

学 位 論 文 題 名

生体模倣による石灰化に関する研究

学位論文内容の要旨

石灰化を行っている貝類などの海の動物は、二酸化炭素の水和化機能を持つカルボニックアンヒドラーゼ(CA)活性中心とカルシウムイオンの分子認識機能を持つアスパラギン酸を豊富に含む部位からなるタンパク質を持っている。

CA 活性中心は亜鉛に 3 つのヒスチジンと 1 つの水分子又は水酸化物イオンが配位している。本研究では、海の動物が行っているバイオミネラリゼーションのしくみを模倣して *in vitro* で再現することによってこの石灰化反応メカニズムを明らかにし、炭酸カルシウムの結晶多形を制御することを目的とする。海の生き物によるバイオミネラリゼーションが大気中の二酸化炭素濃度一定への役割を果たしてきたかの判断や炭酸カルシウム多形相制御による新規材料の開発のための基礎的な研究成果が期待される。

CA 活性中心とカルシウムイオン分子認識中心の各々を生体模倣の立場から水に溶解していない状態で限定された場所に設計することが重要である。更に、それぞれの作用を解明するために、亜鉛イオン二次元配列基板とポリアスパラギン酸(pAsp)に覆われた基板を別々に設計を行った。前者はヒスチジンイミダゾール類似のイミダゾリン誘導体のシリコン化合物 3-(2-imidazolin-1-ly)propyltriethoxysilane (ImSi)の自己組織化膜上に亜鉛イオンを配位させて構築した。後者は pAsp が chitin 基板上に覆うことによって作製した。

亜鉛イオンに対して強い分子認識能を持っている ImSi 修飾探針を用いた化学力顕微鏡により亜鉛イオン二次元配列が ImSi の自己組織化単分子膜上に構築されていることおよび CO₂-Veronal indicator method により亜鉛イオンの二次元配列が CA 活性を持つことをそれぞれ確認した。亜鉛イオン二次元配列基板が二酸化炭素水和反応場として働くことが明らかになった。pAsp を含む水溶液中の chitin 基板表面は AFM 測定から pAsp によって chitin 基板が覆われていることが確認された。X 線光電子分光測定により、pAsp に覆われた chitin 基板がカルシウムイオンの分子認識機能を持つことが明らかになった。

CA の活性中心の模倣として亜鉛イオンの二次元配列基板を、カルシウムイオンの分子認識機能部位の模倣として pAsp に覆われた chitin 基板を使用して、生体模倣による石灰化を *in vitro* で試みた。

亜鉛イオン二次元配列基板が存在する場合は、pAsp が 5×10^{-6} wt% の低い濃度の時、無機系での 30°C 以上ではじめて生成する炭酸カルシウム結晶多形 aragonite / vaterite が 15, 25°C で生成し（石灰化時間 2 日間）、存在しない場合と比較してより多く生成することが確認された。石灰化反応の初期過程（約 4 時間以内）において、 $[\text{pAsp}] = 5 \times 10^{-5}$ wt% の水溶液に亜鉛イオン二次元配列が存在する場合は存在しない場合と比較してより多くの炭酸カルシウムが chitin 基板に生成した。よって、亜鉛イオンの二次元配列は aragonite / vaterite 生成を促進する機能を持つことが確認された。これは、亜鉛二次元配列の二酸化炭素水和化機能により炭酸水素イオン生成速度がそして炭酸カルシウム生成速度が増加した結果、aragonite / vaterite の生成が促進されたと考えられる。亜鉛イオン二次元配列が aragonite / vaterite の生成を促進させることから、貝殻の真珠層に含まれる CA の活性中心が炭酸カルシウムの結晶多形生成を制御する要因のひとつであると考えられる。

pAsp の濃度が 5×10^{-6} から 5×10^{-4} wt% へと増加するほど aragonite / vaterite の calcite に対する相対比が増大することから（石灰化時間 2 日間）、pAsp もまた、aragonite / vaterite の生成促進の機能を持つことが確認された。これは、pAsp によって覆われた chitin 基板が aragonite / vaterite の生成を促進したと考えられる。 $[\text{pAsp}] = 5 \times 10^{-5}, 5 \times 10^{-4}$ wt% の場合において chitin 基板の表面上に aragonite の集合体から構成されているフィルム状のものが生成した。また、亜鉛イオン二次元配列が存在する場合は存在しない場合と比較して、当フィルム状のものがより多く生成することが確認された。フィルム状の aragonite は、pAsp のカルボン酸イオンと炭酸水素イオンとの静電的な反発により chitin 表面の垂直方向の結晶成長が抑制されたことにより平板状となったと考えられる。当フィルムは、chitin 基板上に pAsp 層が存在し、その上に aragonite が積み重なって生成したと考えられる。

貝殻の真珠層は有機質層と aragonite 結晶層が積み重なった層状構造のものであり、本研究における石灰化反応において aragonite から構成されているフィルム状のものが得られた。よって、亜鉛イオン二次元配列と pAsp に覆われた chitin 基板を用いる生体模倣によって、貝類のバイオミネラリゼーションによって生成した真珠層を再現することができ、結晶多形・形態の制御による無機-有機の複合材料などの新規材料開発が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 市 川 和 彦

副 査 教 授 中 村 博

副 査 教 授 奥 原 敏 夫

副 査 教 授 魚 崎 浩 平 (理学研究科化学専攻)

学 位 論 文 題 名

生体模倣による石灰化に関する研究

石灰化を行っている貝類などの海の動物は、二酸化炭素の水和化機能を持つカルボニックアンヒドラーゼ(CA)活性中心とカルシウムイオンの分子認識機能を持つアスパラギン酸を豊富に含む部位からなるタンパク質を持っている。CA活性中心は亜鉛に3つのヒスチジンと1つの水分子又は水酸化物イオンが配位している。本研究では、海の動物が行っているバイオミネラリゼーションのしくみを模倣して *in vitro* で再現することによってこの石灰化反応メカニズムを明らかにし、炭酸カルシウムの結晶多形を制御することを目的とした。海の生き物によるバイオミネラリゼーションが大気中の二酸化炭素濃度一定への役割を果たしてきたかの判断のための基礎的な研究成果が得られた。

本論文は第八章からなり、第一章では海の動物が行っているバイオミネラリゼーションのしくみについて言及した。第二章及び第三章では CA 活性中心を生体模倣の立場から水に溶解していない状態で限定された場所に設計し、更に、その作用を解明するために、亜鉛イオン二次元配列基板の設計を行った。それにはヒスチジンイミダゾール類似のイミダゾリン誘導体のシリコン化合物 3-(2-imidazolin-1-yl)propyltriethoxysilane (ImSi)の自己組織化膜上に亜鉛イオンを配位させて構築した。亜鉛イオンに対して強い分子認識能を持っている ImSi 修飾探針を用いた化学力顕微鏡により亜鉛イオン二次元配列が ImSi の自己組織化単分子膜上に構築されていることを確認した。第四章では CA のモデル化合物の亜鉛に配位している水分子の酸解離定数 pK_a を測定した。亜鉛イオン二次元配列も亜鉛配位水の pK_a 以上の値の pH 領域で CA 活性を示すことがモデル化合物と同様に実現した。第五章ではカルシウムイオン分子認識中心を生体模倣の立場から水に溶解していない状態で限定された場所に設計し、その作用を解明するために、ポリアスパラギン酸(pAsp)に覆われた基板の設計を行った。それには pAsp が chitin 基板上に覆うことによって作製した。pAsp を含む水溶液

中の chitin 基板表面は AFM 測定から pAsp によって chitin 基板が覆われていることが確認された。X 線光電子分光測定により、pAsp に覆われた chitin 基板がカルシウムイオンの分子認識機能を持つことが明らかになった。

第六章では CA の活性中心の模倣として亜鉛イオンの二次元配列基板を、カルシウムイオンの分子認識機能部位の模倣として pAsp に覆われた chitin 基板を使用して、生体模倣による石灰化を *in vitro* で試みた。亜鉛イオン二次元配列基板が存在する場合は、pAsp が 5×10^{-6} wt% の低い濃度の時、無機系での 30°C 以上ではじめて生成する炭酸カルシウム結晶多形 aragonite / vaterite が $15, 25^{\circ}\text{C}$ で生成し（石灰化時間 2 日間）、存在しない場合と比較してより多く生成することが確認された。石灰化反応の初期過程（約 4 時間以内）において、 $[\text{pAsp}] = 5 \times 10^{-5}$ wt% の水溶液に亜鉛イオン二次元配列が存在する場合は存在しない場合と比較してより多くの炭酸カルシウムが chitin 基板に生成した。よって、亜鉛イオンの二次元配列は aragonite / vaterite 生成を促進する機能を持つことが確認された。亜鉛イオン二次元配列が aragonite / vaterite の生成を促進させることから、貝殻の真珠層に含まれる CA の活性中心が炭酸カルシウムの結晶多形生成を制御する要因のひとつであると考えられる。pAsp の濃度が 5×10^{-6} から 5×10^{-4} wt% へと増加するほど aragonite / vaterite の calcite に対する相対比が増大することから（石灰化時間 2 日間）、pAsp もまた、aragonite / vaterite の生成促進の機能を持つことが確認された。これは、pAsp によって覆われた chitin 基板が aragonite / vaterite の生成を促進したと考えられる。 $[\text{pAsp}] = 5 \times 10^{-5}, 5 \times 10^{-4}$ wt% の場合において chitin 基板の表面上に aragonite の集合体から構成されているフィルム状のものが生成した。また、亜鉛イオン二次元配列が存在する場合は存在しない場合と比較して、当フィルム状のものがより多く生成することが確認された。当フィルムは、chitin 基板上に pAsp 層が存在し、その上に aragonite が積み重なって生成したと考えられる。

第七章では、カルシウムイオンの分子認識機能部位の模倣として硫酸基を持つ nafia を用いて効率良く石灰化がおきた。

第八章では本研究における石灰化反応において aragonite から構成されているフィルム状のものが得られた。尚、貝殻の真珠層は有機質層と aragonite 結晶層が積み重なった層状構造のものである。

以上、亜鉛イオン二次元配列と pAsp に覆われた chitin 基板を用いる生体模倣によって、貝類のバイオミネラル化によって生成した真珠層を部分的に再現することができた。結晶多形・形態の制御による無機－有機の複合材料などの新規材料開発が期待される。

審査委員はこれらの成果を評価し、大学院課程における取得単位なども併せて申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。