

10th International Peptide Symposium
第 55 回ペプチド討論会

山本 拓実

Takumi YAMAMOTO

物質化学専攻修士課程 2018 年度修了

1. はじめに

私は 2018 年 12 月 3 日から 7 日にかけて、京都ロームシアターとみやこめっせで開催された「10th International Peptide Symposium 第 55 回ペプチド討論会」に参加し、『Effect of osteoblasts adhesion onto hydroxyapatite modified with collagen model peptides』をテーマにポスター発表を行った。

2. 研究背景

コラーゲンは哺乳類で最も多量に存在するタンパク質であり、歯などの形成に参与する物質である。コラーゲンなどの細胞外マトリックスの重大な役割の一つは細胞接着であるが、生体材料として生物由来のコラーゲンを利用する場合、感染病やコラーゲンの変性温度など機能制御が困難であるといった問題点がある。これらの問題を改善するために、コラーゲンモデルペプチド (CMP) を化学合成することにより、感染病抑制や機能制御が容易になると考えられる。本研究では、骨や歯といった硬組織の主要構成成分であるヒドロキシアパタイト (HA) と細胞を複合化するために、I 型コラーゲン由来の細胞認識部位 (GFOGER) および、HA との親和性をもつリン酸化セリンを配置した CMPs を合成し、CD スペクトルを用いてコラーゲンの二次構造評価をするとともに、コラーゲンの二次構造の温度依存性についての測定を行った。さらに、HA との結合を試みた。

3. 実験方法

固相合成法により CMP を合成し、逆相 HPLC に

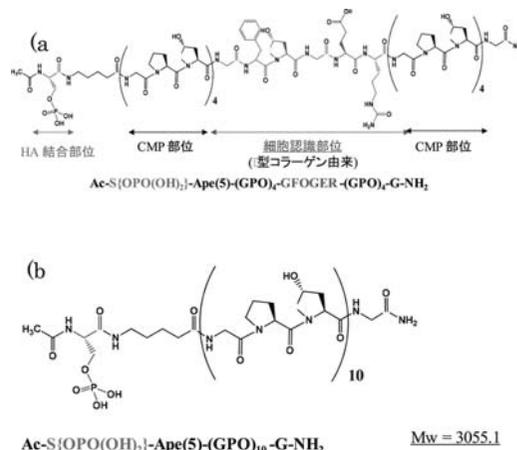


図 1 (a) CMP-1, (b) CMP-2 のペプチドの配列

より精製, MALDI-TOF-MS で同定した。精製ペプチドを緩衝液中 200 μM の濃度で 4°C, 24 h 自己集合化を行い、CD スペクトルによる二次構造評価を試みた。また、HA 基板に修飾した後、XPS でペプチドの存在を確認し、その後細胞実験を行った。

4. 結果と考察

CD スペクトルの結果から 4°C 条件下では 200 nm 付近に負のピーク、225 nm 付近に正のピークがあることより、2 種類ともトリプルヘリックス構造であると考えられる。80°C 条件下では 2 種類とも 225 nm 付近の正のピークが消失し、200 nm 付近の負のピークが確認できる。

構造転移後、再び 4°C 条件下でインキュベートすると、ランダム構造から再びトリプルヘリックス構造へと転移した。これら二つの集合化溶液を HA 基盤にコーティングし、その表面を XPS で評価した。ペプチドをコーティングした表面ではリン酸化カルシウム由来のカルシウムとリンのピークが減少していた。また、ペプチド由来と考えられる窒素のピークが確認できたことからペプチドは HA 基盤の表面に存在していることが考えられる。細胞実験ではマウス由来の骨芽細胞 MC3T3-E1 を使って行った。ペプチドをコーティングした基盤とコーティングなしの基盤のサンプルに 1×10⁴ 個の細胞を

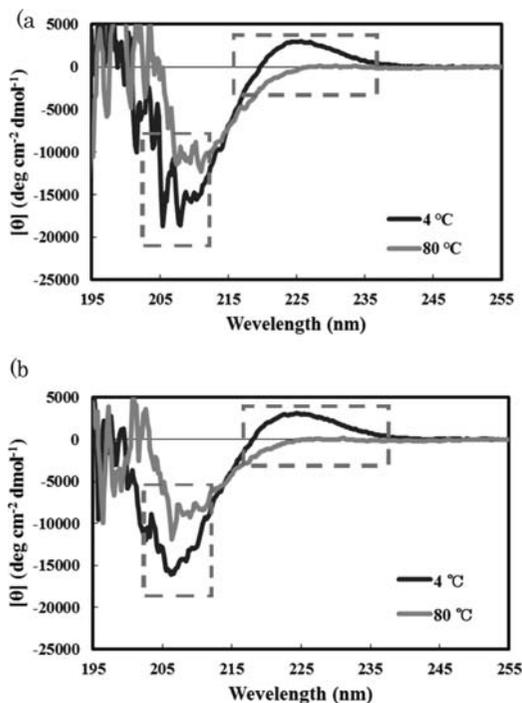


図2 (a) CMP-1 の CD スペクトル
(b) CMP-2 の CD スペクトル

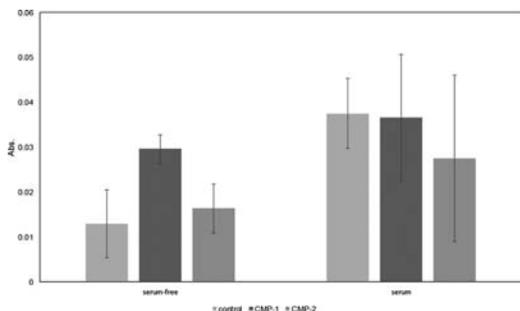


図3 CCK-8 測定

播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で3時間接着を行い、初期の接着量の違いを見た。また、培養液中の血清を含んだものと、無血清の条件もで行った。結果として、無血清条件下では、ペプチドが存在すると細胞の接着量が増加した。しかし、血清中で

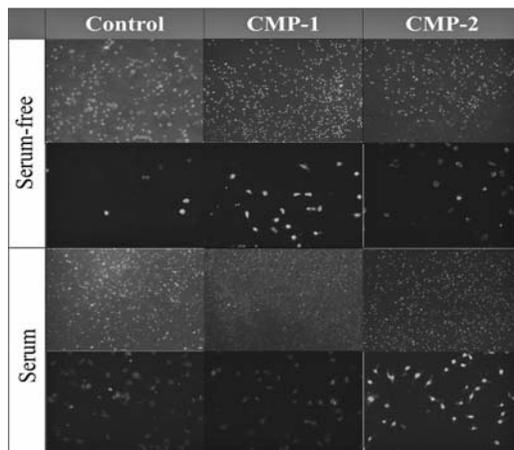


図4 各サンプルの蛍光顕微鏡画像

は、有意な差が見られなかった。これは、血清中のタンパク質が基板表面に接着し、細胞を接着させたためだと考えられる。

5. まとめ

CD スペクトルより、トリプルヘリックス構造しているのが安定であり、熱変性温度は約 45°C と約 44°C と比較的高い値であり、生体に対しても親和性が高いのではないかと考えられる。また、基盤に被膜すると細胞の初期接着を増加させることがわかった。これからの展望として細胞の増殖や分化に影響を及ぼすか研究していく考えである。

6. おわりに

今回は初めての発表だったので自分の考えがうまく発表できなかった。これからも学会に積極的に参加して人前で自分の考えが述べられる力をつけたい。また、たくさんの方から、研究に対する意見を頂きこれからより一層研究に精をだしていきたいと思う。最後に研究のご指導頂いた富崎先生、山崎先生ならびに研究生方に深くお礼申し上げます。