

令和元年6月5日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18250

研究課題名(和文) ペプチドゲル中での生体模倣型ミネラリゼーションによる有機-無機複合材料の構築

研究課題名(英文) Fabrication of organic-inorganic hybrid materials by biomimetic mineralization in peptide hydrogel

研究代表者

村井 一喜 (Murai, Kazuki)

信州大学・繊維学部・助教(特定雇用)

研究者番号：30756268

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)：本研究においてハイドロゲル中のペプチドの加水分解速度は、ゲルの弾性率の上昇とともに減少する相関が見られた。また、ペプチドネットワーク間の架橋度が低い系においては、ミネラリゼーションによりペプチドと類似したナノファイバー状の炭酸カルシウムが鉱化し、架橋度の上昇によりナノファイバーとシート状構造を併せ持つモルフォロジーへ変化した。これらの結果は、鉱化する炭酸カルシウムの微細構造がペプチドゲルの力学特性に大きく影響を受けることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はペプチドの自己組織化を利用した3次元反応場およびミネラル源の自己供給能を付与したテンプレート上で炭酸カルシウムのミネラリゼーションを行い、無機物質の核形成および選択的結晶成長機構について検討した。このバイオミネラリゼーションの基礎的知見は、生物が一般的に行なっているバイオミネラルの構築機構の基礎原理を明らかとするのみならず、生物に倣う環境調和型製造プロセスによる機能性材料創製のためにも重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：Biom mineralization is fabrication process for biominerals having hierarchically organized structures at nanoscale under a mild condition. In this study, we investigated the mechanisms of nucleation and selective crystal growth of the calcium carbonate mineralized in the peptide hydrogel having self-supplied ability utilizing enzyme-like hydrolysis activity on urea. Hydrolysis reaction rate on urea of the peptide was decreased with the increase of the elastic modulus of the peptide gel. In a system with a low degree of cross-linking between the peptide networks, the mineralized calcium carbonate has nanofiber-like morphology, which was similar to the peptide network. Moreover, morphology of the mineralized calcium carbonate changed to a combination of nanofibers and sheet-like structure by increase of degree of cross-linking. These results suggest that the nanostructure of the mineralized calcium carbonate is greatly influenced by the mechanical properties of the peptide gel.

研究分野：界面化学

キーワード：ペプチドハイドロゲル ミネラリゼーション 炭酸カルシウム 有機無機複合材料

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨や貝殻などの硬組織は、バイオミネラリゼーションにより人工合成では達成できないナノレベルの秩序構造を有し、その構造に由来する優れた機能を発現している。これらの硬組織は、有機成分である生体高分子と無機成分であるカルシウム系セラミックス(炭酸カルシウムやリン酸カルシウム等)からなる有機無機複合材料であり、生物は自己組織化的に形成される3次元秩序反応場において常温常圧の穏やかな環境で生合成している。この生物に倣う微細構造および機能が制御された有機/無機複合材料の鈷化機構の解明は、環境調和型製造プロセスによる次世代の機能性材料創製のために重要な知見である。先行研究では、貝のバイオミネラル鈷化機構を模倣したミネラル源の自己供給能および無機成分の構造制御能を付与したペプチドテンプレートを用いて、炭酸カルシウムの核形成機構および選択的結晶成長機構について報告している(文献1)。しかし、生物がバイオミネラルを構築する反応場である3次元秩序構造体がミネラリゼーションの核形成および結晶成長機構に与える影響を十分議論できていない。

### 2. 研究の目的

研究背景においても述べたように、生物は生体高分子の自己組織化により形成された3次元秩序構造を無機成分構築のための反応場として用い、階層・配向・秩序構造が厳密に制御されたバイオミネラルを生合成している。バイオミネラルを構築する作用であるバイオミネラリゼーションは様々な研究によりその鈷化機構が明らかになりつつあるが(文献2)、いまだに未解明な課題も多く存在する。これらの課題を解決するために研究代表者は、タンパク質様の自己組織化による秩序構造体形成や機能発現が可能となるペプチドに注目している。このペプチドの自己組織化により、生体環境における3次元秩序反応場の構築に加え、酵素様活性に基づくミネラル源の自己供給能を兼ね備えるテンプレートの合成を可能とする。この新規テンプレートは、従来の研究では明らかにできなかった生体組織に類似した反応場でのミネラリゼーションによる炭酸カルシウムの核形成および結晶成長を評価可能とする。そこで本研究課題では、ペプチドの自己組織化を利用した水ゲル形成(3次元反応場の構築)とアミノ酸側鎖官能基ペア間の協調効果による尿素に対する加水分解活性によるミネラル源の自己供給能を併せ持つペプチドテンプレート上の炭酸カルシウムのミネラリゼーションを行い、有機無機複合構造および鈷化機構の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

先行研究で得られた尿素に対して加水分解活性を発現するアミノ酸配列(文献1)および、 $\beta$ -シートの自己組織化に基づく水ゲル形成能を付与するために $\beta$ -シート型ペプチド[Ac-(VHVEVS)<sub>3</sub>-CONH<sub>2</sub>]を固相法により合成した。ペプチド水ゲルはペプチド水溶液を pH7.4 に調整し、ペプチドネットワークの架橋剤として機能するカルシウムイオンを含む水溶液を加えることで行なった。ペプチドゲルの作製後、炭酸イオンの前駆体である尿素をゲル中心部にシリンジを用いて注入し、室温で7日間静置することで尿素の加水分解および炭酸カルシウムの生体模倣型ミネラリゼーションを行なった。得られた炭酸カルシウム/ペプチド複合ゲル中における各成分のモルフォロジーおよび結晶相は、透過型電子顕微鏡(TEM)、電子線回折および走査電子誘電率顕微鏡(SE-ADM)を用いて観察した。

### 4. 研究成果

#### (VHVEVS)<sub>3</sub>ペプチドゲルの尿素に対する加水分解活性

本研究では、異なるカルシウム架橋率([Ca<sup>2+</sup>]/[COO<sup>-</sup>]= 0.05, 0.125, 0.175 および 0.250)を有するペプチドゲルを作製し、全ての系において無色透明な水ゲルが形成された(図1)。この水ゲルを構成するペプチドの二次構造は、赤外分光スペクトル解析より、 $\beta$ -シートが主であることを明らかとした。加えて、ペプチドがカルシウムにより架橋された場合に生じる COO<sup>-</sup>の吸収スペクトルが確認された。この COO<sup>-</sup>の吸収スペクトルの吸光度はカルシウム濃度の上昇に比例した上昇は得られず、架橋度([Ca<sup>2+</sup>]/[COO<sup>-</sup>])が 0.175 以上では一定の吸光度であった。この結果は、ペプチド側鎖カルボキシル基がカルシウムイオンのみならず、ペプチドを構成するアミノ酸の一種であるヒスチジンの側鎖イミダゾール基とも静電相互作用を生じているためであると考えられる。水ゲル中のペプチドネットワークのモルフォロジーは、凍結乾燥などの前処理を必要とせず、ウェットな環境下におけるネットワークの状態を直接観察可能な SE-ADM 観察手法を用いて行なった。ペプチドネットワークのモルフォロジーは、SE-ADM 観察よりファイバー径が 10 nm 未満のナノファイバーであった(図2)。ペプチドネットワーク径は、架橋剤であるカルシウムイオン濃度の上昇とともに増大した。これは水ゲル中のカルシウムイオン濃度の上昇に伴い、ネットワーク間の架橋度が上昇したためにペプチドの凝集を誘起したことを示唆する。また、カルシウムイオン濃度は、ネットワーク径以外にもペプチドゲルの弾性率の上昇を誘起した。この結果は、ペプチドネットワーク間の架橋度の上昇を支持する。

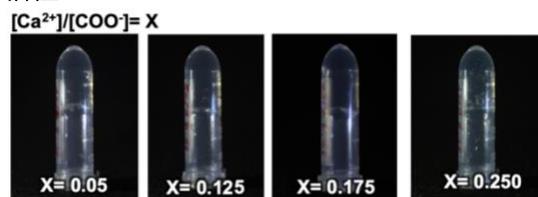


図1 各架橋度で作製したペプチド水ゲル。

本研究課題で設計・合成したペプチドの一次構造には、尿素に対して加水分解活性を発現するアミノ酸配列(VHVEVS)を含んでおり、同反応をミネラル化のためのミネラル源供給機構としてデザインしている。作製したペプチドは水溶液またはハイドロゲルの両系において、尿素に対する加水分解活性を発現することを確認した(図 3)。このペプチドゲル中での尿素の加水分解速度はカルシウムイオン濃度の上昇、つまりペプチドゲルの弾性率の上昇とともに低下し、ペプチドゲルの弾性率が一定となる架橋度( $[Ca^{2+}]/[COO^-]=0.175$ )以上では一定の値を示した。これはペプチドゲルの弾性率の上昇により、ハイドロゲル中に溶解している基質である尿素の拡散速度の減少を誘起し、結果としてペプチドと尿素間の接触頻度が減少したためであると考えられる。そのため、この結果は、炭酸カルシウムのミネラル源である炭酸イオンの供給速度を任意の値に制御できる可能性を示唆する。

### ペプチドネットワーク上での $CaCO_3$ の選択的核形成と結晶成長機構

ミネラル源の自己供給機構とペプチドの自己組織化により構築される3次元反応場における生体模倣型ミネラル

リゼーションは、カルシウムイオン濃度により異なるモルフォロジーの炭酸カルシウムを鉱化した。低カルシウムイオン濃度域、つまり架橋度が小さくて低い弾性率を示すペプチドゲル系では、ペプチドネットワーク上での選択的な炭酸カルシウムの鉱化が生じ、そのモルフォロジーはペプチドに類似したナノファイバーの集合体であった(図 4)。ミネラル化により鉱化する炭酸カルシウムのモルフォロジーは、カルシウムイオン濃度の上昇とともにナノファイバーからナノファイバーに加えてシート状へと変化した。また、得られたナノファイバーのファイバー径は、カルシウムイオン濃度の上昇とともに増大することがわかった。次に電子線回折パターンより、鉱化した炭酸カルシウムの結晶構造について評価した。低い架橋度(0.05 および 0.125)の系において炭酸カルシウムの結晶相は、熱力学的に準安定相であるアラゴナイトのみが選択的に成長していた。また、カルシウムイオン濃度の上昇に伴い、アラゴナイトのみならずカルサイト相の成長が確認された。このペプチドファイバー近傍における選択的な炭酸カルシウムの核形成および結晶成長は、以下のように説明することができる。炭酸カルシウムのミネラル源のカルシウムイオンは、ペプチド中の Glu 側鎖カルボキシル基上に静電相互作用により捕捉されている。その一方、炭酸イオンは、ペプチドネットワーク表面上での加水分解により生成される。これは、各ミネラル源がペプチドネットワーク近傍の局所部位において高い濃度で存在していることを示唆する。そのため、ペプチドネットワーク近傍において炭酸カルシウムが不均一核形成的に鉱化することでテンプレートに類似したモルフォロジーであるナノファイバーに構造規制されたと考えられる。高いカルシウムイオン濃度系においては、ネットワーク間でも徐々にミネラル化が生じることで、ナノファイバーのみならずシート状の炭酸カルシウムが鉱化したと考えられる。ペプチドゲルは、炭酸カルシウムのミネラル化により無色透明から白色のハイドロゲルへの状態変化が確認されたが、ゲルの崩壊は確認されなかった。

本研究課題の総括として、ペプチドの自己組織化による3次元反応場での生体模倣型ミネラル化により鉱化する炭酸カルシウムの核形成および結晶成長機構に関する基礎的知見を得た。本課題で得られた成果は、生物に倣う環境調和型製造プロセスによる機能性生体材料開発のための重要な基礎的知見となり、さらなる技術発展を促すと期待している。

参考文献

1. K. Murai, M. Higuchi, T. Kinoshita, K. Nagata, K. Kato, "Calcium carbonate biomaterialization utilizing a multifunctional  $\beta$ -sheet peptide template", *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 9947.

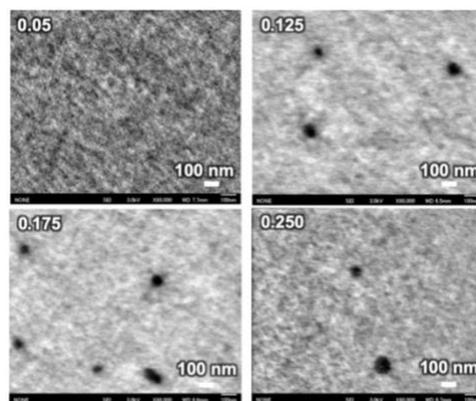


図 2 ハイドロゲル中のペプチドネットワークのSE-ADM像。

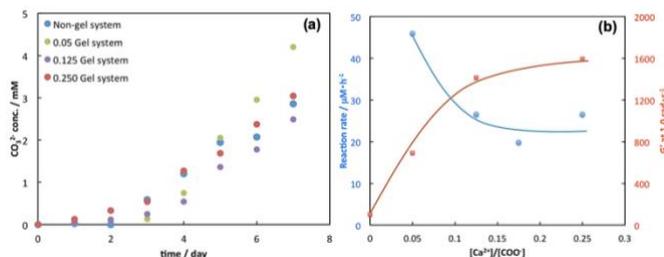


図 3 (a)各系における尿素の加水分解活性と(b)反応速度と貯蔵弾性率間での相関。

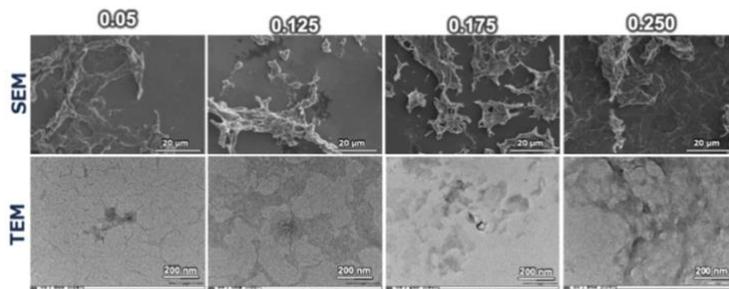


図 4 生体模倣型ミネラル化により鉱化した炭酸カルシウムのSEMおよびTEM像。

2. A. Dey, G. With, N. A. J. M. Sommerdijk, "In situ techniques in biomimetic mineralization studies of calcium carbonate", *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 397.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. 村井一喜, "ペプチド界面を利用したミネラルゼーションによる無機物質の構造制御", *C. & I. Commun.*, **2018**, 43, 29-32. (査読あり)
2. S. Watanabe, M. Fujisaki, K. Murai, M. Matsumoto, "Superhydrophobic Surface on Phase-separated Nanostructures of Polystyrene/Polymethyl Methacrylate Films Fabricated by the Double-Spray Technique", *J. Oleo Sci.*, **2018**, 67, 1101-1105. (査読あり)
3. J. Koyanagi, K. Takeguchi, K. Murai, H. Furue, N. Masuda, "Monte Carlo Simulations for Blue-Phase Structure in Liquid Crystals", *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **2017**, 656, 54-65. (査読あり)
4. K. Murai, K. Kurumisawa, Y. Nomura, M. Matsumoto, "Regulated Drug Release Abilities of Calcium Carbonate-Gelatin Hybrid Nanocarriers Fabricated via a Self-Organizational Process", *ChemMedChem*, **2017**, 12, 1595-1599. (査読あり)
5. K. Murai, Y. Yamamoto, T. Kinoshita, K. Nagata, M. Higuchi, "Self-bonding and the electrochemical properties of silica-coated nanowires composed of cobalt-coordinated peptide bundles", *J. Mater. Chem. B*, **2017**, 5, 5539-5548. (査読あり)
6. K. Murai, T. Kinoshita, K. Nagata, M. Higuchi, "Mineralization of Calcium Carbonate on Multifunctional Peptide Assembly Acting as Mineral Source Supplier and Template", *Langmuir*, **2016**, 32, 9351-9359. (査読あり)

[学会発表] (計 29 件)

1. 村井一喜, 磯辺寛人, 鳥越幹二郎, 西尾圭史, 松本睦良, 「ペプチドゲル界面を選択的反応場とするリン酸カルシウムのミネラルゼーション」, 第 137 回無機マテリアル学会学術講演会, 穂の国とよはし芸術劇場 PLAT, 2018. 11.
2. 村井一喜, 「多機能性ペプチドによる二次元または三次元反応場での生体模倣型ミネラルゼーション」, 第 67 回高分子学会年次大会, 名古屋国際会議場, 2018. 5.
3. 村井一喜, 船水陽介, 小椋俊彦, 西尾圭史, 松本睦良, 「ペプチドハイドロゲルを三次元反応場とする炭酸カルシウムの生体模倣型ミネラルゼーション」, 第 135 回無機マテリアル学会学術講演会, 熊本市国際交流会館, 2017. 11.
4. 磯辺寛人, 村井一喜, 鳥越幹二郎, 松本睦良, 「異なる電荷を有するペプチドハイドロゲル界面でのリン酸カルシウムのミネラルゼーション」, 第 66 回高分子討論会, 愛媛大学, 2017. 9.
5. 村井一喜, 船水陽介, 松本睦良, 「多機能性ペプチドハイドロゲル中での生体模倣型ミネラルゼーションによる炭酸カルシウムの形成」, 日本セラミックス協会 2017 年年会, 日本大学, 2017. 3.
6. K. Murai, T. Tomozoe, K. Horiba, Y. Nomura, M. Matsumoto, "Control of functional property of TiO<sub>2</sub> by mineralization utilizing biomolecule", 16<sup>th</sup> Australasian Bioceramics Symposium, Queensland University of Technology, Brisbane Australia, 2016. 12. 他

[その他]

1. 村井一喜, "“バイオマテリアル”による可能性”, バイオマテリアル-生体材料-, 2017, 35, 184.
2. *Journal of Materials Chemistry B* 誌のバックカバーとして採択 (雑誌論文 2)
3. *ChemMedChem* 誌のバックカバーとして採択 (雑誌論文 3)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。