

珪藻殻自己組織化機能を用いた人工バイオミネラリゼーション

田中 祐二^{1,2}・金子 忠昭^{3,4}・藤原 伸介^{1,2}・松田 祐介^{1,2*}

アメリカの物理系雑誌“Journal of Nanoscience and Nanotechnology”の2005年1月号は珪藻を用いたナノテクノロジーの特集であった。¹⁾近年、半導体微細加工技術をはじめとするナノテクノロジー分野では珪藻の被殻形成における高度な自己組織化機能に注目が集まっている。背景には、従来の“top-down型”半導体微細技術が加工限界に近づいていることと、珪藻殻形成因子が分子のレベルで特定されはじめ人工的な反応系でその機能解析が可能になったことが挙げられる。すなわち次世代の“bottom-up型”微細技術への展開の可能性である。酸化珪素を自己組織化する珪藻由来ペプチドが*in vitro*系でバイオシリカ粒を形成するという報告が相次いでいるが、その一方では自然界の珪藻殻がもつような幾何学的な微細構造の人工的な自己組織化は実現できていない。より高次元な構造形成と制御に必要とされる因子は何なのであろうか？ 本稿では、珪藻殻形成因子 Silaffin を用いたこれまでの報告と我々の試みを紹介しながら、この問題について検討を加えたいと思う。

珪藻研究の歴史は古く、光学顕微鏡の発明に伴い1700年代には珪藻らしきものがすでに観察されている。1960年代には電子顕微鏡の発明に伴い珪藻の被殻構造を詳細に調べることが可能になった。²⁾珪藻は幾何学的に整列した珪酸質の被殻を有する。被殻表面にはさらに胞紋(殻を貫通する小孔:多くの種で小室構造をとる)(図1)³⁾と呼ばれる数ナノメートルオーダーの微細な素構造が規則正しく整列している。珪藻の被殻は全体が同時に形成されるのではなく、種ごとに異なる被殻形成開始点から

一定の順番に従って点あるいは線対称に形成されていく。この被殻形成の開始はちょうど植物細胞の分裂時に隔膜形成体が細胞の中心部に形成されるように、分裂中の珪藻細胞内部では、まず微小管重合中心の形成が起こり、これに続いて珪藻殻の最も大きな単位区画を形成する壁が作られる。胞紋構造はこの単位区画壁が形成された後にその内部に形成される。⁴⁾単位区画壁はもとより、胞紋構造の形状は珪藻の種によって大きく異なり、特異的である。しかし胞紋形成のプロセスに微小管重合などの細胞的制御因子が関与しているのか否かについては不明であった。

1999年 Kröger らは海洋性珪藻 *Cylindrotheca fusiformis* の被殻から単離された分子質量4~8 kDaの3種類のポリペプチドがそれぞれ珪酸沈積能をもつことを示した。^{5,6)}興味深いことにこれら3種類のポリペプチドは、合わせて1つの遺伝子にコードされており、*Silaffin-1*と名づけられた。*Silaffin-1*がコードする3種類のポリペプチドは分子量の大きい順にそれぞれ Silaffin-1B (8 kDa), Silaffin-1A₂ (4 kDa), Silaffin-1A₁ (4 kDa) であるが、これらのポリペプチドのうち、Silaffin-1BとSilaffin-1A₂はそれぞれ1回ずつ、Silaffin-1A₁は5回、*Silaffin-1* 遺伝子上に繰り返しコードされていた(図2)。さらに、Silaffin-1A₁, Silaffin-1A₂, および Silaffin-1B それぞれは15, 18, および29残基のアミノ酸から構成されている。これらは

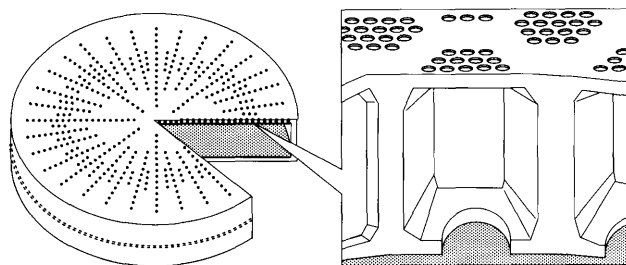


図1. 珪藻被殻および胞紋構造。中心目珪藻の形状と断面の模式図(左)。被殻断面の小室と胞紋構造の模式図(右)。³⁾

MKLTAIFPLLEF	
AVGYCAAQSIADLAAANLS	
TEDSKSAQLISADSSDDAS	
DSSVESVDAASSDVSGSSV	
ESVDVSGSSLESVDVSGSS	
LESVDSSSEDEEEELRIL	
R1	SSKKSGSYYSYGTKKSGSYSGYSTKKSASRRIL 1B
R2	SSKKSGSYSGYSTKKSASRRIL 1A ₂
R3	RRIL
R4	RRNL
R5	RRIL
R6	RRNL
R7	RRIL
SGGLRGSM	

図2. *Silaffin-1* 遺伝子にコードされるアミノ酸配列。ハイライト箇所は機能ペプチド(Silaffin-1B, Silaffin-1A₂, Silaffin-1A₁)それぞれの領域を示す。^{5,6)}

* 著者紹介 ¹関西学院大学理工学部生命科学科(助教授), ²ナノバイオテクノロジー研究開発センター

〒669-1337 三田市学園2-1 TEL. 079-565-8559 FAX. 079-565-8542 E-mail: yusuke@ksc.kwansei.ac.jp

³関西学院大学理工学部物理学科, ⁴ナノ界面創生センター

互いに高い相同性を示すが、データベース上にはオルソログが見いだせなかった。このことから Silaffin は珪藻特異的因子であり、Silaffin-1 タンパク質は翻訳後切断され、その断片 (Silaffin-1B, Silaffin-1A₂, Silaffin-1A₁) が機能ペプチドとして珪藻の胞紋形成に関与していると考えられている。

Silaffin の物理化学的特徴と機能

Silaffin-1A₁, Silaffin-1A₂, および Silaffin-1B の3種のポリペプチドはリジン残基を多く含みポリカチオン性である。生体内でリジン残基はさらにポリアミンによる修飾を受けている。^{5,6)} ポリアミンはそれ自身が珪酸沈積作用を促進する効果があることが知られている。⁷⁾ しかし修飾を受けていない合成ペプチドは酸性領域で珪酸沈積能がなくなるものの、中性領域においては珪藻殻から単離した天然 Silaffin-1A₁ を凌ぐ珪酸沈積能を示した。この結果からポリアミンの修飾は珪酸沈積能の pH 依存性に影響を与えるものの、Silaffin-1A₁ の珪酸沈積作用そのものは Silaffin-1A₁ のアミノ酸骨格自身によるものであることが示唆された。

Silaffin はポリアミン修飾だけでなく、セリン残基にリン酸化の修飾を受けることも報告されている。^{5,6)} リン酸基の修飾を失った Silaffin は珪酸沈積能を失うが、反応系にリン酸緩衝液のリン酸が存在すればその活性を回復することが Kröger らによって示されている。⁸⁾ この結果から、Silaffin が珪酸沈積能を示すにはリン酸の存在が必須であることが示されたが、その理由については不明である。

Silaffin によって *in vitro* 系で形成されるバイオシリカの形状は、Silaffin の種類、および反応場における物理化学的要因の影響を受けることが報告されている。Silaffin-1A₁ に Silaffin-1B を加えると、形成されるバイオシリカ粒は Silaffin-1A₁ 単独のとき (500~700 nm) よりも小さくなり (<50 nm), Silaffin-2 (Silaffin-1 同様に珪藻 *C. fusiformis* の被殻から単離された糖タンパク質) を加えると、バイオシリカ粒は凝集しブロック状になる。^{5,9)} pH と塩濃度は酸化珪素の重合反応平衡に影響を与える化学的要因であり、たとえば低塩かつ中性から弱アルカリ領域 (7<pH<10) ではシリカ粒が大きくなる方向に、また、高塩濃度または酸性領域ではシリカ粒の数が増大する方向に酸化珪素の重合反応は進行する。¹⁰⁾ 反応場に流体力学的要因 (合成 Silaffin ペプチドを含む反応液が常に一定方向に流れ続けるように反応系を回転し続ける) を加えると、形成されるバイオシリカは太さ 1.5 ~ 10

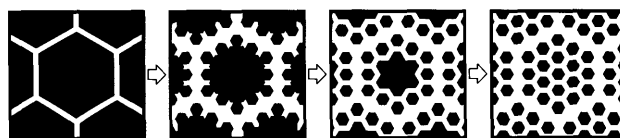


図3. 珪藻 *C. wailesil* の胞紋形成過程。胞紋形成過程珪藻の被殻 (左→右) の模式図。¹²⁾

μm, 長さ 100 ~ 1400 μm の繊維状になる。¹¹⁾ いずれの場合も単純な水溶液中の反応において Silaffin は、バイオシリカ塊の肥大や粒の連続といった熱力学的に無理の少ない等方的な固体成長反応を促進しており、これは珪藻被殻に見られるような幾何学構造の自己組織化とは区別して考えるべきである。

Phase separation モデル

2002 年 Sumper は *Coscinodiscus* 種に属する3種の珪藻の胞紋が図3で示すように形成されていくことに注目し、珪藻の胞紋形成は主として物理化学的な相互作用によって駆動されるものであると提唱した。¹²⁾ Sumper の説では、有機物を含む珪酸溶液が壁に囲まれた珪素沈着胞膜上で有機物相と珪酸相とに相分離 (phase separation) を繰り返すことにより自己相似形が壁で囲まれた枠内に形成され、さらにその内部に自己相似形が形成されることでフラクタルな微細構造が形成されていくものとしている。この場合、酸化珪素から成る壁間距離やその隙間に含まれる珪酸・有機物混合液滴の粘性、そして溶質の電荷が胞紋構造の決定に大きな影響を与えと考えられる。Sumper の phase separation モデルはシリカメソ多孔体 (大きさや表面構造がよく制御された微空間をもつシリカ・ペース体) の研究からも支持される説である。シリカメソ多孔体は有機物を含む珪酸溶液に対して反応場を制御することで形成することができる。シリカメソ多孔体の形成機構は有機物と珪酸の間で相分離が生じ、相分離後の珪酸相で酸化珪素の重合反応が促進されることで、有機物相が存在していた空間が孔となるものと考えられている。¹³⁾

組換え Silaffin によるバイオシリカ自己組織化

我々の研究グループでは、Silaffin がもつ機能は基本的にはバイオシリカ成長の核形成であり、精密な胞紋構造は phase separation モデルのような反応場における固相と液相の物理化学的相互作用に拠るものであると考えている。しかしながら、上述したように Silaffin ペプチドの性質そのものも、反応場の要因に積極的に働きかける

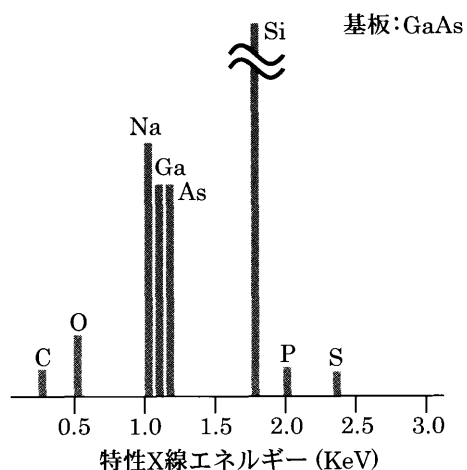


図4. 組換えSilaffinにより形成されたバイオシリカ粒の組成分析.

“微調整因子”である可能性は非常に興味深い。そこで生物学的要因であるSilaffinの機能を分子レベルでより詳細に調べられるよう、*C. fusiformis*からRT-PCRの手法を用いて目的遺伝子断片をクローニングし、組換えSilaffinの大量発現系を構築した。この系から得られた組換えSilaffinに対してリン酸存在下で珪酸沈積能を調べたところ数マイクロメートルの微小な粒の形成が広範囲なpH (3.5～12.5) で確認された。形成された粒の評価法としてSiを含まないGaAs基板上でEDX (energy-dispersive X-ray analysis) による組成分析法を用いた (図4)。その結果、生成した粒には高濃度のSiとOが存在することが示された。また、組換えSilaffinのメチオニン由来と考えられるSが検出された。これらのことから組換えSilaffinを用いても合成ペプチドと同様の珪酸沈積能があると考えられた。合成ペプチドよりも組換えSilaffinの活性pH領域が拡大した理由は現在不明であるが、短いアミノ酸断片の付加により等電点も比較的大きく変化しており、Silaffinの遺伝子工学的改変による機能化に可能性を示す結果である。天然、合成、および今回我々が作製した組換えSilaffinの諸性質の比較を図5にまとめる。

Silaffinの反応場に物理化学的制限を加えることは自己組織化への第一歩であることは上にも述べた。我々は最も単純な制限の付加として、組換えSilaffinをスライドガラス面上に固定し、固定面上に珪酸・リン酸緩衝液から成る反応溶液を滴下した。この反応系をさらにカバーガラスで挟み込み、自然対流が抑制された薄膜溶液環境をつくった後、バイオシリカ形成過程を観察した。また反応過程でのシリカゲルに対して蛍光プローブ機能をもつPDMPO [2-(4-pyridyl)-5-{[4-(2-dimethyl-aminoethyl-aminocarbonyl)methoxy]phenyl}-oxazole] を溶液中に

	Silaffins	pH 依存性	リン酸要求性	文献
天然Silaffin 1A ₁	$ \begin{array}{ccccccc} & P & P & P & P & P & P \\ & & & & & & \\ S & S & K & K & S & G & S & Y & S & G & S & K & G & S & K \end{array} $ AA A A P:リン酸基/A:ポリアミン	3.5 - 7.0: +	なし	7)
合成Silaffin	SSKKSGSYSGSKGSK	3.5 - 6.0: - 7.0: +	あり	7)
組換えSilaffin	$ \begin{array}{l} MSSKKSGSYSGSKGSKRRIL \\ SGGLRGSMLERHHHHH \end{array} $	3.5 - 12.5: +	あり	本研究

図5. 天然、合成、組換えSilaffin-1Aの構造と珪酸沈積能。+、シリカ粒形成あり；-、シリカ粒形成なし。

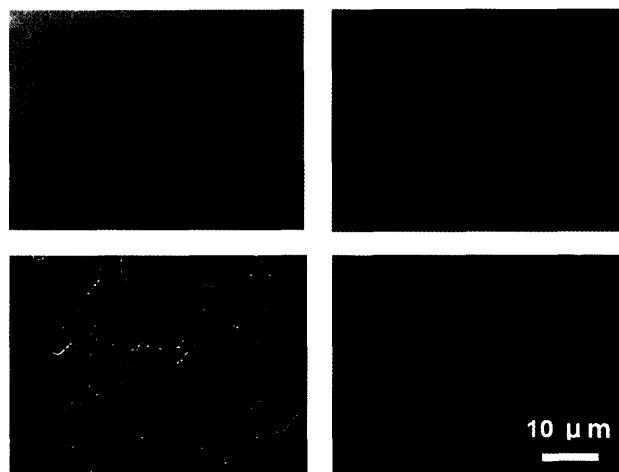


図6. Silaffin固定面におけるバイオシリカ形成。珪酸・リン酸緩衝液と15時間以上反応させた。Silaffin非固定面 (上), Silaffin固定面 (下) の結果を示す。左は微分干渉顕微鏡像, 右は蛍光顕微鏡像。

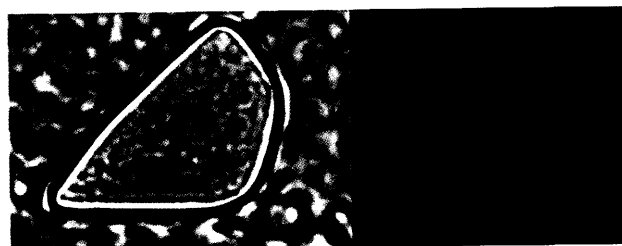


図7. Silaffin固定面で形成されたバイオシリカドーム。珪酸・リン酸緩衝液と15時間以上反応させた。左は光学顕微鏡像, 右はセクション蛍光顕微鏡像。

添加した。¹⁴⁾ この固体界面に挟まれた薄膜状液内での反応の結果、はじめにSilaffin固定面の全体が弱い蛍光を発するようになり、その後固定面内のところどころでマイクロメートルオーダーの粒が数珠状に連なったものが形成された (図6)。さらに時間が経過すると、形状の異

なるさらに大きな構造物が形成された。この構造物に対してセクション蛍光顕微鏡を用いて内部構造を調べると、数珠状の形成物を包み込むようにドーム状の外壁構造が発達していることが明らかになった（図7）。この“バイオシリカドーム”の外壁は非常に薄いものと見積もられ、数十ナノから数百ナノメートルと推定されるものであった。内部が密でないドームの形成は、単純な粒子形成とは異なるバイオシリカ成長が起こったことを示すものであり、おそらく数珠状の構造物とドーム壁との間で何らかの相互作用が生じたことを示唆している。物理的な制限のない反応では単なる球状シリカしか得られないことから、ドームの形成はSilaffinの平面上での固定および反応場の薄膜化といった物理的な制限要因によって反応液中の基質の拡散抑制、不均質化、および固相面と基質の静電的相互作用により、バイオシリカ形成に何らかの強い方向性が与えられたものと推察される。

Silaffin のバイオナノテクノロジーへの応用

これまで述べてきた Silaffin によるバイオシリカの形成形態は大きく分けて二つに分類される。一つは単純な水溶液中でのマイクロメートルオーダーの粒塊形成と成長。もう一つは物理的制限が強く施された環境における二～三次元構造の自己組織化的展開であり、これは今後、基礎的知見の深化および技術的洗練を待たなければならないものの、phase separation モデルに言われるようなナノメートルオーダーでの幾何学構造制御へ向かうものである。いずれの場合も、いわゆる生化学的な反応環境（常温、常圧、中性）下で反応を進めることができる点が応用上の重要な価値であろう。たとえば前者の粒塊形成の場合、有用な酵素タンパク質などの生体高分子を粒塊形成時に混ぜることにより、バイオシリカ粒内に活性を保持したまま固定した例がこれまでに報告されている。¹⁵⁾ この場合、酵素活性が飛躍的に安定化されており、今後の展開に大きな期待が持たれる。

一方、固体表面に酸化珪素固体の高次微細構造を自己組織的に形成する方法は半導体表面加工技術への応用が期待される。現在の高度情報化社会は、半導体プロセス技術の微細化とともに発展してきた。汎用リソグラ

フィ法は現在の半導体微細加工技術を代表する“top-down 型”の核技術であるが、パターン形成に用いる光源の波長以下の微細領域の加工は困難であり、近い将来技術限界に達することが予想される。そこで原子を一つずつ積み上げる“bottom-up 型”の技術が注目されている。¹⁶⁾ この方法は単原子精度での加工を可能にするものと考えられるが、生産性の観点から自己組織化機能を駆動力にもつ構造制御法が検討されている。Silaffin を用いたバイオミネラリゼーションは、生命現象がもつ自己組織化機能は無機化合物の構造制御に対して分子レベルで制御するものであり、完全“bottom-up 型”表面加工技術として位置づけられるだろう。今後の展開に関しては、現在主流の生命現象からのアプローチとともに、反応場である結晶成長環境そのものを構造形成能に対して最適化させ得る物理的なアプローチも必要と考えられる。また、上にも述べたように Silaffin によって形成されるバイオシリカにはさまざまな機能高分子を取り込ませることが可能と考えられるため、従来にない素子機能を有する微細構造の作製にも大きな期待が寄せられる。

文 献

- 1) Gordon, R. *et al.*: *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **5**, 1 (2005).
- 2) Lauritis, J. A. *et al.*: *Arch. Mikrobiol.*, **62**, 1 (1968).
- 3) <http://lbm.ab.a.u-tokyo.ac.jp/%7Ekeiso/diatom4/index.html>
- 4) Pickett-Heaps, J. and Kowalski, S. E.: *Eur. J. Cell Biol.*, **25**, 150 (1981).
- 5) Kröger, N. *et al.*: *Science*, **286**, 1129 (1999).
- 6) Kröger, N. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **276**, 26066 (2001).
- 7) Menzel, H.: *Chem. Commun.*, **24**, 2994 (2003).
- 8) Kröger, N. *et al.*: *Science*, **298**, 584 (2002).
- 9) Poulsen, N. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 12075 (2003).
- 10) Iler, R. K.: *The Chemistry of Silica*, John Wiley and Sons, Inc. (1979).
- 11) Naik, R. R. *et al.*: *Chem. Commun.*, **21**, 238 (2003).
- 12) Sumper, M.: *Science*, **295**, 2430 (2002).
- 13) Monnier, A. *et al.*: *Science*, **261**, 1299 (1993).
- 14) Shimizu, K. *et al.*: *Chem. Biol.*, **8**, 1051 (2001).
- 15) Luckarift, H. R. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **22**, 211 (2004).
- 16) Mijatovic, D. *et al.*: *Lab. Chip.*, **5**, 492 (2005).