

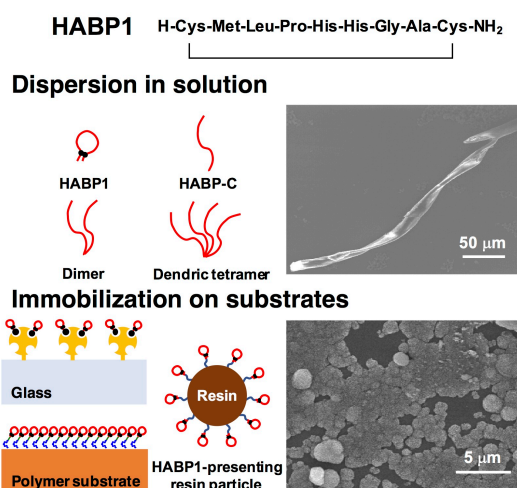
Accounts of Materials & Surface Research

Creation of Peptide-Hydroxyapatite Nanohybrids by Biomimetic Processes

Kazutoshi IJIMA^a and Mineo HASHIZUME^{a,b,*}

^aDepartment of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, Tokyo University of Science 12-1 Ichigayafunagawara-machi, Shinjuku-ku, Tokyo 162-0826, Japan, ^bWater Frontier Science & Technology Research Center, Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science 1-3 Kagurazaka, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8601, Japan, mhashizu@ci.kagu.tus.ac.jp

Material design and fabrication utilizing the process mimicking biomineralization have been received much attentions recently from the view point of sustainable manufacturing in addition to excellent functions of resultant hybrid materials. In this manuscript, we provide an overview of studies and ongoing challenges on the creation of peptide-hydroxyapatite (HAp) nanohybrids using HAp-binding peptide HAPB1 (H-CMLPHHGAC-NH₂) and its derivatives under simulated body fluid (SBF) conditions. Distribution and state of assembly of peptides affected their HAp or calcium phosphate mineralization behaviors in SBFs and morphology of resultant hybrids. Potential application and future direction of the present systems are also described.



Keyword: Hydroxyapatite, Biomineralization, Peptide, Surface functionalization, Biomaterials

Kazutoshi Iijima was born in 1981 and received his B.S. in 2004 and Ph.D. in 2009 from Keio University under the direction of Professor Toshinori Sato. He then he worked as a postdoctoral fellow in the laboratory of Dr. Nobutaka Kiyokawa at the National Research Institute for Child Health and Development. He was appointed as an Assistant Professor at Tokyo University of Science in 2013. His research interests focus on hybrid materials and their biomedical applications.



Mineo Hashizume is currently a professor in Tokyo University of Science. He was born in 1971 and received his Ph.D. in 1999 from Tokyo Institute of Technology under the supervision of Associate Professor Toshinori Sato and Professor Yoshio Okahata. After one-year of postdoctoral research experience in University of Texas at Austin (Professor Eric. V. Anslyn), he joined in RIKEN as a frontier researcher (Professor Toyoki Kunitake). In 2002, he moved to Nara Institute of Science and Technology as an Assistant Professor (Professor Jun-ichi Kikuchi). In 2008, he became a Junior Associate Professor and started his own research group at Tokyo University of Science. Following an Associate Professor (2012-2016), he was promoted to a Professor (2017-). His research interests include creation of organic-inorganic hybrid materials using biomimetic processes, surface functionalization of engineering plastics, and utilization of biomass as structural materials.



生体模倣プロセスを用いたペプチド-ヒドロキシアパタイト ナノハイブリッドの作製

飯島 一智,^a 橋詰 峰雄^{a,b*}

^a 東京理科大学工学部工業化学科

^b 東京理科大学総合研究院ウォーターフロンティアサイエンス&テクノロジー研究センター

1. バイオミネラリゼーションとその原理に倣った有機-無機ナノハイブリッドの作製

骨や歯のリン酸カルシウム (CaP)、貝殻やサングの骨格の炭酸カルシウム (CaCO_3) など、生物は多様な無機物を恒常的に作り出しており、この作用のことをバイオミネラリゼーションという。一般に、バイオミネラリゼーションにおいてはタンパク質や多糖など有機分子がテンプレートとなり、バイオミネラルの形態および結晶性を精密に制御するとともに、ナノスケールでの複合化により無機物単体にはない優れた機能を発現することが知られている。例えば、貝殻の真珠層ではキチンなどの有機固体マトリクスと可溶タンパク質が協調的に作用することで CaCO_3 のうちアラゴナイト結晶が特異的に生じ、有機マトリクスとの規則的な層状構造体を形成する (Figure 1a)¹⁾。一方、歯のエナメルにおいてはアメロゲニンが溶液中の微小な CaP に吸着して安定化させ、それが配列することでヒドロキシアパタイト (HAp) の束構造を形成している (Figure 1b)²⁾。骨においては I 型コラーゲンの束間に形成されるギャップ領域と呼ばれる酸性アミノ酸を豊富に含むドメインにおいて HAp のナノ結晶の析出が誘起され、ナノスケールで複合化することで強靱で高い強度を獲得する (Figure 1c)³⁾。

近年、このバイオミネラリゼーションを模倣したプロセスによる有機-無機複合材料の作製が、得られる複合材料の優れた特性に加えて、常温・常圧の温和な条件下、低エネルギー消費で進行することから環境低負荷で持続可能な材料作製法として注目を集めている。 CaCO_3 では、可溶性マトリクス、不溶性マトリクスおよびそれらの組み合わせにより形態や結

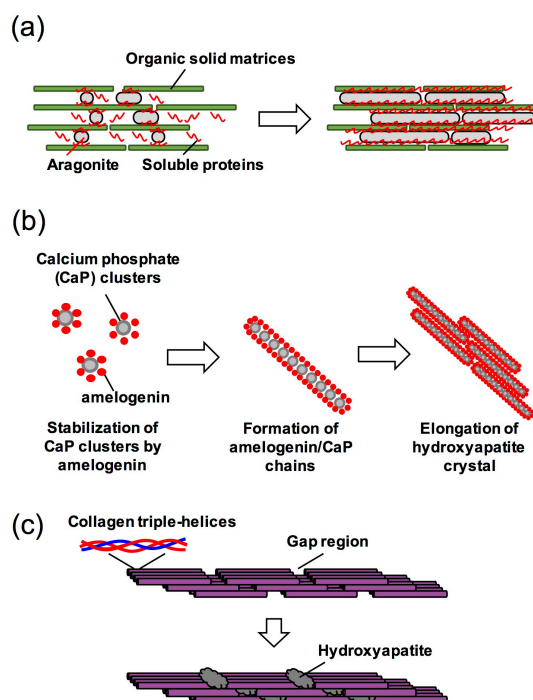


Figure 1. Control of mineralization by organic components, (a) aragonite in the nacre of shells, (b) formation of hydroxyapatite (HAp) by amelogenin in teeth enamels, and (c) HAp mineralization on type I collagen in bones.

晶型が制御された有機物- CaCO_3 複合体が作製されている。加藤らはキチンなどの多糖を不溶性マトリクス、ポリアクリル酸やポリグルタミン酸などの酸性高分子を可溶性マトリクスとして用いることで、真珠層に類似した有機物- CaCO_3 複合体の作製に成功している⁴⁾。彼らはこの系を発展させることで生体模倣にとどまらず、生体内では起こらない結晶型、結晶形態や配向の優先的な析出も実現しており⁵⁾、

バイオミネラリゼーションに倣う手法がバイオインスパイアードな材料作製へと繋がることも示されている。

一方、ヒドロキシアパタイト(HAp)を含む CaP に関しては、骨形成過程に関与するタンパク質やその一次配列を基にしたペプチドを用いた人工的なミネラリゼーション系に加え、ポリアミノ酸⁶⁾、ブロックポリマー⁷⁾、ベシクル⁸⁾、ペプチドナノファイバー⁹⁾など特徴的な有機ナノ構造体を利用した有機-CaP 複合材料の作製が行われてきた。

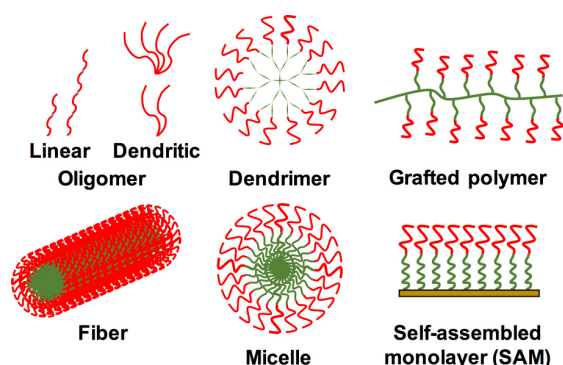


Figure 2. Structures of peptide assemblies.

筆者らは、有機分子としてペプチドに注目し、ペプチド-HAp ナノハイブリッドの作製に取り組んできた。ペプチドはその配列として、天然タンパク質中の特徴的なモチーフや人工設計によるものだけでなく、フェージディスプレイ法などの利用により特定の材料に対して高い結合性を示す配列を得て用いることも可能である。さらに固相合成法により十分な量を得ることができ、ペプチド以外の分子要素を導入することで共有結合によるリニアや樹状のオリゴマー、デンドリマー、グラフトポリマー、自己組織化によるナノファイバー、ミセル、単分子膜など、多様な多量体構造 (Figure 2) を作製することができる点からも無機複合化の鋳型分子として有力な候補である。

2. 擬似体液を用いた有機-HAp 複合体の作製

バイオミネラリゼーションを模倣したプロセス

による HAp の作製法の一つに、ヒト血しょうの無機イオン濃度組成を模倣した溶液である擬似体液 (SBF, Table 1) を用いる手法がある¹⁰⁻¹²⁾。SBF は小久保らによってインプラント材料の生体活性を生体外で評価するために開発された溶液であるが、その後、温和な条件下で様々な材料表面に生体模倣的に HAp を析出させるために使用されるようになった^{10,11)}。SBF は HAp に対して過飽和な溶液であり、材料表面にイオン性官能基が存在すると HAp の不均一核形成が誘起され、それが HAp 層析出の駆動力となると考えられている。SBF より 1.5 倍高いイオン濃度を有する 1.5SBF も開発され、HAp の析出に利用されている¹²⁾。これらの系において生成する HAp は、一部 Na^+ や Mg^{2+} などの金属イオンや炭酸イオンによる置換が起こり、また結晶性が化学量論的 HAp よりも低下している。それは天然骨でも見られる性質であることから、SBF から生成する HAp を骨類似 HAp と呼ぶこともある。骨類似 HAp は化学量論的 HAp よりも生体吸収性が高いため、骨修復材料の開発において意図的に SBF から析出する HAp を利用している場合も多い。

Table 1. Ion concentrations in blood plasma, simulated body fluid (SBF), and 1.5SBF.

Ion	Concentration / mM		
	Plasma	SBF	1.5SBF
Na^+	142	142	213
K^+	5	5	7.5
Mg^{2+}	1.5	1.5	2.3
Ca^{2+}	2.5	2.5	3.8
Cl^-	103	147.8	221.7
HCO_3^-	27	4.2	6.3
HPO_4^{2-}	1	1	1.5
SO_4^{2-}	0.5	0.5	0.8

筆者らは、SBF を用いて汎用高分子基材表面を HAp 層で被覆することで、それら高分子の利用可能性を拡げることができると考えた。しかしながら多くの汎用高分子基材はその表

面に HAp の不均一核形成に有効な官能基を提示していない。そこで、それら基材の物理化学的特性に応じた簡便な表面修飾法の開発を行い、あわせてそれら修飾表面に対する SBF および 1.5SBF からの HAp 析出について検討を進めてきた。たとえばポリイミドフィルムについては表面選択的な加水分解により提示されるカルボキシ基を利用して¹³⁾、またポリスチレン基材はその表面にアルブミンなどの血清タンパク質がよく吸着することを利用し、それらタンパク質が提示するイオン性アミノ酸側鎖を核形成部位として¹⁴⁻¹⁸⁾、HAp 層の形成が可能であることを示している。関連して、多糖のポリイオンコンプレックスから成型した自己支持性フィルム¹⁹⁾やポルフィリン誘導体の分子集積膜²⁰⁾などの表面に提示されたイオン性官能基を不均一核形成部位とした HAp 析出についても検討している。

3. HAp 結合性ペプチド

ファージディスプレイ法は、有機および無機材料に対して高い親和性を示すペプチド配列を単離するための有力な方法である²¹⁻²³⁾。ランダム化された DNA 配列をファージゲノムに挿入することにより、ファージの表面上に極めて多様なペプチドライブラリーが作製され、特定の材料に対するセレクション、回収、増幅をくり返し行うことで、高い親和性を有するペプチド配列が同定される²⁴⁾。金属、無機、有機さまざまな材料に対して高い結合性をもつペプチドが報告されており、それらマテリアル結合性ペプチドおよびその配列にさらに機能部位を連結した誘導体は、対象材料の表面修飾のツールとしての利用が期待されている。

一方で、特定の無機物に選択的に結合するペプチドおよびその誘導体を利用して、溶液からそれら無機物の析出を誘起できることが期待され、数多くの研究グループにより HAp 結合性ペプチドの探索が行なわれてきた²⁵⁻²⁹⁾。一般的な配列モチーフはまだ同定されていないが、プロリン、塩基性アミノ酸、特にヒスチジンおよびヒドロキシ化アミノ酸が高頻度で検出された。プロリンは、 β -ターンなどの構

造的特徴の可能性を提供し、塩基性およびヒドロキシ化アミノ酸は、HAp との水素結合および静電相互作用が可能である²⁵⁾。Sarikaya らは HAp 結合ペプチド HABP1 (H-CMLPHHGAC-NH₂) が、酵素を用いた CaP 析出プロセスにおいてリン酸八カルシウム (OCP) の析出を誘起することを示した²⁶⁾。彼らはまた、HABP1 の C 末端側にペプチド自己集合ドメインを導入することで (H-VKVKVKVKV^DPPTKVEVKVKVMLPPHGA-NH₂, ^DP: D-プロリン) ペプチドゲルを形成させ、ペプチドゲル中において HAp の析出が誘起されることを示した³⁰⁾。他の HAp 結合ペプチドでは、C 末端側に疎水基を導入 (H-NPYHPTIPQSVHGGGCK-COC₁₅H₃₁) することで自己組織化ナノファイバーを形成させ、Ca²⁺および PO₄³⁻を含む溶液への繰り返しの交互浸漬によりファイバーを鋳型とした HAp パターン構造が形成されることが示されている³¹⁾。

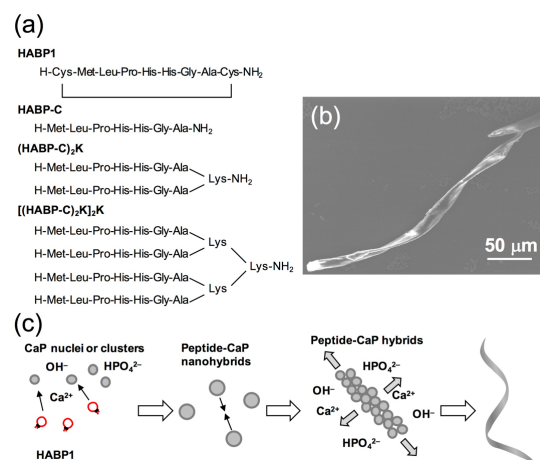


Figure 3. Biomimetic mineralization of CaP using the HAp-binding peptide HABP1 and its derivatives from simulated body fluid (SBF). (a) Sequences of HABP and its derivatives, (b) SEM image of the hybrid formed in the presence of HABP1 after an incubation of 2 h in SBF, and (c) presumable mechanisms for CaP mineralization by dispersed peptides in SBF.

4. HABP を用いた擬似体液中でのペプチド-リン酸カルシウムナノハイブリッドの作製

SBFを用いた種々の材料表面に対するHAp析出についての検討例は数多いが、SBF中に溶解したHAp結合性分子に対する検討例は少ない。我々は、マクロな界面を提示しないHAp結合性分子やナノ物質がSBFからHApの析出を誘起しうるかについて興味をもった。

HAp結合性分子としてペプチドHABP1に注目し、そのSBF中でのミネラル化能について評価を行なった。SBFへHABP1を添加し、37℃にてインキュベーションしたところ、シート様の形態を有する析出物が生じた(Figure 3b)³²。種々のキャラクタリゼーションより、析出物はペプチドとCaPからなる複合体であることがわかった。溶液中に分散した状態のペプチド分子が体液類似環境においてCaPのミネラル化を誘起することは興味深い現象であった。SarikayaらのCaP析出実験において析出メカニズムの詳細については解明されていないが、ヒスチジン残基による静電効果およびペプチド二次構造のある程度のフレキシビリティが寄与していることが示唆されている²⁶。一方SBF中においては、自発的に形成されたCaPの核^{33,34}とペプチドが結合し、それらが会合することでシート状構造を有するペプチド-CaPハイブリッドを形成したと推定される(Figure 3c)。さらに環状(セレクションに用いたファージのランダム配列領域の設計に由来)のHABP1に対し、HABP1のジスルフィド結合部位を除いたHABP-Cと名付けたペプチド(H-MLPHHGA-NH₂)もSBF中において同様の析出能を有することがわかり、ペプチドのコンフォメーションにおける“constrained”の効果はみられなかった。

次に、ペプチドの多価効果について検証した。Figure 1に示したようにペプチド多量体には多様な構造があるが、最初の検討として合成の容易さからリジンを利用してHABP-Cの樹状二量体((H-MLPHHGA)₂K-NH₂)および四量体([(H-MLPHHGA)₂K]₂K-NH₂)を設計・合成し(Figure 3a)、ペプチド-CaPハイブ

リッド形成においてHAp結合部位がSBF中でクラスター化したときの効果について検討した。その結果HABP1-Cの樹状オリゴマー化は、得られるペプチド-CaPハイブリッドの形態には影響を与えなかったが、樹状四量体においては単量体や二量体と比較してはるかに短時間で析出物を生じた³⁵。このことは、樹状四量体化がペプチドとCaP核の会合の初期段階を加速していること、ペプチドのクラスター状態がそれらのミネラル化挙動に影響を与えることを例示している。

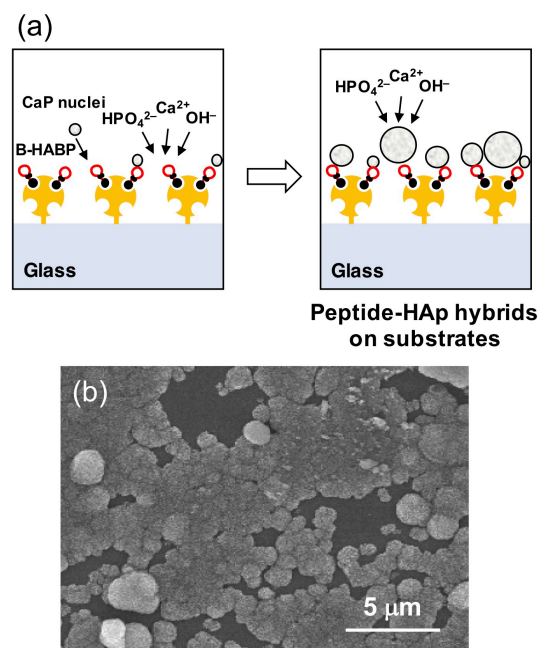


Figure 4. HAp deposition on biotinyl-HABP1 (B-HABP) immobilized on glass substrates via streptavidin. (a) Illustration of immobilization of B-HABP on glass substrates via streptavidin and HAp deposition thereon after incubation in 1.5SBF, and (b) SEM image of the deposits formed on B-HABP-immobilized surface after 1 week incubation in 1.5SBF.

5. HABP1 を用いた SBF 中での材料表面への HAp ミネラル化

次に固体基材上に固定化された HABP1 による SBF 中でのミネラル化挙動を解析した。ガラス基板に対してアビジンを介してビオチン化 HABP1 (B-HABP) を固定化し (Figure 4a)、1.5SBF に1週間浸漬させると、基材表面上に板状構造を有する HAp の析出が誘起された (Figure 4b)³²⁾。1.5SBF 中において生じた微小な CaP または HAp の核が固体基材上に提示された HABP1 配列に結合し、それらが不均一核形成の足場となって HAp の結晶が成長したものと推測される (Figure 4a)。SBF 中に溶解した HABP1 がシート状の析出物を生じたこととの対比は、分布状態が HABP1 ペプチドの SBF 中におけるミネラル化能に影響を及ぼすことを明確に示している。

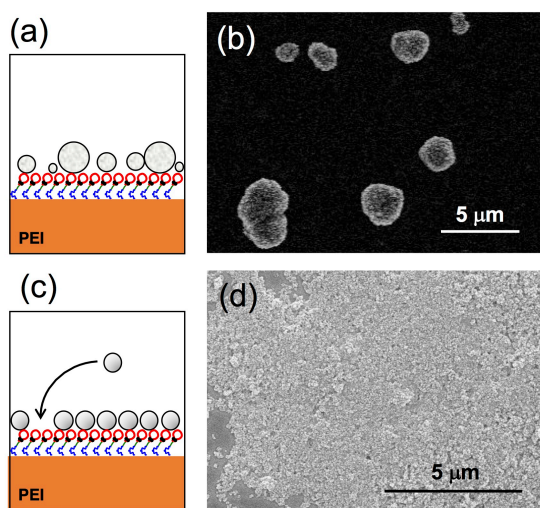


Figure 5. Deposition and immobilization of HAp on polyetherimide (PEI) substrates using HABP1 derivatives. (a, c) Illustration of deposition (a) and immobilization (c) of HAp on PEI using HABP1 derivatives. (b, d) SEM image of the deposits formed on p1-EG₂-HABP treated PEI films after 3 days incubation in 1.5SBF (b) and the HAp nanoparticles immobilized on p1-EG₂-HABP treated PEI films (d).

マテリアル結合性ペプチドを用いた高分子材料表面への HABP1 の固定化と SBF 中での HAp ミネラル化についても検討した³⁶⁾。モデル材料として、その機械的特性、熱安定性などから医療機器等にも利用されているエンジニアリングプラスチックの一種ポリエーテルイミド (PEI) と、PEI 結合性ペプチド p1 (TGADLNT) を用いた。芹澤らによって同定された p1 は PEI フィルム表面に対して 10^8 M⁻¹ オーダーの高い結合定数をもつ³⁷⁾。p1 配列の C 末端側にジエチレングリコールリンカー (EG₂) を介して HABP1 配列を導入したペプチド p1-EG₂-HABP を設計・合成した。p1-EG₂-HABP を PEI フィルムに吸着させた後、1.5SBF に 48 時間浸漬させると、フィルム表面に HAp が析出した (Figure 5a, b)。前述の B-HABP を固定化した系と同様の機構 (Figure 4a) が考えられた。一方で SBF 中での HAp の析出のみならず、p1-EG₂-HABP を用いることで溶液中に分散した HAp や CaP のナノ粒子を PEI 表面に固定することもできた (Figure 5c, d)。それら固定化されたナノ粒子層は、1.5SBF で HAp の不均一核形成部位として有効に機能することも明らかとなった。このようなアプローチは他の材料とその結合性ペプチドについても適用可能である。溶液からの吸着によるペプチドの修飾という方法は、プラズマ処理などの表面改質と比較して簡便で低コストであり、また材料自体の化学的改質を伴わない。さらに、基材の形状に制限がない。患者の症状にあわせて成型加工した後の人工骨材料表面に HAp 層をコーティングする技術としての利用など、さまざまな場面への応用が期待される。

6. 微粒子固定化 HABP1 を用いた HAp-ペプチド複合体の作製

著者らは、微粒子固定化 HABP1 を用いた HAp-ペプチドナノ複合体の作製にも取り組んでいる。ペプチド固相合成樹脂 (ポリスチレンなどをベースとした微粒子) を用いることで、ペプチドを比較的疎に提示することができる。ペ

ペプチド固定化微粒子が SBF 中に分散した状態は、前述までの SBF に溶解したペプチド分子と、基板上に集積したペプチド固定化層との中間に位置する環境といえる。そのような環境の違いが HABP1 のミネラル化能に与える影響に興味をもたれた。また、光解離性リンカーを介して提示された HABP1 を SBF 中にて HAp と複合化をさせた後に光照射により固相合成微粒子から切り出すことで、原理的にはペプチド一分子に対して HAp が複合化した構造体が得られると期待される (Figure 6a)。

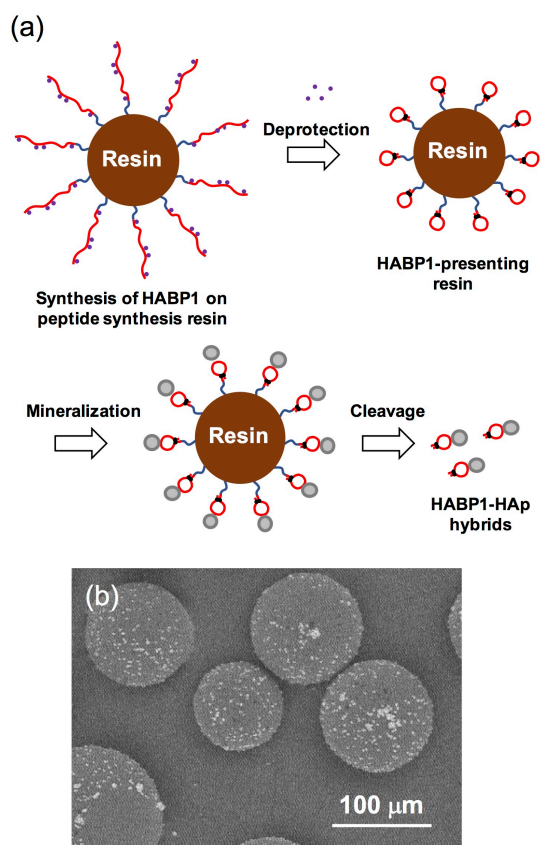


Figure 6. Creation of HABP1-HAp hybrids on peptide synthesis resins. (a) Schematic illustrations of the concept, and (b) SEM image of HABP1-presenting peptide synthetic resin after 1 week incubation in 1.5SBF.

通常の Fmoc ペプチド固相合成法ではペプチド伸長反応後、トリフルオロ酢酸 (TFA) などを用いて側鎖保護基の脱保護とともに担持樹脂からの切り出しを行う。著者らは側鎖の保護基に低濃度の TFA により脱保護可能な 4-メトキシトリチル (Mmt) 基を用い、低濃度の TFA にて樹脂から切り出すことなく保護基の脱保護のみを行うことで、固相合成担体微粒子表面にペプチドを提示させることに成功した。提示されたペプチドは HAp 微粒子に対する結合性を有していることが確認され、また HABP1 配列と担体との間に光解離性リンカーを導入した場合には提示されたペプチドを UV 照射により樹脂から解離させることも可能であった。

得られた HABP1 固定化微粒子を 1.5SBF 中に浸漬させると、微粒子表面へ析出物が生じ、固相合成担体微粒子に提示された HABP1 による HAp 析出、複合化が示唆された (Figure 6b)。一方で、微粒子表面への非特異的な析出を完全に抑制できないなど解決すべき課題も多い。今後、ペプチド密度や SBF への浸漬条件を最適化するとともに、得られた複合体の詳細なキャラクター化を進めていく予定である。

7. まとめ

ペプチドを用いた生体模倣プロセスによるペプチド-HAp ナノハイブリッドの作製について概説した。ペプチドの会合状態や存在状態が HAp あるいは CaP の析出挙動に影響をあたえることが示された。溶解したペプチドから得られるペプチド-CaP 複合体は骨置換材などとして、基材表面に固定された HABP1 による HAp 析出はインプラント材料表面の HAp による機能化法としての応用が考えられる。ペプチドの組織化の形態は多様であり、本稿で紹介したような着想に基づく系の更なる発展が期待される。

生体由来する有機-無機ハイブリッドに関する研究は、精密な設計に基づく新たな有機-無機ナノハイブリッド構造構築への挑戦と、医療に役立つ材料開発という二つの大きな方

向性をもつ。骨が緻密なナノハイブリッド構造から構築されていることを考えると、それらはきっと統合できるはずである。著者らも微力ながらこの分野に貢献していきたい。

8. 謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究について、参考文献に掲載の共同研究者、学生諸氏をはじめとした関係者に深く感謝する。研究の一部は科学研究費補助金(若手研究 B(M. H., 20710088))の補助を受けて実施されたものである。また一部は私立大学ブランディング事業「材料表面・界面における水の学際研究拠点の形成」に関連する研究として実施した。

参考文献

- 1) L. Addadi, and S. Weiner, *Nature* **1997**, *389*, 912-915.
- 2) P. A. Fang, J. F. Conway, H. C. Margolis, J. P. Simmer, and E. Beniash, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 14097-14102.
- 3) P. Fratzl, and R. Weinkamer, *Prog. Mater. Sci.* **2007**, *52*, 1263-1334.
- 4) T. Kato, A. Sugawara, and N. Hosoda, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 869-877.
- 5) A. Sugawara, T. Ishii, and T. Kato, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5299-5303.
- 6) A. Tsortos, and G. H. Nancollas, *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *250*, 159-167.
- 7) M. Antonietti, M. Breulmann, C. G. Göltner, H. Cölfen, K. K. W. Wong, D. Walsh, and S. Mann, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 2493-2500.
- 8) H. T. Schmidt, B. L. Gray, P. A. Wingert, and A. E. Ostafin, *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 4942-4947.
- 9) J. D. Hartgerink, E. Beniash, and S. I. Stupp, *Science* **2001**, *294*, 1684-1688.
- 10) T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, *J. Biomed. Mater. Res.* **1990**, *24*, 721-734.
- 11) T. Kokubo, and H. Takadama, *Biomaterials* **2006**, *27*, 2907-2915.
- 12) C. Ohtsuki, M. Kamitakahara, and T. Miyazaki, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2007**, *1*, 33-38.
- 13) M. Hashizume, M. Maeda, and K. Iijima, *J. Ceram. Soc. Jpn.* **2013**, *121*, 816-818.
- 14) M. Hashizume, A. Sakai, Y. Sakamoto, H. Matsuno, and T. Serizawa, *Chem. Lett.* **2010**, *39*, 220-222.
- 15) M. Hashizume, Y. Sakamoto, A. Sakai, H. Matsuno, and T. Serizawa, *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.* **2010**, *35*, 115-118.
- 16) K. Iijima, A. Sakai, A. Komori, Y. Sakamoto, H. Matsuno, T. Serizawa, and M. Hashizume, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2015**, *130*, 77-83.
- 17) K. Iijima, R. Suzuki, A. Iizuka, H. Ueno-Yokohata, N. Kiyokawa, and M. Hashizume, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2016**, *147*, 351-359.
- 18) K. Iijima, A. Iizuka, R. Suzuki, H. Ueno-Yokohata, N. Kiyokawa, and M. Hashizume, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2017**, *28*, 193.
- 19) M. Hashizume, H. Kobayashi, and M. Ohashi, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, *88*, 534-538.
- 20) M. Hashizume, and R. Saito, *J. Ceram. Soc. Jpn.* **2011**, *119*, 456-459.
- 21) T. Serizawa, H. Matsuno, and T. Sawada, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 10252-10260.
- 22) U. O. S. Seker, and H. V. Demir, *Molecules* **2011**, *16*, 1426-1451.
- 23) I. M. Martins, R. L. Reis, and H. S. Azevedo, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 2962-2980.
- 24) G. P. Smith, and V. A. Petrenko, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 391-410.
- 25) M. D. Roy, S. K. Stanley, and E. J. Amis, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 1830-1836.
- 26) M. Gungormus, H. Fong, I. W. Kim, J. S. Evans, C. Tamerler, and M. Sarikaya, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 966-973.
- 27) S. J. Segvich, H. C. Smith, and D. H.

- Kohn, *Biomaterials* **2009**, *30*, 1287-1298.
- 28) W. J. Chung, K. Y. Kwon, J. Song, and S. W. Lee, *Langmuir* **2011**, *27*, 7620-7628.
- 29) J. Mao, X. Shi, Y. B. Wu, and S. Q. Gong, *Materials* **2016**, *9*, 700.
- 30) M. Gungormus, M. Branco, H. Fong, J. P. Schneider, C. Tamerler, and M. Sarikaya, *Biomaterials* **2010**, *31*, 7266-7274.
- 31) H. E. Jin, J. Jang, J. Chung, H. J. Lee, E. Wang, S. W. Lee, and W. J. Chung, *Nano Lett.* **2015**, *15*, 7138-7145.
- 32) M. Hashizume, N. Kamaya, Y. Uchida, T. Matsubara, and T. Sato, *Chem. Lett.* **2012**, *41*, 588-590.
- 33) K. Onuma, and A. Ito, *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 3346-3351.
- 34) A. Dey, P. H. H. Bomans, F. A. Müller, J. Will, P. M. Frederik, G. de With, and N. A. J. M. Sommerdijk, *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 1010-1014.
- 35) 橋詰峰雄, 小野上彩乃, 飯島一智, 松原輝彦, 内田祐樹, 佐藤智典, *高分子論文集* **2016**, *73*, 55-61.
- 36) K. Iijima, H. Nagahama, A. Takada, T. Sawada, T. Serizawa, and M. Hashizume, *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 3651-3659.
- 37) T. Date, J. Sekine, H. Matsuno, and T. Serizawa, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 351-359.