

「人工ペプチドと DNA を用いたミネラル化の精密制御」

甲南大学フロンティアサイエンス学部

臼井 健二

1 研究の背景と目的

近年、欧米では国家戦略的にナノバイオ研究が盛んに取り組まれている一方、日本における当該研究においては、遅れているのが現状である。そこで、日本の強みである電子工学との融合による、ナノバイオエレクトロニクス研究が我が国におけるナノバイオ研究のイニシアチブを取れる分野の一つになるのではないかと考えられる。具体的には、ナノ電子回路、ナノ半導体などに応用できる金属ナノ材料開発、有機物と無機物を組み合わせたハイブリッド材料開発が挙げられる。金属ナノ材料作製においては、有機分子による金属粒子集積技術が用いられ、多くの研究がなされてきた。しかし、さらなるボトムアップ技術向上を目指すためには、金属溶解液から直接ナノ凝集沈殿を行い粒子を生成する技術（ミネラル化）が有用である。また、この技術は有機-無機ハイブリッド材料への展開にも利用できる。これにより、よりスケールの小さい nm サイズのデバイス構築が可能となり、ナノバイオエレクトロニクス分野に大きく貢献できると考えられる。そこで本研究では、天然で歯や骨などの形成におけるメカニズムであるバイオミネラル化に着目し、配列により様々な無機物凝集能を有するタンパク質の小型版、ペプチドを用いて、位置特異的な制御や、さらに、温度、マイクロウェーブなどにより、形状や形成具合の制御を試み、高度なナノ沈殿制御法の確立を目指すことを目的にした。

我々はこれまでに、シリカ沈殿を題材として、比較的大きな数百ナノメートルの有機分子（DNA）の部位特異的（位置特異的）にシリカを沈殿させる技術を開発してきた。本研究では、新たな沈殿技術法の確立と、その新手法とこれまでの位置特異的沈殿法とを組み合わせたさらに複雑な沈殿制御法の確立などを目指した。

具体的には、以下の3点について研究を行うことにした。

- ① カルシウム沈殿（シリカ以外の無機物沈殿）の制御
- ② ①とこれまでに確立した位置特異的沈殿法を組み合わせた2種類の無機物の位置特異的沈殿制御
- ③ 温度やマイクロウェーブを用いた新たな沈殿制御法の確立

本研究により、バイオミネラル化の精密制御が可能となり、これを用いて、新規の金属ナノ材料、有機-無機ハイブリッド材料の作製が可能・容易となると期待できる。

2 研究方法・研究内容

上記、背景と目的の①から③について以下詳細に、研究方法および内容を説明する。

① カルシウム沈殿の制御

これまでに行っていたシリカ以外の沈殿として、カルシウムを題材に沈殿の制御を試みた。本研究では2種類の方法によるカルシウム沈殿を試みた。1つは、すでに他グループが見出していたザリガニの骨格由来のタンパク質の部分配列とそのアナログ、もう1つは位置特異的沈殿の際に使用した DNA である。ペプチドについては、Fmoc 固相合成法により合成し、HPLC にて精製を行った。DNA については pBR322 を鋳型として、PCR を用いて合成した。次にカルシウム沈殿溶液の調製法の検討を行った。飽和炭酸水素カルシウム溶液を作製後、キレート滴定による濃度決定を試み、安定した再現性の良いカルシウム沈殿が可能となるような調製法の確立を行った。最後に、カルシウム沈殿の最適な時間、濃度調製を行った。

② 2種（カルシウムとシリカ）の位置特異的沈殿制御法の確立

上記①の知見と、以前に確立したシリカの位置特異的沈殿法を組み合わせ、2種の無機物の位置特異的沈殿法の確立を目指した。まず、①で作製したDNAとすでに以前に得られたペプチドを組み合わせ、シリカ沈殿を行った。この際に、TEMによるさらなる詳細解析を行った。

その後、①で確立したカルシウム沈殿を行った。形状観察をAFMおよびTEMにて行い、シリカ-カルシウムの複合沈殿物が存在しているかを確認した。

③ 温度やマイクロウェーブを用いた新たな沈殿制御法の確立

上記①で確立したペプチドを用いたカルシウム沈殿の知見を活かして、ミネラルゼーションの際に熱（温度）を加えたり、マイクロウェーブを照射したりすることによって、沈殿物の形状、量などが変化するかどうかを確認した。AFMによる形状観察のほか、HPLCによる残存ペプチド量の算定により、沈殿量の評価を行った。

3 研究成果

① カルシウムの凝集沈殿

まず、今回選択したペプチドの配列は図1に示すとおりであり、ザリガニ由来のタンパク質の部分配列（pS ペプチド）および、

pSペプチド配列 H-pSer-Ser-Glu-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-OH
 Sペプチド配列 H-Ser-Ser-Glu-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-OH

図1 選択したペプチド配列

リン酸基を除去したアナログ配列（S ペプチド）を選定し、合成した。次にDNAは位置特異的沈殿制御が可能のように、以前作製した、シリカ沈殿ペプチド中のDNAと結合するペプチド核酸（PNA）配列部分と相補的に結合する配列が両端に提示できるようなプライマーを用いて、pBR322を鋳型として、PCRを用いて合成した。

カルシウム沈殿溶液は図2に示すような装置を考案し、キレート滴定によるカルシウム飽和濃度の算定を可能にした。これにより、毎回再現性よく沈殿を行うことができた。

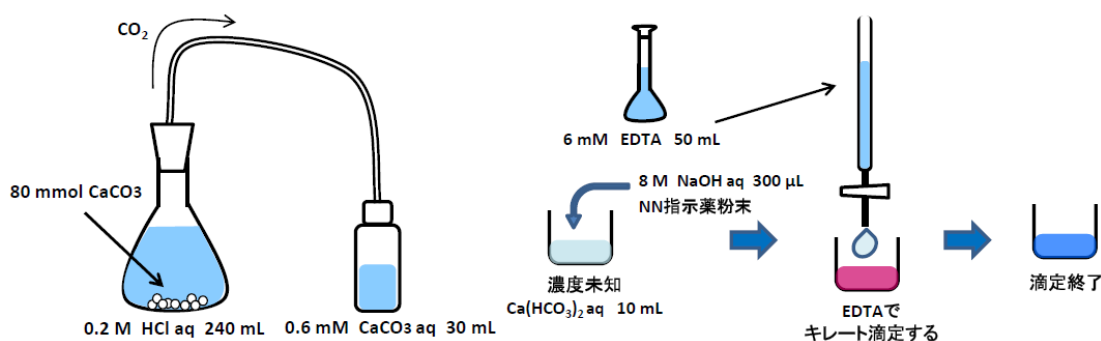


図2 (a) カルシウム沈殿溶液の調製 (b) キレート滴定

以上を確立したのちに、沈殿時間、濃度などの最適化を行った結果、図3のような沈殿物をAFMにて確認することができた。ザリガニ由来ペプチドについては、非常に粒の細かい沈殿が多数みられ、Sペプチドについては、沈殿量の減少が見られた。これは、わずかにSペプチドの方がpSペプチドよりもペプチド全体の負電荷が小さいことが起因していると思われる。また、DNAについては、DNAの形状通りの500nmのファイバー状のカルシウム沈殿物を得ることに成功した。

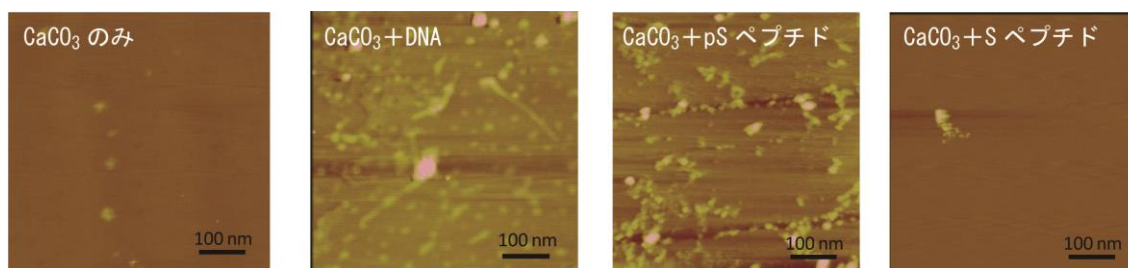


図3 カルシウムの凝集沈殿

② シリカとカルシウムの2種の同時沈殿制御

上記①の知見と、これまでの知見を利用してシリカとカルシウム2種の位置特異的沈殿を試みることにした(図

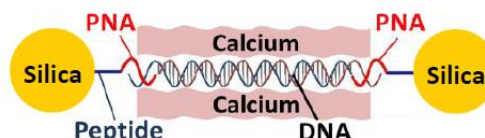


図4 2種の同時沈殿制御の概略図

4)。まず、シリカの沈殿において、これまで以上の詳細な解析を試みた。まず、TEMおよびTEM-EDXにおいて、AFMと同様の粒子が見られ、元素分析からそれらがシリカであることが判明した。また、DNAを金コロイドによって免疫染色する手法により、TEM上でもDNAが存在していることを明らかにした。以上より、確実に、DNAの両端にシリカが位置特異的に沈殿していることが判明した。ここまでの結果は現在論文作成が終了し、国際誌に現在投稿中である。次に、カルシウム沈殿を行った。現在条件の検討中であるが、シリカ・カルシウムの複合体をTEMにて観察できている(図5)。

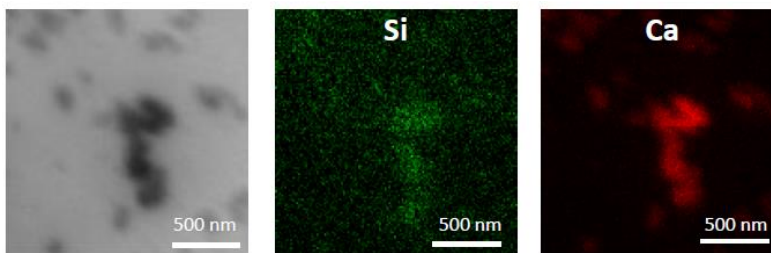


図5 TEMで観察されたシリカ・カルシウムの複合体

③ 温度、マイクロウェーブによるカルシウムの沈殿形状制御

上記①の知見を基に、ペプチドのカルシウム沈殿の際に、温度をかけたり、マイクロウェーブを照射したりすることによる、沈殿の変化を観察した。まず、用いたペプチドは、より、温度やマイクロウェーブの影響が顕著にわかるよう、沈殿の比較的少なかったアナログペプチドを用いた。温度やマイクロウェーブによって、いずれも沈殿量が多くなることが判明した。また、マイクロウェーブの照射によっては粒上ではなく、ひも状の構造物が得られるという興味深い結果も得られた。これらの結果は、現在論文発表を行うべく現在詰めの実験を行っている。

▼発表学会

Kenji Usui, Kazuma Nagai, Hiroto Nishiyama, Aoi Yamada, Makoto Ozaki, Takaaki Tsuruoka, and Kin-ya Tomizaki, "Designed small protein for controlling site-specific mineralization of silica and calcium on DNAs", The 28th Annual Symposium of The Protein Society, San Diego, California, USA, 2014/7

白井健二、尾崎誠、山田葵、鶴岡孝章、富崎欣也「PNA含有ペプチドを用いたDNA上での

シリカ-カルシウムの位置特異的沈殿制御」、第8回バイオ関連化学シンポジウム、岡山大学、岡山県岡山市、2014年9月

Kenji Usui, Hiroto Nishiyama, Aoi Yamada, Makoto Ozaki, Takaaki Tsuruoka and Kin-ya Tomizaki, "Site-Specific Mineralization of Silica and Calcium on DNAs Using a Designed Peptide", 第51回ペプチド討論会、徳島大学、徳島県徳島市、2014年10月

尾崎誠、臼井健二「ペプチド-DNA 複合体上へのシリカ-カルシウムミネラル化制御」、第31回関西地区ペプチドセミナー、関西大学、大阪府吹田市、2014年11月

圓東那津実、尾崎誠、臼井健二「ペプチドを用いたバイオミネラル化制御」、2014年ハイペップ研究所紅葉ワークショップ、ハイペップ研究所、京都府京都市、2014年12月

尾崎 誠、圓東 那津実、西山 浩人、山田 葵、鶴岡 孝明、富崎 欣也、臼井 健二「設計ペプチドおよびDNAを用いた二種の無機物の位置特異的ミネラル化制御」、日本化学会第95春季年会、日本大学理工学部船橋キャンパス、千葉県船橋市、2014年3月

▼発表論文

K. Usui*, H. Nishiyama, A. Yamada, M. Ozaki, T. Tsuruoka, K.-y. Tomizaki
Site-Specific Mineralization of Silica and Calcium on DNAs Using a Designed Peptide
Peptide Science, 2014, in press (2015)

M. Ozaki, K. Nagai, H. Nishiyama, T. Tsuruoka, S. Fujii, T. Imai, K.-y. Tomizaki, K. Usui*
Site-Specific Control of Silica Mineralization on DNA Using a Designed Peptide
in preparation

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究ではシリカやカルシウム沈殿しか扱わなかったが、配列さえ変更すれば DNA 上の指定の場所に特定の無機物を凝集沈殿させる方法および、温度やマイクロウェーブによる沈殿量や形状を制御した沈殿方法が確立し、ナノレベルでの高度で精密な無機物の沈殿制御ができる。これにより様々な有機物質と無機物の構造体をブロックのように組み合わせることが可能となり、新規の有機-無機ナノ材料、金属ナノ材料の創製が可能となる。よって、既存の粒子を集積させる技術よりもさらに高度なナノ集積体の構築が可能となり、日本のナノテクノロジー発展のブレークスルーになると考えられる。沈殿させる無機物を、ペプチド配列を変更することにより、様々な変更することが可能なので、その目的に応じて、導電性や半導電性無機物沈殿を行えば、ナノ電子回路、ナノ半導体、ナノコンデンサー、ナノ合金の構築が可能となり、ナノバイオエレクトロニクスという新たな技術領域の開拓が期待できる。また、重金属などの環境汚染物質の選択的回収にも利用でき、環境分野への応用も期待できる。こうした観点のもと、本研究成果を基に、兵庫県内の複数企業とも新たなテーマによる共同研究を締結することができ、兵庫県発の新規産業、技術の開発に大きく寄与できたと考えている。以上より、本研究は、資源の少ない日本において、限りある資源から最大限の付加価値を付与でき、省エネルギーでもある、兵庫県発のナノバイオ技術における基盤であり、要となる研究となると期待できる。