

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19901

研究課題名（和文）導電性タンパク質ナノワイヤの創製

研究課題名（英文）Development of conductive protein nanowires

研究代表者

鳴瀧 彩絵（Sugawara-Narutaki, Ayae）

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：10508203

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）：本研究の成果は、組換えエラスチンからなるタンパク質ナノファイバーの導電性とその機構を明らかにし、導電性向上のための分子設計指針を得たことである。超高真空クライオ二探針電気伝導測定で組換えエラスチンGPPGナノファイバー薄膜の電気伝導特性を評価すると真空中では絶縁体であった。大気中二端子IV測定および交流インピーダンス測定では湿度上昇により電気伝導性が向上し、プロトン伝導体としての特徴を確認した。ナノファイバー分散液の小角X線散乱測定から、ナノファイバーの分子集合構造に関する知見を得た。これらの結果から導電性向上に有効と考えられるアミノ酸配列を考案し、数種類の誘導体を作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者が開発してきた組換えエラスチンタンパク質ナノファイバー及びハイドロゲルは、細胞接着性や特異な粘弾性特性を持つ新素材として注目されている。本研究により、このタンパク質ナノファイバーが真空中で絶縁体、水蒸気存在下でプロトン伝導体であることが示され、さらに、タンパク質ナノファイバーの分子集合構造に関する知見及び導電性向上のための分子設計指針が得られた。これらは、生体親和性が必要とされる場面でのプロトン伝導体としての応用、細胞間情報伝達、あるいは非線形粘弾性を活用した電気伝導性の制御など、幅広い応用と新たな学術を拓く研究成果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The results of this study revealed the electrical conductivity and mechanism of protein nanofibers composed of recombinant elastin, and provided molecular design guidelines for improving electrical conductivity. The electrical conductivity of recombinant elastin GPPG nanofiber thin films was evaluated by ultra-high vacuum cryo-two probe electrical conductivity measurements and found to be an insulator in vacuum. Two-terminal IV and AC impedance measurements in air showed that the electrical conductivity increased with increasing humidity, confirming its characteristics as a proton conductor. Small-angle X-ray scattering measurements of nanofiber dispersion solutions provided insight into the molecular assembly structure of the nanofibers. Based on these results, we devised an amino acid sequence that may be effective in improving conductivity and prepared several derivatives.

研究分野：高分子材料化学

キーワード：タンパク質 ナノファイバー 導電性 分子集合体

1. 研究開始当初の背景

人体の動きから電力を得る環境発電デバイスや、人間と機械が情報をやりとりするヒューマンインターフェースにおいて、生体適合性と柔軟性を持つ導電性材料が求められている。研究代表者らが開発してきた人工タンパク質である組換えエラスチンは、水中で自己集合してナノファイバー(図1)を形成し、ファイバーの網目に水を取り込むことで柔軟なハイドロゲルを形成する[1]。また、細胞接着性に代表される生体適合性を有する[2]。この素材が導電性を持てば、ナノファイバーに沿った長距離電荷移動が期待され、上述の応用に適した材料となる可能性がある。

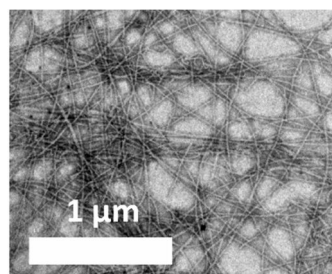


図1 組換えエラスチン GPPG が形成するナノファイバーの透過型電子顕微鏡像

タンパク質が自己集合して形成するナノファイバーのうち、導電性を有するものはしばしば「タンパク質ナノワイヤ」と呼ばれる。タンパク質ナノワイヤに関する研究は、近年世界的な機運の高まりを見せており、2018年以降、毎年総説論文が発表されている。鉄還元細菌 *Geobacter* の繊毛に含まれる pili というタンパク質の導電性機構の解明が研究の本流であるが、報告されている導電率の値や導電性機構(電子伝導・プロトン伝導等)は論文によって様々に異なり、議論が続いている。実験事実として、pili の α -helix 鎖を構成する芳香族アミノ酸の数が増加すると導電性が向上するという報告が複数あり、タンパク質集合体中の π -スタッキングが導電性と関連している可能性が指摘されている[3]。

2. 研究の目的

組換えエラスチンからなるタンパク質ナノファイバーの導電性とその機構を明らかにし、導電性向上のための分子設計指針を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

組換えエラスチンとして GPPG (図2) を用いた[4]。GPPG は、生体エラスチン由来の G 配列と P 配列から構成され、末端にオリゴヒスチジンタグを有する。G 配列、P 配列はファイバー形成に関与し、比較的疎水性の高いアミノ酸から構成される。電子伝導に関与する可能性のある芳香族アミノ酸(F:フェニルアラニン, W:トリプトファン)と、プロトン伝導に関与する可能性のある極性アミノ酸(K:リシン, E:グルタミン酸, H:ヒスチジン)を図2中に示した。

GPPG を大腸菌から発現させ、金属イオンアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製し、凍結乾燥粉末を得た。この GPPG 粉末を超純水に溶解し、37°C で7日間静置してナノファイバーへと自己集合させた。0.016 wt% に調製した分散液を 37°C に保ち、導電率計と pH メータを用いて電気伝導率および pH を測定した。続いて、0.3 wt% に調製した分散液を石英基板上に計 500 μ L 滴下し自然乾燥することで薄膜を作製した。薄膜上へ金電極をギャップ 90 μ m で真空蒸着し、真空中 (1.2×10^{-6} Pa) および大気中二端子 IV 測定、大気中交流インピーダンス測定を行った。

GPPG ナノファイバーの分子集合構造に関する知見を得るため、0.016 wt% に調整したナノファイバー分散液の小角 X 線散乱(SAXS)測定を 37°C の条件下で行った。

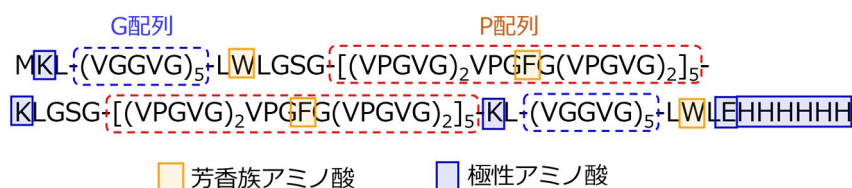


図2 GPPG のアミノ酸配列

4. 研究成果

GPPG を 0.016 wt% 含むナノファイバー分散液の電気伝導率は 0.038 mS cm^{-1} 、pH は 4.75 であった。GPPG から放出されたプロトンが電気伝導のキャリアであると考え、同じ pH の酢酸水溶液の電気伝導率を測定したところ 0.012 mS cm^{-1} と、約 3 分の 1 の値であった。ナノファイバーの存在が電気伝導率を向上させていると言える。

真空中で二端子 IV 測定を行うと、測定器の測定範囲を超える高抵抗を示した。一方、大気中湿度制御二端子 IV 測定を行うと、湿度上昇に伴う測定電流の上昇およびヒステリシスの増大を観測した

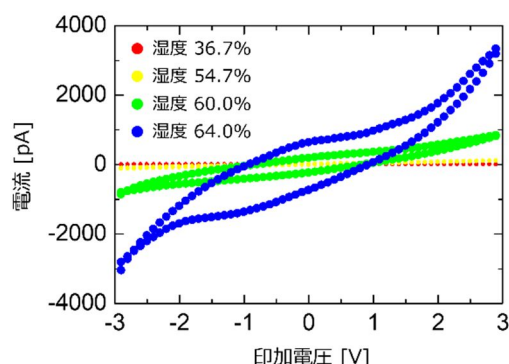


図3 大気中湿度制御二端子 IV 測定結果

(図3)。ヒステリシスの増大は、プロトンが電極との界面で電気二重層を形成したこと由来すると考えられる。また、交流インピーダンス測定において、湿度上昇に伴うインピーダンスの実数部($\text{Re}(Z)$) および虚数部($\text{Im}(Z)$)の絶対値の低下を観測した(図4a)。この測定結果について、図4bに示す等価回路を用いて解析を行った。本等価回路は抵抗 R と定位置素子 CPE の並列回路が二つ直列接続されたモデルである。GPPG ナノファイバー薄膜内における抵抗値および電気容量をそれぞれ R_1 , CPE_1 , 薄膜と金電極界面の抵抗値および電気容量を R_2 , CPE_2 とおき、図4aの実線で

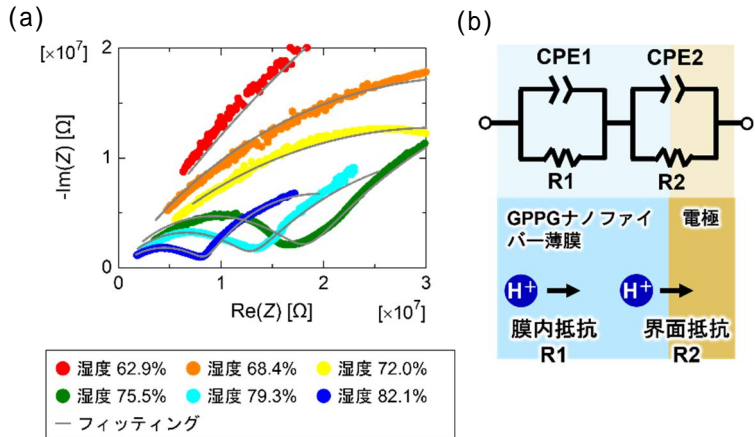


図4 (a)大気中湿度制御インピーダンス測定の複素インピーダンスプロットおよび等価回路によるフィッティング結果、(b)等価回路図。

示すフィッティング結果から R_1 を見積もった。GPPG 薄膜の抵抗を表す R_1 は湿度上昇に伴い低下した(図5)。

湿度上昇に伴う抵抗値の低下、およびIV測定におけるヒステリシスの発生はプロトン伝導体の特徴である。また、水中測定において、GPPG ナノファイバーを含む分散液が同pHの酢酸水溶液よりも高い電気伝導率を示したことは、プロトンがGPPG ナノファイバーに沿って、バルク水中よりも速く輸送されていることを示唆している。以上の結果より、GPPG ナノファイバーの導電機構は、タンパク質を構成する極性アミノ酸のプロトンと周囲の水分子が水素結合し、その組み替えが起こることによるプロトン伝導であると考えられる(図6)。GPPG ナノファイバーが0.016 wt%という低濃度でも水中でネットワークを形成していることは、動的粘弾性測定によって分散液の貯蔵弾性率 G' が損失弾性率 G'' よりも大きいことから示唆された。GPPG ナノファイバーのSAXS測定結果を図7に示す。横軸は散乱ベクトルの絶対値 q 、縦軸は散乱強度 $I(q)$ である。 $I(q)$ は小角側で q^{-1} に従い、散乱粒子の形状がファイバー状であることが示された。この散乱プロファイルは、棒状粒子の周囲にガウス鎖(コロナ鎖)が付着したモデル[5]でよく再現でき、この解析からファイバー中心部の直径が4.6 nmでありその周りに回転半径1.5 nmのコロナ差鎖が存在することが示唆された。GPPG 分子中、疎水的なG配列とP配列がコアを形成、オリゴヒスチジntagを含む親水的なN末端がコロナ鎖を形成し、コロナ鎖同士の接触点(物理架橋点)を通じてプロトン伝導経路が形成されている可能性がある。さらに、GPPG に存在する極性アミノ酸のうち、最も含有量の多いヒスチジンの効果を検証するため、石英基板へのナノファイバー堆積後にコバルトイオンを含む水溶液に浸漬し、ヒスチジン残基にコバルトイオンを配位させることでプロトン受容サイトを塞ぐことを試みた。コバルトイオン配位後のナノファイバー薄膜は、大気中IV測定において測定器の測定範囲を超える高抵抗を示し、GPPG 薄膜のプロトン輸送経路のひとつがヒスチジン残基であることが示唆された。

以上のように、本研究では、組換えエラスチン GPPG のナノファイバーがプロトン伝導体であることを初めて示し、ナノファイバーの液中の構造に関する測定結果からその伝導機構を提案した。これらは、生体親和性が必要とされる場面でのプロトン伝導体としての応用、細胞間情報伝達、あるいは非線形粘弾性を活用した電気伝導性の制御など、幅広い応用と新たな学術を拓く研究成果であると考えられる。一方、GPPG は真空中では絶縁体であったことから、電子伝導を誘発できるような新たな誘導体の作製にも取り組み、一定の成果を得ている。プロトン共役電子移動機構を組み込むことを目的とし、GPPG のフェニルアラ

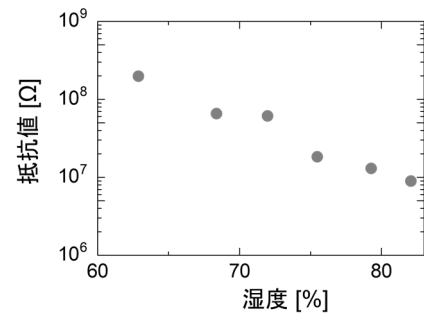


図5 GPPG ナノファイバー膜内抵抗 R_1 の湿度依存性

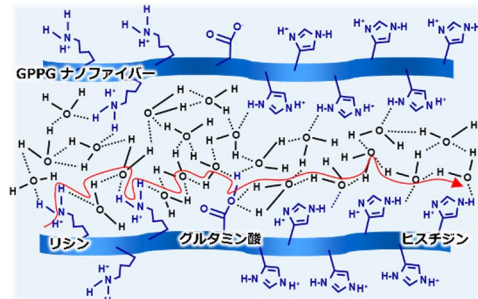


図6 GPPG ナノファイバーにおけるプロトン伝導の模式図

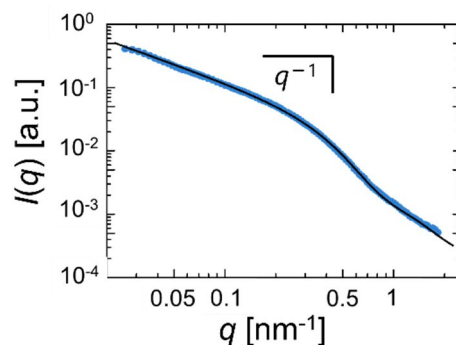


図7 GPPG ナノファイバー分散液のSAXS プロファイル

ニン残基をチロシンに置換した誘導体のプラスミド DNA の作製とタンパク質の発現にまで成功した。また、プロトン伝導体としての機能向上に向けては、極性アミノ酸をさらに組み込むことが有効であると考えられるため、すでに当研究室にて保有している GPG-REDV[2]等、極性アミノ酸の含有割合の高い誘導体を用い、サンプル間で電気伝導率を比較できる測定系を組んだうえで効果を検証していく。

<引用文献>

1. Y. Sugioka, J. Nakamura, C. Ohtsuki, A. Sugawara-Narutaki, *Int. J Mol. Sci.*, **22**, 4104(12 pages)(2021).
2. K. Natsume, J. Nakamura, K. Sato, C. Ohtsuki, A. Sugawara-Narutaki, *Regen. Biomater.*, **10**, rbac111(10 pages) (2023).
3. Y. Tan, R. Y. Adhikari, N. S. Malvankar, S. Pi, J. E. Ward, T. L. Woodard, K. P. Nevin, Q. Xia, M. T. Tuominen., D. R. Lovely, *Small*, **12**, 4481-4485 (2016).
4. A. Sugawara-Narutaki, S. Yasunaga, Y. Sugioka, D. H. T. Le, I. Kitamura, J. Nakamura, C. Ohtsuki, *Int. J Mol. Sci.*, **20**, 6262(12 pages)(2019).
5. J.S. Pedersen, *J. Appl. Cryst.*, **33**, 637-640 (2000).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 鳴瀧彩絵	4. 巻 80(2)
2. 論文標題 エラスチンの機能を再現する人工タンパク質の創製	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 B&I バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 144-146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 3件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柴田黎，的場馨，高橋倫太郎，中村仁，大槻主税，鳴瀧彩絵
2. 発表標題 タンパク質ナノファイバー分散液への超音波処理がもたらす導電性の変化
3. 学会等名 ナノ学会第19回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳴瀧彩絵
2. 発表標題 タンパク質ナノファイバーの機能設計と応用
3. 学会等名 ナノ学会第19回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀雄一，柴田黎，高橋倫太郎，鳴瀧彩絵
2. 発表標題 生体適合性を有する導電性ナノファイバーの創製に向けたタンパク質の合成
3. 学会等名 第7回 D-マテリアルズ分野融合研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鳴瀧彩絵
2. 発表標題 超分子ナノファイバーを形成する人工タンパク質の創製と応用
3. 学会等名 第5回ナノ材料科学・応用研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴田梨，高橋倫太郎，中谷真人，尾上順，鳴瀧彩絵
2. 発表標題 エラスチン類似タンパク質が形成する自己集合性ナノファイバーの導電性の解明
3. 学会等名 第183回東海高分子研究会講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鳴瀧彩絵，大石俊輔
2. 発表標題 エラスチンに着想を得た人工タンパク質ナノファイバーとハイドロゲルの開発
3. 学会等名 ITbM/GTRコンソーシアムワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鳴瀧彩絵
2. 発表標題 デザイナータンパク質が形成する自己組織化ナノファイバーの物性と応用
3. 学会等名 第6回ナノ材料科学・応用研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鳴瀧研究室 https://softmater.energy.nagoya-u.ac.jp/index.html
--

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
研究分担者	高橋 倫太郎 (Takahashi Rintaro) (10794125)	名古屋大学・工学研究科・助教 (13901)	
研究分担者	尾上 順 (Onoe Jun) (50241245)	名古屋大学・工学研究科・教授 (13901)	

	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
研究協力者	柴田 黎 (Shibata Rei)		
連携研究者	中谷 真人 (Nakaya Masato) (30725156)	名古屋大学・工学研究科・准教授 (13901)	

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
---------	---------