

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24760642

研究課題名(和文) ナノ粒子-バイオ分子融合法への超分子化学的概念の導入とメゾ構造体作成法への展開

研究課題名(英文) Fabrication of Biomolecule-Inorganic Hybrid nanomaterials via supramolecular technique toward mesocrystal fabrication

研究代表者

富樫 貴成 (Togashi, Takanari)

山形大学・理学部・助教

研究者番号：80510122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、カルボキシル基を表面に有する無機ナノ粒子の合成と、カルボキシル基とグアニジウム基間で形成される塩橋構造を利用し、タンパク質-無機ナノ粒子を混合のみで融合させる技術の開発を行った。

3,4-ジヒドロキシヒドロ桂皮酸を配位子とした金属錯体を高温高圧水中で分解することによりCOOH基が呈示された種々の金属酸化物ナノ粒子の合成に成功した。また、N末端にアルギニン繰り返し配列を有する組換え緑色蛍光タンパク質を大腸菌発現させ、COOH基を有するナノ粒子と混合すると選択的に融合することを確認した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have studied the synthesis of COOH group displayed metal oxide nanoparticles and fusion technique of protein and nano particles. COOH group displayed metal oxide nanoparticles were synthesized via hydrothermal reaction of 3,4-dihydroxyhydroxy cinnamic acid-metal complex. GFP with Arginine repeat peptide was fused with COOH group displayed metal oxide nanoparticle by mixing in aqueous medium.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード：ナノバイオ ナノ材料

1. 研究開始当初の背景

無機ナノ材料を集積・配列させる事でナノ材料単独では発現できない機能(協力現象)を発現し、その機能は構造体の形状・サイズに大きく依存する。さらに、二種類以上のナノ材料を自在に配列させる事が可能となれば異種材料界面で生じる電氣的・磁氣的な物理現象を利用した新たな材料創成も可能となる。

申請者は自己組織化的に多彩な構造形成を形成するペプチド・タンパク質に着目した。ペプチド・タンパク質を用いた無機ナノ材料集合体・構造体は多く報告されており、その構造は多彩なだけでなく、遺伝子情報を改変による人工的な構造・機能のデザインが可能である。しかし、タンパク質-無機材料を融合し作成された構造体はペプチド・タンパク質構造体上で金属イオンを鉱物化させて作成するため、無機材質の種類が制限されている。対して、ナノ材料合成の分野では多種多様な材料の合成が報告されており、さらにそのサイズ・形状も制御可能となっている。これら、ナノ粒子を自在に配列・集積する技術が完成されれば集合体特有な物性の発現を見出す事ができるだろう。しかしながら、タンパク質の構造体をナノ粒子配列に利用する場合、ナノ粒子とタンパク質等を自在に融合させる技術が必要である。

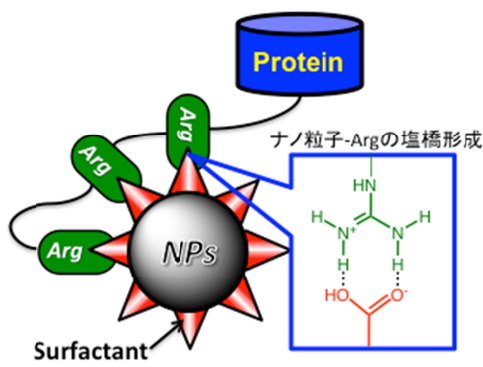


図1.本研究で開発する超分子接合法の開発

2. 研究の目的

本研究では、高度なナノ粒子間架橋構造デザインを行うために、超分子化学的な概念を基にしたバイオ・有機-無機ナノ素材の自在な融合法の開発から、ペプチド・タンパク質などの生体分子や超分子科学的な多重水素結合形成等による相補結合能・自己組織化能を利用し、より複雑な有機-無機ハイブリッド構造体形成を行い、構造体の形状・サイズや異種材料界面に由来する特異的な物性発現をめざした。

3. 研究の方法

まず、はじめに様々な材質の表面 COOH 呈示ナノ粒子およびナノ粒子集合体の合成を行う。次に、申請者が開発した表面 COOH 呈示ナノ粒子表面とタンパク質やペプチド間を多重水素結合等の超分子化学的相互作用を利用した複合法の開発を目指し研究を行った(図1)。

4. 研究成果

(1)【COOH 呈示金属酸化物ナノ粒子およびその集合体の合成】 3,4-ジヒドロキシヒドロキシシンナミックアシッド(DHCA)(図2)を配位子として用い、様々な水溶性金属錯体を合成した。調製した DHCA 金属錯体水溶液を高温高圧環境で反応させると、表面に COOH 基を呈示した金属酸化物ナノ粒子およびその集合体が合成できた(図3)。これら集合体は COOH 基を表面に有しているため、いずれの粒子・集合体は水に対して高い分散性を有していた。また、COOH を表面に有しているため超分子接合法によりタンパク質と混合のみで融合できうる。さらに、pH、反応温度等、合成条件の変化により集合体自身のサイズ・形状が変化することを見出した。

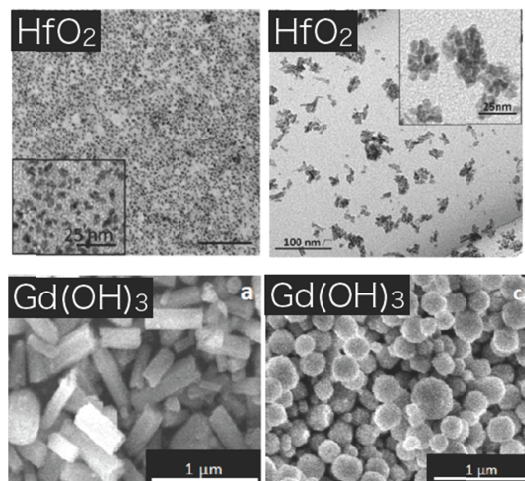


図3.金属-DHCA 錯体分解法により得られた金属酸化物・金属水酸化物ナノ粒子および集合体の電子顕微鏡像: 上段 HfO₂, 下段 Gd(OH)₃

(2)【FITC ラベル化 Arg 繰り返しペプチドを用いた COOH 呈示酸化鉄ナノ粒子への吸着特性評価(超分子接合法の証明)。】 Arg 6 残基・8 残基の繰り返しペプチドと FITC(蛍光分子)を融合した合成ペプチドを固相合成法により合成した。その後、図4に示す手法により各ペプチドと COOH 呈示 Fe₃O₄ 結合強度を測定した。その結果、Arg ペプチド融合 FITC のみナノ粒子に対して特異的吸着が確認された(図5)。この結果より、本研究目的である超分子接合法のタンパク質-ナノ粒子複合材料創成に対する有効性を示すことができた。

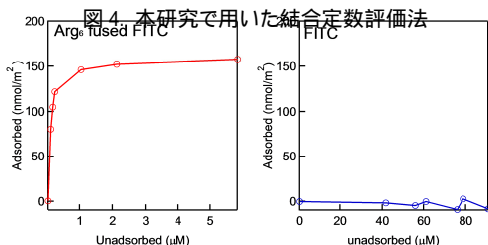
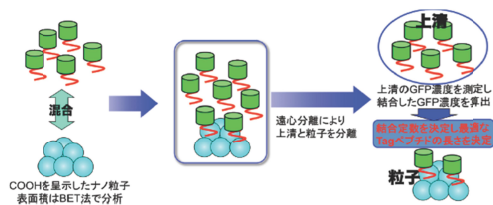


図5. Arg 融合 FITC と FITC の COOH 呈示酸化鉄ナノ粒子
に対する吸着等温線

(3) Arg 繰り返しペプチド融合ベクターの作製と結合能の評価

(2)で有効性を示した、超分子接合法をタンパク質に応用するため、N 末端に Arg6 残基・Arg8 残基の繰り返しペプチドを有する緑色蛍光タンパク質(GFP)発現ベクターを遺伝子工学的手法により作製した。大量発現された Arg6 融合 GFP は COOH 呈示酸化鉄ナノ粒子に対して吸着することを確認した。

本成果については、学术论文投稿準備中である。

(4)金属ナノ粒子へのタンパク質直接固定化水溶性シュウ酸架橋二核アルキルアミン錯体を合成した。合成した錯体は 30 の熱処理で分解し、直ちに金属銀が生成した。本錯体水溶液に、モデルタンパクとしてゼラチンを混合し、熱分解した結果、ゼラチンが銀表面に吸着した銀ナノ粒子が合成された。合成された粒子はゼラチンが吸着した効果により、水に対する分散性が非常に高い。また、合成した粒子を寒天培地に混合すると、大腸菌・黄色ブドウ球菌の増殖が抑制される等、抗菌活性を有している。

以上より、本研究の最大の開発目標であった超分子接合法によるタンパク質-無機材料接合法の有用性について示すことができた。本手法は、ナノ粒子配列のみならず、医療用ナノ材料の開発にも応用できる優れた手法である。

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 8 件)

Takanari Togashi, Kota Saito, Yukiko Matsuda, Ibuki Sato, Hiroki Kon, Keirei Uruma, Manabu Ishizaki, Katsuhiko Kanaizuka, Masatomi Sakamoto, Norimasa Ohya, Masato Kurihara, “Synthesis of

Gelatin protected and water dispersible Silver Nanoparticles by Thermal Decomposition of Silver Oxalate” *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2014, Vol. 14, pp. 6022-6027

高見誠一、相田努、富樫貴成、青木宣明、有田稔彦、北條大介、阿尻雅文 “超臨界流体を用いたナノ粒子の合成と構造制御” 触媒、印刷中

Daisuke Hojo, Takanari Togashi, Tadafumi Adschiri

“Self-Assembly and Reassembly phenomena of Organic-Inorganic Hybrid Nanocrystals in Highly-ordered Nanocrystalline Multi/Monolayer”

Japanese Journal of Applied Physics, 2013, 52, 110113

青木宣明、富樫貴成、北條大介、高見誠一、梅津光央、名嘉節、阿尻雅文

“超臨界法による有機修飾ナノ粒子合成と有機無機ハイブリッド材料合成” *日本接着学会誌* 2013, Vol.49, No.5, pp191-196

Varu Singh Takashi Naka, Seiichi Takami, Ameneh Saharaneshin, Takanari Togashi, Nobuaki Aoki, Daisuke Hojo, Toshihiko Arita, Tadafumi Adschiri

“Hydrothermal Synthesis of Inorganic-Organic Hybrid Gadolinium Hydroxide Nanoclusters with Controlled Size and Morphology”

Dalton Transactions, 2013, Vol.42, pp.16176-16184

Ameneh Saharashim, Shunsuke Asahina, Takanari Togashi, Varu Singh, Seiichi Takami, Daisuke Hojo, Toshihiko Arita, Kimitaka Minami, Tadafumi Adschiri

“Surfactant Assisted Hydrothermal Synthesis of water Dispersible Hafnium Oxide Nanoparticles in Highly Alkaline Media”

Crystal Growth & Design, 2012, Vol.12, No. 11, pp. 5219-5226

Syunsuke Asahina, Takanari Togashi, Osamu Terasaki, Seiichi Takami, Tadafumi Adschiri, Masateru Shibata, Natasha Erdman,

“High-resolution low-voltage scanning electron microscope study of nanostructured materials ”

Wiley Microscopy and Materials, 2012 26(7), S12-S14

高見誠一、富樫貴成、北條大介、有田稔彦、青木宣明、阿尻雅文

“ナノ粒子の配列複合化と機能化” *セラミックス*, 2012, vol. 47, pp.613-615

〔学会発表〕(計 4 件)

Takanari Togashi

“Synthesis of metal oxide nanoparticle assembled materials in high pressure and temperature water”(Invite)

International workshop on coordination compounds (山形) (2013 年 9 月)

Takanari Togashi

“One-step synthesis of metal oxide nanoparticle assembled materials in hydrothermal condition”(Invite)

CC3DMR2013 (韓国・済州) (2013 年 6 月)

富樫貴成、高見誠一、川上和義、山本秀輝、名嘉節、佐藤康一、阿尻雅文
“免疫回避能を有する医療用磁性ナノ粒子の連続合成”

第 10 回ナノ学会(平成 24 年 6 月 大阪)

“バイオ・配位化学的アプローチによる高温高压水中でのナノ粒子集合体合成”(依頼講演)

日本セラミックス協会秋季大会(日本・名古屋)(2012 年 9 月)

〔図書〕(計 1 件)

Tadafumi Adschiri, Seiichi Takami, Toshihiko Arita, Daisuke Hojo, Kimitaka Minami, Nobuaki Aoki, and Takanari Togashi

Handbook of Advanced Ceramics, Second Edition: Materials Applications, Processing and Properties.[Academic Press,(2013)] Shigeyuki Somiya (Edited), Chapter 11.1.5, Supercritical Hydrothermal Synthesis
ISBN:9780123854698

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富樫 貴成 (Takanari Togashi)

山形大学理学部物質生命化学科・助教

研究者番号：80510122