

生物を用いた繊維材料のナノ構造制御

九州大学バイオアーキテクチャーセンター教授
近藤 哲男

“ファイバー”スーパーバイオミメティックス
～近未来の新技术創成～
pp.303-307 (2006年10月)

7. 生物を用いた繊維材料のナノ構造制御

1. はじめに

ナノスケールでの物質の表面構造、界面での相互作用が生物体にまで拡大され、さらに、高分子と生物体とのナノスケールでの界面相互作用の利用が、新たな構造体を生み出す可能性を秘めている¹。最近、足場 (Scaffold) を用いて種々の細胞を培養し、医療材料として用いようとする再生医療材料形成法が注目されている。本稿で取り上げる手法は、これをさらに発展させたものとなる。すなわち、強度補強の役割をもつ単なる足場ではなく、構造構築の方向を制御させる「ルール」という機能をテンプレートに加える。その上でセルロースナノ繊維を分泌する酢酸菌の培養を行うと、分泌繊維がルールとの界面で強く吸着し、堆積方向も同時に制御され、あるパターンを有する3次元構造体が自動的に構築されていくという低エネルギーで生産から構造形成までをおこなうプロセスが出来上がる。しかも、この3次元構造体は、高結晶性のセルロースナノ繊維から成っているため、十分な強度をもち、生分解性があるのはもちろんのこと、生体適合性もある、ナノからボトムアップ的に構築される機能材料として期待される。

これまで著者らは、分子から結晶繊維、そして細胞壁へとナノからボトムアップ的、階層的に構造形成をする高等植物の細胞壁形成²⁻⁴をヒントとして、酢酸菌の分泌ナノ繊維の堆積方向を制御させることによる低エネルギー型3次元構造構築法を提案してきた⁵⁻⁹。これは、菌が繊維を分泌する際の反作用による任意走行に着目したところに端を発する。

酢酸菌 (*Acetobacter xylinum* または *Gluconacetobacter xylinus*) は、結晶性セルロースナノ繊維 (幅40-60nm, 厚10nm) であるマイクロバイアルセルロース (バクテリアセルロース) を生産する。この菌は、同時に菌体外への繊維分泌の際の噴出エネルギーを駆動力として分泌方向と逆方向に走行する。それぞれの菌が任意の方向に走行するため、結果として、分泌ナノ繊維からなるネットワークが形成され、ペリクルと呼ばれるゲル状の膜ができあがる (図1)。これが、食品の分野でナタデココとして一般に知られる。上述のように本研究のコンセプトは、このような菌体外物質生産微生物

のランダムな方向への物質生産に起因する走行を、セルロース分子からなる種々の2次元足場パターンを持つ高分子ルールテンプレートを用いて制御することにある。しかも、その結果、パターン上に3次元構造が構築される。このことは、あたかも家を建築する際に、まず土台を作り、その上に建材を積み重ねていくことを連想していただくと理解しやすいと思う。土台が高分子ルールテンプレートであり、酢酸菌の分泌する繊維が建材、菌自身が家を建てていく大工さんということになる。このシステムを簡単に述べると、この建材がまず土台に強固に接着されていくために、大工さんが建材を積み上げるように動かされ、最終的に土台パターン表面上にセルロースナノ繊維からなる3次元構造が構築される。本稿では、このような酢酸菌をナノビルダーとして用いた新規3次元構造体構築法を述べる。なお、バクテリアセルロースと酢酸菌についての詳細は、本編第1章第3節2の項を参照願いたい。

2. 分子ルールテンプレート

- ネマティックオーダーセルロースとハニカム型セルロース薄膜 -

著者らは、以前から酢酸菌などの物質生産菌や植物細胞などに対して、独自の足場を用いた培養に着手している⁵⁻⁸。その表面に独特のナノおよびマイクロパターンを有するテンプレートについて以下に



図1 酢酸菌と分泌されるセルロースナノ繊維 (セルロースリボン: 幅40-60nm)

述べる。この特殊な表面構造こそが、分泌バクテリアセルロースの表面と強固に界面相互作用して、酢酸菌の走行制御を誘発させ、結果的に酢酸菌にナノビルダーとしての機能を付加させて、自動3次元材料構築を可能にさせる。

天然ではセルロースは結晶繊維形態で生産される。著者らは、セルロースの分子集合構造を積極的に変化させる試みを続けてきた。その結果、セルロース溶液を飽和水蒸気下に放置することにより、分子間水素結合形成を極めて低く抑え、それを水と溶媒交換して得られる高水膨潤セルロースゲルを開発した。これは透明な不可逆ゲル状シートとなって生成されるため、さらに延伸し、乾燥固定することにより、分子鎖が極めて良好に一軸配向した、しかし非結晶性を示す新たなセルロース高次構造が形成された。この構造に対して、「ネマティックオーダーセルロース」(nematic ordered cellulose: NOC) と名付けた¹⁰。高分解能電子顕微鏡による分子像、および高分解能原子間力顕微鏡による表面解析等の手法で解析したところ、表面構造は、**図2**に示すように、グルコピラノース環面が表面に対してほぼ垂直に位置し、平行な分子鎖間隔が0.66nmで配列した構造であることが明らかとなった¹⁰。NOCでは、グルコース残基の水酸基が赤道結合(環面に平行方向)していることから、この分子鎖の配列を考えると、いずれの水酸基も表面に対して垂直方向を向くことになる。これは、水酸基が表面上で延伸方向(二分

子配向方向)に平行に、レールのように配向して並ぶことを意味する。さらに、この極性のある水酸基が表面で配向していることが、他の物質(繊維、有機・無機高分子)との強い相互作用を促し、その物質を含む溶液あるいは懸濁液をNOC上に展開すると、エピタキシャル的に表面に配向誘発させながら堆積をさせるという現象を引き起こした。また、セルロースのみならず、キチンでも同様の方法により、このネマティックオーダー構造が形成された¹²。

さらに最近著者らは、分子の自己組織化を利用して、飽和水蒸気下でまず三酢酸セルロースのハニカム(蜂の巣)型フィルムを作製し、それを脱アセチル化することでセルロースのハニカム型フィルムを創製した(**図3**)¹³。この方法で作られた酢酸セルロースならびにセルロース両フィルムでは、数 μm から数百 μm までの範囲でハニカム径の制御が可能であった。セルロースあるいは酢酸セルロースフィルムは生体適合性を持っている可能性があることから、輸血の際に赤血球、白血球、血小板などの分離に使う血液フィルターや限外ろ過膜のような医療用材料としての利用が期待される。また、細孔を用いるハニカム構造という特徴を生かした利用法に加えて、二次元の細胞壁モデルや動物細胞などの培養の足場、シングルセルの培養器としての利用といったそのナノ/マイクロ構造に基づく機能性材料への展開も期待できる。しかも、特徴的なことに、そのハニカム骨格の表面が、NOCの場合と同じように、エピタ

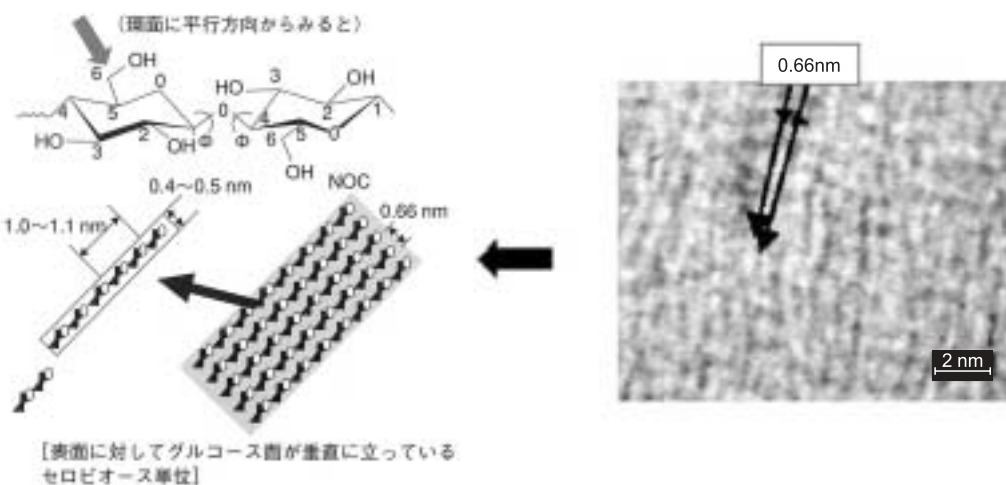


図2 高分解能電子顕微鏡による NOC 中のグルカン分子鎖像の画像解析
(左図が模式図)。試料は負染色されている。右図では、白い点から点までがセロビオース(2量体)単位。

キシャル的にその八ニカム表面に他の物質を配向誘発させながら堆積をさせる効果が認められた。

3. 酢酸菌をナノビルダーとして用いる自動3次元構造構築

セルロース、キチンなどの生物由来の天然素材においては、3次元構造を人為的に制御できるかどうかが新規構造材料創製への課題となる。著者は、以下に述べる方法により、この点を解決する糸口を見出したことになると考えている。

セルロースナノ繊維を分泌する酢酸菌の細胞壁には、セルロース合成顆粒 (terminal complex : TC) と呼ばれる酵素の集合体が存在し、特にこの菌の場合にはそれが3個ずつのサブユニットで一つのTCを構成し、それが直線状に配列している。サブユニットは3.5~4nm程度の微小結晶性繊維 (サブエレメンタリーフィブリル) を形成させる。さらに、この直線配列により、サブエレメンタリーフィブリルが

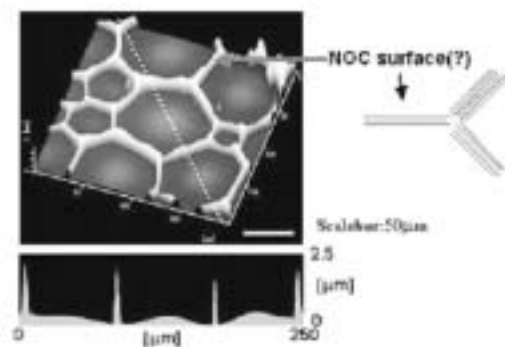


図3 八ニカム型細孔を有するセルロース薄膜の原子間力顕微鏡による立体像

自己集し最終的に約50nm幅のリボン状の結晶繊維が形成され、そのセルロースリボンは酢酸菌の生産時の自己回転運動に起因してねじれる (図4左)。

このセルロースナノ繊維を産生する酢酸菌を用いて、特定のナノオーダーパターンを有するテンプレート上での培養を試みた。足場としてまず、上述の水酸基がその表面で一軸方向にレールのように配向するNOCを用いた。テンプレート上で酢酸菌が培養されると、生合成直後のサブエレメンタリーフィブリルが、NOCテンプレート表面の水酸基とその配列方向に沿って強い相互作用をし、それがアンカーとなり、さらに分泌を続けるため繊維が押し出された結果として、配向方向に菌の走行が限定される現象が見出された^{6,7} (図4右)。同時に、堆積されるセルロースナノ繊維もレールに沿ってエピタキシャル的に堆積され、縞状三次元構造体が構築されていくことも明らかとなった。この一連の作用は、ナノスケールでの相互作用にはじまり、マイクロスケールでの三次元構造制御を可能にするものであった。言い換えると、テンプレート表面の特性が、酢酸菌の走行パターンに反映した。

まず、CCDカメラ付き光学顕微鏡下で、NOC上における菌の運動挙動を連続観察した際の典型的なパターンを図5に示す。このNOCの分子配向方向は左右である。基本的には酢酸菌は表面の水酸基レールに沿ってまっすぐファイバーを生産しながら走行する。NOC上で構造の欠陥が存在すると、レールから脱線し、スパイラルを巻きながら運動と生産を続ける。そのまま運動を中止する場合もあれば、来たコースを逆行する場合も見られた。運動速度は、直進、スパイラル走行のいずれの場合も変わらず、

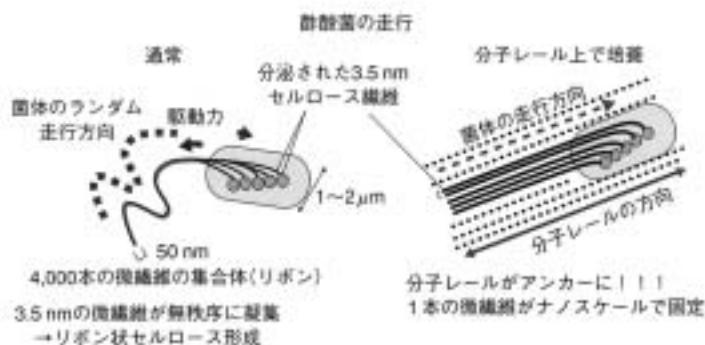


図4 サブフィブリルの凝集によるバクテリアセルロースナノ繊維の形成とそれらのNOCテンプレート上でのアンカー効果

24 で $4.5 \mu\text{m}/\text{min}$ であった。条件が異なるので単純には比較できないが、これまでに報告されている 25 での酢酸菌の運動速度 $2.0 \mu\text{m}/\text{min}$ ¹⁴ と同等以上であった。しかし、条件の違いによる生産速度の差異に関してはまだ検討する必要がある。

さらに、培養を続けると、24時間後にはもとの NOC テンプレートの配向パターンは保持したまま、高さ方向に10倍程度増大していることが判明した。パターンを保持するには、通常の培養ではなく、選択的にパターンに酢酸菌の吸着が行われていることが必要であった。

また、ハニカム細孔骨格を有するセルロースフィルムをテンプレートとする酢酸菌の自動3次元構造構築を試みたところ、培養条件によって酢酸菌がハニカム骨格に選択的に吸着し、同時に骨格に沿ってセルロースナノ繊維を分泌しながら走行し、10時間で70nm（7層分）増加するという NOC の場合と同様の現象が生じた（図6）¹⁵。このことにより、非結晶性であり、一方で水酸基が極めて良好にレール状に配列する表面構造が形成されれば、酢酸菌のナノビルダーとしての機能が発揮されるのではないかとこの仮説に現在至っている。

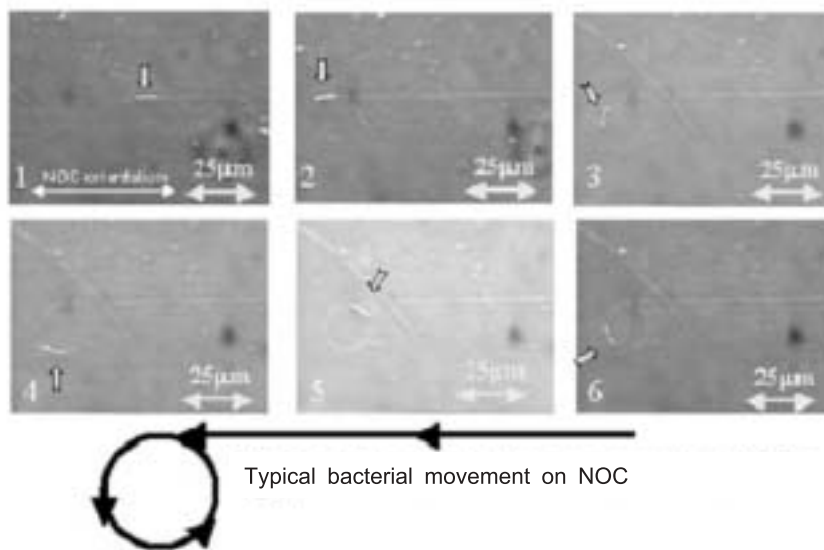


図5 CCDカメラ付きタイムラプス光学顕微鏡による NOC 上における菌の運動挙動の連続観察
1～2：酢酸菌の分子レールに沿った走行、3～6：レールから脱線し、スパイラルを巻きながらの運動。

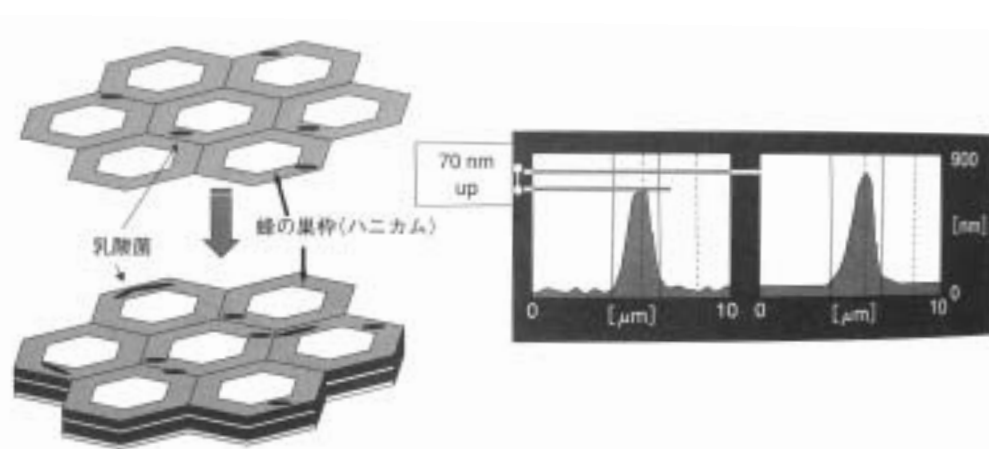


図6 蜂の巣枠の上でセルロースナノ繊維を分泌・堆積させながら制御走行する酢酸菌（模式図）。この繊維の堆積により三次元ハニカム構造体が自動的に出来上がる。右図は、10時間で高さが70nm アップしたことを示す。

4. おわりに

本稿では、セルロースナノ繊維を菌体外に分泌し続けて走行するナノビルダーとしての酢酸菌とテンプレートの役割、そしてテンプレートになりうる構造条件、さらには実際にどのようにして3次元構造がテンプレート上で自動的に構築されるかという著者らの提案しているボトムアップ型構造構築ナノテクノロジーの一端をご理解いただけたら幸いである。

セルロース繊維からなる種々のナノ/マイクロパターンを有する3次元構造への機能性の付与については、まだ、その途についたばかりであり、今後更なる検討が必要であることは言うまでもない。例えば、このようにしてつくられる立体ハニカム構造体などは、ろ過膜や輸血分離用血液フィルターなどの医療材料、あるいは植物の細胞壁モデルや動物細胞を培養する足場、ナノ粒子を作製する鋳型などとしての利用へと展開される。また、著者らは、セルロースハニカムをプラットフォーム（反応場）として、無機材料や複合材料を合成する研究も進めており、ナノ/マイクロ材料開発にセルロース繊維を用いた手法が大きく道を開くものと期待される。

文献：

- 1) Taton, T. A., Bio Nanotechnology: Two-way traffic, *Nature Materials*, **2**, 73 74 (2002).
- 2) Kataoka Y. and Kondo, T., *Macromolecules*, **29**, 6356 6358 (1996).
- 3) Kataoka, Y. and Kondo, T., *Macromolecules*, **31**, 760 764 (1998).
- 4) Kataoka, Y. and Kondo, T., *Int. J. Biol. Macromol.*, **24**, 37 41 (1999).
- 5) 近藤ら、特開2002 142796.
- 6) Kondo, T., Nojiri, M, Hishikawa, Y., Togawa, E., Romanovicz, D. & Brown, Jr., R. M., *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, **99**, 14008 14013 (2002); Kondo, T. *Nature Scienceupdate: Bugs trained to build circuit*, October 8 (2002), http://www.nature.com/nsu/021007/021007_1.html
- 7) Hesse, S & Kondo, T. *Carbohydr. Polym.* **60**, 457 465 (2005).
- 8) 近藤 哲男, *Cellulose Commun.*, **12**, 52 57 (2005).
- 9) 近藤 哲男, *繊維学会誌*, **61**, P290 P293 (2005).
- 10) Kondo, T., Togawa, E. & R. Malcolm Brown, Jr. *Biomacromolecules*, **2**, 1324 1330 (2001).
- 11) 近藤 哲男 *繊維学会誌*, **57(9)**, 234 236 (2001).
- 12) Kondo, T., Kasai, W. and Brown, Jr., R. M., *Cellulose*, **11**, 463 474 (2004).
- 13) Kasai, W., Kondo, T., *Macromol. Biosci.*, **4**, 17 (2004).
- 14) Brown, R.M., Jr., J.H.M. Willison, & C. L. Richardson., *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, **73** (12), 4565 4569 (1976).
- 15) Kondo, T., Kasai, W., Tomita, Y. & Morita, M. *American Chemical Society Meeting Abstract Part 1*, CELL 168 (2004)