

令和元年6月13日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14090

研究課題名(和文) “Silicon Pool” への分子刺激によるバイオミメティックシリカ合成

研究課題名(英文) Biomimetic synthesis of silica through the molecular stimulus to "silicon pool".

研究代表者

鳴瀧 彩絵 (Sugawara-Narutaki, Ayae)

名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号：10508203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ケイ酸が濃縮された場である“silicon pool”を活用する新規概念に基づき、常温・常圧・中性pHで高度に構造制御されたシリカを得る生物模倣合成法を実証することを目的とした。

ケイ酸を濃縮して分子周囲に“silicon pool”を形成するペプチドP1、およびP1と複合化して鋳型構造を形成しつつ、ケイ酸の重縮合反応を触媒するペプチドP2を独自に開発し、ケイ酸溶液に段階的に添加してシリカを合成した。ペプチドを除去して得られるシリカが、鋳型構造を反映した多孔質構造およびキラル認識能を持つことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イオン性結晶のバイオミネラリゼーションにおいて、無機イオンが有機高分子によって濃縮されたアモルファス前駆体を利用して精緻な結晶構造を組み上げる戦略が見られる。本研究は、シリカにおいても同様の戦略が有効であることを示すproof of conceptとなり、バイオミネラリゼーションの学術的な体系化につながった。さらに、本研究は、無機材料の環境低負荷合成や、無機物への新しいペプチド担持法を提供するものであり、無機工業材料や医用材料分野への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study demonstrates a biomimetic synthesis to obtain highly structure-controlled silica at ambient temperature, pressure and neutral pH based on the novel concept of utilizing “silicon pool” which is a place where silica is concentrated. We have designed and obtained peptides P1 and P2 for this purpose. P1 can condense silicic acid and forming a “silicon pool” around the molecule. P2 catalyzes the polycondensation of silicic acid while forming a template structure by forming a complex with P1. The stepwise addition of P1 and P2 to the silicic acid solution resulted in the formation of peptides/silica hybrids. It was revealed that the silica obtained by removing the peptide had a porous structure reflecting its template structure and a chiral recognition ability.

研究分野：生体高分子化学

キーワード：ナノ材料 バイオミメティック シリカ ペプチド 多孔体

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シリカ (SiO_2) は食品からエレクトロニクスまであらゆる製品に利用される汎用材料であり、近年のナノテクノロジーの発展により、ナノサイズの良質なシリカへの需要がますます高まっている。ナノ構造が制御されたシリカ (多孔質シリカ、中空シリカ等) は、通常、高純度のケイ素アルコキシドを原料とし、酸性または塩基性条件における加水分解・重縮合反応を経て合成される。一方、自然界には、繊細な多孔質シリカの被殻を持つ珪藻が存在する。珪藻は環境水中のケイ酸を原料に、常温・常圧・中性付近 pH でシリカを合成する。ナノシリカを温和な条件でつくるプロセスとして注目されているが、機構は解明されておらず、人工的に常温・常圧・中性 pH でナノ構造が制御されたシリカを得る手法も確立されていない。

近年、珪藻シリカの形成プロセスに、ケイ酸が高度に濃縮・安定化された“silicon pool”の関与が指摘されはじめた (M. Preari *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 136, 4236 (2014)). ケイ酸の溶解度は pH < 9 において 2 mM 程度であるが、珪藻内では 19–340 mM ものケイ酸が、析出することなく安定に貯蔵されている。これにはタンパク質が関与していると考えられているが詳細は不明であり、silicon pool を材料化学の見地から利用した例もない。

2. 研究の目的

本研究では、silicon pool を活用する独創的なアプローチにより、ケイ酸を原料とする常温・常圧・中性 pH のプロセスで、鑄型構造を明確に反映した多孔質シリカを得る新規な生物模倣合成法を実証する。これには、戦略的にデザインした 2 種のペプチド P1 および P2 を用いる (図 1)。P1, P2 はそれぞれ 30 残基のアミノ酸から構成される。P1 はケイ酸との水素結合サイトを豊富に含む両性高分子電解質であり、ケイ酸の重縮合を阻害する効果を持つことが期待される。P2 はケイ酸の重縮合を触媒するアミノ基を多く含む。これら 2 つのペプチドは単独ではランダムコイル構造をとっているが、混合することで α -ヘリックスが会合した coiled-coil 構造というシリンダー状の構造を形成する。P1 によって形成されたケイ酸の濃縮場に P2 を添加すると、P1/P2 が剛直な coiled-coil 構造を形成するとともにケイ酸の重縮合を促進し、シリカ形成の鑄型として機能することを期待した。

炭酸カルシウムやリン酸カルシウムの生鉱化作用 (バイオミネラリゼーション) において、無機イオンが有機高分子によって濃縮されたアモルファス前駆体を利用して精緻な結晶構造を組み上げる戦略が見られる。本研究は、シリカにおいても同様の戦略が有効であることを示す proof of concept となり、これが実証されればバイオミネラリゼーションの学術的な体系化につながる。さらに、本研究は、無機材料の環境低負荷合成や、無機物への新しいペプチド担持法を提供するものであり、無機工業材料や医用材料分野への貢献が期待される。

3. 研究の方法

P1 および P2 は (株) ペプチド研究所に合成を委託した。P1 または P2 を残基濃度が 0.8 mM となるように溶解させた酢酸緩衝液に、ケイ酸濃度が 20 mM となるように Na_2SiO_3 を加えた。塩酸を用いて pH を 5.5 に調節したのち、25 °C、300 rpm で保持した。溶液中の溶存ケイ酸濃度の経時変化をモリブデンブルー法により測定した。溶液中のペプチドの二次構造を円二色性 (CD) スペクトル測定により解析した。P1 と P2 を段階的に添加する実験においては、20 mM の Na_2SiO_3 を含む酢酸緩衝液 (pH 5.5) に P1 を添加し、1 時間後に P2 を加え、25 °C、300 rpm で 24 時間保持した。得られた析出物を、遠心分離機を用いて回収し、水で洗浄して試料とした。試料を 650 °C で 6 時間焼成することでペプチドを除去した。窒素吸脱着測定により細孔構造を分析した。試料の形態を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。さらに、焼成後の粉末へのポリアミノ酸の吸着性を評価した。0.4 mg の試料を 1.5 mM の poly-L-lysine または poly-D-lysine Tris-HCl 緩衝液 1 mL 中に分散させた。溶液を 24 時間攪拌し、ピシンコニン酸 (BCA) タンパク質分析法を用いて溶液中の poly-lysine 濃度を評価した。対照試料として、市販のシリカ粉末 (SiO_2 , 関東化学) を用いた。

4. 研究成果

モリブデンブルー法により求めた溶存ケイ酸濃度の経時変化を図 2 に示す。ペプチドを添加しない場合と比較して、P1 を加えた溶液の溶存ケイ酸濃度は測定開始からおよそ 5 時間後まで高く、P2 を加えた場合には低くなった。P1 を 2 倍量添加した場合、溶存ケイ酸濃度はさらに増加した。当初の設計どおり、P1 はケイ酸の重縮合を抑制し、P2 は促進する効果を持つことが示された。すべての条件において、24 時間後には溶存ケイ酸濃度が 3.5 mM 程度にまで低下

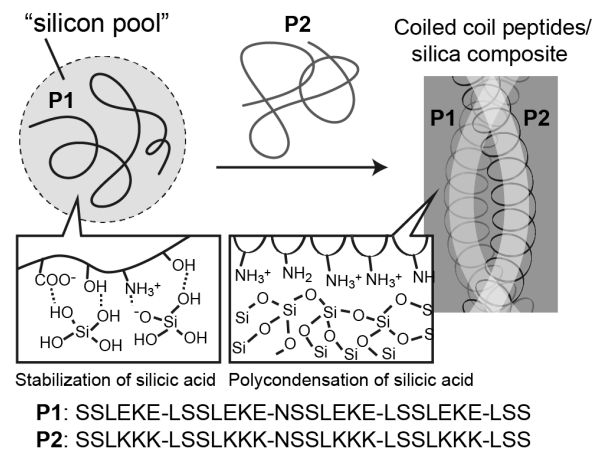


図 1 本研究の概念図。

した。

ケイ酸溶液中における P1 および P2 の CD スペクトル、およびケイ酸溶液中で P1 を加えてから 1 時間後に P2 を加えたときの CD スペクトル (P1 + P2) を図 3 に示す。P1、P2 のスペクトルはともに 200 nm 付近に負の極大を持つことから、それぞれ単独ではランダムコイル状態で存在していることが示唆される。P1 のスペクトル強度が P2 より低いのは、P1 分子の周囲に silicon pool が形成されている影響を受けている可能性がある。P1 と P2 を混合すると、205 nm および 222 nm に負の極大を持つようになる。これは α -ヘリックス構造の形成を示している。ランダムコイル構造をとっているペプチドが、混合により α -ヘリックス構造へ変化するのは coiled-coil を形成するペプチド群に通常見られる挙動であり、silicon pool が形成されている状況下においても P1 と P2 はコイルド構造を形成しうることを示唆する結果である。

続いて、silicon pool を経由することで、最終的に形成されるシリカの形態に違いがみられるかどうかを調べた。モリブデンブルー法の結果 (図 2) より、ケイ酸溶液に P1 を加えて 1 時間後であれば P1 周囲に silicon pool が形成されていると考えられる。そのため、silicon pool を経由する試料は、P1 を添加して 1 時間後に P2 を加え、その後 24 時間保持することで作製した。比較として、P1 と P2 をケイ酸溶液に同時に添加した条件で得られる試料を用意した。各試料を焼成後、窒素吸脱着測定および TEM 観察により評価した。窒素吸脱着測定により得られた吸着等温線を図 4 に示す。各試料において、 $p/p_0 < 0.05$ における等温線の立ち上がり、 $p/p_0 > 0.4$ におけるヒステリシスが見られたことから、どちらの試料もミクロ孔とメソ孔を有していることが示唆される。メソ孔への窒素吸着量は P1 と P2 を段階添加した試料 (図 4 (a)) においてより多くなった。Silicon pool を経由することでより多くのメソ孔が形成されることが示唆される。焼成後試料の TEM 像からは、P1 と P2 を段階的に添加した試料において、幅 2 nm 程度の細長い空孔の存在が観察されたのに対し (図 5 (a))、同時添加した試料では粒径 2~3 nm のナノ粒子が凝集した形態が観察された。Coiled-coil 構造から予想されるシリンダー構造は、幅が約 2.4 nm、全長が 4.0 nm 程度である。段階添加により生じた試料で観察された細長い空孔の幅はほぼ一致しており、coiled-coil 構造が空孔として転写された可能性がある。空孔の長軸長さが、予想される 4.0 nm よりも大きい理由としては、繰り返し配列を持つ P1 および P2 が部分的に会合して伸長し、ファイバー状の構造を形成した可能性が考えられる。P2 の添加をトリガーとして、P1 周囲に濃縮されているケイ酸が重縮合するため、ペプチド鑄型を覆うようにシリカが形成したと考えられる。P1 と P2 を同時添加した場合には、coiled-coil 構造の一部を足場としてシリカの核が形成したのちケイ酸が溶液から供給されて重縮合が進行するため、粒子状のシリカが形成されたと考えられる。

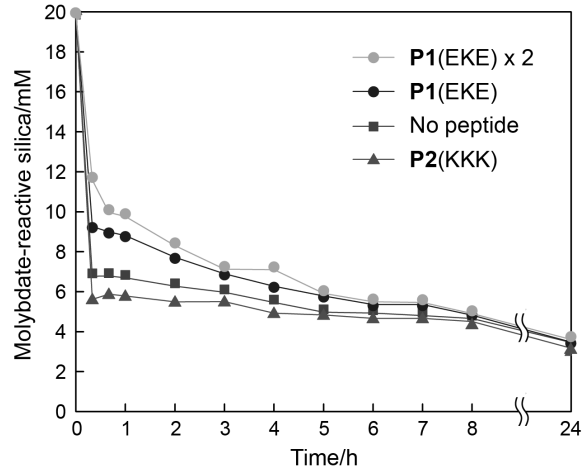


図 2 モリブデンブルー法による溶存ケイ酸濃度の測定。

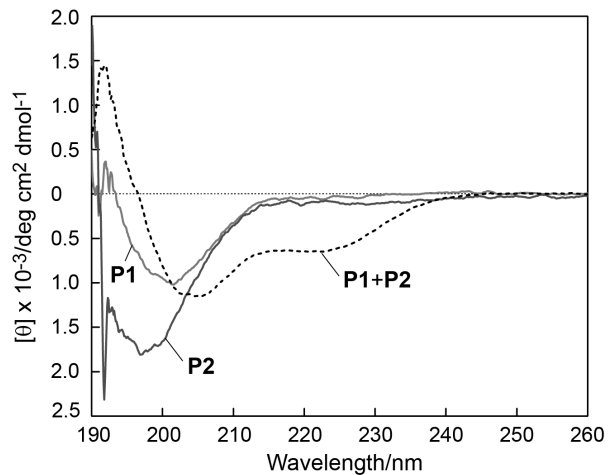


図 3 ケイ酸溶液中におけるペプチドの CD スペクトル。

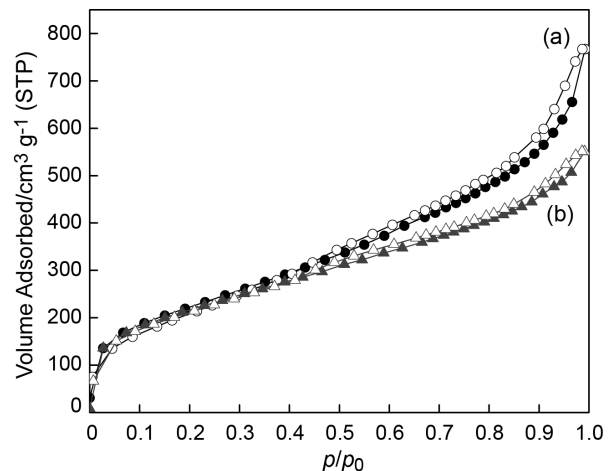


図 4 窒素吸脱着測定により得られた焼成後試料の吸着等温線。(a) P1 と P2 を段階添加、(b) 同時添加。黒のシンボルは吸着、白抜のシンボルは脱着曲線を示す。

最後に、焼成後粉末試料へのポリアミノ酸の吸着性を評価した。図6は、市販のシリカ粉末、P1とP2を同時添加して合成した多孔質シリカ、およびP1とP2を段階添加して合成した多孔質シリカに対して、初期濃度の何パーセントのpoly-L-lysine または poly-D-lysine が吸着したかを示したグラフである。市販のシリカ粉末と、P1とP2を同時添加して得た試料においては、D体がより多く吸着された。poly-L-lysine および poly-D-lysine は、それぞれ重量平均分子量が1000–4000 g/mol、1000–5000 g/molであったため、分子量の大きい分布D体をより多く吸着した可能性がある。段階添加した試料においてこの傾向は逆転した。段階添加した試料中の coiled-coil 構造由来の細孔が、右巻き α -helix を形成する poly-L-lysine を多く吸着できたと考えられる。

以上のように本研究では、ペプチドが形成する“silicon pool”を活用する生物模倣合成法が、シリカへの分子レベルの鋳型構造転写に有効であることを示した。高分子の吸着性試験を通じて、本材料への吸水性に関する新たな知見も得られており、今後のさらなる材料設計に関する知見を得ることができた。さらに、本研究を通じて得られたシリカ-高分子相互作用の知見を、シリカ粒子の配列化に応用し、様々なシリカナノ構造体の作製へと発展させることができた。

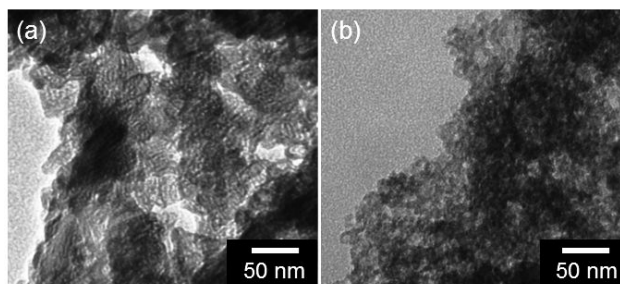


図5 焼成後試料のTEM像。(a) P1とP2を段階添加、(b) 同時添加。

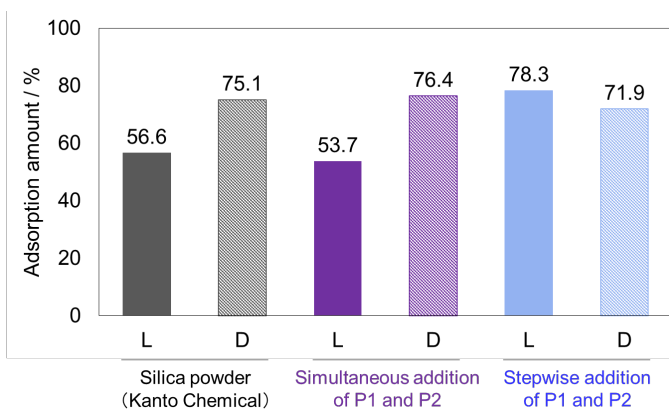


図6 各試料へのpoly-L-lysine および poly-D-lysine の吸着性。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Chisato Atsumi, Shintaro Araoka, Kira B. Landenberger, Arihiro Kanazawa, Jin Nakamura, Chikara Ohtsuki, Sadahito Aoshima, Ayae Sugawara-Narutaki,* Ring-Like Assembly of Silica Nanospheres in the Presence of Amphiphilic Block Copolymer: Effects of Particle Size, *Langmuir*, 査読有, 34巻, 2018, 7751–7758. (DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b00420)

鳴瀧彩絵, 無機ナノ粒子と両親媒性高分子が織り成す自己集合と多孔体形成, セラミックス (日本セラミックス協会誌), 査読無, 52巻, 1号, 2017, 15–19. (http://www.ceramic.or.jp/ihensyub/index_j.html)

〔学会発表〕(計9件)

鳴瀧彩絵, 無機ナノ粒子と両親媒性高分子が織り成すエキゾチックな自己集合, 第13回バイオミネラルイゼーションワークショップ, 2018年。(招待講演)

Takahiro Shimizu, Ayae Sugawara-Narutaki, Jin Nakamura, Chikara Ohtsuki, Kinetic Control of Silicic Acid Polycondensation and Synthesis of Porous Silica by Using Peptides, The 30th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (Bioceramics30), 2018年。

清水貴弘, 浅野拓也, 鳴瀧彩絵, 中村 仁, 大槻主税, 二種の機能性ペプチドの利用による多孔質シリカのバイオインスパイアード合成, 日本セラミックス協会 第31回秋季シンポジウム, 2018年。(セッション奨励賞受賞)

Ayae Sugawara-Narutaki, Formation of Nanoarchitectures through the Synergetic Self-Assembly of Inorganic Nanoparticles and Amphiphilic Polymers, MIRAI Materials Science Scientific Session, 2018年。(依頼講演)

鳴瀧彩絵, 渥美知里, 荒岡伸太郎, Kira B. Landenberger, 金澤有紘, 中村仁, 大槻主税, 青島貞人, 高分子存在下におけるシリカナノ粒子のリング状自己集合: 粒子径と自己集合構造の関係, 粉体粉末冶金協会 平成30年度春季大会, 2018年。

渥美知里, 荒岡伸太郎, 鳴瀧彩絵, 金澤有紘, 青島貞人, 大槻主税, 両親媒性高分子共存下におけるシリカナノ粒子のリング状自己集合, 粉体粉末冶金協会平成29年度春季大会, 2017

年.

鳴瀧彩絵, 生物にならう無機合成：前駆体の重要性, 光・量子デバイス研究会, 2017 年.

鳴瀧彩絵, 浅野拓也, 大槻主税, 二種のペプチドを用いたケイ酸の重縮合制御と多孔質シリカの合成, 公益社団法人日本セラミックス協会 2017 年年会, 2017 年.

浅野拓也, Duc H. T. Le, 鳴瀧彩絵, 大槻主税, 中野裕美, 機能性ペプチドを用いたバイオミメティックプロセスによる多孔性シリカの合成, 第 20 回生体関連セラミックス討論会, 2016 年.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://profs.provost.nagoya-u.ac.jp/view/html/100007263_ja.html

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。