

令和 5 年 6 月 1 6 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15340

研究課題名（和文）ペプチドゲルの融合により誘起されるゲル界面での連続的二次構造転移挙動の解析

研究課題名（英文）Continuous second-order structural transition induced by fusion between peptide hydrogels

研究代表者

村井 一喜（Murai, Kazuki）

信州大学・学術研究院繊維学系・助教

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）：本研究では種々のペプチドを用いて構築される性質（電荷およびpH）の異なるペプチドゲルを生体組織のモデル系とし、ペプチドゲル同士の融合により誘起される界面近傍のペプチド分子による二次構造転移挙動および自発的な構造形成機構の動力学的解析を試みた。本研究で見出された可逆的な二次構造転移（振動現象）を伴うペプチドゲルの融合には、(1) ゲル界面近傍のpH変化により誘起されるアミノ酸側鎖官能基のプロトン化、(2) 分子間での静電相互作用に起因するペプチドの構造安定化の2つの因子が重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物の生命活動を維持する多くの機能は細胞内外を隔てる細胞膜、つまり異なる性質を有する組織界面に存在する生体高分子集合体で発現する。この生体システムにおける自発的かつ可逆的な構造転移に基づく機能発現機構の解明は、生物学や生化学分野における学術的に重要な課題の1つであるとともに、材料工学的観点から見ても生体機能を超越する新たな機能性材料創製のために重要な課題である。本研究の遂行により得られる学術的知見は、自発的かつ可逆的な構造転移を利用した生体システムを超越する機能創発に加え、機能性材料創製のためにも重要な学術的知見となると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the mechanism of the continuous variation of the secondary structural contents of interfacial peptides induced by the fusion of hydrogels with different charges. The hydrogel fusion induced continuous pH changes at the interface through ionic diffusion from the hydrogel matrices, and the pH value increased rapidly during the early stage of the fusion process. In addition, the secondary structural content of the interfacial peptides changed continuously between the beta-sheet and random coil conformations during the early stage of the fusion process. The continuous variation in the secondary structural contents of the interfacial peptides was caused by (1) the protonation of peptide molecule amino acid side-chains in the region of pH change, and (2) charge shielding due to the electrostatic interactions between the intramolecular peptides, intermolecular peptides, and intramolecular and intermolecular peptides.

研究分野：界面化学

キーワード：ペプチドハイドロゲル ゲル融合 二次構造転移

1. 研究開始当初の背景

生物の生命活動を維持する多くの機能は細胞内外を隔てる細胞膜、つまり異なる性質を有する組織界面に存在する生体高分子集合体で発現する。この界面の集合体は、外部環境の変化 (pH やイオン濃度など) に応答することで可逆的な二次構造転移に基づく高次構造の変化が誘起され、その機能を厳密に制御している。この生体システムにおける自発的かつ可逆的な構造転移に基づく機能発現機構の解明は、生物学や生化学分野における学術的に重要な課題の 1 つであるとともに、材料工学的観点から見ても生体機能を超越する新たな機能性材料創製のために重要な課題である。しかし、生体に倣う構造制御による機能設計技術の確立に加え、同概念の導入による生体システム様の特異な機能を発現する材料の創製は達成されていない。これは、生体高分子が複雑な 3 次元的な階層性および配向性を有する秩序構造体を形成するために、その自己組織化による構造形成機構を解明することが困難なことに起因する。近年では、タンパク質のモデル分子であるペプチドをビルディングブロックとした自己組織化による秩序集合体形成とその形成機構に関する研究が行われている。ペプチドは、アミノ酸の種類や配列 (一次構造) に応じた機能発現や多様な二次構造制御に基づく構造制御が可能である。そのため、生体システムを超越する構造制御による機能創発には、生体システムのモデル系において“性質の異なる物質間の界面で生じる構造転移と構造形成機構の動力学的解析”が重要であると考えた。以上より、本研究の遂行により得られる学術的知見は、自発的かつ可逆的な構造転移を利用した生体システムを超越する機能創発に加え、機能性材料創製のためにも重要な学術的知見となると期待される。

2. 研究の目的

以上の学術的背景より、本研究では種々のペプチドを用いて構築される性質 (電荷および pH) の異なるペプチドゲルを生体組織のモデル系とし、ペプチドゲル同士の融合により誘起される界面近傍のペプチド分子による二次構造転移挙動および自発的な構造形成機構の動力学解析を目的とする。特に、本研究では細胞組織の界面を模倣した異種電荷を有するペプチドゲルを作製し、その界面におけるペプチド分子の二次構造転移挙動と界面近傍の pH の間に着目し、その相関について検討した。

3. 研究の方法

異なる電荷状態を有するペプチドゲルを作製するために、本研究では 3 種類の β -シート型ペプチドを固相法により合成した。合成したペプチドは、主に負電荷を有する Ac-(VEVS)₄-CONH₂ : VEVS、電荷的に中性な Ac-(VHVEVS)₃-CONH₂ : VHVEVS および正電荷を有する Ac-(VKVS)₄-CONH₂ : VKVS である。ペプチド水溶液は、各ペプチド水溶液を所定の pH 値 (VEVS: 5.5, VHVEVS: 8.0 および VKVS: 9.0) に制御し、その後、超音波ホモジナイザーによる水溶液を混合することにより作製した。ペプチドゲル間の融合は、作製したペプチドゲルから VKVS/VEVS 系 (塩基性/酸性ゲル系) および VEVS/VHVEVS 系 (酸性/中性ゲル系) の組み合わせで行った。具体的な融合プロセスは各ペプチドゲルをスタックさせ、1 日室温でインキュベートした。このゲル融合に伴い界面近傍に存在するペプチドの二次構造および pH 値の変化を動的に解析した。

4. 研究成果

・ペプチドゲルの融合に伴う界面ペプチドの二次構造転移挙動の解析

設計・合成した 3 種類のペプチドは全て無色透明なハイドロゲルを形成し、透過型電子顕微鏡 (TEM) からそのモルフォロジーがナノスケールのファイバー状集合体であることを観察した。これらのハイドロゲル中におけるペプチドの二次構造は、赤外吸収 (FT-IR) スペクトルの波数分離解析から主として β -シート構造であることがわかった。また、ハイドロゲルの貯蔵弾性率は、構成成分であるペプチドの水素結合および静電相互作用の形成部位数に依存することがわかった。具体的には、水素結合および静電相互作用の

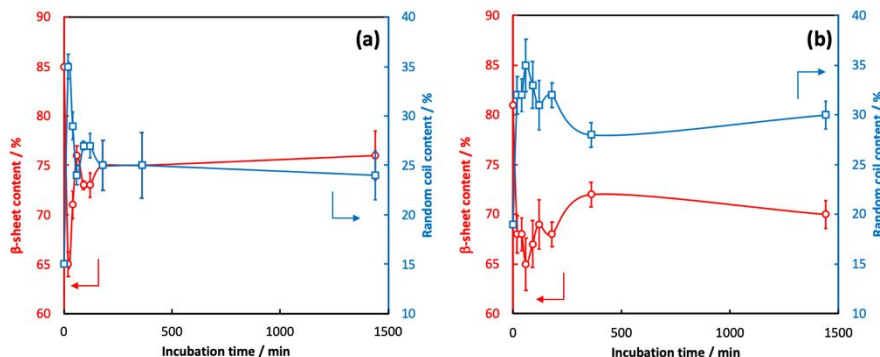


Fig. 1. Continuous variation of secondary structural contents induced by fusion between (a) the VKVS/VEVS and (b) the VEVS/VHVEVS peptide hydrogels. The red and blue lines indicate the β -sheet and random coil conformation contents, respectively.

形成部位数が最も多い VHVEVS 系では約 500 Pa、次に多い VEVs 系では約 400 Pa、最も少ない VKVS 系では約 300 Pa であった。これらのペプチドゲルの融合により、ゲル界面では興味深い 2 つの現象が確認された。1 つ目は、振動現象を伴う連続的および可逆的な二次構造転移挙動である。2 つ目は、界面近傍における pH 変化挙動である。Fig. 1 は、VKVS/VEVS 系 (塩基性/酸性ゲル) および VEVs/VHVEVS 系 (酸性/中性ゲル) における界面ペプチドの二次構造 (β -シートとランダムコイル) の経時変化を示す。VKVS/VEVS 系では、融合プロセスの最初期において急激な β -シートからランダムコイルへの転移が観察された。融合プロセスの進行とともに、VKVS/VEVS 系の界面ペプチドの二次構造は、 β -シートとランダムコイル間での連続的かつ可逆的な二次構造転移 (振動現象) を伴いながら、最終的には融合初期の β -シート含有率を回復した。つまり、融合プロセスにより β -シートからランダムコイルへの連続的かつ可逆的な構造転移が生じたことを意味する。一方、VEVS/VHVEVS 系では、VKVS/VEVS ゲル系と同様に融合プロセスの最初期において急激な β -シートからランダムコイルへの転移の存在、 β -シートとランダムコイル間での連続的な二次構造転移も同様に観察されたが、VKVS/VEVS ゲル系で観察された初期の β -シート含有率への再転移は見られなかった。また、2 つ目の現象として確認された融合ゲル界面近傍の pH 変化に関しても、界面ペプチドの二次構造転移挙動と同様に用いたゲル系により異なる挙動を示した。具体的には、VKVS/VEVS ゲル系において融合プロセスの最初期で界面近傍の pH が酸性ゲルの pH 5.5 から 60 分以内に中性 pH である 7.4 付近まで急激に変化した。その後、融合プロセスが終了するまで界面近傍の pH に大きな変化を観察できなかった。その一方 VEVs/VHVEVS 系では、融合プロセスの開始時において中性ゲルの pH 値である 8.0 であったが、プロセスの進行とともに緩やかな変化を示し、融合プロセスの終了時には酸性ゲルの pH 値である 5.5 に達した。つまり用いるゲル系により、pH 変化の速度に大きな影響を与えることを明らかとした。

・界面ペプチドの連続的かつ可逆的な構造転移挙動を伴うゲルの融合機構の解析

ペプチドゲルの融合によりその界面で観察された 2 つの興味深い現象をもとに、ゲルの融合機構の解析を試みた。ペプチドゲルの融合は、ゲル界面における 2 つの現象により界面ペプチドの異なる挙動を誘起していると考えられる。各ゲル系において融合プロセス終了時における界面ペプチドのモルフォロジーを TEM により観察したところ、VKVS/VEVS ゲル系においては融合前と比較してペプチドファイバーが絡み合った高密度ペプチドファイバーが観察された。その一方 VEVs/VHVEVS 系では、融合前と同様のペプチドナノファイバーのみ観察された。この融合プロセスの進行に伴うペプチドファイバーの高密度化は、ペプチドの安定な二次構造形成および界面近傍の pH 変化から説明することができる。VKVS/VEVS ゲル系において、ゲル融合の最初期には、VEVS ゲル相から VKVS ゲル相に対してプロトンの拡散が生じることでゲル界面近傍の pH が中性領域に急激に変化する。この pH 変化に連動し、各ゲルを構成するペプチド分子の Lys または Glu の側鎖官能基 (アミノ基またはカルボキシル基) がプロトン化される。この側鎖官能基のプロトン化は同じ電荷特性をもつ分子内または分子間ペプチド間での静電反発が生じることで β -シートからランダムコイルへの二次構造転移を誘起する。この二次構造転移によりゲル界面近傍においては、部分的なゾル-ゲル相転移が生じ、ゲル界面のペプチドが他のゲル領域よりも高い拡散性を獲得する。その結果、界面の VKVS ペプチドと VEVs ペプチド間での静電相互作用により電荷遮蔽が生じ、再度安定な二次構造である β -シート構造に再転移する。TEM により観察された高密度のペプチドナノファイバーは、この異種電荷ペプチド間での静電相互作用を駆動力として形成されたと考えられる。その後、ゲル界面領域は融合プロセスの進展に基づく pH 変化により拡張され、拡張された界面領域においても先と同様の pH 変化およびペプチドの二次構造転移が生じる。この連続的なゲル界面の拡張に基づくペプチドの挙動が、二次構造の振動現象として観察されたと結論づけた。以上の結果より、 β -シートとランダムコイル間での連続的かつ可逆的な二次構造転移 (振動現象) を伴うペプチドゲルの融合には、(1) ゲル界面近傍の pH 変化により誘起されるアミノ酸側鎖官能基のプロトン化、(2) 分子間での静電相互作用に起因するペプチドの構造安定化の 2 つの因子が重要であることを明らかとした (Fig. 2)。

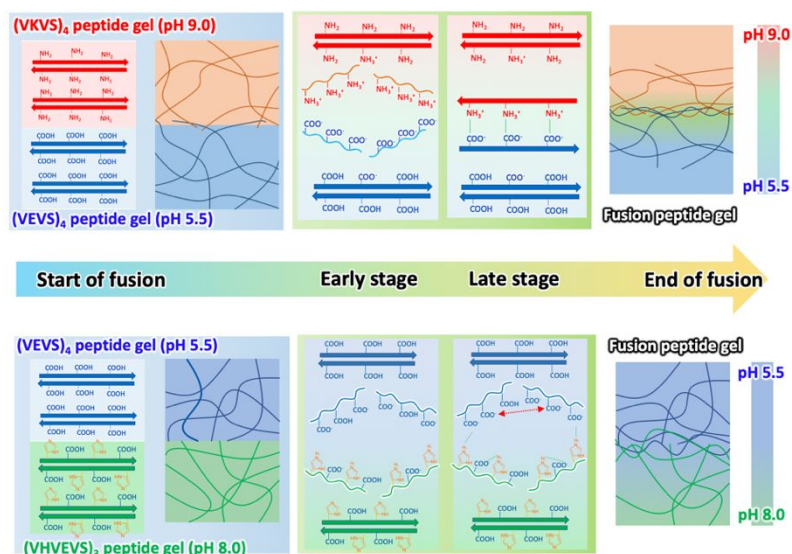


Fig. 2. Mechanism of the continuous variation of secondary structural contents of the fusion hydrogel interfacial peptides.

5. 主な発表論文等

[学術論文] (計 7 報) *: 責任著者

1. **K. Murai***, “Development of peptide-inorganic hybrid materials based on biomineralization and their functional design based on structural controls”, *Polym. J.*, **2023**, in press.
2. R. Tsuchiya, **K. Murai***, “Peptide-templated biomineralization of titanium dioxide toward improved light absorption and photodegradation activity”, *Mol. Syst. Des. Eng.*, **2022**, 7, 1602.
3. **K. Murai***, H. Isobe, A. Tezuka, K. Nishio, “Continuous variation of secondary structural contents of interfacial peptides induced by hydrogel fusion”, *Langmuir*, **2022**, 38, 3032.
4. K. Otsuka, **K. Murai***, “Silica mineralization on anisotropic gelatin-hydrogel scaffolds”, *CrystEngComm*, **2022**, 24, 1917.
5. K. Kawaguchi, S. Komatsu, A. Kikuchi, Y. Nomura, **K. Murai***, “Facile fabrication of gelatin hydrogel with anisotropic gel properties via self-assembly”, *Polym. J.*, **2022**, 54, 377.
6. **K. Murai***, Y. Funamizu, T. Ogura, K. Nishio, “Bioinspired mineralization of calcium carbonate in peptide hydrogel acting as a multifunctional three-dimensional template”. *J. Asian Ceram. Soc.*, **2021**, 9, 771.
7. **村井 一喜***, “界面構造の設計および制御による機能性有機無機複合材料の構築”, *J. Jpn. Soc. Colour Mater.*, **2021**, **94**, 270.

[学会発表] (計 12 件) ○: 発表者

1. ○林 広華, 野々山 貴行, **村井 一喜**, “イオン液体中でのミネラルゼーションによるシリカ形成の動力学的解析”, 第 71 回高分子討論会, 北海道大学, 2022. 9.
2. ○前田 環, 小松 周平, 菊池 明彦, 野村 義宏, **村井 一喜**, “ゼラチンゲル中の異方性ネットワークによる選択的物質透過性の解析”, 第 71 回高分子討論会, 北海道大学, 2022. 9.
3. ○**村井 一喜**, “テンプレート法を利用した構造制御型機能性材料の構築”, S メンブレン第 2 回若手教員交流会・生体分子化学勉強会合同講演会, オンライン, 2022. 3.
4. ○**村井 一喜**, 川口 航平, 小松 周平, 野村 義宏, 菊池 明彦, “自己組織化を利用した配向化ゼラチンゲルのネットワーク成長および配向化機構の解析”, 第 70 回高分子討論会, オンライン, 2021. 9.
5. ○林 広華, 野々山 貴行, **村井 一喜**, “生体分子イオン液体中でのミネラルゼーションによるシリカの構造制御”, 第 70 回高分子討論会, オンライン, 2021. 9. 他 7 件

[図書] (計 0 件)

1. 該当なし

[産業財産権] (計 0 件)

1. 該当なし

[その他]

1. 学術論文 2 が *Mol. Syst. Des. Eng.* 誌の Front cover として採択
2. 学術論文 3 が *Langmuir* 誌の Supplementary cover として採択
3. 学術論文 6 が *Eurek Alert!* (American Association for the Advancement of Science) にて紹介

6. 研究組織

(1) 研究代表者

研究代表者氏名: 村井 一喜

ローマ字氏名: Murai Kazuki

所属研究機関名: 信州大学

部局名: 学術研究院 繊維学系

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 30756268

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murai Kazuki, Isobe Hiroto, Tezuka Atsuya, Nishio Keishi	4. 巻 38
2. 論文標題 Continuous Variation of Secondary Structural Contents of Interfacial Peptides Induced by Hydrogel Fusion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 3032-3039
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.langmuir.1c01858	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Otsuka Kazuma, Murai Kazuki	4. 巻 24
2. 論文標題 Silica mineralization on anisotropic gelatin-hydrogel scaffolds	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CrystEngComm	6. 最初と最後の頁 1917-1923
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D1CE01539G	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawaguchi Kohei, Komatsu Syuuhei, Kikuchi Akihiko, Nomura Yoshihiro, Murai Kazuki	4. 巻 54
2. 論文標題 Facile fabrication of gelatin hydrogels with anisotropic gel properties via self-assembly	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 377-383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41428-021-00589-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kazuki Murai, Yosuke Funamizu, Toshihiko Ogura, Keishi Nishio	4. 巻 9
2. 論文標題 Bioinspired mineralization of calcium carbonate in peptide hydrogel acting as a multifunctional three-dimensional template	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Asian Ceramic Societies	6. 最初と最後の頁 771 ~ 781
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/21870764.2021.1911060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchiya Ryosuke, Murai Kazuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Peptide-templated biomineralization of titanium dioxide toward improved light absorption and photodegradation activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Systems Design & Engineering	6. 最初と最後の頁 1602 ~ 1610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2ME00136E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murai Kazuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of peptide-inorganic hybrid materials based on biomineralization and their functional design based on structural controls	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41428-023-00783-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村井一喜
2. 発表標題 テンプレート法を利用した構造制御型機能性材料の構築
3. 学会等名 群馬大学Sメンブレン第2回若手教員交流会・生体分子科学勉強合同講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村井一喜, 磯辺寛人, 川村諒人, 西尾圭史
2. 発表標題 ペプチドゲルの融合により誘起される界面における連続的な構造転移現象の解析
3. 学会等名 第70回高分子学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村井一喜, 土屋遼祐, 友添崇, 西尾圭史
2. 発表標題 ペプチドのアミノ酸側鎖官能基がミネラルリゼーションにより鉱化する酸化チタンの光触媒活性に与える影響
3. 学会等名 第142回無機マテリアル学会学術講演会, オンライン
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村井一喜, 川口航平, 小松周平, 野村義宏, 菊池明彦
2. 発表標題 自己組織化を利用した配向化ゼラチンゲルのネットワーク成長および配向化機構の解析
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林広華, 野々山貴行, 村井一喜
2. 発表標題 生体分子イオン液体中でのミネラルリゼーションによるシリカの構造制御
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 手塚敦也, 磯辺寛人, 西尾圭史, 村井一喜
2. 発表標題 ペプチドハイドロゲルの融合により誘起される界面での可逆的な二次構造転移挙動
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1．発表者名 村井一喜、川口航平、小松周平、菊池明彦
2．発表標題 ゼラチンの自己組織化を利用したハイドロゲルの配向構造制御
3．学会等名 第69回高分子学会年次大会
4．発表年 2020年

1．発表者名 川口航平、小松周平、菊池明彦、野村義宏、村井一喜
2．発表標題 自己組織化的に配向構造を形成するゼラチンハイドロゲルの構造形成機構の解明
3．学会等名 2020年度東海高分子研究会学生発表会
4．発表年 2020年

1．発表者名 村井一喜、土屋僚祐、友添崇、西尾圭史
2．発表標題 ペプチドのアミノ酸側鎖官能基がミネラルゼーションにより鉱化する酸化チタンの機能に与える影響
3．学会等名 日本セラミックス協会2021年年会
4．発表年 2021年

1．発表者名 林広華、野々山貴行、村井一喜
2．発表標題 イオン液体中でのミネラルゼーションによるシリカ形成の動力学的解析
3．学会等名 第71回高分子討論会
4．発表年 2022年

1. 発表者名 前田環、小松周平、菊池明彦、野村義宏、村井一喜
2. 発表標題 ゼラチンゲル中の異方性ネットワークによる選択的物質透過性の解析
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村井一喜、川口航平、小松周平、菊池明彦
2. 発表標題 ゼラチンの自己組織化を利用したハイドロゲルの配向構造制御
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

1. 学術論文2がMol. Syst. Des. Eng.誌のFront coverとして採択 2. 学術論文3がLangmuir誌のSupplementary coverとして採択 3. 学術論文6がEurek Alert! (American Association for the Advancement of Science) にて紹介
--

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------