

## コラーゲン様ペプチドの構造解析と機能化†

菅原一晴\*, 門屋利彦\*\*

## 1 はじめに

コラーゲンは古くから知られているタンパク質の一つであり、脊椎動物の真皮、靭帯、腱、骨、軟骨などの組織に存在し<sup>1),2)</sup>、多細胞動物の細胞外マトリックスとして重要である。コラーゲンは三重ヘリックス構造を取り、3つのアミノ酸の Gly-Xaa-Yaa の繰り返し配列から成る。Xaa の位置には 3-ヒドロキシプロリン残基、Yaa の位置には 4-ヒドロキシプロリン残基とヒドロキシリジン残基が入る<sup>3)</sup>。このような構造の一部の配列をコラーゲン様ペプチドと呼ばれ、F-moc 法による合成において容易に合成できる<sup>4)</sup>。今回は、コラーゲン様ペプチドに関する研究を取り上げ、特に三量体構造に着目した論文を紹介する。以下、①蛍光染料でラベル化したコラーゲン様ペプチドを用いたヘテロ三量体構造を取るコラーゲン様ペプチド構造解析とヘテロ三量体のセンシング、②IgG を細胞に導入するために細胞膜透過性を有したコラーゲン様ペプチドを結合させたプローブの挙動、③<sup>15</sup>N アイソトープでラベル化したグリシンを含むコラーゲン三重ヘリックス組織化の NMR 解析と題した3つの論文について解説する。

## 2 nM レベルでのコラーゲン様ペプチドのヘリックス組成の可視および蛍光モニタリング

コラーゲン様ペプチドの生物物理学的な構造を解析することは、コラーゲンのヘリックス構造を理解することに役立つ。タイプ I コラーゲンは、2つの同一の $\alpha 1(I)$ と1つの $\alpha 2(I)$ 鎖からなるヘテロ三量体である。Sun らのグループは、コラーゲン様ペプチドのヘリックス組成を特長づけるために蛍光分光法に基づいた解析を行った<sup>5)</sup>。この蛍光自己消光は、タンパク質のコンフォメーション変化やアミロイド $\beta$ ペプチド凝集を研究するために利用されている。一般に、蛍光共鳴エネルギー移動法では2タイプのフルオロフォアが必要とされる。今回、提案するプローブは1タイプのフルオロフォアだけをペプチドに結合させればよく、コラーゲン様ペプチドのヘテロ混合物を測定するための方法となる。そのフルオロフォアはフルオレセイン系蛍光色素 (FAM) でありコラーゲン様ペプチドに共有結合された。FAM-ラベル化ペプチドはモノマーの状態では強い蛍光を示し、ホモ三量体が形成すると蛍光自己消光が引き起こされた。対照的に、FAM-ラベル化ペプチドがラベル化されていない相補的なコラーゲン様ペプチドとヘテロ三量体を形成するには強い蛍光を示した。この蛍光強度の差異は、ヘテロ三量体からホ

モ三量体を区別することができ、コラーゲン様ペプチドのヘリックス組成の決定が可能となる。2つのコラーゲン様ペプチドにはペプチド FAM-G (PRGPOG)<sub>5</sub> (ペプチド A) と G(POG)<sub>10</sub> (ペプチド B) を選んだ。ヘテロ三量体を検出するこのアッセイの可能性を調べるために、FAM-ラベル化ペプチド A が様々な濃度のターゲットペプチド B とハイブリッドされた。その際に B の濃度と蛍光強度との関係は直線となった ( $R^2 = 0.99$ )。B の濃度が増加するにつれて、ヘテロ三量体が形成されて蛍光強度が増加した。この蛍光分析は、50 から 1000 nM で直線的で 36 nM の検出限界を示した。

## 3 コラーゲン様細胞膜透過性ペプチドを使った IgG の細胞内への取り込み

細胞膜透過性ペプチド (CPP) は、抗体のような低い膜透過性をもつ高分子を細胞内へ導入するための有用なツールである。しかしながら、これまでの CPP の欠点は、生体中で不安定になることであった。Masuda らは、三重ヘリックス CPP を使った細胞内へ免疫グロブリン G (IgG) 抗体の導入について報告した<sup>6)</sup>。CPP が架橋試薬である 2-イミノチオレンを介して 1 ステップでの反応によって IgG に接合された。三重ヘリックス CPP は従来用いられた CPP であるオクタアルギニンよりも血清によって凝集されたりその効果が低下したりすることは少ないものであった。しかしながら、CPP-IgG の多くはエンドソーム中でトラップされることが見出された。それゆえ、IgG に CPP を接合する効率的な方法において、効果的なエンドソーム・ターゲティングが必要とされる。

ここで開発されたペプチド colpep は、(Gly-Pro-Arg)<sub>3</sub> の N-と C-末端に (Gly-Pro-Hyp)<sub>3</sub> を結合させたペプチドであった。コントロールとして N 末端側に  $\beta$ -アラニン・リンカーを伴ったオクタアルギニン ( $\beta R_8$ ) が合成された。細胞への IgG の輸送は CPPs との結合によって成し遂げられた。蛍光活性化セルソーティング分析によって、IgG-colpep は IgG- $\beta R_8$  より効率的に細胞に取り込まれることがわかった。CPP 結合 IgG の細胞内分布は、生細胞イメージングによって分析された。テトラメチルローダミン-トランスフェリンを用いたエンドソーム染色の結果、抗体に由来する大部分の蛍光はエンドソームによって共局在化された抗体から誘導されることがわかった。そのうえ、IgG-colpep と IgG- $\beta R_8$  との両方は、リソソーム中に部分的に局所化された。これらの結果は、IgG-CPP 複合体が内サイトチック経路を通して細胞によって

† 原稿受理 令和3年2月26日 Received February 26, 2021

\* 教職センター (Teaching Profession Center)

\*\* 生物工学科 (Department of Biotechnology)

取り込まれ、そしてベシクル中にトラップされることを示した。細胞内への IgG の導入に関しての colpep の効果は高く、血清による阻害効果は $\beta R_8$  を使った導入よりも低かった。この結果は、colpep が血清タンパク質に対して $\beta R_8$  より弱く結合することによって説明される。しかしながら、細胞内 IgG-colpep と IgG- $\beta R_8$  はエンドソーム中でトラップされる。カーゴ分子が主にエンドサイトーシスによって CPP を介して取り込まれるが、直接の膜透過性は取り込みの異なるメカニズムがあるとも考えられる。

#### 4 N-から C-末端へのコラーゲントリプルヘリックス組織化に関する比較 NMR 解析

Acevedo-Jake らは、コラーゲンペプチドのモデルであるタイプ I の (POG)<sub>10</sub> と N-末端にグリシンやチロシン、トリプトファン、ヒスチジン残基を導入したペプチドを合成しその構造と安定性を評価するために比較 NMR 解析を行った<sup>7)</sup>。測定の際には、各ペプチドのグリシン残基の一つを<sup>15</sup>N アイソトープでラベル化した。コラーゲン様ペプチドの両末端は、そのペプチドの中心部とは異なった構造と性質をもっており、2組の(POG)がヘリックスを形成するため必要とされる。コラーゲン様ペプチド末端の“ほつれ”の程度は、これまで X 線や NMR による研究で見出すことが困難とされてきた。なぜなら、結晶充てん力効果や繰り返しのペプチド配列がもたらす対称的等価となる官能基の位置関係のために、得られるシグナル間のオーバーラップが原因となっていた。本手法におけるラベル化は、上記の NMR 測定で問題になっているそれぞれのペプチド部位からのシグナルの区別化を明確にすることができる。その理由は、連なる(POG)のグリシン残基においてそれぞれの位置でのラベル化により得られるシグナルが異なるためにペプチドの安定性や位置関係を評価することが可能となったからである。従って、N-末端と C-末端(G1 と G10 のポジション)においても、<sup>15</sup>N の緩和値は、十分にヘリックスペプチドとモノマー・ペプチドとを区別することができる。得られた結果によって、わずかな末端のアミノ酸配列の変化がその末端の構造と安定性にかなりの影響を及ぼすことを見出した。N-末端において多くのシーケンスでは、末端の結合が“ほつれ”ていることが観察された。N-末端にさらに一つのグリシンを追加したペプチド(G(POG)<sub>10</sub>)では、他のペプチド配列と比較してラギング鎖とリーディング鎖との間の水素結合を強化して N-末端側のヘリックス構造が安定された。天然に存在するコラーゲンではほとんど見られないアミノ酸残基の付加は、芳香族アミノ酸残基が N-末端に存在した場合でも予期されるヘリクストポロジーの阻害を引き起こした。芳香族アミノ酸であるヒスチジン残基が結合された時、N-末端側のシーケンスの“ほつれ”が抑制される傾向が認められた。このような情報は、コラーゲン様ペプチドの配列が、そのフォールディングとアンフォールディングとの両方に本質的な役割を果たしていることを示している。

#### 5 まとめ

以上のように、コラーゲン様ペプチドでは、ペプチドを構成するアミノ酸配列によってそれらの性質を大きく異にすることが明らかである。ここで取り上げた論文は、生体内でのコラーゲンタンパク質の機能や特性を評価するために有用な知見となっている。また、コラーゲン様ペプチドの生体内での作用を考察する際に非常に重要な研究である。コラーゲン様ペプチドを蛍光物質でラベル化したプローブを用いホモ三量体とヘテロ三量体を識別する研究では、迅速にヘテロ三量体を検出することを可能としており、アミノ酸配列の異なるコラーゲン様ペプチドにおいても適用できたため興味深い研究となっている。抗体にコラーゲン様ペプチドを結合させた研究では、コラーゲン様ペプチドが細胞膜透過性ペプチドとして機能することを見出しており、細胞内への取り込み効率の向上を利用した研究試薬や医薬品への応用など、多様な分野での展開が期待される。また、<sup>15</sup>N アイソトープでラベル化したグリシンを含むコラーゲン様ペプチドでは、<sup>15</sup>N アイソトープのペプチドでの導入位置からのシグナルを測定することでヘリックス末端の“ほつれ”の状態を明らかにするなど新たな情報を得ている。その手法を用いることで末端の状態変化についての有益な情報が得られる。これらのコラーゲン様ペプチドの構造に基づいた研究は、生体内での働きに関する研究や生体機能性材料としての特性評価に対して、今後も寄与することが期待される。

#### 参考文献

- 1) L. Knott et al., Collagen cross-links in mineralizing tissues: A review of their chemistry, function, and clinical relevance, *Bone*, **22**, 181-187 (1998).
- 2) K.S. Silvipriya et al., Collagen: Animal Sources and Biomedical Application, *J. Appl. Pharm. Sci.* **5**, 123-127 (2015).
- 3) A.V. Persikov et al., Stability related bias in residues replacing glycines within the collagen triple helix (Gly-Xaa-Yaa) in inherited connective tissue disorders, *Hum. Mutat.* **24**, 330-337 (2004).
- 4) S. Subramanian et al., Ethinyl estradiol treats collagen-induced arthritis in DBA/1LacJ mice by inhibiting the production of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , *Clin. Immunol.*, **115**, 162-172 (2005).
- 5) X. Sun et al., Colorimetric and fluorometric monitoring of the helix composition of collagen-like peptides at the nM level, *Chem. Commun.*, **52**, 3107-3110 (2016).
- 6) R. Masuda et al., Cellular uptake of IgG using collagen-Like cell-penetrating peptides, *Biol. Pharm. Bull.* **39**, 130-134 (2016).
- 7) A.M. Acevedo-Jake et al., Comparative NMR analysis of collagen triple helix organization from N- to C-termini, *Biomacromolecules*, **16**, 145-155 (2015).