

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：34504

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651119

研究課題名(和文)珪藻殻形成にヒントを得たシリカ自己組織化塩基性ペプチドの創成

研究課題名(英文)Development of silica-biomineralizing peptides hinted by diatom frustule formation.

研究代表者

松田 祐介 (Matsuda, Yusuke)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号：30291975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：珪藻が有する整列シリカ構造自己組織化には、殻に分泌される塩基性ペプチドが関与する。本研究ではこれを模倣した人工ペプチドの作製とその作用の特徴付けを行った。その結果、単純なヘリックス構造ペプチドにリジンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸を導入した様々な人工ペプチドの作製・大腸菌による大量発現に成功した。これら塩基性ペプチドは全て強いシリカ固体化活性を有し、反応環境の制御により生成されるシリカ粒径の制御が出来た。また、反応時に特異的抗体を混合することで、平板状のシリカ固体作製に成功した。一方、このペプチド反応場として、SiC系等の基板を試作し、限られた空間内での構造充填パターンモデル化を試みた。

研究成果の概要(英文)：The highly self-organized silica nano-structure in the diatom frustule is made partially by the function of basic polypeptides which are excreted to the frustule. In this study, we constructed artificial polypeptides resembling the diatom frustule factors, and characterized their functions. As a result, we succeeded to produce polypeptides with introduced basic amino acid residues such as Arg and Lys. All these newly made polypeptides showed a strong silica biomineralization activity, and the spherical diameter of mineralized silica could be controlled by the regulation of reaction conditions. By the addition of a specific antibody against these polypeptides to the reaction mixture, we also succeeded to make a plate-type biosilica. On the other hand, we made prototype SiC-based substrates and attempted to model a packing structure in the constrained reaction area.

研究分野：植物分子生理学

キーワード：自己組織化 ナノバイオ シリカ構造 塩基性ペプチド 珪藻殻

1. 研究開始当初の背景

珪藻、放散虫、海綿など、水圏に生息する生物を中心にケイ酸を固体化して細胞壁等に使っている例はいくつか存在する。中でも珪藻の殻は数十ナノメートル単位のメソスコピックなサイズの整列構造を自己組織化する最も精密なものである。これまでに珪藻殻には Silaffin と呼ばれる比較的短いペプチドが分泌され、これに結合するポリアミン鎖と協調して珪藻殻の構造を形成することが強く示唆されている。しかしながら、*in vitro* では球体や板状のシリカ固体を作ることが出来るが、ナノ構造の再現は出来ていない^[1,2]。珪藻殻形成の原理はまだ分かっていないが、これらの分子は塩基性の強い領域を有していることと、ケイ酸重合反応を抑制する因子が協調している可能性があること、中心パターンと呼ばれる大きな枠構造がまず必要であること、および反応が起こる場の物理化学的性質が構造に影響を与える可能性などが指摘されている^[1,2]。

2. 研究の目的

珪藻類が環境中のケイ酸を取り込んでこれを固体化するバイオミネラリゼーション作用は、近年の研究から殻に分泌される塩基性ペプチドとポリアミン鎖の作用によることが分かってきている。本研究では、この作用にヒントを得、人工的に作った様々なパターンの塩基性ポリペプチドによるシリカバイオミネラリゼーションの可能性を探ることを目的としている。最終的に、基板表面上に、珪藻殻に見られるようなナノメートル単位の整列構造を自己組織化するペプチドのセットを開発すること、およびその作用原理を明らかにすることを目標とする。

具体的には、異なる2次構造をとると推定されるいくつかのペプチドをデザインし、ここに塩基性アミノ酸として、リジン或いはアルギニンを類型化されたパターンで導入する。このようにして作製した様々な人工ペプチドにおいて、シリカ重合活性を確認するとともに、シリカ重合反応が起こる条件、原料となるケイ酸分子を変えることにより、これらペプチドがシリカ重合を誘導する原理を抽出する。次に反応を基板表面上に移すために、適当なサイズと物性を有する基板を作製する。ここに吸着させた人工ペプチドにより、限られた空間を充填する微細構造作製手法を確立する。また、シリカ重合活性を有するペプチドの推定構造から、活性抑制・修飾因子となりうるペプチドをデザインし、溶液および基板上的反応系でその働きを確認する。最終的に基板の上に構造を形成する原理を推定し、この数理科学的モデルを構築することを目標とした。

3. 研究の方法

本研究は以下の5項目のサブプロジェクトに分けて遂行した。(1)単純な二次構造と正

電荷クラスタを有する塩基性ペプチドの設計及び大腸菌を用いた大量発現および生産、(2)合成したペプチドによるシリカ固体形成反応の確認、反応条件の検討、およびペプチド設計へのフィードバック、(3)シリカ形成ペプチドと相互作用するペプチド系の設計・生産、(4)反応条件とシリカ構造関連の解析、(5)基板の設計と基板上シリカ固体形成反応の最適化。これにより液体内と固体表面でシリカ構造を形作る原理を数理科学的にモデル化し、構造体作製技術の確立を目指した。モデル化、基板作製、ケイ酸供給、および微細構造観察にはそれぞれ連携研究者、研究協力者の協力を得た。

4. 研究成果

(1)単純な二次構造と正電荷クラスタを有する塩基性ペプチドの設計及び大腸菌を用いた大量発現および生産：単純な二次構造を持つペプチドとして、本研究では、機能の良く調べられている珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* の葉緑体型炭酸脱水酵素 (*P. tricornutum* carbonic anhydrase 1; PtCA1) のC末端側配列を使用した。PtCA1のC末端配列は α -helix 構造を有し、3アミノ酸ごとに疎水性アミノ酸が配置された疎水クラスタを持つ^[3]。この構造に着目し、疎水クラスタ形成アミノ酸の隣にリジン或いはアルギニンといった塩基性アミノ酸を部位特異的変異導入技術により埋め込んだ。これを、CDPF (Cationized-Diatom Pyrenoid Forming Factor) とし、盲検用として塩基性ペプチドを全く埋め込まないものを CDPF0、リジン或いはアルギニンを埋め込んだものを、それぞれ CDPF1 或いは CDPF2 とした (図1)。また、これら CDPFs を2連結或いは4連結したもの、及び連結部分にグリシンが3~12個連なった柔軟なポリペプチド鎖 (G^{3-12} リンカー)を持つタイプのものを作製

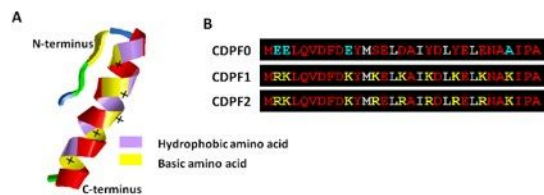


図1 作製した塩基性ペプチドの基本単位構造

した。

これら人工遺伝子を大腸菌に形質転換し、大腸菌内で大量発現させた。このようにして作った CDPFs を精製後、このペプチドの水溶性ケイ酸との反応性を見た。

(2)合成したペプチドによるシリカ固体形成反応の確認、反応条件の検討、およびペプチド設計へのフィードバック：CDPF ペプチドはリジン型およびアルギニン型の両方が、溶液中でシラフィンと同様に数百ナノメートルの球状シリカ構造を、中性、常圧、常温環境下で、迅速に形成することが分かった。こ

のヘリックス構造にもともと含まれる疎水クラスター構造が、CDPF ペプチド同士を引き付けている為に、より高い正電荷領域を生み出し、シリカ固体形成活性に寄与していることが強く示唆された。

CDPF1およびCDPF2をリンカーなしで2連結した場合、形成されたシリカ固体の形状はどちらの場合も基本的に球形であり、両者で大きな差は見られなかった(図2)。一方、ペプチドの濃度を25 μM~0.1 μMの範囲で変化させて、バイオシリカ形成反応を行ったところ、それぞれの単位構造 CDPF の場合と同様に、ペプチド濃度依存的に、粒子径は変化した。すなわち、ペプチド濃度が高濃度であるほど粒子径は大きく、ペプチド濃度が低濃度であるほど小さくなる傾向を示した(図2)。なお、盲検である CDPF0:CDPF0 においては、比較的ペプチド濃度の高い25 μM のみにおいて非常に微量のバイオシリカの形成が確認されたが、他の CDPF と比較すると無視できる量であった。

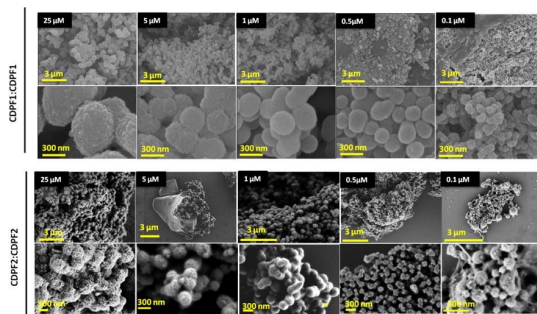


図2 様々な濃度の2連結したリンカーなしCDPF1:CDPF1および CDPF2:CDPF2によるシリカ個体

2連結 CDPFs が単位 CDPF と大差ないシリカ固体形成能を示したことから、連結部にG³⁻¹²リンカーの導入および4連結型 CDPFs の作成を行い、これらのシリカ固体形成能を分析した。その結果、G³⁻¹²リンカーの導入は粒径に一定の変化をもたらすとは考えられなかった。一方、連結数を1、2、及び4と増加させた場合の形成シリカ固体を分析したところ、CDPF1 および CDPF2 のいずれの場合も、単ペプチドでは80 nm、2連結ペ

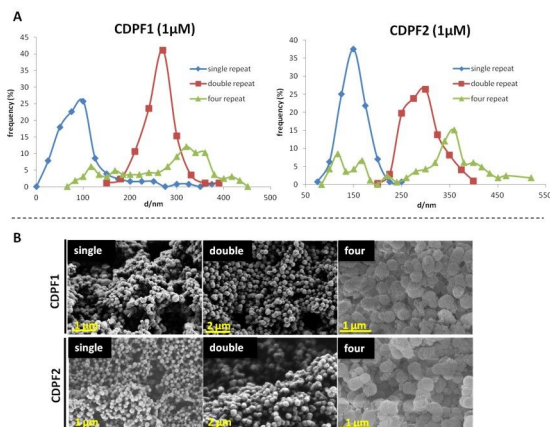


図3 CDPF1およびCDPF2ペプチドの連結数(1, 2, および4連結)と形成シリカ固体形状・サイズの相関

チドでは280 nm、4連結ペプチドでは350 nm 付近に分布のピークを示す球状粒子であった(図3)。このことから、CDPFs ペプチドの連結数は、形成されるシリカ固体の大きさに影響することが分かった。

(3)シリカ形成ペプチドと相互作用するペプチド系の設計・生産：本研究の計画段階に於いては CDPFs 以外の人工ペプチドの創製も行う予定であったが、図1に示す3種の CDPFs の多連結体およびリンカー導入体のバリエーションだけで膨大な試料・試験数となったため、CDPFs に対する相互作用分子の効果のみを検証した。CDPF はもともと珪藻 *P. tricornutum* の炭酸脱水酵素 PtCA1 の分子表面に露出していると考えられる C 末端ヘリックスをベースに改変しているものであるため、PtCA1 のポリクローナル抗体との交差反応を確認したところ、十分陽性であった。このため、本抗体を相互作用ペプチドと位置づけ、CDPFs のシリカ固体形成能に対する影響を分析した。

G⁶リンカー付きの2連結 CDPF1 を1 μM に対して、抗 PtCA1 ウサギ抗血清の他、約40 μM の抗体および1 mM の牛血清アルブミン(BSA)を用いて試験を行った。まず、特異的抗血清を加えて反応した場合、図4左上に示すような明確な板状構造が再現性よく形成された。一方、精製した PtCA1 抗体のみを加えても板状にはならなかった(図4左下)。しかし、非特異的血清や BSA のみを加えても明確な板状構造は取らず、特異的精製抗体と BSA を混合した場合、板状構造が見られた(図4)。このことから、CDPF を集合させる作用に BSA の有する脱水作用が関わることで板状の構造が作られることが強く示唆された。

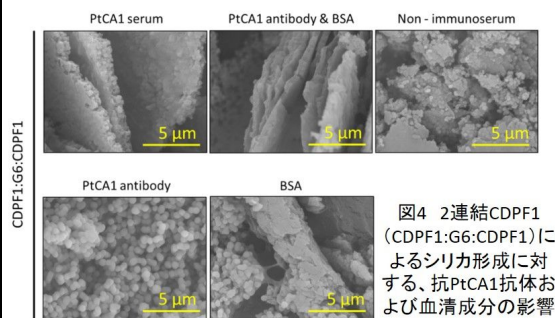


図4 2連結CDPF1 (CDPF1:G6:CDPF1)によるシリカ形成に対する、抗PtCA1抗体および血清成分の影響

(4)反応条件とシリカ構造相関の解析：本研究で作製した CDPF1 および CDPF2 の連結ペプチドについて、pH、温度、溶媒極性等の物理化学的条件の異なる様々な反応環境下でシリカ固体形成能と形成シリカ固体の形状を比較した。単リピート構造の時と同様、反応は中性付近で最も迅速に進行したが、形成されるシリカ固体の形状に大きな変化は見られなかった。

(5)基板の設計と基板上シリカ固体形成反応の最適化：珪藻における細胞骨格が形成する中

心パターンに類似した機能を持つような基本描画構造を半導体基板表面上に試作した。基本描画構造を作製するに当たり、化学的組成の異なる複数の化合物半導体材料を対象に、最新のパターン加工法を導入した。材料としては III-V 族化合物半導体材料の中からは GaAs-AlAs 系、IV 族半導体の中からは SiC-Graphene を選択した。GaAs-AlAs 系材料の加工に関しては、連携研究者の独自プロセス“MBE-Litho”を用い、電子線を GaAs 半導体基板上の酸化膜（厚さ 1 nm）に対して直接描画により安定な耐熱性酸化膜 (Ga_2O_3) パターン形成後、超高真空下 MBE (Molecular Beam Epitaxy) プロセスにて選択的熱エッチング、或いは選択的 MBE 成長を行い、任意の周期と深さで制御した描画構造を作製した。また、SiC-Graphene に関しても、同様に独自開発した Si 蒸気圧エッチング法により、2000 を超える高温超高真空環境下で SiC 表面の原子配列を精密に整える技術と、その表面から Si だけを優先的に熱脱離させ、残留した C 原子を 1 層グラフェンに自己形成させる SiC 熱分解法を組み合わせ、ランダム性を有した整列基板を作製した (図 5)。これらの基板構造上で、CDPFs のシリカ固体形成を試みるまでには至っていない。

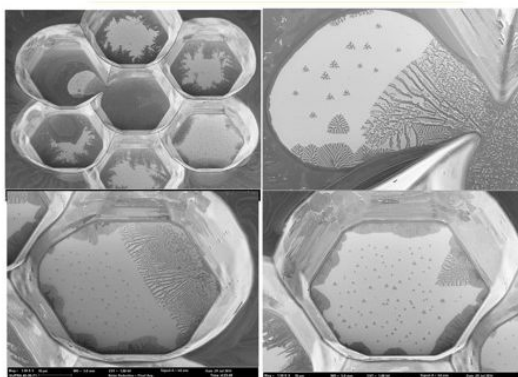


図5 SiC熱分解法を用いたSiCグラフェン成長基板例

また、珪藻殻に見られるような六角形の空間充填パターン形成をモデル化するために、まずミツバチ巣形成の数値モデルを構築した。その結果、1つの六角形パターンの形成に成功している。このモデルのサイズ微少化にはまだ成功していない。

<引用文献>

- Kröger et al (1999) *Science* 286: 1129-1132
 Sumper et al (2002) *Science* 295: 2430-2433
 Kitao & Matsuda (2009) *Biochem J.*, 419: 681-688

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 12 件)

井上高康、松田祐介、抗菌ペプチドによるバイオシリカ生産技術の開発、*BIOINDUSTRY*、査読有、32(3)巻、2015、35 - 41

DOI : なし

松田祐介、バイオシリカ形成性ポリペプチドの創製、*化学工業*、査読有、66(1)巻、2015、14 - 20

DOI : なし

Tanaka R, Kikutani S, Mahardika A, Matsuda Y、Localization of enzymes relating to C4 organic acid metabolism in the marine diatom, *Thalassiosira pseudonana*, *Photosynthesis Research*、査読有、121 巻、2014、251 - 263

DOI : 10.1007/s11120-014-9968-9

Samukawa M, Shen C, Hopkinson BM, Matsuda Y、Localization of putative carbonic anhydrases in the marine diatom, *Thalassiosira pseudonana*, *Photosynthesis Research*、査読有、121 巻、2014、235 - 249

DOI : 10.1007/s11120-014-9967-x

Yoshinaga R, Niwa-Kubota M, Matsui H, Matsuda Y、Characterization of iron-responsive promoters in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *Marine Genomics*、査読有、16 巻、2014、55 - 62

DOI : 10.1016/j.margen.2014.01.005

Nakaguchi E, Osaki K、Global solutions and exponential attractors of a parabolic-parabolic system for chemotaxis with subquadratic degradation, *DCDS-B*、査読有、18(10)巻、2013、2627 - 2646

DOI : 10.3934/dcdsb.2013.18.2627

Uemichi K, Osaki K, Ohtani T、High temperature areas in the first stage of the comb construction of european honeybees, *Hyogo Biology*、査読有、14(4)巻、2013、265 - 269

DOI : なし

井上高康、堀口雅人、松田祐介、バイオシリカ抗菌剤の特性・性能とその応用技術、*技術情報協会編*、*抗菌・抗ウイルス材料の開発・評価と加工技術*、査読有、2013年9月第21節、2013、121 - 126

DOI : なし

松田祐介、珪藻類の殻形成に学ぶバイオシリカ作製技術の開発とその可能性、*高分子*、査読有、62 巻、2013、85 - 86

DOI : なし

Ohtani N, Ushio S, Kaneko T, Aigo T, Katsuno M, Fujimoto T, Ohashi W、Tunneling atomic force microscopy studies on surface growth pits due to dislocations in 4H-SiC epitaxial layers, *J Electron Mater*、査読有、41 巻、2012、219 - 2196

DOI : 10.1007/s11664-012-2133-3

松田祐介、井上高康、バイオシリカ抗菌剤、プラスチック、査読有、9月号、2012、10 - 14

DOI: なし

Kuto K, Osaki K, Sakurai T, Tsujikawa T、Spatial pattern formation in a chemotaxis-diffusion-growth model、Physica D、査読有、241巻、2012、1629-1639
DOI : 10.1016/j.physd.2012.06.009

〔学会発表〕(計 14 件)

Abfa IK, Freeman E, Morishita M, Mckinder L, Jonicas M, Kikutani S, Matsuda Y、Development of an intracellular inorganic carbon nanosensor based upon Foerster resonance energy transfer (FRET)、第 56 回日本植物生理学会年会、2015 年 3 月 16 日、東京農業大学世田谷キャンパス、東京都

村上慶如、木村友紀、藤山一平、松田祐介、The design of novel artificial peptide revealing a silica biomineralization activity. シリカバイオミネラルゼーションを行う新奇人工ペプチドの設計、第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月 27 日、札幌コンベンションセンター、札幌市

Meksiarum P, Spegazzhini N, Matsui H, Matsuda Y, Sato H、Raman spectroscopy for monitoring CO₂ effects on fatty acid synthesis of microalgal marine diatom *Thalassiosira pseudonana*、The 2nd International Conference on Science and Engineering in Biology, Medical and Public health、2014 年 5 月 31 日、Dynasty Resort, Kuta Bali, Indonesia
大井皓正、松田祐介、分子マーカーによる海洋性珪藻有性生殖確認、日本珪藻学会第 35 回大会、2014 年 4 月 27 日、名古屋大学、名古屋市

大井皓正、松田祐介、環境ストレスが誘導する海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* のアリル再編、日本藻類学会第 38 回大会、2014 年 3 月 16 日、東邦大学、船橋市

金子忠昭、SiC 表面ナノ制御と高品質グラフェン創成、放射光科学による革新的イノベーションワークショップ、2014 年 3 月 14 日、岡山大学、岡山市
久津間保徳、堂島大地、芦田晃嗣、大谷昇、金子忠昭、4H-SiC(000-1)C 面グラフェン成長における熱分解抑制 Ar 効果と Si 分圧添加効果 / The study of graphene growth mechanism on 4H-SiC(000-1) C-face by controlling thermal decomposition rate in Ar over

pressure with adding a silicon partial pressure、SiC 及び関連半導体研究 第 22 回講演会 2013 年 12 月 10 日、埼玉会館、埼玉市

大崎浩一、Destabilization and Pattern Formation of Solutions to Reaction-Diffusion Systems (反応拡散方程式の解の不安定化とパターン形成) (招待講演) 大阪大学大学院情報数理学セミナー 2013 年 10 月 10 日、大阪大学、豊中市

菊谷早絵、長里千香子、松田祐介、海洋性珪藻における新規ピレノイド貫通チラコイド局在タンパク質、第 77 回日本植物学会 2013 年度大会、2013 年 9 月 14 日、北海道大学、札幌市

Matsuda Y、Molecular aspects of carbon acquisition mechanisms in marine diatoms、10th International Phycological Congress (招待講演)、2013 年 8 月 9 日、The Renaissance Orlando, Orlando, Florida, USA

Matsuda Y、SLC4 family bicarbonate transporters in marine diatoms. EMBO Workshop The 2nd Molecular Life of Diatoms、2013 年 6 月 25 日、University of Paris, Paris, France

Matsuda Y、CCMs in two model strains of marine diatom、The 8th International Symposium on Inorganic Carbon Utilization by Aquatic Photosynthetic Organisms (招待講演)、2013 年 5 月 30 日、Loyola University, New Orleans, Louisiana, USA

松田祐介、海洋性珪藻プラスチド代謝のレドックス制御、第 54 回日本植物生理学会大会 (招待講演)、2013 年 3 月 21 日、岡山大学、岡山市

松田祐介、Redox regulation of plastid metabolism by thioredoxin in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*、第 22 回国際珪藻学会、2012 年 8 月 28 日、ゲント市、ベルギー
松田祐介、Development of a New Screening System Using Pyrimidine Auxotrophy in a Marine Diatom、第 9 回アジア太平洋マリンバイオテクノロジー学会、2012 年 7 月 13 日、高知市文化プラザ、高知市

松田祐介、珪藻エンジニアリングによる CO₂ 固定研究、日本光合成学会 (招待講演)、2012 年 6 月 1 日、東京工業大学すずかけ台キャンパス、東京都

〔図書〕(計 2 件)

Matsuda Y, Kroth PG、Springer、Carbon fixation in diatoms. In Martin Hofmann-Marriott Ed. The structural basis of Biological Energy Generation,

Advances in Photosynthesis and
Respiration, The structural Basis of
Biological Energy Generation Volume
39, 2014 年、335 - 362、総ページ数 483
藤原伸介、松田祐介、三共出版、遺伝子
工学の原理、2012 年 総ページ数 201

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：板状バイオシリカの製造方法
発明者：松田祐介、村上慶如
権利者：学校法人関西学院
種類：特許
番号：特願 2015 - 61592
出願年月日：2015 年 3 月 24 日
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

松田 祐介 (MATSUDA, Yusuke)
関西学院大学・理工学部・教授
研究者番号：30291975

(3)連携研究者

金子 忠昭 (KANEKO, Tadaaki)
関西学院大学・理工学部・教授
研究者番号：50291977

(3)連携研究者

大崎 浩一 (OSAKI, Koichi)
関西学院大学・理工学部・教授
研究者番号：40353320

(4)研究協力者

井上 高康 (INOUE, Takayasu)