

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20350052
 研究課題名(和文) 生物学的スクリーニング技術を利用したエンブラ用ペプチド接着剤の創製
 研究課題名(英文) BIOLOGICALLY IDENTIFIED PEPTIDE AS ADHESIVES FOR ENGINEERING PLASTICS
 研究代表者
 芹澤 武 (SERIZAWA TAKESHI)
 東京大学・先端科学技術研究センター・准教授
 研究者番号:30284904

研究成果の概要(和文)：エンジニアリング・プラスチック(EP)表面に特異的に結合するペプチドをファージディスプレイ法により同定した。得られたペプチドのEPに対する結合挙動を定量的に解析した。ペプチドを接着剤としてデザインし、EP間の接着に利用できるか検討した。

研究成果の概要(英文)：Peptides that specifically bind to the surface of engineering plastic (EP) were identified via a phage display method. The binding of the identified peptides to EP was quantitatively analyzed. It was then evaluated whether the peptide derivatives designed as adhesives were applicable to adhere two EP films.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |
| 2009年度 | 8,700,000 | 2,610,000 | 11,310,000 |
| 2010年度 | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,900,000 | 4,470,000 | 19,370,000 |

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・高分子化学

キーワード：スクリーニング、エンブラ、ペプチド、ファージ、ポリエーテルイミド、表面プラズモン共鳴、接着、モチーフ

1. 研究開始当初の背景

流体を扱う微細な部品を高精度かつ安定に製造する技術の開発が望まれている。例えば、医療分野では、核酸やタンパク質などの生化学反応を統合して分析・検査するマイクロTAS(Micro Total Analysis Systems)が次世代の病予防や診断、あるいは治療法として注目されている。この方法には、携帯性に優れ、微量の試料と試薬で結果を得られるメリットがある。また、IT分野では、微量なインクの飛翔を制御可能なインクジェットヘッドを有するプリンタが使われ、印刷品質の向上と省資源を両立させている。

従来、これらの流体部品は、シリコン基板に微細な流路をエッチングした後にガラス板で封止して製造されてきた。しかしながら、このようなエッチング処理は、真空環境下で行う必要があるために、製造リードタイムが延びる。またシリコン基板に圧着するためには、ガラス表面をあらかじめ特殊処理する必要がある、コストが高くなる。

もしも流体部品の基板をプラスチック成型で製造し、同じくプラスチック板で封止することができれば、上記の問題をすべて解決できる。しかしながら、従来的高分子接着剤は、接着時のみ出しや遊走により、成形し

た微細流路を塞いでしまう致命的な問題がある。

一方、申請者らは、ポリメタクリル酸メチル、ポリスチレン、ポリ乳酸、セルロースなどの汎用性高分子にファージディスプレイ法を適用することにより、それらに特異的に結合する短鎖ペプチドの取得に成功している。このようなペプチドを構成ユニットとし、橋かけ型のペプチド誘導体を新規に設計・合成することにより、プラスチック用接着剤が創製できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、高強度・高耐熱性・高耐薬品性に優れ、各種の流体部品として有望なエンジニアリング・プラスチック（以下、エンブラ）に注目し、まず、これらに特異的に結合する短鎖ペプチドをファージディスプレイ法により明らかにする。次に、得られたペプチドを構成ユニットとしたエンブラ用接着剤を設計・合成し、接着強度を定量的に評価する。これらにより、エンブラ結合性ペプチドが接着剤として利用可能であることを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) エンブラに強く結合するペプチドをファージディスプレイ法により探索する、(2) ペプチドのエンブラに対する結合能力を高感度な相互作用解析により定量化する、(3) ペプチドを接着剤として設計する、(4) Lap-shear テストによる接着強度の測定結果をもとにペプチドを最適化する。(1)に関しては、これまでに各種のビニル高分子やポリエステルに結合するペプチドの取得に成功していることから、蓄積した技術やノウハウを利用する。(2)に関しては、代表者らが以前より扱っている表面プラズモン共鳴法を適用する。(3)に関しては、ペプチドは接着剤として様々な形態に設計可能であるため、構造に依存した接着を検討する。

4. 研究成果

7 残基のランダムペプチドが提示された M13 バクテリオファージライブラリーを用い、代表的なエンブラであるポリエーテルイミド (PEI) に特異的に結合するペプチドを探索した。スピコート法により一穴スライドガラス上に製膜し、得られたフィルムをバイオパニングに適用した。インプットしたファージ濃度と回収されたファージ濃度から各ラウンドの収率を求め、特異的なファージ群に濃縮しているか確認しながらバイオパニングを繰り返した。濃縮を確認した後、ファージをクローニング、DNA シークエンシングを行い、各クローンが提示しているペプチドのアミノ酸配列を決定した。その結果、

Thr-Gly-Ala-Asp-Lys-Asn-Thr のアミノ酸配列をもつ FB01 ペプチドが高い頻度で同定できた。FB01 ペプチドを固相合成し、液体クロマトグラフィーにより分離・精製した。表面プラズモン共鳴法により PEI フィルムに対する FB01 ペプチドの結合を解析したところ、 $3.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ の結合定数を示すことが分かった。この結合定数は、これまでに取得された 7 残基程度のマテリアル結合性ペプチドの中でも例外的に高い値である。アミノ酸の置換解析により、一次配列の重要性と必須モチーフが分子全体にわたることが示唆された。ポリスチレンに対しては $2.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ の結合定数であり、FB01 ペプチドの高い特異性が示唆された。

PEI に特異的に結合する FB01 ペプチドが接着剤として機能するかを検証するために、分子内に二つ以上のペプチド分子を有し、プラスチック面を橋かけする構造となる以下のペプチド誘導体を設計・合成した。設計 1: ペプチドの片末端にシステインを導入し、ジスルフィド結合の形成により接着剤とした。設計 2: 金ナノ粒子の表面に複数のペプチドをクラスター化することで高分子との結合性を向上させる接着剤とした。設計 3: ポリアクリル酸の側鎖にペプチドをペンダント状にコンジュゲートした高分子接着剤とした。設計 4: 片末端に正あるいは負の電荷を有するペプチド誘導体を設計・合成し、エンブラ面に固定化した後、テイル部の静電相互作用あるいはポリオンコンプレックス形成により接着させた。設計 5: ビオチン化ペプチドを設計・合成し、アビジンタンパク質による架橋反応による接着を期待した。これらのペプチド誘導体を用い、様々な条件下で接着挙動を追跡したが、工業用途に耐えうる接着強度を実現することはできなかった。しかしながら、ペプチド分子がエンブラ表面に良好に露出する条件が分かったため、この条件をもとに新たな接着の構築を目指す。

ペプチド分子がエンブラ表面に良好に露出する条件を利用し、新たな接着系を構築した。これまでの研究により、ペプチド分子のみではエンブラ間を強固に接着することができないことがわかった。そこでペプチドによるエンブラ表面の処理と、他のバルク性の接着剤を組み合わせることによる接着を検討した。バルク性接着剤として、ペプチドと同様に生体由来分子として知られているドーパミンを選択し、所定条件下で重合させたポリドーパミンを接着剤に適用した。ペプチドの構造や固定化量、ドーパミンの重合条件を変化させ、接着強度の変化について検討したものの、ペプチドの有無による接着強度の向上は観察できなかった。一方、ペプチド処理することにより、水中における接着安定性が向上することが分かった。水に触れる環境下

で機能する接着技術は多くの工業材料において必要とされていることから、本系を洗練することにより、接着における生体分子の新たな利用が期待される。

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 14 件)

1. Hirotaka Ejima, Kisei Matsumiya, Toshiki Sawada, Takeshi Serizawa, Conjugated Polymer Nanoparticles Hybridized with the Peptide Aptamer, Chem. Commun., 査読有, 2011, 印刷中
2. Jing Chen, Takeshi Serizawa, Makoto Komiyama, Binding Analysis of Peptides that Recognize Preferentially Cis-Azobenzene Groups of Synthetic Polymers, J. Pept. Sci., 査読有, 17, 2011, 163-168
3. Takaaki Date, Jun Sekine, Hisao Matsuno, Takeshi Serizawa, Polymer-binding Peptides for the Noncovalent Modification of Polymer Surfaces: Effects of Peptide Density on the Subsequent Immobilization of Functional Proteins, ACS Appl. Mater. Interfaces, 査読有, 3, 2011, 351-359
4. Zhenghong Gao, Chunyi Zhi, Yoshio Bando, Dmitri Golberg, Takeshi Serizawa, Noncovalent Functionalization of Disentangled Boron Nitride Nanotubes with Flavin Mononucleotides for Strong and Stable Visible-Light Emission in Aqueous Solution, ACS Appl. Mater. Interfaces, 査読有, 3, 2011, 627-632
5. Takeshi Serizawa, Yu Hirai, Mamoru Aizawa, Detection of Enzyme Activities Based on the Synthesis of Gold Nanoparticles in HEPES Buffer, Mol. BioSyst., 査読有, 6, 2010, 1561-1564
6. Zhenghong Gao, Chunyi Zhi, Yoshio Bando, Dmitri Golberg, Takeshi Serizawa, Isolation of Individual Boron Nitride Nanotubes via Peptide Wrapping, J. Am. Chem. Soc., 査読有, 132, 2010, 4976-4977
7. Hirotaka Ejima, Hisao Matsuno, Takeshi Serizawa, Biological Identification of Peptides that Specifically Bind to Poly(phenylene vinylene) Surfaces: Recognition of the Branched or Linear Structure of the Conjugated Polymer, Langmuir, 査読有, 26, 2010, 17278-17285
8. Hirotaka Ejima, Hiromi Kikuchi, Hisao Matsuno, Hirofumi Yajima, Takeshi Serizawa, Peptide-Based Switching of Polymer Fluorescence in Aqueous Phase,

Chem. Mater., 査読有, 22, 2010, 6032-6034

9. Takeshi Serizawa, Yu Hirai, Mamoru Aizawa, Novel Synthetic Route to Peptide-Capped Gold Nanoparticles, Langmuir, 25, 査読有, 2009, 12229-12234
10. Daisuke Matsukuma, Takao Aoyagi, Takeshi Serizawa, Adhesion of Two Physically Contacting Planar Substrates Coated with Layer-by-Layer Assembled Films, Langmuir, 査読有, 25, 2009, 9824-9830
11. Takaaki Date, Mizuki Ishikawa, Koichiro Hori, Keiji Tanaka, Toshihiko Nagamura, Makio Iwahashi, Takeshi Serizawa, Water Droplets for the Symmetric Adhesion of Two Poly(methyl methacrylate) Films, Chem. Lett., 査読有, 38, 2009, 660-661
12. Jing Chen, Takeshi Serizawa, Makoto Komiyama, Peptides Recognize Photo-Responsive Material Targets, Angew. Chem. Int. Ed., 査読有, 48, 2009, 2917-2920
13. Hisao Matsuno, Jun Sekine, Hirofumi Yajima, Takeshi Serizawa, Biological Selection of Peptides for Poly(L-lactide) Substrates, Langmuir, 査読有, 24, 2008, 6399-6403
14. Takaaki Date, Keiji Tanaka, Toshihiko Nagamura, Takeshi Serizawa, Chem. Mater., 査読有, 20, 4536-4538

[学会発表] (計 35 件)

1. Takeshi Serizawa, Functional Modification of Soft Interfaces with Polymer-Binding Peptides, Pacificchem 2010、2010年12月17日、Honolulu
2. Zhenghong Gao, Chunyi Zhi, Yoshio Bando, Dmitri Golberg, Takeshi Serizawa, Isolation and Functionalization of Individual Boron Nitride Nanotubes via Biomolecules Wrapping, Pacificchem 2010、2010年12月17日、Honolulu
3. Takaaki Date, Takeshi Serizawa, Surface Modification of Polymers Using Specific-binding Peptides, Pacificchem 2010、2010年12月17日、Honolulu
4. T. Serizawa, Peptides Recognize Synthetic Polymers, E-MRS 2010 Spring Meeting、2010年6月11日、Strasbourg Congress Center
5. 松野寿生・吉野里美・伊達隆明・芹澤武、短鎖ペプチドを用いた PMMA 薄膜

- 表面の機能化、第 59 回高分子年次大会、2010 年 5 月 28 日、パシフィコ横浜
6. 伊達 隆明・関根 淳・松野寿生・芹澤武、表面修飾剤としてのエンブラ結合性ペプチド：界面構造が機能発現に及ぼす影響、第 59 回高分子年次大会、2010 年 5 月 28 日、パシフィコ横浜
 7. 今西優子・吉野祐太・伊達隆明・松野寿生・芹澤武・曾我部敦・黒板敏弘・功刀 滋・田中直毅、ポリマー親和性組換え蛋白質の設計と細胞培養制御への応用、第 59 回高分子年次大会、2010 年 5 月 27 日、パシフィコ横浜
 8. 江島広貴・松野寿生・芹澤武、ペプチドによる共役系高分子の樹状または直鎖構造の認識、第 59 回高分子年次大会、2010 年 5 月 26 日、パシフィコ横浜
 9. 芹澤武、マテリアル結合性ペプチドの探索と応用、平成 21 年度高分子学会九州支部フォーラム、2010.2.12、九州大学
 10. Hisao Matsuno, Naoki Tanaka, Takeshi Serizawa, Enhanced Adsorption of the Fusion Protein with Polymeric Material-binding Peptide、第 19 回日本 MRS 学術シンポジウム、2009 年 12 月 9 日、横浜開港記念館
 11. Takeshi Serizawa, Hisao Matsuno、Modification of Polymer Soft Interfaces with Specific Peptides、第 19 回日本 MRS 学術シンポジウム、2009 年 12 月 7 日、横浜開港記念館
 12. Hirotaka Ejima, Hisao Matsuno, Takeshi Serizawa, Biological Selection of Peptides that Bind to pi-conjugated Polymers、4th International Symposium on Integrated Molecular/Materials Engineering、2009 年 10 月 27 日、四川大学
 13. Takaaki Date, Jun Sekine, Hisao Matsuno, Takeshi Serizawa, Selection of Poly(ether imide)-Binding-Peptides and Their Applications to Surface Modifiers、4th International Symposium on Integrated Molecular/Materials Engineering、2009 年 10 月 27 日、四川大学
 14. 伊達 隆明・関根 淳・松野寿生・芹澤武、高分子結合性ペプチドを用いた表面修飾：界面構造と機能発現の相関、第 58 回高分子討論会、2009 年 9 月 17 日、熊本大学
 15. 松隈大輔・芹澤武、交互吸着膜間の接着とそのメカニズム解析、第 58 回高分子討論会、2009 年 9 月 17 日、熊本大学
 16. 江島広貴・菊池宏海・松野 寿生・矢島 博文・芹澤 武、 π 共役系高分子結合性ペプチドの探索、第 58 回高分子討論会、2009 年 9 月 17 日、熊本大学
 17. 江島広貴・松野寿生・芹澤武、フェージディスプレイ法による共役系高分子結合性ペプチドの探索、第 19 回バイオ高分子シンポジウム、2009 年 7 月 30 日、東京大学
 18. 芹澤武・松野寿生、高分子結合性ペプチドの探索と医用高分子研究における可能性、第 37 回医用高分子シンポジウム、2009 年 7 月 28 日、東京大学
 19. 伊達 隆明・関根 淳・松野寿生・芹澤武、ペプチド修飾された高分子表面の構造制御と機能発現、第 37 回医用高分子シンポジウム、2009 年 7 月 27 日、東京大学
 20. Hisao Matsuno, Takeshi Serizawa, Peptides that Recognize Crystalline PLLA Surface、8th International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers、2009 年 5 月 21 日、東レ研修センター
 21. Takeshi Serizawa、Peptides Specifically Bind to Synthetic Polymers、NIMS Week、2009 年 7 月 22 日、つくば国際会議場
 22. 平井 悠・相澤 守・芹澤武、ペプチド・タンパク質で保護された金ナノ粒子の新規合成法の開発、日本化学会第 89 春季年会、2009 年 3 月 27 日、日本大学
 23. Takaaki Date, Keiji Tanaka, Toshihiko Nagamura, Takeshi Serizawa、Directional Affinity of Polymer-Recognizing Heptapeptides、3rd International Symposium on Integrated Molecular/Materials Engineering、2008 年 11 月 6 日、Northwestern Polytechnical University
 24. Takaaki Date, Keiji Tanaka, Toshihiko Nagamura, Takeshi Serizawa、Directional Affinity of Polymer-Recognizing Peptides、Japan-Korea Polymer Young Scientist Symposium、2008 年 10 月 24 日、グリーンピア津南
 25. 伊達隆明・石川恭希・岩橋楨夫・芹澤武、水分子により膨潤した PMMA 表面間の接着挙動の解析、第 56 回レオロジー討論会、2008 年 10 月 6 日、新潟コンベンションセンター
 26. 松隈大輔・芹澤武、高分子電解質多層膜間のナノ接着とそのメカニ

- ズム解析、第 57 回高分子討論会、2008 年 9 月 25 日、大阪市立大学
27. 伊達隆明・石川恭希・田中敬二・長村利彦・岩橋榎夫・芹澤武、水分子により膨潤した薄膜表面間の接着挙動の評価、第 57 回高分子討論会、2008 年 9 月 25 日、大阪市立大学
28. 平井 悠・相澤 守・芹澤武、塩基性ペプチドで保護された金ナノ粒子の One-pot 合成と機能評価、第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム、2008 年 9 月 19 日、東京工業大学
29. 松隈大輔・芹澤武、高分子電解質多層膜によるナノ接合メカニズムの解析、第 61 回コロイドおよび界面化学討論会、2008 年 9 月 7 日、九州大学
30. 陳 景・芹澤武・小宮山真、アゾベンゼンポリマーの異性化を認識するペプチドの探索と特性評価、第 57 回高分子年次大会、2008 年 5 月 30 日、パシフィコ横浜
31. 関根 淳・松野寿生・芹澤武、フェージディスプレイ法によるポリエーテルイミド結合性ペプチドの探索、第 57 回高分子年次大会、2008 年 5 月 30 日、パシフィコ横浜
32. 吉野里美・松野寿生・岩橋榎夫・芹澤武、ポリマーステレオコンプレックスに特異結合する短鎖ペプチドの探索、第 57 回高分子年次大会、2008 年 5 月 30 日、パシフィコ横浜
33. 松隈大輔・青柳隆夫・芹澤武、高分子電解質多層膜を用いたナノ接着層の構築、第 57 回高分子年次大会、2008 年 5 月 30 日、パシフィコ横浜
34. 伊達隆明・芹澤武、ポリマー二層膜界面におけるナノ接着制御、第 57 回高分子年次大会、2008 年 5 月 30 日、パシフィコ横浜
35. 松野寿生・芹澤武、短鎖ペプチドによるポリ乳酸ステレオコンプレックス表面認識、第 57 回高分子年次大会、2008 年 5 月 28 日、パシフィコ横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芹澤 武 (SERIZAWA TAKESHI)
東京大学・先端科学技術研究センター・准教授
研究者番号：30284904

(2) 研究分担者

松野 寿生 (MATSUNO HISAO)
東京大学・駒場オープンラボラトリー・助教
研究者番号：50376696
(H22 年 1 月より九州大学・工学研究院・助教)

(3) 連携研究者

田中 敬二 (TANAKA KEIJI)
九州大学・工学研究院・教授
研究者番号：20325509