

平成 21 年 6 月 17 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007-2008

課題番号：19710099

研究課題名（和文） 自己組織化ペプチドナノファイバーの微細構造チューニング

研究課題名（英文） Nanostructure Tuning of Self-assembled Peptide Nanofibers

研究代表者

古賀 智之 (KOGA TOMOYUKI)

同志社大学・理工学部・准教授

研究者番号：10388043

研究成果の概要：

ナノスケールの構造体を制御して構築する技術は、次世代高機能材料設計のための必須技術である。本研究では、人工ペプチドの精密設計に基づいて、自己組織的に形成されるナノファイバーの微細構造を制御する新しい分子システムの開発を行った。分子構造に由来する(a)疎水性相互作用(b)静電相互作用(c)分岐性(d)キラリティーと自己組織化特性との関連を明らかにし、超分子ナノファイバー設計の新たな指針を得ることに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノファイバー、自己組織化、ペプチド、ナノ材料、高次構造、ナノ構造制御

1. 研究開始当初の背景

ナノメートルオーダーの物質や構造を制御して構築する技術の確立は、ナノテクノロジー推進の基礎となる中心命題であり、次世代高機能材料を設計するための必須技術である。現在、材料や構造のダウンサイジングのアプローチは、主にレーザーリソグラフィに代表されるトップダウン型の方法と、原子・分子レベルでの組織化制御によりナノサイズの構造を創りだすボトムアップ法の二つに大別される。ボトムアップ法は従来のトップダウン型技術のサイズ限界を補う新手法として注

目されているものの、人間が意図した通りに組織化していくプロセスを体系化することが難しく、実用レベルには至らないのが現状である。一方、*in vivo*系においては様々な生体分子がその分子構造や外部因子に基づいて自己組織的にナノスケールの構造体へとビルドアップされ、生命現象を支える重要な機能を高効率で発現している。例えば、タンパク質がアミノ酸の一次構造に基づきペプチド鎖間に働く相互作用を正確に制御することで機能発現に必要な特定の立体構造を形成すること、また微小管に代表されるようにタン

パク質ユニットがさらに巧妙かつ厳密に集合し、より高次な組織構造を形成することなどは良い例である。

このような背景から研究代表者らは、分子素材としてポリペプチドに着目し、分子間相互作用の精密設計に基づく自己組織化制御：すなわち人工ペプチドをビルディングブロックとする“プログラム化された自己組織化技術”の開発と新規ナノ構造材料の創製を目指した。ポリペプチドはアミノ酸種の選択(組み合わせ)により合目的な機能設計に加え、高次構造を含めた明確な構造設計が可能となる。またペプチド末端や側鎖の化学修飾により容易に機能化できること、本質的に生分解性等を有することから環境調和型ナノバイオ材料として極めて有望な分子素材といえる。本研究では、特に β -シート構造をモチーフとするナノファイバー構造への自己組織化現象に焦点を合わせ、ペプチド一次構造の精密設計(相互作用様式/方向/強さ等を厳密に制御)により分子中に集合様式プログラム(特定条件下で特定構造への自己組織化)の書き込みを行い、その多様な集合プログラムに基づいてペプチドナノファイバーの微細構造チューニングを行うことを目指した。これまでも国内外の研究者によりタンパク質やペプチドの β -シート構造への自己組織化に関する研究が報告されている。しかしながら、ペプチド分子構造と自己組織化・ナノファイバーの微細構造との相関性については明らかにされておらず、ナノ構造形成に重要な因子の特定も行われていないのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究者のグループは、界面等を利用して独自にペプチド間に働く様々な相互作用に関する知見を蓄積してきた。これらの成果をもとに、ナノファイバー構造に自己組織化しやすいペプチド分子構造(アミノ酸配列)の特徴が見いだされてきた。特に疎水性 Leu ドメイン(4 量体)を親水性の Lys ペプチド鎖の両末端に組み込んだトリブロック型両親媒性オリゴペプチドが特定の pH 条件下で安定な β -シートフォルダマーとなること、またその際、疎水性相互作用と水素結合が自己集合駆動力として重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。本研究では、この研究成果を分子設計の基本概念として採用し、ペプチドナノファイバーへの自己組織化コントロールを目指し、(1)構成アミノ酸のキラリティーによる水素結合モードのチューニング(3D 形状および長さ制御)、(2)疎水性アミノ酸配列による疎水性相互作用のチューニング(ナノファイバー径制御)、(3)分岐型アミ

ノ酸配列によるナノファイバーの形状制御、(4)イオン性アミノ酸種の組み合わせ(親水性ドメインの等電点チューニング)によるナノファイバー形成条件の拡張を目指した。すなわち、様々な観点からペプチド分子の相互作用モードを精密設計し、ペプチドナノファイバーの微細構造チューニングという新しい発想のもと、超分子ナノファイバーを設計するための新たな方法論を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究で行った主たる研究の具体的な内容を以下に示す。

(1) 構成アミノ酸のキラリティーによる水素結合モードのチューニング

ペプチド間に働く水素結合様式をチューニングする因子として構成アミノ酸のキラリティーに着目し、表 1 に示すように Leu および Lys からなるトリブロック型配列を基本に、L-および D-アミノ酸を様々な組み合わせた 8 種類の両親媒性シーケンシャルペプチドを新規に分子設計・合成した。これらペプチドの水中におけるコンホメーション特性、自己組織化特性ならびにナノ集合構造を CD、FTIR、AFM を中心に評価した。

(2) 疎水性アミノ酸配列による β -シート間疎水性相互作用のチューニング

ナノファイバー構造の安定化には β -ストランド間の水素結合に加えて、 β -シート間のスタッキング(主として疎水性相互作用)も重要であると考えられる。そこで、ペプチド鎖の両末端に配した疎水性アミノ酸ドメインの種類を Leu から他の疎水性アミノ酸に変えた 4 種類のペプチド分子を新規に合成し、水中でのコンホメーション特性および自己組織化特性を CD および AFM を中心に評価した。

(3) 分岐型アミノ酸配列によるナノファイバーの形状制御

ナノファイバーの形状制御を目指して、 β -シート性ペプチド鎖に分岐構造を導入した三分岐型新規ペプチド(図 1a)を合成し、直鎖型ペプチドの自己組織化特性と比較した。分岐点としては Lys を採用し、自己組織化特性を CD、AFM、TEM を中心に評価した。

(4) イオン性アミノ酸種の組み合わせによるナノファイバー形成条件の拡張

過去の研究において、Leu および Lys をベースとするトリブロック型配列では、Lys 側鎖の pK_a 付近(pH 9.0)が最適なナノファイバー形成条件であることを明らかにしてきた

(*Chem. Eur. J.* **12**, 1360 (2006)). そこで、ペプチド分子の等電点をチューニングし、様々な pH 領域で自己組織化可能なアミノ酸配列を探索するために、親水性アミノ酸ドメインを酸性アミノ酸 (Glu) や Glu/Lys の組み合わせ配列とした種々のペプチドを新規に合成し、種々の pH の水中における自己組織化特性を CD、AFM を中心に評価した。

4. 研究成果

β -シート・ナノファイバーを自己組織的に形成することが知られる、疎水性のロイシン (L) と親水性のリシン (K) からなるトリブロック型ペプチド ($L_4K_8L_4$) のアミノ酸配列を基本に、様々な観点から分子構造をチューニングした各種人工ペプチドを新規に合成し、その自己組織化特性およびナノ構造を詳細に評価した。本研究で得られた主たる研究成果を以下にまとめる。

(1) 構成アミノ酸のキラリティーによる水素結合モードのチューニング

構成アミノ酸のキラリティーの異なる 8 種類の $L_4K_8L_4$ (表 1: グループ II, III) を Fmoc 固相合成法により新規に調製することに成功した。これらの水中 (pH 9) での自己集合特性を、過去に調製した同一キラリティーを有する 2 種類の $L_4K_8L_4$ と比較した。ペプチド **1-10** は、D/L-アミノ酸の配列によって次の 3 つのグループに分類される。すなわち、グループ I はすべて L または D 体のアミノ酸から、グループ II は L 体と D 体のアミノ酸がそれぞれ 8 個ずつから構成されており、グループ III は L 体と D 体の数が異なる。これまでに単一のキラリティーをもつ **1** および **2** は、pH 9.0 の水中において、それぞれ左巻きおよび右巻きにねじれた直径 5-6 nm のよく発達したナノファイバーに自己組織化することをすでに報告している。一方、**3-10** の自己組織化ナノ構造は、L-および D-アミノ酸の組み合わせにより著しく変化する (ファイバー状、球状、プレート状) ことがわかった。特に興味深いことに、L 体と D 体の数が異なる **3**、**9**、**10**

表1. 構成アミノ酸のキラリティーを種々に組み合わせたトリブロック型両親水性ペプチド

Groups	Peptides	Primary structures
I	1	LLLLKKKKKKKKLLLL
	2	L ₀ L ₀ L ₀ L ₀ K ₀ K ₀ K ₀ K ₀ K ₀ K ₀ K ₀ L ₀ L ₀ L ₀ L ₀
	3	LLLLK ₀ K ₀ K ₀ K ₀ K ₀ K ₀ K ₀ K ₀ LLLL
	4	L ₀ L ₀ L ₀ L ₀ KKKKKKKKL ₀ L ₀ L ₀ L ₀
II	5	L ₀ L ₀ L ₀ L ₀ K ₀ K ₀ K ₀ K ₀ KKKKLLLL
	6	LLLLKKKKK ₀ K ₀ K ₀ K ₀ L ₀ L ₀ L ₀ L ₀
	7	L ₀ LL ₀ LK ₀ KK ₀ KK ₀ KK ₀ KL ₀ LL ₀ L
	8	L ₀ LL ₀ LKK ₀ KK ₀ KK ₀ KK ₀ L ₀ LL ₀ L
III	9	LLLLKKK ₀ K ₀ K ₀ K ₀ KKLLLL
	10	LLLLKKK ₀ K ₀ KKLLLL

は、いずれも pH 9.0 の水中においてナノファイバー構造に自己組織化するものの、その長さに大きな違いが観察された。L-アミノ酸の割合が高くなるに従って、ナノファイバー長が長くなることがわかった。おそらく同一キラリティーのアミノ酸が多いほど、 β -ストランド鎖間の水素結合の安定性が増すため、より発達した安定なナノファイバーを形成したものと推察される。このように、構成アミノ酸のキラリティーの組み合わせを様々に変化させることで、得られる自己組織構造の形態やナノファイバー長を制御できることを明らかにした。

(2) 疎水性アミノ酸配列による β -シート間疎水性相互作用のチューニング

基本となる両親水性ペプチド $L_4K_8L_4$ の疎水性 Leu ドメインをイソロイシン、バリン、フェニルアラニン、アラニンに置換した $I_4K_8L_4$ 、 $V_4K_8V_4$ 、 $F_4K_8F_4$ 、 $A_4K_8A_4$ を Fmoc 固相合成法により新規に合成することに成功した。水中 (pH 9 付近) での自己集合特性を検討した結果、ナノファイバーの形成能や形態が用いたアミノ酸の疎水性度に強く依存することを見いだした。特に、疎水性の低い $A_4K_8A_4$ では時間の経過に伴う β -シート構造への二次構造転移も観察されず (ランダムコイル構造として存在)、ナノファイバー形成も見られなかった。一方、疎水性が高く π - π 相互作用も働く $F_4K_8F_4$ では $L_4K_8L_4$ ・ナノファイバーよりも直径が大きいナノファイバー (ca. 10 nm) を形成することを見いだした。

(3) 分岐型アミノ酸配列によるナノファイバーの形状制御

Lys の α -位と ϵ -位のアミノ基がいずれも Fmoc 基で保護された Fmoc-Lys(Fmoc)-OH を分岐点に用い、従来の Fmoc 固相合成法に組み込むことで、 $L_4K_8L_4$ を三本結合させた三分岐型ペプチド ($K-(L_4K_8L_4)_3$) (図 1a) の新規合成に成功した。この分岐型ペプチドの pH 8.7 の水中における二次構造特性を CD スペクトルより検討したところ、溶液調製直後は α -ヘリックス構造を形成するが、時間の経過に伴って部分的に β -シート様の構造へ構造転移することがわかった。ナノ構造を AFM および TEM より観察したところ、分岐鎖を持たない直鎖型のペプチドと異なり、興味深いことに折れ曲がり構造を多く含む形状特異ナノファイバー (図 1b) を自己組織的に形成することを見いだした。

(4) イオン性アミノ酸種の組み合わせによるナノファイバー形成条件の拡張

ナノファイバー形成に及ぼす親水性ドメインの影響について検討するため、 $L_4K_8L_4$ の Lys をすべて Glu に置換した $L_4E_8L_4$ や K/E の組み合わせ

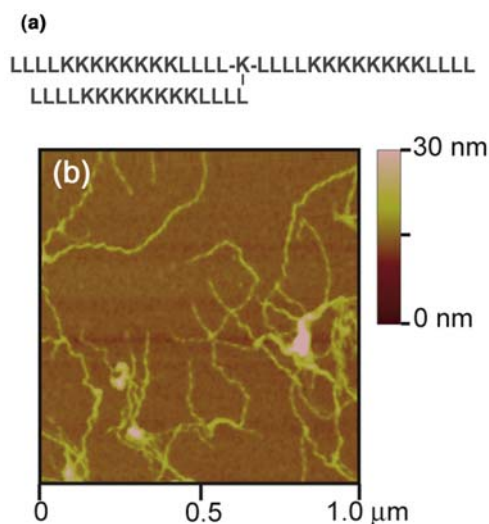


図 1. (a) 三分岐型ペプチド(K-(L₄K₃L₄)₃)の分子構造.
(b) 折れ曲がり構造を含んだ形状特異自己組織化ナノファイバーの AFM 像.

わせ配列に置換したL₄(KE)₄L₄、L₄(K₃E₂K₃)L₄、L₄(EKE₄KE)L₄、L₄(EKE₄KE)L₄等を新規に合成した。L₄E₈L₄では pH 6 付近において、β-シート構造への構造転移を伴いナノファイバーを形成することがわかった。また興味深いことに、L₄E₈L₄は中性(pH7.5)条件下では時間の経過によらずランダムコイル構造として分子分散しているが、Ca²⁺イオンの添加により、β-シート構造への構造転移が誘発され、ナノプレート状の構造に自己組織化することもわかった。この自己組織化は EDTAの添加により可逆的に進行することから、人工的にコントロールすることも可能である。また、親水性セグメントとしてK/Eを組み合わせた配列を有するペプチド群では、その組み合わせ(配列)に応じて pH3-4.5の酸性領域で効率的にナノファイバーに自己組織化することもわかった。すなわちペプチドの等電点や静電相互作用のチューニングにより、様々な pH 領域で自己組織化可能なペプチド分子の開発に成功した。

その他に、種々の官能基(分子)による自己組織化ペプチドの機能化や自己組織化ナノファイバーの新しい分子素子(ビルディングユニット)となり得る三重らせんフォルダマーの開発にも成功した。

以上、ペプチド分子構造に由来する(a)疎水性相互作用(b)静電相互作用(c)分岐性(d)キラリティーと自己組織化特性との関連を明らかにし、超分子ナノファイバー設計のための重要かつ新たな指針を提唱することができた。本研究の提案する“プログラム化された自己組織化技術”は、トップダウン型加工技術に比べ最小エネルギー・最大の厳密性で容易に任意の三次元ナノ構造の構築を可能にする次世代自己組織化技術と位置付けることができ、今後のナノ

バイオサイエンスの中心基盤技術となることが期待される。他の超分子化学的手法を用いたボトムアップ法と比較して、アミノ酸の一次構造のデザインのみで多様なビルディングブロックを容易に調製できること、また任意の部位を化学修飾等により容易に機能化できる点は大きなメリットと言える。得られるペプチド組織体は本質的に生分解性を有していることから、細胞工学等に有用なナノバイオ材料として、また特定の機能性分子団を三次元配置するためのNano-scaffoldなど様々な分野に応用・展開が可能であると予想される。また一方で、人工ペプチドの自己集合に関して得られた本研究成果は、アミロイド形成メカニズムを含めたタンパク質のミスフォールディングを理解するモデルとして学術的な意義も非常に高い。

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 4 件)

1) T. Koga, K. Kitamura, N. Higashi, “Stimuli-responsive Peptide Self-assembly into Well-organized Nanofibers”, *Advances in Experimental Medicine and Biology: Peptides for Youth*, 査読有, **611**, 237-238 (2009).

2) T. Koga, N. Higashi, “Fabrication of Peptide Nanoarchitectures through Molecular Self-assembly”, *Bottom-up Nanofabrication*, 査読有, **4**, 241-268 (2009).

3) N. Higashi, T. Koga, “Self-assembled Peptide Nanofibers”, *Advances in Polymer Science*, 査読有, **219**, 27-68 (2008).

4) 古賀 智之, 榎藤 裕一, 清水 康明, 東 信行, “ヘリックス型ペプチドを分子素材とする一次元ナノ構造材料の開発”, *同志社大学理工学研究所報告*, 査読無, **49(4)**, 38-42 (2008).

[学会発表] (計 26 件)

1) 川崎 陽一・古賀 智之・東 信行, “分岐型コラーゲンモデルペプチドの合成と三重らせん形成能”, 日本化学会第 89 春季年会, 2009 年 3 月 27-30 日, 日本大学

2) 古賀 智之, “ボトムアップ戦略によるペプチド・ナノ材料の設計”, 2008 年度東海高分子学生研究会, 2009 年 3 月 7 日, 名古屋工業大学

3)S. Soga · T. Koga · N. Higashi, “Tuning of Self-assembling Properties of Amphiphilic Peptide by Attachment with Vinyl Polymers”, The IUMRS International Conference in Asia 2008, 2008年12月9-13日, 名古屋国際会議場

4)H. Tachibana · T. Koga · N. Higashi, “Synthesis of Peptide-attached Fullerenes and Their Self-assembling Properties”, The IUMRS International Conference in Asia 2008, 2008年12月9-13日, 名古屋国際会議場

5)岩崎 迅希 · 古賀 智之 · 東 信行, “くさび型ペプチド脂質の自己組織化によるナノチューブ形成”, 第57回高分子討論会, 2008年9月24-26日, 大阪市立大学

6)古賀 智之 · 松井 晴信 · 東 信行, “コラーゲン様三重らせんフォルダマーの設計と高次構造特性”, 第57回高分子討論会, 2008年9月24-26日, 大阪市立大学

7)N. Higashi · Y. Kawamura · T. Koga, “Novel Nanoscaffolds Carrying Cell Adhesion Peptide Sequence”, 30th European Peptide Symposium, 2008年8月31日, Finland

8)阿部 正登志 · 古賀 智之 · 東 信行, “オリゴアラニン部位を含むトリブロック型合成ポリマーによるスパイダーシルクのモデル化”, 第57回高分子学会年次大会, 2008年5月28-30日, パシフィコ横浜

9)小池 正人 · 古賀 智之 · 東 信行, “ロッド・コイル型ペプチド-ポリマー・ハイブリッドによるナノ相分離形成と制御”, 第57回高分子学会年次大会, 2008年5月28-30日, パシフィコ横浜

10)古賀 智之 · 松井 晴信 · 東 信行, “光分解性コラーゲンモデルの設計と高次構造安定性”, 第57回高分子学会年次大会, 2008年5月28-30日, パシフィコ横浜

11)山田 慶祐 · 古賀 智之 · 東 信行, “アゾベンゼンを導入した三分岐型コラーゲンモデル分子の合成と構造特性”, 第57回高分子学会年次大会, 2008年5月28-30日, パシフィコ横浜

12)古賀 智之 · 東 信行, “ペプチド・ナノ集合体の構造制御と機能化”, 第7回界面ナノアーキテクトニクスワークショップ, 2007年12月14日, 産業技術総合研究所

13)河村 蓉子 · 古賀 智之 · 東 信行, “RGDS 細胞接着ドメインを導入した自己組

織化ペプチドスキャホールドの構築”, The 18th Symposium of The Materials Research Society of Japan, 2007年12月8日, 日本大学

14)西馬 千恵 · 古賀 智之 · 東 信行, “ELPとPEGからなるペプチド-ポリマー・ハイブリッドの感温的自己集合特性”, The 18th Symposium of The Materials Research Society of Japan, 2007年12月8日, 日本大学

15)阿部 正登志 · 古賀 智之 · 東 信行, “スパイダーシルクをモデルとするpoly(ethylene glycol)-(Ala)₈-poly(acrylic acid)の高次構造”, The 18th Symposium of The Materials Research Society of Japan, 2007年12月8日, 日本大学

16)古賀 智之 · 曾我 修二 · 松本 孝広 · 東 信行, “ペプチド-ポリマー・ハイブリッドの合成と高次構造特性”, 2007年日本化学会西日本大会, 2007年11月11日, 岡山大学

17)古賀 智之 · 金澤 千絵 · 東 信行, “感温性 *elastin* 類似ペプチド修飾金ナノ粒子の凝集特性と二次元集積化”, 2007年日本化学会西日本大会, 2007年11月11日, 岡山大学

18)古賀 智之 · 曾我 修二 · 松本 孝広 · 東 信行, “ATRP法によるペプチド-ポリマー・ハイブリッドの調製と高次構造形成”, 第56回高分子討論会, 2007年9月20日, 名古屋工業大学

19)古賀 智之 · 金澤 千絵 · 東 信行, “*elastin* 類似ペプチド修飾金ナノ粒子の感温性を利用した固体表面への選択的集積化”, 第56回高分子討論会, 2007年9月20日, 名古屋工業大学

20)吉田 健太 · 古賀 智之 · 東 信行, “芳香環をコアに有する両親媒性ペプチドの合成と自己組織化”, 第53回高分子研究発表会(神戸), 2007年7月20日, 兵庫県中央労働センター

21)松井 晴信 · 古賀 智之 · 東 信行, “三分岐型ペプチドを素材とした形状特異ナノ組織体”, 第53回高分子研究発表会(神戸), 2007年7月20日, 兵庫県中央労働センター

22)古賀 智之, “自己組織化でつくるペプチド・ナノ材料”, 九州地区高分子若手研究会・夏の講演会, 2007年7月6日, ウェルシティー小倉

23)T. Koga, K. Kitamura, N. Higashi, “Stimuli-responsive Peptide Self-assembly into Well-organized Nanofibers”, 20th Annual

24) American Peptide Symposium, 2007年6月
29日, モントリオール国際会議場

25) 古賀 智之・松岡 美穂・東 信行, “構成
アミノ酸のキラリティーによるペプチドナ
ノファイバーの微細構造チューニング”, 第
56回高分子学会年次大会, 2007年5月30日,
京都国際会議場

26) 古賀 智之・北村 健一・東 信行, “刺激
応答性ペプチド自己集合システムの設計”,
第56回高分子学会年次大会, 2007年5月30
日, 京都国際会議場

27) 松井 晴信・古賀 智之・東 信行, “三分
岐型ペプチドによる特異形状ナノファイバ
ーの形成”, 第56回高分子学会年次大会, 2007
年5月30日, 京都国際会議場

〔図書〕(計 1 件)

1) 古賀 智之, 株式会社 エヌ・ティー・エス,
“超分子:サイエンス&テクノロジー 第二章
ペプチドナノファイバー”, (2009) 総ページ
数 1244.

〔その他〕

HP: <http://www1.doshisha.ac.jp/~polychem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古賀 智之 (KOGA TOMOYUKI)

同志社大学・理工学部・准教授

研究者番号: 10388043