



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Control of Self-Assembly Using Multiple Modified Amyloid Peptides for Functionalized Nanowires and Nanocircuitry [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	坂井, 公紀
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第11142号
Issue Date	2013-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53911
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroki_Sakai_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 坂井 公紀

学 位 論 文 題 名

Control of Self-Assembly Using Multiple Modified Amyloid Peptides for Functionalized Nanowires and Nanocircuitry

(複数の修飾アミロイドペプチドを用いる機能化ナノワイヤーおよびナノ回路のための自己組織化制御)

近年、分子の自己組織化に基づくボトムアップ型戦略が、機能性ナノ材料の創製において非常に注目されている。その中でも、多様な機能化ナノワイヤーの効率的な作製法の開発は、センサーなどのナノデバイス創製のために極めて重要である。アミロイドペプチドは、自己組織化により幅数 nm、長さ数 μm オーダーの安定で剛直なナノワイヤー構造をもつアミロイド線維を形成する。この自己組織化能と、機能修飾が容易なペプチドの性質から、アミロイドペプチドは機能化ナノワイヤー作製のためのビルディングブロックとして期待されている。しかしながら、アミロイド線維形成には非常に複雑なメカニズムが関与するため、形成されるナノワイヤーの長さ・幅・均一性などの構造制御が困難である。さらに、アミロイドペプチドへの機能化修飾部位の付加は、自己組織化をより複雑化し、構造制御を更に困難とするばかりでなく、しばしば線維形成自体の阻害をも引き起こす。このことから、アミロイド自己組織化の効果的な制御法、およびその制御メカニズムの解明が強く求められている。ボトムアップ型ナノデバイス創製には、機能化ナノワイヤーのパターンを作製し、ナノ回路を構築することが不可欠であるが、これもまた実現困難であり、重要な研究課題となっている。

当研究室ではこれまでに、アミロイドペプチドの N 末端への 3 アミノ酸残基付加が、線維構造および線維形成能を大きく変化させることを見出だしており、これらの修飾ペプチドを、構造制御アミロイドペプチド (SCAP) と命名した。本研究では、自己組織化制御に基づくナノ材料開発を目指し、複数の SCAP をヘテロ混合することにより、効果的な自己組織化制御を可能とする混合 SCAP 法を開発した。そして、この混合 SCAP 法に基づき (1) 機能化ナノワイヤーの形成制御、(2) 自己組織化制御メカニズムの解明、および (3) ナノワイヤーのパターン化法の開発を実施した (図 1)。

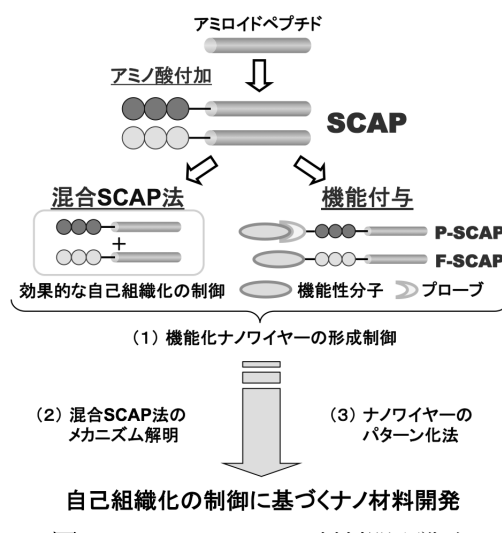


図 1 SCAP によるナノ材料開発戦略

序章に続く第二章では、混合 SCAP 法による機能化ナノワイヤー形成の制御を実施した。アミロイドペプチドとしてトランスサイレチンタンパク質由来の TTR(105-115)ペプチド (YTIAALLSPYS-NH₂) を選択し、その N 末端に 3 残基の Lys および Glu を付加した K₃-TTR および E₃-TTR を化学合成した。これらのペプチドを混合 SCAP 法により線維形成させたところ、非常に興味深いことに、線維伸長が著しく促進され、40 μm を大きく超える極めて長

い線維を形成した。これは、これまでで最大のアスペクト比（長さ/高さ >8000）を有しており、ナノワイヤー材料として魅力的である。次に、機能化ナノワイヤー形成のため、SCAP の N 末端に様々なプローブ分子（ビオチン/ α リボ酸/マレイミド/アジド）や機能分子（テトラメチルローダミン）を修飾した、プローブ化 SCAP（P-SCAP）および機能化 SCAP（F-SCAP）を合成した。これらのペプチドはいずれも単独では線維を形成しない、または非常に不均一な線維を形成したが、混合 SCAP 法を用いることにより、P/F-SCAP を含まない場合と極めて類似した構造を有する線維を形成した。これらのことから、混合 SCAP 法により、修飾アミロイド線維の形成能および構造を効果的に制御可能であることが示された。形成したプローブ化線維上へは、特異的結合能によりアビジン磁気ビーズ、金ナノ粒子、Cys またはアルキン有する機能性ペプチドを配置し、機能化することに成功した。また、バイオミネラリゼーションを組み合わせた無機ナノワイヤー形成法を確立した。

第三章では、混合 SCAP 法の長鎖線維形成メカニズムの解明を実施した。このために、自己組織化の各過程におけるアセンブリの構造解析を行った。イオンモビリティ質量分析法（IM-MS）を用い、オリゴマー形成過程の解析を実施した結果、混合 SCAP では、ヘテロオリゴマーの形成を介し「伸展型構造をもつ高次オリゴマーの形成能」というユニークなオリゴマー化特性を与えることが明らかになった。Seeding による線維形成を AFM で観察した結果、混合 SCAP 法による伸長促進効果が核形成に非依存的であり線維伸長過程に特異的に働くことが示唆された。線維伸長過程の線維構造を詳細に解析したところ、混合 SCAP では、一般的なアミロイド線維形成で常に観察されるプロトフィブリル中間体が全く形成されず、成熟した線維構造のみが存在していた。

以上の構造解析に基づき、混合 SCAP 法による線維伸長促進メカニズムを提案した。IM-MS で見られた伸展型オリゴマー構造は線維中の β コンフォメーションと等価である。したがって、混合 SCAP の伸展型オリゴマー形成能は、線維伸長末端に付加したペプチドの β 構造への変化を誘起し、成熟過程を著しく加速させることで線維伸長を促進する。同時に、高次オリゴマーの形成能が、安定的な線維伸長効果を与える。このような速度論的・熱力学的効果により、最終的に長鎖線維構造が形成される。これは、「ペプチドのオリゴマー化特性が、伸長段階特異的に効果を与えることで線維構造に寄与する」という新規のメカニズムである。

第四章では、ナノワイヤーのパターン化を目的とし、線維の配向・配置の制御法の開発を実施した。高さ 0.2 mm、幅 1 mm、長さ 10-20 mm の単純な流路を基板上に構築し、水の Flow を発生させながら線維を基板上へ吸着させることにより、長鎖の機能化線維を目的の方向へ配向制御することを可能とした。また、混合 SCAP 法により形成させた金ナノ粒子特異的な線維を超音波破碎して Seed とし、基板上の金ナノ粒子を標的とすることにより、線維を単一ナノ粒子から形成させる線維の伸長開始点の制御に成功した。本手法は、異方性材料やナノ電極間配線へ応用可能であると考えられる。

以上、本研究により開発された混合 SCAP 法は、自己組織化制御を基盤とした効果的な機能化ナノワイヤー形成・ナノワイヤー構造制御・ナノワイヤーのパターン化に極めて有用であることが示された。本成果により、ナノ電子デバイスやバイオナノ材料などの幅広い分野で利用可能な機能化ナノワイヤーの調製が可能であると期待される。また、混合 SCAP 法を進展させ、より高度に自己組織化を制御することにより、自己組織化型ナノ材料およびナノデバイスの開発への新規アプローチが確立されると期待される。一方、アミロイド線維形成は、アルツハイマー病を始めとする、数多くの重篤な疾患にも関与している。近年の研究により、細胞毒性を示す種は、成熟線維ではなくオリゴマーやプロトフィブリル中間体であることが示されている。したがって、本研究で解明された、混合 SCAP による線維形成の成熟過程促進メカニズムは、有効な治療戦略の開発に繋がる可能性が期待される。