

藤森科学技術振興財団 研究実施概要報告書

(西暦) 2022年 6月 23日

公益財団法人藤森科学技術振興財団
理事長 藤森 明彦 殿

藤森科学技術振興財団の助成金による研究が終了しましたので、下記のとおり報告をいたします。

所属機関 国立大学法人 宮崎大学

職 名 助教

氏 名 稲田 飛鳥



【提出書類】

(1)研究実施概要報告書(本紙)

添付書類(A4版3枚以内):研究状況を示す写真等の資料

(2)収支報告書

添付書類:助成金を充当した経費の領収書

領収書を添付しない場合:支払一覧表と支払部門担当者確認署名

⑤

(1)テーマ

※スペースが足りない場合は、枠を追加いただいて構いません。

環境水中汚染物質を高度選択的に吸着するペプチド系金属有機構造体の開発

(2)本研究の期間

(西暦) 2021年4月～2022年3月

(3)本研究の目的

環境水中の汚染物質には無機物と有機物に大別されるが、前者は主に重金属を含む有害金属類のことであり、後者については低分子有機化合物からマイクロプラスチックまでと対象が極めて広範囲となる。これらの環境水中汚染物質を低環境負荷・省エネルギーで除去するためには、対象物質に対して高い選択性と、吸着容量を有し、かつ高い生分解性を有する高機能性吸着剤の開発が必須である。この数十年で無機物系汚染物質については、金属吸着剤の研究開発が盛んに行われ、生分解性の高いセルロースやキトサンなどを基材とした高機能性吸着剤が数多く開発されている。一方で、有機物系汚染物質については、古くから有機物の吸着剤として知られるゼオライトや活性炭、また、それらに官能基を修飾した吸着剤の研究が現在もなされている。しかしながら、これらの吸着剤の有機化合物に対する選択性・吸着容量はそれほど高くないため、これらの研究方針の延長線では有機化合物に対する選択性・吸着容量の著しい向上は見込めない。

本研究では、有機物系汚染物質の低分子化合物を対象とし、高選択性・高吸着容量を有し、かつ、生分解性を有する随一のエコマテリアルである、金属ペプチド構造体(Metal peptide framework; MPF)の開発を目的とする。新規材料であるMPFを創製し、MPFの有機物系汚染物質の高性能吸着剤としての実現可能性を示し、MPFを構成するペプチド配列の違いによる吸着挙動の変化を明らかにする。

(4)本研究の概要

本研究で創製する金属ペプチド構造体(MPF)は、金属有機構造体(MOF)の一種であり、金属イオンと配位子ペプチドが自己組織化することで組み上がる多孔性結晶である。近年、MOFはガス分子から低分子化合物まで様々なサイズの物質を内部空間に超高効率で包接できる次世代材料として注目されている。活性炭やゼオライトなど、従来の吸着剤材料と比較しても、極めて高い空隙率を有するMOFを低分子有機化合物の包接・吸着担体とすることにより、これまでにない高い吸着容量・効率になることが予想される。

MPFの大きな特徴は、従来のMOFに用いられてきた剛直な有機配位子ではなく、高生分解性かつ柔軟な構造を有するペプチドを配位子として利用する点である。配位子として構造多様性の高いペプチドを用いることにより、MPFの構造多様性・設計性は従来MOFよりも格段に向上することが期待される。さらに、配位子ペプチドのアミノ酸配列を変化させることで、MPFは汚染物質である低分子有機化合物に対する親和性の精密制御が可能となり、吸着容量・効率についても従来吸着剤をはるかに凌駕する革新的な吸着剤となり得る。MPFは配位子としてのペプチドの構造自由度が高いがゆえに、その結晶形成条件が確立されておらず、MPFを取り扱った研究例は極めて少なく、本提案のようにMPFを有機物の吸着剤として利用した研究は皆無である。したがって、本研究の革新性、先見性、および独創性は極めて高いと考える。

(5)本研究の内容及び成果

本研究では、有機物系汚染物質の低分子化合物を対象とし、高選択性・高吸着容量を有し、かつ、生分解性を有する、ペプチドを配位子とした金属有機構造体(MPF)の新規開発を検討した。以下、詳細を記述する。

1. 実験

1.1. 配位子ペプチドの固相合成

まず初めに、配位子となるトリペプチドを Fmoc 固相合成法により合成した。金属イオンと配位する性質を持つという報告例のある、Gly-His-Gly (GHG) を基軸にした、X-His-X を配列の候補とした。また、GHG は試薬を購入して実験に使用した。

1.1.1. 樹脂の膨潤

各樹脂を所定のスケール測り取り、dichloromethane (DCM) で樹脂が浸る程度加え、2-3 h 静置し、樹脂を膨潤させた。用いた樹脂および合成スケールを表 1 に示す。

表1 使用した樹脂と合成スケール

Peptide	Resin	Synthesis scale [mmol]	Substitution at filling [mmol/g]	Amount of resin [mg]
KHK	Fmoc-Lys(Boc)-Wang resin	0.9	0.61	1475.41
LHL	Fmoc-Leu-Wang resin	0.9	0.70	1285.71
FHF	Fmoc-Phe-Wang resin	0.9	0.61	1475.41
IHI	Fmoc-Ile-Wang resin	0.9	0.70	1285.71

1.1.2. Fmoc 保護基の脱保護

Piperidine (PPD) 20 mL とジメチルホルムアミド (DMF) 80 mL を混合し 20 % PPD/DMF を 100 mL 調製した。この混合液を 4 mL 樹脂に加え 1 min Voltex ミキサーで攪拌し溶液を取り除き、再度 4 mL を加え、室温で 10 min 振とうした。その後、4 mL の DMF で 5 回洗浄した。

1.1.3. カップリング反応

縮合剤 COMU 9.3 g と DMF 54 mL を混合させ、0.40 M 縮合剤カクテルの調製を行った。次に、2,4,6-trimethylpyridine (TMP) 4.65 mL と *N*-methylpyrrolidone (NMP) 54 mL を混合し、0.60 M TMP の調製を行った。

反応点に対して 3 等量 (1.5 mmol) の Fmoc 保護アミノ酸を秤りとり、そこで 1) で調製した 0.40 M 縮合剤カクテルと 0.60 M TMP を 3.5 mL ずつ測り取ってそれぞれ混合し Vortex で完全に溶解するまで攪拌した。溶解後、樹脂の入った合成用ガラスカラムに全量を加え、(株)ハイペップ研究所製 PetiSyzer II を用いて 60 °C で 50-130 rpm で攪拌し、30 min 静置した。終了後、4 mL の DMF で 5 回洗浄した。

1.1.4. Kaiser テストによる未反応アミノ基の有無の確認

ニンヒドリン反応を利用し、未反応のアミノ基の有無を確認した。Ninhydrin/Ethanol, phenol/Ethanol, potassium cyanide/Pyridine を各々 20 μ L 測り取り、ディスプレイ試験管で混合し調製した Kaiser 試薬に、反応後の樹脂を微量加え、沸騰水中で 1 min 加熱した後、樹脂及び溶液の色を観察した。陽性の場合には青紫色に呈色し、陰性の場合には黄色に呈色する。陽性の場合には未反応のアミノ基が存在しているので、実験 1.1.4 に戻り、再度カップリングを行った。陰性の場合には、次の行程に進んだ。

1.1.5. 樹脂の膨潤

4 mL の DCM 及び DMF で 3 回洗浄した。その後、実験 1.1.2 から実験 1.1.5 までの操作手順を同様に繰り返し、各アミノ酸を順次結合させた。

1.1.6. ペプチド鎖の伸長の終了

実験 1.1.3 と同様の操作を行った後、4 mL の DMF, DCM, MeOH の順に 5 回洗浄後、2-3 h 減圧乾燥させた。

1.1.7. 脱保護・樹脂からの切り出し

Trifluoroacetic acid(TFA)/水/triisopropylsilane(TIS)を 95/2.5/2.5 となるように、それぞれ 23.75/0.625/0.625 mL 混合して、脱保護カクテルを調製した。

あらかじめ調製して冷蔵しておいた脱保護カクテルを樹脂が浸る程度加え、攪拌し 90 min 静置した。その後、ろ液を遠沈管に回収した。また、TFAによる洗浄を 2 回行い、そのろ液も遠沈管に回収した。

1.1.8. 沈殿精製

ろ液を含め 45 mL となるように冷ジエチルエーテルを加え、超音波で攪拌した。その後、遠心分離(4 °C, 6000 rpm, 10 min)を行い、上澄み液を除去する操作を 3 回繰り返した。その後、減圧乾燥することで目的のトリペプチドを得た。

1.1.9. トリフルオロ酢酸(TFA)イオンの除去

Agilent VariPure IPE(陰イオン交換樹脂)を用いてペプチドの対イオンとして含まれる TFA を除去した。充填剤の 2-3 倍量のメタノールを流した後、試料と同組成の溶媒(水:ACN=50:50)充填剤の 2-3 倍流した。次に、ペプチドに溶媒を加え溶解させた後、Agilent VariPure IPE に流し、溶出する溶液を回収した。その後、メタノールを充填剤の等倍量流し、溶出する溶液を回収した。得られた溶液をエバポレーターで減圧濃縮し、凍結乾燥を行った。

1.2.1 ESI-MS による合成ペプチドの分子量測定

合成したペプチド(KHK, LHL, FHF, IHI)の少量を蒸留水で溶解させペプチド溶液を調製し、精密質量分析装置(Q-Exactive)を用いて測定した。その結果を図 1~図 4 に示す。

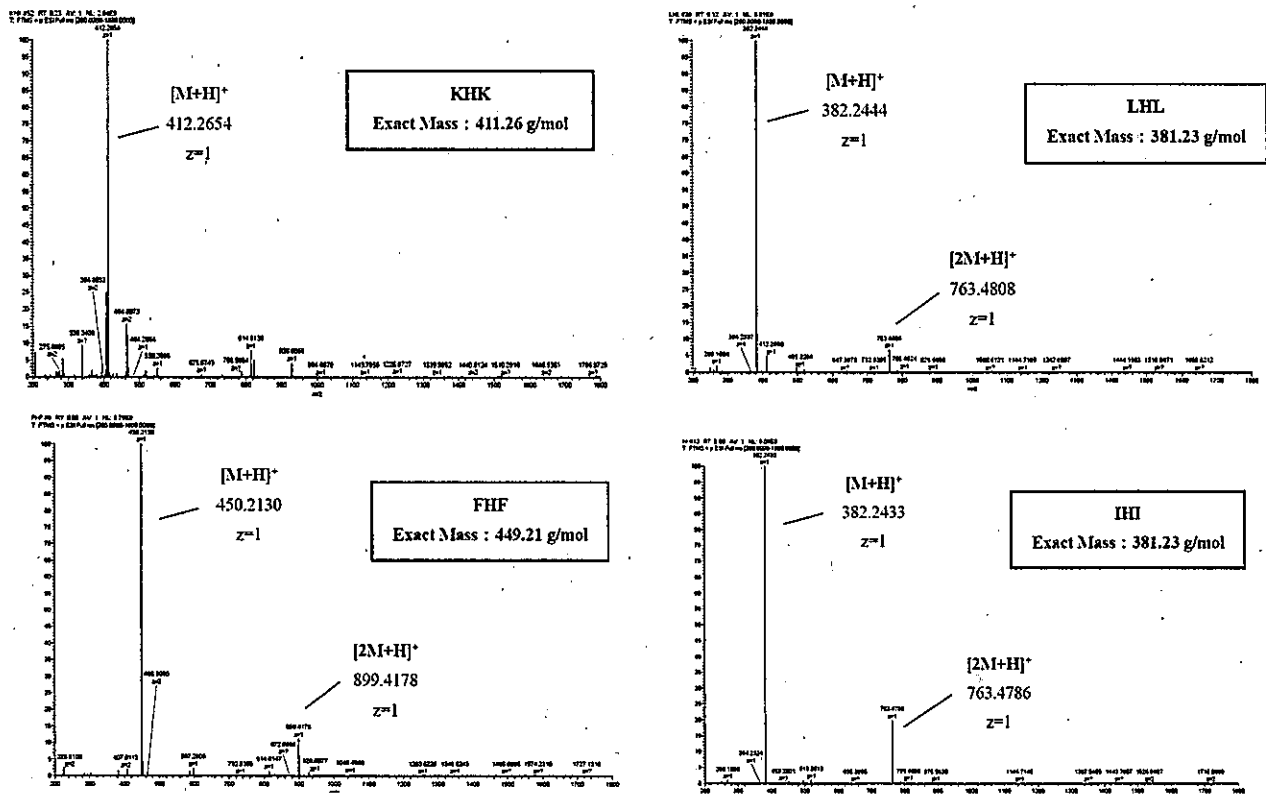


図 1. KHK, LHL, FHF, IHI の ESI-MS スペクトル。

図 1 のマスペクトルより、目的ペプチドの合成は成功していることが確認された。HPLC で純度測定をした結果、KHK : 収率 97.9% , LHL : 収率 71.5% , FHF : 収率 98.8% , IHI : 96.9% となった。

1.3 MPF の合成

合成したトリペプチド(KHK, LHL, FHF, IHI)を用いた MPF の合成を試みた。一般的な MOF に使用されて

いる配位子は剛直な構造を持つが、ペプチドは構造が柔軟であるため、MPF の合成には、貧溶媒添加法を用いた。また、金属イオンは主に、ヒスチジンの側鎖のイミダゾール基と安定した結合を形成するという報告のある、銅イオン(Cu(II))を主に用いた。その他、GHG と Ni(II), Zn(II), Fe(II), Mg(II), Ca(II), Al(III)等も検討したが、結晶物は得られなかった。また、システイン(Cys)を含む配列の合成も検討したが、目的合成物が確認されなかった。

表2 MPF の合成条件と生成物の形態。

MPF	金属塩	配位子	貧溶媒	体積比(水:貧溶媒)	沈殿の形態
Cu-GHG (EtOH)	Cu(OAc) ₂	GHG	EtOH	28 : 72	結晶状
Cu-KHK (EtOH)	Cu(OAc) ₂	KHK	EtOH	11 : 89	沈殿せず
Cu-KHK (ACN)	Cu(OAc) ₂	KHK	ACN	25 : 75	沈殿せず
Cu-LHL (EtOH)	Cu(OAc) ₂	LHL	EtOH	11 : 89	沈殿せず
Cu-LHL (ACN)	Cu(OAc) ₂	LHL	ACN	20 : 80	沈殿せず
Cu-FHF (EtOH)	Cu(OAc) ₂	FHF	EtOH	11 : 89	ゲル状
Cu-FHF (ACN)	Cu(OAc) ₂	FHF	ACN	50 : 50	ゲル状
Cu-IHI (EtOH)	Cu(OAc) ₂	IHI	EtOH	11 : 89	沈殿せず
Cu-IHI (ACN)	Cu(OAc) ₂	IHI	ACN	18 : 82	沈殿せず

表2より、配位子ペプチドの種類、貧溶媒の種類・体積比では Cu-GHG の結晶物と、Cu-FHF のゲル状の沈殿が得られた。

(6)本研究の考察

今回合成した4つの配列 KHK, LHL, FHF, IHI では、検討した溶媒種、貧溶媒と水の体積比では結晶状の沈殿物は得られなかった。一方 GHG については、銅イオンと錯体を形成して結晶状の MPF が得られた。これらの結果から、KHK, LHL, IHI のペプチド配列は銅イオンと錯体を形成した際の貧溶媒への溶解度が高いため沈殿しなかった、あるいは、配位高分子が形成されなかったためと考えられる。また、FHF ではゲル状の沈殿物が確認された。これはおそらく、ペプチドの水への溶解性が非常に低いため、錯体を形成することができなかったと考えられる。一方で GHG と銅の錯体は配位高分子が形成され、結晶物が析出したと考えられる。

今回は、実験計画通り、得られた MPF (Cu-GHG) でメチレンブルー色素を用いてモデル有機物の吸着試験を実施した。しかしながら、メチレンブルー水溶液に Cu-GHG が徐々に溶解し、吸着試験をすることが出来なかった。今後は、上記の配列で MPF が形成されるような溶媒の探索、体積比、温度なども制御して、疎水性の高い MPF の形成を検討していく予定である。

(7)共同研究者(所属機関名、役職、氏名)

該当なし

(8)本研究の成果の公表先

学会発表準備中

[注]この報告書を当財団のホームページ等に掲載します。予めご了承ください。