

## 細胞情報伝達の増強・変調・持続化を実現するペプチド材料

Peptide Materials for Enhancement, Modulation, and Prolongation of Signal Transduction

研究代表者 京都大学大学院工学研究科材料化学専攻 木村 俊作

Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

Shunsaku Kimura

共同研究者 奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科 伊藤 嘉浩

Graduate School of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology

Yoshihiro Ito

We developed here novel peptide biomaterials which affect specifically the signal transduction in the cell membrane systems. In these peptide biomaterials, naturally occurring peptides or proteins were fixed at a surface of liposomes (vesicles formed by a lipid bilayer membrane) or polymer matrix. In the former case, many peptide hormones were immobilized at a surface of the bilayer membrane, where the immobilized ligand showed a higher receptor affinity than free peptide hormones. Furthermore, when two kinds of peptide hormones were immobilized on the same bilayer membrane, one of them showed a higher affinity than that without the other. In the latter case, insulin or epidermal growth factor (EGF) was immobilized at a surface of various polymeric materials. The amounts of immobilized insulin required to stimulate cell growth were 1-10 % of the amount of free insulin required to produce the same effect. The immobilized EGF enhanced the growth of anchorage-dependent cells more than native EGF. Interestingly, the maximal mitogenic effect was greater than that of native EGF by artificial juxtacrine signaling. In summary, peptide or protein ligands, which are involved in receptor-mediated signaling, show unique biological activities upon immobilization at a surface of liposome or polymer film, which are different from those of free ligands.

### 研究目的

本研究では、レセプターを介して生理活性を発現するペプチドあるいはタンパク質リガンドに注目し、これらを化学的に様々なマトリックスに固定化することで、新規なペプチド材料を開発し、これらのリガンドが有していた従来の生理活性と比べて、生理活性が増強、変調、持続化されたリガンドシステムを構築することを目的としている。このような新規な生理活性ペプチド材料の開発の基礎となる概念は、ペプチドあるいはタンパク質リガンドを溶液中でフ

リーな形態で作用させるのではなく、マトリックスに組織化して固定化し、レセプター-レセプター相互作用を調節しようとするものである。ここで、レセプター-レセプター相互作用の調節には、次のような4種類の局面があると我々は考えている。

(図1) i) 1個のレセプター分子の中で、リガンド結合部位とサブサイトあるいはアクセサリー結合部位の両者と同時に結合するようリガンドの組織化。ii) 細胞膜で隣接する2種類の異なるレセプターを架橋するような形での2種類のリガンドの組織化。

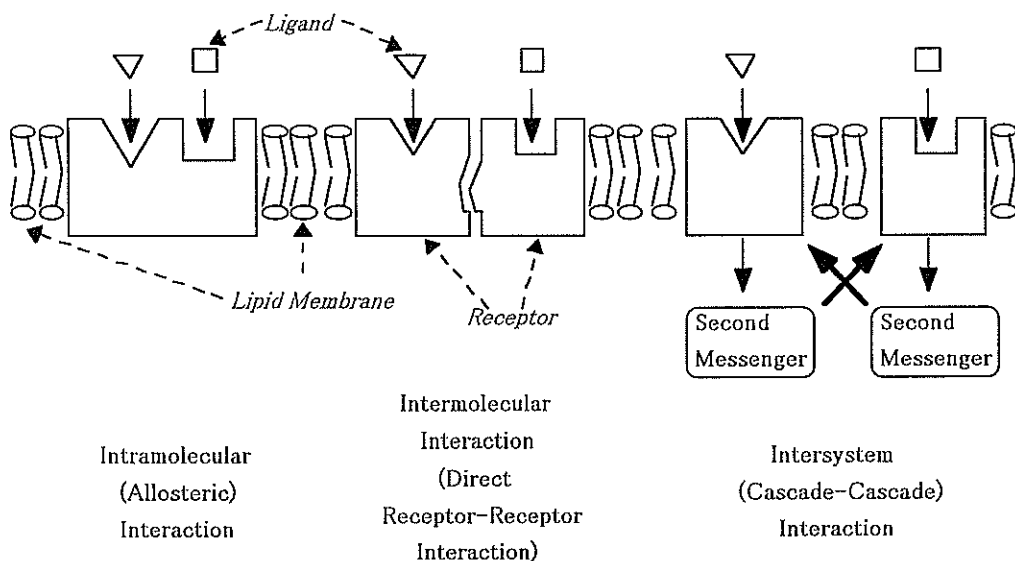


図1 リガンド結合によって誘導されるレセプター-レセプター相互作用の3種類の機構。

iii) セカンドメッセンジャーを介した2種類の情報伝達経路の相互作用を積極的に誘導するようなリガンドの組織化。iv) リガンドがレセプターに結合した後のレセプターの細胞膜中での再編成（パッチ形成や内在化）を調節するようなリガンドの組織化。これら4種類の局面に関する知見を得るため、次のようなリガンドシステムを構築した。1) 2種類のペプチドホルモンをスパーサーを介して結合した2価リガンド。2) ペプチドホルモンをリポソーム表面上に固定化した多価リガンド。3) 成長因子をポリマーフィルム上に固定化した基板上固定化リガンド。以下、それぞれについて、得られた研究成果を簡単にまとめる。

### 研究成果

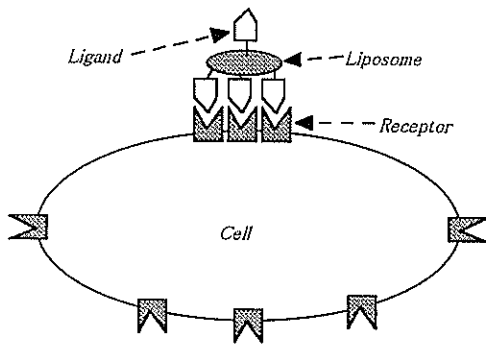
#### 1) 2価リガンド

鎮痛作用を有するエンケファリンと同じく神経ペプチドであるニューロテンシンを、様々な鎖長のスパーサーを介して結合した2価リガンドを合成した。これらのリガンドのニューロテンシンレセプターへの親和性は、過剰のエンケファリンが存在すると

減少したことから、2価リガンドは同時に2種類の結合部位に結合することでレセプター親和性が向上することがわかった。スパーサー鎖長が8量体と12量体の2価リガンドが高いレセプター親和性を示したことから、2種類の異なるレセプターの架橋にはこのスパーサー長が適していることが示唆された。しかし、エンケファリンとニューロテンシンとを直接結合した2価リガンドでも高い親和性が観測されたことから、この場合には、エンケファリン部位がレセプターのアクセサリ部位に結合していることが考えられる。興味深いことには、この2価リガンドはcGMPの濃度を上昇させるが、その効果はフリーのエンケファリンとニューロテンシンとの混合物の場合よりも強かった。レセプター-レセプター相互作用によるものと考えられる。

#### 2) リポソーム固定化多価リガンド

エンケファリン/脂質複合体およびニューロテンシン/脂質複合体を合成し、DMPCリポソームに組み込んだ。この多価リガンドのオピオイドレセプター親和性は、



Multivalent Ligand System

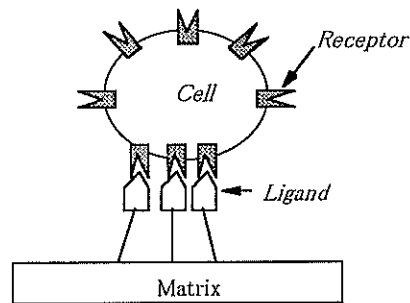
図2 リポソームを用いた多価リガンドシステム。

フリーのときに比べて、リポソームに固定化することで飛躍的に上昇した。最大のレセプター親和性が観測されたのは、ニューロテンシン部位と脂質との間のスペーサーに9量体を用い、脂質とリガンドとをモル比200で多価リガンドを調製した場合で、天然のニューロテンシン8-13フラグメントより高くなった。蛍光標識したリポソームを用いて、オピオイドレセプターを有する細胞との結合を蛍光顕微鏡観察により調べたところ、リポソームに固定化したペプチドホルモン誘導体は、リポソームから解離することなく、細胞膜上のレセプターに結合していることが示された。このことから、1個の多価リガンドリポソームと細胞膜上の複数個のレセプターとが多点結合することで、レセプター親和性が向上し、バイオシグナリングを増強できたと考えられる。また、リポソームに固定化したニューロテンシン/脂質複合体のレセプター親和性は、リポソームにエンケファリン/脂質複合体を共固定化することで増大した。この共固定化効果は、DAGOの存在下では消失したことから、1個のリポソームに固定化された2種類のリガンドが細胞膜上の2種類のレセプターと多点結合することで、この効

果が現れると考えられる(図2)。

### 3) 基板上固定化リガンド

インシュリンを光照射により培養ディッシュに固定化し、細胞増殖効果について検討した。インシュリンには、3個のアミノ基が存在するが、azidobenzoic acidの活性エステルと反応させることで、インシュリン1分子あたり1個のazidobenzoic acidを共有結合で導入した。これをポリスチレン製細胞培養用ディッシュにコートした後、UV光照射を行って、インシュリンを表面に固定化したポリスチレンディッシュを調製した。この培養ディッシュで繊維芽細胞STOを、無血清、無タンパク質で培養したところ、インシュリンあるいはazidobenzoic acidで修飾したインシュリンを同量添加した場合よりも細胞成長が促進された。チミジンの細胞による取り込み量は、インシュリンを固



Artificial Juxtacrine Signaling

図3 基板上固定化リガンドシステム。

定化したディッシュを用いたときが一番多かった。光照射により固定化したインシュリンは、細胞に取り込まれたり、メディアウム中に放出されることはなかった。固定化されたインシュリンは、内在化によるレセプターのdown regulationを妨げることから、長時間にわたり細胞情報伝達タンパク質を

活性化することが原因と考えられる。

さらに、上皮細胞成長因子(EGF)を固定化したポリマーフィルム上で細胞培養を行ったときにも、細胞増殖がフリーのEGFに比べて促進されることが示された。EGFは、細胞膜に固定化された状態で隣接する細胞とのcommunicationにより、細胞増殖活性を示すことが知られている(juxtacrine stimulation)。ポリマーフィルム上に固定化したEGFが同じ効果を示したことから、基板上固定化リガンドによる細胞増殖活性の発現は、artificial juxtacrine stimulationと捉えられる(図3)。

#### 今後の課題と発展

今回の研究により、レセプター-レセプター相互作用を誘導する4種類の局面すべてを、新規なペプチド材料により実現することができた。いずれの場合においても、フリーな状態での単独あるいは2種類共存下のペプチドリガンドの生理活性と比べると、2価リガンド、多価リガンドあるいは基板固定化リガンドとすることで、生理活性の増強あるいは異なった作用の発現が認められた。細胞膜情報伝達を理解するにあたり、そのカスケードに関わる分子種の同定とそれらの関連・相互作用の解明が重要であることは勿論であるが、情報伝達に関わるレセプターをはじめとする分子種が活性化されるとき、空間的および時間的要素についても重要な因子として検討されていく必要があると考えられる。この観点から、本研究で提示したりガンドシステムが、他の生理活性物質にも応用され、様々な新しい知見が得られることを期待したい。

#### 発表論文リスト

1) Zhao, J., Kimura, S. and Imanishi, Y.:

Receptor Affinity of Neurotensin Message Segment Immobilized on Liposome. *Biochim. Biophys. Acta*, **1282**, 249-256 (1996)

2) Zhao, J., Kimura, S. and Imanishi, Y.: Multivalent Ligand System Carrying Enkephalin and Neurotensin Coimmobilized on Liposomes. *J. Peptide Science*, **2**, 245-251 (1996)

3) Yano, K., Kimura, S. and Imanishi, Y.: Simultaneous Activation of Two Different Receptor Systems by Enkephalin/Neurotensin Conjugates Having Spacer Chains of Various Lengths. *European J. Pharmaceutical Sci.*, accepted.

4) Ito, Y., Chen, G. and Imanishi, Y.: Photoimmobilization of Insulin onto Polystyrene Dishes for Protein-Free Cell Culture. *Biotechnology Progress*, **12**, 700-702 (1996)

5) Chen, G., Ito, Y. and Imanishi, Y.: Mitogenic Activities of Water-Soluble and -Insoluble Insulin Conjugates. *Bioconjugate Chem.*, **8**, 106-110 (1997)

6) Chen, G., Ito, Y., Imanishi, Y., Magnani, A., Lamponi, S. and Barbucci, R.: Photoimmobilization of Sulfated Hyaluronic Acid for Antithrombogenicity. *Bioconjugate Chem.*, **8**, 730-734 (1997)

7) Ito, Y., Chen, G., Guan, Y. and Imanishi, Y.: Patterned Immobilization of Thermoresponsive Polymer. *Langmuir*, **13**, 2756-2759 (1997)

8) Chen, G., Ito, Y. and Imanishi, Y.: Regulation of Growth and Adhesion of Cultured Cells by Insulin Conjugated with Thermoresponsive Polymers. *Biotechnol. Bioeng.* **53**, 339-344 (1997)

9) Chen, G., Ito, Y. and Imanishi, Y.: Photo-Immobilization of Epidermal Growth Factor Enhances Its Mitogenic Effect by Artificial Juxtacrine Signaling. *Biochim. Biophys. Acta*, **1358**, 200-208 (1997)