

平成22年 5月27日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19310074

研究課題名 (和文) ペプチドナノチューブ：統合的設計と機能付与

研究課題名 (英文) The Peptide Nanotube: Design and Functionality

研究代表者

田村 厚夫 (TAMURA ATSUO)

神戸大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：90273797

研究成果の概要 (和文)：アミノ酸数7～30からなるペプチドを設計し、自己集合させることでナノメートルレベルの構造体を創製した。基本構造としては、ファイバー、チューブ、ケージ等を含む。これら構造体に、新たな機能として、金属結合能、構造転移能、抗菌力、および細胞接着能を付与することで、新規のナノマテリアルを創り出すことに成功した。この材料は、水溶媒系低副産物省エネルギーかつ高収率で作成でき、生分解性でもあるため、環境調和型の特質を保持した新規材料と言える。

研究成果の概要 (英文)：Various nano-structures, including nano-fiber, nano-tube, and nano-cage have been designed and synthesized from peptides consisting 7-30 amino acid residues. New functions such as metal-binding, structural transition, antimicrobial activity, and cell-adhesion activity have also been added to produce novel nanomaterials. Since these biodegradable materials can be formed at high yield without adding extra energy nor producing harmful byproducts, we can call them "environment-conscious".

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2008年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノ多機能材料

1. 研究開始当初の背景

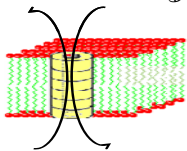
私共は、新しい概念でタンパク質の分子を新規にデザインすることに成功している。これは、タンパク質内の相互作用を物理化学的に正確に理解し、その原理を適用して実際に

「人工タンパク質構造を作ってしまう」ことができたということである。一方、ここ数年で、ペプチド (タンパク質) 分子を整然と集合させ、太さ10nm程度で長さ数百 μ m以上のナノファイバーおよびナノチューブを形

成させる技術を開発してきた。この際、ファイバーの形態や大きさを制御すること、さらには形成したナノファイバーに、酵素や金属などを付加することで新たな機能を生み出すことを可能としてきた。このように、1) タンパク質1分子内で生じる原子間の相互作用を分子設計可能なレベルにまで昇華して理解したこと、2) タンパク質分子を集合させてナノレベルの構造体を種々作成することができるようになったこと、の2点を達成した。一方、金属や合成高分子を用いたナノテクノロジーや新素材に関する記事を見ると、これらに掲載されているナノマテリアルと、我々がペプチドで創製したペプチドファイバーとの、サイズと形態に関する非常に高い類似性に気付く。この類似性を生かせば、自然素材であるペプチドで同様のナノマテリアルを創製することができるようになるだけでなく、ペプチドにしかない性質を生かせば、より機能性の高いものも容易に創り出せるのではないかと考えられる。また、ペプチドは自然素材であるため生分解性があり、合成時には、常温常圧で水溶媒で収率100%で反応が進行するため、有害な副産物が出ずにエネルギーも不要であるなど、環境にフレンドリーである面は大きな利点となる。

2. 研究の目的

タンパク質集合体の設計レベルに於いて達成できていないことは、上述した1)と2)を橋渡しして、分子レベルのデザインをナノレベルの構造へ持っていくための設計原理図を描くことである。本申請では、この設計図を完成させ、任意の構造体、具体的には、ナノファイバー、ナノチューブ、ナノケージの設計を行う。さらには実際に設計したものに酵素機能や導電性などの新たな機能を付与することで、有用かつ環境フレンドリーな機能性新規バイオナノマテリアルを創出することを目指すものである。特に、選択的物質結合能を持ち、生体膜内に埋め込まれたチューブは、図のように物質輸送を行うことが可能となり、センサー等への応用が期待されるとともに、自然の生物中の膜内外での輸送やシグナル伝達などの高度な生理機能の解明につながるモデル物質となる可能性がある。



3. 研究の方法

物質としては、まずは構成の単純なナノファイバーについて、続いてナノチューブ化したものに進展させる。双方について、進め方としては以下のステップを踏む。

ステップ1：サイズのバラエティー増加と制

御

ステップ2：形態のバラエティー増加と制御

ステップ3：規格化、機能化

チューブ化に際しては「環状化」ペプチドを用いる。この際、L型とD型のアミノ酸を交互にかつ環状に結合させると、丁度平面型のリングとなり、それをβシート型の水素結合によって積層させることができる。さらに長く伸びる新しい配列を設計し、リング中央の穴の大きさをアミノ酸配列と長さで制御することで、互いの特徴を生かした強固なファイバーが形成されると考える。これは、機能化するための担体として大きな利点となる。配列は私共が新規に開発した内部に特定の金属イオンのみ特異的に配位させることができる12アミノ酸のものを用いる。

機能としては、化学的側面として選択的な金属結合能から、生物的側面として微生物への作用（抗菌力、細胞凝集能など）までを含めて付与を試みる。

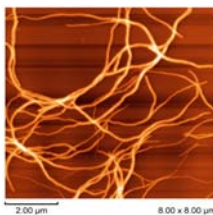
物質の作成は、まずペプチド合成機を用いて化学的に合成し、これを質量分析によって確認しながらクロマトグラフィーを用いて精製する。観測には、各種分光学的手法（核磁気共鳴、赤外、円二色性等）によって分子レベルでの構造を探り、マクロな形態は原子間力顕微鏡、膜との相互作用解析は表面圧などの物理的手法を用いる。機能は、タンパク質や菌体を用いた生化学的手法で行い、検出には分光器や光学顕微鏡等を用いる。

4. 研究成果

ペプチドを環状化したものを、アミロイド繊維のようにβシート様水素結合で積層化することで、中空のナノチューブを形成させた。この際、内側に一部のアミノ酸残基を配することで、特定の金属イオンのみ特異的に結合するペプチドナノチューブとすることに成功している。この構造について、固体状態でのATR法による赤外分光測定を行い、予想通り逆βシート型の水素結合を形成していることが確認できた。また、温度による安定性を調べたところ、90℃でもナノチューブ構造を保持しており、安定な材料として利用可能であることが明らかになった。

チューブに結合する金属イオンとして種々を試したところ、亜鉛、ニッケル、コバルトなどには全く結合せず、銅イオンのみを選択的に結合するものを見出した。結合部位は、核磁気共鳴法で特定した結果、予想通りチューブ内部のヒスチジンおよびアスパラギン酸に配位していることが明らかになった。チュ

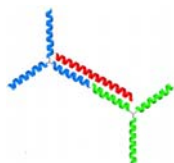
ープ形態を原子間力顕微鏡で観測した所、直径 10nm 強の均一な繊維形態が観測された(次図)。



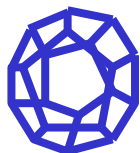
銅イオンを結合させたペプチドナノチューブの例 (AFM 画像)

続いて、この水溶性ペプチドナノチューブを生体膜と相互作用させるために、外側に疎水性アミノ酸を導入したものを新たに設計した。この際、膜との相互作用が強いと想定される芳香族アミノ酸および正電荷を持ったアミノ酸を特定の位置に導入した。また、上と同様に内部に金属イオンが配位できるアミノ酸を配置した。この結果、溶媒条件を選ぶとナノチューブ構造を形成することを、原子間力顕微鏡などの手法で明らかにした。このチューブの多くは、直径 3nm 程度であることが観測され、チューブ間ではバンドルにならず、単一のチューブが形成していることが示唆された。生体疑似膜を作成し、この疎水性ペプチドナノチューブを滴下した所、表面圧の変化や原子間力顕微鏡の観測により、想定通り膜に埋め込まれていることが明らかになった。

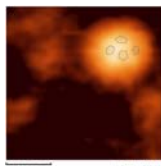
次に、ペプチドを用いたシンプルな構成単位から複雑な規則構造体を作製することを考え、 α ヘリックスペプチドと C_3 対称性のリンカーから構成される三叉状複合体をテンプレートペプチドとのコイルドコイル形成によって自己集合させ、新規機能を備えたかご状の規則的集合体ペプチドナノケージを創製することとした(下図)。



α ヘリックス構造を組み合わせたjunction基本構造。青と緑が三叉状、赤が直線状



基本構造を自己集合させたペプチドナノケージのモデル図：一辺約7nm, 直径は約20nm

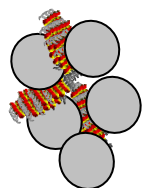


実際の原子間力顕微鏡観測：一番大きな集合体内に五角形の周期構造が見て取れる。

ここで、テンプレートペプチド(赤)は三叉状複合体同士を橋渡しする役割を果たしており、テンプレートペプチドと三叉状複合体による α ヘリックスの会合体(コイルドコイル)が形成されることで自己集合が進行し、かご状のクローズド構造体が形成されると考えたものである。このように設計し作製したペプチドナノケージについて、集合体構造の評価を行うとともにその構造を活かした機能、すなわち内部に物質を取り込む「キャリアー機能」の評価を行ったところ、酸素運搬タンパク質であるミオグロビンを取り込む能力を見出した。

以上のように、すでに機能として金属およびタンパク質と相互作用させることができたが、ここで大きく目指す方向としての機能をまとめてみる。これには、自然界のタンパク質に存在する機能および自然界では成し得ない新規の機能の2種類が考えられる。具体的には：1) 金属イオン結合性、2) 核酸などの低分子生体物質との相互作用、3) 抗菌、抗ウイルス物質などとして細胞内外の物質輸送がある。一部上述したように、1) については、ペプチドナノファイバーの設計および製法についての特許およびこれに金属を配位する技術の特許を成立させ、さらに自然界に存在し得ない機能として、ペプチドナノファイバーを導電性にする技術を確立した(日、米で特許取得)。これら基本技術に加え、環状ペプチドで形成させたペプチドナノチューブについて、特定の金属イオンの取り込みを円二色性や核磁気共鳴などの分光測定および原子間力顕微鏡等による観察によって確認した。この結果、特に、パラジウムイオンと相互作用するケースを初めて発見した。2) については、GTP結合によるタンパク質の構造転移の研究を進め、機能化への足がかりとした。これは、膜の内外でのシグナル伝達等、生体の高度な機能のモデルとなることが期待される。3) は生体膜とタンパク質が相互作用をすることで起こる現象であり、まず膜との相互作用で抗菌活性を発揮するペプチドを設計し、さらに細胞膜同士を接着させる新機能ペプチドの設計にも成功した。前者の例として、膜との相互作用に必要な因子として、静電相互作用と疎水相互作用のバランスを明らかにし、両親媒性ではないペプチドを用いた場合でも膜と相互作用させ、膜内部の流動性を低下させることで抗菌力を発揮させることができた。後者については、まずペプチド自身が一定数集合し、その集合体が生体膜同士を

つなぐ「糊」の役割を果たす接着分子となるよう電荷と疎水性を制御することで設計に成功した。このことは、ペプチド集合体が新規機能分子として働く可能性を示したものである(次図)。



接着機能を持ったペプチド集合体(赤黄色)が細胞(灰色)を接合させる際のモデル図。



実際にペプチド添加によって凝集した菌体の光学顕微鏡像：直径約10 μm

以上のように、ナノファイバー、ナノチューブ、ナノケージ等各種ペプチドナノ集合体の創製を行い、これに新規機能、具体的には選択的結合能、構造転移能、タンパク質分子取り込み能、抗菌力、細胞接着能を付与させることに成功することとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

- ① Fumi Shima, Yuichi Ijiri, Shin Muraoka, Jingling Liao, Min Ye, Mitsugu Araki, Kosuke Matsumoto, Naoki Yamamoto, Takeshi Sugimoto, Yoko Yoshikawa, Takashi Kumasaka, Masaki Yamamoto, Atsuo Tamura and Tohru Kataoka (2010) Structural basis for conformational dynamics of GTP-bound Ras protein, *J. Biol. Chem.*, in press
- ② Naoki Yamamoto & Atsuo Tamura (2010) Designed low amphipathic peptides with α -helical propensity exhibiting antimicrobial activity via a lipid domain formation mechanism, *PEPTIDES*, **31**, 794-805.
- ③ Mitsugu Araki & Atsuo Tamura (2009) Solubility-dependent structural formation of a 25-residue natively unfolded protein induced by addition of a 7-residue peptide fragment. *FEBS J.* **276**, 2336-2347 (2009)
- ④ Ohki Kambara, Atsuo Tamura, Akira Naito, & Keisuke Tominaga (2008) Structural changes of poly-L-Lysine in solution and lyophilized form. *Phys. Chem. Chem.*

Phys., **10**, 5017-5164

- ⑤ Tomohiro Imamura, Naoki Yamamoto, Atsuo Tamura, Shinji Murabayashi, Shigeki Hashimoto, Hiroaki Shimada & Seiichi Taguchi (2008) NMR based structure-activity relationship analysis of an antimicrobial peptide, thanatin, engineered by site-specific chemical modification: activity improvement and spectrum alteration. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **369**, 609-615.
- ⑥ Mitsugu Araki, & Atsuo Tamura (2007) Transformation of an α -helix peptide into a α -hairpin induced by addition of a fragment results in creation of a coexisting state. *Proteins: Struct., Funct., Bioinformatics.*, **66**, 860-868
他4件

[学会発表] (計15件)

- ①招待講演：分子間相互作用によりナノ構造体を形成するペプチドの設計、田村厚夫、第82回日本生化学会大会(神戸)、2009年10月21~24日
他14件

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計4件)

- ①
名称：CONDUCTIVE PEPTIDE NANOFIBER AND METHOD OF MANUFACTURE THE SAME
発明者：Kentaro Onizuka, Shuhei Tanaka, Hirokazu Sugihara, Atsuo Tamura
権利者：パナソニック株式会社、国立大学法人神戸大学
種類：特許
番号：Patent No. 7449445
取得年月日：2008/11/11
国内外の別：国外(米国)
- ②
名称：ナノファイバー形成能を有するペプチド、及びペプチドナノファイバー
発明者：鬼塚健太郎、田中修平、田村厚夫、杉原宏和
権利者：パナソニック株式会社、国立大学法人神戸大学
種類：特許
番号：第4448947号
取得年月日：2010年2月5日
国内外の別：国内
- ③
名称：導電性ペプチドナノファイバー及びそ

の製造方法

発明者：鬼塚健太郎、田中修平、杉原宏和、田村厚夫

権利者：パナソニック株式会社、国立大学法人神戸大学

種類：特許

番号：第4448949号

取得年月日：2010年2月5日

国内外の別：国内

④

名称：ペプチドで構成されるナノファイバーとその製法

発明者：田村厚夫

権利者：財団法人新産業創造研究機構

種類：特許

番号：第4457198号

取得年月日：2010年2月19日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 厚夫 (TAMURA ATSUO)

神戸大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：90273797