

# ペプチド核酸含有ペプチドを用いた無機物沈殿によるナノ粒子の作製と精製

## Synthesis and purification of inorganic nanoparticles by mineralization using artificial peptides with peptide nucleic acids

甲南大学フロンティアサイエンス学部 准教授 臼井 健二  
FIRST (Faculty of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology),  
Konan University, Kenji Usui

### 要旨

本研究では、様々な無機物凝集沈殿能を有するペプチドを用い、これを核酸と、ペプチド核酸 (PNA) 含有ペプチドを配置したマイクロビーズを用いて特異的に結合させアフィニティ精製を行う。本研究では金を題材とし、無機物沈殿により生成された金粒子のうち、形の整った金粒子のみを精製・濃縮できるシステムの確立を目指した。用いた金沈殿ペプチドは、還元剤を用いずに金ナノ粒子の生成が可能であった。また、ペプチドの濃度を変化させることで粒子サイズの制御も可能であった。さらに核酸と核酸塩基を側鎖に持つペプチドである PNA を配置したマイクロビーズを用いることにより、ペプチドにより作製された金粒子の回収・精製が可能であることが示された。本システムが確立できれば、還元剤を使用しない、環境にやさしい金ナノ粒子の作製が可能となると同時に、回収、精製も可能となる。したがって、本システムは、有力な次世代の無機物ナノ粒子の合成法、回収法として、材料、環境分野など広く産業界に提案できる手法であると考えられる。

### 1. はじめに

近年、有機化学と無機化学を融合させた技術による材料創製研究が急速に発展している。さらなるボトムアップ技術の向上による次世代材料開発には、バイオミネラリゼーションを模倣した、制御された無機物のナノ凝集沈殿も有力な手法となる。本研究では、様々な無機物凝集沈殿能を有するペプチドを用い、これを核酸と、人工ペプチドを配置したマイクロビーズを用いて特異的に結合させ、アフィニティ精製を行うことで、ペプチドにより生成された形の整った無機物粒子のみを精製・濃縮できるシステムの確立を目指す。本研究の基礎技術である、1 種類の位置特異的沈殿手法は既に構築できている [1, 2]。この知見を活かし、本研究においても、ペプチドと核酸の特異的結合には、核酸塩基を側鎖に持つペプチド核酸 (PNA) を用いた核酸との相補的相互作用や、アクリジンを用いた核酸の二重鎖にインターカレートする特異的相互作用を利用する。本システムは、こ

れまで困難であった、無機物沈殿後における意図した構造体の精製・濃縮が可能となる技術である。これを応用すれば、産業廃棄物などからのリサイクルの場において、複数の異種金属が混在した溶液からの回収と同時に、付加価値の高い、均一なサイズ・形状のナノ粒子の作製が可能となり、ナノ材料工学における大きなブレイクスルーとなると考えられる。

本研究では、無機物沈殿・濃縮モデルとして金のみを扱ったが、ペプチドの配列さえ変更すれば、自在に他の無機物においても沈殿・精製・濃縮が可能となる手法である。また、無機物をナノレベルで、形状を整えられ、精製・濃縮後も DNA 折り紙技術などを利用すれば、無機物を自在にブロックのように組み立てることができる点で、本手法は斬新な着想の方法論で、ナノ材料工学における大きなブレイクスルーとなると考えられる。社会・産業面では、本手法により、自在な無機物ナノ粒子の作製ができ、今まで構築できなかったような、機能性ナ

ノ構造体、ナノ材料が創製できる可能性があり、世界でも類を見ない、日本発のナノバイオ材料産業の基盤になると考えられる。

## 2. 実験方法

### 2.1 ペプチド、PNA-resin の合成

ペプチドの合成は Fmoc(9-fluorenylmethyl-oxy-carbonyl)固相合成法[3]にて行った。4 当量の Fmoc アミノ酸誘導体や PNA モノマー、カップリング試薬は HATU (1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate)を用いて、合成を行った。アクリジンは、樹脂上で導入を行った。アクリジンを配置する Lys の保護基は Mtt (4-Methyltrityl)基を使用し、Fmoc-Lys(Mtt)-OH を TentaGel S RAM resin にカップリング後、Mtt 基の除去 (3 % TFA(trifluoroacetic acid) / 5 % TIS (Triisopropylsilane) / 92 % DCM) を行った [4]。続いて、4 当量の 9-Acridinecarboxylic Acid を用いて通常のペプチド合成と同様に反応させた。その後、ペプチドの伸長を行い、目的のペプチド配列を合成した。合成終了後、2% MilliQ / 2% TIS / 2% thioanisole / 94% TFA を加え、室温で 1 時間反応させることで脱保護、脱樹脂を行った。また、HPLC (GL7410; GL7450、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、アミノ酸分析にて、同定した。

PNA-resin の合成は TentaGel S NH<sub>2</sub> resin を使用して、同様に Fmoc 固相合成法にて行った。合成後、脱保護を行い、目的 resin を得た。脱保護条件は、4.5 % MilliQ / 4.5 % TIS / 91 % TFA で、室温で 2 時間反応させた。その後、脱保護用 TFA 溶液、続いて純水、DMF、クロホルムなどで樹脂の洗浄を行った。

### 2.2 AuBP1-Acridine のみの金のミネラルリゼーション

終濃度が AuBP1-Acridine 1~250  $\mu$ M、塩化金酸 100  $\mu$ M、全量が 400  $\mu$ L となるように MilliQ でメスアップし、室温で 24 時間反応させた。

### 2.3 AuBP1-Acridine-DNA 複合体の金のミネラルリゼーション

あらかじめアニーリングによって作製した 5.0  $\mu$ M 二本鎖 DNA に終濃度が AuBP1-Acridine 25  $\mu$ M、塩化金酸 100  $\mu$ M とし、全量が 400  $\mu$ L となるように MilliQ でメスアップし、室温で 24 時間反応させた。

### 2.4 AuBP1-Acridine-DNA-PNA-resin 複合体の金のミネラルリゼーション及び金の回収

まず、5.0  $\mu$ M 二本鎖 DNA に終濃度が AuBP1-Acridine 25  $\mu$ M になるように MilliQ でメスアップした。室温で 30 分間静置した。次に、ペプチド合成用の小カラムに PNA-resin を秤量し、NMP(N-methylpyrrolidone)で膨潤させた。その後、NMP を除去し、MilliQ で洗浄した。その後、PNA-resin に AuBP1-Acridine-DNA 複合体溶液を添加し、アニーリングを行った。アニーリング後、反応溶液をろ過して、MilliQ で洗浄した。以上の操作で作製した AuBP1-Acridine-DNA-PNA-resin 複合体に 100 $\mu$ M 塩化金酸を加え、室温で 24 時間反応させた。24 時間後、反応溶液をろ過した。続いて MilliQ で 5 回洗浄後、8 M 尿素を加えてあらかじめ 120  $^{\circ}$ C に温めておいたヒートブロックにカラムを入れ、3 分間インキュベートを行うことにより熱融解を行った。その後反応溶液をろ過し、MilliQ で 5 回洗浄した。

### 2.5 走査型電子顕微鏡(SEM)観察

金のミネラルリゼーションを行った resin サンプルを、カーボンテープ (日新 EM) を貼り付けた SEM 試料台に載せ、オスミウムコートを行った。SEM は JSM-7001FA (JEOL) を用いて、加速電圧 15 kV で観察を行った。

### 2.6 UV-VIS 測定

金還元の時変化を測定する場合には UV ディスPOSEL (東京硝子) を使用し、Shimadzu UV-1700 分光光度計を用いた。DNA 回収実験においては超微量分光光度計 NanoDrop One

(サーモフィッシャーサイエンティフィック)を使用した。

## 2.7 原子間力顕微鏡(AFM)測定

サンプルをマイカに滴下後 3 分間静置し、ろ紙を用いて溶液を吸い取った。次に、MilliQ で洗浄を行った。洗浄後、窒素乾燥を行いある程度乾燥させた後、真空ポンプを用いて減圧乾燥を行った。AFM は Multi Mode Scanning Probe を使用し、タッピングモードにより観察した。

## 2.8 動的光散乱 (DLS) 測定

サンプルをセル (Malvern Disposable Solvent Resistant Micro Cuvette (ZEN0040)) に入れ、DLS (Malvern ZETA Sizer-ZEN3600) にて粒子径の分布を測定した。

## 3. 実験結果

本研究では人工ペプチドを用いた無機物沈殿ナノ粒子を作製し、その粒子の精製・濃縮を試みた。研究期間内では、次の 3.1~3.5 を行った。

### 3.1 ペプチドおよび核酸の設計・合成

まず、本研究で用いる PNA-resin、DNA、AuBP1-Acridine の設計および合成を行った。複合体形成の概略図は図 1(a)のとおりである。

無機物沈殿ペプチドにはこれまで、DNA に相補的結合を見込める PNA 配列を配置してきたが、本研究では、金を題材に異方性を持つ粒子の獲得を目指すため、二本鎖 DNA にインターカレートするアクリジン配置した人工ペプチド AuBP1-Acridine (図 1 (b)) を設計・合成することにした。なお、金沈殿配列は、金還元能を有する AuBP1[5]を選択し、還元剤を必要としない、環境にやさしいシステムの構築を模索した。

続いて DNA の設計を行った。DNA2 の 3'側 20 mer を DNA1 と、5'側 10 mer を PNA と相補的になるようにし、残り 30mer をスペーサーとして設計した。また、それぞれの DNA は自己相補鎖を形成しないように設計した。なお、

以上の DNA 配列は北海道システムサイエンスから購入した。

さらに、PNA-resin の設計を行った。DNA2 の 5' 側 10 mer と相補的となるよう PNA 配列を設計した。Resin は、今回ひとまず、詳細な検討を省けるよう、ペプチド合成に使用する PEG 鎖を配置したポリスチレン樹脂である NH<sub>2</sub>-PEG-Resin を用いて、通常のペプチド合成により、PNA 鎖を合成した。

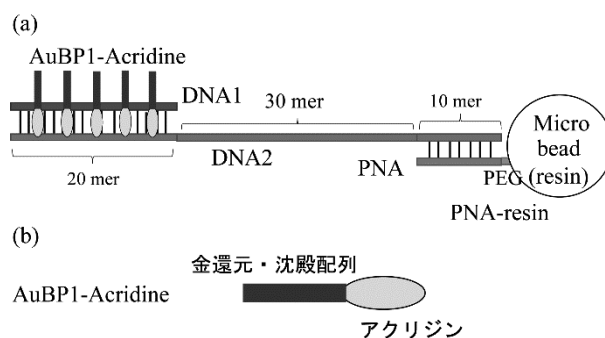


図 1 (a) 本研究で用いた PNA-resin、DNA、AuBP1-Acridine の複合体の概略図。(b) AuBP1-Acridine。

### 3.2 AuBP1-Acridine のみの金のミネラルゼーション

まず、AuBP1-Acridine のみで金の還元を行った。塩化金酸の濃度を 100  $\mu\text{M}$  に固定し、AuBP1-Acridine の濃度を 1~250  $\mu\text{M}$  と変化させて塩化金酸のみと比較した。添加条件で 25~250  $\mu\text{M}$  AuBP1-Acridine のとき、UV 測定において 520~540 nm 付近に SPR 由来の吸収ピーク、DLS、AFM 観察において粒径 5~20 nm の球状粒子が確認できた。また、AuBP1-Acridine の濃度を増加させることで、粒径が減少することが明らかとなった。これは AuBP1-Acridine の濃度を増加させることで、金の結晶成長反応よりも核形成反応の方が優位に進行したためと考えられる。

### 3.3 AuBP1-Acridine-DNA 複合体の金のミネラルゼーション

次に、DNA1 と DNA2 のハイブリダイゼーションを行い、AuBP1-Acridine-DNA 複合体を

作製した。この複合体のみを用いて、金のミネラリゼーションを行ったところ、反応開始直後から UV 測定において SPR 由来の吸収ピークが確認でき、金ナノ粒子の生成が示唆された。

### 3.4 二本鎖 DNA と PNA-resin のハイブリダイゼーション及び熱融解

二本鎖 DNA と PNA-resin のみを使用してマイクロビーズを用いた金の回収、精製が可能であるかのデモンストレーションを行った。PNA-resin に二本鎖 DNA を添加し、アニーリング後、フィルターろ過したろ液を分析したところ、結合しなかった DNA が 4 割程度算出されたことから、6 割がハイブリダイズできていることが示唆された。その後、熱融解を行ったところ 5 割程度が検出されたことから、結合した DNA の 9 割近くを回収することが可能であることが明らかとなった。以上より、DNA、PNA を用いた本システムは設計通りに、回収、精製が可能であることが期待できる。

### 3.5 AuBP1-Acridine-DNA-PNA-resin 複合体の金のミネラリゼーション

様々な回収手順を検討したが、現在、回収が可能となりそうな手順としては、AuBP1-Acridine-DNA-PNA-resin 複合体作製後に金のミネラリゼーションを行い、その後、熱融解を行い、回収する手順であった (図 2)。AuBP1-Acridine-DNA-PNA-resin 複合体で金のミネラリゼーションを行い、熱融解後の溶液の UV 測定を行ったところ、resin に結合させた複合体の全量のうち、6 割ほどを回収することができたことが示唆された。また、DLS による粒子径測定を行った結果、4  $\mu\text{m}$  程度の構造物が確認された。また AFM においても同様の構造物が観察された。現在、この構造物が金粒子であるか TEM-EDX、ICP-AES などの元素分析を行い、確認中である。

また、金のミネラリゼーションを行った AuBP1-Acridine--DNA-PNA-resin 複合体について、SEM 観察を行った。その結果、resin 上に金粒子の集合体と思われる構造体が生成して

いることが確認できたが、コントロールサンプルであるペプチドを配置していない DNA-PNA-resin 複合体では、このような構造物は確認できなかった (図 3)。

以上の結果から、本ペプチド AuBP1-Acridine が resin 上で設計通りに結合し、金のミネラリゼーションが実現できていることが示唆された。さらに、その複合体を熱融解により回収が可能であることが示唆された。

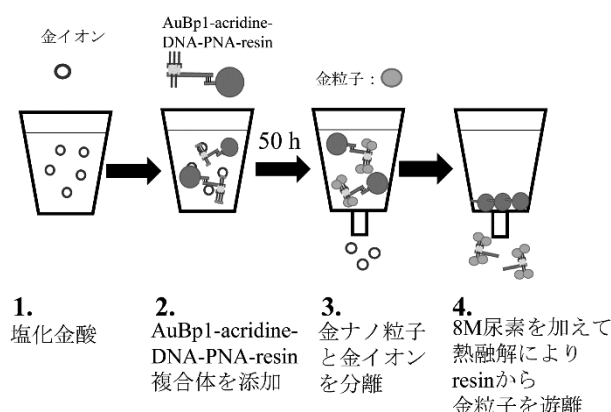


図 2 金ナノ粒子の作製と回収の手順

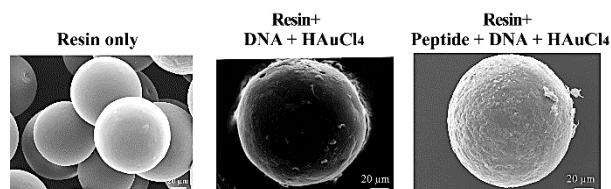


図 3 金のミネラリゼーションを行った AuBP1-Acridine-DNA-PNA-resin 複合体の SEM 観察

## 4. まとめ

AuBP1-Acridine のみの金のミネラリゼーションでは、還元剤を使用せずに金ナノ粒子の作製が可能であった。また、ペプチドの濃度を変化させるだけで粒子サイズの精密制御も可能であった。さらに DNA と PNA-resin を用いることにより、AuBP1-Acridine を介した金粒子の作製と同時に回収・精製が可能であることが示された。今後は、本システムのさらなる最適化を行うと同時に、ある応用目的に応じた特殊な形状の精密合成と回収・精製のデモンストレ

ーションを行い、本法の有用性を示していきたい。

本システムが確立できれば、還元剤を使用せずに金ナノ粒子の作製が可能であると同時に、回収、精製も可能であるため、有力な次世代の無機物ナノ粒子の合成法、回収法として提案できると考えている。

## 謝辞

本研究は甲南大学フロンティアサイエンス学部・研究科の尾崎誠氏、大浦真歩氏との共同研究です。

また、まだまだ課題は残るものの、このような発展性の期待できる本研究に、ご援助いただきました公益財団法人京都技術科学センターに深く感謝申し上げます。

## 参考文献

- [1] M. Ozaki *et al.*, *Chem. Commun.*, **52**, 4010-4013 (2016).
- [2] K. Usui *et al.*, *Nanoscale*, **8**, 17081-17084 (2016).
- [3] W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*; Oxford University Press: New York, 2000.
- [4] K. Usui *et al.*, *Mol. Divers.*, **8**, 209-218 (2004).
- [5] C. J. Munro *et al.*, *J. Phys. Chem. C*, **120**, 8917-18924 (2016).

## 研究成果発表

### 原著論文

- 1 . "Nanocontrolled Mineralization to Manufacture Gold-Titania Photocatalyst with Visible Light Excitation Using Artificial Peptides and DNA", Makoto Ozaki, Takahito Imai, Takaaki Tsuruoka, Shungo Sakashita, Yoshio Hamada, Kin-ya Tomizaki, Kenji Usui、執筆中

### 学会発表

1. 「核酸の相互作用とマイクロビーズを利用したペプチドのミネラルゼーションによる金

ナノ粒子の作製および精製」、大浦真歩、尾崎誠、浜田芳男、臼井健二、日本化学会第 99 春季年会 2019、2019 年 3 月 17 日

2. 「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、2019 年 3 月 14 日

### ※分子ロボティクス若手奨励賞受賞

3. 「レアメタル回収を指向したマイクロビーズと生体分子を用いるミネラルゼーション制御」、大浦真歩、尾崎誠、臼井健二、第 6 回 貴金属シンポジウム、2019 年 1 月 11 日

4. 「アクリジン含有 Au 還元ペプチドと PNA ペプチドを利用した Au ナノ粒子の作製・回収システムの構築」、大浦真歩、臼井健二、第 35 回 関西地区ペプチドセミナー、2018 年 12 月 22 日

5. 「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可視光励起性光触媒を作製する」、尾崎誠、臼井健二、第 35 回 関西地区ペプチドセミナー、2018 年 12 月 22 日

### ※優秀ポスター賞受賞

6. "Photocatalytic Gold-Titania Nanoarchitecture by Mineralization Using Designed Peptides and DNA", Makoto Ozaki, Takaaki Tsuruoka, Kin-ya Tomizaki, Kenji Usui, 10th International Peptide Symposium、2018 年 12 月 4 日～7 日

7. "Gold-Titania Nanocatalyst Generated by Mineralization Using Two Artificial Peptides with DNA", Makoto Ozaki, Kin-Ya Tomizaki, Yoshio Hamada, Kenji Usui, 35EPS(European Peptide Symposium)、2018 年 8 月 26 日～31 日

### ※奨励賞受賞