

# ペプチド内包リポソームを利用した リン酸カルシウムの結晶成長制御

立命館大学 生命科学部 応用化学科 越山友美

Control of Crystal Growth of Calcium Phosphate using Peptide-encapsulated Liposomes

Tomomi Koshiyama

Department of Applied Chemistry, College of Life Sciences, Ritsumeikan University

骨形成では、骨芽細胞から分泌される脂質二分子膜と蛋白質からなる基質小胞内で、リン酸カルシウム的一种であるヒドロキシアパタイトが生成することが知られている。本研究では、天然における基質小胞内でのリン酸カルシウム生成に着想を得て、人工の球状脂質二分子膜であるマイクロサイズの巨大リポソームを小胞として用い、リン酸カルシウムの生成制御能を有するペプチドを内包した巨大リポソームを作製し、光学顕微鏡を用いて巨大リポソーム内部で進行するリン酸カルシウムの生成過程を観察した。ペプチドの有無により生成する固体のサイズや形状が異なることを明らかとした。

During bone formation by osteoblasts, it is known that hydroxyapatite, a type of calcium phosphate, is formed within matrix vesicles consisting of lipid bilayers and proteins. Inspired by the calcium phosphate formation within matrix vesicles in nature, we used micro-sized giant liposomes, which are artificial spherical lipid bilayers, as vesicles to form calcium phosphate. We prepared giant liposomes encapsulating a peptide that can control calcium phosphate formation, and observed the process of calcium phosphate formation occurring within the giant liposomes using an optical microscope. The results showed that the size and shape of calcium phosphate changed depending on the presence or absence of the peptide.

## 1. はじめに

生物が生産する生体鉱物的一种であるカルシウム塩は、骨や貝殻などに含まれる無機成分であり、カルシウム塩の組成、結晶性、結晶サイズや形態は、骨や貝殻の化学的・物理的性質を決定する重要なファクターであり、生物学や生体材料工学の分野において生体鉱物の形成機構に関する研究が進められている。例えば、骨のヒドロキシアパタイト(リン酸カルシウムの一种)は、骨芽細胞から分泌された脂質膜で囲まれた基質小胞内への無機リン酸と  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの取り込み・濃縮により形成すると推定されている。*in vitro* での生体鉱物形成に関する研究においては、核形成・結晶成長に関与している蛋白質を同定し、蛋白質やそのアミノ酸配列の一部を抽出したペプチドフラグメントの生体鉱物生成への影響が調べられている。一方で、基質小胞が提供する脂質膜空間を考慮した生体鉱物形成に関する研究例は少なく、基質小胞を人工的に再現できれば、生体鉱物形成における基質小胞の役割の解明に繋がるばかりでなく、新たな無機結晶合成法を確立できると考えられる。そこで本研究では、天然の常温・常圧下での生体鉱物形成に倣い、ペプチド内包リポソ-

ムを利用したリン酸カルシウムの結晶成長制御を目指した。まずは、リン酸カルシウムの形成に参与するペプチドの合成、ペプチド非存在下と存在下でのリン酸カルシウム生成条件の系統的なスクリーニング、および、光学顕微鏡による巨大リポソーム内部空間におけるリン酸カルシウムの生成過程の観察に取り組んだ。

## 2. 実験方法

### 2.1 ペプチドの合成

Fmoc 固相合成法を用いてペプチドを手動で合成した。各縮合反応後に Kaiser test を行い、反応の進み具合を確認した。Fmoc 固相合成により得られた粗精製のペプチドは、C18 逆相カラム (COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR- II) (nacalai tesque) を装着した逆相 HPLC により単離精製した。また、精製したペプチドは、MALDI-TOF-MS 測定により目的物であることを確認した (マトリックスに  $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸を使用)。また、蛍光分子修飾ペプチドの合成は、単離精製したペプチドに対して 2 当量のマレイミド基を有する蛍光分子を添加し、室温で 20 時間反応させた。スピンカラムにより過剰の蛍光分子を除去した後、逆相 HPLC により目的の蛍光分子修飾ペプチドを単離精製した。

### 2.2 リン酸カルシウム生成条件の系統的なスクリーニング

リポソーム非存在下でのリン酸カルシウム生成のスクリーニングには、Ca<sup>2+</sup> イオン源として CaCl<sub>2</sub> 水溶液、リン酸源としてリン酸二水素ナトリウム (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) とリン酸水素二ナトリウム二水和物 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O) の混合水溶液を用いた。様々な反応条件でリン酸カルシウムの生成反応を行い、生成した沈殿は位相差顕微鏡を用いて観察した。

### 2.3 巨大リポソーム内部空間におけるリン酸カルシウムの生成過程の観察

巨大リポソームは一般的な界面通過法により作製した<sup>1)</sup>。巨大リポソーム内部空間で進行するリン酸カルシウムの生成は、位相差、および蛍光顕微鏡を用いて経時観察を行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 ペプチドの設計と合成

リン酸カルシウムの生成反応に関わる蛋白質やペプチドは様々報告されており、本実験ではリン酸カルシウム生成を抑制する機能を有するオステオポンチンに着目し<sup>2,3)</sup>、その部分配列であるペプチド OPN peptide (配列: DDMDDEDDE) を合成した。このペプチドに多く含まれるアスパラギン酸 (D) やグルタミン酸 (E) が結晶形成に参与すると考えられている。さらに、巨大リポソーム内でのペプチドの分布が観察できるように、蛍光分子を化学修飾した OPN peptide (OPN<sub>蛍光</sub> peptide) も設計・合成した。なお、OPN peptide の N 末端に導入したシステイン残基とマレイミド基の反応を利用して蛍光分子を化学修飾した。逆相 HPLC で単離精製した OPN peptide と OPN<sub>蛍光</sub> peptide の MALDI-TOF-MS スペクトルを図 1 に示す。OPN peptide では、Na<sup>+</sup> もしくは K<sup>+</sup> がそれぞれ付加した [M+Na]<sup>+</sup> と [M+K]<sup>+</sup> のピークが観察され、OPN<sub>蛍光</sub> peptide では、Na<sup>+</sup> が付加した [M+Na]<sup>+</sup> のピークが観察され、目的のペプチドが得られたことを確認した。

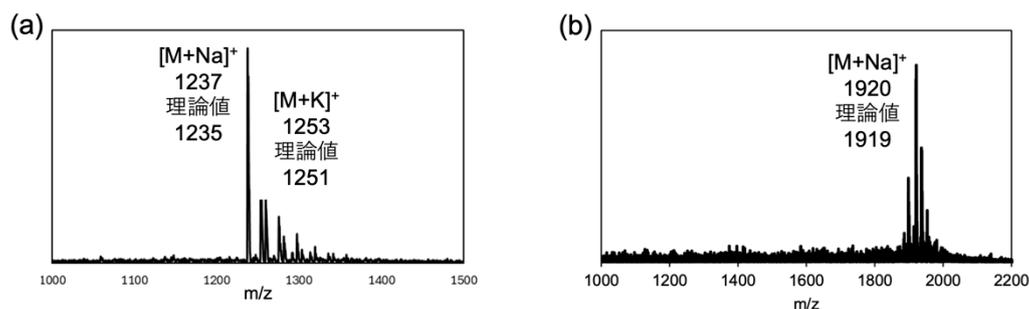


図1 (a) OPN peptide および (b) OPN<sub>蛍光</sub> peptide の MALDI-TOF-MS スペクトル

### 3.2 リン酸カルシウムの生成反応の系統的なスクリーニング

合成した OPN peptide のリン酸カルシウム生成への影響を調べるため、まずはリポソームを用いない系でリン酸カルシウム生成のスクリーニングを行った。反応溶液の pH は 7.4、反応温度は 23°C として、OPN peptide 濃度、Ca<sup>2+</sup> イオン濃度、リン酸濃度、および反応時間を系統的に変化させた。得られた結果の内、OPN peptide 非存在下、存在下で、リン酸カルシウム生成に大きな違いが見られた条件の一例を示す。反応溶液中の Ca<sup>2+</sup> イオン濃度を 1.5 mM、リン酸濃度を 25 mM とし、OPN peptide 非存在下、存在下 (OPN peptide 濃度は 25 μM) で反応させた時の 30 分後と 60 分後の反応溶液の位相差顕微鏡画像を図 2 に示す。30 分後の位相差顕微鏡画像では、OPN peptide 非存在下、存在下の両方でマイクロサイズの固体が観察されたものの、OPN peptide 存在下の方が固体のサイズが小さく、また固体の量が少なかった。さらに、60 分後の OPN peptide 非存在下の位相差顕微鏡画像では、マイクロサイズの固体が凝集した数十マイクロサイズの塊が観察されたことに対し、60 分後の OPN peptide 存在下では塊は少なく、30 分後と同程度のサイズの固体が観察された。加えて、遠心操作により反応溶液中の沈殿を回収したところ、OPN peptide 非存在下の沈殿量に比べて OPN peptide 存在下の方がかなり少なかった。これらの結果から、OPN peptide はリン酸カルシウム生成を抑制し、加えて固体同士の凝集を抑制する効果あると考えられる。生成した固体の FT-IR スペクトル測定によりリン酸カルシウムの種類の同定を試みたが、十分な強度が得られず、現在 測定条件の改善を進めている。

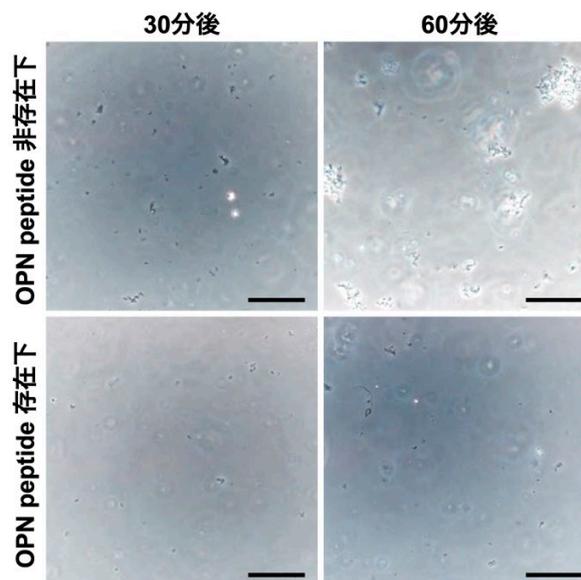


図2 反応溶液の位相差顕微鏡画像(上段: OPN peptide 非存在下、下段: OPN peptide 存在下) 図中のバーは 50 μm を表す

### 3.3 巨大リポソーム内部空間におけるリン酸カルシウムの生成過程の観察

光学顕微鏡で観察可能な 10 μm ほどの巨大リポソームを作製し、巨大リポソーム内部で進行するリン酸カルシウム生成を経時観察した。内水相をリン酸緩衝液(濃度 100 mM、pH 7.4)で満たした巨大リポソームに、Ca<sup>2+</sup> イオンを添加し静置した後、Ca<sup>2+</sup> イオンを選

択的に輸送するイオノフォアを添加することで巨大リポソーム内部へ  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを流入させ、リン酸カルシウムの生成反応を開始させた。添加する  $\text{Ca}^{2+}$  イオン濃度やイオノフォア濃度を様々に変化させて実験を行った。ペプチドを内包していない巨大リポソーム、または、OPN<sub>蛍光</sub> peptide を内包した巨大リポソームに  $\text{Ca}^{2+}$  イオンとイオノフォアを添加した後の位相差顕微鏡画像を図3に示す。図3に示すように巨大リポソーム内部で固体が生成し、本手法の妥当性が確認された。両サンプルともに、1分後には顕微鏡で観察可能なマイクロサイズの固体が生成し(図中の矢印)、時間の経過とともに固体のサイズは若干大きくなるものの5分後以降サイズはあまり変化しなかった。いくつかの画像を解析したところ、ペプチドを内包していない巨大リポソームでは、細長い形状の2 $\mu\text{m}$ ほど固体が生成したのに対し、OPN<sub>蛍光</sub> peptide を内包した巨大リポソームでは、2 $\mu\text{m}$ ほど細長い形状の固体に加え、1 $\mu\text{m}$ ほど丸みを帯びた形状の固体も生成することがわかった。巨大リポソームを用いた系においてもペプチドがリン酸カルシウムの生成に影響することが示唆された。また、図3に示した10分後のOPN<sub>蛍光</sub> peptide を内包した巨大リポソームの蛍光顕微鏡画像では、OPN<sub>蛍光</sub> peptide 由来の蛍光に偏りはなく、OPN<sub>蛍光</sub> peptide がリポソーム内部空間に均一に分布していることがわかった。巨大リポソーム内部でのリン酸カルシウムの生成反応のさらなる解析に向けて、現在生成した固体の分光学的解析(顕微ラマン測定など)を進めている。

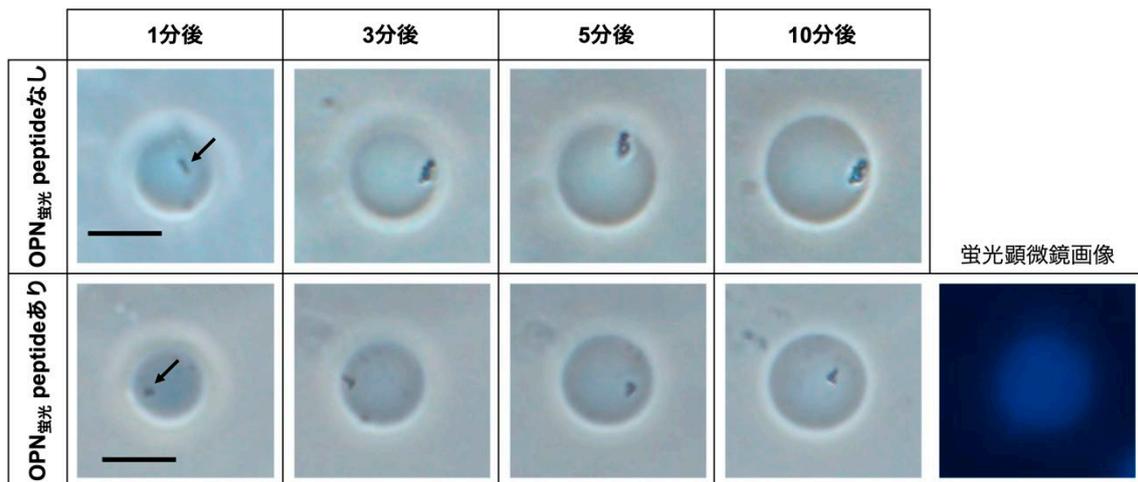


図3  $\text{Ca}^{2+}$  イオンとイオノフォア添加後の巨大リポソームの位相差顕微鏡画像(上段:ペプチドを内包していない巨大リポソーム、下段:OPN<sub>蛍光</sub> peptide を内包した巨大リポソーム)図中のバーは5 $\mu\text{m}$ を表す

#### 4. 結論

リン酸カルシウム生成を抑制する機能を有するオステオポンチンの部分配列であるOPN peptide を合成し、リポソームを用いない系でのリン酸カルシウム生成のスクリーニングの実験より、OPN peptide はリン酸カルシウム生成を抑制し、加えて生成した固体同士の凝集を抑制する効果あることがわかった。さらに、光学顕微鏡による巨大リポソーム内部空間におけるリン酸カルシウムの生成過程の観察から、ペプチドの有無によりリポソーム内で生成する固体のサイズや形状が変化することを明らかとした。今後は、FT-IR スペクトル測定、顕微ラマン測定やTEM 観察により生成した固体の詳細な分析を行い、リン酸カルシウムの結晶成長の自在制御を進めていく。

## 5. 謝辞

本研究は令和4年度 日本板硝子材料工学助成会の研究助成を受けて行われたものであり、同助成会に心より感謝申し上げます。

## 6. 参考文献

- 1) S. Pautot, B. J. Frisken, and D. A. Weitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2003**, *100*, 10718-10721.
- 2) A. George, and A. Veis, *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 4670-4693.
- 3) Y. J. Yang, A. L. Holmberg, and B. D. Olsen, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, **2017**, *8*, 549-575.