

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (A)
 研究期間：2006 ～ 2008
 課題番号：18686065
 研究課題名 (和文) セラミックスナノアセンブリ構造体の創生を指向したペプチド・蛋白質の工学的機能拡張

研究課題名 (英文) Peptide and protein engineering for spontaneous assembly of ceramic nanocrystals

研究代表者

梅津 光央 (UMETSU MITSUO)
 東北大学・大学院工学研究科・准教授
 研究者番号：70333846

研究成果の概要：

ファインセラミックスは多くの光・電子デバイスに使われている重要な金属酸化物であり、至適なナノアセンブリ構造体を構築することによる新規機能の発現が期待されている。その中で、高分子の持つ自己秩序化能を用いたナノ材料アセンブリの開発が、高速・大面積・低欠陥性が要求される産業化に最も近い方法論の一つであると言われている。本研究では、研究代表者がこれまで蓄積した蛋白質リフォールディング・アセンブリ操作技術と *in-vitro* バイオミネラリゼーション技術を組み合わせ、生体・有機分子に最適な室温かつ温和な条件下で、至適有機-無機ハイブリッドナノアセンブリ構造体を創生する基盤技術の構築を目指した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2007 年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2008 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
年度			
年度			
総計	23,000,000	6,900,000	29,900,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学, 生体機能・バイオプロセス

キーワード：ペプチド, ファージ提示法, セラミックス, ナノアセンブリ, 分子認識

1. 研究開始当初の背景

ファインセラミックスは多くの光・電子デバイスに使われている重要な材質であり、至適なナノアセンブリ構造体を構築することによる新規機能の発現と新規ナノデバイス

構築が期待されている。その中で、高分子の持つ自己秩序化能を用いたナノ材料アセンブリの開発が、高速・大面積・低欠陥性が要求される産業化に最も近い方法論の一つであると言われている。しかし、金属酸化物合成場は高温・強酸性等の有機材料にとって不

適な環境であり、ナノ材料合成後、凝集させることなく高分子を利用してアセンブルすることが困難である。

その解決策として研究代表者は、生体内で金属イオンが鉱物(セラミックス)化するバイオミネラリゼーション現象に着目した。バイオミネラリゼーションでは、ペプチド・蛋白質が室温かつ中性水溶液中で金属イオンをセラミックス化する。さらに、そのセラミックス化は、鉱物の結晶成長を自在に制御し、ナノからセンチレベルまで至適な骨格構造を構築されており、有機-無機ハイブリッド材料作成に非常に魅力的な無機材料合成系である。そこで研究代表者は、ペプチド・蛋白質のミネラリゼーション機能と多彩な自己組織化機能とを組み合わせることによって、至適なナノハイブリッドアセンブリ構造体を作成することを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者がこれまで蓄積した蛋白質リフォールディング・アセンブリ操作技術と *in-vitro* バイオミネラリゼーション技術を組み合わせ、おだやかな温度・水溶液環境下で目的セラミックスを合成し、至適なナノアセンブリ構造体を形成するペプチド・蛋白質をコンビナトリアル的に創製する手法の構築を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ファージ提示法を用いた鉱物認識ペプチドの選択と新規ライブラリーの作成

ファージペプチドライブラリーを用いて、各々異なる等電点を持つセラミックスに特異的に結合するペプチド配列を検索する。

(2) 鉱物認識ペプチドの定量的活性評価と認識機構の解明

取得したペプチドを緑色蛍光蛋白質と融合発現させ、蛍光検出による定量的活性評価を行う。

(3) 蛋白質との融合による鉱物材料の積層化

取得した材料結合性ペプチド・蛋白質を用いて無機材料粒子の積層化を行った。

(4) 鉱物認識ペプチドを用いた鉱物合成

取得したペプチドを各々の鉱物合成系に添加することによって、合成される鉱物の構造を変化させる。

4. 研究成果

(1) ファージ提示法を用いた鉱物認識ペプチドの選択と新規ライブラリーの作成

既存のファージペプチドライブラリーを用いて、各々異なる等電点を持つセラミックスの各々に、特異的に結合するペプチド配列を検索し、希土類酸化物やリン酸カルシウム系に関してペプチドの選択に成功した。また、組成ではなく、結晶構造が異なるセラミックスに対しても、ファージ提示法を用いてペプチドの検索を行ったところ、選択されてくるペプチドが異なり、結晶構造もペプチド選択に非常に重要な要因であることが確認された。さらに、ファージ提示法でのファージ抽出操作を変えることによる選択されるペプチドの変化を評価した。その結果、抽出操作でもペプチド選択性が変化することが示唆された。

(2) 鉱物認識ペプチドの定量的活性評価と認識機構の解明

検索されたペプチドを緑色蛍光蛋白質と融合発現させ、蛍光検出による定量的活性評価を行った。定量的活性評価は、まず認識ペプチド部位に変異を導入して、結合に必要な最小のペプチド配列を明らかにした (Fig. 1)。その結果、セラミックスの認識自体は、アミノ酸4残基程度でも機能するが、強い親和性も保持するには、7残基程度必要であることがわかった。また、ペプチドのセラミックスへの結合は、アニオン分子と競合し、局所的な静電的相互作用が結合要素であることが示唆された。ラングミュアプロットを用いた定量的評価から、その結合はエンタルピー依存的事であることも確認できた (Fig. 2)。

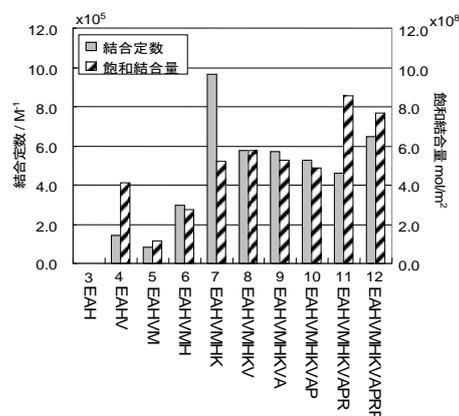


Fig.1 4~12 残基のペプチドの ZnO 粒子に対する結合定数と飽和結合量

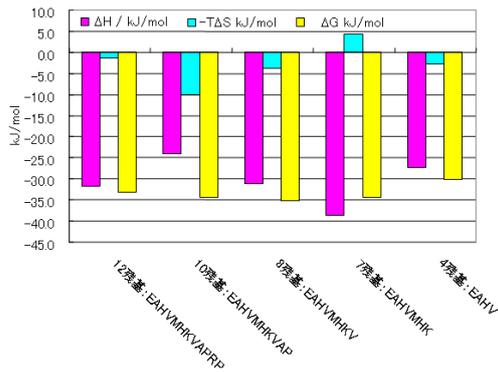


Fig.2 ペプチド融合 GFP の吸着エネルギー変化

(3) 蛋白質との融合による鋳物材料の積層化

これまで取得に成功してきた材料認識ペプチドを抗体分子の相補性決定領域に移植し成熟操作をすることによって、ペプチドを凌駕する酸化亜鉛・酸化アルミナ・酸化コバルトに高親和性な蛋白質を作成することに成功した。さらに、その抗体同士を融合させて、基板上へ基板と異なった材質のナノ粒子を積層化した (Fig. 3)。また、材料高親和性な抗体を用いて、ナノ粒子の高分散化を行い、さらに、二重特異性抗体を作製し、ナノ粒子間を接合させることができた (Fig. 4)。

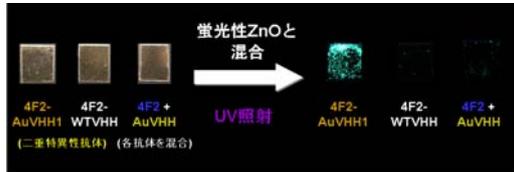


Fig. 3 金プレートをを用いた二重特異性試験

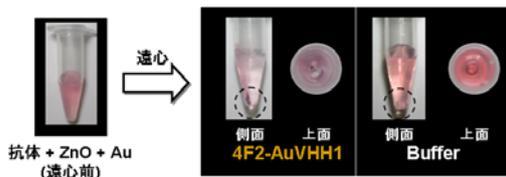


Fig. 4 ZnO, Au 粒子凝集阻害試験

また、量子ドット表面への生分解性プラスチック結合性抗体断片を固定化し、その粒子を含んだ水溶液に金板上のプラスチック薄膜を浸し、生分解性プラスチック結合性抗体断片を介したプラスチック薄膜への量子ドット固定化を量子ドット由来の発光により評価した (Fig. 5)。まず、結合性抗体断片を提示していない量子ドットのみを金板と

プラスチック薄膜に相互作用させた場合、量子ドットは金板、プラスチック薄膜の両方にほとんど固定化されなかった。一方、抗体断片を提示した量子ドットは、プラスチック薄膜のみに吸着した。これより、プラスチックへ特異的に結合する抗体断片が接合分子として機能し、量子ドットがプラスチック薄膜上へ選択的に固定化されたためと言える。

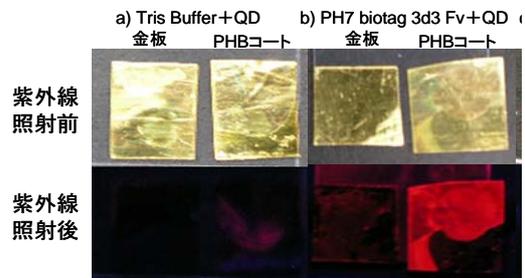


Fig.5 プラスチック (PHB) 薄膜への量子ドット集積化

(4) 鋳物認識ペプチドを用いた鋳物合成

(2)により検出したセラミックス結合性ペプチドの材料結合特性を利用して、対応する無機材料の合成場に、そのペプチドを添加あすることによって、合成材料の形状を変化させることに成功した (Fig. 6)。水酸化亜鉛から加熱することによって脱水反応を誘導し酸化亜鉛を合成する系に、酸化亜鉛結合性ペプチドを添加した場合、ペプチドの添加量に比例して、酸化亜鉛粒子の形状が針状から立方体上へ変化した。さらに合成場の環境パラメータである温度、pH、酸化還元、乾燥度を変化させてもさらに形状が変化することも分かった。これより、材料結合性ペプチドを用いることによって材料の形態を変化させることがわかった。

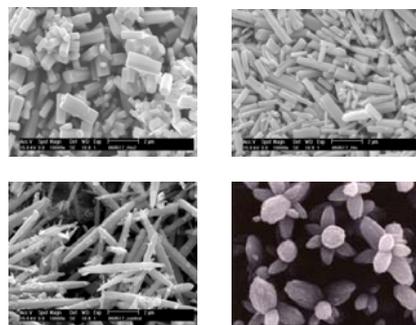


Fig.6 酸化亜鉛へ特異的に結合するペプチドを用いて作成した酸化亜鉛

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 26 件)

1. Hideki Watanabe, Takeshi Nakanishi, Mitsuo Umetsu, and Izumi Kumagai, "Human anti-gold antibodies: Bio-functionalization of gold nanoparticles and surfaces with anti-gold antibodies", *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 36031-36038 (2008) 査読有
2. Mitsuo Umetsu, Takamitsu Hattori, Shinsuke Kikuchi, Itsuki Muto, Takeshi Nakanishi, Hideki Watanabe, and Izumi Kumagai, "Nanoparticles with affinity for biopolymer - Bio-assisted room-temperature selective multistacking of inorganic particles on biopolymer film -", *Journal of Materials Research*, 23, 3241-3246 (2008) 査読有
3. Asano R., Kawaguchi H., Watanabe Y., Nakanishi T., Umetsu M., Hayashi H., Katayose Y., Unno M., Kudo T., Kumagai I., "Diabody-based recombinant formats of humanized IgG-like bispecific antibody with effective retargeting of lymphocytes to tumor cells", *J. Immunother*, 31, 752-761 (2008) 査読有
4. Ryutaro Asano, Yukiko Sone, Keiko Ikoma, Hiroki Hayashi, Takeshi Nakanishi, Mitsuo Umetsu, Yu Katayose, Michiaki Unno, Toshio Kudo, and Izumi Kumagai, "Preferential heterodimerization of a bispecific diabody based on a humanized anti-EGFR antibody 528", *Protein Engineering Design & Selection.*, 10, 597-603 (2008) 査読有
5. Yoshiharu Hatakeyama, Mitsuo Umetsu, Satoshi Ohara, Fumihiko Kawadai, Seiichi Takami, Takashi Naka, and Tadafumi Adschiri, "Homogenous Spherical Mosslike Assembly of Pd Nanoparticles by using DNA Compaction -Application of Pd-DNA Hybrid Materials to Volume-Expansion Hydrogen Switches-", *Advanced Materials*, 20, 1122-1128 (2008) 査読有
6. Yoshiharu Hatakeyama, Mitsuo Umetsu, Masahiro Minami, Satoshi Ohara, Seiichi Takami, Tadafumi Adschiri, "Temperature control for the expansion of artificial DNA motif", *Journal of Materials Science*, 43, 2426-2430 (2008) 査読有
7. Satoshi Ohara, Tahereh Mousavand, Takafumi Sasaki, Mitsuo Umetsu, Takashi Naka, and Tadafumi Adschiri, "Continuous Production of Fine Zinc Oxide Nanorods by Hydrothermal Synthesis in Supercritical Water", *Journal of Materials Science*, 43, 2393-2396 (2008) 査読有
8. Dinesh Rangappa, Satoshi Ohara, Mitsuo Umetsu, Takashi Naka and Tadafumi Adschiri, "Synthesis, characterization and organic modification of copper manganese oxide nanocrystals under supercritical water", *The Journal of Supercritical Fluids*, 44, 441-445 (2008) 査読有
9. Kazuhide Okuda, Satoshi Ohara, Mitsuo Umetsu, Seiichi Takami, and Tadafumi Adschiri, "Disassembly of Lignin and Chemical Recovery in Supercritical water and p-cresol Mixture -Studies on Lignin Model Compounds-", *Bioresource Technology*, 99, 1846-1852 (2008) 査読有
10. Koki Makabe, Takeshi Nakanishi, Kouhei Tsumoto, Yoshikazu Tanaka, Hidemasa Kondo, Mitsuo Umetsu, Yukiko Sone, Ryutaro Asano, and Izumi Kumagai, "Thermodynamic consequences of mutations in Vernier zone residues of a humanized anti-human epidermal growth factor receptor (EGFR) murine antibody, 528", *The Journal of Biological Chemistry* 283, 1156-1166, (2008) 査読有
11. Takamitsu Hattori, Mitsuo Umetsu, Takeshi Nakanishi, Kouhei Tsumoto, Satoshi Ohara, Hiroya Abe, Makio Naito, Ryutaro Asano, Tadafumi Adschiri, and Izumi Kumagai, "Grafting of Material-binding Function into Antibodies -Functionalization by Peptide Grafting-", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 365, 751-757 (2008) 査読有
12. Ryutaro Asano, Yasuhiro Watanabe, Hiroko Kawaguchi, Hidesuke Fukazawa, Takeshi Nakanishi, Mitsuo Umetsu, Kouhei Tsumoto, Hiroki Hayashi, Yu Katayose, Michiaki Unno, Toshio Kudo, and Izumi Kumagai, "Highly effective recombinant format of humanized IgG-like bispecific antibody for cancer immunotherapy with retargeting of lymphocytes to tumor cells", *The Journal of Biological Chemistry*, 282,

- 27659-27665 (2007) 査読有
13. Seiichi Takami, Teruyuki Sato, Tahereh Mousavand, Satoshi Ohara, Mitsuo Umetsu, and Tadafumi Adschiri, "Hydrothermal Synthesis of Surface-modified Iron Oxide Nanoparticles", *Materials Letters*, 61, 4769-4772 (2007) 査読有
 14. Mehrnoosh Atashfaraz, Mojtaba Shariaty-Niassar, Satoshi Ohara, Kimitaka Minami, Mitsuo Umetsu, Takashi Naka, and Tadafumi Adschiri, "Effect of titanium dioxide solubility on the formation of BaTiO₃ nanoparticles in supercritical water", *Fluid Phase Equilibria*, 257, 233-237 (2007) 査読有
 15. Tahereh Mousavand, Jing Zhang, Satoshi Ohara, Mitsuo Umetsu, Takashi Naka and Tadafumi Adschiri, "Organic-ligand-assisted supercritical hydrothermal synthesis of titanium oxide nanocrystals leading to perfectly dispersed titanium oxide nanoparticle in organic phase", *Journal of Nanoparticle Research*, 9, 1067-1071 (2007) 査読有
 16. Hideki Watanabe, Kouhei Tsumoto, Seiichi Taguchi, Koichi Yamashita, Yoshiharu Doi, Yoshiyuki Nishimiya, Hidemasa Kondo, Mitsuo Umetsu, and Izumi Kumagai, "A human antibody fragment with high affinity for biodegradable polymer film", *Bioconjugate Chemistry* 18, 645-651 (2007) 査読有
 17. Tahereh Mousavand, Satoshi Ohara, Mitsuo Umetsu, Jing Zhang, Seiichi Takami, Takashi Naka, and Tadafumi Adschiri, Hydrothermal synthesis and in-situ surface modification of boehmite nanoparticles in supercritical water, *The Journal of Supercritical Fluids* 40, 397-401 (2007) 査読有
 18. 大原 智, 林 直樹, 張 静, 梅津 光央, 名嘉 節, 阿尻 雅文, 超臨海水熱法による有機-無機ハイブリッドナノ粒子の合成, 粉体および粉末冶金, 54, 48-51 (2007) 査読有
 19. Jing Zhang, Satoshi Ohara, Mitsuo Umetsu, Takashi Naka, Yoshiharu Hatakeyama, Tadafumi Adschiri, "Colloidal Ceria Nanocrystals: A Tailor-made Crystal Morphology in Supercritical Water", *Advanced Materials* 19, 203-206 (2007) 査読有
 20. Tahereh Mousavand, Seiichi Takami, Satoshi Ohara, Mitsuo Umetsu, Takashi Naka, and Tadafumi Adschiri, "In Situ Surface Modification of AlOOH Nanoparticles in Supercritical Water", *International Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 1, 85-89 (2007) 査読有
 21. Hiroki Oguri, Shintaro Tanabe, Akifumi Oomura, Mitsuo Umetsu, and Masahiro Hirama, "Synthesis and evaluation of α -helix mimetics based on a trans-fused polycyclic ether: sequence-selective binding to aspartate pairs in α -helical peptides", *Tetrahedron Letters*, 47, 5801-5805 (2006) 査読有
 22. 佐々木隆史、大原智、梅津光央、名嘉節、阿尻雅文、鍋田千賀、市川秀喜、福森義信、"超臨界水熱法によるGd中性子捕捉療法用新規無機ナノ粒子の調製", 粉体工学会誌, 43, 440-444 (2006) 査読有
 23. Mitsuo Umetsu, Xin Man, Kazuhide Okuda, Mousavand Tahereh, Satoshi Ohara, Jing Zhang, Seiichi Takami and Tadafumi Adschiri, Biomass-assisted Hydrothermal Synthesis of Ceria Nanoparticle - A New Application of Lignin as a Bio-nanopool -, *Chemistry Letters*, 35, 732-733 (2006) 査読有
 24. Takanari Togashi, Mitsuo Umetsu, Hiroyuki Tsuchizaki, Satoshi Ohara, Takashi Naka, and Tadafumi Adschiri, "Simultaneous Synthesis and Self-assembly of Cyclic Diphenyl- alanine at Hydrothermal Condition", *Chemistry Letters*, 35, 636-637 (2006) 査読有
 25. Tahereh Mousavand, Seiichi Takami, Mitsuo Umetsu, Satoshi Ohara, and Tadafumi Adschiri, "Supercritical Hydrothermal Synthesis of Organic-Inorganic Hybrid Nanoparticles", *Journal of Materials Science*, 41, 1445-1448 (2006) 査読有
 26. Yokihiko Matsumura, Mitsuru Sasaki, Kazuhide Okuda, Seiichi Takami, Satoshi Ohara, Mitsuo Umetsu, and Tadafumi Adschiri, "Supercritical water treatment of biomass for energy and material recovery", *Combustion Science and Technology*, 178, 509-536 (2006) 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. Mitsuo Umetsu, HOMOGENOUS SPHERICAL MOSS-LIKE ASSEMBLY OF PD NANOCUSTER BY DNA COMPACTION, 6th Asian Biophysics Association Symposium 27th Hong Kong Society of Neurosciences Annual Meeting, Jan. 13, 2009, Hong Kong
2. Mitsuo Umetsu, Peptide and Antibody Engineering as Bio-Interface Molecules for Hybrid, Organic-Inorganic-Miomolecules Materials, The IUMRS International Conference in Asia 2008 (IUMRS-ICA 2008), Dec. 9, 2008, Nagoya
3. 梅津 光央, 会合機能ペプチドデザインによるビルドアップ抗体アセンブリ, 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム, 2008年9月20日, 横浜
4. Mitsuo Umetsu, Bio-assisted conformation control of inorganic materials by Peptide Engineering, European Peptide Symposium, Sep. 4, 2008, Helsinki
5. Mitsuo Umetsu, Peptide Engineering for Crystal Growth Control of Inorganic Materials, 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference, Jul. 3, 2008, Athens
6. Mitsuo Umetsu, Bio-assisted conformation control of inorganic materials by Peptide Engineering, 2nd WORKSHOP ON ANISOTROPIC SCIENCE AND TECHNOLOGY OF MATERIALS AND DEVICES, Jun. 23, 2008, Gebze, Turkey
7. 梅津 光央, 有機ポリマー特異的抗体を利用したナノ粒子機能化, 第30回分子生物学会年会, 2007年12月14日, 横浜
8. 梅津 光央, バルク材料高親和性なバイオインターフェースとしての抗体分子, 第18回日本MRS学術シンポジウム, 2007年12月8日, 東京
9. 梅津 光央, ポジティブスタート生体外選択法を用いた材料界面インターフェース抗体の作製, 化学工学会第72年会, 2007年3月19日, 京都
10. 梅津 光央, CDR移植法を用いた新規機能抗体の作製-材料認識抗体を中心に, 化学工学会第38回秋季大会, 2006年9月17日, 福岡

[図書] (計 3 件)

1. 梅津 光央, 『究極の粉をつくる』第8章 生物から学ぶ地球に優しい粉づくり, 171-191 (2008), 日刊工業新聞社
2. 梅津 光央, 『ナノバイオプロセス』第11章 セラミックス結合・合成ペプチド 104-111 (2008), シーエムシー出版
3. Mitsuo Umetsu, "Nanoparticle patterning by nanobiotechnology: Peptide", Editors: Masuo Hosokawa, Kiyoshi Nogi, Makio Naito, Toyokazu Yokoyama, Nanoparticle Technology Handbook, 182-187 (2007), Elsevier

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

1. 名称: 酸化亜鉛結合性抗体及びその用途
発明者: 梅津 光央, 熊谷 泉, 浅野 竜太郎, 中西 猛
権利者: 東北大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2008/052917
出願年月日: 2008年2月14日
国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ等

<http://www.che.tohoku.ac.jp/~kuma/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅津 光央 (UMETSU MITSUO)

東北大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 70333846

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし