



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on Silver Nanostructures Formed through Oligomerization and Orientation of Biomineralization Peptides [an abstract of entire text]
Author(s)	坂口, 達也
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第11917号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59005
Type	doctoral thesis
File Information	Tatsuya_Sakaguchi_summary.pdf



学 位 論 文 内 容 の 要 約

博士の専攻分野の名称 博士（理学）

氏名 坂口 達也

学 位 論 文 題 名

Study on Silver Nanostructures Formed through Oligomerization and Orientation of Biomineralization Peptides
(バイオミネラリゼーションペプチドの多量体化と配向化によって形成される銀ナノ構造体に関する研究)

無機ナノマテリアルはナノサイズとは異なる性質を示し、サイズや形状が大きくその機能に影響を与える。特に銀ナノマテリアルは触媒活性や高い導電率、特異な光学活性を有しており、高機能材料として知られている。そのため、銀ナノマテリアルの応用には詳細な構造制御が必須である。さらに近年、銀ナノマテリアルによる癌細胞毒性や、HIV ウイルスの新たな細胞への感染阻害などの生理活性が注目を集めている。しかし、銀ナノマテリアルの生理活性とナノ構造との相関についての報告は少なく、多くの点が不明である。

ナノ構造制御法は、材料を削ることでナノ構造を作成する「トップダウン式」と、原子・分子の組み立てによってナノ構造を作成する「ボトムアップ式」と大きく2種類に分けることができる。トップダウン式ナノ構造制御は精密なサイズと形状の制御を可能とし、現在のナノ構造制御法の主流となっている。しかし、トップダウン式構造制御は、非常に高い時間的・費用的コストが必要であることから、新たなナノ構造制御法としてボトムアップ式手法が注目を集めている。

現在最も効率的なボトムアップ型ナノ構造制御は、特異的結合能を有した界面活性剤によるナノ結晶の成長制御である。界面活性剤が、成長過程にあるナノ結晶の特定面に結合することで結晶成長方向を調整することによってナノ構造制御を達成している。そのため、界面活性剤の結合能および特異性はナノ構造制御能に直接的に関与するが、任意の機能を持たせた界面活性剤の設計は未だに挑戦的課題である。

生体分子を用いた硬質形成であるバイオミネラリゼーションはこの課題を克服するための有望な手法である。生体分子は、ファージディスプレイをはじめとした分子進化的手法によって特定の構造を標的とするバイオミネラリゼーションペプチドをスクリーニング可能である。現在までに、特定の白金結晶面を認識するペプチドを用いることで、生じる結晶構造を制御可能であることが報告されている。

そこで本研究では、抗癌活性に対する銀ナノ構造の解析から銀ナノプレートが高い抗癌活性を有しており、癌治療への応用として有望な銀ナノ構造体であることを示し、効果的な銀ナノプレート作成法の開発を通じたナノ構造制御機構の解明を目的として、バイオミネラリゼーションペプチドの多量体化を介した配向制御がその結合特異性およびナノ構造制御能に及ぼす影響を解析した。

本学位論文は、全5章より構成されている。第一章では総括的な序論として研究の背景および目的を述べている。第二章では、銀のナノ構造と生理活性との相関の解析を目的とし、球状およびプレート状銀ナノ構造体のヒト前骨髄球性白血病細胞株 HL-60 に対する抗癌活性を解析した。銀ナノ構造体の添加はその形状に関わらず、HL-60 細胞のアポトーシスを誘導したが、プレート状銀ナノ構造体は球状銀ナノ粒子に比べ高い細胞増殖抑制能

を示した。一方、2種の銀ナノ構造体の細胞内局在を比較した結果、共に細胞質内に分布しており、差は見られなかった。そのため、2種の銀ナノ構造体は同じ機構で細胞増殖を抑制しているが、その効率がナノ構造に依存していると考えられる。銀ナノ粒子による抗癌活性は、活性酸素種（ROS）の生産が強く関連していると報告されている。また、銀がROSを生産する際には、酸素分子の銀表面への化学吸着が必須であるが、その吸着効率が表面の結晶構造によって異なることが報告されている。銀ナノプレートは、その表面の大部分が{111}面であり、酸素の吸着効率が最も高いと報告されている結晶面である。そのため、銀ナノプレートは効率的にROSを生産することによって、高い抗癌活性を有したと考えられる。以上の結果から、ナノマテリアルの生理活性に対するナノ構造の重要性と、銀ナノプレートの有用性を示した。

第三章では、バイオミネラリゼーションペプチドが多量体を形成することによって、その結合能および特異性が増強されることを明らかにした。銀に対するバイオミネラリゼーションペプチドであるTBPは、p53四量体形成ドメインペプチドを介した四量体（TBP-p53Tet）を形成することによって、銀ナノプレートに対して強い結合を示すことが見出されたが、単量体変異体（TBP-p53Mono）では銀ナノプレートに対する特異性は見られなかった。この結果から、バイオミネラリゼーションペプチドの標的に対する結合特異性は、多量体形成によって増強されることが明らかとなった。さらに、銀ナノ結晶成長過程にTBP-p53Tetを加える事によって、銀ナノプレートの形成率が有意に増加した。本研究は、多量体形成がバイオミネラリゼーションペプチドの特異性を増強することを初めて明らかにした。この結果から、バイオミネラリゼーションペプチドによるナノ構造制御には、ペプチド配列のみならず、バイオミネラリゼーションペプチドの立体的配置が重要であることを示した。

第四章では、多量体化がバイオミネラリゼーションペプチドにおよぼす効果の一般性の検証とより詳細な解析を行った。その結果、多量体化バイオミネラリゼーションペプチドによるナノ構造制御には、ペプチドの価数だけではなく配置、特に対称性が重要であることを示した。多量体形成ペプチドとして、多量体数に関わらず画一的な多量体構造を形成するcoiled-coilペプチド（CC）を用いることによって、同一平面上に2から4個のTBPを配置した（TBP-CC(Di), TBP-CC(Tri), TBP-CC(Tet)）。各TBP-CCペプチドを用いて銀ナノ構造体の形成を行った結果、TBP-CC(Tri)が最も高い銀ナノプレート形成能を示した。多量体中におけるTBPの数が3価であるTBP-CC(Tri)が4価のTBP-CC(Tet)よりも高いナノ構造制御能を示したことから、TBP-CC(Tri)におけるTBP配置が最適化されていることを示唆する。この結果から、バイオミネラリゼーションペプチドの配向における対称性に着目した構造制御モデルを提案する。TBP-CC(Tri)中においてTBPは、三角形の頂点に配置されており、三重回転対称を有している。TBP-CC(Tet)においては、四角形の頂点にTBPは配置されており、四重回転対称を示す。一方、TBPの結合標的だと考えられる銀{111}面の原子配置は六重回転対称を有しており、三重回転対称を内包している。そのため、TBP-CC(Tri)中のTBPは全てが同様の形式で銀{111}面に結合可能であり、高いナノ構造制御能を示したと考えられる。

以上、本研究により、バイオミネラリゼーションペプチドの多量体化を介した配向制御によって、バイオミネラリゼーションペプチドの標的に対する結合特異性が増強され、ナノ構造制御能が向上することが明らかとなった（図1）。本研究で得られた知見は高い一般性を有しており、生体分子を用いたナノ構造制御の発展に大きく貢献することが期待される。

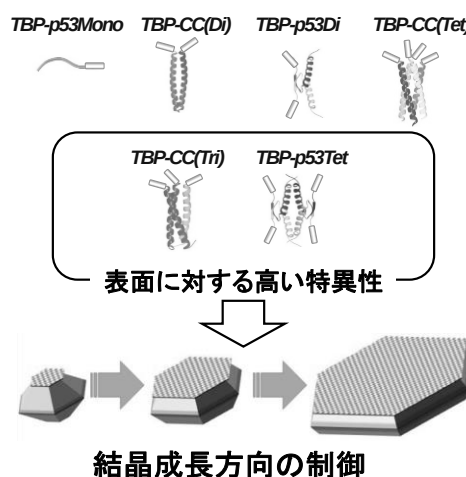


図1 バイオミネラリゼーションペプチドの多量体化と配向化によるナノ構造制御