

甲南大学 博士学位論文

人工ペプチドを用いたミネラルゼーションによる
無機ナノ粒子作製法の確立

甲南大学大学院

フロンティアサイエンス研究科 生命化学専攻

尾崎 誠

2021年2月

目次

第1章 要旨	1
第2章 序論	3
2-1. バイオミネラリゼーション	
2-2. ペプチドを用いた無機物のミネラリゼーション	
2-3. ペプチドの細胞透過能	
2-4. 人工アミノ酸や機能性官能基を付与した自己集合化ペプチドを用いた無機物のミネラリゼーション	
2-5. 細胞内環境を利用した細胞内での無機ナノ粒子の直接合成	
2-6. 研究目的と構成	
第3章 Au還元ペプチドを用いたAuのミネラリゼーションにおけるTrp残基の影響	16
3-1. 緒言	
3-2. 実験材料および実験手法	
3-2-1. 実験材料	
3-2-2. Au還元ペプチドの設計	
3-2-3. Au還元ペプチドの合成	
3-2-4. Au還元ペプチドのストック溶液の濃度決定	
3-2-5. CD測定による三種類のAu還元ペプチドの二次構造確認	
3-2-6. 各種ペプチドを用いたAuのミネラリゼーション	
3-2-7. UV-VIS測定によるAuナノ粒子のSPR由来の吸収の確認と速度定数の解析	
3-2-8. 透過型電子顕微鏡(TEM)による形成したAuナノ粒子の形状観察	
3-2-9. ζ電位測定によるAuナノ粒子の分散性評価	
3-2-10. 各種ペプチドを用いて作製したAuナノ粒子の触媒活性評価	
3-3. 結果と考察	
3-3-1. 三種類のAu還元ペプチドの合成	
3-3-2. 合成したAu還元ペプチドの二次構造確認	
3-3-3. Au還元ペプチドのAu還元能の評価	
3-3-4. Au還元ペプチドを用いたAuの還元反応における速度論的評価	
3-3-5. 作製したAuナノ粒子表面へのペプチドの保護効果	
3-3-6. Au還元ペプチドのAu還元能の評価	
3-3-7. 作製したAuナノ粒子の4-ニトロフェノール還元反応の触媒活性評価	
3-4. 結論	

4-1. 緒言

4-2. 実験材料および実験手法

4-2-1. 実験材料

4-2-2. SiO₂ 沈殿ペプチドの設計

4-2-3. SiO₂ 沈殿ペプチドの合成および精製

4-2-4. SiO₂ 沈殿ペプチドのストック溶液の調製

4-2-5. テンプレート用 DNA の設計

4-2-6. 鋳型 pBR 322 の作製

4-2-7. テンプレート用 DNA の調製

4-2-7-1. テンプレート DNA の作製

4-2-7-2. テンプレート DNA の精製

4-2-8. SiPP-PNA-TempDNA 複合体の調製

4-2-9. DNA 上への SiO₂ の位置特異的沈殿

4-2-10. 免疫染色による DNA 上への SiO₂ の位置特異的沈殿の確認

4-2-11. CaCO₃ 沈殿溶液 (Ca(HCO₃)₂) の調製

4-2-12. CaCO₃ 沈殿溶液の濃度決定

4-2-13. DNA 上への CaCO₃ の位置特異的沈殿の確認

4-2-13-1. CaCO₃ のミネラルゼーションの確認

4-2-13-2. TempDNA_L-0 を用いた SiO₂ のミネラルゼーションによる SiO₂ 形成の有無の確認

4-2-13-3. TempDNA_L-0 を用いた CaCO₃ のミネラルゼーションの最適化

4-2-14. SiO₂ 沈殿後の DNA 上への CaCO₃ の位置特異的制御

4-3. 各種測定サンプルの作製方法

4-3-1. AFM による形状観察

4-3-2. TEM による形状観察と TEM-EDX による元素分析

4-3-3. SEM による形状観察

4-3-4. DLS による SiO₂ 沈殿物の粒子径測定

4-3-5. アガロース電気泳動による SiPP-PNA と TempDNA の結合確認

4-3-6. モリブデンブルーアッセイによる SiO₂ 沈殿能の確認

4-3-7. キレート滴定による CaCO₃ 沈殿能の確認

4-4. 実験結果

4-4-1. SiO₂ 沈殿ペプチドの SiO₂ 沈殿能の確認

4-4-2. AFM 観察による DNA 上への SiO₂ の位置特異的沈殿の確認

4-4-3. TEM 観察による DNA 上への SiO₂ の位置特異的沈殿の確認

4-4-4. 免疫染色による DNA 上への SiO₂ の位置特異的沈殿制御の確認

- 4-4-5. DLS とアガロース電気泳動によるマクロ的解析
- 4-4-6. DNA の CaCO_3 沈殿能の確認と CaCO_3 のミネラル化の最適化
- 4-4-7. マクロ的解析による SiO_2 と CaCO_3 沈殿能の確認
- 4-4-8. SiO_2 と CaCO_3 の DNA 上への二種の無機物の位置特異的沈殿制御の確認
- 4-4-9. $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ の濃度および沈殿時間の変化による SiO_2 - CaCO_3 複合ナノ構造体の形状制御
- 4-5. 結論

第5章 二種の無機物沈殿ペプチドを用いた DNA 上への Au と TiO_2 の位置特異的沈殿制御 53

- 5-1. 緒言
- 5-2. 実験材料および実験手法
 - 5-2-1. 実験材料
 - 5-2-2. TiO_2 沈殿ペプチドの設計
 - 5-2-3. Au 沈殿ペプチドの設計
 - 5-2-4. Au 沈殿ペプチドの合成および精製
 - 5-2-5. Au 沈殿ペプチドのストック溶液の調製
 - 5-2-6. 短鎖テンプレート DNA の設計
 - 5-2-7. 長鎖テンプレート DNA の作製
 - 5-2-8. 長鎖テンプレート DNA の精製
 - 5-2-9. 長鎖テンプレート DNA と TiO_2 沈殿ペプチドの複合化
 - 5-2-10. DNA 上への TiO_2 の位置特異的沈殿制御の確認
 - 5-2-11. DNA 上への Au の位置特異的沈殿制御の確認
 - 5-2-12. Au- TiO_2 nanocomposite の作製方法
 - 5-2-13. 光触媒活性評価方法
 - 5-2-13-1. コントロールサンプルとして使用する P25 TiO_2 の特徴
 - 5-2-13-2. コントロールサンプルとして使用する Commercial Au- TiO_2 の特徴
 - 5-2-13-3. コントロールサンプルとして使用する Au- TiO_2 generated by conventional method
 - 5-2-13-4. 可視光照射下 (> 450 nm) における光触媒活性評価
 - 5-2-14. 細胞の準備
 - 5-2-15. 継代培養
 - 5-2-16. 作製した Au- TiO_2 nanocomposite の細胞毒性試験
 - 5-2-17. Au- TiO_2 nanocomposite を用いた可視光照射による細胞死誘導
- 5-3. 各種測定サンプルの作製方法
 - 5-3-1. AFM による形状観察
 - 5-3-2. TEM、TEM-EDX による形状観察および元素分析
 - 5-3-3. UV-VIS 測定による光吸収特性解析
 - 5-3-4. DLS による粒子径測定

5-3-5. ラマン分光測定による結晶構造解析

5-3-6. UV-VIS-IR 拡散反射スペクトル測定による光吸収特性解析

5-4. 結果および考察

5-4-1. Au 沈殿ペプチドの合成と精製

5-4-2. TiO₂ と Au の位置特異的沈殿制御による Au-TiO₂ nanocomposite の作製と元素含有比の制御

5-4-3. 作製した Au-TiO₂ nanocomposite の光触媒活性評価

5-4-4. 作製した Au-TiO₂ nanocomposite の細胞毒性試験

5-4-5. 作製した Au-TiO₂ nanocomposite を用いた可視光照射による細胞死誘導

5-4-6. DNA 上への Au の位置特異的沈殿制御の確認

5-4-7. DNA 末端部位への TiO₂ の位置特異的沈殿制御の確認

5-4-8. ミネラリゼーションにより作製した TiO₂ の結晶構造解析

5-4-9. 作製した Au-TiO₂ nanocomposite の詳細解析

5-5. 結論

第 6 章 細胞透過性 Au イオン結合ペプチドを用いた細胞内での Au ナノ粒子の直接合成79

6-1. 緒言

6-2. 実験材料および実験手法

6-2-1. 実験材料

6-2-2. 細胞透過性 Au イオン結合ペプチドの設計・合成

6-2-3. 細胞透過性 Au イオン結合ペプチドの合成および精製

6-2-4. 細胞透過性 Au イオン結合ペプチドのストック溶液の調製

6-2-5. 細胞透過性 Au イオン結合ペプチドによる *in vitro* での Au ナノ粒子形成の有無の確認

6-2-6. 細胞の準備

6-2-7. 継代培養

6-2-8. 細胞透過性 Au イオン結合ペプチドを用いた細胞内での Au のミネラリゼーション

6-2-9. エンドサイトーシス阻害剤添加条件における細胞内での Au のミネラリゼーション

6-2-10. 細胞の破砕

6-2-11. 位相差顕微鏡観察による Au のミネラリゼーション後の細胞の観察

6-2-12. UV-VIS 測定による形成した Au ナノ粒子の光学特性の解析

6-2-13. 共焦点顕微鏡観察によるペプチドの導入および Au ナノ粒子の形成の確認

6-2-14. TEM 観察による細胞内で形成した Au ナノ粒子の形状観察

6-3. 実験結果と考察

6-3-1. 細胞透過性 Au イオン結合ペプチドの合成

6-3-2. 細胞透過性 Au イオン結合ペプチドによる *in vitro* での Au ナノ粒子形成の有無の確認

6-3-3. TEM によるペプチド集合体の形状観察

6-3-4. 細胞透過性 Au イオン結合ペプチドを用いた Au のミネラル化後の細胞の位相差顕微鏡観察	
6-3-5. UV-VIS 測定による形成した Au ナノ粒子の光学特性の解析	
6-3-6. 共焦点顕微鏡観察による細胞内での Au ナノ粒子形成の有無の確認	
6-3-7. TEM による細胞透過性 Au イオン結合ペプチドを用いて細胞内で形成した Au ナノ構造体の形状観察	
6-3-8. 細胞透過性 Au イオン結合ペプチドと H ₂ AuCl ₄ の濃度変化による Au ナノ粒子の形状制御	
6-4. 結論	

第7章 総括	94
謝辞	99
研究業績	100
学会発表リスト	101
受賞歴	105

第1章 要旨

ヒトの歯や骨はタンパク質やペプチドなどが無機物の結晶化を巧みに制御するバイオミネラリゼーション（無機物沈殿）により形成されている。近年、様々な無機物沈殿ペプチドが開発され、ペプチド工学と無機化学を融合した材料工学への応用を指向した研究が着目されるようになった。無機物沈殿による合成は工業生産で用いられる還元剤などを使用せずに温和な条件下で行えるため、生体や環境に優しい新たな無機材料合成手法として注目されている。現在のペプチドを用いたミネラリゼーション研究においては、自己集合化により作製したペプチド集合体を無機物沈殿の鋳型として用い、無機ナノ構造体のサイズや形状の制御を試みている。しかしながら、ペプチドのナノレベルでの精密な自己組織化制御が現状難しいことに加えて、一つの構造体につき一種類の無機物しか沈殿させることができないため、高機能性の無機ナノ構造体を作製するには複数の無機物のミネラリゼーションを達成することが不可欠であり、新たな作製手法が求められている。また、細胞内での応用を指向した場合、合成した無機ナノ粒子を細胞内に導入する方法では細胞膜に損傷を与えるほか、細胞内で凝集が生じて目的の機能が発現しないといった問題点がある。細胞内で無機ナノ粒子を直接合成できればこの問題点を解決することができ、合成した無機ナノ粒子を利用した応用展開が期待できる。上記の課題を解決することでペプチド科学における新しい概念を見出すことができ、ナノからバイオまで幅広い分野への応用が見込める。そこで本研究では、無機物沈殿ペプチドに他の有機分子や機能性ペプチドの修飾、さらには細胞内の環境を利用することで、上記の問題点を解決できる新たな無機ナノ粒子作製法の開発を目的とした。したがって本論文では、ナノ分野とバイオ分野の両分野に着目し、それぞれ分野の現状の課題を克服するための新たな無機ナノ粒子作製手法を提案し、それを実践した結果について述べる。本論文では、ペプチドを用いたミネラリゼーションの有用性をまず評価し（第3章）、(i) ミネラリゼーションによる二種の無機物からなる無機物複合ナノ構造体作製法の開発（第4章）と本手法を用いた機能性無機物複合ナノ構造体の作製（第5章）、(ii) ミネラリゼーションによる細胞内での無機ナノ粒子作製法の開発（第6章）の2点を指向した研究から構成されている。

第3章のペプチドを用いた無機物のミネラリゼーションの有用性評価では、Auのミネラリゼーションを題材に、Auの還元に関与するTrp残基の数を変化させることで、Auの還元速度を制御することができた。また、Trp残基の数を増加させるにつれて、従来法で使用される還元剤や分散保護剤を使用せずに高分散性および高触媒活性を有するAuナノ粒子を作製することができた。

第4章の核酸とペプチドを用いた無機物の精密沈殿制御法の確立では、数nmスケールでサイズや形状の制御が可能であるDNAを用いて、DNA上の任意の位置に無機物沈殿ペプチドを配置したペプチド-DNA複合体

を無機物沈殿のテンプレートとすることで、DNA 上の特定部位に無機ナノ粒子を位置特異的に形成させる手法を確立した。第 5 章では、DNA に結合させる無機物沈殿ペプチドの数を変化させることで無機ナノ構造体中の元素含有比の制御および無機ナノ構造体の機能を変化させることに成功した。

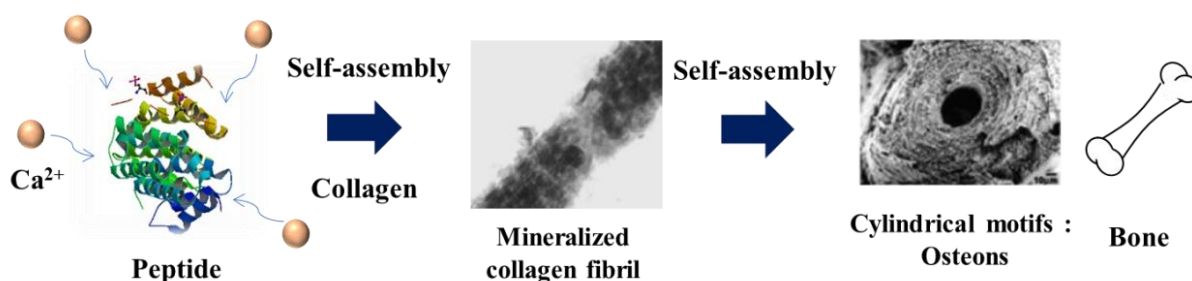
第 6 章では細胞透過性金属イオン結合ペプチドを用いた細胞内での無機ナノ粒子の直接合成を試みた。細胞透過能性配列を組み込んだ金属イオン結合ペプチドを用い、in test tube でペプチドに金属イオンを結合させた後、細胞内に導入することにより細胞内で無機ナノ粒子を直接合成する手法を確立した。

現在のペプチド科学において、生理活性ペプチドやペプチド製剤の開発といった創薬研究、CPP を用いた細胞工学、医療分野への応用を指向した DDS 研究、自己集合化ペプチドを用いた機能性材料の開発研究といったナノからバイオまで様々な分野の研究が行われている。しかしながら、それぞれの研究分野の中で独立して発展しており、それぞれの研究分野の垣根を超えるようなペプチドの利用方法やその指針が見出されていないのが現状である。本研究で確立した人工ペプチドを用いたミネラルゼーションによる無機ナノ粒子作製法は無機物沈殿ペプチドに機能性官能基や他の機能性ペプチドを修飾することで、ミネラルゼーションにより形成する無機物ナノ構造体のサイズや形状、元素含有比の制御も可能であることに加えて、細胞内に目的の無機物ナノ構造体を直接合成することができ、さらには細胞を「工場」とした無機材料合成場として利用することが可能であるという、ナノからバイオまで幅広い分野への波及が期待できる非常に独創的な手法である。このように、ペプチド単独の機能のみを利用するのではなく、他の有機分子やさらには細胞内の環境を利用して無機物と複合化した研究はなく、それらを基に無機ナノ粒子合成方法を示した本研究は非常に新規性の高いものである。本研究によって、ペプチド科学における新しい概念を見出すことができ、ナノからバイオ分野まで幅広い分野に応用することが期待できる。

第2章 序論

2-1. バイオミネラリゼーション

生体内では様々な生体分子が複雑に相互作用し、生体の恒常性を維持している。タンパク質の小型版であるペプチドも多彩な生理機能を有しており、生命現象を支える機能を担っている。ペプチドはいくつかのアミノ酸が連結した分子であり、アミノ酸配列の違いにより α -helix 構造や β -sheet 構造といった構造を形成する。近年では、アミノ酸配列を合目的に設計することにより β -barrel 構造といった高次構造の形成だけでなく、物質輸送や触媒、シグナル伝達、細胞内の物質の認識・結合といったタンパク質に匹敵するような機能を付与できることが報告されている。ヒトの歯や骨などもタンパク質やペプチドなどの有機分子が無機物の結晶化を巧みに制御するバイオミネラリゼーションという作用により形成している (Fig. 2-1)^[1]。2002年に R. R. Naik らがファージディスプレイ法によりいくつかのペプチドが Ca だけでなく、Au や Pt、Ag などの貴金属イオンも還元する作用があることを発見^[2]してから、様々な無機物沈殿ペプチドが開発され^[2-14]、ペプチド工学と無機化学を融合した材料工学分野への応用を指向した研究が着目されるようになった。従来の水熱合成や化学還元による無機物合成法では高温・高圧下での反応など高エネルギー条件が必要であること、還元剤などの環境負荷物質を使用することなど様々な問題点がある。一方、ミネラリゼーションにより形成する無機物は人工では作製することの難しい結晶モルフォロジーや光学特性を有することもある。また、工業生産の際に用いられる還元剤や強酸、強塩基を使用せずに温和な条件下で無機物の創製が可能であるため、環境に優しい新たな無機材料合成手法として注目されている。無機ナノ粒子はバルクには無い様々な量子サイズ効果を発現しており、材料分野だけでなく、フォトサーマル療法^[15, 16]やドラッグデリバリー (DDS) のキャリア^[17, 18]、*in vivo* イメージング^[19, 20]といった医療分野への応用を指向した研究も試みられている。ミネラリゼーションにより形成する無機物は還元剤やその他の生体に有害な試薬を使用せずに合成することが可能であるため、生体適合性の高い無機ナノ粒子を作製することができ、そのまま生体へ導入し応用することが期待できる。



L. C. Palmer *et al.*, *Chem. Rev.*, **108**, 4754-4783 (2008).

Fig. 2-1 Illustration of bone formation by biom mineralization.

2-2. ペプチドを用いた無機物のミネラルゼーション

現在、タンパク質や核酸、多糖など様々な有機分子を用いたミネラルゼーションの研究が盛んに行われているが、その中でも特に注目されているのがペプチドを用いたミネラルゼーションである。ペプチドは構造安定性が高く、機能性官能基の付与が容易であることに加えて、天然アミノ酸だけでなく人工アミノ酸^[21-23]や低分子化合物^[24-26]も修飾することが可能である。そのため、様々な有機分子や無機材料にペプチドを結合させることも可能である^[27, 28]。また、ペプチドはいくつかのアミノ酸が連結した分子であるため、還元剤（低分子化合物）などと比較して無機物イオンとの相互作用点が多く、ペプチド配列を合目的に設計することで様々な無機物をミネラルゼーションにより形成させることが可能である（Table 2-1）^[2-14]。さらに、ペプチドを自己集合化させ、それらをミネラルゼーションの鑄型にすることでファイバー状^[8]、ディスク状^[10]、リボン状^[11]などの様々な形状の無機物ナノ構造体を作製することも可能である。

Table 2-1 Sequences of inorganic precipitating peptides.

Peptide	Inorganic compounds	Sequence	Reference
AuBP1	Au	H-WAGAKRLVLRRE-NH ₂	<i>J. Phys. Chem. C</i> , 120 , 18917-18924 (2016).
Ge8	Ag	H-SLKMPHWPHELLP-NH ₂	<i>ACS Nano</i> , 4 , 3883-3888 (2010).
Pd4	Pd	H-TSNAVHPTLRHL-NH ₂	<i>Chem. Commun.</i> , 50 , 9259-9262 (2014).
RU-019	SiO ₂	Ac-KIEATXKIE-NH ₂	<i>Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.</i> , 37 , 541-546 (2012).
R5	TiO ₂	H-SGSKGSKRRIL-NH ₂	<i>Chem. Mater.</i> , 18 , 3108-3113 (2006).
pS peptide	CaCO ₃	H-pSSEDDDDDD-NH ₂	<i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> , 45 , 2876-2879 (2006).

2-3. ペプチドの細胞透過能

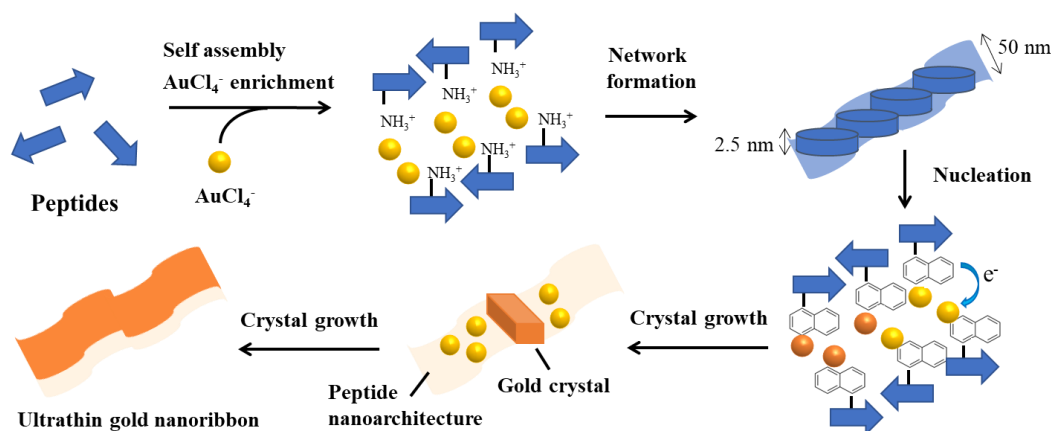
ペプチドには、細胞膜を貫通することで細胞死を誘導する抗菌ペプチド^[29-31]が知られている他、細胞膜を透過して物質を導入することができる細胞膜透過性ペプチド（CPP）なども開発されている^[32-48]。現在、数多くの CPP が開発されており^[32-48]、ペプチド配列によっては細胞膜を透過する様式が異なっていることも報告されている（Table 2-2）。α-helix 構造を形成するペプチドはエンドサイトーシスによるエンドソームを介した透過経路、β-sheet 構造を形成するペプチドは細胞膜に突き刺さり微少の穴を形成し、物質を透過させる直接透過経路という経路で透過することが知られている。このような透過経路の違いなどを利用して、無機材料や DDS のキャリア、薬剤などを細胞内に導入できることが報告されている。

Table 2-2 Sequences of cell penetrating peptide (CPP).

CPP	Sequence	Net charge	Amphipathicity	Secondary structure in the presence of phospholipids	Mechanisms of membrane translocation	Origin
TAT(48-60)	GRKKRRQRRRPPQ-NH ₂	8	nonamphipathic	random coil	endocytosis	HIV-Tat protein
polyarginine	Rn-NH ₂ n = 8,9	8,9	nonamphipathic	random coil		Based on Tat peptide
CADY	GLWRALWRLRLSLWRLWRA-Cya	5	secondary	α -helix	barrel-stave	PPTG1 peptide
R6/W3	RRWWRWRN-NH ₂	6	secondary	α -helix		Based on penetratin
MAP	KLALKLALKALKAAALKLA-NH ₂	5	secondary	α -helix		Chimeric
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV-Cya	6	primary	α -helix	toroidal	Trp-rich motif-SV40 NLS
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	4	primary	α -helix		Galanin and mastoparan
Transportan	GWTLNS/AGYLLGKINLKALAALAKKIL-N	5	primary	α -helix		Galanin and mastoparan
SAP	VRLPPPVRLLPPPVRLLPPP-NH ₂	3	-	PP -helix	toroidal	Synthetic peptide
Bac7	RRIRPRPRLPRPRPLPFPRPG-NH ₂	9	-	PP -helix		Synthetic peptide
PPR	(PPR) _n (n=3,4,5,6)	n	-	PP -helix		Synthetic peptide
Penetratin	RQIKIWFQRRRMKWK-NH ₂	7	-	α -helix / β -sheet (higher concentration)	inverted micelle	Antennapedia (43-58)
pVEC	LLILRRRIRKQAHASK-NH ₂	8	-	β -sheet	carpet	VE-cadherin(615-632)
MPG	GALFLGLGAAGSTMGA-Cya	5	-	β -sheet	carpet	HIV Gp41-SV40 NLS
Pep-7	SDLWEMMMVSLACQY-NH ₂	-2	nonamphipathic	random coil	endocytosis	Synthetic peptide
SG3	RLSGMNEVLSFRWL-NH ₂	1	nonamphipathic	random coil		Synthetic peptide
FGF	PIEVCMYREP-NH ₂	-1	nonamphipathic	random coil		Synthetic peptide

2-4. 人工アミノ酸や機能性官能基を付与した自己集合化ペプチドを用いた無機物のミネラルゼーション

RU-005 Ac-A-I-A-K-A-X-K-I-A-NH₂ (X=L-2-naphthylalanine)



K.-y. Tomizaki *et al.*, *Langmuir*, **30**, 846-856 (2014).

Fig. 2-2 Proposed reaction mechanism for the synthesis of ultrathin gold nanoribbons within the interior cavity of a self-assembled peptide.

現在、ペプチドを用いたミネラルゼーションの研究において、人工アミノ酸や機能性官能基を付与した自己集合化能を有するペプチドを用いた無機ナノ構造体の創製研究が盛んに行われている。K.-y. Tomizaki らは、親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸を交互に配置した β -sheet 構造を形成するペプチドに 2-ナフチルアラニンを導入した RU-005 を用いて、リボン状の Au ナノ構造体の作製に成功している^[12]。Au ナノリボンの形成メカニズムとして、まず HAuCl_4 存在下でペプチドの自己集合化を行うことで、 $[\text{AuCl}_4]$ が Lys 側鎖のアミノ基と静電

相互作用により引き寄せられ、ペプチド集合体の内部空間に[AuCl₄]⁻が取り込まれる。取り込まれた[AuCl₄]⁻は芳香族性人工アミノ酸である 2-ナフチルアラニンから電子が供給されることで Au³⁺から Au⁰に還元され、Au の結晶種が形成した後、内部空間で結晶成長反応が進行することでリボン状の Au ナノ構造体が形成したと考えられている (Fig. 2-2)。また、J. I. B. Janairo らは腫瘍抑制タンパク質である p53 (ヒト由来の p53) の 324 残基から 358 残基の 4 量体化ドメイン (DGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDAQAGKE) の N 末端にファージディスプレイによるインビトロセクションで取得された Pd 沈殿ペプチド (PD4; TSNVHPTLRHL) を 2 残基の Gly を介して付加させたペプチドを用いて、高触媒活性を有する Pd nanocorals の作製に成功している^[13]。C.-L. Chen らは Au と高親和性を有する A3 ペプチド (AYSSGAPPMPF) の N 末端にスクシニルイミドドデカン酸 (C₁₂H₂₃O) を付加したペプチドを用いて、二重らせん様に集合化したペプチド集合体上に Au ナノ粒子が配置した一次元 Au ナノ粒子集合体の作製に成功している^[14]。このようにペプチドの自己集合化能およびペプチドに機能性分子を修飾することで数百 nm～数 μm サイズの無機物構造体の形状制御が可能であることが示されている。

現在、上記のようにペプチドの自己集合化能を利用して様々な形状の無機物構造体を作製することには達成できているが^[7-14]、ミネラルゼーションの鋳型となるペプチド構造体の nm スケールでのサイズ制御は現状難しい。そのため無機物構造体の微細なサイズ制御は、他の手法はもちろんのこと、ペプチドを用いた手法においても現状達成できていない。現状のペプチドの自己集合化能を利用したミネラルゼーションには以下の 2 つの問題点がある。1 つ目の問題点として、ペプチド配列の違いにより、無機物の沈殿能やペプチド集合体のサイズや形状が大きく変化することが挙げられる。形成する無機物ナノ構造体のサイズや形状はテンプレートとなるペプチド集合体に依存するのだが、ペプチドのナノレベルでの精密な自己集合化の制御が現状難しいことが問題となっている。そのため、ペプチドのナノレベルでの精密な自己集合化制御は現状達成できていない。2 つ目の問題点として、他の手法やペプチドを用いた手法どちらにおいても一つの構造体につき一種類の無機物しかミネラルゼーションにより形成させることができないことが挙げられる。高機能性の無機物ナノ構造体を作製するには複数の無機物のミネラルゼーションを達成することが不可欠であり、ミネラルゼーションによる新たな無機物ナノ構造体の作製手法の提案が求められている。

2-5. 細胞内環境を利用した細胞内での無機ナノ粒子の直接合成

金属や半導体はサイズダウンすることにより、バルクには見られない特異な光学特性を発現する。これら材料が発現する量子サイズ効果を生かした材料創製研究が盛んに行われており、エレクトロニクス^[49, 50]、触

媒^[51, 52]といったナノ材料工学分野だけでなく、ドラッグデリバリー（DDS）のキャリア^[17, 18]や *in vivo* イメージング^[19, 20]などの医工学分野の応用も着手されつつある。合成した無機ナノ粒子を細胞内で応用するには、無機ナノ粒子表面を機能化した後、細胞内に導入する。しかしながら、従来の細胞内への無機ナノ粒子導入の際にはいくつかの問題がある（Fig. 2-3）。1）作製した無機ナノ粒子からの還元剤や界面活性剤を除去することや保護剤の使用が必要であること、2）無機ナノ粒子のサイズが減少するにつれて、細胞導入の際に損傷を生じやすく、細胞死を誘導すること^[53]、3）異方性無機ナノ粒子のアスペクト比が増大するにつれて細胞導入効率が低下すること^[54]、4）細胞膜を透過する際、無機ナノ粒子同士が凝集し、細胞内で目的の機能を発現しないこと^[55, 56]などが挙げられる（Fig. 2-3）。

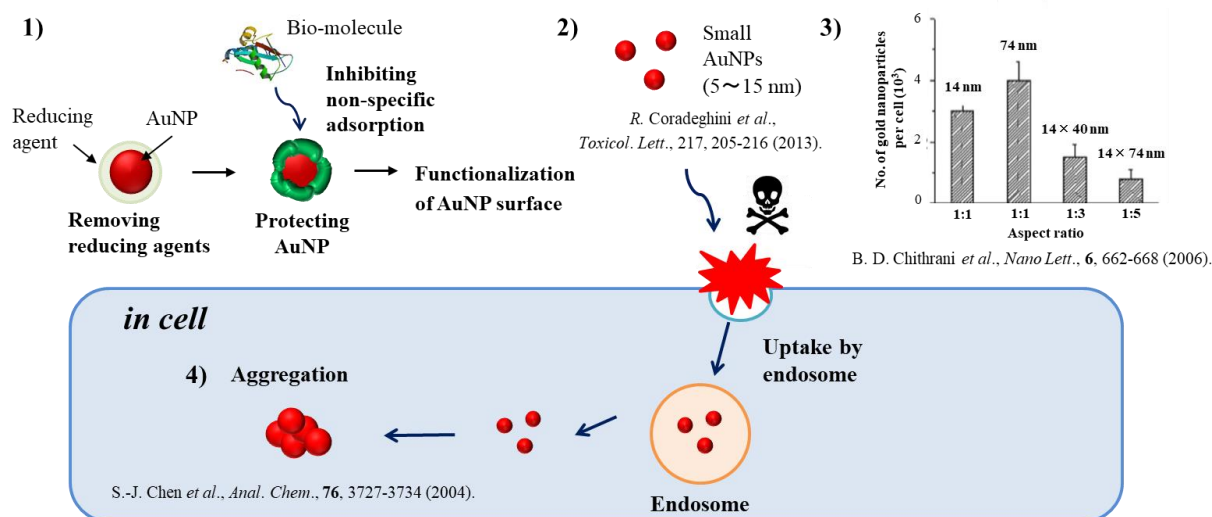


Fig. 2-3 Problems for transportation of metal nanoparticles into cells.

上記のように様々な問題があることから、合成した無機ナノ粒子を細胞に導入するのではなく、イオンの状態で細胞に導入した後、還元剤などの環境負荷物質を使用せずに細胞の代謝機能などを利用して細胞内に直接無機ナノ粒子を合成する試みがなされている^[57, 58]。ヒト由来の細胞においては無機ナノ粒子が形成するメカニズムは詳細には解明されていないが、細菌レベルではある程度無機イオンの還元メカニズムが理解されてきている。Auの還元においては、*P. islandicum* ではシトクロム c^[59]、*S. algae* では H₂^[60]、*Escherichia* ではヒドロゲナーゼ^[61]が電子供与体として、Auイオンを還元していることが明らかとなっている。Y. Xiaoらは、乳酸デヒドロゲナーゼを用いて、*in vitro*でAuナノ粒子の合成を試みたところ、乳酸デヒドロゲナーゼから産生されたNADHがAu³⁺をAu⁰に還元し、Auナノ粒子を形成することを示した^[62]。このように、生体由来の酵素を用いて*in vitro*でAuナノ粒子を合成する報告例はNADHの他に、アセチルコリンエステラーゼ

(AChE) / チオコリン^[63]、グルコースオキシダーゼ / 過酸化水素^[64]、チロシナーゼ / ドーパミン誘導体^[65]など多数の研究報告がある。

2005年にAnshupらはPBSで溶解させた1 mMのHAuCl₄をHeLa細胞に添加し、5% CO₂雰囲気下の37°Cインキュベーターで96時間インキュベートすることでヒト由来の細胞内においてもAuナノ粒子が形成することを報告した^[57]。正常細胞を用いて同様の実験を行ったところ、正常細胞ではAuナノ粒子の形成が生じにくいことが示された。これらの結果から、ガン細胞では代謝機能の異常や酵素の異常発現が起きているためにAuイオンの還元が促進され、Auナノ粒子が形成したのだと考えられている。2014年にN. I. Smithらは、HeLa細胞にPBSで溶解させた2 mMのHAuCl₄を添加し、室温で30分インキュベートさせた後、照射出力0.3 mWで波長532 nmのパルスレーザーを4~10秒間スポット照射させることで、細胞内の任意の部位にAuナノ粒子を合成することができることを示した^[58]。本手法では、HAuCl₄を添加した細胞に短パルスレーザーを照射することでレーザー励起反応場を形成させ、還元剤を使用せずに細胞内にAuナノ粒子を形成させることができる^[58]。短パルスレーザーを照射した部位は局所的に加熱されることで高温状態となり、キャビテーション気泡が生じる。このキャビテーション気泡の内部は高エネルギー状態のレーザー励起反応場となっており、水分子は光分解され水和電子や水素ラジカルとなる。これらラジカルが還元剤として機能し、Auナノ粒子を形成することが知られている (Fig. 2-4)^[66, 67]。さらに、パルスレーザーを走査することでレーザーを照射した部位にのみ位置選択的にAuを還元させることで、細胞内にAuナノ粒子で文字を描くことにも成功している。

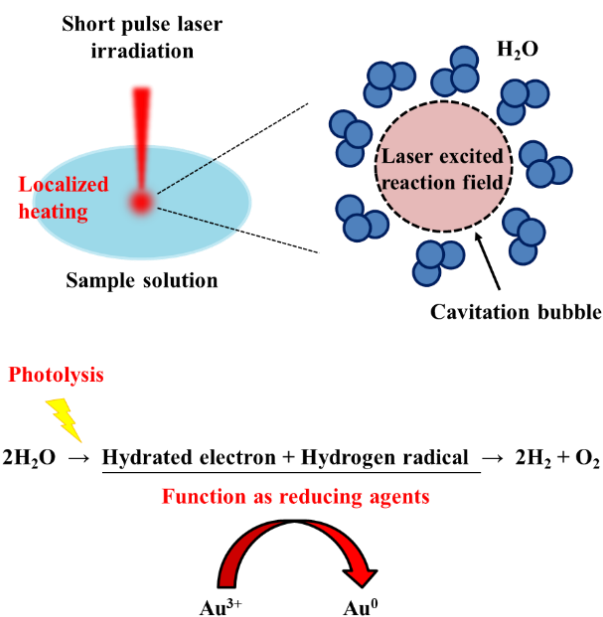


Fig. 2-4 Reduction mechanism of Au³⁺ to Au⁰ by short pulse laser irradiation.

しかしながら、細胞内に存在する酵素や細胞の代謝機能を利用した従来の合成方法では、Au ナノ粒子を形成させているため、粒子径分布の広い球状の Au ナノ粒子しか合成することができない。また、短パルスレーザーを用いた外部刺激による合成方法は、培養容器などで培養している細胞内においては適用可能であるが、532 nm の短パルスレーザーは皮膚をほとんど透過しないため、生体に応用することは難しい。1 mM を超える高濃度前駆体溶液の使用や高額なラマン顕微装置が必要であるという問題点がある。

2-6. 研究目的と構成

ペプチドを用いたミネラルゼーションの研究が注目されるようになってから約 20 年が経過し、様々な無機物沈殿ペプチドが開発されてきた^[2-14]。また、機能的官能基や人工アミノ酸を組み込んだ自己集合化能を有する無機物沈殿ペプチドを用いることで様々な形状の無機物構造体を作製することに成功している^[7-14]。しかしながら、現状では nm レベルでのサイズや形状を制御することのできる無機物合成法や二種以上の無機物からなる複合ナノ構造体を作製することが達成できていない。単一の無機物のみでは高付加価値を有する無機ナノ構造体を作製するためには限界があり、複数の無機物を複合化させることが必要である。また、細胞内での応用を指向した場合、合成した無機ナノ粒子を細胞内に導入する方法では細胞膜に損傷を与えるほか、細胞内で凝集が生じて目的の機能が発現しないといった問題点がある。細胞内で無機ナノ粒子を直接合成できれば現状の問題点を解決することができ、合成した無機ナノ粒子の機能を利用し様々な応用展開が期待できる。上記の課題を解決することでペプチド科学における新しい概念を見出すことができ、ナノからバイオまで幅広い分野への応用が見込める。そこで本研究では、無機物沈殿ペプチドに他の有機分子や機能的ペプチドの修飾、さらには細胞内の環境を利用することで、上記の問題点を解決できる新たな無機ナノ粒子作製法の開発を目的とした。したがって本論文では、ナノ分野とバイオ分野の両分野に着目し、それぞれ分野の現状の課題を克服するための新たな手法を提案し、それを実践した結果について述べる。本論文では、ペプチドを用いたミネラルゼーションの有用性をまず評価し (Fig. 2-5, Chapter 3)、(i) ミネラルゼーションによる二種の無機物からなる無機物複合ナノ構造体作製法の開発 (Fig. 2-5, Chapter 4) と本手法を用いた機能的無機物複合ナノ構造体の作製 (Fig. 2-5, Chapter 5)、(ii) ミネラルゼーションによる細胞内での無機ナノ粒子作製法の開発 (Fig. 2-5, Chapter 6) の 2 点を指向した研究から構成されている。

Overview

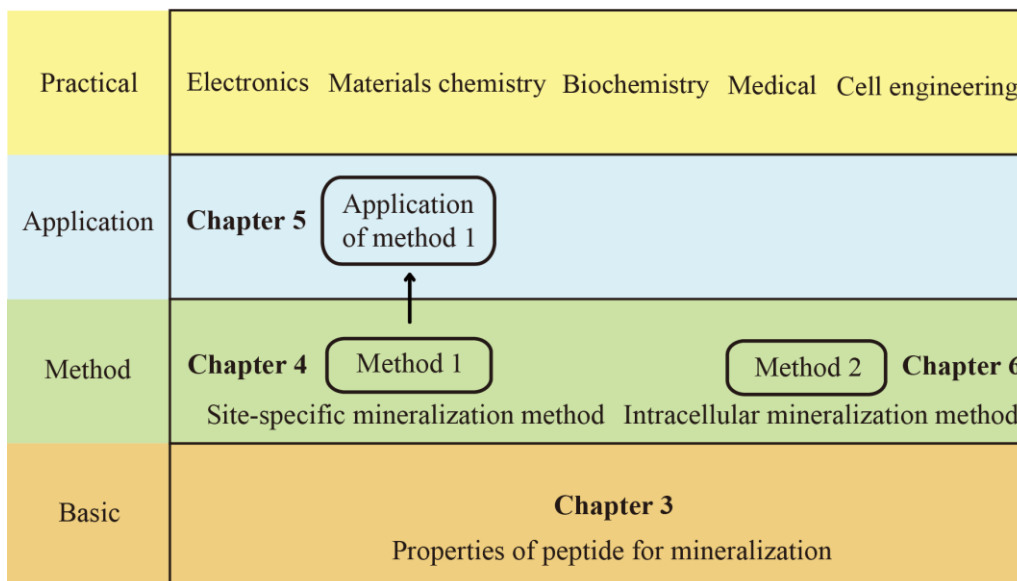


Fig. 2-5 Illustration of the overview of this thesis.

第3章ではAuのミネラルゼーションを題材に、Au還元ペプチド中のAuイオンの還元に関与しているTrp残基の数のみを変化させることでAuのミネラルゼーションにどのような影響を与えるのかを詳細に解析した。現在のペプチドを用いた無機物のミネラルゼーションの研究において、どのようなアミノ酸が無機物イオンとの結合や還元に関与しているのかといったことはある程度明らかとなっている。しかしながら、いくつかのアミノ酸が連結した構造であるペプチドは配列が変化することで劇的に構造や機能が変化する。そのため、どのようなアミノ酸をどの程度導入すればよいのかといった知見がないのが現状である。そこで、本章ではAu還元ペプチド中のTrp残基の数を変化させることでAuのミネラルゼーションにどのような影響があるのかをUV-VIS測定、透過型電子顕微鏡(TEM)観察、速度論的解析などにより詳細に解析した。さらに、作製したAuナノ粒子表面へのペプチドの保護効果や4-ニトロフェノールから4-アミノフェノールの還元反応をモデル反応に用いて、市販のAuナノ粒子と触媒活性の比較評価を行い、無機物のミネラルゼーションにペプチドを用いる有用性について評価した。

第4章と第5章では、現状のペプチドを用いたミネラルゼーションでは難しい数nmスケールでの無機物のサイズや形状の制御、ならびに二種の無機物の複合化を達成することのできる手法の確立を目指した。従来のペプチドを用いた無機物のミネラルゼーションでは、ペプチドの自己集合化能を利用してミネラルゼーションのための鋳型を作製しているため、一種類の無機物しか形成させることができず、形成する無機物のサイズや形状を制御するにも限界がある。そこで、本研究ではペプチド集合体をミネラルゼーションのテン

プレートにするのではなく、サイズや形状が整った分子である DNA に無機物沈殿ペプチドを配置したペプチド-DNA 複合体をミネラルゼーションのテンプレートにすることを考えた。DNA は数 bp (数 nm) 単位で鎖長を変化さ

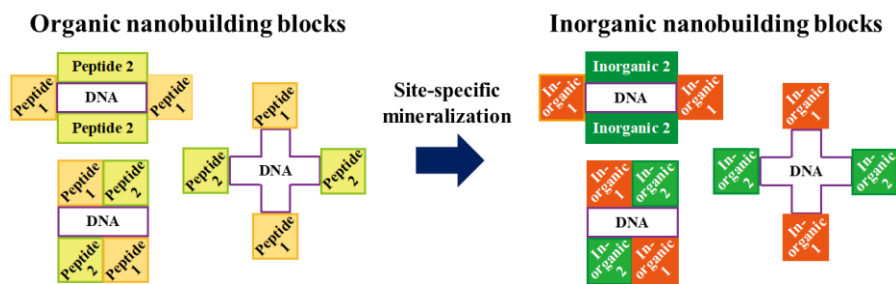


Fig. 2-6 Schematic illustration of site-specific mineralization using DNA and inorganic precipitating peptides

せることが可能である。また、二本鎖 (duplex) だけでなく DNA 配列を精密に設計することにより、三重らせん構造 (triplex) や四重らせん構造 (quadruplex) といった高次構造の形成、スリーウェイジャンクションやホリデイジャンクションといった分岐構造、DNA オリガミ技術などを駆使することにより 1 次元や 2 次元だけでなく 3 次元構造体を作製することも可能であり^[67-69]、数 nm 単位で構造体のサイズや形状を制御することができる。無機物沈殿ペプチドと DNA の複合化は DNA と相補的に結合可能なペプチド核酸 (PNA: peptide nucleic acid)^[70]や二本鎖 DNA の塩基間にインターカレートすることで知られているアクリジン^[71]などの分子をペプチドに導入することで DNA 上の任意の位置に無機物沈殿ペプチドをブロックのように配置することができる (Fig. 2-6)。このペプチド-DNA 複合体をテンプレートとして、無機物のミネラルゼーションを行うことで多種多様なサイズ、形状の無機物複合ナノ構造体を作製することが可能になると期待できる (Fig. 2-5)。このように本手法は現行のペプチドを用いたミネラルゼーションの問題点のブレークスルーが図れ、多種多様な機能性無機物複合ナノ構造体の創製および機能制御ができる非常に独創的な手法である。第 4 章では、SiO₂ のミネラルゼーションを題材に、PNA 配列を組み込んだ SiO₂ 沈殿ペプチドと SiO₂ 沈殿ペプチド中の PNA 配列と相補的な配列を両端に配置した DNA を用いて、DNA の両端に位置特異的に SiO₂ を沈殿制御することを試みた。また、DNA の両端に配置する PNA 結合部位の数や DNA の鎖長を変化させることで形成する DNA の両端に形成する SiO₂ および SiO₂-DNA 複合体のサイズを制御することにも試みた。さらに、SiO₂ のミネラルゼーションを行った後、DNA に沈殿することが知られている CaCO₃ を DNA 上に位置特異的に沈殿制御することを試みた。しかしながら、CaCO₃ が DNA 上だけでなく、SiO₂ 上にも沈殿することが確認されたため、第 5 章では TiO₂ と Au のミネラルゼーションを題材に、DNA 上に直接無機物を沈殿させるのではなく、二種の無機物沈殿ペプチドを用いて DNA 上の任意の位置にそれぞれのペプチドを配置した後、ミネラルゼーションすることでそれぞれの無機物を特定部位に精密に沈殿制御し、可視光励起性を有する Au-TiO₂ 複合ナノ構造

体の作製を試みた。第4章の知見を基にDNA上に配置するそれぞれの無機物沈殿ペプチドの数を制御することにより、Au-TiO₂複合ナノ構造体中のAuとTiO₂の元素含有比を制御することを試みた。また、作製したAu-TiO₂複合ナノ構造体の可視光照射下(>450 nm)における光触媒活性をメチレンブルーの分解反応を用いて評価した。さらに、HeLa細胞を用いた細胞毒性試験および可視光照射によるAu-TiO₂複合ナノ構造体の細胞死誘導効果の評価も行った。

第6章では、Auイオン結合能を有するペプチドにCPP配列を組み込んだ人工ペプチドを用い、*in vitro*でペプチドにAuイオンを結合させた後、細胞内に導入することにより細胞内の環境を利用して無機ナノ粒子を細胞内で直接合成する手法の確立を試みた。従来の細胞内の環境を利用した無機ナノ粒子の直接合成では高濃度の前駆体溶液(>1 mM)の使用や外部刺激を必要とするが、本研究ではペプチドにAuイオンを結合させた状態で細胞に導入するため、比較的低濃度で効率的にAuナノ粒子を作製することが期待できる。また、無機物イオン結合配列の数を変化させることで様々な無機ナノ粒子を作製することも理論上可能である。第4章と第5章の知見を用いることで、様々なサイズ・形状を有する二種以上の無機物からなる無機物複合体を細胞内に直接合成することも期待できる。さらに、細胞小器官移行性シグナルペプチド配列^[72, 73]を組み込むことで任意の細胞小器官に目的の無機ナノ粒子を作製することができると考えられる。

第7章では、本研究で確立した無機ナノ粒子作製法の位置づけと応用展開についてまとめた。

参考文献

- [1] L. C. Palmer, C. J. Newcomb, S. R. Kaltz, E. D. Spoerke, S. I. Stupp, *Chem. Rev.*, **108**, 4754-4783 (2008).
- [2] R. R. Naik, S. J. Stringer, G. Agarwal, S. E. Jones, M. O. Stone, *Nat. Mater.*, **1**, 169-172 (2002).
- [3] W. J. Crookes-Goodson, J. M. Slocik, R. R. Naik, *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 2403-2412 (2008).
- [4] M. B. Dickerson, K. H. Sandhage, R. R. Naik, *Chem. Rev.*, **108**, 4935-4978 (2008).
- [5] M. Ozaki, S. Sakashita, Y. Hamada, K. Usui, *Protein Pept. Lett.*, **25**, 15-24 (2018).
- [6] C. J. Munro, Z. E. Hughes, T. R. Walsh, M. R. Knecht, *J. Phys. Chem. C*, **120**, 18917-18924 (2016).
- [7] S. L. Sewell, D. W. Wright, *Chem. Mater.*, **18**, 3108-3113 (2006).
- [8] T. Nonoyama, T. Kinoshita, M. Higuchi, K. Nagata, M. Tanaka, K. Sato, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 8841-8847 (2012).
- [9] A. Altunbas, N. Sharma, M. S. Lamm, C. Yan, R. P. Nagarkar, J. P. Schneider, D. J. Pochan, *ACS Nano*, **4**, 181-188 (2010).
- [10] K.-y. Tomizaki, Y. Yamaguchi, N. Tsukamoto, T. Imai, *Protein Pept. Lett.*, **25**, 53-63 (2018).

- [11] A. Araki, K. Shimizu, M. Oda, T. Sakamoto, T. Nishimura, T. Kato, *Org. Biomol. Chem.*, **13**, 974-989 (2015).
- [12] K.-y. Tomizaki, S. Wakizaka, Y. Yamaguchi, A. Kobayashi and T. Imai, *Langmuir*, **30**, 846-856. (2014).
- [13] J. I. B. Janairo, T. Sakaguchi, K. Hara, A. Fukuoka, K. Sakaguchi, *Chem. Commun.*, **50**, 9259-9262 (2014).
- [14] C.-L. Chen, P. Zhang, N. L. Rosi, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 13555-13557 (2008).
- [15] N. S. Abadeer, C. J. Murphy, *J. Phys. Chem. C*, **120**, 4691-4716 (2016).
- [16] S. Yamashita, *Chem. Lett.*, **38**, 226-227 (2009).
- [17] E. C. Dreaden, A. M. Alkilany, X. Huang, C. J. Murphy, M. A. El-Sayed, *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 2740-2779 (2012).
- [18] B. Coradeghini, *J. Control Release*, **148**, 122-127 (2010).
- [19] B. R. Smith, S. S. Gambhir, *Chem. Rev.*, **117**, 901-986 (2017).
- [20] V. Biju, D. Muraleedharan, K. Nakayama, Y. Shinohara, T. Itoh, Y. Baba, M. Ishikawa, *Langmuir*, **23**, 10254-10261 (2007).
- [21] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science*, **254**, 1497-1500 (1991).
- [22] K. Usui, A. Okada, K. Kobayashi, N. Sugimoto, *Org. Biomol. Chem.*, **13**, 2022-2025 (2015).
- [23] K.-y. Tomizaki, T. Okamoto, T. Tonoda, T. Imai, M. Asano, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 5060 (2020).
- [24] G. P. Moloney, D. P. Kelly, P. Mack, *Molecules*, **6**, 230-243 (2001).
- [25] Y. Sekiya, S. Sakashita, K. Shimizu, K. Usui, R. Kawano, *Analyst*, **143**, 3540-3543 (2017).
- [26] H. Inaba, A. Uemura, K. Morishita, T. Kohiki T, A. Shigenaga A, A. Otaka A, K. Matsuura, *Sci. Rep.*, **8**, 6243 (2018).
- [27] K. Kim, S. Yoon, J. Chang, S. Lee, H. H. Cho, S. H. Jeong, K. Jo, J. H. Lee, *Small*, **16**, 1905821 (2020).
- [28] K.-y. Tomizaki, T. Kurosawa, M. Kajiyama, T. Imai, *Chem. Lett.*, **41**, 597-599 (2012).
- [29] T. Vitor, F. Maria, B. Margarida, *Prog. Lipid Res.*, **51**, 149-177 (2012).
- [30] J. Durzyńska, L. Przysiecka, R. Nawrot, J. Barylski, G. Nowicki, A. Warowicka, O. Musidlak, A. Goździcka-Józefiak, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **354**, 32-42 (2015).
- [31] N. Nekhotiaeva, A. Elmquist, G. K. Rajarao, M. Hällbrink, U. Langel, L. Good, *FASEB J.*, **45**, 393-396 (2016).
- [32] E. Vivés, P. Brodin, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.*, **272**, 16010-16017 (1997).
- [33] S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, *J. Biol. Chem.*, **276**, 5836-5840 (2001).
- [34] L. Crombez, G. A. Herrada, K. Konate, Q. N. Nguyen, G. K. McMaster, R. Bresseur, F. Heitz, G. Divita, *Mol. Ther.*, **17**, 95-103(2009).

- [35] D. Delaroche, B. Aussedat, S. Aubry, G. Chassaing, F. Burlina, G. Clodic, G. Bolbach, S. Lavielle, S. Sagan, *Anal. Chem.*, **79**, 1932-1938 (2007).
- [36] J. Oehlke, A. Scheller, B. Wiesner, E. Krause, M. Beyermann, E. Klauschenz, M. Melzig, M. Bienert, *Biochim. Biophys. Acta*, **1414**, 127-139(1998).
- [37] M. C. Morris, J. Depollier, J. Mery, F. Heitz, G. Divita, *Nat. Biotechnol.*, **19**, 1173-1176 (2001).
- [38] U. Soomets, M. Lindgren, X. Gallet, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1467**, 165-176, (2000).
- [39] M. Pooga, M. Hallbrink, M. Zorko, U. Langel, *FASEB J.*, **12**, 67-77(1998).
- [40] I. Martin, M. Teixidó, E. Giralt, *ChemBioChem*, **12**, 896-903 (2011).
- [41] K. Sadler, K. D. Eom, J.-L. Yang, Y. Dimitrova, J. P. Tam, *Biochemistry*, **41**, 14150-14157 (2002).
- [42] D. S. Daniels, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 14578-14579 (2007).
- [43] D. Derossi, A. H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, *J. Biol. Chem.* **269**, 10444-10450 (1994).
- [44] A. Elmquist, M. Lindgren, T. Bartfai, U. Langel, *Exp. Cell Res.*, **269**, 237-244 (2001).
- [45] M. C. Morris, P. Vidal, L. Chaloin, F. Heitz, G. Divita, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2730-2736 (1997).
- [46] C. Gao, S. Mao, H. J. Ditzel, L. Farnaes, P. Wirsching, R. A. Lerner, K. D. Janda, *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 4057-4065 (2002).
- [47] S. Gao, M. J. Simon, C. D. Hue, B. Morrison, S. Banta, *ACS Chem. Biol.*, **6**, 484-491 (2011).
- [48] F. Nakayama, T. Yasuda, S. Umeda, M. Asada, T. Imamura, V. Meineke, M. Akashi, *J. Biol. Chem.*, **286**, 25823-25834 (2011).
- [49] T. Qiu, Y. Hu, F. Xu, Z. Yan, F. Bai, G. Jia, S. Zhang, *Nanoscale*, **10**, 20963-20989 (2018).
- [50] S. Choi, S. I. Han, D. Kim, T. Hyeon, D.-H. Kim, *Chem. Soc. Rev.*, **48**, 1566-1595 (2019).
- [51] A. Fujishima, K. Honda, *Nature*, **238**, 37-38 (1972).
- [52] A. Heller, *Acc. Chem. Res.* **28**, 503-508 (1995).
- [53] R. Coradeghini, S. Gioria, C. P. Garcia, P. Nativo, F. Franchini, D. Gilliland, J. Ponti, F. Rossi, *Toxicol. Lett.*, **217**, 205-216 (2013).
- [54] B. D. Chithrani, A. A. Ghazani, W. C. W. Chan, *Nano Lett.*, **6**, 662-668 (2006).
- [55] S.-J. Chen, H.-T. Chang, *Anal. Chem.*, **76**, 3727-3734 (2004).
- [56] C. Contini, J. W. Hindley, N. Quirke, *Commun. Chem.*, **3**, 130 (2020).
- [57] A. Anshup, S. J. Venkataraman, C. Subramaniam, R. R. Kumar, S. Priya, T. R. S. Kumar, R. V. Omkumar, A. John,

- T. Pradeep, *Langmuir*, **21**, 11562-11567 (2005).
- [58] N. I. Smith, K. Mochizuki, H. Niioka, S. Ichikawa, N. Pavillon, A. J. Hobro, J. Ando, K. Fujita, Y. Kumagai, *Nat. Commun.*, **5**, 5144 (2014).
- [59] K. Kashefi, J. M. Tor, K. P. Nevin, D. R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3275-3279 (2001).
- [60] Y. Konishi, T. Tsukiyama, K. Ohno, N. Saitoh, T. Nomura, S. Nagamine, *Hydrometallurgy*, **81**, 24-29 (2006).
- [61] J. R. Lloyd, J. A. Cole, L. E. Macaskie, *J. Bacteriol.*, **179**, 2014-2021 (1997).
- [62] Y. Xiao, V. Pavlov, S. Levine, T. Niazov, G. Markovitch, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 4519-4522 (2004).
- [63] V. Pavlov, Y. Xiao, I. Willner, *Nano Lett.*, **5**, 649-653 (2005).
- [64] M. Zayats, R. Baron, I. Popov, I. Willner, *Nano Lett.*, **5**, 21-25 (2005).
- [65] R. Baron, *Anal. Chem.*, **77**, 1566-1571 (2005).
- [66] T. Nakamura, Y. Mochizuki, S. Sato, *J. Mater. Res.*, **23**, 968-974 (2008).
- [67] D. Liu, S. H. Park, J. H. Reif, T. H. LaBean, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **101**, 717-722 (2004).
- [68] H. Yan, S. H. Park, G. Finkelstein, J. H. Reif, T. H. LaBean, *Science*, **301**, 1882-1884 (2003).
- [69] J. Chen, N. C. Seeman, *Nature*, **350**, 631-633 (1991).
- [70] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science*, **254**, 1497-1500 (1991).
- [71] G. P. Moloney, D. P. Kelly, P. Mack, *Molecules*, **6**, 230-243 (2001).
- [72] M. Ray, R. Tang, Z. Jiang, V. M. Rotello, *Bioconjugate Chem.*, **26**, 1004-1007 (2015).
- [73] T. Ozawa, Y. Natori, Y. Sako, H. Kuroiwa, T. Kuroiwa, Y. Umezawa, *ACS Chem. Biol.*, **2**, 176-186 (2007).

第3章

Au還元ペプチドを用いたAuのミネラルゼーションにおけるTrp残基の影響

3-1. 緒言

現在のペプチドを用いた無機物のミネラルゼーションにおいて、無機物沈殿ペプチドを設計するにあたり、どのようなアミノ酸残基がどの程度必要なのかといった明確なガイドラインがないのが現状である。そこで本研究では、ナノ材料分野^[1-6]から医療分野^[7-9]まで幅広い分野への応用が期待できるAuのミネラルゼーションを題材に、Auイオン(Au³⁺)の還元メカニズムを詳細に解析することにした。Tanらはチロシン(Tyr)、トリプトファン(Trp)、フェニルアラニン(Phe)などの芳香族性アミノ酸がAu³⁺からAu⁰への還元に関与していることを報告している^[10]。また、Trp残基を含有したペプチドにおいて、還元剤を使用せずにAuナノ粒子を合成することができることも報告されている^[11]。しかしながら、ペプチド中のTrp残基の数によってAuの還元能がどのように変化するかといった知見はない。Auナノ粒子はサイズや形状によって光学特性が劇的に変化するため、Auのミネラルゼーションメカニズムや形成するAuナノ粒子の形態やその特性を理解することは非常に重要である。本研究では、還元剤を使用せずにAuナノ粒子を合成することができるAuBP1を題材に、AuBP1のN末端に配置しているTrpの数を変化させることでAuのミネラルゼーションにどのような影響があるのかをUV-VIS測定、透過型電子顕微鏡(TEM)観察、速度論的解析などにより詳細に解析した。さらに、作製したAuナノ粒子の分散性の評価および触媒活性を市販のAuナノ粒子と比較した。

3-2. 実験材料および実験手法

3-2-1. 実験材料

ペプチド合成時に使用したFmoc-NH-SAL PEG resin、各種Fmocアミノ酸誘導体、縮合剤であるHBTU (O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N, N, N, N-tetramethyluronium hexafluorophosphate)、HOBt・H₂O (1-Hydroxy-1H-benzotriazole hydrate) Piperidine、DIPEA、TFAは渡辺化学(株)から購入した。ペプチドの精製の際に使用したアセトニトリルはSigma-Aldrich社の高速液体クロマトグラフィー用のものを使用した。Auのミネラルゼーションに使用したテトラクロロ金(III)酸四水和物(HAuCl₄)はSigma-aldrich社から購入した。4-ニトロフェノールの還元反応に使用した4-ニトロフェノールとテトラヒドロホウ酸ナトリウム(NaBH₄)はSigma-aldrich社から購入した。

3-2-2. Au 還元ペプチドの設計

本研究で設計した Au 還元ペプチドは以下のとおりである (Fig. 3-1)。

AuBP1



2W-AuBP1



3W-AuBP1



Fig. 3-1 Sequences of gold reducing peptide used in this study.

本研究で使用する AuBP1 はファージディスプレイ法によるインビトロセレクションにより取得されたペプチドであり、Au 表面に対してアルカンチオールに匹敵する高い親和性を有している^[12]。また、還元剤を使用せずに Au ナノ粒子を作製することができることも報告されている^[11]。本ペプチドの 6 残基目、10 残基目、11 残基目の Arg が Au³⁺ と相互作用し、N 末端の Trp が Au³⁺ から Au⁰ への還元に関与していることが明らかになっている^[13, 14]。そこで、本研究では Au の還元に関与している N 末端に配置している Trp に着目し、Trp 残基の数を変化させた三種類のペプチド (AuBP1、2W-AuBP1、3W-AuBP1) を用いて (Fig. 3-1)、Au のミネラルゼーションにおける Trp 残基の影響ならびに形成する Au ナノ粒子を詳細に解析することにした。

3-2-3. Au 還元ペプチドの合成

三種類の Au 還元ペプチドの合成は Fmoc (Fluorenylmethyloxycarbonyl) 固相合成法^[15]により合成した。50 μmol スケール相当の Fmoc-NH-SAL PEG resin を秤量し、NMP で 5 回洗浄した後 NMP で 1 日膨潤させた。その後、NMP を除去し、NMP 2 mL で 5 回洗浄後、25% PPD/NMP 溶液 2 mL を添加し、攪拌しながら 7 分間反応させた。25% PPD/NMP 溶液を除去して再度 25% PPD/NMP 溶液 2 mL を添加し、攪拌しながら 7 分間反応させることで樹脂表面の Fmoc 基を切断した。これを NMP 2 mL で 5 回洗浄した。その後、樹脂に導入可能なペプチド量に対して、10 当量の Fmoc-AA-OH と 10 当量の HBTU、10 当量の HOBt・H₂O を NMP 2 mL に溶解し、15 当量の DIEA を添加し、30 分間インキュベートさせた。NMP 2 mL で 5 回洗浄した。以上を繰り返し目的のペプチドを得た。MilliQ : triisopropylsilane : thioanisole : TFA = 1 : 1 : 1 : 50 で脱保護・脱樹脂を 1 時間行った後、エバポレーターで余分な TFA を除去した。目的のペプチドが含まれるエバポレーター後の溶液に冷ジエチル

エーテルを加え、粗ペプチドを沈殿させた。3000 rpm で遠心することでスカベンジャーをデカンテーションによって除去し、再び冷ジエチルエーテルを加えデカンテーションを行う作業を 3~4 回繰り返し粗ペプチドを洗浄した。デカンテーション後、ジエチルエーテルを除くために真空乾燥を行い、粗ペプチドを得た。この粗ペプチドを 0.1 %TFA 水溶液に溶かし、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) により精製した。その後、HPLC (RP-HPLC GL7410、波長可変型紫外検出器 : GL7450、カラム : Inertsil ODS-3 カラム、A 溶媒 : MilliQ 100%/TFA 0.01%、B 溶媒 : アセトニトリル 100%/TFA 0.08%) で精製し、MALDI-TOF MS で同定した。

3-2-4. Au 還元ペプチドのストック溶液の濃度決定

ペプチド溶液の濃度はアミノ酸分析で決定した。70 Torr、120°Cの条件下で 6 M HCl によって 24 時間加水分解を行い、PITC 標識した。内部標準には Val を使用した。HPLC は Water 社の Water2695 を使用し、カラムは GL サイエンス社の Inertsil ODS-2 カラム、溶離液は溶離液 A (アセトニトリル/60mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH6.0=6/94(v/v))、溶離液 B (アセトニトリル/60mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH6.0=60/40(v/v)) を用いた。

3-2-5. CD 測定による三種類の Au 還元ペプチドの二次構造確認

10 μ M の各種ペプチド 200 μ L を光路長 0.2 cm の石英セルに入れ、J-820 (JASCO) で測定した。測定により得られた CD 値と各ペプチドのペプチド結合の数 (AuBP1; 12、2W-AuBP: 13、3W-AuBP1; 14) からモル楕円率を算出した。

3-2-6. 各種ペプチドを用いた Au のミネラル化

光路長 1 cm の UV キュベットセル (Merck, BR759200) に 1 mM のペプチド (AuBP1、2W-AuBP1、3W-AuBP1) を 35 μ L と MilliQ を 280 μ L 添加した。その後、1 mM の H₂AuCl₄ を 35 μ L 添加し、室温で 24 時間インキュベートした。

3-2-7. UV-VIS 測定による Au ナノ粒子の SPR 由来の吸収の確認と速度定数の解析

Au のミネラル化を 24 時間行ったサンプルを紫外可視分光高度計 (UV-1800、Shimadzu) により測定した。速度定数は 540 nm の Au ナノ粒子由来の SPR の吸収の経時変化を測定し、反応初期の吸収の変化が線形直線になる部分の傾きの値を自然対数として取ることで得た。

3-2-8. 透過型電子顕微鏡 (TEM) による形成した Au ナノ粒子の形状観察

Au のミネラルゼーション終了後 (終濃度: ; 5~100 μM ペプチド、100 μM HAuCl_4) に 20 μL 分取して TEM 用グリッドに滴下し、1 分間静置させた。その後、濾紙を用いて溶液を吸引した。吸引後、MilliQ を 20 μL 滴下し、濾紙で吸引する工程を洗浄とし、3 回洗浄を行った。洗浄後、窒素乾燥を行いある程度乾燥させた後、1 日真空乾燥を行った。TEM は JEM-1400 (JEOL) を使用し、加速電圧 115 kV で観察を行った。

3-2-9. ζ 電位測定による Au ナノ粒子の分散性評価

ζ 電位測定用セル (Malvern、Disposable Solvent Resistant Micro Cuvette: DTS1070) に 750 μL 入れ、Zetasizer-ZEN3600 (Sysmex) により平衡化時間 120 秒、温度 25°C で ζ 電位を測定した。100 回測定したデータ平均を 1 回分の測定とし、3 回分の測定データをまとめた。

3-2-10. 各種ペプチドを用いて作製した Au ナノ粒子の 触媒活性評価

Au のミネラルゼーションを 24 時間行ったサンプルから 8 連マイクロマルチセル (208-92089, Shimadzu) に 26 μL 分取した後、7.5 mM の NaBH_4 を 52 μL を添加し、室温で 10 分間インキュベートすることで Au ナノ粒子表面に水素を吸着させた。その後、0.2 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) を 19.5 μL と 400 μM の 4-ニトロフェノールを 32.5 μL 添加し、紫外可視分光高度計 (UV-1800, Shimadzu) を用いて 20°C から 40°C の範囲で 4-ニトロフェノール由来の 400 nm の吸収の経時変化を測定した。それぞれの反応温度における 4-ニトロフェノールから 4-アミノフェノールへの還元反応の速度定数を算出し、アレニウスプロットを作成した。作成したアレニウスプロットの傾きから活性化エネルギーを算出した。

3-3. 結果と考察

3-3-1. 三種類の Au 還元ペプチドの合成

三種類の Au 還元ペプチドを Fmoc 固相合成法により合成した後、MilliQ : triisopropylsilane : thioanisole : TFA = 1 : 1 : 1 : 50 で脱保護・脱樹脂を行った。その後、冷ジエチルエーテルで粗ペプチドを沈殿させ、デカンテーションにより洗浄した。HPLC により精製した後、凍結乾燥することでペプチド粉末を得た。1 mM になるようにペプチド粉末を MilliQ で溶解させ、アミノ酸分析を行い濃度決定した。HPLC で純度の確認を行ったところ、高純度で合成できていることが示された (Fig. 3-2a-c)。また、MALDI-TOF MS により AuBP1 は 1453.9 (obs.) ($[M+H]^+=1453.8$ (calc.))、2W-AuBP1 は 1640.9 (obs.) ($[M+H]^+=1640.0$ (calc.))、3W-AuBP は 1826.9 (obs.) ($[M+H]^+=1826.2$ (calc.)) であることが示され、目的のペプチドを合成できていることが明らかとなった。

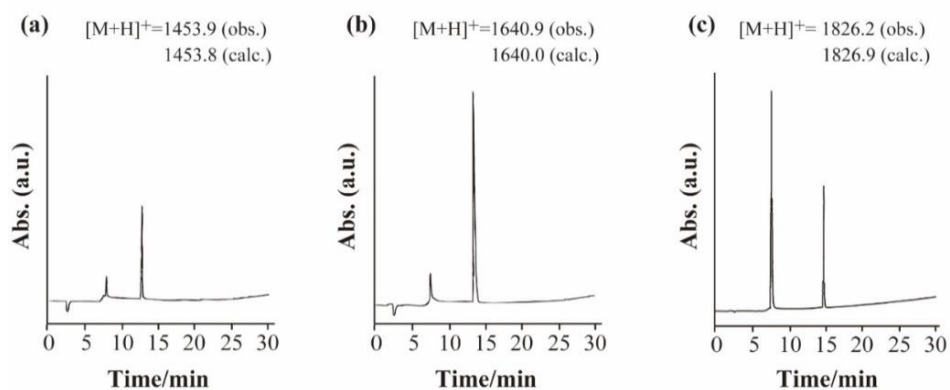


Fig. 3-2 HPLC for purified (a) AuBP1, (b) 2W-AuBP1, and (c) 3W-AuBP1 separated on an ODS column (150 × 4.6 mm, 5 mm) with MilliQ water (containing 0.1% TFA) using a gradient from 0% to 100% acetonitrile (containing 0.08% TFA) over 30 min, 1.0 mL/min; detection at 220 nm.

3-3-2. 合成した Au 還元ペプチドの二次構造確認

まず、CD 測定により合成した 3 種類のペプチド (AuBP1、2W-AuBP1、3W-AuBP1) の二次構造の形成の有無の確認を行った。その結果、3 種類すべてのペプチドにおいてランダムコイルに特徴的なスペクトルが確認された (Fig. 3-3)。このことから、Au のミネラルゼーションにおいて、ペプチドの二次構造の影響は除外できることが示唆されたので、Trp 残基の数の違いによる Au のミネラルゼーショ

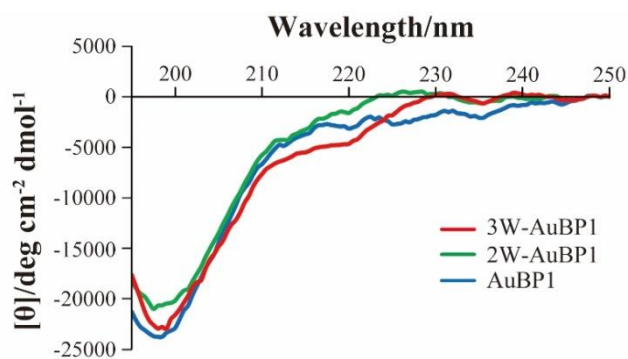


Fig. 3-3 CD spectra of 10 μ M AuBP1, 2W-AuBP1, and 3W-AuBP1.

ンの影響についてのみ焦点をあて、解析することにした。

3-3-3. Au 還元ペプチドの Au 還元能の評価

UV-VIS 測定により Au ナノ粒子由来の表面プラズモン共鳴 (SPR) 由来の吸収を測定し、各ペプチドの Au イオン還元能を確認した。ペプチドと HAuCl_4 の濃度を $100 \mu\text{M}$ とし、24 時間インキュベートしたところ、3 種類すべてのペプチドで $520\sim 540 \text{ nm}$ 付近に SPR 由来の吸収ピークが確認された (Fig. 3-4a)。それぞれのサンプルにおいて、Au ナノ粒子の SPR 由来の吸収の極大吸収波長は、Trp 残基の数が增大するにつれて極大吸収波長がブルーシフトしていることが示された (Fig. 3-4b)。SPR 由来の吸収ピークがブルーシフトしていることから、Trp 残基の数が增大するにつれて形成した Au ナノ粒子の粒子径は減少していることが示唆されているので、TEM 観察により形成した Au ナノ粒子のサイズを観察することにした。その結果、AuBP1 を用いて作製した Au ナノ粒子の粒子径は $22.8 \pm 6.3 \text{ nm}$ (Fig. 3-4c)、2W-AuBP1 は $11.7 \pm 2.2 \text{ nm}$ (Fig. 3-4d)、3W-AuBP1 は $8.6 \pm 1.8 \text{ nm}$ (Fig. 3-4e) であることが示され、UV-VIS 測定と一致する結果が得られた。これらの結果から、Trp 残基の数が增大するにつれて Au の還元速度が向上し、核形成反応が優位に起こることでサイズの小さい Au ナノ粒子が形成したのだと考えられる。

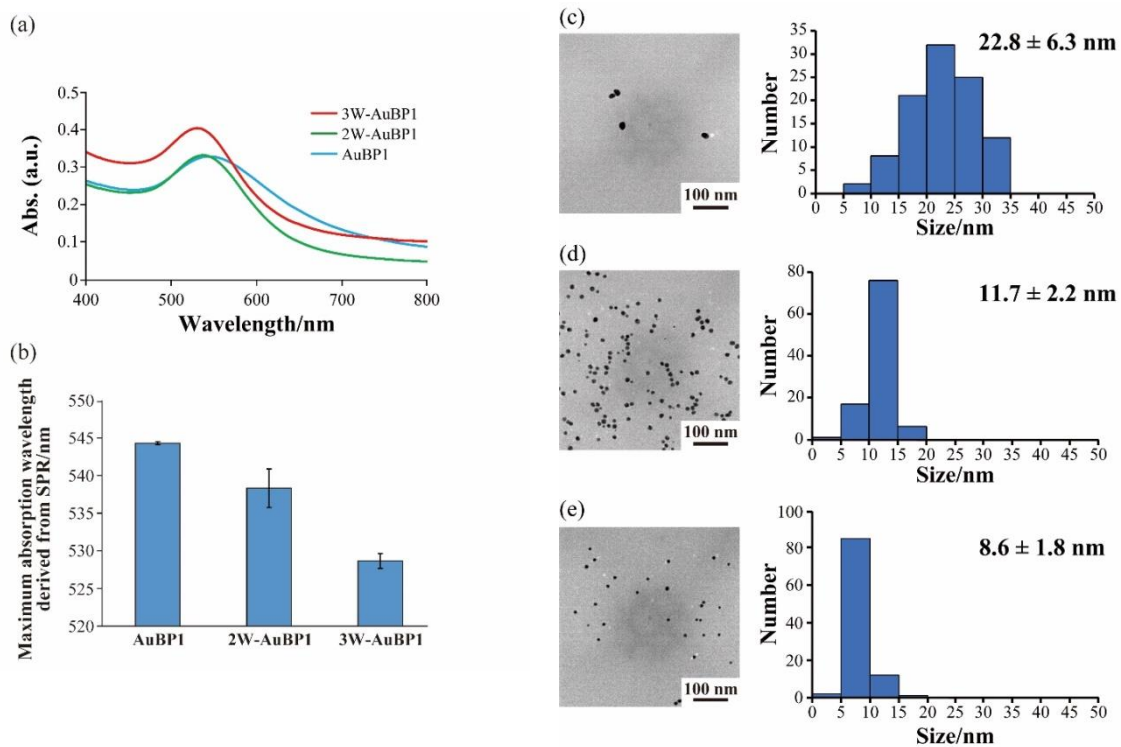


Fig. 3-4 (a) UV-VIS spectra of the sample after gold reduction using peptides. (b) Maximum absorption wavelength of the sample after gold reduction for 24 h using peptides. TEM images (left) and particle size histograms (right) of the sample after gold reduction for 24 h using (c) AuBP1, (d) 2W-AuBP1, and (e) 3W-AuBP1.

3-3-4. Au 還元ペプチドを用いた Au の還元反応における速度論的評価

続いて、Au の還元反応の速度定数を算出することで、それぞれのペプチドにおける Au の還元速度を速度論的に評価した。速度定数の算出はそれぞれのサンプルにおいて、540 nm の Au ナノ粒子由来の SPR の吸収の経時変化を測定し、反応初期の吸収の変化が線形直線になる部分の傾きの値を自然対数として取ることで得た (Fig. 3-5a)。その結果、AuBP1 の擬一次速度定数 k は $(4.2 \pm 1.2) \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ 、2W-AuBP1 は $(7.6 \pm 1.1) \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ となり、2W-AuBP1 の方が速度定数が高いことが示された (Fig. 3-5b)。3W-AuBP1 は HAuCl_4 添加直後の反応初期段階に Au ナノ粒子の形成が生じたため、信頼できる速度定数の値を算出することができなかった。そこで、3W-AuBP1 の濃度を $100 \mu\text{M}$ から $50 \mu\text{M}$ に低下させて速度定数の算出を行った。その結果、 $(8.6 \pm 2.8) \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ であることが示され、2倍濃度が低いにもかかわらず、2W-AuBP1 よりも高い値を示した (Fig. 3-5b)。以上の結果から、Trp 残基の数を増加させることで Au の還元速度が向上することが示された。

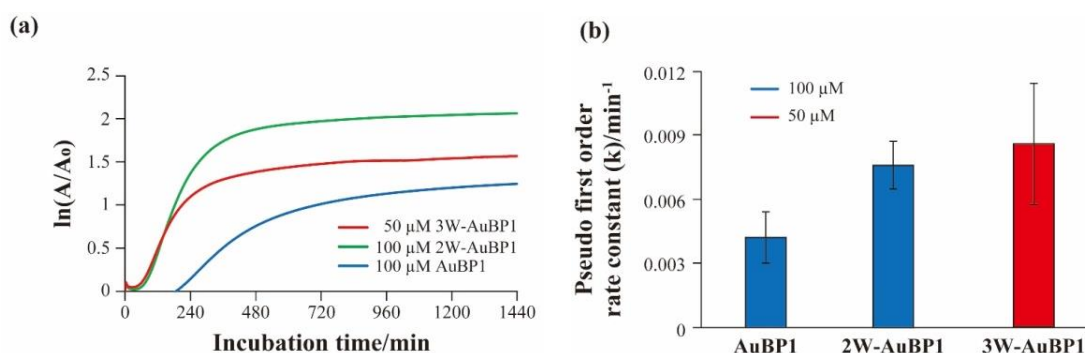


Fig. 3-5 (a) Pseudo-first-order kinetic analysis of the reduction of Au^{3+} in the presence of peptides. (b) Calculated k values for the reduction of Au^{3+} in the presence of peptides.

3-3-5. 作製した Au ナノ粒子表面へのペプチドの保護効果

一般的に Au ナノ粒子を合成する際には凝集を防ぐためにポリビニルピロリドン (PVP) などの分散保護剤を使用する必要がある。しかしながら、3W-AuBP1 を用いて作製した Au ナノ粒子は3ヶ月経過後も凝集せずに安定に分散状態を維持していることが確認された (Fig. 3-6a)。そこで、24時間経過後と3ヶ月経過後のサンプルを UV-VIS 測定したところ、SPR 由来の吸収ピークがわずかにブルーシフトしていることが確認されたが吸光度はほとんど減少していないことが示された (Fig. 3-6b)。さらに、 ζ 電位測定により分散性の確認を行ったところ、24時間後では -28.4 mV 、3ヶ月経過後においても -25.8 mV とほとんど ζ 電位の値に差が見られず、凝集が生じていないことが示唆された。以上の結果から、これらペプチドは Au の還元だけでなく、形成した Au ナノ粒子表面を保護する効果も有していることが示唆された。

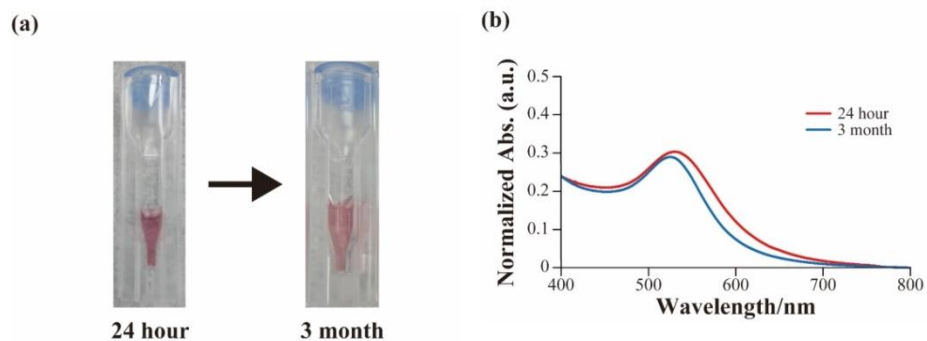


Fig. 3-6 (a) Photograph of mineralized gold nanoparticles obtained with 100 μM 3W-AuBP1 after 24 h and 3 months. (b) UV-VIS spectra of the sample after gold mineralization using 3W-AuBP1 after 24 h and 3 months.

3-3-6. Au 還元ペプチドの Au 還元能の評価

続いて、それぞれのペプチドにおける Au 還元能を評価した。ペプチドの濃度を 5 μM から 100 μM まで変化させて Au のミネラルゼーションを行い、UV-VIS 測定により Au ナノ粒子の形成の有無を確認した。その結果、AuBP1 では 50 μM 以下では SPR 由来の吸収ピークが確認されなかった (Fig. 3-7a) のに対して、2W-AuBP1 では 25 μM (Fig. 3-7b)、3W-AuBP1 では 10 μM まで濃度を低下させても SPR 由来の吸収ピークが確認された (Fig. 3-7c, d)。これらの結果から、Trp 残基の数を増加させることにより、Au 還元能が向上することが示された。

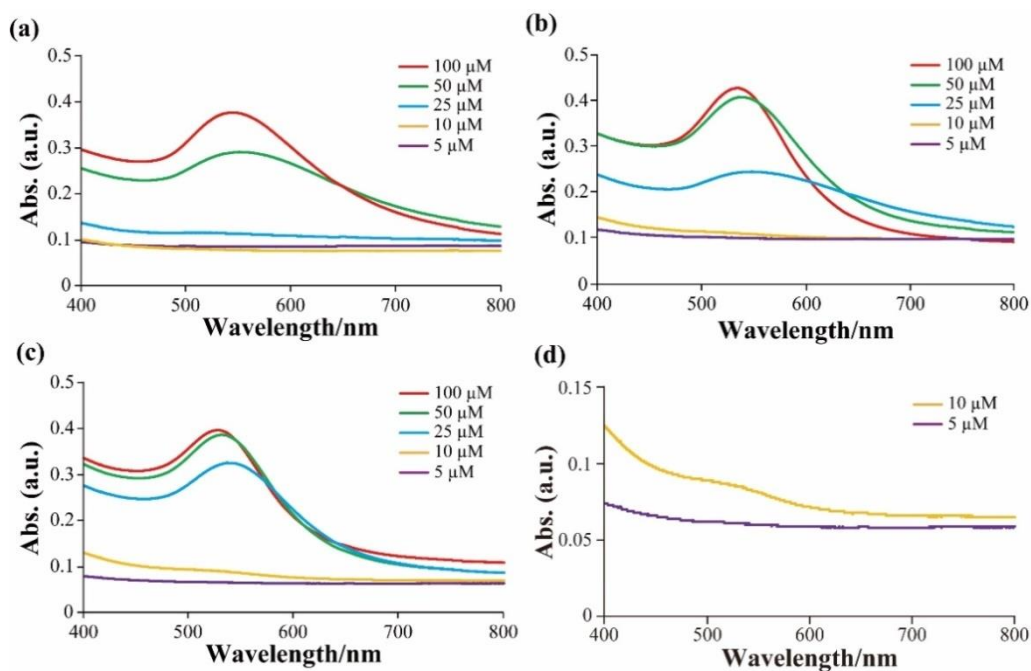


Fig. 3-7 UV-VIS spectra of the sample after gold mineralization using (a) AuBP1, (b) 2W-AuBP1, and (c), (d) 3W-AuBP1.

さらに、形成した Au ナノ粒子の形状を TEM により観察したところ、50 μM AuBP1 では 18.5 ± 5.0 nm の微細な Au ナノ粒子と 49.8 ± 9.8 nm の Au ナノ粒子の凝集体が確認された (Fig. 3-8a)。一方、2W-AuBP1 と 3W-AuBP1 では凝集体の形成は確認されず、3W-AuBP1 では 2W-AuBP1 よりも粒子径が小さいことが示された (2W-AuBP1 では 13.8 ± 3.0 nm; Fig. 3-8b、3W-AuBP1 では 8.9 ± 3.8 nm; Fig. 3-8c)。これらの結果から、ペプチド濃度 100 μM と同様に、Trp 残基の数が増大するにつれて Au ナノ粒子の粒子径が減少することが示された。25 μM においては 2W-AuBP1 では 18.4 ± 7.3 nm の微細な Au ナノ粒子と 78.9 ± 7.4 nm の Au ナノ粒子の凝集体が確認されたが (Fig. 3-8c)、3W-AuBP1 においては 12.7 ± 4.5 nm の微細な Au ナノ粒子しか確認されなかった (Fig. 3-8e)。10 μM までペプチド濃度を低下させると 3W-AuBP1 においても 34.5 ± 11.6 nm の微細な Au ナノ粒子と 140.4 ± 12.6 nm の Au ナノ粒子の凝集体が観察された (Fig. 3-8f)。以上の結果から、Trp 残基の数を増加させることで Au の還元速度が向上し、核形成反応が優位に生じるため粒子径分布の小さい微細な Au ナノ粒子が形成することが明らかとなった。

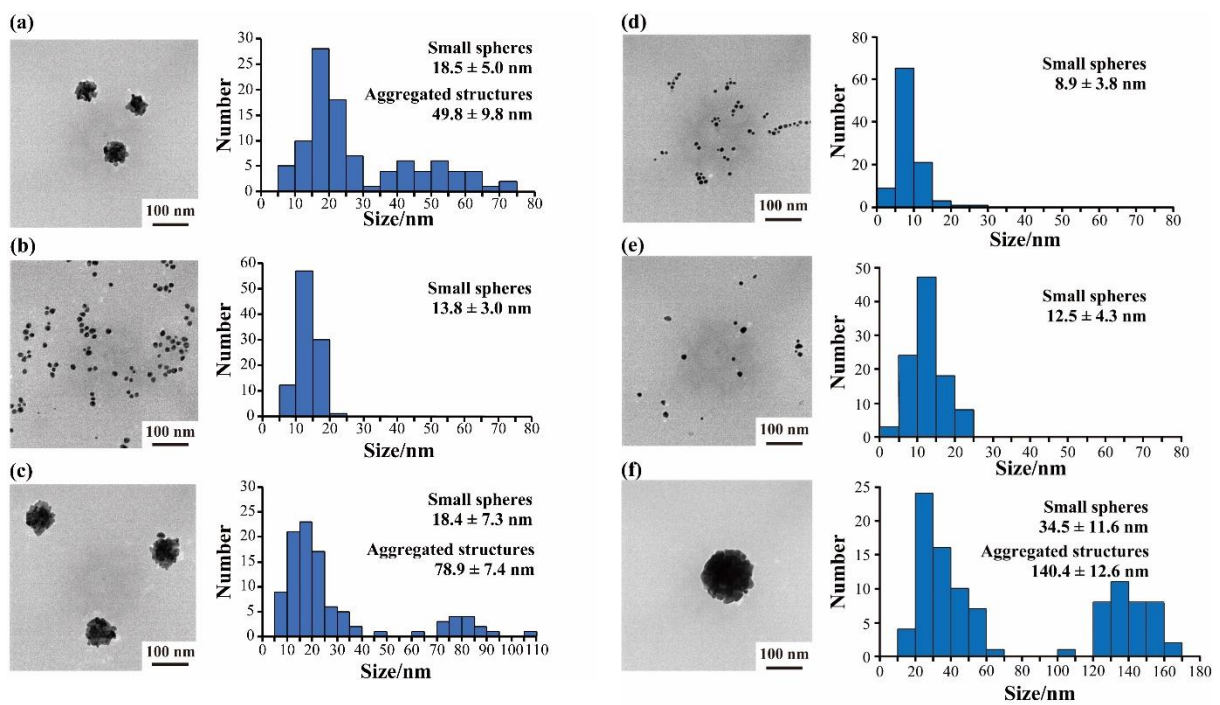


Fig. 3-8 TEM images (left) and particle size histograms (right) of samples after gold reduction for 24 h using (a) 50 mM AuBP1, (b) 50 mM 2WAuBP1, (c) 25 mM 2W-AuBP1, (d) 50 mM 3W-AuBP1, (e) 25 mM 3WAuBP1, and (f) 10 mM 3W-AuBP1.

3-3-7. 作製した Au ナノ粒子の 4-ニトロフェノール還元反応の触媒活性評価

最後に、4-ニトロフェノールから 4-アミノフェノールへの還元反応をモデル反応とし、それぞれのペプチドで作製した Au ナノ粒子と市販の Au ナノ粒子の触媒活性を比較した。一般的に Au ナノ粒子は 2-6 nm のサイズにおいて高い触媒活性を示すので^[16, 17]、 5.9 ± 1.1 nm のクエン酸還元法で作製された市販の Au

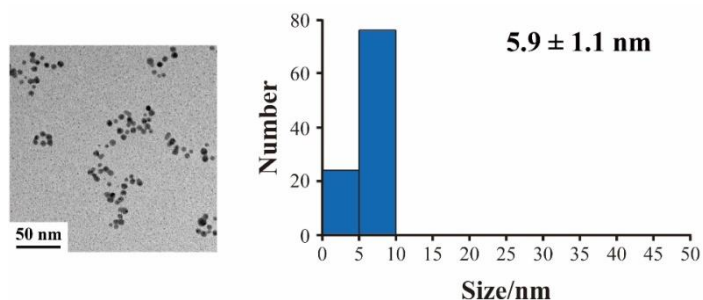


Fig. 3-9 TEM image, and particle histogram of the commercial gold nanoparticle (Sigma-Aldrich, 741949).

ナノ粒子 (Sigma-aldrich, 741949) を触媒活性評価のコントロールサンプルに使用した (Fig. 3-9)。4-ニトロフェノールは塩基性条件下で 400 nm に極大吸収を有しており、 NaBH_4 により 4-ニトロフェノールから 4-アミノフェノールに還元されることで吸収が減少する。そこで、紫外可視分光光度計を用いて 400 nm における 4-ニトロフェノールの吸光度の減少の経時変化を測定することでそれぞれの Au ナノ粒子における 4-ニトロフェノールの還元反応の速度定数を算出した。Au ナノ粒子未添加条件においては 4-ニトロフェノールから 4-アミノフェノールへの還元は生じないことが示された (Fig. 3-10a)。一方、ミネラルゼーションにより作製した Au ナノ粒子とクエン酸還元法で作製された市販の Au ナノ粒子を用いた条件においては全てのサンプルで 4-ニトロフェノールから 4-アミノフェノールへの還元が進行することが確認された (Fig. 3-10b)。そこで、 20°C から 40°C の範囲で反応温度を変化させて触媒活性実験を行い、得られた速度定数からアレニウスプロットを作成し、活性化エネルギー (E_a) を算出した。それぞれの活性化エネルギーを算出したところ、市販の Au ナノ粒子は $-70.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ 、AuBP1 は $-60.1 \text{ kJ mol}^{-1}$ 、2W-AuBP1 は $-56.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ 、3W-AuBP1 は $-54.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ であり、

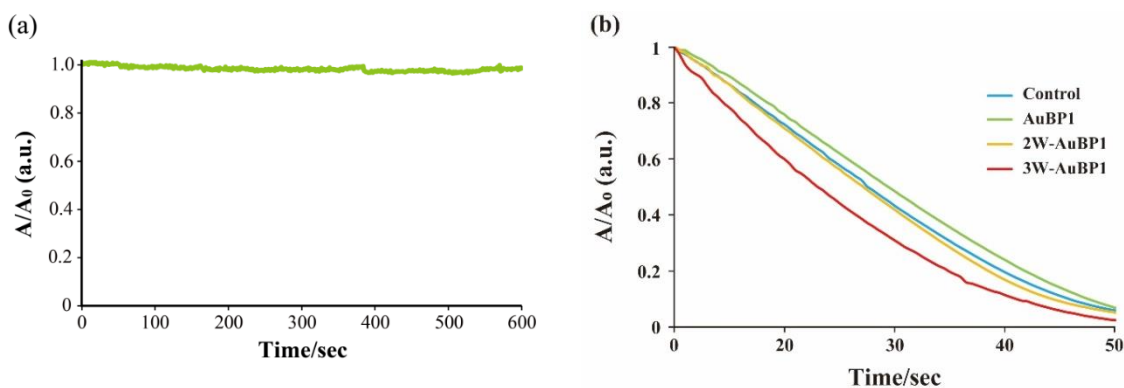


Fig. 3-10 (a) Time course of reduction reaction of 4-nitrophenol to 4-aminophenol without gold nanoparticles at 20°C . (b) Time course of reduction reaction of 4-nitrophenol to 4-aminophenol using gold nanoparticles at 30°C .

ミネラルゼーションにより作製した Au ナノ粒子の方が粒子径が大きいものにも関わらず、市販の Au ナノ粒子よりも高い触媒活性を示した (Table 3-1)。また、作製に用いた Au 還元ペプチド中の Trp 残基の数が増大するにつれて触媒活性が向上することも示された。Trp 残基の数が増大するにつれて触媒活性が増大したのは、形成する Au ナノ粒子の粒子径が小さくなることで比表面積が増加することに加えて、形成した Au ナノ粒子表面をペプチドが保

護することによって 4-ニトロフェノールと水素が吸着する活性化部位が生じることで触媒活性が向上したのだと考えられる。さらに、Au ナノ粒子表面のペプチドの保護効果を評価するために、4-ニトロフェノールの還元反応後の Au ナノ粒子の形態を TEM により観察した。Trp 残基の数が少ない AuBP1 においては Au ナノ粒子同士が凝集している箇所が多く見られたが (Fig. 3-11a)、Trp 残基が増加するにつれて Au ナノ粒子同士の凝集が抑制されており、ある程度分散状態を維持していることが確認された (Fig. 3-11b, c)。今後、高触媒活性を有する Au ナノ粒子を作製するには、高い Au 還元能および Au ナノ粒子表面への保護効果を有する Au 還元ペプチドを開発する必要がある。

3-4. 結論

本研究では Au のミネラルゼーションを題材に、AuBP1 を用いて Au のミネラルゼーションにおける Trp 残基の影響および作製した Au ナノ粒子の分散性ならびに触媒活性評価を行った。UV-VIS 測定、TEM 観察、速度論的解析により、Trp 残基の数が増大するにつれて Au の還元速度が向上し、核形成反応が優位に起こることと微細な Au ナノ粒子が形成することが示された。また、作製した Au ナノ粒子表面をペプチドが保護し、長期間分散状態を維持することも示された。さらに、作製した Au ナノ粒子を 4-ニトロフェノールの還元反応をモデル反応として触媒活性を測定したところ、クエン酸還元法で合成された市販の Au ナノ粒子よりも高い触媒活性を示した。本研究で得られた Au のミネラルゼーションにおける Trp 残基の数と Au の還元能に関する

Table 1 Activation energy (Ea) value of mineralized gold nanoparticles and the commercial gold nanoparticle.

	5 nm AuNPs	AuBP1	2W-AuBP1	3W-AuBP1
Activation energy (Ea)	70.9 kJ	60.1 kJ	56.0 kJ	54.5 kJ

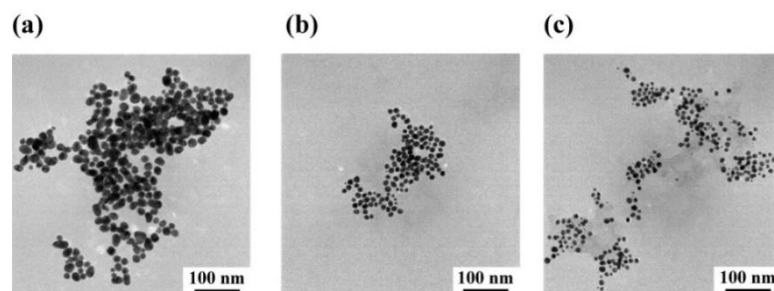


Fig. 3-11 TEM images of mineralized gold nanospheres with (a) 100 μ M AuBP1, (b) 100 μ M 2W-AuBP1, and (c) 100 μ M 3W-AuBP1 after reduction reaction of 4-nitrophenol to 4-aminophenol is completed.

る知見を基に、ペプチド配列を合目的に設計することで目的とするサイズ・形状を有する Au ナノ粒子を合成することが期待できる。本研究から、ミネラルゼーションにペプチドを用いることで、還元能力の制御や有用な単一の無機ナノ粒子を作製することが可能であることが示された。次章からは現状のペプチドを用いたミネラルゼーションで達成することができていない、(i) ミネラルゼーションによる二種の無機物からなる無機物複合ナノ構造体作製法の開発と作製した無機物複合構造体の機能評価、(ii) ミネラルゼーションによる細胞内での無機ナノ粒子作製法の開発を試みた。

参考文献

- [1] K. Ueno, T. Oshikiri, Q. Sun, X. Shi, H. Misawa, *Chem. Rev.*, **6**, 2955–2993 (2018).
- [2] G. Aragay, J. Pino, A. Merkoçi, *Chem. Rev.*, **111**, 3433–3458 (2011).
- [3] J. Zhao and R. Jin, *Nano Today*, **18**, 86–102 (2018).
- [4] B. Zhu, S. Gong, W. Cheng, *Chem. Soc. Rev.*, **48**, 1668–1711 (2019).
- [5] C. Tan, Z. Liu, W. Huang, H. Zhang, *Chem. Soc. Rev.*, **44**, 2615–2628 (2015).
- [6] H. Zheng, Y. Li, H. Liu, X. Yin, Y. Li, *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 4506–4524 (2011).
- [7] K. Saha, S. S. Agasti, C. Kim, X. Li, V. M. Rotello, *Chem. Rev.*, **112**, 2739–2779 (2012).
- [8] L. Vigderman, B. P. Khanal, E. R. Zubarev, *Adv. Mater.*, **24**, 4811–4841 (2012).
- [9] L. An, Y. Wang, Q. Tian, S. Yang, *Materials*, **10**, 1372 (2017).
- [10] Y. N. Tan, J. Y. Lee, D. I. C. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 5677–5686 (2010).
- [11] C. J. Munro, Z. E. Hughes, T. R. Walsh, M. R. Knecht, *J. Phys. Chem. C*, **120**, 18917–18924 (2016).
- [12] C. Tamerler, E. E. Oren, M. Duman, E. Venkatasubramanian, M. Sarikaya, *Langmuir*, **22**, 7712–7718 (2006).
- [13] C. J. Munro, M. R. Knecht, *Langmuir*, **33**, 13757–13765 (2017).
- [14] S. Si, T. K. Mandal, *Chem. Eur. J.*, **13**, 3160–3168 (2007).
- [15] C. W. Chan, P. D. White, *Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical Approach*, Oxford University Press, New York, 2000.
- [16] P. Suchomel, L. Kvitek, R. Prucek, A. Panacek, A. Halder, S. Vajda, R. Zboril, *Sci. Rep.*, **8**, 4589 (2018).
- [17] C. Lin, K. Tao, D. Hua, Z. Ma, S. Zhou, *Molecules*, **18**, 12609–12620 (2013).

第 4 章

ペプチドと DNA を用いた SiO_2 と CaCO_3 の位置特異的ミネラルゼーション制御

4-1. 緒言

複数の無機物を有機物上の任意の位置に特異的に沈殿させることができれば、従来の作製方法では難しい様々な形状の無機物複合ナノ構造体を作製することが可能になると期待できる。そこで、本研究ではシリカ (SiO_2) を題材に、DNA と相補的に結合することができる PNA 配列を組み込んだ SiO_2 沈殿ペプチド (SiPP-PNA) と SiO_2 沈殿ペプチドの PNA 配列と相補的な配列を両端に有する DNA (TempDNA) を用いて、ミネラルゼーションにより SiO_2 を DNA の両端に位置特異的に沈殿させる手法の確立を試みた (Fig. 4-1)。DNA の両端に SiO_2 を沈殿させるように設計した理由として、DNA の両端であれば、DNA 上の任意の位置に SiO_2 を位置特異的に形成しているか容易に判別可能だからである。また、本研究では PNA 結合部位の数や DNA の鎖長を変化させることで、DNA の両端に形成する SiO_2 の粒子径や SiO_2 -DNA 複合体の構造体自体のサイズを制御することも試みた。DNA の両端への SiO_2 の位置特異的沈殿の確認には、原子間力顕微鏡 (AFM)、走査型電子顕微鏡 (SEM)、TEM、Immuno-EM による形状観察や透過型電子顕微鏡-エネルギー分散型 X 線分光法 (TEM-EDX) による元素分析などのミクロ的 (局所的) な測定と、動的光散乱 (DLS) による SiO_2 -DNA 複合体の粒子径測定やアガロース電気泳動による SiO_2 沈殿ペプチドと DNA の結合確認などのマクロ的 (巨視的) な測定の両方の測定から明らかにした。

さらに本研究では、 SiO_2 の位置特異的沈殿制御後に DNA に沈殿することが知られている炭酸カルシウム (CaCO_3) を題材に、二種の無機物の位置特異的沈殿制御法の確立を試みた。二種の無機物の位置特異的沈殿のプロトコルとして、 SiO_2 を位置特異的に DNA の両端に沈殿させた後、DNA 上に CaCO_3 の沈殿を試みた (Fig. 4-1)。 SiO_2 と CaCO_3 の二種の無機物の位置特異的沈殿の確認には、AFM と TEM による形状観察や TEM-EDX による元素分析などのミクロ的な測定、モリブデンブルーアッセイとキレート滴定による SiO_2 と CaCO_3 沈殿の定量分析といったマクロ的な測定から明らかにした。また、 CaCO_3 のミネラルゼーションに使用する炭酸水素カルシウム ($\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$) の濃度および CaCO_3 の沈殿時間を変化させることにより、形成する SiO_2 - CaCO_3 複合ナノ構造体の形状制御にも試みた。

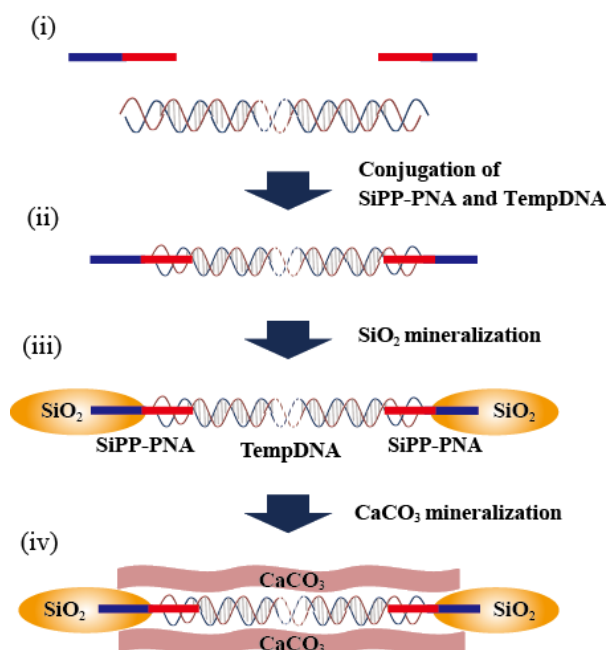


Fig. 4-1 Outline of site-specific SiO₂ and CaCO₃ precipitation using SiPP-PNA and TempDNA_L-1 in this study.

4.2. 実験材料および実験手法

4.2-1. 実験材料

ペプチド合成時に使用する Fmoc-NH-SAL-PEG resin、各種 Fmoc アミノ酸誘導体、縮合剤 (HBTU、HOBt・H₂O)、Piperidine、DIPEA、TFA (Trifluoroacetic acid) は渡辺化学 (株) から購入したものをを使用した。ペプチドの精製の際に使用するアセトニトリルはSigma-Aldrich社の高速液体クロマトグラフィー用のものを使用した。DNA は北海道システムサイエンス (株) から購入し、滅菌水を用いて所定の濃度に調製した後に使用した。SiO₂のミネラルゼーションの際に使用するオルトケイ酸テトラメチル (TMOS) は東京化成 (株) から購入したものをを使用した。CaCO₃のミネラルゼーションに使用する Ca(HCO₃)₂の調製にはフジフィルム和光純薬 (株) の炭酸カルシウムと塩酸、米山工業 (株) の石灰石を使用した。モリブデンブルーアッセイに使用するモリブデン酸アンモニウム四水和物 ((NH₄)₆Mo₇O₂₄・4H₂O)、硫酸、シュウ酸、p-アミノフェノール、無水硫酸ナトリウムはフジフィルム和光純薬 (株) から購入したものをを使用した。キレート滴定の際に使用する、水酸化ナトリウム、EDTA (ethylenediamine-N, N, N', N' -tetraacetic acid, disodium salt, dihydrate) はフジフィルム和光純薬 (株)、NN 指示薬粉末 (2-hydroxy-1-(2-hydroxy-4-sulfo-1-naphthylazo)-3-naphtioic acid) は東京化成 (株) から購入したものをを使用した。

ド量に対して、4当量の Fmoc-AA-OH（渡辺化学工業（株））と4当量の HBTU および HOBt を NMP 2 mL に溶解し、8当量の DIEA を添加し 30 分間させ、NMP 2 mL で 5 回洗浄した。以上を繰り返し目的のペプチドを得た。合成終了した樹脂は真空乾燥後、95 % TFA (Trifluoroacetic acid) / 2.5 % TIS (Triisopropylsilane) / 2.5 % H₂O を加え、室温で 2 時間反応させることで樹脂からの切り出しを行った。目的のペプチドが含まれるろ液に冷ジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿させた。TFA / TIS / H₂O のカクテルはデカンテーションによってとり除き、再び冷ジエチルエーテルを加えデカンテーションを行う作業を 3~4 回繰り返し粗ペプチドを洗浄した。ジエチルエーテル洗浄後、ジエチルエーテルを除くために真空乾燥を行い、粗ペプチドを得た。この粗ペプチドを 0.1 % TFA 水溶液に溶かし、逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）により精製した（Figure 5）。RP-HPLC には GL7410 (GL Science 社) を使用し、検出は波長可変型紫外検出機 GL7450 (GL Science 社) 使用し、カラムには Inertsil ODS-3 カラム (GL sciences 社) を使用した。合成したペプチドはペプチド結合に由来する 220 nm の波長により検出した。溶媒には、A 液として 0.1 % TFA / H₂O を、B 液には 0.08 % TFA / アセトニトリルを用いた。目的とするペプチドの同定には BRUKER 社の MALDI-TOF MS AutoflexIII smartbeam を用い、マトリックスにはシナピン酸を用いた。精製後の試料は、凍結乾燥後 -20 °C で保存した。

4-2-4. SiO₂ 沈殿ペプチドのストック溶液の調製

ペプチドの濃度決定は PITC 標識によるアミノ酸分析によって算出した。ペプチド溶液を約 1 mM になるように調製し、標準溶液として 4 mM Val 溶液をそれぞれ 10 μL ずつ混合し、乾燥させた。乾燥後、6 M HCl を 10 μL 添加し、120°C で 24 時間加水分解を行った。加水分解後のサンプルは、ethanol/H₂O/trimethylamine=2/2/1 の割合で混合させた溶液を 20 μL 添加し攪拌後、減圧乾燥を行った。乾燥後、ethanol/H₂O/trimethylamine/PITC=7/1/1/1 の割合で混合した溶液を添加し攪拌後、室温で 20 分間反応させた。反応終了後、減圧乾燥を行った。乾燥後、acetonitrile/60 mM buffer pH6.0=6/94 (v/v) 1 mL に溶解させ、HPLC (Waters 2695) を用いて分析を行った。カラムは C18 カラム (Inertsil ODS-2) を使用、検出波長は 254 nm で行った。ペプチド溶液の濃度は標準溶液のピーク面積との割合から算出した。算出方法は以下の通りである。

$$\text{ペプチドのモル数 (mol)} = \frac{\text{標準溶液のモル数 (mol)} \times \text{ペプチドのピーク面積}}{\text{標準溶液のピーク面積}}$$

4-2-5. テンプレート用 DNA の設計

本研究で位置特異的な SiO₂ のミネラルゼーションを行うためのテンプレート DNA の設計として、両端に SiPP-PNA の PNA 配列と相補的配列をもつ 1500 bp と 600 bp の二種類の二本鎖 DNA を設計した。SiPP-PNA の PNA 配列と相補的配列を持つ部位が両端ならば、位置特異的であるかどうかの判断が容易であると期待できる。また、DNA の鎖長を 1500 bp と 600 bp と長鎖にすることで AFM 観察や TEM 観察の際、ある程度の大ききさで観察することができるため、DNA 上の任意の位置に位置特異的に SiO₂ が形成しているか容易に判別することができる (DNA は 10 bp で約 3.4 nm のため、1500 bp では約 500 nm、600 bp では約 200 nm)。DNA はプラスミド DNA である pBR322 の一部分から SiPP-PNA の PNA 配列と相補的配列を持たない部分をプライマーを用いて抜粋し、PCR により合成した。抜粋する箇所は GenBank を用いて検索した pBR322 の DNA の情報 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/J01749.1>) をソフトウェアである APE に入力し、相補的配列を組む配列 (5-TGCATCTAGT-3') を検索した。本 DNA の相補的配列を持たない部分の候補として pBR322 の 250 bp から 1570 bp の部分が挙げられ、その部分を用いることにした。プライマーとして切り出す部分は 25 塩基対とし、PNA 鎖の C 末端と DNA の 5' 末端が向かい合う形で相補鎖 (アンチパラレル鎖) を組む方が安定であるため、アンチパラレル鎖を形成するように設計した。目的とするプライマーは以下の通りであり、赤字の部分 SiPP-PNA の PNA 配列と相補的な配列となっている。

• pBR322_nR5

5'-ACGTAGATCA-GCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTC-3'

• pBR322_rR5

5'-ACGTAGATCA-TCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTT-3'

• pBR322_n4R5

5'-ACGTAGATCAACGTAGATCAACGTAGATCAACGTAGATCA-GCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTC-3'

• pBR322_r4R5

5'-ACGTAGATCAACGTAGATCAACGTAGATCAACGTAGATCA-TCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTT-3'

• pBR322_r4R5_short

5'-ACGTAGATCAACGTAGATCAACGTAGATCAACGTAGATCA-3'

・ pBR322_n

5'-GCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTC-3'

・ pBR322_r

5'-TCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTT-3'

4-2-6. 鋳型 pBR 322 の作製

本研究で使用する鋳型 pBR 322 は甲南大学先端生命工学研究所の遠藤玉樹先生よりご提供して頂いた pBR 322 を用いて作製した。滅菌済みの LB 培地 3 mL に抗生物質 (*Amp*) を 30 μ L 添加し、-80°C で保存していた菌体ストックから、pBR 322 菌体を LB 培地に植菌し、37°C で 1 日振盪培養した。培養後の大腸菌溶液を 12000 rpm で 2 分間遠心し、上清を完全に除去した。続いて、SIGMA GenElute Plasmid Kit を使用し、プラスミドの抽出を行った。まず、上清除去後の大腸菌に Resuspension solution を 200 μ L 添加し、よく懸濁させた。次に、Lysis solution を 200 μ L 添加し、転倒混和させた。その後、Neutralization/Binding solution を 350 μ L 添加し、転倒混和させた。この大腸菌懸濁溶液を 12000 rpm で 10 分間遠心した。プラスミド抽出用のカラムに Column preparation solution を 500 μ L 添加し、12000 rpm で 1 分間遠心した。Wash solution 1 を 500 μ L 添加後、12000 rpm で 1 分間遠心し、上清を除去した。Wash solution 2 を 750 μ L 添加後、12000 rpm で 1 分間遠心し、上清を除去した。完全に溶液を除去するために、12000 rpm で 1 分間空遠心した。MilliQ を 100 μ L 添加し、12000 rpm で 1 分間遠心した。大腸菌溶液を抽出後の鋳型 pBR 322 の濃度は NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) を用いて決定した。

4-2-7. テンプレート用 DNA の調製

4-2-7-1. テンプレート DNA の作製

SiPP-PNA の PNA 配列に対して相補的な配列を両端に 1 つ持つ 1500 bp の DNA (TempDNA_L-1) は pBR322 を鋳型とし、pBR322_nR5 と pBR322_rR5 の 2 種類のプライマーを用いて、PCR により合成した。SiPP-PNA の PNA 配列に対して相補的な配列を両端に 4 つ持つ 1500 bp の DNA (TempDNA_L-4) は pBR322 を鋳型とし、pBR322_n4R5 と pBR322_r4R5 の 2 種類のプライマーを用いて、PCR により合成した。SiPP-PNA の PNA 配列に対して相補的な配列を両端に 4 つ持つ 600 bp の DNA (TempDNA_S-4) は pBR322 を鋳型とし、pBR322_n4R5 と pBR322_r4R5_short の 2 種類のプライマーを用いて、PCR により合成した。また、コントロールサンプルと

して、SiPP-PNA の PNA 配列に対して相補的な配列を両端に持たない TempDNA_L-0 は pBR322 を鋳型とし、pBR322_n と pBR322_r の 2 種類のプライマーを用いて、PCR により合成した。PCR 用のサンプル溶液は次ページの条件で記載した順に添加した。

・ サンプル条件

MilliQ	31 μ L
25 mM MgSO ₄	3 μ L
10 μ M sence primer	1.5 μ L
10 μ M anti sence primer	1.5 μ L
鋳型 pBR 322	2 μ L
PCR buffer (KOD Plus 2)	5 μ L
dNTPs	5 μ L
Total volume	49 μ L

ボルテックスミキサー (Scientific Industries) によりサンプル溶液を攪拌し、卓上遠心機 (Capsulefvge PMC-060) で遠心を行った後、KOD ポリメラーゼ 1 μ L を添加し、全量 50 μ L にした。この PCR サンプルをサーマルサイクラー (GeneAtlas 482/485) を用いて、以下の条件で PCR を行った。

・ PCR 条件

長鎖 DNA (1500 bp)

1. 94°C, 2 min (Denature)
2. 98°C, 10 sec (Annealing)
3. 56°C, 30 sec (Elongation)
4. 68°C, 2 min
5. 2~4, 30 cycle
6. 4°C, cooling

・ PCR 条件

短鎖 DNA (600 bp)

1. 94°C, 2 min (Denature)
2. 98°C, 10 sec (Annealing)
3. 58°C, 30 sec (Elongation)
4. 68°C, 1 min
5. 2~4, 30 cycle
6. 4°C, cooling

4-2-7-2. テンプレート DNA の精製

PCR で増幅した DNA を Qiagen kit (Qiagen Minelute Sin columns 50) を用いて精製した。PCR 産物 50 μL と PB buffer 250 μL を混合させた合計 300 μL の溶液を調製し、専用のスピнкаラムにいった。卓上遠心機 (Caspulefyge PMC-060) で 2 分間遠心した後、PE buffer 700 μL をスピнкаラムに添加し、再び卓上遠心機で 2 分間遠心した。続いて、buffer を完全に取り除くために、15000 rpm、2 min、25°C で空遠心を行った。次に、DNA を抽出するためにスピнкаラムに MilliQ を 30 μL を加えて、15000 rpm、2 min、25°C で遠心する操作を 2 回行った。得られた DNA 溶液の濃度は NanoDrop を用いて決定した。DNA の濃度は g/L から mol/L に変換し、以下の方法で算出した。(相補的塩基対一つの式量は 660 g/mol \cdot bp とした。)

$$\text{DNA の濃度 (mol/L)} = \frac{\text{DNA の濃度 (g/L)}}{\text{相補的塩基対一つの式量} \left(\frac{\text{g}}{\text{mol} \cdot \text{bp}} \right) \times \text{塩基数 (bp)}}$$

4-2-8. SiPP-PNA-TempDNA 複合体の調製

TempDNA_L-1 は SiPP-PNA を mol 比にて 1 : 1、TempDNA_L-4 と TempDNA_S-4 は SiPP-PNA を mol 比にて 1 : 4 の割合で混合させ、遠心エバポレーター (CVE-2000 型) を用いてドライダウンさせた。コントロールの DNA である TempDNA_L-0 は SiPP-PNA を添加せずにドライダウンさせた。その後、SiPP-PNA-TempDNA 複合体の終濃度が 0.1 μM になるように 0.625 mM Tris-HCl (pH 7.0) を添加した後、サーマルサイクラーを用いて 90°C で 3 分間インキュベートした。その後、90°C から 37°C まで 1 時間かけて降温することでアニーリングを行い、0.1 μM の SiPP-PNA-TempDNA 複合体を調製した。

4-2-9. DNA 上への SiO₂ の位置特異的沈殿

0.1 μM の SiPP-PNA-TempDNA 複合体を 1 μL 、1 M のリン酸バッファーを 1 μL 、MilliQ を 9 μL 混合させた後、10 mM の Si(OH)₄ を 1 μL 添加し、室温で 3 時間インキュベートすることで SiO₂ のミネラルゼーションを行った。

4-2-10. 免疫染色による DNA 上への SiO₂ の位置特異的沈殿の確認

SiO₂ のミネラルゼーションを 3 時間行ったサンプルに ss & dsDNA antibody (Gene Tex) を 6 μL 添加し、室温で 30 分間インキュベートした。その後、10 nm の Au ナノ粒子が担持された Protein A (British BioCell

International、EM Protein A: 10 nm Gold) を 3 μ L 添加し、室温で 30 分間インキュベートした。

4-2-11. CaCO_3 沈殿溶液 ($\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$) の調製

CaCO_3 は難水溶性のため、下記の反応により $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ にすることで水に溶解させた^[5]。

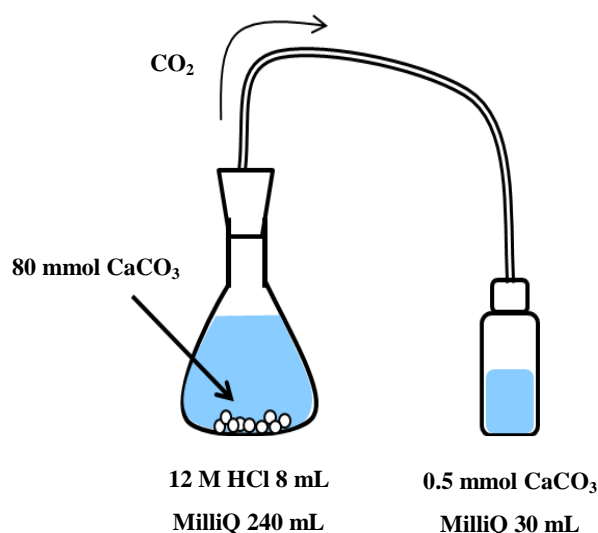
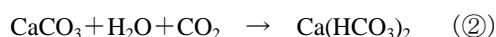


Fig. 4-2 Preparation of $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ solution.



まず、三角フラスコとバイアル瓶を接続した反応装置 (Fig. 4-2) を用意し、上記の反応の①を三角フラスコで、②をバイアル瓶中で行うことで $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ を得た。三角フラスコに MilliQ を 240 mL、12 M の塩酸を 8 mL、80 mmol の石灰石を加え (石灰石は反応開始直前に添加)、バイアル瓶中に 0.5 mmol の CaCO_3 粉末と MilliQ 30 mL を加え (反応直前までボルテックスで攪拌し、 CaCO_3 粉末をできるかぎり溶解させた)、攪拌しながら 1 時間インキュベートした。反応終了後、上澄みをフィルター (Syringe-driven Filter Unit, PVDF 0.1 μm , Millex®-VV) を用いて濾過し、これを CaCO_3 沈殿溶液とした。

4-2-12. CaCO_3 沈殿溶液の濃度決定

$\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ の濃度を実験ごとに統一するため、キレート滴定による濃度決定を行った (Fig. 4-3)。濃度未知の $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ 5 mL に 8 M の NaOH を 300 μ L 添加した後、NN 指示薬を少量添加した。この時、溶液は赤紫色に呈色した。その後、6 mM EDTA を溶液が赤紫色から青色を呈するまで添加した。

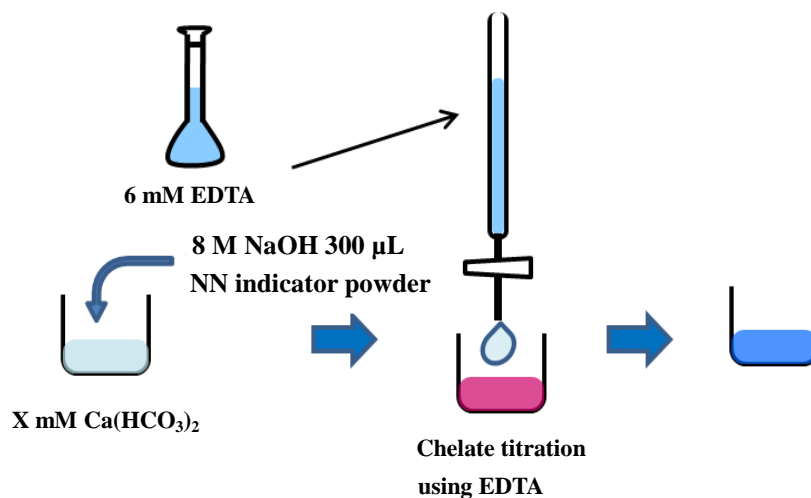


Fig. 4-3 Outline of the chelate titration.

$\text{Ca(HCO}_3)_2$ の濃度は以下の式により算出した。

$$\text{Ca(HCO}_3)_2 \text{ concentration} = \frac{\text{EDTA concentration} \times \text{EDTA}}{\text{Sample volume}}$$

なお、 $\text{EDTA concentration} = 6 \times 10^{-3} \text{ (mol/L)}$ 、 $\text{Sample volume} = 5.0 \times 10^{-3} \text{ (L)}$ として計算を行った。

4-2-13. DNA 上への CaCO_3 の位置特異的沈殿の確認

4-2-13-1. CaCO_3 のミネラルゼーションの確認

DNA にのみ CaCO_3 が沈殿するか確認するために高濃度の 2 mM の $\text{Ca(HCO}_3)_2$ を使用し、 CaCO_3 のミネラルゼーションを行った。 $0.1 \mu\text{M}$ の TempDNA_L-0 を $1 \mu\text{L}$ 、終濃度が 2 mM になるように $\text{Ca(HCO}_3)_2$ と MilliQ を $19 \mu\text{L}$ 添加し、室温で 3 時間インキュベートした。DNA 添加条件で確認される構造物が非特異的沈殿によるものでないことを証明するためのコントロールのサンプルとして、 $\text{Ca(HCO}_3)_2$ のみのサンプルも作製することにした。キレート滴定により $\text{Ca(HCO}_3)_2$ の濃度を算出した後、 2 mM の $\text{Ca(HCO}_3)_2$ を $20 \mu\text{L}$ 調製し、室温で 3 時間インキュベートした。

4-2-13-2. TempDNA_L-0 を用いた SiO_2 のミネラルゼーションによる SiO_2 形成の有無の確認

DNA 上に SiO_2 が沈殿しないことを確認するために、TempDNA_L-0 を用いて SiO_2 のミネラルゼーションを行った。 $0.1 \mu\text{M}$ の SiPP-PNA を $1 \mu\text{L}$ 、室温で 3 時間インキュベートした。

4-2-13-3. TempDNA_L-0 を用いた CaCO_3 のミネラルゼーションの最適化

CaCO_3 沈殿の最適時間を見積もるために、 $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ の濃度を 0.15 mM に固定し、経時変化を見ることにした。そこで、0.1 μM の TempDNA_L-0 を 1 μL 、終濃度が 0.15 mM になるように $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ と MilliQ を添加し、室温で 3 時間から 24 時間インキュベートした。

4-2-14. SiO_2 沈殿後の DNA 上への CaCO_3 の位置特異的制御

TempDNA_L-1 を用いて SiO_2 の位置特異的沈殿を行った後（第 4 章参照）、サンプル 20 μL を TEM グリッドに滴下し、5 分間静置させた。その後、濾紙を用いて溶液を吸い取り、20 μL の MilliQ を滴下、再度濾紙で吸い取る行程を洗浄とし、3 回洗浄を行うことで余分な $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ を除去し、 SiO_2 -DNA 複合体を TEM グリッド表面に吸着させた。0.30 mM $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ 20 μL を TEM グリッド上に滴下し、3 時間から 24 時間インキュベートした。

4-3. 各種測定サンプルの作製方法

4-3-1. AFM による形状観察

SiO_2 沈殿サンプル 20 μL を AFM 用マイカ（1 cm×1 cm）に滴下し、5 分間静置させた。その後、MilliQ を 20 μL 滴下し、濾紙で溶液を除去するという洗浄工程を 3 回行った。窒素乾燥によりサンプルをある程度乾燥させた後、1 日減圧乾燥を行った。 SiO_2 沈殿物の形状は原子間力顕微鏡（AFM、Multi Mode Scanning Probe）により観察した。カンチレバーにはバネ定数: 40 N/m、共振周波数: 300 kHz の RTESP MPP-11100-10（Bruker）を用いて、タッピングモードにより観察した。

4-3-2. TEM による形状観察と TEM-EDX による元素分析

SiO_2 沈殿サンプル 20 μL を TEM 用グリッド（日新 EM、コロジオン膜貼付メッシュ 200 メッシュ）に滴下し、1 分間静置させた後、濾紙を用いて溶液を除去した。その後、MilliQ を 20 μL 滴下し、濾紙で溶液を除去するという洗浄工程を 3 回行った。窒素乾燥によりサンプルをある程度乾燥させた後、1 日減圧乾燥を行った。TEM は龍谷大学の JEM-2100（JEOL）を用いて、加速電圧 200 kV で観察を行った。TEM-EDX には龍谷大学の JEM-3000F（JEOL）を用いて、加速電圧 200 kV で測定を行った。

4-3-3. SEM による形状観察

SiO₂沈殿サンプル 20 μL を TEM 用グリッド（日新 EM、コロジオン膜貼付メッシュ 200 メッシュ）に滴下し、1 分間静置させた後、濾紙を用いて溶液を除去した。その後、MilliQ を 20 μL 滴下し、濾紙で溶液を除去するという洗浄工程を 3 回行った。窒素乾燥によりサンプルをある程度乾燥させた後、1 日減圧乾燥を行った。SEM は龍谷大学の JIB-4601F（JEOL）を用いて、加速電圧 30 kV で観察を行った。

4-3-4. DLS による SiO₂ 沈殿物の粒子径測定

全量 40 μL で反応させた SiO₂沈殿サンプルを DLS 用ポリスチレンセル (Malvern Disposable Solvent Resistant Micro Cuvette: ZEN0040) に入れ、Zetasizer-ZEN3600 (Sysmex) により粒子径分布を測定した。測定は平衡化時間 120 秒、温度 25°C で行い、20 回測定したデータ平均を 1 回分の測定とし、3 回分の測定データをまとめた。

4-3-5. アガロース電気泳動による SiPP-PNA と TempDNA の結合確認

サンプル溶液 10 μL と 6×ローディングバッファー 2 μL を混合し、0.7% のアガロースゲルに添加した後、100 V で 30 分間泳動した。泳動終了後、アガロースゲルをエチジウムブロマイドで 30 分間染色した。染色後のアガロースゲルを FLA-7000（フジフィルム（株））を用いて撮影し、バンドの濃淡の変化を Multi Gauge software (V.3.2) により解析した。

4-3-6. モリブデンブルーアッセイによる SiO₂ 沈殿能の確認

モリブデンブルーアッセイによって残存するケイ酸 (Si(OH)₄) の濃度から SiO₂ の沈殿量を定量した。本研究の SiO₂ 沈殿では、リン酸バッファーを使用している。定量時に使用するモリブデン酸アンモニウム四水和物 ((NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O) とリン酸はリンモリブデン酸錯体 (H₃[PMo₁₂O₄₀] · nH₂O) を形成することが知られており^[6]、正確に定量することが難しいと考え、使用するバッファーをリン酸バッファーから Tris-HCl バッファーに変えて Si(OH)₄ の定量を行うことにした。また、バッファー存在下で定量を試みた場合、モリブデン錯体の形成を阻害し、吸光度の低下する可能性があるため、Tris-HCl バッファーを使用した条件で検量線を作成した。SiO₂ 沈殿終了後、全量 20 μL の溶液を 2 サンプル合わせた計 40 μL を濾過フィルター (Centrifugal Filters Durapore®-PVDF 0.22 μm Ultrafree®-MC-HV) に加え、卓上遠心機 (Capsulefyge PMC-060) で 1 分間遠心した。遠心により落ちてきた溶液を 20 μL 回収し、MilliQ 230 μL と 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) を添加して 320 μL

に希釈した。その後、0.72 mM の塩酸 10 mL にモリブデン酸アンモニウム四水和物を 160 μmol 添加し、溶解させた Solution A を 30 μL 添加し、室温で 15 分間インキュベートした。このとき溶液は無色から黄色に変化した。3 M の硫酸 12 mL に 4.4 mmol のシュウ酸、390 μmol の p-アミノフェノール、560 μmol の無水硫酸ナトリウムを添加し、溶解させた Solution B を 150 μL 添加し、室温で 2 時間インキュベートした。反応終了後、紫外可視分光光度計 (Shimadzu UV-1800) を用いて、モリブデンブルー由来の 680 nm の吸光度を測定し、残存する $\text{Si}(\text{OH})_4$ の定量を行った。

4-3-7. キレート滴定による CaCO_3 沈殿能の確認

EDTA を用いたキレート滴定によって、 CaCO_3 のミネラルゼーション後の残存する $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ の濃度から沈殿した CaCO_3 の量を見積もることにした。 CaCO_3 沈殿終了後、計 20 μL の溶液を 2 サンプル合わせた計 40 μL を濾過フィルター (Centrifugal Filters Durapore®-PVDF 0.45 μm Ultrafree®-MC-HV) に加え、卓上遠心機 (Capsulefuge PMC-060) で 1 分間遠心した。遠心後の溶液を 20 μL 回収し、8 M の NaOH を 3 μL 添加した後、NN 指示薬を加えた。この時、溶液は透明から赤紫色に変化した。その後、6 mM EDTA を溶液が青色を呈するまで徐々に添加し、添加した EDTA 量から残存する $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ の濃度を算出した。

4-4. 実験結果

4-4-1. SiO_2 沈殿ペプチドの SiO_2 沈殿能の確認

まず、合成した SiO_2 沈殿ペプチドが SiO_2 沈殿能を有しているのか確認するために、 SiO_2 のミネラルゼーションを 3 時間行った後、AFM および SEM 観察により SiO_2 形成の有無を確認した。その結果、PNA 配列がない SiPP を用いて SiO_2 のミネラルゼーションを行ったサンプルではサイズや形状が不均一な沈殿物の形成が確認されたが (Fig. 4-4a, c)、SiPP-PNA を用いたサンプルにおいては SiPP と比較して形状が整った SiO_2 ナノ粒子の形成が確認された (Fig. 4-4b, d)。この要因として、SiPP の C 末端に存在する Leu と Ile および PNA 配列が疎水性である

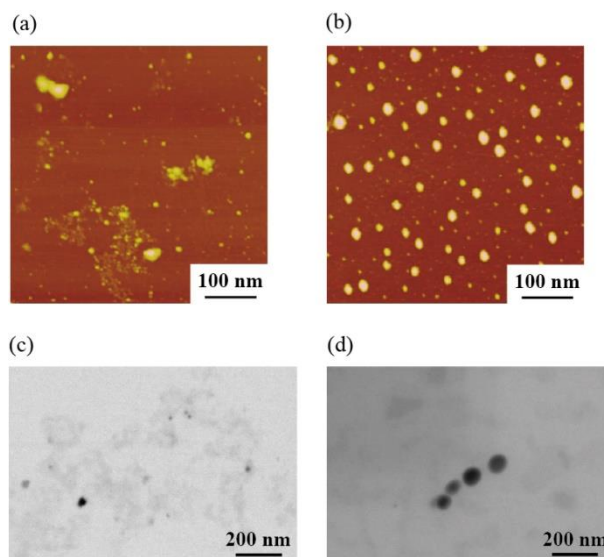


Fig. 4-4 AFM images of the sample after SiO_2 mineralization using (a) SiPP and (b) SiPP-PNA. SEM images of the sample after SiO_2 mineralization using (c) SiPP and (d) SiPP-PNA.

ことから疎水性相互作用によりペプチドが集合化し、それが核となり SiO_2 のミネラルゼーションが生じることで SiPP-PNA において、均一なサイズ・形状の SiO_2 が形成したのだと考えられる。

4-4-2. AFM 観察による DNA 上への SiO_2 の位置特異的沈殿の確認

SiPP-PNA に SiO_2 沈殿能があることが明らかとなったので、SiPP-PNA と TempDNA_L-4 を複合化させ、ミネラルゼーションにより DNA の両端に SiO_2 を位置特異的に沈殿することを試みた。位置特異的に DNA の両端に SiO_2 を沈殿できているかを AFM により観察したところ、長い紐状の構造物の両端に球状の沈殿物が形成していることが確認された (Fig. 4-5)。このことから、DNA の両端に SiO_2 が位置特異的に沈殿していることが

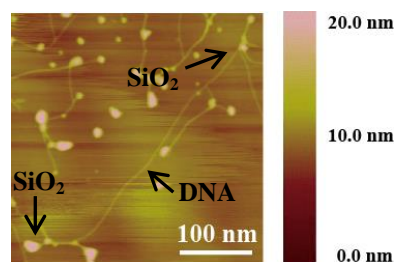


Fig. 4-5 AFM image of the sample after SiO_2 mineralization using TempDNA_L-4 with SiPP-PNA .

示唆された。そこで、SiPP-PNA の PNA 配列と相補的な配列がない TempDNA_L-0 を用いて SiO_2 のミネラルゼーションを行ったサンプルと SiPP-PNA を添加していないサンプルを AFM 観察したところ、長い紐状の構造物の両端に球状沈殿物がつながった構造物の形成は確認されなかった (Fig. 4-6a, b)。以上の結果から、SiPP-PNA が DNA の両端に配置した PNA 結合部位に結合し、ミネラルゼーションにより SiO_2 が位置特異的に DNA の両端に配置した SiPP-PNA 上に形成したのだと考えられる。 SiO_2 の位置特異的沈殿制御が可能であることが示唆されたので、DNA の両端に配置する SiPP-PNA 結合部位の数と DNA 鎖長をさせることで形成する SiO_2 のサイズや SiO_2 -DNA 複合体の形状を制御することができるかを検証した。DNA の両端に配置する PNA 結合部位の数を 4 ヲ所から 1 ヲ所に減少させた TempDNA_L-1 と DNA 鎖長を 1500 bp (約 500 nm) から 600 bp (約 200 nm) に短くした TempDNA_S-4 を用いて、 SiO_2 のミネラルゼーションを行ったところ、TempDNA_L-1 では TempDNA_L-4 と同様の長さの紐状構造物の両端に TempDNA_L-4 よりも粒子径が小さい球状粒子の形成が確認された (Fig. 4-6c)。TempDNA_S-4 においては、TempDNA_L-1 および TempDNA_L-4 より短い紐状構造物の両端に球状粒子が形成した構造物が確認された (Fig. 4-6d)。以上の結果から、DNA の両端に配置した PNA 結合部位の数と DNA 鎖長を変化させることで形成する SiO_2 の粒子径および構造体自体の形状を制御できることが示唆された。

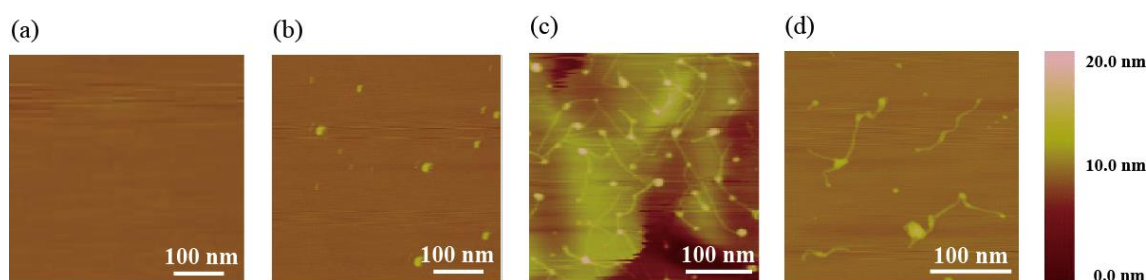


Fig. 4-6 AFM images of the sample after SiO₂ mineralization using (a) TempDNA_L-4 without SiPP-PNA, (b) TempDNA_L-0 with SiPP-PNA, (c) TempDNA_L-4 with SiPP-PNA, and (d) TempDNA_S-4 with SiPP-PNA.

4-4-3. TEM 観察による DNA 上への SiO₂ の位置特異的沈殿の確認

AFM による観察では球状粒子が SiO₂、紐状構造物が DNA であることが断定できないため、TEM を用いて詳細に解析することにした。まず、TempDNA_L-1 と SiPP-PNA の複合体を用いて SiO₂ のミネラルゼーションを行ったサンプルの TEM 観察を行った。一般的に TEM ではネガティブ染色などの染色操作なしでは有機物を観察することはできない。そのため、AFM で観察された DNA と思われる紐状構造物は確認できなかったが、約 45 nm 程度の SiO₂ と思われる球状粒子が形成していることが示された (Fig. 4-7a)。そこで、TempDNA_L-4 と SiPP-PNA の複合体を用いて SiO₂ のミネラルゼーションを行ったサンプル

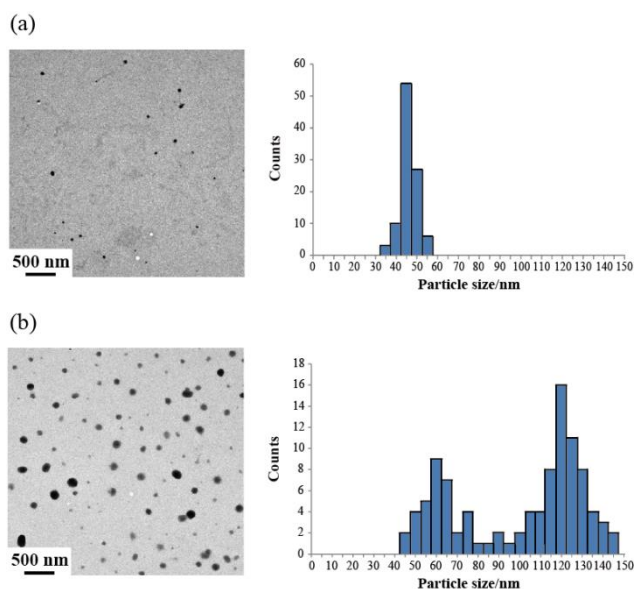


Fig. 4-7 TEM images (left) and particle size histograms (right) of the sample after SiO₂ mineralization using (a) TempDNA_L-1 with SiPP-PNA and (b) TempDNA_L-4 with SiPP-PNA.

を TEM により観察したところ、TempDNA_L-1 と SiPP-PNA の複合体と比較して粒子径の大きい楕円状の粒子の形成が確認された (Fig. 4-7b)。これらの結果から、DNA の両端に配置した PNA 結合部位の数と DNA 鎖長を変化させることで形成する SiO₂ の粒子径を制御できることが示された。続いて、観察された球状粒子が SiO₂ であることを確認するために TEM-EDX と SEM-EDX による元素分析を行った。TEM-EDX により TempDNA_L-1 と TempDNA_L-4 のそれぞれのサンプルの球状粒子部分とバックグラウンド部分を点分析したところ、バックグラウンド部分では SiO₂ 由来の Si 原子のシグナルはほとんど検出されなかったが、球状粒子部分において Si 原子のシグナルがバックグラウンドと比較しても優位に検出されたので、球状粒子は SiO₂ で

あることが明らかとなった (Fig. 4-8a, b)。TEM-EDX および SEM-EDX によるマッピングにおいても球状粒子が SiO_2 であることが示された (Fig. 4-8c, d)。以上の結果から、AFM で観察された球状粒子は SiO_2 であることが明らかとなった。

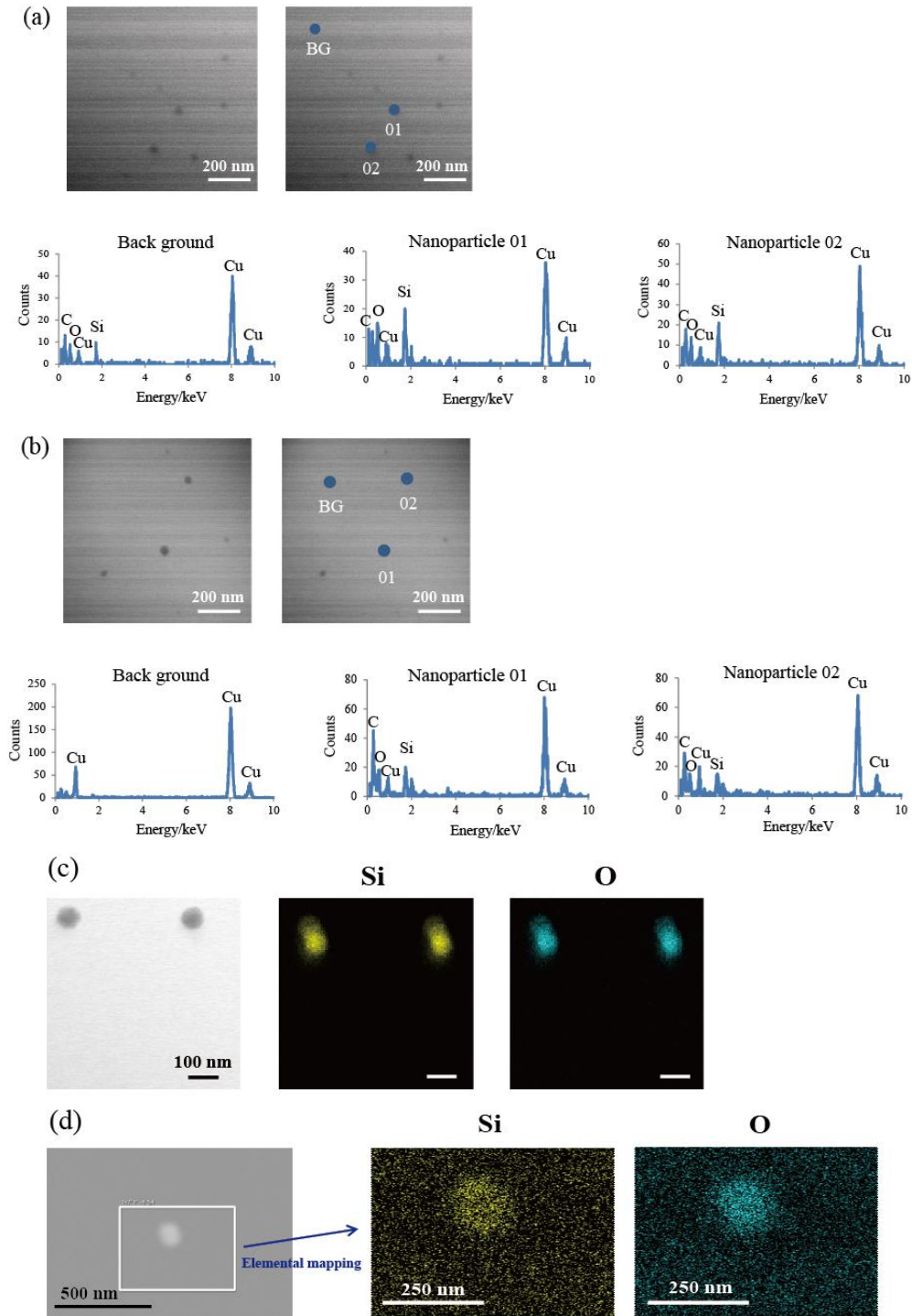


Fig. 4-8 TEM-EDX point analyses of the sample after SiO_2 mineralization using (a) TempDNA_L-1 with SiPP-PNA and (b) TempDNA_L-4 with SiPP-PNA. (c) TEM-EDX and (d) SEM-EDX mapping images of the sample after SiO_2 mineralization using TempDNA_L-1 with SiPP-PNA.

4-4-4. 免疫染色による DNA 上への SiO₂ の位置特異的沈殿制御の確認

続いて、SiO₂ の粒子間に DNA が存在しているのかを確認するために二本鎖 DNA 認識抗体と Au ナノ粒子が修飾された抗 DNA 認識抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、SiO₂ 粒子間に Au ナノ粒子が一直線上に並んでいる箇所が多数確認された (Fig. 4-9a)。コントロールサンプル

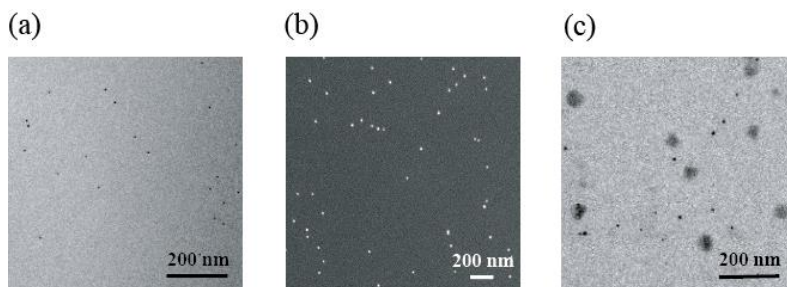


Fig. 4-9 Immuno-EM image of the sample after SiO₂ mineralization using TempDNA_L-1 with SiPP-PNA. (b) Immuno-EM image without TempDNA and peptide (control sample). (c) Immuno-EM image of TempDNA_L-1.

ルとして dsDNA 認識抗体と Au ナノ粒子修飾抗 DNA 認識抗体のみを TEM グリッドに滴下したサンプルと TempDNA_L-1 を免疫染色したサンプルを TEM により観察した。抗体のみを TEM グリッドに滴下したサンプルでは、非特異的に Au ナノ粒子が吸着しているのが観察され (Fig. 4-9b)、TempDNA_L-1 においては Au ナノ粒子が線状に並んだ箇所が多数確認された (Fig. 4-9c)。以上の結果から、AFM で観察された紐状構造物は DNA であることが示され、ミネラルゼーションにより DNA の両端に SiO₂ を位置特異的に沈殿できていることが明らかとなった。

4-4-5. DLS とアガロース電気泳動によるマクロ的解析

続いて、DNA の両端に SiO₂ をミネラルゼーションさせることで、ダンベル型の SiO₂-DNA 複合体が形成するので、DLS により SiO₂-DNA 複合体のサイズを測定した。TempDNA_L-1 および TempDNA_L-4 添加条件では約 600 nm の構造体の形成が確認され、鎖長 500 nm の DNA の両端に SiO₂ が形成していることが示唆された (Fig. 4-10)。一方、鎖長が約 200 nm の TempDNA_S-4 は約 400 nm の構造体の形成が確認され、DNA 鎖長を短くすることで、形成する SiO₂-DNA 複合体のサイズが制御できていることが示された (Fig. 4-10)。

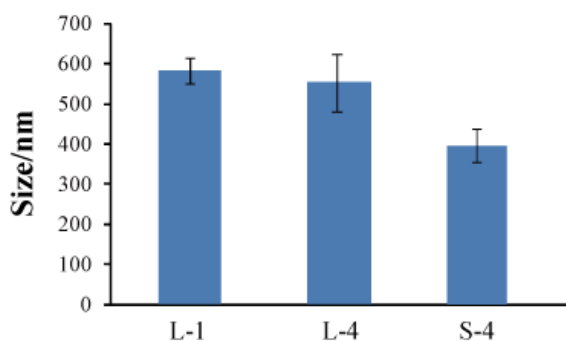


Fig. 4-10 DLS analyses of the size of SiO₂-TempDNA nanostructure after SiO₂ mineralization using TempDNA with SiPP-PNA.

最後にアガロース電気泳動により、DNA と SiPP-PNA が結合しているかを解析した。TempDNA_L-0 と

TempDNA_L-4 を泳動し、得られたバンドの濃淡のコントラストを100%とし、SiPP-PNA 添加したサンプルおよび SiO₂ のミネラリゼーションを行ったサンプルを泳動し、得られたバンドの濃淡のコントラストの減少度から SiPP-PNA と DNA の結合の有無を評価した。

TempDNA_L-4 において、SiPP-PNA 未添加条件では SiO₂ のミネラリゼーションを行っても、バンドの濃淡に変化が見られなかった (Fig. 4-11)。SiPP-PNA 添加条件においては、得られたバンドの

濃淡コントラストが減少していることが確認され、SiO₂ のミネラリゼーションを行ったサンプルではバンドの濃淡コントラストがさらに減少していることが確認された (Fig. 4-11)。これらの結果から、DNA の両端に配置した SiPP-PNA の PNA 配列と相補的な配列に SiPP-PNA が結合し、さらにミネラリゼーションにより DNA の両端に結合した SiPP-PNA 上に SiO₂ が形成していることが示唆される。一方、TempDNA_L-0 においては、SiPP-PNA 添加条件や SiO₂ のミネラリゼーションを行ったサンプルにおいてもバンドの濃淡コントラストには変化が見られなかった (Fig. 4-11)。このことから、SiPP-PNA は DNA に非特異的に結合しておらず、SiO₂ も DNA 自体には沈殿していないことが示唆される。以上の結果から、SiPP-PNA は DNA の両端に配置した SiPP-PNA の PNA 配列と相補的な配列に結合し、ミネラリゼーションにより DNA の両端に結合した SiPP-PNA 上に SiO₂ が位置特異的に沈殿していることが示され、一種類の無機物の位置特異的な沈殿制御が可能であることが明らかとなった。次に、DNA に沈殿することで知られている CaCO₃ を SiO₂ 沈殿後に DNA 上に位置特異的に沈殿制御することを試みた。

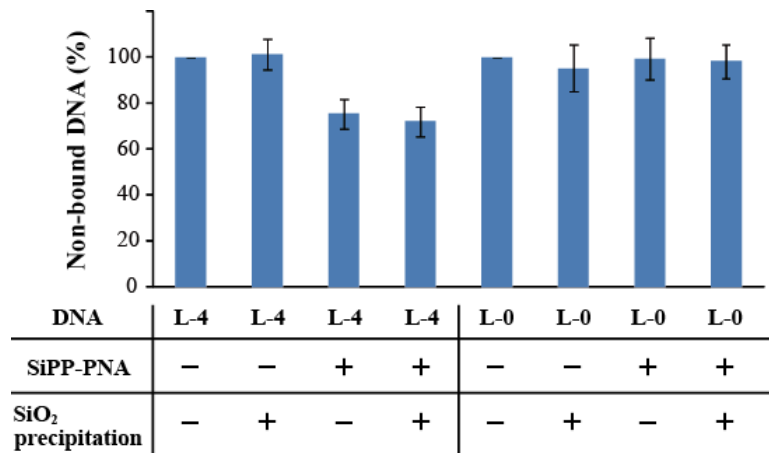


Fig. 4-11 TempDNA band density (Non-bound DNA, DNA alone) in agarose gel electrophoresis of TempDNA alone (SiPP-PNA “-”; SiO₂ precipitation “-”, Fig. 1 (i)), TempDNA alone after (with) SiO₂ precipitation (SiPP-PNA “-”; SiO₂ precipitation “+”), TempDNA mixed with SiPP-PNA before (without) SiO₂ precipitation (SiPP-PNA “+”; SiO₂ precipitation “-”, Fig. 1 (ii)) and TempDNA mixed with SiPP-PNA after (with) SiO₂ precipitation (SiPP-PNA “+”; SiO₂ precipitation “+”, Fig. 1 (iii)) in TAE buffer

4-4-6. DNA の CaCO_3 沈殿能の確認と CaCO_3 のミネラルゼーションの最適化

位置特異的に CaCO_3 が DNA 上に沈殿可能かを
確認するために、 $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ の濃度を 2 mM に固定
し、 $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ のみ、SiPP-PNA 添加条件、
TempDNA_L-0 添加条件で CaCO_3 沈殿を 3 時間行
った。AFM 観察の結果、 $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ のみ、SiPP-PNA
添加条件では沈殿物は確認されず (Fig. 4-12a, b)、
TempDNA_L-1 添加条件では、多数のひも状構造
物の形成が確認された (Fig. 4-12c)。また、DNA
上に SiO_2 の沈殿が生じないかを確認するために、
TempDNA_L-0 添加条件で SiO_2 のミネラルゼーシ
ョンを 3 時間行ったところ、沈殿物の形成は確認
されなかった (Fig. 4-12d)。以上の結果から、 CaCO_3
は DNA に特異的に沈殿し、 SiO_2 は DNA には沈殿
しないことが示された。しかし、 $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ が高
濃度である場合、多量の CaCO_3 が DNA に沈殿す

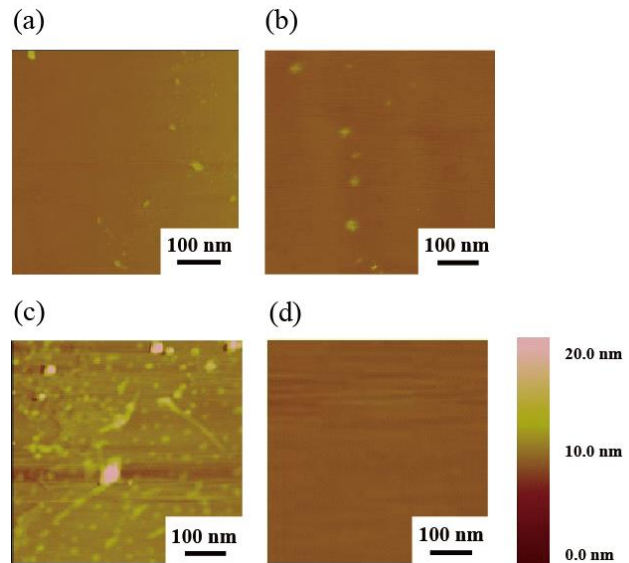


Fig. 4-12 (a) AFM image of the sample after CaCO_3 mineralization without TempDNA and SiPP-PNA. AFM images of the sample after CaCO_3 mineralization using (b) SiPP-PNA alone, and (c) TempDNA_L-0 alone. (d) AFM image of the sample after SiO_2 mineralization using TempDNA_L-0 alone.

ることが明らかになったので、 CaCO_3 のミネラルゼーションの最適化を試みた。終濃度 0.15 mM $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ の条件で CaCO_3 のミネラルゼーションを 6 時間以上行ったところファイバー状の構造物の形成が確認できた (Fig. 4-13a-c)。これらのことから、ファイバー状の構造物は DNA 上に沈殿した CaCO_3 であることが示唆された。

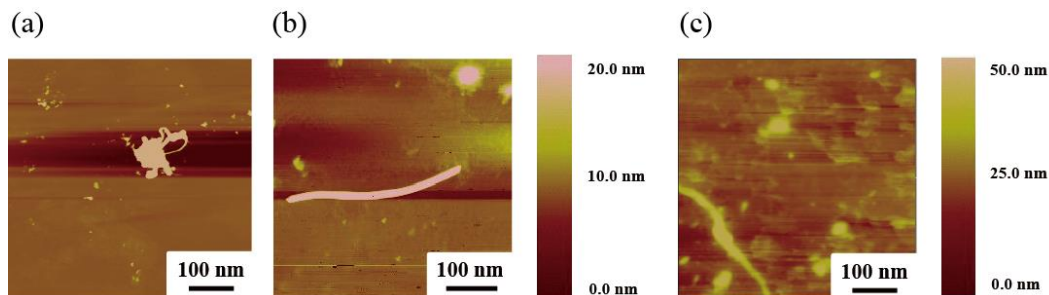


Fig. 4-13 AFM images of the sample with TempDNA_L-0 after CaCO_3 mineralization for (a) 3 hour, (b) 6 hour, and (c) 24

4-4-7. マクロ的解析による SiO₂ と CaCO₃ 沈殿能の確認

続いて、モリブデンブルーアッセイにより SiO₂ 沈殿後の Si(OH)₄ 中の Si⁴⁺ とキレート滴定により CaCO₃ 沈殿後の Ca(HCO₃)₂ 中の Ca²⁺ の定量測定を行い、ペプチドに対しては SiO₂、DNA に対しては CaCO₃ が位置特異的に沈殿しているかの確認を行った。モリブデンブルーアッセイに使用するモリブデン酸アンモニウム四水和物はリン酸と親和性が高く、リンモリブデン酸錯体を形成する

ことが知られている^[6]。そこで、SiO₂ のミネラル化に使用するバッファーをリン酸バッファーから Tris-HCl バッファーに変えて Si(OH)₄ の定量を行うことにした。また、バッファー存在下でモリブデンブルーアッセイを試みた場合、バッファーがモリブデン錯体の形成を阻害し、モリブデンブルーの吸光度が低下する可能性がある。そこで、Tris-HCl バッファーを使用した条件で検量線を作成した。まず、Si(OH)₄ のみ添加した条件と TempDNA_L-1 添加条件で SiO₂ のミネラル化を 3 時間行った後のサンプルを分析し、Si(OH)₄ のみ (0 時間) と比較した。その結果、Si(OH)₄ のみ (3 時間) と TempDNA_L-1 添加条件は Si(OH)₄ のみ (0 時間) と比較してほとんど Si(OH)₄ の濃度が減少していないことから、SiO₂ は DNA には沈殿しないことが示された (Fig. 4-14)。一方、SiPP-PNA 添加条件と SiPP 添加条件では、これらと比較して Si(OH)₄ の濃度が大きく減少していることが示された (Fig. 4-14)。以上の結果から、SiO₂ はペプチドに対して特異的に沈殿していることが明らかとなった。また、PNA 配列の有無は SiO₂ のミネラル化に直接的な影響を与えていないということも明らかとなった (Fig. 4-14)。

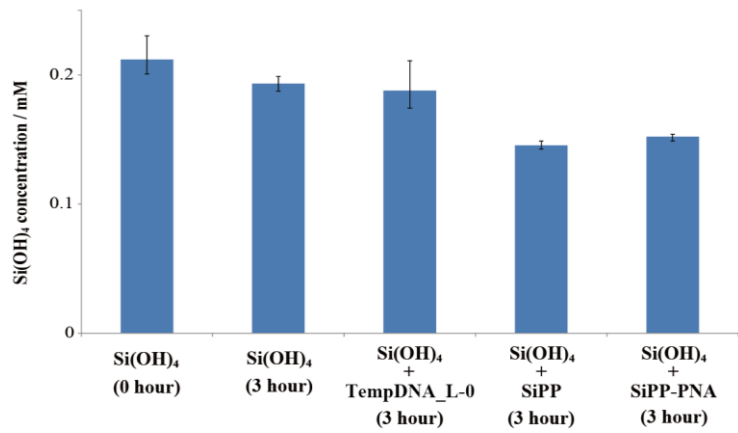


Fig. 4-14 Residual Si(OH)₄ concentrations in various conditions by the blue silicomolybdic assay.

続いて、DNAにCaCO₃が位置特異的に沈殿していることを確認するためにキレート滴定を行った。Ca(HCO₃)₂のみで3時間インキュベートさせた条件においても0時間と比較してわずかにCa(HCO₃)₂の濃度が減少していることが確認されたが、ほとんど沈殿していないことが明らかとなった (Fig. 4-15)。

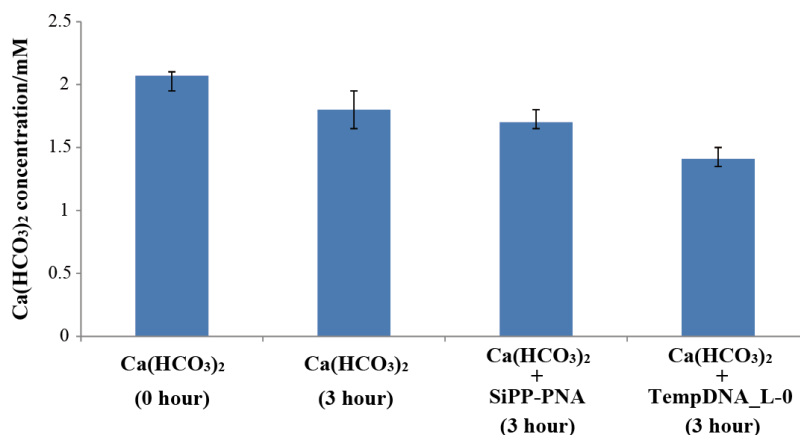


Fig. 4-15 Residual Ca(HCO₃)₂ concentrations in various conditions by standard titration with ethylenediaminetetraacetate..

SiPP-PNA 添加条件においても、

Ca(HCO₃)₂の濃度の減少が見られたが、Ca(HCO₃)₂添加条件とほとんど変わらないことが示された (Fig. 4-15)。このことから、ペプチドにはCaCO₃が特異的に沈殿していないことが明らかとなった。TempDNA_L-0添加条件では、Ca(HCO₃)₂のみとSiPP-PNA添加条件と比較してCa(HCO₃)₂の濃度が大きく減少していることが確認された (Fig. 4-15)。このことから、CaCO₃はDNAに特異的に沈殿することが明らかとなった。以上の結果から、ペプチドに対してはSiO₂、DNAに対してはCaCO₃が位置特異的に沈殿していることが定量分析から明らかとなった。

4-4-8. SiO₂とCaCO₃のDNA上への二種の無機物の位置特異的沈殿制御の確認

4-4-6 および 4-4-7 の結果より、SiO₂とCaCO₃の二種類の無機物の位置特異的沈殿制御が可能であると考えられたため実際に実験を行うことにした。4-4-6 の結果より、非特異的な沈殿も少ないことから、0.15 mM Ca(HCO₃)₂の濃度条件を参考にし、SiO₂とCaCO₃の二種類の無機物のミネラルリゼーションを行った。濃度および沈殿時間の検討の結果、SiO₂のミネラルリゼーションの後、0.3 mM Ca(HCO₃)₂の濃度条件でCaCO₃のミネラルリゼーションを6時間行うと紐状構造物の両端に球状粒子が連結したダンベル型の構造物の形成が確認できた (Fig. 4-16a)。この構造物の球状粒子部分と紐状部分をTEM-EDXにより元素分析したところ、紐状部分からはCaCO₃由来のCa原子とO原子のシグナルに加え、P原子のシグナルが検出され (Fig. 4-16b)、球状粒子部分からはSiO₂由来のSi原子とO原子のシグナルに加え、P原子およびCa原子のシグナルも検出された (Fig. 4-16c)。まず、Pのシグナルが検出された理由として、紐状部分のみPのシグナルが検出されれば、DNAのリン酸基由来のものであるが、球状粒子部分からも検出されたので、このP原子のシグナルはSiO₂沈殿時

に使用していたリン酸バッファー由来のシグナルであることが示唆された。続いて、Ca 原子のシグナルが球状粒子からも検出された理由として、SiO₂表面はマイナスチャージを帯びた状態であるため、Ca²⁺のプラスチャージと相互作用し、SiO₂粒子の周りに CaCO₃の沈殿が生じ、SiO₂-CaCO₃のコアシェル構造を形成していると考えられる。

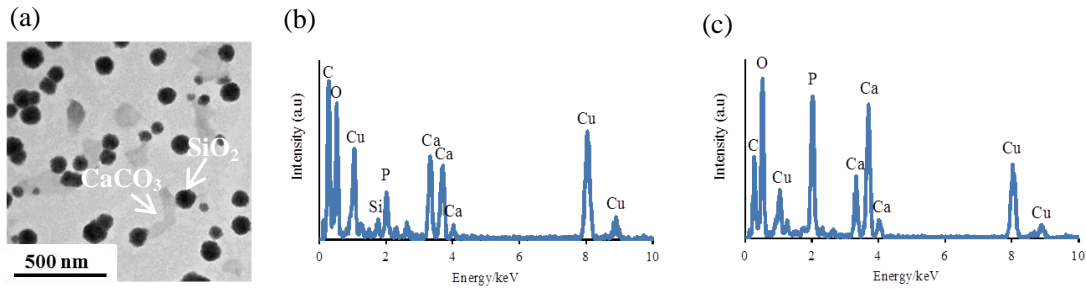


Fig. 4-16 (a) TEM image of the sample after site-specific SiO₂ and CaCO₃ mineralization for 6 h in 0.3 mM Ca(HCO₃)₂ using SiPP-PNA and TempDNA_L-1. (b) TEM-EDX point analysis of (b) a nanoparticle and (c) a nanochain obtained using TempDNA_L-1.

次に、Fig. 4-16a で確認されたダンベル型の構造物は DNA とペプチドが結合し、DNA の両端に SiO₂ が DNA 上に CaCO₃ が沈殿して形成したものであるのかを確認した。まず、TempDNA_L-0 と SiPP-PNA 添加条件および TempDNA_L-1 と SiPP 添加条件で SiO₂ と CaCO₃ のミネラルゼーションを行ったサンプルを作製し、TEM 観察を行った。その結果、どちらの条件においてもダンベル型の構造物の形成は確認されず、球状粒子もしくは形状の崩れた沈殿物の形成しか確認されなかった (Fig. 4-17a, b)。また、TempDNA_L-0 のみ添加した条件と SiPP のみ添加した条件で SiO₂ および CaCO₃ のミネラルゼーションを行ったサンプルを作製し、TEM 観察を行ったところ、Fig. 4-17a, b と同様の球状粒子もしくは形状の崩れた沈殿物しか確認されなかった (Fig. 4-17c, d)。以上の結果から、SiPP-PNA の PNA 配列と PNA 配列と相補的な配列がない DNA

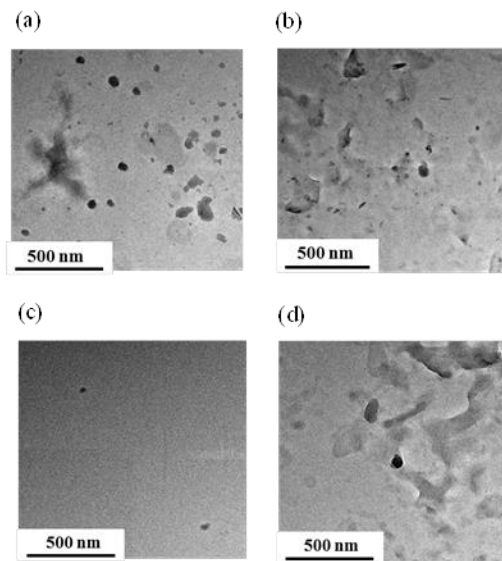


Fig. 4-17 TEM images of the sample after SiO₂ and CaCO₃ mineralization using (a) TempDNA_L-0 with SiPP-PNA, (b) TempDNA_L-1 with SiPP, (c) SiPP-PNA alone, and (d) SiPP alone.

を添加した条件ではダンベル型の構造物は確認されず、SiPP-PNA と TempDNA_L-1 を添加した条件でしかダ

ンベル型の構造物の形成は確認されなかった。このことから、DNA の両端に配置した SiPP-PNA の PNA 配列と相補的な配列に SiPP-PNA が結合し、SiO₂ のミネラルゼーションにより DNA の両端に SiO₂ が沈殿し、CaCO₃ のミネラルゼーションにより DNA 上に CaCO₃ が沈殿していることが示された。ある程度位置特異的に SiO₂ と CaCO₃ を沈殿させることには成功したが、TEM-EDX による元素分析の結果から SiO₂ の周りにも CaCO₃ が沈殿していることが確認されたため、二種の無機物の精密なミネラルゼーション制御は達成できなかった。しかし、本手法はコアシェル構造からなる無機ナノ構造体を作製する際には、非常に有用な手法であると考えられる。

4-4-9. Ca(HCO₃)₂ の濃度および沈殿時間の変化による SiO₂-CaCO₃ 複合ナノ構造体の形状制御

CaCO₃ の沈殿時間と Ca(HCO₃)₂ の濃度を变化させてダンベル型の SiO₂-CaCO₃ 複合ナノ構造体の形状を制御することが可能かを検討した。まず、Ca(HCO₃)₂ の濃度を 0.30 mM 固定にして CaCO₃ のミネラルゼーションを行った。その結果、沈殿時間が 0 時間では球状粒子のサイズが 46.8 ± 3.6 nm (Fig. 4-18a)、3 時間では 94.7 ± 6.7 nm (Fig. 4-18b)、6 時間では 138.6 ± 7.3 nm (Fig. 4-18c)、24 時間では 131.6 ± 7.1 nm (Fig. 4-18d) と 0 時間から 6 時間にかけて球状粒子のサイズが増大し、それ以降は粒子成長が起こらないこと示された。また、0 時間から 6 時間にかけての粒子成長中は DNA 上への CaCO₃ の沈殿は起こらず、粒子成長反応停止後に徐々に DNA 上に CaCO₃ 沈殿が生じることが明らかとなった。粒子成長反応停止後は時間経過に伴い、紐状構造物のはっきりと確認できることから DNA 上に CaCO₃ が形成していることが明らかとなった。

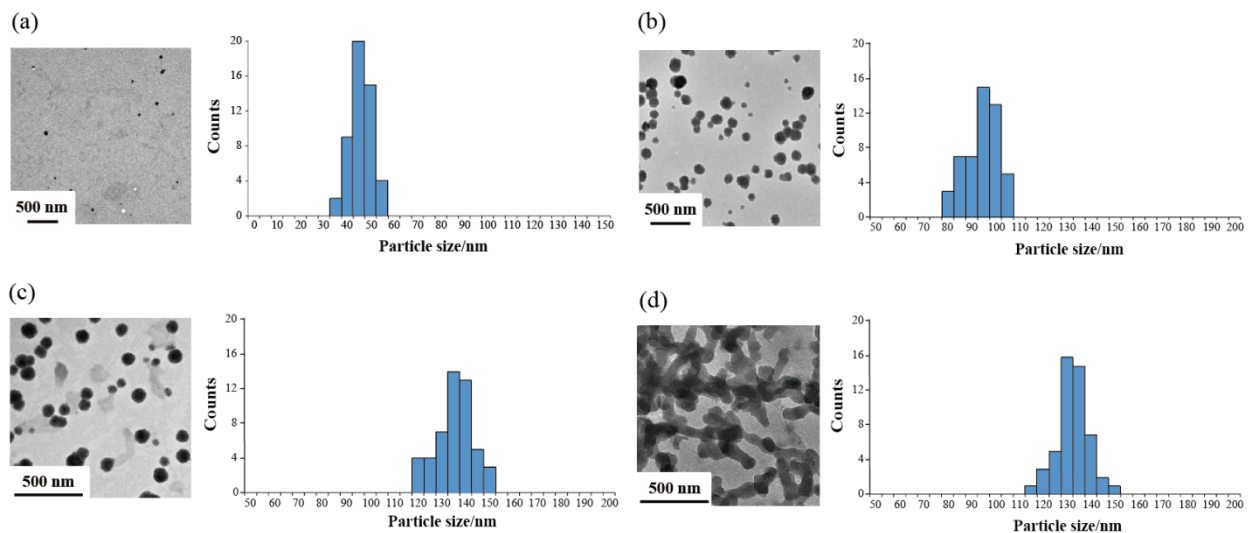


Fig. 4-18 TEM images (left) and particle size histograms (right) of the sample after site-specific SiO₂ and CaCO₃ mineralization using TempDNA_L-1 with SiPP-PNA. (a) CaCO₃ mineralization for 0 h in 0.3 mM Ca(HCO₃)₂. (b) CaCO₃ mineralization for 3 h in 0.3 mM Ca(HCO₃)₂. (c) CaCO₃ mineralization for 6 h in 0.3 mM Ca(HCO₃)₂. (d) CaCO₃ mineralization for 24 h in 0.3 mM Ca(HCO₃)₂.

続いて、 $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ の濃度を 0.50 mM で同様の実験を行った。沈殿時間が 0 時間では球状粒子のサイズが 46.8 ± 3.6 nm (Fig. 4-19a)、3 時間では、 130.2 ± 5.9 nm (Fig. 4-19b)、6 時間では、 173.3 ± 4.5 nm (Fig. 4-19c) と 0.30 mM の時と同様に沈殿時間の経過に伴い、球状粒子のサイズが増大することが明らかとなった。一方、紐状構造物は 0.30 mM で観察された紐状構造物よりも非常に細く、 SiO_2 に対して特異的に CaCO_3 が沈殿していることが示された。以上の結果から、 CaCO_3 の沈殿時間および $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ の濃度を変化させることで形成する SiO_2 - CaCO_3 複合ナノ構造体の形状を制御できることが示された。

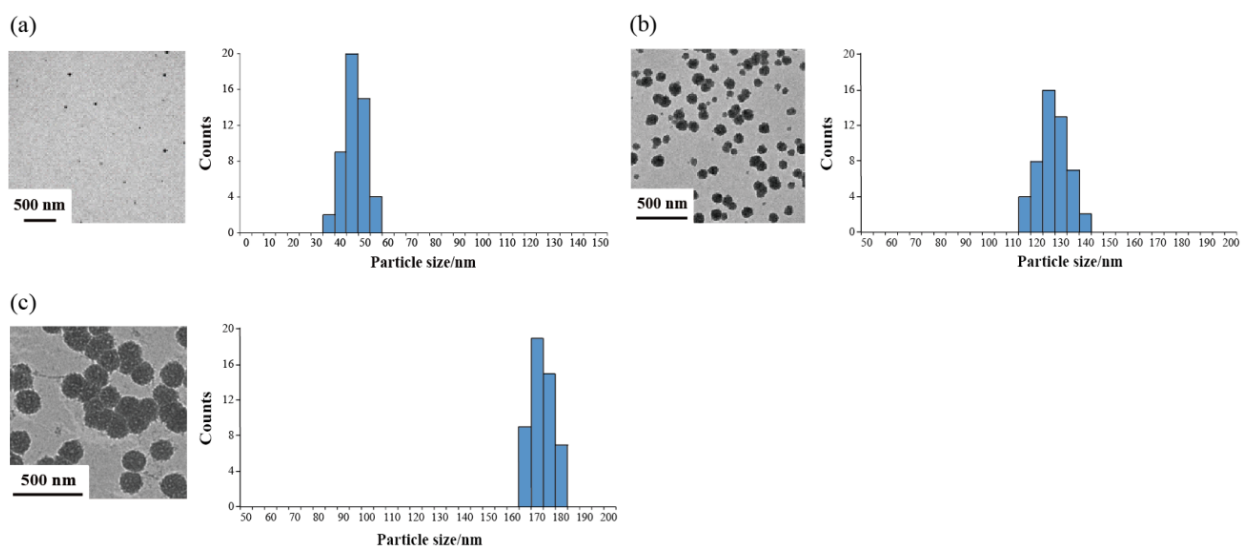


Fig. 4-19 TEM images (left) and particle size histograms (right) of the sample after site-specific SiO_2 and CaCO_3 mineralization using TempDNA_L-1 with SiPP-PNA. (a) CaCO_3 mineralization for 0 h in 0.5 mM $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$. (b) CaCO_3 mineralization for 3 h in 0.5 mM $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$. (c) CaCO_3 mineralization for 6 h in 0.5 mM $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$.

4-5. 結論

本研究では SiO_2 を題材に、DNA と相補的に結合することができる PNA 配列を組み込んだ SiO_2 沈殿ペプチド (SiPP-PNA) と SiO_2 沈殿ペプチドの PNA 配列と相補的な配列を両端に有する DNA を用いて、ミネラルゼーションにより SiO_2 を DNA の両端に位置特異的に沈殿させることに成功した^[7]。さらに、DNA の両端に配置している PNA 結合部位の数と DNA 鎖長を変化させることで、形成する SiO_2 のサイズや SiO_2 -DNA 複合体の形状を制御することができた。一種類の無機物においては DNA 上の特定部位に位置特異的に沈殿させることができたので、DNA に沈殿することが知られている CaCO_3 のミネラルゼーションを題材に、 SiO_2 のミネラルゼーションを行った後に DNA 上にさらに CaCO_3 を位置特異的に沈殿制御することを試みた。また、 CaCO_3 のミネラルゼーションの際に使用する $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ の濃度と沈殿時間を変化させることで形成する SiO_2 - CaCO_3 複合構造体の形状制御にも試みた。DNA 上の任意の位置にある程度 SiO_2 および CaCO_3 を位置特異的に沈殿で

きていることが確認されたが、TEM-EDXによる元素分析からSiO₂の周りにもCaCO₃が沈殿しており、精密な沈殿制御には至らなかったが、Ca(HCO₃)₂の濃度とCaCO₃の沈殿時間を変化させることで、SiO₂-CaCO₃複合ナノ構造体の形状を制御可能であることが示された^[8]。第5章では、TiO₂とAuのミネラルゼーションを題材に、DNA上に直接無機物を沈殿させるのではなく、二種の無機物沈殿ペプチドを用いてDNA上の任意の位置にそれぞれのペプチドを配置した後、ミネラルゼーションすることでそれぞれの無機物を特定部位に精密に沈殿制御し、可視光励起性を有するAu-TiO₂複合ナノ構造体の作製を試みた。また、DNA上に配置するそれぞれの無機物沈殿ペプチドの数を制御することにより、Au-TiO₂複合ナノ構造体中のAuとTiO₂の元素含有比を制御することにも試みた。作製したAu-TiO₂複合ナノ構造体の可視光照射下(>450 nm)における光触媒活性やHeLa細胞を用いた細胞毒性試験と可視光照射下における細胞死誘導効果を評価した。

参考文献

- [1] M. R. Knecht, D. W. Wright, *Chem. Commun.*, 3038-3039 (2003).
- [2] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science*, **254**, 1497-1500 (1991).
- [3] N. Kroger, R. Deutzmann, M. Sumper, *Science*, **286**, 1129-1132 (1999).
- [4] W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*; Oxford University Press; New York, 2000.
- [5] H. Kumagai, R. Matsunaga, T. Nishimura, Y. Yamamoto, S. Kajiyama, Y. Oaki, K. Akaiwa, H. Inoue, H. Nagasawa, K. Tsumoto, T. Kato, *Faraday Discuss.*, **159**, 483-494 (2012).
- [6] T. Coradin, D. Eglin, *Spectroscopy*, **18**, 567-576 (2004).
- [7] M. Ozaki, K. Nagai, H. Nishiyama, T. Tsuruoka, S. Fujii, T. Endoh, T. Imai, K.-y. Tomizaki, K. Usui, *Chem. Commun.*, **52**, 4010-4013 (2016).
- [8] K. Usui, M. Ozaki, A. Yamada, Y. Hamada, T. Tsuruoka, T. Imai, K.-y. Tomizaki, *Nanoscale*, **8**, 17081-17084 (2016).

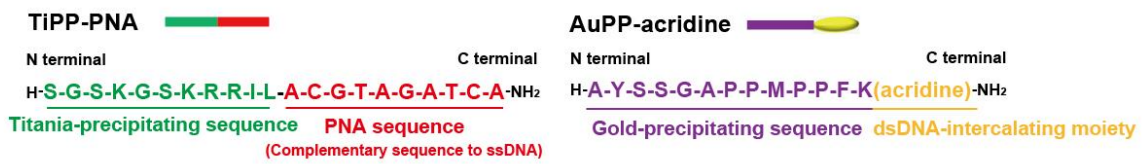
第 5 章

二種の無機物沈殿ペプチドを用いた DNA 上への Au と TiO₂ の位置特異的沈殿制御

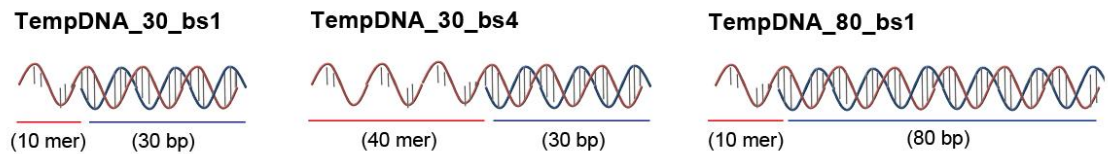
5-1. 緒言

第 4 章で二種の無機物の位置特異的沈殿制御が可能であることが示された^[1]。しかしながら、DNA 上に直接ミネラルゼーションにより無機物を沈殿させる場合、もう一方の無機物上にも無機物沈殿が生じるという課題点が見つかった。そこで、DNA 自体に二種類目の無機物を沈殿させるのではなく、二種の無機物沈殿ペプチドを DNA 上の任意の配置し、ミネラルゼーションを行うことで DNA 上の特定部位に二種の無機物をより高度に位置特異的に沈殿制御することができるのではないかと考えた。本研究では、TiO₂ と Au のミネラルゼーションを題材に、DNA と相補的に結合可能な PNA 配列を組み込んだ TiO₂ 沈殿ペプチド (TiPP-PNA) と二本鎖 DNA の塩基間にインターカレートするアクリジンを組み込んだ Au 沈殿ペプチド (AuPP-acridine) を用いて、二種の無機物の位置特異的沈殿制御法の確立を試みた (Fig. 5-1a)。また、ミネラルゼーションにより TiO₂ と Au を DNA 上の任意の位置に形成させた後、焼成することで可視光励起性を有する Au-TiO₂ 複合ナノ構造体 (Au-TiO₂ nanocomposite) の作製を試みた (Fig. 5-1c)。さらに、DNA 上に配置する TiPP-PNA の PNA 配列と相補的な配列の数と AuPP-acridine が結合する二本鎖 DNA の鎖長を変化させることで、Au-TiO₂ nanocomposite 中の TiO₂ と Au の元素含有比を制御することにも試みた (Fig. 5-1b, c)。DNA 上への TiO₂ と Au の位置特異的沈殿の確認は AFM と TEM による形状観察と TEM-EDX による元素分析により行った。作製した Au-TiO₂ nanocomposite の元素含有比の制御の確認には TEM による Au-TiO₂ nanocomposite 中の TiO₂ ナノ粒子と Au ナノ粒子の形状観察、DLS による Au-TiO₂ nanocomposite の粒子径測定、誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP-AES) による定量分析を用いて評価した。作製した Au-TiO₂ nanocomposite の可視光照射下 (> 450 nm) における光触媒活性はメチレンブルーの分解反応を用いて測定し、コントロールサンプルとして従来法により作製した Au-TiO₂ nanocomposite と市販の TiO₂ 光触媒、Au-TiO₂ 光触媒の光触媒活性と比較した。また、HeLa 細胞を用いて細胞毒性試験を行い、生体適合性の高い Au-TiO₂ nanocomposite が作製できているのかを評価した。さらに、Au-TiO₂ nanocomposite の光触媒活性を利用した細胞死誘導実験もを行い、コントロールサンプルと本研究で作製した Au-TiO₂ nanocomposite の光触媒活性を比較評価した。

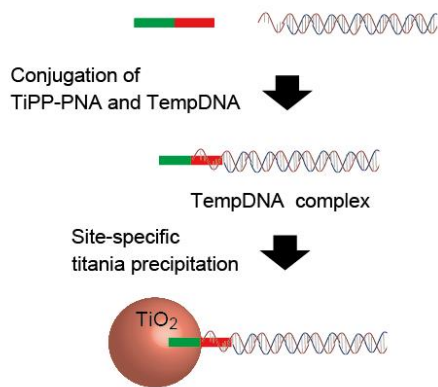
(a) Peptide



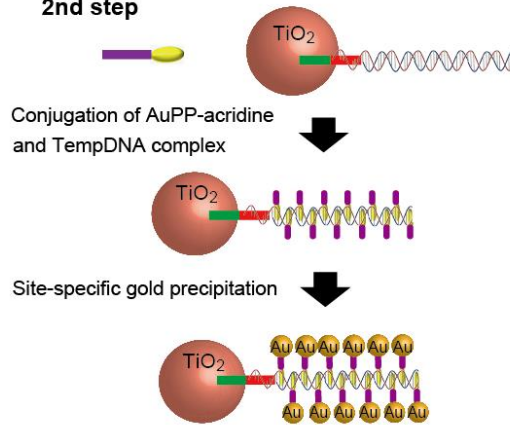
(b) DNA



(c) 1st step



2nd step



3rd step

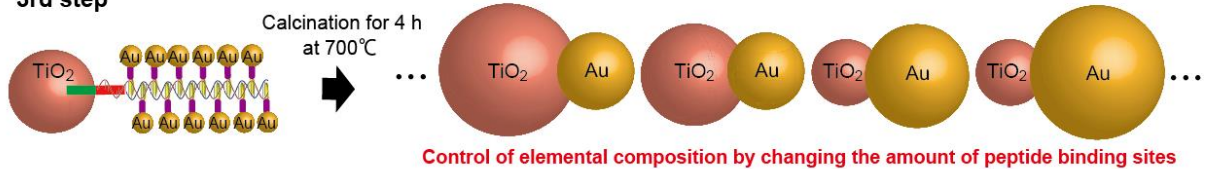


Fig. 5-1 (a) Sequences of the TiO₂ precipitating peptide (TiPP-PNA) and Au precipitating peptide (AuPP-acridine) used in this study. (b) Illustration of the three DNA sequences (TempDNA_30_bs1, TempDNA_bs4 and TempDNA_80_bs1) used in this study (the other three DNA sequences are shown in Fig. 5-2). (c) Outline of the site-specific TiO₂ and Au precipitation using the DNA and the two peptides (TiPP-PNA and AuPP-acridine).

5-2. 実験材料および実験手法

5-2-1. 実験材料

Au 沈殿ペプチドの合成時に使用する TentaGel S RAM resin はハイペップ研究所、各種 Fmoc アミノ酸誘導体、縮合剤である HATU (O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate)、Piperidine、DIPEA、TFA は渡辺化学(株)から購入した。ペプチドの精製の際に使用するアセトニトリルは Sigma-Aldrich 社の高速液体クロマトグラフィー用のものを使用した。DNA は北海道システムサイエンス(株)から購入し、滅菌水を用いて所定の濃度に調製した後に使用した。TiO₂ および Au のミネラルゼーションに使用する TiBALDH (Titanium(IV) bis(ammonium lactato)-dihydrohyde) と HAuCl₄ は Sigma-aldrich 社、クエン酸三ナトリウムは和光純薬(株)から購入した。TiO₂ および Au のミネラルゼーション後の限外濾過には Merck の Amicon Ultra-0.5 (PLBC Ultracel-3 membrane, 3 kDa) を用いた。Au-TiO₂ nanocomposite の焼成の際に使用するセルロースフィルム (Cellu・Sep® H1 Tubular Membrane 45 mm×50 cm (Nominal MWCO 2000)) はフナコシ(株)から購入した。光触媒活性評価に使用するメチレンブルー (MB) は東京化成工業(株)から購入した。

5-2-2. TiO₂ 沈殿ペプチドの設計

第4章の SiO₂ のミネラルゼーションで使用していた SiPP-PNA の SiO₂ 沈殿配列は TiO₂ も沈殿させることが知られている^[2]。本 TiO₂ 沈殿ペプチドは 11 残基と短い配列でありながら約 30 nm から 60 nm 程度の TiO₂ ナノ粒子を形成することが明らかとなっている^[2]。第4章の SiO₂ の位置特異的沈殿制御の際、本ペプチドを用いて DNA の両端に SiO₂ を位置特異的に沈殿制御することができた経緯もあるので^[1,3]、本配列に PNA 配列を組み込んだ TiPP-PNA を使用することにした。合成方法および精製方法は第4章の 4-2-2 と 4-2-3 に記載している。

5-2-3. Au 沈殿ペプチドの設計

本研究で設計した Au 沈殿ペプチドは以下の通りである。

AuPP-acridine

N 末端

C 末端

H-Ala-Tyr-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Met-Pro-Pro-Lys(Acridine)-NH₂

分子量 (計算値) 1555.7

本研究で使用する Au 沈殿ペプチド (AuPP-acridine) は大きく分けて二つの部分からなり、一つは天然アミノ酸からなる金のミネラルゼーションを行う部分^[4]、もう一つはアクリジンからなる二本鎖 DNA の塩基間にインターカレートする部分からなる^[5]。本ペプチドの Ala から Pro までの天然アミノ酸からなる部分は論文から引用した^[4]。この配列はフェージディスプレイ法により Au 沈殿能を有することが同定されており^[6, 7]、約 10 nm ほどの大きさの Au ナノ粒子が形成することが明らかとなっている^[8, 9]。本配列を選択した理由として、比較的短い配列でありながら、Au のミネラルゼーションを行った際、均一なサイズの Au ナノ粒子が形成するからである。また、二本鎖 DNA に結合させるためのアクリジンを付加させる位置は、立体障害の影響により、DNA へのインターカレートが阻害されないように側鎖が長い Lys の側鎖部分に付加させることにした。

5-2-4. Au 沈殿ペプチドの合成および精製

本研究で使用する Au 沈殿ペプチド (AuPP-acridine) は、Fmoc 固相合成法により合成した^[10]。まず、200 μ mol スケール相当の TentaGel S RAM resin (ハイペップ研究所) を秤量し、NMP 2 mL で 5 回洗浄した後、NMP 2 mL で 1 日膨潤させた。その後、NMP を除去し、25% PPD/NMP 溶液 2 mL を添加し、攪拌しながら 7 分間反応させた。25% PPD/NMP 溶液を除去し、再度 25% PPD/NMP 溶液 2 mL を添加し、攪拌しながら 7 分間反応させることで樹脂表面の Fmoc 基を切断した。NMP 2 mL で 5 回洗浄した後、樹脂に導入可能なペプチド量に対して、4 当量の Fmoc-Lys(Mtt)-OH (渡辺化学工業 (株)) と 4 当量の HATU を NMP 2 mL に溶解し、8 当量の DIEA を添加し、30 分間インキュベートすることで側鎖が Mtt 基で保護された Lys を樹脂に導入した。反応後、溶液を除去し NMP 2 mL で 5 回洗浄した。続いて、アクリジンカルボン酸を Lys 側鎖に導入するために Mtt 基を除去した。まず、DCM 1 mL で 5 回洗浄を行った後、1% TFA / 5% TIS / 94% DCM のカクテルを 1 mL 添加し、4°C で 1 分間転倒混和しながら反応させた。この操作を 7 回行い、Mtt 基を除去した^[11]。その後、DCM \rightarrow NMP \rightarrow 1% DIEA \rightarrow NMP の順で 5 回ずつ洗浄することで中和した。続いて、Fmoc 基を除去するために 25% PPD/NMP 溶液 2 mL を添加し、攪拌しながら 7 分間反応させた後、25% PPD/NMP 溶液を除去した。再度、25% PPD/NMP 溶液 2 mL を添加し、攪拌しながら 7 分間反応させることで Lys の Fmoc 基を切断した。その後、4 当量の Fmoc-AA-OH と 4 当量の HATU を NMP 2 mL に溶解し、8 当量の DIEA を添加し 30 分間反応させ、Lys のカルボキシ基末端側にアミノ酸を導入した。以上の操作を繰り返し目的のペプチドを得た。合成終了後の樹脂は真空乾燥を行い完全に乾燥させた後、m-cresol / ethanedithiol / thioanisole / TFA = 0.25 mL / 0.75 mL / 0.75 mL / 10 mL を加え、室温で 1 時間反応させることで樹脂からの切り出しを行った。目的のペプチドが含まれるろ液に冷ジエチルエーテルを加え、粗ペプチドを沈殿させた。m-cresol / ethanedithiol / thioanisole / TFA のカ

クテルはデカンテーションによって取り除き、再び冷ジエチルエーテルを加えてデカンテーションを行う作業を3~4回繰り返し粗ペプチドを洗浄した。ジエチルエーテル洗浄後、ジエチルエーテルを除くために真空乾燥を行い、粗ペプチドを得た。この粗ペプチドを0.1%TFA水溶液に溶解し、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) により精製した。RP-HPLCにはGL7410 (GL Science社) を使用し、検出は波長可変型紫外検出機GL7450 (GL Science社) 使用し、カラムにはInertsil ODS-3カラム (GL sciences社) を使用した。合成したペプチドはペプチド結合に由来する220 nmの波長により検出した。溶媒には、A溶媒として0.1% TFA / H₂Oを、B溶媒には0.08% TFA / アセトニトリルを用いた。目的とするペプチドの同定にはBRUKER社のMALDI-TOF MS AutoflexIII smartbeamを用い、マトリックスにはシナピン酸を用いた。精製後の試料は、凍結乾燥後-20℃で保存した。

5-2-5. Au 沈殿ペプチドのストック溶液の調製

ペプチドの濃度決定はPITC標識によるアミノ酸分析によって算出した。ペプチド溶液を約2 mMになるように調製し、標準溶液として4 mM Val溶液をそれぞれ25 μLずつ混合し、乾燥させた。乾燥後、6 M HClを10 μL添加し、120℃で24時間加水分解を行った。加水分解後のサンプルは、ethanole/H₂O/trimethylamine=2/2/1の割合で混合させた溶液を20 μL添加し攪拌後、減圧乾燥を行った。乾燥後、etanole/H₂O/trimethylamine/PITC=7/1/1/1の割合で混合した溶液を添加し攪拌後、室温で20分間反応させた。反応終了後、減圧乾燥を行った。乾燥後、acetonitrile/60 mM buffer pH6.0=6/94 (v/v) 1 mLに溶解させ、HPLC (Waters 2695) を用いて分析を行った。カラムはC18カラム (Inertsil ODS-2) を使用、検出波長は220 nmで行った。ペプチド溶液の濃度は標準溶液のピーク面積との割合から算出した。算出方法は以下の通りである。

$$\text{ペプチドのモル数 (mol)} = \frac{\text{標準溶液のモル数(mol)} \times \text{ペプチドのピーク面積}}{\text{標準溶液のピーク面積}}$$

5-2-6. 短鎖テンプレート DNA の設計

本研究で使用するTiO₂とAuの位置特異的沈殿制御を行うためのテンプレートDNAの設計として、一方のDNAの5'側の10 merにTiPP-PNAのPNA配列と相補的な配列を配置し、残りの部分はAuPP-acridineがインターカレートするために二本鎖とした以下の6種類のDNAを設計した (Fig. 5-2)。

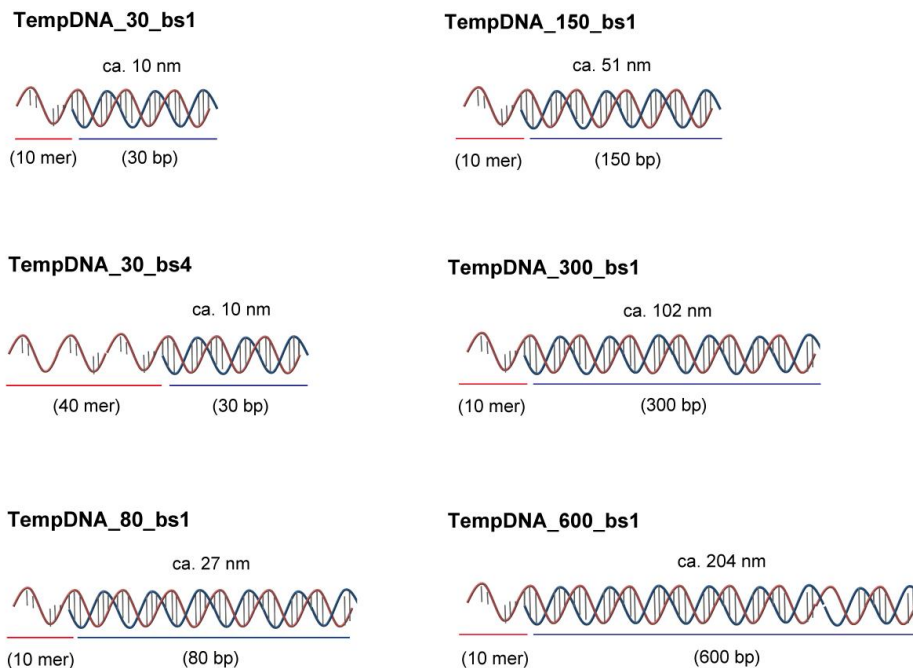


Fig. 5-2 Illustration of the six DNA sequences used in this study.

TempDNA_30_bs4 は 4 つの TiPP-PNA の PNA と相補的な配列を有しており、二本鎖部分には 10 個の AuPP-acridine が結合するように設計している。TempDNA_30_bs1 は 1 つの TiPP-PNA の PNA と相補的な配列を有しており、二本鎖部分には 10 個の AuPP-Acridine が結合するように設計している。TempDNA_80_bs1 は 1 つの TiPP-PNA の PNA と相補的な配列を有しており、二本鎖部分には 20 個の AuPP-acridine が結合するように設計している。TempDNA_150_bs1 は 1 つの TiPP-PNA の PNA と相補的な配列を有しており、二本鎖部分には 50 個の AuPP-acridine が結合するように設計している。TempDNA_300_bs1 は 1 つの TiPP-PNA の PNA と相補的な配列を有しており、二本鎖部分には 100 個の AuPP-acridine が結合するように設計している。TempDNA_600_bs1 は 1 つの TiPP-PNA の PNA と相補的な配列を有しており、二本鎖部分には 200 個の AuPP-acridine が結合するように設計している。それぞれの DNA は自己相補鎖形成しないように設計している。TempDNA_30_bs4 と TempDNA_30_bs1、TempDNA_80_bs1 は北海道システムサイエンス（株）から購入した次ページ記載のオリゴ DNA を使用した。

• TempDNA_30_bs4

5'-TGCATCTAGT-TGCATCTAGT-TGCATCTAGT-TGCATCTAGT-GCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGC-3'

5'-GCTCCGAGAACGGGTGCGCATAGAAATTGC-3'

• TempDNA_30_bs1

5'-TGCATCTAGT-GCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGC-3'

5'-GCTCCGAGAACGGGTGCGCATAGAAATTGC-3'

• TempDNA_80_bs1

5'-TGCATCTAGT GCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTCCGACCGCTTTGGCCGCCGCCAGTCCT
GCTCGCTTCGCTACTTG-3'

5'-CAAGTAGCGAAGCGAGCAGGACTGGGCGGCGGCCAAAGCGGTTCGGACAGTGCTCCGAGAACGGGTGCGCA
TAGAAATTGC-3'

滅菌水を用いてそれぞれのオリゴ DNA の濃度を 100 μ M になるように調製した後、TempDNA_30_bs4 は TiPP-PNA をモル比にて 1 : 4、TempDNA_30_bs1 と TempDNA_80_bs1 は TiPP-PNA をモル比にて 1 : 1 の割合で混合させ、遠心エバポレーター (CVE-2000 型) を用いてドライダウンさせた。その後、それぞれの DNA の終濃度が 10 μ M になるように 0.625 mM Tris-HCl (pH 7.0) を添加した後、サーマルサイクラーを用いて 90°C で 3 分間インキュベートした。その後、90°C から 37°C まで 1 時間かけて降温することでアニーリングを行い、10 μ M の TempDNA を調製した。100 bp 以上の DNA は PCR でないと作製することができないので、TempDNA_150_bs1 と TempDNA_300_bs1、TempDNA_600_bs1 は第 3 章の 3-2-7 と同様に pBR 322 を用いて PCR により作製した。

5-2-7. 長鎖テンプレート DNA の作製

TempDNA_150_bs1 は pBR322 を鋳型とし、pBR322_nR5 と pBR322_250-400 の 2 種類のプライマーを用いて、PCR により合成した。TempDNA_300_bs1 は pBR322 を鋳型とし、pBR322_nR5 と pBR322_250-550 の 2 種類のプライマーを用いて、PCR により合成した。TempDNA_600_bs1 は pBR322 を鋳型とし、pBR322_nR5 と pBR322_250-850 の 2 種類のプライマーを用いて、PCR により合成した。それぞれのプライマー配列を以下に

記載した（赤字が TiPP-PNA の PNA 配列と相補的な配列）。

・ pBR322_nR5

5'-**ACGTAGATCA**-GCAATTTCTATGCGCACCCGTTCTC-3'

・ pBR322_250-400

5'-CACGATGCGTCCGGCGTAGAG-3'

・ pBR322_250-550

5'-GCCCAACAGTCCCCCGCCAC-3'

・ pBR322_250-850

5'-GAATACCGCAAGCGACAGGCC-3'

PCR 用のサンプル溶液は以下の条件で記載した順に添加した。

・ サンプル条件

MilliQ	62 μ L
25 mM MgSO ₄	6 μ L
10 μ M sence primer	3 μ L
10 μ M anti sence primer	3 μ L
鋳型 pBR 322	4 μ L
PCR buffer (KOD Plus 2)	10 μ L
dNTPs	10 μ L
Total volume	98 μ L

ボルテックスミキサー (Scientific Industries) によりサンプル溶液を攪拌し、卓上遠心機 (Capsulefvge PMC-060) で遠心を行った後、KOD ポリメラーゼ 2 μ L を添加し、全量 100 μ L にした。この PCR サンプルをサーマルサイクラー (GeneAtlas 482/485) を用いて、次ページの条件で PCR を行った。

・ PCR 条件

TempDNA_150_bs1	TempDNA_300_bs1	TempDNA_600_bs1
1. 94°C, 2 min (Denature)	1. 94°C, 2 min	1. 94°C, 2 min
2. 98°C, 10 sec (Annealing)	2. 98°C, 10 sec	2. 98°C, 10 sec
3. 62°C, 30 sec (Elongation)	3. 62°C, 30 sec	3. 58°C, 30 sec
4. 68°C, 20 sec	4. 68°C, 30 sec	4. 68°C, 1 min
5. 2~4, 30 cycle	5. 2~4, 30 cycle	5. 2~4, 30 cycle
6. 4°C, cooling	6. 4°C, cooling	6. 4°C, cooling

5-2-8. 長鎖テンプレート DNA の精製

PCR で増幅した DNA を Qiagen kit (Qiagen Minelute Sin columns 50) を用いて精製した。PCR 産物 100 μL と PB buffer 500 μL を混合させた合計 600 μL の溶液を調製し、専用のスピнкаラムにいった。卓上遠心機 (Caspulefyge PMC-060) で 2 分間遠心した後、PE buffer 700 μL をスピнкаラムに添加し、再び卓上遠心機で 2 分間遠心した。続いて、buffer を完全に取り除くために、15000 rpm、2 min、25°C で空遠心を行った。次に、DNA を抽出するためにスピнкаラムに MilliQ を 30 μL を加えて、15000 rpm、2 min、25°C で遠心する操作を 2 回行った。得られた DNA 溶液の濃度は NanoDrop を用いて決定した。DNA の濃度は g/L に変換し、以下の方法で算出した。(相補的塩基対一つの式量は 660 g/mol \cdot bp とした。)

$$\text{DNA の濃度 (mol/L)} = \frac{\text{DNA の濃度 (g/L)}}{\text{相補的塩基対一つの式量} \left(\frac{\text{g}}{\text{mol} \cdot \text{bp}} \right) \times \text{塩基数 (bp)}}$$

5-2-9. 長鎖テンプレート DNA と TiO₂ 沈殿ペプチドの複合化

TempDNA_150_bs1 と TempDNA_300_bs1、TempDNA_600_bs1 を TiPP-PNA と mol 比にて 1:1 の割合で混合させ、遠心エバポレーター (CVE-2000 型) を用いてドライダウンさせた。その後、終濃度が 10 μM になるように 0.625 mM Tris-HCl (pH 7.0) を添加した後、サーマルサイクラーを用いて 90°C で 3 分間インキュベートした。その後、90°C から 37°C まで 1 時間かけて降温することでアニーリングを行い、10 μM の TempDNA を調製した。

5-2-10. DNA 上への TiO₂ の位置特異的沈殿制御の確認

TiBALDH を 2.98 mg 秤量し、298 μ L の MilliQ を加え、ボルテックスを用いて 5 分間攪拌した。その後、MilliQ で 100 倍希釈し、100 mM の TiBALDH を調製した。9 μ L の MilliQ に 0.1 μ M の TempDNA_80_bs1 を 1 μ L 添加した後、10 mM の TiBALDH を 1 μ L 添加し、室温で 3 時間インキュベートすることで TiO₂ のミネラルゼーションを行った。

5-2-11. DNA 上への Au の位置特異的沈殿制御の確認

DNA に AuPP-acridine をインターカレーションさせるために、12 μ L の MilliQ に 10 μ M の TempDNA_80_bs1 を 2 μ L、200 μ M の AuPP-acridine を 2 μ L 添加し、室温で 30 分間インキュベートさせた。続いて、5 mM の塩化金酸を 2 μ L 添加し、室温で 30 分間インキュベートさせ、[AuCl₄]⁻を AuPP-acridine に結合させた。その後、10 mM のクエン酸三ナトリウムを 2 μ L 添加し、室温で 12 時間インキュベートすることで Au のミネラルゼーションを行った。

5-2-12. Au-TiO₂ nanocomposite の作製方法

9 μ L の MilliQ に 10 μ M の TempDNA を 1 μ L と 100 mM の TiBALDH を 1 μ L 添加し、室温で 3 時間インキュベートさせ、TiO₂ のミネラルゼーションを行った。その後、MilliQ で 20 μ L にメスアップし、限外濾過フィルターに分取した。続いて、MilliQ を 480 μ L 添加し、15000 rpm で 30 分間遠心を行い、余分な TiBALDH を除去した。その後、200 μ M の AuPP-acridine を 10 μ L 添加し、室温で 30 分間インキュベートした。30 分経過した後、5 mM の HAuCl₄ を 10 μ L 添加し、室温で 30 分間インキュベートした。さらに、10 mM のクエン酸三ナトリウムを 10 μ L を添加し、室温で 12 時間インキュベートした。その後、15000 rpm で 30 分間限外濾過を行い、余分な HAuCl₄ およびクエン酸三ナトリウムを除去した。焼成時に使用するセルロースフィルムを MilliQ で洗浄した後、減圧乾燥を 1 時間行った。乾燥させたセルロースフィルム上に限外濾過後の Au-TiO₂ サンプルを滴下し、Au-TiO₂ をセルロースフィルム表面に吸着させた後、減圧乾燥を 1 時間行った。乾燥させたセルロースフィルムをアルミナるつぼに入れ、電気炉で焼成した。焼成の条件として、25°C から 700°C まで 20 分で昇温させ、700°C で 4 時間焼成した。その後、4°C/min の速度で室温まで冷却した。得られたサンプルはバイアル瓶に保管した。

5-2-13. 光触媒活性評価方法

5-2-13-1. コントロールサンプルとして使用する P25 TiO₂ の特徴

P25 TiO₂ (日本アエロジル (株)) はアナターゼが 80 %、ルチルが 20 % 含有した平均粒子径 21 nm の TiO₂ ナノ粒子である (Fig. 5-3)。通常、チタニアは 385 nm 未満に吸収を有しているのだが、P25 TiO₂ は 410 nm まで吸収領域を有している。本製品は非常に高い光触媒活性を有しており、TiO₂ 光触媒の研究においてコントロールサンプルとしてよく使用されている。

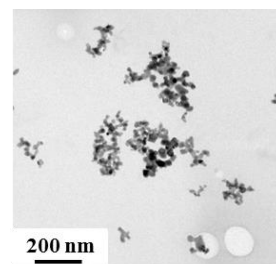


Fig. 5-3 TEM image of P25 TiO₂.

5-2-13-2. コントロールサンプルとして使用する Commercial Au-TiO₂ の特徴

Commercial Au-TiO₂ (ハルタゴールド (株)、RR2Ti) は P25 TiO₂ に 4.1 ± 2.2 nm の Au ナノ粒子が担持された Au の含有率が 0.96 wt% の Au-TiO₂ である (Fig. 5-4)。

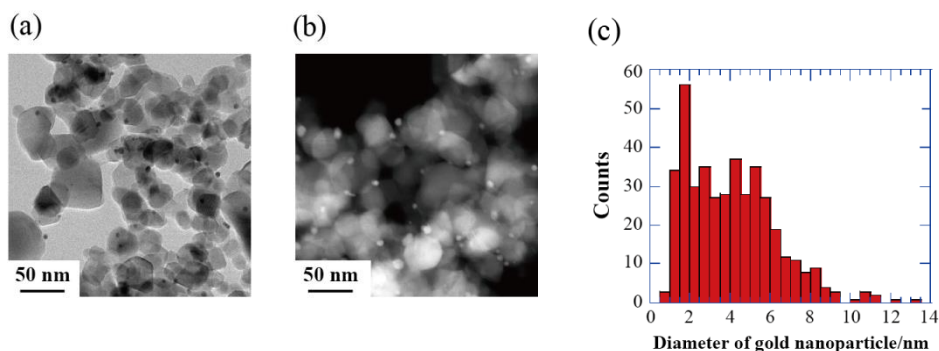


Fig. 5-4 (a) TEM and (b) HAADF-STEM images of RR2Ti. (c) Distribution of the diameter of gold nanoparticles on RR2Ti.

5-2-13-3. コントロールサンプルとして使用する Au-TiO₂ generated by conventional method

本研究では市販の Au-TiO₂ だけでなく、従来法で作製した Au-TiO₂ もコントロールサンプルとして使用することにした。120 mL の MilliQ に 10 mM TiBALDH 15 mL と 10 mM 尿素 15 mL を添加し、160°C で 24 時間インキュベートした^[12]。反応溶液を放冷した後、20000 g で 30 分間遠心することで形成した TiO₂ を回収し、減圧乾燥を行った。340 mL の MilliQ に 5 mM HAuCl₄ 40 mL と 20 mM NaBH₄ 20 mL を添加し、室温で 30 分間インキュベートした。その後、20000 g で 30 分間遠心することで形成した Au ナノ粒子を回収した。乾燥させた TiO₂ と Au を 1 : 4 の割合で混練した後、700°C で 4 時間焼成することで Au-TiO₂ generated by conventional method を作製した。

5-2-13-4. 可視光照射下 (> 450 nm) における光触媒活性評価

本研究で作製した Au-TiO₂ nanocomposite の可視光照射下 (> 450 nm) における光触媒活性を MB の分解反応を用いて評価した^[13]。コントロールサンプルとして上記の 3 種類の TiO₂ と Au-TiO₂ に加えて、TiPP-PNA を用いて TiO₂ のミネラルゼーションを行った後、700°C で焼成した TiO₂ mineralized by peptide と AuPP を用いて Au のミネラルゼーションを行うことで作製した Au mineralized by peptide、TiO₂ mineralized by peptide と Au mineralized by peptide を 1:4 の割合で混合した Au and TiO₂ mineralized by peptide without DNA を用いた。TiO₂ の終濃度が 0.1 mg/mL になるように各サンプルを 20 μM の MB 150 μL に分散させた。可視光照射装置は浜松ホトニクス (株) の高出力 UV-VIS ファイバー光源ユニット (L10290) を用い、450 nm から 950 nm の可視光のみを透過するフィルター (TS 高性能ショートパスフィルター; エドモンドオプティクスジャパン (株)) を通し、照射距離 3 cm で可視光を 90 分間照射した。紫外可視分光光度計 (UV-1800、Shimadzu) を用いて、MB の 665 nm における吸収を測定し、90 分後の MB の分解量を算出した。UV-VIS 測定には光路長 10 mm の 8 連マイクロマルチセルを使用した。

5-2-14. 細胞の準備

凍結保存していた HeLa 細胞を 37°C で融解し、細胞を懸濁させた後、1.5 mL チューブに細胞懸濁液を分取し、1500 rpm で 5 分間遠心することで細胞を沈降させた。培地を除去し、37°C に加温した培地 (D-MEM、10% FBS、1% ペニシリンストレプトマイシン) を 1 mL 添加し、細胞を懸濁した。4 mL の培地を添加したディッシュに細胞懸濁液を添加し、ディッシュに均一になるように細胞を撒き、5% CO₂ 雰囲気下の 37°C インキュベーターで 1 日培養した。

5-2-15. 継代培養

培地、1 × PBS、0.25% トリプシンを 37°C に加温し、前日に細胞を培養したディッシュ (または継代培養をしていたディッシュ) から培地を除去した。1 × PBS 1 mL で 3 回洗浄した後、400 μL の 0.25% トリプシンを添加し、5% CO₂ 雰囲気下の 37°C インキュベーターで 3 分間インキュベートすることで細胞をディッシュから剥離させた。その後、600 μL の培地をディッシュに添加し、1.5 mL チューブに細胞懸濁液を分取した。1500 rpm で 5 分間遠心することで細胞を沈降させ、トリプシンが含有している培地を除去した後、新たに培地を 1 mL 添加し、細胞を懸濁した。細胞懸濁液を 20 μL を分取し、血球計算盤を用いて細胞懸濁液中の細胞数を算出した。算出した細胞数を基に所定量の細胞をディッシュに撒き、5% CO₂ 雰囲気下の 37°C インキュベーターで培

養した。

5-2-16. 作製した Au-TiO₂ nanocomposite の細胞毒性試験

5-2-15 で培養していた細胞を 24 穴マイクロプレート (Nest Biotech Co., Ltd.) に 5.0×10^4 cells 撒き、5% CO₂ 雰囲気下の 37°C インキュベーターで一日培養した。翌日、培地を除去して 1 × PBS 1 mL で 3 回洗浄した後、450 μL の培地と 1.0 mg/mL の Au-TiO₂ サンプルを 50 μL 添加して、5% CO₂ 雰囲気下の 37°C インキュベーターで 24 時間インキュベートした。24 時間経過後、培地を除去して 1 × PBS 1 mL で 3 回洗浄した後、0.25% トリプシン 200 μL を添加し、5% CO₂ 雰囲気下の 37°C インキュベーターで 3 分間インキュベートすることで細胞をディッシュから剥離させた。その後、300 μL の培地をディッシュに添加し、1.5 mL チューブに細胞を分取した。1500 rpm で 5 分間遠心することで細胞を沈降させ、トリプシンが含有している培地を除去した後、1 × HEPES を 125 μL 添加し細胞を懸濁した。96 穴マイクロプレート (Nest Biotech Co., Ltd.) の 2 ウェルに細胞懸濁液 50 μL を分取した。Cell Counting Kit-8 (CCK-8) と 1 × HEPES を 1 : 4 の割合で混合した溶液 50 μL を 96 穴マイクロプレートの各 well に添加し、5% CO₂ 雰囲気下の 37°C インキュベーターで 1 時間インキュベートし、CCK-8 を還元させた。UV 測定器 (MTP-310 Microplate Reader COLONA ELECTRIC) を用いて波長 450 nm で各サンプルにおける吸光度 (ホルマザン由来の吸収) を測定し、得られた吸光度の値から以下の式を用いて細胞生存率を算出した。

$$\text{Cell viability} = \frac{\text{Abs. of the sample using Au-TiO}_2 \text{ nanocomposite}}{\text{Abs. of the sample without Au-TiO}_2 \text{ nanocomposite}}$$

5-2-17. Au-TiO₂ nanocomposite を用いた可視光照射による細胞死誘導

6-2-15 で培養していた細胞を 24 穴マイクロプレートに 5.0×10^4 cells 撒き、5% CO₂ 雰囲気下の 37°C インキュベーターで一日培養した。翌日、培地を除去して 1 × PBS 1 mL で 3 回洗浄した後、滅菌水 400 μL、10 × PBS 50 μL と 1.0 mg/mL の Au-TiO₂ サンプルを 50 μL 添加した。6-2-11-4 の光触媒活性評価で使用した 450 ~ 950 nm の可視光のみを透過するフィルターを付属した可視光照射装置を用いて、照射距離 3 cm で可視光を 20 分間照射した。20 分経過後、培地を除去して 1 × PBS 1 mL で 3 回洗浄した後、6-2-14 と同様の操作方法で CCK-8 アッセイを行い、UV 測定器を用いて波長 450 nm で各サンプルにおける吸光度を測定し、得られた吸光度の値から細胞生存率を算出した。

5-3. 各種測定サンプルの作製方法

5-3-1. AFM による形状観察

Au 沈殿サンプル（全量 20 μL ）もしくは TiO_2 沈殿サンプル（全量 20 μL ）を AFM 用マイカ（1 cm \times 1 cm）に滴下し、5 分間静置させた。その後、濾紙を用いて溶液を吸引した。吸引後、MilliQ を 20 μL 滴下し、濾紙で吸引する工程を洗浄とし、3 回洗浄を行った。洗浄後、窒素乾燥を行いある程度乾燥させた後、1 日減圧乾燥を行った。AFM は Multi Mode Scanning Probe を使用し、カンチレバーは（バネ定数：40 N/m, 共振周波数：300 kHz, BRUKER）を用い、タッピングモードにより観察した。

5-3-2. TEM、TEM-EDX による形状観察および元素分析

0.1 mg/mL の Au- TiO_2 nanocomposite 分散溶液、Au 沈殿サンプル、 TiO_2 沈殿サンプルの全ての条件において 20 μL を TEM 用グリッドに滴下し、1 分間静置させた。その後、濾紙を用いて溶液を吸引した。吸引後、MilliQ を 20 μL 滴下し、濾紙で吸引する工程を洗浄とし、3 回洗浄を行った。洗浄後、窒素乾燥を行いある程度乾燥させた後、1 日真空乾燥を行った。染色サンプルは、MilliQ による洗浄操作後、2% のリンタングテン酸を 20 μL 滴下し、1 分間静置させた。その後、濾紙を用いて溶液を吸引、洗浄する操作を 3 回行い、1 日減圧乾燥した。Au 沈殿サンプルと TiO_2 沈殿サンプルは龍谷大学の JEM-2100 (JEOL) を用いて、加速電圧 200 kV で TEM 観察を行った。Au- TiO_2 nanocomposite は甲南大学の JEM-1400 (JEOL) を用いて、加速電圧 115 kV で TEM 観察を行った。TEM-EDX は龍谷大学の JEM-3000F (JEOL) を用いて、加速電圧 200 kV で測定を行った。

5-3-3. UV-VIS 測定による光吸収特性解析

UV-VIS 測定には、Shimadzu UV-1700 分光光度計に温度制御装置 PC-TEC controller を接続したものをを用い、8 連石英セルで測定した。サンプルは 130 μL で測定した。Au ナノ粒子の測定においては 400~800 nm の波長範囲で、 TiO_2 の測定においては 300~500 nm の波長範囲で測定を行った。

5-3-4. DLS による粒子径測定

サンプル調製後（全量 20 μL ）、MilliQ で 40 μL に希釈し、DLS 用ポリスチレンセル (Malvern Disposable Resistant Micro Cuvette : ZEN0040) に入れ、Zetasizer ZEN3600 (Sysmex) により粒子径分布を測定した。測定は、平衡化時間 120 秒、温度は 25 $^{\circ}\text{C}$ で行い、20 回測定したデータ平均を 1 回分の測定とし、3 回分の測定データをまとめた。

5-3-5. ラマン分光測定による結晶構造解析

焼成後の TiO₂ 粉末サンプルをスライドガラスの上に少量のせ、励起波長 532 nm、積算回数 9 回、露光時間 10 秒で龍谷大学の蛍光回避型レーザーラマン装置 (RMP-510S) を用いて測定を行った。

5-3-6. UV-VIS-IR 拡散反射スペクトル測定による光吸収特性解析

焼成後の Au-TiO₂ nanocomposite と TiO₂ の粉末サンプルを硫酸バリウム (BaSO₄) 担体上に押し付け、兵庫県立工業技術センターの紫外可視赤外分光光度計 (ISR-240A、shimadzu) を用いて 300 nm から 1500 nm における反射率を測定した。測定により得られた各波長における反射率の値を Kubelka-Munk の式 (Equation 1) に代入し、各波長における吸収係数 (F(R)) を算出した。各波長において算出した F(R) の値をプロットし、吸収スペクトルを作成した。

$$F(R) = \frac{(1-R)^2}{2R}$$

Equation 1. Kubelka-Munk equation

5-4. 結果および考察

5-4-1. Au 沈殿ペプチドの合成と精製

AuPP-acridine のアクリジンの導入方法として、まず Fmoc 固相合成法により Fmoc-Lys(Mtt)-OH を Tenta Gel S RAM resin に導入した。次に、Lys 側鎖にアクリジンを導入するために TFA / TIS / DCM = 1 % / 5 % / 94 % を用いて、Mtt 基を除去した。しかしながら、室温で Mtt 基の脱保護を行ったところ、樹脂から Lys が脱離して収率が非常に低くなった。そこで、樹脂からの脱離を防ぐために 4°C で Mtt 基の脱保護を行った。アクリジン以降のアミノ酸のカップリングと脱保護・脱樹脂は 5-2-4 の通りに行った。HPLC により精製した後、凍結乾燥することでペプチド粉末を得た。1 mM になるようにペプチド粉末を MilliQ で溶解させ、アミノ酸分析を行い濃度決定した。HPLC で純度の確認を行ったところ、高純度で合成できていることが示された (Fig. 5a)。また、Au のミネラルゼーションのコントロールサンプルとして使用する acridine がない Au 沈殿ペプチド AuPP も高純度で合成できていることが示された (Fig. 5-5b)。また、MALDI-TOF MS により AuPP は 1222.1 (obs.) ($[M+H]^+=1222.4$ (calc.))、AuPP-acridine は 1555.0 (obs.) ($[M+H]^+=1555.7$ (calc.)) であることが示され、目的のペプチドを合成できていることが明らかとなった。

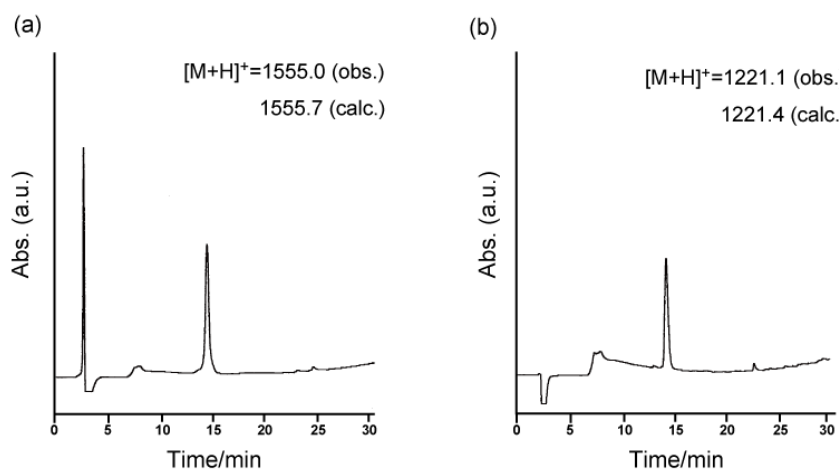


Fig. 5-5 HPLC charts for purified (a) AuPP-acridine and (b) AuPP separated on an ODS column (150×4.6 mm, 5 μm) with MilliQ water (containing 0.1% TFA) using a gradient from 0% to 100% acetonitrile (containing 0.08% TFA) over 30 min, 1.0 mL/min; detection time at 220 nm.

5-4-2. TiO₂ と Au の位置特異的沈殿制御による Au-TiO₂ nanocomposite の作製と元素含有比の制御

DNA 鎖長と PNA 結合部位の異なる 6 種類の DNA を用いて Au-TiO₂ nanocomposite の作製および Au-TiO₂ nanocomposite 中の Au と TiO₂ の元素含有比の制御を試みた。鎖長が短い 100 bp 未満の DNA である TempDNA_30_bs4 と TempDNA_30_bs1、TempDNA_80_bs1 では Au-TiO₂ nanocomposite を作製することができた。しかしながら、DNA の鎖長が 100 bp 以上ある TempDNA_150_bs1 と TempDNA_300_bs1、TempDNA_600_bs1 を用いた条件では TiO₂ と Au のミネラルゼーションの際に凝集が生じ、Au-TiO₂ nanocomposite を作製することができなかった (Table 5-1)。作製することができた Au-TiO₂ nanocomposite 中の Ti に対する Au の元素含有比 (Au/Ti) を ICP-AES により解析したところ、TempDNA_30_bs4 が 2.1、TempDNA_30_bs1 が 2.7、TempDNA_80_bs1 が 4.0 であることが示された (Table 5-1)。TempDNA_30_bs4 は TempDNA_bs1 よりも TiPP-PNA の結合部位の数が多いため、形成する TiO₂ のサイズは増大するが、DNA 鎖長は同様であり、形成する Au ナノ粒子のサイズは変化しないため、TempDNA_30_bs4 の方が Au/Ti が減少したのだと考えられる。一方、TempDNA_80_bs1 は TempDNA_30_bs4 や TempDNA_bs1 よりも DNA 鎖長が長い (AuPP-acridine の結合部位が増加する) ため、形成する Au ナノ粒子数が増加することで焼成後の Au ナノ粒子のサイズが増大し、Au/Ti が増大したのだと考えられる。ICP-AES で得られた結果と Au-TiO₂ nanocomposite のサイズに相関があるのかを TEM 観察により確認したところ、TempDNA_30_bs4 で確認された Au-TiO₂ nanocomposite の TiO₂ ナノ粒子の粒子径は約 50 nm であり、TempDNA_30_bs1 の Au-TiO₂ nanocomposite の TiO₂ ナノ粒子 (約 20 nm) よりもサイズが増大していることが確認された (Fig. 5-6a, b)。また、TempDNA_80_bs1 で確認された Au-TiO₂ nanocomposite の Au ナノ粒子は約 90 nm であり、TempDNA_30_bs4 と TempDNA_30_bs1 の Au-TiO₂ nanocomposite の Au ナノ粒子 (約 50 nm) よりもサイズが増大していることが確認された (Fig. 5-6c)。これらの結果から、AuPP-Acridine の結合部位である二本鎖部分の鎖長と TiPP-PNA 結合部位の数を増大させることで、形成する TiO₂ と Au のサイズを増加させることができ、Au-TiO₂ nanocomposite の元素組成を制御可能で

Table 5-1 Properties of manufactured Au-TiO₂ nanocomposites by site-specific mineralization using various TempDNAs.

	TempDNA_30_bs4	TempDNA_30_bs1	TempDNA_80_bs1	TempDNA_150_bs1	TempDNA_300_bs1	TempDNA_600_bs1
Structure size *1	133.5 nm	111.8 nm	147.0 nm	n.d. *3	n.d. *3	n.d. *3
Au/Ti *2 (Content ratio)	2.1	2.7	4.0	n.d. *3	n.d. *3	n.d. *3
TiPP-PNA binding sites	4	1	1	1	1	1
AuPP-acridine intercalating sites	10	10	20	50	100	200

*1 Structure sizes were measured by DLS.

*2 The content ratio were measured by ICP-AES.

*3 Gold with bulk size was formed, and it was impossible to fabricate the gold-titania nanocomposite.

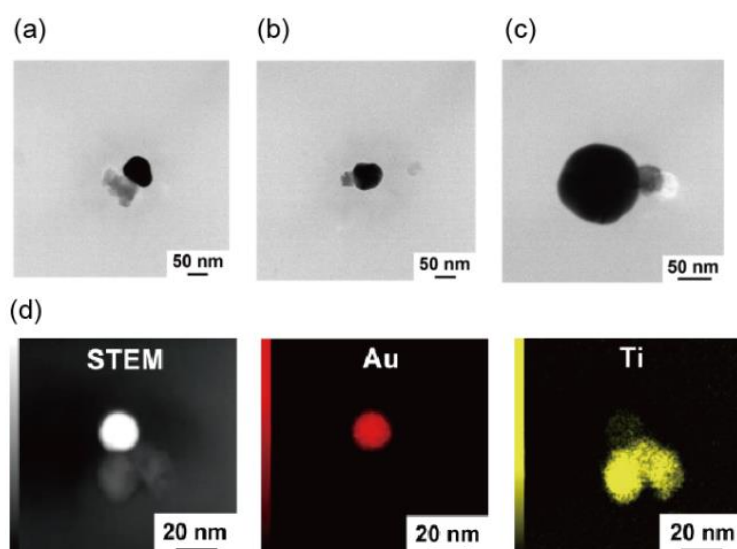


Fig. 5-6 TEM images of Au-TiO₂ nanocomposites with (a) TempDNA_30_bs4, (b) TempDNA_30_bs1 and (c) TempDNA_80_bs1. (d) TEM-EDX mapping images of Au-TiO₂ nanocomposite with TempDNA_30_bs4.

あることが示された。さらに、位置特異的に Au と TiO₂ が形成しているのかを確認するために TEM-EDX による元素マッピングを行った。TempDNA_30_bs4 を用いて作製した Au-TiO₂ nanocomposite を分析したところ、Au 原子と Ti 原子のシグナルが完全に分離して検出されたことから、DNA 上の任意の位置に TiO₂ と Au が位置特異的に形成していることが明らかとなった (Fig. 5-6d)。また、Au-TiO₂ nanocomposite が焼成後も分解せずに形態を維持している理由として、TiPP-PNA と AuPP-acridine が DNA に結合したペプチド-DNA 複合体を鋳型にして、Au と TiO₂ のミネラルリゼーションを行っているので形成した Au-TiO₂ nanocomposite は構造が安定化しているのだと考えられる。また、Au-TiO₂ nanocomposite の内部にペプチド-DNA 複合体が存在しているので、焼成によりペプチド-DNA 複合体の熱分解が遅れ、Au-TiO₂ nanocomposite の構造崩壊が生じていないのだと考えられる。

5-4-3. 作製した Au-TiO₂ nanocomposite の光触媒活性評価

作製した 3 種類の Au-TiO₂ nanocomposite の可視光照射下 (> 450 nm) における光触媒活性をメチレンブルー (MB) の分解反応^[13]を用いて評価した。比較サンプルとして以下の 3 種類のコントロールサンプル (P25 TiO₂、Commercial Au-TiO₂、Au-TiO₂ generated by conventional method) とネガティブコントロールとして TiO₂ mineralized by peptide と Au mineralized by peptide、Au and TiO₂ mineralized by peptide without DNA の光触媒活性を測定した。MB は可視光を吸収し、徐々に分解する。そこで、まず MB のみに可視光を 90 分間照射し、分解量を測定したところ、90 分間の可視光照射下では分解はほとんど生じないことが確認された (Fig. 5-7)。ま

た、紫外領域に高い光触媒活性を有している P25 TiO₂ においても MB の分解率は 10 % 未満であり、可視光照射下では分解が生じないことが示された。本研究で作製した Au-TiO₂ nanocomposite において、MB の分解率は 30 % から 50 % と高い分解率を示した (Fig. 5-7)。また、Au-TiO₂ nanocomposite 中の Au の含有量が増加するにつれて、MB の分解率も向上することが示された (Fig. 5-7)。これは、Au-TiO₂ nanocomposite の Au の含有量が増加するにつれて、電子とホールの電荷分離が促進されたことにより光触媒活性が向上したのだと考えられる。これらの結果から、Au-TiO₂ nanocomposite 中の Au の含有量を変化させることで光触媒活性も変化させることが可能であることが示された。一方、コントロールサンプルである Commercial Au-TiO₂ と Au-TiO₂ generated by conventional method では MB の分解率は約 15 % であり、本研究で作製した Au-TiO₂ nanocomposite よりも分解率は低かった (Fig. 5-7)。一般的に TiO₂ は可視光領域に吸収がないため光触媒活性を示さないはずである。しかしながら、TiO₂ mineralized by peptide は Commercial Au-TiO₂ と Au-TiO₂ generated by conventional method に匹敵する MB の分解率を示した。TiO₂ mineralized by peptide が可視光照射下で光触媒活性を示した理由として、TiPP-PNA を用いてミネラルゼーションにより作製した TiO₂ mineralized by peptide は焼成時にペプチド由来の N 原子がカチオンドーピングされたことによりバンドギャップが狭くなり、可視光照射下においても光触媒活性が生じたのではないかと考えられる^[14]。さらに、TiO₂ と Au が物理吸着でなく、複合していることにより可視光励起性を示しているのかを確認するために、Au and TiO₂ mineralized by peptide without DNA の光触媒活性を測定した。その結果、TiO₂ mineralized by peptide と同程度の分解率であったことから、Au と TiO₂ が複合化していないと光触媒活性を示さないことが示された。以上の結果から、作製した Au-TiO₂ nanocomposite は可視光励起性を有しており、TiO₂ と Au が位置特異的に沈殿していることが明らかとなった。

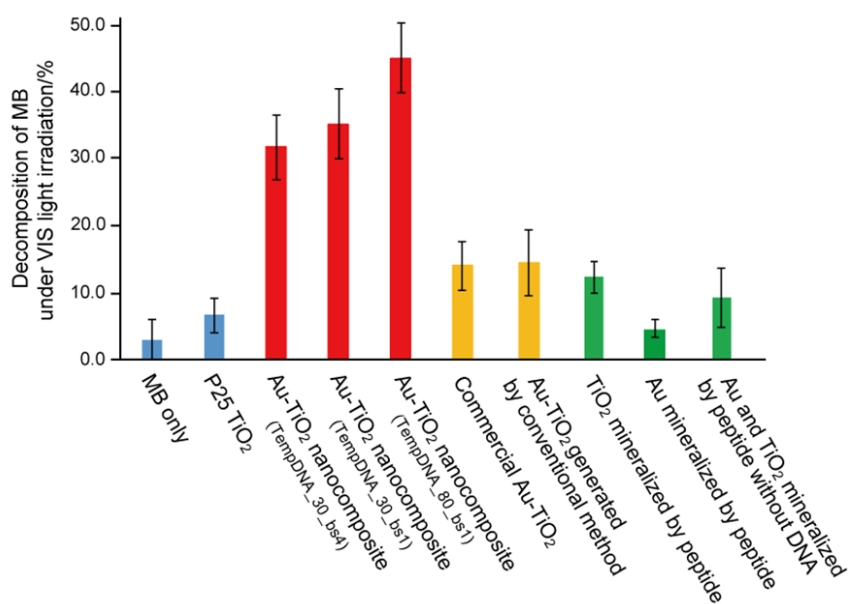


Fig. 5-7 Decomposition of MB under visible light (> 450 nm) irradiation using various Au-TiO₂ samples.

5-4-4. 作製した Au-TiO₂ nanocomposite の細胞毒性試験

近年、汚れなどの有機物の分解やウイルスや細菌などの殺菌を目的として、ビルの壁面やガラスの表面など我々の身近な製品に光触媒がコーティングされている。実用化するには人体に無毒な光触媒の開発が必須となっている。そこで、本研究で最も高い光触媒活性を示した TempDNA_80_bs1 を用いて作製した Au-TiO₂ nanocomposite の細胞毒性（急性毒性）の有無を CCK-8 アッセイにより確認した。また、比較サンプルとして光触媒活性評価でも使用した Commercial Au-TiO₂ と Au-TiO₂ generated by conventional method の細胞毒性も評価した。0.1 mg/mL になるように各 Au-TiO₂ サンプルを細胞に添加し、24 時間後の細胞生存率を CCK-8 アッセイにより算出した結果、Au-TiO₂ nanocomposite は 99.1%、Commercial Au-TiO₂ は 97.3%、Au-TiO₂ generated by conventional method は 98.2% であり、すべての Au-TiO₂ において急性毒性はないことが示された。

5-4-5. 作製した Au-TiO₂ nanocomposite を用いた可視光照射による細胞死誘導

近年、TiO₂ は酸化ストレスを誘起して細胞死を誘導することが報告されている。そこで、モデル細胞種として HeLa 細胞を用いて、それぞれの Au-TiO₂ サンプルにおいて可視光照射により細胞死を誘導することが可能かを検討することにした。培養培地存在下では光触媒から生じた活性酸素種が細胞に作用する前に培地中に存在する糖、アミノ酸、タンパク質などの有機物に補足されることが懸念されるため、無機塩をベースとした緩衝液である PBS を用いて細胞死誘導実験を行うことにした。0.1 mg/mL になるように各 Au-TiO₂ サンプルを細胞に添加し、450 ~ 950 nm の可視光を 20 分間照射したところ、細胞生存率は Au-TiO₂ nanocomposite が $32.7 \pm 5.3\%$ 、Commercial Au-TiO₂ は $52.9 \pm 4.6\%$ 、Au-TiO₂ generated by conventional method は $54.9 \pm 3.9\%$ であることが示された (Fig. 5-8)。これらの結果から、Au-TiO₂ nanocomposite

が最も細胞生存率が低いことから、可視光照射により発現する光触媒作用が高く、最も高い細胞死誘導を示したのだと考えられる。この結果は 5-3-4 の光触媒活性の結果 (Fig. 5-7) からも支持されている。以上の結果から、還元剤などの環境負荷物質を使用せずにペプチドを用いたミネラル化により、生体適合性のある可視光励起性の高光触媒活性を有する Au-TiO₂ nanocomposite を作製することができた。

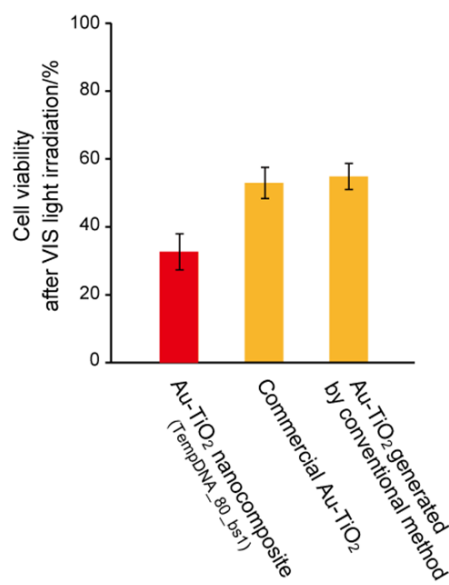


Fig. 5-8 Cell death induction effect under visible light (> 450 nm) irradiation of various Au-TiO₂ samples.

5-4-6. DNA 上への Au の位置特異的沈殿制御の確認

続いて、Au が DNA 上に位置特異的に形成していることを確認した (Fig. 5-9a)。TempDNA_80_bs1 と AuPP-acridine 添加条件で、Au のミネラルゼーションを行ったサンプルを TEM により観察したところ、 6.5 ± 2.0 nm の Au ナノ粒子が紐状に並んだ構造体の形成が確認された (Fig. 5-9b, c)。Au ナノ粒子が紐状に並んだ部分の長さを計測したところ、 36.0 ± 9.9 nm であることが分かり、TempDNA_80_bs1 の鎖長とほぼ一致していることが示された (Fig. 5-9d)。そのため、観察された紐状構造体を TEM-EDX により元素分析したところ、Au 原子由来のシグナルに加えて、ペプチド由来の N 原子のシグナルと DNA 由来の P 原子のシグナルが検出された (Fig. 5-9e)。

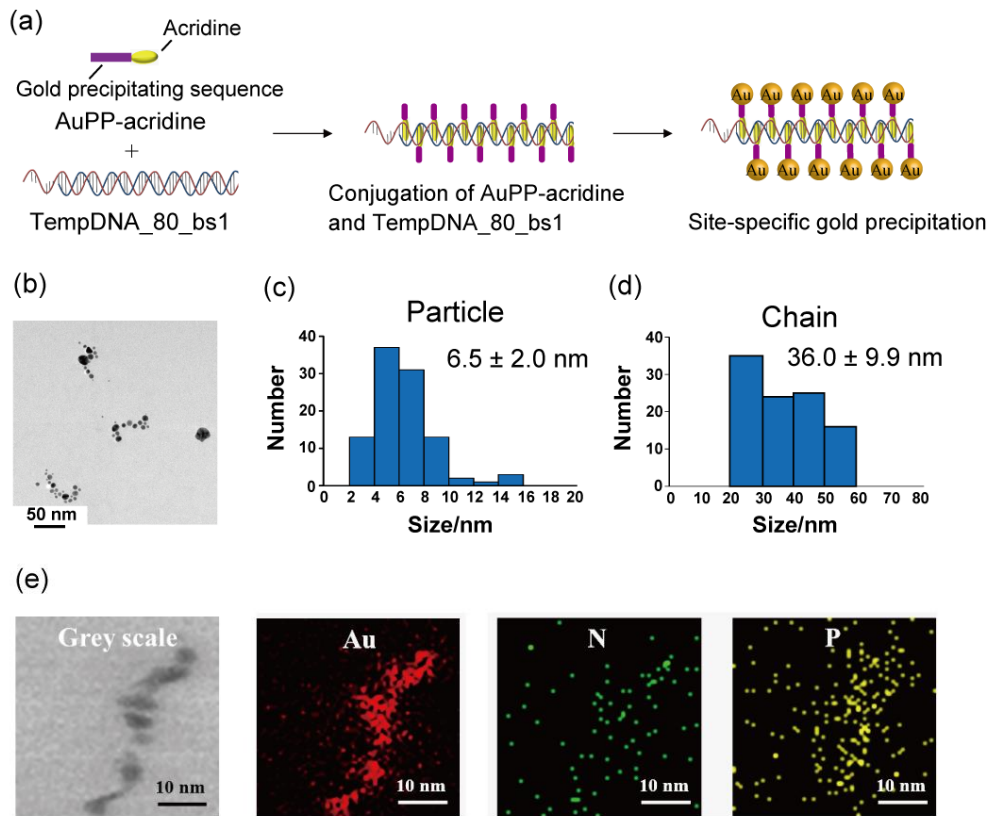


Fig. 5-9 (a) Schematic illustration of site-specific Au mineralization using AuPP-acridine and TempDNA_80_bs1. (b) TEM image of the sample after Au mineralization using AuPP-acridine and TempDNA_80_bs1. (c) Particle size distribution determined from the TEM data. (d) Chain size distribution determined from the TEM data. (e) TEM-EDX mapping images of the sample after Au mineralization using AuPP-acridine and TempDNA_80_bs1.

このことから、DNA に AuPP-acridine がインターカレートし、DNA 上に結合した AuPP-acridine に Au ナノ粒子が形成していることが示唆された。そこで、TempDNA_80_bs1 と AuPP 添加条件、AuPP-acridine のみ添加した条件で Au のミネラルゼーションを行い、TEM 観察したところ、Au ナノ粒子が紐状に並んだ構造体の形成は確認されず、分散した球状粒子しか確認されなかった (Fig. 5-10a, b)。以上の結果から、AuPP-acridine を用いて DNA 上に Au を位置特異的に沈殿させることが可能であることが明らかとなった。

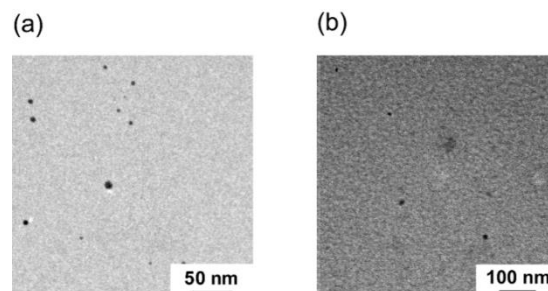


Fig. 5-10 TEM images of the samples after Au mineralization using (a) TempDNA_80_bs1 and AuPP (without acridine moiety), and (b) AuPP-acridine alone.

5-4-7. DNA 末端部位への TiO₂ の位置特異的沈殿制御の確認

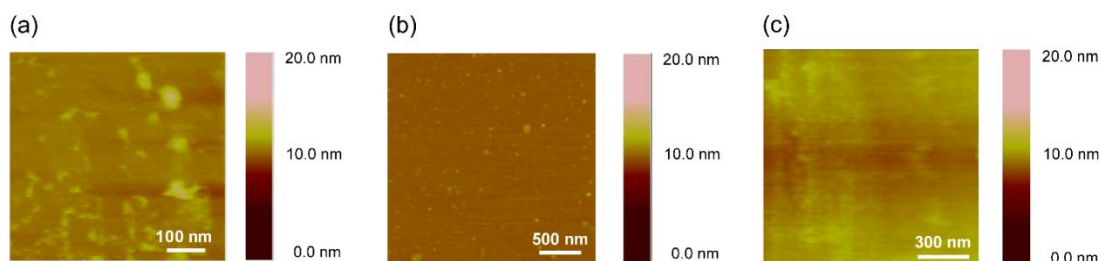


Fig. 5-11 AFM images of the sample after TiO₂ mineralization using (a) TempDNA_80_bs1 with TiPP-PNA, (b) TempDNA_80_bs1 with TiPP, and (c) TempDNA_80_bs1 alone.

TiO₂ が DNA の片方の端に位置特異的に沈殿していることを確認するために、TempDNA_80_bs1 のみ添加した条件、TempDNA_80_bs1 と PNA 配列がない TiPP を添加した条件、TiPP-PNA と TempDNA_80_bs1 の添加条件で TiO₂ のミネラルゼーションを行った。AFM 観察から TiPP-PNA と TempDNA_80_bs1 の混合条件においては、紐状の構造物の片方の端に球状沈殿物がつながった構造物の形成が確認された (Fig. 5-11a) しかしながら、TempDNA_80_bs1 のみ、TempDNA_80_bs1 と TiPP 添加条件では TiPP-PNA 未添加であるため、TiO₂ の沈殿は確認されなかった (Fig. 5-11b, c)。そこで、TiPP-PNA と TempDNA_80_bs1 添加条件のサンプルを TEM により観察したところ、リンタングステン酸によるネガティブ染色を行っていないサンプルにおいては約 40 nm ほどの球状粒子のみが確認され (Fig. 5-12a)、ネガティブ染色を行ったサンプルにおいては、紐状構造物の片方の端に約 40 nm 程の球状粒子が確認された (Fig. 5-12b)。これらの結果から、球状粒子は TiO₂、紐状構造物は DNA であると考えられ、DNA の端に配置した TiPP-PNA の PNA 配列と相補的な配列に TiPP-PNA が結合し、TiO₂ のミネラルゼーションにより TiPP-PNA 上に TiO₂ が形成したのだと示唆される。さらに、TiPP-PNA

添加条件で TiO_2 のミネラルゼーションを行った後、UV-VIS 測定を行った。その結果、波長 385 nm 未満の領域にアナターゼの TiO_2 に起因する吸収帯が確認された (Fig. 5-12c)。このことから DNA の片方の端に見られた球状構造物は TiO_2 であると考えられる。以上の結果から、ミネラルゼーションにより DNA 上に TiO_2 が位置特異的に沈殿できていることが明らかとなった。

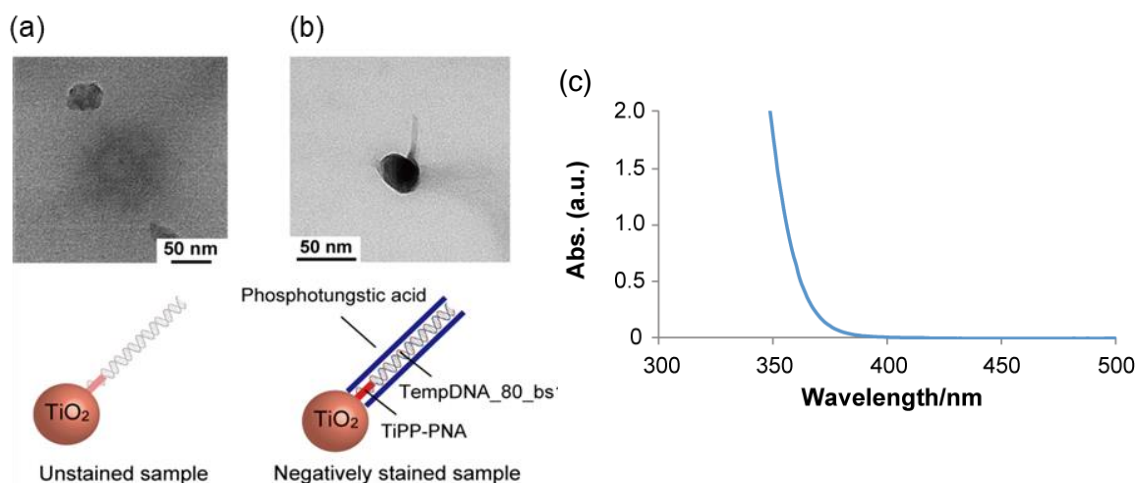


Fig. 5-12 TEM images of the sample after TiO_2 mineralization using TiPP-PNA and TempDNA_80_bs1. The TEM sample for (a) was not stained. The TEM sample for (b) was negatively stained with 2% phosphotungstic acid. (c) UV-VIS spectra of the sample after TiO_2 mineralization using TiPP-PNA.

5-4-8. ミネラルゼーションにより作製した TiO_2 の結晶構造解析

続いて、 TiO_2 の結晶構造と光触媒活性は密接に関連しているので、ラマン分光測定と制限視野電子線回折 (SAED) 測定により本研究で作製した TiO_2 の結晶構造を同定した。 TiO_2 のラマンスペクトルの特徴として、アナターゼでは 144 cm^{-1} 、 399 cm^{-1} 、 513 cm^{-1} 、 638 cm^{-1} に顕著なピーク、 202 cm^{-1} に非常に小さいピークが確認され、ルチルでは 499 cm^{-1} 、 612 cm^{-1} に顕著なピーク、 240 cm^{-1} になだらかなピークが確認されることが知られている。以上の特徴を基にスペクトルの帰属を行ったところ、TiPP-PNA を用いて TiO_2 のミネラルゼーションを行い、 400°C で焼成した TiO_2 においてはアモルファス特有のスペクトルを示したが、 700°C で焼成した TiO_2 mineralized by peptide

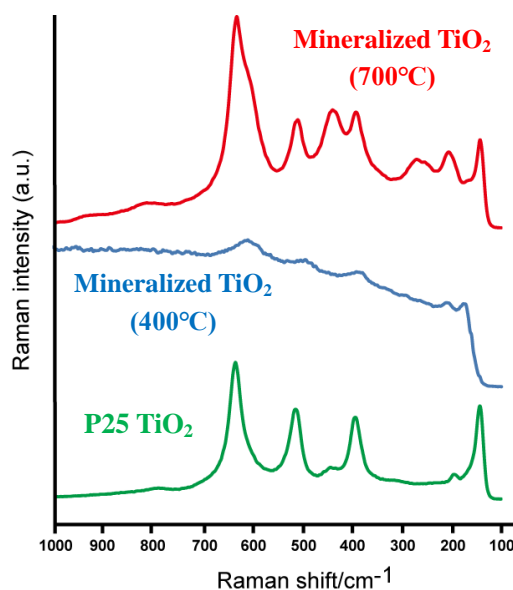


Fig. 5-13 Raman spectra of various TiO_2 samples.

においてはアナターゼとルチル由来の両方のピークが確認された (Fig. 5-13)。さらに、紫外領域に非常に高い光触媒活性を有している P25 TiO₂ においても測定したところ、アナターゼとルチル由来のピークが確認された (Fig. 5-13)。ゆえに本研究で作製した TiO₂ mineralized by peptide は P25 TiO₂ と同様のアナターゼとルチルからなる複合結晶であることが示された。さらに、700°Cで焼成した TiO₂ mineralized by peptide を SAED 測定による結晶構造解析を行ったところ、アナターゼ由来の (101) と (200)、ルチル由来の (101) の回折パターンが確認されたことからラマン分光測定により得られた結果と相関を得ていることが示された (Fig. 5-14)。近年、TiO₂ 光触媒の研究において、アナターゼの TiO₂ とルチルの TiO₂ よりもアナターゼとルチルからなる複合結晶構造が高い光触媒活性を発現することが報告されている^[14]。そのため、本研究で作製した Au-TiO₂ nanocomposite は高い光触媒活性を示したのだと考えられる。

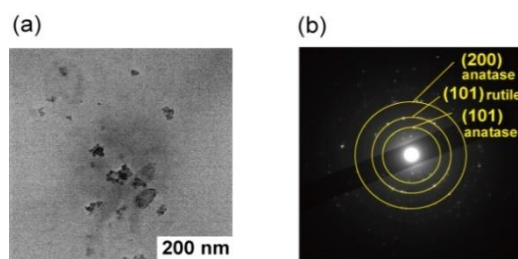


Fig. 5-14 (a) TEM image of mineralized TiO₂ after calcination at 700°C. (b) SAED pattern of mineralized TiO₂ after calcination at 700°C.

5-4-9. 作製した Au-TiO₂ nanocomposite の詳細解析

DNA 未添加条件で TiPP-PNA と AuPP-acridine 用いて TiO₂ と Au のミネラリゼーションを行い、TEM 観察を行ったところ、TiO₂ と Au が複合した構造体の形成は確認されず、分散した TiO₂ ナノ粒子と Au ナノ粒子しか確認されなかった (Fig. 5-15a)。この結果から、DNA の片方の末端に配置した TiPP-PNA の PNA 配列と相補的な配列に TiPP-PNA が結合し、AuPP-acridine が二本鎖部位にインターカレートし、TiO₂ と Au のミネラリゼーションにより位置特異的に TiO₂ と Au が形成することで Au-TiO₂ nanocomposite が形成していることが明らかとなった。

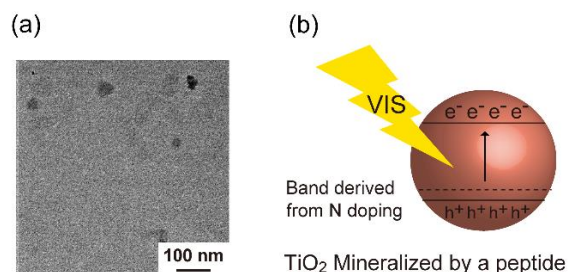


Fig. 5-15 (a) TEM image of the sample calcined at 700°C after TiO₂ and Au precipitation using TiPP-PNA and AuPP-acridine without TempDNA. (b) Schematic illustration of an energy diagram of TiO₂ mineralized by a peptide.

最後に UV-VIS-IR DRS 測定により作製した Au-TiO₂ nanocomposite の反射率を測定し、測定により得られた各波長における反射率の値を Kubelka-Munk の式に代入し、各波長における吸収係数 (F(R)) を算出した。各波長において算出した F(R)の値をプロットし、吸収スペクトルを作成した。コントロールサンプルとして、

P25 TiO₂ と TiO₂ mineralized by peptide においても吸収スペクトルを作成した。P25 TiO₂ においては 400 nm 未満の紫外領域にのみ吸収が確認されたが、400 nm 以上の可視光領域には吸収を有していないことが示された (Fig. 5-16)。一方、可視光照射下で光触媒活性を示した TiO₂ mineralized by peptide は可視光領域にわずかに吸収を有していることが確認された。これは、焼成によりペプチド由来の N 原子が TiO₂ にドーピングされたこと

によりバンドギャップが狭くなり、可視光吸収特性が得られたのではないかと考えられる (Fig. 5-15b) [14]。また、Au-TiO₂ nanocomposite においては紫外領域ならびに可視光領域の広い範囲で吸収を有していることが確認された (Fig. 5-16)。以上の結果から、本研究で作製した Au-TiO₂ nanocomposite は可視光励起性を有していることが示された。

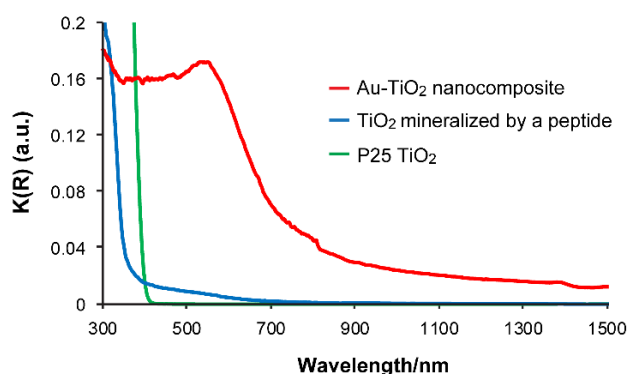


Fig. 5-16 UV-VIS-IR DRS absorption spectra of various Au-TiO₂ samples.

5-5. 結論

本研究では、Au と TiO₂ のミネラルゼーションを題材に、二種の無機物沈殿ペプチドを用いることで DNA 上の任意の位置に Au と TiO₂ の二種の無機物を精密に沈殿制御することに成功した。さらに、DNA に結合させるペプチドの数を変化させることで Au-TiO₂ nanocomposite の元素組成を自在に制御することができ、Au/Ti の含有比によって光触媒活性を制御することが可能であることが示された。さらに、HeLa 細胞を用いた細胞毒性試験と可視光照射による細胞死誘導実験から生体適合性のある可視光励起性の Au-TiO₂ nanocomposite が作製できていることが示された。以上より、DNA と二種の無機物沈殿ペプチドを用いることで DNA 上の任意の位置に二種の無機物を位置特異的に沈殿させることができ、従来法では達成することの出来なかったミネラルゼーションによる二種の無機物からなる機能性無機物複合ナノ構造体の作製に成功した。第 6 章では Au のミネラルゼーションを題材に、Au イオン結合能を有するペプチドに CPP 配列を組み込んだ人工ペプチドを用い、*in vitro* でペプチドに Au イオンを結合させた後、細胞内に導入することにより細胞内環境を利用して無機ナノ粒子を細胞内で直接合成する手法の確立を試みた。

参考文献

- [1] K. Usui, M. Ozaki, A. Yamada, Y. Hamada, T. Tsuruoka, T. Imai, K.-y. Tomizaki, *Nanoscale*, **8**, 17081-17084 (2016).
- [2] S. L. Sewell, D. W. Wright, *Chem. Mater.*, **18**, 3108-3113 (2006).
- [3] M. Ozaki, K. Nagai, H. Nishiyama, T. Tsuruoka, S. Fujii, T. Endoh, T. Imai, K.-y. Tomizaki, K. Usui, *Chem. Commun.*, **52**, 4010-4013 (2016).
- [4] J. M. Slocik, M. O. Stone, R. R. Naik, *Small*, **1**, 1048-1052 (2005).
- [5] G. P. Moloney, D. P. Kelly, P. Mack, *Molecules*, **6**, 230-243 (2001).
- [6] R. R. Naik, S. J. Stringer, G. Agarwal, S. E. Jones, M. O. Stone, *Nat. Mater.*, **1**, 169-172 (2002).
- [7] M. Sarikaya, C. Tamerler, A. K.-Y. Jen, K. Schulten, F. Baneyx, *Nat. Mater.*, **2**, 577-585 (2003).
- [8] C.-L. Chen, P. Zhang, N. L. Losi, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 13555-13557 (2008).
- [9] S. K. Stanley, M. L. Becker, E. K. Lin, W. Wu, *Langmuir*, **25**, 10886-10892 (2009).
- [10] W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*; Oxford University Press; New York, 2000.
- [11] K. Usui, J. D. Hulleman, J. F. Paulsson, S. J. Siegel, E. T. Powers, J. W. Kelly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **106**, 18563-18568 (2009).
- [12] T. A. Kandiel, A. Feldhoff, L. Robben, R. Dillert, D. W. Bahnemann, *Chem. Mater.*, **22**, 2050-2060 (2010).
- [13] C. Randorn, S. Wongnawa, P. Boonsin, *Science Asia*, **30**, 149-156 (2004).
- [14] T. Nonoyama, T. Kinoshita, M. Higuchi, K. Nagata, M. Tanaka, K. Sato, K. Kato, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 8841-8847 (2012).

第 6 章

細胞透過性 Au イオン結合ペプチドを用いた細胞内での Au ナノ粒子の直接合成

6-1. 緒言

本研究では、Au のミネラルゼーションを題材に、Au イオン結合能を有するペプチドに CPP 配列を組み込んだ人工ペプチド (R8-AuBP) を用い、in test tube で R8-AuBP に Au イオンを結合させた後、細胞内に導入することにより細胞内の環境を利用して Au ナノ粒子を細胞内で直接合成する手法の確立を試みた (Fig. 6-1)。従来の細胞内の環境を利用した無機ナノ粒子の直接合成では高濃度の前駆体溶液 (> 1 mM) の使用や外部刺激を必要とするが、本研究ではペプチドに Au イオンを結合させた状態で細胞に導入するため、比較的 low 濃度で効率的に Au ナノ粒子を作製することが期待できる。細胞内で Au ナノ粒子が形成しているかどうかの確認には、位相差顕微鏡観察と共焦点顕微鏡観察、Au ミネラルゼーション後の反応溶液と洗浄液、細胞破砕液の UV-VIS 測定、細胞破砕して回収した Au ナノ粒子の形状を TEM により観察することで評価した。

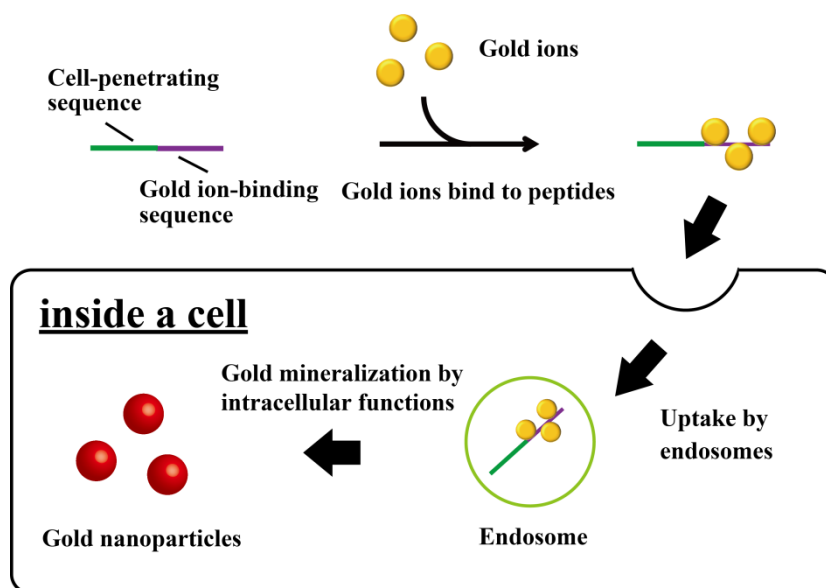


Fig. 6-1 Outline of the Au mineralization in cell using Au ion binding peptide with cell penetrating ability.

6-2. 実験材料および実験手法

6-2-1. 実験材料

ペプチド合成時に使用する Fmoc-NH-SAL-PEG resin、各種 Fmoc アミノ酸誘導体、縮合剤 (HBTU、HOBt・H₂O)、PPD、DIPEA、TFA は渡辺化学 (株)、5,6-carboxyfluorescein はフジフィルム和光純薬 (株) から購入したものを使用した。ペプチドの精製の際に使用するアセトニトリルは Sigma-Aldrich 社の高速液体クロマトグラフィー用のものを使用した。Au のミネラルゼーションの際に使用する H₂AuCl₄ は Sigma-Aldrich 社から購入したものを使用した。それ以外の試薬は和光純薬から購入したものを使用した。

6-2-2. 細胞透過性 Au イオン結合ペプチドの設計・合成

本研究で設計・合成したペプチドは以下の通りである。

R8-AuBP

N 末端

C 末端

H-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Ala-Tyr-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Met-Pro-Pro-NH₂

分子量 2470.0 (計算値)

Flu-R8-AuBP

N 末端

C 末端

Flu-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Ala-Tyr-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Met-Pro-Pro-NH₂

分子量 2828.3 (計算値)

R8

N 末端

C 末端

H-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂

分子量 1267.6 (計算値)

AuBP

N 末端

C 末端

H-Ala-Tyr-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Met-Pro-Pro-NH₂

分子量 1221.4 (計算値)

本研究で使用する細胞透過性 Au イオン結合ペプチド (R8-AuBP) は細胞透過性ペプチド配列 (R8: R-R-R-R-R-R-R) と Au イオン結合ペプチド配列 (AuBP: A-Y-S-S-G-A-P-P-M-P-P) の二つの部分から構成されている。R8 はエンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシスにより細胞を透過し、他の細胞透過性ペプチドよりも細胞導入効率が高いことに加えて、低毒性であることが知られているので使用することにした^[1]。AuBP はファージディスプレイにより取得された Au イオン結合ペプチドであり、Au 表面に対するアフィニティが高いことが知られているので使用することにした^[2]。また、R8-AuBP を用いて細胞内に Au ナノ粒子を直接合成するシステムが構築できたことを確認するために、R8-AuBP に 5,6-カルボキシフルオロセインを修飾した Flu-R8-AuBP と R8 単独配列、AuBP 単独配列も合成した。

6-2-3. 細胞透過性 Au イオン結合ペプチドの合成および精製

本研究で使用したペプチドは Fmoc 固相合成法により合成した^[3]。50 μmol スケール相当の Fmoc-NH-SAL-PEG resin を秤量し、NMP 2 mL で 5 回洗浄した後、NMP 2 mL で 1 日膨潤した。その後、NMP を除去し、NMP 2 mL で 5 回洗浄後、25% PPD/NMP 2 mL を添加し、攪拌しながら 7 分間インキュベートした。25% PPD/NMP を除去して、再度 25% PPD/NMP 2 mL を添加し、攪拌しながら 7 分間インキュベートすることで樹脂表面の Fmoc 基を切断した。25% PPD/NMP を除去し、NMP で 5 回洗浄した後、樹脂に導入可能なペプチド量に対して 10 当量の Fmoc-AA-OH と 10 当量の HBTU、10 当量の HOBt・H₂O、15 当量の DIEA を添加し 30 分間インキュベートした。カップリング反応終了後、NMP 2 mL で 5 回洗浄し、上記の操作を繰り返し目的のペプチドを合成した。共焦点顕微鏡観察の際に使用するフルオレセイン修飾ペプチドに関しては、ラクタム化を防ぐために 5,6-カルボキシフルオレセインをカップリングした後、NMP 2 mL で 5 回洗浄した後、PPD 処理を行った減圧乾燥で樹脂を乾燥した後、m-cresol (Wako) : ethandithiol (Wako) : thioanisole (Wako) : TFA = 1 : 3 : 3 : 40 で室温で攪拌しながら 1 時間インキュベートすることで脱保護・脱樹脂を行い、樹脂からペプチドを切断した。TFA をエバポレーターにより飛ばした後、冷ジエチルエーテルを添加し、粗ペプチドをエーテル沈殿により沈殿させた。3000 rpm、4°C で 5 分間遠心することで粗ペプチドを沈降させ、ジエチル

エーテルを除去した。再度、冷ジエチルエーテルを添加し、攪拌することで粗ペプチドを分散させ、3000 rpm、4°Cで5分間遠心することで粗ペプチドを沈降させるデカンテーションを4回繰り返すことでスカベンジャーを出来る限り除去した。その後、ジエチルエーテルを飛ばすために減圧乾燥した。乾燥した粗ペプチドを A 溶媒 (MilliQ 100% / 0.1% TFA) に溶解し、HPLC (GL science GL7410、波長可変型紫外検出器 : GL7450、Inertsil ODS-3 カラム、A 溶媒 (MilliQ : 100%、TFA : 0.1%)、B 溶媒 (アセトニトリル : 100%、TFA : 0.08%)) により精製を行った。目的とするペプチドの同定には MALDI-TOF MS (Autoflex III, Bruker Daltonics) を使用し、マトリクスにはシナピン酸 (Sigma-Aldrich) を用いた。精製後、エバポレーターを用いて TFA とアセトニトリルを飛ばし、凍結乾燥させた。凍結乾燥後、HPLC を用いて純度の確認を行った。

6-2-4. 細胞透過性 Au イオン結合ペプチドのストック溶液の調製

ペプチドの濃度はアミノ酸分析により算出した。各ペプチドを 1 mM になるように調製し、標準溶液として 4 mM Val 溶液を混合し、減圧乾燥した。乾燥後、6 M HCl を添加し、120°Cで24時間加水分解を行った。加水分解後のサンプルは、ethanol (Wako) : MilliQ : triethylamine (Wako) = 2 : 2 : 1 の割合で混合した溶液を 20 μ L 添加し、攪拌した後、減圧乾燥を行った。乾燥後、ethanol : MilliQ : trimethylamine : PITC (Wako) = 7 : 1 : 1 : 1 の割合で混合した溶液を添加し、攪拌した後、室温で20分間インキュベートした。20分経過後、減圧乾燥を行った。乾燥後、acetonitrile : 60 mM buffer pH6.0 = 6 : 94 (v/v) 1 mL で溶解し、HPLC (Waters 2695) を用いて分析を行った。カラムは Inertsil ODS-2 を使用し、検出波長 254 nm で測定した。ペプチド溶液の濃度は標準溶液のピーク面積との割合から算出した。算出方法は以下の通りである。

$$\text{ペプチドのモル数 (mol)} = \frac{\text{標準溶液のモル数 (mol)} \times \text{ペプチドのピーク面積}}{\text{標準溶液のピーク面積}}$$

6-2-5. 細胞透過性 Au イオン結合性ペプチドによる *in vitro* での Au ナノ粒子形成の有無の確認

MilliQ 690 μ L に 10 \times PBS 100 μ L と 100 μ M R8-AuBP 10 μ L、5 mM HAuCl₄ 200 μ L を添加し、室温で48時間インキュベートした。

6-2-6. 細胞の準備

凍結保存していた HeLa 細胞を 37°Cで融解し、細胞を懸濁させた後、1.5 mL チューブに細胞懸濁液を分取し、1500 rpm で5分間遠心することで細胞を沈降させた。培地を除去し、37°Cに加温した培地 (D-MEM、10%

FBS、1% ペニシリンストレプトマイシン) を 1 mL 添加し、細胞を懸濁した。4 mL の培地を添加したディッシュに細胞懸濁液を添加し、ディッシュに均一になるように細胞を撒き、5% CO₂ 雰囲気下の 37°C インキュベーターで 1 日培養した。

6-2-7. 継代培養

培地、1×PBS、0.25% トリプシンを 37°C に加温し、前日に細胞を培養したディッシュ (または継代培養をしていたディッシュ) から培地を除去した。1×PBS 1 mL で 3 回洗浄した後、400 μL の 0.25% トリプシンを添加し、5% CO₂ 雰囲気下の 37°C インキュベーターで 3 分間インキュベートすることで細胞をディッシュから剥離させた。その後、600 μL の培地をディッシュに添加し、1.5 mL マイクロチューブに細胞懸濁液を分取した。1500 rpm で 5 分間遠心することで細胞を沈降させ、トリプシンが含有している培地を除去した後、新たに培地を 1 mL 添加し、細胞を懸濁した。細胞懸濁液を 20 μL を分取し、血球計算盤を用いて細胞懸濁液中の細胞数を算出した。算出した細胞数を基に所定量の細胞をディッシュに撒き、5% CO₂ 雰囲気下の 37°C インキュベーターで培養した。

6-2-8. 細胞透過性金イオン結合ペプチドを用いた細胞内での Au のミネラルゼーション

6-2-6 で培養していた細胞を 6 穴マイクロプレート (Nest Biotech Co., Ltd.) に 3.0×10^5 cells 撒き、5% CO₂ 雰囲気下の 37°C インキュベーターで一日培養した。滅菌水 690 μL に 10×PBS 100 μL と 100 μM R8-AuBP 10 μL、フィルター滅菌した 5 mM HAuCl₄ 200 μL を添加し、室温で 30 分間インキュベートした。30 分経過後、培地を除去し、1×PBS 1 mL で 3 回洗浄した後、サンプル 1 mL を添加し、5% CO₂ 雰囲気下の 37°C インキュベーターで 24 時間~48 時間インキュベートし、細胞内で Au のミネラルゼーションを行った。

6-2-9. エンドサイトーシス阻害剤添加条件における細胞内での Au のミネラルゼーション

6-2-6 で培養していた細胞を 6 穴マイクロプレートに 3.0×10^5 cells 撒き、5% CO₂ 雰囲気下の 37°C インキュベーターで一日培養した。培地を除去して 1×PBS 1 mL で 3 回洗浄した後、5 μM サイトカラシン D (in 無血清培地; D-MEM、1% ペニシリンストレプトマイシン) 1 mL を添加し、5% CO₂ 雰囲気下の 37°C インキュベーターで 15 分間インキュベートした^[4]。15 分経過後、サイトカラシン D を除去して 1×PBS 1 mL で 3 回洗浄した。滅菌水 690 μL に 10×PBS 100 μL と 100 μM R8-AuBP 10 μL、フィルター滅菌した 5 mM HAuCl₄ 200 μL を添加し、室温で 30 分間インキュベートしたサンプル 1 mL を添加し、5% CO₂ 雰囲気下の 37°C インキュベーターで

ターで 48 時間インキュベートした。

6-2-10. 細胞の破碎

細胞内での Au のミネラルゼーション後、培地を除去して 1×PBS 1mL で 3 回洗浄した後、滅菌水 500 μL を添加しスクレーパーを用いて細胞をディッシュから剥離し、1.5 mL マイクロチューブに分取した。スクレーパーとディッシュに付着した残りの細胞を滅菌水 500 μL で洗いこみ、1.5 mL のマイクロチューブに回収した。その後、Bioruptor (Cosmo Bio Co. Ltd., UCD-250) を用いて、氷浴中で超音波処理 (High) を 10 分間行うことで細胞を破碎し、細胞内に形成した Au ナノ粒子を回収した。卓上遠心機 (Caspulefve PMC-060) で 1 分間遠心することで形成した Au ナノ粒子と細胞断片を分離した。

6-2-11. 位相差顕微鏡観察による Au のミネラルゼーション後の細胞の観察

24 時間～48 時間ミネラルゼーションした後の細胞を位相差顕微鏡 (オリンパス (株)、IX 70) を用いて観察した。

6-2-12. UV-VIS 測定による形成した Au ナノ粒子の光学特性の解析

細胞破碎液を遠心した後の上清 350 μL を UV キュベットセル (Merck, BR759200) に分取し、紫外可視分光光度計 (UV-1800, Shimadzu) により測定した。

6-2-13. 共焦点顕微鏡観察によるペプチドの導入および Au ナノ粒子の形成の確認

共焦点顕微鏡観察用のシャーレ (Cellview Glass Bottom Dish 4 Compartments, No. 627870) で Au のミネラルゼーションを 24 時間行った後、反応溶液を除去し、1×HEPES 200 μL で 2 回洗浄を行った。1×HEPES 200 μL を添加し、共焦点顕微鏡観察を行った (LSM-700, ZEISS)。

6-2-14. TEM 観察による細胞内で形成した Au ナノ粒子の形状観察

細胞破碎液を遠心した後の上清 20 μL を TEM 用グリッド (日新 EM) に滴下し、1 分間静置させた。その後、濾紙を用いて溶液を吸引した。吸引後、MilliQ を 20 μL 滴下し、濾紙で吸引する工程を洗浄とし、3 回洗浄を行った。ペプチド集合体のサンプルにおいては、上記操作後に 2% リンタングステン酸を 20 μL 滴下して 1 分間静置することでネガティブ染色した後、濾紙を用いて溶液を吸引し、3 回洗浄を行った。洗浄後、窒素

ガスで乾燥を行いある程度乾燥させた後、1日減圧乾燥を行った。TEMはJEM-1400（JEOL）を用いて、加速電圧115 kVで観察を行った。

6-3. 実験結果と考察

6-3-1. 細胞透過性 Au イオン結合ペプチドの合成

各ペプチドを Fmoc 固相合成法により合成し、脱保護・脱樹脂した後、HPLC により精製を行い、凍結乾燥した後のペプチド粉末を 1 mM になるように MilliQ で溶解させた。HPLC および MALDI-TOF MS によりそれぞれのペプチドの純度を確認したところ、各ペプチドともに高純度で合成・精製ができていることが示された (Fig. 6-2a-d)。また、MALDI-TOF MS により R8-AuBP は 2469.3 ($[M+H]^+$ calcd. 2470.0)、AuBP は 1221.1 ($[M+H]^+$ calcd. 1221.4)、R8 は 1266.6 ($[M+H]^+$ calcd. 1267.6) であることが示され、目的のペプチドが合成できていることが示された。Flu-R8-AuBP は 2 本のピークが確認されたが、どちらのピークにおいても Flu-R8-AuBP の分子量と同様の分子量であることが確認された (Fig. 6-2d)。この要因として、5,6-カルボキシフルオレセインは 5-カルボキシフルオレセインと 6-カルボキシフルオレセインの 2 種の光学異性体が混合しているため、それぞれのカルボキシフルオレセインが修飾されたペプチドが生成されたためであると考えられる。

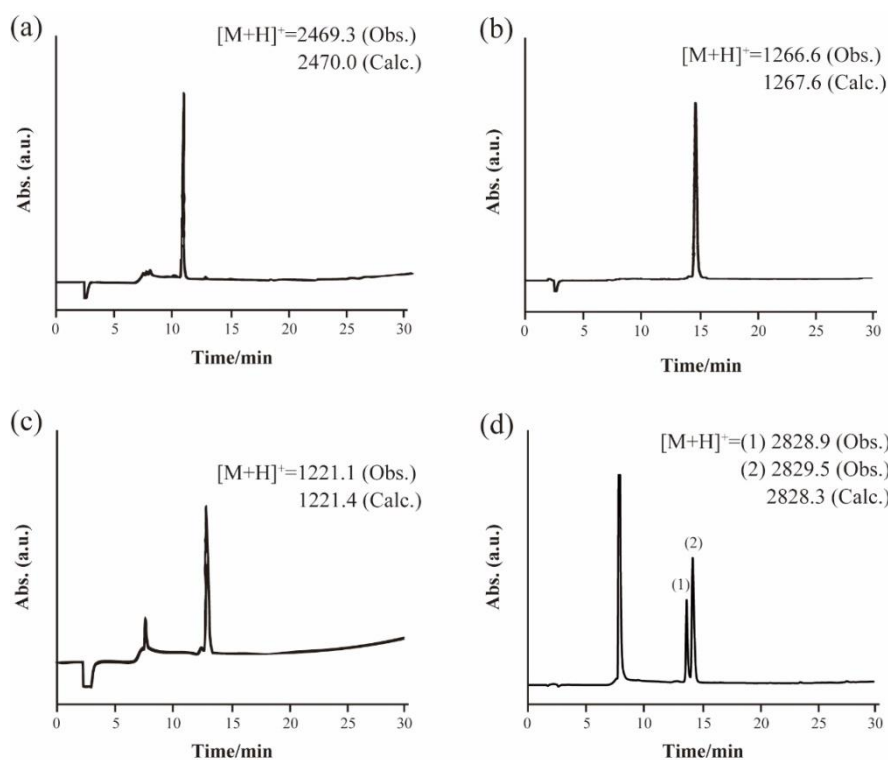


Fig. 6-2 HPLC charts for purified (a) R8-AuBP, (b) R8, (c) AuBP, and (d) Flu-R8-AuBP separated on an ODS column (150×4.6 mm, 5 μm) with MilliQ water (containing 0.1% TFA) using a gradient from (a, c, and d) 0% to 100% or (b) 0% to 30% acetonitrile (containing 0.08% TFA) over 30 min, 1.0 mL/min; detection time at 220 nm.

6-3-2. 細胞透過性 Au イオン結合性ペプチドによる in test tube での Au ナノ粒子形成の有無の確認

S. K. Stanley らにより、本研究で使用している AuBP 配列は HEPES buffer 存在下で Au^{3+} から Au^0 の還元が生じ、Au ナノ粒子が形成することが示されている^[2]。本研究では in test tube で R8-AuBP に Au イオンを結合させた後、細胞に Au イオンが結合した R8-AuBP を導入し、細胞内で Au のミネラルゼーションを行う必要がある。そこで、PBS buffer 存在下において、R8-AuBP が *in vitro* で Au ナノ粒子を形成しないことを UV-VIS 測定により確認した。終濃度が $[\text{R8-AuBP}] = 1 \mu\text{M}$ 、 $[\text{HAuCl}_4] = 1 \text{ mM}$ in $1 \times \text{PBS buffer}$ で in test tube で 48 時間インキュベートしたサンプルにおいて、Au ナノ粒子の SPR 由来の吸収ピークは確認されなかった (Fig. 6-3a)。このことから、Au ナノ粒子が形成していないと考えられる。また、R8 単独配列と AuBP 単独配列添加条件においても同様の実験を行ったところ、Au ナノ粒子の SPR 由来の吸収ピークは確認されなかった (Fig. 6-3b, c)。以上の結果から、PBS buffer 存在下において、R8-AuBP は in test tube では Au のミネラルゼーションが生じないことが示唆された。

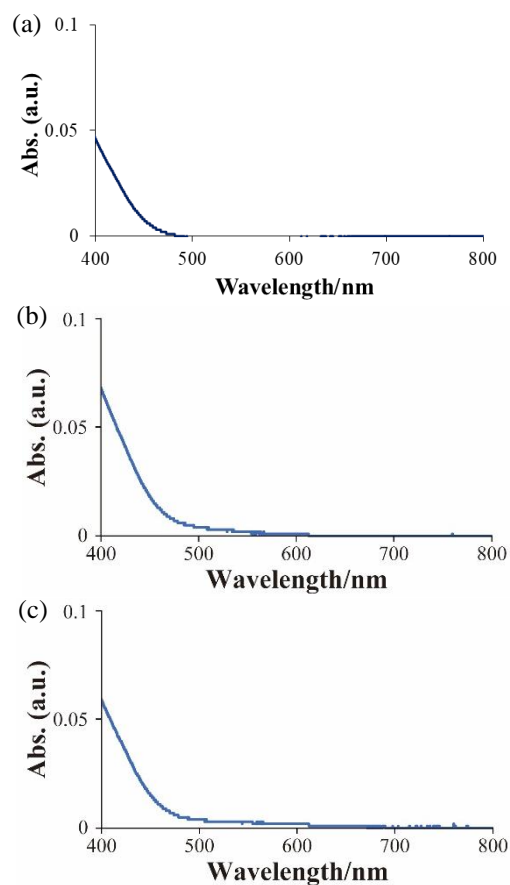


Fig. 6-3 UV-VIS spectra of the sample after gold mineralization for 24 h using (a) R8-AuBP, (b) AuBP, and (c) R8 in test tube.

6-3-3. TEM によるペプチド集合体の形状観察

UV-VIS 測定により、R8-AuBP は in test tube では Au ナノ粒子を形成しないことが示唆された。そこで、Au ナノ粒子の形成の有無を TEM により観察した。その結果、Au ナノ粒子の形成は確認されず、有機物の凝集体の形成が確認されたため、サンプルをネガティブ染色して観察することにした。染色したサンプルを TEM 観察したところ、リボン状の集合体構造の形成が確認された (Fig. 6-4a)。UV-VIS 測定により SPR 由来の吸収が確認されなかったことから、この構造体は Au ではなくペプチド由来の集合体であると考えられる。続いて、 HAuCl_4 未添加条件で R8-AuBP を TEM 観察したところ、リボン状構造体の形成は確認されなかった (Fig. 6-4b)。このことから、R8-AuBP に Au イオンが結合することによってペプチド集合体の形成が生じたのだと考えられる。次に、 HAuCl_4 の濃度を 1 mM から 0.5 mM に低下させて、R8-AuBP の濃度を 1 μM と 10 μM にして 48 時

間インキュベートすることでペプチド集合体の形状が変化するかを TEM により確認した。R8-AuBP の濃度が $1 \mu\text{M}$ では集合体構造の形成は確認されなかったが (Fig. 6-4c)、R8-AuBP の濃度が $10 \mu\text{M}$ のサンプルでは短いリボン集合体の形成が確認された (Fig. 6-4d)。以上の結果から、R8-AuBP と HAuCl_4 の濃度を変化させることでペプチド集合体の形状を制御できることが示された。

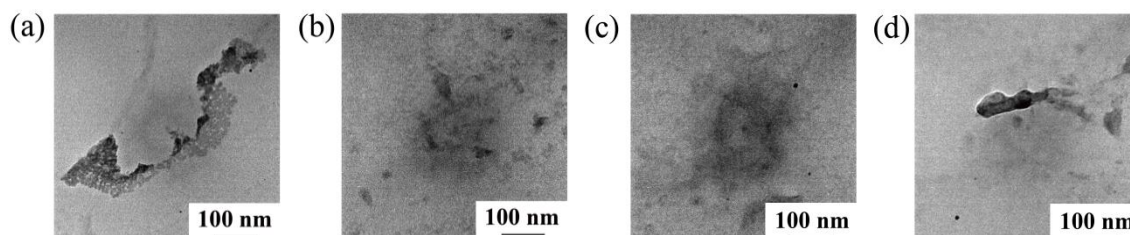
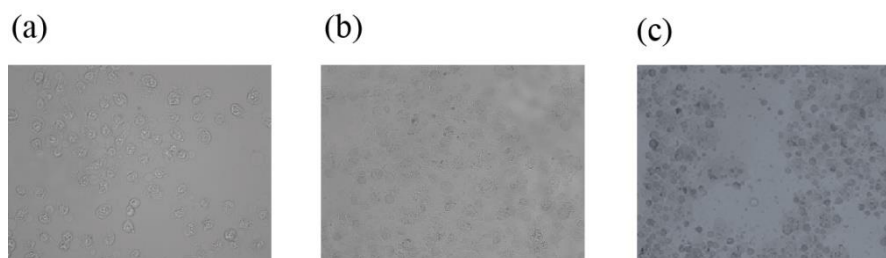


Fig. 6-4 TEM images of the sample with (a) $1 \mu\text{M}$ R8-AuBP containing 1 mM HAuCl_4 , and (b) 1 mM HAuCl_4 alone after incubation for 48 h in test tube. TEM images of the sample with (c) $1 \mu\text{M}$ R8-AuBP containing 0.5 mM HAuCl_4 , and (d) $10 \mu\text{M}$ R8-AuBP containing 0.5 mM HAuCl_4 after incubation for 48 h in test tube. All TEM samples were stained with 2% phosphotungstic acid.

6-3-4. 細胞透過性 Au イオン結合ペプチドを用いた Au のミネラル化後の細胞の位相差顕微鏡観察

続いて、R8-AuBP 添加条件と未添加条件において、細胞内で Au のミネラル化を行った後の細胞を位相差顕微鏡観察により観察した。R8-AuBP 未添加条件で 6 時間と 24 時間インキュベートした細胞ではコントラストに変化は確認されなかったが (Fig. 6-5a, b)、48 時間インキュベートした細胞では黒いコントラストがついており、Au ナノ粒子の形成が示唆された (Fig. 6-5c)。一方、R8-AuBP 添加条件では 6 時間インキュベートした細胞ではコントラストに変化は確認されなかったが (Fig. 6-5d)、24 時間インキュベートした細胞には黒いコントラストがついており、Au ナノ粒子の形成が示唆された (Fig. 6-5e)。さらに、48 時間インキュベートした細胞においては R8-AuBP 未添加条件の細胞よりも黒いコントラストが明瞭についており、Au ナノ粒子の形成が促進されていることが示唆された (Fig. 6-5f)。以上の結果から、R8-AuBP 添加により細胞内で Au のミネラル化が効率的に生じていると考えられる。



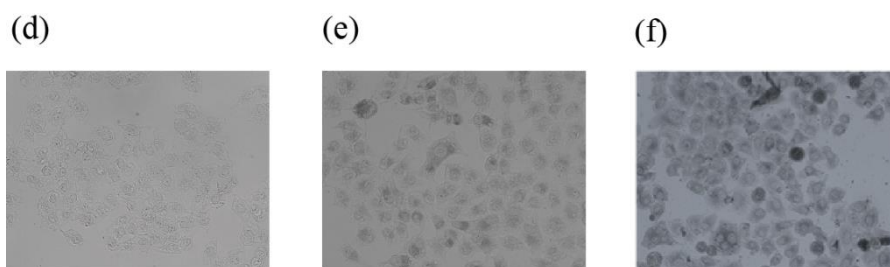


Fig. 6-5 Phase contrast microscopic images of the cells after Au mineralization for (a) 6 h, (b) 24 h, and (c) 48 h without the peptide. Phase contrast microscopic images of the cells after Au mineralization for (d) 6 h, (e) 24 h, and (f) 48 h with R8-AuBP.

6-3-5. UV-VIS 測定による形成した Au ナノ粒子の光学特性の解析

細胞内に Au ナノ粒子が形成していることが示唆されたので、細胞内で Au のミネラルゼーションを 48 時間行った後、PBS で 3 回洗浄し、スクレーパーを用いて細胞を回収した。その後、細胞を超音波で破碎することで細胞内部の Au ナノ粒子を回収し、UV-VIS 測定を行った。その結果、R8-AuBP 添加条件で in test tube で 48 時間インキュベートしたサンプルでは Au ナノ粒子由来の吸収ピークが確認されなかったのに対して (Fig. 6-6)、細胞内で Au のミネラルゼーションを行ったサンプルでは Au ナノ粒子由来の SPR のピークが確認された (Fig. 6)。

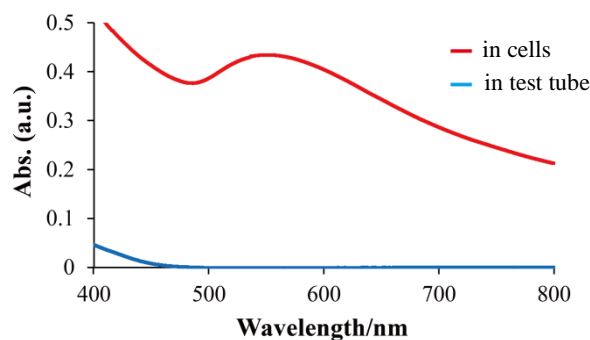


Fig. 6-6 UV-VIS spectra of reaction solution after incubation in test tube and lysate solution after incubation using 1 mM R8-AuBP and 1 mM HAuCl₄.

さらに、細胞外ではなく細胞内に Au ナノ粒子が形成しているのかを確認するために、細胞にサンプル溶液を添加して 48 時間インキュベートした直後のサンプル溶液と PBS 洗浄後の洗浄液を UV-VIS 測定した。その結果、サンプル溶液と洗浄液のどちらからも Au ナノ粒子由来の SPR 由来の吸収ピークは確認されなかったことから、細胞外ではなく細胞内に Au ナノ粒子が形成していることが示唆された (Fig. 6-7a-c)。

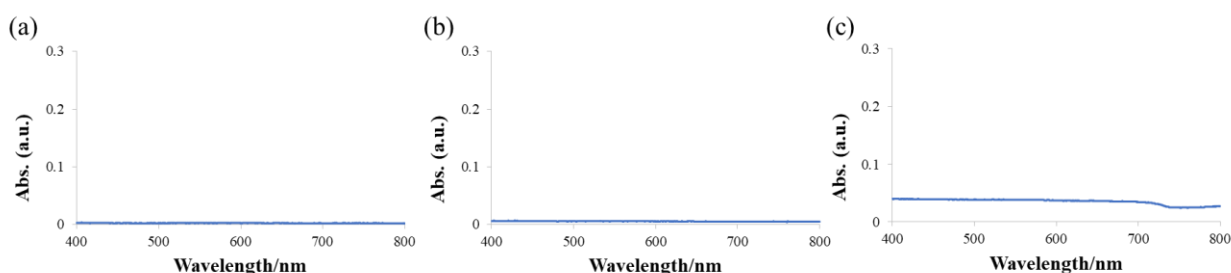
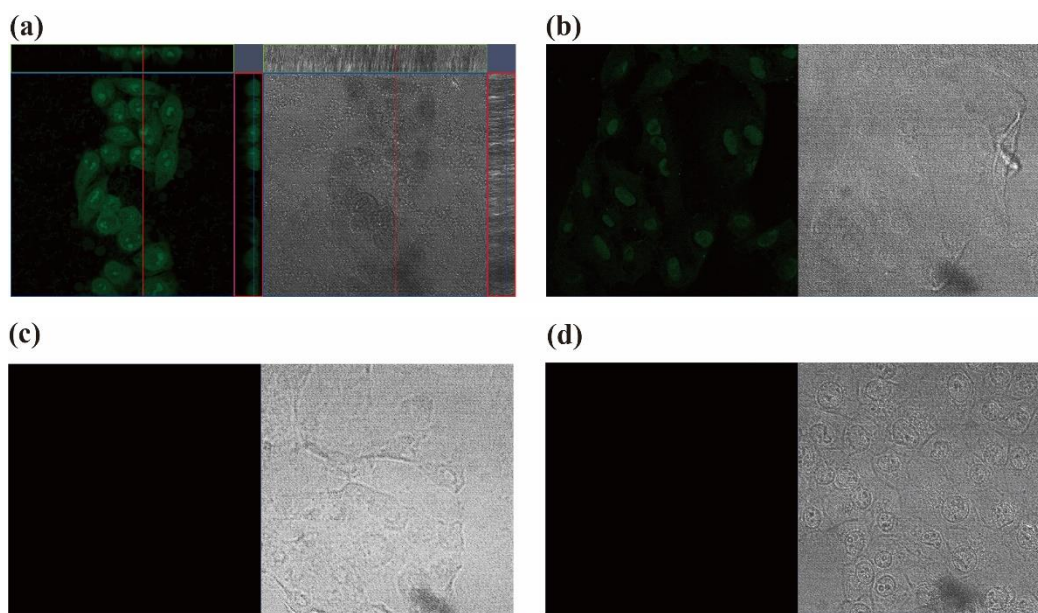


Fig. 6-7 (a) UV-VIS spectrum of sample solution after incubation for 48 h. UV-VIS spectrum of solution after (b) first and (c) second PBS washes.

6-3-6. 共焦点顕微鏡観察による細胞内での Au ナノ粒子形成の有無の確認

6-3-5 より、細胞内に Au ナノ粒子が形成されていることが示唆されたので、共焦点顕微鏡観察によりペプチドが細胞内に導入され、Au ナノ粒子が形成しているのかを確認した。その結果、5,6-カルボキシフルオレセインが修飾された Flu-R8-AuBP および HAuCl_4 を添加し、24 時間インキュベートした細胞では細胞内に Flu-R8-AuBP 由来の蛍光と Au ナノ粒子と考えられる黒いコントラストが細胞内に観察された (Fig. 6-8a)。ペプチドおよび HAuCl_4 未添加条件で 24 時間インキュベートした細胞では、細胞内に黒いコントラストは確認されていない (Fig. 6-8b) ことから、黒いコントラストは Au ナノ粒子に由来するものだと考えられる。また、Flu-R8-AuBP のみ添加した条件においては、Flu-R8-AuBP 由来の蛍光は確認されたが、黒いコントラストは確認されなかった (Fig. 6-8c)。さらに、 HAuCl_4 のみ添加した条件では、蛍光および黒いコントラストは確認されなかった (Fig. 6-8d)。7-3-4 の位相差顕微鏡観察の結果から、 HAuCl_4 のみ添加した条件で 24 時間インキュベートした細胞では Au ナノ粒子の形成していないことが示唆されているので、この結果は 6-3-4 の結果と相関を得ている。以上の結果から、Au イオンがペプチドに結合した後、細胞内に導入されることで細胞内に Au ナノ粒子が形成していることが示された。



Green : Flu-R8-AuBP Black: Au nanoparticles

Fig. 6-8 (a) Confocal microscopic images of the cells with Flu-R8-AuBP and HAuCl_4 after incubation. (b) Confocal microscopic images of the cells after incubation for 24 h using Flu-R8-AuBP without HAuCl_4 . (c) Confocal microscopic images of the cells after incubation for 24 h without the peptide and HAuCl_4 . (d) Confocal microscopic images of the sample after incubation for 24 h with HAuCl_4 alone.

6-3-7. TEMによる細胞透過性 Au イオン結合ペプチドを用いて細胞内で形成した Au ナノ構造体の形状観察

細胞内に Au ナノ粒子が形成していることが示唆されたので、細胞内で Au のミネラルゼーションを行った後、細胞を破碎し、形成した Au ナノ粒子を TEM により観察した。HAuCl₄のみを添加し、細胞内で 48 時間インキュベートさせたサンプルではわずかに球状のナノ粒子がしていることが確認された (Fig. 6-9a)。一方、R8-AuBP を添加し 48 時間インキュベートさせたサンプルでは、6-3-3 の Fig. 6-4a の in test tube で確認されたリボン状のペプチド集合体と非常に類似したリボン状の Au ナノ構造体の形成が確認された (Fig. 6-9b)。また、24 時間インキュベートさせたサンプルでは、48 時間インキュベートさせたサンプルで確認されたリボン状の Au ナノ構造体よりも短いリボン状のナノ構造体の形成が確認された (Fig. 6-9c)。続いて、Au イオン結合配列がない R8 と CPP 配列がない AuBP を用いて Au のミネラルゼーションを 48 時間行ったところ、HAuCl₄のみを添加したサンプルと同様に球状の Au ナノ粒子しか確認されなかった (Fig. 6-9d, e)。これらの結果から、R8 は細胞を透過する能力は有しているが Au イオン結合配列がないため、リボン状の Au ナノ構造体は形成せず、AuBP は細胞透過能がないので細胞内に導入することができず、リボン状の Au ナノ構造体の形成が生じなかったのだと考えられる。次に、エンドサイトーシス阻害剤であるサイトカラシン D を用いて^[4]、エンドサイトーシスによる R8-AuBP の細胞への取り込みを阻害した条件で Au のミネラルゼーションを 48 時間行ったところ、R8-AuBP 添加条件であるにも関わらずリボン状の Au ナノ構造体の形成は確認されなかった (Fig. 6-9f)。以上の結果から、in test tube で R8-AuBP に Au イオンが結合することでリボン状のペプチド集合体を形成し、エンドサイトーシスにより細胞に取り込まれた後にペプチド集合体上に結合した Au イオンが還元され、ペプチド集合体をテンプレートにして結晶成長反応が進行し、リボン状の Au ナノ構造体が形成したのだと考えられる。

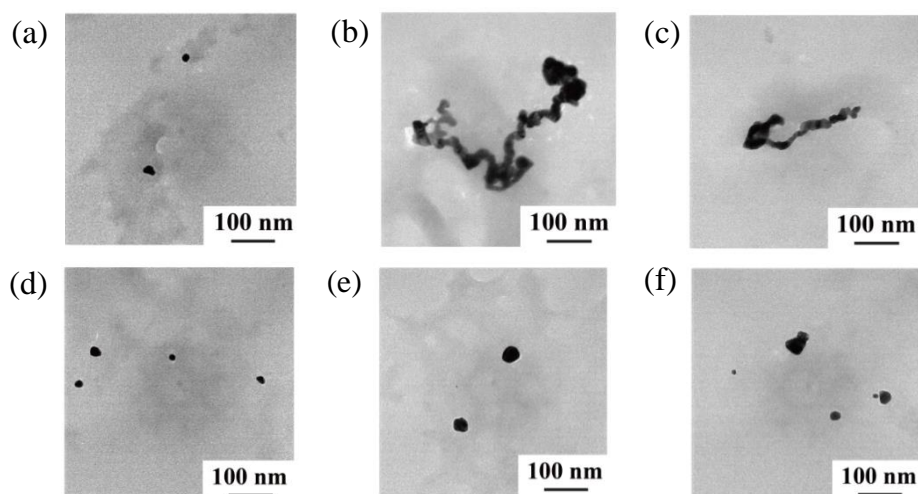


Fig. 6-9 (a) TEM image of the sample with HAuCl₄ alone after Au mineralization for 48 h in cells without the peptide. TEM images of the sample with R8-AuBP after Au mineralization for (b) 24 h and (c) 48 h in cells. (d) TEM image of the sample with R8-AuBP after Au mineralization for 48 h using cytochalasin D. TEM images of the sample with (e) R8 and (f) AuBP after Au mineralization for 48 h in cells.

6-3-8. 細胞透過性 Au イオン結合ペプチドと HAuCl_4 の濃度変化による Au ナノ粒子の形状制御

最後に、従来法では Au ナノ粒子が形成しない濃度の HAuCl_4 添加条件でペプチドの濃度を変化させることで、形成する Au ナノ粒子の形状制御を試みた。その結果、6-3-3 の Fig. 6-4d に示した in test tube で短いリボン状のペプチド集合体を形成した条件においては、Fig. 6-4d の in test tube で確認されたリボン状のペプチド集合体と類似した短いリボン状の Au ナノ構造体の形成が確認された (Fig. 6-10a)。しかしながら、6-3-3 の Fig. 6-4c に示したペプチド集合体が形成していない条件では、球状の Au ナノ粒子しか形成していないことが確認された (Fig. 6-10b)。以上の結果から、R8-AuBP と HAuCl_4 の濃度を変化させることで形成するペプチド集合体の形状を制御することができ、細胞内で Au のミネラルゼーションを行うことにより、ペプチド集合体上で Au の核形成および結晶成長反応が進行し、ペプチド集合体の形状に類似した Au ナノ構造体を作製することができることが明らかとなった。

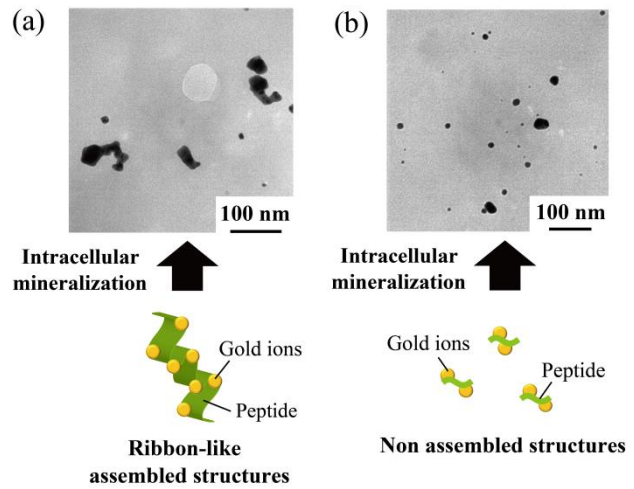


Fig. 6-10 (a) TEM image of the sample with 10 μM R8-AuBP containing 0.5 mM HAuCl_4 after Au mineralization for 48 h in cell. (b) TEM image of the sample with 1 μM R8-AuBP containing 0.5 mM HAuCl_4 after Au mineralization for 48 h in cell.

6-4. 結論

本研究では、Au イオン結合能を有するペプチドに CPP 配列を組み込んだ人工ペプチドを用い、in test tube でペプチドに Au イオンを結合させた後、細胞内に導入することにより細胞内の環境を利用して Au ナノ粒子を細胞内で直接合成する手法を確立することができた。従来の細胞内の環境を利用した無機ナノ粒子の直接合成では高濃度の前駆体溶液 (> 1 mM) の使用や外部刺激を必要とするが、本研究ではペプチドに Au イオンを結合させた状態で細胞に導入するため、比較的 low 濃度で効率的に Au ナノ粒子を作製することができた。また、Au イオンをペプチドに結合させた際に集合体構造を形成し、細胞内にリボン状の Au ナノ構造体が形成することが確認された。さらに、ペプチドと HAuCl_4 の濃度を変化させることで形成するペプチド集合体の形状が変化し、細胞内で形成する Au ナノ構造体の形状を制御できることも示された。本研究では HeLa 細胞を用いて細胞内での Au のミネラルゼーションを試みたが、PC12 細胞などの神経細胞は成長因子 (NGF; nerve

growth factor) を添加し、細胞を活性化させることでアセチルコリンエステラーゼ (AChE) などの酵素を分泌することが知られている。この酵素は Au イオンを還元する作用があることが報告されている^[6]。そのため、NGF 添加により PC12 細胞の活性化させることで、細胞内の還元環境を変化させることが期待できるため、本研究で示した知見を基に細胞内での無機物のミネラルリゼーションを制御するシステムの構築も期待できる。

参考文献

- [1] S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura, *J. Biol. Chem.*, **276**, 5836-5840 (2001).
- [2] S. K. Stanley, M. L. Becker, E. K. Lin, W. Wu, *Langmuir*, **25**, 10886-10892 (2009).
- [3] C. W. Chan, P. D. White, *Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach*, Oxford University Press, 2000, New York.
- [4] K. Takayama, I. Nakase, H. Michiue, T. Takeuchi, K. Tomozawa, H. Matsui, S. Futaki, *J. Control. Release*, **138**, 128-133 (2009).
- [5] V. Pavlov, Y. Xiao, I. Willner, *Nano Lett.*, **5**, 649-653 (2005).

第7章 総括

現在のペプチド科学において、生理活性ペプチドやペプチド製剤の開発といった創薬研究、CPP を用いた細胞工学、医療分野への応用を指向した DDS 研究、自己集合化ペプチドを用いた機能性材料の開発研究といったナノからバイオまで様々な分野の研究が行われている。しかしながら、それぞれの研究分野の中で独立して発展しており、それぞれの研究分野の垣根を超えるようなペプチドの利用方法やその指針が見出されていないのが現状である。本論文で提案する人工ペプチドを用いたミネラル化の無機ナノ粒子作製法は無機物沈殿ペプチドに機能性官能基や他の機能性ペプチドを修飾することで、ミネラル化により形成する無機物ナノ構造体のサイズや形状、元素含有比の制御も可能であることに加えて、細胞内に目的の無機物ナノ構造体を直接合成することができ、さらには細胞を「工場」とした無機材料合成場として利用することが可能であるという、ナノからバイオまで幅広い分野への波及が期待できる非常に独創的な手法である。このように、ペプチド単独の機能のみを利用するのではなく、他の有機分子やさらには細胞内の環境を利用して無機物と複合化した研究はなく、それらを基に無機ナノ粒子合成方法を示した本研究は非常に新規性の高いものである。

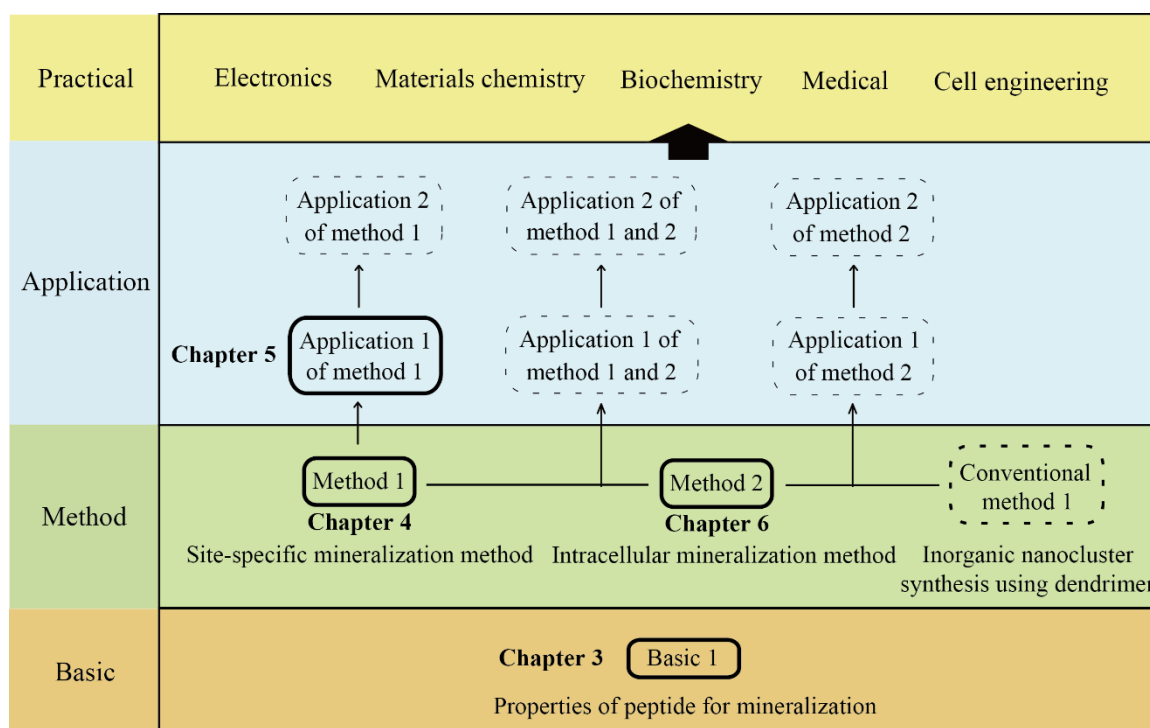


Fig. 7-1 Illustration of the overview of this thesis.

第 3 章では本研究により、ペプチド配列を合目的に設計することで無機物沈殿能だけでなく、無機ナノ粒子の保護効果も付与することが可能であることが示された。以上より、ペプチドは無機物のミネラルゼーションに有用な分子であることが示された (Fig. 7-1, Chapter 3) ^[1]。

第 4 章と第 5 章では、現状のペプチドを用いたミネラルゼーションでは難しい数 nm スケールでの無機物のサイズや形状の制御ならびに二種の無機物の複合化を達成することのできる新たな手法を確立した (Fig. 7-1, Chapter 4, Chapter 5) ^[2-4]。本手法はサイズや形状が整った分子である DNA に無機物沈殿ペプチドを配置したペプチド-DNA 複合体をミネラルゼーションのテンプレートとして用いて、ミネラルゼーションを行うことで DNA 上の特定部位に配置した無機物沈殿ペプチドの部位にのみ無機物を位置特異的に形成させることができる。二種以上の無機物を沈殿させる際は、それぞれの無機物に対応する無機物沈殿ペプチドを用いることで、DNA 上の任意の位置に精密にそれぞれの無機物を沈殿することができた。また、DNA 上に結合させるペプチドの数を自在に変化させることで形成する無機物のサイズや形状も自在に変化させることができ、無機物複合ナノ構造体中の元素含有比も制御できることが示された (Fig. 7-1, Chapter 5) ^[4]。さらに本手法では、生体由来の分子である DNA とペプチドを無機物のミネラルゼーションのテンプレートとして用いているので、生体適合性の高い無機物複合ナノ構造体を作製することができる。本手法を利用することでペプチド配列を変化させるだけで様々な無機物を形成させることができるため、還元剤などの環境負荷物質を使用せずに温和な条件下で目的とする機能性無機物ナノ構造体を作製することが期待できる。本論文では二本鎖 DNA を使用したが、スリーウェイジャンクションやホリデイジャンクションなどの分岐型の DNA を使用することで二種以上の無機物を形成させることが理論上可能である。そのため、スリーウェイジャンクション構造の分岐点に量子ドットを形成させ、分岐構造の末端部位に対応する無機物を形成させることで単電子トランジスタの基本構造 (Fig. 7-2) や高触媒活性を有する多元金属触媒を作製することができ (Fig. 7-1, Application 2 of method 1)、材料工学分野やエレクトロニクス分野への応用が期待できる。

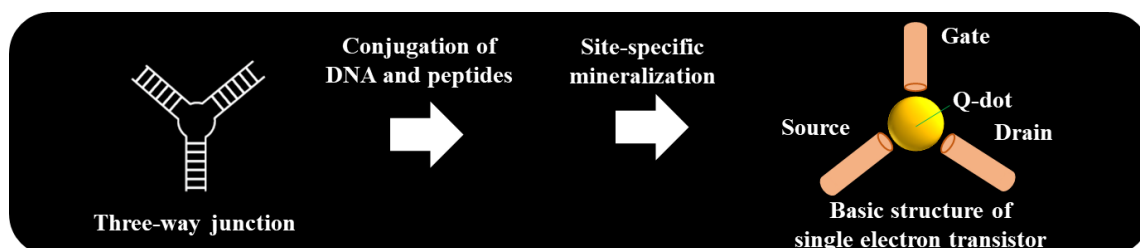


Fig. 7-2 Illustration of Application 1 of method 1 on Fig. 7-1.

第6章では Au イオン結合能を有するペプチドに CPP 配列を組み込んだ人工ペプチドを用い、in test tube でペプチドに Au イオンを結合させた後、細胞内に導入することにより細胞内の環境を利用して Au ナノ粒子を細胞内で直接合成する手法を確立した (Fig. 7-1, Chapter 6)^[5]。従来の細胞内の環境を利用した Au ナノ粒子の直接合成では高濃度の前駆体溶液 (>1 mM) の使用や外部刺激を必要とするが、本研究ではペプチドに Au イオンを結合させた状態で細胞に導入するため、比較的低濃度で効率的に Au ナノ粒子を作製することができた。本研究では Au イオンをペプチドに結合させた際に集合体構造を形成し、細胞内にリボン状の Au ナノ構造体が形成することが確認された。さらに、ペプチドと H₂AuCl₄ の濃度を変化させることで形成するペプチド集合体の形状を制御することができ、細胞内で形成する Au ナノ構造体の形状も制御できることが示された。このことから、ペプチドの自己集合体を精密に制御することで様々な形状の無機ナノ構造体を作製することが期待できる。さらに、第4章と第5章の知見を基に DNA 上の任意の位置に細胞透過性無機物イオン結合ペプチドを配置し、in test tube で無機物イオンを結合させた後に細胞内に導入することで、様々なサイズ・形状を有する無機物複合ナノ構造体を作製することが期待できる (Fig. 7-1, Application 1 of method 1 and 2)。そのため、異方性 Au ナノ粒子を細胞内に直接合成することも理論上可能であるので、in vivo で異方性 Au ナノ粒子を合成することができれば、フォトサーマル療法への利用も期待できる (Fig. 7-1, Application 2 of method 1 and 2, Fig. 7-3)。

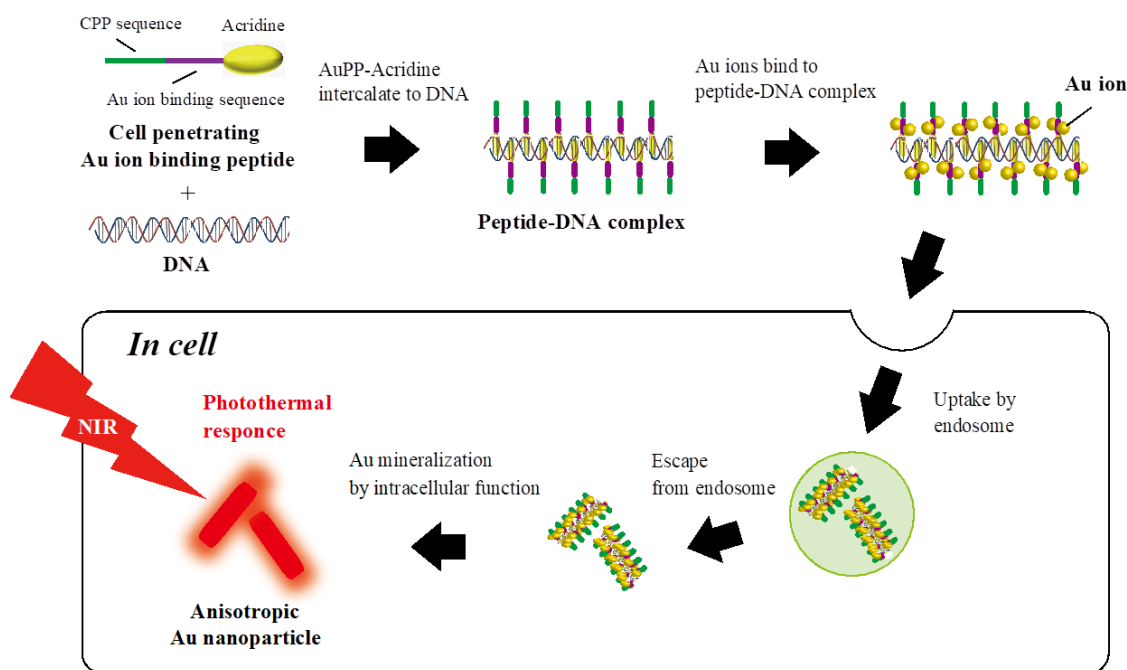


Fig. 7-3 Illustration of Application 2 of method 1 and 2 on Fig. 7-1.

また、分岐状高分子である dendrimer は合目的に設計することで金属イオンを結合させることができる^[6]。その中でも、フェニルアゾメチン dendrimer (DPA)^[7] は内層のイミンほど塩基性度が高いような電子勾配を有しており、内層から放射状段階的にルイス酸と錯形成を起こすことが知られている (Fig. 7-4)^[8]。M. Takahashi らはテトラフェニルメタンをコアとする世代数 4 のテトラフェニルアゾメチン dendrimer (TPM-DPA G4) を用いて粒子径 1 nm の多元合金ナノクラスターの作製に成功している

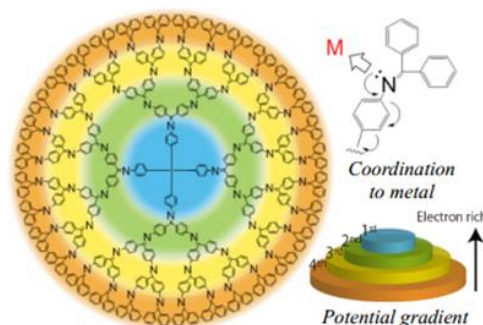


Fig. 7-4 Illustration of TPM-DPA G4 structure and intramolecular potential gradient.

(Fig. 7-1, Conventional method 1)^[9]。 dendrimer の表面にペプチドを化学修飾することができるため、TPM-DPA G4 表面に細胞透過性ペプチドを修飾し、任意の金属イオンを結合させた後に細胞内に導入することで、細胞内環境を利用して細胞内に多元合金ナノクラスターや Q-dot を直接合成することが可能であると考えられる (Fig. 7-1, Application 1 of method 2)。さらに、細胞透過性ペプチド配列に細胞小器官移行性シグナル配列^[10, 11]を組み込むことで任意の細胞小器官に目的の多元合金ナノクラスターや Q-dot を作製することも理論上可能であるため、目的の細胞小器官の *in vivo* イメージングや細胞内での酵素反応触媒、細胞内物質のセンシングといった細胞工学分野や医療分野への応用が期待できる (Fig. 7-1, Application 2 of method 2)。また、細胞を「工場」として無機物ナノ構造体を合成し、細胞を破碎して回収することでナノ材料として使用することも可能であるため、新たなナノ材料開発手法として利用することも可能である。

本研究を通して、ミネラルゼーションを題材とし、ペプチドを他の有機分子や無機物さらには細胞内の環境などを利用することで、現状の問題点を解決できる新たな無機ナノ粒子作製法を確立することができた。本研究はペプチド科学における新しい概念を見出すことができ、ナノからバイオ分野まで幅広い分野に応用することが期待できる。

参考文献

- [1] M. Ozaki, S. Yoshida, M. Oura, T. Tsuruoka, K. Usui, *RSC Adv.*, **10**, 40461-40466 (2020).
- [2] M. Ozaki, K. Nagai, H. Nishiyama, T. Tsuruoka, S. Fujii, T. Endoh, T. Imai, K.-y. Tomizaki, K. Usui, *Chem. Commun.*, **52**, 4010-4013 (2016).
- [3] K. Usui, M. Ozaki, A. Yamada, Y. Hamada, T. Tsuruoka, T. Imai, K.-y. Tomizaki, *Nanoscale*, **8**, 17081-17084 (2016).
- [4] M. Ozaki, T. Imai, T. Tsuruoka, S. Sakashita, K.-y. Tomizaki, K. Usui, *Commun. Chem.*, **4**, 1 (2021).

- [5] M. Ozaki, S. Yoshida, T. Tsuruoka, K. Usui, *Chem. Commun.*, (2021).
- [6] K. Yamamoto, M. Higuchi, S. Shiki, M. Tsuruta, H. Chiba, *Nature*, **415**, 509 (2002).
- [7] K. Takahashi, H. Chiba, M. Higuchi, K. Yamamoto, *Org. Lett.*, **6**, 1709-1712 (2004)
- [8] O. Enoki, H. Katoh, K. Yamamoto, *Org. Lett.*, **8**, 569-571 (2006).
- [9] M. Takahashi, H. Koizumi, W. J. Chun, M. Kori, T. Imaoka, K. Yamamoto, *Sci. Adv.*, **3**, e1700101 (2017).
- [10] M. Ray, R. Tang, Z. Jiang, V. M. Rotello, *Bioconjugate Chem.*, **26**, 1004-1007 (2015).
- [11] T. Ozawa, Y. Natori, Y. Sako, H. Kuroiwa, T. Kuroiwa, Y. Umezawa, *ACS Chem. Biol.*, **2**, 176-186 (2007).

謝辞

本研究を遂行するに当たり、御指導および御助言を頂きました甲南大学フロンティアサイエンス研究科 臼井 健二 准教授に厚く御礼申し上げます。本論文を御高覧頂き、御助言を下さいました甲南大学 フロンティアサイエンス研究科 西方 敬人 教授、鶴岡 孝章 准教授、東京工業大学生命理工学院 三原 久和 教授に深く感謝致します。本研究の電子顕微鏡観察において龍谷大学工学部物質化学科の富崎 欣也 教授、今井 崇人 実験助手、甲南大学フロンティアサイエンス学部生命化学科の赤松 謙祐 教授、鶴岡 孝章 准教授から丁寧かつ熱心なご指導を賜りました。厚く御礼申し上げます。また、TEM 観察と SEM 観察の際に快くサポートして頂いた龍谷大学富崎研究室の諸先輩方、同級生の友人ならびに甲南大学フロンティアサイエンス学部ナノ材料科学研究室の中本 成美 氏に感謝致します。DNA 設計と大腸菌を用いた遺伝子組み換え実験のご指導をして頂いた甲南大学先端生命工学研究所 遠藤 玉樹 准教授に深く感謝いたします。ラマン分光測定において、丁寧なご指導および測定のサポートをして頂いた龍谷大学理工学研究科物質化学専攻の和田 翼 氏と春日 誠 氏に感謝します。ICP-AES の分析の際に装置の使用ならびに測定のサポートをして頂いたクリーンケミカル株式会社の原田 陽滋 氏と川田原 瑠偉 氏に厚く御礼申し上げます。また、論文投稿の際に有用なご助言を頂いた藤井 敏司 教授、浜田 芳男 特別研究員に感謝いたします。UV-VIS-IR DRS 測定の際に、丁寧なご指導および測定のサポートをして頂いた兵庫県立工業技術センターの平瀬 龍二 氏に感謝いたします。

お忙しい中、実験のご指導をして頂いた山田 葵 氏、日々の研究生活でディスカッションや相談にのってくれ、3年間共に研究を頑張った坂下 峻吾 氏、横田 晋一郎 氏、ミネラルリゼーションテーマで研究を頑張ってくれた圓東 那津実 氏、大浦 真歩 氏、高坂 翼 氏、実験のサポートをしてくれた吉田 秀平 氏、平田 桃 氏に感謝いたします。また、共に勉学に励んだ甲南大学フロンティアサイエンス研究科の同級生の友人と事務員の方々にも感謝いたします。

最後に、長い間学生として勉強する機会を与えて頂き、心の支えになって頂いた家族に感謝します。

令和3年2月

尾崎 誠

業績リスト

公表論文（副論文）リスト

1. M. Ozaki, S. Yoshida, T. Tsuruoka, K. Usui “Intracellular Mineralization of Gold Nanoparticles Using Gold Ion-Binding Peptides with Cell-Penetrating Ability.” *Chem. Commun.*, **57**, 725-728 (2021).
2. M. Ozaki, T. Imai, T. Tsuruoka, S. Sakashita, K.-y. Tomizaki, K. Usui “Elemental Composition Control of Gold-Titania Nanocomposites by Site-Specific Mineralization Using Artificial Peptides and DNA.” *Commun. Chem.*, **4**, 1 (2021).
3. M. Ozaki, S. Yoshida, M. Oura, T. Tsuruoka, K. Usui “Effect of Tryptophan Residues on Gold Mineralization by a Gold Reducing Peptide” *RSC Adv.*, **10**, 40461-40466 (2020).
4. M. Ozaki, T. Tsuruoka, T. Imai, K.-y. Tomizaki, K. Usui “Construction of Visible Light Responsive Nanocatalyst by Mineralization Using Designed Peptide” *Peptide Science* 2019, 111-112 (2020).
5. K. Usui, M. Ozaki, A. Yamada, Y. Hamada, T. Tsuruoka, T. Imai, K.-y. Tomizaki “Site-Specific Control of Multiple Mineralizations Using a Designed Peptide and DNA” *Nanoscale*, **8**, 17081-17084 (2016).
6. M. Ozaki, K. Nagai, H. Nishiyama, T. Tsuruoka, S. Fujii, T. Endoh, T. Imai, K.-y. Tomizaki, K. Usui “Site-Specific Control of Silica Mineralization on DNA Using a Designed Peptide” *Chem. Commun.*, **52**, 4010-4013 (2016).

参考論文リスト

1. K. Usui, S. Yokota, M. Ozaki, S. Sakashita, T. Imai, K.-y. Tomizaki “Modification of the N-terminus of Calcium Carbonate Precipitating Peptide Affects Calcium Carbonate Mineralization” *Protein Pept. Lett.*, **25**, 42-47 (2018).

学会発表リスト

1. 異なる炭酸カルシウム沈殿能を有するペプチドの凝集沈殿におけるマイクロ波の影響

臼井 健二、○尾崎 誠、高坂 翼、富樫 浩行、有本 米次郎、裏鍛 武史、大沢 隆二、梅谷 智弘

第 14 回日本電磁波エネルギー応用学会シンポジウム、オンライン、2020 年 11 月

※ベストポスター受賞

2. 二種の人工ペプチドと DNA を用いたミネラルゼーションによる金-チタニア光触媒の元素含有比の制御

○尾崎 誠、鶴岡 孝章、富崎 欣也、臼井 健二

第 100 回日本化学会春季年会、東京、2020 年 3 月 (ポスター発表)

3. Construction of Visible Light Responsive Nanocatalyst by Mineralization Using Designed Peptide

○M. Ozaki, T. Tsuruoka, T. Imai, K.-y. Tomizaki, K. Usui

第 56 回ペプチド討論会、東京、2019 年 10 月 (ポスター発表)

4. 人工ペプチドを用いた位置特異的ミネラルゼーションによる無機物ナノ構造体の作製とその応用展開

○尾崎 誠、今井 崇人、富崎 欣也、臼井 健二

第 51 回若手ペプチド夏の勉強会、北海道、2019 年 8 月 (口頭発表)

5. Shape and Elemental Composition Control for Synthesis of Gold-Titania Photocatalyst Using DNAs and Designed

Peptides

○M. Ozaki, T. Tsuruoka, K.-y. Tomizaki, K. Usui

26th American Peptide Symposium, USA, June 2019 (ポスター発表)

6. 無機ナノ構造体の分子ロボットへの実装を指向した DNA とペプチドによる無機物沈殿制御
- 尾崎 誠、鶴岡 孝章、富崎 欣也、臼井 健二
- 第 2 回分子ロボティクス年次大会、東京、2019 年 3 月 (ポスター発表) ※若手研究奨励賞受賞
7. PNA 含有チタニア沈殿ペプチドとアクリジン含有金沈殿ペプチドを用いて金-チタニア複合ナノ構造体を作製する
- 尾崎 誠、臼井 健二
- 第 35 回関西地区ペプチドセミナー、滋賀、2018 年 12 月 (ポスター発表) ※優秀ポスター賞受賞
8. Photocatalytic Gold-Titania Nanoarchitecture by Mineralization Using Designed Peptides and DNA
- M. Ozaki, T. Tsuruoka, K.-y. Tomizaki, K. Usui
- 10th International Peptide Symposium, Japan, November 2018 (ポスター発表)
9. Gold-Titania Nanocatalyst Generated by Mineralization Using Two Artificial Peptides with DNA
- M. Ozaki, Y. Hamada, K.-y. Tomizaki, K. Usui
- 35th European Peptide Symposium, Ireland, August 2018 ※Bursary 受賞
10. ペプチドを用いた金、チタニアのミネラルゼーション制御による可視光励起性光触媒の構築
- 尾崎 誠
- 第 2 回ナノバイオ甲龍会、兵庫、2018 年 8 月 (ポスター発表) ※奨励賞受賞
11. 二種の人工ペプチドを用いたミネラルゼーションによる金-チタニア複合ナノ構造体の作製
- 尾崎 誠、坂下峻吾、今井崇人、鶴岡孝章、浜田芳男、富崎欣也、臼井健二
- 日本化学会第 97 春季年会、神奈川、2017 年 3 月 (口頭発表)

12. ペプチドを用いたミネラルゼーションによる二種の無機物から成るナノ構造体の作製と応用

○尾崎 誠、坂下 峻吾、白井 健二

第 33 回関西地区ペプチドセミナー、大阪、2016 年 11 月 (ポスター発表) ※奨励賞受賞

13. Construction of Nanocomposites by Multiple Mineralization Using DNAs and Designed Peptides

○M. Ozaki, Y. Hamada, T. Imai, K.-y. Tomizaki, K. Usui

第 53 回ペプチド討論会、京都、2016 年 10 月 (ポスター発表)

14. Construction of Organic-Inorganic Nanostructures by Site-specific Precipitations on DNAs Using Artificial Peptides

○M. Ozaki, T. Imai, K.-y. Tomizaki, K. Usui

CBI 学会 2016 年大会、東京、2016 年 10 月 (ポスター発表)

15. 人工ペプチドと DNA を用いた二種の無機物の沈殿による有機-無機ナノ構造体の形状制御

○尾崎 誠、山田 葵、富崎 欣也、白井 健二

第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、石川、2016 年 9 月 (ポスター発表)

16. ペプチドを用いたカルシウムのミネラルゼーションにおけるマイクロ波の影響

○圓東 那津実、尾崎 誠、有本 米次郎、裏鍛 武史、大沢 隆二、富樫 浩行、皆木 幸一、白井 健二

第 9 回日本電磁波エネルギー応用学会シンポジウム、東京、2015 年 11 月 (ポスター発表)

※ベストポスター賞受賞

17. PNA Peptide for Site-Specific Mineralization of Two Different Inorganic Compounds Using DNAs

○M. Ozaki, N. Endo, A. Yamada, T. Imai, K.-y. Tomizaki, K. Usui

第 52 回ペプチド討論会、神奈川、2015 年 11 月 (ポスター発表)

18. 設計ペプチドを用いた無機物の位置特異的ミネラル化制御による有機 - 無機ナノ構造体の構築

○尾崎 誠、臼井 健二

第 47 回若手ペプチド夏の勉強会、長野、2015 年 8 月 (口頭発表)

19. 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

○尾崎 誠、圓東 那津実、西山 浩人、山田 葵、鶴岡 孝章、富崎 欣也、臼井 健二

日本化学会第 95 回春季年会、千葉、2015 年 3 月 (口頭発表)

20. 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

○尾崎 誠、臼井 健二

第 31 回関西地区ペプチドセミナー、大阪、2014 年 11 月 (ポスター発表)

21. 人工ペプチドを用いて位置特異的沈殿制御を行いダンベル型シリカ-カルシウムナノ構造体を作製する○

○尾崎 誠、山田 葵、熊野 未里、鶴岡 孝章、臼井 健二

第 46 回若手ペプチド夏の勉強会、京都、2014 年 8 月 (ポスター発表)

※優秀ポスター賞受賞

受賞歴

1. 第13回日本電磁波応用学会シンポジウム、オンライン、2020年11月 (ポスター発表)
ベストポスター賞受賞
2. 第2回分子ロボティクス年次大会、東京、2019年3月 (ポスター発表) 若手研究奨励賞受賞
3. 日本ペプチド学会、2018年3月 トラベルアワード受賞
4. 一般財団法人丸文財団、2018年2月 国際交流研究助成採択
5. 第35回関西地区ペプチドセミナー、滋賀、2018年12月 (ポスター発表) 優秀ポスター賞受賞
6. 35th European Peptide Symposium、Ireland、August 2018 Bursary 受賞
7. 第2回ナノバイオ甲龍会、兵庫、2018年8月 (ポスター発表) 奨励賞受賞
8. 第35回公益財団法人村田学術振興財団、2018年6月 海外派遣援助採択
9. 第33回関西地区ペプチドセミナー、2016年11月 (ポスター発表) 奨励賞受賞
10. 第9回日本電磁波エネルギー応用学会シンポジウム、東京、2015年11月 (ポスター発表)
ベストポスター賞受賞
11. 第46回若手ペプチド夏の勉強会、2014年8月 (ポスター発表) 優秀ポスター賞受賞