

オリゴペプチド超分子ハイドロゲルの階層構造と構造に与える  
添加塩効果の小角散乱法による研究  
SAXS Study on Hierarchical Structure of Oligopeptide Supramolecular  
Hydrogel Depending on Salt Concentration

山本 勝宏<sup>a</sup>, 伊藤 恵利<sup>b</sup>  
Katsuhiko Yamamoto<sup>a</sup>, Eri Ito<sup>b</sup>

<sup>a</sup>名古屋工業大学大学院工学研究科, <sup>b</sup>(株)メニコン

<sup>a</sup>Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, <sup>b</sup>Menicon. Co., Ltd.

疎水性アミノ酸のアラニン(A)、親水性アミノ酸のアスパラギン酸(D、マイナス電荷)、アルギニン(R、プラス電荷)からなるオリゴペプチド SPG-178([CH<sub>3</sub>CO]-RLDLRLALRLDLR-[NH<sub>2</sub>])は、水中で自己集合しハイドロゲルを形成する。X線散乱法によるその場観察および電子顕微鏡観察により、ハイドロゲルの階層構造を明らかにした。SPG-178 は水中でβ-シート構造を取り、リボン状に配列した構造となる。その際リボンの表面は一方が親水性、他方が疎水性となり、水中では疎水性面どうしが凝集したバイレイヤー構造となった、紐状構造を形成する。その紐の直径は約 5 nm であり、添加塩濃度増加に伴い見かけの直径が増大することが分かった。それに伴いゲルの貯蔵弾性率が大きくなる。自己組織化により形成した紐状超分子は他の紐との絡み合う、物理架橋などを通して三次元的なネットワーク構造を形成する。大気圧走査型電子顕微鏡観察から網目の大きさが数μmであることを明らかにした。これらの広範な空間スケールにおける階層構造の構造因子はゲルの物性と強く相関しているものとおもわれ、ゲルの応用を考える上で重要なパラメータとなる。

キーワード： Self-assembled peptide; fibrillar hydrogel; X-ray Scattering,  
Atmospheric scanning electron microscopy

背景と研究目的：

疎水性アミノ酸のアラニン(A)、親水性アミノ酸のアスパラギン酸(D、マイナス電荷)、アルギニン(R、プラス電荷)からなる 16 量体ペプチド RADA16(RADARADARADARADA)は、水中で自己集合し、ナノメートルオーダーの幅を有した繊維(ナノファイバー)からなるゲルを形成する(MIT の Shuguang Zhang 教授ら[1])。このようなペプチドゲルの含水率は 99%程度であり、このゲルはコラーゲンやヒアルロン酸の代替物として注目されており、細胞を 3 次元的に培養するためのスキャフォールド(“細胞の足場”となる材料)[2-5]、止血剤[6][7]、薬物徐放基材[8][9]としての使用が検討されている。しかし、この RADA16 ゲルは酸性の pH では透明で扱いやすいゲルとなるが、中性の pH では白濁してしまい、扱いにくい欠点があり実用には壁があった。本申請研究で用いるペプチドは、電荷を持つアミノ酸の数を変えることや疎水性の高いアミノ酸ロイシン(L)を適切に配列させたものであり、中性 pH において高い透明度と強度を有するゲルの開発(ペプチド SPG178、シーケンスは RLDLRLALRLDLR)に成功したものである。SPG178 からなるペプチドゲルは、MIT 開発のゲルの性能を損なうことなく、適用範囲を広げることができたといえる。特に pH の影響を受けやすい生体に用いることに適しており、細胞培養可能なハイドロゲルであることで利用が進められている。ゲルの構造に関しても、これまで放射光実験において、ハイドロゲル中にナノファイバーが形成しており、ファイバー内のペプチドの二次構造がβ-シート構造を形成し凝集していることを確認してきた[5]。β-ストランド構造がいくつも連なり紐状(幅はオリゴペプチドの分子鎖長)の構造体を形成する。一つのひもは一方の表面が疎水性、その裏面が親水性を示すものとなり、水中では疎水性面を合わせるように会合した高次構造を取った、紐状超分子を形成する。この紐状超分子の長さが十分長いとき、お互い接触し三次元的に物理架橋を起こしたゲル状となると考えている。

これまで、ハイドロゲルを構築するナノファイバーの存在は原子間力顕微鏡または電子顕微鏡

を用いて確認してきた。その構造は、乾燥状態の特殊な条件下であり水中での真の構造であるか疑わしいが、その場観察としての小角散乱法により見積もられた構造は、真の構造であるといえる。これまでの小角散乱実験結果では、顕微鏡法で求めたペプチドファイバーの構造パラメーター(紐状構造と幅)とほぼ同じであったが、水中での構造を確認した意味では重要な結果である。

本報告書では、実空間像のその場観察を含め水ゲルの幅広い空間スケールでの階層構造を示し、水ゲルの各溶液調整の条件(塩濃度、ペプチド濃度など)による構造の相違について、散乱データのモデル解析により構造と添加塩濃度に関する相関を取得した結果について報告する。

### 実験：

試料は合成オリゴペプチド SPG-178(アミノ酸配列 13 残基:([CH<sub>3</sub>CO]-RLDLRLALRLDLR-[NH<sub>2</sub>]) A: アラニン L: ロイシン D: アスパラギン酸 R: アルギニンを示す)。実験は所定の濃度で調整した SPG178 水溶液に塩を添加し塩濃度の異なる溶液(水ゲル)を調整した。その溶液(水ゲル)を両面カプトン(厚み 20 μm)薄膜を張ったセル(セル厚み 1 mm)につめ、室温で小角散乱測定を行った。カメラ長は 3.2 m、X 線エネルギー 18 keV、検出器には Pilatus 2 M を利用した。ビームサイズは縦横約 300 μm であり、露光時間は 100–300 秒とした。カメラ長の補正にはベヘン酸銀を用いた。

### 結果および考察：

Figure.1 に水ゲル(1.5 wt%)の小角・広角 X 線散乱(SAXS/WAXS)結果を示す。WAXS プロファイルから水ゲル中にβ-シート構造が形成されていることを示すピークが観測された。SAXS プロファイルの低  $q$  領域において、散乱強度が  $q^{-1}$  に比例するので、棒(紐)状構造が形成されていることが分かる。実線(a–d)は次のモデルを仮定したもっとも実験データに合うように計算した結果である。モデル a は直径 6 nm の円筒、モデル b は平行六面体( $a = b = 5.2$  nm)、モデル c は楕円シリンダー( $a = 7.3, b = 5.6$  nm)、モデル d は平行六面体( $a = 7.3, b = 5.2$  nm)である。これらの値は、これらの値はこれまでに観測してきた原子間力顕微鏡(マイカ基板上に吸着)、透過型電子顕微鏡(ネガティブ染色法や凍結切断レプリカ法)で得られた紐状構造の幅 5 nm に近い値である。その中でもモデル a と b が最も散乱実験データに一致する結果であった。実空間像観察結果の 5 nm は分子モデル計算による分子サイズ(ペプチド一分子の長さが 5 nm)に対応する。モデル c と d は  $a$  軸の長さが 7 nm 以上であり、その大きさとのがずれが大きいこともあり、これらのモデルは本来の姿ではないと考えている。より詳細な形状の解析にはもう少し  $q$  レンジとして 1–10 nm<sup>-1</sup> の範囲の精度の高いデータが必要であるが、この領域の散乱は現時点では再現性と十分な統計精度のデータが得られていないことからこれ以上の考察は現状では難しい。

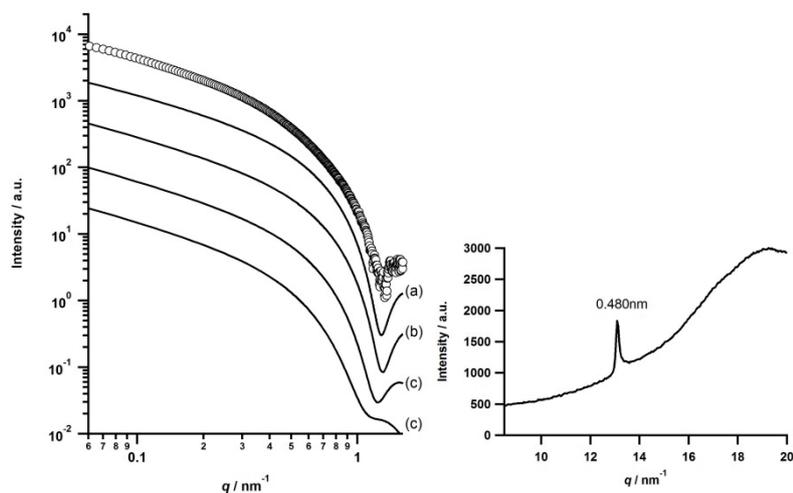


Figure.1. SAXS (left: open symbols) and WAXS (right: solid line) profiles of the SPG-178 peptide hydrogel 1.5 wt%. Left: Solid lines indicated calculated assuming the fiber models; (a) cylinder with a diameter of 6.0 nm, (b) parallelepiped ( $a = b = 5.2$  nm), (c) elliptical cylinder ( $a = 7.3, b = 5.6$  nm), (d) parallelepiped ( $a = 7.3, b = 5.2$  nm).

ハイドロゲルの網目構造の大きさについても重要な因子であるが、観測した小角散乱の  $q$  レンジではその議論ができない。また、TEM 観察でも網目構造は観測されたが、水中での網目自体は見るのが極めて難しい。今回、水中をその場観察可能な大気圧走査型電子顕微鏡(Atmospheric SEM: ASEM)[10]観察を行い、網目の存在とその大きさの実空間像観察を行った。Figure.2 には ASEM 像を示す。実際、現状では SPG-178 ペプチド分子が形成する紐状分子は直接的に観測できない。そこで、紐状分子の周りに金により被覆した状態を作成し、その ASEM 観察を行った像である。

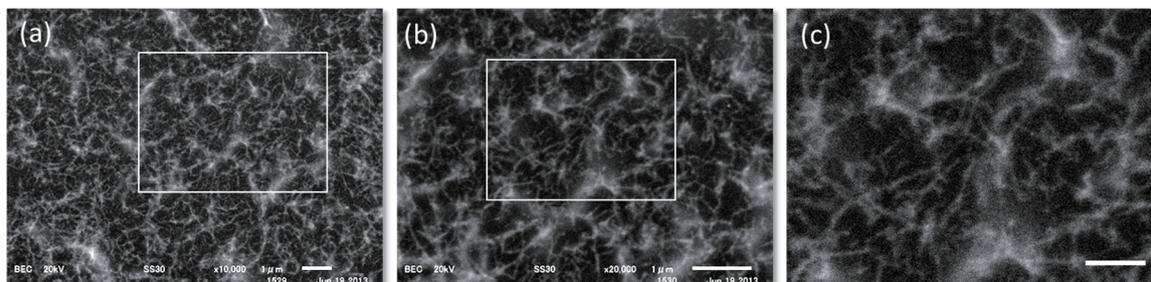


Figure.2. ASEM micrographs of the self-assembled SPG-178 hydrogels in wet state; (a) the magnification was  $\times 10,000$  ( $1 \mu\text{m}$  scale bar), (b) the identical part of the box in a with magnification of  $\times 20,000$  ( $1 \mu\text{m}$  scale bar), and (c) digital zooming image of box in b ( $2 \mu\text{m}$  scale bar).

繊維状の構造体が観測され、その幅が約  $20 \text{ nm}$  であった。SAXS やこれまでの TEM 観察からの繊維径と比較するとかなり太いものであるが、これは金被覆の効果と、ASEM の解像度の限界値であることに依存する。ASEM と同条件で調整した試料の SAXS 測定もおこなっており、繊維幅が  $15\text{--}20 \text{ nm}$  程度に増大していることも確認した。ASEM 測定により、網目の大きさは数  $\mu\text{m}$  オーダーで形成していることが確認できた。

このハイドロゲルの応用を考える際、添加塩濃度に伴う構造変化やゲルの物性との相関を明らかにすることが求められる。添加塩濃度が変化するとハイドロゲルの弾性率も変化することが既に分かっている。塩濃度と構造の相関を明らかにする目的で構造の塩濃度依存性(繊維幅や持続長、形)を小角散乱測定により評価した。Figure.3 には塩濃度の異なるハイドロゲルの小角散乱プロファイルを示す。紐状構造の散乱関数を用いてフィッティングすることで構造パラメーターを得た(Figure.3 の実線)。基本的な構造の大きさ(添加塩なし)としては幅(直径)約  $5 \text{ nm}$  の繊維状構造で説明できる(Figure.1 の時と同様)。塩濃度増加させると繊維の直径が増大する傾向になることが分かった。

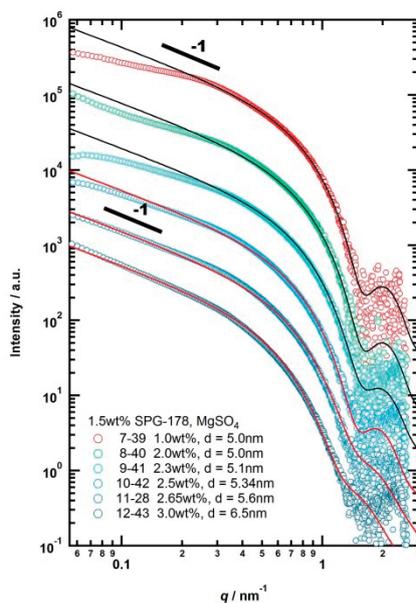


Figure.3. SAXS profiles of the SPG-178 hydrogels with different ion concentrations.

そこで SPG-178 に対する添加塩重量濃度に対して繊維幅を Figure.4 にプロットした。これより次の知見を得た。1)繊維幅は塩濃度が低いときの変化率はほとんどないが、ある濃度(CIC)を境に急激に上昇する。2)繊維直径はイオン種に依存しない。3)繊維直径の急激な増加が起こる濃度以上では、繊維直径の変化率にペプチド(SP178)濃度依存性があり、ペプチド濃度が高いと増加率は大きい。紐状構造の直径は一分子の分子鎖長で決まる値であるが、イオン添加に伴う直径変化は本実験条件内では 2 nm 以内に収まっており、繊維状物がさらに会合するなどしたものではない。おそらくバイレイヤー状の紐の周囲にイオンがまとわりついた状態で存在していると考えた。紐状構造の表面はプラス電荷が過剰な状態であり、硫酸イオンが吸着することができるものと考えられる。CIC は硫酸イオンにして約 2.4 wt%であった。この濃度はペプチド 1.5 wt%濃度の試料において、ちょうど過剰な正電荷を打ち消す量の硫酸イオン濃度に一致する。なぜ、CIC 濃度を超えると繊維直径が大きく変化するのは、溶液中で紐状構造周囲の陽イオンあるいは水分子の構造が異なったことにより見かけ上繊維直径が大きくなってみえたものと考えているが、考察の域を超えない。今後の課題とする。

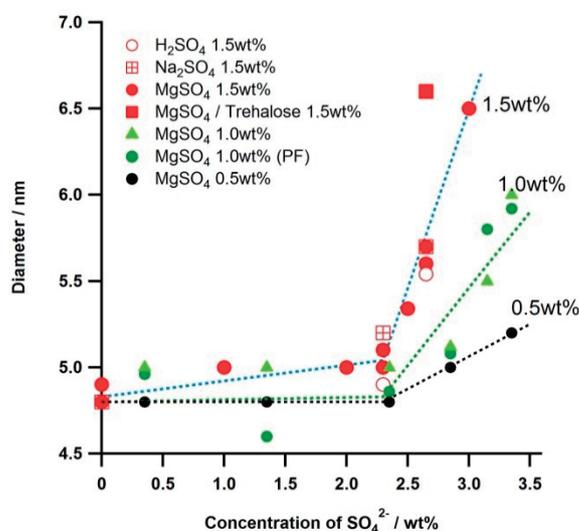


Figure.4. Ion concentration dependence of the diameter of the fibrils in the hydrogels. SPG-178 peptide concentration in hydrogel; red: 1.5 wt%; green: 1.0 wt%; and black 0.5 wt%. Concentration of  $\text{SO}_4^{2-}$  was referred as relative weight fraction to SPG-178 peptide.

#### 参考文献：

- [1] S. Zhang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 3334, 1993.
- [2] J. Kisiday et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 9996, 2002.
- [3] G. A. Silva et al., *Science* 2004, **303**, 1352.
- [4] L. Haines-Butterick et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 7791, 2007.
- [5] Y. Nagai et al., *Biomaterials*, **33**, 1044, 2012.
- [6] R. G. Ellis-Behnke et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 5054, 2006.
- [7] S. Komatsu et al., *PLoS ONE*, **9**, e102778, 2014.
- [8] Y. Nagai et al., *J. Control. Release*. **115**, 18, 2006.
- [9] S. Koutsopoulos et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 4623, 2009.
- [10] H. Nishiyama et al., *J. Struct. Biol.* **169**, 438, 2010.