

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25810110

研究課題名(和文)植物細胞壁を模倣したシルク-ペクチンハイドロゲルの創成とサンゴ再生基盤への利用

研究課題名(英文)Plant cell wall-mimicking silk-pectin hydrogel for coral reef regeneration

研究代表者

沼田 圭司 (Numata, Keiji)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：40584529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：サンゴ再生足場材料として、生体適合性および生分解性に優れたシルクタンパク質を用いて、高強度かつサンゴの生育に適した足場材料を構築することを目指した。シルクのナノ粒子とハイドロゲルからなる足場材料は、二段階の生理活性物質の除法を可能にした。シルクにペクチンを組み合わせることで、高強度化にも成功した。このシルクとペクチンからなるハイドロゲルは、シルク繊維とペクチン分子の相互作用により、その層分離構造が変化することが明らかとなった。一方で、シルクのネットワーク構造を制御することで、タフネスを劇的に改善することにも成功しており、これらの素材を利用した実地試験が望まれる。

研究成果の概要(英文)：We developed a new method to prepare silk hydrogels and silk-pectin hydrogels via dialysis against methanol to obtain hydrogels with high concentrations of silk fibroin. The relationship between the mechanical and biological properties and the structure of the silk-pectin hydrogels was subsequently evaluated. The present results suggest that pectin associates with silk molecules when the silk concentration exceeds 15 wt%, suggesting that a silk concentration of over 15 wt% is critical to construct interacting silk-pectin networks. The silk-pectin hydrogel reported here is composed of a heterogeneous network, which is different from fiber-reinforced, interpenetrated networks and double-network hydrogels, as well as high-stiffness hydrogels (elastic modulus of 4.7 ± 0.9 MPa, elastic stress limit of 3.9 ± 0.1 MPa, and elastic strain limit of $48.4 \pm 0.5\%$) with regard to biocompatibility and biodegradability.

研究分野：高分子構造、生体関連高分子

キーワード：シルク ネットワーク構造 サンゴ

1. 研究開始当初の背景

サンゴ再生足場材料として、生体適合性および生分解性に優れたシルクタンパク質を用いて、高強度かつサンゴの生育に適した足場材料を構築することを目指した。シルクナノ粒子とハイドロゲルからなる足場材料は、二段階の生理活性物質の除法を可能にした。シルクにペクチンを組み合わせることで、高強度化にも成功した。このシルクとペクチンからなるハイドロゲルは、シルク繊維とペクチン分子の相互作用により、その層分離構造が変化することが明らかとなった。一方で、シルクのネットワーク構造を制御することで、タフネスを劇的に改善することにも成功しており、これらの素材を利用した実地試験が望まれる。

シルクフィブロイン水溶液と貧溶媒であるエタノールを混合すると、疎水性相互作用によりフィブロイン分子鎖が凝集し局部的にシート構造を形成し結晶化する。これによりフィブロイン分子鎖間で物理架橋を形成し、シルクフィブロイン水溶液はゲル化する(Numata et al. Biomacromolecules 2011)。また、シルクフィブロイン水溶液にホースラディッシュペルオキシダーゼを加え、さらに過酸化水素を加えて混合すると、ペルオキシダーゼの酸化反応によりフィブロイン中に含まれるチロシン間で共有結合が形成され、シルクフィブロイン水溶液がゲル化することが知られている。本研究では、上記の方法で形成される2種類のネットワーク(物理ゲルおよび化学ゲル)を組み合わせ、新しい構造を有するシルク材料を創生する手法を確立した。物理架橋のみ、または化学架橋のみで構成されたシルクゲルに比べ、物理架橋と化学架橋の両方のネットワークを持つシルクゲルは異なる機械的特性を示すことが期待される。

2. 研究の目的

シルク繊維は、非常に高強度であることが知られているが、シルクのハイドロゲルは非常に脆い物性が、その利用範囲を限定していた。本研究では、シルクゲルに、シルクナノ粒子を加えることで、二段階の薬物徐放を可能にするとともに、幾つかの手法を用いて高強度なシルクゲルを作成することを目指した。一つ目の手法としては、シルク繊維とペクチン分子の相互作用を利用して、高強度のシルクゲルを作成した。また、物理架橋および化学架橋の2種の架橋を制御することで、新しいタイプのネットワーク構造および機械的特性を示すシルク材料の開発に成功した。

3. 研究の方法

シルクフィブロイン水溶液と100%エタノール

を6:4の割合で混合し、シルク水溶液をゲル化した(物理架橋)。得られたシルクゲルを24時間MilliQ水に浸漬し、エタノールを水に置換した。エタノールを除去したシルクゲルを異なる濃度のシルクフィブロイン水溶液3mL中に12時間浸漬し、シルクゲル中にシルク水溶液を浸透させた。そこに30unitのホースラディッシュペルオキシダーゼを加えてよく混合し、その後1.65mMの過酸化水素を加えることで、シルクゲルを含んだシルクフィブロイン水溶液をゲル化した(化学架橋)。この過程により、物理架橋と化学架橋の2種類のネットワークを持つシルクハイドロゲルを調製した。今回は、物理架橋を形成する際のシルク濃度および化学架橋を形成する際のシルク濃度が機械的物性に及ぼす影響を評価した。また、得られたゲルは島津社製卓上試験機(EZ-LX HS)により圧縮強度を測定した。

物理架橋から成るシルクゲルを調製する際に、シルクナノ粒子を加えることで、シルクナノ粒子を含有するシルクハイドロゲルを調製した。また、ペクチン水溶液をシルク水溶液と混合して、貧溶媒によりゲル化することで、相分離系のハイドロゲルを調製した。

4. 研究成果

シルクゲルの圧縮強度を測定した結果、圧縮強度は物理架橋のシルク濃度に依存し、シルク濃度が高くなるにつれて圧縮強度は増加した。ペクチンとシルクが水溶液中で共存する場合、シルク濃度が低いとペクチンと相分離する一方で、シルク濃度が比較的高いと、そう分離せずにゲル化することが明らかとなった。

物理架橋および化学架橋を調製するシルク濃度が比較的高い場合(6.8wt%程度)は、物理架橋のみで構成されたシルクゲルと、物理架橋および化学架橋の2種の架橋で構成されたシルクゲルの応力変化に有意差は見られなかった。しかし、物理架橋のシルク濃度が比較的低い条件(4wt%程度)では、物理架橋のみで構成されたシルクゲルに比べ2種類の架橋で構成されたシルクゲルの圧縮強度が高くなる傾向が確認された。これらの結果から、物理架橋の濃度に依存して、化学架橋により形成されたネットワークの有効網目としての役割が決まると考えられた。

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5件)

1. 査読有り Keiji Numata*, Ryota Sato, Kenjiro Yazawa, Takaaki Hikima, Hiroyasu Masunaga. Crystal structure and physical

properties of *Antheraea yamamai* silk fibers: long poly(alanine) sequences are partially in crystalline region. *Polymer*, Volume 77, pp87-94, **2015**.

2. 査読有り Keiji Numata*, Hiroyasu Masunaga, Takaaki Hikima, Sono Sasaki, Kazuhide Sekiyama, Masaki Takata. Use of extension-deformation-based crystallization of silk fibres to differentiate their functions in nature. *Soft Matter*, Volume 11, pp6335-6342, **2015**.
3. 査読有り Keiji Numata*. Poly(amino acid)s/polypeptides as potential functional and structural materials (Invited Focus review). *Polymer Journal* Volume 47 Issue 8, pp537-545, **2015**.
4. 査読有り Keiji Numata*, Shoya Yamazaki, Jo-Ann Chuah, Takuya Katashima, Naofumi Naga, Takamasa Sakai. Silk-Pectin Hydrogel with Superior Mechanical Properties, Biodegradability, and Biocompatibility. *Macromolecular Bioscience*, Volume 14, Issue 6, pp799-806, **2014 (Back cover)**.
5. 査読有り Keiji Numata*, Shoya Yamazaki, Naofumi Naga. Biocompatible and Biodegradable Dual-Drug Release System Based on Silk Hydrogel Containing Silk Nanoparticles. *Biomacromolecules*, Volume 13, Issue 5, pp1383-1389, **2012** (Most read paper between April and June 2012).

〔学会発表〕(計 10 件)

1. ○Keiji Numata. Chemoenzymatic synthesis and material design of polypeptides. The 3rd International Symposium for Green-Innovation Polymers (GRIP2016), JAIST, March 4th, 2016 (石川県能美市).
2. ○沼田圭司、アミノ酸から構成される高分子の合成および構造材料への展開、高分子学会埼玉地区懇話会、リンテック(株)大会議場、2016年1月22日(埼

玉県蕨市)。

3. ○Keiji Numata. Potential as structural materials and chemo-enzymatic synthesis of poly(amino acid), Pacificchem2015, Hawaii, U.S.A, December 18, 2015.
4. ○沼田圭司、佐藤涼太、増永啓康、引間孝明、*Antheraea yamamai* シルクの結晶構造とその機械的および熱的性質に関する研究、第 64 回高分子学会討論会、東北大学、2015 年 9 月 17 (宮城県仙台市)。
5. ○Keiji Numata. Silk and Related Peptides as Structural Materials, 5TH MOLECULAR MATERIALS MEETING (M3) @ SINGAPORE, August 3, 2015.
6. ○Keiji Numata. Can we use polypeptides as structural and functional materials? Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden, May 22nd, 2015.
7. ○Keiji Numata. Structural analysis of silk fibers and importance of the beta-sheet formation. International Silk Conference, Fudan University, Shanghai, China, October 8th, 2014.
8. ○沼田圭司、増永啓康、引間孝明、クモ糸およびカイコ由来シルクの延伸過程における結晶構造解析、第 63 回高分子学会年次大会、名古屋国際会議場、2014 年 5 月 30 日(愛知県名古屋市)。
9. ○Keiji Numata. Silk hydrogel with high strength and biocompatibility. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society – Asia Pacific Chapter (TERMIS-AP) 2013 annual conference, Shanghai and Wuzhen, PR China, 25 October 2013.
10. Keiji Numata, Plant cell wall-inspired silk hydrogel for dual drug release, *Gordon Research Conference Macromolecular Materials*, Venture, USA, 7-8 January 2013.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ

<http://enzyme.riken.jp/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

沼田 圭司（Numata Keiji）

理化学研究所 環境資源科学研究センター

酵素研究チーム

チームリーダー

研究者番号：40584529

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し