

《様式B》

研究テーマ

「生体基板への金属ナノ粒子配列制御戦略に基づくプラズモン励起型触媒の創製」

研究責任者	所属機関名	静岡大学
	官職又は役職	講師
	氏名	田代陽介
	メールアドレス	tashiro.yosuke@shizuoka.ac.jp
共同研究者 1	所属機関名	静岡大学
	官職又は役職	准教授
	氏名	渡部綾
共同研究者 2	所属機関名	静岡大学
	官職又は役職	助教
	氏名	佐藤浩平

(平成 29 年度募集) 第 30 回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1, 000 字程度)

本研究では、二酸化炭素変換触媒の創製を指向して、大腸菌線毛 (アミロイド) に複数種の金属ナノ粒子を自在に配列制御する技術の構築を目的とした。金属ナノ粒子は量子サイズ効果により特徴的な性質を発揮するため、触媒への応用が期待されている。金属ナノ粒子の表面プラズモン共鳴を利用することで光により触媒活性を向上できるが、その利用は触媒活性とプラズモン共鳴吸収の両方を有する金や銀粒子に限られている。光照射によるプラズモン効果の利用を拡張するためには、触媒活性本体とプラズモン共鳴を示す金属を自在に配列させる基盤技術の構築が不可欠である。

この課題を解決するために、自発的に凝集・配向するアミロイドを細胞外に分泌する大腸菌を生体基板製造装置として利用し、複数種の金属ナノ粒子を自在に配列させる世界初の新技术確立を目指した。具体的には、二酸化炭素分子を効率的に変換する触媒の創製を目指し、自己組織化したアミロイド上に触媒本体である Pt 粒子とプラズモン効果による触媒活性増強が期待される Ag 粒子を交互に配列させる手法を検討した。その結果、アミロイド上への Ag 粒子結合法を確立した。

本研究で対象とする反応は産業プロセスで排出された CO₂ 分子の削減と資源化利用の技術開拓に大きく貢献するため、低炭素社会構築の一助となり得る。本技術は、改変アミロイド中のアミノ酸を化学修飾させ金属粒子特異的なペプチドを介して金属粒子を配列させることから、将来的に様々な金属ナノ粒子の精密配列制御に適用可能である。また、光照射による電場形成で触媒促進が達成されれば、本反応系に限らず数多くの触媒反応への応用に展開できるため汎用性に優れている。さらに、表面プラズモン共鳴を利用可能な金属ナノ粒子交互配列の特徴を活かして、光電極や光センサへの応用展開が期待できる。

2. 実施内容および成果の説明

2-1 緒言

金属ナノ粒子は量子サイズ効果により、錯体やバルク金属では見られない特性を発揮する。金属ナノ粒子の表面プラズモン共鳴を利用することで、光照射により反応が駆動する“省エネルギーな”触媒反応プロセスの創生が期待できる。プラズモン効果の高い金属粒子として金や銀が知られているが、それらの金属を触媒として利用できる化学反応は限定されている (Christopher, Xin, Linic, *Nat. Chem.*, 2011 3:467-472)。プラズモン活性の高い金属 (Au、Ag など) により生じた強力な電場に触媒本体 (Pt、Ni など) を近接して配置させることができれば、光により生じたプラズモン活性を多様な化学反応を促進する触媒活性の向上に寄与すると作業仮説をたてた。特に金属ナノ粒子の間隔を狭めることで、金や銀で生じたプラズモン共鳴の触媒活性向上への利用が期待できるが、微小空間において規則的にナノ粒子を配列させる基板の創製には至っていない。

そこで本研究では、生体分子の特性を利用して複数種の金属ナノ粒子を自在に配列させる技術を確認し、光励起型ナノ粒子触媒を創製することを目的とした。金属ナノ粒子を精密に配列させる基板として、一方向に自己組織化する「アミロイド」から成る大腸菌線毛に着目した。アミロイドにペプチドを挿入あるいは結合させることにより、様々な分子の提示が可能である (Nguyen, Botyanszki, Tay, Joshi, *Nat. Commun.*, 2014 5:4945)。本研究では、プラズモン効果を示す Ag 粒子と触媒本体である Pt 粒子を、金属認識ペプチドを介して交互に配列させ、光照射で反応性が向上する触媒反応プロセスの創生を目指した (図 1)。

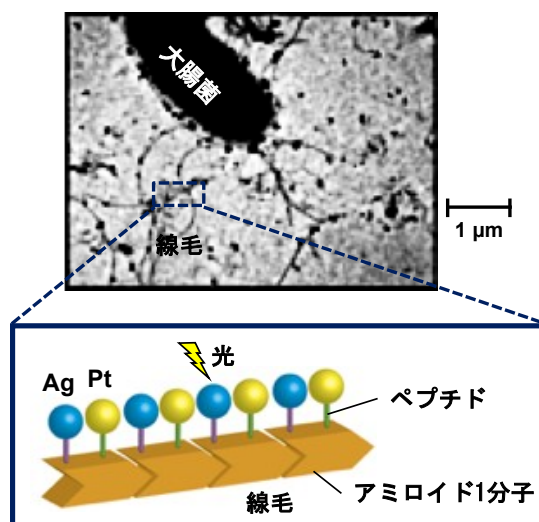


図 1. 大腸菌線毛への金属ナノ粒子配列

2-2 実験方法

2-2-1 微生物の培養と組換えアミロイドの発現

供試菌株として、大腸菌 *Escherichia coli* MG1655 株のアミロイド合成遺伝子 *csgA* が欠損された $\Delta csgA$ 株を用いた。プラスミド pTrc99A に Ag 吸着ペプチド (IRPAIHIPISH) タグを融合した CsgA を発現する遺伝子を当株に挿入した。コントロールとしてヒスチジンタグ融合 CsgA を発現するプラスミドを構築した。上記プラスミドを $\Delta csgA$ 株に形質転換し、0.1 mg/mL アンピシリンを含有した

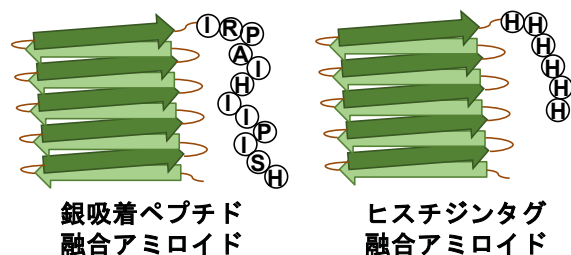


図 2. 大腸菌に発現させたタグ付きアミロイド

Congo red-YESCA 寒天培地 (10 g/L カザミノ酸、1 g/L 酵母エキス、20 g/L 寒天、25 ml/L Congo Red、5 mg/L Brilliant Blue G250) で培養した。また、*csgA* を発現させるために終濃度 1 mM となるようイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加した。大腸菌線毛へのナノ粒子結合の評価には、粒子径 20 nm ならびに 2 nm の銀ナノ粒子を使用した。ポリリジン処理したグリッドに細菌を吸着させ、1%リンタングステン酸によって生体試料の染色を行い、透過電子顕微鏡でナノ粒子とアミロイドの結合を観察した。

2-2-2 アミノ酸修飾剤の合成

メチオニン修飾剤としてオキサジリジン誘導体を 2-アミノエタノールとプロパルギルブロミドから合成し、生成物を質量分析により確認した。また、固相合成により銀に結合するアミノ酸配列を有するペプチドを合成し、生成物を ¹HNMR により確認した。モデル基質として Fmoc-Met-OH を用い、各試薬の結合を高速液体クロマトグラフ (HPLC) および質量分析により解析した。

2-3. 実験結果

2-3-1 アミロイド線毛へのペプチド導入

大腸菌線毛が金属ナノ粒子の基板となり得るかを検証するために、金属吸着ペプチドを線毛の構成成分である CsgA に組み込み、ナノ粒子の線毛結合性を確認した。銀への選択的吸着性があるペプチドとして、IRPAIHIPISH が知られている (Naik, Jones, Murray, McAuliffe, Vaia, Stone, *Adv. Funct. Mater.*, 2004 14:25-30)。上記ペプチドあるいはヒスチジンタグを C 末端に融合した CsgA をコードするプラスミドを構築し、*E. coli* MG1655 Δ *csgA* 株に形質転換した。細胞外に分泌されたアミロイドは Congo-red に吸着する特性を有する (Chapman, Robinson, Pinkner, Roth, Heuser, Hammar, Normark, Hultgren, *Science*, 2002 295:851-855)。Congo-red 含有寒天培地に形質転換体を培養したところ、コロニーが赤色を示したことから (図 3)、C 末端にタグを導入してもアミロイドの高次構造形成には影響しないことが示唆された。

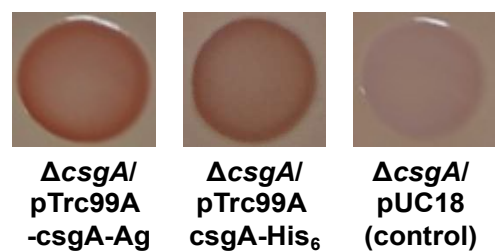


図 3. 大腸菌コロニーの Congo red による呈色

2-3-2 銀ナノ粒子のアミロイド吸着

銀吸着ペプチドが組み込まれた大腸菌線毛上に銀ナノ粒子を配列可能か検証するために、YESCA 寒天培地に生育した菌体と銀ナノ粒子の結合を透過電子顕微鏡で観察した。その結果、銀吸着ペプチドタグが導入された線毛上に 20 nm ならびに 2 nm の銀ナノ粒子の結合が見られた (図 4)。一方、ヒスチジンタグが導入された線毛上には銀ナノ粒子の結合は確認されなかったことから、大腸菌線毛の金属ナノ粒子配列基板としての有用性が示された。また、20 nm の銀ナノ粒子は分散して線毛に結合していたのに対し、

2 nm の銀ナノ粒子は凝集しており、線毛へ配列させる銀ナノ粒子のサイズとしては 20 nmの方が適していると考えられた。

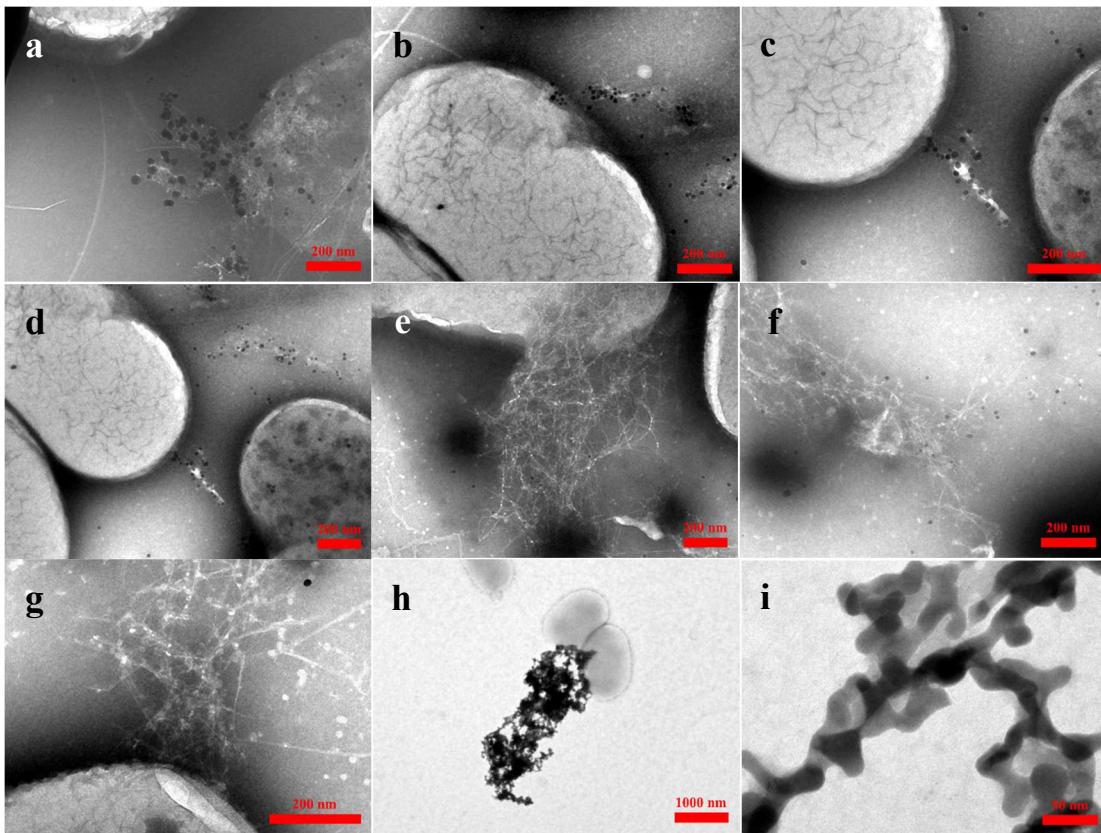


図4. 透過電子顕微鏡による銀ナノ粒子吸着観察 (a-d) $\Delta csgA/pTrc99A-csgA-Ag$ への 20 nm 銀ナノ粒子の結合 (e-g) $\Delta csgA/pTrc99A-csgA-His_6$ への 20 nm 銀ナノ粒子の結合 (h, i) $\Delta csgA/pTrc99A-csgA-Ag$ への 2 nm 銀ナノ粒子の結合

2-3-3 アミノ酸特異的修飾法の開発

次にアミロイド1分子に2種類の金属ナノ粒子を結合させる手法を検討した。これまでにアミノ酸選択的に化学修飾する手法が報告されている (Lin, Yang, Jia, Weeks, Hornsby, Lee, Nichiporuk, Iavarone, Wells, Toste, Chang, *Science*, 2017 355:597-602)。そこでアミロイド1分子中に1つずつ存在するメチオニン・トリプトファンにそれぞれ銀粒子・プラチナ粒子を結合させることを目指した。まずアミロイド上のメチオニン側鎖に銀認識ペプチドを結合させるため、メチオニン修飾試薬を合成した。アジド基を導入したペプチドとクリックケミストリーにより結合させるため、アルキニル基を有するオキザジリジン誘導体を合成した (図5)。また、アジド基を導入した銀ナノ粒子結合ペプチド (IRPAIHIPISH) を合成し、その修飾ペプチドがオキザジリジン誘導体を介してメチオニンに結合可能なことを高速液体クロマトグラフィーならびに質量分析によって確認した。より迅速な反応を達成させるために、現在反応条件の最適化に取り組んでいる。

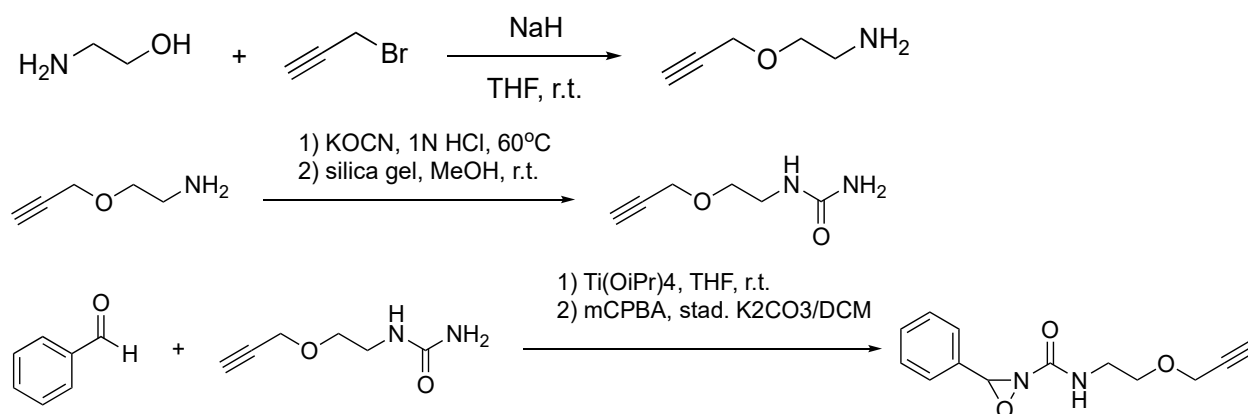


図5. オキサジリジン誘導体の合成

2-4 総括

本研究では、銀ナノ粒子吸着ペプチドをアミロイド分子に組み込むことで、金属ナノ粒子配列基板としての大腸菌線毛の有用性を示した。一種類の金属の線毛への結合を達成したが、二種類の金属を交互に配列させるためには、よりナノ空間における精密配列制御が必要であると考えられた。そこでアミノ酸選択的なナノ粒子結合に着目し、メチオニンに銀吸着ペプチドを結合させた。今後はその反応を利用して、2種類の金属を線毛上に配列させる基盤技術を構築する。さらに、遺伝子改変により2種類のアミノ酸位置を変更して金属ナノ粒子間隔を精密に制御し、光励起型ナノ粒子触媒の創製に挑戦する。

本研究の最終目標は、プラズモン効果の高い金属ナノ粒子とあらゆる化学反応に対して汎用性の高い金属ナノ粒子を生体材料を用いて微小空間で精密に配列させ、光を利用した環境低負荷な触媒反応を創製することである。本成果はその基盤技術確立に向けた第一歩であり、今後の本研究の継続により、産業技術への実用化を目指す。

謝辞

本研究は、静岡大学の渡部綾准教授、佐藤浩平助教との共同研究であり、上野想、平田望、田中晶子の各氏の協力により実施された。