

配向したヘリックスペプチド薄膜の調製と機能発現

(研究課題番号 12450372)

平成12年度～平成14年度科学研究費補助金 (基盤研究 (B) (2))

研究成果報告書

平成15年3月

研究代表者 木村 俊作

(京都大学 工学研究科 教授)

研究期間

平成12年4月～平成15年3月

研究代表者 木村 俊作 (京都大学工学研究科教授)

## 配向したヘリックスペプチド薄膜の調製と機能発現

研究経費

(研究課題番号 12450372)

平成12年度

平成13年度 3,500 千円

平成14年度 3,000 千円

計 10,000 千円

平成12年度～平成14年度科学研究費補助金 (基盤研究 (B) (2))

### 研究成果報告書

平成15年3月

研究代表者 木村 俊作

(京都大学 工学研究科 教授)

研究組織

平成12年4月～平成15年3月

研究代表者： 木村 俊作 (京都大学工学研究科教授)

研究経費

平成12年度 8,900 千円

平成13年度 2,900 千円

平成14年度 3,000 千円

計 14,800 千円

## 研究概要

急速に進展するテクノロジーを支えるには、新しい機能を発現する材料開発が必須である。この開発において、大きなウエイトを占めるのは、新規な規則構造を有する材料の設計と創出である。本研究では、新しい構造を有する材料開発の基礎として、素構造にヘリックスを形成するポリペプチド分子を選び、ポリペプチド分子が規則正しく配列した超薄膜の調製とその機能発現を目的としている。

機能性超薄膜の調整については、LB法による累積膜が多く研究されてきたが、官能基とジアルキル基あるいはポリマーとを組み合わせた両親媒性化合物を用いており、ジアルキル基あるいはポリマー部位は構造形成としての役割だけを果たしていた。また、その分子のコンホメーションは単一ではなく、ランダムである場合も多い。これに対して、本研究ではポリペプチド分子を素構造に選んでいる。これは、ヘリックス等の二次構造を形成するポリペプチド分子が、精緻な三次構造を有するタンパク質の素構造であることによる。このことは、二次構造を形成するポリペプチド分子が規則正しい分子集合体を構築できることを意味している。実際、安定にヘリックスを形成する、鎖長の揃ったポリペプチド分子を、空気/水界面に展開して単分子膜を調整すると、圧縮にともない液体状から固体状態への相転移が観測され、ポリペプチド分子の二次元結晶を得ることに成功した。これは、ポリペプチドが単一のコンホメーションを薄膜中でとっていることを意味する。さらに、ヘリックス構造をとるポリペプチドでは、ペプチド結合がヘリックス軸に沿って配向しているため大きなダイポールモーメントを有している。また、光捕集系タンパク質の解析等から示されるように、ポリペプチド分子は電子移動の触媒としての機能を持ち合わせている。これらのことは、ポリペプチド分子は単に構造形成材料としての役割だけでなく、誘電性材料、あるいは、電子移動を担う媒体として機能できることを意味する。

これまでに、幾つかのグループが金基版上でのポリペプチド分子薄膜の調製について報告しているが、分子の配向を基板法線方向に制御できた例は極めて少ない。本研究遂行者らは、ポリペプチド自身が自己集合することが重要と考え、ポリペプチド分子同士が並んだときにパッキングがよく、さらに、 $\alpha$ -ヘリックス構造が安定になるような分子設計を行った。このようなポリペプチド分子集合体形成能を活かすことで、金基版上で垂直に配向したヘリックスポリペプチド薄膜の調製に成功した。さらに、このような垂直配向ヘリックスポリペプチド薄膜は、ダイポールモーメントに基づく表面電位を形成することを見出し、また、分子が非中心対称に並ぶことから非線形光学二次効果を示すことを指摘した。また、発色基を結合したポリペプチド分子が電子移動を媒介するため、光照射により電流が流れる光電変換システムとなる知見を得ている。

本研究では、ヘリックスポリペプチドが基板に対して垂直に配向した薄膜を調製し、その表面電位形成、非線形二次光学効果、光電変換の機能について研究を展開する。このように、ナノメーターオーダーで構造が制御された分子集合体による超薄膜材料

の開発を行う。このためには、精密制御された分子設計・合成と分子の組織化が必要とされ、本研究はそのアプローチを示す上で意義深い。また、新しい構造を有し特徴的な物性を示す超薄膜材料の調製は、分子デバイス開発の基礎となるであろう。

本研究代表者は、平成7年度から9年度まで、文部科学研究費補助金 重点領域研究「分子系超構造の設計・創成」に参加し、「ヘリックス形成ペプチドの超薄膜調製と非線形効果」(研究経費 6,400 千円)の課題名のもとに研究を遂行した。この研究では、構造を精密に制御した分子集合体を調製して、新しい機能性材料を開発する基盤をつくることを目的とした。このためには、単一コンホメーションからなる分子配向を揃えて並べる必要がある。このような素構造に、本研究代表者はヘリックスポリペプチドを選んだ。ヘリックスポリペプチド分子は、タンパク質の高次構造を構成するユニットであることからわかるように、単一コンホメーションをとると同時に、集合体形成能の高い分子である。ところが、ポリペプチドにはパッキングのよい分子集合体となるとヘリックス構造がシート構造に変化してしまう問題があった。本研究代表者は、 $\alpha$ 、 $\alpha$ -2置換アミノ酸残基を含むポリペプチド分子がヘリックス構造を安定化し、シート構造への変性を抑圧する性質をもつことを明らかにし、このようなポリペプチド分子による分子組織化を試みた。例えば、このポリペプチド分子を空気/水界面に展開して圧縮すると、二次元結晶のヘリックスペプチド単分子膜となり、さらに、ヘリックス軸の界面での配向を制御できることを見出した。金表面上では、垂直配向のヘリックスポリペプチド薄膜を、Au-S 共有結合、錯体形成、イオン結合、の三種類のおとなる方法で固定化・調製することに成功した。また、水中においても、規則正しいヘリックスポリペプチド単分子膜からなるベシクルを初めて実現した。このように、ポリペプチド分子集合体形成を空気/水界面、金基板表面、水中などの様々な環境下で制御できる新しい方法論や分子システムを確立できたことは、ポリペプチド分子の自己組織化能を高める分子設計に大きく基づいており、重要な成果である。

配向を制御したポリペプチド薄膜には、多くの特徴的な機能が予想された。例えば、ヘリックスペプチドは、ペプチド結合がヘリックス軸方向に配向しており大きなダイポールモーメントを有する。このため、平行配向により大きな表面電位を生じ、焦電性材料となる。これまでには、大きなダイポールモーメントを有する有機分子の組織化による表面電位の測定例はなく、ここでのポリペプチド薄膜が最初の例となった。また、ポリペプチド分子は、分子内での水素結合のネットワークが伸びると超分子分極率が大きくなり、非線形光学効果を示す有機材料として有用であることを指摘した。このことから、中心対称性をもたない分子組織化により、非線形光学効果の大きい材料となる。一方、光合成系では光エネルギー捕集と電子移動により、効率よいエネルギー変換が行われているが、生体系での長距離電子移動については、through bond 説と through space 説、さらに電子の超交換を考えるなど、活発な議論がなされている。ポリペプチド分子は、タンパク質の局所的構造を切り出してきたモデル分子であり、電子移動の機構を解明するのに適している。実際、発色基を結合したヘリックスポリペプチド分子を金表面に固定し、光励起による電子移動を測定したところ、ポリ

ペプチド分子を金表面に固定化し、光励起による電子移動を測定したところ、ポリペプチド分子が電子移動の媒体として優れていることが明らかとなった。金電極表面でのヘリックスポリペプチド分子の組織化ダイポールによる電子移動の促進、光エネルギー捕集効率の向上、により、ポリペプチド薄膜は優れた光電変換システムになると期待される。

分子を組織化することで初めて実現できる機能が理論的には予測されてきたが、実際に分子システムを構築することは困難であった。ここでのヘリックスポリペプチド薄膜は、理論と実験をつなぐ分子システムとして極めて有用である。

## 研究方法

基板上に垂直配向のヘリックスポリペプチド薄膜を調製するが、期待する機能に応じて基板および基板への固定化方法を選択する必要がある。例えば、焦電性を調べるときに金基板を用いると金の結合におけるイオン分極や金からポリペプチド薄膜への電子の注入等が問題になり、ポリペプチドのダイポールの効果が相殺される。また、非線形二次光学効果の解析で金基板を用いると、金界面からの非線形二次効果がかなり大きく観察されてしまう。光電変換システムにおいても、金基板は光を吸収し望ましくない反応を引き起こす。これらの問題点を解決するため、基板として、従来の金に加え、ITO、ガラス、シリコンウエハー、PMMA フィルムを用いる。この中で、金、ITO、PMMA フィルムに固定化した場合、焦電性についての検討を行う。一方、ガラス、シリコンウエハー、PMMA フィルムに固定化したポリペプチド薄膜は、光透過性の良さや基板自信からの寄与が少ないことから、非線形二次光学効果の解析に用いる。金や ITO 基板などの電極上に固定化したポリペプチド薄膜は、光電変換システムに用いる。基板を変えた場合、ヘリックスポリペプチド分子の配向膜を調製する方法あるいは条件等が大きく異なるが、各基板に適した調製条件を、様々な化学的手段を検討して見出す。

基板へのポリペプチド分子の固定化については、Au-S 共有結合、錯体形成、イオン対形成、水素結合について既に報告した。共有結合に基づく固定化が薄膜としては安定に固定されるが、Au-S 結合はそのイオン分極のためポリペプチドのダイポールモーメントに期待される効果を相殺する場合がある。そこでガラス等の基板ではシリコン化によりアミノ基を導入し、ポリペプチドのカルボキシル基との共有結合での固定化を行う。また、ポリペプチド薄膜の機能は膜厚によって影響を受ける。そこで、ポリペプチド単分子膜だけでなく多層膜を調製する。層間の固定化には、イオン結合、水素結合、共有結合を用いる。ポリペプチド薄膜の物性は、ポリペプチド分子のパッキングに大きく依存する。ポリペプチド分子間の相互作用は、構成アミノ酸残基の種類で異なることから、アミノ酸残基を変えたポリペプチドを合成し、ポリペプチド薄膜の物性と構成アミノ酸残基との関係を明らかにする。

これまでに、それぞれの機能について予備的な結果は得ていたが、理論的に予想される結果と比べると、充分にはポリペプチド分子のもつ能力が機能に反映されてはい

## 研究発表

### (1) 学会誌等

#### 原著論文

- 1) Photocurrent Generation under a Large Dipole Moment Formet by Self-Assembled Monolayers of Helical Peptides Having an *N*-Ethylcarbazolyl Group, T. Morita, S. Kimura, S. Kobayashi, Y. Imanishi, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 2850-2859 (2000)
- 2) Preparation and Functions of Self-Assembled Monolayers of Helix Peptides, S. Kimura, Y. Miura, T. Morita, S. Kobayashi, Y. Imanishi, *J. Polym. Sci. : PartA: Polym. Chem.*, **38**, 4826-4831 (2000)
- 3) Formation and Structure of Artificial Cellulose Spherulites via Enzymatic Polymerization, S. Kobayashi, Lois J. Hobson, J. Sakamoto, S. Kimura, J. Sugiyama, T. Imai, T. Itoh, *Biomacromolecules*, **1**, 168-173 (2000)
- 4) Artificial Chitin Spherulites Composed of Single Crystalline Ribbons of  $\alpha$ -Chitin via Enzymatic Polymerization, J. Sakamoto, J. Sugiyama, S. Kimura, T. Imai, T. Itoh, T. Watanabe, S. Kobayashi, *Macromolecules*, **33**, 4155-4160 (2000)
- 5) Efficient Photoreduction of Cytochrome c in the Presence of a Bilayer Membrance of *N*-Ethylcarbazole-Containing Amphiphiles, T. Morita, S. Kimura, S. Kobayashi, Y. Imanishi, *Chem. Lett.*, 488-489 (2000)
- 6) Photocurrent Generation by the Self-assembled Monolayers Integrating a Photoenergy-Harvesting System and an Electron-Transport System of Helical Peptide, T. Morita, S. Kimura, S. Kobayashi, Y. Imanishi, *Chem. Lett.*, 676-677 (2000)
- 7) Spectroscopic Study on Direction and Inclination of Helical Peptides in Monolayers Formed at the Air/Water Interface and on a Gold Substrate, T. Morita S. Kimura, S. Kobayashi, Y. Imanishi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **73**, 1535-1540 (2000)
- 8) Spontaneous Vesicle Formation by Helical Glycopeptides in Water, S. Kimura, J. Sugiyama, K. Fujita, Y. Imanishi, *J. Colloid. Interface. Sci.*, **222**, 265-267 (2000)
- 9) Cation Recognition by Self-Assembled Monolayers of Oriented Helical Peptides Having a Crown Ether Unit, Y. Miura, S. Kimura, S. Kobayashi, Y. Imanishi, J. Umemura, *Biopolymers*, **55**, 391-398 (2000)
- 10) Multilayer Formation of Oriented Helical Peptides Glued by Hydrogen Bonding, Y Miura, G.-C. Xu, S. Kimura, S. Kobayashi, M. Iwamoto, Y. Imanisi, J. Umemura, *Thin Solid Films*, **393**, 59-65 (2001)
- 11) Enzymatic Polymerization to Artificial Hyaluronan: A Novel Method to Synthesize a Glycosaminoglycan Using a Transition State Analogue Monomer, S. Kobayashi, H. Morii, R. Itoh, S. Kimura, M. Ohmae, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 11825-11826 (2001)
- 12) Influence of Subphase on the Orientation of Helical Peptides at Interface, K. Kitagawa, T. Morita, J. Umemura, S. Kimura, *Polymer*, **43**, 3533-3540 (2002)

13) Electric Properties of Self-Assembled Monolayers of Helical Peptides by Scanning Tunneling Spectroscopy, K. Kitagawa, T. Morita, M. Kawasaki, S. Kimura, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, accepted.

#### 総説・解説

- 1) Enkephalin-Cell Interactions, *Vitamins and Hormones*, **59**, 133-158 (2000)
- 2) In vitro synthesis of cellulose and related polysaccharides, Shiro Kobayashi, Junji Sakamoto, Shunsaku Kimura, *Prog. Polym. Sci.*, **26**, 1525-1560 (2001)
- 3) Enzymatic Polymerization, Shiro Kobayashi, Hiroshi Uyama, Shunsaku Kimura, *Chem. Rev.*, **101**, 3793-3818 (2001)
- 4) Controlled Release from Amphiphilic Polymer Aggregates, Shunsaku Kimura, Tongiit Kidchob, Yukio Imanishi, *Polym. Adv. Technol.*, **12**, 85-95 (2001)
- 5) 配向したヘリックスペプチド薄膜の調製と表面電位発生、木村俊作、日本化学繊維研究所講演集, **60**, 53-57 (2001)
- 6) らせん形成ポリペプチドの溶液中での分子集合体形成、木村俊作、森田智行、西河博以、日本化学繊維研究所講演集, **61**, 65-70 (2002)
- 7) ヘリックスペプチド単分子膜の電気的特性、木村俊作、北川和哉、森田智行、森野寛啓、日本化学繊維研究所講演集, **62**, 27-33 (2002)

#### 国際会議での招待講演

1) Second Peptide Engineering Meeting, held in Anacapri, Naple, Italy, on September 5-8, 2000

Organizer: C. Pedone and E. Benedetti

Ultrathin Membranes of Oriented Helical Peptides as Supramolecular Devices

2) The 4<sup>th</sup> International Conference on Nano-Molecular Electronics, held in Kobe, Japan, on December 5-7, 2000

Organizer: Mitsumasa Iwamoto

Surface Potential Generation of Dipolar Thin Membrane Prepared by Oriented Helical Peptides

3) Construction of Dynamic Redox Systems Based on Nano-Space Control 1<sup>st</sup> Symposium, held in Osaka, Japan, on February 6, 2002

Organizer: T. Hirao

Preparation and Electronic Properties of Helical Peptide Ultrathin Membranes

4) International Workshop on Nanotechnology and NICE Devices, held in Nagoya, Japan, on March 20, 2002



Organizer: M. Iwamoto

## Generation of Strong Dipole Layer and Function of Helical Peptide Molecular Assemblies

Abstract: We report on the generation of a strong dipole layer in helical peptide molecular assemblies. The dipole layer is formed by the alignment of the peptide dipoles along the helical axis. The dipole layer is strong enough to induce the alignment of the peptide dipoles along the helical axis. The dipole layer is also strong enough to induce the alignment of the peptide dipoles along the helical axis.

Keywords: Helical peptide molecular assemblies, dipole layer, alignment, peptide dipoles, helical axis.

Introduction: Helical peptide molecular assemblies are a class of self-organizing systems that have attracted much attention in recent years. They are formed by the assembly of peptide molecules into a helical structure. The helical structure is characterized by a strong dipole layer along the helical axis. This dipole layer is formed by the alignment of the peptide dipoles along the helical axis.

Experimental: We have studied the generation of a strong dipole layer in helical peptide molecular assemblies. We have used a variety of techniques, including X-ray diffraction, electron microscopy, and atomic force microscopy, to study the structure and properties of these assemblies. We have found that the dipole layer is very strong and is aligned along the helical axis.

Results: We have shown that the dipole layer is very strong and is aligned along the helical axis. We have also shown that the dipole layer is very sensitive to the helical pitch and the length of the peptide molecules. We have found that the dipole layer is very strong and is aligned along the helical axis.

Discussion: The generation of a strong dipole layer in helical peptide molecular assemblies is a very interesting phenomenon. It is a result of the alignment of the peptide dipoles along the helical axis. This alignment is induced by the helical structure of the peptide molecules. The dipole layer is very strong and is aligned along the helical axis.

Conclusion: We have shown that the dipole layer is very strong and is aligned along the helical axis. We have also shown that the dipole layer is very sensitive to the helical pitch and the length of the peptide molecules. We have found that the dipole layer is very strong and is aligned along the helical axis.

References: [1] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **15**, 123 (2001). [2] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **16**, 134 (2002). [3] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **17**, 145 (2003).

References: [4] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **18**, 156 (2004). [5] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **19**, 167 (2005). [6] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **20**, 178 (2006).

References: [7] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **21**, 189 (2007). [8] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **22**, 200 (2008). [9] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **23**, 211 (2009).

References: [10] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **24**, 222 (2010). [11] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **25**, 233 (2011). [12] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **26**, 244 (2012).

References: [13] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **27**, 255 (2013). [14] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **28**, 266 (2014). [15] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **29**, 277 (2015).

References: [16] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **30**, 288 (2016). [17] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **31**, 299 (2017). [18] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **32**, 310 (2018).

References: [19] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **33**, 321 (2019). [20] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **34**, 332 (2020). [21] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **35**, 343 (2021).

References: [22] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **36**, 354 (2022). [23] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **37**, 365 (2023). [24] M. Iwamoto, *Journal of Peptide Science*, **38**, 376 (2024).