

「医療に向けた自己組織化等の分子配列制御による機能性材料・システムの創製」
平成14年度採択研究代表者

山下 一郎

(松下電器先端技術研究所 主幹研究員)

「バイオのナノテクノロジーを用いたナノ集積プロセス」

1. 研究実施の概要

本テーマは、生物の持つナノテクノロジーを活用し、数～数十ナノメートルサイズの無機ナノ構造を効率よく作製することをねらいとしている。原子レベルで同じ構造を持ち内部空間を有するタンパク質を利用し、その内部空間で無機材料の結晶化（バイオミネラリゼーション）を行ってナノ粒子やナノワイヤを内包するタンパク質-無機材料複合体を作製する。その後タンパクの持つ自己組織化能により、この複合体のナノ構造を作製し、タンパク質部分だけを選択除去することにより、電子デバイスなどのナノメータサイズ素子のキーコンポーネントを自動的に作製することを目指す。

16年度は以下のような成果を得た。まず15年度に引き続き、半導体ナノ粒子作製の条件探索を通じてバイオミネラリゼーションのメカニズム解明をはかり、化合物半導体におけるメカニズムの概要を明らかにした。また、かご状タンパク質の構造決定を行い高分解能のフェリチンの構造情報を得、それを基にかご状タンパク質の遺伝子的改質を行った。一部の突然変異体では、基板との相互作用に特異性があり、基板上への選択吸着の基礎的データを得ることができた。遺伝子工学的超分子構造構築では、15年度に引き続きファージの部品であるベースプレートを基礎とするタンパク質超分子構造作製の基礎的検討を行い、超分子構造構築への道筋をつけた。タンパク質の化学的修飾による超分子構造作製についても、その基礎となるタンパク質の化学修飾に成功した。

今後バイオミネラリゼーションのメカニズムの解明をさらに進め、内部空間を持つタンパク質に任意の無機材料の内包を目指すとともに、遺伝子的手法やタンパク質の化学修飾により自己組織的ナノ構造を行い、新しい機能性ナノ構造作製を行う予定である。

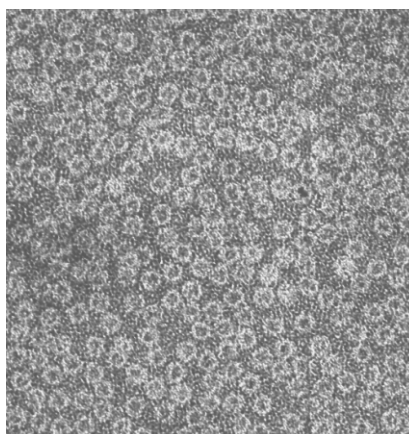
2. 研究実施内容

[バイオミネラリゼーション]

ナノ粒子はその電氣的、光学的性質から興味を持たれているが、その性質は粒子のサイズによって大きく左右される。そのため原子レベルで同じ構造を持つかご状タンパク質を鋳型としてその内部空間に無機材料を析出（バイオミネライズ）させナノ粒子の合成を行い、大きさのそろったナノ粒子を作製する。かご状タンパク質としては、昨年に引き続き、

フェリチンや、Dps、リステリアフェリチンなどを用いた。無機材料としては、還元可能な金属化合物や半導体材料のナノ粒子作製を行った。合成されたナノ粒子は、周囲がタンパク質で取り囲まれているため、ナノ粒子同士の凝集も無く水溶液中に分散性良く保持され、応用に有利であった。

金属化合物では、コバルトや白金コバルトのナノ粒子をフェリチン粒子内に作製した。合成溶液中の金属イオン濃度、pH、温度などの溶液条件を制御することで、酸化コバルトでは、ほぼすべてのフェリチンにナノ粒子が安定的に合成できた。またコバルト白金のフェリチン内での合成にも成功した。化合物半導体では、昨年度はCdSeの合成をおこなったが、本年度はZnSeを取り上げ、そのバイオミネラリゼーションの合成メカニズムの考察を行った。その中から、スロー化学合成手法と2段階合成の手法を提案し、これらがZnSe、CdSeなどのバイオミネラリゼーションに有効であることを示した。この手法はCdやZnイオンなどのアンモニア分子を配位させることで安定化させて、CdSe、ZnSe合成をきわめてゆっくりとさせる「スロー化学合成」手法と、あらかじめこれらCd、Znなどのプラスイオンをフェリチン内部に濃縮した後、セレンイオンを添加する「2段階合成」手法とを合わせたものである。今後はこの手法の更なる展開を行う。



スロー化学合成と2段階合成の手法を組み合わせ、フェリチン内部空間で作製したZnSeのナノ粒子TEM像。(金グルコース負染色) 白い部分はフェリチンのタンパク質殻部分で、中心のドットが合成されたZnSeである。

[フェリチン粒子の構造安定性とX線構造解析]

フェリチン粒子は24サブユニットが球殻構造を作るが、その構造の安定性、自己組織化が注目されている。本年度はサブユニットのN末端残基がフェリチンの安定性に関与していることを明らかにした。特にL-フェリチン (Fer0) のN末端アミノ酸を4残基、8残基欠損させたリコンビナントフェリチン (Fer4、Fer8) をそれぞれHClで酸分解させた後、中性溶液中での巻き戻しを測定して、Fer8では酸変性と巻き戻しが高効率で実現できることを確認した。さらにこれらの差異の原因を調べるため、元のフェリチンおよび変異体を、放射光施設Sprng 8を利用して高分解能X線構造解析を行った。その結果N末端残基欠失によって起こる、フェリチンのサブユニット間及びサブユニット内の水素結合がN末端の欠失に比例して減少し、これが24量体の再構成、巻き戻しに大きく関与していることが明らかになった。このフェリチンのpH安定性の議論は熱安定性の議論と共通する。Fer8によるサブユニットへの分解、24量体への再構成の実現により、内部空間への分子の取り込みが可能となると考えられる。またDpsについてもその生化学的性質と構造解析の基礎

的なデータ収集を行った。

[遺伝子工学的超分子構造体の構築]

東京工業大学と研究協力しつつ、T4ファージの尾部部分とかご状タンパク質を結合した大型のタンパク質超分子構造の作製の基礎的な試みを行った。15年度にプラスミドの設計と一部構築を行ったが、16年度はさらにプラスミドの構築を完成させ、設計したタンパク質の発現を行った。大型のタンパク質超分子はその精製が難しいが、本年度はその手法を確立することに成功すると同時に、TEMをはじめとしてそのキャラクタライゼーションの手法を検討し、高分解能TEMによるその構造の観察に成功しつつある。

また、同じCRESTの研究領域にある「プログラマブル人工蛋白質からの組織体構築」研究チームで作製されたチタン表面を認識するペプチドをかご状タンパク質の表面に配置する研究を昨年度に引き続き行った。本年度はそのプラスミド構築を行い、発現を確認し、パターン化されたチタン上への同フェリチンの選択吸着を確認した。

リング状TRAPタンパク質は多量体からなるリング構造を有し、このサブユニットを遺伝的に改質してリング構造体を積み上げることによりチューブ状構造物を構築することを試みた。本年度は変異体TRAPのX線結晶構造解析を行い、その構造を確認した。またこのリング構造の内部にナノゴールドを析出させるため、システインの導入を行い、その導入を確認した。

[タンパク質の化学修飾による機能付加、2次元配列化]

かご状タンパク質、特にフェリチンのタンパク質殻外部に、DNAや種々の化学物質を、化学反応を利用して共有結合で固定することにより新しい機能の付加を目指した。本年度はPEGをリジン残基に共有結合で固定する表面修飾を行った。まず分子量が2,000ないし5,000程度のPEGを用いたフェリチンの周囲への化学修飾反応条件の最適化をおこなった。その反応状況は、動的光散乱による計測、ゲルろ過、ネイティブ電気泳動によってトレースされ、1分子あたり約24個のPEGが修飾できるようになった。さらにこのPEG修飾フェリチンをTOF-MASで分析し、分子量のPEG分子修飾による増加を確認した。このようにタンパク質のPEG修飾に成功したので、今後は、この手法を利用してフェリチンの空間的配置を可能とするリンカーを修飾させる予定である。特にDNAによるフェリチンの結合を実施したい。

また基板の修飾に高電解質交互膜を利用して行い、フェリチンの高密度吸着も検討した。その結果、交互膜を7-8層以上とすることで、平坦で安定した膜が形成できることが確認された。さらに、フェリチンの電荷をpHにより調整することで、表面が正負電荷交互に現れる高電解質交互膜の性質を利用して、吸着の制御にも成功した。

3. 研究実施体制

バイオミネラルナノ構造グループ

- ① 研究分担グループ長：山下一郎（松下電器先端技術研究所、主幹研究員）
- ② 研究項目：

- 球殻状超分子の変異株の作製とバイオミネラリゼーションのメカニズム解明
- 球殻状タンパク質の化学的修飾による複合粒子の作製
- 化学分子とタンパク質の相互作用を用いたナノ構造の構築
- 球殻状タンパク質の熱安定性の構造解析による考察

プロテインナノチューブ構造グループ

- ① 研究分担グループ長：JeremyTame（横浜市立大学生体超分子システム科学専攻、教授）
- ② 研究項目：
 - リング状超分子の変異株の作製によるチューブ構造の構築
 - リングタンパク質の化学的修飾および核酸鎖修飾による相互作用制御
 - 球殻状、リング状タンパク質のX線構造解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Yamashita. I
Bio-template Synthesis of Uniform CdSe Nanoparticles Using Cage-shaped, Apoferritin
Chemistry Letters
2004. 9
- Yui. H, Shimizu. Y, Kamiya. S, Yamashita. I, Masuda. M, Ito. K, Shimizu. k
Encapsulation of Ferritin within a Hollow Cylinder of Glycolipid Nanotubes
Chemistry Letters
2005. 2
- Yoshii. S, Yamashita. I
Making Monolayer of Inorganic Nanoparticles on Silicon Substrate
Japan Journal of Applied Physics
2005. 3

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：1件）