

令和 6 年 9 月 27 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05182

研究課題名（和文）天然タンパク質の集合制御に基づく高熱伝導化と熱伝導製材料への展開

研究課題名（英文）Control of natural protein-assembly toward thermally conductive materials

研究代表者

澤田 敏樹（Sawada, Toshiki）

東京工業大学・物質理工学院・准教授

研究者番号：20581078

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質集合体の熱伝導性を明らかにすることにより、生体高分子の熱伝導性材料としての有用性を見出すことを目指し、シルクフィブロインやタンパク質結晶の熱伝導性を評価した。シルクフィブロインフィルムを溶媒に浸漬させて紫外光照射した結果、熱拡散率が大きく上昇し、シート構造近傍におけるチロシン残基の架橋が高熱伝導化に重要であることを見出した。他方、タンパク質結晶では結晶形や測定方向によって熱拡散率がそれぞれ変化することがわかり、分子間の相互作用が熱輸送に寄与しているものと推察される。いずれの熱拡散率も一般的な合成高分子より高く、タンパク質集合体が高熱伝導性材料として高い潜在性をもつことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年のデバイスの小型化に伴い、放熱は益々解決すべき問題となっている。本研究では、バイオ素材であるタンパク質が集合化したフィルムや結晶の熱伝導性を明らかにするとともに、タンパク質の構造制御に基づく高熱伝導化を検討した。タンパク質集合体が一般に高い熱伝導性を示すことを見出し、また構造制御による高熱伝導化が可能となることを見出し、タンパク質からなる集合体熱伝導性材料としての有用性を見出した。

研究成果の概要（英文）：To clarify the potential of biopolymers as thermally conductive materials, the thermal diffusivity of films or crystals composed of proteins with various structures was measured. The thermal diffusivity of silk fibroin immersed in a solvent and irradiated with ultraviolet light increased significantly, indicating that the cross-linking of tyrosine residues adjacent to the -sheet structures is essential for the high thermal diffusivity of protein-based assemblies. On the other hand, the thermal diffusivities of protein crystals vary depending on the crystal forms and measurement directions, suggesting that molecular interactions between protein molecules contribute to the heat transport pathway. Both thermal diffusivities of assemblies were higher than those of conventional synthetic polymers, indicating the high potential of proteins as thermally conductive materials.

研究分野：生体高分子科学

キーワード：タンパク質 熱拡散率 熱伝導性 自己集合化 結晶

1. 研究開始当初の背景

エネルギーを消費して仕事を行う全ての機器やデバイスにとって熱の発生は必然であり、放熱は、重要な技術課題である。近年では、電子機器の高集積化に伴う発熱密度の上昇を背景として熱輸送材料の研究が活発化しており、中でも電子機器からヒートシンクへの効率的な熱輸送を実現する熱界面材料に注目が集まっている。熱界面材料は電子機器とヒートシンクの密着性を向上させて放熱を効率化する必要があるため、柔らかい有機系高分子材料は有用な素材の一つである。しかしながら、有機系高分子材料の熱伝導率は、金属やセラミックスと比較すると2~3桁低いことが問題となっている。高分子のような絶縁材料は自由電子をもたないため、フォノンの平均自由行程が熱伝導性を決定する因子となっている。高分子の場合には、分子鎖方向と分子鎖間方向には平均フォノン速度に異方性が存在するため、分子鎖を一軸配向させることで配向方向への熱伝導性が大幅に向上することが明らかとなっており、配向した高分子鎖の共有結合を利用した異方的な高熱伝導化が広く検討されてきた。実際に、合成高分子のみならず、一部の生体高分子も延伸することによって、延伸方向への熱伝導性が大幅に向上することが見出されている。

最近では、大腸菌に感染するウイルスの一種であるバクテリオファージ (ファージ) の規則的な集合体が、非共有結合を介した集合体でありながら高い熱伝導性を示すといった知見が得られており、生体高分子が示す規則的な集合化が、高熱伝導性高分子材料の創製に有用であることが見出されつつある。しかしながら、生体高分子が一般に熱伝導性材料として有用かどうかといった知見は得られておらず、この生体高分子が形成する規則的な集合体の非共有結合を介して高熱伝導性が発現する現象を利用できれば、生体高分子集合体の熱界面材料としての利用という新たな利用価値の創出や、新たな熱伝導性材料の創製に繋がるものと期待される。

2. 研究の目的

上述した繊維状ウイルスは核酸の周りをタンパク質が規則的に取り囲んだ集合体であり、そのサイズは直径5 nm、長さ1 μm、分子量1400万と極めて巨大で細長い形状をしており、多種タンパク質が核酸を取り囲んだ内部空間をもつ構造であるため、ファージ自身に多数のヘテロ界面が存在するため、一般的な知見を得るには難しいといった側面ももつ。そこで本研究では、単一タンパク質のみからなる集合体を構築し、その熱伝導性を明らかにすると共に、様々な構造制御に基づいて、生体高分子から全く新しい高熱伝導性材料の創製が可能であるかを目的とした。タンパク質素材には、シルクなどの構造タンパク質が形成する機械的特性を制御可能なナノ繊維に加え、極めて精緻に集合化するタンパク質結晶を用い、それらの熱伝導性の計測と構造制御に基づく高熱伝導化を検討した。

3. 研究の方法

(1) シルクフィブロイン

蚕の繭から糸取りした後、シルク繊維を剥離して脱ガムし臭化リチウム溶液に溶解させ、水に透析する操作を繰り返すことでシルクフィブロインを抽出した。フィブロインを1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP) に溶解させ、キャストしてシルクフィルムを調製した。フィルムを水/メタノール混合溶液に1時間浸漬させ、10%、20%、30%延伸した。また、浸漬後のフィルムに所定時間紫外光を照射した。それらの構造を偏光顕微鏡 (POM)、走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察し、また赤外分光 (IR) 法により二次構造を評価した。それらのフィルムの熱拡散率を温度波熱分析法により評価した (図1)。

(2) タンパク質結晶

また、リゾチームを適切な濃度で緩衝液に溶解させ、ハンギングドロップ法により正方晶あるいは単斜晶の単結晶を調製した。また、フェリチンならびにアポフェリチンを緩衝液に溶解させ、同様に単結晶を調製した。必要に応じてグルタルアルデヒドにより架橋した。偏光顕微鏡ならびに蛍光顕微鏡により構造を評価し、より小さなスケールの熱拡散率を測定可能なマイクロ温度波分析法により各種タンパク質結晶の熱拡散率を測定した。

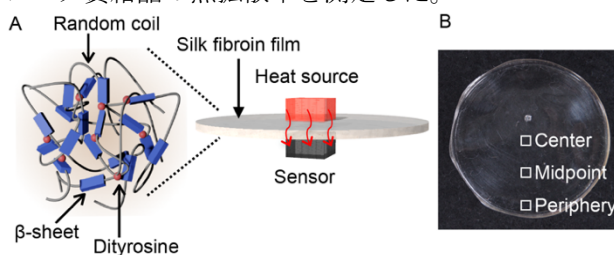


図1 (A) シルクフィブロイン集合体の模式図と熱拡散率測定の模式図
(B) シルクフィブロインフィルムの外観

4. 研究成果

コロイド溶液を蒸発させてフィルムを調製する際、溶質の析出過程が膜の位置によって異なることが報告されており、その結果熱伝導性が異なることが報告されている。フィルムの外側がより規則的な集合構造を形成することが知られており、本研究でも外側の熱拡散率が高い傾向が見られたため、外側に着目した（外側の熱拡散率： $7.6 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ）。POMによりフィルム内のシルクフィブロインの集合構造を評価した結果（図 2A）、ほとんど複屈折は見られず、無配向な集合構造であることがわかった。IR スペクトル測定の結果、ランダムコイル構造に帰属される 1640 cm^{-1} 付近にシャープなバンドが見られ（図 3A）、特徴的な二次構造は形成されていないことがわかった。

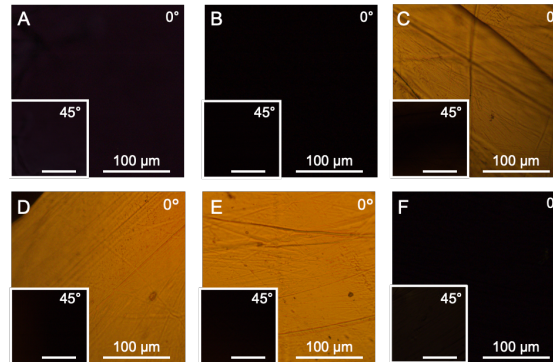
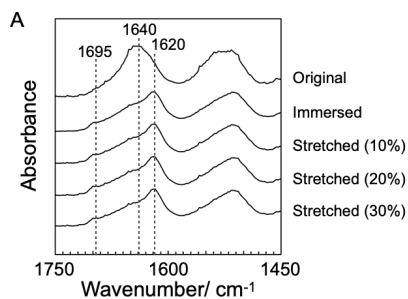


図 2 さまざまな構造をもつシルクフィブロインの POM 像

(A) 調製後 (B) 浸漬後 (C) 延伸後(10%)
(D) 延伸後(20%) (E) 延伸後(30%) (F) 紫外光照射後

シルクフィブロインの構造と熱拡散率を評価するため、集合化させたシルクフィブロインをメタノールと水の混合溶液に浸漬させ、二次構造を制御した。浸漬したフィルムをさらに延伸し、異なる延伸比（10%、20%、30%）で配向構造を形成させた。また別のアプローチとして、元のシルクフィブロインフィルムと浸漬したシルクフィブロインフィルムに紫外光を照射し、シルクフィブロインの β シート領域近傍に位置するチロシン残基を架橋させた。それぞれのフィルムの POM 観察の結果（図 2B-F）、浸漬したフィルムはオリジナルのフィルムと同様に複屈折性を示さず、すなわち浸漬プロセスがシルクフィブロイン配向構造にほとんど影響を及ぼさなかったことを示している。対照的に浸漬し、その後延伸したフィルムでは均一な複屈折が観察され、フィルムを 45 度回転させると暗くなったことから、この構造は一軸配向した集合構造をもつことが示唆された。複屈折性は、POM 画像で観察されるように延伸比が増加するにつれて増加し、シルクフィブロインフィルムの配向構造に対する延伸の効果を実証した。また、延伸フィルムの IR スペクトルは、アミド I 領域に平行 β シート構造（約 1620 cm^{-1} ）と反平行 β シート構造（約 1695 cm^{-1} ）に帰属される 2 つのバンドを示し（図 3A）、元のフィルム中のシルクフィブロインが浸漬過程でランダムコイルから β シートへの構造転移を起こしていることが示された。アミド I 領域のバンドには伸長比に伴うわずかな変化が観察されたことから、シルクフィブロインの分子鎖は伸長方向に配向しているが、浸漬処理によって形成された β シート構造は維持されていることが示唆された。さらに、浸漬後に UV 照射したフィルムの POM 像からは複屈折が観察されず（図 2F）、オリジナルのフィルムと同様に無配向状態であることが示された。POM 観察から、延伸プロセスでは配向したシルクフィブロイン構造が形成されたが、UV 照射では形成されなかったことが示された。照射膜の IR スペクトルは浸漬膜の IR スペクトルと類似しており（図 3B）、UV 照射がシルクフィブロイン膜の二次構造に影響を及ぼさないことを示唆している。



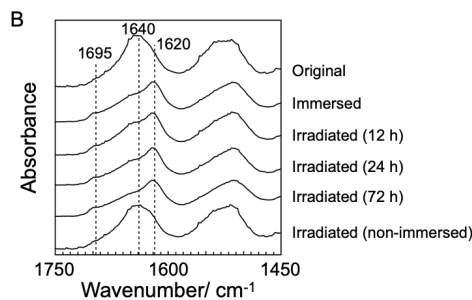


図3 シルクフィブロインのIRスペクトル
(A) 浸漬・延伸後 (B) 浸漬・UV照射後

紫外光照射後のフィルムの吸光度測定の結果、照射後には310 nmの吸光度が経時的に増大し、チロシンの架橋ならびに/あるいは芳香族アミノ酸の酸化が促進されていることがわかった。この際、ベースラインはほとんど変化しなかったから、紫外光照射はフィルムの透明性に影響を与えることはなく、酸化やそれによる分解に対しては大きな効果は見られないものと考えられる。また、フィルムをHFIPに再溶解させて蛍光スペクトルを測定した結果、架橋したジチロシンに由来するピークが観察され、紫外光の照射中にチロシン残基間で架橋構造が形成されているものと推察される。

浸漬、延伸、照射したシルクフィブロインフィルムの垂直方向の熱拡散率を評価した(図4)。浸漬したフィルムの熱拡散率 ($14 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) は、オリジナルフィルムの熱拡散率よりも高かった。これは、 β シート形成に基づいてシルクフィブロイン鎖が結晶化したためと考えられる。 β シート構造は、他の二次構造と比較して優れたフォノン伝導を示すと報告されており、シルクフィブロイン鎖間のフォノンの効果的に伝導に寄与しているものと推察される。さらに、延伸フィルムの熱拡散率は、延伸率の増加とともに減少した。これは、シルクフィブロイン鎖が平面に沿って配向することで、垂直方向の熱拡散率が減少していることを示唆している。したがって、フィルムの垂直方向(すなわち、シルクフィブロイン鎖間)の熱拡散率は、延伸とともに低下することが示唆された。これは、測定方向における β シート構造が熱輸送にとって好ましくない配向が生じているものと推察される。

さらに、フィルム中のシルクフィブロインの架橋が熱拡散率に及ぼす効果を評価した。浸漬後、シルクフィブロインフィルムに紫外光を照射した場合、照射時間24時間までは照射とともに熱拡散率が増加した。72時間後の値は、実験誤差の範囲内で24時間後の値と同じであった。一方で蛍光スペクトル測定の結果からは、ジチロシンの形成量は経時的に増大しているものと推察されるため、シルクフィブロインフィルム(集合体)中でフォノンを効果的に伝導するために十分なジチロシンは24時間の紫外光照射で形成されていると考えられる。

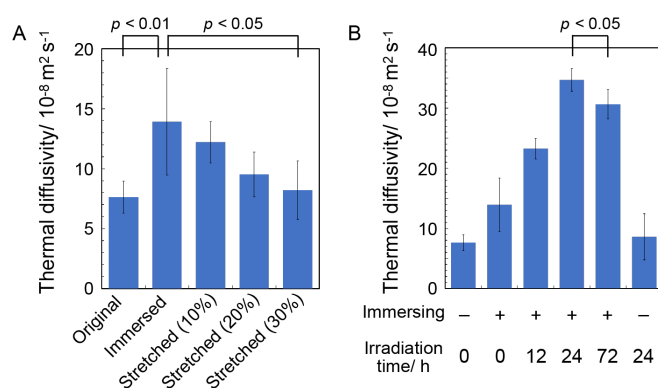


図4 シルクフィブロインフィルムの熱拡散率の比較
(A) 浸漬および延伸後 (B) 浸漬およびUV照射後

シルクフィブロインの二次構造及び配向構造は照射中変化しなかったことから、新たに調製された共有結合が熱拡散率の増加に効率的に寄与したと推測される。実際、SEM像からは、構造が変化していない様子が観察され、架橋の重要性が示唆された。浸漬操作無しに紫外光を照射した場合、熱拡散率は実験誤差の範囲内で元のフィルムと同じであったことから、紫外光照射によって高い熱拡散率を得るためには、浸漬による β シート形成が不可欠であることを示している。紫外光照射中に二次構造、配向構造、マクロな構造変化は見られなかったため、吸光度測定や蛍光測定で観察されたチロシン残基の架橋は、 β シート構造で形成されたシルクフィブロイン膜

の熱拡散率の向上に影響すると考えられる。シルクフィブロインのチロシン残基は β シート構造近傍に位置しており、したがって β シート構造に隣接するチロシン残基の架橋により熱拡散率が上昇しているものと推察される。これらの結果から、 β シート構造をもつシルクフィブロインにおけるチロシン残基の架橋が、高い熱拡散率をもつシルクフィブロイン材料を実現するための効率的なフォノン伝導に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

さらに、サイズの小さなタンパク質の熱拡散率を測定できるよう、マイクロ温度波熱分析法を様々な測定系を検討して確立した。結晶リゾチーム結晶 (図5) の熱拡散率を測定した結果、いずれもが $10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ オーダーの値であった。それらの値に着目すると、熱拡散率は結晶形によっても異なるのみならず、その測定方向によって熱拡散率は確かに異なっていることがわかり、タンパク質分子間のわずかな相互作用の違いが、単結晶内における熱輸送の経路が変化し、結果として熱拡散率に異方性が生じているものと推察される。また、フェリチンならびにアポフェリチンでは熱拡散率が変化しており、内部空間の充填も熱拡散率に寄与することが明らかとなった。また、熱拡散率は架橋によって10%程度上昇する場合とほとんど変化しない場合とがあり、ただ共有結合を形成させることが集合体としてのタンパク質の熱拡散率向上に寄与するわけではないことが示唆された。

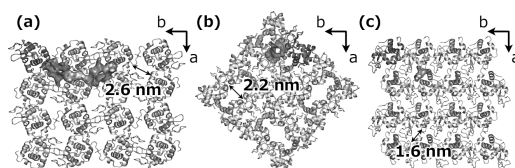


図5 リゾチーム結晶の結晶多形

以上のように、タンパク質からなる集合体を様々な構築し、集合構造や化学架橋などが熱拡散率に与える効果を評価した。規則的な集合構造を形成したタンパク質の熱拡散率は一般的な合成高分子よりも高く、熱伝導性高分子材料としてタンパク質が有用である可能性を見出した。また、適切な位置に架橋構造を形成させた際には熱拡散率が上昇することがわかり、二次構造や三次構造に基づいて適切に構造制御することが、熱伝導性材料としてタンパク質を利用する上で重要であるものと推察される。

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 1件）

1. 著者名 Tanaka Michihiro, Sawada Toshiki, Numata Keiji, Serizawa Takeshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Tunable thermal diffusivity of silk protein assemblies based on their structural control and photo-induced chemical cross-linking	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 12449 ~ 12453
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D3RA06473E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 荒瀬寛紀、藤澤弘樹、劉芽久哉、澤田敏樹、安倍 聡、上野隆史、森川淳子、芹澤 武
2. 発表標題 マイクロ温度波熱分析法によるタンパク質結晶の熱伝導性評価
3. 学会等名 第58回熱測定討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒瀬寛紀、澤田敏樹、安倍聡、森川淳子、上野隆史、芹澤 武
2. 発表標題 熱伝導性材料開発のためのタンパク質結晶の熱伝導特性の評価
3. 学会等名 第32回日本MRS年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshiki Sawada
2. 発表標題 Filamentous Virus-Based Hierarchical Assemblies Toward Thermally Conductive Biopolymeric Materials
3. 学会等名 International Conference on Pure and Applied Chemistry 2022（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 澤田敏樹
2. 発表標題 生体高分子の階層的な集合化を利用したナノスケール熱動態の理解と機能制御
3. 学会等名 さがけ「熱制御」公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 荒瀬寛紀、澤田敏樹、森川淳子、芹澤 武
2. 発表標題 タンパク質結晶の熱伝導性の評価
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshiki Sawada
2. 発表標題 Construction of Functional Polymeric Materials Using Phage-Displayed Peptides
3. 学会等名 26th Korean Peptide Society（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023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
---------	---------