いたポリマーも合成した。



(ii) ペプチド材料の2次構造制御

ペプチド材料を強靱化する上で、分子鎖の高次構造を制御する必要がある。まず、機械的応力によってポリマーの高次構造を制御する手法について検討を進め、結果として、本研究においては右図に示したような2枚のガラス板を用いた重ね剪断試験を通してポリマーの高次構造変化について評価した。またガラス板の剥離に伴って観測された接着力 (F) と変位量から、接着強度 (S_{Adh}) と剛性率 (G) を求め、高次構造との相関について考察した。



こうした検討の一方で、光学活性なアンビデント分子を利用した不斉転写に基づく片巻らせんペプチド交互共重合体の合成についても検討した。

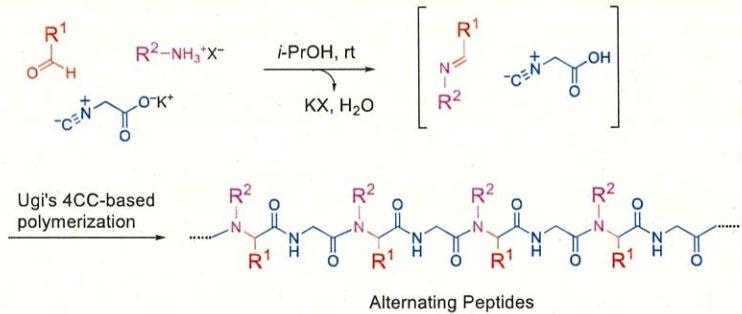
(iii) ペプチド交互共重合体の高次構造制御

こうして合成したペプチド交互共重合体を幹ポリマーとして用いたヒドロゲルの合成についても検討した。具体的には、分子鎖間の物理的な相互作用を架橋点として用いたヒドロゲルと、化学架橋によるヒドロゲルの合成についてそれぞれ検討を進めた。今後、温度応答性や機械的特性を詳細に解析するとともに、生分解性や生体適合性についても評価する予定である。

(5) 本研究の内容及び成果

本研究を通して、応力を添加すると接着性が向上するユニークな高接着性ポリマーを得たので、以下詳細を報告する。

先に述べた Ugi 重合により、ペプチド交互共重合体を合成した。3 成分を *i*-PrOH 中室温で攪拌混合後、所定の時間の後にエバポレーターで溶媒を減圧留去した。濃縮物を室温で数日攪拌し続けると、粘性が顕著に増加したため、重合がさらに進行したことが示唆された。粗生成物に THF を加えてポリマーを溶解後、濾過することで生じた無機塩が簡単に除去できることも分かった。

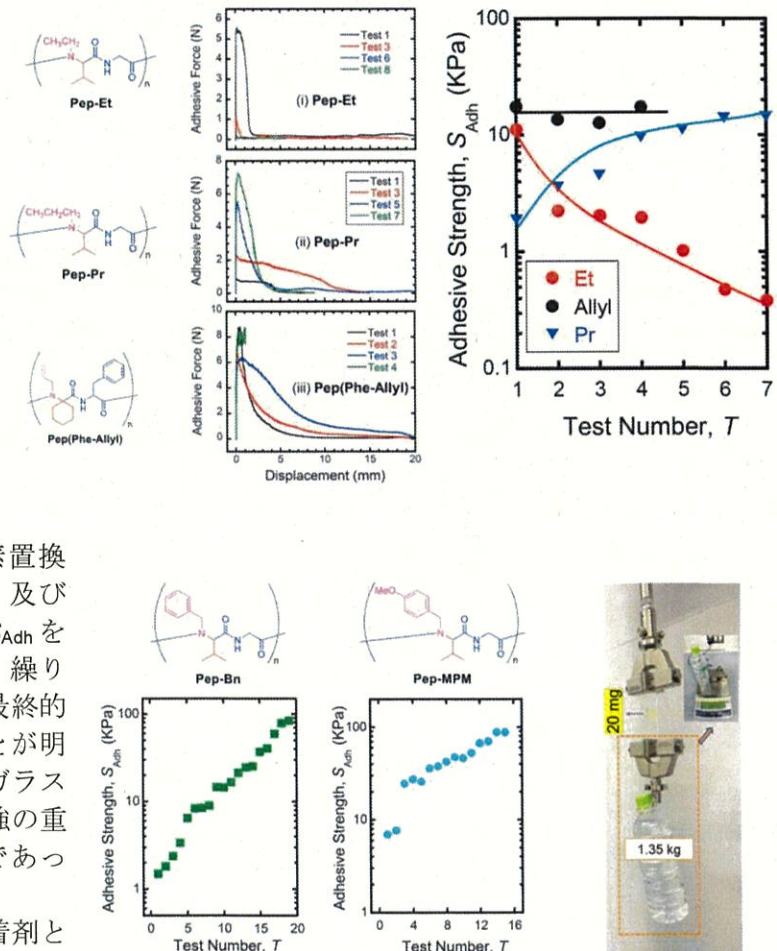


粘性の高いポリマーが数点得られたため、2 枚のガラス板を用いた重ね剪断試験により、その S_{Adh} を詳細に評価した。接着の再現性を明らかにするため、重ね剪断試験でガラス板が剥離した後、再度 2 枚のガラスを指で軽く押し合わせて接着し、さらにその S_{Adh} を測定した。その結果、 S_{Adh} の再現性はポリマーの構造に大きく依存することが明らかとなった。エチル基をアミド窒素上に有する **Pep-Et** では、繰り返し試験の度に S_{Adh} が減少した一方で、プロピル基を有する **Pep-Pr** は S_{Adh} が増加した。

また芳香族を有し、剛直な分子鎖からなる **Pep(Phe-Allyl)** は、最も大きな S_{Adh} を示したが、繰り返し試験によって値に変化がないことが分かった。

剪断応力を加える度に S_{Adh} が増加するという **Pep-Pr** の接着挙動に興味を持ち、また S_{Adh} を更に大きくする目的で、**Pep-Pr** の骨格に芳香環を導入することを考えた。そこで窒素置換基として芳香環を含む **Pep-Bn** 及び **Pep-MPM** を合成し、これらの S_{Adh} を評価した。その結果、予想通り、繰り返し試験の度に S_{Adh} が増加し、最終的には 100 kPa にも到達することが明らかとなった。僅か 20 mg をガラス板の間に塗布するだけで、1 kg 強の重さを軽々と支えることも可能であった。

生体用のペプチドベースの接着剤として用いられているフィブリンの S_{Adh} は 7 kPa 程度であるため、今回我々が観測した S_{Adh} は 11 倍程度強い。本研究を通して、強接着性を示すペプチド材料のための分子設計指針を提示することができたと考えている。



Adhesive material	This work	Fibrin glue
S_{Adh} (kPa)	>80	~7

More than 6700 times load-bearing capacity!!
It would be possible to hold 80 kg weighted person with only about 1.2 g of elastin-mimetic glue.

(6) 本研究の考察

剪断応力を加えるたびに S_{Adh} が顕著に増加する **Pep-Bn** 及び **Pep-MPM** の接着特性を解析した結果、その応力変位曲線の形状が非常にユニークであることに気が付いた。すなわち、重ね剪断試験によって 2 枚のガラス板が徐々に離れていっているのにも関わらず、一定の変位の後で F が更に増加している点である。これは、 F の増加がポリマーの高次構造の変化に起因することを強く示唆している。

これらポリマーのレオロジー特性を解析した結果、粘度は高周波領域ほど小さく、剪断応力によって分子鎖間の弱い相互作用が切断されることが分かった。また剪断応力は高周波領域ほど大きくなることも分かったため、ポリマーが粘弾性であることも明らかとなった。

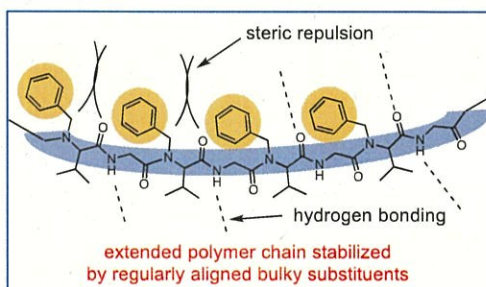
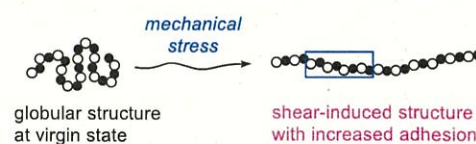
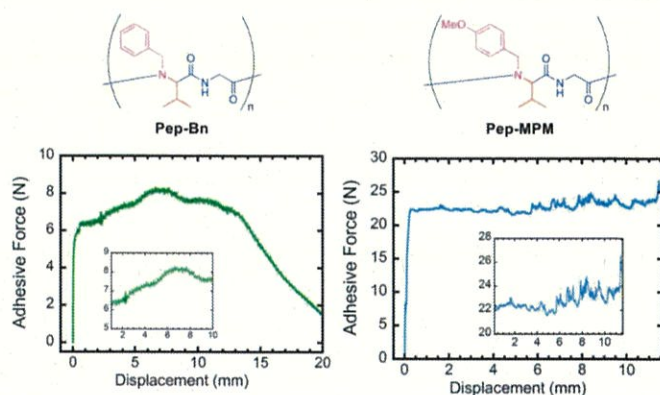
これらの結果を踏まえると、応力駆動型の接着挙動は高分子鎖の応力応答に密接に関連することが示唆された。典型的な粘弾性ポリマーの挙動として、高分子鎖は応力方向に 1 軸に配向すると考えられる。剛直で高高い窒素上の芳香族性置換基は、伸びきり鎖からグローブール状構造への構造緩和を速度論的に抑制するように機能し、あたかも伸びきり鎖のための立体保護基と見なすことができる。グローブール状よりも伸びきり鎖の方が分子鎖間の相互作用が強く働き、結果として接着力が増加すると考えている。一方で、高高い置換基で覆われている **Pep(Phe-Allyl)** は、ロッド状の構造をしており、応力を加える前からすでに伸びきり鎖を形成していると予想される。そのため、ロッド状の構造は剪断応力の添加には安定で、 S_{Adh} も応力添加前後で変化がなかったのだと考えている。

今回観測された剪断応力によって駆動される接着挙動は、血液中に含まれるフォン・ヴィレブランド因子 (VWF) の挙動とよく似ているように思われる。

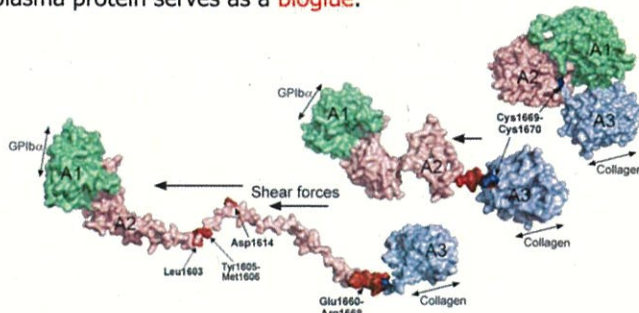
人体が外傷を受けた際、組織液による剪断応力やずり応力によって、球状の VWF が伸びきり鎖に変化し、また構造変化に伴ってコラーゲンや血小板との接着部位が外部に暴露し、止血や血栓を引き起こすことが知られている。

我々が開発した接着性のペプチド交互共重合体は VWF の構造とは比較にならない程に極めて単純ではあるが、どちらともにポリペプチドで、VWF の接着機構を偶然にも模倣したような材料であると考えている。

この研究で観測された現象や上記の仮説は今後、高分子化学者が強靱な接着性材料を設計・創出する上で有用なものであると考えている。



In a human body, von Willebrand factor (VWF) as a multimeric plasma protein serves as a **biogluue**.



David A. Lane, et al., Blood, 2011, 118, 3212.

(7)共同研究者(所属機関名、役職、氏名)

特になし。

(8)本研究の成果の公表先

学術誌

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**, 2000480.

[Multi-component Reaction in Polymer Science の特集号への招待論文]

学会発表

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, 岩手大学上田キャンパス (オンライン), 3C04, 2020.9.18.

[依頼講演]

2) Abu Bin Ihsan, Masataka Taniguchi, **Yasuhito Koyama**, Adhesion Behaviors of Bio-inspired Alternating Peptides, 令和 2 年度北陸地区若手研究会, オンライン, P4, 2020.11.6.

3) 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, P11, 2020.11.6.

4) 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, C-12, 2020.11.7.

[注]この報告書を当財団のホームページ等に掲載することがありますので、予めご了承ください。