

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710122

研究課題名(和文) 繊維状ウイルスによる機能性ハイドロゲルの創製

研究課題名(英文) Preparation of functional hydrogels composed of filamentous viruses

研究代表者

澤田 敏樹 (Sawada, Toshiki)

東京工業大学・理工学研究科・助教

研究者番号：20581078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：繊維状ウイルスからなる機能性ハイドロゲル構築を目的とし、繊維状ウイルスの一種である M13バクテリオファージ(ファージ)の末端と金ナノ粒子が特異的に相互作用するよう分子設計して用いた。適切な濃度比で混合すると、両者は自己組織的にハイドロゲル化した。その際、ファージは三次元的に配向しながら集合化して液晶化し、また金ナノ粒子はフラクタル様のネットワーク構造を構築し、構成要素それぞれの構造が制御されたゲルとなることがわかった。両者の間の特異的な相互作用を制御したゲルを調製することで、ゲルの機械的強度が分子間相互作用に支配されることもわかった。また、自己修復能や大腸菌応答性を示すことも見出した。

研究成果の概要(英文)：For the preparation of functional hydrogels composed of filamentous viruses, genetically engineered M13 bacteriophages (phages) and surface-modified gold nanoparticles (GNPs) were utilized. After mixing of the components under the suitable concentration condition, the mixed solutions were self-assembled into hydrogels. The phages and the GNPs in the hydrogels formed lyotropic liquid crystals and well-ordered fractal like network structures, respectively. Furthermore, it was found that mechanical strengths of the viral hydrogels were dependent on the specific molecular interactions between the phages and the GNPs. Furthermore, the hydrogels showed various functions such as self-repairing capabilities and responsiveness for existence of Escherichia coli.

研究分野：生体関連化学

科研費の分科・細目：ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：生体関連高分子科学 生物有機化学 ソフトマテリアル バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

マイクロ～ナノメートルオーダーの繊維構造から形成されるハイドロゲルは、代表的なソフトマテリアルとして多大な関心を集めている。ハイドロゲルの形成には、基本的に共有結合による架橋を必要とする。一方で、低分子化合物の非共有結合的な自己組織化により構築されるハイドロゲルは、架橋を必要としないため注目されている。ゲルを機能化するためには、新たな機能性基の導入が必要であり、それにより自己組織化のバランスが崩れるため、機能の自在な付与は困難であった。

一方で、大腸菌に感染するウイルスの一種である M13 バクテリオファージ (ファージ) は、従来機能性のペプチドやタンパク質を提示するための担体として利用されていたが、近年ではマテリアル素材として利用する研究が報告され始めていた。本ファージは直径 5 nm、長さ 1 μm と細長い構造をもつ。また無毒であり、遺伝子工学的および合成化学的に機能化が可能であるためマテリアル素材として有用と考えられる。このような繊維状ウイルスからハイドロゲルを非共有結合的に構築することができれば、自在に機能化できるハイドロゲルが創製できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ファージを構成要素とする機能性ハイドロゲルを構築することを目的とする。ハイドロゲル形成のためには、ファージ分子間の相互作用を制御する必要がある。そのため、遺伝子工学的あるいは合成化学的な手法を駆使し、また組み合わせることによりファージ分子間の相互作用を制御し、分子間相互作用によりハイドロゲル形成させることを明らかにする。さらに、構築できたハイドロゲルの分子構造や、力学的強度といった基礎物性を評価することで、ゲル化に重要な因子を明らかにし、ファージからなるハイドロゲル構築のためのストラテジーを明らかにする。

3. 研究の方法

繊維状ファージからなるハイドロゲルを構築するため、他の分子との混合を検討し、広く利用されているナノ材料素材である金ナノ粒子を用いた。ファージと金ナノ粒子を相互作用させるため、ファージ末端に機能性ペプチドを提示したファージを遺伝子工学的に調製した。一方、金ナノ粒子は機能性ペプチドと相互作用するよう表面修飾した。ペプチド提示ファージと抗体固定化金ナノ粒子を混合し、ゲル化する条件を検討した。構築されたハイドロゲル内におけるネットワーク構造を観察するため、透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察した。また、金ナノ粒子間相互作用を評価するため、吸収スペクトルを測定した。また、混合直後から経時的に偏

光顕微鏡により観察した。

4. 研究成果

ファージ末端に抗原として、抗体に対する結合定数がそれぞれ異なる 3 種のタグペプチド (HA, FLAG, 及び Myc ペプチド) を遺伝子工学的に提示させた。一方、金ナノ粒子上にはプロテイン A を介して抗体を配向固定し、ファージと金ナノ粒子が特異的に相互作用するよう分子設計した。抗原ペプチド提示ファージおよび抗体固定化金ナノ粒子を適切な濃度で相互作用させることで容器を反転させても流れ落ちない、ハイドロゲル様の挙動を示すことがわかった。抗体を加えなかった場合や金ナノ粒子を用いなかった場合はそのような挙動は見られなかった。また、機能性ペプチドを提示していない野生型ファージを用いた場合にも同様であった。これらのことは、ファージ末端における金ナノ粒子との特異的な相互作用を基に両者が自己組織化し、ゲル化するほど集合化したことを示している。ファージ末端の抗原ペプチドと金ナノ粒子上の抗体の組合せを変更しても、この挙動は見られた。また、構築した集合体が粘稠な液体ではなく、ハイドロゲルであることは動的粘弾性測定により明らかにした。

構築したハイドロゲルの機械的強度を押し込み破断測定により評価した。その結果、ファージ濃度の上昇により機械的強度は上昇し、高濃度のファージ分子が効果的に集合化を促進するものと考えられる。同濃度条件において、異なるペプチドを提示したファージの機械的強度を比較した結果、ペプチド-抗体間相互作用の強さの序列と機械的強度の序列は良い一致を示し、分子レベルのイベントがマクロな物性に影響することがわかった。

ファージ、金ナノ粒子を混合直後から経時的に偏光顕微鏡観察した結果、15 分程度で複屈折性を示し始め、30 分程度で数百 μm のドメインサイズをもつ液晶構造になることがわかった。つまり、ハイドロゲル内においてファージが三次元的に配向しながら集合化することがわかった。一方で、吸収スペクトル測定により金ナノ粒子間の相互作用を検討した結果、金ナノ粒子は一次的に集合化することが示唆された。さらにゲル表面の構造を TEM により観察した結果、金ナノ粒子が一次的に規則的に配列していること明らかとなり、構成要素それぞれが規則的に集合化しながらゲル化することがわかった。

さらに本ファージハイドロゲルは破断させた箇所に緩衝液を添加して 48 時間インキュベーションすると、破断箇所が修復する自己修復能をもつことも見出した。また修復後の機械的強度は、修復前の 90% 以上であった。さらに、大腸菌に応答してゾルからゲルに転移する性質をもつことも併せて見出した。

ここまでは、ファージ、金ナノ粒子以外にも系内に抗体と抗体を固定化するためのプ

ロテイン A が存在する多成分系であった。系をよりシンプルにするため、ファージ末端に金に結合するペプチドを提示したファージを新たに調製し、両者が直接相互作用できる分子設計とした。両者を混合すると、金ナノ粒子は同様に規則的に集合化することが吸収スペクトルおよび TEM 観察から明らかになったものの、混合による明確なハイドロゲル化は見られなかった。グルタルアルデヒドによる架橋を行ったところ、ハイドロゲル化する挙動が見られた。偏光顕微鏡観察の結果、ゲル化前は液晶性を示さなかったのに対し、ゲル化後には液晶性を示すことがわかった。同濃度でファージのみを架橋しても液晶性は示さなかったことから、金ナノ粒子との相互作用が液晶性発現に重要であることがわかった。また、興味深いことにゲル化する際において、金ナノ粒子の集合構造がより規則的に変化することが示唆された。

以上、ファージ末端と金ナノ粒子が特異的に相互作用する分子設計により、構成要素であるファージと金ナノ粒子それぞれの集合構造が制御されたハイドロゲルを調製できることがわかった。本ハイドロゲルは規則的なネットワーク構造をもつ金ナノ粒子と液晶性を示すファージから構成されるため、さらなる遺伝子工学処理や化学修飾により機能性ハイドロゲルとしての利用が期待される。

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 3 件)

1. Toshiki Sawada, Huanhuan Chen, Naoto Shirakawa, Sungmin Kang, Junji Watanabe, Takeshi Serizawa, Regular Assembly of Filamentous Viruses and Gold Nanoparticles by Specific Interactions and Subsequent Chemical Crosslinking, Polym. J., 査読有, 2014, in press
2. Toshiki Sawada, Sungmin Kang, Junji Watanabe, Hisakazu Mihara, Takeshi Serizawa, Hybrid Hydrogels Composed of Regularly Assembled Filamentous Viruses and Gold Nanoparticles, ACS Macro Lett., 査読有, 3, 2014, 341-345
3. Toshiki Sawada, Hisakazu Mihara, Takeshi Serizawa, Peptides as New Smart Bionanomaterials: Molecular Recognition and Self-Assembly Capabilities, Chem. Rec., 査読有, 13, 2013, 172-186

[学会発表] (計 22 件)

1. 澤田敏樹・陳ファンファン・白川直斗・芹澤 武、繊維状ウイルスからなるメゾスケール組織体の設計と構築、第62回高分子討論会、金沢大学、2013年9月11日
2. 澤田敏樹・陳ファンファン・白川直斗・芹

澤 武、繊維状ウイルスおよび金ナノ粒子からなるメゾスケール集合体の構築と特性評価、第23回バイオ・高分子シンポジウム、東京工業大学、2013年7月31日

3. 澤田敏樹・芹澤 武、繊維状ウイルスと金ナノ粒子からなるメゾスケール集合体の創製、第62回高分子学会年次大会、京都国際会館、2013年5月30日
4. 澤田敏樹・芹澤 武、繊維状ウイルスと金ナノ粒子からなるメゾスケール集合体の構築と特性評価、第93日本化学会春季年会、立命館大学、2013年3月23日
5. Toshiki Sawada, Takeshi Serizawa, Construction and characterization of mesoscale assemblies composed of gold nanoparticle and virus, 2nd International Conference on Biomaterials Science (ICBS2013), Tsukuba, 2013年3月19日
6. Toshiki Sawada Takeshi Serizawa, Design and construction of hydrogels composed of gold nanoparticle and filamentous virus, The First International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2012), Tokyo Institute of Technology, Tokyo, 2012年11月28日
7. Toshiki Sawada, Takeshi Serizawa, Construction of hydrogel composed of superstructured nanoparticle and filamentous virus, The 9th International Gel Symposium (Gelsympo 2012), Tsukuba, 2012年10月9日
8. Toshiki Sawada, Naoto Shirakawa, Takeshi Serizawa, Construction of organic-inorganic hybrid materials composed of gold nanoparticles and filamentous viruses, IUMRS-International Conference on Electronic Materials (IUMRS-ICEM 2012), Yokohama, 2012年9月26日
9. 陳ファンファン・白川直斗・澤田敏樹・芹澤 武、繊維状ファージを用いるハイブリッド型階層構造形成とその特性評価、第61回高分子討論会、名古屋工業大学、2012年9月19日
10. 澤田敏樹・芹澤 武、繊維状ウイルスを利用したソフトマテリアルの設計と構築、第61回高分子討論会、名古屋工業大学、2012年9月19日
11. Toshiki Sawada, Takeshi Serizawa, Development of molecular superstructure composed of gold nanoparticle and filamentous virus, The 6th International Conference on Gold Science Technology and its Applications (GOLD2012), Tokyo, 2012年9月7日
12. 澤田敏樹・白川直斗・芹澤 武、金ナノ粒子と繊維状ウイルスによる分子超構造体の設計と評価、第22回バイオ・高分子シンポジウム、東京大学、2012年6月25日
13. 澤田敏樹・芹澤 武、金ナノ粒子と繊維状ウイルスから構築されるハイドロゲルの特性評価、平成24年度繊維学会年次大会、

- タワーホール船堀、2012年6月6日
14. 陳ファンファン・白川直斗・澤田敏樹・芹澤 武、繊維状フェージとナノ粒子を用いた分子超構造体の構築、第61回高分子学会年次大会、パシフィコ横浜、2012年5月29日
 15. 澤田敏樹・白川直斗・芹澤 武、金ナノ粒子と繊維状ウイルスからなる分子超構造体の構築、第61回高分子学会年次大会、パシフィコ横浜、2012年5月29日
 16. 澤田敏樹・白川直斗・芹澤 武、繊維状ウイルスと金ナノ粒子からなる分子超構造体の設計および構築、第92日本化学会春季年会、慶應義塾大学、2012年3月28日
 17. Toshiki Sawada, Takeshi Serizawa、Development of hydrogels composed of filamentous viruses、12th Australia-Japan Colloid & Interface Science Symposium、Cairns-Australia、2011年11月21日
 18. 白川直斗・澤田敏樹・芹澤 武、金結合性ペプチド提示ウイルスと金ナノ粒子によるハイドロゲルの構築、第60回高分子討論会、岡山大学、2011年9月30日
 19. 澤田敏樹・芹澤 武、繊維状ウイルスを用いるハイドロゲルの設計と構築、第5回バイオ関連化学シンポジウム、つくば国際会議場、2011年9月13日
 20. Toshiki Sawada, Takeshi Serizawa、Development of hydrogels composed of filamentous viruses、The 14th Asian Chemical Congress 2011、Bangkok-Thailand、2011年9月7日
 21. 澤田敏樹・芹澤 武、繊維状ウイルスによるハイドロゲルの設計および合成、第21回バイオ・高分子シンポジウム、関西大学、2011年7月25日
 22. 澤田敏樹・芹澤 武、線維状ウイルスによるハイドロゲルの設計と合成、第60回高分子学会年次大会、名古屋国際会議場、2011年5月26日

〔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

澤田 敏樹 (SAWADA TOSHIKI)
東京工業大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：20581078

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：