

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22107005

研究課題名(和文)機能性ペプチドによる融合マテリアルの精密設計と合成

研究課題名(英文)Fine Design and Synthesis of Fusion Materials Based on Functionalized Peptides

研究代表者

鳴瀧 彩絵 (NARUTAKI, AYAE)

名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10508203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 41,600,000円

研究成果の概要(和文)：融合マテリアル構築の基盤となる制御分子として、新規なエラスチン類似ポリペプチドを作製した。このポリペプチドは天然エラスチンのドメイン構造を簡略化したブロック構造を持ち、外部刺激によって均質性にすぐれたナノファイバーを形成する。エラスチン配列に銀結合配列を付加した融合ポリペプチドを作製し、銀粒子がポリペプチドファイバーに担持された抗菌性ファイバー膜を得た。さらに、ナノファイバーを生分解性を有する高分子素材と融合し、組織工学用の足場材料を作製した。領域内共同研究として、精密合成したブロック高分子を制御分子として利用し、液相中でシリカナノ粒子を二次元のリング状構造体へと組織化することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Novel elastin-like polypeptides have been developed as control molecules for the creation of fusion materials. The polypeptides consist of several functional blocks, the design of which was inspired by the domain structure of native elastin. The polypeptides form well-defined nanofibers in aqueous solution by external stimuli. The silver-binding sequence was fused to the elastin-like polypeptide to give silver nanoparticle-polypeptide nanofiber composite materials that show anti-bacterial properties. Hybrid scaffold was fabricated from the polypeptide fiber and a biocompatible polymer. As a collaborative research in the project, polymer-mediated self-assembly of inorganic nanoparticles was conducted. Unique ring-like nanostructure of silica nanoparticles was obtained in the liquid phase by using synthetic block copolymer as a mediator.

研究分野：高分子材料化学

キーワード：ハイブリッド材料 機能性高分子 融合マテリアル 生体材料 高分子構造・物性

1. 研究開始当初の背景

来るべき新時代に備え、低環境負荷・省エネルギー型の新しい材料構築のための学問を創成するという本領域の目的ののっとり、分子が高度に関与する自然界のものづくり、特にバイオミネラリゼーションに学び、有機と無機が融合した材料を構築する。A01 分子制御班として、融合マテリアル開発の基盤となる制御分子を開発することに重点を置く。さらに、領域内の多様な研究者による新たな視点や手法による共同研究を通じて新材料を創製する。

2. 研究の目的

(1) 機能性ポリペプチドの開発と融合マテリアルの構築

タンパク質やペプチドは、厳密に定義された分子構造とそれに基づく高次構造を有する機能性分子であり、バイオミネラルの形成に最も直接的に関与する分子である。本研究では、生体における重要な構造タンパク質であるエラスチンに着目して新しい制御分子を作製する。エラスチンに見られるアミノ酸配列を遺伝子工学的に改変した多機能性ポリペプチドを作製したのち、他素材と分子制御プロセスを介して融合する。バイオメディカル分野で利用できる融合マテリアルの創製を目指す。

(2) ブロック高分子を利用した無機秩序構造の創製

領域内共同研究として、精密合成した有機高分子の分子制御効果により、環境調和型プロセスで無機ナノ粒子を秩序だった構造へと並べる手法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 機能性ポリペプチドの開発と融合マテリアルの構築

目的とするポリペプチドに対応する遺伝子を DNA クローニングの手法により作製した。遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を用いて大腸菌を形質転換し、ポリペプチドを発現させた。遺伝子組換え生物の取り扱いにあたっては所属機関の許可を得たうえ法令を遵守して実験を行った。ポリペプチドの精製には液体クロマトグラフィー (GE ヘルスケア・ジャパン(株) ÄKTApurifier10, 平成 22 年度導入備品) を活用した。

ポリペプチドの自己集合挙動を円二色性 (CD) 分散計 (日本分光(株) J-820, 平成 23 年度導入備品) および原子間力顕微鏡 (AFM) によって解析した。

融合足場材料の作製にナノファイバー紡糸装置 (メック(株) NANON-06, 平成 24 年度導入備品) を利用した。

(2) ブロック高分子を利用した無機秩序構造の創製

精密合成したブロック高分子は A02 青島グループより提供を受けた。A01 下嶋グループと共同で、粒子径 15 nm あるいは 30 nm の

シリカナノ粒子をテトラエチルオルソシリケートの加水分解・重縮合を経て合成した。ブロック高分子をシリカナノ粒子のゾルに添加し、pH と温度を調整してナノ粒子集合体を得た。

クライオ透過型電子 (cryo-TEM) と走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて粒子を観察した。

4. 研究成果

(1) 機能性ポリペプチドの開発と融合マテリアルの構築

エラスチンは、血管や皮膚に含まれる構造タンパク質であり、前駆体タンパク質 (トロポエラスチン) が組織化して弾性線維を形成することにより、組織に伸縮性を与える。そのすぐれた力学特性と生体適合性からバイオマテリアル応用が期待されているが、生体内のエラスチンは高度に架橋されており抽出や可溶化が困難であることから、生体由来エラスチンを利用した材料開発は遅れをとっていた。そこで近年、化学合成あるいは遺伝子工学的に作製したエラスチン由来ポリペプチド (ELP) が注目されている。しかしながら、ELP の集合構造を制御し、生体に見られるような弾性線維構造を構築するのは未だ困難であった。

本研究では、トロポエラスチンに見られる 2 種類の特徴的な疎水性ドメイン構造を単純化した“二重疎水性”のブロックポリペプチド GPG を開発した (図 1)。GPG は、下限臨界共溶温度 (LCST) を示す Proline-rich 配列 (P 配列, (VPGXG)₂₅) を分子中央部に、分子間水素結合を形成しうる Glycine-rich 配列 (G 配列, (VGGVG)₅) を分子両末端に有する。P 配列、G 配列ともにトロポエラスチンに由来する配列であり、P 配列は LCST に加えてエントロピー弾性を示す。



図 1 GPG のアミノ酸配列。

GPG を水に溶解させて 45 °C に加熱すると、数日でナノファイバーを形成する。CD スペクトル測定 (図 2(a)) および AFM (図 2(b)) によりファイバーの形成過程を調べたところ、GPG はまず疎水的に凝集してナノ粒子を形成し、その後、粒子が β-sheet 構造を形成しながら集合することにより、数珠状のナノファイバーを形成することが示された (図 2(c))。等方的な疎水性相互作用と、方向性を備えた水素結合の形成が異なるタイムスケールで生じることで、階層的な自己集合が達成された。P 配列、G 配列のみを含むポリペプチドはこのようなファイバーを形成しないことから、ブロック構造の重要性が示された。数珠状ナノファイバーは水/トリフルオロエタノール (TFE) 混合溶媒からも得るこ

とができ、TFEの添加量によってファイバー形成速度やファイバー径を制御可能であった。ナノファイバーはゲル化や沈殿を生じることなく、均一な分散液として得られることから、他素材との融合に向けて取扱いのしやすい素材が構築できた。

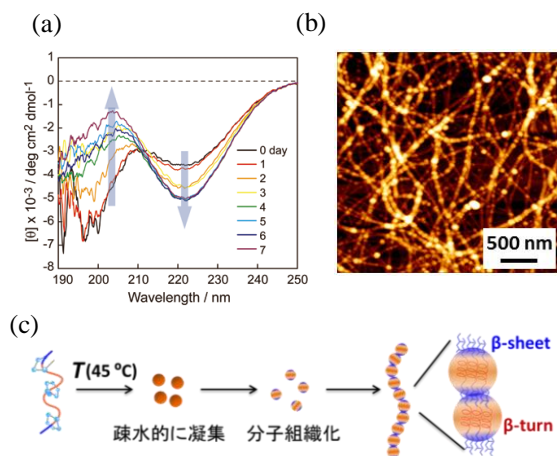


図2 (a) GPG の水中, 45 °C における CD スペクトル, (b) 7 日後に形成された GPG の数珠状ナノファイバーの AFM 像, (c) 予想される集合機構。

GPG にさらに機能性配列を付加し、バイオバイオメディカル分野で有用なポリペプチド材料の開発を目指した。初代の GPG (図1) からなるナノファイバーは、その温度応答性ゆえに、LCST 以下の低温では部分的に分解してしまう問題点があった。そこで、GPG 配列にリシン残基を含む架橋可能配列 (KAAK) を付加した GPG 誘導体を新たに作製し、化学架橋によりファイバーを安定化させることを試みた。GPG 誘導体から水中で自己集合性ファイバーを形成させたのちに BS3 (bis(sulfosuccinimidyl)suberate) で架橋処理を施すことにより、広い温度範囲でナノファイバー構造を安定に保持させることができた。さらに、GPG 配列に銀結合性配列 (AYSSGAPPMPF) を結合させたポリペプチドを作製した。銀結合性配列を銀の核形成の起点とすることにより、GPG/銀ナノ粒子融合ファイバー膜を作製した。このファイバー膜は大腸菌の増殖を抑制する抗菌性を有していた。

再生医療の本格化に向けて重要な細胞足場材料の作製を、GPG ファイバーを構成要素として他素材と融合することによって行った。足場材料は生体内の細胞周辺環境に類似したものであることが望ましいという要件を受け、ゼラチン/ナノファイバー複合足場材料を作製した。これは、コラーゲンとエラスチンの複合線維構造からなるヒト真皮の細胞外マトリクス構造を模倣したものである。ヒト真皮におけるエラスチン量はコラーゲン量の数 wt% 程度であることを考慮し、本研究ではゼラチンに対する GPG ファイバ

一の混合比を 0.25~1 wt% としてその効果を検討した。ゼラチン溶液に GPG ナノファイバー分散液を混合してエレクトロスピンング法を施すことによりファイバー膜を得た。図3(a)に GPG/ゼラチン = 1 wt% の条件で得られたファイバー膜の SEM 像を示す。検討した濃度範囲において、均質な多孔質足場材料が作製できた。グルタルアルデヒドで架橋して不溶化させたファイバー膜にマウス胎仔由来線維芽細胞株 (NIH-3T3) を播種して alamarBlue® Assay を行い、本材料が細胞に対して毒性を示さないことを確認した。架橋後のファイバー膜をリン酸バッファーで湿潤させたのちに引張試験による弾性率測定を行った。図3(b)に示すように、ごく少量 (0.5 wt%) の GPG ファイバーの添加によって、複合ファイバー膜の弾性率はゼラチン単独のファイバー膜と比較して低下し、最大ひずみの値は上昇した。足場材料の力学特性は細胞の増殖や分化に影響する重要な因子であるが、これをごく少量の GPG ファイバーの添加によって調整できた。

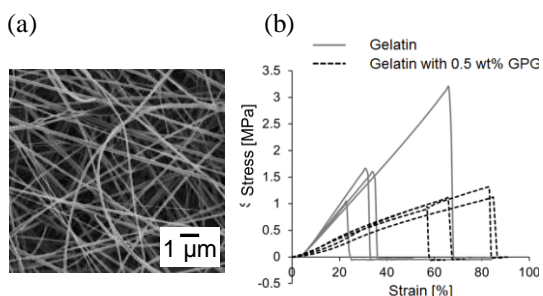


図3 (a) ゼラチン/GPG (1 wt%) 複合ファイバー膜の SEM 像. (b) ファイバー膜の応力-ひずみ曲線。

(2) ブロック高分子を利用した無機秩序構造の創製

ナノメートル領域で構造が制御された材料は従来の原理を超えた機能を発現する可能性があり注目を集めている。コロイドナノ粒子の自己集合はナノ構造材料を築くのに有効な手段のひとつである。研究代表者らは以前、シリカナノ粒子のコロイド溶液に、シリカに吸着しうる両親媒性の poly(ethylene oxide) *-block-*poly(propylene oxide) *-block-*poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) 型のブロックコポリマーを添加すると、適切な pH 条件においてシリカ粒子が液相で 1 次元のチェーン状に自己集合することを見出した。

A02 青島グループ、A01 下嶋グループとの共同研究では、シリカ吸着部位を側鎖に持つタイプの両親媒性ブロックコポリマー、poly[(2-ethoxyethyl vinyl ether) *-block-*(2-methoxyethyl vinyl ether)] (EOVE-MOVE) をシリカナノ粒子 (直径 15 nm または 30 nm) の自己集合に用いた (図4(a))。ポリマーは様々な組成、鎖長のものが精密合成可能であることから、それらのポリ

マーと粒子集合様式との相関を調べることで、現象の深い理解を目指した。様々な鎖長のブロックコポリマーを用いた場合に、直径 15 nm のシリカ粒子が 2 次元のリング状に集合する現象が見られた (図 4(b))。シリカナノリングは cryo-TEM でも観察されたことから、自己集合は液相中で生じていると考えられる。EOVE と MOVE の鎖長を変化させた場合にもナノリングが形成された。一方、同程度の分子量と組成を有するランダムコポリマーを添加した場合にはシリカ粒子は無秩序に凝集するのみであった。これはポリマーのシリカ表面への吸着構造の違いによるものであると考えている。興味深いことに、粒径 30 nm のシリカ粒子を用いた場合には EOVE-MOVE の存在下で 1 次元のチェーン (図 4(c)) が得られた。この結果とナノリング形成過程の SEM による観察をとおして、シリカナノリングはチェーンの屈曲によって生じているという機構を提案した。非結晶性の粒子を、テンプレートの利用なしに 2 次元リング状に並べた例はこれまでになく、本成果は基礎科学的見地からも重要である。

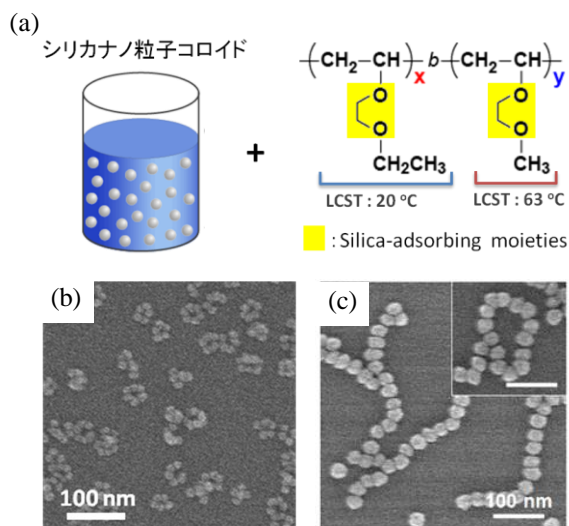


図 4 (a) EOVE-MOVE によるシリカナノ粒子自己集合実験の概念図, (b, c) 粒子の SEM 像: (b) 15 nm の粒子, (c) 30 nm の粒子。

A01 下嶋グループとの共同研究で、1 次元集合に用いたポリマーとは逆の結合様式を持つ PPO-PEO-PPO 型のブロックコポリマーをシリカナノ粒子の分散液に添加し、適切な pH 条件のもとで水熱処理を行うと、シリカ粒子が単層のベシクル構造 (3 次元構造) へと自己集合することを見出した。このナノ粒子ベシクルは、金や酸化スズ等、他の機能性ナノ粒子を担持するためのナノカプセルとして利用できる。

以上のように、ブロック高分子の存在下、水媒体中でシリカナノ粒子を 1~3 次元に自己集合させる方法を確立した。他の氧化物ナノ粒子の 1 次元自己集合系への展開や、粒子合成法 (メソポーラスシリカナノ粒子、樹状シリカ、酸化鉄/シリカのコアーシェル粒

子)、有機-無機ハイブリッド多孔体の合成、ヒドロキシアパタイト/セルロースナノファイバー融合材料などについても、本研究の成果として論文発表を行っている。

本研究全体をとおして、ブロック構造を有する高分子 (ポリペプチドあるいは合成高分子) が、融合マテリアル創製のための強力な制御分子となることを示すことができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 23 件)

- ① Duc H. T. Le, Tatsuya Okubo, Ayae Sugawara-Narutaki, “Beaded Nanofibers Assembled from Double-Hydrophobic Elastin-Like Block Polypeptides: Effects of Trifluoroethanol”, *Biopolymers*, **103**, 175-185 (2015). (査読有)
DOI: 10.1002/bip.22582
- ② Duc H. T. Le, Reiko Kawakami, Yusuke Teraoka, Tatsuya Okubo, Ayae Sugawara-Narutaki, “Cross-Linking Assisted Stabilization of Beaded Nanofibers from Elastin-Like Double Hydrophobic Polypeptides”, *Chem. Lett.*, **44**, 530-532 (2015). (査読有)
DOI: 10.1246/cl.141189
- ③ Shujun Zhou, Yukari Oda, Atsushi Shimojima, Tatsuya Okubo, Sadahito Aoshima, Ayae Sugawara-Narutaki, “Ring Assembly of Silica Nanospheres Mediated by Amphiphilic Block Copolymers with Oxyethylene Moieties”, *Polym. J.*, **47**, 128-135 (2015). (査読有)
DOI: 10.1038/pj.2014.115
- ④ Junzheng Wang, Ayae Sugawara-Narutaki, Atsushi Shimojima, Minoru Osada, Renzhi Ma, Tatsuya Okubo, “Dendritic Silica Nanoparticles Synthesized by a Block Copolymer-Directed Seed-Regrowth Approach”, *Langmuir*, **31**, 1610-1614 (2015). (査読有)
DOI: 10.1021/la504955b
- ⑤ Seira Morimune-Moriya, Sakina Kondo, Ayae Sugawara-Narutaki, Tatsuya Nishimura, Takashi Kato, Chikara Ohtsuki, “Hydroxyapatite Formation on Oxidized Cellulose Nanofibers in a Solution Mimicking Body Fluid”, *Polym. J.*, **47**, 158-163 (2015). (査読有)
DOI: 10.1038/pj.2014.127
- ⑥ 鳴瀧彩絵, “生体模倣ブロックポリペプチドの段階的自己集合”, *Colloid & Interface Communication*, **40**(2), 12-14 (2015). (査読無)
- ⑦ Duc H. T. Le, Ryo Hanamura, Dieu-Huong Pham, Masaru Kato, David A. Tirrell, Tatsuya Okubo, Ayae Sugawara-Narutaki, “Self-Assembly of Elastin-Mimetic Double Hydrophobic Polypeptides”, *Biomacromolecules*, **14**, 1028-1034 (2013).

- (査読有)
DOI: 10.1021/bm301887m
- ⑧ Ayae Sugawara-Narutaki, “Bio-Inspired Synthesis of Polymer-Inorganic Nanocomposite Materials in Mild Aqueous Systems”, *Polym. J.*, **45**, 269-276 (2013). (査読有)
DOI: 10.1038/pj.2012.171
- ⑨ 鳴瀧彩絵, Duc H. T. Le, 大久保達也, “ポリペプチドのデノボデザインに向けて—エラスチン配列の魅力に迫る”, *化学*, **68**(12), 66-67 (2013). (査読無)
- ⑩ 鳴瀧彩絵, 大久保達也, “単分散球状シリカナノ粒子が拓くナノアーキテクチャーの世界”, *表面*, **51**(6), 22-35 (2013). (査読無)
- ⑪ Junzheng Wang, Suminto Winardi, Ayae Sugawara-Narutaki, Akihito Kumamoto, Tetsuya Tohei, Atsushi Shimojima, Tatsuya Okubo, “Chain-Like Nanostructures from Anisotropic Self-Assembly of Semiconducting Metal Oxide Nanoparticles with a Block Copolymer”, *Chem. Commun.*, **48**, 11115-11117 (2012). (査読有)
DOI: 10.1039/C2CC36210D
- ⑫ Junzheng Wang, Ayae Sugawara-Narutaki, Masashi Fukao, Toshiyuki Yokoi, Atsushi Shimojima, Tatsuya Okubo, “Two-Phase Synthesis of Monodisperse Silica Nanospheres with Amines or Ammonia Catalyst and Their Controlled Self-Assembly”, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **3**, 1538-1544 (2011). (査読有)
DOI: 10.1021/am200104m

他 11 件

[学会発表] (計 61 件)

- ① Ayae Sugawara-Narutaki, “Block Copolymer-Mediated Assembly of Silica Nanospheres into One-, Two-, and Three-Dimensional Nanostructures”, 7th International Conference on Advanced Plasma Science and Its Applications to Nitrides and Nanomaterials/8th International Conference on Plasma-Nano Technology & Science (ISPlasma2015/IC-PLANTS2015), Nagoya University (Nagoya), Japan, March 29, 2015. (招待講演)
- ② 鳴瀧彩絵, “シリカナノコロイドが拓くナノアーキテクチャーの世界”, 第 10 回材料フォーラム, ノリタケの森 (名古屋), 2014 年 10 月 8 日. (招待講演)
- ③ 鳴瀧彩絵, Duc H. T. Le, 大城真太郎, 大久保達也, 大槻主税, “エラスチン類似ポリペプチドを利用した生体模倣足場材料の創製”, 第 63 回高分子討論会, 長崎大学文教キャンパス (長崎), 2014 年 9 月 24 日.
- ④ 鳴瀧彩絵, “ブロック高分子を利用した水溶液からの材料創製”, 第 149 回東海高分

- 子研究会講演会, 湯の山温泉 湯元グリーンホテル (三重), 2014 年 9 月 6 日. (依頼講演)
- ⑤ 鳴瀧彩絵, “高分子を利用した水溶液からの材料創製: 有機-無機複合材料を中心に”, 第 3 回自然共生セミナー, 大阪大学 (大阪), 2014 年 9 月 1 日. (招待講演)
- ⑥ 鳴瀧彩絵, Duc H. T. Le, 大城真太郎, 大久保達也, “自己集合性を有するエラスチン由来ポリペプチドとゼラチンからなるハイブリッド足場材料の創製”, 第 62 回高分子討論会, 金沢大学角間キャンパス (金沢), 2013 年 9 月 11 日. (依頼講演)
- ⑦ 鳴瀧彩絵, “エラスチンポリペプチドの魅力と応用展開”, 第 5 回バイオマス有機材料設計研究会, 名古屋工業大学 (名古屋), 2012 年 10 月 12 日. (招待講演)
- ⑧ Ayae Sugawara-Narutaki, Duc H. T. Le, Tatsuya Okubo, “Formation of Nanofibers from Elastin-Derived Block Polypeptides”, IUMRS-International Conference on Electronic Materials, Pacifico Yokohama (Yokohama), Japan, September 24, 2012.
- ⑨ 鳴瀧彩絵, 下嶋敦, 大久保達也, “球状シリカナノ粒子の液相における一次元自己集合とその応用”, 日本セラミックス協会第 24 秋季シンポジウム, 北海道大学 (札幌), 2011 年 9 月 9 日. (招待講演)
- ⑩ Ayae Sugawara-Narutaki, Masashi Fukao, Junzheng Wang, Atsushi Shimojima, Tatsuya Okubo, “Anisotropic Assembly of Silica Nanospheres in Liquid Phase”, The 11th International Symposium on Biomimetic Materials Processing (BMMP-11), Nagoya University (Nagoya), Japan, January 27, 2011. (招待講演)

他 51 件

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 金属酸化物構造体の製造方法
発明者: 大久保達也, 鳴瀧彩絵, 周叔君
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特開 2014-97557
出願年月日: 2012 年 11 月 15 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等
<https://www.fusion-materials.org/>
http://profs.provost.nagoya-u.ac.jp/view/html/100007263_ja.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳴瀧 彩絵 (Narutaki, Ayae)

名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号: 10508203