

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560925

研究課題名(和文)有機官能基秩序配列を有したペプチド薄膜上での無機結晶析出の解析とその応用

研究課題名(英文) Multistep Growth Mechanism of Calcium Phosphate in the Morphology-Controlled Biomine-
ralization

研究代表者

加藤 且也 (Kato, Katsuya)

独立行政法人産業技術総合研究所・先進製造プロセス研究部門・研究グループ長

研究者番号：70356781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、種々の官能基配列パターンを有するペプチド単分子膜を調製し、析出したリン酸カルシウムのモルフォロジーや結晶相、また膜表面に対する結晶の向きとペプチド表面の官能基パターンとの相関性を調査した。具体的には、カルボキシル基、アミノ基そして鉍化不活性な疎水基の3種類の官能基を組み合わせることでペプチド界面パターンを作成した。(COOH)₈膜上では、アモルファスリン酸カルシウムナノファイバーの形成が確認された。一方で、(COOH-NH₃)₄及び(COOH-C₂H₆)₄膜上では結晶性のナノファイバーが確認され、界面パターンの影響が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We studied the effect of surface-functional-group position on precipitate morphology in the earliest stage of calcium phosphate biomineralization and determined the detailed mechanism of precipitation starting from nucleation to precipitate growth. The biomineralization template was a β -sheet peptide scaffold prepared by adsorption with carboxyl groups arranged at strict 0.7 nm intervals. Phosphate was then introduced. Within 10 s, highly ordered embryos of calcium phosphate were formed and confined by a peptide nanofiber pattern. They repeatedly nucleated and dissolved, with the larger embryos absorbing the smaller ones in a clear demonstration of an Ostwald-ripening-like phenomenon, then aggregated in a line pattern, and finally formed highly ordered nanofibers of amorphous calcium phosphate. This multistep growth process constitutes the earliest stage of biomineralization.

研究分野：反応工学・プロセスシステム

科研費の分科・細目：材料工学

キーワード：バイオミネラリゼーション ペプチド リン酸カルシウム 自己組織化 ヒドロキシアパタイト アモルファス リジン グルタミン酸

1. 研究開始当初の背景

バイオミネラル化 (生物鉱化) とは、生物が常温常圧環境下で骨、歯、貝殻、甲羅などの生体無機材料を生成するプロセスのことであり、高効率かつ環境負荷なく特異な無機構造体を構築することを可能にしている。そのメカニズムとして、生体内のタンパク質等の有機分子に存在する種々の官能基が、無機物の結晶核形成の触媒として働くことが重要とされている。従来までの研究では、カルボキシル基やリン酸基などのアニオン性官能基が、生体セラミックスの構成元素であるカルシウムイオンを効率よく結合させ、核形成を引き起こしていることが明らかにされている。しかし、バイオミネラル化は、有機無機界面における反応プロセスであるにも関わらず、界面の影響・すなわち官能基の空間配置が析出物に与える影響という知見は、これまで全く明らかにされてこなかった。それはこれまでの界面場を用いたバイオミネラル化研究では、無機物析出のための有機基板 (ペプチドテンプレート) には主に高分子薄膜や脂質膜などが用いられており、官能基の空間配置を厳密に決定するのは非常に困難であったためである。

一方で我々のこれまでの研究では、逐次重合法で得られた任意ペプチド、つまり親水 (グルタミン酸)・疎水性 (ロイシン) のアミノ酸を交互に配した一軸配向した β -シートペプチドが、基板上でナノファイバー構造を構築し、その表面では官能基 (グルタミン酸のカルボキシル基) が 7\AA で厳密に規則正しく配列していることを見いだしている。さらにこの β -シートペプチド上におけるリン酸カルシウム析出の現象について解析を行い (結果を速報誌 *Chem. Commun.* 2010)、ペプチドの側鎖官能基の秩序配列が、無機結晶の析出様式の解明に極めて重要であると発想した。

2. 研究の目的

バイオミネラル化 (生物鉱化) とは、生物が常温常圧環境下で骨や貝殻などの生体無機材料を生成するプロセスのことであり、そこで生物に模倣する無機物合成方法を生体外において確立することは、セラミックス合成プロセスの低環境負荷化に大きく貢献すると期待されている。本研究課題では、独自技術で調製した官能基秩序配列を有したペプチド有機薄膜をバイオミネラル化用テンプレートとして用い、有機官能基の空間配置や電荷分布が、析出する無機物質の結晶相および析出形態に及ぼす影響を原子レベルで明らかにする。さらにこのペプチド-無機物析出基板の応用展開について、特にタンパク質や細胞のパターン基板や元素回収用フィルターとして適応することを研究目的とする。

(1) そこで本研究課題の研究期間内では、こ

れまでの研究成果を進展させ、我々独自技術で調製した官能基秩序配列を有したペプチド有機薄膜をバイオミネラル化用テンプレートとして用い、官能基の空間配置や電荷分布が、析出する無機物質の結晶相および析出形態に及ぼす影響を原子レベルで明らかにし、かつその応用展開、特にタンパク質や細胞のパターンアレイや元素回収用フィルターとして適応する

(2) 以下の2点が本課題の特色と考えられる。(a) 逐次重合法で合成しているため、アミノ酸の配列を任意に設計できる、すなわちアミノ酸側鎖に由来する多種多様の官能基の順序および量比を自在に組み込むことが可能であり、様々な界面をデザインすることが可能である。(b) 生体内類似物質プロセスを利用するため、無機物質合成において、クリーンプロセス (常温・常圧・中性等) を実現できる。

(3) これらの研究から予想される結果として、第一にバイオミネラル化における界面デザインと結晶相の相関性に関する基礎的知見を得ることができると考えられる。それにより、界面デザインによって、同条件でも、目的の結晶相の析出物のみを選択的に作り分けることが可能となる。また種々の界面の析出量および析出速度を明確に知ること、高効率で無機物を析出させる界面は、元素回収技術に応用できる。また低結晶析出界面に用いたペプチドであれば、膜状に加工し目詰まりの少ない逆浸透膜として海水淡や浄水フィルターとしての応用が期待できる。さらに上記 β -シートペプチド上に析出した無機物への生体分子の選択的な吸着特性を利用した新規なバイオアレイや細胞シートとしての展開も予想される。以上の観点から、本研究課題はバイオミネラル化の原理を明らかとするという学術的な基礎研究であるとともに、様々な応用展開などが期待できる社会還元までを見据えたプロジェクトである。

3. 研究の方法

(1) 「有機テンプレートに用いるペプチド配列の基本的な設計を、以下の原理に従って行う」。はじめに β -シートペプチド構造を形成させるために、親水・疎水のアミノ酸の交互配列の構造設計を行う。さらにリン酸カルシウムのミネラル化において、カルシウムイオンを効率よく結合できる官能基であるカルボキシル基を基準官能基とする。以上の設計指針から基準ペプチドの配列として、親水性アミノ酸にカルボキシル基を側鎖に持つグルタミン酸 (Glu) を、または、疎水性アミノ酸にロイシン (Leu) を選定し、8 回繰り返した (Leu-Glu)₈ (COOH 基間隔: 7\AA) とする。

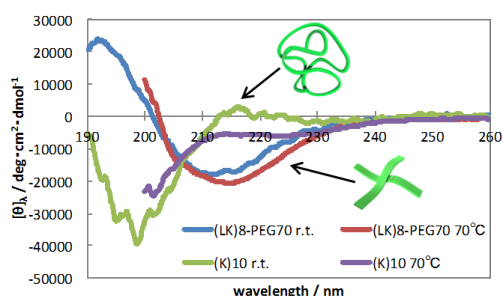


図4 合成ペプチド類のCDスペクトル

(3) 以下の実験で使用したペプチドテンプレートは、6残基のアミノ酸より成りβシート構造形成能を有する Ac-VHVEVS-NH₂を、固相法により合成した(図5)。本ペプチドシーケンスは、セリンプロテアーゼの活性中心を形成する三残基のアミノ酸(セリン Ser, ヒスチジン His およびアスパラギン酸 Asp)が、有する効果的な電荷リレーによる触媒機能を模倣することを目的として設計した。ペプチドのウレアに対する加水分解活性の評価は、インドフェノール法により行った。同ペプチドテンプレート上で炭酸カルシウム(CaCO₃)のバイオミネラリゼーションにより析出した結晶の構造およびそのモルフォロジーは、走査型(SEM)、透過型電子顕微鏡(TEM)および電子線回折を用いて評価した。



図5 合成ペプチドテンプレート (Ac-VHVEVS-NH₂) 上での無機物析出の概念図。

反応溶液中のウレアは、ペプチドにより反応時間の経過に伴い、アンモニアと二酸化炭素へと徐々に加水分解された。得られた二酸化炭素をミネラル源として、テンプレート上に形成された CaCO₃の構造を評価した。図6は、ペプチドテンプレートと、同テンプレート上でミネラリゼーションにより析出した CaCO₃のTEM像を示す。得られたTEM像より、ミネラリゼーションにより析出した CaCO₃のモルフォロジーは、針状構造の凝集体であった。この形状は、ペプチドテンプレートの形状に類似している。一方、ペプチドを含まない系では、析出物が観察されなかった。加えて、得られた CaCO₃結晶の結晶相を電子線回折より評価したところ、準安定相であるアラゴナイトであることがわかった。これらの結果は、本研究で用いたペプチドテンプレート

が、自らミネラル源である二酸化炭素の供給能を有するとともに、そのテンプレート上の官能基の規則配列構造に基づいた結晶構造および、テンプレートの高次構造に基づいたモルフォロジーの制御が可能である事が明らかとなった。

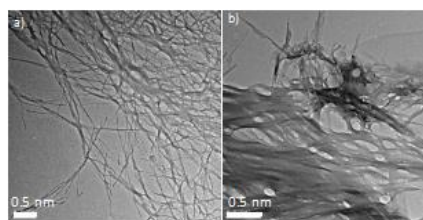


図6 合成ペプチド(左)およびその薄膜上で析出した炭酸カルシウム(右)の電子顕微鏡写真

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11件)

- ① 野々山貴行、木下隆利、樋口真弘、永田謙二、田中正剛、佐藤公泰、加藤且也、**Multistep Growth Mechanism of Calcium Phosphate in the Earliest Stage of Morphology-Controlled Biomineralization**, *Langmuir*, 27, 7707-7083, 2011, 査読有
DOI: dx.doi.org/10.1021/la2006953
- ② 野々山貴行、木下隆利、樋口真弘、永田謙二、田中正剛、佐藤公泰、加藤且也、**TiO₂ Synthesis Inspired by Biomineralization: Control of Morphology, Crystal Phase and Light Use Efficiency in A Single Process**, *Journal of the American Chemical Society*, 134, 8841-8847, 2012, 査読有
DOI: 10.1021/ja211347n
- ③ 村井一喜、樋口真弘、木下隆利、永田謙二、加藤且也、**Calcium carbonate biomineralization utilizing a multifunctional β-sheet peptide template**, *Chemical Communications*, 49, 9947-9949, 2013, 査読有
DOI: 10.1039/C3CC44947E

[学会発表] (計40件)

- ① 野々山貴行、木下隆利、樋口真弘、永田謙二、佐藤公泰、加藤且也、「ペプチドを用いたバイオミネラリゼーションによる酸化チタンの合成とその特性評価」、第42回東海若手セラミスト懇話会 2011年夏期セミナー、2011/06/30、愛知
- ② 野々山貴行、木下隆利、樋口真弘、永田謙二、佐藤公泰、加藤且也、「ペプチドファインチューニング単分子膜表面におけるリン酸カルシウムの結晶相とモルフォロジーの制御」、第24回秋季シンポジウム日本セラミックス協会、2011/09/08、北海道
- ③ 野々山貴行、木下隆利、永田謙二、樋口

真弘、佐藤公泰、加藤且也、「バイオミネラルリゼーションにならう有機・無機界面におけるエピタキシャル性」、第 61 回高分子討論会、2012/09/21、名古屋

- ④ 村井一喜、樋口真弘、木下隆利、永田謙二、加藤且也、「ミネラル源供給能を持つペプチドテンプレートを用いた構造制御無機材料の構築」、第 43 回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会、2012/11/10、名古屋
- ⑤ 川地佑樹、釘宮慎一、中村仁美、加藤且也、「酵素固定化担体への応用を目的とした合成ペプチドによるシリカハイドロゲルの作製」、平成 25 年度東海支部学術研究発表会、2013/12/07、名古屋

〔図書〕(計 1 件)

- ① 加藤且也、野々山貴行、木下隆利、；バイオミネラルの“新たな輝き”生体分子テンプレート上での生物鉱化反応の解析；化学、8, 66-67, 2011

〔その他〕

ホームページ等

<http://unit.aist.go.jp/amri/group/biproc/ja/biproc.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 且也 (Kato, Katsuya)

産業技術総合研究所・研究グループ長

研究者番号：70356781

(3) 連携研究者

樋口真弘 (HIGUCHI, Masahiro)

名古屋工業大学・工学研究科・教授

研究者番号：50357836