

生体機能を規範とした有機-無機ナノハイブリッド
マテリアルの構築とその応用に関する研究

Study of the Fabrication of Bio-Inspired Nano-Hybrid Materials
and Their Applications

2015

村井 一喜

謝 辞

本研究を指示され、終始適切なご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。さらに適切なご教示・ご助言ならびに博士論文審査を賜りました名古屋工業大学 猪股 克弘 教授、稲井 嘉人 教授および永田 謙二 准教授に併せて感謝いたします。木下 隆利 理事には、有意義なご指摘を賜りました事に加え、FT-IR 等、装置の使用を快く承諾下さった事を深く感謝いたします。

電子顕微鏡観察において、有益なご助言を賜りました名古屋工業大学 永田 謙二 准教授に深く感謝いたします。

4- α -ヘリックスバンドルを用いたペプチドナノワイヤーについて、協調し研究に従事して頂きました名古屋工業大学大学院 山本 裕介 修士に感謝申し上げます。

名古屋工業大学セラミックス科学研究教育院のもと、学生研究員として多大な助成を賜りましたこと感謝申し上げます。日本学術振興会のもと、特別研究員 DC2 として多大な助成および支援を賜りました事深く感謝いたします。

産業技術総合研究所での技術研修において、研究・装置使用および論文執筆など研究活動全体にわたってきめ細やかにご指導頂きました先進製造プロセス研究部門生体機構プロセス研究グループ グループ長 加藤 且也 博士に感謝申し上げます。また産総研イノベーションスクールのもと、第6期スクール生として多大なご支援を賜りました事深く感謝申し上げます。

名古屋工業大学 石井 大佑 テニユアトラック助教には3年間絶えず激励とご指導を賜りました。併せて感謝申し上げます。最後に、実験遂行にあたりご協力を頂きました名古屋工業大学 樋口研究室・木下研究室・永田研究室・高須研究室及び産業技術総合研究所生体機構プロセス研究グループの皆様には深く感謝申し上げます。

平成 27 年 3 月

村井 一喜

目 次

第 1 章	序論	1
第 2 章	ペプチドの分子設計	9
2-1.	緒言	9
2-2.	ペプチドの分子設計	
2-2-1.	シリカおよび炭酸カルシウムミネラルゼーションに用いるペプチド	9
2-2-2.	自発的に導電性ナノワイヤーを形成するペプチド	10
2-2-3.	メソポーラスシリカ上のナノゲートとして機能する微小 pH 応答性ペプチド	12
第 3 章	酵素の活性中心を模倣した高い電荷リレー効果を有する ペプチドを用いたシリカミネラルゼーション	14
3-1.	緒言	14
3-2.	実験	14
3-2-1.	Fmoc 固相ペプチド合成	14
3-2-2.	円偏光二色性測定によるペプチドの二次構造評価	16
3-2-3.	ガスクロマトグラフィーによるトリメチルエトキシシラン加水分解率と縮合率	16
3-2-4.	ペプチドテンプレートを用いたシリカミネラルゼーション	17
3-2-5.	シリカの電界放出型走査型および透過型電子顕微鏡観察	17
3-2-6.	エネルギー分散型 X 線分析による元素分析	18
3-2-7.	窒素吸脱着測定によるシリカの細孔分布、比表面積および空間容量測定	18
3-3.	結果・考察	18
3-3-1.	ペプチドテンプレートの構造	18
3-3-2.	ガスクロマトグラフィーによるトリメチルエトキシシラン加水分解活性評価	19
3-3-3.	シリカミネラルゼーションに与えるペプチドの モルフォロジーと電荷リレー効果の影響	21
3-4.	結言	22
第 4 章	Nacrein タンパク質に倣う炭酸カルシウムの 生体模倣型ミネラルゼーションとその機構解明	24
4-1.	緒言	24
4-2.	実験	24
4-2-1.	フーリエ変換赤外吸収スペクトル測定	24
4-2-2.	ペプチドによるウレアの加水分解反応	25

4-2-3. 炭酸カルシウムミネラルゼーション	26
4-2-4. 電界放出型走査型および透過型電子顕微鏡観察および制限視野電子線回折	26
4-2-5. エネルギー分散型 X 線分析による元素分析	26
4-3. 結果・考察	27
4-3-1. 合成ペプチドの二次および高次構造の解析	27
4-3-2. ペプチドによるウレアの加水分解活性評価	28
4-3-3. 多機能性ペプチド上での炭酸カルシウムのミネラルゼーション	22
4-3-4. 炭酸カルシウムミネラルゼーションの機構解析	35
4-3-5. ミネラル源の自己供給能と二種類のテンプレート効果による結晶成長制御	38
4-4. 結言	39

第 5 章 伝導性ナノ配線材料への応用を目指したシリカ被覆膜を有する 自己組織化ペプチドナノワイヤーの構築とその電気化学特性 42

5-1. 緒言	42
5-2. 実験	43
5-2-1. 両親媒性ペプチド-コバルト錯体の形成と各種基板への導入	43
5-2-2. 円偏光二色性スペクトル測定によるペプチドの二次構造評価	44
5-2-3. 紫外-可視吸収スペクトル測定	44
5-2-4. フーリエ変換赤外吸収スペクトル測定	44
5-2-5. セリン側鎖ヒドロキシル基のシリカ結合能の評価	44
5-2-6. シリカミネラルゼーションを用いたペプチドナノワイヤーの被覆	45
5-2-7. 透過型電子顕微鏡および原子間力顕微鏡によるペプチドナノワイヤーの観察	45
5-2-8. ペプチドナノワイヤーの電気化学特性	45
5-3. 結果・考察	46
5-3-1. ペプチドのコバルト錯体形成能を利用したペプチドナノワイヤーの構築とその構造解析	46
5-3-2. シリカミネラルゼーションを利用したペプチドナノワイヤーの被覆と ペプチド側鎖官能基がミネラルゼーションに与える影響	50
5-3-3. シリカ被覆ペプチドナノワイヤーの電気化学特性評価	52
5-4. 結言	56

第 6 章 ペプチドの可逆的二次構造転移を ナノゲートとして利用したナノキャリアの薬物放出制御 58

6-1. 緒言	58
6-2. 実験	59
6-2-1. 薬物担持担体としてのメソポーラスシリカの合成	59

6-2-2. 電界放出型走査型および透過型電子顕微鏡による	
メソポーラスシリカのモルフォロジー観察	59
6-2-3. 低角 X 線回折および BET 法による構造解析	59
6-2-4. ペプチド分子の合成とメソポーラスシリカ表面への導入	60
6-2-5. 示差熱重量同時測定	60
6-2-6. 円偏光二色性および赤外分光スペクトル測定によるペプチドの二次構造解析	60
6-2-7. ペプチド被覆メソポーラスシリカへの薬物の担持と除放試験	61
6-3. 結果・考察	62
6-3-1. ナノゲートとしてペプチドを有するメソポーラスシリカの構造解析	62
6-3-2. 微小な pH 変化によるメソポーラスシリカ表面上の	
ペプチドの可逆的二次構造転移挙動解析	64
6-3-3. ペプチドの可逆的二次構造転移に基づく薬物徐放特性	66
6-4. 結言	68
 第 7 章 結論	 70
 PUBLICATION LIST	 73

第 1 章 序論

人間を初めとする地球上に存在するすべての生物は、タンパク質、リボ核酸(RNA)やデオキシリボ核酸(DNA)を初めとする生体高分子が関与する様々な化学反応により、その生命活動を維持している。これらの生体高分子およびその複合体の作用例として、タンパク質をテンプレートとしたバイオミネラル(貝殻、骨や歯など)の形成^[1-6]、酵素の触媒反応による物質の変換^[7-10]、チャネルタンパク質による情報の受容・伝達および変換^[11,12]、白血球やリンパ球などによる免疫システム^[13-15]などが挙げられる。これらの複雑な生命機能は、原始地球の頃に生じた“化学進化”が引き金となり、単純な化合物から複雑な生体高分子およびその複合体へと幾段階かの化学進化を経ることで、その特異的な生命機能を約 40 億年という膨大な年月の中での試行錯誤の末、獲得したと考えられている。タンパク質を初めとする生体高分子の“進化”が、より高位の生命機能の発現をもたらした事は、これまでの歴史より明らかである。そのため、バイオミネラリゼーションを初めとする生命機能の機構解明は、“化学進化”を解き明かす上で学術的に興味深いばかりではなく、ナノまたはオングストロームオーダーでの分子の配列・配向制御、すなわちナノテクノロジーによる機能性分子集合体の構築、低環境負荷・省エネルギーにて構築を可能とする環境調和型製造プロセスによる高機能材料の創成、新治療手法や新規診断法の開発、情報・通信分野におけるシリコンデバイスに変わる分子素子の構築等、多岐にわたる研究分野において重要な基礎的研究でもある。すなわちこれらの研究は、我々人類の“クオリティー・オブ・ライフ”を向上させる為の持続可能な技術革新をもたらすと期待されている。


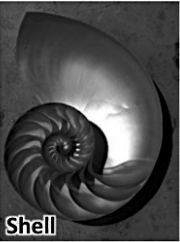


タンパク質は、天然に存在する 20 種類のアミノ酸がペプチド結合により連なったポリペプチドである。ポリペプチドはアミノ酸の種類、その配列(一次構造)および外部環境(塩濃度、pH や温度など)に依り、さまざまな二次構造を形成する事が知られている。二次構造は、アミドの水素結合の様式によりらせん状構造の α -ヘリックス、平面構造の β -シート、無秩序な構造であるランダムコイルなどの種々の構造があり、タンパク質はこれら二次構造部位が三次元的にフォールディングすることにより高次な構造を形成する。このフォールディングにより形成される構造体は、その一次、二次および三次構造、すなわち各々のタンパク質の機能発現に必要な特有な高次構造に基づく特異的な生命機能を発現しており、これは高次構造体中のアミノ酸側鎖官能基がオングストロームからナノレベルで精密に配列・配向が制御されているためである^[16,17]。これらの高次構造形成は、水素結合、配位結合、疎水性相互作用および静電相互作用などの相互作用(非共有結合性)をドライビングフォースにしており、自己組織化プロセスにより形成される^[18-20]。そのため、外部環境の変化に応答し、その構造を可逆的に変化させることで、その特異的な機能を制御している。タンパク質のモデル分子である合成ペプチド分子は、タンパク質と同様にその一次、二次および高次構造制御が可能であり、特に官能基の精密な配列・配向制御は、一般的な合成有機高分子では達成する事が困難であることから、ペプチド分子の優れたアドバンテージである。ペプチド分子の合成法には、液相法や固相法に代表される有機合成化学的手法や、遺伝子組み換えにより特定アミノ酸配列を合成する、大腸菌を用いた遺伝子工学的手法など様々

な合成手法が今日までに開発されている^[21-24]。中でも 1963 年に Merrifield によって開発された固相ペプチド合成(SPPS)法は、ポリスチレン高分子ゲルなどを樹脂として用い、樹脂上で任意のアミノ酸を順次逐次縮合していく手法である。本手法では、D-アミノ酸や側鎖官能基を化学修飾したアミノ酸などの非天然アミノ酸を導入する事が可能なことや、高い収率(ほぼ 100 %)で目的のアミノ酸配列を有するペプチドを合成する事が可能である。本博士論文は、固相法を用いて合成した人工ペプチドの二次構造を制御し、加えてその二次構造に基づく各種アミノ酸側鎖官能基の空間配置を厳密に制御した機能性集合体を構築し、生物の硬組織形成メカニズムであるバイオミネラリゼーションの機構解明、および構築した機能性有機-無機ナノ複合体の機能発現に関する研究である。

近年、生物の硬組織形成プロセスであるバイオミネラリゼーションの研究は、常温常圧下で有機-無機ナノ複合構造に基づく高機能性材料の創成を可能とする次世代の環境調和型製造プロセスとして注目されている。バイオミネラルの代表例である貝殻や骨は、官能基の空間配置が制御された特定の高次構造を有する有機材料(キチンや Nacrein、コラーゲンなどのタンパク質)と結晶構造が厳密に制御された無機材料(炭酸カルシウム、リン酸カルシウムなどのカルシウム系バイオセラミックスや酸化鉄など)がナノレベルで複合構造を形成することで、無機材料単独では成し得ない優れた性質(高い力学的強度や圧電特性など)を有している^[25-27]。Table 1-1 に生物の有するバイオミネラルの種類についてまとめた。骨や貝殻などのバイオミネラルは、その多くが骨格形成の為に使われている^[28-31]。一方、伝書鳩やミツバチなどが有するマグネトソームは、コンパスのように磁気を感知する事で、ナビゲーターとして機能していると考えられている^[32]。これまでの様々なバイオミネラリゼーションの先行研究よりバイオミネラルの形成機構は、タンパク質がテンプレートとなることで、形成される無機材料のモルフロジーや結晶構造がそのテンプレート上の官能基の種類や空間配置に大きく影響されていることが徐々にではあるが明らかになりつつある。特に炭酸カルシウムは、多種多様な生物がバイオミネラリゼーションにおいて形成している無機材料であり、最も詳細に研究されているバイオマテリアルでもあり、多くの研究報告がある。Addadi らは、核形成のためのテンプレートにスルホン酸化ポリスチレン上に吸着させたポリアスパラギン酸を用いて炭酸カルシウムのミネラリゼーションを世界で初めて報告した^[33]。Mann らは、ステアリン酸のラングミュア-ブロジェット膜をテンプレートとして使用した炭酸カルシウムの結晶成長制御を報告している^[34]。これらの研究成果は、ミネラリゼーションのテンプレートとしてラングミュア-ブロジェット膜を使った研究の原点となっている^[35]。Kato らは、多くの生物の中に存在する多糖であるキチン薄膜上で炭酸カルシウムの薄膜結晶の形成について報告している^[36]。Miyashita らは、貝の真珠層に存在する Nacrein が、炭酸脱水素酵素として機能する事で貝殻のミネラル源となる炭酸イオンを供給するだけではなく、構造形成タンパク質、すなわちテンプレートとして機能する事で炭酸カルシウムの結晶相の中でも準安定相であるアラゴナイトを形成していると報告している^[37]。Miyashita らは、Nacrein が一般的な脱水素酵素の分子サイズ(約 30 kDa)と比較して、巨大な酵素(約 48 kDa)であることを報告している。これは Nacrein タンパク質のアミノ酸配列が、脱水素酵素触媒部位と Gly-Xaa-Asn を基本構造とする繰り返し部位よりなっている事に由来することを報告している(Xaa = Asp, Asn または Glu)。この繰り返し構造は、炭酸カルシウム結晶やリン酸カル

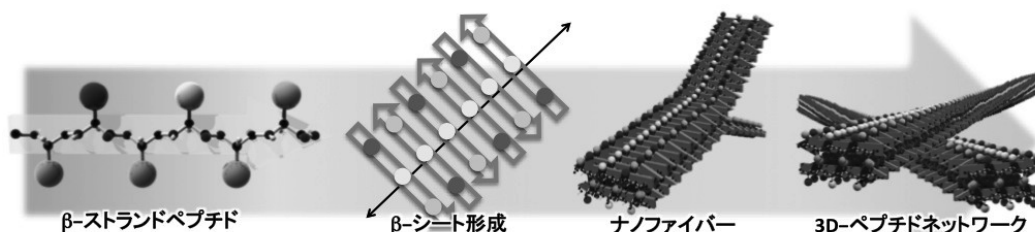
シウム結晶の形成に寄与しているコラーゲン(Glu-Xaa-Yaa: Yaa = 任意のアミノ酸)のなかでも見られる^[38,39]。この酸性アミノ酸を含むシーケンスの繰り返し部位が、カルシウムイオンを捕捉する為の結合部位として機能することで Nacrein では炭酸カルシウム結晶、コラーゲンでは、炭酸カルシウムおよびリン酸カルシウム結晶の成長を制御していることが提唱されている。

Table 1-1. The biomineral in the living systems and their organic and inorganic components.

 Bone		 Shell	 Coral	 Magnetosome
Biominerals		Organic Matters		Inorganic Matters
Bone		Collagen		Hydroxyapatite (Calcium phosphate)
Shell		Conchiolin Nacrein		Calcite and Aragonite (Calcium carbonate)
Coral		Polyp		Aragonite (Calcium carbonate)
Magnetosome		Mam protein		Magnetite (Ferric oxide)

上記で記述したバイオミネラリゼーションを模倣し、炭酸カルシウムを初めとするさまざまな無機材料のモルフォロジーや結晶構造制御に関して、有機ポリマーをテンプレートとしたミネラリゼーション研究が報告されている。Table 1-2 に代表的なミネラリゼーションをまとめた。しかし、天然のバイオミネラルを形成している Nacrein の様な多機能性テンプレートを用いたミネラリゼーション研究報告はされていない。そのため、多機能性テンプレートを用いるミネラリゼーション研究は、バイオミネラリゼーション機構解明の為の重要な知見を得ると共に、次世代の低環境負荷型の機能性材料合成の新たな手法創成に関する技術革新をもたらすと考えられる。

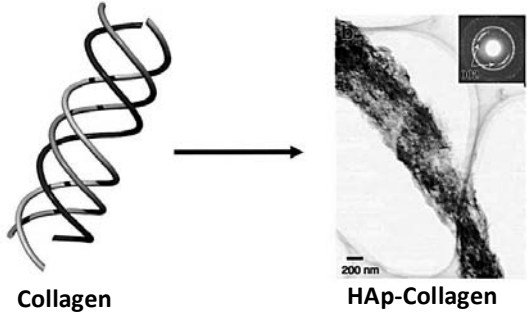
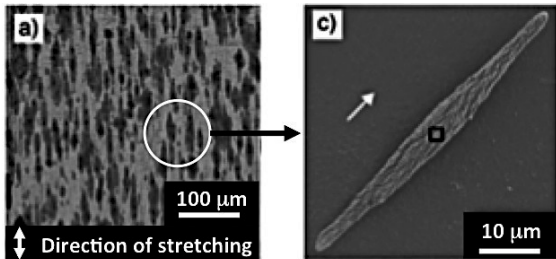
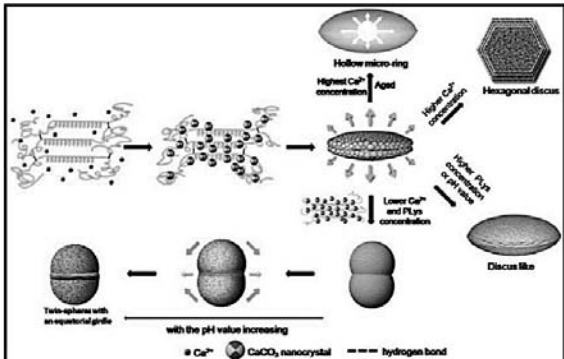
そこで、触媒様機能によるミネラル源供給能と、テンプレート効果に基づく結晶構造制御能を併せ持つ多機能性テンプレートの創成の為に、人工合成ペプチドに着目した。固相法により合成されるペプチドは、先に記述した様にアミノ酸配列を自在に制御可能であるため種々の機能発現(例えば、酵素様機能や特定外部刺激に対する応答性)が期待出来る。加えて、アミノ酸側鎖官能基の空間配置を厳密に規制することが可能であるため、ミネラリゼーションにより形成されたペプチド-無機物質間での構造相関、すなわち官能基の空間配置と得られる無機物質の結晶構造を詳細に検討する事も可能である。



Scheme 1-1. Schematic image of hierarchical self-assembly composed of the β -sheet peptide.

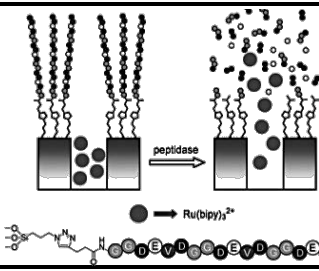
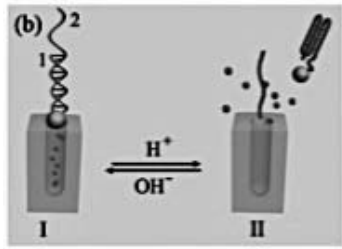
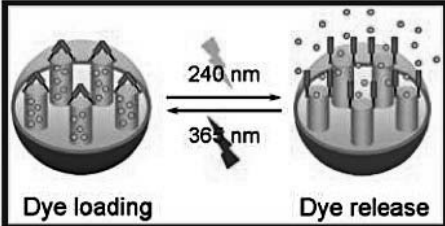
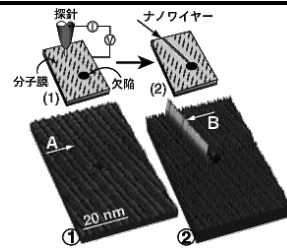
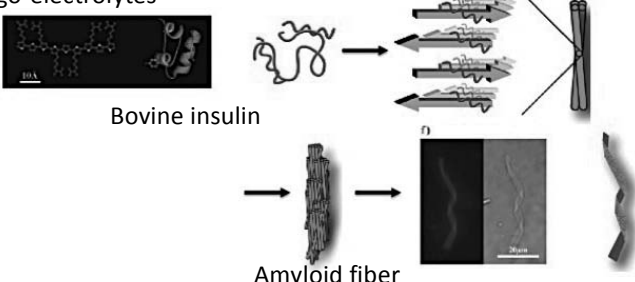
種々ある二次構造の中でも特に β -シート構造では、二次元平面上に官能基をオングストロームからナノレベルで広範囲(マイクロメートルサイズ)にわたり配列させる事が可能である為に、本論文内で用いるペプチドの主な二次構造として採用した(Scheme 1)。

Table 1-2. Mineralization system reported in the previous studies.

Organic template	Obtained inorganic material	Schematic picture	Ref.
Collagen	CaP (HAp)	 <p>Collagen</p> <p>HAp-Collagen</p>	39
Chitin	CaCO ₃ (Calcite)	 <p>a) Chitin film</p> <p>c) CaCO₃</p>	44
Poly(L-lysine)	CaCO ₃ (Vaterite)		45

また、有機-無機ナノ複合体についての研究は、上述したバイオミネラリゼーションを模倣したバイオミネラル様マテリアルの創成だけではなく、生体分子の優れた分子認識性や外部環境変化に対する応答性を利用したドラッグデリバリーシステム(DDS)用担体^[40,41]やナノエレクトロニクス用マテリアル^[42,43]などの基礎から応用に至る幅広い分野で行われている。Table 1-3 に有機-無機ナノ複合体を用いた機能性材料をまとめた。Chen らは、メソポーラスシリカ(MSN)表面上に修飾した pH 変化(pH 5.0-8.0 間)に応答する DNA の可逆的な塩基対形成-解離を利用し、薬物担持担体である MSN より厳密な薬物放出能の制御可能な DDS 担体の構築を報告している。Coll らは、MSN 表面上に固定化したペプチド

Table 1-3. Functional nano-composite material reported in the previous studies.

Research field	Schematic picture	Ref.
Drug delivery system		40
		41
		46
Nanoelectronics		43
	<p>Oligo-electrolytes</p> 	47

によりシェルを形成し、ペプチド分解酵素であるペプチダーゼによるペプチドの加水分解を薬物放出のトリガーとする担体を報告している。これらの研究から、有機材料の有する外部環境変化に対する高い認識性が、DDS 用担体の機能発現、すなわち薬物放出制御に極めて重要な役割を果たしている事がわかる。しかし、Coll らの研究では、MSN 表面のペプチドシェルが酵素反応により分解される為に、可逆的な薬物放出制御は不可能である。そのため、外部の環境変化に応答し、可逆的に薬物放出性が制御可能である薬物担持担体の開発が望まれている。また、ナノエレクトロニクス分野では、ボトムアップアプローチによるトップダウンアプローチでは達成が出来なかった微細構造より成る材料構築

が期待されている。Aono らは、基板上で走査型トンネル顕微鏡を用い、ジアセチレンを重合することで得られるナノスケールの配線材料の形成を報告している^[43]。このようにボトムアップアプローチにより得られる微細構造形成技術の発展は、電子機器の小型化、省エネルギー化や、より複雑な構造を持つ新規デバイスの創成などの可能性を秘めている事がわかる。しかし、構造を微細化させることにより、外部環境の変化に対する耐久性の低下などの問題を抱えており、有機ナノワイヤーに対して無機材料と同等の安定性を付与する事が望まれている。

本博士論文研究では、天然のバイオミネラルの一種類である貝殻を形成する Nacrein のように“ミネラル源供給能”および“結晶構造制御能”を併せ持つ多機能性ペプチドテンプレートを用い、炭酸カルシウムのミネラルリゼーション機構の解明を試みた。さらに、ミネラルリゼーションの知見を基に、工学的応用を目指したシリカ被覆ペプチドバンドルの形成とその電気化学特性の評価を行った。加えて医療分野での応用を目指した、MSN とペプチドのナノ複合体による薬物放出を厳密に制御可能な DDS 担体を構築し、その薬物放出特性の評価を行った。

以下、初めに第 2 章では、本博士論文中で用いるミネラルリゼーションの為のテンプレートや、極めて微小な外部環境変化に応答し、その二次構造転移を起こすペプチド分子の分子設計に関する設計指針を記述した。第 3 章では、ミネラルリゼーションの触媒として機能するペプチド分子の分子構造、特に側鎖官能基の配列と、二次構造に関してシリカミネラルリゼーションへの影響を検討した。第 4 章では、生物、特に貝殻の真珠層に存在する Nacrein タンパク質が行っているミネラル源を自己供給する炭酸カルシウムのバイオミネラルリゼーション機構の解明を目的に、ミネラル源供給能および結晶相の制御能を併せ持つ多機能性ペプチドテンプレートを用いた炭酸カルシウム形成機構を詳細に検討し、モルフロジーおよび結晶成長に与える影響を評価した。第 5 章および第 6 章では、ペプチドの有する自己組織化能を利用した工学および医療・福祉分野での応用を目指した新規有機-無機複合ナノマテリアルの構築を試みた。具体的に第 5 章では、 α -ヘリックスペプチドが金属配位およびマクロダイポール相互作用により自己組織化的に集合した 4- α -ヘリックスバンドルより成る金電極間を自発的に結線するナノワイヤー形成技術の確立、およびその電気化学特性の評価を行った。第 6 章では、外部環境変化(本研究では中性から弱塩基性領域における微小な pH 変化)に対する応答性を利用した DDS 用担体の構築を行い、その薬物徐放特性について評価した。第 7 章は、本研究論文の総括を行った。

Reference

- (1) A. Herman, L. Addadi, S. Weiner, *Nature*, **1988**, 331, 546-548.
- (2) S. Weiner, L. Addadi, *J. Mater. Chem.*, **1997**, 7, 689-702.
- (3) A. L. Boskey, R. Roy, *Chem. Rev.*, **2008**, 108, 4716-4733.
- (4) C. H. J. Hof, D. E. G. Briggs, *Palaios*, **1997**, 12, 420-438.
- (5) W. Ogasawara, W. Shenton, S. A. Davis, S. Mann, *Chem. Mater.*, **2000**, 12, 2835-2837.
- (6) M. A. Cariolou, D. E. Morse, *J. Comp. Physiol. B*, **1988**, 157, 717-729.
- (7) S. Sanchez, A. A. Solovlev, Y. Mei, O. G. Schmidt, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 13144-13145.

- (8) G. Hublik, F. Schinner, *Enzyme Microb. Technol.*, **2000**, 27, 330-336.
- (9) E. Quiroga, N. Priolo, D. Obregón, J. Marchese, S. Barberis, *Biochem. Eng. J.*, **2008**, 39, 115-120.
- (10) K. Sangeetha, V. B. Morris, T. E. Abraham, *Appl. Catal.*, **2008**, 341, 168-173.
- (11) R. O. Fox Jr, F. M. Richard, *Nature*, **1982**, 300, 325-330.
- (12) M. Sugawara, K. Kojima, H. Sazawa, Y. Umezawa, *Anal. Chem.*, **1987**, 59, 2842-2846.
- (13) D. F. Steiner, H. S. Anker, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1956**, 42, 580-586.
- (14) T. F. Dougherty, J. H. Chase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1944**, 57, 295-298.
- (15) P. F. Kohler, R. S. Farr, *Nature*, **1966**, 210, 1070-1071.
- (16) F. Farivar, A. A. Moosavi-Movahedi, Y. Sefilbakht, K. Nazari, J. Hong, N. Sheibani, *Biochem. Eng. J.*, **2010**, 49, 89-94.
- (17) V. Bansal, Y. Delgado, E. Fasoli, A. Ferrer, K. Griebenow, F. Secundo, G. L. Barletta, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2010**, 64, 38-44
- (18) O. Carny, D. E. Shalev, E. Gazit, *Nano Lett.*, **2006**, 6, 1594-1597.
- (19) A. Altunbas, N. Sharma, M. S. Lamm, C. Yan, R. P. Nagarkar, J. P. Schneider, D. J. Pochan, *ACS Nano*, **2010**, 4, 181-188.
- (20) N. E. Dixon, C. Gazzola, R. L. Blakeley, B. Zerner, *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 4131-4133.
- (21) S. Cavalli, A. Fernando, A. Kros, *Chem Soc. Rev.*, **2010**, 39, 241-363.
- (22) H. Klok, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 1509-1513.
- (23) J. Tulla-Puche, F. Albericio, *The Power of Functional Resins in Organic Synthesis*, Willy-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (Germany), 2008.
- (24) R. V. Uljijn, B. Baragaña, P. J. Halling, S. L. Flitsch, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 10988-10989.
- (25) E. Fukada, I. Yasuda, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **1957**, 12, 1158-1162.
- (26) P. Fratzl, H. S. Gupta, E. P. Paschalis, P. Roschger, *J. Mater. Chem.*, **2004**, 14, 2115-2123.
- (27) J. Y. Rho, L. H. Spearing, P. Zioupos, *Med. Eng. Phys.*, **1998**, 20, 92-102.
- (28) L. Addadi, S. Raz, S. Weiner, *Adv. Mater.*, **2003**, 15, 959-970.
- (29) B. Hasse, H. Ehrenberg, J. C. Marxen, W. Becker, M. Eppel, *Chem. Eur. J.*, **2000**, 6, 3679-3685.
- (30) L. Addadi, S. Weiner, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1992**, 31, 153-169.
- (31) S. Mann, *J. Mater. Chem.*, **1995**, 5, 935-946.
- (32) M. Hanzlik, C. Heunemann, E. Holtkamp-Rötzler, M. Winklhofer, N. Petersen, G. Fleissner, *BioMetals.*, **2000**, 13, 325-331.
- (33) L. Addadi, J. Moradian, E. Shay, N. G. Maroudas, S. Weiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1987**, 84, 2732-2736.
- (34) S. Mann, B. R. Heywood, S. Rajam, J. D. Birchall, *Nature*, **1988**, 334, 692-695.
- (35) A. Dey, G. de With, N. A. J. M. Sommerdijk, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 397-409.
- (36) T. Kato, *Adv. Mater.*, **2000**, 12, 1543-1546.

- (37) H. Miyamoto, T. Miyashita, M. Okushima, S. Nakano, T. Morita, A. Matsushiro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1996**, *93*, 9657-9660.
- (38) J. G. davis, J. C. Oberholtzer, F. R. Burns, M. I. Greene, *Science*, **1995**, *267*, 1031-1034.
- (39) M. Kikuchi, S. Itoh, S. Ichinose, K. Shinomiya, J. Tanaka, *Biomaterials*, **2001**, *22*, 1705-1711.
- (40) C. Coll, L. Mondragón, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, M. D. Marcos, J. Soto, P. Amorós, E. Pérez-Payá, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 2138-2140.
- (41) L. Chen, J. Di, C. Cao, Y. Zhao, Y. Ma, J. Luo, Y. Wen, W. Song, Y. Song, L. Jiang, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 2850-2852.
- (42) T. Nonoyama, M. Tanaka, Y. Inai, M. Higuchi, T. Kinoshita, *ACS Nano*, **2011**, *5*, 6174-6183.
- (43) Y. Okawa, M. Aono, *Nature*, **2001**, *409*, 683-684.
- (44) T. Nishimura, T. Ito, Y. Yamamoto, M. Yoshio, T. Kato, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 2800-2803.
- (45) Y. Yao, W. Dong, S. Zhu, X. Yu, D. Yan, *Langmuir*, **2009**, *25*, 13238-13243.
- (46) D. He, X. He, K. Wang, J. Cao, Y. Zhao, *Langmuir*, **2012**, *28*, 4003-4008.
- (47) A. Herland, P. Björk, K. P. R. Nilsson, J. D. M. Olsson, P. Åsberg, P. Konradsson, P. Hammarström, O. Inganäs, *Adv. Mater.*, **2005**, *17*, 1466-1471.

第 2 章 ペプチドの分子設計

2-1. 緒言

本章では、本博士論文中で用いたペプチド分子の分子設計指針とその集合体構造について述べる。SPPS 法により合成したペプチド分子を用いる最大の利点は、アミノ酸シーケンスである一次構造を設計し、その二次構造を制御する事で、集合体中の各アミノ酸側鎖官能基の空間配列がオングストロームからナノレベルで厳密に制御された規則的集合体形成が可能な点である。本研究で用いたペプチドは、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基(Fmoc)によりアミノ基末端が保護された Fmoc-アミノ酸を用い、Fmoc 固相ペプチド合成法により合成された。Fmoc 固相ペプチド合成についての詳細は、第 3 章 3-2-1 節で述べる。

2-2. ペプチドの分子設計

2-2-1. シリカおよび炭酸カルシウムミネラル化に用いるペプチド

第 3 章において、官能基の組み合わせ、ペプチドの二次構造およびモルフォロジーの違いがシリカのミネラル化に及ぼす影響を検討するために、2 種類のペプチドを設計・合成した。設計・合成したペプチドは、酵素の 1 種であるセリンプロテアーゼの活性サイト^[1]を構成する塩基性(ヒスチジン: H)、中性(セリン: S)および酸性アミノ酸(アスパラギン酸: D)をそのシーケンス内に有する SHE および β -シート形成能を付与するために親水・疎水性アミノ酸の交互シーケンスとした VHVEVS ペプチドである(Figure 2-1d および e)。また、上記ペプチドとの比較として、Kuno らによりシリカミネラル化に対して触媒活性を有していることが報告されている塩基性官能基(イミダゾール基)を有するヒスチジンを基本アミノ酸とした H₁₀ (Figure 2-1a)、このアミノ酸シーケンスの一部を酸性官能基(カルボキシル基)を有するアスパラギン酸(D)に置換したブロックシーケンスペプチド(H₅D₅: Figure 2-1b)および交互シーケンスペプチド[(HD)₅: Figure 2-1c]を比較用ペプチドとして用いた^[2]。固相合成に用いる Fmoc-アミノ酸には、Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OBu^t) · H₂O-OH および Fmoc-Ser(Bu^t)-OH (ペプチド研究所)をそれぞれ用いた。また、合成用樹脂には、C 末端が

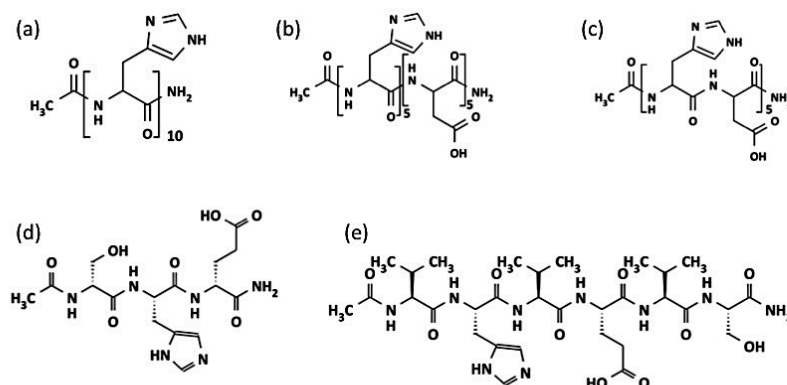
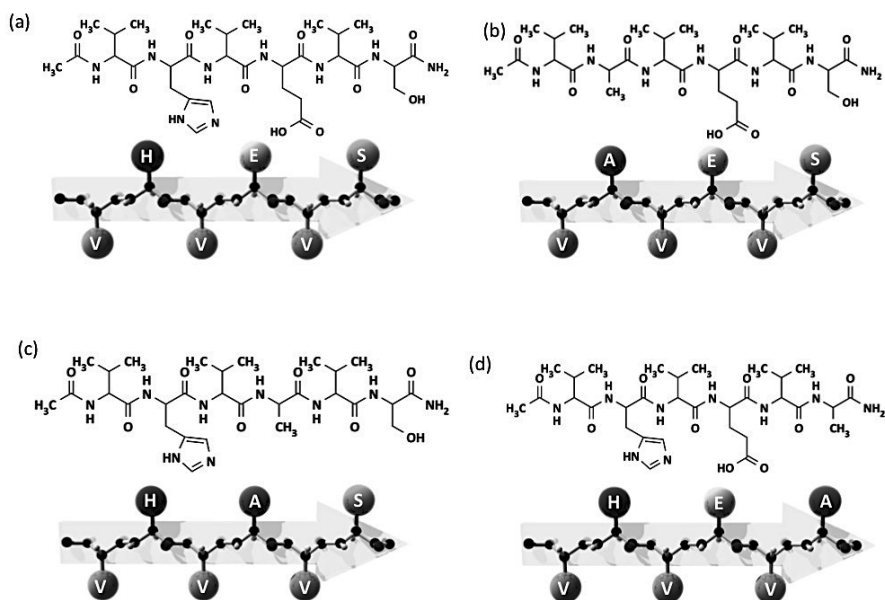


Figure 2-1. Molecular formulas of (a) H₁₀, (b) H₅D₅, (c) (HD)₅, (d) SHE, and (e) VHVEVS.

また、第 4 章において、炭酸カルシウムの“自己供給型ミネラルゼーション”のためにミネラル源の自己供給能および結晶相制御能を併せ持つ、4 種類の多機能性ペプチド(VHVEVS、VAVEVS、VHVAVS および VHVEVA: Figure 2-2)を設計した。本章では、アミノ酸側鎖官能基の二次元配列を目的にアンチパラレル β -シート構造を形成するように親水・疎水性アミノ酸の交互シーケンス^[3]を基本骨格とした。今回用いたペプチドは、酵素の 1 種であるセリンプロテアーゼの活性サイトを構成する塩基性、中性および酸性アミノ酸(ヒスチジン、セリンおよびアスパラギン酸)をその一次構造中に有し、疎水性アミノ酸としてバリンを導入した。本来、触媒三残基を構成する酸性アミノ酸は、アスパラギン酸であるが、本研究では、アスパラギン酸の側鎖官能基より高い自由度を有する酸性アミノ酸であるグルタミン酸(E)を用いた。これらのアミノ酸は、酵素の活性中心で行われているヒスチジン側鎖イミダゾール基によるセリン側鎖ヒドロキシル基中のプロトンの引き抜きによる効果的な電荷リレー効果^[4]を模倣した酵素様活性の発現を目的に設計した。また、酵素様活性へ各種親水性アミノ酸が与える影響を検討するために、親水性アミノ酸を一つずつアラニン(A)に置換した VAVEVS、VHVAVS および VHVEVA も同様に設計した。隣接する親水性アミノ酸の α 炭素間の間隔は、ペプチドファイバー短軸および長軸方向(ストランド間距離^[5])にそれぞれ 0.7 および 0.47 nm である。Fmoc-アミノ酸には、Fmoc-Val-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Glu(OBu^t) \cdot H₂O-OH、Fmoc-Ser(Bu^t)-OH および Fmoc-Ala \cdot H₂O-OH(ペプチド研究所)を用いた。また、合成用樹脂には、C 末端がアミド基となるアミド樹脂(CLEAR-Amide-Resin: ペプチド研究所)を用いた。



2-2-2. 自発的に導電性ナノワイヤーを形成するペプチド

10

ールとの結合サイトとして機能するヒドロキシル基を有するセリンを、そしてシリカミネラリゼーションを触媒する酸性アミノ酸であるグルタミン酸と塩基性アミノ酸であるリジンを含む一次構造を持つ(Figure 2-3a)。上記ペプチドが α -ヘリックス構造を形成し、かつ金属配位子であるヒスチジン側鎖イミダゾール基が、棒状ヘリックス分子の片側側面に集中する場合には、金属原子とイミダゾール基間の錯体形成により、内部に金属錯体の一次元配列を有するヘリックスバンドルの形成が期待出来る。そこで、ペプチドの一次構造は、ヘリックスバンドル形成を目的に、配位子であるヒスチジンを含む疎水性アミノ酸が α -ヘリックスの片側に集中するように設計した(Figure 2-3b)。ヒスチジンに配位する金属に、6 配位 8 面体構造をとるコバルト(II)を用いる事で、 α -ヘリックスペプチドのヒスチジン側鎖イミダゾール基と平面 4 配位し、対アニオンが軸 2 配位する錯体構造を形成する事で 4- α -ヘリックスバンドルの形成が可能となる。またコバルト(II)を用いる別の理由として、立体化学的な位置関係も挙げられる。ヘリックスペプチドの直径約 1.1 nm を考慮すると、ヘリックスペプチドが隙間なく六方最密充填した場合、向かい合うヘリックス同士の距離は約 0.9 nm となる。しかし、コバルト(II)とイミダゾール基間の配位結合距離 0.2 nm とコバルト(II)の直径(0.1 nm)を考えると、イミダゾール-コバルト(II)-イミダゾールの距離は、0.5 nm となり、ヘリックス間距離より短くなり、結合は不可能であると考えられる。しかし、3 つのヒスチジン側鎖イミダゾール基は、ヘリックス軸方向に対して斜めに配置されるため、このヘリックス間隔の距離が短くなり、バンドル内に錯体が形成可能な距離になると考えられる(Scheme 2-4)。これは、ルテニウムの様な側鎖イミダゾール基と平面 6 配位の錯体形成を用いたバンドル形成ではさらにこの解離が大きくなり、より困難になると考え、本論文ではコバルト(II)との錯形成を採用した。

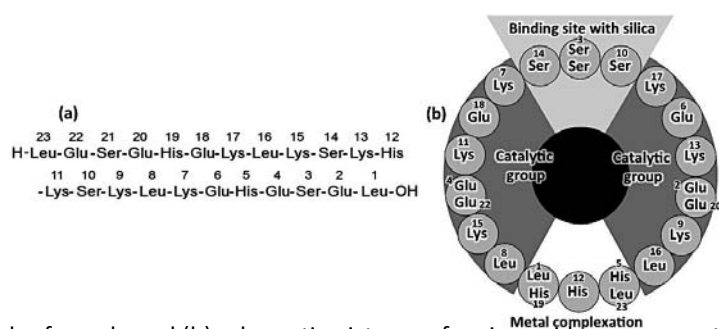


Figure 2-3. (a) Molecular formula and (b) schematic pictures of amino acid arrangement of the Pep-GLS.

リジンは、シリカミネラリゼーションの触媒として機能するためアミノ酸シーケンス内へ導入した。また、塩基性アミノ酸(アミノ基やイミダゾール基など)の近傍に酸性アミノ酸(カルボキシル基など)が存在する場合、シラノール基間の脱水縮合反応が促進する事が知られている^[5]。そのため、リジン近傍にグルタミン酸を導入した。セリンは、以下 2 点の目的の為に導入した。第 1 の目的として、グルタミン酸とリジンが親水部で交互に配置したペプチドでは、上記アミノ酸の静電相互作用によりヘリックス構造形成が阻害されるため、これを緩和するた

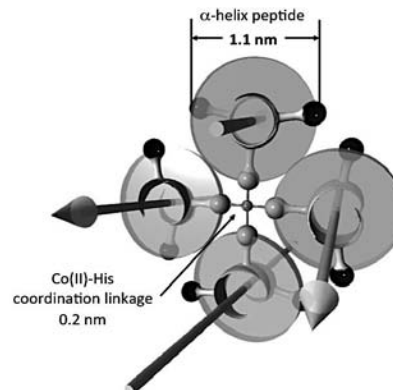


Figure 2-4. Stereoscopic distance of α -helix peptide's diameter and coordination linkages between Co(II) and α -helical peptide.

めである。第 2 の目的として、セリン側鎖ヒドロキシル基が、シリカミネラルゼーションにおいてシリカとの反応点となる事を期待し、導入した。以上のコンセプトから LESEHEKCLKSKHKSLKEHESEL (Pep-GLS)を設計した。

また、電極表面への上記ペプチドバンドルの固定化を目的に、同ペプチドバンドルの接点を電極基板表面に形成するため、金電極表面との結合サイトとして同ペプチドの *N* 末端にリポ酸を導入した lipoic acid-LESEHEKCLKSKHKSLKEHESEL (Lipo-Pep-GLS) も設計した。Fmoc-アミノ酸には、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Glu(OBu^t)・H₂O-OH、Fmoc-Ser(Bu^t)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH および Fmoc-Lys(Boc)-OH(ペプチド研究所)をそれぞれ用いた。合成用樹脂には、*C* 末端がカルボキシル基となるアシッド樹脂(Fmoc-Leu-CLEAR-Acid-Resin: ペプチド研究所)を用いた。

2-2-3. メソポーラスシリカ上のナノゲートとして機能する微小 pH 応答性ペプチド

第 6 章では、ペプチドの二次構造転移(β -シート \rightleftharpoons ランダムコイル)を利用したナノゲートシステムとして、わずかな pH 変化に応答することで薬物放出特性を変化させるペプチド-MSN 複合体 (Pep-MSN)の創成を目的に、以下のペプチドを設計した。 β -シート構造は、親水・疎水性アミノ酸の交互シーケンス[(VKVS)₄]を用いた。種々存在するペプチドの二次構造中においても β -シート構造は、非常に安定である事が知られている。そこで、pH 変化により β -シート構造を他の構造へ転移させるために、一次構造中のアミノ酸側鎖官能基間の静電反

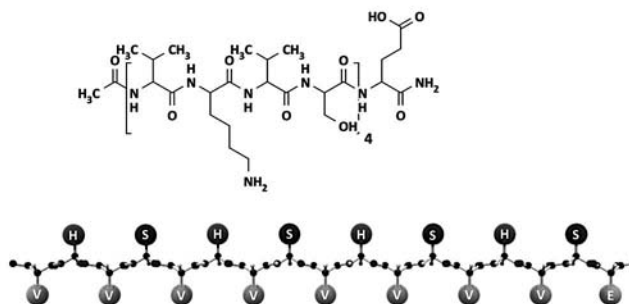


Figure 2-5. Molecular formula and schematic picture of the [(VKVS)₄E] peptide.

発が有効な相互作用であると考えられる。酸性環境下において側鎖官能基が、プロトン化する塩基性アミノ酸(リジン; K)をイオン性親水性アミノ酸として用いた。また、薬物担持無機担体となるメソポーラスシリカへの結合サイトとしてアミノ酸側鎖官能基にカルボキシル基を有するグルタミン酸を、溶解度向上のために極性非イオン性側鎖を有するアミノ酸であるセリンをそれぞれ用いた。疎水性アミノ酸には、バリンを用いて[(VKVS)₄E]ペプチドを設計した(Figure 2-5)。Fmoc-アミノ酸には、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ser(Bu^t)-OH および Fmoc-Glu(OBu^t)・H₂O-OH(ペプチド研究所)をそれぞれ用いた。また、合成用樹脂には、*C* 末端がアミド基となるアミド樹脂(CLEAR-Amide-Resin: ペプチド研究所)を用いた。

Reference

- (1) L. Headstrom, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 4501-4523.
- (2) T. Kuno, T. Nonoyama, K. Hirao, K. Kato, *Langmuir*, **2011**, 27, 13154-13158.
- (3) T. C. Holmes, S. Lacalle, X. Su, G. Liu, A. Rich, S. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2000**, 97,

- (4) S. Scheiner, D. A. Kleier, W. N. Lipscomb, *Proc. Acad. Sci. U.S.A.*, **1975**, 72, 2606-2610.
- (5) D. A. Kirschner, C. Abraham, D. J. Selkoe, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1986**, 83, 503-507.
- (6) A. F. Wallace, J. J. DeYoreo, P. M. Dove, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 5244-5250.

第3章

酵素の活性中心を模倣した高い電荷リレー効果を有する ペプチドを用いたシリカのミネラル化

3-1. 緒言

貝殻や骨、歯などに代表されるバイオミネラルは、ナノスケールで構造が制御された有機-無機複合体である^[1-3]。これらのバイオミネラルは有機-無機複合構造に基づき、有機物質の“しなやかさ”と無機物質の“硬さ”を併せ持つ優れた力学特性を有している。これらのバイオミネラルを生物が形成するプロセスは、バイオミネラル化と呼ばれている^[4,5]。このプロセスは、人間を初めとする様々な生物が行っている硬組織合成プロセスであるとともに、バイオミネラルの主成分である無機物質の結晶相や結晶方位などの構造がキチンやシラフィン、コラーゲンなどの生体高分子により厳密な制御を達成されるため、次世代の機能性材料の創成手法として注目されている。

コラーゲンやシラフィンは、バイオミネラル化の有機テンプレートとして用いられる生体高分子であり、これらテンプレートの表面上に存在する各種官能基(アミノ基やカルボキシル基など)がバイオミネラル化プロセスにおける触媒として機能している事が知られている^[6-9]。例えば、アミノ基は、効果的にシラノール間の脱水縮合反応を触媒する事でシリカのミネラル化を促進し、カルボキシル基は炭酸カルシウムやリン酸カルシウムのミネラル化において、カチオンの結合サイトとして機能することで無機物質の形成を促進している。シリカは、珪藻や海洋生物中においてよく見られるとともに、工業分野においても利用されている無機材料である。シリカミネラル化において Kuno ら^[10]や Wallace ら^[11]は、アミノ基やカルボキシル基の官能基が単独で存在する場合と比較して、アミノ基/カルボキシル基が共存する界面においてシリカのミネラル化が促進される事を報告している。これは、アミノ基と、その近傍に存在するカルボキシル基とのイオン対形成による官能基間での協調効果、いわゆる“電荷リレー効果”により、上記の触媒作用が促進され、シリカが同界面において効率的に形成されることを報告した。

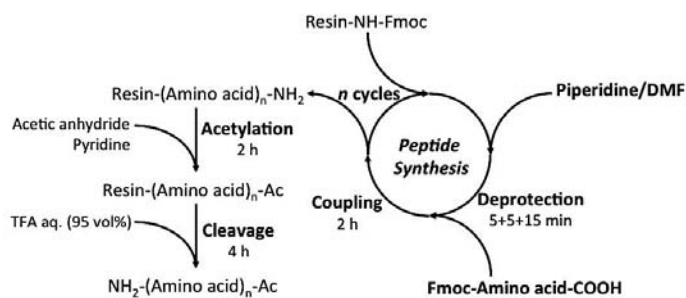
本章では、シリカミネラル化の触媒として機能するペプチド分子の有する側鎖官能基の配列の差により、形成されるシリカへ与える影響を詳細に検討した。具体的には、シリカミネラル化を触媒する塩基性側鎖のイミダゾール基を有するヒスチジンと、酸性側鎖のカルボキシル基を有するグルタミン酸を含む種々のペプチドをテンプレートとして用い、ヒスチジンとグルタミン酸間の電荷リレー効果に与えるヒスチジンとグルタミン酸の配列、すなわちペプチドの一次構造とペプチドコンフォメーション(二次構造)の影響を検討した。本研究では、ミネラル化によるシリカ形成における電荷リレー効果に関する基礎的知見を得るだけでなく、工業的に価値の高い機能を導入したシリカの低環境負荷型の合成プロセスを確立する事が期待出来、その潜在的価値は高いと考える。

3-2. 実験

3-2-1. Fmoc 固相ペプチド合成

本博士論文研究で用いた各ペプチドは、固相合成装置を使用した Fmoc 固相ペプチド合成法(Fmoc-

SPPS)により合成した(Scheme 3-1)。ペプチド C 末端のカルボキシル基をアミド化する場合には、ペプチドを担持する樹脂に、CLEAR-amide-resin(ペプチド研究所)を、一方 C 末端をカルボキシル基として残す場合には、CLEAR-acid-resin(ペプチド研究所)をそれぞれ用いた。本章で



Scheme 3-1. Protocol of solid phase peptide synthesis.

用いるペプチドは、ヒスチジンとグルタミン酸側鎖のシリカミネラリゼーションに対する影響を検討するため、両末端のカルボキシル基およびアミノ基を保護する必要があり、ペプチド担持樹脂には CLEAR-amide-resin を用いた。以下に合成手順を記述する。0.5 mg の CLEAR-amide-resin をジクロロメタン(DCM) 5 mL 中に分散させ、30 分間振とうすることで樹脂を膨潤させた。その後、吸引ろ過により DCM を除去し、次に、樹脂上に存在するアミノ酸の縮合点であるアミノ基の Fmoc 保護基の脱保護を行う為に、ピペリジン/DMF 混合溶液(1/4 v/v)を 5 mL 加え、3 分間振とうした。吸引ろ過後、同操作を繰り返した。さらに上記 20 vol% ピペリジン/DMF 混合溶液を加え、15 分間振とうした。その後、*N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF)を 5 mL 加え、1 分間振とうした。吸引ろ過により DMF を除去し、同操作を 4 度繰り返し樹脂の膨張および溶媒置換を行った(DMF 洗浄)。DMF 洗浄後、洗浄液を pH 試験紙にて検査し、ピペリジンが検出されなくなるまで DMF 洗浄を繰り返した。

次に側鎖保護アミノ酸カルボキシル基の活性化、および Fmoc 脱保護後の樹脂への縮合反応は以下に従って行った。樹脂に担持されたアミノ基に対して 3 倍モル量の Fmoc-アミノ酸、1-ヒドロキシ 7-アゾトリアゾール(HOAt)および *N,N*-ジイソプロピルカルボジイミド(DIPCDI)をそれぞれ 3、1 および 1 mL の DMF に溶解させ、各溶液を調製した。本縮合反応では、アズラクトン経由で α 位のラセミ化を防ぐ為に高い求核性を持つ HOAt を、縮合剤として DIPCDI をそれぞれ用いた。Fmoc-アミノ酸、HOAt および DIPCDI のモル比は、1:1:1 とした。調製した Fmoc-アミノ酸、HOAt および DIPCDI 溶液を反応容器中に加え 2 時間振とうすることで樹脂上のアミノ基と Fmoc-アミノ酸のカルボキシル基間での縮合を行った。縮合反応後、吸引ろ過により反応溶液を除去し、DMF 洗浄を行った。縮合反応の進行は、2,4,6-ニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)試験を行い確認した。具体的には、樹脂を少量反応容器より取り出し、ピクリルスルホン酸/DMF 溶液(1 wt%)と *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン/DMF 溶液(10 wt%)をそれぞれ 5 μ L ずつ混合した溶液中に 5 分間浸し、樹脂の呈色により確認した(赤: 反応点であるアミノ基が露出しており縮合が未完了、無色: 反応が終了)。これらの一連の操作を目的のアミノ酸配列を有するペプチドが得られるまで繰り返し行った。本章では、SHE および VHVEVS のシーケンスを持つ 2 種類のペプチドを合成し、これらのペプチドがシリカミネラリゼーションに与える影響を検討するための比較ペプチドとして、Kuno らによって報告された His-His-His-His-His-His-His-His-His(H₁₀), His-His-His-His-His-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp(H₅D₅), および His-Asp-His-Asp-His-Asp-His-Asp-His-Asp(HD)₅ の 3 種類のペプチドを用いた。

アミノ酸の縮合後、ペプチド主鎖 N 末端のアセチル化を行った。20 vol% ピペリジン/DMF 混合溶液

を反応容器へ加えることで *N* 末端アミノ酸の Fmoc 基を脱保護し、その後 DMF 洗浄を行った。主鎖 *N* 末端のアセチル化を行うために、無水酢酸/ピリジン混合溶液(1/2 v/v)を 6 mL 加え 2 時間振とう後、吸引ろ過し、さらに上記アセチル化の操作をもう一度行った。その後 DMF 洗浄し、DCM を 5 mL 加え 3 分間振とうした。同様の操作を 3 回行った後、真空下でペプチド樹脂を十分に乾燥させた。

樹脂からペプチドの切断は以下に従って行った。乾燥させたペプチド樹脂を反応容器からバイアルに移し、トリフルオロ酢酸(TFA)/H₂O 混合溶液(95/5 v/v)を 10 mL 加え 4 時間攪拌した。反応溶液は深黄色に呈色した。その後、反応溶液をフィルターを通して吸引ろ過し樹脂と反応液を分離し、さらに TFA で樹脂が透明になるまで洗浄し、洗浄液も先の反応液と同様に回収した。反応溶液はアスピレーターを用いて可能な限り TFA を除去した。続いて、-20 °C に冷却したジエチルエーテル約 200 mL を先に回収した反応溶液に攪拌しながら徐々に注ぎペプチドを沈殿させ、30 分間攪拌した。沈殿操作中は攪拌溶液を氷水で冷却しながら行った。その後、ペプチド懸濁液を遠沈管にとり 4000 rpm、10 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を除去した。同様の操作をすべての懸濁液を分離するまで繰り返した。得られた沈殿物をジエチルエーテルで洗浄し、その後室温で乾燥させた。乾燥した沈殿物を水に溶解させ、凍結真空乾燥することで目的のペプチドを得た。

3-2-2. 円偏光二色性測定によるペプチドの二次構造評価

水溶液中でのペプチドの二次構造は、円偏光二色性(CD)スペクトルを用いて評価した。ペプチド水溶液の濃度は 1.0 mM に固定し、調製したペプチド水溶液を石英セル(光路長: 0.1 cm)に満たし、これを測定サンプルとした。CD スペクトル測定は、室温・窒素雰囲気下で円偏光二色性分散計(J-820、日本分光)を用いて波長領域 190–260 nm、積算回数 16 回の条件で行った。ペプチドの二次構造は、3-1 式より得られるモル楕円率 $[\theta]_{\lambda}$ (deg · cm² · dmol⁻¹)より評価した。

$$[\theta]_{\lambda} = \frac{\theta_{\lambda}}{10nCL} \quad \text{式 (3-1)}$$

ここで θ_{λ} は楕円率(mdeg)、*n* はアミノ酸残基数、*C* はペプチドモル濃度(M, ここでは 1.0×10^{-3} M に固定)および *L* は光路長(cm, ここでは 0.1 cm に固定)である。また、測定により得られたスペクトルのモル楕円率の値から 3-2 式を用いてカーブフィット法より、各二次構造の含有率を決定した^[12]。

$$[\theta]_{\lambda} = \alpha[\theta_{\alpha}]_{\lambda} + \beta[\theta_{\beta}]_{\lambda} + (1 - \alpha - \beta)[\theta_{\gamma}]_{\lambda} \quad \text{式 (3-2)}$$

上記式において $[\theta_{\alpha}]_{\lambda}$ 、 $[\theta_{\beta}]_{\lambda}$ 、 $[\theta_{\gamma}]_{\lambda}$ は、それぞれ各波長における分散型 α -ヘリックス、 β -シートおよびランダムコイル構造の基準スペクトルのモル楕円率であり、 α および β は、 α -ヘリックスと β -シート構造の含有率を示す。ここでは、ペプチドは、 α -ヘリックス、 β -シートおよびランダムコイル以外の二次構造は取らないと仮定した。

3-2-3. ガスクロマトグラフィーによるトリメチルエトキシシラン加水分解率と縮合率

テトラエトキシシラン(TEOS)をシリカ源としたシリカミネラリゼーションは、下記反応により進行する(Scheme 3-2a)。ここでペプチドによるシランからシラノールへの加水分解、およびシラノール間の縮合反応を定量するために、モデル系を用い検討した(Scheme 3-2b)。具体的にはトリメチルエトキ

タする事で、白金のナノ薄膜をコートした。FE-SEM 観察時の加速電圧は、10 kV とした。また、TEM 観察においてサンプルは、エラスチックカーボン支持膜付銅グリッド上へ吸着させた。TEM 観察時の加速電圧は、200 kV とし、無染色下で Ultra Scan CCD カメラ(Orinus, Gatan Inc.)にて撮影を行った。ペプチドを含まない系である“コントロール”に関しても同様に行った。

3-2-6. エネルギー分散型 X 線分析(EDX)による元素分析

JEM-z2500 に付属したエネルギー分散型 X 線分光器(EDX, JED-2300, JEOL)を用いて元素マッピング分析を行った。EDX 測定では、TEM モードから STEM モードにて暗視野または明視野走査像を取得し、カルシウム、炭素、窒素および酸素の各元素マッピング分析を行った。この測定時のカメラ長およびスポットサイズは、それぞれ 4 m および 1.0 nm とした。

3-2-7. 窒素吸着測定によるシリカの細孔分布、比表面積および空間容量測定

ミネラリゼーションにより得られたシリカの有する細孔分布、比表面積および空間容量を得る為に、液体窒素の沸点温度(77 K)での窒素分子の吸脱着等温線を測定し、BET の式 3-3 より比表面積を、BJH 法により細孔径分布を求めた。測定装置は、Tristar3000(島津製作所)を用いた。

$$\frac{1}{W[(\frac{P_0}{P})-1]} = \frac{C-1}{W_m} (\frac{P}{P_0}) \frac{1}{W_m} \quad \text{式(3-3)}$$

式 3-3 における W は吸着平衡圧 P におけるガス分子の吸着量(mL)、P₀ は飽和蒸気圧(atm)、P は圧力(atm)、W_m は単分子層吸着量(mL)、C は BET 定数である。BET 定数は式 3-4 より求める事が出来る。

$$C = \exp \left\{ \frac{E_1 - E_2}{RT} \right\} \quad \text{式(3-4)}$$

式 3-4 における E₁ は第 1 層の吸着熱(kJ/mol)、E₂ は吸着質の測定温度における液化熱(kJ/mol)である。比表面積 S (m²/g)は式 3-5 より算出した。

$$S = \frac{W_m \times N \times A}{W} \quad \text{式(3-5)}$$

式 3-5 における N はアボガドロ数、A は吸着断面積(窒素では 16.2 Å²)、W はサンプル重量(g)である。細孔直径 D (Å)は式 3-6 により求める事が出来る。

$$D = 2 \times \left(\frac{4.148}{\log(\frac{P_0}{P})} + \left(\frac{13.99}{\log(\frac{P_0}{P}) + 0.034} \right)^2 \right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{式(3-6)}$$

3.3. 結果・考察

3-3-1. ペプチドテンプレートの構造

Fmoc-SPPS 法により合成したペプチド(SHE および VHVEVS) は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法-飛行時間質量分析計(MALDI-TOF-MS: JEM-S3000, JEOL)を用いて合成の確認を行った(Figure 3-1)。いずれのペプチドにおいても、測定で得られた分子量は、計算から求めた[ペプチドの分子量+H]⁺の値と一致した事から設計ペプチドの合成を確認した。([SHE+H]⁺ 実測値: 411.2、計算値: 412.2、[VHVEVS+H]⁺ 実測値: 710.6、計算値: 709.4)

Figure 3-2 は、pH を 7.0 に調製した各ペプチド水溶液の CD スペクトルを示す。SHE ペプチドの CD スペクトルは、198 nm に負の極大ピークが見られたことから、その二次構造がランダムコイル構造であると考えられる^[13]。一方、VHVEVS ペプチドは、218 nm で負の極大ピークを示した^[14]。

このピークは、VHVEVS ペプチドの二次構造が主として β -シート構造であることを示唆する。各ペプチドの二次構造含率は、それぞれの CD スペクトルを式 3-2 を用い、カーブフィット法により求め、Table 3-1 にまとめた。一方、上記ペプチドとの比較ペプチドとして H₁₀, H₅D₅および(HD)₅を用いた。これらのペプチドの二次構造は、Kuno らによりランダムコイルである事が報告されている^[10]。

各ペプチドのモルフォロジーは、TEM を用いた直接観察により得た。SHE および VHVEVS ペプチドの TEM 像を、Figure 3-3 に示す。VHVEVS ペプチドは、三次元ナノネットワーク構造のモルフォロジーを有していた(Figure 3-3b)。この三次元ナノネットワークは、VHVEVS ペプチドが β -シート構造の片面側に存在するバリン側鎖イソプロピル基よりなる疎水面同士の疎水性相互作用により形成される二分子膜状のナノファイバーが階層的に自己集合することで形成したと考えられる。その一方、SHE ペプチドでは、VHVEVS が形成したナノファイバー集合体や粒子状集合体を観察する事が出来なかった(Figure 3-3a)。この結果は、SHE ペプチドが VHVEVS ペプチドとは異なり、水溶液中で特定の会合体を形成する事なく分子分散した状態で存在している事を示唆する。

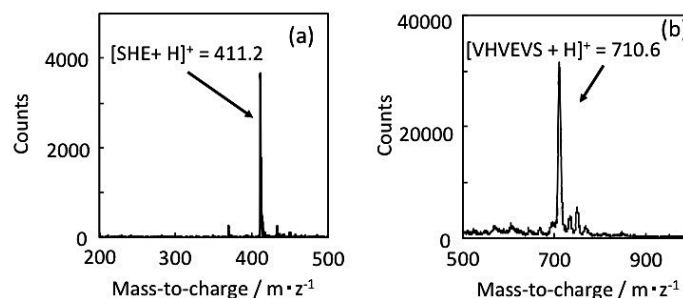


Figure 3-1. MALDI-TOF-MS spectra of the (a) SHE and (b) VHVEVS peptides.

Table 3-1. Fractions of secondary structure of the SHE and VHVEVS peptides.

Peptide	Conformation/ %		
	α -helix	β -sheet	random coil
SHE	0	34	66
VHVEVS	0	85	15

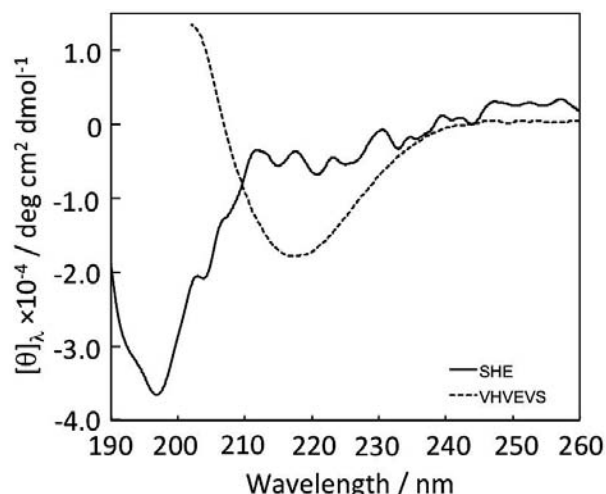


Figure 3-2. CD spectra of the SHE and VHVEVS peptides.

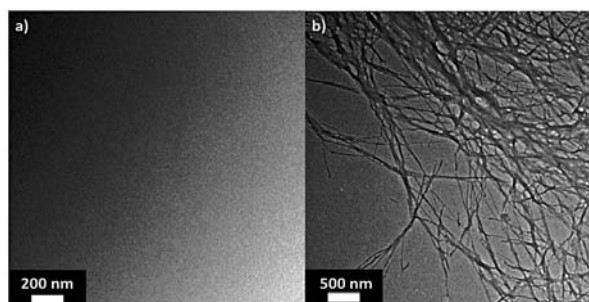


Figure 3-3. TEM images of the (a) SHE and (b) VHVEVS peptides.

3-3-2. ガスクロマトグラフィーによるトリメチルエトキシシラン加水分解活性評価

SHEおよびVHVEVSペプチドがシラノール間の脱水縮合反応の触媒として作用するかを検討する為

に、TMEOS をモデル化合物として、ペプチド水溶液中での TMEOS の加水分解および脱水縮合を GC により評価した。Figure 3-4 は、GC 分析より得たペプチド存在下での TMEOS の加水分解および縮合反応より生成された TMS、HMDS および未反応の TMEOS の重量比を示す。先行研究において、基質である TMEOS は、ペプチドの非存在下においても速やかに加水分解されるこ

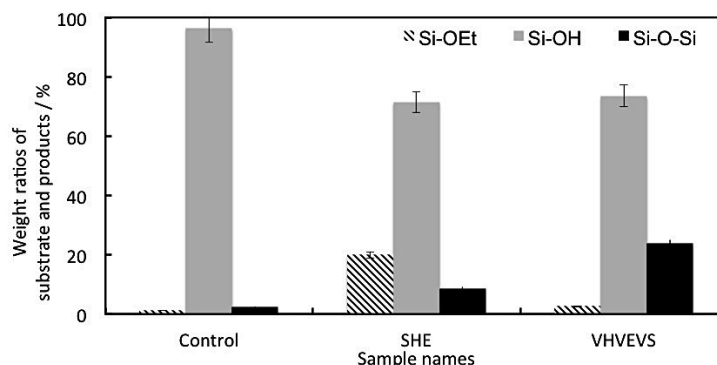


Figure 3-4. Weight ratios of the substrate, intermediate, and end product in the hydrolysis and dehydration reactions of trimethylethoxysilane. The peptide concentration was 1 mM.

とを明らかにしている^[10,15]。加水分解反応により生成された TMS 中間体は、ペプチドの非存在下において脱水縮合反応を経て最終生成物の HMDS へと変換される事はなかった(Figure 3-4; control)。しかし、SHE および VHVEVS ペプチドを含む水溶液中では、TMS が脱水縮合反応により HMDS へ変換された。

この結果は、SHE および VHVEVS の両ペプチドが中間体である TMS の脱水縮合反応に必要な触媒活性を有している事を示した。興味深い事に、ペプチドの触媒活性が、ランダムコイル型の SHE ペプチドと β -シート型の VHVEVS では明らかに異なり、SHE ペプチドと比較して VHVEVS ペプチドで高い事がわかる。この触媒活性の差は、 β -シート型ペプチドにおいてヒスチジン側鎖イミダゾール基とグルタミン酸側鎖カルボキシル基間で生じる“電荷リレー効果”の発生頻度の影響であると考えられる。SHE ペプチドは、TEM 観察より水溶液中で分

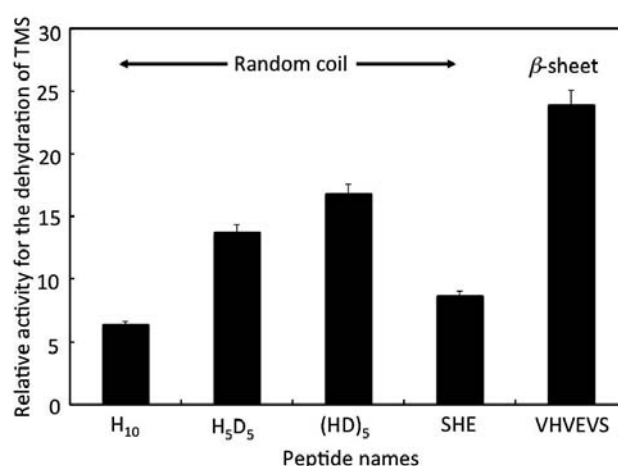


Figure 3-5. Relative activities of various peptides for the dehydration of TMS. The relative activity values were calculated as the weight ratio of HMDS of the number of His residues.

子分散状態にあると考えられるため、ペプチド分子内でしか電荷リレー効果を発現する事が出来ない。しかし VHVEVS ペプチドは、 β -シート構造に基づく巨大な集合体を形成するため、ペプチド分子内だけではなく、分子間すなわち β -シートのストランド間および β -シート間での電荷リレー効果を発現する事が可能であると考えられる。それゆえ、先に述べた触媒活性に大きな影響が生じたと推察した。

次に、TMS の縮合の為の電荷リレー効果にペプチドの一次構造と二次構造がどのような影響を与えるか検討した。縮合反応の触媒として機能する塩基性アミノ酸一つあたりの活性を比較する為に、H₁₀、H₅D₅、(HD)₅、SHE および VHVEVS ペプチドの相対活性を求めた。Figure 3-5 は、Figure 3-4 で得られた最終生成物である HMDS の重量比を塩基性アミノ酸(ヒスチジン)の数で割った塩基性官能基あたりの規格化した HMDS 重量比を示す。 β -シート型ペプチドである VHVEVS は、他のすべてのランダムコイル型ペプチドより高い相対活性を示した。また、SHE ペプチドの相対活性は、同じランダムコイ

ル型の H_5D_5 および $(HD)_5$ より低く、 H_{10} と同等の値であった。 H_5D_5 および $(HD)_5$ ペプチドの塩基性および酸性アミノ酸側鎖間の分子内相互作用は、SHE ペプチドと比較しても容易に生じると考えられるため、SHE の低い相対活性は、これら塩基性および酸性アミノ酸間のペア形成の減少に基づくと考えられる。従って、TMS の脱水縮合反応に対して高い活性を有する VHVEVS は、 β -シート表面上で他の系より高い密度で塩基性および酸性アミノ酸間のペア形成すなわち、効果的な電荷リレー効果が生じるため TMS の縮合反応を促進したと考えられる。

3-3-3. シリカミネラルゼーションに与えるペプチドのモルフォロジーと電荷リレー効果の影響

前節において SHE および VHVEVS ペプチドが TMS の縮合反応に対する触媒活性を有し、特に β -シート構造を形成する VHVEVS において、その電荷リレー効果に基づく効果的なシラノール間の縮合反応を触媒する事を示した。本節では、シリカ源として TEOS を用い、これらペプチドをテンプレートとするシリカミネラルゼーションを行った。ミネラルゼーションにより得たシリカのモルフォロジーは、FE-SEM および TEM により観察した(Figure 3-6)。FE-SEM および TEM 像からは、形成されたシリカが巨大なキュービク状粒子であることが明らかとなった。しかし、FE-SEM 観察により得られたシリカの表面モルフォロジーは、テンプレートとして用いたペプチドにより明らかに異なる。テンプレートとして β -シート型 VHVEVS ペプチド用いて得たシリカは、平滑な平面を有する粒子であった(Figure 3-6c)。その一方、ランダムコイル型 SHE ペプチドにより形成されたシリカの表面モルフォロジーは、多数の空隙を有する構造であった(Figure 3-6a)。この表面モルフォロジーの差は、TEM 観察からも明らかである(Figure 3-6b, d)。窒素ガス吸脱着測定から、各ペプチドをテンプレートとして形成されたシリカの比表面積および空間容量を求めた。VHVEVS ペプチドを用い形成したシリカの比表面積および空間容量は、それぞれ $760 \text{ m}^2/\text{g}$ 、 $0.18 \text{ cm}^3/\text{g}$ であるのに対して、SHE ペプチドにより得たシリカの比表面積および空間容量は、 $862 \text{ m}^2/\text{g}$ 、 $0.33 \text{ cm}^3/\text{g}$ であり(Figure 3-7)、SHE をテンプレ

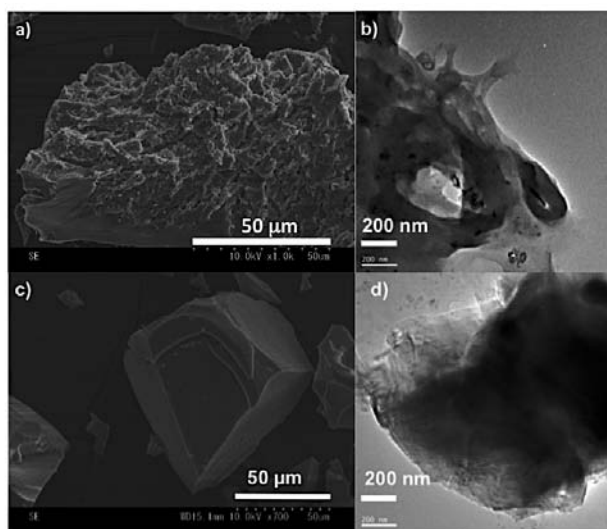


Figure 3-6. (a) FE-SEM and (b) TEM images of the silica mineralized by the SHE peptide. (c) FE-SEM and (d) TEM images of the silica mineralized by the VHVEVS peptide.

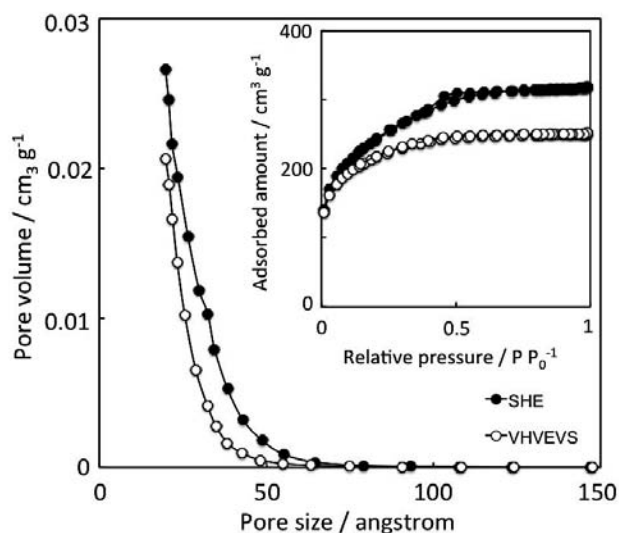


Figure 3-7. N_2 adsorption-desorption isotherms for the silica precipitates mineralized by the SHE and VHVEVS peptides.

リカの比表面積および空間容量は、それぞれ $760 \text{ m}^2/\text{g}$ 、 $0.18 \text{ cm}^3/\text{g}$ であるのに対して、SHE ペプチドにより得たシリカの比表面積および空間容量は、 $862 \text{ m}^2/\text{g}$ 、 $0.33 \text{ cm}^3/\text{g}$ であり(Figure 3-7)、SHE をテンプレ

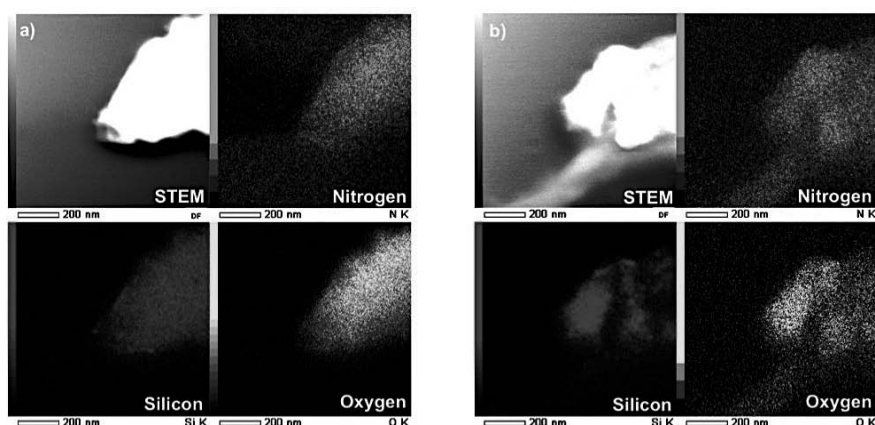


Figure 3-8. EDX mapping images of the silica mineralized by the (a) SHE and (b) VHVEVS peptides.

レートとして形成したシリカの比表面積、空間容量とも大きな値を示した。これは、先の FE-SEM および TEM の結果とも一致した。加えてエネルギー分散型 X 線分析(EDX)によりシリカの元素分析を行い、シリカとペプチドとの複合化について検討を行った。Figure 3-8 は、暗視野走査 TEM(DF-STEM) 像および窒素、ケイ素および酸素の元素マッピング像を示す。ペプチドの存在を示す窒素元素のマッピング像は、DF-STEM 像およびケイ素マッピングによるシリカの存在位置と一致した。これは、ペプチドテンプレートが、ミネラルゼーションにより形成したシリカと複合化している事を示唆する。この複合化は、SHE および VHVEVS の両ペプチドで確認された。これらの結果をふまえ、用いるペプチドテンプレートにより形成するシリカのモルフォロジーの差について考察する。VHVEVS ペプチドをテンプレートとして用いたシリカミネラルゼーションは、三次元ペプチドナノネットワークの表面上で生じること、そのシート構造を反映した平滑な表面モルフォロジーを持つ。しかしその一方、SHE ペプチドを使用して得たシリカは、巨大な集合体であった。SHE ペプチドは水溶液中では分子分散しているため、典型的なシリカ粒子作製と同様な微小シリカ粒子を形成した。形成された微小シリカ粒子は凝集し、多数の空隙を有する大きな粒子へと成長する。用いたテンプレートによるシリカのモルフォロジーの差は、窒素吸脱着測定の結果とも一致する。ミネラルゼーションにより形成されたシリカのモルフォロジーは、テンプレートとなるペプチドのモルフォロジーに大きく影響を受ける。それゆえこれらの結果から、ペプチドがミネラルゼーションにより形成するシリカに対してのモルフォロジー制御能を有するという一つの知見が得られた。

3-4. 結言

ミネラルゼーションにおいて効率的な触媒活性を示すペプチドシーケンス設計のために、シリカミネラルゼーションのモデル実験系の基質である TMEOS を用いてグルタミン酸およびヒスチジン側鎖官能基ペアによる協調効果“電荷リレー効果”が、シリカミネラルゼーションに与える影響を検討した。水溶液中で分子分散している SHE ペプチドと比較して、三次元のペプチドナノネットワークを形成する VHVEVS ペプチドがより高い触媒活性を示した。この結果は、 β -シート構造を形成する事により触媒能を有するグルタミン酸およびヒスチジン側鎖官能基のペアが、 β -シート集合体上で隣接して存在することで、シラノール間の脱水縮合に対し、効果的な電荷リレー効果を発現することを示唆し

た。このような生体を模倣した反応機構の研究は、生体分子中で生じている電荷リレー効果の基本的原理を解明するだけでなく、より効率的なミネラルゼーション手法を利用した機能性材料の創成を可能にし、さらには人工酵素などへの発展が期待される。

Reference

- (1) T. Nishimura, T. Ito, Y. Yamamoto, M. Yoshio, T. Kato, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 2800-2803.
- (2) A. Sugawara, T. Ishii, T. Kato, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 5299-5303.
- (3) A. W. Xu, M. Antonietti, S. H. Yu, H. Cölfen, *Adv. Mater.*, **2008**, 20, 1333-1338.
- (4) A. Dey, G. de With, N. A. J. M. Sommerdijk, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 397-409.
- (5) J. Yang, Y. Liu, T. Wen, X. Wei, Z. Li, Y. Cai, Y. Su, D. Wang, *Cryst. Growth Des.*, **2012**, 12, 29-32.
- (6) M. Kikuchi, S. Itoh, S. Ichinose, K. Shinomiya, J. Tanaka, *Biomaterials*, **2001**, 22, 1705-1711.
- (7) P. Habibovic, D. C. Bassett, C. J. Doillon, C. Gerard, M. D. Mckee, J. E. Barralet, *Adv. Mater.*, **2010**, 22, 1858-1862.
- (8) E. Brunner, C. Gröger, K. Lutz, P. Richtammer, K. Spinde, M. Sumper, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2009**, 84, 607-616.
- (9) Y. Yao, W. Dong, S. Zhu, X. Yu, D. Yan, *Langmuir*, **2009**, 25, 13238-13243.
- (10) T. Kuno, T. Nonoyama, K. Hirao, K. Kato, *Langmuir*, **2011**, 27, 13154-13158.
- (11) A. F. Wallace, J. J. DeYoreo, P. M. Dove, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 5244-5250.
- (12) N. J. Greenfield, G. D. Fasman, *Biochemistry*, **1969**, 8, 4108-4116.
- (13) T. Koga, K. Taguchi, Y. Kobuke, T. Kinoshita, M. Higuchi, *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 1146-1156.
- (14) T. Nonoyama, M. Tanaka, Y. Inai, M. Higuchi, T. Kinoshita, *ACS Nano*, **2011**, 5, 6174-6183.
- (15) T. Kuno, T. Nonoyama, K. Hirao, K. Kato, *Chem. Lett.*, **2012**, 41, 1547-1549.

第 4 章

Nacrein タンパク質に倣う炭酸カルシウムの 生体模倣型ミネラルゼーションとその機構解明

4-1. 緒言

バイオミネラルの形成は、第 3 章で記述した様な珪藻や海洋生物のみならず地球上に存在する数多くの生物で見える事が出来る。その代表例が人間の骨や歯、そして貝の貝殻などの硬組織の形成機構であるバイオミネラルゼーションである。このような、様々な生物が行っているバイオミネラルゼーションは、有機-無機複合体よりなる特異的な構造を常温常圧の低環境負荷の合成プロセスでなされるため、次世代の機能性材料創成のための新手法として注目され、盛んに研究が行われている。中でも炭酸カルシウムは、最安定相のカルサイト^[1,2]、準安定相のアラゴナイト^[3,4]、および不安定相であるバテライト^[5,6]といった多様な結晶相を持ち、コッコリスの外骨格(カルサイト)^[7,8]、貝殻(カルサイトおよびアラゴナイト)^[9-11]、甲殻類の外骨格(アモルファス)^[12,13]、サンゴ(アラゴナイト)^[14,15]や脊椎動物の耳石(カルサイト)^[16]など、動植物に至る非常に多くの生物がバイオミネラルとして用いている。これらの無機物質形成機構については、さまざまな先行研究により徐々に明らかとなりつつある。これまでのミネラルゼーションに関する先行研究では、炭酸カルシウムの例を取ると、キチン薄膜上での Kato らの、またポリリジンをテンプレートとした Yan らの研究から、形成される炭酸カルシウムの結晶相やモルフォロジーに与えるテンプレートの影響について検討されてきた^[6,17]。しかし、天然のバイオミネラル(貝殻)を形成している Nacrein は、貝自身が呼吸により放出した二酸化炭素を酵素活性により炭酸イオンへと変換することによる“ミネラル源の自己供給能”とテンプレートとして機能するタンパク質表面において“形成される炭酸カルシウムの結晶相制御”を行っていると考えられている^[18]。Nacrein の様な異なる機能を併せ持つテンプレートを利用したバイオミネラルゼーションを模倣した研究は報告されていない。この基礎的知見の解明は、未だに解明されていない生体が熱力学的に安定相であるカルサイトのみではなく、準安定相であるアラゴナイトを同一組織中に混在させてバイオミネラルを形成する“カルサイト-アラゴナイト問題”を解決するための重要なブレイクスルーとなると期待出来る^[19,20]。

そのため本章では、Nacrein タンパク質の様な“ミネラル源の自己供給能”と“結晶構造制御能”を併せ持つ多機能性ペプチドテンプレートを用いた炭酸カルシウムの自己供給型ミネラルゼーション機構の解明に主眼を置いた。本章では、第 3 章で得た効果的な電荷リレー効果の知見を基に、 β -シート型 VHVEVS ペプチドを基本に、種々のアミノ酸シーケンスを有するペプチドを設計し、同テンプレートを用いて析出する炭酸カルシウムの結晶相やモルフォロジーについて検討した。

4-2. 実験

4-2-1. フーリエ変換赤外吸収スペクトル測定

ペプチドおよび炭酸カルシウムのミネラルゼーションより得た炭酸カルシウム-ペプチド複合体中のペプチドの二次構造を得るために、FT-IR スペクトル測定を行った。FT-IR スペクトルを行うための

測定サンプルは以下の様に作製した。ペプチド単独系においては、ペプチド濃度が 0.1 mM となるように純水に溶解させた。その後、液体窒素を用いて急速凍結を行い、真空乾燥後、KBr と混合し、錠剤を形成して測定サンプルを得た。一方、炭酸カルシウム-ペプチド複合体における測定サンプルは、21 日間のミネラルゼーションを行った反応溶液中にフッ化カルシウム基板を 1 週間浸し、吸着させて作製した。炭酸カルシウム-ペプチド複合体を吸着させたフッ化カルシウム基板は、純水を満たしたシャーレの中で洗浄を行った。

赤外吸収スペクトル測定は、フーリエ変換赤外分光光度計(Spectrum 2000, PerkinElmer)を用いて透過吸収測定モード、波数領域:1900–1550 cm^{-1} および積算回数 32 回の条件下で行った。

得られた FT-IR スペクトルにおいて、アミド I およびアミド II 領域の吸収スペクトルを α -ヘリックス、 β -シートおよび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^[21]、それぞれのスペクトルの面積比より各二次構造の含有率を決定した。

4-2-2. ペプチドによるウレアの加水分解反応

ペプチド (VHVEVS, VAVEVS, VHVAVS および VHVEVA) を触媒に用いたウレアの加水分解反応は、以下の手順により行った。それぞれのペプチド水溶液(1 mM, 0.5 mL)に、ウレア水溶液(50 mM, 2 mL)と純水(2 mL)を加え、種々の温度(10, 15, 20, 30 および 40 $^{\circ}\text{C}$)で反応を行った。各ペプチドの加水分解活性は、ウレアーゼ活性キット(BUN Kinos, カイノス)を使用したインドフェノール法により測定

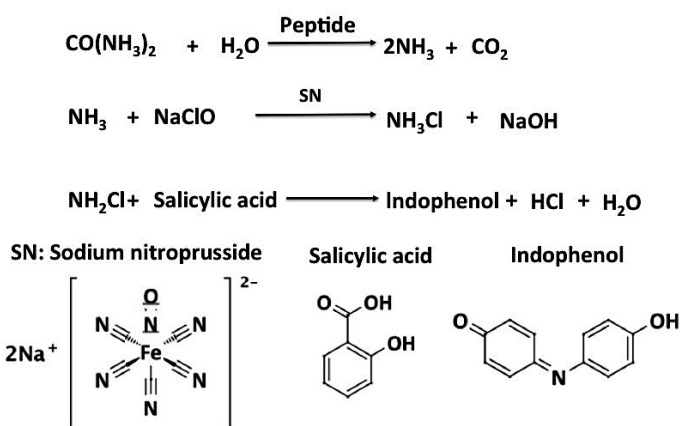


Figure 4-1. The reaction mechanisms of the indophenol method.

した(Figure 4-1)^[22]。反応時間の経過に伴い、各ペプチドによるウレアの加水分解により生じたアンモニウムイオンの濃度は、生成されたインドフェノールに基づく吸光度の変化より決定した。吸光度は UV-vis スペクトル測定(紫外可視分光光度計 UV-3600, 島津製作所)より行い、測定サンプル(光路長: 0.1 cm)を石英セルに満たし、500–800 nm の波長領域で行った。インドフェノールの定量は、700 nm のモル吸光係数を基に行った。インドフェノール法により得られるのは、ウレアの加水分解で生じたアンモニウムイオンの濃度であるため、得られた値より炭酸イオン濃度への変換を行った。ウレアの加水分解では、2 分子のアンモニアと 1 分子の二酸化炭素が生成される。そのため、測定により得たアンモニウムイオンの半分の濃度が炭酸イオン濃度となる。一方、カルシウムイオンを含むミネラルゼーション系においても先と同様の手法によりミネラルゼーション系におけるペプチドによるウレアの加水分解活性を測定した。ミネラルゼーション系の場合では、酢酸カルシウム水溶液(50 mM, 2 mL)、ウレア水溶液(50 mM, 2 mL)およびペプチド水溶液(1 mM, 0.5 mL)の混合溶液を 20 $^{\circ}\text{C}$ で攪拌し、反応を行った。

4-2-3. 炭酸カルシウムミネラルゼーション

本論文中では、2種類の炭酸カルシウムのミネラルゼーションを行った。初めに、“自己供給型ミネラルゼーション”について記述する。自己供給型ミネラルゼーションでは、カルシウム源として酢酸カルシウムを、炭酸イオン源としてウレアを用いた。VHVEVS ペプチド水溶液(1 mM, 0.5 mL)に、酢酸カルシウム水溶液(50 mM, 2 mL)とウレア水溶液(50 mM, 2 mL)を加え、室温で21日間攪拌を行うことでミネラルゼーションを行った。このウレアの加水分解により生成した炭酸イオンをミネラル源として行うミネラルゼーションを本論文では“自己供給型ミネラルゼーション”と記す。一方比較実験として、“外部供給型ミネラルゼーション”を行った。外部供給型ミネラルゼーションでは、カルシウムイオン源として酢酸カルシウムを、そして炭酸イオン源として炭酸水素アンモニウムを用いた。この時の炭酸水素アンモニウムは、最終濃度が0.15, 0.3 および0.6 mM となる様にそれぞれ添加した。以下に操作を記述する。VHVEVS ペプチド水溶液(1 mM, 0.5 mL)に、酢酸カルシウム水溶液(50 mM, 2 mL)および炭酸水素アンモニウム水溶液(任意の濃度, 2 mL)を加え、室温で21日攪拌する事でミネラルゼーションを行った。炭酸イオン源として炭酸水素アンモニウムを用いるミネラルゼーションを“外部供給型ミネラルゼーション”と記す。

4-2-4. 電界放出型走査型および透過型電子顕微鏡観察および制限視野電子線回折

得られた炭酸カルシウムのモルフォロジーおよび結晶相は、FE-SEM、TEM および電子線回折により評価した。FE-SEM および TEM 観察においてサンプルは、SEM サンプル台およびエラスチックカーボン支持膜付銅グリッド上へミネラルゼーション後の反応溶液を吸着させた。吸着後、未反応のウレアおよびカルシウムイオンを取り除くために純水を満たしたシャーレに浸漬し、洗浄を行った。その後、ろ紙を用いてサンプル台およびグリッド上に残った水分を除去した。その後 SEM 観察用サンプルは、観察中のチャージアップを防ぐためにイオンスパッタ装置を用いて、気圧 7 Pa、電流 15 mA、直流電圧 2.5 kV の条件で2分間スパッタする事で、白金のナノ薄膜をコートした。FE-SEM 観察時の加速電圧は、10 kV とした。一方、TEM 観察時の加速電圧は、200 kV とした。TEM 観察は、Ultra Scan CCD カメラ(Orinus, Gatan Inc.)にて撮影した。また、形成した炭酸カルシウムの結晶相は、JEM-z2500 による制限視野電子線回折(SAED)により同定した。

4-2-5. エネルギー分散型 X 線分析(EDX)による元素分析

JEM-z2500 に付属したエネルギー分散型 X 線分光器(EDX, JED-2300, JEOL)を用いて元素マッピング分析を行った。EDX 測定では、STEM モードにて暗視野または明視野走査像を取得し、カルシウム、炭素、窒素および酸素の各元素マッピング分析を行った。この測定時のカメラ長およびスポットサイズは、それぞれ 4 μm および 1.0 nm とした。

4-3. 結果・考察

4-3-1. 合成ペプチドの二次および高次構造の解析

Fmoc-SPPS 法により得られたペプチド(VHVEVS, VAVEVS, VHVAVS および VHVEVA)は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法-飛行時間質量分析計(MALDI-TOF-MS: JEM-S3000, JEOL)を用いて合成の確認を行った(Figure 3-1b および Figure 4-2)。いずれのペプチドにおいても、その測定された

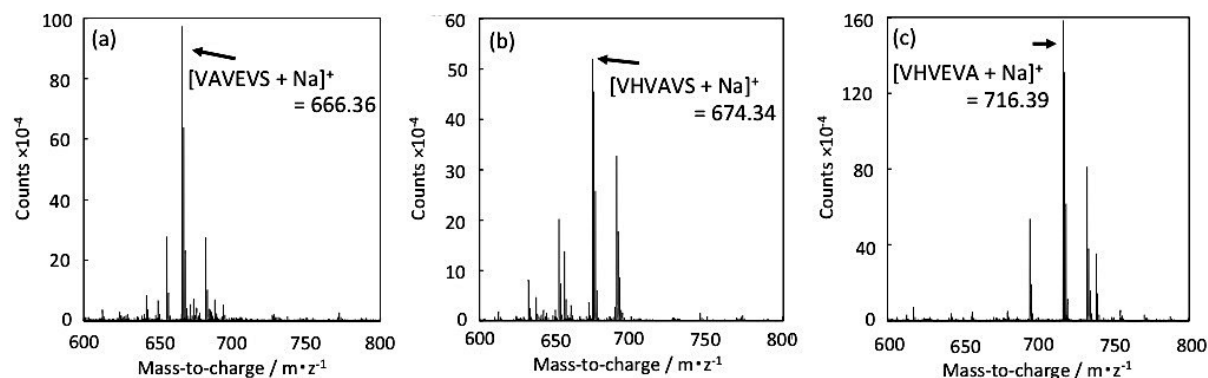


Figure 4-2. MALDI-TOF-MS spectra of the (a) VAVEVS, (b) VHVAVS, and (c) VHVEVA peptides.

分子量は、[ペプチドの分子量 + H]⁺ または[ペプチドの分子量 + Na]⁺の計算値と一致したことからデザインしたペプチドの合成を確認した。([VHVEVS+H]⁺ 実測値: 710.6、計算値: 709.4、[VAVEVS+Na]⁺ 実測値: 666.36、計算値: 643.35、[VHVAVS+Na]⁺ 実測値: 674.34、計算値: 651.37、[VHVEVA+Na]⁺ 実測値: 716.39、計算値: 693.38)

Figure 4-3 は、VHVEVS、VAVEVS、VHVAVS および VHVEVA ペプチドそれぞれを、4-2-1 節で述べた手法でこれらペプチド水溶液を凍結乾燥して得た試料の FT-IR スペクトルを示す。凍結乾燥により、水溶液中のペプチドの二次構造に変化がない事は確かめている(6-3-2 節にて記述)。各

Table 4-1. Fraction of secondary structure of the peptides.

Peptide	Conformation/ %		
	α -helix	β -sheet	Random coil
VAVEVS	5	76	19
VHVAVS	7	52	41
VHVEVA	0	77	23

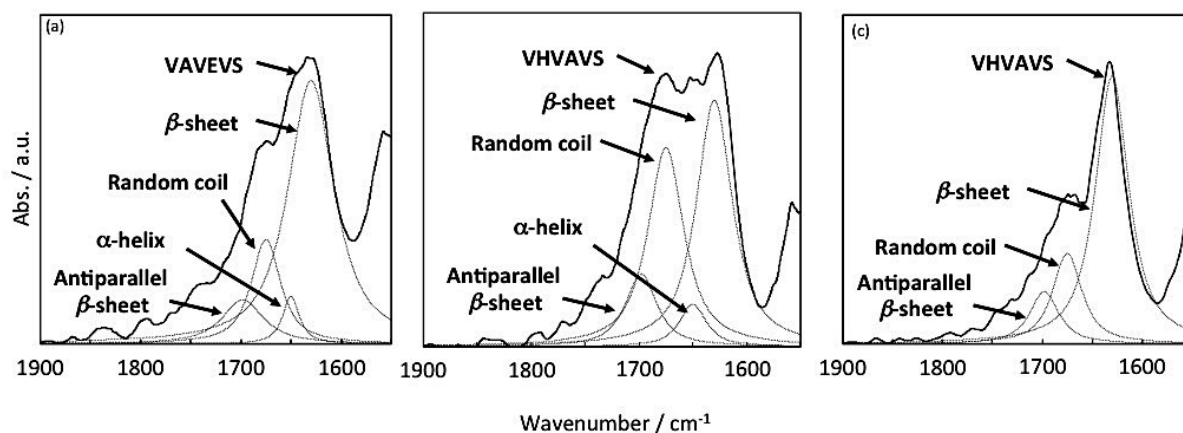


Figure 4-3. FT-IR spectra of the (a) VAVEVS, (b) VHVAVS, and (c) VHVEVA peptides. Dotted lines show the peak deconvolution of the amide I band with β -sheet, antiparallel β -sheet, α -helix, and random coil conformations.

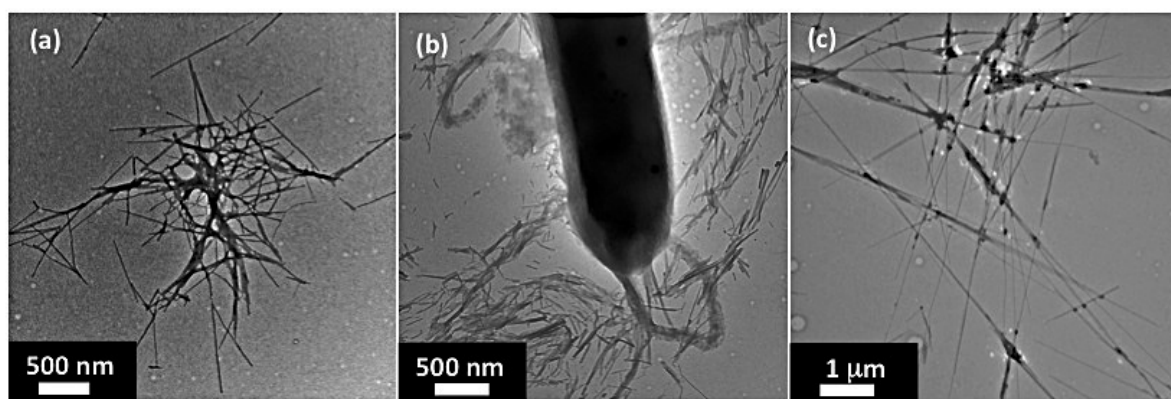


Figure 4-4. TEM images of the (a) VAVEVS, (b) VHVAVS, and (c) VHVEVA peptide templates.

ペプチドは、アミド I 領域にそれぞれ β -シート構造に帰属される吸収ピーク(1630 cm^{-1})が観察された。FT-IR スペクトルの波形分離解析結果より、各ペプチドの二次構造含率を算出した(Table 4-1)。各ペプチドの二次構造は、主として β -シート構造であった。しかし、VHVAVS ペプチドの β -シート構造含率は、他の 3 種類のペプチドと比較して低い値を示した。 β -シート構造は、親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸の交互シーケンスを有するペプチドにおいて形成されやすい事が報告されている^[23]。つまり、VHVAVS はペプチドを構成する 3 種類の親水性アミノ酸(ヒスチジン、グルタミン酸およびセリン)のうち最も親水性度が高いグルタミン酸を疎水性アミノ酸であるアラニンに置換したため、他のペプチドと比較して親水/疎水性の交互シーケンスが崩れたためであると考えられる。

次に合成したペプチドのモルフォロジーを、透過型電子顕微鏡(TEM)観察により評価した。Figure 4-4 に、VAVEVS、VHVAVS および VHVEVA ペプチドの TEM 像を示す。TEM 観察のためにペプチドは、 0.1 mM の濃度となるように純水に溶解させ、 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 1 週間インキュベートし、十分に二次構造が安定した、すなわち二次構造変化が認められなくなった試料を用いた。TEM 観察より各ペプチドのモルフォロジーは、3 次元ナノネットワークを形成するナノファイバー構造であった。この構造は、3-3-1 節の述べた様に β -シート構造を形成したペプチドの片面側に存在するバリン側鎖イソプロピル基間の疎水性相互作用により形成される二分子膜状のナノファイバーが階層的に自己集合することで形成したと考えられる(Figure 3-3b, Figure 4-4)。しかし、VHVAVS では、ナノファイバー状の構造以外にも大きな会合体が観察された(Figure 4-4b)。これは、VHVAVS ペプチドのランダムコイル構造の分率が上昇した事、すなわち β -シート形成能が低下した事によりペプチドが無秩序にその疎水性相互作用によって凝集したために形成されたと考えられる。

4-3-2. ペプチドによるウレアの加水分解活性評価

合成した VHVEVS ペプチドの触媒活性を検討するための基質として本研究ではウレアを用いた。4-2-3 節でも述べた様にウレアは、加水分解される事により炭酸イオンとアンモニウムイオンへと変換されるため炭酸カルシウムのミネラル源となること、およびインドフェノール法によりアンモニウムイオンの発生量から、簡便にその加水分解活性を評価できるためである。Figure 4-5a は、アンモニウムイオンの反応により生じたインドフェノールの吸光度より、求めたペプチド水溶液系での炭酸イオ

ンの濃度変化を示す。VHVEVS ペプチドをウレアの加水分解反応の触媒として用いる事で生成された炭酸イオン濃度は、反応日時の経過と共に上昇し、21 日後には 0.6 mM に達した。その一方、触媒である VHVEVS ペプチドを含まないコントロール系では、21 日後においてもウレアの加水分解反応を確認出来なかった(Figure 4-5b)。この結果は、VHVEVS ペプチドがウレア

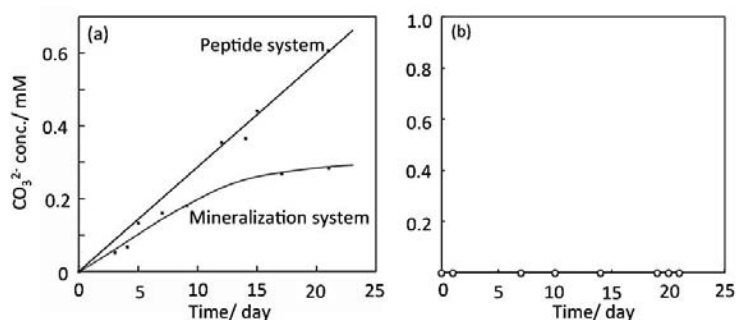


Figure 4-5. The concentration changes of carbonate ion produced by the hydrolysis of urea in the (a) peptide solution (Peptide system) and mineralization solution containing the peptide and calcium acetate (Mineralization system) and (b) non-peptide system.

に対する加水分解活性を有すると共に、ウレア分子が 20 °C の水溶液環境下において自己熱分解等を起こさない事を示す。ペプチドの親水性アミノ酸がウレアの加水分解活性に与える影響を検討するために、ヒスチジン、グルタミン酸およびセリンの各親水性アミノ酸をアラニンに置換した VAVEVS、VHVAVS および VHVEVA を 3 種類のペプチドを合成した。新たに合成した 3 種類のペプチドを用いてウレアの加水分解反応を行った(Figure 4-6)。新たに合成したペプチドのうち、セリンをアラニンに置換した VHVEVA では、反応時間の経過に伴う炭酸イオンの生成はほとんど認められず、同ペプチドがウレアの加水分解活性を有していない事がわかる。一方、ヒスチジンをアラニンに置換した VAVEVS、およびグルタミン酸をアラニンに置換した VHVAVS では、それぞれ反応時間に伴い炭酸イオンの発生、すなわちウレア加水分解活性が認められた。この結果より、ウレアの加水分解には、セリンの存在が必須である事がわかる。しかし、VHVEVS ペプチドと比較した時、この活性が認められた 2 種のペプチドで異なる特徴が見られた。VAVEVS(His → Ala)ペプチドを用いたウレアの加水分解反応では、生成された炭酸イオン濃度が、21 日後で 0.09 mM であった。つまり、VHVEVS ペプチド(21 日後の炭酸イオン濃度: 約 0.6 mM)と比較して VAVEVS ペプチドのウレアの加水分解に対する触媒活性は低下した。これは、ヒスチジンの存在下でセリンのウレアの加水分解作用が促進される事を意味する。ヒスチジ

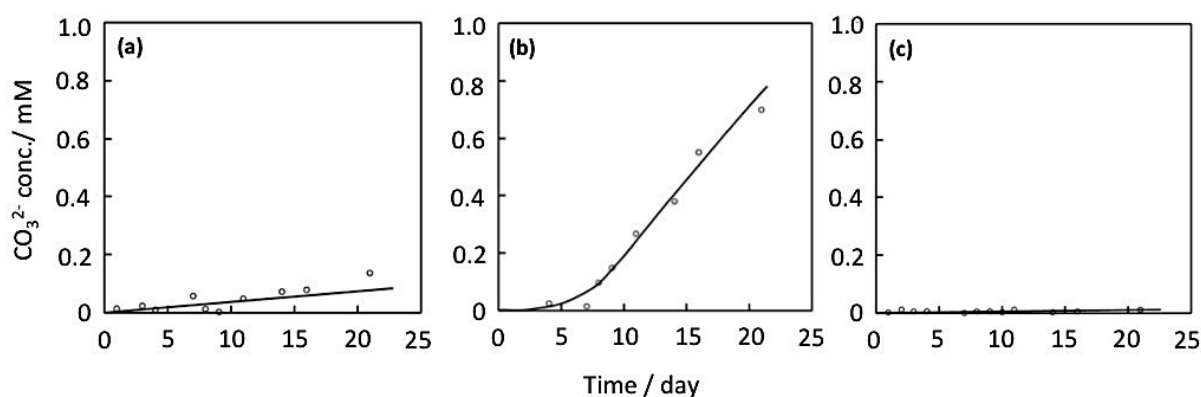


Figure 4-6. The concentration changes of carbonate ion produced by the hydrolysis of urea in the (a) VAVEVS, (b) VHVAVS, and (c) VHVEVA peptide solution.

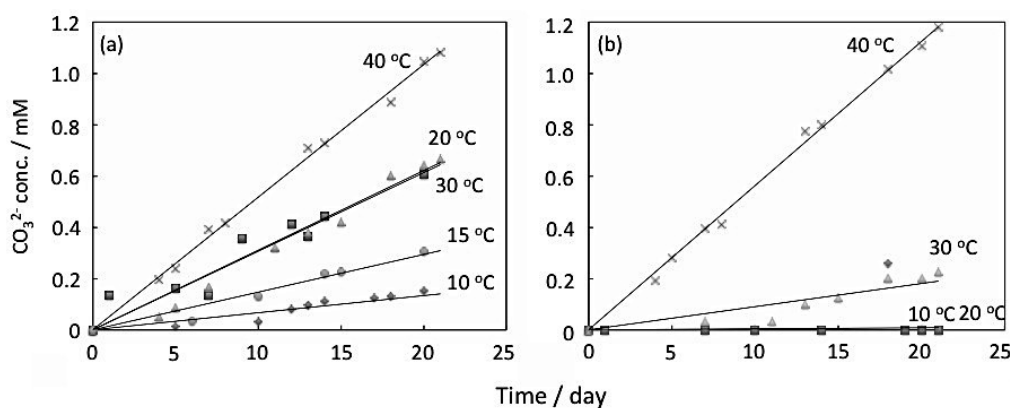


Figure 4-7. The concentration changes of carbonate ion produced by the hydrolysis of urea in the (a) VHVEVS peptide and (b) non-peptide solution under the various temperature conditions.

ンおよびセリンを有し、グルタミン酸を有していない VHVAVS ペプチドでは、反応初期(0-5 日目)において活性が見られない誘導期を持ち、その後に大きな活性を示した。この系では、21 日後の炭酸イオン濃度は、VHVEVS ペプチドと比較して高い値(約 0.8 mM)であり、ウレアの加水分解がより促進している事がわかった。これらの特徴は、以下のように説明出来る。VHVAVS ペプチドは、4-3-1 節で述べた様にナノファイバーに加えて大きな凝集体を形成した。この大きな凝集体は、高密度のペプチドが凝集して形成されたと考えられるため、基質であるウレアが凝集体内へ侵入するためには時間がかかる。そのため他のペプチド系では生じない誘導期が生じたと考えられる。さらに VHVAVS では、先に述べた様に凝集体中のペプチドの局所濃度が高い。そのため、触媒サイトとなる官能基が多数存在しているためヒスチジンとセリンの協調作用によるウレアの加水分解反応が促進され、炭酸イオンの最終生成濃度が高くなったと考えられる。

以上の結果より、ペプチドによるウレアの加水分解は、以下の様なプロセスにより生じていると考察した。初めにヒスチジン側鎖イミダゾール基が、セリン側鎖ヒドロキシル基よりプロトンを引き抜く事によりセリンを活性化させる。プロトンの引き抜きにより活性化したセリンの求核攻撃によりペプチド表面近傍に存在するウレアが、炭酸イオンとアンモニウムイオンへと加水分解される。これらのアミノ酸側鎖官能基同士での協調的相互作用、つまり電荷リレー効果は、ペプチド分子内のみで生じているのではなく、 β -シート内または β -シート間、加えて VHVAVS が形成するペプチド凝集体中でも生じていると考えられる。この反応機構のため、セリンを欠く VHVEVA では、ウレア分子への求核攻撃が生じず、そのセリンの活性化が生じないことにより触媒活性の低下が見られたと考えられる (Figure 4-6)。また、ウレアに対する VHVEVS ペプチドの加水分解は、カルシウムイオンを含むミネラルゼーション系においても生じた (Figure 4-5a)。しかし、VHVEVS ペプチドによるウレアの加水分解速度は、反応日時の経過と共に徐々に減少し、最終的に生成された炭酸イオン濃度は、21 日間で 0.3 mM

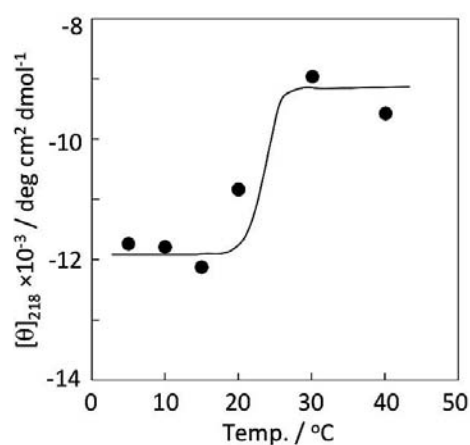
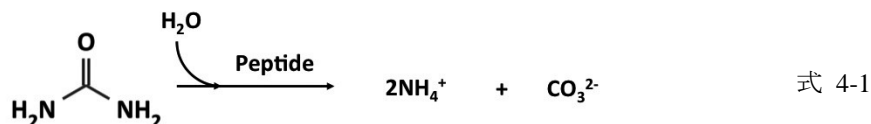


Figure 4-8. Temperature dependence of molar ellipticity at $[\theta]_{218}$.

であった。この現象については次節において述べる。

次に VHVEVS ペプチド触媒の二次構造とウレアの加水分解反応間の相関を検討した。Figure 4-7 は、各温度(10, 15, 20, 30 および 40 °C)でのペプチド水溶液系(Figure 4-7a)とコントロール系(Figure 4-7b)でのウレアの加水分解に伴う炭酸イオンの濃度変化を示す。炭酸イオンの発生より、ペプチドを含まないコントロール系においても 30 および 40 °C では、ウレアの熱分解によりアンモニウムイオンと炭酸イオンが生じている事がわかる。一方、ペプチド水溶液系では、すべての反応温度でウレアの加水分解反応に基づく炭酸イオンの発生が認められた。しかし、高温域(30 および 40 °C)では、コントロール系と比較し、その発生量は、同程度でありウレアの熱分解が支配的と考えられる。これは、ペプチド自体の触媒活性の低下を意味し、高温域においてペプチドの構造が変化していることが原因であると考えられる。そこで、高温域(30 および 40 °C)での VHVEVS ペプチドの触媒活性の低下をペプチドの二次構造より検討するために各温度(5, 10, 15, 20, 30 および 40 °C)における CD スペクトルを測定した。CD スペクトルより得られた $[\theta]_{218}$ の値は、測定温度の上昇と共にその負のモル楕円率の低下が認められた(Figure 4-8)。これは、温度の上昇に従い VHVEVS ペプチドの二次構造が、 β -シート構造からランダムコイルへと変化している事を示す。この β -シート-ランダムコイル間での構造転移が、ウレアの加水分解に必要な電荷リレー効果の発現を阻害するために触媒活性の低下が生じたものと考えられる。実際に、 $[\theta]_{218}$ の負の値が大きく減少した温度は、30 °C 以上の高温域であり、Figure 4-7a で示した結果を支持する。

次に各反応温度での速度定数 $k(s^{-1})$ を式 4-1 の反応式を基に式 4-2 より求めた。



$$x = a[1 - \exp(-kt)] \quad \text{式 4-2}$$

ここでの x は溶液中のウレア濃度(mol/L)、 a はウレアの初期濃度(mol/L)、そして t は反応時間(s)である。式 4-2 で得られる k は、ペプチド触媒作用による k_{cat} と熱分解による k_{Δ} の和として、 $k(=k_{\text{cat}} + k_{\Delta})$ と示せる。Figure 4-9a にペプチド存在下での $k(=k_{\text{cat}} + k_{\Delta})$ の値の温度依存性を、Figure 4-9b にコントロール系、すなわちペプチド非存在下での速度定数 k_{Δ} の値を示した。これよりペプチドの触媒作用による k_{cat} を求め、特にペプチドの二次構造転移の影響の少ない低温度域(10, 15 および 20 °C)における速度定数 k_{cat} をアレニウスプロットすることで、VHVEVS ペプチドの触媒作用によるウレア分子の加水分解反応の活性化エネルギーを算出した(Figure 4-9)。速度定数 k_{cat} と活性化エネルギー $E_a(\text{J/mol})$ の関係は、アレニウスの式(式 4-3)で表される。

$$k_{\text{cat}} = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad \text{式 4-3}$$

式 4-3 における R は気体定数、 T は温度(K)そして A は頻度因子を示す。アレニウスプロットより算出した活性化エネルギーは、約 36 kcal/mol であった。一方、ウレアを加水分解する酵素であるウレアーゼを用いた系の実験的活性化エネルギーは、Gould らによって 9.8 kcal/mol であることが報告されている^[24]。加えて熱分解に伴うウレア加水分解の活性化エネルギーは、Mitsukawa によって 33.6 kcal/mol

であることが報告されている^[25]。

この値は、上記ペプチドの触媒作用による活性化エネルギーと同程度である。このことは、ペプチドの触媒作用では活性化エネルギーの低下より、頻度因子(A)の増大をもたらしていると思われる。これは、ペプチド β -シート集合体上のグルタミン酸側鎖カルボキシル基

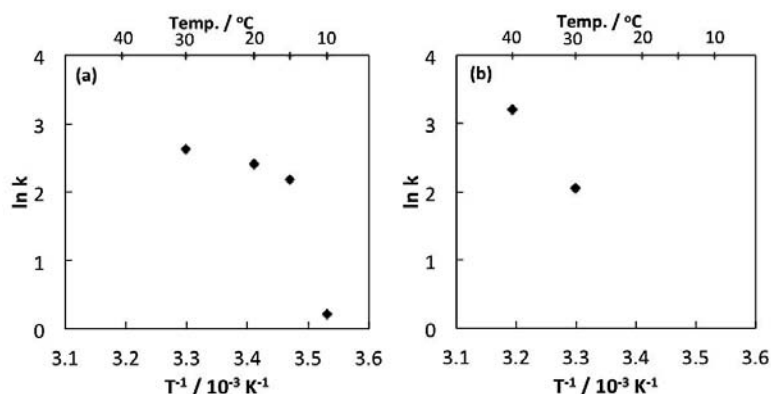


Figure 4-9. Arrhenius plots of the (a) VHVEVS peptide and (b) non-peptide systems.

へのウレアの結合がセリン側鎖ヒドロキシル基の求核攻撃の促進をもたらしているのかもしれない。

これらの触媒反応機構の解明は、反応中間体の構造解析などより詳細な検討が必要である。しかしながら、上述した結果より合成した VHVEVS ペプチドが熱分解を生じない温度域においてウレア分子に対する加水分解活性を有している事は明らかである。

4-3-3. 多機能性ペプチド上での炭酸カルシウムミネラルゼーション

本章では、炭酸カルシウムを2種類のミネラルゼーション手法により形成した。1つ目の手法は、ペプチドによるウレアの加水分解反応により生成される炭酸イオンをミネラル源として利用する“自己供給型ミネラルゼーション”である。2つ目の手法は、炭酸イオンを炭酸水素アンモニウム水溶液の添加により供給する“外部供給型ミネラルゼーション”である。この2種類のミネラルゼーション手法

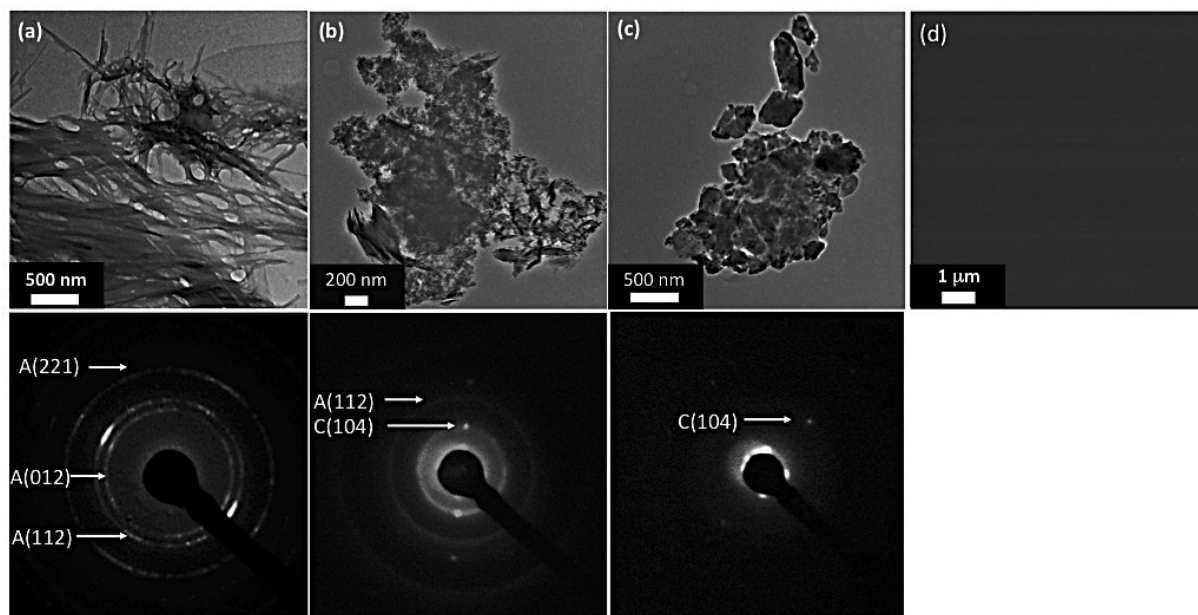


Figure 4-10. TEM images and SAED patterns of CaCO_3 mineralized by the (a) self- and (b) externally-supplied mineralization after the 21 days. (c) TEM image of CaCO_3 mineralized by the externally-supplied mineralization on the non-peptide system. In the externally-supplied mineralization system, concentration of added carbonate ion was 0.3 mM. (d) FE-SEM image of CaCO_3 mineralized on the control system.

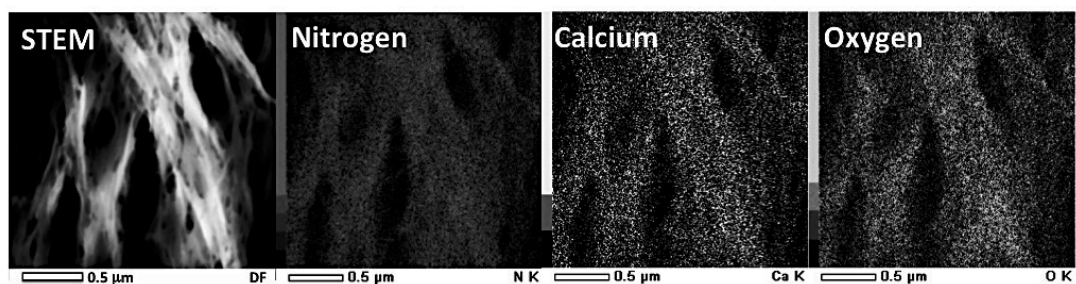


Figure 4-11. EDX mapping images of the CaCO_3 -peptide hybrid material.

により得られる炭酸カルシウムの結晶相やモルフォロジーを検討する事により、貝類で見られるバイオミネラリゼーション機構の解明を目的とした。

Figure 4-10 は、21 日経過後の自己供給型ミネラリゼーション(Figure 4-10a)および外部供給型ミネラリゼーション(Figure 4-10b)により得た析出物の FE-SEM、TEM 像および制限視野電子線回折(SAED)パターンを示す。TEM 像より、自己供給型ミネラリゼーションにより得た析出物のモルフォロジーはナノファイバー状であり、ミネラリゼーション前の VHVEVS ペプチドテンプレートの構造と類似していた。加えて SAED 測定から、明確な 3 種類の回折リングが認められたために、特定の結晶構造を持つ事が示された。そこで析出物の構成元素をエネルギー分散型 X 線測定(EDX)による元素マッピングを行ったところ、カルシウム元素(炭酸カルシウム由来)と窒素元素(ペプチド由来)の存在箇所が一致する事から、析出物が炭酸カルシウムとペプチドの複合体であることが示された(Figure 4-11)。その一方、ペプチドの非存在下においては、炭酸カルシウムを観察する事が出来なかった(Figure 4-10d)。これは、自己供給型ミネラリゼーションにおいて、ペプチドによるウレアの加水分解により生成された炭酸イオンをミネラル源として炭酸カルシウムを生成させている事を示唆する。4-1 でも述べた様に炭酸カルシウムは、3 種類の結晶相を有する。そこで自己供給型ミネラリゼーションにより析出した炭酸カルシウムの結晶相を同定するために SAED を行った。SAED パターン解析(Figure 4-10a の下部)を行ったところ回折パターンの D-spacing は、2.69、2.37、および 1.69 Å であった。この値は、それぞれアラゴナイトの(012)、(112)、(221)面に一致する事から^[26]、得られた炭酸カルシウムの結晶相は、準安定相のアラゴナイトであることがわかった。ミネラリゼーションにより得られた炭酸カルシウム-ペプチド複合体中でのペプチドの二次構造を FT-IR スペクトル測定により評価した。FT-IR 用測定サンプルは、フッ化カルシウム基板上に析出した炭酸カルシウムを吸着させた。その後、未反応のウレアや炭酸カルシウム非被覆ペプチドを取り除くためにフッ化カルシウム基板は、純水を満たしたシャーレ内で洗浄し、デシケーター内で乾燥した。Figure 4-12 に、自己供給型ミネラリゼーションで得られた炭酸カルシウム-ペプチド複合体の FT-IR スペクトルを示す。得られた FT-IR スペクトルでは、ペプチド由来のアミド I 領域の吸収を確認した。アミド I 領域の波形分離解析より、複合体中に存在する VHVEVS ペプチドの二次構造は、主として β -シート構造であったが(Table 4-2)、複合体中の VHVEVS の二次構造はミネラリゼーションにより炭酸カルシウムとの複合構造を形成する前とは大きく異なり、 β -シート含率の大幅な上昇が見られた(85 % \rightarrow 96 %)。この結果は、無機物質である炭酸カルシウムによりペプチド表面が被覆される事で、ペプチド分子の分子運動が抑制され、 β -シート構造を安定化したもの

だと考えられる。これらの結果は炭酸カルシウムミネラリゼーションが、ペプチドテンプレート表面上で選択的に生じている事を示唆する。なぜならば、炭酸カルシウムミネラル源である炭酸イオンは、ウレアの加水分解反応によりペプチド集合体の界面でのみ生成される。ペプチドテンプレート上の界面での炭酸イオン濃度は、バルク水溶液に比べ高いと考えられる。そのため、ペプチドテンプレート表面において炭酸カルシウムの不均一核形成が発生し、テンプレート上に析出する炭酸カルシウムのモルフォロジー (ナノファイバー状) がテンプレートのモルフォロジーに沿って規制されたと考えられる。加えて 4-3-2 節で述べた様に、カルシウムイオンを溶液中に含まないペプチド水溶液系と比較してミネラリゼーション系の触媒活性は、反応日時の経過と共に徐々に減少したことを示した。この現象は、ペプチドが加水分解によって炭酸イオンを供給すると共にテンプレート界面で炭酸カルシウムを析出させるために、ペプチド表面上に存在する活性サイトが被覆されてしまうために加水分解活性の減少が生じたと考えられる。ミネラリゼーション 21 日後での炭酸カルシウムによるペプチドテンプレートの被覆率を、ウレアの加水分解速度が触媒サイトとして振る舞うペプチドテンプレート表面上の非被覆面積に比例すると仮定する事により算出した。21 日後においてペプチドテンプレートは、炭酸カルシウムにより約 88 % が被覆されていた。

次に上述したミネラル源の自己供給の効果を検討するために、外部供給型ミネラリゼーションにより析出した炭酸カルシウムとの比較を行った。外部供給型ミネラリゼーションで供給した炭酸イオンの最終濃度は、0.3 mM に固定した。この濃度は VHVEVS ペプチドが、カルシウムイオンを含むミネラリゼーション系において反応 21 日間で生成した炭酸イオンの濃度に等しい (Figure 4-5a)。外部供給型ミネラリゼーションにより析出した炭酸カルシウムのモルフォロジーは、自己供給型ミネラリゼーションにより析出した炭酸カルシウムとは異なり、ナノキューブおよびナノファイバー状粒子の凝集体であった (Figure 4-10b)。析出物の SAED パターン解析から、先のアラゴナイトの (112) 面 (D-spacing 2.37 Å) に加え、新たに 3.04 Å の

D-spacing、すなわちカルサイト相の (104) 面に相当する回折スポットが観察された^[27]。この結果より、外部供給型ミネラリゼーションで得られる炭酸カルシウムの結晶は、カルサイトとアラゴナイトの 2

Table 4-2. Fraction of secondary structure of the VHVEVS in the CaCO₃-VHVEVS hybrid material.

Sample	Conformation/ %		
	α -helix	β -sheet	Random coil
VHVEVS-CaCO ₃	0	96	4

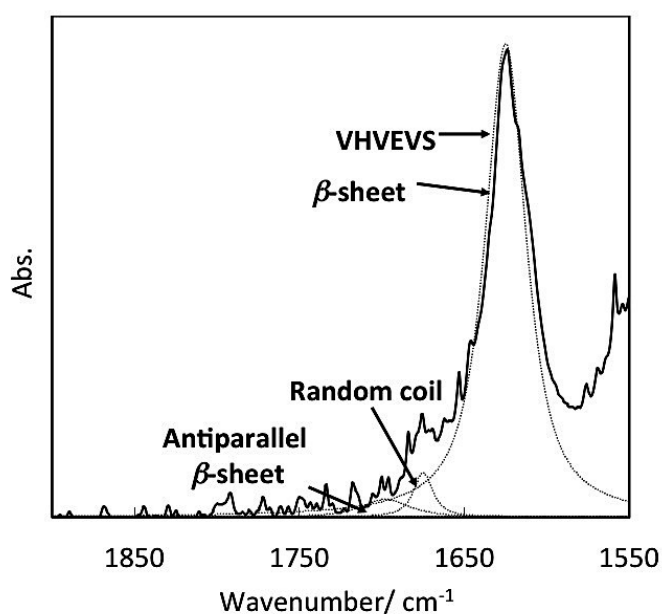


Figure 4-12. FT-IR spectrum of the CaCO₃-VHVEVS hybrid material obtained by the self-supplied mineralization after the 21 days. Dotted lines show the peak deconvolution of the amide I band with antiparallel β -sheet, random coil, and β -sheet conformations, respectively.

つの結晶相が混在している事がわかる。カルサイト相の典型的なモルフォロジーであるナノキューブ粒子は、その核形成および結晶成長が、ペプチドテンプレート表面上ではなく、溶液中のような均一系で生じる事で形成されることが知られている。実際、ペプチドテンプレートを含まないコントロール系では、同濃度の炭酸イオン濃度(0.3 mM)を供給することでカルサイト相のみで形成されるナノキューブ粒子を形成したことからも明らかである(Figure 4-10c)。外部供給型ミネラル化で得られた、もう一方のモルフォロジーであるナノファイバー状の炭酸カルシウムの存在は、わずかながらペプチドテンプレート上においても炭酸カルシウムのミネラル化が生じたために形成されたと考えられる。しかし、外部供給型ミネラル化において、炭酸カルシウムは、その多くがバルク中での核形成と、その成長により形成されたと考えられる。その理由は、炭酸イオンの初期濃度である。外部供給型ミネラル化では、炭酸イオンを反応初期にすべて供給するため、自己供給型ミネラル化と比較して溶液中の濃度が高くなり、テンプレートが存在しない系と同様にバルク中に形成される最安定相のカルサイト結晶が成長するためと考えられる。これらの結果から、自己供給型ミネラル化により得られる炭酸カルシウムは、ペプチドテンプレートの表面ナノ構造によりそのモルフォロジーおよび結晶相が規制されている事を示唆する。次節にてこの形成機構の詳細な検討を行う。

4-3-4. 炭酸カルシウムミネラル化の機構解析

自己供給型ミネラル化の初期過程を検討するために、自己供給型および外部供給型ミネラル化による炭酸カルシウム形成の動力学的解析を行った。この解析のための外部供給型ミネラル化系における、供給した炭酸イオンの終濃度は、0.3 mM に固定した。Figure 4-13 に、ミネラル化3日および7日後の炭酸カルシウムの TEM 像を示す。自己供給型ミネラル化3日後において、3次元ナノネットワーク構造が観察されたが、ハローやスポット等の特徴的な SAED パターンは得られなかった(Figure 4-13a)。一方3日間の外部供給型ミネラル化により得た炭酸カルシウムは、ファイバー状およびナノキューブ粒子の凝集体が観察された(Figure 4-13c)。SAED パターン解析は、Figure 4-11c と同様な結果を示し、析出した炭酸カルシウムの結晶相は、カルサイトとアラゴナイトが混在していた。また外部供給型ミネラル化7日後において析出した炭酸カルシウムは、3日後に析出した炭酸カルシウムと比較してモルフォロジーおよび結晶相に大きな変化を確認する事が出来なかった(Figure 4-13d)。しかし、自己供給型ミネラル化系では、7日後において観察された析出物はアラゴナイト相の(221)面に基づく D-spacing 値(2.37 Å)の SAED パターンのみが観察された(Figure 4-13b)。この初期に形成された炭酸カルシウム-ペプチド複合体のモルフォロジーは、巨大なナノファイバー構造であった。この時間経過に伴う炭酸カルシウムの形成過程を検討するために、自己供給型ミネラル化系での VHVEVS ペプチドにより生成される炭酸イオン濃度の変化に着目した(Figure 4-5a)。自己供給型ミネラル化系で生成された炭酸イオン濃度は、3日および7日後にそれぞれ 0.05 および 0.15 mM であった。これはペプチドテンプレート上での炭酸カルシウムのミネラル化が、安定した核種を形成するために必要な臨界ミネラル源濃度が存在してい

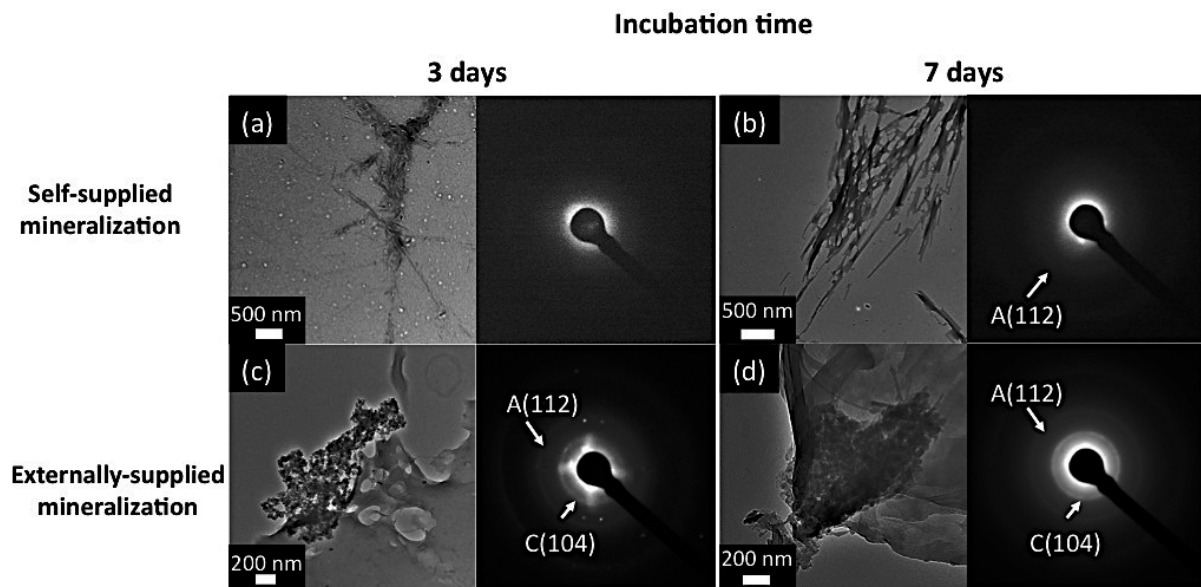


Figure 4-13. TEM images and SAED patterns of the CaCO_3 -VHVEVS obtained by the self- (a, b) and externally-supplied mineralization (The externally added carbonate ion concentration was 0.3 mM) (c, d). TEM images of (a) and (c) are CaCO_3 obtained by the mineralization after 3 days. (b) and (d) are CaCO_3 obtained by mineralization after 7 days.

る事を示唆する。自己供給型ミネラルゼーション 3 日後における炭酸イオン濃度は、臨界濃度に達していなかった為に炭酸カルシウムの析出が観察されなかったと考えられる。これらの結果は、ペプチドテンプレートによるテンプレート効果の発現が、溶液中、特にテンプレート界面のミネラル源濃度に強く影響を受ける事を示唆する。事実、ミネラルゼーション系での反応 3 日目に生成される炭酸イオン濃度(0.05 mM)を用いた外部供給型ミネラルゼーションでは、3 日間の反応で炭酸カルシウム結晶の析出を確認出来なかった。

これまでの結果より、ペプチドテンプレートを用いた炭酸カルシウムのミネラルゼーションには、ミネラル源の濃度が大きく影響する事がわかった。そのため、外部供給型ミネラルゼーション系での炭酸カルシウムミネラルゼーションにおける炭酸イオン濃度の影響を検討した。今回用いる炭酸イオンの終濃度は、0.15 および 0.6 mM の 2 種類である。Figure 4-14 に、外部供給型ミネラルゼーション 3 日, 7 日および 21 日後において析出した炭酸カルシウムの TEM 像をそれぞれ示す。炭酸イオン濃度 0.6 mM の系において析出した炭酸カルシウムはナノキューブ状粒子と非常にわずかなナノファイバーを形成されており、その結晶相は、ミネラルゼーション 3 日後でカルサイトおよびアラゴナイト相よりなる混合相であった(Figure 4-14a)。この結果は、炭酸イオン濃度 0.3 mM を用いて行った外部供給型ミネラルゼーションと同様であった。また、0.15 mM の炭酸イオン濃度を用いた外部供給型ミネラルゼーションにより析出した炭酸カルシウムのモルフォロジーは、主として観察されたナノファイバーに加え、ナノキューブ状粒子であった(Figure 4-14d)。加えて SAED パターン解析より、結晶相は先と同様カルサイトおよびアラゴナイト相であった。これはカルサイト相の形成が、高い炭酸イオン濃度(0.6 mM)を含む溶液中の初期過程で優先的に生じる事を示唆する。その一方、低い炭酸イオン濃度(0.15 mM)の系では、ナノファイバー構造が多く観察されたため、溶液中で生じる最安定相のカルサイト結晶核の形成が抑制されるとともにペプチドテンプレート上でのミネラルゼーションが優先的に生じる

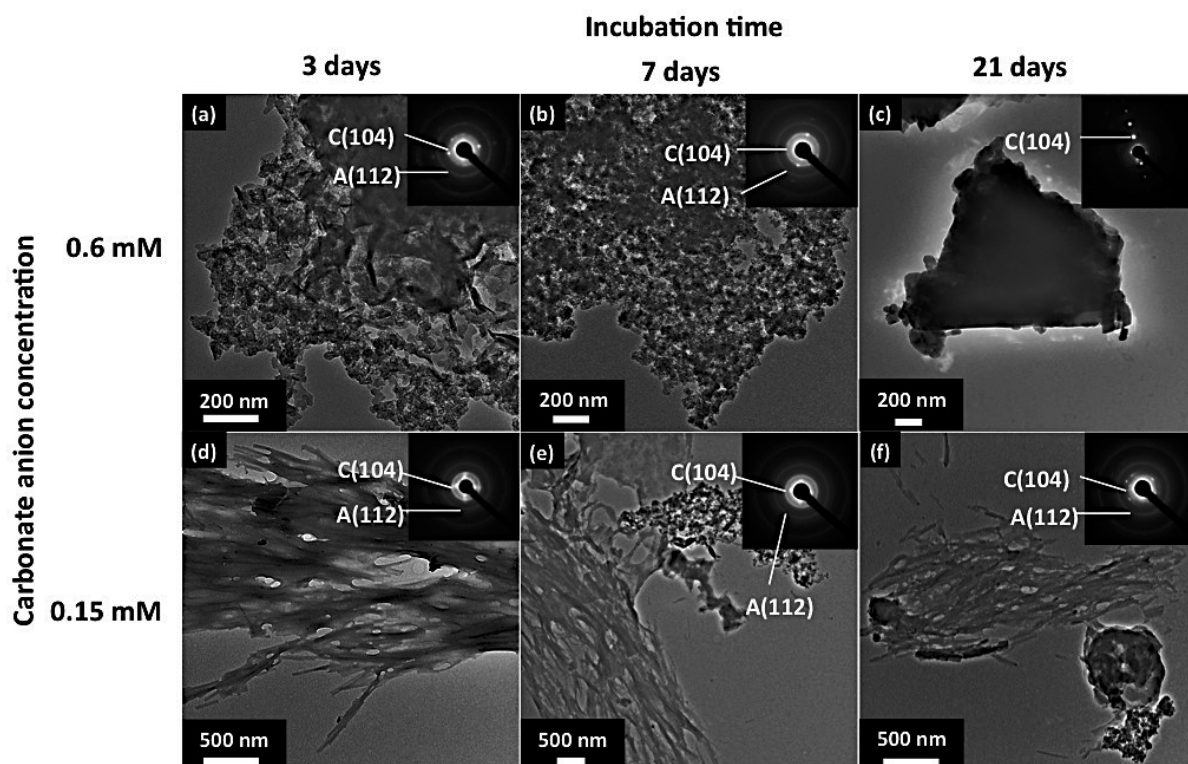


Figure 4-14. TEM images and SAED patterns of CaCO_3 obtained by the externally-supplied mineralization at 0.15 mM (a-c) and 0.6 mM (d-f) carbonate concentration. Incubation times of (a) and (d), (b) and (e), and (c) and (f) are 3, 7, 21 days, respectively.

ことを示唆する。この結果は、低炭酸イオン濃度(0.15 mM)において、テンプレート上のグルタミン酸側鎖カルボキシル基にイオン相互作用により濃縮されたカルシウムイオンが、テンプレート界面で炭酸イオンと反応し、テンプレートの効果をより強く受けた結果と考えられる。すなわち、低い炭酸イオン濃度では、バルクでの反応より、界面での反応が優先した。さらに反応の進行に伴い、ミネラルリゼーション開始7日後、高炭酸イオン濃度(Figure 4-14b)および低炭酸イオン濃度(Figure 4-14e)の両系において析出した炭酸カルシウムのモルフォロジーおよび結晶相に著しい変化を観察する事ができなかったものの、反応21日目において、特に高炭酸イオン濃度(0.6 mM)では、析出した炭酸カルシウムのモルフォロジーおよび結晶相に大きな変化が確認された(Figure 4-14c)。TEM観察より析出した炭酸カルシウムは、ナノキュービック粒子のみからなら凝集体を形成した。その凝集体のSAEDパターンは、カルサイト(104)面に基づく 3.04 \AA の D-spacing 値の回折スポットのみが観察された。この結果は、最安定相であるカルサイトが高炭酸イオン濃度下(0.6 mM)で準安定相であるアラゴナイトより優先的に成長した事を示唆する。加えて、低炭酸イオン濃度下(0.15 mM)で析出した炭酸カルシウムは、ミネラルリゼーション21日目においてもナノファイバー状粒子とナノキューブ粒子より形成されており、結晶相もアラゴナイトとカルサイトより形成されていた(Figure 4-14f)。アラゴナイトはペプチドテンプレート表面で、カルサイトがバルク中でそれぞれ優先的に成長する事がこれまでの結果より明らかである。高い炭酸イオン濃度下での外部供給型ミネラルリゼーションで見られるアラゴナイト相からカルサイト相への転移は、バルク中で形成される最安定相である多数のカルサイトの結晶核の成長が優先したも

のと考えられる。供給炭酸イオン濃度差に基づく炭酸カルシウム結晶形成の差は、低炭酸イオン濃度では長時間ミネラルゼーションを行った場合でも、ミネラル源となる炭酸イオン量が少ないため、高炭酸イオン濃度環境下とは異なりバルク中で形成されるカルサイト結晶核が少なく、著しいカルサイト形成が生じなかったと考えられる。そのため、外部供給型ミネラルゼーションによる炭酸カルシウムの結晶成長には、ミネラル源、つまり炭酸イオン濃度に大きな影響を受ける事が明らかとなった。

4-3-5. ミネラル源の自己供給能と二種類のテンプレート効果による結晶成長制御

最後に、炭酸カルシウム結晶の中でも熱力学的に準安定相であるアラゴナイトが、ペプチドテンプレート表面で形成されるメカニズムについて検討した。これまでに我々のグループでは、ミネラルゼーションにより析出する無機物質の結晶相が有機-無機界面間のエピタキシャル性により制御可能である事を報告している^[28]。そのため、アラゴナイト相形成のメカニズム解明のために、はじめに有機-無機界面間でのエピタキシャル性に着目した。Figure 4-15 は、21 日間の自己供給型ミネラルゼーションにより得た炭酸カルシウム-ペプチド複合体の高分解能-TEM(HR-TEM)を示す。HR-TEM 像は、アラゴナイト(002)面に基づく間隔 0.3 nm の結晶格子縞を示した。これはアラゴナイトの *a* 面が、ペプチドテンプレート表面

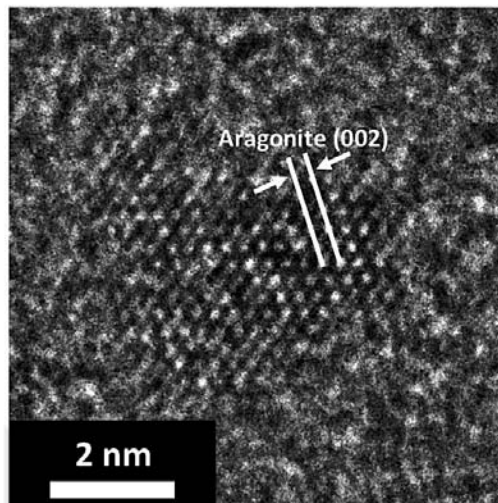


Figure 4-15. HR-TEM image of CaCO_3 mineralized on the VHVEVS peptide template by the self-supplied mineralization after 21 days.

に対して平行に接触している事を意味する(Figure 4-16)。そこでアラゴナイトおよびカルサイトの *a* 面における最表面カルシウム原子とペプチドテンプレート表面上の官能基間の位置関係を検討した(Figure 4-17)。ヒスチジンおよびグルタミン酸側鎖官能基は、カルシウムイオンと相互作用するため、その結合場として機能するためにその空間配置は非常に重要である。 β -シート構造中の長軸(ストランド間方向)および短軸(ストランド間、分子軸方向)方向に対するグルタミン酸とヒスチジンの α -炭素間の距離は、それぞれ 4.7 および 7.0 Å である(Figure 4-17a)。イミダゾール基およびカルボキシル基を示す円の直径は、ヒスチジンとグルタミン酸の α -炭素- β -炭素結合が自由回転すると仮定した時の可動距離を示す。ペプチドテンプレート表面上の官能基と両結晶相の最表面カルシウム原子の位置関係では、アラゴナイト、カルサイト、いずれの結晶相においても同程度のミスマッチが生じてしまった。そのために、エピタキシャル性のみでアラゴナイト相の選択的成長を説明する事は出来ない。

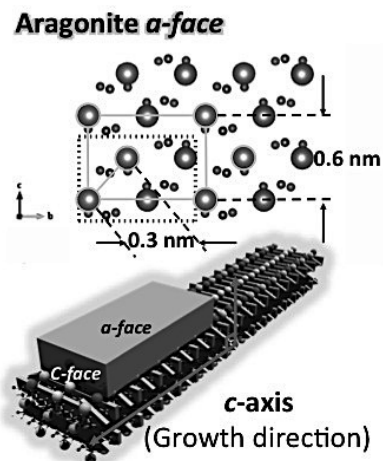


Figure 4-16. Schematic picture of positional relationship between the CaCO_3 crystal and peptide template.

面カルシウム原子の位置関係では、アラゴナイト、カルサイト、いずれの結晶相においても同程度のミスマッチが生じてしまった。そのために、エピタキシャル性のみでアラゴナイト相の選択的成長を説明する事は出来ない。

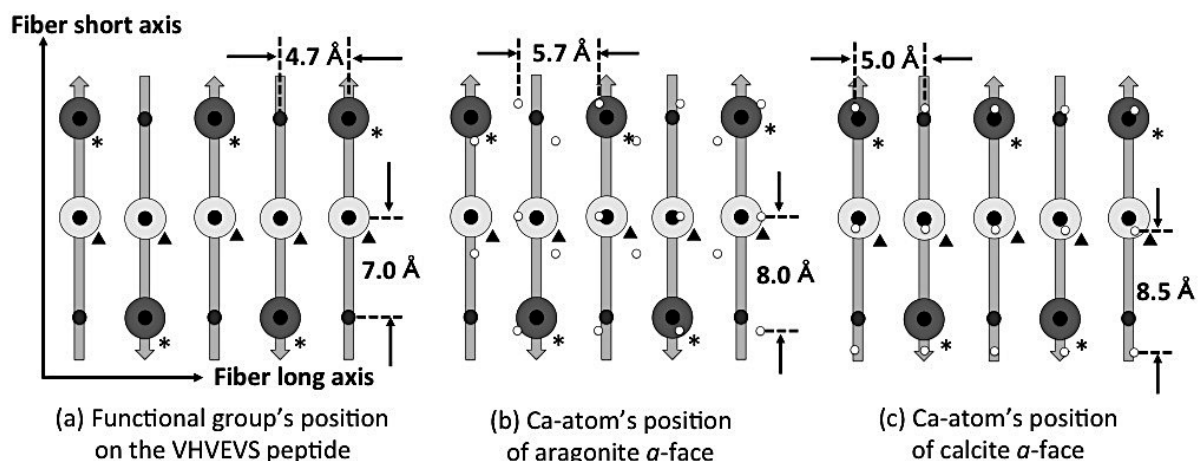


Figure 4-17. (a) Functional group's positions on the surface of the β -sheet peptide template. Ca-atom's positions on the α -face of (b) aragonite phase and (c) calcite phase, superimposed on (a). The asterisk and triangle marks in (a) exhibit the position of imidazole and carboxyl groups, respectively.

次に、アラゴナイト相の結晶成長方向と β -シートペプチドテンプレートのファイバー成長方向(ストランド間方向)間の相関を検討した。先行研究では、アラゴナイト相の結晶成長方向が、 a 軸や b 軸と比較して、 c 軸に成長しやすい事が報告されている^[29]。上述した様に、ミネラル化により析出した炭酸カルシウム結晶は、ペプチドテンプレート表面に対して a 面が接触している事を HR-TEM 像より明らかにした。そのため、アラゴナイト相の c 軸は、ペプチドテンプレートのファイバーの成長方向と一致している。自己供給型ミネラル化系では、炭酸カルシウムの成長がペプチドテンプレート表面上でのみ生じる。従って自己供給型ミネラル化により析出する炭酸カルシウム結晶は、二つのテンプレート効果により成長を規制される。1つ目は、ペプチドテンプレートの成長方向と炭酸カルシウム結晶の成長方向が一致する事での成長誘導、そして2つ目は、前節で述べた有機/無機界面における選択的核形成である。この際、オストワルド成長により幾分かの不整合の存在はあるものの、その成長方向がテンプレートの方向と一致するアラゴナイト結晶核が優先的に成長したものと考えられる。そのため自己供給型ミネラル化により析出した炭酸カルシウムは、これまでに我々のグループが提唱してきた有機-無機界面間でのエピタキシャル成長のみでその結晶成長が規制されているのではなく、ペプチドテンプレートのモルフォロジーに基づき析出する炭酸カルシウム結晶の成長が規制されていることが示唆される。

4-4. 結言

Nacrein タンパク質に倣い、酵素様活性によるミネラル源の自己供給能とテンプレート効果に基づく無機物質の結晶構造制御能を併せ持つペプチドテンプレートを設計し、炭酸カルシウムの自己供給型ミネラル化に与える影響を検討した。ミネラル源である炭酸イオンの前駆体であるウレアは、ペプチドの β -シートストランド内、ストランド間およびシート間でのセリンおよびヒスチジン側鎖官能基ペア間での協調効果“電荷リレー効果”により加水分解された。自己供給型ミネラル化により析出した炭酸カルシウムは熱力学的に準安定であるアラゴナイト相であり、モルフォロジーは

ペプチドテンプレートの構造を反映し、針状構造を取った。また、準安定相であるアラゴナイトの選択的形成は、これまでに提唱してきた有機-無機界面間でのエピタキシャル性のみではなく、ペプチドテンプレート上での局所的な核形成に加え、テンプレートのモルフォロジーと得られる結晶の成長方向間の関係により結晶成長が制御される事を明らかにした。このような“ミネラル源供給能”および“結晶成長制御能”を併せ持つ炭酸カルシウムの生体模倣型ミネラルリゼーションを行う事で、これまでのミネラルリゼーション研究では明らかにされてない新たな無機結晶制御機構に関する基礎的知見を得る事が出来た。さらに研究が発展する事により、緒言でも述べた“カルサイト-アラゴナイト問題”のような未解明な基本原理の解明を初め、新たな有機-無機複合体の創成手法の確立や低分子人工酵素などの工学や医学を初めとするさまざまな研究分野の発展が期待される。

Reference

- (1) C. Li, G. Hong, H. Yu, L. Qi, *Chem. Mater.*, **2010**, 22, 3206-3211.
- (2) J. Yang, Y. Liu, T. Wen, X. Wei, Z. Li, Y. Cai, Y. Su, D. Wang, *Cryst. Growth Des.*, **2012**, 12, 29-32.
- (3) A. Sugawara, T. Kato, *Chem. Commun.*, **2000**, 487-488.
- (4) L. Wang, I. Sondi, E. Matijević, *J. Colloid Interf. Sci.*, **1999**, 218, 545-553.
- (5) A.-W. Xu, M. Antonietti, S.-H. Yu, H. Cölfen, *Adv. Mater.*, **2008**, 20, 1333-1338.
- (6) Y. Yao, W. Dong, S. Zhu, X. Yu, D. Yan, *Langmuir*, **2009**, 25, 13238-13243.
- (7) L. Addadi, S. Weiner, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1992**, 31, 153-169.
- (8) F. C. Meldrum, H. Cölfen, *Chem. Rev.*, **2008**, 108, 4332-4432
- (9) S. Blank, M. Arnoldi, S. Khoshnavaz, I. Treccani, M. Kuntz, K. Mann, G. Grathwohl, M. Fritz, *J. Microsc.*, **2003**, 212, 280-291.
- (10) Y. Yamamoto, T. Nishimura, A. Sugawara, H. Inoue, H. Nagasawa, T. Kato, *Cryst. Growth Des.*, **2008**, 8, 4062-4065
- (11) B. Pokroy, A. N. Fitch, E. Zolotoyabko, *Cryst. Growth Des.*, **2007**, 7, 1580-1583.
- (12) A. Sugawara, T. Nishimura, Y. Yamamoto, H. Inoue, H. Nagasawa, T. Kato, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 2876-2879.
- (13) A. Shechter, A. Berman, A. Singer, A. Freiman, M. Grinstein, J. Erez, E. D. Aflalo, A. Sagi, *Biol. Bull.*, **2008**, 214, 122-134.
- (14) Y. Isa, *Marine Biology*, **1986**, 93, 91-101.
- (15) J. L. Arias, A. Neira-Carrillo, J. I. Arias, C. Escobar, M. Boderó, M. David, M. S. Fernández, *J. Mater. Chem.*, **2004**, 14, 2154-2160.
- (16) J. G. Davis, J. C. Oberholtzer, F. R. Burns, M. I. Greene, *Science*, **1995**, 267, 1031-1034.
- (17) T. Kato, *Adv. Mater.*, **2000**, 12, 1543-1546.
- (18) H. Miyamoto, T. Mitashita, M. Okushima, S. Nakano, T. Morita, A. Matsushiro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1996**, 93, 9657-9660.

- (19) S. Mann, Oxford University Press, **1989**.
- (20) R. L. Curl, *Natl. Speleol. Soc.*, **1962**, 24, 57-73.
- (21) T. Miyazawa, E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, 83, 712-719.
- (22) K. Kato, M. Nishida, K. Ito, M. Tomita, *Appl. Surf. Sci.*, **2012**, 262, 69-75.
- (23) T. C. Holmes, S. D. Lacalle, X. Su, G. Liu, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2000**, 97, 6728-6733.
- (24) W. D. Gould, F. D. Cook, G. R. Webster, *Plant and Soil*, **1973**, 38, 393-401.
- (25) 三川, 田代, **1950**, 71, 451-454
- (26) S. M. Antao, I. Hassan, *Canadian Mineralogist*, **2010**, 48, 1225-1236.
- (27) J. Paquette, R. J. Reeder, *Am. Mineral.*, **1990**, 75, 1151-1158.
- (28) T. Nonoyama, T. Kinoshita, M. Higuchi, K. Nagata, M. Tanaka, K. Sato, K. Kato, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 8841-8847.
- (29) S. Weiner, L. Addadi, *J. Mater. Chem.*, **1997**, 7, 689-702.

第 5 章

伝導性ナノ配線材料への応用を目指したシリカ被覆膜を有する 自己組織化ペプチドナノワイヤーの構築とその電気化学特性

5-1. 緒言

近年の電子産業を支え発展した微細加工技術であるシリコン半導体形成に代表されるリソグラフィなどの“トップダウン”アプローチは、今では 10 nm 程度の規則的ナノ構造体を形成可能な技術革新をもたらしてきた。しかし、トップダウンアプローチによるナノレベルの規則的構造体形成は、加工サイズが微細化されるとともに、その製造コストが飛躍的に増大し、さらにこれ以上の精密および微細構造を有する材料創生は困難であるといわれている。そのため近年のナノテクノロジーの研究分野において、自己組織化プロセスによる“ボトムアップ”アプローチを用いたナノレベルでの規則構造体形成技術が、注目され飛躍的に発展している。このナノテクノロジーを基盤とし生み出される材料の産業応用は、原子・分子レベルでの精密な設計が可能であるため、ナノ構造体固有の物性や特性を発現するために工学(半導体や電極材料など)や医療・福祉分野(再生医療など)などを初めとする幅広い研究領域で可能となっている^[1-5]。特に自己組織化を利用した導電性ナノ材料は、近代技術の発展における電子機器の小型化や低環境負荷型の製造プロセスに貢献可能であるため、盛んに研究が進められている。マイクロエレクトロニクスの分野において、微細構造構築は、同一サイズの空間にさまざまな機能素子の導入による高機能化や、サイズの減少による作動効率の上昇に基づく省エネルギー化などの技術革新を意味している。一例として導電性ナノワイヤーを例にとると、Aono らは、基板上に形成されたジアセチレンの自己組織化膜を走査型トンネル顕微鏡(STM)により重合し、規定の位置でのナノワイヤーの結線を報告している^[6]。また、電極を溶液中に浸し、電極間に電圧を加える事で自発的に電極間をナノレベルのワイヤーを結線する報告もある^[7]。しかし、自己組織化により形成されるナノワイヤーは、有機物質よりなるため以下の様な欠点を有する。シリコンデバイスに代表される無機材料が温度などの外部環境変化に対して高い耐久性を有する事に対して、自己組織化有機材料はこれらの安定性が低い点が上げられる。そのため、自己組織化を利用して形成されるナノ有機材料は、無機材料と同等またはそれ以上の安定性を付与することが課題となっている。

これらの課題を解決するために本章では、前章でも述べた生物が硬組織(骨・歯や貝殻など)を形成するプロセスであるバイオミネラル化による有機-無機複合化に着目した。本研究では、自発的に結線され且つ、無機物質であるシリカにより自己組織化ペプチドナノワイヤー表面をコーティングした有機-無機複合導電性材料の構築とその電気化学特性の発現を目的とした。ペプチド分子に規則的ナノワイヤーを形成させるにあたり、ペプチドの一次構造中に錯体形成サイトとしてヒスチジンを導入し、錯体形成能を付与した。ペプチドナノワイヤーへの無機物質コーティングは、生物がバイオミネラルを形成する合成プロセスであるバイオミネラル化を模倣し、温和な条件下において同ナノワイヤーをテンプレートとしてシリカミネラル化により行った。

5-2. 実験

5-2-1. 両親媒性ペプチド-コバルト錯体の形成と各種基板への導入

本研究で用いた水素結合および配位結合をドライビングフォースとして利用する自己組織化および、シリカミネラリゼーションのテンプレートとして働く両親媒性ペプチドは、2-2-2 で記述した 2 種類シークェン ス [LESEHEKLKSKHKSKLKEHESEL (Pep-GLS) および lipoic acid-LESEHEKLKSKHKSKLKEHESEL (Lipo-Pep-GLS)]からなる(Figure 2-3)。Pep-GLS は、錯形成に基づく軸方向への伸張を期待し、そのマクロダイポールと末端基間の静電相互作用のため、C 末端および N 末端をそれぞれカルボキシル基とアミノ基とした。このため、ペプチド担持樹脂には、C 末端がカルボキシル基となる CLEAR-Acid-Resin を用い、N 末端は未保護とした。また、Lipo-Pep-GLS は、上記 Pep-GLS が形成するナノワイヤーの基板表面での接点とする目的で、N 末端にリポ酸を導入した。合成は、Pep-GLS 合成後に N 末端アミノ基とリポ酸のカルボキシル基を結合させ、行った。

ペプチド-金属錯体を形成させる為の配位金属として、6 配位 8 面体構造を形成する 2 価のコバルト [Co(II)]を選択した^[8]。濃度 0.6 mM の Co(II)-エタノール溶液(2 μ L)を、調製した Pep-GLS-エタノール溶液(1.0 mM, 8 mL)中に 2 mL ずつ順次添加していった。この際、Co(II)の錯形成に基づく 530 nm における吸光度変化が一定になるまで待ち、安定化後 Co(II)溶液の添加を再開した。Pep-GLS-Co(II)錯体は、[Co(II)] / [His] = 0.25 すなわち、目的の錯構造となる Co(II)とヒスチジン側鎖イミダゾール基のモル比が化学量論比の 1:4 となった状態の溶液を Pep-GLS-Co(II)錯体溶液と記述する。

基板上で両親媒性ペプチドの自己組織化単分子膜(SAM)の形成を行う為に以下の操作を行った。N 末端にリポ酸を導入した Pep-GLS(Lipo-Pep-GLS)およびジブチルジスルフィドをエタノール中にそれぞれ溶解させた。この時の Lipo-Pep-GLS およびジブチルジスルフィドの最終濃度は、それぞれ 0.1 mM である。それぞれのエタノール溶液を種々の割合で混合し、混合溶液を形成し、同溶液に金蒸着マイカ基板[金蒸着層の厚さ: 150 nm, 露出結晶面: (1,1,1), Molecular Imaging]、および電極間距離が 2 μ m のくし型電極(012261 IDA electrode (Au) 2 μ m without passivation membrane, BAS)を、それぞれ 24 時間浸漬させた。その後、得られた金蒸着マイカ基板およびくし型電極を、エタノールで十分洗浄し、ペプチドナノワイヤーの接点となる基板および電極を作製した。また、比較実験として 0.1 mM のジブチルジスルフィド-エタノール溶液を用いた SAM 修飾金蒸着マイカ基板および SAM 修飾くし型電極を作製した。これらの基板および電極は、使用するまでデシケーター内で保管した。

SAM 修飾金蒸着マイカ基板および SAM 修飾くし型電極上でペプチド-Co(II)錯体を形成する為に以下の操作を行った。SAM 修飾金蒸着マイカ基板および SAM 修飾くし型電極を濃度 1.0 mM に調製した Pep-GLS-エタノール溶液 2 mL に浸漬し、振とうさせながら Co(II)-メタノールエタノール溶液を順次添加した。Co(II)溶液の添加量は、Pep-GLS-エタノール溶液(1.0 mM, 2 mL)に対して、100 mM の Co(II)-エタノール溶液を 3 μ L とした。添加間隔は、上記溶液中での錯形成の時間を考慮し、十分にとった。最終的な滴下量は 15 μ L である。この時 Co(II)とイミダゾール基のモル比は、[Co(II)] / [His] = 0.25 となる。Co(II)溶液滴下終了後、Pep-GLS-エタノール溶液中から各種基板を取り出し、純水で洗浄した。

5-2-2. 円偏光二色性スペクトル測定によるペプチドの二次構造評価

エタノール中でのペプチドの二次構造は、円偏光二色性(CD)スペクトルを用いて評価した。ペプチド溶液の濃度は 1.0 mM に固定し、調製したペプチド溶液を石英セル(光路長: 0.1 cm)に満たし、これを測定サンプルとした。CD スペクトル測定は、室温・窒素雰囲気下で円偏光二色性分散計(J-820、日本分光)を用いて波長領域 190-260 nm、積算回数 8 回の条件で行った。

5-2-3. 紫外-可視吸収スペクトル測定

Co(II)添加に伴うペプチド-Co(II)錯体形成を調べるために、紫外-可視(UV-vis)吸収スペクトル測定を行った。ペプチド-エタノール溶液(1.0 mM, 8 mL)を調製し、同溶液に対して酢酸コバルト四水和物-メタノール溶液(600 mM, 2 μ L)を順次添加した。Co(II)-メタノール溶液の添加は、Co(II)の錯形成に基づく 530 nm の吸光度の変化が安定するまで待ち、安定化後順次行った。UV-vis スペクトル測定には、UV-vis 測定装置(紫外可視光光度計 UV-3600, 島津製作所)を用い、光路長 1 cm の石英セル中で積算回数 1 回および波長領域:400-700 nm の条件下で行った。

UV-vis スペクトル測定時、Co(II)添加に伴い集合体形成による散乱が認められたため、得られたスペクトルを吸収スペクトルと散乱の各成分に波形分離し、スペクトルの解析を行った。吸収スペクトルには、ガウス-ローレンス分布を用い、その比は 9:1 とした。

5-2-4. フーリエ変換赤外(FT-IR)吸収スペクトル測定

ミネラルゼーションにより得られたシリカ-ペプチド複合体中のペプチドの二次構造、およびシリカ形成を評価するために、赤外分光吸収スペクトル(FT-IR)測定を行った。測定サンプルは、ミネラルゼーション後の溶液を遠心分離し、沈殿物を真空乾燥した後、KBr を混合したものを錠剤形成した。スペクトル測定はフーリエ変換赤外分光光度計(Spectrum 2000, PerkinElmer)を用いて透過吸収測定モード、波数領域:1900-1400 cm^{-1} および積算回数 32 回の条件下で行った。本測定の検出器には、 $\text{Hg}_{1-x}\text{Cd}_x\text{Te}$ (MCT)高感度検出器を用いた。

得られた FT-IR スペクトルにおいて、アミド I およびアミド II 領域のスペクトルを α -ヘリックス、 β -シートおよび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⁹⁾、それぞれのスペクトルの面積比より各二次構造の含有率を決定した。波形分離を行う各 FT-IR スペクトルは、ガウス-ローレンス分布とし、その比は 9:1 とした。また、シリカ形成は、Si-O-Si に帰属される 1030 から 1090 cm^{-1} の波長領域での吸光度より評価した。

5-2-5. セリン側鎖ヒドロキシル基のシリカ結合能の評価

ペプチド中のセリンが有する側鎖ヒドロキシル基のシリカに対する結合能を評価するために、モデル化合物である TMEOS 1.5 mL とペプチド-エタノール溶液(1.0 mM, 1.5 mL)の混合溶液を、25 $^{\circ}\text{C}$ で 15 日間反応させた。15 日間の反応後、ペプチドの分子量をマトリックス支援レーザー脱イオン化-飛行時間型質量分析法(MADLI-TOF-MS, JMS-S3000, 日本電子)により測定し、ヒドロキシル基-TMEOS 間の

脱水縮合反応の進行を確認した。

5-2-6. シリカミネラリゼーションを用いたペプチドナノワイヤーの被覆

Pep-GLS および Pep-GLS-Co(II)複合体(Pep-GLS-Co)をテンプレートとしたシリカミネラリゼーションを行った。シリカ前駆体である TEOS(1.5 mL)を、Pep-GLS-エタノール溶液(1.0 mM, 1.5 mL)または、Pep-GLS-Co(1.0 mM, 1.5 mL, [Co(II)] / [His] = 0.25)-メタノール溶液中へ加え、25 °C で 15 日間反応を行った。ミネラリゼーション後、遠心分離を行い、得られた沈殿物を、エタノールにより洗浄する事で未反応の TEOS を除去した後、真空乾燥を行いその質量を測定した。また比較実験として、ペプチド未含有のエタノールおよび Pep-GLS-Co 溶液中の Co(II)と同濃度の Co(II)を含むエタノール溶液でもシリカのミネラリゼーションを行った。

金蒸着マイカ基板およびくし型電極上に修飾したペプチドナノワイヤーをシリカにより被覆するために、5-2-1 で得られたペプチド修飾基板をそれぞれ 3.0 mL の TEOS 中に一週間浸漬し、ミネラリゼーションを行った。ミネラリゼーション後、TEOS から基板を取り出し、乾燥させた。

5-2-7. 透過型電子顕微鏡および原子間力顕微鏡によるペプチドナノワイヤーの観察

透過型電子顕微鏡(TEM)観察を行うにあたり、エタノール溶液中での Pep-GLS および Pep-GLS-Co(II)錯体の TEM 観察用サンプルは、吸着法により作製した。手順は以下の順により行った。

Pep-GLS-エタノール溶液(1.0 mM, 2 μ L)をエラスチックカーボン支持膜付銅グリッド(グリッドピッチ: 100 μ m)上に滴下し、5 分間グリッド上に吸着させた。その後、グリッド上の余分な溶液は、ろ紙を用いて除去した。Pep-GLS-Co-メタノール溶液([Co(II)] / [His] = 0.25)およびシリカ被覆ペプチドにおいても、同様の操作で TEM 観察用サンプルを作製した。

TEM 観察には、Ultra Scan CCD カメラ(Orius, Gatan Inc.)を装備した透過型電子顕微鏡(JEM-z2500, 日本電子)を用い、加速電圧 100 kV 下、無染色で観察した。また、モリブデン酸アンモニウムを用い、ネガティブ染色したサンプルに関し、加速電圧 200 kV にて観察を行った。染色は、濃度 2 wt%のモリブデン酸アンモニウム水溶液を 1 滴、サンプルを吸着させた TEM グリッドに滴下し、5 分間行った。その後、過剰なモリブデン酸アンモニウム水溶液をろ紙で吸収し、除去した。

基板上に固定化したペプチドナノワイヤーの表面モルフォロジーを観察するために、原子間力顕微鏡(AFM, Nanoscope V, Burker)を用い、大気中タッピングモードにて行った。スキャナーには 10 μ m \times 10 μ 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: 10 nm, Veeco Instruments)を使用した。

5-2-8. ペプチドナノワイヤーの電気化学特性

くし型電極(電極間距離: 2 μ m)の電極間を結線したペプチドナノワイヤーの電気化学特性は、Triangular Wave Generator(日本光電工業)および Patch/Whole-Cell Clamp Amplifier(日本光電工業)を用いて評価した。くし型電極の両電極を Triangular Wave Generator の陽極と陰極にそれぞれつなぎ、電圧を印加した。

印加電圧は、走査速度 1 mV/s、範囲+500～-500 mV の三角波を印加した。得られる応答電流を、Patch/Whole-Cell Clamp Ammplifier により計測・記録した。ナノワイヤーの電気化学特性は、ミネラリゼーション前後のものを比較する事で、ペプチドナノワイヤーのシリカ被覆による効果を検討した。

5.3. 結果・考察

5-3-1. ペプチドのコバルト錯体形成能を利用したペプチドナノワイヤーの構築とその構造解析

Fmoc 固相合成により得られた Pep-GLS および Lipo-Pep-GLS は、MALDI-TOF-MS を用いて合成の確認を行った(Figure 5-1)。いずれのペプチド ($[\text{Pep-GLS} + \text{H}]^+$ 実測値: 2775.1, 計算値: 2774.1, $[\text{Lipo-Pep-GLS} + \text{H}]^+$ 実測値: 2962.8, 計算値: 2962.4)においても測定分子量は、プロトン付加体の分子量計算値[ペプチドの計算分子量 + H]⁺とよく一致したことより、目的のペプチドが得られたと考えられる。次にこれらペプチドのエタノール溶媒中での二次構造を CD スペクトルより評価した。Figure 5-2 には、1.0 mM のペプチド-エタノール溶液中での CD スペク

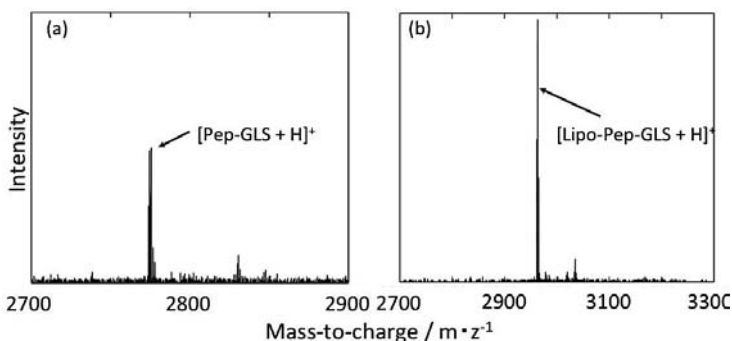


Figure 5-1. MALDI-TOF-MS spectra of the (a) Pep-GLS and (b) Lipo-Pep-GLS.

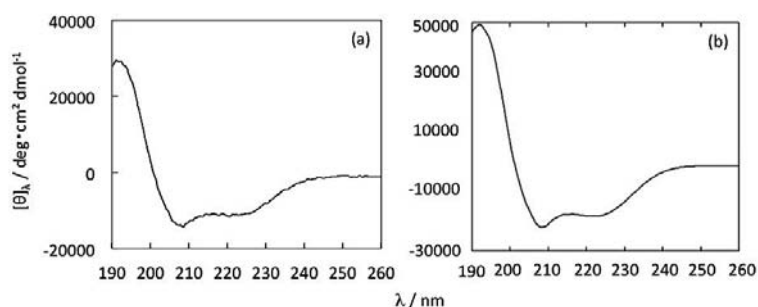


Figure 5-2. CD spectra of the (a) Pep-GLS and (b) Lipo-Pep-GLS in ethanol.

トルを示す。どの CD スペクトルも $[\theta]_{208}$ と $[\theta]_{222}$ に負の極大が観測されたため^[10]、 α -ヘリックス構造を形成している事が示された(Table 5-1)。しかしながら、N 末端にリポ酸を導入した Lipo-Pep-GLS では、 $[\theta]_{208}$ 、 $[\theta]_{222}$ いずれも Pep-GLS よりも大きな値を示し、N 末端を保護する事で α -ヘリックス構造が安定化される事がわかった。

次に、Pep-GLS と Co(II)間での錯形成反応について、Pep-GLS-エタノール溶液中に

Co(II)溶液を添加し、錯形成およびそれに伴う二次構造変化を UV-vis および CD スペクトルの経時変化より検討した。Pep-GLS-エタノール溶液に対して Co(II)-メタノール溶液を、 $[\text{Co(II)}] / [\text{His}] = 0.25$ (モル比)となるように添加し、1 日毎に UV-vis スペクトル測定を行った(Figure 5-3a)。上記のモル比は、Co(II)が 6 配位 8 面体構造の錯体を形成し、4 分子の His 側鎖イミダゾール基が Co(II)に対して平面 4 配位とする錯体構造を形成する時の値である。UV-vis スペクトル測定より、Co(II)のイミダゾール基への配位に基づく波長 530 nm 付近の吸収スペクトル変化は、1 日後には一定となった(Figure 5-3b)。一方 CD スペクトル測定では、Co(II)添加後にスペクトルが徐々に変化し(Figure 5-4a)、 $[\theta]_{222} / [\theta]_{208}$ の値の上

Table 5-1. Fraction of secondary structure of the peptides in ethanol.

Peptide	α -helix (%)	β -sheet (%)	Random coil (%)
Pep-GLS	50	25	25
Lipo-Pep-GLS	47	21	32

昇が確認された。このスペクトル変化は、およそ4日後に平衡値に達した(Figure 5-4b)。 $[\theta]_{222} / [\theta]_{208}$ の値は、 α -ヘリックスの会合体形成により上昇する事が報告されている^[11-13]。CD スペクトル測定の結果より、Pep-GLS 中の His 側鎖イミダゾール基が Co(II)に配位することで4分子のペプチドよりなる α -ヘリックスの会合体(4 α -ヘリックスバンドル)が形成された事が示唆される。また UV-vis スペクトル測定による Pep-GLS と Co(II)間の錯体形成時間、CD スペクトル測定による α -ヘリックスの会合体形成時間の差異より安定なヘリックス集合体形成メカニズムは、以下のように考えられる。 α -ヘリックス会合体の形成には、ペプチド4分子と Co(II)による4- α -ヘリックスバンドルユニットの

形成と、ヘリックス軸方向への成長のためにペプチド分子間のマクロダイポール相互作用が必要である。UV-vis スペクトル測定より、錯体形成反応初期に4- α -ヘリックスバンドルユニットが形成されると考えられる。その後、先に形成された4- α -ヘリックスバンドルユニットがマクロダイポール相互作用をドライビングフォースとして巨大なヘリックス集合体を形成するため、各スペクトルの安定化時間に差が出たのだと考えられる。

次に、Pep-GLS-Co(II)錯体形成における Co(II)の濃度依存性について検討した。Pep-GLS-エタノール溶液に対して、Co(II)-メタノール溶液を順次添加し、 $[\text{Co(II)}] / [\text{His}]$ のモル比を0.05

ずつ変化させて、UV-vis スペクトル測定を行った。Co(II)が Pep-GLS-エタノール溶液中において低濃度(モル比: 0.05)で存在するときには、錯体形成に基づく波長 530 nm の吸光度の安定化に長時間(10 日間)を有した。その後、Pep-GLS-エタノール溶液中における $[\text{Co(II)}] / [\text{His}]$ のモル比の上昇に伴い吸光度の安定化に要する時間が短くなっていった(Figure 5-5)。この結果より、錯体形成は、Co(II)の濃度依存性がある事が示唆される。この濃度依存性は、以下のように考える事が出来る。Co(II)の6配位8面体構造を考えた際、Co(II)が Pep-GLS4分子中のいずれか3つのヒスチジン側鎖イミダゾール基に配位し、

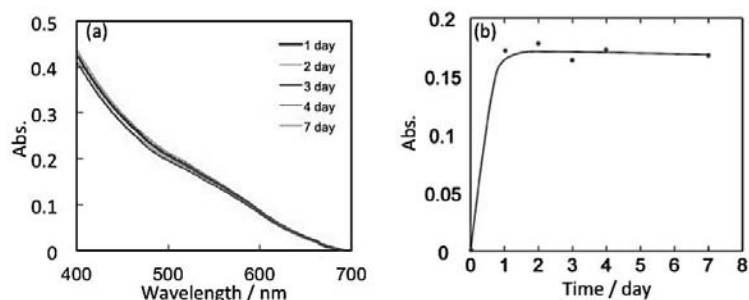


Figure 5-3. (a) Time dependence changes of UV-vis spectra of the Pep-GLS in ethanol after addition of Co(II). The concentration ratio of $[\text{Co(II)}] / [\text{His}]$ was fixed at 0.25. (b) Time dependence changes of absorbance at 530 nm.

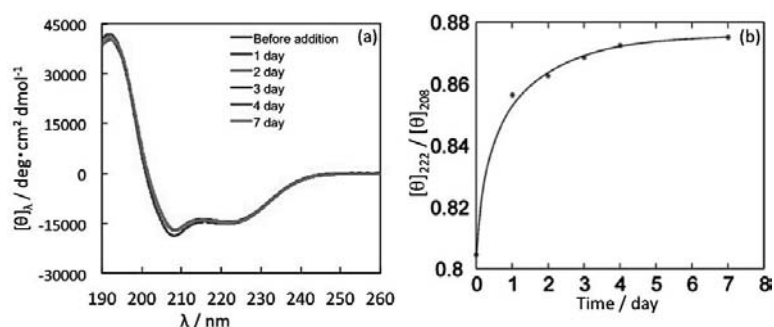


Figure 5-4. (a) Time dependence changes of CD spectra of the Pep-GLS in ethanol after addition of Co(II). The concentration ratio of $[\text{Co(II)}] / [\text{His}] = 0.25$. (b) Time dependence changes of ratios of molar ellipticity at 222 nm and 208 nm.

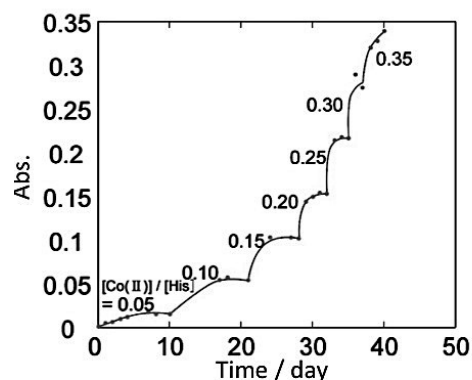


Figure 5-5. Time dependence changes of absorbance at 530 nm of the Pep-GLS in ethanol after the addition of Co(II). The addition of Co(II) was carried out sequentially.

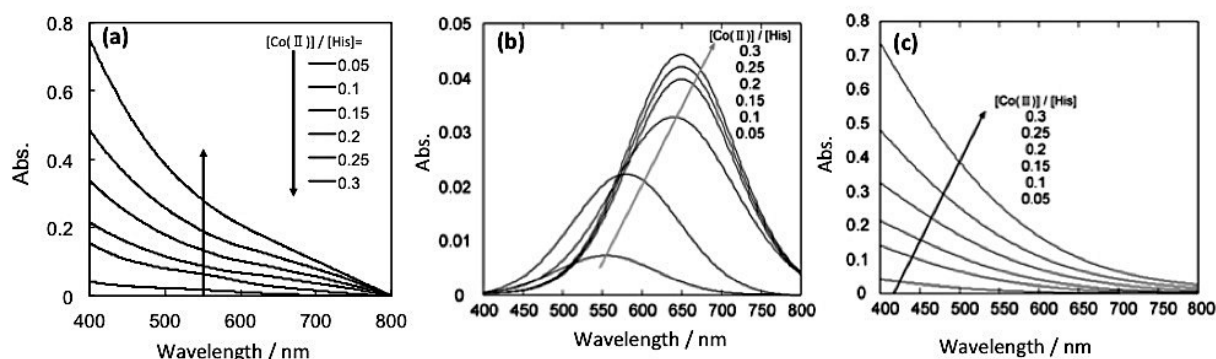


Figure 5-6. (a) UV-vis spectra of the Co(II)-coordinated Pep-GLS in ethanol by addition of Co(II) sequentially after having reached the equilibrium. The (a) UV-vis spectra and (c) scattering component based on Co(II) complexation obtained by peak deconvolution of the spectra in Figure 5-6(a).

4-ヘリックスバンドルを形成すると考えると、低濃度比の Co(II)の添加によりペプチド集合体中に 1 つ錯体が形成される事で、集合体中に Co(II)に対する空の結合サイトが形成され、後に添加した Co(II)とイミダゾール基間での配位が促進されたものと考えられる。また $[\text{Co(II)}] / [\text{His}] = 0.25$ における 530 nm の吸光度の平衡値は、0.17(Figure 5-3) 程度であるのに対し、順次 Co(II)溶液を添加した場合では、0.22 とより高い値を示した(Figure 5-5)。この結果は、順次 Co(II)を添加する事でより効果的に、すなわち一度に化学量

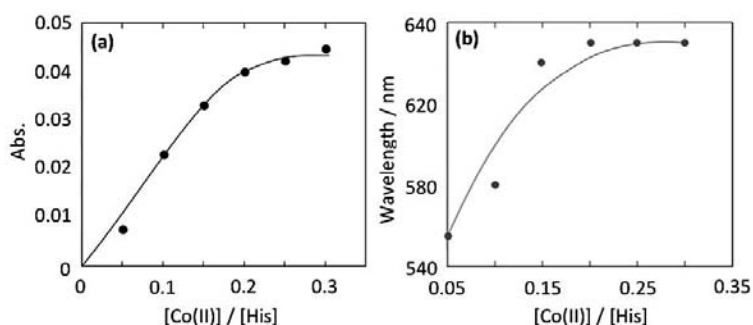


Figure 5-7. $[\text{Co(II)}] / [\text{His}]$ dependence changes of (a) maximum absorbance and (b) absorbance maximum peak of the spectrum based on Co(II) complexation.

論比の Co(II)を添加した場合とくらべ、多くのヒスチジン側鎖イミダゾール基が Co(II)-イミダゾール基間の錯体形成に関与した事を示唆する。Figure 5-6a は、段階的に Co(II)を添加した際の吸光度変化を示す。同スペクトルには、錯形成に伴う会合体形成による散乱成分が含まれるため、同スペクトルの Co(II)配位に基づく吸収スペクトル(Figure 5-6b)と散乱成分(Figure 5-6c)に波形分離を行った。錯形成に基づく吸収スペクトル(Figure 5-6b)に関して、その最大吸収波長における吸光度(Figure 5-7a)と、吸収波長(Figure 5-7b)の $[\text{Co(II)}] / [\text{His}]$ 依存性を検討した。Co(II)配位に基づく吸収は、最大吸収波長が高波長側にシフトす

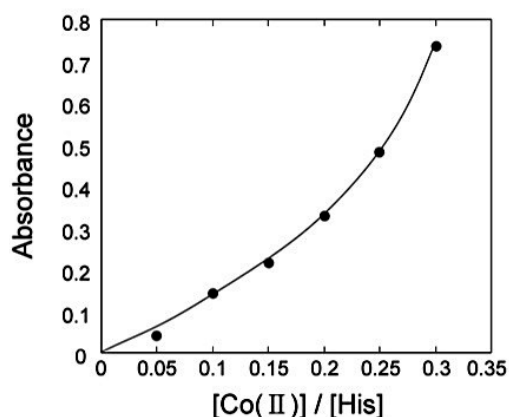


Figure 5-8. $[\text{Co(II)}] / [\text{His}]$ dependence changes of absorbance of the scattering component.

るとともにその吸光度は、 $[\text{Co(II)}] / [\text{His}] = 0.25$ になったところで平衡に達した。モル吸光係数の波長依存性は無視出来ないものの、その吸光度が飽和となる $[\text{Co(II)}] / [\text{His}] = 0.25$ という値は、先に述べたヒスチジン側鎖イミダゾール基が Co(II)に対し、平面 4 配位した際の値に等しく α -ヘリックス構造を取

った 4 分子の Pep-GLS 中の個々の His 側鎖イミダゾール基と Co(II)が平面 4 配位構造の形成、すなわち 4- α -ヘリックスバンドルを形成したものと考えられる。また、Co(II)添加に伴う、最大吸収波長の長波長シフト(Figure 5-6b)は、4- α -ヘリックスバンドル中に形成される Co(II)-イミダゾール錯体間に共役が生じ、バンドルの成長に伴いその共役長が伸長することを示唆している。このことは、散乱成分の $[\text{Co(II)}]/[\text{His}]$ 依存性からも裏付けられる。Figure 5-8 は、400 nm における Figure 5-6c の散乱成分の吸光度を $[\text{Co(II)}]/[\text{His}]$ に対してプロットしたものである。Co(II)添加に伴い、散乱成分の吸光度は増加し、より大きな会合体へと成長する事がわかる。これは、4- α -ヘリックスバンドルの軸方向への成長と考えられ、このことから内部に形成された Co(II)-イミダゾール錯体間の共役長の伸長が示唆される。 $[\text{Co(II)}]/[\text{His}] = 0.25$ 以降の散乱成分の増加は、バンドル表面のグルタミン酸側鎖カルボキシル基と Co(II)との相互作用により、各々のバンドルが凝集し、より太く大きな集合体を形成したためと考えられる。

さらに Co(II)を順次添加した際の CD スペクトルの変化を検討した(Figure 5-9a)。得られた CD スペクトルの 222 nm と 208 nm におけるモル楕円率の比

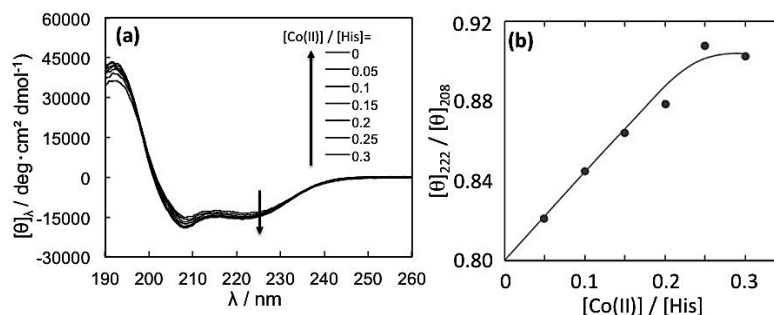


Figure 5-9. (a) CD spectral changes of the Lipo-Pep-GLS in ethanol by addition of Co(II) sequentially after having reached the equilibrium, respectively. (b) $[\text{Co(II)}]/[\text{His}]$ dependence changes of ratio of molar ellipticity of 222 nm and 208 nm.

$([\theta]_{222}/[\theta]_{208})$ を $[\text{Co(II)}]/[\text{His}]$ に対してプロットした(Figure 5-9b)。 $[\theta]_{222}/[\theta]_{208}$ の値は、Co(II)添加により増加し、Co(II)が His 側鎖イミダゾール基と平面 4 配位する化学量論比の $[\text{Co(II)}]/[\text{His}] = 0.25$ で平衡値に達した。先にも述べた様にペプチド鎖がバンドルを形成した際に 222 nm の吸収ピークは高波長側にシフトするとともに、208 nm の吸収ピーク強度は減少する事が知られている。 $[\theta]_{222}/[\theta]_{208}$ の値は、バンドル形成に伴い増加する。この結果は、Co(II)とイミダゾールとの錯形成に伴い、4- α -ヘリックスバンドルを形成する事を示している。以上の結果より、 $[\text{Co(II)}]/[\text{His}] = 0.25$ のモル比において、Pep-GLS は 4-ヘリックスバンドルがヘリックス軸方向に成長し、内部に連続した Co(II)-4His 錯構造を形成した事が明らかとなった。

Pep-GLS および Pep-GLS-Co 錯体のエタノール中でのモルフォロジーは、TEM 観察により評価した。Pep-GLS-Co 錯体は、先の実験で Co(II)を順次添加し、 $[\text{Co(II)}]/[\text{His}] = 0.25$ に調製したものである。まず、無染色条件で加速電

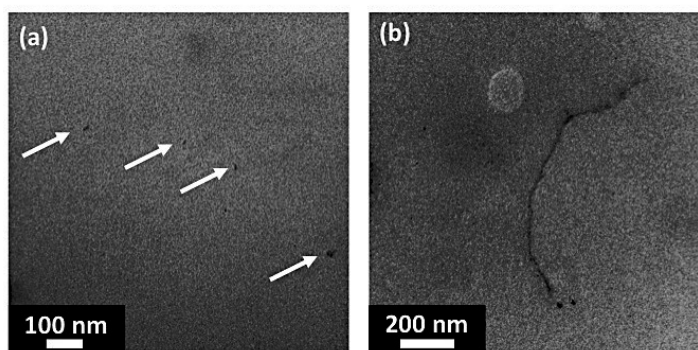


Figure 5-10. TEM images of the (a) Pep-GLS and (b) Pep-GLS-Co. These samples were prepared by the absorption method. The observation was carried out at 100 kV under the unstained condition.

圧 100 kV にて観察を行った。これは、染色剤(モリブデン酸アンモニウム)による凝集等の形態変化を

防ぐためである。Pep-GLS では、粒子状のものが多く観察され (Figure 5-10a)、その直径は約 30 nm であった。比較実験として行ったエタノールのみを TEM グリッド上に吸着させたサンプルでは、像を観察出来なかった。そのため、Pep-GLS 系で観察された TEM 像は、ペプチドの凝集体であると考えられる。一方、

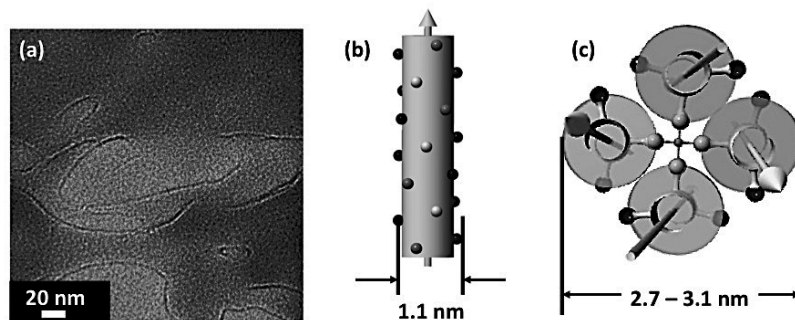


Figure 5-11. TEM image of the (a) Pep-GLS-Co and schematic pictures of (b) α -helix and (c) 4- α -helix bundle. The TEM sample was prepared by the absorption method and negative stained by using a hexaammonium heptamolybdate. The observation was carried out at 200 kV.

Pep-GLS-Co(II)錯体の TEM 観察では、Pep-GLS 系とは異なり繊維状の会合体が観察された (Figure 5-10b)。無染色での TEM 観察では、十分なコントラストが得られなかったため、明確な繊維幅を求める事が出来なかった。そこで、TEM グリッド上へ吸着させた Pep-GLS-Co(II)錯体をモリブデン酸アンモニウムによるネガティブ染色を施し、再度 TEM 観察 (加速電圧: 200 kV) を行った。モリブデン酸アンモニウムを用いたネガティブ染色においても、無染色と同様に繊維状会合体の存在が確認出来、このモルフォロジーは、Pep-GLS-Co 錯体に固有のものである。ネガティブ染色の TEM 観察より、繊維幅が約 3.7 nm である事を得た (Figure 5-11a)。 α -ヘリックスバンドルの断面のモデル図を (Figure 5-11b) に示す。 α -ヘリックスの直径を 1.1 nm とし、4 本の α -ヘリックス分子が垂直に最密充填した場合、得られるバンドル幅は、約 3.1 nm となる。しかしながら、2-2-2 で述べたように His 残基はヘリックス軸に対して傾いて配向しており、4-ヘリックスバンドル中の個々のヘリックス分子は Co(II)-His 側鎖イミダゾール基間の錯形成により傾いて集合体を形成する。この場合、Co(II)-イミダゾール基間の配位結合距離は 0.2 nm、Co(II)のイオン直径 0.1 nm を考慮したモデル図が Figure 5-11c の右図であり、この場合のバンドル径は、2.7 nm となる。この値は、ネガティブ染色を考慮して TEM による直接観察で得られた繊維径の値とほぼ一致する。この結果は、Co(II)と His 側鎖イミダゾール基間での錯形成により、4- α -ヘリックスバンドルがヘリックス軸方向に成長することで繊維状ナノワイヤーを形成した事をそのモルフォロジーからも明らかとするものである。

5-3-2. シリカミネラルゼーションを利用したペプチドナノワイヤーの被覆と

ペプチド側鎖官能基がミネラルゼーションに与える影響

シリカのミネラルゼーションを利用したペプチドナノワイヤー表面の無機被覆を考えた上で、Pep-GLS 中に存在する Ser 側鎖ヒドロキシル基がシリカとの結合サイトとなる可能性を検討した。5-2-6 節で述べたシリカミネラルゼーションの手法と同一条件下で、シリカ前駆体を TEOS から TMEOS に変え、Pep-GLS との反応を行った。具体的には、TMEOS 1.5 mL と Pep-GLS-エタノール溶液 (1.0 mM, 1.5 mL) を混合し、25 °C で 15 日間振とうした。反応終了後、混合溶液中の生成物の分子量を MALDI-TOF-MS により測定した (Figure 5-12)。その結果、Pep-GLS に由来する 2774.8 のピークに加え、新たに 2847.5

にピークを確認した。これは、Pep-GLS 分子内の Ser 一残基と TMEOS が脱水縮合し、形成される複合体の計算分子量 2846.2 に近い値であった。以上の事より、Pep-GLS 分子中の Ser 側鎖ヒドロキシル基は、脱水縮合反応によりシラノール基と結合する事が示唆された。このヒドロキシル基とシラノール基間で縮合反応が生じるには、2 段階の過程が考えられる。最初の過程では、TMEOS の加水分解によりシラノール基が生成される。溶媒がエタノールにもかかわらず加水分解反応が生じるのは、エタノール中に微量に存在する水の作用であると考えられる。最後の過程は、ヒ

ドロキシル基とシラノール基間での縮合である。この縮合反応では、第 3 章で述べた Pep-GLS 分子内または他分子間の Lys および Glu の効果的な相互作用“電荷リレー効果”によるものだと考えられる。

TMEOS を用いた反応系での結果より、Pep-GLS 中のセリン側鎖ヒドロキシル基がシリカとの結合サイトとなることが明らかとなったため、5-3-1 で述べた Pep-GLS-Co 錯体表面をミネラルゼーション法によりシリカでの被覆を試みた。また比較実験のために Pep-GLS、ペプチドを含まないエタノールおよび酢酸コバルトのみを含むエタノールにおいてもシリカのミネラルゼーションを行った。各サンプルでのミネラルゼーションでは、Pep-GLS-Co 錯体および Pep-GLS でのみ析出物の存在が確認された。エタノ

ール単独および酢酸コバルト-エタノール溶液では、析出物が確認されなかったことから、シリカのミネラルゼーションがペプチドテンプレートにより触媒されていると考えられる。次に、シリカとペプチドの複合化を確認する為に、各析出物およびペプチドの FT-IR スペクトル測定を行った。Pep-GLS および Pep-GLS-Co(II)錯体と比較して、ミネラルゼーション後の析出物では、 1070 cm^{-1} 付近に新たな吸収スペクトルが観察された(Figure 5-13)。この吸収ピークは、ミネラルゼーションにより形成したシリカに由来する Si-O-Si(吸収ピーク波数: $1030\sim 1090\text{ cm}^{-1}$)に基づく吸収であると考えられる^[14-16]。また同時に、得られた IR スペクトルのアミド I およびアミド II 吸収帯より複合化されたペプチドの二次構造解析を行った(Figure 5-14)。得られたスペクトルを波形分離することにより、各ペプチドの二次構造含有率を算出した(Table 5-2)。IR スペクトルの波形分離の結果より、ミネラルゼーション前の各ペプチドが有していた二次構造含有率に変化が生じていた。ミネラルゼーションにより複合化された各ペプチド

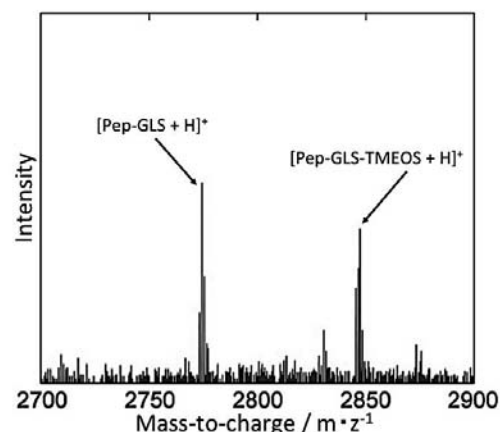


Figure 5-12. MALDI-TOF-MS spectrum of the product obtained by mixing of the Pep-GLS and trimethylethoxysilane.

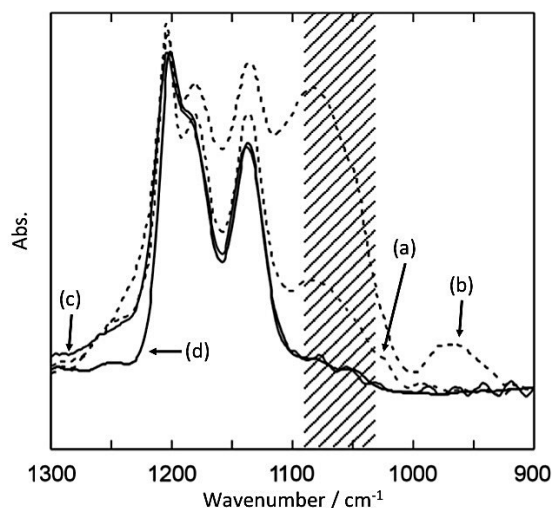


Figure 5-13. FT-IR spectra of peptide/silica nanocomposites obtained by mineralization using templates, (a) Pep-GLS, (b) Pep-GLS-Co, and spectra of non-mineralized peptides, (c) Pep-GLS and (d) Pep-GLS-Co, respectively.

は、 α -ヘリックス構造の含有率が上昇していた。これは、無機物質であるシリカがペプチドを被覆する事により、ペプチド分子の分子運動が抑制される事によるものだと考えられる。加えて、Pep-GLS-Co(II)錯体では、錯形成により形成される4- α -ヘリックスバンドル構造中で α -ヘリックス構造が安定化されるため、その効果が顕著に現れたと考えられる。

シリカ-ペプチド複合体のモルフロジーを観察する為に、

吸着法により作製したサンプルを TEM により観察した(加速電圧: 200 kV, 無染色)。Pep-GLS および Pep-GLS-Co(II)錯体をテンプレートとしてミネラルゼーションしたシリカ-Pep-GLS 複合体のモルフロジーは、それぞれ粒子状(Figure 5-15a)および繊維状(Figure 5-15b)であった。先に述べたペプチドテンプレートのモルフロジー(Figure 5-10)と、シリカミネラルゼーションにより形成したシリカ-ペプチドの複合体のモルフロジーは良く一致し、各ペプチドのテンプレート効果により、そのモルフロジーが制御されたことが示唆される。特に Pep-GLS-Co 錯体から形成される繊維状集合体は、その内部に共役した Co(II)錯体を有する4- α -ヘリックスバンドルがヘリックス軸方向に成長したペプチドナノワイヤーの形成が可能と考えられる。次節にて、このペプチドナノワイヤーの電気化学特性とナノボンディング材料への応用に関し検討する。

5-3-3. シリカ被覆ペプチドナノワイヤーの電気化学特性評価

本節の初めに、Pep-GLS の自己組織化的なナノワイヤー形成能を利用し、基板間を自発的に結線するナノボンディングについて検討した。基板上へペプチドナノワイヤーの接点となる結合点を形成するために、Pep-GLS の N 末端に金との結合能を有するリガ酸を導入した Lipo-Pep-GLS を基板表面に固定化した。金基板(電極)表面上における Lipo-Pep-GLS の表面濃度の最適化を行った。スパーサーとし

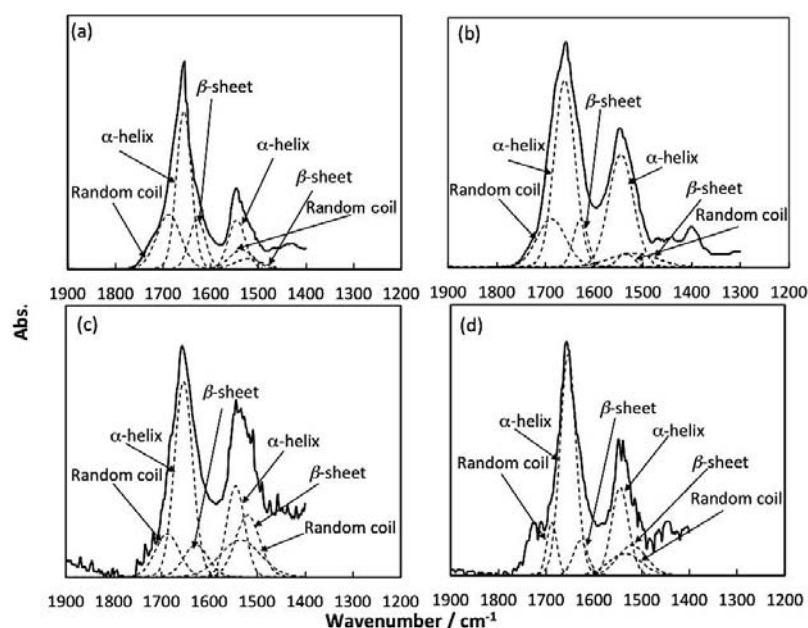


Figure 5-14. TM-FTIR spectra of the (a) Pep-GLS, (b) Pep-GLS-Co, (c) Pep-GLS-silica, and (d) Pep-GLS-Co-silica nano-composites after mineralization.

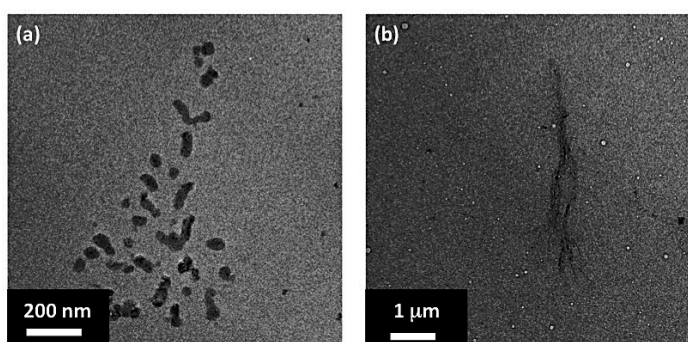


Figure 5-15. TEM images of the (a) Pep-GLS-silica and (b) Pep-GLS-Co-silica nano-composites after mineralization. Each nano-composites redispersed in ethanol, and prepared by the absorption method. These observations were carried out without stain at 200 kV.

Table 5-3. Conditions of concentration ratios of mixed solutions of C4 and Lipo-Pep-GLS. Area ration was calculated using ration of concentration.

Condition names	Area ration of C4: Lipo-Pep-GLS: 4-helical bundle on the Au Plate	Ration of Concentration of C4: Lipo-Pep-GLS in the ethanol
P3	100: 15: 57	0.1: 4.0×10^{-3}
P4	1000: 15: 57	0.1: 4.0×10^{-4}
P5	10000: 15: 57	0.1: 4.0×10^{-5}
P6	10000: 15: 57	0.1: 4.0×10^{-6}
Control	—	0.1: 0

てジブチルジスルフィドを用いた。スペーサーであるジブチルジスルフィドは、ジスルフィド結合が切断される事により、ブチル基を有する 2 分子のスルフィドとなり金基板表面上へスルフィド結合を介して固定化させる。スペーサーは、Lipo-Pep-GLS とともに金基板表面に固定化する事で基板の絶縁層として機能するとともに、ペプチドバンドルよりなるナノワイヤーの結合点となる Lipo-Pep-GLS の表面密度を制御するために用いた。加えて、スペーサーは、疎水性表面を形成するため、表面が親水的なペプチドバンドルよりなるナノワイヤーの金基板表面への非特異的な吸着が抑制されると考えられる。次に、Lipo-Pep-GLS とスペーサーの金基板の占有面積比の最適化は、5-2-1 で述べた SAM 形成における Lipo-Pep-GLS とスペーサーの混

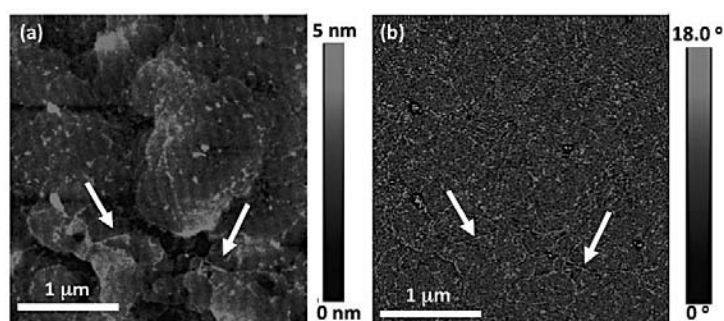


Figure 5-16. AFM (a) height and (b) phase images of complex-modified SAM on the Au plate. The mixed SAM containing C4 and Lipo-Pep-GLS was formed under the P5 condition. Complex-modified SAM having field Co(II) coordinated peptide nano-wires (showed by white arrows) were fabricated by the addition of Co(II) to the mixed SAM in the Pep-GLS ethanol solution.

合溶液の濃度比を変えて調製した SAM を用いて、その表面分析により行った。ここで Lipo-Pep-GLS とスペーサーの占有面積比は、混合溶液中の各成分の濃度比に対応すると仮定した。 α -ヘリックスおよびスペーサーの断面積は、それぞれ 1.5 nm^2 ^[17]および 0.4 nm^2 (アルキル鎖一本の占有面積は 0.2 nm^2)^[18]であることから、金基板表面上での SAM を構成する各成分の面積比が Table 5-3 となる様に 4 種類の異なる濃度比を有する混合溶液を作製し、SAM を形成した。比較実験として Lipo-Pep-GLS を含まないスペーサーのみでの SAM も作製した。また、コバルト(II)との錯体形成により得られる 4-ヘリックスバンドルの断面積は、4- α -ヘリックスバンドルの直径: 2.7 nm であるため、 5.7 nm^2 である。混合 SAM 中に固定化された Lipo-Pep-GLS 1 本が、ペプチドナノワイヤー 1 本を固定化すると仮定し、C4, Lipo-Pep-GLS および 4- α -ヘリックスバンドルより成るペプチドナノワイヤーの面積比を算出した。Table 5-3 の条件に従い作製した SAM 修飾金基板を 1.0 mM の Pep-GLS エタノール溶液に浸漬し、振とうしながら 5-2-1 節で述べた様に $[\text{Co(II)}]/[\text{His}] = 0.25$ となるまで順次 Co(II)を順次添加し基板表面での Lipo

-Pep-GLS 間の 4- α -ヘリックスバンドルよりなるナノワイヤーの結線を行った。各条件で作製したナノワイヤーで結線された金基板の表面を AFM により観察した。条件 P5 において、Height および Phase モードで、繊維状の構造を観察する事ができた(Figure 5-16)。一方、他の作製条件(P3, P4, P6 および Control)では、特異的な構造を観察出来なかった。ナノワイヤー形成金基板は、AFM 観察を行う前にエタノール洗浄をおこなっている。それゆえ AFM 観察により得られた像は、物理吸着により基板上へ固定化されているものではなく、基板表面に導入した Lipo-Pep-GLS を結合始点として形成された 4-ヘリックスバンドルよりなるナノワイヤーだと考えられる。P3 および P4 は、繊維状構造体を観察した P5 と比較して、SAM 作製時の Lipo-Pep-GLS とスペーサーよりなる混合溶液中のペプチドの濃度が高いため、金基板表面上のペプチドの占有面積比が上昇していると考えられる。そのため、結合始点同士の距離間が短くなり、P5 の様な長距離間でのナノワイヤー形成が生じにくくなったものだと考えられる。それに対して P6 では、P3 や P4 とは逆に金基板表面上のペプチドの占有面積比が低いため、結合始点同士の距離が長くなってしまふことでナノワイヤー形成の確率が減少することで AFM 観察より確認できなかったと考えられる。これらの結果より、SAM 修飾金基板上での Lipo-Pep-GLS の表面濃度の最適条件は、基板上に存在する結合始点同士を結線したナノワイヤーがある程度の長さを持つ事が可能な P5 および P6 である。

次に、くし型電極(電極間距離: 2 μm)を用いた電極間での自発的結線および形成されたナノワイヤーの電気化学測定を行った。本節では、SAM の作製条件に前述した P6 の条件を用いた。P6 の条件を用いた理由を以下に記述する。くし型電極上での Lipo-Pep-GLS を結合始点とするナノワイヤー形成では、金基板とは異なり 2 種類の結線状態(くし型電極間と電極表面内)が存在すると考えられる。P5 の条件で作製したナノワイヤーでは、AFM 観察より 2 μm を超える長さのナノワイヤーを確認する事が出来なかった。これを別の視点から見

ると、P5 の作製条件で得られた SAM の Lipo-Pep-GLS を結合始点として成長を開始したナノワイヤーが、2 μm 以内に存在する電極表面内の結合点と結合し、ボンディングを終了してしまう可能性があり、結果として電極間での結線の障害となる。また、P6 の作製条件により形成される SAM 中の Lipo-Pep-GLS の有する占有面積は、P5 に対して 10

分の 1 であるため、先で述べた電極表面内での結線頻度を低下させる事が可能になると考えた。

電気化学測定を行う為に、P6 の SAM 作製条件および Co(II)溶液の順次添加によるナノワイヤー形成を行い、ナノワイヤー修飾くし型電極を作製した。また、比較実験として、ジブチルジスルフィドの

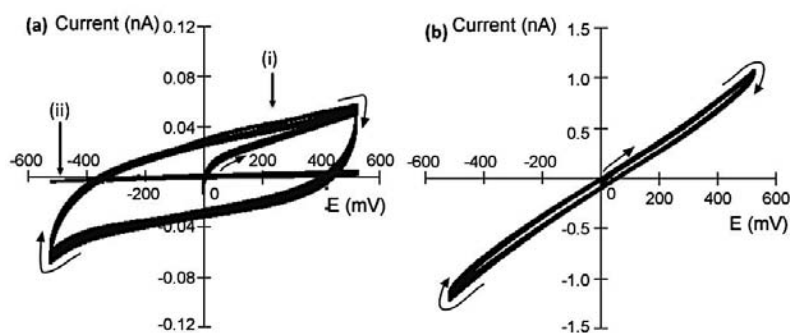


Figure 5-17. I-V curves of the interdigitated array electrodes having (a) Co(II)-coordinated and (b) silica coated Co(II)-coordinated peptides nano-wire on the SAMs. The (i) curve is the response of the interdigitated array electrodes modified by the mixed SAM containing C4 and Pep-GLS-L prepared under the P6 condition, and (ii) curve is the response of the interdigitated array electrodes modified by C4 SAM prepared under the C condition.

みからなる SAM を作製し、Pep-GLS-エタノール溶液中に浸漬させ、振とうしながら Co(II)溶液を順次添加し、比較実験用くし型電極も作製した。5-2-8 節で記述した電気化学測定手法の従い、サンプルとなる各くし型電極の両極を Triangular Wave Generater の陽極および陰極につなぎ、三角電位を印加しながら応答電流を測定し、I-V 曲線を求めた(Figure 5-17a)。Lipo-Pep-GLS を結合始点として形成したナノワイヤーを有するくし型電極では、電圧印加時に明らかに大きな電流応答が得られた(Figure 5-17a(i))。一方、比較実験用電極では、ほとんど電流応答が見られなかった(Figure 5-17a(ii))。この結果より、4-ヘリックスバンドルよりなるナノワイヤーが電極間を結線した事が示唆され、P6 の作製条件に得られた SAM 中の Lipo-Pep-GLS が、金電極表面とナノワイヤーの結合始点として効果的に作用した事が示唆された。ナノワイヤー修飾くし型電極から得られた I-V 曲線がキャパシタンス成分を含んでいるのは、ナノワイヤー中において導電体である Co(II)-イミダゾール基錯体間の隙間に誘電体であるヘリックスペプチドの側鎖が入り込む事により、導電体-誘電体の交互配列、すなわち連続したコンデンサーと抵抗の直列回路様の構造に起因するためであると考えられる。ジブチルジスルフィドの SAM 修飾くし型電極において測定されたわずかな電流応答は、電極間をまたいで物理吸着した Pep-GLS のヘリックスバンドルが、洗浄後においてもわずかに存在していた為であると考えられる。

Pep-GLS の 4- α -ヘリックスバンドルからなるナノワイヤーが導電性を有している事が確認されたため、ミネラルゼーション方を利用したシリカ被覆ナノワイヤーを作製し、その電気化学特性を評価した。ナノワイヤーをシリカで被覆する為に、P6 の SAM 作製条件を用いて作製したナノワイヤー修飾くし型電極を、3.0 mL の TEOS 中で 7 日間反応させる事でシリカのミネラルゼーションを行った。ミネラルゼーション後、エタノール洗浄し、乾燥を行った。ここで、ペプチドナノワイヤーで結線されたくし型電極の応答電流は、同じ P6 条件で作製された混合 SAM を有する電極においてもバラツキが生じた。これはくし型電極間に形成されるナノワイヤーの本数にバラツキが生じてしまうためである。しかしながら、ペプチドナノワイヤーで結線したくし型電極は、いずれも対象実験(Figure 5-17a(i))に比べ有意な応答を示していた。シリカミネラルゼーションによる無機被覆の効果を検討するため、ここではシリカミネラルゼーション前に I-V 測定を行った、くし型電極を用い、上記手法によりシリカ被覆したナノワイヤー修飾くし型電極の I-V 特性を上記と同様の手法により評価した(Figure 5-17b)。シリカ被覆ナノワイヤー修飾くし型電極においても、印加電圧に対して大きな電流応答を確認した。I-V 測定の結果より、シリカ被覆ナノワイヤー修飾くし型電極の導電性は、シリカ修飾前と比較して 10 倍以上であった。シリカの被覆による導電性の向上は、4- α -ヘリックスバンドル表面がシリカにより被覆された事によってナノワイヤー自体の構造が安定化された事によると考えられる。エタノール溶液中のナノワイヤーにおいてもシリカにより被覆される事で、アスペクト比および α -ヘリックス構造含有率の上昇が確認されている。これらの結果より、シリカによりナノワイヤーが被覆される事で 4- α -ヘリックスバンドルを形成するペプチドの α -ヘリックス構造含有率が上昇し、ナノワイヤーの構造がより剛直で秩序だったものになったため、ナノワイヤー内部に存在するコバルト錯体部位の一次配列が整列し、電子伝達効率が上昇したものと示唆される。

5-4. 結言

本章では、 α -ヘリックスペプチドが金属配位およびマクロダイポール相互作用により自己組織化的に集合した4- α -ヘリックスバンドルよりなる金電極間を自発的に結線するナノワイヤー形成の確立とその電気化学特性について検討した。Pep-GLS のエタノール溶液中に酢酸コバルト Co(II)を添加する事で、4- α -ヘリックスバンドル内部に Co(II)錯体の一次元配列構造を有するペプチドナノワイヤーが自己組織的に形成した。このペプチドバンドルは、シリカのミネラル化により無機被覆する事でペプチドの α -ヘリックス構造が安定化する事を見出した。くし型電極間を Pep-GLS で結線し、電気化学測定を行ったところペプチドナノワイヤーの結線に基づく電流応答が確認された。加えて、ミネラル化によりシリカを被覆したペプチドナノワイヤーでは、被覆前と比較して約 10 倍もの応答電流を確認した。

以上の結果より、配位結合によるバンドル形成とミネラル化触媒能発現のための分子プログラミングを施す事で、ナノスケールテンプレートから自己組織的に機能性集合体への成長を可能とする手法を確立した。これは、トップダウンアプローチでは達成し得ない微細構造形成を自発的、且つ低環境負荷型的に行い得る手法として、今後のナノテクノロジーの発展に寄与するものと考えられる。本研究で用いた自己組織化プロセスによる形成されるナノワイヤーは、その構築条件が十分に最適化されていないため、ナノワイヤーの配向や繊維長、電子伝導効率が完全に制御されたとは言い難い。今後のさらなる発展として、構築条件の最適化を行う事で、高い機能性を有するナノデバイスを構築が期待出来るなど、ナノエレクトロニクス分野における技術革新が期待される。

Reference

- (1) C. Farcau, H. Moreira, B. Viallet, J. Grisolia, L. Ressler, *ACS Nano*, **2010**, 4, 7275-7282.
- (2) M. Shimomura, A. Tsuruma, M. Tanaka, H. Sunami, S. Yamamoto, *J. Surf. Sci. Soc. Jpn.*, **2006**, 27, 170-175.
- (3) T. Nonoyama, M. Tanaka, Y. Inai, M. Higuchi, T. Kinoshita, *ACS Nano*, **2011**, 5, 6174-6183.
- (4) O. Carny, D. E. Shalev, E. Gazit, *Nano Lett.*, **2006**, 6, 1594-1597.
- (5) R. J. Mart, R. D. Osborne, M. M. Stevens, R. V. Ulijn, *Soft Matter*, **2006**, 2, 822-835.
- (6) Y. Okawa, M. Aono, *Nature*, **2001**, 409, 683-684.
- (7) 一般社団法人電子情報通信学会 編, 電子情報通信学会技術研究報告, **2005**, 104, 63-67.
- (8) 基礎錯体工学研究会 編, 新版 錯体化学 講談社
- (9) S. Wang, X. Ge, J. Xue, H. Fan, L. Mu, Y. Li, H. Xu, J. R. Lu, *Chem. Mater.*, **2011**, 23, 2466-2474.
- (10) N. Greenfield, G. D. Fasman, *Biochemistry*, **1969**, 8, 4108-4116.
- (11) H. Maeda, H. Kato, S. Ikeda, *Biopolymers*, **1984**, 23, 1333-1346.
- (12) K. Rosenheck, A. S. Schneider, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1973**, 70, 3458-3462.
- (13) O. Pieroni, A. Fissi, J. L. Houben, F. Ciardelli, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 2990-2991.
- (14) Y. F. Lu, H. Y. Fan, S. Stump, T. L. Ward, T. Rieker, C. J. Brinker, *Nature*, **1999**, 398, 223-226.

- (15) V. Vamvakaki, M. Hatzimarinaki, N. Chaniotakis, *Anal. Chem.*, **2008**, *80*, 5970-5975.
- (16) A. Altunbas, N. Sharma, M. S. Lamm, C. Yan, R. P. Nagarkar, J. P. Schneider, D. J. Pochan, *ACS Nano*, **2011**, *4*, 181-188,
- (17) T. Doi, T. Kinoshita, Y. Tsujita, H. Yoshimizu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2001**, *74*, 421-425.
- (18) H. E. Reis, *Sci. Am.*, **1961**, *204*, 152-165.

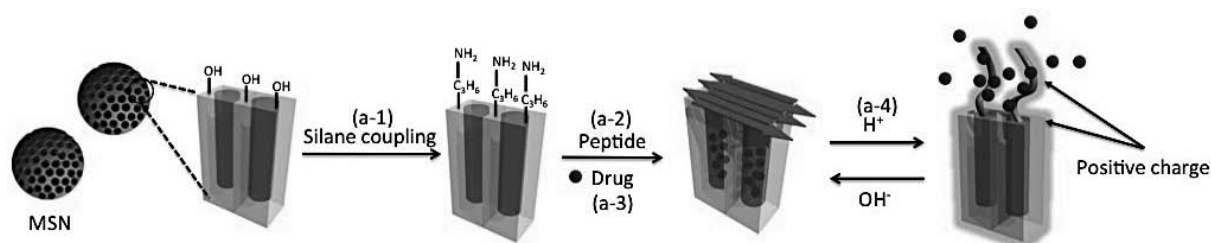
第 6 章

ペプチドの可逆的二次構造転移をナノゲートとして利用した ナノキャリアの薬物徐放制御

6-1. 緒言

外部環境に対して高い応答性を有する薬物担持担体の構築は、“必要なときに”、“必要な薬物量を”、“必要としている部位へ” 輸送する事により、治療薬の持つ副作用の抑制や薬効の最大化により患者の“クオリティ・オブ・ライフ”を向上させるための薬物送達システム(DDS)として期待され、盛んに研究が行われている^[1-5]。加えて、薬物を特定部位、特定環境下で選択的に放出可能な DDS 技術の発展は上記に挙げた利点のみならず、強すぎる副作用のため、治療薬として使用出来なかった薬物の使用をも可能にする。ターゲット細胞(炎症細胞やガン細胞など)周辺の pH や温度、生体分子濃度は、正常細胞がおかれている環境と比較して異なる^[6,7]。そのため薬物放出が制御可能な担体には、このような微小な外部環境経変化に対して極めて高い応答性が必要となる。この基本的概念に基づく DDS 用担体は、薬物担持能を有するマトリックスコア、および様々な外部環境変化に迅速に応答する事で担持した薬物の放出量を厳密に制御可能なナノゲートシステムの二つの成分よりなることが求められる。マトリックスコアとしては、メソポーラスシリカやメソポーラスカーボン等に代表されるメソポーラス材料が多く用いられている。メソポーラス材料の中でも特にメソポーラスシリカ(MSN)は、高い空間容量^[8]、均一で制御可能なメソ細孔^[9,10]、生体適合性^[11,12]や容易な表面機能化能^[13]を有している事で有望視されている。しかし、メソポーラスシリカ単体では、外部環境変化に対する応答性を有していない。表面ナノゲートシステムとして、近年のバイオテクノロジーやナノテクノロジーの発展に伴い、ポリペプチドや DNA などの生体高分子を利用した DDS 用担体が報告されている^[6,14-16]。タンパク質モデル分子であるポリペプチドの特徴は、第 1 章でも述べた様に外部環境変化に対する高い応答性、すなわち二次構造転移による大きな分子形態変化を示すことである。これらの無機メソポーラス材料による優れた薬物担持性とポリペプチドの外部環境変化に対する高い応答性を併せ持つ新規有機-無機複合機能性材料の創成は、DDS 研究による医療・福祉分野や工学分野などの幅広い研究分野の発展に繋がると期待される。

そのため本章では、ポリペプチドが外部環境変化(本研究では pH)により可逆的に二次構造を変化さ



Scheme 6-1. Schematic pictures of the preparation and drug release mechanisms of the Pep-MSN. (a-1) Preparation of aminopropyl group modified MSN. (a-2) Immobilization of the (VKVS)₄E peptide onto the MSN surface. (a-3) Loading the PtOEP into the mesopores of the Pep-MSN and capping of the mesopores. (a-4) Schematic picture of the reversible β -sheet-random coil conformational transition of the surface peptide, and the resulting drug release property of the Pep-MSN.

せる特徴に着目した。ペプチドの二次構造は、アミノ酸側鎖官能基の種類および配列を制御する事である環境における安定な二次構造が決まる。ここで pH 等の環境を変える事で、その安定構造が変化し、ペプチド中のアミノ酸側鎖官能基(イオン性側鎖を有するアミノ酸等)の種類により、構造転移条件を制御する事が可能である。本研究では、MSN 表面上のメソ細孔のキャップ-アンキャップを制御する新規ナノゲートシステムとして、ペプチドの可逆的な二次構造転移を利用したペプチド-MSN 複合材料(Pep-MSN)の構築、およびその薬物放出特性の制御を目的とした(Scheme 1)。

6-2. 実験

6-2-1. 薬物担持担体としてのメソポーラスシリカの合成

本章で用いたメソポーラスシリカ(MSN)は、界面活性剤を有機テンプレートに用いたゾル-ゲル法により合成した^[17,18]。本手法において有機テンプレートには、カチオン性の界面活性剤であるセチルトリメチルアンモニウムブロミド(CTAB)を、シリカ源には TEOS を用いた。初めに、1.0 g の CTAB および水酸化ナトリウム水溶液(2.0 M, 3.5 mL)を 480 mL の純水に加えた。CTAB が完全に溶解した後、同混合水溶液を 80 °C へ加温した。温度調節後、5 mL の TEOS を同水溶液中へゆっくりと滴下し、2 時間攪拌した。その後、白濁沈殿物を、12000 rpm の条件下で 10 分間遠心分離し、エタノールおよび純水を用いて洗浄した。得られた沈殿物を、60 °C で 3 時間乾燥し、焼結(昇温速度 10 °C / min, 500 °C, 5 時間)により有機テンプレートである CTAB を除去した。

6-2-2. 電界放出型走査型および透過型電子顕微鏡による

メソポーラスシリカのモルフォロジー観察

合成した MSN のモルフォロジーおよび細孔構造は、FE-SEM、TEM (JEM 2010 JEOL)および低角 X 線回折より評価した。FE-SEM 観察においてサンプルは、カーボンテープを用いて SEM サンプル台上に固定化し、観察中のチャージアップを防ぐためにイオンスパッタ装置を用いて、気圧 7 Pa、電流 15 mA、直流電圧 2.5 kV の条件で 2 分間スパッタする事で、白金のナノ薄膜をコートした。FE-SEM 観察時の加速電圧は、10 kV とした。また、TEM 観察においてサンプルは、濃度 1 mg/mL の MSN 分散水溶液をエラスチックカーボン支持膜付銅グリッド上へ 1 滴滴下後、5 分間吸着させた。その後、余分な水分をろ紙により吸い取り観察サンプルとした。TEM 観察時の加速電圧は、200 kV とした。

6-2-3. 低角 X 線回折および BET 法による構造解析

細孔構造の評価は、低角 X 線回折装置(SAXRD, RINT-TTR, Rigaku)を用いた。SAXRD 測定は、1-8° の範囲で行った。SAXRD 測定において、鉄管球から取り出した特性 X 線源の波長は、K α である 1.936 Å である。

MSN の有する細孔分布、比表面積および空間容量を得る為に、液体窒素の沸点温度(77 K)での窒素分子の吸着等温線を測定し、第 3 章 3-2-6 節で述べた BET 型の吸着を仮定し、式 3-3 より比表面積を、式 3-6 により細孔径分布を求めた。

6-2-4. ペプチド分子の合成とメソポーラスシリカ表面への導入

MSN 表面上においてナノゲートとして機能するペプチド分子[(VKVS)₄E]は、2-2-3 で述べたように Fmoc-SPPS 法により合成した。同ペプチド分子を MSN 表面上に固定化するために、シランカップリング剤であるアミノプロピルトリメトキシシランを用いて MSN 表面上に、ペプチド分子との結合点となるアミノ基を導入した。シランカップリング剤を用いた MSN の表面機能化手法を以下に記載する。

初めに 50 mg の MSN を、3-アミノプロピルトリエトキシシラン(1 mL)を溶解させた 10 mL のトルエン溶液中へ懸濁させた。MSN 懸濁液を、6 時間加熱還流を行った。その後、懸濁液を遠心分離、エタノール、アセトンおよび純水を用いてそれぞれ洗浄を行った。その後、再度純水に分散させ、凍結真空乾燥を行い、アミノ基修飾-MSN(NH-MSN)を得た。

NH-MSN 表面へのペプチド分子の固定化は、ペプチドの C 末端側に存在するグルタミン酸側鎖のカルボキシル基と NH-MSN 表面上に存在するアミノ基間の縮合により行った。初めに 160 mg の NH-MSN を、21 mL の (VKVS)₄E/DMF 溶液(ペプチド濃度: 8.1×10^{-6} mol)に懸濁させた。カルボキシル基とアミノ基を縮合するために、HOAt/DMF 溶液 1 mL (HOAt: 2.4×10^{-5} mol)および DIPCDI/DMF 溶液 1 mL (DIPCDI: 2.4×10^{-5} mol)を加えた。上記反応懸濁溶液を 1 日間室温下で攪拌し、ペプチドの表面固定化反応を行った。縮合反応後、得られた反応懸濁液を遠心分離(4000 rpm, 10 min)し、沈殿物を回収し、純水を用いて洗浄した。その後、再度純水に分散させ凍結真空乾燥を行い、ペプチド被覆 MSN(Pep-MSN)とした。

6-2-5. 示差熱重量同時測定

示差熱重量同時測定(TGA/DTA)は、熱重量分析システム(RTG320U, Seiko Instruments)を用いて昇温速度 10 °C/min で 20~1050 °C の温度領域を測定した。測定は NH-MSN より、MSN 1 g あたりのアミノ基固定化量を、Pep-MSN より MSN 1 g あたりのアミノ基および(VKVS)₄E の固定化量を求め、この差より MSN 1 g あたりの(VKVS)₄E 固定化量を算出した。また、焼結前の MSN、すなわちメソ細孔に界面活性剤が詰まっている状態で 6-2-3 節の BET 法より得られる比表面積(メソ細孔の表面積を除外した値)から(VKVS)₄E 1 分子あたりの占有面積を算出した。

6-2-6. 円偏光二色性および赤外分光スペクトル測定によるペプチドの二次構造解析

水溶液中(pH6.0 および 8.0)での[(VKVS)₄E]ペプチド単独系での二次構造は、CD スペクトル測定により決定した。ペプチド水溶液の濃度は 1.0×10^{-5} M に固定した。調製したペプチド水溶液を石英セル(光路長: 0.1 mm)に満たし、これを測定サンプルとした。ペプチド水溶液の pH は、0.01 M の塩酸水溶液および 0.01 M の水酸化ナトリウム水溶液により調製した。CD スペクトル測定は、室温・窒素雰囲気下で円偏光二色性分散計(J-820、日本分光)を用いて波長領域 190-260 nm、積算回数 16 回の条件で行った。

MSN 表面上に固定化された[(VKVS)₄E]ペプチドの pH6.0 および 8.0 の水溶液中、さらに DCM 中での二次構造を得るために FT-IR スペクトル測定を行った。FT-IR スペクトル測定サンプルは、以下の 4 種類である。1 つ目は、Pep-MSN を pH8.0 のリン酸緩衝液(50 mM)に分散させ、一晚・室温下で攪拌

を行った。その後、懸濁液を、遠心分離により上清と Pep-MSN に分離した。上清は除去し、Pep-MSN を、凍結真空乾燥を行い、粉体サンプルとした。2 つ目は、Pep-MSN を pH8.0 のリン酸緩衝液(50 mM) に分散させ、一晚・室温下で攪拌を行った。その後、懸濁液は、遠心分離により上清と Pep-MSN に分離した。上清は除去し、Pep-MSN を、pH6.0 のリン酸緩衝液中に再度分散させ、一晚・室温下で攪拌を行った。その後、懸濁液を前と同様に、遠心分離し、Pep-MSN を、凍結真空乾燥し、粉体サンプルを得た。3 つ目は、2 つ目で Pep-MSN を分散させたリン酸緩衝液を再度 pH8.0 に変えたもの、つまり pH を pH8.0 → 6.0 → 8.0 と変化させ、同様に沈殿分を凍結真空乾燥により粉体サンプルとしたものである。4 つ目は Pep-MSN を DCM 中に分散させ、一晚・室温下で攪拌を行った。その後、懸濁液を、遠心分離により上清と Pep-MSN に分離した。上清は除去し、Pep-MSN は、ドラフト内で乾燥する事で粉体サンプルを得た。測定サンプルは、各粉体サンプルと KBr を混合したものを錠剤形成し、スペクトル測定はフーリエ変換赤外分光光度計(Spectrum 2000, PerkinElmer)を用いて透過吸収測定モード、波数領域:1900–1550 cm^{-1} および積算回数 64 回の条件下で行った。

得られた FT-IR スペクトルにおいて、アミド I およびアミド II 領域のスペクトルを α -ヘリックス、 β -シートおよび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、それぞれのスペクトルの面積比より各二次構造の含有率を決定した。波形分離を行う各 FT-IR スペクトルは、ガウスローレンス分布とし、その比は 9:1 とした。

6-2-7. ペプチド被覆メソポーラスシリカへの薬物の担持と徐放試験

本章において使用したモデル薬物には、プラチナ錯体の 1 種であるプラチナムオクタエチルポルフィリン(PtOEP)を用いた。以下に薬物担持用担体への薬物の導入手法を記述した。3 mg の薬物担持用担体である Pep-MSN または NH-MSN を、0.5 mg の PtOEP を含む DCM 溶液中(1 mL)へと懸濁させた。その後 MSN 懸濁液は一晚・室温の条件下で攪拌を行い、メソ細孔への PtOEP の担持を行った。担持後、得られた PtOEP 担持担体は、アセトンおよびリン酸緩衝液(50 mM, pH 8.0)を用いて洗浄した。PtOEP 担持量は、担持前後の Pep-MSN、および NH-MSN の 6-2-5 節で示した TGA 測定を行い、それぞれの重量減少差、すなわち Pep-MSN、NH-MSN 中の Pt の重量を求め、Pep-MSN および NH-MSN 担体 1 g あたりの PtOEP の担持量をそれぞれ算出した。

次に薬物徐放試験の操作手順を記述した。3 mg の PtOEP 担持 Pep-MSN を、リン酸緩衝液(50 mM, 1 mL, pH 6.0 または 8.0)中へ懸濁させた。この PtOEP 担持 Pep-MSN サンプルを、それぞれの pH 条件下 37.0 °C で 20 分間インキュベートした。インキュベート後、懸濁液は、遠心分離(4 °C, 12000 rpm)することで上清と Pep-MSN に分離した。Pep-MSN から徐放された PtOEP を含む上清から含まれる、すなわち放出された PtOEP を、1 mL のクロロホルムに抽出した。その後、抽出液中の PtOEP 量を、UV-vis 測定装置(紫外可視分光光度計 UV-3600, 島津製作所)を用いて 381 nm でのモル吸光係数より抽出液中の PtOEP の濃度を求め、放出量を算出した。沈殿として分離された PtOEP 担持 Pep-MSN は、再度任意のリン酸緩衝液中に分散し、引き続き薬物徐放試験を行った。この薬物徐放試験は、合計 3 回行った。また比較実験として、ペプチドを MSN 表面上に持たない MSN 担体(NH-MSN)においても PtOEP を導

入し、同一の徐放試験を行った。

また、PtOEP 担持担体の懸濁水溶液の pH を連続的に変化させることで、厳密な薬物放出量の制御実験を行った。この実験系において、3 mg の PtOEP 担持 Pep-MSN を、リン酸緩衝液(50 mM, 1 mL, pH 8.0) 中へと懸濁させた。その後、37.0 °C の温度下で 20 分間インキュベートした。懸濁液を、遠心分離(4 °C, 12000 rpm)により、上清と Pep-MSN に分離した。PtOEP の放出量は、上述の吸光度測定より決定した。分離した PtOEP 担持担体は、先と異なる pH を有するリン酸緩衝液中に懸濁させ、再度薬物の徐放試験を行った。この様に pH を連続的に変化させる事で、PtOEP 担持担体からの徐放特性の評価を行った。

6-3. 結果・考察

6-3-1. ナノゲートとしてペプチドを有するメソポーラスシリカの構造解析

ゾル-ゲル法により合成した MSN のモルフォロジーを、FE-SEM および TEM により観察した。Figure 6-1 は、5 時間 500 °C の焼結後に得た MSN の FE-SEM および TEM 像を示す。FE-SEM 像より、得られた MSN は約 50 nm の球形粒子である事が確認された

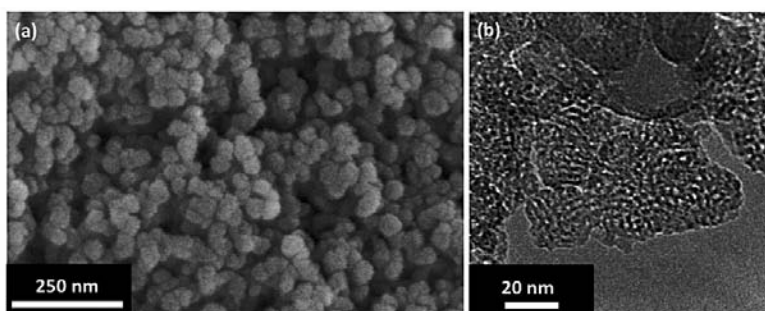


Figure 6-1. FE-SEM (a) and TEM (b) images of the MSN matrix after calcination at 500 °C for 5 h. TEM image was exhibited that MSN matrix had a disordered pore structure.

(Figure 6-1a)。また、TEM 像より得られた MSN は、直径数ナノメートルサイズのメソ細孔を多数持っていることが確認された(Figure 6-1b)。MSN の微細構造の評価をするために、MSN への窒素分子の吸脱着挙動を用い、Brunauer-Emmett-Teller (BET)および Barrett-Joyner-Halenda (BJH) 法より、その細孔サイズ、比表面積および空間容量を測定した(Figure 6-2)。窒素分子吸脱着実験より、MSN は、直径 2.8 nm の均一な細孔サイズ、巨大な空間容量(0.88 cm³/g)および非常に大きな比表面積(918 m²/g)を有している事がわかった。DDS 用の薬物担持担体では、気道や肺胞に留まらず血液に乗って全身に運ばれるために、100 nm

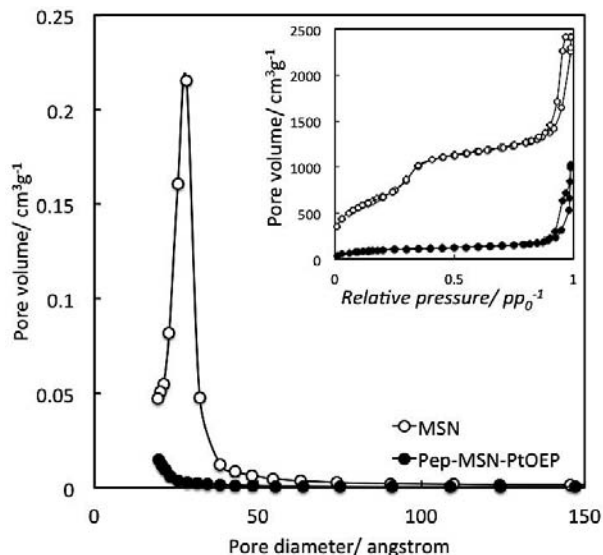


Figure 6-2. Pore size distribution and N₂ adsorption-desorption isotherm (inset) for the MSN matrix.

以下の粒子サイズが求められている。これらの結果は今回合成した MSN が、DDS 用薬物担持担体として適切な粒子サイズや巨大な空間容量を有している事がわかる。また、メソポーラス材料である MSN は、ヘキサゴナル構造やキュービック構造などの多様な細孔構造を有することが既に報告されている^[19-24]。合成した MSN が、どのような細孔構造を持っているかを検討するために SAXRD 測定を行った。

Figure 6-3 は、合成した MSN の SAXRD プロファイルを示す。SAXRD 測定では、 2.5° 付近にメソ細孔径に基づく回折パターンのみが確認された。そのため、合成した MSN の細孔構造は、先に述べたヘキサゴナル構造などの規則的な細孔構造は有していない、無秩序な構造であると考えられる。

次に MSN 表面上へのペプチド分子の導入について検討した。MSN 表面上にペプチドを導入するにあたり、シランカップリング剤である 3-アミノプロピルトリエトキシシランを用いて MSN 表面上にアミノプロピル基を修飾した。ペプチド分子は、C 末端側に存在するグルタミン酸側鎖カルボキシル基とアミノ

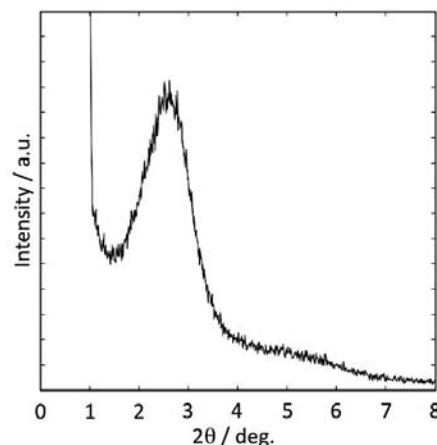


Figure 6-3. SAXRD pattern of the MSN matrix.

プロピル基間での縮合により MSN 表面上に固定化される。MSN 表面上に修飾したアミノプロピル基およびペプチド分子の量を TG-DTA 測定により決定した。Figure 6-4 に、アミノプロピル基修飾 MSN(NH-MSN)およびペプチド修飾 MSN(Pep-MSN)の TG-DTA プロファイルを示す。TG-DTA 測定による質量減少曲線より、MSN 表面上に修飾したアミノプロピル基の量は、24 wt%であり、この値よりシリカ 1 mg あたり 4.1×10^{-6} mol のアミノプロピル基が固定化されている事がわかる。

本章で用いたペプチド分子[(VKVS)₄E]は、2-2-3 節で記述した様に MSN 表面上に存在するメソ細孔のナノゲートとして機能する様に分子設計がされている(Figure 2-5)。[(VKVS)₄E]ペプチド分子の分子長は、 β -シート構造を形成した場合に 5.8 nm となり、MSN 表面上に存在するメソ細孔の平均細孔径(2.8 nm)より十分に大きいため、ナノゲートとして機能すると考えられる。MSN 表面上に存在するアミノプロピル基とペプチドのグルタミン酸側鎖カルボキシル基間での縮合を利用して MSN 表面上に固定化されたペプチドの量を検討するために TG-DTA 測定を行った。

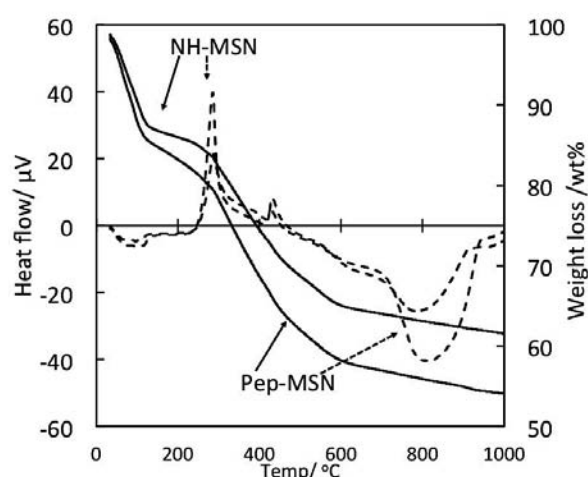


Figure 6-4. TG-DTA curves for the NH-MSN and Pep-MSN matrices. The solid and dashed lines denoted the weight loss and heat flows, respectively.

6-2-5 節で示したペプチド修飾前後の重量減少の差より、MSN 表面上に固定化されたペプチド分子の量は、8 wt%と求まった。この値は、シリカ 1 mg あたり 4.3×10^{-8} mol のペプチド分子が固定化されている事を示し、先に得られたアミノプロピル基の固定化量より 2 桁少ない値である。このことは、MSN 表面上にはペプチド分子とは未反応であるアミノプロピル基が多く存在している事を示唆している。次にペプチドの固定化量よりペプチドによる MSN 表面の被覆面積率を算出した。[(VKVS)₄E]ペプチド分子が β -シート構造を形成したと仮定した時の分子面積は、 2.8 nm^2 である。このペプチド分子がすべて β -シート構造を形成し、かつ単分子膜として MSN 表面上に平行に横たわり固定化されたと仮定した場合の β -シートペプチド単分子膜の表面積は、Pep-MSN 1 mg あたり $7.01 \times 10^{-2} \text{ m}^2$ と見積もられる。

一方、メソ細孔中に界面活性剤を内包した MSN の表面積、すなわちメソ細孔表面の面積を差し引いた MSN の表面積は、MSN 1 mg あたり $5.01 \times 10^{-2} \text{ m}^2$ であることが窒素分子の吸脱着測定よりわかっている。これらの結果より、 β -シート[(VKVS)₄E]ペプチド分子の表面被覆率は、約 141 %であると算出した。この値は、ペプチド分子が β -シート構造を形成する事により MSN 表面上に存在するメソ細孔を十分キャップすることを可能とする量が固定化されている事を示唆する。

6-3-2. 微小な pH 変化によるメソポーラスシリカ表面上のペプチドの可逆的二次構造転移挙動解析

MSN 表面上に固定化したペプチド分子の pH 誘起二次構造転移の検討は、FT-IR スペクトル測定により行った。FT-IR スペクトル測定を行うにあたり、Pep-MSN は、凍結真空乾燥の過程により溶液系と異なる二次構造を取る可能性がある。凍結真空乾燥による二次構造への影響を検討するために、pH 6.0 および 8.0 に調製した水溶液中のペプチド分子単独での CD スペクトル測定(Figure 6-5a)、および pH 調製を行ったペプチド水溶液を凍結乾燥した

Table 6-1. Fractions of secondary structure of the (VKVS)₄E peptide on the MSN surface by CD and TM-FTIR measurement.

pH condition	CD-Conformation / %			FTIR-Conformation / %		
	α -helix	β -sheet	Random coil	α -helix	β -sheet	Randomcoil
6.0	4.7	39.2	56.1	6.9	39.2	53.1
8.0	0.8	53.4	45.8	2.9	53.0	44.1

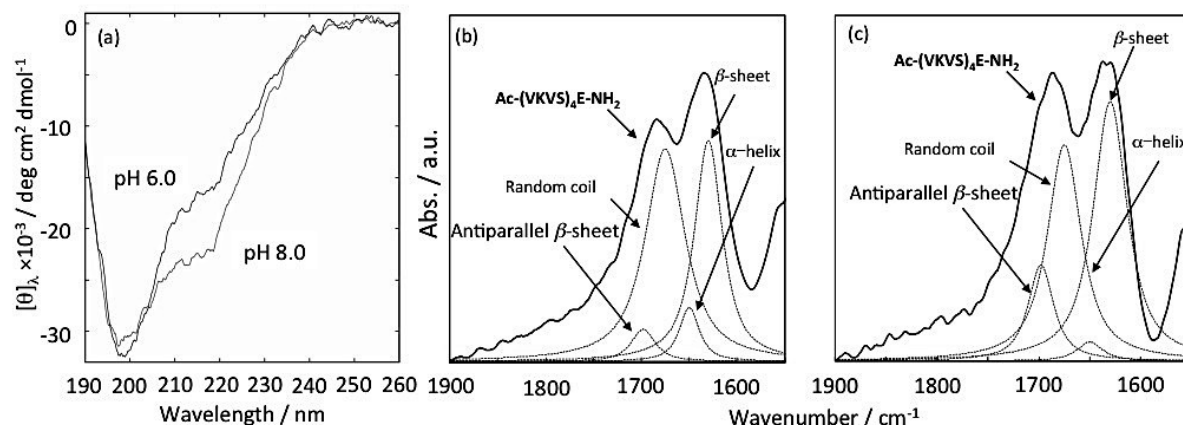


Figure 6-5. (a) CD and (b and c) TM-FTIR spectra of the Ac-(VKVS)₄E-NH₂ peptide on the Pep-MSN nanocarrier: b) under the weakly acidic condition (pH 6.0) and c) under the weakly basic condition (pH 8.0). Dotted lines show the peak deconvolution of the amide I band to β -sheet, antiparallel β -sheet, α -helix and random coil conformations.

粉体サンプルの FT-IR スペクトル測定(pH 6.0; Figure 6-5b, pH 8.0; Figure 6-5c)を行った。両スペクトルから得た各二次構造の含率は、ほぼ一致した(Table 6-1)。この結果は、凍結乾燥過程がペプチド分子の二次構造に影響を与えない事を示す。Figure 6-6 は、MSN 表面上に固定化したペプチドの pH 誘起 FT-IR スペクトル変化を示す。スペクトル中で α -ヘリックス、 β -シートおよびランダムコイルに帰属されるアミド I 領域の特性吸収は、1650, 1630 および 1675 cm^{-1} でそれぞれ観測された^[24,25]。FT-IR スペクトルから各二次構造含率は、アミド I 領域の波形分離によって得た。各二次構造の含有率は、Table 6-2 にまとめた。弱塩基性条件下(pH 8.0, Figure 6-6a)における Pep-MSN の FT-IR スペクトルは、MSN 表面上に固定化されたペプチドの二次構造が主としてアンチパラレル β -シート構造を形成した事を示した(最大吸収波数が 1630 cm^{-1} であり、アンチパラレル β -シート構造に基づく 1698 cm^{-1} にピークが出現)。

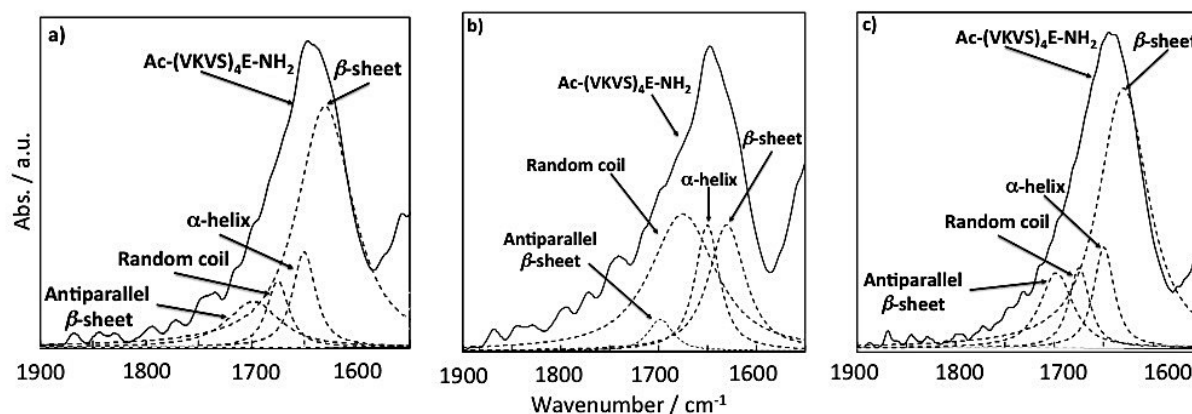


Figure 6-6. TM-FTIR spectra of the Ac-(VKVS)₄E-NH₂ peptide on the Pep-MSN nanocarrier: a) under the weakly basic condition (pH 8.0), b) under the pH condition shifting from basic to weakly acidic condition (pH 8.0 → 6.0) and c) under the pH condition altering to weakly basic pH from acidic condition again (pH 8.0 → 6.0 → 8.0). Dotted lines show the peak deconvolution of the amide I band to β -sheet, antiparallel β -sheet, α -helix and random coil conformations.

一方、弱塩基性条件から弱酸性条件下に pH を変化させる事により (pH 8.0 → 6.0)、ペプチドの二次構造は、 β -シート構造からランダムコイル構造へと劇的に変化した (Figure 6-6b)。弱酸性条件下における表面ペプチドの β -シート構造の含率は、弱塩基性条件下と比較して 27 % まで減少した。また、pH を再び弱酸性条件下から弱塩基性条件下 (pH 8.0 → 6.0 → 8.0) に戻したとき (Figure 6-6c)、表面ペプチドの二次構造は、初期の弱塩基性条件下における β -シート構造へと再度構造転移した。

Table 6-2. Fractions of secondary structure of the (VKVS)₄E peptide on the MSN surface.

pH condition	Conformation/ %		
	α -helix	β -sheet	Random coil
pH 8.0	13	79	8.0
pH 8.0 → 6.0	18	27	55
pH 8.0 → 6.0 → 8.0	12	78	10

これらの結果は、MSN 表面上に固定化された [(VKVS)₄E] ペプチドが pH 8.0 と 6.0 間のわずかな pH 変化により可逆的に β -シート-ランダムコイル転移を生じている事を示す。MSN 表面上でのペプチドの劇的かつ可逆的な β -シート-ランダムコイル転移は、次の様に説明する事ができる。初めに、[(VKVS)₄E] ペプチドのリジン側鎖アミノ基の pK_a は、50 mM 塩化ナトリウム水溶液中での [(VKVS)₄E] ペプチドの pH 滴定によって 8.3 と決定された。しかし、MSN 表面上に固定化されることによりペプチドのリジン側鎖アミノ基の pK_a は、7.4 へとシフトした。このため弱塩基性条件下 (pH 8.0) で表面ペプチドのリジン側鎖アミノ基は、脱プロトン化する。そのためペプチドは、安定なアンチパラレル β -シート構造を形成する。その一方、弱酸性条件下 (pH 6.0) においてペプチドのリジン側鎖アミノ基は、 pK_a の値を下回る pH 環境下にさらされているため、プロトン化する。このプロトン化したリジン側鎖アミノ基間の静電反発により β -シート構造が不安定化されランダムコイル構造へと転移すると考えられる。加えて MSN 表面では、6-3-1 節で述べた様にシランカップリング剤により導入したアミノプロピル基が過剰に存在している。このアミノプロピル基の pK_a は 6.3 であり、弱酸性条件下では、プロトン化している。このリジン側鎖アミノ基と MSN 表面のアミノプロピル基間でのさらなる静電反発が、他の二次構造と比較しても安定性の高い β -シート構造を崩壊させ、ランダムコイル構造への転移に大きな影響を与えていると考えられる。これらの結果は、MSN 表面上に固定化した [(VKVS)₄E] ペプチドの二次

構造が、pH 6.0–8.0 間の微小な変化によって制御可能である事を示唆した。

6-3-3. ペプチドの可逆的二次構造転移に基づく薬物徐放特性

6-3-2 節で述べた表面ペプチドの pH 応答性を利用した Pep-MSN のメソ細孔からの薬物徐放の制御について検討した。本章で用いたモデル薬物は、臨床で用いられている無電荷白金錯体抗がん剤と類似した白金錯体であるプラチナムオクタエチルポルフィリン(PtOEP)である(Figure 6-7)。PtOEP のメソ細孔への導入は、PtOEP/DCM 溶液中に分散させた Pep-MSN を一晚攪拌する事により行った。PtOEP のメソ細孔への導入は、窒素分子の吸脱着測定により評価した。Figure 6-8 は、Pep-MSN と PtOEP 担持後の Pep-MSN の窒素分子の吸脱着曲線を示す。PtOEP 担持前の Pep-MSN の平均細孔サイズが 2.8 nm(Figure 6-8▲)であるのに対して、PtOEP 担持後には、2.8 nm の細孔サイズのピークが消失している(Figure 6-8■)。これは、Pep-MSN のメソ細孔中に PtOEP が導入された事を意味する。加えて、MSN 表面上の[(VKVS)₄E]ペプチドの二次構造は、PtOEP 導入の時、用いる溶媒である DCM 中で主として α -ヘリックス構造を形成する(Figure 6-9a)。DCM 中では、MSN 表面ペプチドは α -ヘリックス構造を取るため、メソ細孔は開孔な状態であり、薬物が細孔内へと担持される事が可能である。この結果は、Figure 6-8 で示した窒素分子の吸脱着測定の結果を支持する。次に Pep-MSN への PtOEP

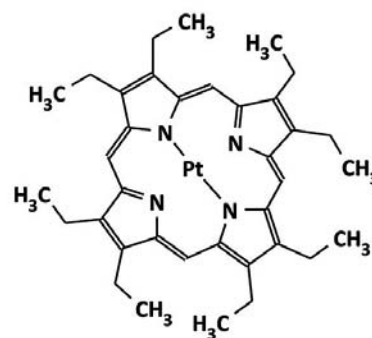


Figure 6-7. Schematic picture of the PtOEP as the model drug.

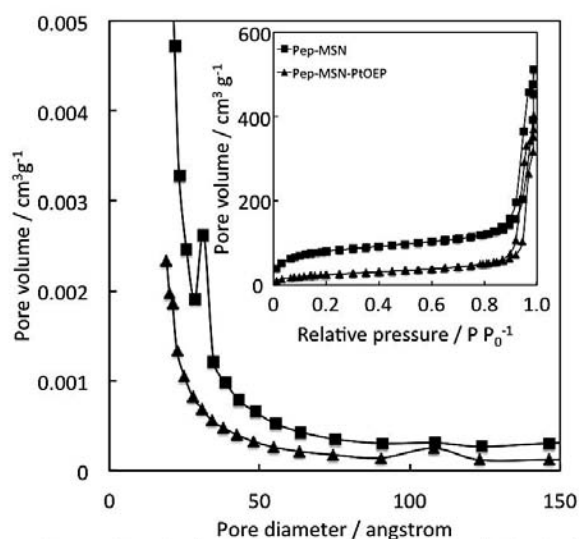


Figure 6-8. N₂ adsorption-desorption isotherms and pore size distribution (inset) for the Pep-MSN (■) and Pep-MSN-PtOEP (▲) nanocarriers.

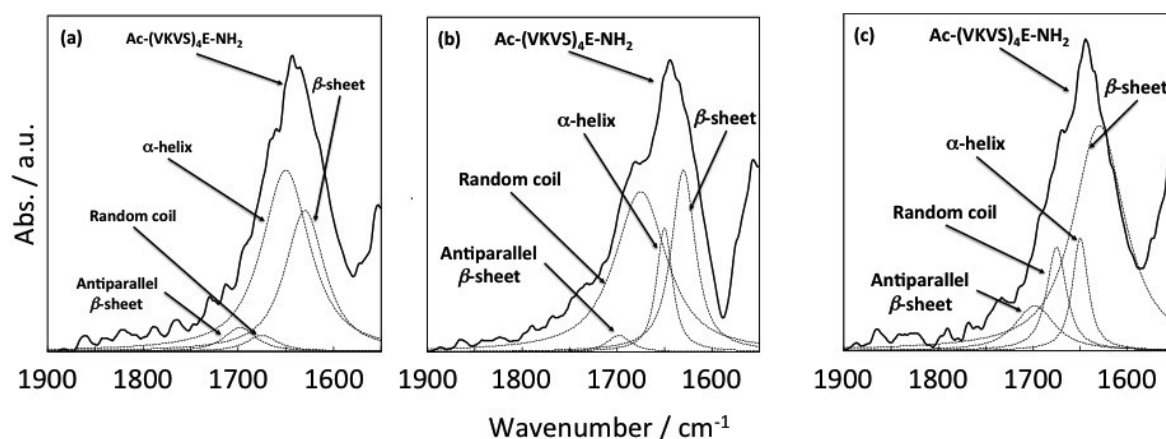


Figure 6-9. TM-FTIR spectrum of (a) the Pep-MSN in DCM. TM-FTIR spectra of the Pep-MSN-PtOEP under the (b) weakly acidic condition (pH 6.0) and (c) under the weakly basic condition (pH 8.0).

担持量を得るために TG-DTA 測定を行った。6-2-5 節で述べた手法を用い質量減少曲線よりプラチナの内包量を求める事で、NH-MSN および Pep-MSN に担持された PtOEP は、それぞれ 3.7 および 8.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ NH-MSN or Pep-MSN であることがわかった (Figure 6-10)。この NH-MSN への低い PtOEP 導入量は、表面ナノゲートのない NH-MSN から洗浄過程で PtOEP が溶出したことが原因であると考えられる。一方 Pep-MSN サンプルにおいても同様に洗浄を行っているが、同サンプルは表面上に β -シートペプチドのナノゲートを有しているため、薬物の溶出が妨げられたと考えられる。また、メソ細孔内に担持した PtOEP が、MSN 表面上のペプチドの二次構造に与える影響を検討した。Figure 6-9b および 6-9c は、各 pH 条件下(pH 6.0 と 8.0)での PtOEP を担持した Pep-MSN の FT-IR スペクトルを示す。FT-IR スペクトル測定の結果より、薬物担持 Pep-MSN 表面上に存在するペプチドの二次構造は、PtOEP 担持前の Pep-MSN と同一である事が確認された。それ故、メソ細孔へ導入した PtOEP は、MSN 表面上に存在するペプチドの二次構造に影響がない事が示された。

弱酸性条件(pH 6.0)および塩基性条件下(pH 8.0)での NH-MSN および Pep-MSN における薬物徐放プロファイルを、Figure 6-11 に示した。放出量は、内包した PtOEP に対する量として % release で示した。薬物担持担体として NH-MSN を用いた場合に担持された PtOEP は、弱酸性および塩基性の両条件下で速やかに放出され、いずれも 3600 秒にはすべての PtOEP を放出した(pH 6.0; Figure 6-11○および pH 8.0; Figure 6-11□)。その一方 Pep-MSN に担持した PtOEP の徐放は、NH-MSN と比較して非常に緩やかなものであった。特に塩基性条件下において 3600 秒後においても Pep-MSN からの放出した PtOEP の量は、9 %であり、残りの 91 %はメソ細孔中に残存している(Figure 6-11■)。これは、表面ペプチドの二次構造が β -シート構造を取るため、同ペプチドがメソ細孔を塞ぐ事でナノゲートとして機能し、PtOEP の放出を阻害したためと考えられる。しかしながら弱酸性条件下において PtOEP は、メソ細孔から徐々にではあるが徐放されている(Figure 6-11●)。この pH6.0 の塩基性環境下で表面ペプチドは、6-3-2 節で示した様にランダムコイル構造を取る。そのため、メソ細孔を塞いでいた β -シートペプチドが、ランダムコイル構造に転移する事でゲ

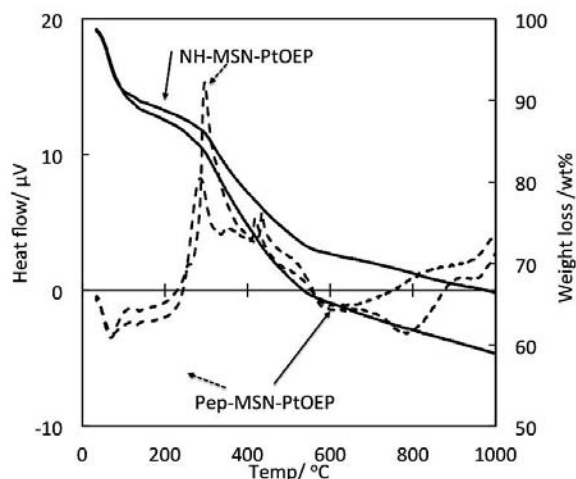


Figure 6-10. TG-DTA curves for the NH-MSN-PtOEP and Pep-MSN-PtOEP nanocarriers. The solid and dashed lines denoted the weight loss and heat flows, respectively.

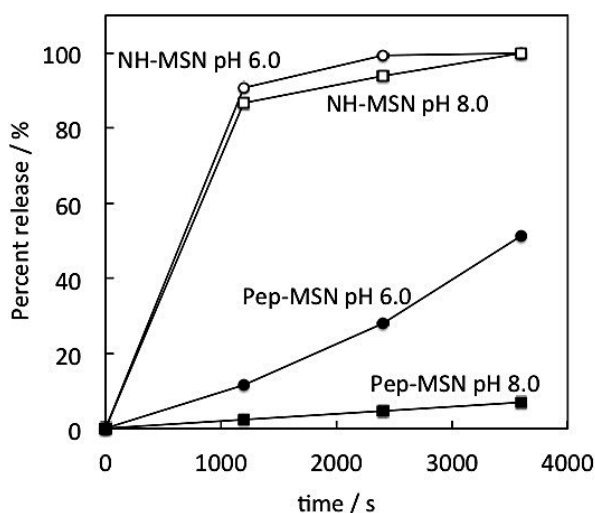


Figure 6-11. The pH dependence of the release profiles of the PtOEP from the NH-MSN (open) and Pep-MSN (closed) nanocarriers at pH 6.0 (circle) and pH 8.0 (square), respectively.

トが開放され、PtOEP の放出量が増大したためと考えられる。NH-MSN と比較して放出速度が減少するのは、ランダムコイルペプチドによる立体障害によりメソ細孔からの PtOEP 放出が NH-MSN と比べ阻害されたためと考えられる。

次に pH 6.0–8.0 間の微小 pH 変化を用いた Pep-MSN の薬物放出の精密制御を試みた。Figure 6-12 は、pH 8.0 から 6.0 へ、6.0 から 8.0 へと連続的に pH を変化させた時の Pep-MSN の薬物放出挙動を示す。薬物放出プロファイルは、Pep-MSN からの PtOEP の放出特性が、MSN 表面上のペプチドの可逆的二次構造転移により規制出来る事を強く示唆する。このことは、メソ細孔のキャップ-アンキャップシステムのスイッチングは、pH の微小変化によって表面ペプチドの可逆的構造転移をトリガーとして繰り返し行う事が可能であることを示す。

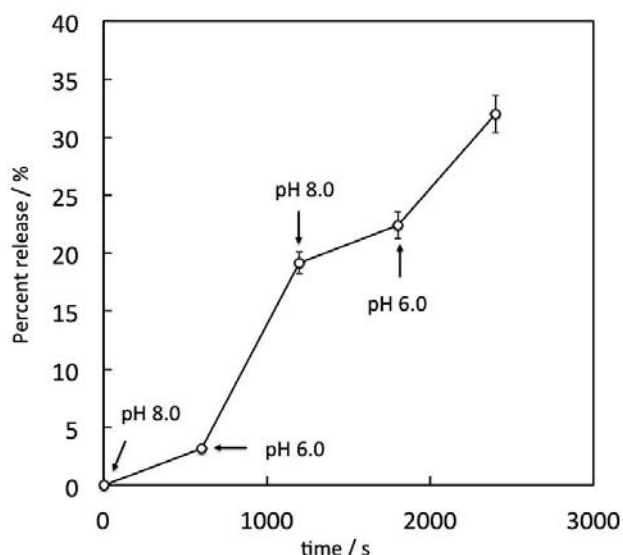


Figure 6-12. The regulated drug release profile of PtOEP from the Pep-MSN by alternately shifting pH from pH 8.0 to 6.0 and 6.0 to 8.0, respectively.

6-4. 結言

本章では、外部環境変化に対する応答性を利用したペプチドの可逆的に二次構造転移を MSN 表面上のメソ細孔のナノゲートシステムとして利用した新規 DDS 用担体の構築と薬物放出特性について検討した。MSN 表面上にペプチド分子を固定化する事で、ペプチドのリジン側鎖アミノ基間同士の静電反発、およびリジン側鎖アミノ基と MSN 表面上に残存するアミノプロピル基間での静電反発を利用する事で、微小 pH 変化(pH6.0–8.0)で可逆的にβ-シート-ランダムコイル転移を達成した。この二次構造転移をメソ細孔のキャップ-アンキャップシステムとして利用する事で、Pep-MSN からモデル薬物である PtOEP の放出を厳密に制御することが出来た。この可逆的な薬物放出特性は、pH を変化させることにより繰り返し制御する事が可能であった。

以上の結果より、無機物の高い物質内包特性と有機物の環境応答性を併せ持つ、特に外部環境変化に敏感なペプチド分子との複合化で得られる有機-無機複合材料が薬物担持担体として有用である事を示した。この機能性材料設計の知見は、今後の DDS 研究を初めとする医療・福祉および工学分野におけるナノテクノロジーの発展に寄与するものと考えられる。本研究で用いたペプチドナノゲートシステムでは、弱酸性-塩基性間(pH 6.0–8.0)での薬物徐放特性について報告したが、ペプチドのアミノ酸シーケンスを制御する事で様々な外部刺激(あらゆる pH 領域、温度や光など)に応答する物質輸送担体を創成する事が可能であり、DDS 研究の新たな可能性を導く事に繋がると期待される。

Reference

(1) J. Gu, S. Su, Y. Li, Q. He, J. Shi, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 2101-2103.

- (2) T. M. Allen, P. R. Cullis, *Science*, **2004**, *303*, 1818-1822.
- (3) S. Svenson, D. A. Tomalia, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2005**, *57*, 2106-2129.
- (4) P. D. Thornton, A. Heise, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 2024-2028.
- (5) L. Du, H. Song, S. Liao, *Micropor. Mesopor. Mat.*, **2012**, *147*, 200-204.
- (6) L. Chen, J. Di, C. Cao, Y. Zhao, Y. Ma, J. Luo, Y. Wen, W. Song, Y. Song, L. Jiang, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 2850-2852
- (7) S. Angelos, Y.-W. Yang, K. Patel, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 2222-2226.
- (8) Q. He, J. Shi, F. Chen, M. Zhu, L. Zhang, *Biomaterials*, **2010**, *31*, 3335-3346.
- (9) K. Murai, T. Nonoyama, T. Saito, K. Kato, *Catal. Sci. Technol.*, **2012**, *2*, 310-315.
- (10) K. Murai, K. Kato, *Appl. Surf. Sci.*, **2011**, *258*, 1725-1732.
- (11) C.-H. Lee, S.-H. Cheng, Y.-J. Wang, Y.-C. Chen, N.-T. Chen, J. Souris, C.-T. Chen, C.-Y. Mou, C.-S. Yang and L.-W. Lo, *Adv. Funct. Mater.*, **2009**, *19*, 215-222.
- (12) Y. Zhao, B. G. Trewyn, I. I. Slowing, V. S.-Y. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 8398-8400.
- (13) Q. Gan, X. Lu, Y. Yuan, J. Qian, H. Zhou, X. Lu, J. Shi, C. Liu, *Biomaterials*, **2011**, *32*, 1932-1942.
- (14) C. Coll, L. Mondragón, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, M. D. Marcos, J. Soto, P. Amorós, E. Pérez-Payá, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 2138-2140.
- (15) T. Borodina, E. Markvicheva, S. Kunizhev, H. Möhwald, G. B. Sukhorukov, O. Kreft, *Macromol. Rapid Commun.*, **2007**, *28*, 1894-1899.
- (16) S. S. Dharap, Y. Wang, P. Chandna, J. J. Khandare, B. Qiu, S. Gunaseelan, P. J. Sinko, S. Stein, A. Farmanfarmaian, T. Minko, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2005**, *102*, 12962-12967.
- (17) G. Zhou, Y. Chen, J. Yang, S. Yang, *J. Mater. Chem.*, **2007**, *17*, 2839-2844.
- (18) J. Fan, C. Yu, L. Wang, B. Tu, D. Zhao, Y. Sakamoto, O. Terasaki, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 12113-12114.
- (19) D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G. H. Fredrickson, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *Science*, **1998**, *279*, 548-552.
- (20) Y. J. Han, J. M. Kim, G. D. Stucky, *Chem. Mater.*, **2000**, *12*, 2068-2069.
- (21) F. Kleitz, S. H. Choi, R. Ryoo, *Chem. Commun.*, **2003**, 2136-2137.
- (22) D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 6024-6036.
- (23) S. Che, A. E. Garcia-Bennett, T. Yokoi, K. Sakamoto, H. Kunieda, O. Terasaki, T. Tatusmi, *Nature Materials*, **2003**, *2*, 801-805.
- (24) T. Miyazawa, E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, *83*, 712-719.
- (25) M. J. Winningham, D. Y. Sogah, *Macromolecules*, **1997**, *30*, 862-876.

第 7 章

結論

本博士論文では、生物が行っているバイオミネラルの形成機構の解明、すなわちバイオミネラリゼーションの機構解明を目的に、構造の規制されたペプチド集合体をテンプレートとしたミネラリゼーションを行い、テンプレート上の官能基のミネラリゼーションに与える影響を詳細に検討した。1 つは、テンプレート上の官能基間の相互作用に着目し、同官能基間の“電荷リレー効果”に基づく無機物形成に対する触媒効果を明らかにした。もう 1 つは、生物、特に貝類が行っているバイオミネラリゼーション、すなわちミネラル源を酵素反応により自ら生成すると共にそのミネラル源を用い、特定の結晶相よりなる無機相を作り分けている事に着目し、この機構解明を目的とした。具体的には、ナクレインタンパク質に倣い“ミネラル源の自己供給能”および“結晶構造制御能”を併せ持つ多機能性ペプチドテンプレートを用い、炭酸カルシウムのミネラリゼーションを行い、その機構を詳細に解析した。これらミネラリゼーションに関する基礎的知見を基に、構造の制御された有機-無機ナノ材料の工学的応用を目的に、導電性シリカ被覆 4- α -ヘリックスバンドル形成、および同バンドルを用いた自己組織化的なナノボンディング技術の確立、および医療・福祉分野での応用に向けたペプチド-メソポーラスシリカ複合体による厳密な薬物放出特性の制御に関して検討を行った。

第 2 章では、本研究で用いたペプチドの分子設計指針、およびその合成法について述べた。本研究では、ペプチドの二次構造として β -シートおよび α -ヘリックス構造を高次構造体形成のビルディングブロックとして用いた。 β -シートペプチドには、親・疎水性アミノ酸の交互シーケンスを採用し、親水面に配するアミノ酸としては、触媒活性機能およびミネラリゼーションにおける無機物の構造制御機能を念頭に、分子設計および合成を行った。また、 β -シートペプチドの二次構造転移を利用した有機-無機複合材料の機能制御を念頭に、pH 応答性を有する分子設計も行った。 α -ヘリックスペプチドに関しては、錯形成をドライビングフォースとしたヘリックスバンドル形成による内部の錯体の一次元配列を有する。ナノワイヤーの形成とその表面におけるミネラリゼーションによる構造安定化を念頭に分子設計を行った。

第 3 章では、シリカミネラリゼーションの触媒として機能する塩基性および酸性側鎖を有するペプチド分子を用い、そのアミノ酸の一次構造および二次構造がシリカミネラリゼーションに与える影響を詳細に検討した。グルタミン酸側鎖カルボキシル基とヒスチジン側鎖イミダゾール基が、隣接して存在するとき酵素の活性中心で見られる電荷リレーと同様な現象を発現する事を明らかとした。この“電荷リレー効果”はシリカのミネラリゼーション、特にシラノール間の脱水縮合反応に対して大きく影響し、シリカ形成を促進する事を見出した。今後は、アミノ酸シーケンスの最適化を施す事により、ミネラリゼーションに対する高い触媒活性の基となった効果的な電荷リレー効果を利用することで、人工酵素創成のための基礎的知見が得られると期待される。

第 4 章では、ナクレインタンパク質に倣い異なる二つの機能を併せ持つ新規ペプチドテンプレートを用いた炭酸カルシウムの生体模倣型ミネラリゼーション機構の解明を試みた。本章では、第 3 章で

用いた電荷リレー効果を有するペプチドが触媒として機能し、ウレア分子を加水分解することで、炭酸カルシウムのミネラル源となる炭酸イオンを自己供給する事を見出した。同系において、生成された炭酸イオンを用いた自己供給型の炭酸カルシウムミネラル化を行なったところ、得られる炭酸カルシウムは、ペプチドテンプレートの構造を反映した針状構造のモルフォロジーを取り、その結晶相は準安定相のアラゴナイトであった。ミネラル化により得られた炭酸カルシウムのモルフォロジーおよび結晶相は、テンプレートであるペプチドのモルフォロジー、テンプレート界面での炭酸イオン濃度、およびテンプレート効果(炭酸カルシウムの結晶成長方向とテンプレートの成長方向間の関係と、テンプレートと得られる無機結晶のエピタキシャル性)に強く依存する事を見出した。この生体模倣型ミネラル化に関する基礎的知見は、未だ未解明なバイオミネラル化に関する基本原理の解明を初め、新たな構造制御された有機-無機複合体の創成手法の確立や低分子人工酵素などの工学や医学を初めとするさまざまな研究分野の発展が期待される。

第 5 章では、 α -ヘリックスペプチドが金属配位およびマクロダイポール相互作用により自己組織化的に集合した 4- α -ヘリックスバンドルよりなる金電極間を自発的に結線するナノワイヤー形成技術の確立とその電気化学特性について検討した。4- α -ヘリックスバンドルは、ヘリックス分子の片側側面にのみ配する、ヒスチジン側鎖イミダゾール基と Co(II)との錯形成により、自己組織化的に形成され、さらに軸方向に成長する事で内部にコバルト(II)錯体の一次元配列構造を有するナノワイヤーを目的の端子間に自発的に結線する事に成功した。さらに α -ヘリックス片側側面に配したグルタミン酸およびリジン側鎖官能基(ヒスチジンと反対方向に配する様分子設計)のシリカミネラル化に対する触媒効果により、得られたナノワイヤー表面にシリカ膜を形成する事で、構造が安定化され、この結果導電性の飛躍的な向上が確認された。本知見は、トップダウンアプローチでは達成し得ない微細構造を思いのまま省エネルギー・低環境負荷プロセスで形成可能である事から、今後のナノエレクトロニクス分野の発展に寄与すると期待される。

第 6 章では、MSN 表面上のメソ細孔のキャップ-アンキャップを制御する新規ナノゲートシステムとして β -シートペプチドを用い、その可逆的な二次構造転移を利用した DDS 担体としてのペプチド-MSN 複合材料の創成を行い、薬物放出特性の制御を試みた。MSN 表面上に固定化されたペプチドは、pH 6.0-8.0 間の微小な pH 変化に応答し、異なる 2 種類の静電反発(ペプチドのリジン側鎖アミノ基間、およびリジン側鎖アミノ基と MSN 表面上に残存するアミノプロピル基間)により効果的、且つ可逆的に β -シート-ランダムコイル転移を生じ、担持した薬物の放出量を劇的に制御可能であった。今後さらなる研究の発展により、例えば応答 pH 値のチューニング、光や熱等他の刺激応答性の付加により、より高い環境認識性や放出量の厳密制御が可能な物質輸送担体の開発が可能となり、医療・福祉分野における新規産業創出のためのキーテクノロジーの進展に寄与するものと期待される。

以上、ペプチドのオングストロームからナノレベルで厳密に制御された自己組織化構造が、酵素様触媒活性の発現、無機物の結晶構造の制御、さらには有機-無機ナノ複合体のそれぞれ単独成分では得られない機能発現・向上、および制御に密接に関連している事を明らかにした。特に自己供給型ミネラル化による炭酸カルシウム形成に関する知見は、生物学や結晶学を初めとする各研究分野

における極めて重要な学術的知見となるだけではなく、生命の化学進化に対する“答え”を導く事になるかもしれない。加えて生体機能に倣う構造制御技術の更なる発展は、次世代の環境調和型製造プロセスにより、生体系での優れた機能性材料であるバイオミネラルをも超える“究極の機能性材料”として、次代の安心・安全社会の形成に寄与するだろう。

PUBLICATION LIST

1. “Design of a nanocarrier with regulated drug release ability utilizing a reversible conformational transition of a peptide, responsive to slight changes in pH”, **Kazuki Murai**, Masahiro Higuchi, Takatoshi Kinoshita, Kenji Nagata and Katsuya Kato, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2013**, *15*, 11454-11460.
2. “Calcium carbonate biomineralization utilizing a multifunctional β -sheet peptide template”, **Kazuki Murai**, Masahiro Higuchi, Takatoshi Kinoshita, Kenji Nagata and Katsuya Kato, *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 9947-9949.
3. “Silica Mineralization by a Peptide Template Having a high Charge Relay Effect”, **Kazuki Murai**, Masahiro Higuchi, Tatsuya Kuno and Katsuya Kato, *ChemPlusChem*, **2014**, *79*, 531-535.