

高配向性金属配位ペプチドナノアレーの構築と

ナノ反応場への応用

Study on Novel Nano-Reactors Using Ordered

Metal Coordinated Peptide Nano-Arrays

2013

王 心心

謝辞

本研究を指示され、始終適切な御指導を賜りました名古屋工業大学、樋口真弘教授に深く感謝いたします。更に、適切な御指導、御助言並びに御審査を賜りました名古屋工業大学、中西英二教授、鈴木将人教授、猪股克弘教授に深く感謝いたします。

高感度赤外反射スペクトル測定に当たり、装置の使用を快く承諾いただき、有益な御助言を賜りました名古屋工業大学、木下隆利教授に深く感謝いたします。また、電気化学測定に当たり、有益な御助言を賜りました産業技術総合研究所生産計測技術研究センター、松田直樹チーム長に深く感謝致します。

最後に、名古屋工業大学、永田謙二准教授、田中正剛助教、石井大佑助教には絶えず激励と御指導を賜りました。併せて心より感謝の意を表します。

目次

第1章 序論	1
第2章 金属配位能を有するペプチドの設計及び合成	7
2-1 緒言	7
2-2 金属配位能を有するペプチドの分子設計	8
2-3 ペプチドの合成	9
2-3-1 ペプチド L14A2S の合成	9
2-3-1-1 Fmoc-Leu-Clear-Acid-Resin の膨潤	9
2-3-1-2 Fmoc 法によるペプチドの固相合成	10
2-3-1-3 N-末端へのリボ酸の導入	12
2-3-1-4 Fmoc-Leu-Clear-Acid-Resin からペプチドの切り出し	12
2-3-2 ペプチド L14H2S の合成	12
2-4 ペプチドのキャラクタリゼーション	12
2-5 結言	13
第3章 逐次重合を用いた高配向性を有するペプチドナノアレーの構築	15
3-1 緒言	15
3-2 実験	16
3-2-1 試料	16
3-2-1-1 金属配位能を有するペプチド	16
3-2-1-2 配位金属	16
3-2-1-3 基板	17
3-2-2 ペプチドナノアレーの調製	17
3-2-2-1 自己組織化単分子膜法	17
3-2-2-2 逐次重合法	17
3-2-2-2-1 ペプチド合成のための開始点を有する自己組織化単分子膜の調製	17
3-2-2-2-2 混合自己組織化単分子膜上におけるペプチドの逐次重合	18
3-2-3 測定	20
3-2-3-1 紫外可視吸収スペクトル測定	20
3-2-3-2 円偏光二色性スペクトル測定	20
3-2-3-3 高感度赤外反射スペクトル測定	21
3-2-3-4 サイクリックボルタンメトリー	21
3-2-3-5 表面電位顕微鏡観察	22
3-2-3-6 走査トンネル顕微鏡観察	23
3-2-3-7 電気化学特性	23

3-3 結果と考察	24
3-3-1 溶液中におけるペプチド-金属錯体の形成	24
3-3-2 溶液中におけるペプチドの二次構造	25
3-3-3 ペプチドナノアレーの分子配向	26
3-3-4 ペプチドナノアレー中の金属配位	32
3-3-5 ペプチドナノアレーの電気化学特性	33
3-4 結言	36
第4章 電場配向による自己組織化を用いたペプチドナノアレーの調製	39
4-1 緒言	39
4-2 実験	40
4-2-1 試料	40
4-2-1-1 金属配位能を有するペプチド	40
4-2-1-2 配位金属	40
4-2-1-3 基板	41
4-2-2 ペプチドナノアレーの調製	41
4-2-2-1 自己組織化単分子膜法	41
4-2-2-2 電場配向による自己組織化単分子膜法	41
4-2-3 測定法	43
4-2-3-1 紫外可視吸収スペクトル測定	43
4-2-3-2 円偏光二色性スペクトル測定	43
4-2-3-3 高感度赤外反射スペクトル測定	43
4-2-3-4 表面電位顕微鏡観察	43
4-2-3-5 走査トンネル顕微鏡観察	44
4-2-3-6 電気化学特性	44
4-3 結果と考察	44
4-3-1 溶液中におけるペプチド-金属錯形成	44
4-3-2 溶液中におけるペプチドの二次構造	45
4-3-3 自己組織化ペプチドナノアレーの二次構造及び分子配向	46
4-3-4 電場配向で調製したペプチドナノアレーの電気化学特性	50
4-4 結言	53
第5章 高配向性金属配位ペプチドナノアレーを用いて新規光反応場への応用	57
5-1 緒言	57
5-2 実験	58
5-2-1 試料	58

5-2-1-1 金属配位能を有するペプチド	58
5-2-1-2 配位金属	58
5-2-1-3 電子受容体	58
5-2-1-4 電子供与体	58
5-2-2 ペプチドレアーの調製	59
5-2-2-1 逐次重合法による光電変換能を有する金属配位ペプチドナノアレーの調製	59
5-2-2-2 ペプチドナノアレー表面へのレドックス蛋白質の固定	60
5-2-3 測定	61
5-2-3-1 高感度赤外反射スペクトル測定	61
5-2-3-2 走査トンネル顕微鏡観察	61
5-2-3-3 空気中におけるペプチドナノアレーの電気化学特性	61
5-2-3-4 溶液中におけるペプチドナノアレーの電気化学測定	62
5-2-3-5 光照射による光電変換	62
5-2-3-6 原子間力顕微鏡観察	62
5-2-3-7 表面レドックス蛋白質の活性評価	62
5-2-3-7-1 レドックス蛋白質生成物の定量	63
5-2-3-7-2 紫外可視吸収スペクトル測定	63
5-3 結果及び考察	64
5-3-1 逐次重合で調製した光応答性ペプチドナノアレーの二次構造及び分子配向	64
5-3-2 光電変換能を有するペプチドナノアレーの電気化学特性	65
5-3-3 レドックス蛋白質-ペプチドナノアレー複合体上の固定化蛋白質	69
5-3-4 光照射による表面レドックス蛋白質の活性制御と光反応場への応用	70
5-4 結言	74
第6章 結論	78
PUBLICATION LIST	80

第1章 序論

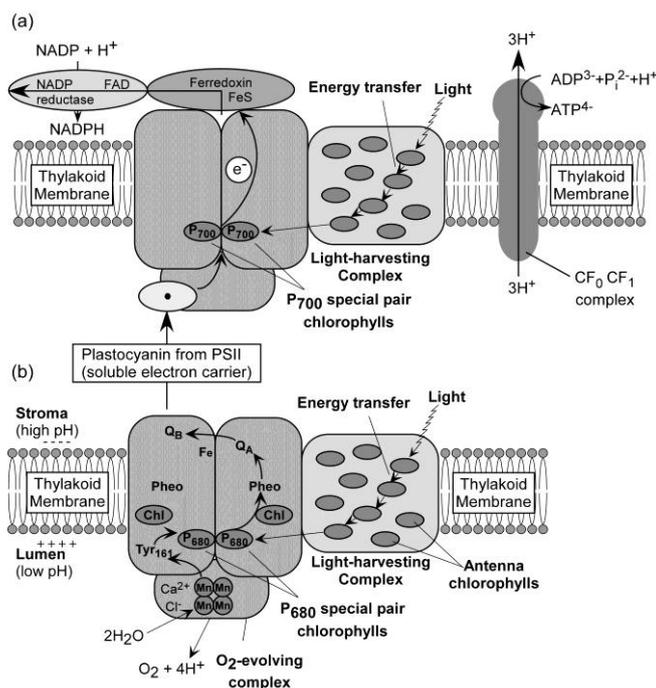
生体におけるエネルギー変換は様々な生命活動を維持する上で非常に重要なプロセスである。その中、光エネルギーを化学エネルギーに変換する光合成は、地球上の生態系を維持する上で基本的なプロセスであり、また、現在のエネルギー問題を解決する上で、クリーンエネルギーの観点から、その人工系での開発と応用が求められている緊急の課題でもある¹⁻³⁾。

自然界における光合成系に関する研究は近年、急速に進み、その反応プロセスが詳細に研究されてきた⁴⁻¹⁰⁾。植物における光合成は、葉緑体(チラコイド膜)内で行われる、二酸化炭素の固定反応である。その過程は大きく二つの段階、光化学系 I (PSI) 及び光化学系 II (PSII) に分けられ、この二つの系は複数のクロロフィル分子を含む蛋白質複合体より構成されている (Scheme 1-1)¹¹⁾。ここでの反応プロセスは、まず、

PSII が光を吸収し、水分子が分解され、四個の電子が取り出され、酸素が放出される¹⁴⁻¹⁶⁾。この電子が PSI の P 700 のクロロフィルに伝達され、光によって励起されたフェレドキシン (FeS) を経て、

NADP⁺を還元して NADPH を生じ、同時に、CF₀CF₁ が濃度勾配を駆動力として同蛋白質複合体を介して膜を移動した三つの H⁺を利用し ATP を生成する¹⁷⁻²³⁾。これらの過程で生成された ATP、及び NADPH を用い、炭素固定において、最終的に糖が合成される。人工的に、光反応中心におけるエネルギー変換システムを構築することは、生体模倣科学において学術的に興味深い²⁴⁻²⁶⁾ばかりでなく、エネルギー問題や環境問題を解決する上で重要な役割を果たすと考えている^{1,27-29)}。また、材料工学においても、効率的なエネルギー変換システムの構築は、新規ナノデバイス³⁰⁻³⁴⁾、及びバイオ光電子工学システム³⁵⁻³⁸⁾等の設計指針を与え、その開発に大きく寄与することが期待されている。

上記生体膜におけるエネルギー変換系は、レドックス反応を伴う一連の方向性を有する電子移動に直接に関連する。即ち、光電変換現象を分子膜を介する方向を有する (光誘起



Scheme 1-1. Photosynthesis in plants, which utilize two photosystems, (a); PSI and (b); PSII. Both photosystems use the energy of absorbed light to move an electron across the thylakoid membrane¹¹⁾.

電子供与体から電子受容体への) 電気の移動と取られることができる。ここでは、効率的な光エネルギーの変換を達成する上で、光励起した状態の物質や分子が失活せず、光誘起電子を活性化部位に伝達するための電子伝達経路としての「分子膜」の存在が不可欠である。人工系において、この電子伝達経路を構築するためには、「分子膜」中に存在する各種官能基の距離及び配向をその物理化学的ポテンシャルを考慮し、特定の空間配置を保ち、固定化する必要がある。このような官能基の空間配置を有する分子膜は、安定で、かつ効率的な、一方向への電子移動が実現可能な電子伝達経路として期待される³⁹⁾。

本研究では、効率的な電子移動を目的に、分子膜の構成物質として、 α -ヘリックスペプチドに注目した。 α -ヘリックス構造を有するペプチドの最も顕著な特徴は、分子軸に沿って大きなマクロダイポールモーメントを持つことである ($3.5 \text{ D/residue}^{40,41}$)。固体基板上での、マクロダイポールモーメントの配向が揃った α -ヘリックスペプチドの集合体は、そのマクロダイポールに沿った電子移動が加速されることが報告されている⁴²⁾。

α -ヘリックスペプチドの垂直配向膜の構築は、古くからよく研究され、その中で Langmuir-Blodgett (L-B) 法⁴³⁻⁵⁰⁾、自己組織化単分子膜 (SAM) 法⁵¹⁻⁵⁷⁾、 α -アミノ酸-N-カルボキシ無水物 (NCA) の開環重合によるグラフト重合法⁵⁸⁻⁶¹⁾が報告されている (Table 1-1)。岡畑らは液-液界面に、 α -ヘリックスペプチドの垂直配向 L-B 膜の調製に成功し⁴³⁾、木下らは、気-液界面に垂直配向したヘリックス構造を有するブロックコポリマー分子膜を同手法により構築した⁴⁴⁾。しかし、L-B 膜においては、ペプチド分子膜が基板間との物理的な相互作用より吸着固定化されており、実用化する際の力学的強度が問題となっている。化学結合で α -ヘリックスペプチド分子を基板上に固定化するために、ペプチドの分子末端にチオール基を導入し、金とチオールとの共有結合^{62,63)}により金基板上にペプチド SAM を形成することができる。木村らは金基板上に安定なペプチド垂直配向 SAM を構築し、同膜を介する電子移動に異向性が有ることを報告している⁶⁴⁾。東⁵³⁾及び藤田⁵¹⁾らの研究グループはヘリックスのマクロダイポールモーメント間の相互作用により、これを打ち消すような逆平行配向を取ることを主張している。また、無水アミノ酸の開環重合によるグラフト重合法で調製されたペプチド膜は、ペプチドのマクロダイポールモーメントは単一方向に配向するものの、ペプチド鎖のアミノ酸配列を決められない等の問題点があった。簡便に、 α -ヘリックスのマクロダイポールモーメントを一方に揃へ、かつ、アミノ酸配列が規制されたペプチドナノアレーを構築する方法が強く求められている。

本研究では、金蒸着ガラス基板上に一軸・垂直配向性を有する α -ヘリックスペプチドナノアレーの構築法として、新規二種の手法を提案した。一つは、基板上に固定化したアミノ基からのペプチドの「逐次重合法」である。もう一つは、従来の自己組織化単分子膜法の改良法として、ペプチド分子の自己組織化時に、基板に電場を印加しながら製膜する「電場配向自己組織化単分子膜法」である。

加えて、ナノデバイスへの実用化を目指し、同ペプチドナノアレーを利用した新規光反応場の構築を試みた。基板表面に光誘起電子供与体、ナノアレー表面に電子受容体である

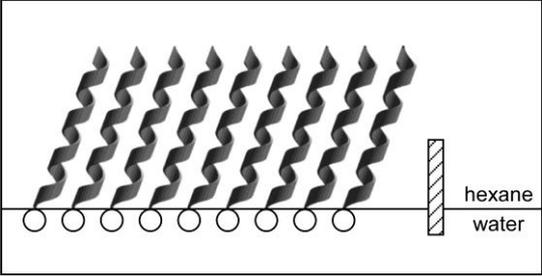
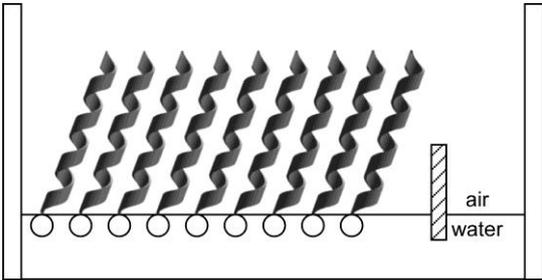
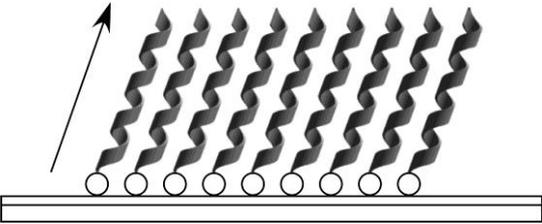
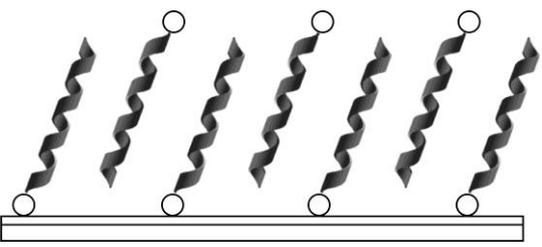
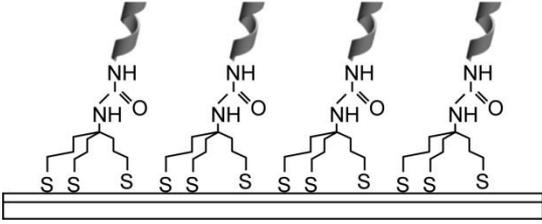
Method	Medium	Schematic picture	Reference
L-B	Oil-water interface		43-50
	Air-water interface		
SAM	Gold substrate		51-57
			
Graft	Gold & indium-tin oxide glass		58-61

Table 1-1. Methods for the fabrication of the ordered α -helical peptide monolayers.

レドックス蛋白質をコンジュゲートさせ、ペプチドナノアレーを介した電子伝達経路を設計した。同光電変換能を有するペプチドナノアレーの光照射に基づく一方向への電子移動を利用し、ナノアレー表面に導入したレドックス蛋白質の活性制御を行った。

以下、まず、第2章においては、本研究に用いるペプチドの分子設計及び合成について述べる。第3章及び第4章では、それぞれ逐次重合法、電場配向自己組織化単分子膜法による一軸・垂直配向性を有するペプチドナノアレーを構築し、その構造、特に分子配向と電気化学特性との相関に関して論じる。第5章では、高配向性ペプチドナノアレーを用いた新規ナノ反応場の構築について検討する。最後に、第6章では、本論文の総括を行う。

REFERENCES

- 1) Gust, D.; Moore, T. A.; Moore, A. L. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1890-1898.
- 2) Dubois, M. R.; Dubois, D. L. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1974-1982.
- 3) Noji, T.; Suzuki, H.; Gotoh, T.; Iwai, M.; Ikeuchi, M.; Tomo, T.; Noguchi, T. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 2448-2452.
- 4) Bolton, J. R. *Inorganic Chemistry: Toward the 21st Century*, Chapter 1, 1983, p. 3-19.
- 5) Bassham, J. A. *J. Chem. Educ.* **1959**, *36*, 548.
- 6) LeBard, D. N.; Matyushov, D. V. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 12424-12437.
- 7) Rabinowitch, E. *J. Phys. Chem.* **1957**, *61*, 870-878.
- 8) Yachandra, V. K.; Sauer, K.; Klein, M. P. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2927-2950.
- 9) Frank, H. A.; Brudvig, G. W. *Biochemistry* **2004**, *43*, 8607-8615.
- 10) Cramer, W. A.; Zhang, H.; Yan, J.; Kurisu, G.; Smith, J. L. *Biochemistry* **2004**, *43*, 5921-5929.
- 11) Lodish, H.; Baltimore, D.; Berk, A.; Zipursky, S. L.; Matsudaira, P.; Darnell, J. *Molecular Cell*, 3rd ed.; Scientific American Books: New York, 1998, p. 790-805.
- 12) Babcock, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10893-10895.
- 13) Yachandra, V.; DeRose, V. J.; Latimer, M. J.; Mukerji, I.; Sauer, K.; Klein, M. P. *Science* **1993**, *260*, 675-679.
- 14) Dau, H.; Haumann, M. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 273-295.
- 15) Yano, J.; Kern, J.; Sauer, K.; Latimer, M. J.; Pushkar, Y.; Biesiadka, J.; Loll, B.; Saenger, W.; Messinger, J.; Zouni, A.; Yachandra, V. K. *Science* **2006**, *314*, 821-825.
- 16) Lubitz, W.; Reijerse, E. J.; Messinger, J. *Energy Environ. Sci.* **2008**, *1*, 15-31.
- 17) Owens, T. G.; Webb, S. P.; Mets, L.; Alberte, R. S.; Fleming, G. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 1532-1536.
- 18) Brettel, K.; Leibl, W. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1507*, 100-114.

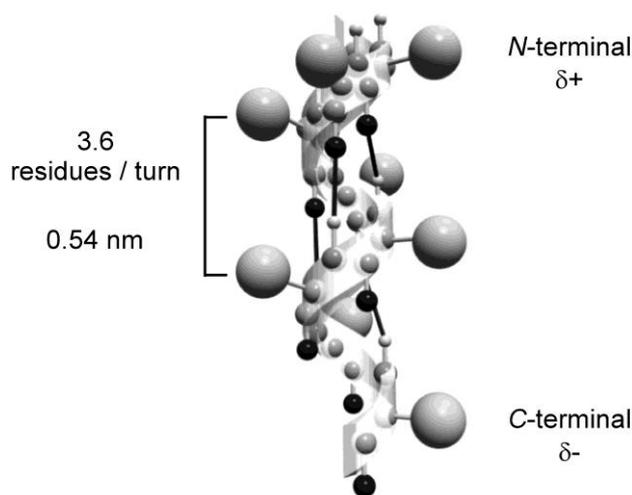
- 19) Melkozernov, A. N.; Barber, J.; Blankenship, R. E. *Biochemistry* **2006**, *45*, 331-345.
- 20) Muller, M. G.; Niklas, J.; Lubitz, W.; Holzwarth, A. R. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3899-3922.
- 21) Markvart, T. *Prog. Quantum Electron.* **2000**, *24*, 107-186.
- 22) Gulis, G.; Narasimhulu, K. V.; Fox, L. N.; Redding, K. E. *Photosynth. Res.* **2008**, *96*, 51-60.
- 23) Anderson, J. M.; Anderson, B. *Trends Biochem. Sci.* **1982**, *7*, 288-292.
- 24) Zhang, Y.; You, C.; Chen, H.; Feng, R. *Recent Advances in Post-Combustion CO₂ Capture Chemistry*, Chapter 15, 2012, 275-292.
- 25) Hammarström, L.; Hammes-Schiffer, S. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1859-1860.
- 26) Wasielewski, M. R. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 5051-5066.
- 27) Kalyanasundaram, K.; Graetzel, M. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 298-310.
- 28) McConnell, I.; Li, G.; Brudvig, G. W. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 434-447.
- 29) Muckerman, J. T.; Fujita, E. *Chemical Evolution II: From the Origins of Life to Modern Society*, Chapter 15, 2010, 283-312.
- 30) Flexer, V.; Mano, N. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1444-1449.
- 31) H. Ti Tien *Biomembrane Electrochemistry*, Chapter 24, 1994, 513-529.
- 32) Greenbaum, E.; Rodriguez, M. Jr.; Sanders, C. A. *Nanotechnology and the Environment*, Chapter 25, 2004, 194-199.
- 33) Yadav, R. K.; Baeg, J.; Oh, G. H.; Park, N.; Kong, K.; Kim, J.; Hwang, D.; Biswas, S. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11455-11461.
- 34) Noji, T.; Suzuki, H.; Gotoh, T.; Iwai, M.; Ikeuchi, M.; Tomo, T.; Noguchi, T. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 2448-2452.
- 35) Willner, I.; Rubin, S. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 367-385.
- 36) Willner, I.; Willner, B. *Adv. Mater.* **1995**, *7*, 587-589.
- 37) Willner, I.; Lion-Dagan, M.; Marx-Tibbon, S.; Katz, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6581-6592.
- 38) Blonder, R.; Willner, I.; Bückmann, A. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9335-9341.
- 39) Sumner, J.; Creager, S. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 8739-8745.
- 40) Wada, A. *Adv. Biophys.* **1976**, *9*, 1-63.
- 41) Hol, W. G. J.; van Duijnen, P. T.; Berendsen, H. J. C. *Nature* **1978**, *273*, 443-446.
- 42) Yasutomi, S.; Morita, T.; Imanishi, Y.; Kimura, S. *Science* **2004**, *304*, 1944-1947.
- 43) Kishihara, K.; Kinoshita, T.; Mori, T.; Okahata, Y. *Chem. Lett.* **1998**, *27*, 951-952.
- 44) Doi, T.; Kinoshita, T.; Tsujita, Y.; Yoshimizu, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2001**, *74*, 421-425.
- 45) Higashi, N.; Koga, T.; Niwa, M. *Langmuir* **2000**, *16*, 3482-3486.
- 46) Boncheva, M.; Vogel, H. *Biophys. J.* **1997**, *73*, 1056-1072.

- 47) Toyotama, A.; Kugimiya, S.; Yonese, M.; Kinoshita, T.; Tsujita, Y. *Chem. Lett.* **1997**, *26*, 443-444.
- 48) Hosokawa, H.; Kinoshita, T.; Tsujita, Y.; Yoshimizu, H. *Chem. Lett.* **1997**, 745-746.
- 49) Yokoi, H.; Kinoshita, T. *Chem. Lett.* **2004**, *33*, 426-427.
- 50) Nguyen, L. T.; Ardana, A.; Brinke, G.; Schouten, A. J. *Langmuir* **2010**, *26*, 6515-6521.
- 51) Fujita, K.; Bunjes, N.; Nakajima, K.; Hara, M.; Sasabe, H.; Knoll, W. *Langmuir* **1998**, *14*, 6167-6172.
- 52) Miura, Y.; Kimura, S.; Imanishi, Y.; Umemura, J. *Langmuir* **1998**, *14*, 6935-6940.
- 53) Niwa, M.; Murata, T.; Kitamatsu, M.; Matsumoto, T.; Higashi, N. *J. Mater. Chem.* **1999**, *9*, 343-344.
- 54) Miura, Y.; Kimura, S.; Imanishi, Y.; Umemura, J. *Langmuir* **1999**, *15*, 1155-1160.
- 55) Yanagisawa, K.; Morita, T.; Kimura, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12780-12781.
- 56) Geng, Y.; Discher, D. E.; Justynska, J.; Schlaad, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 7578-7581.
- 57) Sakamoto, M.; Ueno, A.; Mihara, H. *Chem. Commun.* **2000**, 1741-1742.
- 58) Whitesell, J. K.; Chang, H. K. *Science* **1993**, *261*, 73-76.
- 59) Whitesell, J. K.; Chang, H. K.; Whitesell, C. H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 871-873.
- 60) Wieringa, R. H.; Schouten, A. J. *Macromolecules* **1996**, *29*, 3032-3034.
- 61) Heise, A.; Menzel, H.; Yim, H.; Foster, M. D.; Wieringa, R. H.; Schouten, A. J.; Reb, V.; Stamm, M. *Langmuir* **1997**, *13*, 723-728.
- 62) Nuzzo, R. G.; Allara, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4481-4483.
- 63) Ulman, A. *An Introduction to Ultrathin Organic Films from Langmuir-Blodgett to Self-Assembly*, Part 3, Academic Press: San Diego, 1991.
- 64) Okamoto, S.; Morita, T.; Kimura, S. *Langmuir* **2009**, *25*, 3297-3304.

第2章 金属配位能を有するペプチドの設計及び合成

2-1 緒言

ペプチドは一つのアミノ酸の α -アミノ基ともう一つアミノ酸の α -カルボキシル基との脱水縮合により繋がったひも状の分子で、それが特定の形で折りたたまれ、機能を担うようになる。その中、分子間水素結合により形成された、らせん状の α -ヘリックス構造や分子間水素結合で数本のペプチドが並んだ β -シート構造がよく研究されてきた¹⁾。中でも、 α -ヘリックス構造は、分子鎖中のアミノ酸残基の側鎖が 5.4 \AA 間隔で分子軸方向に並び、らせん構造を取る。それぞれのアミノ酸側鎖はらせん中で 100° 向きを変え、 3.6 残基で 1 回転する (Scheme 2-1)。アミノ酸のアミノ基は 4 残基離れたアミノ酸のカルボキシル基と分子内水素結合で結ばれ、部分的にらせん軸に沿って双極子モーメントが発生する。 α -ヘリックス全体としては、 N -末端に $1/2$ の正電荷、 C -末端に $1/2$ の負電荷を持たヘリックス軸に沿って配向したダイポールに近似できる²⁻⁵⁾。 α -ヘリックス構造では、 1 残基毎に 1.5 \AA だけヘリックス軸に沿って鎖が成長するため、 n 残基からなるヘリックスペプチドは、 $3.5 n \text{ Debye}$ のダイポールモーメントを有する^{3,6)}。 α -ヘリックスペプチドの機能は主に軸に沿ったマクロダイポールに由来するもので、それについては、古くから研究され、タンパク質中での働きについては、最近になって明らかになりつつある。 α -ヘリックスペプチドのマクロダイポールモーメントは、生理的な重要性のみならず、その光学異向性と共に、ナノ材料やナノデバイスの構成単位としての応用に期待されている⁷⁻⁹⁾。



Scheme 2-1. Side view of the α -helical peptide.

本研究では、 α -ヘリックス構造のマクロダイポールモーメントに注目し、固体基板上に高配向性ペプチド単分子膜を構築し、その一方向に揃った α -ヘリックスマクロダイポールモーメントを利用した効率的な電子移動を目的とする。

具体的に本研究で用いるペプチドの分子設計指針及びその合成方法について述べる。用いるペプチドには、以下 2 点の性質を有することが求められる。

- (1) α -ヘリックス形成能を有する。
- (2) 金属配位能を有する側鎖を持つ。

この 2 点を踏まえ、本研究では α -ヘリックス形成能を有するロイシンの 16 量体を基本と

し、その一部のアミノ酸を金属配位子として、ヒスチジン、及び側鎖ピリジル基を有する4-ピリジルアラニンに置換した2種類のアミノ酸シーケンスを設計した。本章では、これら2種のペプチドの分子設計と、第3章、第4章で述べる逐次重合法、電場配向による自己組織化単分子膜法の対照実験である自己組織単分子膜法に用いた末端リボ酸を修飾したペプチドの固相合成法、並びに同ペプチドのキャラクタリゼーションについて述べる。

2-2 金属配位能を有するペプチドの分子設計

ペプチドの二次構造とアミノ酸組成の関連に関しては、古くから研究されており、疎水性アミノ酸であるロイシン (Leu : Chart 2-1a) を多く含むペプチドは α -ヘリックス構造を形成する傾向が強いことが報告されている。従って、本研究ではロイ

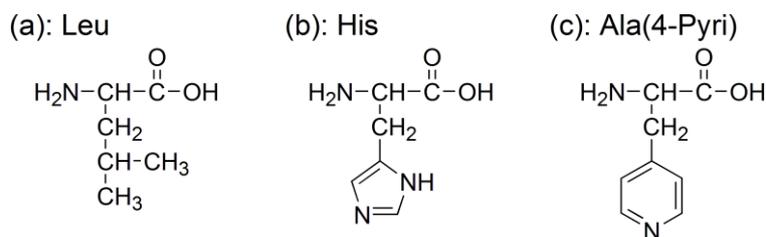
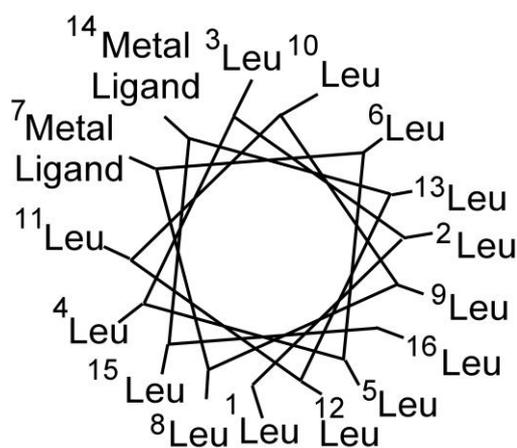


Chart 2-1. Chemical structures of amino acids (a); Leucine, (b); Histidine and (c); 4-Pyridyl alanine.

シンに富むペプチドのアミノ酸シーケンスを設計した。合成の簡便性、及びペプチド収率を考慮し、アミノ酸16量体よりなるペプチドを用いる。



Scheme 2-2. Top view of the α -helical peptide.

金属配位子は上記 α -ヘリックスペプチド分子のN-末端から7残基目と14残基目の二箇所に導入する。この理由は、同ペプチドが α -ヘリックス構造を形成した場合、棒状ペプチド分子の片側側面に二つの金属配位子が配向するからである (Scheme 2-2)。上記のシーケンスを有するペプチドでは、 α -ヘリックス分子の側鎖金属配位子と金属が錯体を形成した場合、バンドル形成による α -ヘリックス構造の安定化が期待できる。また、ペプチドのマクロダイポールモーメントを一軸に垂直配向させた金属配位ペプチドナノアレーでは、そのマクロダイポールモーメントと金属錯体との共役により、一方向への効率的な電子移動が期待できる。

本研究では、金属配位子として、二価コバルトイオン (Co(II)) の指示薬であるイミダゾール基を側鎖に有するヒスチジン (His)、及び同様に Co(II) との錯形成が期待できる側鎖に4-ピリジル基を有する4-ピリジルアラニンを用いた (Chart 2-1b and Chart 2-1c)。従って、ペプチドのアミノ酸シーケンスには、 $\text{Leu}_6\text{HisLeu}_6\text{HisLeu}_2$ 、及

び $\text{Leu}_6\text{Ala}(4\text{-Pyri})\text{Leu}_6\text{Ala}(4\text{-Pyri})\text{Leu}_2$ を設計した。

金蒸着ガラス基板上に上記ペプチドの自己組織単分子膜を形成するため、ペプチドの *N*-末端に金と結合できるリポ酸を導入した。

2-3 ペプチドの合成

ペプチドの合成は、液相、固相法に代表される有機合成化学的手法、蛋白工学法及び開環重合法などが知られている^{10,11)}。この中で、有機溶媒に不溶な支持体に、アミノ酸を逐次結合し、それによりペプチド鎖を成長させる固相法は、単時間で簡便にペプチドを合成できることから、よく用いられている^{10,12)}。

本研究に用いる *N*-末端をリポ酸で修飾したペプチド $\text{Leu}_6\text{Ala}(4\text{-Pyri})\text{Leu}_6\text{Ala}(4\text{-Pyri})\text{Leu}_2$ (L14A2S : Chart 2-2)、及び $\text{Leu}_6\text{HisLeu}_6\text{HisLeu}_2$ (L14H2S : Chart 2-3) は Fmoc 法による固相法で合成した¹³⁾。

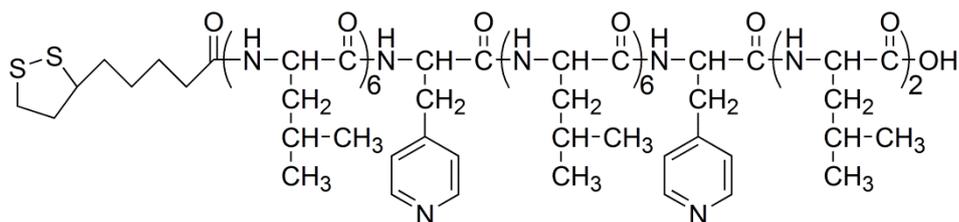


Chart 2-2. Chemical structure of peptide, $\text{Leu}_6\text{Ala}(4\text{-Pyri})\text{Leu}_6\text{Ala}(4\text{-Pyri})\text{Leu}_2$, having sulfur at *N*-terminal (L14A2S).

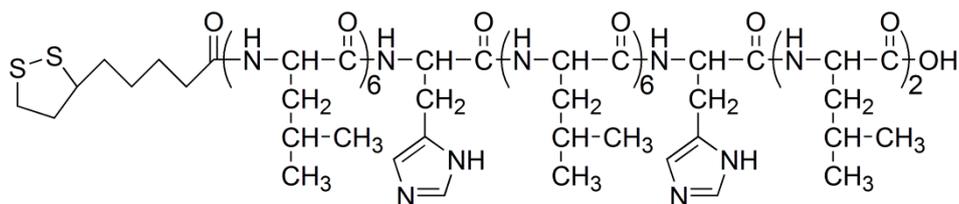


Chart 2-3. Chemical structure of peptide, $\text{Leu}_6\text{HisLeu}_6\text{HisLeu}_2$, having sulfur at *N*-terminal (L14H2S).

2-3-1 ペプチド L14A2S の合成

2-3-1-1 Fmoc-Leu-Clear-Acid-Resin の膨潤

Fmoc-Leu-Clear-Acid-Resin (ペプチド研究所 (株) 社製) 0.5 g をジクロロメタン (DCM) (和光製薬 (株) 社製) 5 mL に分散させ、固相合成装置で 24 時間膨潤させた。膨潤した Fmoc-Leu-Clear-Acid-Resin をろ別後、*N,N*-dimethylformamide (DMF) (和光純薬工業 (株) 社製) 5 mL を加え、同合成装置を用い、1 分間振蕩させ、ろ別した。この操作を 3 度繰り返す。

返し、溶媒を置換した。

2-3-1-2 Fmoc 法によるペプチドの固相合成

N-末端 Fmoc 基の脱保護は以下に従った。

Fmoc-Leu-Clear-Acid-Resin に 20 vol% piperidine (Biosystems 社製) の DMF 溶液 5 mL を加え、3 分間振蕩後、ろ別し、この操作を 2 回行った。更に、同溶液を 5 mL を加え、20 分間振蕩を行い、Fmoc-Leu-Clear-Acid-Resin の *N*-末端にある Fmoc 保護基の脱保護を行った (Chart 2-4)。溶液をろ別し、DMF 5 mL を加え 1 分間振とう後、ろ別・洗浄操作を 5 回行った。その洗浄液が純粋な DMF と同じ pH になるまで洗浄した。

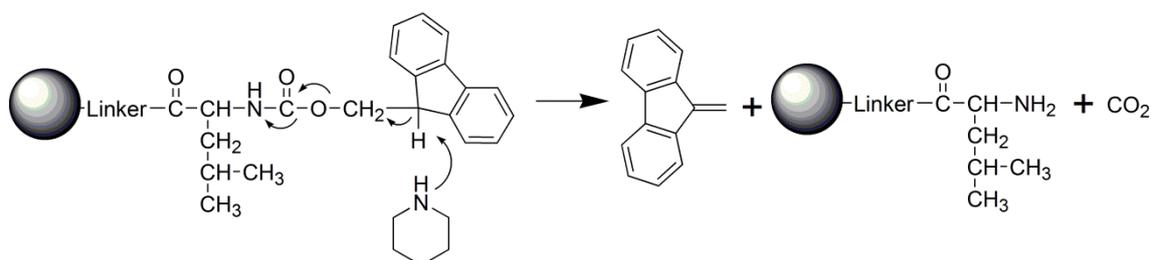
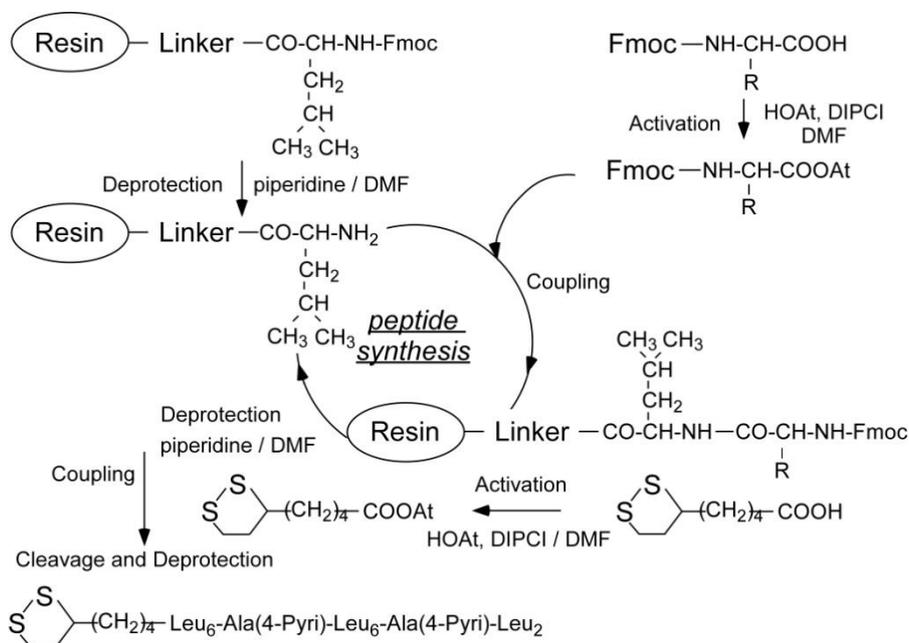


Chart 2-4. The deprotection for Fmoc group.



Scheme 2-3. Process of solid phase peptide synthesis for L14A2S.

アミノ酸 *N*-末端の活性化、及び脱保護後の Resin への縮合は以下に従った (Scheme 2-3)。

N,N'-diisopropyl carbodiimide (DIPCI) (渡辺化学工業 (株) 社製)、1-hydroxy-7-azobenzotriazol (HOAt) (渡辺化学工業 (株) 社製) を DMF に溶解させ、アミノ酸の活性化エステル溶液を調製した。DIPCI は縮合剤として用いた (Chart 2-5a)。アズラクトン経由で α 位のラセミ化を防ぐため、求核性の高い HOAt を用いた (Chart 2-5b)。アミノ酸濃度は Resin のアミノ基担持量の 3 倍量とし、アミノ酸と DIPCI、HOAt のモル比は 1:1:1 とした。これら、アミノ酸、DIPCI、HOAt を含む DMF 混合溶液 5 mL を調製し、Resin に加え、2 時間振蕩させ、Resin 表面のアミノ基と Fmoc-アミノ酸のカルボキシル基との縮合を行った。縮合後、DMF を用い Resin の洗浄操作を 3 度繰り返した。

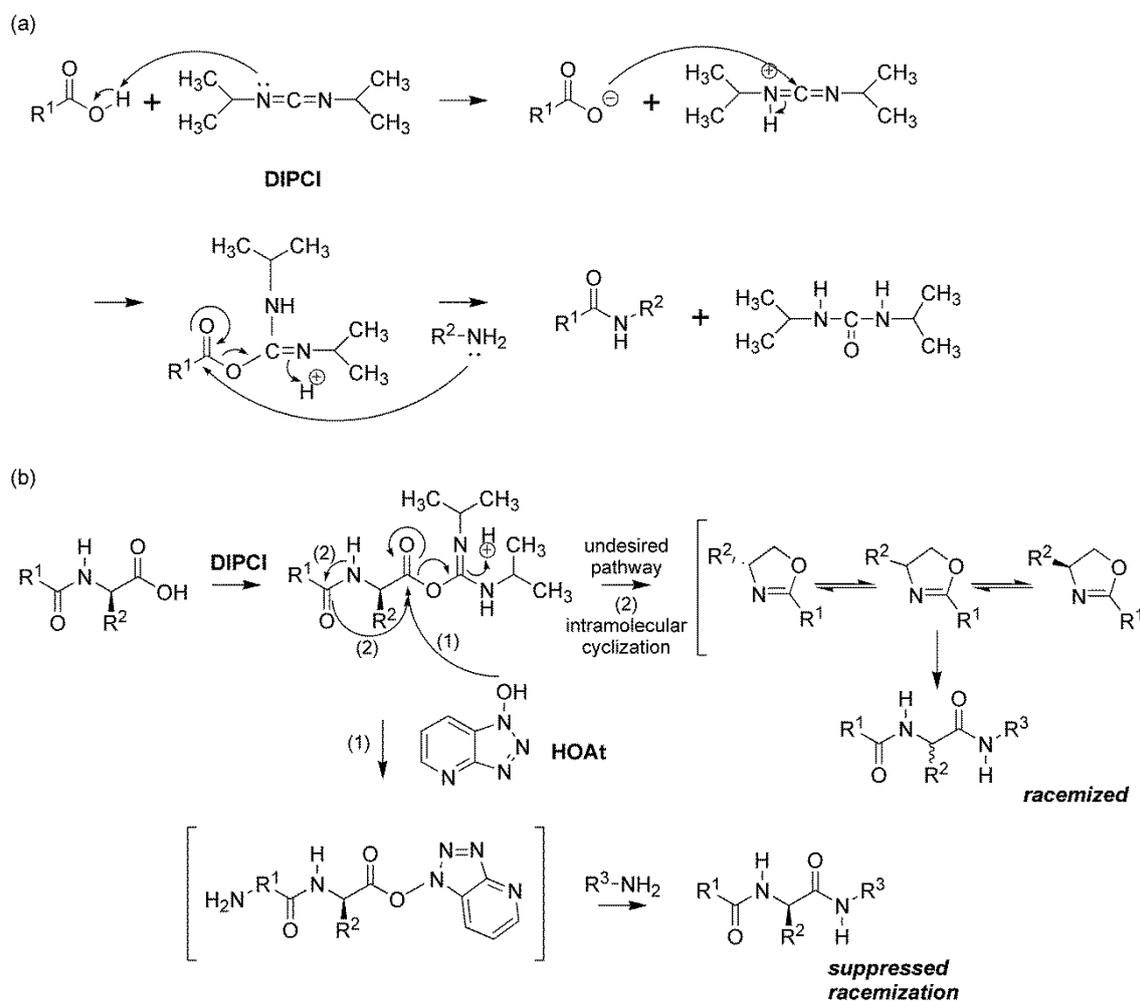


Chart 2-5. The condensation reactions for the amino acids.

上記操作、即ち、*N*-末端 Fmoc 基の脱保護、Fmoc-アミノ酸の活性化、Resin への縮合を繰り返し、目的のシーケンスペプチド、Fmoc-(L14A2)を得た。Fmoc-アミノ酸には、疎水性 Fmoc-ロイシン (Fmoc-Leu) (ペプチド研究所 (株) 社製)、及び金属配位子となる Fmoc-4-ピリジルアラニン (Fmoc-Ala(4-Pyri)) (渡辺化学工業 (株) 社製) を用いた。

2-3-1-3 *N*-末端へのリボ酸の導入

上記で得た Fmoc-(L14A2)の *N*-末端 Fmoc 基を上記脱保護溶液で脱保護し、DL-thioctic acid (関東化学 (株) 社製) との縮合反応を行い、ペプチド L14A2 の *N*-末端に金基板表面に固定化するためのリボ酸を導入した。Fmoc-Leu-Clear-Acid-Resin 上に目的であるペプチド L14A2S を得た。

2-3-1-4 Fmoc-Leu-Clear-Acid-Resin からペプチドの切り出し

ペプチド合成後、L14A2S 担持 Resin を 24 時間真空乾燥させ、氷冷した 95 vol% trifluoroacetic acid (TFA) (ナカライテスク (株) 社製) / 純水 (体積比 95 / 5) 10 mL を同 Resin に加えた。氷冷下で 30 分間攪拌し、室温に戻した後、更に 1.5 時間攪拌した。反応後、Resin とペプチド溶液をろ別し、ろ液を 30 分間減圧濃縮後、氷冷した diethyl ether (ナカライテスク (株) 社製) を約 200 mL 加え、ペプチドを析出させた。上記懸濁液を 4000 rpm にて遠心分離し、diethyl ether にて十分に洗浄した。得られた白色粉末を乾燥後、純水中に分散させ、凍結乾燥を行い、ペプチド L14A2S を得た。

2-3-2 ペプチド L14H2S の合成

ペプチド L14H2S の合成は前節 2-3-1 における L14A2S の合成法に従い、Fmoc-Leu-Clear-Acid-Resin の膨潤、ペプチドの固相合成、*N*-末端へのリボ酸の導入の順で行った。金属配位子として、Fmoc-トリチル-ヒスチジン (Fmoc-His(Tri)) (ペプチド研究所 (株) 社製) を用いた。側鎖保護トリチル基の脱保護は Resin からペプチドを切り出しと同時にいった。L14H2S 担持 Resin を 24 時間真空乾燥させ、氷冷した 95 vol% TFA / 純水 (体積比 95 / 5) 10 mL を同 Resin に加えた。氷冷下で 30 分間攪拌し、室温に戻した後、更に 1.5 時間攪拌した。反応後、Resin とペプチド溶液をろ別し、ろ液を 30 分間減圧濃縮後、氷冷した diethyl ether を約 200 mL 加え、ペプチドを析出させた。上記懸濁液を 4000 rpm にて遠心分離し、diethyl ether にて十分に洗浄した。得られた白色粉末を乾燥後、純水中に分散させ、凍結乾燥を行い、ペプチド L14H2S を得た。

2-4 ペプチドのキャラクタリゼーション

合成したペプチドの分子量測定を、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF-MS、日本電子 (株) 製 JMS-3000) を用い、行った。MALDI-TOF-MS 法では、サンプルはマトリックスと混合された状態で、紫外光である窒素レーザー光を照

射すると、マトリックスは光を吸収し、熱エネルギーに変換される。この時、マトリックスの一部が急速に加熱され、サンプルと共に気化される。同時に、マトリックスとサンプル間でプロトンの授受が起こって、サンプルがイオン化される。生成したイオンに加速電圧（20～25kV 前後）が印加され、運動エネルギーを生じ、イオン検出器まで飛行する。イオンが受け取るエネルギーは電荷量のみ依存する為、電荷に対する質量（質量電荷比）が大きい分子は低速で、逆に小さい分子は高速で飛行する。この差異により、検出器に到達するまでの時間差からサンプルの質量を得ることが可能となる。

MALDI-TOF-MS 測定での試料調製を以下に示す。

マトリックス溶液は、 α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸（CHCA）（SIGMA（株）社製）15 mg に、純水 400 μ L、アセトニトリル（和光純薬工業（株）社製）500 μ L、trifluoroacetic acid (TFA)（ナカライテスク（株）社製）/ 純水（体積比 3/97）100 μ L を加え、調製した。同溶液をボルテックスミキサーにかけ、飽和溶液を調製した。ペプチド L14A2S、L14H2S を *N,N*-dimethylformamide (DMF)（和光純薬工業（株）社製）に溶解させ、 5.0×10^{-5} M に調製した。マトリックス溶液とペプチド溶液それぞれを 2 μ L ずつ、ターゲット基板上に交互滴下した後、アスピレーターで十分乾燥させ、溶媒を完全に除去した。

MALDI-TOF-MS 測定では、L14A2S と L14H2S の分子量は、それぞれ 2087.0（計算値：2086.9）と 2064.2（計算値：2064.8）と得られ、計算値と一致し、2 種ペプチドの合成を確認した。

Table 2-1. Molecular weight of the peptide synthesized by the solid-phase method.

	Calculated value	Observed value
L14A2S	2086.9	2087.0
L14H2S	2064.8	2064.2

2-5 結言

本章では、金属配位能を有する 2 種の α -ヘリックスペプチド、L14A2S 及び L14H2S、を設計し、固相合成法により合成した。得られたペプチドの分子量を MALDI-TOF-MS で測定し、ペプチドのキャラクタリゼーションを行った。以下、第 3 章及び第 5 章で逐次重合法による調製するペプチドナノアレーの amino acid シーケンスには L14A2S を用いる。第 4 章では、L14H2S を用い、電場印加下で自己組織化単分子膜を調製する。

REFERENCES

- 1) Lodish, H.; Baltimore, D.; Berk, A.; Zipursky, S. L.; Matsudaira, P.; Darnell, J. *Molecular*

- Cell*, 3rd ed.; Scientific American Books: New York, 1998; Chapter 3.
- 2) Kimura, S.; Miura, Y.; Morita, T.; Kobayashi, S.; Imanishi, Y. *J. Poly. Scienc* **2000**, *38*, 4826-4831.
 - 3) Hol, W. G. J.; van Duijnen, P. T.; Berendsen, H. J. C. *Nature* **1978**, *273*, 443-446.
 - 4) Galoppini, E.; Fox, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2299-2300.
 - 5) Hol, W. G. H. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **1985**, *45*, 149-195.
 - 6) Wada, A. *Adv. Biophys.* **1976**, *9*, 1-63.
 - 7) Yang, Y. L.; Khoe, U.; Wang, X. M.; Horii, A.; Yokoi, H.; Zhang, S. G. *Nano Today* **2009**, *4*, 193-210.
 - 8) Ulijn, R. V.; Smith, A. M. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 664-675.
 - 9) Floudas, G.; Spiess, H. W. *Macromol. Rapid Commun.* **2009**, *30*, 278-298.
 - 10) Cavalli, S.; Fernando, A.; Kros, A. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 241-363.
 - 11) Klok, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1509-1513.
 - 12) Tulla-Puche, J.; Albericio, F. *The Power of Functional Resins in Organic Synthesis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (Germany), 2008.
 - 13) Can, W. C.; White, P. D. *Fmoc Solid Synthesis: A Protocol Approach*, Oxford University Press. 2000.

第3章 逐次重合を用いた高配向性を有するペプチドナノアレーの構築

3-1 緒言

α -ヘリックスはペプチド二次構造の中、最もよく研究されたモチーフの一つであり、蛋白質の構造形成及び機能発見の上で、非常に重要な役割を果たす¹⁾。その生理学的機能は、規則構造に伴う官能基の特定空間配位とヘリックス軸に沿った大きなマクロダイポールモーメント ($3.5 \text{ D / residue}^{2,3)}$) によるものが多い⁴⁾。例えば、生体中における光合成は、光反応中心において、脂質二分子膜に埋め込まれた蛋白質中の α -ヘリックスドメインが膜に対して垂直に配向し、各 α -ヘリックスペプチド鎖中の各種官能基が特定な空間配置を取ることにより、一方向への効率的な電子移動を生じることにより発現されている⁵⁻⁷⁾。この方向性を持つ電子移動の結果とし、NADPHやATPが生成され、最終的には糖の生成につながる。近年、生体中にあるこのような情報・エネルギー変換システムを構築するため、一方向への効率的な電子移動の研究が盛に行われている^{8,9)}。 α -ヘリックスペプチドは、その光学特性、分子軸に沿ったマクロダイポールモーメント等の性質に注目し、一方向への電子移動を達成できる材料として関心を持たれた¹⁰⁻¹²⁾。

これらの研究の中、 α -ヘリックスペプチドの垂直配向膜が様々の手法により構築された。Langmuir-Blodgett (L-B) 法¹³⁻²⁰⁾、自己組織化単分子膜 (SAM) 法²¹⁻²⁸⁾、無水アミノ酸の開環重合によるグラフト重合法²⁹⁻³²⁾が報告されている。しかし、L-B法は、ペプチドと基板間との物理的な相互作用より吸着固定化されており、その力学的強度が弱い。SAM法から得られた膜は、ヘリックスのマクロダイポール間の相互作用により、これを打ち消すような逆平行になる場合もある。また、無水アミノ酸の開環重合によるグラフト法で調製されたペプチド膜はペプチドのマクロダイポールモーメントは単一方向に配向するものの、ペプチド鎖のアミノ酸配列を決められない等の問題点があった。

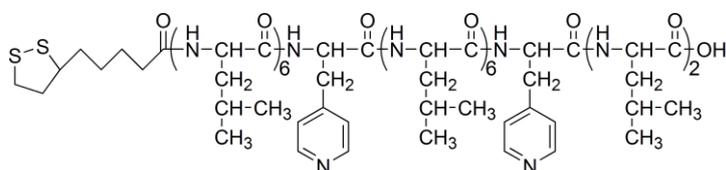
従って、本章では、基板表面に高い軸・垂直配向性を有する金属配位ペプチドナノアレーを構築するため、基板表面でのアミノ酸の逐次重合法を提案した。同手法を用い、 α -ヘリックスペプチドのマクロダイポールモーメントが一方向に揃い、かつ、アミノ酸配列が規制されたペプチドナノアレーの構築を試みた。これはペプチド鎖の特定位置に導入した配位子の錯形成によるナノ構造体の構造安定化、及び金属錯体とペプチドマクロダイポールモーメントとの共役による、より効率的な一方向への電子移動を目的としたものである。ペプチドのアミノ酸シーケンスには前章で記述した $\text{Leu}_6\text{Ala}(4\text{-Pyri})\text{Leu}_6\text{Ala}(4\text{-Pyri})\text{Leu}_2$ を用いる。同ペプチドは、 α -ヘリックス構造を形成した際、金属配位子として機能する 4-ピリジルアラニンの側鎖ピリジル基がヘリックス分子片側面に配置する。尚、従来の SAM法を用い、同じアミノ酸シーケンスを有するペプチドナノアレーを構築した。得られた二種のペプチドナノアレーの二次構造、分子配向、及びその電気化学特性に関し、比較・検討を行った。

3-2 実験

3-2-1 試料

3-2-1-1 金属配位能を有するペプチド

本章では、金属配位能を有するペプチドとして、アミノ酸シーケンスが



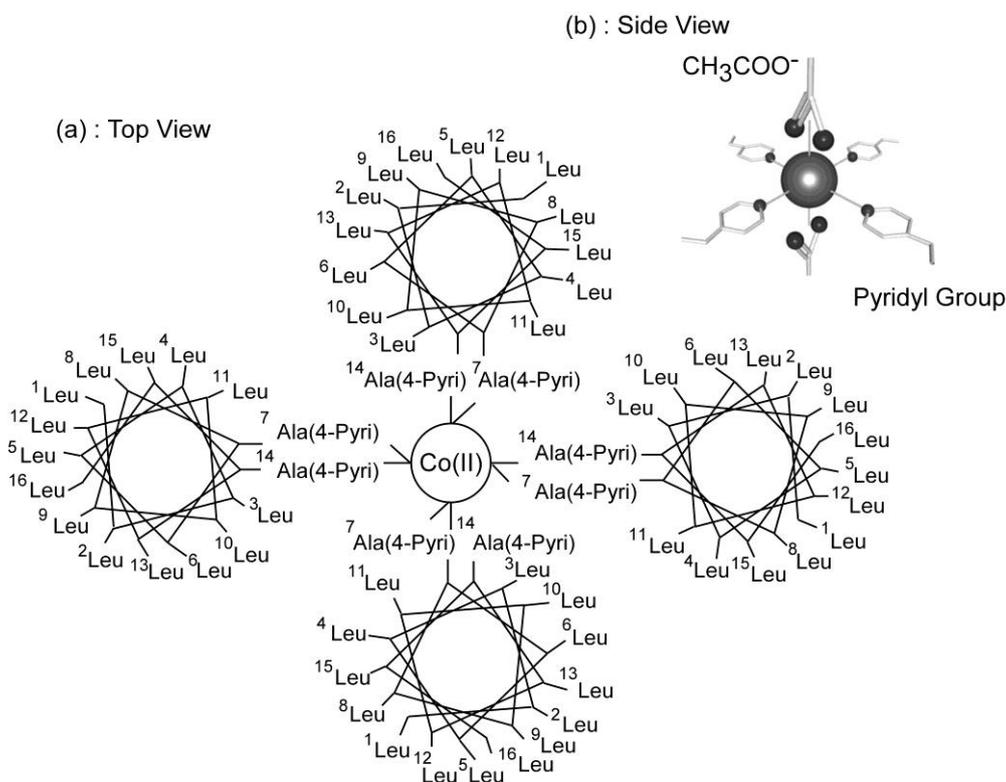
Scheme 3-1. Amino acid sequence of the peptide L14A2S.

Leu₆Ala(4-Pyri)Leu₆Ala(4-

Pyri)Leu₂ よりなるペプチドを第 2 章に従い、Fmoc 法で合成した³³⁾。また、その *N*-末端には金蒸着ガラス基板上に固定化するために、リポ酸を導入した。以下、L14A2S とする (Scheme 3-1)。

3-2-1-2 配位金属

本章においては、配位金属として、錯形成時に、八面体構造を取ることが期待できる二価のコバルト (酢酸コバルト (II)) (和光純薬工業 (株) 社製) を用いた。L14A2S の *N*-末端から 7 残基目と 14 残基目に存在する側鎖ビリジル基との平面四配位による 4-ヘリックスバンドルの形成を期待した (Scheme 3-2)。



Scheme 3-2. Schematic pictures of (a); top view and (b); side view for the cobalt(II)-L14A2S complex.

3-2-1-3 基板

ペプチドナノアレーの基板として、金蒸着膜の膜厚が 50 nm である金蒸着ガラス基板(日本レーザー電子(株)製、13 mm x 20 mm)を用いた。

金蒸着ガラス基板の前処理を以下に従って行った。

金蒸着ガラス基板をオートドライデシケーター(イウチ社製)内、湿度 30%以下で保存し、使用する直前に、全て UV オゾンクリーナー(日本レーザー電子(株)社製、UV-253 型)を用いて、表面洗浄を行った。チャンバー内を酸素で十分満たした後、紫外線照射を 20 分間を行うことより金蒸着ガラス基板表面の有機物を分解させた。洗浄後、直ちに実験に用いた。

3-2-2 ペプチドナノアレーの調製

本章では、金蒸着ガラス基板表面に高配向性を有する α -ヘリックスペプチドナノアレーを以下の二種類の方法、即ち、自己組織化単分子膜法及び逐次重合法によりそれぞれ構築した。

3-2-2-1 自己組織化単分子膜法

2,2,2-trifluoroethanol (TFE) (和光純薬工業(株)社製)に濃度 0.1 mM となるように N-末端にリポ酸を導入した金属配位能を有するペプチド L14A2S を溶解させた。同溶液に酢酸コバルト(II)水溶液を加え、錯形成を溶液中で予め行った。Co(II)とペプチド側鎖ピリジル基とのモル比, [Co(II)]/[4-Pyri], は 0.6 とした。上記で調製された溶液中に金蒸着ガラス基板を 24 時間浸漬させた。その後、得られた基板を TFE で 3 回以上洗浄し、真空中で十分乾燥させた。

また、金属配位をしていないペプチドナノアレーも上記の手順に従い、金蒸着ガラス基板を N-末端にリポ酸を有するペプチド L14A2S の 0.1 mM TFE 溶液中に 24 時間を浸漬することにより調製した。

得られた金属配位、金属未配位ペプチドナノアレーは以下それぞれ L14A2Co SAM 及び L14A2 SAM とする。

3-2-2-2 逐次重合法

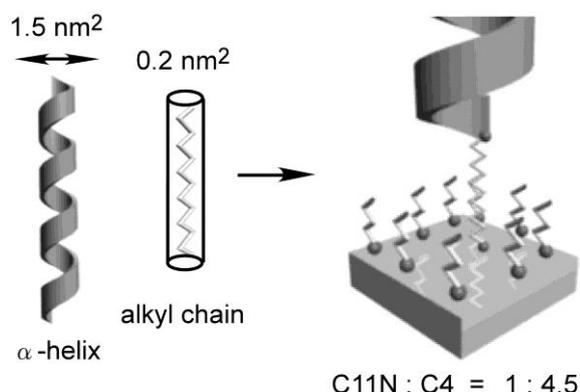
基板表面でのアミノ酸の逐次重合を行うため、金蒸着ガラス基板上に逐次重合開始点となるアミノ基を有する自己組織化単分子膜の形成を行った。得られた自己組織化単分子膜のアミノ基を開始点として、ペプチド固相合成法により設計したペプチドを成長させた。

3-2-2-2-1 ペプチド合成のための開始点を有する自己組織化単分子膜の調製

基板上でのペプチド合成のための開始点を基板表面に固定化するために、分子鎖片末端にアミノ基を有し、金蒸着ガラス基板表面に固定化のために反対側の末端にチオール基を

有する 1-amino-11-undecanethiol hydrochloride (C11N) (DOJINDO Laboratories 社製) を用い、自己組織化単分子膜を調製した。

α -ヘリックス鎖の断面積は、逐次重合開始点である C11N のアルキル鎖の断面積よりおよそ十倍大きい (Scheme 3-3)。仮に、C11N 単独の自己組織化単分子膜を用いた場合、合成したペプチド分子間の立体障害によりアミノ酸の重合が進行しない³⁴⁾。このため、自己組織化単分子膜中のアミノ基間に、アミノ酸の重合に必要な隙間を形成することを目的に、スペーサーとして C11N よりも短鎖のアルキル鎖を導入した。短鎖のアルキル基として、n-butyl disulfide (C4) (DOJINDO Laboratories



Scheme 3-3. Fabrication of the substrate for stepwise polymerization.

社製) を用いた。アミノ酸の逐次重合開始点として働く C11N と、スペーサーとして働く短鎖アルキル鎖のモル比は次のように設計した。アルキル鎖の最密充填を仮定すると、その一本あたりの断面積は 0.2 nm^2 である³⁵⁾。 α -ヘリックスペプチドの断面積が 1.5 nm^2 であること¹⁴⁾より、C11N と短鎖アルキル鎖とのモル比は 1:9 とした。C11N と C4 との混合自己組織化単分子膜の場合は、C4 が二本鎖のジスルフィドであるため、C11N と C4 のモル比は 1:4.5 とした。

C11N 及び C4 を含む混合自己組織化単分子膜の形成を以下に従い行った。

C11N 及び C4 をモル比 1:4.5 で、チオール基の終濃度が 0.1 mM になるようにエタノール (ナカライテスク (株) 社製) に溶解させ、C11N 及び C4 の混合溶液を調製した。オゾンクリーナーで洗浄した金蒸着ガラス基板を上記で調製した溶液中で 24 時間震蕩し、基板の上に C11N と C4 との混合自己組織化単分子膜を形成した。反応後、エタノールで基板を 3 回以上洗浄した。その後、アンモニア水 (ナカライテスク (株) 社製) で pH 11 に調製した水溶液中で震蕩させ、C11N の末端アミノ基の脱プロトン化を行った。純水で洗浄し、洗浄水の pH が中性になるまで洗浄を行った。

得られた混合自己組織化単分子膜は以下 C11N/C4 mixed SAM とする。

3-2-2-2 混合自己組織化単分子膜上におけるペプチドの逐次重合

以下に従い、上節 3-2-2-1 で調製した混合自己組織化単分子膜 C11N/C4 mixed SAM 表面にペプチドの逐次重合及び金属の配位を行った。

Fmoc-Leu (ペプチド研究所 (株) 社製)、Fmoc-Ala(4-Pyri) (渡辺化学工業 (株) 社製) の活性エステル化を行った。上記のアミノ酸、*N,N'*-diisopropyl carbodiimide (DIPCI) (渡

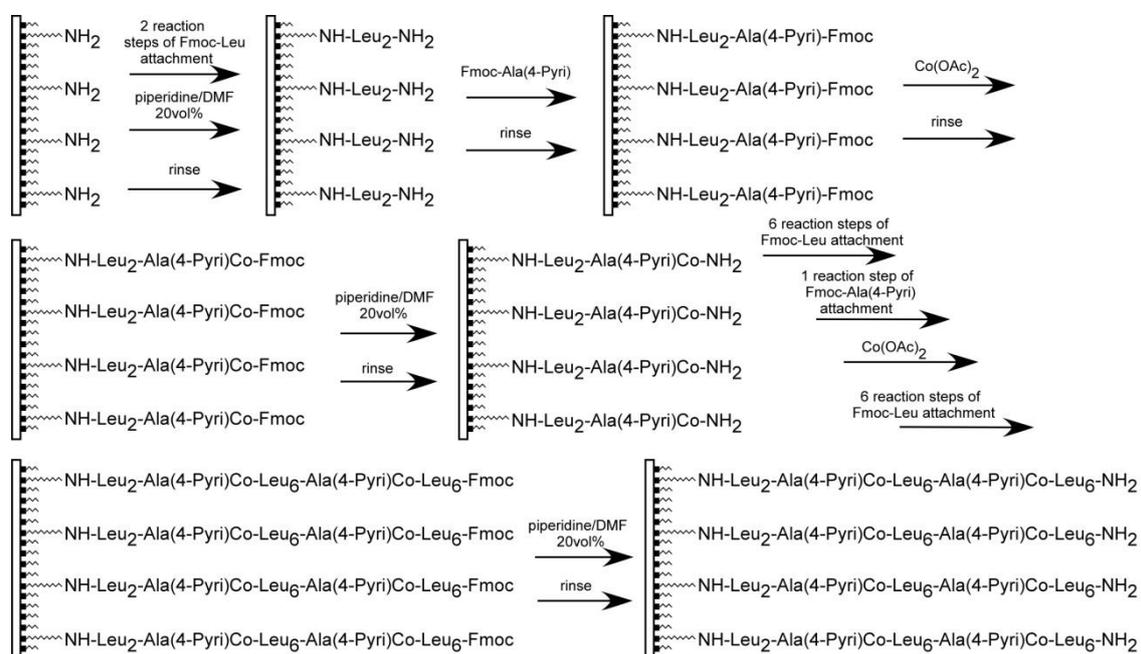
辺化学工業（株）社製）、1-hydroxy-7-azobenzotriazol（HOAt）（渡辺化学工業（株）社製）を *N,N*-dimethylformamide（DMF）（和光純薬工業（株）社製）に溶解させ、各溶液を混合攪拌することでアミノ酸の活性化エステル溶液を調製した。アミノ酸濃度は 10 mM とし、アミノ酸と DIPCI、HOAt のモル比は 1:1:1 とした。

前節で調製した末端アミノ基を脱プロトン化させた C11N/C4 mixed SAM 基板を Fmoc-Leu の活性エステルの DMF 溶液中で震蕩させながら、2 時間反応させ、C11N/C4 mixed SAM 表面のアミノ基に Fmoc-Leu を縮合させた。反応後、DMF で 3 回洗浄した後、20 vol% の piperidine（Biosystems 社製）の DMF 溶液に浸漬し、1 時間 Fmoc 保護基の脱保護を行った。脱保護後、DMF で基板をよく洗浄し、その洗浄液が純粋な DMF と同じ pH になるまで洗浄した。

上記手法を繰り返し、C11N/C4 mixed SAM 表面上に -Leu₂Ala(4-Pyri) を金蒸着ガラス基板上で縮合させた後、純水で 3 回洗浄し、基板を 0.1 M の酢酸コバルト (II) 水溶液に浸し、震蕩しながら、24 時間反応させ、Co(II) とペプチド側鎖のピリジル基との錯形成を行った。反応後、基板を純水で 3 回洗浄し、その後、DMF で 3 回を洗浄した (Scheme 3-4)。

以上の反応を繰り返すことによって、-Leu₂Ala(4-Pyri)(Co(II))Leu₆Ala(4-Pyri)(Co(II))Leu₆ のシーケンスを有する金属配位ペプチドナノアレーを金蒸着ガラス基板上に構築した。

得られた金属配位ペプチドナノアレーは以下 L14A2Co SP とする。



Scheme 3-4. Fabrication of the Co(II) coordinated peptide nano-array on the C11N/C4 mixed SAM by the stepwise polymerization.

また、金属未配位のペプチドナノアレーも上記手順に従い、C11N/C4 mixed SAM 上に調製した。

得られた金属未配位ペプチドナノアレーを以下 L14A2 SP とする。

3-2-3 測定

3-2-3-1 紫外可視吸収スペクトル測定

溶液中において、金属とペプチドとの錯形成を検討するため、紫外可視吸収スペクトル (UV-vis) 測定を行った。

溶媒には TFE を用い、ペプチドと配位金属はそれぞれ L14A2S と二価のコバルトである酢酸コバルト (II) を用いた。ペプチド L14A2S の濃度は 0.1 mM とした。酢酸コバルトのメタノール溶液を調製し、上記ペプチド TFE 溶液中に添加した。Co(II) とペプチド側鎖ピリジル基とのモル比, $[\text{Co(II)}]/[4\text{-Pyri}]$, は 0.1 から 0.8 まで 0.1 間隔で振った。上記溶液を光路長 1 cm の石英セルに満たし、室温で紫外可視分光光度計 (日本分光製、JASCO V550) を用い、400-700 nm 範囲で UV-vis 測定を行った。

3-2-3-2 円偏光二色性スペクトル測定

溶液系において、ペプチドの二次構造、及び金属とペプチドとの錯形成に基づく二次構造変化を検討するため、円偏光二色性 (CD) 測定を行った。

溶媒には TFE を用いた。ペプチドは L14A2S を用い、配位金属は Co(II) を使用した。ペプチド L14A2S の濃度は 0.1 mM とした。金属配位ペプチド溶液の調製は、上記ペプチド溶液中に予め調製した酢酸コバルト (II) のメタノール溶液を添加することによって行った。Co(II) とペプチド側鎖ピリジル基とのモル比, $[\text{Co(II)}]/[4\text{-Pyri}]$, は 0.1 から 0.8 まで 0.1 間隔で振った。上記溶液を光路長 0.5 cm の石英セルに満たし、室温、窒素雰囲気下で円偏光二色性分散計 (日本分光製、JASCO J800) を用い、190-260 nm 範囲における CD 測定を行った。積算回数は 16 回とした。溶液中ペプチドの各波長におけるモル楕円率 $[\theta]_{\lambda}$ は eq. 3-1 より求めた³⁶⁾。

$$[\theta]_{\lambda} = \frac{M \cdot \theta_{\lambda}}{10 \cdot d \cdot c} \quad \text{eq. 3-1}$$

ここで、M は一残基あたりの平均分子量、 θ_{λ} (mdeg) は各波長における楕円率、d (cm) は光路長、c (mg/mL) は試料の濃度である。

溶液中におけるペプチドの二次構造は分散型 α -ヘリックス、 β -シート、ランダムコイルの各二次構造の基準スペクトルに基づき、eq. 3-2 を用い、190 nm から 260 nm のカーブフィッティングにより求めた。

$$[\theta]_{\lambda} = \alpha \cdot [\theta_{\alpha}]_{\lambda} + \beta \cdot [\theta_{\beta}]_{\lambda} + R \cdot [\theta_R]_{\lambda} \quad \text{eq. 3-2}$$

ここでは、 $[\theta_{\alpha}]_{\lambda}$ 、 $[\theta_{\beta}]_{\lambda}$ 、 $[\theta_R]_{\lambda}$ は、それぞれ、 α -ヘリックス、 β -シート、ランダムコイル構造の基準スペクトルの各波長におけるモル楕円率、 α 、 β 、 R はそれぞれペプチド分子の α -ヘリックス、 β -シート、ランダムコイル構造の含有率である。

3-2-3-3 高感度赤外反射スペクトル測定

金蒸着ガラス基板上に調製した各ペプチドナノアレーの二次構造及び分子配向を高感度赤外反射スペクトル (FTIR-RAS) 測定より評価した。

FTIR-RAS 測定を行うまで、各サンプルをオートドライデシケーター内、湿度 30%以下で保存した。装置は高感度反射装置を装備したフーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR, SPECTRUM 2000, Perkin Elmer 社製) を用い、検出器には、 $\text{Hg}_{1-x}\text{Cd}_x\text{Te}$ (MCT) 高感度検出器を使用した。入射光角度は 80° に設定し、分解度は 4 cm^{-1} とした。測定は $1900\text{-}1300 \text{ cm}^{-1}$ 範囲において、積算回数は 1024 回で行った。また、大気中の水蒸気及び二酸化炭素の影響を除外するために、測定中、検出器及び試料室は窒素ガスで満たした。

得られたスペクトル中のアミド I 及びアミド II 領域をそれぞれ α -ヘリックス、 β -シート、ランダムコイル構造に帰属される吸収スペクトルに波形分離を行った。波形分離を行う各スペクトルはガウス関数とローレンツ関数の和で表されるものとし、その比は 9:1 とした。

アミド I 領域の波形分離後の各二次構造に帰属されるスペクトルの面積比より、各二次構造の含有率を算出した。

また、基板表面における α -ヘリックスの基板垂直法線からの傾斜角、 γ 、はアミド I 及びアミド II 領域の α -ヘリックス構造に帰属される分離スペクトルの面積、 A_I と A_{II} 、の比から、eq. 3-3 を用い求めた³⁷⁾。

$$D_{obs} = A_I/A_{II} = C \frac{2[0.5(3\cos^2\gamma-1)] \cdot [0.5(3\cos^2\theta_1-1)] + 1}{2[0.5(3\cos^2\gamma-1)] \cdot [0.5(3\cos^2\theta_2-1)] + 1} \quad \text{eq. 3-3}$$

ここで、係数 C はスケーリング係数で、KBr 錠剤法を用いたランダム配向状態にある Poly(Leu)の A_I/A_{II} 値であり、その値は 1.49 である。また、 θ_1 、 θ_2 はそれぞれ α -ヘリックス構造に帰属されるアミド I 吸収帯及びアミド II 吸収帯の遷移モーメントの配向角であり、その値はそれぞれ 39° 、 75° である。

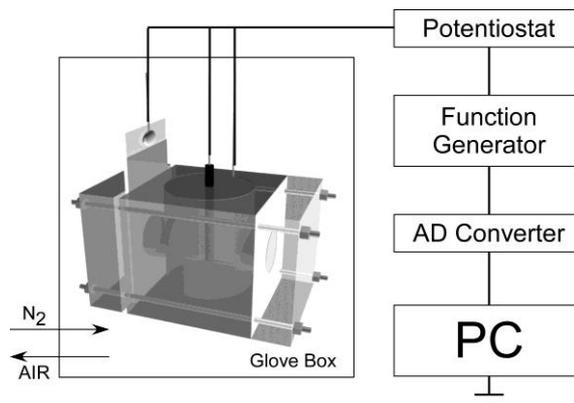
3-2-3-4 サイクリックボルタンメトリー

金蒸着ガラス基板上に調製したペプチドナノアレー中の金属配位をサイクリックボルタンメトリー (CV) 測定を用い、配位金属の酸化・還元電位より確認した。測定には三電極法を用い、ペプチドナノアレーを作用極、 Ag/AgCl 電極を基準電極、Pt ワイヤを補助電極とし、電解質には 0.1 M KCl 水溶液を用いた。測定は室温で行った。電圧の印加はファンクションジェネレーター (NIKKO KEISOKU 社製) を用い、応答電流はポテンシオスタット (NPS-2, NIKKO KEISOKU 社製) を用い測定した。作用電極面積は 0.28 cm^2 であり、走査

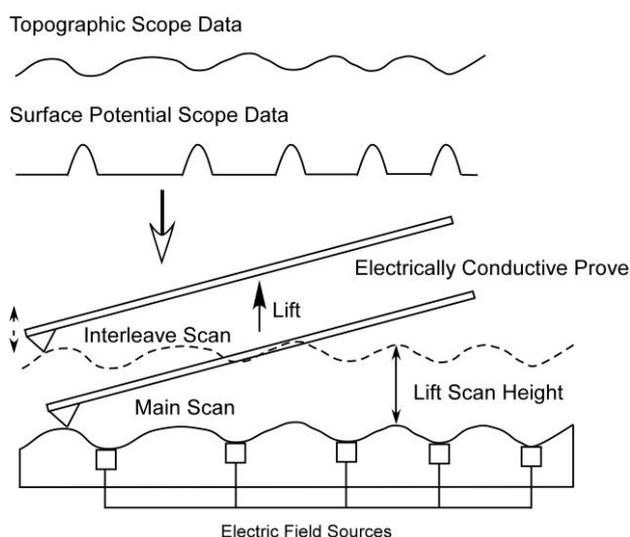
速度は 100 mV/s と設定した。測定中、系内は窒素ガスで満たした (Scheme 3-5)。

3-2-3-5 表面電位顕微鏡観察

金蒸着ガラス基板上で調製したペプチドナノアレーの表面電位を表面電位顕微鏡 (SPoM) を用い観察した。SPoM 測定では、インターリーブスキャンを用い、以下のように行った。初めのメインスキャンでは、タッピングモードを用いて表面形状を測定する。次



Scheme 3-5. Setup of the electrochemical measurement.



Scheme 3-6. Schematic picture of the SPoM measurement.

に、同じスキャンラインを得られた表面形状からプローブをサンプル表面から一定距離を離し、サンプルの凹凸形状をキャンセルした状態でノンコンタクトモードでスキャンする。この際、プローブに印加する電位を振動させる。プローブの電位と表面電位が等しくなる場合、探針-サンプル表面間に電気的相互作用が相殺され、プローブは、自由振幅と同じ振幅を示す。この時のプローブに印加した電位より、表面電位を得る^{38,39)} (Scheme 3-6)。

本章で行った SPoM 測定には、コントロールステーションとして Nanoscope V (Bruker 社製) を用いた。Pt/Ir をコートしたシリコンカンチレバー (SCM-PIT、Bruker 社製) を使用し、表面のイメージングには 10 μm \times 10 μm のスキャナーを用いた。プローブの走査速度は 1 Hz/Line である。メインスキャンでは、振幅と共振周波数がそれぞれ 500 mV と 150 Hz と設定し、インターリーブスキャンでは印加電位の振幅と周波数をそれぞれ 1.5 V と 150 Hz に設定した。リフト距離は 20 nm とした。測定は金蒸着ガラス基板を接地し、行った。

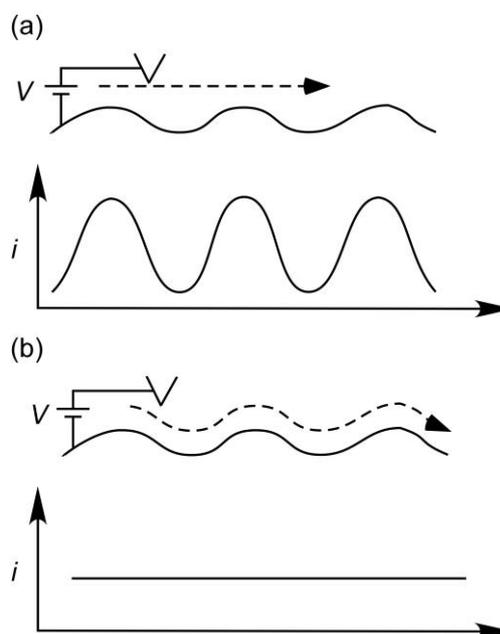
3-2-3-6 走査トンネル顕微鏡観察

走査トンネル顕微鏡 (STM) を用い、ペプチドナノアレーの表面形状を観察した。STM 測定では、先鋭な探針を導電性サンプル表面に 1 nm 以下まで近づけ、サンプルにバイアス電圧を印加すると、量子効果によって、探針とサンプル間にトンネル電流が発生する。このトンネル電流は、探針とサンプルのそれぞれの仕事関数、バイアス電圧、探針-サンプル間距離に依存し、トンネル電流は、eq. 3-4 で表せられる^{40,41)}。

$$I_T \propto \frac{V}{d} \cdot \exp(-A\phi^{1/2}d) \quad \text{eq. 3-4}$$

ここでは、 V 、 d 、 A と ϕ はそれぞれバイアス電圧、探針-サンプル間距離、定数 = $1.025(\text{eV})^{-1/2} \text{ \AA}^{-1}$ と仕事関数の平均を表す。このようなトンネル電流は探針-サンプル間距離に対し指数関数的に非常に敏感に変化し、表面形状を得られる。測定法には、探針の高さを保ちつつ水平に走査しながら電流値を測定する定高度 (変電流) モード (Scheme 3-7a) と、電流値が一定になるよう探針を上下させ、探針の移動量を測定する定電流モードがある (Scheme 3-7b)。本章で用いた STM 測定は定電流モードを採用した。

コントロールステーションとして Nanoscope V (Bruker 社製) を用いた。機械研磨した Pt/Ir コーティングカンチレバー (PT 10、Bruker 社製) を使用し、表面のイメージングには $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ のスキャナを用いた。走査速度は 1 Hz/Line である。サンプルバイアス及び電流はそれぞれ 50 mV と 1.0 nA と設定した。



Scheme 3-7. Schematic picture of the STM measurement.

3-2-3-7 電気化学特性

空気中におけるペプチドナノアレーの電気化学特性は走査トンネル分光法 (STS) を用いて評価した⁴²⁾。STS とは、STM 測定におけるトンネル電子のエネルギーが数 eV 以下と低いため、フェルミ準位近傍の電子帯や空準位との相互作用が生じ、この相互作用によるトンネル電流の変化を利用して分析する手法である。STS では、印加電圧 (従ってトンネ

ル電子のエネルギー) によるトンネル電流の変化を測定することより、サンプルの電気化学的な情報を得る。本章における STS 測定は STM 測定に基づき、イメージ中心に探針を固定し、*I-V* 曲線を測定した。印加バイアスは $-0.5 \sim +0.5$ V とした。

3-3 結果と考察

3-3-1 溶液中におけるペプチド-金属錯体の形成

溶液中におけるペプチドと金属との錯形成を紫外可視吸収スペクトル (UV-vis) 測定より評価した。配位金属として、二価のコバルト Co(II) を用いた。0.1 mM のペプチド TFE 溶液を調製し、酢酸コバルト (II) のメタノール溶液を添加し、 Co(II) とペプチド側鎖ピリジル基とのモル比, $[\text{Co(II)}]/[\text{4-Pyri}]$, を 0.1 から 0.8 まで 0.1 間隔で振った。 Co(II) 添加前後の UV スペクトルを Figure 3-1 に示した。 Co(II) 添加前、400 nm から 700 nm にかけて吸収は確認されなかったものの、 Co(II) 添加後、529 nm に Co(II)-(4-(Pyri)) 錯体に基づく極大吸収が観察でき、 Co(II) 添加に伴い、その吸光度の増加が確認できた。529 nm における吸光度を Co(II) とペプチド側鎖ピリジル基とのモル比, $[\text{Co(II)}]/[\text{4-Pyri}]$, に対してプロットした (Figure 3-2)。 Co(II) の添加に従って、529 nm における吸光率が増大し、0.6 付近から飽和になる傾向を示した。溶液中、ペプチドと Co(II) との錯体形成を示唆した。しかしながら、吸光率が飽和となった Co(II) とピリジル基とのモル比, $[\text{Co(II)}]/[\text{4-Pyri}]=0.6$, はペプチド側鎖ピリジル基が Co(II) に対して、平面四配位の錯体構造を形成すると仮定した場合に比べ、 Co(II) の添加量が過剰である。この考察については、下節に述べる。

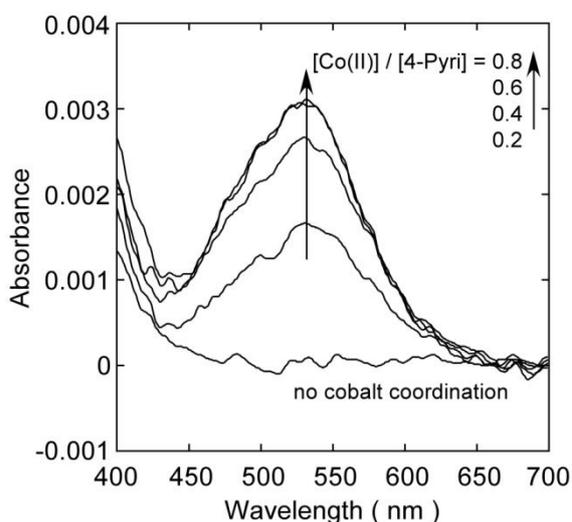


Figure 3-1. UV spectra of L14A2S in TFE solution before and after cobalt(II) acetate addition. The concentration of L14A2S was fixed at 0.1 mM.

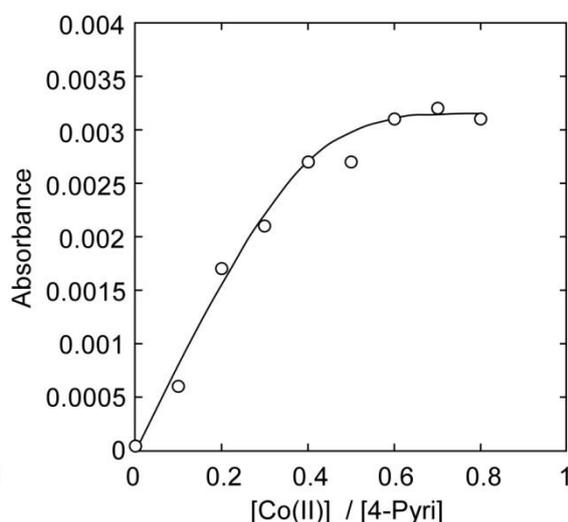


Figure 3-2. The change in the absorbance at 529 nm of L14A2S induced by cobalt(II) acetate addition in TFE solution.

3-3-2 溶液中におけるペプチドの二次構造

溶液中におけるペプチド L14A2S の二次構造を円偏光二色性 (CD) 測定より評価した。溶媒には TFE を用い、ペプチドの濃度を 0.1 mM とした。結果を Figure 3-3a に示した。CD スペクトルは 208 nm と 222 nm に負の極大値を示すことからペプチド L14A2S は TFE 中で、 α -ヘリックス構造を有することが分かる。3-2-3-2 節で述べた分散型の α -ヘリックス、 β -シート、ランダムコイル構造に基づく基準スペクトルを用い、Figure 3-3a の CD スペクトルをカーブフィティングした結果、各二次構造の含有率は α -ヘリックス : 51%、 β -シート : 11%、ランダムコイル : 38% と得られた。

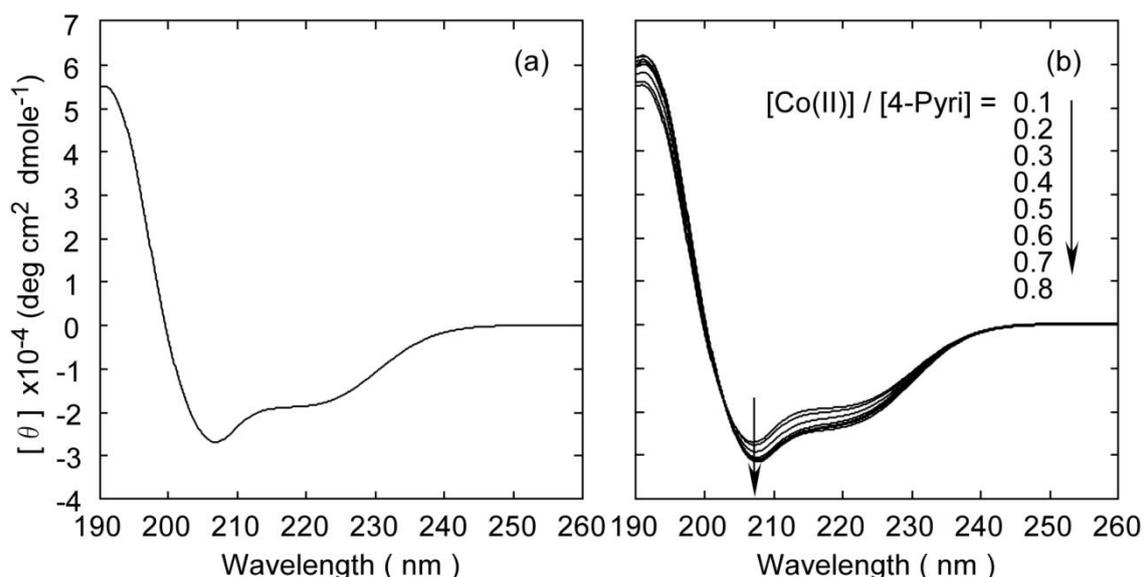


Figure 3-3. (a); CD spectrum of L14A2S in TFE. And (b); Co(II) induced CD spectral change of L14A2S in TFE. The molar ratio of Co(II) to 4-pyridyl group was changed from 0.1 to 0.8 at 0.1 intervals. The concentration of L14A2S was fixed at 0.1 mM.

次に、金属イオン添加に伴うペプチドの二次構造変化を同様に CD スペクトルより評価した (Figure 3-3b)。金属を添加したペプチド溶液の CD スペクトルにおいては、208 nm と 222 nm に負の極大値を表し、TFE 中においてペプチド L14A2S は金属添加後も主に α -ヘリックス構造を取ることが判明した。Co(II)の添加に伴いその負の値が増加し、Co(II)添加により α -ヘリックス構造の安定化が認められた。

金属添加に伴う二次構造変化を評価するために、上記と同様に各二次構造に基づく基準スペクトルを用いたカーブフィティングを Figure 3-3 に示す各スペクトルに適応し、ペプチド鎖の各二次構造含有率を求めた。得られた各二次構造の含有率と、添加した Co(II)と側鎖ピリジル基とのモル比, $[\text{Co(II)}]/[4\text{-Pyri}]$, との関係をそれぞれ Figure 3-4 (○; α -ヘリックス、□; β -シート及び△; ランダムコイル) に示した。Co(II)を添加することによって、ヘリックスの含有率が増加し、Co(II)とピリジル基のモル比が 0.6 程度まで α -ヘリックス構造の

安定化が認められた。これは金属と側鎖ピリジル基との錯形成により、 α -ヘリックスバンドル形成が促進され、 α -ヘリックス構造が安定化されたものと思われる。また、 β -シート構造の含有率には変化がないことから、この二次構造転移は α -ヘリックスとランダムコイル構造の転移によるものである。 Co(II) とピリジル基のモル比が 0.6 になった以降では、 α -ヘリックスの含有率が飽和になる傾向を示した。この値は前節 3-3-1 の UV 測定における錯体由来の吸光度の変化が飽和になった結果と一致し (Figure 3-2)、ペプチドと金属との錯形成が α -ヘリックスバンドルを生成させることによって、ヘリックス構造を安定化させたことを示唆した。前節 3-2-1-2 (Scheme 3-2) に述べたように、 Co(II) とペプチド

との錯体構造は、ペプチド側鎖のピリジル基が平面四配位で Co(II) イオンと錯形成し、 Co(II) イオンの上下にそれぞれひとつの CH_3COO^- 基が配位する八面体構造を取る錯体と仮定した。即ち、一つの Co(II) イオンに対し、4本のヘリックスのそれぞれの側鎖ピリジル基が四配位する。上記仮定に基づくと、 Co(II) とピリジル基のモル比、 $[\text{Co(II)}]/[\text{4-Pyri}]$ 、が 0.25 の時にヘリックスの含有率が一定になると想定した。しかし、飽和に達する Co(II) 添加量が過剰 ($[\text{Co(II)}]/[\text{4-Pyri}]=0.6$) になった。その理由としては、一部ランダムコイル構造を有するペプチドの主鎖アミノ基も金属 Co(II) のリガンドとして働いたと思われる。しかし、 $[\text{Co(II)}]/[\text{4-Pyri}]=0.6$ においては、 α -ヘリックスペプチドが錯形成より安定したため、以降の実験、即ち、基板上に自己組織化単分子膜法により金属配位ペプチドナノアレーを調製する際、金属イオンとペプチド側鎖ピリジル基のモル比は、二次構造転移が収束する $[\text{Co(II)}]/[\text{4-Pyri}]=0.6$ の条件で行った。

3-3-3 ペプチドナノアレーの分子配向

金蒸着ガラス基板上に形成したペプチドナノアレーの二次構造及び分子配向を検討するために、FTIR-RAS 測定を行った。自己組織化単分子膜 (SAM) 法で調製した L14A2 SAM 及び L14A2Co SAM の FTIR-RAS を Figure 3-5a と Figure 3-5c に、逐次重合法で調製した L14A2 SP 及び L14A2Co SP の FTIR-RAS を Figure 3-5b と Figure 3-5d に、それぞれ示した。

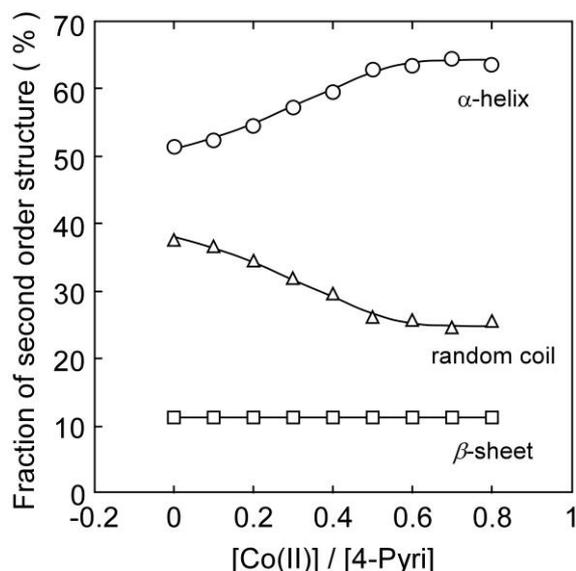


Figure 3-4. Co(II) dependence of fraction of second order structure for L14A2S in TFE solution. \circ ; α -helical, Δ ; random coil and \square ; β -sheet structure of L14A2S estimated by CD curve fitting method.

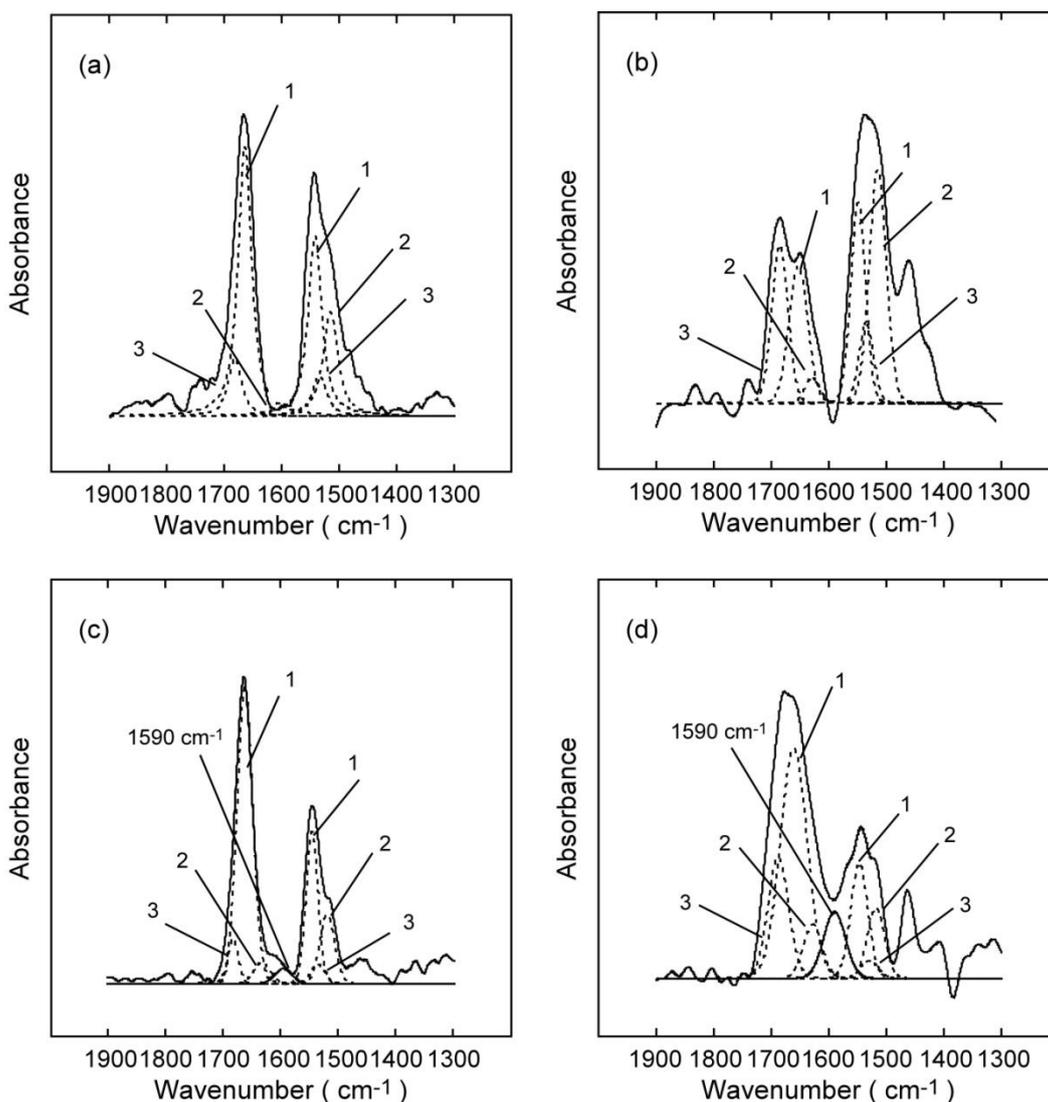


Figure 3-5. FTIR-RAS of (a); L14A2 SAM, (b); L14A2 SP, (c); L14A2Co SAM and (d); L14A2Co SP peptide nano-arrays on gold substrates. Broken lines show the peak deconvolution of the amide I and the amide II bands to 1; α -helix (1654 and 1545 cm^{-1}), 2; β -sheet (1635 and 1522 cm^{-1}) and 3; random coil (1679 and 1535 cm^{-1}) conformation.

高感度赤外反射吸収法 (FTIR-RAS) を用いて、ペプチドナノアレーのアミド I 吸収帯及びアミド II 吸収帯からペプチドの二次構造を評価した^{43,44}。アミド I 吸収帯は、ペプチドが α -ヘリックス、 β -シート、ランダムコイル構造を取る場合には、それぞれ 1654 cm^{-1} 、1635 cm^{-1} 、1679 cm^{-1} 付近に極大吸収を示すことが報告されている。また、アミド II 吸収帯では、 α -ヘリックス、 β -シート、ランダムコイル構造に基づく極大吸収は、それぞれ 1545 cm^{-1} 、1522 cm^{-1} 、1535 cm^{-1} 付近に現れることが報告されている。

SAM 法を用いて調製した金属未配位 (L14A2 SAM : Figure 3-5a) 及び Co(II)配位 (L14A2Co SAM: Figure 3-5c) ペプチドアレーにおいて、何れもアミド I 吸収帯が 1654 cm^{-1}

付近、アミド II 吸収帯が 1545 cm^{-1} 付近に認められることより、基板上においても、ペプチド L14A2S は主に α -ヘリックス構造を有することが分かる。また、3-2-3-3 節で述べた手法を用い、アミド I 領域を各二次構造に帰属されるスペクトルに波形分離し、各スペクトルの面積比より各二次構造含有率を求めた。結果を Table 3-1 にまとめた。SAM 法で形成した金属配位 L14A2Co SAM 及び金属未配位 L14A2 SAM ペプチドナノアレーについては、それぞれ 85%及び 82%の高い α -ヘリックス含有率を示し、この値は TFE 溶液中での同じシーケンスよりなる L14A2S より高く、ペプチド鎖が基板表面へ固定化されることにより、 α -ヘリックス構造が安定化されていることが分かる。

一方、逐次重合法で調製したペプチドナノアレー (L14A2 SP 及び L14A2Co SP) については、金属未配位ペプチドナノアレー (L14A2 SP) はその α -ヘリックス含有率は 47%となり、この値は溶液中におけるペプチドの α -ヘリックス含有率とほぼ等しく、SAM 法より調製した金属未配位ペプチドナノアレー L14A2 SAM より低かった。その原因は未だ明らかではないが、一つの理由として、逐次重合開始点である C11N 分子が基板上に均一分散していないためだと考えられる。また、C11N/C4 mixed SAM 中で、開始点であるアミノ基の表面密度が最適となる C11N と C4 との分率に設計したが、実際には、調製時の溶液中でのモル分率と基板表面でのモル分率に差が生じた可能性なども考えられる。しかしながら、Co(II)配位ペプチドナノアレー L14A2Co SP において、Co(II)配位によって、 α -ヘリックス含有率が 47%から 64%まで、20%近く大きく向上した。この結果はペプチド側鎖ピリジル基と配位金属との錯体形成により、 α -ヘリックスのバンドル状集合体を形成することにより、 α -ヘリックス構造を安定化させたことが示唆された。

Table 3-1. Summary of the fraction of second order structure and tilt angle for the peptide nano-arrays prepared by the SAM method and the stepwise polymerization one, respectively.

	Conformation (%)			Tilt angle (deg)
	α -helix	β -sheet	Random coil	
L14A2 SAM	82	1	17	55
L14A2Co SAM	85	7	8	42
L14A2 SP	47	7	46	70
L14A2Co SP	64	10	26	37

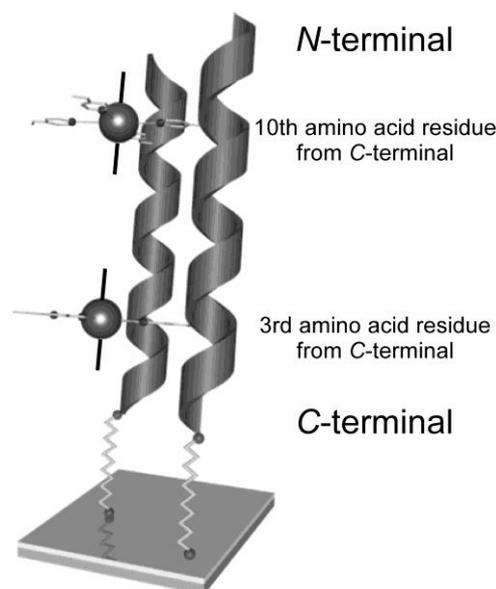
FTIR-RAS より、基板上でのペプチドナノアレーの分子配向を評価した。3-2-3-3 節で述べたように、各スペクトルから α -ヘリックス構造に帰属されるアミド I 吸収帯の吸光度とア

ミドII吸収帯の吸光度の比から、eq. 3-3を用い、 α -ヘリックスの基板垂直法線からの傾斜角を算出した。

傾斜角の結果を二次構造の結果と合わせて、Table 3-1 にまとめた。SAM法を用い構築したペプチドナノアレー中では、その α -ヘリックス構造は金属配位に伴い、Co(II)配位 SAM (L14A2Co SAM) の傾斜角が未配位のもの (L14A2 SAM) に比べ、 55° から 42° へと向上した。一方、逐次重合法により構築したペプチドナノアレーでは、Co(II)配位ペプチドナノアレー (L14A2Co SP) と未配位 (L14A2 SP) との配向角を比較したところ、Co(II)を配位することによって、その傾斜角が 70° から 37° へと大きく減少した。金属添加による配向変化は、SAM法に比べて、逐次重合法の方が大きく、

即ち、錯形成に伴い、逐次重合で調製したペプチドナノアレー中の α -ヘリックスペプチドは、より垂直配向することが分かる。錯形成に伴う α -ヘリックスペプチドの配向性の向上は、 α -ヘリックスバンドル形成による立体的な効果によるものと思われるが、この効果は逐次重合でより顕著に働くこと示唆される。この結果は、逐次重合法により形成した α -ヘリックスペプチドはそのC-末端側が基板表面に固定されているため、各 α -ヘリックスペプチド鎖中のC-末端から3残基目と10残基目に存在する金属配位子として働くピリジル基がそれぞれ基板表面から等距離に配置されるため、Co(II)との錯形成時に α -ヘリックスバンドルがSAM法で構築したペプチドナノアレーに比べ、より形成され易くなったと考えられる (Scheme 3-8)。

更に、SAM法、逐次重合法で調製した金属配位ペプチドナノアレーL14A2Co SAM (Figure 3-5c)、L14A2Co SP (Figure 3-5d) においては、 1590 cm^{-1} 付近に対イオンである CH_3COO^- のカルボキシル伸縮振動に由来する吸収が認められた。 CH_3COO^- は、Scheme 3-2 に示す様に、Co(II)と四つのピリジル基よりなる平面四配位面に対し、上下から配位することで、八面体構造を形成すると考えられる。逐次重合法で調製したL14A2Co SPにおける同吸光度がSAM法で調製したL14A2Co SAMより大きかった。RASでは、基板に対して垂直方向に存在する遷移モーメントを有する振動により敏感であることが知られている⁴⁵⁾。この結果は、先述の配向度の結果と併せて考察すると、L14A2Co SPにおいて、Co(II)は垂直に配向したペプチド鎖中C-末端から等距離に配置したピリジル基と錯体を形成することで、対イオンである CH_3COO^- がCo(II)と四つのピリジル基との平面四配位面に対し、



Scheme 3-8. Schematic picture of the Co(II) coordinated peptide nano-array prepared by stepwise polymerization.

上下垂直方向に配位し、結果として、 CH_3COO^- の遷移モーメントが基板法線に対し垂直配向したからと考えられる。

従って、SAM法に比べ、逐次重合法においては、Co(II)がペプチドの3残基目と10残基目に存在する金属配位子として働くピリジル基と効率的に錯体を形成し、基板上で安定な α -ヘリックスバンドルよりなる垂直配向ナノアレーが構築できることが明らかとなった。

ペプチドナノアレーの分子配向を更に確認するために表面電位顕微鏡 (SPoM) を用い、SAM法及び逐次重合法で調製したナノアレーの表面電位を観察した。メインスキャンではペプチドナノアレーの表面形状をタッピングモードで測定した (Figure 3-6)。SAM法、逐次重合法、何れの方法で調製したペプチドナノアレーの表面が均一であることが確認できた。ペプチドが金蒸着ガラス基板上に密にパッキングされたことを示唆した。次に、プローブをサンプル表面より 20 nm リフトさせ、インターリーブスキャンを行い、ペプチドナノアレーの表面電位を得た。その表面電位分布を Figure 3-7 に示し、平均表面電位を Table 3-2 にまとめた。SAM法で調製したペプチドナノアレーはマイナスの表面電位を示したことに對し、一方、逐次重合により構築したものはプラスの表面電位を示した。これは、二つの方法で調製したペプチドナノアレーの異なった分子配向によるものだと考えられる。SAM法で調製した L14A2 SAM と L14A2Co SAM においては、ペプチドが N-末端に導入したリポ酸を介し基板表面に結合したため、基板表面にペプチドの N-末端、ペプチドナノアレー表面にその C-末端が配向するように基板上に固定化される。上記ペプチドナノアレーは、このような分子配向を持つため、主にペプチド C-末端に基づくマイナスの表面電位を示した。一方、逐次重合で構築した L14A2 SP と L14A2Co SP の場合、基板上のアミノ基を反応開始点として α -ヘリックス分子が成長するため、すべてのペプチド分子が基板上にその C-末端、アレー表面に N-末端を配し固定化され、ペプチドの N-末端に起因するプラスの表面電位を示した。また、逐次重合で調製した金属配位、金属未配位のペプチドナノアレーは SAM法で構築した同配列のペプチドナノアレーより、その表面電位の絶対値は大きかった。L14A2 SAM と L14A2Co SAM においては、 α -ヘリックスペプチドのマクロダイポール間の相互作用により、それを打ち消すように、マクロダイポールモーメントが逆平行に配向する可能性も考えられる。このように、異なった配向性を有する α -ヘリックス分子が SAM中に混在することによって、表面電位の絶対値が減少したと考えられる。

Table 3-2. Surface potentials for the peptide nano-arrays prepared by SAM method and stepwise polymerization.

	L14A2 SAM	L14A2Co SAM	L14A2 SP	L14A2Co SP
Surface potential (mV)	-39.4±12.2	-46.8±12.1	+63.2±12.9	+74.2±14.3

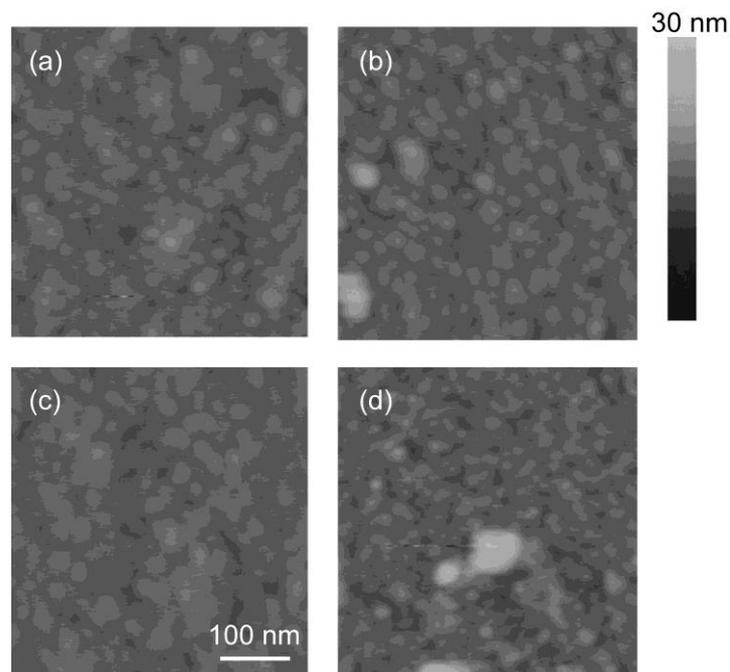


Figure 3-6. TMAFM images (500 x 500 nm) for (a); L14A2 SAM, (b); L14A2 SP, (c); L14A2Co SAM and (d); L14A2Co SP, respectively. The scanning speed was at a line frequency of 1 Hz.

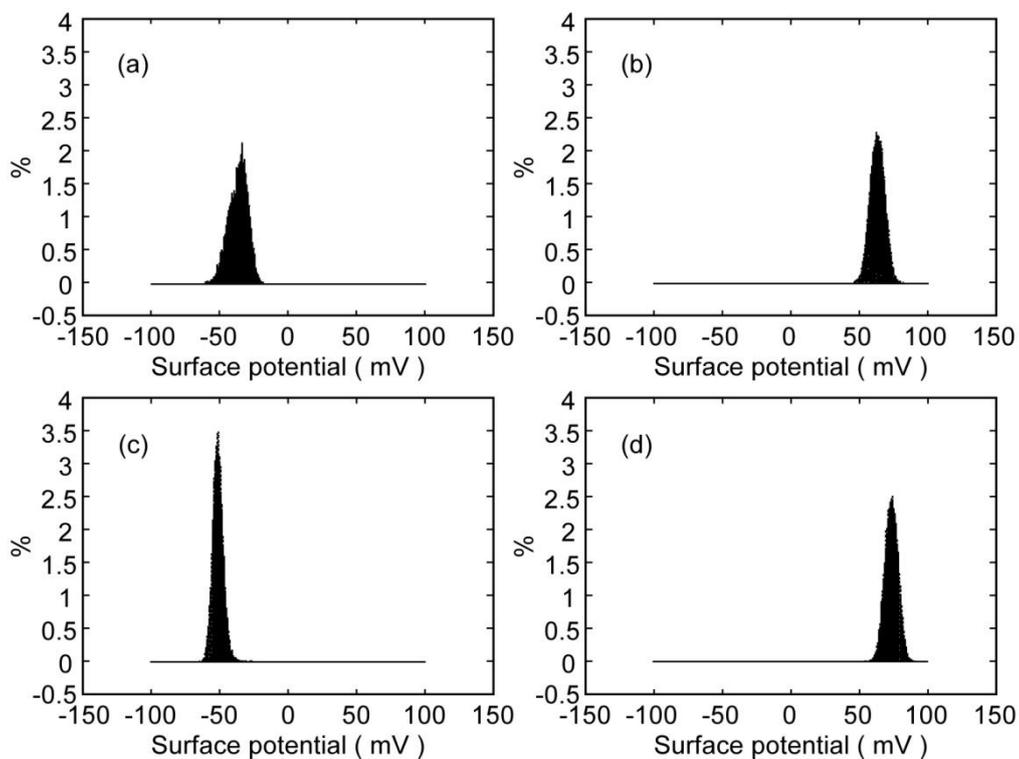


Figure 3-7. The distributions of surface potentials for (a); L14A2 SAM, (b); L14A2 SP, (c); L14A2Co SAM and (d); L14A2Co SP, respectively.

以上の結果より、逐次重合を用いることで、ペプチド分子が固体基板表面に垂直に固定化でき、 α -ヘリックスペプチドのマクロダイポールの配向が揃った安定なナノアレーが形成可能であることが示された。

3-3-4 ペプチドナノアレー中の金属配位

金蒸着ガラス基板上に形成した金属配位ペプチドナノアレー中の配位金属の酸化・還元反応をサイクリックボルタンメトリー (CV) 測定を用い評価した。測定は室温において、三電極法を用い行った。すべての測定において、電圧は 0 V からマイナス方向で走査した。結果を Figure 3-8 に示した。SAM 法で調製した金属未配位ペプチドナノアレー, L14A2 SAM, と逐次重合で構築した L14A2 SP において、酸化還元ピーク電位を示していないことに対し (broken line in Figure 3-8a and Figure 3-8b)、Co(II)配位ペプチドナノアレー (L14A2Co SAM and L14A2Co SP : solid line in Figure 3-8a and Figure 3-8b) では金属 Co(II)に対応する酸化還元ピーク電位を示した。二種の方法で調製したペプチドナノアレーは同じ電位に酸化還元ピークが存在し、その酸化還元電位値を Table 3-3 にまとめた。金属配位ペプチドナノアレーにおいて観察できたピークはペプチドナノアレー中 Co(II)-(Ala(4-Pyri))錯体の Co(II)イオンの酸化還元によるものだと考えられ、Co(II)がペプチドのピリジル基に配位したことを確認された。一方、これらの金属配位ペプチドナノアレー (L14A2Co SAM、L14A2Co SP) の CV 曲線には、大きなバックグラウンド電流が観察でき、これは基板上に形成されたペプチドナノアレー膜のキャパシタンス電流によるものと思われる。

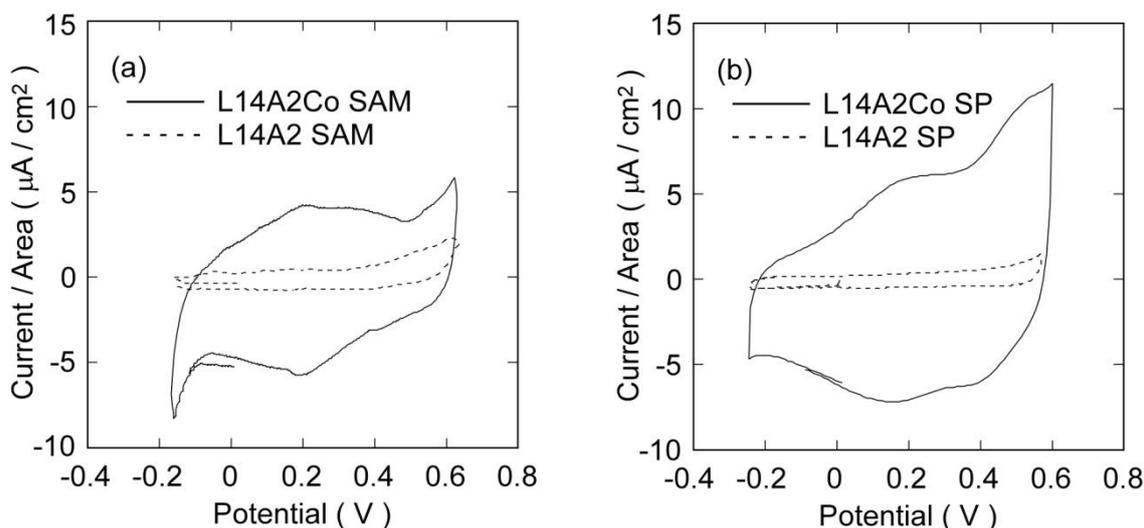


Figure 3-8. Cyclic voltammograms of (a); L14A2 SAM (---) and L14A2Co SAM (—), and (b); L14A2 SP (---) and L14A2Co SP (—) in 0.1 M KCl aqueous solution at room temperature. The area of working electrode exposed to the electrolyte solution was 0.28 cm². The sweep rate was set at 100 mV·s⁻¹.

また、L14A2Co SAM と L14A2Co SP の酸化還元電流を比較すると、L14A2Co SP、即ち、逐次重合法で構築したペプチドナノアレーの方が大きな値を示した。これは、アレー中により多くの Co(II)錯体が存在することを意味し、アレー中で配位子であるピリジル基を基板表面より等距離で配置することで、より規則的なナノ構造の形成が可能であることを示すものである。

Table 3-3. Cathodic-anodic peak potentials of the Co(II) coordinated peptide nano-arrays.

	L14A2Co SAM	L14A2Co SP
Cathodic peak (V)	+ 0.19	+ 0.18
Anodic peak (V)	+ 0.22	+ 0.22

3-3-5 ペプチドナノアレーの電気化学特性

走査トンネル顕微鏡 (STM) を用いペプチドナノアレーの表面トポグラフィーを観察した。STM 測定では、SAM 法及び逐次重合法で調製したペプチドナノアレーの STM イメージがフラットであり (Figure 3-9)、Figure 3-6 に示した TMAFM と同様の結果を示し、ペプチド分子が金蒸着ガラス基板上に均一にパッキングしていることが分かる。

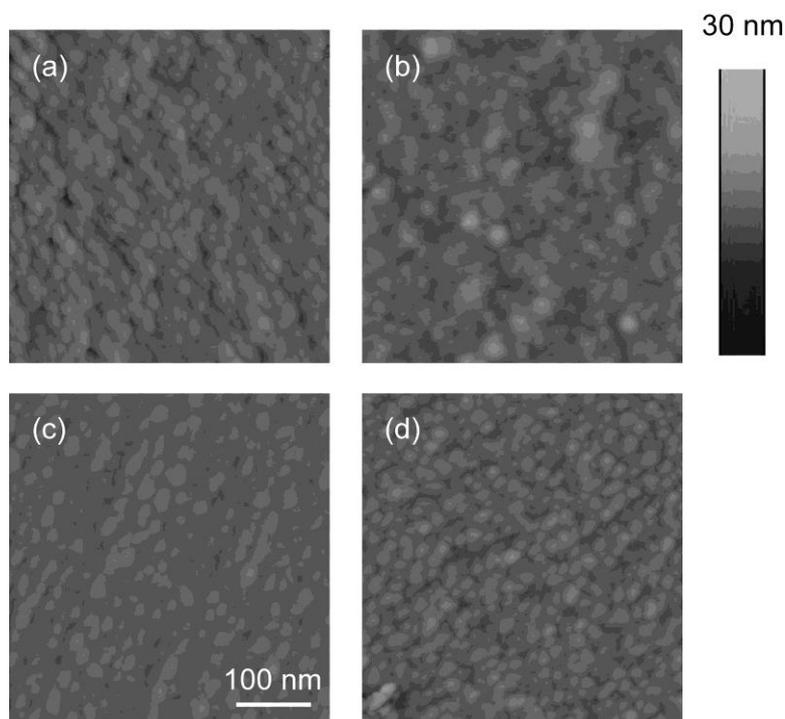


Figure 3-9. STM images (500 x 500 nm) for (a); L14A2 SAM, (b); L14A2 SP, (c); L14A2Co SAM and (d); L14A2Co SP, respectively.

上記 STM 測定に基づき、探針をイメージ中心に固定し、走査トンネル分光法 (STS) を用い、空気中におけるペプチドナノアレーの電気化学特性を評価した。印加バイアス電圧は $-0.5 \sim +0.5 \text{ V}$ でスキャンした。

SAM 法で調製したペプチドナノアレー、逐次重合法で調製したペプチドナノアレーの STS はそれぞれ Figure 3-10a 及び Figure 3-10b に示した。上記二種の異なる方法で調製したペプチドナノアレーにおいては、印加電位に対する電流の応答特性は明らかに異なった。SAM 法で調製した金属未配位 L14A2 SAM、金属配位 L14A2Co SAM 何れにおいて、基板上に正、負何れの電位を印加した場合にも、電流応答が観察され、その応答は金属配位ペプチドナノアレー L14A2Co SAM において大きかった。一方、逐次重合法で構築したペプチドナノアレー (L14A2 SP と L14A2Co SP) では、基板に負の電位を印加した時のみ電流の応答が観察され、その値は負電位印加時の L14A2Co SAM の電流応答がより大きいものであった。

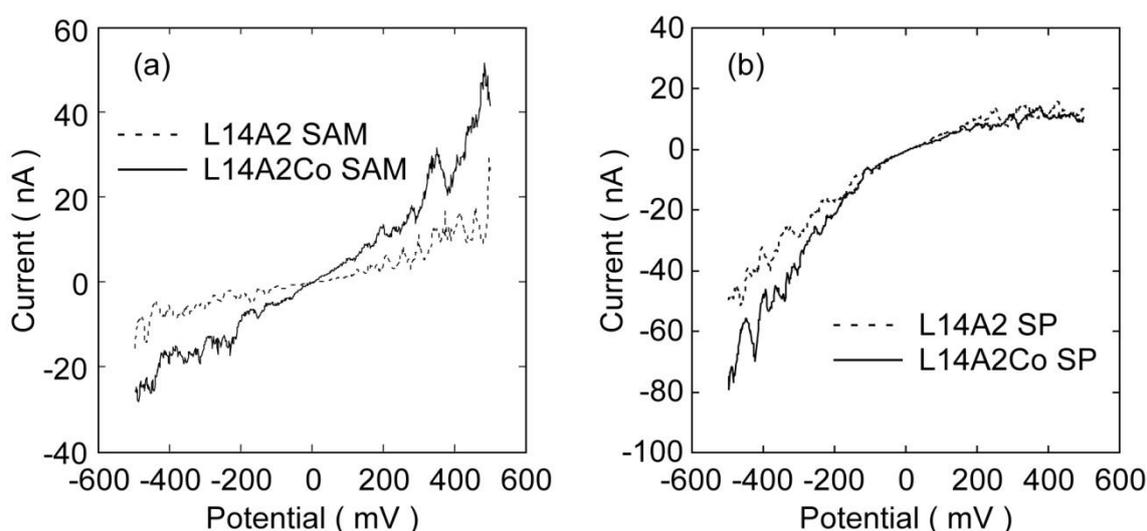


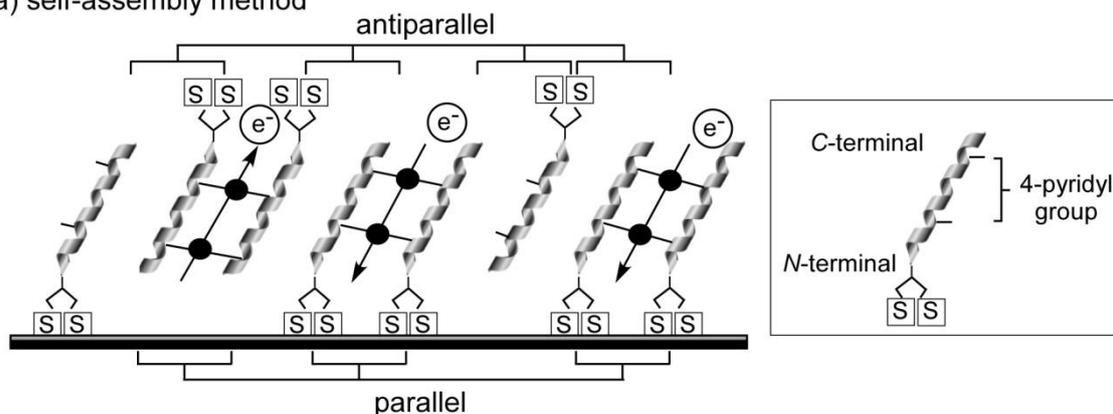
Figure 3-10. Current (I)-voltage (V) curves for (a); L14A2 SAM (---) and L14A2Co SAM (—), and (b); L14A2 SP (---) and L14A2Co SP (—). The I-V curves were obtained by the STS measurements.

上記応答性の違いは、異なる方法で調製したペプチドナノアレーにおいて、その α -ヘリックスのマクロダイポールモーメントの配向方向の相違によるものと考えられる。Scheme 3-9a に示すように、L14A2Co SAM の場合、ペプチド分子は N-末端に導入されたリボ酸を介し基板表面に結合しているため、基板表面に α -ヘリックス分子の N-末端、ペプチドナノアレー表面にその C-末端が配向するよう、基板上に固定化され、平行に配向したペプチド分子のマクロダイポールに沿って、電子がペプチドナノアレー表面から基板表面へ移動できる。同時に、 α -ヘリックスのマクロダイポールモーメント間の相互作用により、マクロダ

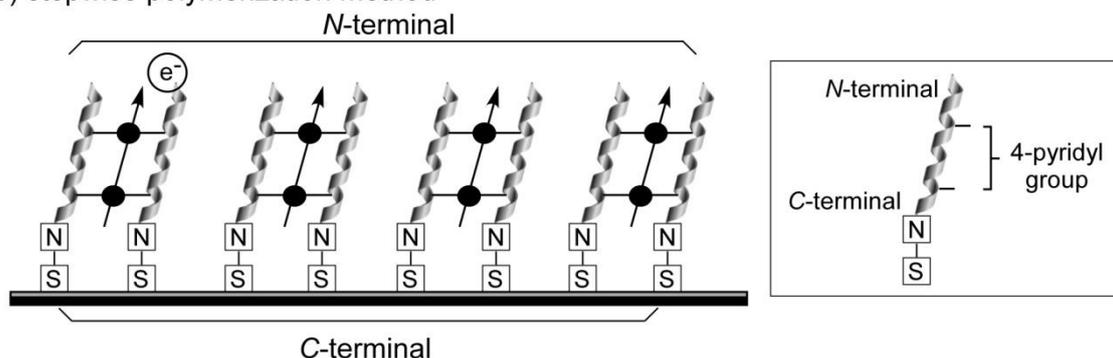
イポールモーメントが逆平行になる可能性もある (Scheme 3-9a)。従って、平行及び逆平行の配向性を有する α -ヘリックス分子の混在、即ち、異なった配向を有するマクロダイポールモーメントを持ったペプチド分子の混在が正、負何れの電位を印加した場合にも、電流応答を示した要因と考えられる。

一方、逐次重合法で調製した L14A2 SP 及び L14A2Co SP の場合、基板上的のアミノ基を反応開始点とし、 α -ヘリックス分子が成長したために、すべてのペプチド分子が基板上にその C-末端、アレー表面に N-末端を配し、固定化されるために、 α -ヘリックス分子のマクロダイポールモーメントが一方向に揃うと考えられる (Scheme 3-9b)。そのため、基板に正の電位を印加した時、電流応答が見られないことに対し、負の電位を印加した時電流応答が観察された。

(a) self-assembly method



(b) stepwise polymerization method



Scheme 3-9. Schematic pictures of the molecular alignment and the direction of electron flow through the Co(II) coordinated nano-arrays prepared by (a); the self-assembly method and (b); the stepwise polymerization one, respectively.

加えて、SAM 法及び逐次重合法、それぞれで構築した金属配位ペプチドナノアレーは同じ手法で調製した金属未配位のものより、高い電流の応答性を示した。この結果は α -ヘリッ

クスのマクロダイポールモーメントと金属錯体との共役より、電子移動が加速されたことが示唆される。更に、逐次重合で調製した金属配位ペプチドナノアレー、L14A2Co SP, では最も大きな電流応答と非線形効果が観察できた。SAM法で調製したL14A2Co SAMと比べると、L14A2Co SPのヘリックス含有率が低いものの、そのマクロダイポールが一方向に揃っていると共に、その垂直法線からの配向角が小さいことを前節3-3-3で示した。このことより、負の電位を印加時に、L14A2Co SPでは一方向に垂直配向したペプチドナノアレー中に規則正しく配列した二箇所の金属錯体と一軸配向したペプチドマクロダイポールとの共役より、大きな非線形電流応答が発現されたものと考えられる。

従って、基板上に逐次重合法による構築した金属配位ペプチドナノアレーは分子配向性が高く、本章の目的である非線形的な電子移動を実現できる。

3-4 結言

本章では、ペプチドのアミノ酸シーケンスにはロイシン、及び金属配位子として機能するピリジル基を有する4-ピリジルアラニンの周期配列を有するLeu₆Ala(4-Pyri)Leu₆Ala(4-Pyri)Leu₂を用い、金蒸着ガラス基板上に、自己組織化単分子膜(SAM)法と逐次重合法の二種の手法による、金属配位ペプチドナノアレーを構築した。同ペプチドは α -ヘリックスを形成した際、二つのピリジル基は棒状 α -ヘリックス分子の片側側面に配向し、金属と錯体を形成することで、 α -ヘリックスのバンドル構造を形成することが期待される。更に、ペプチドのマクロダイポールモーメントを一方向に揃えることで、そのマクロダイポールモーメントと金属錯体との共役により効率的な一方向への電子の移動を期待できると考えた。

上記二種の手法で得られた金属配位ペプチドナノアレー中のペプチド分子の二次構造、及びヘリックス軸の基板垂直法線からの傾斜角を高感度赤外分光(FTIR-RAS)測定より評価したところ、SAM法、逐次重合法、何れの手法で構築したペプチドナノアレーにおいても、ペプチドは金属配位により、主に α -ヘリックス構造を取り、基板垂直法線からのヘリックス軸の傾斜角が減少した。この結果は金属との錯形成より、 α -ヘリックスがバンドル集合体を形成することによって、ペプチドが基板上により垂直配向することを示唆された。

また、金属配位ペプチドナノアレー中 α -ヘリックスペプチドの分子配向を表面電位顕微鏡(SPoM)を用いて評価した。SAM法による調製したペプチドナノアレーにおけるヘリックス分子が基板上に平行及び逆平行が混在に配向することに対し、逐次重合法による構築したペプチドナノアレーは α -ヘリックスのマクロダイポールが一方向に配向したと分かった。

空気中におけるペプチドナノアレーの電気化学特性を走査トンネル分光法(STS)より評価した。SAM法で構築した金属配位ペプチドナノアレーが正、負何れの電位を印加した場合においても、電流の応答が観察できたことに対し、逐次重合法で調製した金属配位ペプチドナノアレーが負の電位を印加する場合のみ電流応答が見られ、電子移動の整流作用の発見が確認できた。以上の結果は、逐次重合法で構築したペプチドナノアレーの一軸・

垂直配向した α -ヘリックス分子に基づく一方向に配向したマクロダイポールモーメントと、配位金属との共役によるものであると示唆された。逐次重合法は高配向性金属配位ペプチドナノアレーの構築において有用な手法であり、このような単分子膜が電子移動の際の整流効果を有する伝達経路として機能することを示し、ナノデバイスとしての応用が期待できると考えられる。

REFERENCES

- 1) Naito, M.; Kishihara, K.; Okahata, Y. *Langmuir* **2010**, *26*, 9166-9169.
- 2) Wada, A. *Adv. Biophys.* **1976**, *9*, 1-63.
- 3) Hol, W. G. J.; van Duijnen, P. T.; Berendsen, H. J. C. *Nature* **1978**, *273*, 443-446.
- 4) Hol, W. G. H. *Prog. Biophys. Molec. Biol* **1985**, *45*, 149-195.
- 5) Deisenhofer, J.; Epp, O.; Miki, K.; Huber, R.; Michel, H. *Nature* **1985**, *318*, 618-624.
- 6) Babcock, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10893-10895.
- 7) Lodish, H.; Baltimore, D.; Berk, A.; Zipursky, S. L.; Matsudaira, P.; Darnell, J. *Molecular Cell*, 3rd ed.; Scientific American Books: New York, 1998; p. 782-783.
- 8) Imahori, H.; Hasobe, T.; Yamada, H.; Nishimura, Y.; Yamazaki, I.; Fukuzumi, S. *Langmuir* **2001**, *17*, 4925-4931.
- 9) Harada, A.; Yamaguchi, H.; Okamoto, K.; Fukushima, H.; Shiotsuki, K.; Kamachi, M. *Photochemistry and Photobiology* **1999**, *70*, 298-302.
- 10) Heleg-Shabtai, V.; Gabriel, T.; Willner, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3220-3221.
- 11) Heller, A. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 3579-3587.
- 12) Willner, I.; Lion-Dagan, M.; Marx-Tibbon, S.; Katz, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6581-6592.
- 13) Kishihara, K.; Kinoshita, T.; Mori, T.; Okahata, Y. *Chem. Lett.* **1998**, 951-952.
- 14) Doi, T.; Kinoshita, T.; Tsujita, Y.; Yoshimizu, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2001**, *74*, 421-425.
- 15) Higashi, N.; Koga, T.; Niwa, M. *Langmuir* **2000**, *16*, 3482-3486.
- 16) Boncheva, M.; Vogel, H. *Biophys. J.* **1997**, *73*, 1056-1072.
- 17) Toyotama, A.; Kugimiya, S.; Yonese, M.; Kinoshita, T.; Tsujita, Y. *Chem. Lett.* **1997**, 443-444.
- 18) Hosokawa, H.; Kinoshita, T.; Tsujita, Y.; Yoshimizu, H. *Chem. Lett.* **1997**, 745-746.
- 19) Yokoi, H.; Kinoshita, T. *Chem. Lett.* **2004**, *33*, 426-427.
- 20) Nguyen, Le-Thu T.; Ardana, A.; Brinke, G.; Schouten, A. J. *Langmuir* **2009**, *26*, 6515-6521.
- 21) Higashi, N.; Koga, T.; Niwa, M. *Langmuir* **2000**, *16*, 3482-3486.

- 22) Fujita, K.; Bunjes, N.; Nakajima, K.; Hara, M.; Sasabe, H.; Knoll, W. *Langmuir* **1998**, *14*, 6167-6172.
- 23) Miura, Y.; Kimura, S.; Imanishi, Y.; Umemura, J. *Langmuir* **1998**, *14*, 6935-6940.
- 24) Niwa, M.; Murata, T.; Kitamatsu, M.; Matsumoto, T.; Higashi, N. *J. Mater. Chem.* **1999**, *9*, 343-344.
- 25) Miura, Y.; Kimura, S.; Imanishi, Y.; Umemura, J. *Langmuir* **1999**, *15*, 1155-1160.
- 26) Yanagisawa, K.; Morita, T.; Kimura, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12780-12781.
- 27) Geng, Y.; Discher, D. E.; Justynska, J.; Schlaad, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 7578-7581.
- 28) Sakamoto, M.; Ueno, A.; Mihara, H. *Chem. Commun.* **2000**, 1741-1742.
- 29) Whitesell, J. K.; Chang, H. K. *Science* **1993**, *261*, 73-76.
- 30) Whitesell, J. K.; Chang, H. K.; Whitesell, C. H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 871-873.
- 31) Wieringa, R. H.; Schouten, A. J. *Macromolecules* **1996**, *29*, 3032-3034.
- 32) Heise, A.; Menzel, H.; Yim, H.; Foster, M. D.; Wieringa, R. H.; Schouten, A. J.; Reb, V.; Stamm, M. *Langmuir* **1997**, *13*, 723-728.
- 33) Can, W. C.; White, P. D. *Fmoc Solid Synthesis: A Protocol Approach*, Oxford University Press. 2000.
- 34) Higuchi, M. *Thin Solid Films* **2008**, *516*, 4312-4318.
- 35) Reis, H. E. *Sci. Am.* **1961**, *204*, 152-165.
- 36) Greenfield, N.; Fasman, G. D. *Biochemistry* **1969**, *8*, 4108-4116.
- 37) Enriquez, E. P.; Samulski, E. T. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* **1992**, *255*, 423-434.
- 38) Schmutz, P.; Frankel, G. S. *J. Electrochem. Soc.* **1998**, *145*, 2285-2295.
- 39) Schmutz, P.; Frankel, G. S. *J. Electrochem. Soc.* **1998**, *145*, 2295-2306.
- 40) Behm, R. J.; Garcia, N.; Rohrer, H. Eds. *Scanning Tunneling Microscopy and Related Methods*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 1990.
- 41) Haggerty, L.; Lenhoff, A. M. *Biotechnol. Prog.* **1993**, *9*, 1-11.
- 42) Hamers, R. J. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1989**, *40*, 531-539.
- 43) Miyazawa, T.; Blout, E. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 712-719.
- 44) Kennedy, D. F.; Crisma, M.; Toniolo, C.; Chapman, D. *Biochemistry* **1991**, *30*, 6541-6548.
- 45) Umemura, J.; Kamata, T.; Kawai, T.; Takenaka, T. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 62-67.

第4章 電場配向による自己組織化を用いたペプチドナノアレーの調製

4-1 緒言

ナノ構造体 (0.1 nm~200 nm) の構築には、古くから、大きなものを「切っ」たり、「削っ」たりして、小さくしていく微細加工技術である「トップダウン (top-down)」がよく用いられてきた¹⁾。従来法は、技術の極限化、高精度化、高機能化を追求する技術であるが、この加工法では、加工線幅 50 nm 以下の構造を大量生産するのは困難とされ、今後のナノテクノロジーでは、分子レベルで「もの」を組み立てる技術が必要とされる。この中、「ボトムアップ (bottom up)」と言う、個々の原子や分子から、ミクロな新規材料やデバイスを組み立てる微細組立技術、つまり、原子・分子を数十から数百の単位で集合させ、ナノ構造体を構築する技術が提案された²⁻⁹⁾。この方法は、50 nm 以下のスケールでナノ構造体の加工や構築には有効である¹⁰⁾。より小さい構造体を構築するのは、現代科学や工業において、非常に重要な意味があり、それは、一定空間に如何により多くの素子を組み込むか、高速・簡便に、かつ低いエネルギーで動作できるかにある¹¹⁾。1959年、R. Feynman が原子、分子の自己集合であるボトムアップによるナノサイズの機能構造体の構築を提唱して以来¹²⁾、ナノスケールの構造がある条件下で自発的に形成する「自己組織・集合」が注目されている¹³⁻¹⁶⁾。

分子の自己集合は、蛋白質化学、生化学、高分子化学、材料化学など様々な分野で応用されている¹⁷⁻²³⁾。自己集合による生成した単分子膜はその安定性より機能性材料としてよく研究された。1983年に、Nuzzo と Allara は始めて金表面における金とチオールとの共有結合による dialkyl disulfide の自発的な吸着で形成した自己集合単分子膜 (SAM) を報告した²⁴⁻²⁶⁾。様々な SAM についての報告の中^{27,28)}、 α -ヘリックスペプチド SAM が脚光を浴びてきた²⁹⁻³⁴⁾。

ペプチドの α -ヘリックス構造では、ペプチド主鎖アミノ基は4残基離れたアミノ酸のカルボキシル基と水素結合で結ばれ、部分的にらせん軸に沿って双極子モーメントを持つため、ヘリックス全体としては、N-末端に1/2の正電荷、C-末端に1/2の負電荷を有するヘリックス軸に沿って配向したダイポールに近似できる (3.5 D / residue^{35,36)})³⁷⁾。 α -ヘリックス構造の生理的な機能は、主にその規則的分子構造と、分子軸に沿ったマクロダイポールによるものと考えられ、生物システムにおける蛋白質の構造や機能に大きく影響を与える。例えば、光合成中心における電子移動は、膜蛋白質中 α -ヘリックスドメインのマクロダイポールモーメントに関係する³⁸⁻⁴⁰⁾。その機能を模倣し、 α -ヘリックスペプチドは一方向への電子移動媒体を構築するための有効な素材と考えられた⁴¹⁻⁴³⁾。木村らは、金基板表面に構築したN-末端に disulfide 基でラベルしたペプチド SAM において、膜を介する一方向への電子移動を示した⁴⁴⁾。一方、東らは、ヘリックスマクロダイポール間の相互作用により、これを打ち消すような逆平行になる場合もあることを報告した³¹⁾。本章では、SAM におけるペプチドのマクロダイポールに着目し、静電的相互作用により、そのマクロダイポール

モーメントの配向性を向上させることを検討した。

近年、静電的相互作用は様々なダイポールモーメントを持つ分子の配向を規則化させることに、大きく貢献した⁴⁵⁻⁴⁸⁾。Samulskiらは、マクロダイポールモーメントを有する disulfide 基修飾ポリ α -ヘリックスペプチドの電場配向による自己集合膜を報告している⁴⁸⁾。彼らの研究では、二つ基板の間に適切な電圧を印加することによって、 α -ヘリックス分子のマクロダイポールモーメントが一方方向に配向したペプチド自己集合膜が構築できることを示している。

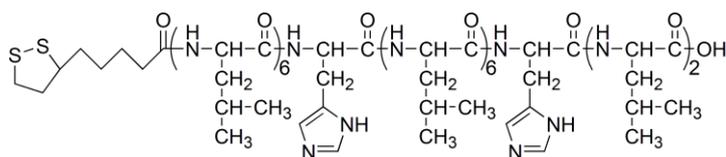
本章では、電場配向自己組織化単分子膜法を用い、固体基板表面に高い一軸・垂直配向性を有する金属配位ペプチドナノアレーを構築する。基板間に適切な電圧を印加し、ペプチドのマクロダイポールモーメントと電場との静電的相互作用によって、そのマクロダイポールモーメントが一方方向に揃った金属配位ペプチドナノアレーの構築を試みた。ペプチドのアミノ酸シーケンスには、第2章で記述した α -ヘリックス構造を形成した際、金属配位子である His 側鎖イミダゾール基がヘリックス分子片側側面に配位する Leu₆HisLeu₆HisLeu₂を用いた。尚、従来の SAM 法を用い、同アミノ酸シーケンスを有する金属配位ペプチドナノアレーを構築した。得られた二種のペプチドナノアレーの二次構造、分子配向及びその電気化学特性に関し、比較・検討を行った。

4-2 実験

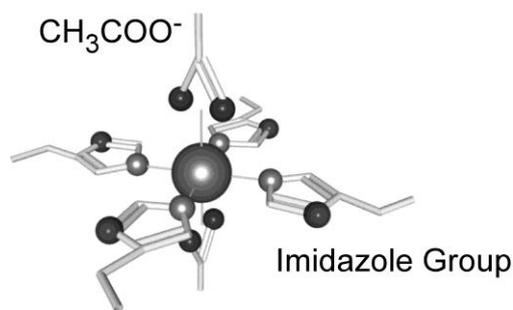
4-2-1 試料

4-2-1-1 金属配位能を有するペプチド

本章では、アミノ酸シーケンスが Leu₆HisLeu₆HisLeu₂ よりなるペプチドを第2章に従い、Fmoc 法で合成した⁵⁰⁾。ここでは、金属配位子として His を用いた。これは、His の側鎖イミダゾール



Scheme 4-1. Amino acid sequence of the peptide L14H2S.



Scheme 4-2. Schematic picture of cobalt(II)-His complex.

基が Co(II)の指示薬として使われていることを考え、前節で用いた Ala(4-Pyri)の側鎖ピリジル基よりも強い錯形成を期待したものである。また、基板上に同ペプチドを固定化するためにその N-末端にリポ酸を導入した (L14H2S : Scheme 4-1)。

4-2-1-2 配位金属

本章においては、配位金属として、錯

形成時に、配位子である L14H2S の His 側鎖イミダゾール基が平面四配位構造を取る二価のコバルト (酢酸コバルト (II) : Scheme 4-2) を用いた。

4-2-1-3 基板

本章では、前章 3-2-1-3 節で用いた金蒸着ガラス基板を同様に洗浄し、ペプチドナノアレーの吸着基板として用いた。電気ポーリングセルも同じ基板を用い作成した。

4-2-2 ペプチドナノアレーの調製

本章では、基板表面に高配向性を有する金属配位ペプチドナノアレーを以下の二種類の方法、即ち、従来の自己組織化単分子膜法 (SAM 法) 及び電場配向による自己組織化単分子膜法 (EF-SAM 法) よりそれぞれ構築した。

4-2-2-1 自己組織化単分子膜法

2,2,2-trifluoroethanol (TFE) (和光純薬工業 (株) 社製) に濃度 0.25 mM となるように N-末端にリポ酸を導入した金属配位能有するペプチド L14H2S を溶解させた。同溶液に酢酸コバルト (II) メタノール溶液を加え、錯形成を溶液中で予め行った。Co(II) とペプチド側鎖イミダゾール基とのモル比, $[\text{Co(II)}]/[\text{His}]$, は 0.25 とした。上記で調製した溶液中に金蒸着ガラス基板を 24 時間浸漬させた。その後、得られた基板を TFE で 3 回以上洗浄し、真空中で十分乾燥させた。

得られたペプチドナノアレーを以下 L14H2Co SAM とする。

4-2-2-2 電場配向による自己組織化単分子膜法

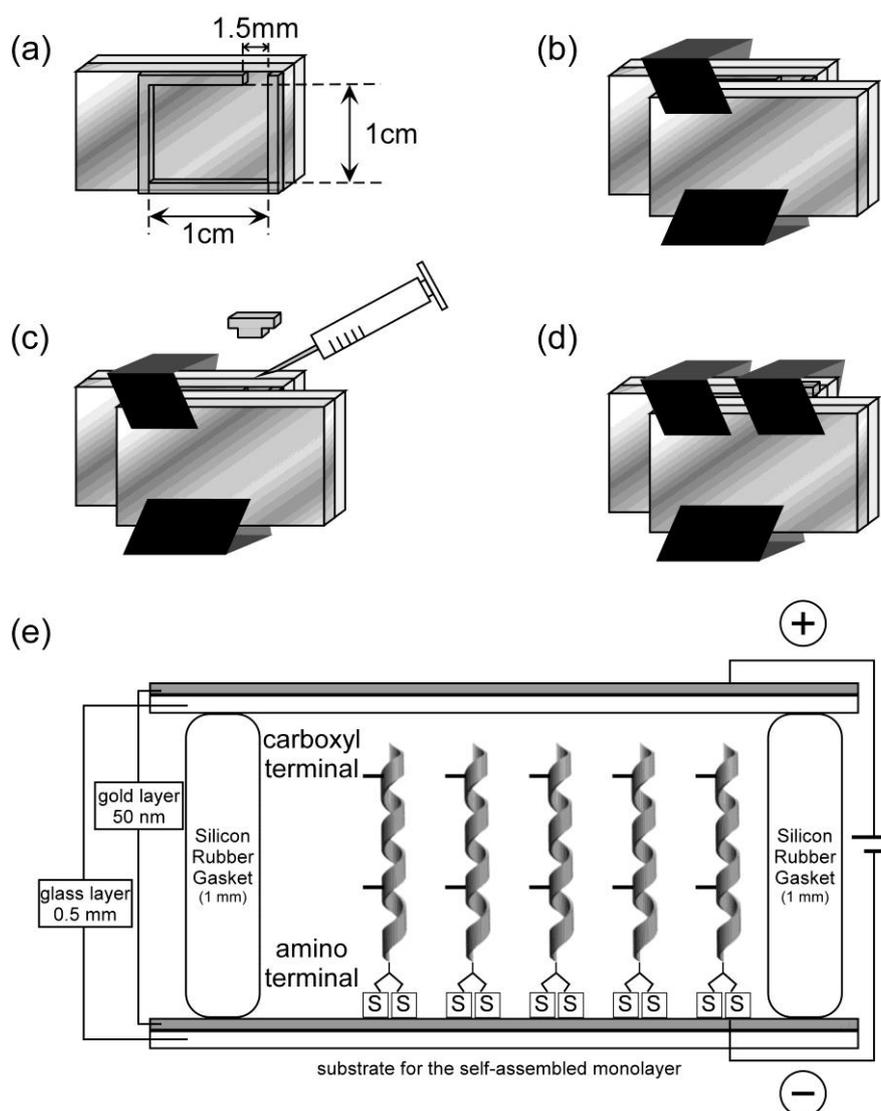
電場配向による金属配位ペプチドナノアレーの調製は電気ポーリングセル中で行った。本章で用いた電気ポーリングセルは以下の手順に従い作成した。

厚さ 1 mm のシリコーンシート (サカセ化学工業株式会社、SRT-33-S) を 1 cm×1cm の正方形を切り抜き、その正方形の四辺を 1.5 mm 残し、内部に開口部を形成した。また、その一辺の中心を 1.5 mm 切り取り、サンプル注入用の孔を形成した (Scheme 4-3a)。上記シリコーンシートを、金表面を上にした金蒸着ガラス基板上に置いた。もう一枚の金蒸着ガラス基板をガラス表面がシリコーンシートと接するようにおいた。セル内部では基板の金表面ともう一枚の基板のガラス表面とが向き合うように設置した。基板・シリコーンシート・基板の上下部をクリップで固定した (Scheme 4-3b)。

N-末端にリポ酸を導入した金属配位能を有するペプチド L14H2S 溶液を調製した。TFE に濃度 0.25 mM となるように L14H2S を溶解させた。同溶液に酢酸コバルト (II) メタノール溶液を加え、錯形成を溶液中で予め行った。Co(II) とペプチド側鎖イミダゾール基とのモル比, $[\text{Co(II)}]/[\text{His}]$, は 0.25 とした。

上記ペプチド TFE 溶液をテルモマイクロシリンジで開孔部からセル内に注入し

(Scheme 4-3c)、シリコンダックシートで作成した T 字蓋を開口部に差し込んだ。開口部をグリップで固定した (Scheme 4-3d)。Electrophoresis Power Supply EPS 1001 (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用い、電圧を印加した。ペプチド TFE 溶液と接する金表面に印加する電圧の極性を変え、2 通りのペプチド SAM を構築した。電場配向後、セルを分解し、ペプチド溶液と接する金蒸着ガラス基板を TFE で 3 回以上洗浄し、真空中で十分乾燥させた。得られたペプチドナノアレーは以下それぞれ EFneg-L14H2Co SAM (ペプチド溶液と接する金表面が負極となる場合 : Scheme 4-3e) 及び EFpos-L14H2Co SAM (ペプチド溶液と接する金表面が正極となる場合) とする。



Scheme 4-3. (a)~(d); Set up of an electric poling cell. And (e); Fabrication of the self-assembled peptide monolayer under the electric field.

4-2-3 測定法

4-2-3-1 紫外可視吸収スペクトル測定

溶液中において、金属とペプチド L14H2S との錯形成を考察するため、紫外可視吸収スペクトル (UV-vis) 測定を行った。

溶媒には TFE を用いた。ペプチド L14H2S の濃度は 0.1 mg/mL とした。酢酸コバルトのメタノール溶液 (6.78 mM) を調製し、上記ペプチド TFE 溶液中に添加した。Co(II) とペプチドのヒスチジン残基とのモル比, [Co(II)]/[His], は 0.05 から 0.5 まで 0.05 間隔で振った。上記溶液を光路長 5 mm の石英セルに満たし、室温で紫外可視分光光度計 (日本分光製、JASCO V550) を用い 300-700 nm 範囲で UV 測定を行った。

4-2-3-2 円偏光二色性スペクトル測定

溶液系において、ペプチド L14H2S の二次構造及び金属コバルト, Co(II), 添加に伴う L14H2S の二次構造変化を考察するため、円偏光二色性 (CD) 測定を行った。

溶媒には同じく TFE を用いた。ペプチド L14H2S の濃度は 0.25 mM とした。金属配位ペプチド溶液の調製は、上記ペプチド TFE 溶液中に、予め調製した酢酸コバルト (II) のメタノール溶液を添加することによって得られた。Co(II) とペプチドのヒスチジン残基とのモル比, [Co(II)]/[His], は 0.25 とした。上記溶液を光路長 5 mm の石英セルに満たし、室温、窒素雰囲気下で円偏光二色性分散計 (日本分光製、JASCO J800) を用い、190-260 nm 範囲における CD 測定を行った。積算回数は 16 回である。前章 3-2-3-2 節に従い、溶液中ペプチドの各波長におけるモル楕円率を計算した。溶液中におけるペプチドの二次構造は分散型 α -ヘリックス、 β -シート、ランダムコイルの各二次構造の基準スペクトルに基づき、190 nm から 260 nm のカーブフィッティングより求めた⁵¹⁾。

4-2-3-3 高感度赤外反射スペクトル測定

金蒸着ガラス基板上に調製した各金属配位ペプチドナノアレーの二次構造及び分子配向を高感度赤外反射スペクトル (FTIR-RAS) 測定より評価した。測定は前章 3-2-3-3 節に従って行った。得られたスペクトル中のアミド I 及びアミド II 領域をそれぞれ α -ヘリックス、 β -シート、ランダムコイル構造に帰属される吸収スペクトルに波形分離を行い、アミド I 領域の波形分離後の各二次構造に帰属されるスペクトルの面積比より、各二次構造の含有率を算出した。また、基板表面における α -ヘリックスの基板垂直法線からの傾斜角はアミド I 及びアミド II 領域の α -ヘリックス構造に帰属される分離スペクトルの面積比から求めた^{52,53)}。

4-2-3-4 表面電位顕微鏡観察

金蒸着ガラス基板上で調製した金属配位ペプチドナノアレーの表面形状を TMAFM より観察し、表面電位を表面電位顕微鏡 (SPoM) を用い得た^{54,55)}。測定法は、前章 3-2-3-5 節

に従って行った。

4-2-3-5 走査トンネル顕微鏡観察

電場未印加及び印加時で調製した金属配位ペプチドナノアレーの表面トポグラフィを表面走査トンネル顕微鏡 (STM) を用い観察した。測定法は、前章 3-2-3-6 節に従って行った。

4-2-3-6 電気化学特性

空气中における金属配位ペプチドナノアレーの電気化学特性は走査トンネル分光法 (STS) を用いて評価した⁵⁶⁾。本章における STS 測定は前章 3-2-3-7 節に従い、イメージ中心に探針を固定し、*I-V* 曲線を測定した。印加バイアスは $-0.5 \sim +0.5$ V でスキャンした。

4-3 結果と考察

4-3-1 溶液中におけるペプチド-金属錯形成

TFE 溶液中において、ペプチド L14H2S と金属 Co(II) との錯形成を UV 測定により評価した。本節では配位金属として、前章と同様に、錯形成により α -ヘリックスバンドルを形成可能な Co(II) を用いた。ただし、配位子には、ピリジル基と比較し、Co(II) との錯形成能の高いイミダゾール基を有する His を用いた。0.1 mg/mL のペプチド TFE 溶液を調製し、酢酸コバルト (II) のメタノール溶液を添加し、Co(II) とペプチドのヒスチジン残基とのモル比, $[\text{Co(II)}]/[\text{His}]$, を 0.05 から 0.5 まで 0.05 間隔で振った。Co(II) 添加後の UV-vis スペクトルを Figure 4-1 に示した。Co(II) 添加後、550 nm に Co(II)-His 錯体に基づく極大吸収ピークが観察でき、Co(II) 添加により、その吸光度の増加が確認できた。550 nm における吸光

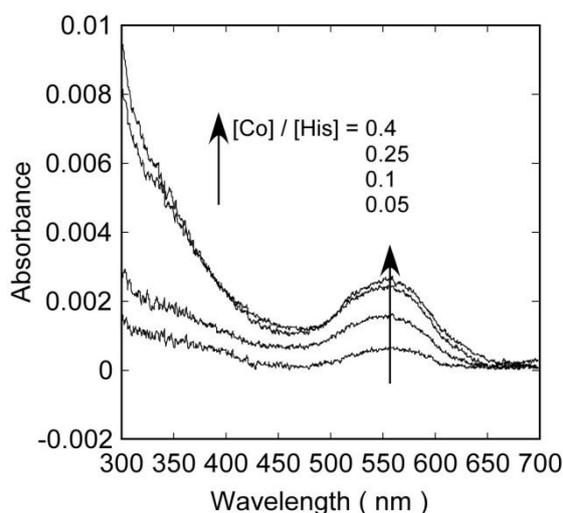


Figure 4-1. UV spectra of peptide, L14H2S, in TFE solution after cobalt(II) acetate addition. The concentration of peptide was fixed at 0.1 mg/mL.

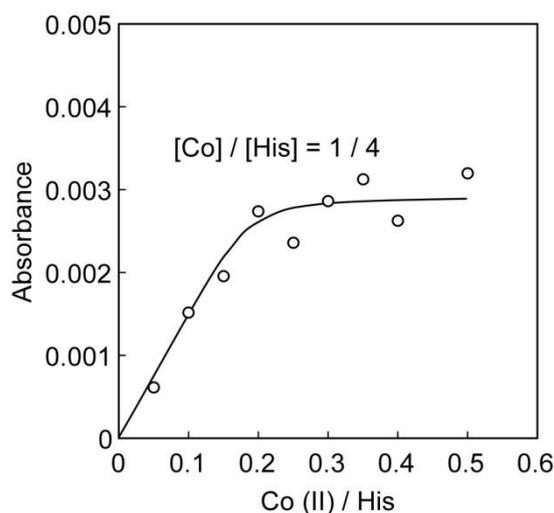


Figure 4-2. The changes in the absorbance at 550 nm of peptide, L14H2S, induced by cobalt(II) acetate addition in TFE solution.

度を Co(II) とペプチド側鎖のイミダゾール基とのモル比, $[\text{Co(II)}]/[\text{His}]$, に対してプロットした (Figure 4-2)。 Co(II) 添加量の増大に従って、550 nm における吸光率が増大し、 Co(II) とヒスチジン残基とのモル比, $[\text{Co(II)}]/[\text{His}]$, が 0.25 となる以後、吸光度の増加が飽和になる傾向を示した。この値は、Scheme 4-2 に示したように、 Co(II) が四つのペプチドの His 側鎖イミダゾール基と平面四配位する際のモル比と一致し、前節のピリジル基と比較して、化学量論的に錯体を形成することが分かった。これは、イミダゾール基の Co(II) への配位能が高いためと考えられる。

4-3-2 溶液中におけるペプチドの二次構造

TFE 溶液中におけるペプチド L14H2S の二次構造を円偏光二色性 (CD) 測定より評価した。ペプチドの濃度は 0.25 mM とした。また、金属イオン (Co(II)) 添加に伴うペプチドの二次構造変化を同様に CD スペクトルより評価した。 Co(II) とペプチド側鎖イミダゾール基とのモル比, $[\text{Co(II)}]/[\text{His}]$, は前節で錯形成が化学量論的に行われる 0.25 とした。CD スペクトルを Figure 4-3 に示した。金属添加後及び金属未添加の CD スペクトルでは、何れも 208 nm と 222 nm に負の極大値を示すことから、ペプチド L14H2S、 Co(II) 配位 L14H2S と共に、TFE 溶液中で α -ヘリックス構造を有することが分かる。

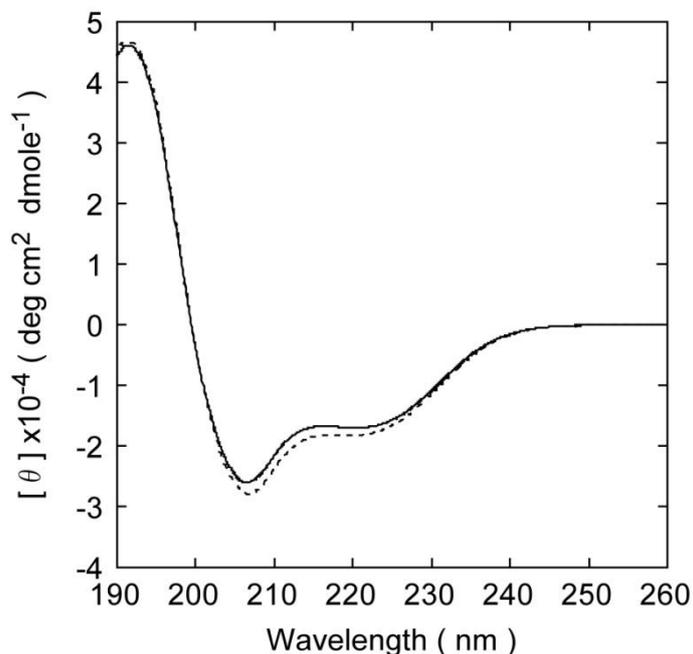


Figure 4-3. CD spectra of cobalt(II) free peptide, L14H2S (solid line), and cobalt(II) coordinated peptide (broken line) in TFE solution. The concentration of peptide was fixed at 0.25 mM, and the molar ratio of Co(II) to imidazole group of the peptide was 0.25.

3-2-3-2 節で述べた分散型の α -ヘリックス、 β -シート、ランダムコイル構造に基づく基準スペクトルを用い、Figure 4-3 における CD スペクトルをカーブフィティングした。その結果、金属添加前、ペプチド L14H2S の各二次構造含有率は、 α -ヘリックス：54%、 β -シート：0%、ランダムコイル：46%と得られた。Co(II)添加後では、CD スペクトルの負の極大値が増加し、Co(II)添加により α -ヘリックス構造の安定化が認められた。二次構造含有率を算出して見ると、Co(II)添加後、ペプチドのヘリックス含有率が 60%となり、Co(II)未添加時より 10%程向上した。これは金属とヒスチジン残基が有する側鎖イミダゾール基との錯形成により、 α -ヘリックスバンドルの形成が促進され、 α -ヘリックス構造が安定化されたものと思われる。

4-3-3 自己組織化ペプチドナノアレーの二次構造及び分子配向

本章では、より配向性が高い自己組織化単分子膜を得ることを目的として、基板上で自己組織化単分子膜を形成する際、同時に基板垂直方向に電場を印加し (Scheme 4-3)、金蒸着ガラス基板上に金属配位ペプチドナノアレーを構築した (EF-SAM 法)。ペプチド溶液と接する金表面が負極となる様に電場を印加したペプチドナノアレーを EFneg-L14H2Co SAM とし、ペプチド溶液と接する金表面が正極となる様に電場を印加したペプチドナノアレーを EFpos-L14H2Co SAM とした。比較のため、電場未印加時に、従来の SAM 法により Co(II) 配位 L14H2S ナノアレー (L14H2Co SAM) を調製した。

金蒸着ガラス基板上に上記二種の方法で調製したペプチドナノアレーの二次構造及び分子配向を検討するために、FTIR-RAS 測定を行った。EF-SAM 法で調製した EFneg-L14H2Co SAM 及び EFpos-L14H2Co SAM の FTIR-RAS はそれぞれ Figure 4-4a と Figure 4-4b に示し、電場未印加時に SAM 法で調製した L14H2Co SAM の FTIR-RAS は Figure 4-4c に示した。

高感度赤外反射吸収 (FTIR-RAS) 法より、前章 3-2-3-3 節で述べた手法を用い、アミド I 領域を各二次構造に帰属されるスペクトルに波形分離し、各スペクトルの面積比より各二次構造含有率を求めた。各スペクトルから α -ヘリックス構造に帰属されるアミド I の強度とアミド II の強度の比から、 α -ヘリックスの基板垂直法線からの傾斜角を算出し、基板上でのペプチドナノアレーの分子配向を FTIR-RAS を用い評価した^{51,52}。分子配向の結果を二次構造の結果と合わせて、Table 4-1 にまとめた。

Table 4-1. Summary of conformation and molecular orientation for the peptide monolayers.

	Conformation (%)			Tilt angle (deg)
	α -helix	β -sheet	Random coil	
EFneg-L14H2Co SAM	79	20	1	36
EFpos-L14H2Co SAM	49	38	13	—
L14H2Co SAM	64	17	19	47

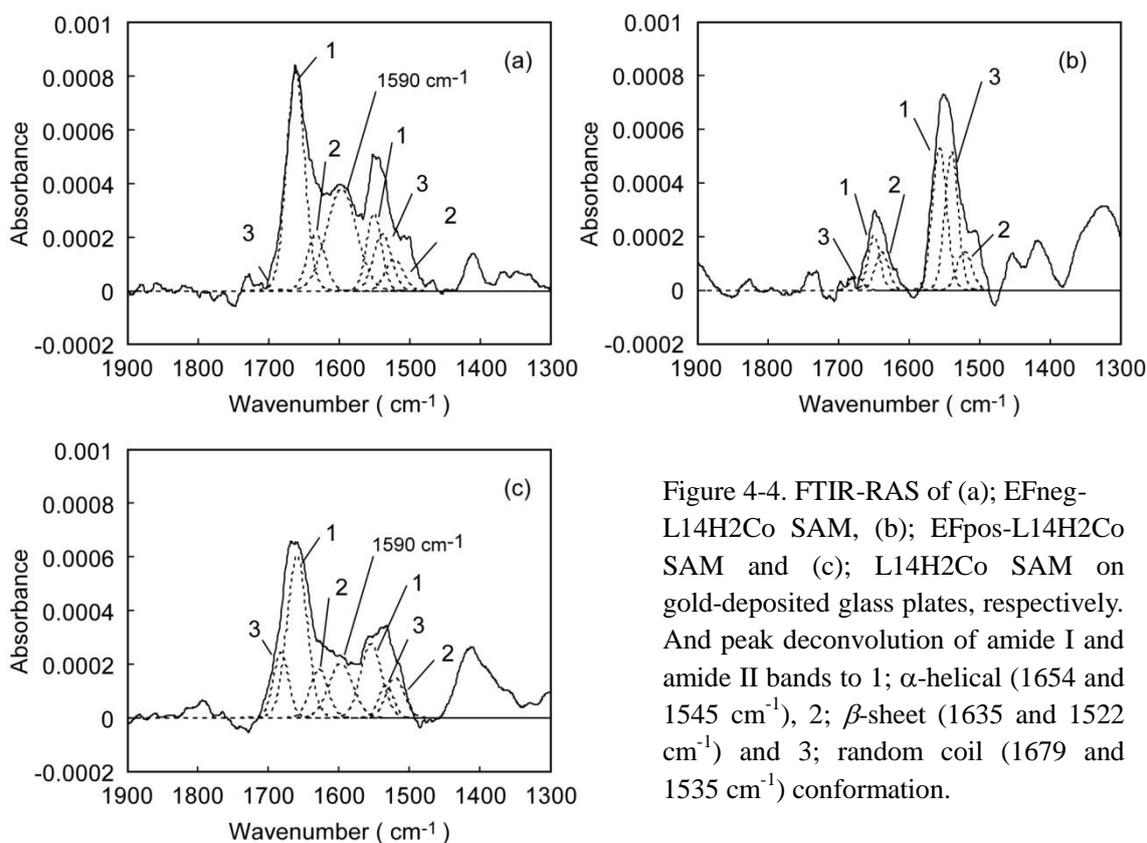


Figure 4-4. FTIR-RAS of (a); EFneg-L14H2Co SAM, (b); EFpos-L14H2Co SAM and (c); L14H2Co SAM on gold-deposited glass plates, respectively. And peak deconvolution of amide I and amide II bands to 1; α -helical (1654 and 1545 cm^{-1}), 2; β -sheet (1635 and 1522 cm^{-1}) and 3; random coil (1679 and 1535 cm^{-1}) conformation.

電場配向時に、負極上で形成した金属配位ペプチドナノアレー、EFneg-L14H2Co SAM, (79%) は従来の SAM 法で形成した L14H2Co SAM (64%) より高い α -ヘリックスの含有率を示した。また、EFneg-L14H2Co SAM における α -ヘリックスの基板垂直法線からの傾斜角, 36 deg, は従来の SAM 法で形成した L14H2Co SAM の 47 deg に比べ減少した。この結果は、電場印加により負極上で調製した Co(II)配位ペプチドナノアレーは電位未配位 SAM に比べ、 α -ヘリックス構造が安定化され、 α -ヘリックスペプチド分子が基板上により垂直に配向したことが分かる。一方、金蒸着ガラス基板が正極となる様に電場を印加し、調製した EFpos-L14H2Co SAM においては、ペプチド分子の α -ヘリックス含有率は 49%まで減少し、 β -シート (38%) やランダムコイル (13%) 構造が混在した。

電場配向による金蒸着ガラス基板上におけるペプチドナノアレーの形成機構は以下の様に説明できる。

ペプチドの α -ヘリックス構造は分子内水素結合により形成されており、分子軸に沿って大きなマクロダイポールモーメント (3.5 D/residue) を有している。電場下では、その電場に沿って α -ヘリックス分子が配向することが知られている⁴⁸⁾。まず、電場下で、金蒸着ガラス基板表面にペプチド SAM を構築する場合を考えて見る。基板が負極となる様に電場を印加し、構築した EFneg-L14H2Co SAM では、ペプチド L14H2S は N-末端に導入したリポ酸を介し、チオールと金との結合より金基板表面に固定化される。基板が負極であるた

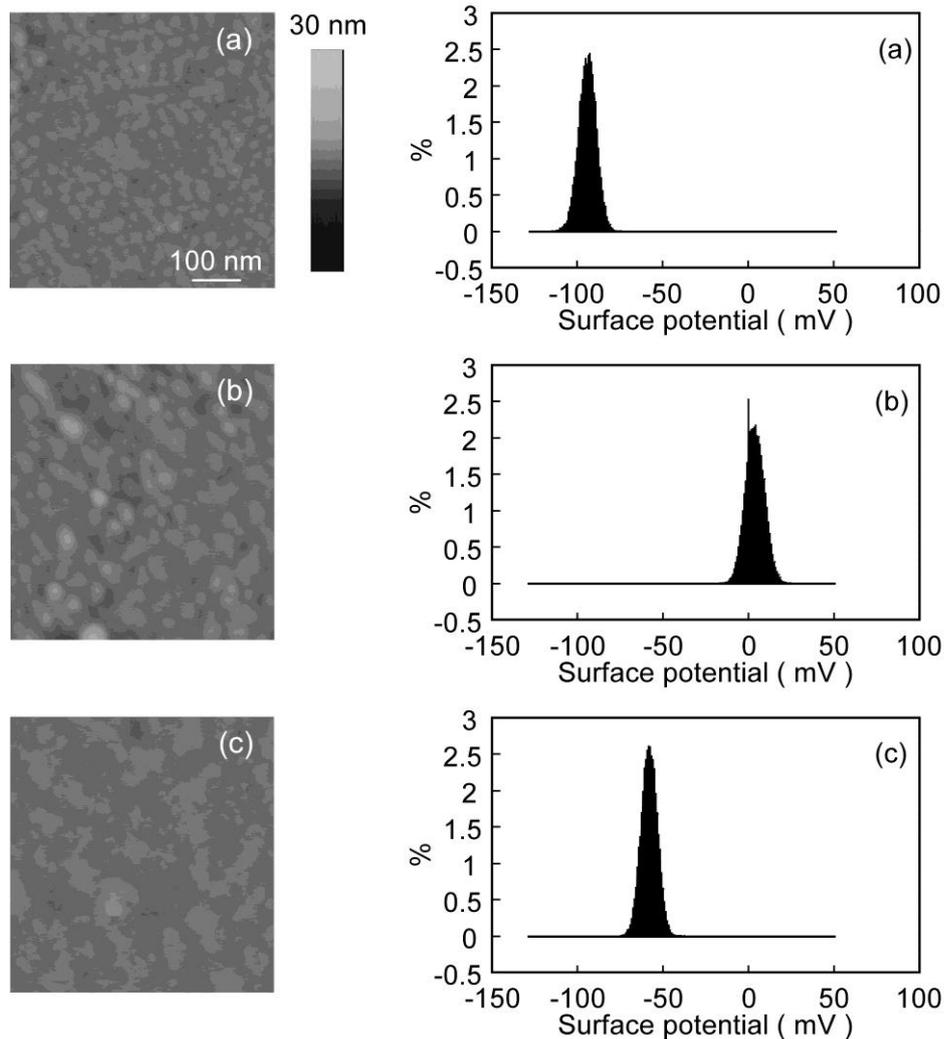


Figure 4-5. TMAFM images (500 x 500 nm) for (a); EFneg-L14H2Co SAM, (b); EFpos-L14H2Co SAM and (c); L14H2Co SAM, respectively. The scanning speed was at a line frequency of 1 Hz.

Figure 4-6. The distributions of surface potentials for (a); EFneg-L14H2Co SAM, (b); EFpos-L14H2Co SAM and (c); L14H2Co SAM, respectively.

Table 4-2. Surface potentials for the peptide nano-arrays prepared by SAM method with or without the electric field applied.

	EFneg-L14H2Co SAM	EFpos-L14H2Co SAM	L14H2Co SAM
Surface potential (mV)	-94.2±14.6	+3.4±14.8	-53.6±12.0

め、従来の SAM 法（電場が存在しない）に比べ、負極である基板と正電位を持つペプチド N-末端との静電相互作用によって、ペプチド分子がより効率的に基板に固定し、ペプチドがより垂直、かつ一方向に配向したと考えた。一方、正電位を印加した金蒸着ガラス基板上形成される EFpos-L14H2Co SAM では、リポ酸を有するペプチドの N-末端が基板に S-Au 結合により固定すると同時に、負電位を持つペプチド C-末端も正極である金基板との静電相互作用によって基板に接近する。このため、EFpos-L14H2Co SAM 中のペプチド分子はひずみが生じ、 α -ヘリックス含有率が減少したと考えられる。

また、基板に負電位を印加し、電場下での自己組織法で調製した Co(II)配位ペプチドナノアレー、EFneg-L14H2Co SAM (Figure 4-4a), 及び従来の SAM 法（電場が存在しない）で調製した L14H2Co SAM (Figure 4-4c) においては、 1590 cm^{-1} 付近に Co(II)錯体の対イオンである CH_3COO^- カルボキシル基の伸縮振動に由来する大きな吸収が観察された。この結果は、ペプチド側鎖のイミダゾール基と Co(II)との錯体における対イオンの CH_3COO^- が基板法線に対し垂直に配向していることを示唆した。即ち、Co(II)と四つのイミダゾール基で形成される平面四配位面が基板に対し平行していることを示した。更に、この 1590 cm^{-1} における吸光度は従来の SAM 法で調製した L14H2Co SAM より、EF-SAM 法で負極に形成した EFneg-L14H2Co SAM が大きな値を示した。EFneg-L14H2Co SAM において、垂直に配向したペプチド鎖中 N-末端（基板表面）から等距離に存在したイミダゾール基（7 残基目と 14 残基目）と Co(II)が効果的に錯体を形成し、対イオンの CH_3COO^- が基板法線に対し、より垂直に配向したと考えられる。即ち、EFneg-L14H2Co SAM における錯形成は、より安定な垂直配向した分子配列を形成することが示唆される。一方、電場下正極基板上に調製した EFpos-L14H2Co SAM では、 1590 cm^{-1} 付近に吸収が観察されなかった。この結果は、ペプチド分子の配向がランダムであると共に、Co(II)との錯形成が阻害されたためと考えられる。

従来の SAM 法及び EF-SAM 法による調製したペプチドナノアレーの分子配向を確認するために、表面電位顕微鏡 (SPoM) 観察を行った。メインスキャンではペプチドナノアレーの表面形状をタッピングモードで観察した (Figure 4-5)。EF-SAM 法により負極、正極基板上に調製した EFneg-L14H2Co SAM (Figure 4-5a)、EFpos-L14H2Co SAM (Figure 4-5b)、及び従来の SAM 法で調製した L14H2Co SAM (Figure 4-5c) の表面が均一であることが確認できた。ペプチドの自己組織化単分子膜が金蒸着ガラス基板上によくパッキングされていることを示唆した。

次に、プローブをサンプル表面より 20 nm リフトさせ、インターリーブスキャンを行い、ペプチドナノアレーの表面電位を得た。その表面電位分布を Figure 4-6 に示し、Table 4-2 にまとめた。電場配向による負極上で調製した EFneg-L14H2Co SAM は最も大きな負の平均表面電位を示した。一方、正極上で調製した EFpos-L14H2Co SAM の表面電位はほぼゼロであった。EFneg-L14H2Co SAM における大きな負の表面電位はペプチドナノアレー中ペプチド分子の分子配向によるものだと考えられる。EFneg-L14H2Co SAM では、ペプチド

ド L14H2S が N-末端に導入したリポ酸を介し負の電位を印加した金基板表面に固定化されている。これは、正電位を持つペプチドの N-末端と負電位を印加した基板との静電相互作用によってペプチドの N-末端が選択的に基板表面に固定化されることで、負の電位を持つペプチド C-末端がペプチドナノアレー表面に存在するためと推定できる。結果として、負電位を印加した基板表面でペプチド分子のマクロダイポールが一軸に配向した配向膜が形成された。一方、従来の SAM 法で調製した L14H2Co SAM では、 α -ヘリックスペプチドのマクロダイポール間の相互作用によって、部分的にマクロダイポールモーメントが逆平行に配向する場合が混存する。ペプチド C-末端のカルボキシル基の表面密度が逆平行の配向構造の形成により減少し、負の平均表面電位の絶対値が減少した。また、電場存在下、正極上に調製した EFpos-L14H2Co SAM は、種々の二次構造を含む。二次構造が不均一である (α -ヘリックス : 49%、 β -シート : 38%、ランダムコイル : 13%) ことに加え、その分子配向がランダムであることから (恐らく基板表面に横たわって存在している)、ほぼ中性の平均表面電位を示したと考えられる。

以上の結果より、電場配向自己組織化単分子法を用いることで、負電位を印加した基板表面で調製したナノアレー中のペプチド分子が固体基板表面に垂直に固定化でき、ペプチドのマクロダイポールが一方向に配向した高配向性ペプチドナノアレーを形成したことが分かる。

4-3-4 電場配向で調製したペプチドナノアレーの電気化学特性

走査トンネル顕微鏡 (STM) を用いペプチドナノアレーの表面形状観察した。STM 測定では、従来及び電場配向自己組織化単分子膜法で調製したペプチドナノアレーはフラットな

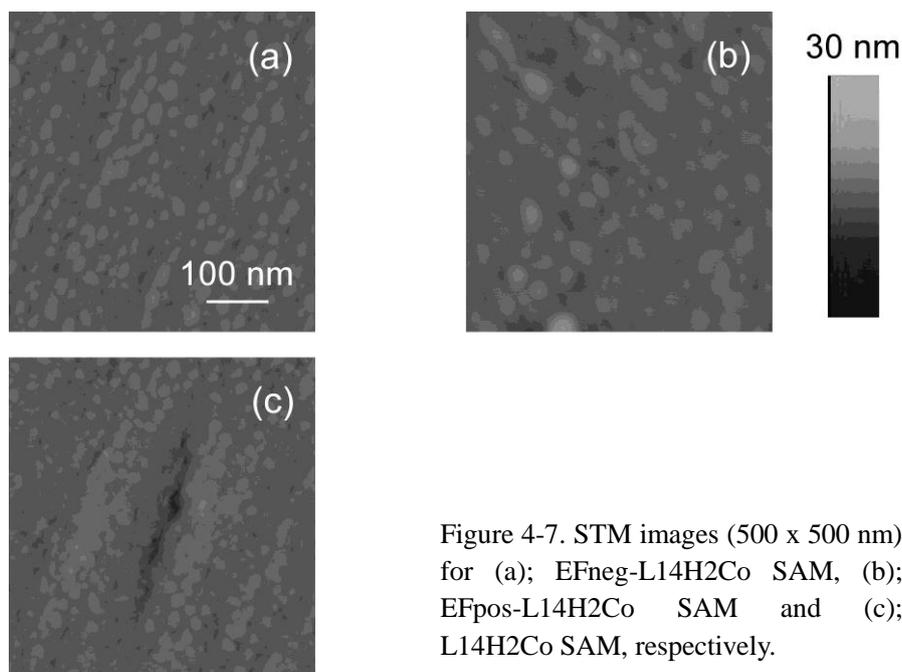


Figure 4-7. STM images (500 x 500 nm) for (a); EFneg-L14H2Co SAM, (b); EFpos-L14H2Co SAM and (c); L14H2Co SAM, respectively.

表面を示し (Figure 4-7)、ペプチド分子は金蒸着ガラス基板上に均一にパッキングしたことが分かった。この結果は TMAFM 観察の結果 (Figure 4-5) を裏付けた。

その後、STM 測定に基づき、探針をイメージ中心に固定し、走査トンネル分光法 (STS) を用い空気中におけるペプチドナノアレーの電気化学特性を評価した。印加バイアスは $-0.5 \sim +0.5 \text{ V}$ でスキャンした。

本章で用いた二種の手法 (SAM 法及び EF-SAM 法) で調製した金属配位ペプチドナノアレーの STS 曲線を Figure 4-8 に示した (EFneg-L14H2Co SAM: solid line in Figure 4-8a、L14H2Co SAM : broken line in Figure 4-8a と EFpos-L14H2Co SAM : Figure 4-8b)。電場未印加時に SAM 法で調製した金属配位ペプチドナノアレー L14H2Co SAM では、基板上に正、負何れの電位を印加した場合にも、電流応答が観察され、その応答は基板に負電位を印加した時より、正電位を印加した際の応答電流が若干大きかった。一方、電場配向法で調製した負極基板に形成したペプチドナノアレー、EFneg-L14H2Co SAM, においては、非対称的な I - V 挙動が観察できた。即ち、EFneg-L14H2Co SAM に正電位を印加した時のみ顕著な電流応答が観察され、その値は正電位印加時の L14H2Co SAM の電流応答に比べ、大きなものであった。加え、EF-SAM 法より正極上に調製した EFpos-L14H2Co SAM における電流応答はほぼ左右対称で、L14H2Co SAM 及び EFneg-L14H2Co SAM に比べ、非常に小さかった。

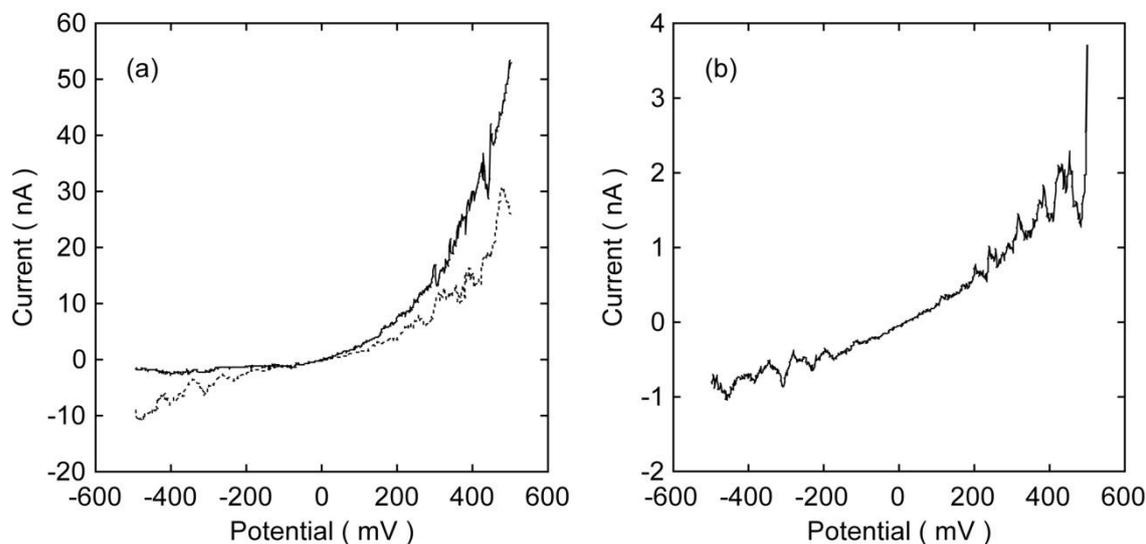
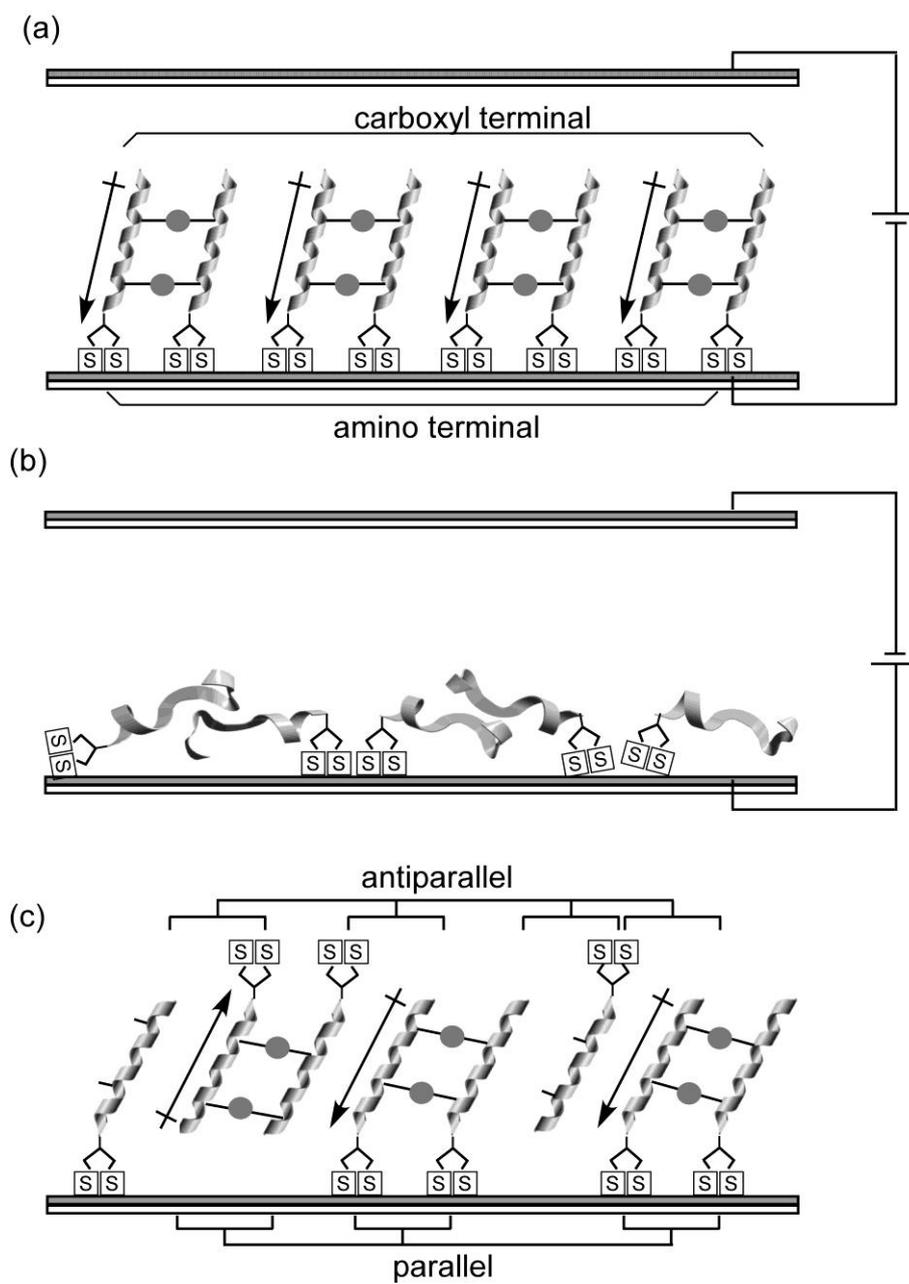


Figure 4-8. Current (I)-voltage (V) curves for (a); EFneg-L14H2Co SAM (solid line) and L14H2Co SAM (broken line), and (b); EFpos-L14H2Co SAM. The I - V curves were obtained by the STS measurements.

上記応答性の違いは、以下のように説明できる。その電子移動メカニズムを Scheme 4-4 に模式的に示した。



Scheme 4-4. The schematic pictures of electron flow through the α -helical self-assembled peptide monolayers (a); EFneg-L14H2Co SAM, (b); EFpos-L14H2Co SAM and (c); L14H2Co SAM, respectively. The arrow lines showed the direction of macro-dipole moment.

ペプチド L14H2Co は N-末端に導入したリボ酸を介し、金蒸着ガラス基板上に固定化される。EFneg-L14H2Co SAM では、負の電位が印加された基板表面とペプチド N-末端との静電吸着及びペプチド C-末端との静電反発より、ヘリックス分子がその N-末端を基板に向け、基板上に垂直に固定化された。即ち、ペプチドのマクロダイポールモーメントが一方向に垂直配向し、その C-末端がペプチドナノアレー表面に位置した配向膜を形成した (Scheme 4-4a)。この一軸に垂直配向したヘリックスのマクロダイポールモーメントによりペプチドナノアレーは正電位を印加した時のみ、電流応答が観察でき、非線形的な *I-V* 挙動を示した。言い換えると、EFneg-L14H2Co SAM での電子移動は平行に配向した α -ヘリックスペプチドを介し、ナノアレー表面から金基板表面へに起こった。一方、従来の SAM 法で調製した L14H2Co SAM では、EFneg-L14H2Co SAM と同様にペプチドが平行に配向したものの、 α -ヘリックスペプチドのマクロダイポールモーメント間相互作用によって逆平行に配向することも考えられる。このことは、表面電位の負の値が EFneg-L14H2Co SAM に比べ低い値であることから分かる。ペプチドナノアレー中では、平行及び逆平行に配向する α -ヘリックス分子が混在するため、負電位を印加する際にも、逆方向の金基板表面から膜表面への電子移動が起こったと考えられる (Scheme 4-4c)。また、この逆向きのヘリックスペプチドの配向により、EFneg-L14H2Co SAM で見られた正電位印加時の電流応答、即ち、膜表面から金基板表面への電子移動が、従来の SAM 法で調製した L14H2Co SAM において、減少したものであると思われる。一方、電場配向時に正極基板上に調製した EFpos-L14H2Co SAM では、ペプチド分子が特定の二次構造及び配向を有していないことから、基板上では単に電子移動の抵抗として働き、小さな電流応答しか示さなかったものと思われる。

以上の結果より、電場配向時に負極上で調製した、一方向に垂直配向した α -ヘリックスバンドル集合体は効率的な電子移動媒体であることが分かった。本研究の目的である非線形的な電子移動は、ペプチドが基板上に自己集合時、適切な電圧を印加することによって調製した金属配位ペプチドナノアレーを用いることで実現できる可能性が示唆された。

4-4 結言

本章では、高配向金属配位ペプチドナノアレーを構築することを目的に、電場配向によるペプチドの自己組織化を用い、金蒸着ガラス基板上に金属配位ペプチドナノアレーを調製した。ペプチドのアミノ酸シーケンスには、ロイシンと金属配位子として機能するイミダゾール基を有するヒスチジンの周期配列を有する Leu₆HisLeu₆HisLeu₂を用いた。イミダゾール基は Co(II)の指示薬として用いられており、強い錯形成能が期待できる。金蒸着ガラス基板表面への固定化のため、同ペプチドの N-末端にリボ酸を導入した。電場印加方向を変え、それぞれ正極及び負極となる金表面上に金属配位ペプチドナノアレーを調製した。また、電場未印加時も同ペプチドナノアレーを従来の自己組織単分子膜法より調製した。得られた自己組織化単分子膜の構造と電気化学特性を比較・検討をした。

上記手法で得られた金属配位ペプチドナノアレー中のペプチド分子の二次構造及びヘリックス軸の垂直法線からの傾斜角を高感度赤外分光 (FTIR-RAS) 測定より評価した。従来の自己組織化単分子膜法、電場印加時に負極上で形成した金属配位ペプチドナノアレーにおいては、ペプチドが主に α -ヘリックス構造を取った。ヘリックス含有率が基板に負電位を印加することによって増加し、ヘリックスが基板により垂直に配向したことが判った。一方、電場印加時に正極上で形成したナノアレーは特定の二次構造を形成せず、その配向もランダムなものであった。

また、金属配位ペプチドナノアレー中、 α -ヘリックスペプチドの分子配向を表面電位顕微鏡 (SPoM) を用いて評価したところ、負極金表面に構築した金属配位ペプチドナノアレーは最も大きな負の平均表面電位を示し、 α -ヘリックスのマクロダイポールが一方向に配向したことが明らかとなった。

空気中における金属配位ペプチドナノアレーの電気化学特性を走査トンネル分光法 (STS) より評価した。従来の自己組織化単分子膜法で構築した金属配位ペプチドナノアレーが正、負何れの電位を印加した場合においても、電流の応答が観察できたことに対し、電場印加時に負極基板表面に構築した金属配位ペプチドナノアレーが正電位を印加する場合のみ顕著な電流応答が認められ、電子移動が一方向に配向したペプチドのマクロダイポールモーメントに沿って非線形的に起こり、上記手法で調製した金属配位ペプチドナノアレーにおいて、電子移動の整流作用の発現が確認できた。

以上の結果より、ペプチドの自己組織化による金属配位ペプチドナノアレーを調製する際、適切な電圧を印加することによって、ペプチドのマクロダイポールモーメントが一方向に配向し、非線形的な膜を介する電子移動が生ずることがわかった。本章で論じた電場配向によるペプチドの自己組織化が、前章の逐次重合法と共に、一方向への電子移動を達成するために有用な手法であると考えられる。

REFERENCES

- 1) Ulijn, R. V.; Smith, A. M. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 664-675.
- 2) Lehn, J. M. *Science* **1985**, 227, 849-856.
- 3) Lehn, J. M. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 89-112.
- 4) Lehn, J. M. *Science* **1993**, 260, 1762-1763.
- 5) Philip, D.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1154-1196.
- 6) Lehn, J. M. *Science* **1993**, 260, 1762-1763.
- 7) Lehn, J. M. *Science* **2002**, 295, 2400-2403.
- 8) Whitesides, G. M.; Grzybowski, B. *Science* **2002**, 295, 2418-2421.
- 9) Nuraje, N.; Banerjee, I. A.; MacCuspie, R. I.; Yu, L.; Matsui, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**,

126, 8088-8089.

- 10) Whitesides, G. M.; Xia, Y. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 550-575.
- 11) Gatto, E; Porchetta, A.; Scarselli, M; Crescenzi, M. De; Formaggio, F.; Toniolo, C.; Venanzi, M. *Langmuir* **2012**, *28*, 2817-2826.
- 12) Cavalli, S.; Albericio, F.; Kros, A. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 241-263.
- 13) Gazit, E. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1263-1269.
- 14) Whitesides, G. M.; Mathias, J. P.; Seto, C. T. *Science* **1991**, *254*, 1312-1319.
- 15) Zhang, S. *Nat. Biotechnol* **2003**, *21*, 1171-1178.
- 16) Lazzari, M.; Rodriguea-Abreu, C.; Rivas, H.; Lopez-Quintela, A. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6*, 892-905.
- 17) Zhao, X.; Zhang, S. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 1105-1110.
- 18) Zhang, S. *Biotechnol. Adv.* **2002**, *20*, 321-339.
- 19) Zhang, S.; Zhao, X. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2082-2086.
- 20) Zhao, X.; Zhang, S. *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 470-476.
- 21) Yu, Y. C.; Pakalns, T.; Dori, Y.; McCarthy, J. B.; Tirrell, M.; Fields, G. B. *Methods Enzymol* **1997**, *289*, 571-582.
- 22) Fields, G. B. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 75-81.
- 23) Whitesides, G. M.; Grzybowski, B. *Science* **2002**, *295*, 2418-2421.
- 24) Nuzzo, R. G.; Allara, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4481-4483.
- 25) Dubois, L. H.; Nuzzo, R. G. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1992**, *43*, 437-463.
- 26) Porter, M. D.; Bright, T. B.; Allara, D. L.; Chidsey, C. E. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3559-3568.
- 27) Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103-1169.
- 28) Ulman, A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533-1554.
- 29) Fujita, K.; Bunjes, N.; Nakajima, K.; Hara, M.; Sasabe, H.; Knoll, W. *Langmuir* **1998**, *14*, 6167-6172.
- 30) Miura, Y.; Kimura, S.; Imanishi, Y.; Umemura, J. *Langmuir* **1998**, *14*, 6935-6940.
- 31) Niwa, M.; Murata, T.; Kitamatsu, M.; Matumoto, T.; Higashi, N. *J. Mater. Chem.* **1999**, *9*, 343-344.
- 32) Miura, Y.; Kimura, S.; Imanishi, Y.; Umemura, J. *Langmuir* **1999**, *15*, 1155-1160.
- 33) Yanagisawa, K.; Morita, T.; Kimura, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12780-12781.
- 34) Higashi, N.; Kawahara, J.; Niwa, M. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *288*, 83-87.
- 35) Wada, A. *Adv. Biophys.* **1976**, *9*, 1-63.
- 36) Hol, W. G. J.; van Duijnen, P. T.; Berendsen, H. J. C. *Nature* **1978**, *273*, 443-446.
- 37) Hol, W. G. H. *Prog. Biophys. Molec. Biol* **1985**, *45*, 149-195.

- 38) Deisenhofer, J.; Epp, O.; Miki, K.; Huber, R.; Michel, H. *Nature* **1985**, *318*, 618-624.
- 39) Babcock, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10893-10895.
- 40) Lodish, H.; Baltimore, D.; Berk, A.; Zipursky, S. L.; Matsudaira, P.; Darnell, J. *Molecular Cell*, 3rd ed.; Scientific American Books: New York, 1998; p. 782-783.
- 41) Heleg-Shabtai, V.; Gabriel, T.; Willner, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3220-3221.
- 42) Heller, A. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 3579-3587.
- 43) Willner, I.; Lion-Dagan, M.; Marx-Tibbon, S.; Katz, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6581-6592.
- 44) Morita, T.; Kimura, S.; Kobayashi, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 2850-2859.
- 45) Olszowka, V.; Kuntermann, V.; Boker, A. *Macromolecules* **2008**, *41*, 5515-5518.
- 46) Bordel, D.; Putaux, J.; Heux, L. *Langmuir* **2006**, *22*, 4899-4901.
- 47) Hu, Z.; Fischbein, M. D.; Querner, C.; Drndic, M. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 2585-2591.
- 48) Wang, S.; Zhao, L.; Zhang, X.; Shi, Z.; Cui, Z.; Yang, Y. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *336*, 470-476.
- 49) Worley, C. G.; Linton, R. W.; Samulski, E. T. *Langmuir* **1995**, *11*, 3805-3810.
- 50) Can, W. C.; White, P. D. *Fmoc Solid Synthesis: A Protocol Approach*, Oxford University Press. 2000.
- 51) Greenfield, N.; Fasman, G. D. *Biochemistry* **1969**, *8*, 4108-4116.
- 52) Tsuboi, M. *J. Polym. Sci.* **1962**, *59*, 139-153.
- 53) Enriquez, E. P.; Samulski, E. T. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* **1992**, *255*, 423-434.
- 54) Schmutz, P.; Frankel, G. S. *J. Electrochem. Soc.* **1998**, *145*, 2285-2295.
- 55) Schmutz, P.; Frankel, G. S. *J. Electrochem. Soc.* **1998**, *145*, 2295-2306.
- 56) Hamers, R. J. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1989**, *40*, 531-539.

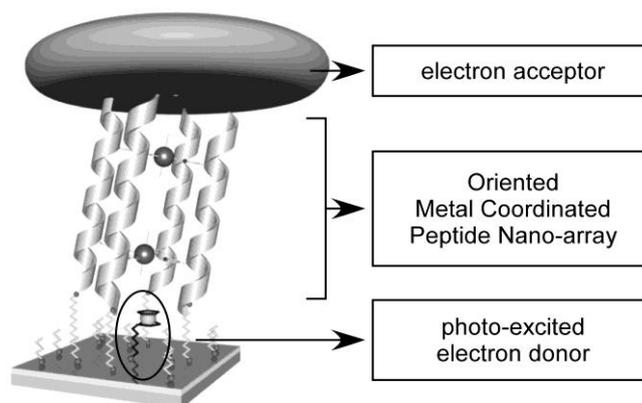
第5章 高配向性金属配位ペプチドナノアレーを用いた新規光反応場への応用

5-1 緒言

生体における物質の生成やエネルギー変換は極めて複雑で、しかも巧妙なプロセスによって、温和の条件（地球上）下で、効率的かつ選択的に行われている。これは、生物が生きるために進化しつつ、辿った高度に最適化されたものである。生体及びそこで行われる反応は非常に効率的なものであるため、生体中における優れた機能を模倣し、工学的に応用することを考え、「バイオミメティック・ケミストリ（生体模倣化学）」が提案された¹⁻⁴⁾。広義的な「バイオミメティック」とは、生体物質・系が有する各種機能（特異的な分子認識、物質やエネルギーの輸送・伝達、選択的な物質変換など）の模倣を示すものであるが⁵⁻¹⁶⁾、本章では、効率的な物質変換を注目した。

生体中における物質変換は、様々な生命活動を維持する上で、非常に重要なプロセスである。例えば、植物の光合成では、光反応中心において、光のエネルギーを利用して NADP^+ を還元し、 NADPH と ATP が合成され、 NADPH が CO_2 を還元し、糖を生成される¹⁷⁾。 NADPH の生成は分子膜を通した一方向への効率的な電子移動に大きく関与し、それは膜に垂直配向した α -ヘリックスセグメントにおけるペプチド鎖中の官能基が特定の空間配置をとることによるものである^{18,19)}。 α -ヘリックスペプチドは、その分子軸に沿った大きなマクロダイポールモーメント²⁰⁻²²⁾より、非線形電子伝達材料として関心が集まっている²³⁻²⁷⁾。 α -ヘリックスペプチドのマクロダイポールに沿った電子移動は、溶液系²⁸⁾及び基板表面上²⁹⁾において報告されている。特に、 α -ヘリックスの垂直配向膜は、ナノデバイスとして様々な手法より構築されたものの、いくつかの問題点が指摘された³⁰⁻⁴¹⁾。本研究では、生体中における一方向への効率的な電子移動の模倣を目的に、基板上に高い一軸・垂直配向性を有する金属配位ペプチドナノアレーを、第3章においては逐次重合法で、また、第4章においては電場配向自己組織化単

分子膜法を用い調製した。上記金属配位ペプチドナノアレーでは、一軸・垂直配向したペプチドマクロダイポールモーメントとアレー中の金属錯体との共役により、膜を介する効果的な電子の整流作用が確認できた。本章では、同金属配位ペプチドナノアレーを用いた光反応場を構築し、ナノデバイスへの応用について述べる。



Scheme 5-1. The model of a novel nano-reactor.

我々は、光反応場として、Scheme 5-1 に示したモデルを提案した。光誘起電子供与体を有する金蒸着ガラス基板上に金属配位ペプチドナノアレーを調製し、更に酸化還元能を有するレドックス蛋白質をアレー表面に固定化する。得られた複合体においては、光照射に基づく光誘起電子が高配向性金属配位ペプチドナノアレーの整流作用を利用し、ナノアレーを介する一方向、即ち、基板表面からレドックス蛋白質へと効率的に移動し、アレー表面のレドックス蛋白質の活性制御が実現できると考えた。光電変換能を有する金属配位ペプチドナノアレーは、第 3 章で述べた逐次重合法により構築し、二次構造及びその電気化学特性を評価した上で、表面にレドックス蛋白質である還元酵素を固定化し、基質存在下、上記系における光照射に伴う物質変換能を評価した。

5-2 実験

5-2-1 試料

5-2-1-1 金属配位能を有するペプチド

本章では、電子伝達器として機能するペプチドナノアレーは逐次重合法により調製を行う。ペプチドのアミノ酸シーケンスには、第 3 章で述べた金属配位子としてピリジル基を側鎖に有する $\text{Leu}_6\text{Ala}(4\text{-Pyri})\text{Leu}_6\text{Ala}(4\text{-Pyri})\text{Leu}_2$ を用いた。

5-2-1-2 配位金属

本章においては、一方向への効率的な電子移動を達成するために、アレー中のペプチド分子に安定な α -ヘリックス構造と高い分子配向性を持たせるため、 α -ヘリックス間での金属配位によるバンドル形成を行う。配位金属として、第 3 章で論じた錯形成時、ペプチド $\text{Leu}_6\text{Ala}(4\text{-Pyri})\text{Leu}_6\text{Ala}(4\text{-Pyri})\text{Leu}_2$ と錯形成し、安定な平面四配位構造を取る二価のコバルト（酢酸コバルト（II））を用いた。

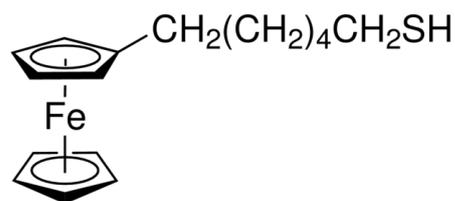
5-2-1-3 電子受容体

本章で設計する光反応場では、ペプチドアレーを介して、一方向に移動する光誘起電子を利用した物質変換を目的とする。具体的に、硝酸還元酵素である **Nitrate Reductase** (cytochrome kind, E.C. 1.9.6.1, from *Escherichia coli*) (Sigma (株) 社製) を電子の受容体として用い、ペプチドナノアレー表面に固定化した。同蛋白質はレドックス蛋白質であり、中性の環境で電子を受け取り、硝酸イオン (NO_3^-) を亜硝酸イオン (NO_2^-) に還元する⁴²⁻⁴⁴⁾。

5-2-1-4 電子供与体

上記光反応場における光反応のトリガーとして働く光誘起電子供与体として、フェロセニル基を有する **1-ferrocenyl-6-hexanthiol** (DOJINDO Laboratories 社製) を用いた (Scheme 5-2)。酸化還元能を有するフェロセンの挙動は、電気化学手法による選択的物質検出におい

て、特に興味を持たれ、検出素子の実現に向け、自己組織化方法による素子構築に関する研究が多くなされている。アミド修飾したフェロセンユニットを有する自己組織化単分子膜のレドックス特性を利用したアニオンセンサーが開発され⁴⁵⁾、フェロセンウデカンチオール自己組織化単分子膜を被覆したマイクロカンチレバーが報告されている⁴⁶⁾。近年、



Scheme 5-2. The chemical structure of 1-ferrocenyl-6-hexanthiol.

「Ferrocenyl hexanethiolate」の単分子層で被覆された安定な金ナノ粒子が作製され⁴⁷⁾、フェロセン被覆粒子が白金電極上で強固に吸着し、安定に存在することが確認されている⁴⁸⁾。更に、銀基板上の自己組織化フェロセニルアルキルチオールを用い、交流電流を直流電流に変換できる分子整流器が報告された^{49,50)}。本研究では、フェロセニル基の酸化還元に基づく機能性、及び将来的に多種の基板への実用化に期待し、光誘起電子供与体として用いた。

5-2-2 ペプチドレーアの調製

本章では、逐次重合法を用い、光電変換能を有する金属配位ペプチドナノアレーを電極基板上に調製した。また、上記ペプチドナノアレー表面にレドックス蛋白質である硝酸還元酵素の固定化を行った。

5-2-2-1 逐次重合法による光電変換能を有する金属配位ペプチドナノアレーの調製

光電変換能を有するペプチドナノアレーを逐次重合法を用い調製した。

まず、金蒸着ガラス基板上に逐次重合開始点となるアミノ基及び光誘起電子供与体である ferrocenyl 基を有する混合自己組織化単分子膜の形成を行った。具体的には、重合開始点には、第 3 章と同様にアミノ基を有する 1-amino-11-undecanethiol hydrochloride (C11N) (DOJINDO Laboratories 社製) を用い、光励起電子供与体には 1-ferrocenyl-6-hexanthiol (C6Fc) (DOJINDO Laboratories 社製) を用いた。 α -ヘリックス鎖の断面積は、逐次重合開始点である C11N のアルキル鎖の断面積よりおよそ十倍大きいいため、ペプチド鎖成長時の立体障害を考え、C11N とスペーサーである短鎖アルキル鎖とのモル比は 1:9 とした (第 3 章、3-2-2-2 節参照)。また、スペーサーとして、2 本のアルキル鎖を有する n-butyl disulfide (C4) (DOJINDO Laboratories 社製) を用い、得られる混合単分子膜中の単鎖アルキル鎖の内、10%に光誘起電子供与体である ferrocenyl 基を導入することとした。即ち、C11N、C4、C6Fc のモル比は 1:4:1 とした。

C11N、C4 及び C6Fc を含む混合自己組織化単分子膜の形成を以下に従い行った。

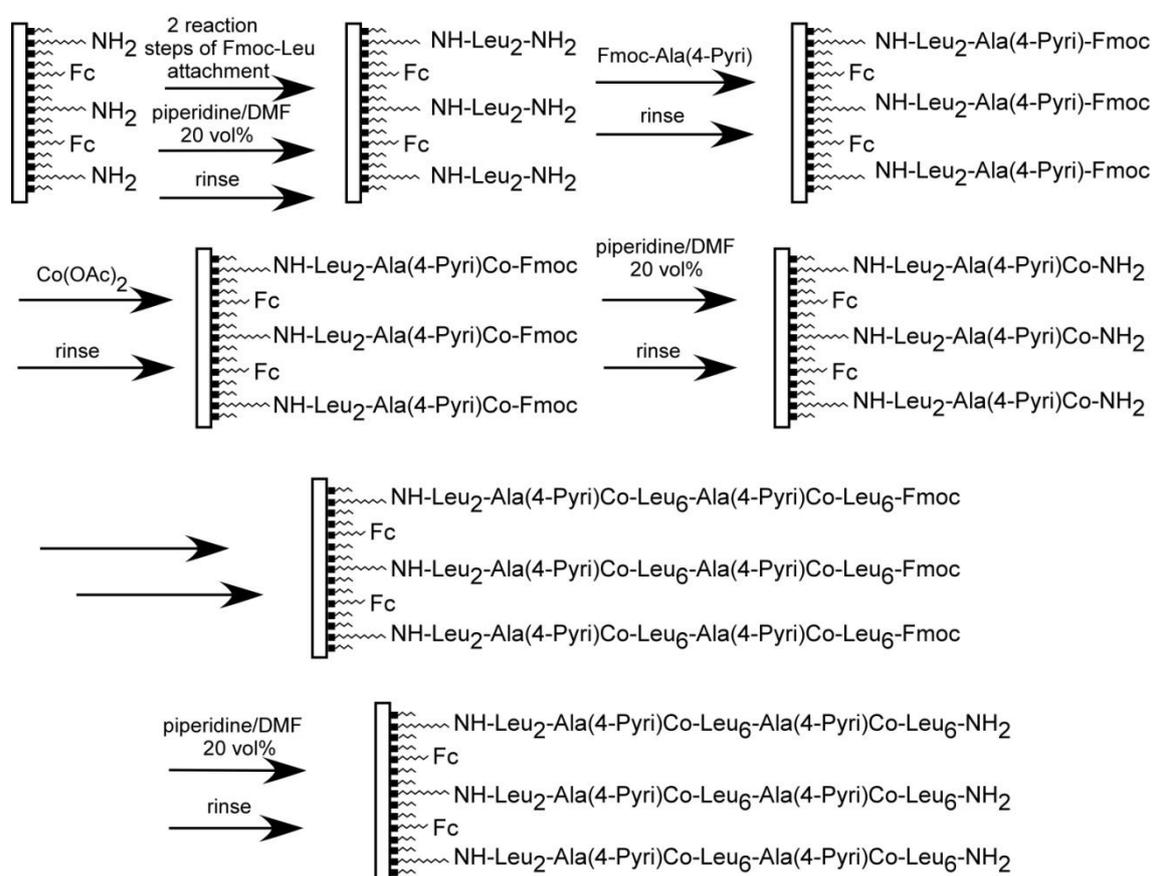
C11N、C4 及び C6Fc をモル比 1:4:1 で、チオール基の終濃度が 0.1 mM になるようにエタノール (ナカライテスク (株) 社製) に溶解させ、C11N、C4 と C6Fc の混合溶液を調製

した。UV オゾンクリーナーで洗浄した金蒸着ガラス基板を上記で調製した溶液中で 24 時間震蕩し、基板上に C11N/C4/C6Fc の混合自己組織化単分子膜を形成した。反応後、エタノールで基板を 3 回以上洗浄した。その後、基板をアンモニア水（ナカライテスク（株）社製）で pH 11 に調整した水溶液中で震蕩させ、C11N の末端アミノ基の脱プロトン化を行った。純水で洗浄し、洗浄水の pH が中性になるまで洗浄を行った。

得られた光誘起電子供与体を有する混合自己組織化単分子膜を C11N/C4/C6Fc mixed SAM とする。

次に、第 3 章 3-2-2-2 節で述べた「逐次重合法」に従い、C11N/C4/C6Fc mixed SAM 膜表面にアミノ酸の縮合反応及び金属の配位を行った (Scheme 5-3)。

得られた金属配位ペプチドナノアレーは以下 Fc-L14A2Co SP とする。



Scheme 5-3. Fabrication of the metal coordinated peptide nano-array on C11N/C4/C6Fc mixed SAM by stepwise polymerization.

5-2-2-2 ペプチドナノアレー表面へのレドックス蛋白質の固定

C11N/C4/C6Fc mixed SAM 表面上に、逐次重合法により調製した金属配位ペプチドナノ

アレー (Fc-L14A2Co SP) のアレー表面にレドックス蛋白質である硝酸還元酵素 (NR) の固定化を以下に従って行った。

0.15 M、pH 7.38 の塩化カリウム (KCl) (ナカライテスク (株) 社製) 水溶液中において、1-ethyl-3-(3-himethylamino propyl)-carbodiimide hydrochloricde (WSC) (和光純薬工業 (株) 社製) と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) (ナカライテスク (株) 社製) の存在下、硝酸還元酵素のカルボキシル基を活性化した。硝酸還元酵素の濃度を 0.005 unit/mL とした。WSC と HOBt のモル比は 1:1 で、最終濃度を 10 mM とした。Fc-L14A2Co SP を上記溶液中に浸漬し、活性化された NR 中のカルボキシル基とペプチドナノアレー表面のアミノ基との縮合反応により、ペプチドナノアレー表面に同酵素を固定した。反応は室温で 36 時間を行い、反応後、0.15 M、pH 7.38 の KCl 水溶液でよく洗浄した。

得られた金属配位ペプチドレドックス蛋白質複合体を Fc-L14A2Co SP-NR とする。

対照サンプルとして、5-2-2-1 節で調製した C11N/C4/C6Fc mixed SAM 表面にレドックス蛋白質を直接に固定した。以下 C11N/C4/C6Fc mixed SAM-NR とする。

上記アレーを脱イオン水でよく洗浄し、水中 4°C にて暗所保存した。

5-2-3 測定

5-2-3-1 高感度赤外反射スペクトル測定

金蒸着ガラス基板上に調製した光電変換能を有する金属配位ペプチドナノアレー (Fc-L14A2Co SP) の二次構造及び分子配向を高感度赤外反射スペクトル (FTIR-RAS) 測定より評価した。測定は第 3 章 3-2-3-3 節に従って行った。得られたスペクトル中のアミド I 及びアミド II 領域をそれぞれ α -ヘリックス、 β -シート、ランダムコイル構造に帰属される吸収スペクトルに波形分離を行い、アミド I 領域の波形分離後の各二次構造に帰属されるスペクトルの面積比より、各二次構造の含有率を算出した。また、基板表面における α -ヘリックスの基板垂直法線からの傾斜角は、アミド I 及びアミド II 領域の α -ヘリックス構造に帰属される分離スペクトルの面積比から求めた⁵¹⁾。

5-2-3-2 走査トンネル顕微鏡観察

逐次重合法による調製した光電変換能を有する金属配位ペプチドナノアレーの表面形状を表面走査トンネル顕微鏡 (STM) を用い観察した^{52,53)}。

5-2-3-3 空気中におけるペプチドナノアレーの電気化学特性

空気中における光電変換能を有するペプチドナノアレーの電気化学特性は走査トンネル分光法 (STS) を用いて評価した。本章における STS 測定は STM 測定に基づき、イメージ中心に探針を固定し、*I-V* 曲線を測定した⁵⁴⁾。印加バイアスは -0.5 ~ +0.5 V でスキャンした。

5-2-3-4 溶液中におけるペプチドナノアレーの電気化学測定

逐次重合により調製した金属配位ペプチドナノアレーの溶液中における電気化学特性を電流-電圧 (I - V) 測定より評価した。測定には三電極法を用い、ペプチドナノアレーを作用電極、 Ag/AgCl 電極を基準電極、 Pt ワイヤを補助電極とし、電解質には 0.1 M KCl 水溶液を用いた。作用電極面積は 0.28 cm^2 であり、測定は室温で行った。作用電極に負電位を印加する時の I - V 測定は、電解質中に電子受容体である methyl viologen hydrate ($\text{MV}^{2+} : 50 \text{ mM}$) (ナカライテスク (株) 社製) を添加した状況で行い、正電位を印加場合の I - V 曲線は電子供与体である 2-[bis(2-hydroxyethyl)amino] ethanol (TEOA : 50 mM) (ナカライテスク (株) 社製) を含む電解質中で行った。電圧の印加はファンクションジェネレーター (NIKKO KEISOKU 社製) を用い、応答電流はポテンシオスタット (NPS-2, NIKKO KEISOKU 社製) を用い、一定電位印加後の電流値を読み取った。

5-2-3-5 光照射による光電変換

光照射による、光電変換能を有する金属配位ペプチドナノアレーを介する電子移動を評価した。光照射の光源として、 500 W の Xe Lamp (SANEI Denki Co. Ltd. 社製、XEF-501s) を用い、照射は光ファイバーバンドルアレーを用いた。測定には、前節 5-2-3-4 と同様に三電極法を用いた。作用電極面積は 0.28 cm^2 であり、測定は室温にて行った。ポテンシオスタットを用い、印加電圧 0 mV の状態で、光照射の ON、OFF に伴う応答電流値を読み取った。電解質には塩化カリウム (KCl) (ナカライテスク (株) 社製) 水溶液 (0.1 M) を用いた。電解質中、電子受容体である MV^{2+} (5 mM) を添加した。

また、光電変換能を有する金属配位ペプチド-レドックス蛋白質複合体の光照射による光電変換能を上記測定によって評価した。電解質には、硝酸還元酵素の基質である硝酸カリウム (KNO_3) (ナカライテスク (株) 社製) 水溶液 (0.1 M) を用いた。

5-2-3-6 原子間力顕微鏡観察

原子間力顕微鏡 (AFM) を用い、金属配位ペプチド-レドックス蛋白質複合体 (Fc-L14A2Co SP-NR) 及び混合 SAM-レドックス蛋白質複合体 (C11N/C4/C6Fc mixed SAM-NR) に存在する表面蛋白質の形状を観察し、蛋白質の表面密度を算出した。測定は MultiMode microscope (Burker 製、Nanoscope V) を用い、大気中ダッピングモードにて行った。スキャナーには $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ のものを用い、カンチレバーにはシリコン単結晶 (NCHV-10V, 平均曲率半径 : 6.6 nm , Veeco Instruments) を用いた。上記複合体を真空中にて乾燥し、観察に用いた。

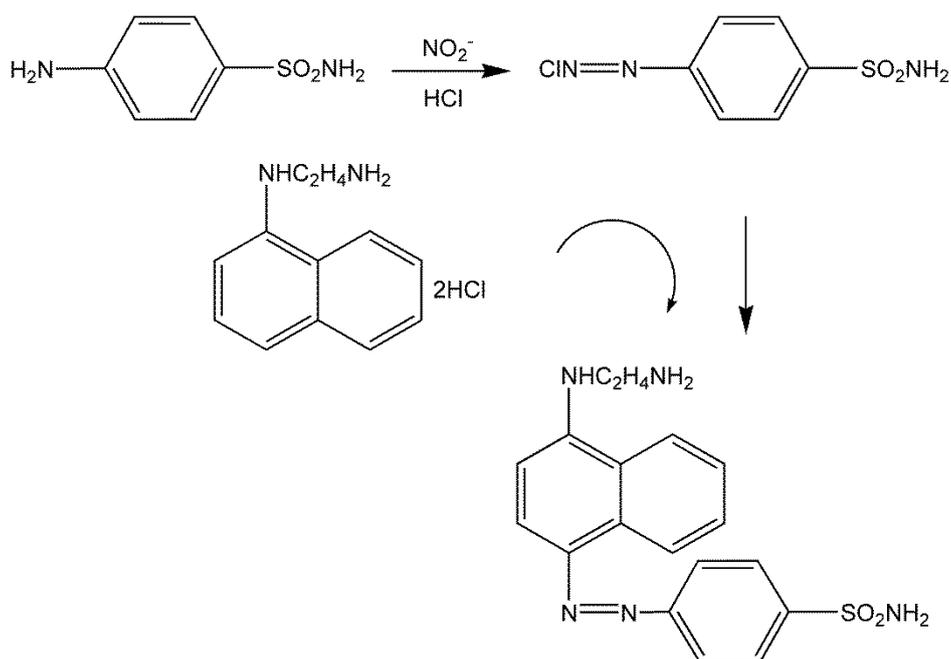
5-2-3-7 表面レドックス蛋白質の活性評価

本章では、光電変換能を有する金属配位ペプチドナノアレーを逐次重合より調製し、アレー表面にレドックス蛋白質である硝酸還元酵素を固定した。光照射に伴うアレー表面の

硝酸還元酵素の活性制御を行い、以下の方法で生成物である亜硝酸イオンの定量を行った。

5-2-3-7-1 レドックス蛋白質生成物の定量

レドックス蛋白質（硝酸還元酵素）の生成物である亜硝酸イオンの定量はナフチルエチレンジアミン法を用いて行った⁴⁴⁾ (Scheme 5-4)。この手法は、試料に sulfanilamide（ナカライテスク（株）社製）を加え、試料中の亜硝酸イオンによって、ジアゾ化し、引き続いて *N*-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride（ナカライテスク（株）社製）を加えて、赤い吸収を持つアゾ化合物を生成させ、その吸光度より、試料中に存在する亜硝酸イオンを定量するものである。具体的に、以下の手順に従って、試料を調製した。100 mg の sulfanilamide を濃 HCl（ナカライテスク（株）社製）3 mL に溶解させ、水を加え、全体積 10 mL にした（試薬 A）。また、*N*-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride の水溶液（1 mg/mL）を調製した（試薬 B）。光照射後の電解質溶液を 1 分間おきに 10 μ L を移し取った。上記試薬 A と B をそれぞれ 200 μ L を加え、反応させ、水で 2 mL まで希釈した。上記溶液を紫外可視吸収スペクトル測定により、次節 5-2-3-7-2 に述べる手法により定量した。



Scheme 5-4. The schematic picture of the quantitative analysis for the nitrite generated by NR.

5-2-3-7-2 紫外可視吸収スペクトル測定

光照射後の電解質中に存在するレドックス蛋白質生成物の定量を行うため、紫外可視吸収スペクトル (UV-vis) 測定を行った。5-2-3-7-1 節で希釈した電解質溶液を 1 cm の石英セ

ルに満たし、室温で紫外可視分光光度計（日本分光製、JASCO V550）を用い 400-700 nm 範囲で UV-vis 測定を行った。

得られる 540 nm の吸光度より、予め測定した亜硝酸イオン（亜硝酸カリウム：ナカライテスク（株）社製）により作成したアゾ化合物の濃度—吸光度の検量線より光照射で発生した亜硝酸イオン、即ち、アレー表面 NR により還元された硝酸イオンの定量を行った。

5-3 結果及び考察

5-3-1 逐次重合で調製した光応答性ペプチドナノアレーの二次構造及び分子配向

第 3 章より、逐次重合法で調製した Co(II)配位ペプチドナノアレー (L14A2Co SP) 中においては、各 α -ヘリックスペプチドがそのマクロダイポールモーメントを一方に垂直配向させ (3-3-3 節)、そのマクロダイポールモーメントに沿って電子が基板からナノアレー表面まで、一方に移動することが明らかとなった (3-3-5 節)。本節では、同ペプチドナノアレーにおける電子移動を光より制御させることを目的に、光誘起電子供与体である ferrocenyl 基を有する C6Fc を導入した基板表面に、金属配位ペプチドナノアレーを逐次重合法により構築した (Fc-L14A2Co SP)。光による上記ナノアレーにおける一方への電子移動特性の発現を検討した。加えて、光による物質変換能の発現を目的に、上記逐次重合法で調製した光電変換能を有する金属配位ペプチドナノアレー表面に、レドックス蛋白質 (NR) を固定化した複合体 (Fc-L14A2Co SP-NR) を構築した。レドックス蛋白質として、硝酸還元酵素を用いた。

初めに、C6Fc の導入が逐次重合法で調製した金属配位ペプチドナノアレーの二次構造及び分子配向へ及ぼす影響について、FTIR-RAS より評価した^{51,55,56})。Fc-L14A2Co SP の FTIR-RAS を Figure 5-1 に示した。5-2-3-1 節で述べた手法より二次構造及び基板垂直法線からの傾斜角を算出し、同じ手法で調製した C6Fc を導入していない金属配位ペプチドナノアレー (L14A2Co SP) の結果と合わせて、Table 5-1 にまとめた。Fc-L14A2Co SP において、ペプチド分子は 66%の α -ヘリックス含有率を示し、その傾斜角が 37°である。この結果は C6Fc を導入していない L14A2Co SP 中の二次構造及び傾斜角と一致し、逐次重合を行う上で、基板表面への C6Fc の導入は、基板上の金属配位ペプチドナノアレーの二次構造及び分子配向に影響を与えないことが分かる。

一方、硝酸還元酵素を修飾したペプチド—レドックス蛋白質複合体 (Fc-L14A2Co SP-NR) 中のペプチド分子の二次構造及び分子配向については、ペプチドのアミド I、アミド II 領域のスペクトル中に硝酸還元酵素に存在するアミド基に由来する吸収が混在し、FTIR スペクトルの波形分離によってペプチド分子の二次構造や傾斜角を評価することが困難であるため、硝酸還元酵素を修飾した Fc-L14A2Co SP-NR 中の金属配位ペプチドナノアレーの二次構造と分子配向は Fc-L14A2Co SP の分子配向を保持すると仮定し、以下の考察はこの仮定の下で行った。

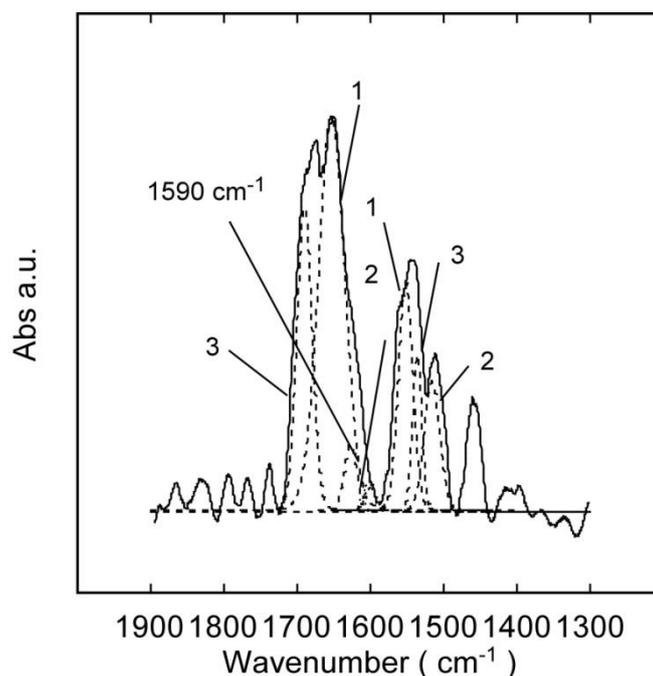


Figure 5-1. FTIR-RAS of Fc-L14A2Co SP prepared by the stepwise polymerization on gold-deposited glass plates. And peak deconvolution of amide I and amide II bands to 1; α -helical (1654 and 1545 cm^{-1}), 2; β -sheet (1635 and 1522 cm^{-1}) and 3; random coil (1679 and 1535 cm^{-1}) conformation.

Table 5-1. Summary of conformation and molecular orientation for the metal coordinated peptide nano-arrays prepared by stepwise polymerization.

	Conformation (%)			Tilt angle (deg)
	α -helix	β -sheet	Random coil	
L14A2Co SP	64	10	26	37
Fc-L14A2Co SP	66	6	28	37

5-3-2 光電変換能を有するペプチドナノアレーの電気化学特性

逐次重合法による調製した光電変換能を有するペプチドナノアレーFc-L14A2Co SP の電気化学特性は大気中及び溶液中において、それぞれ評価した。

大気中における Fc-L14A2Co SP の電気化学特性は前節と同じく、走査トンネル顕微鏡 (STM) (Figure 5-2a : STM イメージ) 観察に基づき、走査トンネル分光法 (STS) を行った。Fc-L14A2Co SP の STS を Figure 5-2b に示した。Fc-L14A2Co SP では、基板に負

の電位を印加した時のみ顕著な電流応答が観察された。逐次重合法で調製した光電変換能を有するペプチドナノアレーでは、基板にある反応開始点のアミノ基から α -ヘリックス分子が成長したために、すべてのペプチド分子が基板上にそのC-末端、アレー表面にN-末端に配し、固定化されている。そのために、 α -ヘリックス分子のマクロダイポールモーメントが一方向に揃うと考えられ、電子がペプチド分子のマクロダイポールに沿って基板表面からペプチドナノアレー表面へ方向に移動したと考えられる。即ち、光電子供与体を導入したFc-L14A2Co SPにおいても、L14A2Co SPと同様に、大気中で非線形的な電子移動特性が発現された。

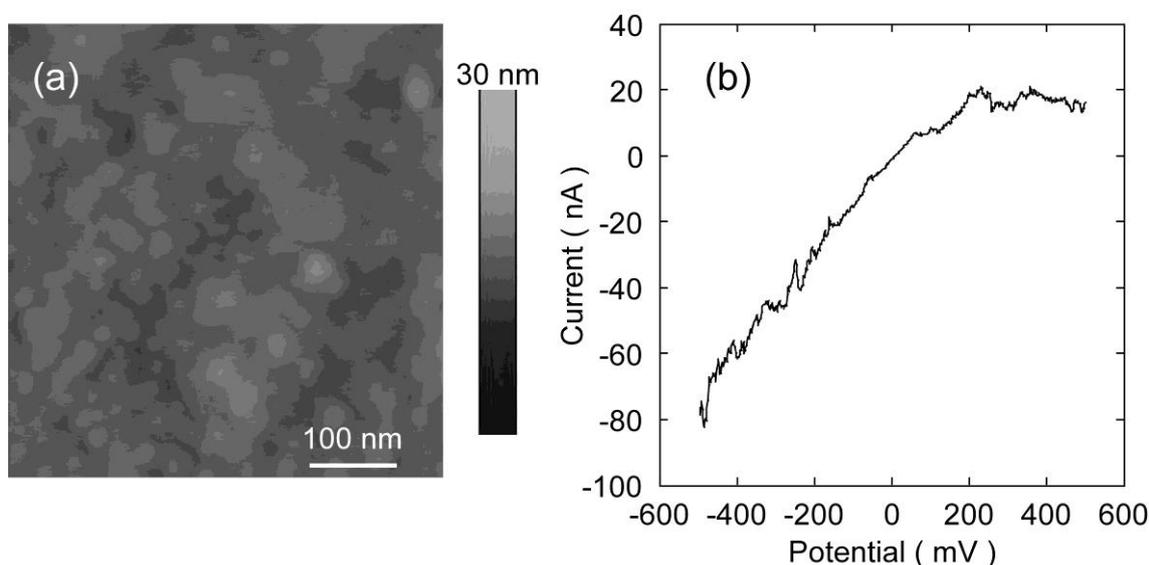


Figure 5-2. (a); STM image (500 x 500 nm) for the Fc-L14A2Co SP. And (b); Current (I)-voltage (V) curve for Fc-L14A2Co SP. The *I-V* curve was obtained by the STS measurements in air.

一方、溶液中における金属配位ペプチドナノアレーの電気化学特性を電流-電圧 (*I-V*) 測定より評価した。測定には三電極法を用い、電解質には 0.1 M KCl 水溶液を用いた。基板上に光電子供与体を導入した Fc-L14A2Co SP では、基板に電圧印加時、フェロセンの酸化還元に伴う電子の受け取りが複雑であり、また、フェロセン未導入 L14A2Co SP と Fc-L14A2Co SP が大気中に類似した *I-V* 挙動を示したため、溶液中における逐次重合法で調製した金属配位ペプチドナノアレーの電気化学特性は、L14A2Co SP を用い評価した。測定時、作用電極に正電位を印加する際には、電解質中に電子供与体である 2-[bis(2-hydroxyethyl)amino] ethanol (TEOA : 50 mM) を添加し (Figure 5-3a)、負電位を印加する際は電子受容体である methyl viologen hydrate (MV^{2+} : 50 mM) を含む電解質中で行った (Figure 5-3b)。溶液中における L14A2Co SP の *I-V* 曲線においては、正電位を

印加した時、電流応答が見られないことに対し、負電位を印加した時のみ大きな電流応答が観察された。大気中にて得られた STS 曲線（第 3 章、Figure 3-10b）と類似した挙動を示した。溶液系中においても、電子移動がペプチドナノアレーを介し、電極基板よりアレー表面に一方方向に起こることが分かった。溶液系での非線形的な電子移動も一方方向に配向した α -ヘリックスのマクロダイポールモーメントと金属錯体との共役によるものと考えられ、溶液中、光誘起電子供与体を有する Fc-L14A2Co SP においても、電子移動が基板からアレー表面に一方方向に起こると考えられる。

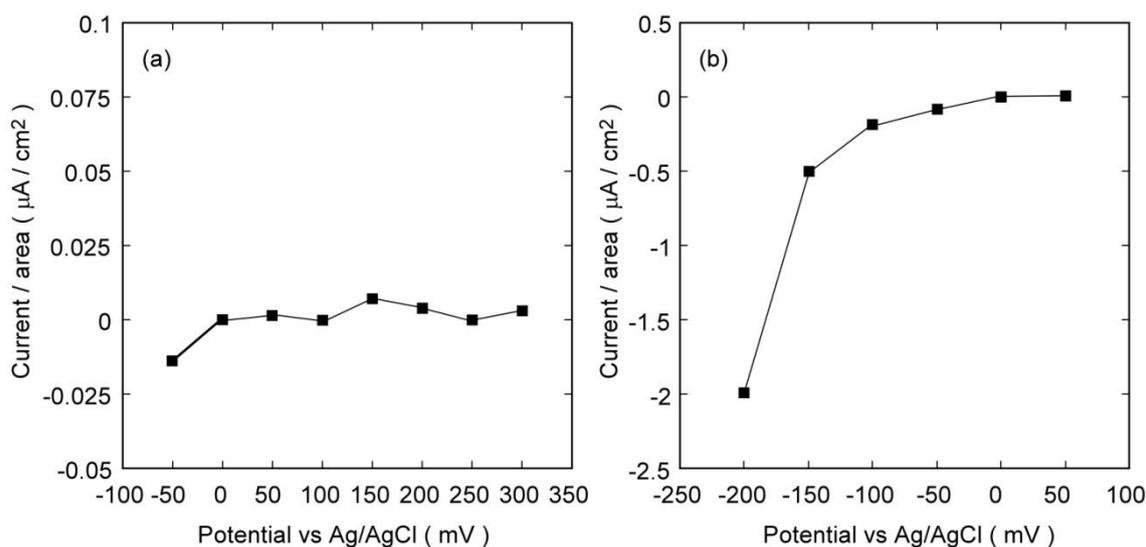


Figure 5-3. Current (I)-voltage (V) plots for L14A2Co SP in 0.1 M KCl aqueous solution containing (a); TEOA (50 mM) as an electron donor and (b); MV^{2+} (50 mM) as an electron acceptor.

次に、溶液系における光照射に伴う Fc-L14A2Co SP を介する電子移動を考察した。測定は室温で三電極法を用い、電解質として KCl 水溶液 (0.1 M) を用い、電子受容体である MV^{2+} (5 mM) を電解質中に添加した。印加電圧 0 mV を保ち、光照射の ON、OFF に伴う応答電流値を読み取った。応答電流値の変化を Figure 5-4a に示した。光誘起電子供与体である ferrocenyl 基を有する混合自己組織化単分子膜 C11N/C4/C6Fc mixed SAM における光電流を Figure 5-4b に示した。Fc-L14A2Co SP、C11N/C4/C6Fc mixed SAM、何れのアレーでも光照射より、マイナス方向に光誘起電流を観察できた。Fc-L14A2Co SP における光誘起電流値 (ca. $5.4 \text{ nA}/\text{cm}^2$) は C11N/C4/C6Fc mixed SAM におけるもの (ca. $1.6 \text{ nA}/\text{cm}^2$) の約 3 倍である。

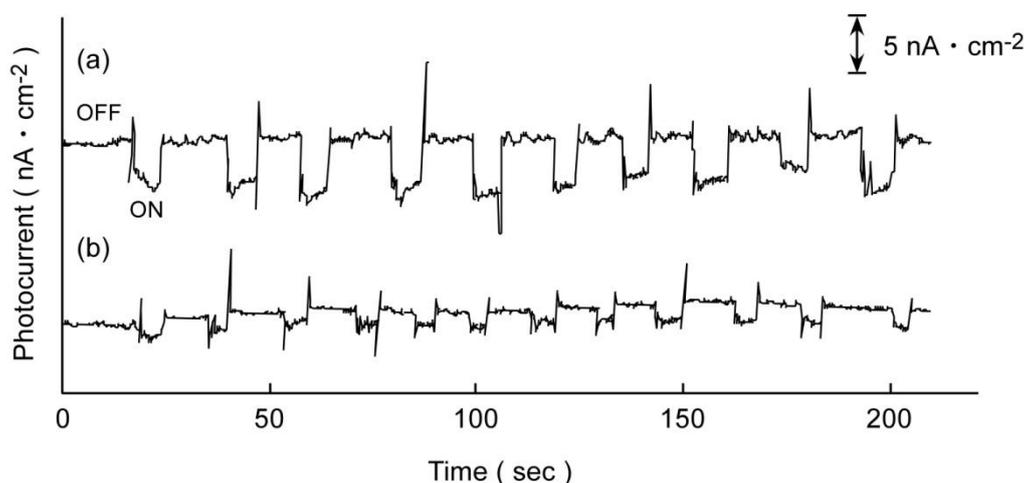
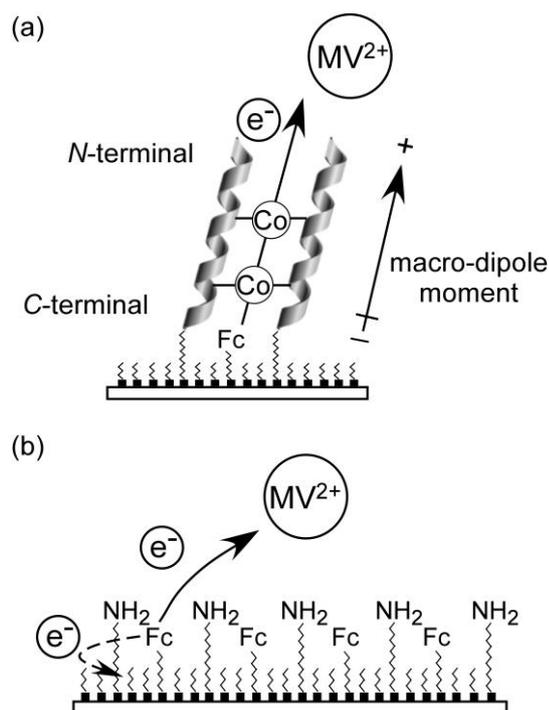


Figure 5-4. Time courses of the photocurrents of (a); Fc-L14A2Co SP and (b); C11N/C4/C6Fc mixed SAM in 0.1 M KCl aqueous solution consisting of 5 mM MV²⁺ at 0 mV upon photo-irradiation by 500-W Xe lamp.

この結果は、以下に従って説明できる。

C6Fc を有するアレーにおいて、基板上に固定化した光誘起電子供与体、C6Fc、は光照射による誘起電子を発生する。電解質中に存在する電子受容体、MV²⁺、がその誘起電子を受け取り、系全体には基板上の C6Fc から電解質相に存在する MV²⁺ への電子移動が起こり、シグナルとしてはマイナス方向に光誘起電流を観察できた。興味深い点は、このような電子移動は C11N/C4/C6Fc mixed SAM と Fc-L14A2Co SP 何れにおいても生じるが、C11N/C4/C6Fc mixed SAM に比べ、ペプチドナノアレー、Fc-L14A2Co SP、ではペプチド層が存在し、電子移動距離が長いにもかかわらず、光電流の値が高い点である。第 3 章で述べたように、逐次重合法で調製した Fc-L14A2Co SP において、各ペプチド分子は基板上にある反応開始点である-NH₂から成長するため、 α -ヘリックス分子のマクロダイポールモーメントが一方向に揃って (α -ヘリックス



Scheme 5-5. Schematic pictures of electron flow through (a); Fc-L14A2Co SP fabricated by the stepwise polymerization, and (b); C11N/C4/C6Fc mixed SAM, respectively. The arrow lines from the Fc groups on the substrates showed the direction of electron flow.

スぺプチドの C-末端が基板表面に位置し、その N-末端が電解質相に配向) 固定化された。照射時、C6Fc から励起された電子がマクロダイポールモーメントの配向方向に沿って、基板から電解質相へ効果的に移動する (Scheme 5-5a)。即ち、C6Fc から MV^{2+} への電子移動が加速され、高い光電流応答が得た。一方、C11N/C4/C6Fc mixed SAM では、ペプチド nanoアレーが存在していないため、電子の伝達経路が短いものの、上記一方向に配向したマクロダイポールモーメントによる電子移動の整流作用がなく、C6Fc から近くにある金基板への電子の逆移動が生じたと考えられる。言い換えると、分子配向が揃ったペプチド nanoアレーが整流器として機能し、C6Fc から基板への電子移動 (Scheme 5-5b : 点線) が抑えられたと考えられる。逐次重合法で調製した光電変換能を有する金属配位ペプチド nanoアレーは、そのマクロダイポールモーメントが一方向に配向することで、マクロダイポールと金属錯体との共役により、電子移動の整流器として機能した。

5-3-3 レドックス蛋白質-ペプチド nanoアレー複合体上の固定化蛋白質

レドックス蛋白質-ペプチド nanoアレー複合体, Fc-L14A2Co SP-NR, の表面観察を原子間力顕微鏡 (AFM) を用い行った。Fc-L14A2Co SP-NR の AFM イメージを Figure 5-5d に示した。併せて、NR 未修飾ペプチド nanoアレー-Fc-L14A2Co SP と C11N/C4/C6Fc mixed SAM のイメージをそれぞれ Figure 5-5c と Figure 5-5a に示し、混合 SAM 上に直接にレドックス蛋白質を修飾した複合体, C11N/C4/C6F mixed SAM-NR, のイメージを Figure 5-5b に表した。

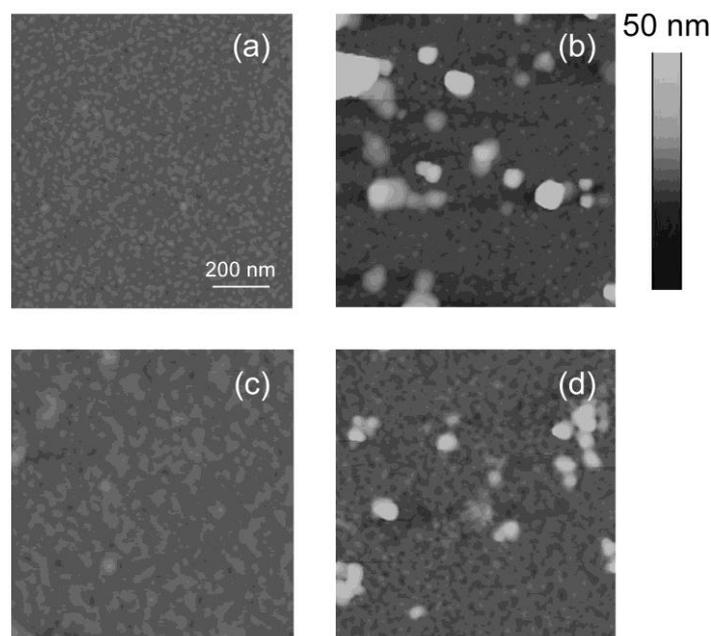


Figure 5-5. Tapping-mode AFM images (image size: $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$; Z scale: 50 nm) of the NR free (a); C11N/C4/C6Fc mixed SAM, (c); Fc-L14A2Co SP, respectively. And the AFM images of immobilized NR on (b); C11N/C4/C6Fc mixed SAM-NR and (d); Fc-L14A2Co SP-NR, respectively.

蛋白質未固定の C11N/C4/C6Fc mixed SAM、Fc-L14A2Co SP において、何れも高さが均一な表面が観察できたものの、レドックス蛋白質を固定化した C11N/C4/C6Fc mixed SAM-NR と Fc-L14A2Co SP-NR では、何れも球状粒子が見られた。球状部分の平均高さは 16 nm であり、レドックス蛋白質 NR の直径と一致し⁵⁷⁾、NR が C11N/C4/C6Fc mixed SAM と Fc-L14A2Co SP 表面に修飾できていることを示した。

レドックス蛋白質複合体における NR 被覆率を $1 \mu\text{m}^2$ 中、NR の占有面積から算出した。C11N/C4/C6Fc mixed SAM-NR と Fc-L14A2Co SP-NR にて任意 5 箇所を AFM 測定し、NR 被覆率を得た (Table 5-2)。平均 NR 被覆率は C11N/C4/C6Fc mixed SAM-NR : 10%、Fc-L14A2Co SP-NR : 5%を得た。

Table 5-2. NR immobilized area observed by AFM as bright regions in $1 \mu\text{m}^2$ region.

	C11N/C4/C6Fc mixed SAM-NR (μm^2)	Fc-L14A2Co SP-NR (μm^2)
No.1	0.113	0.041
No.2	0.093	0.056
No.3	0.102	0.042
No.4	0.106	0.051
No.5	0.092	0.044
Average	0.101	0.047

5-3-4 光照射による表面レドックス蛋白質の活性制御と光反応場への応用

前節では、光誘起電子供与体 C6Fc を導入した基板表面に逐次重合により構築した金属配位ペプチドナノアレー (Fc-L14A2Co SP) は、 α -ヘリックス構造を有し、基板上で一方向に垂直配向することが確認できた (5-3-1 節)。また、上記ペプチドナノアレー表面にレドックス蛋白質が固定化されていることが確認できた。本節では、まず、ペプチドナノアレーレドックス蛋白質複合体 (Fc-L14A2Co SP-NR) における、基板表面の ferrocenyl 基の光誘起による金属配位ペプチドナノアレーを介する光誘起電子移動特性を評価した。測定は室温で三電極法を用い、電解質として硝酸還元酵素, NR, の基質である KNO_3 を用いた。印加電圧 0 mV を保ち、光照射の ON、OFF に伴う応答電流値を読み取った。Fc-L14A2Co SP-NR における応答電流値の変化は C11N/C4/C6Fc mixed SAM-NR の結果と併せ、Figure 5-6 に示した。

Fc-L14A2Co SP-NR、C11N/C4/C6Fc mixed SAM-NR、何れのレドックス蛋白質複合体においても、光照射 ON の状態で、マイナス方向に電流の応答が観察できた。その光電流

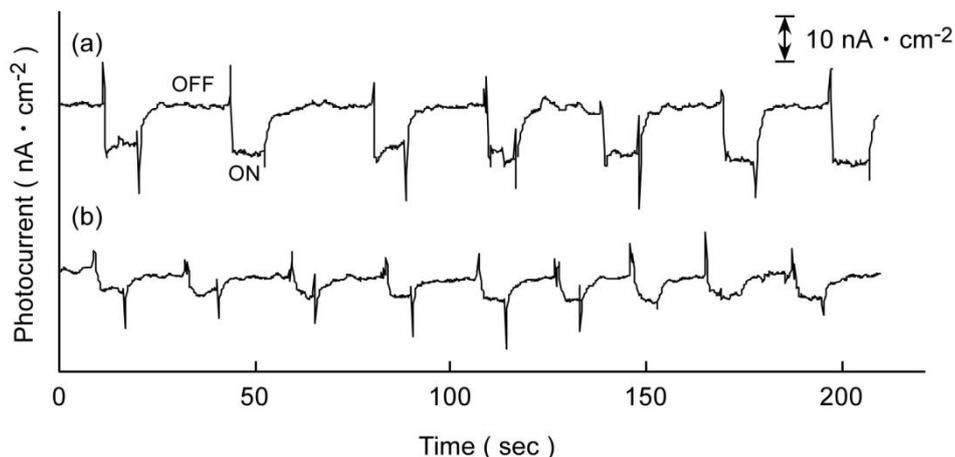
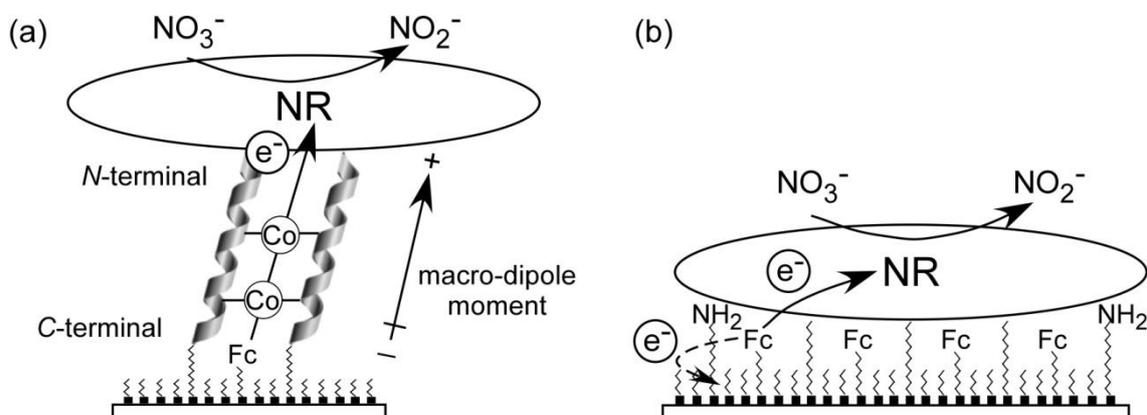


Figure 5-6. Time courses of the photocurrents of (a); Fc-L14A2Co SP-NR and (b); C11N/C4/C6Fc mixed SAM-NR in 0.1 M KNO_3 aqueous solution at 0 mV upon photo-irradiation by 500-W Xe lamp.

応答が可逆的であり、光照射を OFF にすると、基の電流値 0 に戻る。光電流値は Fc-L14A2Co SP-NR は、およそ 15.9 nA/cm^2 であり、混合 SAM 上に直接に硝酸還元酵素を修飾した C11N/C4/C6Fc mixed SAM-NR では、その半分以上の 6.9 nA/cm^2 であった。



Scheme 5-6. Schematic pictures of electron flow through (a); Fc-L14A2Co SP-NR and (b); C11N/C4/C6Fc mixed SAM-NR, respectively. The arrow lines from the Fc groups on the substrates showed the direction of electron flow.

上記結果より、Fc-L14A2Co SP-NR、C11N/C4/C6Fc mixed SAM-NR では、光照射より基板表面 ferrocenyl 基からアレー表面への電子移動が生じ、アレー表面に修飾した NR が C6Fc からの光誘起電子を受け取ることが明らかとなった。Fc-L14A2Co SP-NR 及び C11N/C4/C6Fc mixed SAM-NR は、何れもアレー表面に固定化した硝酸還元酵素が電子の

受容体として働き、C6Fc からの光誘起電子を受容したと考えられる (Scheme 5-6)。特に、Fc-L14A2Co SP-NR の硝酸還元酵素被覆率は C11N/C4/C6Fc mixed SAM-NR に比べ、低いにもかかわらず、光電流応答が大きかった。逐次重合法で調製したペプチドナノアレーは方向性を持つ電子移動のよい媒体、即ち、効率的な整流器として機能することを更に裏付けた。

次に、上記複合体における光照射に伴う物質変換能を評価した。本章で表面レドックス蛋白質として用いたのは硝酸還元酵素, NR, であり、同酵素は中性の環境で電子を受け取り、硝酸イオン (NO_3^-) を亜硝酸イオン (NO_2^-) に還元する。光照射による電解質中に存在する NO_3^- の還元反応による NO_2^- の生成はナフチルエチレンジアミン法に基づき、紫外可視分光法を用いて、 NO_2^- の定量より行った。具体的には、光照射後の KNO_3 電解質溶液を少量計り取り、同溶液に sulfanilamide の $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$ 溶液、*N*-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride 水溶液を順次加え、色素であるアゾ化合物を生成させた。得られるアゾ色素の吸光度より NR により生成された溶液中の亜硝酸イオンの定量を行った。得られた UV スペクトルを光照射前の電解質のスペクトルと合わせ、Figure 5-7 に示した。光照射前の電解質溶液では、アゾ化合物に由来する 540 nm における吸収が観察できないことに対し、光照射後の電解質では 540 nm 付近に吸収を示した。その吸収が時間の経過と共に増加し、特に、Fc-L14A2Co SP-NR (Figure 5-7b) では NR が生成した NO_2^- 由来する吸光度の増加が顕著であり、レドックス蛋白質複合体を直接固定化した C11N/C4/C6Fc mixed SAM-NR (Figure 5-7a) より大きかった。

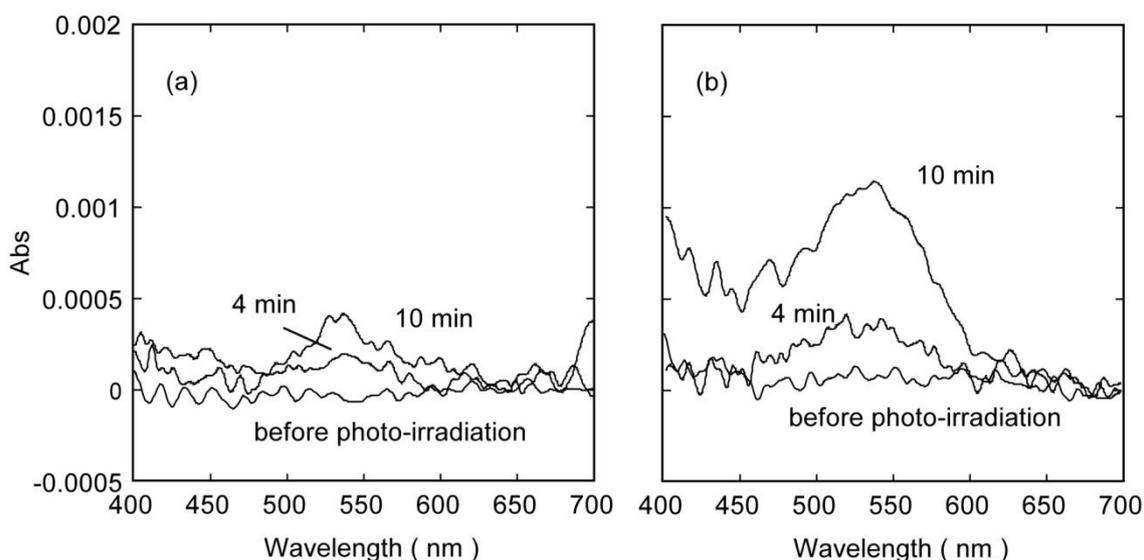


Figure 5-7. UV spectra of azo compound, which was produced from bioelectrocatalytic product NO_2^- by NR on the (a); C11N/C4/C6Fc mixed SAM-NR, and (b); Fc-L14A2Co SP-NR in the supporting electrolyte solution before and after photo-irradiation, respectively.

光照射で、表面に固定化した NR による NO_3^- の還元から生じた NO_2^- の定量を行った。ナフチルエチレンジアミン法を用い、検量線を作成し (Figure 5-8a)、一定時間ごとに表面固定化 NR により溶液中に生成された NO_2^- の生成量を得た (Figure 5-8b)。

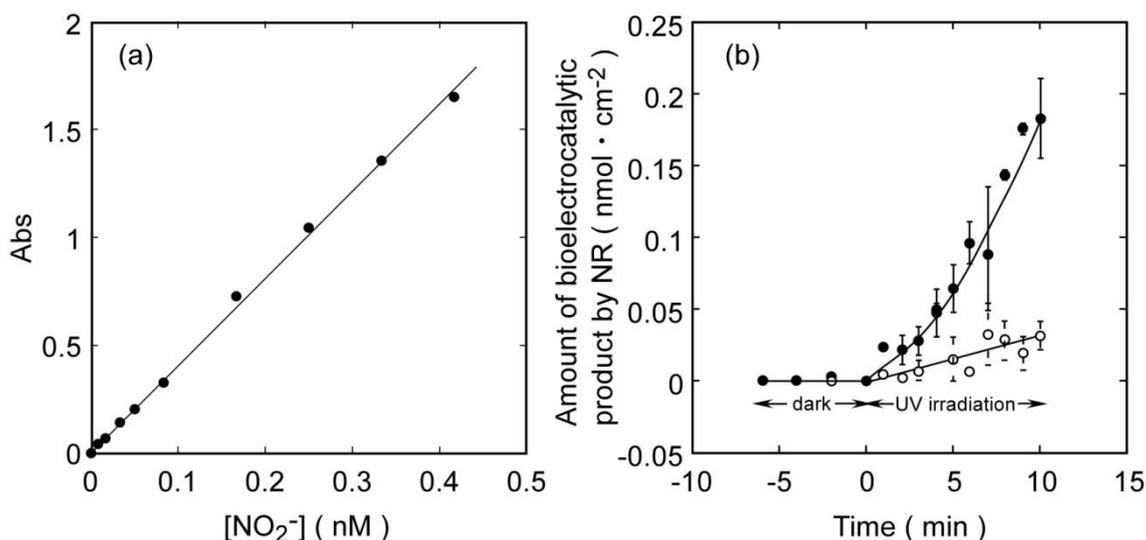


Figure 5-8. (a); The calibration curve for the amount of NO_2^- based on the naphthylethylenediamine method obtained by UV measurement. And (b); The changes of the amount of bioelectrocatalytic product, NO_2^- , by the photo-irradiation to the C11N/C4/C6Fc mixed SAM-NR (○) and Fc-L14A2Co SP-NR (●), respectively.

何れのレドックス蛋白質複合体も時間の経過と共に光照射による生成した NO_2^- の量が増加したが、ペプチドナノアレーレドックス蛋白質複合体では C11N/C4/C6Fc mixed SAM-NR に比べ、光照射直後に顕著な増加が観察できた。AFM 観察では、Fc-L14A2Co SP-NR における NR 被覆率 (5%) は C11N/C4/C6 mixed SAM-NR の蛋白質被覆率 (10%) より低いことが分かったものの、Fc-L14A2Co SP-NR はより多量の NO_2^- を生成した。逐次重合法で調製した金属配位ペプチドナノアレーレFc-L14A2Co SP 表面に修飾した NR が、混合 SAM である C11N/C4/C6Fc mixed SAM 表面に直接固定化した NR に比べ、より効率的に NO_3^- を還元したことは明らかである。アレー表面に固定化した蛋白質 NR における酵素効率の向上は一方向に配向する α -ヘリックスペプチドのマイクロダイポールモーメントに沿った効率的な、かつ一方向への電子移動によるものだと考えられる。上記システムにおいて、逐次重合法で調製した金属配位ペプチドナノアレーが、基板表面に固定化した電子供与体 (C6Fc) とアレー表面に修飾した電子受容体 (NR) との間の効果的な電子整流器として機能したと考えられる。光照射による基板上の C6Fc からの光誘起電子は、マイクロダイポールが一方向に配向したペプチドナノアレーを介し、アレー中の金属錯体との共役によ

り、アレー表面まで一方向へ効率的に移動する。同移動電子は、アレー表面に修飾したレドックス蛋白質である NR に受容され、電解質中に存在する基質 NO_3^- を効率的に NO_2^- に還元した。即ち、光照射より、表面レドックス蛋白質の還元反応が効率的に制御され、その高い活性発現制御に成功した。

本章で得られた光電変換能を有するペプチドレドックス蛋白質複合体システムは、これまでになく集積度の高いナノリアクターとしての応用が今後期待される。

5-4 結言

逐次重合法により、光誘起電子供与体を固定化した金蒸着ガラス基板上に、光電変換能を有する金属配位ペプチドナノアレーを構築した。同ペプチドナノアレー表面にレドックス蛋白質を固定化し、光照射による、得られた光電変換能を有する金属配位ペプチドレドックス蛋白質複合体の活性制御を行った。

上記、金属配位ペプチドナノアレー中のペプチド分子の二次構造及び配向角を高感度赤外分光 (FTIR-RAS) 測定より評価したところ、ペプチドは主に α -ヘリックス構造を取り、金蒸着ガラス基板上に、ほぼ垂直に配向することが判った。その電気化学特性は、溶液中、大気中、何れにおいても非線形的な電流応答が観察でき、光電変換能を有する金属配位ペプチドナノアレーの高い整流作用の発現が確認できた。上記膜構造及び電気化学特性は、光誘起電子供与体が固定化していない基板において、逐次重合法で調製した金属配位ペプチドナノアレーと同等であることから、その整流器としての機能を損なうことなく、ペプチドナノアレーに種々の刺激応答性を付与できる可能性を有し、今後の発展性が期待できる。

光による金属配位ペプチドレドックス蛋白質複合体の活性制御を検討した。印加電圧を 0 mV に保って、レドックス蛋白質複合体への光照射を行った。光照射の ON、OFF に伴い、可逆的な電流応答が観察できた。この結果は基板表面からナノアレー表面へ、ナノアレーを介した一方向への効率的な電子移動に伴い、表面レドックス蛋白質が効果的に電子を受容し、基質である水溶液中の硝酸イオンが亜硝酸イオンに還元された結果である。

本章にて設計した光誘起電子供与体-高配向性ペプチドナノアレー-レドックス蛋白質からなるシステムでは、光照射による基板からアレー表面への一方向への効率的な電子移動が実現でき、光電変換及び物質変換が達成された。本システムは微小領域における効果的な物質変換を可能にするものであり、微小反応場としての新規ナノデバイスとしての応用が期待される。

REFERENCES

- 1) Breslow, R. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 1337-1342.

- 2) Breslow, R. *Chem. Soc. Rev.* **1972**, 1, 553-580.
- 3) Leete, E. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1972**, 1091.
- 4) Burke, D. E.; Le Quesne, P. W. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1972**, 678.
- 5) Mardilovich, A.; Kokkoli, E. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 950-957.
- 6) Xu, F.; Li, J.; Jain, V.; Tu, R. S.; Huang, Q.; Nanda, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 47-50.
- 7) Hamada, T.; Morita, M.; Kishimoto, Y.; Komatsu, Y.; Vestergaard, M.; Takagi, M. *J. Phys. Chem. Lett.*, **2010**, 1, 170-173.
- 8) Halas, N. J. *ACS Nano* **2008**, 2, 179-183.
- 9) Sun, B.; Mi, Z.; An, G.; Liu, G.; Zou, J. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, 48, 9823-9829.
- 10) Guo, C.; Ng, S.; Khoo, S. Y.; Zheng, X.; Chen, P.; Li, C. *ACS Nano* **2012**, 6, 6944-6951.
- 11) Kuciauskas, D.; Kiskis, J.; Caputo, G. A.; Gulbinas, V. *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 16029-16035.
- 12) Brown, N. J.; Johansson, J.; Barron, A. E. *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 1409-1417.
- 13) He, Q.; Cui, Y.; Li, J. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 2292-2303.
- 14) Nicolaou, K. C.; Tamsyn, M.; Snyder, S. A. *Chem. Commun.* **2003**, 551-564.
- 15) Breslow, R.; Dong, S. D. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1997-2011.
- 16) Aili, D.; Enander, K.; Rydberg, J.; Lundström, I.; Baltzer, L.; Liedberg, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2194-2195.
- 17) Lodish, H.; Baltimore, D.; Berk, A.; Zipursky, S. L.; Matsudaira, P.; Darnell, J. *Molecular Cell*, 3rd ed.; Scientific American Books: New York, 1998; p. 782-783.
- 18) Deisenhofer, J.; Epp, O.; Miki, K.; Huber, R.; Michel, H. *Nature* **1985**, 318, 618-624.
- 19) Babcock, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 10893-10895.
- 20) Wada, A. *Adv. Biophys.* **1976**, 9, 1-63.
- 21) Hol, W. G. J.; van Duijnen, P. T.; Berendsen, H. J. C. *Nature* **1978**, 273, 443-446.
- 22) Hol, W. G. H. *Prog. Biophys. Molec. Biol* **1985**, 45, 149-195.
- 23) Heleg-Shabtai, V.; Gabriel, T.; Willner, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 3220-3221.
- 24) Heller, A. *J. Phys. Chem.* **1992**, 96, 3579-3587.
- 25) Willner, I.; Lion-Dagan, M.; Marx-Tibbon, S.; Katz, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 6581-6592.
- 26) Eaton, D. F. *Science* **1991**, 253, 281-287.
- 27) Whitesell, J. K.; Chang, H. K. *Cryst. Liq. Cryst.* **1994**, 240, 251-258.
- 28) Galoppini, E.; Fox, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2299-2300.
- 29) Yasutomi, S.; Morita, T.; Imanishi, Y.; Kimura, S. *Science* **2004**, 304, 1944-1947.
- 30) Kishihara, K.; Kinoshita, T.; Mori, T.; Okahata, Y. *Chem. Lett.* **1998**, 951-952.
- 31) Doi, T.; Kinoshita, T.; Tsujita, Y.; Yoshimizu, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2001**, 74, 421-425.

- 32) Higashi, N.; Koga, T.; Niwa, M. *Langmuir* **2000**, *16*, 3482-3486.
- 33) Whitesell, J. K.; Chang, H. K. *Science* **1993**, *261*, 73-76.
- 34) Whitesell, J. K.; Chang, H. K.; Whitesell, C. S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 871-873.
- 35) Wieringa, R. H.; Schouten, A. J. *Macromolecules* **1996**, *29*, 3032-3034.
- 36) Heise, A.; Menzel, H.; Yim, H.; Foster, M. D.; Wieringa, R. H.; Schouten, A. J.; Reb, V.; Stamm, M. *Langmuir* **1997**, *13*, 723-728.
- 37) Fujita, K.; Bunjes, N.; Nakajima, K.; Hara, M.; Sasabe, H.; Knoll, W. *Langmuir* **1998**, *14*, 6167-6172.
- 38) Miura, Y.; Kimura, S.; Imanishi, Y.; Umemura, J. *Langmuir* **1998**, *14*, 6935-6940.
- 39) Niwa, M.; Murata, T.; Kitamatsu, M.; Matumoto, T.; Higashi, N. *J. Mater. Chem.* **1999**, *9*, 343-344.
- 40) Miura, Y.; Kimura, S.; Imanishi, Y.; Umemura, J. *Langmuir* **1999**, *15*, 1155-1160.
- 41) Yanagisawa, K.; Morita, T.; Kimura, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12780-12781.
- 42) Cosnler, S.; Innocent, C.; Jouanneau, Y. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3198-3201.
- 43) Ramsay, G.; Wolpert, S. M. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 504-506.
- 44) Willner, I.; Heleg-Shabtai, V.; Katz, E.; Rau, H. K.; Haehnel, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6455-6468.
- 45) Beer, P. D.; Davis, J. J.; Drillsma-Milgrom, D. A.; Szemes, F. *Chem. Commun.* **2002**, 1716-1717.
- 46) Norman, L. L.; Badia, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2328-2337.
- 47) Wolfe, R. L.; Balasubramanian, R.; Tracy, J. B.; Murray, R. W. *Langmuir* **2007**, *23*, 2247-2254.
- 48) Stiles, R. L.; Balasubramanian, R.; Feldberg, S. W.; Murray, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1856-1865.
- 49) Nijhuis, C. A.; Reus, W. F.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17814-17827.
- 50) Nijhuis, C. A.; Reus, W. F.; Siegel, A. C.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15397-15411.
- 51) Enriquez, E. P.; Samulski, E. T. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* **1992**, *255*, 423-434.
- 52) Behm, R. J.; Garcia, N.; Rohrer, H. Eds. *Scanning Tunneling Microscopy and Related Methods*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 1990.
- 53) Haggerty, L.; Lenhoff, A. M. *Biotechnol. Prog.* **1993**, *9*, 1-11.
- 54) Hamers, R. J. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1989**, *40*, 531-539.
- 55) Miyazawa, T.; Blout, E. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 712-719.
- 56) Kennedy, D. F.; Crisma, M.; Toniolo, C.; Chapman, D. *Biochemistry* **1991**, *30*,

6541-6548.

- 57) Coelho, C.; Gonzalez, P. J.; Moura, J. J. G.; Moura, I.; Trincao, J.; Romao, M. J.
J.Mol.Biol. **2011**, *408*, 932-948.

第6章 結論

本研究では、新規手法により、金蒸着ガラス基板上において高配向性金属配位ペプチドナノアレーを調製し、その構造、特に分子配向とそれに伴う電気化学特性を評価した。また、同ペプチドナノアレーに光誘起電子供与体及び電子受容体であるレドックス蛋白質をそれぞれ基板表面とナノアレー表面に固定化し、光電変換能を有する金属配位ペプチドレドックス蛋白質複合体を構築し、同システムの新規光反応場への応用について検討した。結果を以下にまとめる。

第2章では、本研究で用いるペプチドの分子設計指針及びその合成方法について述べた。二種のアミノ酸シーケンスを有するペプチド、 $\text{Leu}_6\text{HisLeu}_6\text{HisLeu}_2$ 及び $\text{Leu}_6\text{Ala}(4\text{-Pyri})\text{Leu}_6\text{Ala}(4\text{-Pyri})\text{Leu}_2$ を設計した。同二種のペプチドは、ロイシン (Leu) に富むアミノ酸シーケンスであり、 α -ヘリックス構造を形成し易い。また、ペプチド分子の *N*-末端から7残基目及び14残基目の二箇所に、金属配位子であるヒスチジン (His)、或いは、4-ピリジルアラニン (Ala(4-Pyri)) を導入することによって、 α -ヘリックスペプチドに金属配位能を与えた。固相合成法により上記ペプチドを合成し、得られたペプチドの分子量をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF-MS) で測定し、ペプチドのキャラクタリゼーションを行った。

第3章では、金属配位ペプチドナノアレーの構築を基板上でのアミノ酸の逐次重合法によって行った。ペプチドのアミノ酸シーケンスには、第2章にて設計した Leu と金属配位子として機能する Ala(4-Pyri)の周期配列を有する $\text{Leu}_6\text{Ala}(4\text{-Pyri})\text{Leu}_6\text{Ala}(4\text{-Pyri})\text{Leu}_2$ を用い、配位金属としてペプチド側鎖ピリジル基と平面四配位構造を取る二価のコバルト (Co(II)) を用いた。対照実験では、同金属配位ペプチドナノアレーを従来の自己組織化単分子膜 (SAM) 法で調製し、上記二種の方法で得られたペプチドナノアレーの二次構造を高感度分光法 (FTIR-RAS) を用い、また、その分子配向は FTIR-RAS と表面電位測定より評価した。逐次重合法で構築したペプチドナノアレーは自己組織化単分子膜に比べ、高い一軸・垂直配向性を示した。また、電気化学測定より、逐次重合法で構築したペプチドナノアレーにおいては電子移動の整流作用が確認できた。膜を介するこの非線形的な電子移動は、逐次重合法で構築したペプチドナノアレーの一軸・垂直配向した α -ヘリックス分子に基づく一方向に配向したマクロダイポールモーメントと、配位金属との共役によるものと示唆された。

第4章では、金属配位ペプチドナノアレーを、電場配向によるペプチドの自己組織化を用い、金蒸着ガラス基板上に調製した。ペプチドのアミノ酸シーケンスには、第2章にて設計した Leu と金属配位子として機能する二価コバルトイオンの指示薬 His の周期配列を有する $\text{Leu}_6\text{HisLeu}_6\text{HisLeu}_2$ を用いた。また、得られた自己組織化単分子膜の構造と電気化学特性を電場未印加時に自己組織化単分子膜法により調製したナノアレーと比較・検討をしたところ、適切な電圧を印加した基板上においては、安定な α -ヘリックスペプチドナノア

レーが得られ、従来の自己組織化単分子膜法に比べ、ペプチドのマクロダイポールモーメントが一方向に配向し、膜を介する非線形的な電子移動が生ずることが分かった。

本論文で提案した二種の高配向性金属配位ペプチドナノアレーの構築法、「逐次重合法」（第3章）と「電場配向自己組織化単分子膜法」（第4章）は、何れも一方向への電子移動を達成する上での電子伝達経路（効率的な整流器）を形成する有用な手法である。

この知見を基に、第5章では、第3章の結果に基づき、新規ナノ反応場の構築を試みた。逐次重合法により、光誘起電子供与体を固定化した金蒸着ガラス基板上に、光電変換能を有する金属配位ペプチドナノアレーを構築した。同ペプチドナノアレー表面にレドックス蛋白質を固定化し、光照射による、得られた光電変換能を有する金属配位ペプチドレドックス蛋白質複合体の光による活性制御を行った。光照射の ON、OFF に伴い、可逆的な電流応答が観察でき、基板表面からペプチドナノアレー表面へ、マクロダイポールモーメントが一軸・垂直配向したペプチドナノアレーを介した効率的な一方向への電子移動を確認できた。この光誘起電子は、表面レドックス蛋白質に効率的に受容され、微小領域における物質変換場の構築が可能となり、新規ナノデバイスとしての有用性が確認された。

以上、本論文では、 α -ヘリックスペプチドのマクロダイポールが一軸・垂直配向した「高配向性金属配位ペプチドナノアレー」の新規二種の構築法を確立し、得られるナノアレーが非線形効果を有する有効な電子伝達経路を形成することを明らかとした。更に、ナノデバイスへの応用として、微小反応場の構築を目的に、同ナノアレー表面に酸化還元酵素を固定化し、アレーを介する一方向の電子移動により、その活性制御に成功した。本研究の成果は、情報・エネルギー・物質変換能を有する新規ナノデバイス構築のための基礎的知見を与えると共に、今後のナノデバイス構築のために寄与するものと考えられる。

PUBLICATION LIST

- 1) “Functional regulation of photo-responsive nano-arrays composed of ordered metal coordinated peptide-redox protein conjugates”
Wang, X.; Nagata, K.; Higuchi, M.
Proceedings of V International Conference on Science and Technology of Composite Materials, **2009**, 549-552.

- 2) “Activity control of redox protein on the photo-responsive ordered metal coordinated peptide nano-array”
Wang, X.; Nagata, K.; Higuchi, M.
Trans. MRS-J. **2010**, *35*[4], 821-824.

- 3) “Functional regulation of an immobilized redox protein on an oriented metal coordinated peptide monolayer as an electron mediator”
Wang, X.; Nagata, K.; Higuchi, M.
Langmuir **2011**, *27*[20], 12569-12574.

- 4) “Formation and electrochemical investigation of ordered cobalt coordinated peptide monolayers on gold substrates”
Wang, X.; Nagata, K.; Higuchi, M.
Thin Solid Films **2012**, *520*[7], 2884-2891.

- 5) “Electric-field-enhanced oriented cobalt coordinated peptide monolayer and its electrochemical properties”
Wang, X.; Fukuoka, S.; Tsukigawara, R.; Nagata, K.; Higuchi, M.
J. Colloid and Interface Sci. **2013**, *390*[1], 54-61.