

令和 4 年 9 月 9 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21121

研究課題名（和文）イオン・ドーピングによるペプチド結晶エレクトロニクスへの創出

研究課題名（英文）Electronic Properties of Peptide Crystals with Ion Doping

研究代表者

早水 裕平（Hayamizu, Yuhei）

東京工業大学・物質理工学院・准教授

研究者番号：80443216

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ペプチドのアミノ酸数は4つに固定し、テトラペプチドのアミノ酸配列による結晶化機構の違いを検討した。結晶化プレートを用いた蒸気拡散法によるペプチド結晶化を行った。水やアルコールを溶媒として得られた結晶の単結晶構造解析を行い、各ペプチドの結晶構造を得た。その結果、どのペプチドもアミド骨格が織りなす水素結合ネットワークを主としたベータシート状の構造を取ることが分かった。X線構造解析やラマン分光から配列に使用するアミノ酸の特性（疎水性、電荷性、芳香属性）などにより結晶の構造および金属イオンやハロゲン化物イオンとの相互作用の違いが見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでアミノ酸などの低分子化合物によって検討されていた分子性結晶内の分子間相互作用が、本研究での発見によりペプチド結晶でも分子間相互作用の検討が可能であることがわかった。近年のジペプチドを用いた機能性結晶開発の進展に対して、本研究ではアミノ酸4つからなるテトラペプチドを用いて結晶化および物性評価をおこなったことにより、アミノ酸配列によって結晶成長のメカニズムに大きな違いが出るだけでなく、その結晶構造とそれに起因した光学特性や電子物性に大きな違いが見出されることが明らかとなった。機能性ペプチド結晶の創生に向けて基礎となる知見が得られたと考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, the number of peptides was fixed at four amino acids, and the difference in crystallization mechanism depending on the amino acid sequence of tetrapeptides was examined. Peptide crystallization was performed by vapor diffusion method using a crystallization plate. The crystal structures of each peptide were obtained by single crystal structure analysis of the crystals obtained using water and alcohol as solvents. X-ray structural analysis and Raman spectroscopy revealed differences in crystal structures and interactions with metal ions and halide ions, depending on the amino acid used in the sequence (hydrophobicity, chargeability, aromaticity, etc.). The structure of the crystals and their interactions with metal and halide ions varied depending on the characteristics of the amino acids used in the sequence (hydrophobic, charged, aromatic).

研究分野：ペプチド工学

キーワード：生体材料 ペプチド 自己組織化

1. 研究開始当初の背景

ペプチドの自己組織化構造は、生物学的な視点から長く研究されてきた。近年では、物質科学的な視点からペプチド研究に新たな動きがあり、2017年にGazidらによって「Self-assembling peptide semiconductors」がScience誌に発表された。ここでは、アミノ酸2つからなるジペプチド結晶の電子材料としての電子伝導、プロトン伝導、発光、圧電特性などが紹介された。これらの物性は、ペプチドを構成するアミノ酸の配列と、その結晶構造に起因する。2019年には、Yanらによって、さまざまなペプチド結晶の成長機構について総説が発表され(*Nat Rev Chem* 3, 567–588 2019)、ペプチドのバイオエレクトロニクス応用に関する研究が広がりを見せている。一方、申請者はこれまでグラフェンなどのナノ材料表面で自己組織化するペプチド単分子膜の研究を行ってきた(Y. Hayamizu, et al., *Sci. Rep.* 6, 33778, 2016; P.Li, Y. Hayamizu(5/5) et al., *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2019)。これらのペプチドは、グラフェンの炭素原子構造をテンプレートとして、秩序構造へと自己組織化し、グラフェン界面の電子状態を変調することを明らかにした。一方で、ペプチドの分子立体構造が不明であるため、構造と電子物性の相関は理解困難であった。そこで、X線構造解析が可能なペプチドの単結晶を作製して機能を探索した。予備実験として、グラフェンとの相互作用が強い芳香族のフェニアラニンと荷電性のアミノ酸を含有する4アミノ残基(FEFE)ペプチドを設計し、結晶化を試みたところ、長さがmmスケール、太さが数十マイクロンの針状の結晶を得ることに成功した。そのX線回折像から、フェニアラニンが重なり合う分子構造であることを発見した(茂田井、早水ら、2019 秋季応用物理学会)。さらに、単体では絶縁体であったペプチド結晶の電気伝導率が、結晶をヨウ素ガス雰囲気中に保管したところ100倍以上増加することを見出した。このヨウ素ドーピングは、ペプチド結晶の分野では全く新しい発見である。しかしながら、ヨウ素原子がペプチド結晶にどのように取り込まれ、電子物性に影響を与えたのかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究は、生体分子であるペプチドの新規設計と結晶化技術を組み合わせ、イオン・ドーピングによりペプチド結晶の電子物性制御技術を創製することを目的とする。ペプチドは化学合成が可能であり、高い自由度で様々なアミノ酸配列のペプチドを作製できる。その結晶構造の研究は近年発展が著しく、その電子材料としての利用も期待が持たれている。ペプチド結晶のエレクトロニクス応用に向け、以下のように電子物性を制御するための全く新しい技術を創出する。

- (1) 結晶構造へと成長するペプチドのアミノ酸配列を設計し、成長機構を理解する。成長中にイオンを結晶に挿入する技術、そして、すでに成長した結晶へイオンを挿入する技術を開発する。
- (2) 成長したペプチド結晶の電子物性を評価する。特に、電子伝導度や光学特性について明らかにし、構造と物性の相関を理解する。
- (3) ペプチド結晶の電子特性の環境応答性を評価し、バイオエレクトロニクスにおけるアクティブ素子としての特性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ペプチド結晶の成長機構の解明とイオン・ドーピングの技術開発

アミノ酸配列数が4~12残基のペプチドを設計および合成し、その結晶成長機構を検証する。結晶成長では、水素結合、ファンデルワールス力、疎水相互作用、クーロン相互作用などが駆動力として働く。これらの相互作用を制御するため各種天然アミノ酸を有するペプチドを設計する。結晶成長は主に水溶液中で行うが、有機溶媒も適宜用いることにより、水に不溶性の結晶を作製する。単結晶X線回折を用いて構造解析する。必要があれば、高輝度光源を使用した共同利用設備を使用する。

(2) ペプチド結晶の物性評価

イオンドープを施されたペプチド結晶の吸湿性、構造安定性、電気伝導性、光学特性(蛍光・吸収および散乱)などの基礎物性を評価する。伝導特性評価では、シリコン基板などに微細加工を施し、電極を作製することにより、 μm スケールのペプチド単結晶の電子伝導評価を行う。X線構造解析から得られる結晶構造に対して、第一原理計算を用いて電子軌道の波動関数を得る。

(3) ペプチド結晶を用いた新規機能発現

ペプチドの結晶構造およびその電子状態が温度、印加電圧、光励起などの外部刺激によってどのように変化するかをリアルタイムで観測する。測定には(2)で構築した電気伝導測定および光学測定を用いる。イオンを内包したペプチド結晶は準安定状態をとることが期待される。温度変化では相転移が期待できる。温度制御下で顕微蛍光ラマン分光によるその場観察を行い、時空間的に結晶状態の変化を捉える。

2. 研究成果

(1) ペプチド結晶の成長機構の解明とイオンドーピングの技術開発

本研究では、芳香属アミノ酸および電荷を有するアミノ酸からなる複数のペプチドを設計した。また、ペプチドのアミノ酸数は4つに固定し、これらのテトラペプチドのアミノ酸配列による結晶化機構の違いを検討した。結晶化プレートを用いた蒸気拡散法によるペプチド結晶化を行なった。得られた結晶の単結晶構造解析を行い、各ペプチドの結晶構造を得た。その結果、どのペプチドもアミド骨格が織りなす水素結合ネットワークを主としたベータシート状の構造を取ることが分かった。配列の順番を変えることで疎水性の側鎖と親水性の側鎖の空間的な配置が異なることが分かった。フェニルアラニン(F)とグルタミン酸(E)からなる FEFE、FEFF、FFEE の3種類のテトラペプチドは一次元に規則的な格子状に広がった結晶構造と二次元的な層状構造をとった結晶を取る事が確認された。側鎖の芳香環同士が疎水性相互作用により向き合い、グルタミン酸のカルボキシ基は水素結合ネットワークの構築に寄与していることが分かった。また、シート上の構造が結晶の長軸方向に向いていることが分かった。これらの違いは自己組織化過程の違いを反映していると考えられる。

これらの結晶にヨウ素ガスをを用いてヨウ素のドーピングを行なったところ、1次元的な結晶構造を有するテトラペプチドについてヨウ素導入後に当初透明であった結晶が褐色に変色することが観測された。さらに、この褐色の結晶は偏光顕微鏡を用いて観測すると偏光子の方位に応じて色が変化することがわかった。これにより、ヨウ素がドーピングされたペプチド結晶が構成されていることが示唆された。

さらにプロリンやヒスチジンを含むテトラペプチドの結晶化についても検討をおこなった。ヒスチジンやプロリンは上記のフェニルアラニンなどの疎水性アミノ酸に対して水への溶解性が非常に高く、水溶液中では結晶化しにくい。この問題を解決するためにエタノールを用いた結晶化をおこなった。エタノールと水の混合比を調整した溶液を使用したところ、プロリンもしくはヒスチジンを使用したテトラペプチドにおいても結晶化に成功した。特にヒスチジンをを用いたペプチドでは銅イオンを有するエタノール-水混合溶液中で結晶成長をおこなった際に、緑色および青色の結晶が形成された。これらの色から銅イオンが内包されたペプチド結晶が形成されたものと考えられる。一方で、X線構造解析による結晶構造解析は未だに信頼性の高いデータが取得されておらず、結晶品質の高いサンプルの成長方法に検討の余地が残る。

(2) ペプチド結晶の物性評価

得られた結晶は、まず偏光依存顕微ラマン分光測定を用いて結晶中の分子間相互作用の解析と結晶の光学特性の評価をおこなった。それぞれの結晶は各ラマン振動モードにおいて強い結晶方位依存性を示した。フェニルアラニンを有するペプチド結晶ではそれぞれ 1200 cm^{-1} のピークは芳香環の振動に由来するピークであり、Fの 1320 cm^{-1} 、 3055 cm^{-1} のピークはそれぞれ CH_2 伸縮及び芳香環の CH 伸縮に由来する振動モードに強い偏光依存性が観測された。さらに 1660 cm^{-1} 近傍のアミド結合の $\text{C}=\text{O}$ の伸縮に由来する振動モードも強い偏光依存性を示し、さらにその振動数からペプチドが結晶内で水素結合ネットワークを形成していることがわかった。

さらに、ペプチド結晶のラマン分光における温度依存性を測定したところ、上記のアミド結合に由来した振動モードの振動数が温度上昇に伴って増加することがわかった。温度変化に対応した単結晶 X線構造解析も行なったところ、温度上昇とともに結晶中の水素結合距離が増加していることがわかった。これに伴い、ペプチド間の水素結合距離と水素結合を有するアミド結合のラマン振動数の相関を調査したところ、線形の正の相関を有することがわかった。これらの物性は、先行文献においてアミノ酸などの低分子結晶において検討がされているものの、ペプチド結晶での報告例はなかった。先行文献の低分子における水素結合距離とラマン振動数の変化量にくらべて、本研究のペプチドは水素結合距離の変化に対して振動エネルギーが大きく変化しないことがわかった。単結晶 X線構造解析からわかった結晶構造および量子化学計算の結果から、ペプチド結晶内のアミド結合に関係した水素結合は分子同士が一对一で水素結合を形成しているのではなく、一つのアミド結合部位に対してとなりのペプチドのアミド結合部位ともうひとつのペプチドのグルタミン酸の側鎖が同時に水素結合を形成した分岐型水素結合を結晶全体に形成していることがわかった。

(3) ペプチド結晶を用いた新規機能発現

新規機能を探索すべくラマン信号と結晶の温度変化の相関を各種ペプチドで評価した。同種のペプチドから形成された結晶と、正の電荷と負の電荷を有する2種のペプチドを用いた共結晶で温度に対するラマン信号の変化を測定したところ、共結晶の方がより温度に対してラマン信号の変化が少ないことが示唆された。単一種のペプチドではなく複数のペプチドを用いた結晶成長によってより安定な構造を有した機能結晶の創生へと道が開けた。また、ヨウ素ドーピングしたペプチド結晶の電気伝導特性はノンドーピングの結晶に比べて飛躍的に高い電気伝導度を示すことが複数のペプチドで観測された。一方で、ヨウ素ドーピングした結晶は経時的にそのラマン信号が変化することがわかった。これらの結果から、ヨウ素がペプチド内に安定に存在しているかが問題として残る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Motai Kazunori, Narimatsu Takuma, Chen Chen, Hayamizu Yuhei	4. 巻 8
2. 論文標題 Oriented crystal growth of phenylalanine and a dipeptide by solution shearing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry C	6. 最初と最後の頁 8585 ~ 8591
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D0TC01208D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 茂田井和紀、大津 博義、河野 正規、早水 裕平
2. 発表標題 X線構造解析および偏光ラマン分光法によるテトラペプチド結晶構造の温度依存性評価
3. 学会等名 応用物理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 茂田井和紀、早水裕平
2. 発表標題 ソリューションシェアリング法による生体分子結晶の配向制御
3. 学会等名 応用物理学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------