

「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

生物はナノメートルサイズの物質を自己集合的に集積して機能性ナノ構造を作製したり、その表面の性質を利用して無機材料を析出させるなどの能力を持っておりナノテクノロジーの観点から魅力的である。この生物の能力を活用し、数～数十ナノメートルサイズの無機ナノ構造を自己集合的に効率よく作製することを目的として研究を進め 17 年度は以下のような成果を得た。

球殻状タンパク質のフェリチンや Dps、チューブ状タンパク質の TMV などナノ空間でナノ粒子、ナノワイヤの作製を行った。球殻状タンパク質では、ZnSe、CdS、CdSe などの化合物半導体のナノ粒子合成を中心に研究を進め、蛍光をもつナノ粒子の合成を行い、そのナノ粒子合成の初期過程メカニズムについての情報も得た。TMV では、CoPt 合金の内包に成功した。その他フェリチン変異体、フェリチン核形成極初期過程の X 線構造解析を行い、バイオミネラリゼーションの核形成部位の情報を得た。

タンパク質超分子によるナノ構造構築では、対称性を利用して球殻状超分子とロッド状超分子それぞれのサブユニットをつなげたキメラタンパク質を設計し、タンパク質の自己組織化を用いることで大型のテトラポッド状のタンパク質超分子を作製した。また脂質チューブ内に Dps (タンパク質 + ナノドット) 高密度内包を実現し、1 次元配列の可能性を確認した。リング状タンパク質 TRAP では、遺伝子改変が自然界に無い新しい 12 量体のリング構造を実現することを見出した。

タンパク質表面の修飾による改質では、球殻状タンパク質の PEGylation、カーボン膜結合性ペプチドの修飾を行った。これにより、バイオミネラリゼーションの効率化、基板表面でのタンパク質 2 次元アレイを実現した。また高電解質ポリマーによるフェリチンとの多層構造の作製を行った。

今後バイオミネラリゼーション機構の理解さらに深め、タンパク質に無機材料の効率的内包を行い、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作製をさらに発展させ、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]

球殻状タンパク質、フェリチン、リステリアフェリチン及び Dps への化合物半導体の導入と特性評価を行った。アポフェリチンではこれまで、CdSe、ZnSe の合成に成功してきたスロー化学反応機構と 2 段階合成プロトコルに若干の変更を加えることで、CdS ナノ粒子の作製が可能になった。またこの合成手法を小型球殻状リステリアフェリチンに応用し、合成最適条件を仔細に検討することで化合物半導体 CdS ナノ粒子の作製に始めて成功した。遺伝子変異アポフェリチンを用いたフェリチン内部及び 3 回対称チャネルの電荷の影響の検討から、アポフェリチンの CdS の形成は CdSe、ZnSe 合成とほぼ同じく、陽イオンがはじめに内空に捉えられ、その後陰イオンと反応して結晶ができるメカニズムと理解された。またリステリアフェリチンの CdS コア形成の極初期段階においては、ESI-MASS や X 線結晶構造解析方法により、Cd イオンが、タンパク質に急速に結合することを明らかにすると同時にその内部表面での結合位置を X 線構造解析で特定した。またその後のナノ粒子の形成過程は自己触媒的成長によると示唆された。さらにこのコアからの蛍光を確認した。TMV の内部空間では CoPt 合金の合成をおこなった。

[遺伝子工学的超分子構造体の構築]

単電子トランジスタの鋳型となる円筒状タンパク質と球状タンパク質を自己組織化させることによる新規超分子構造体の作製を行った。球状構造体としてリステリアフェリチンを、円筒状構造体として T4 バクテリアファージ由来 gp5 の β ヘリックスドメイン (gp5C) を用いた。リステリアフェリチンは 12 個のサブユニットモノマーが自己組織化することにより直径 9nm、コア内直径 5nm の球殻状タンパク質を構築する (図 1)。また gp5C は三量化し、長さ 12nm、直径 3nm の円筒状タンパク質を形成する (図 1)。リステリアフェリチンはその N 末端で三回対称軸を有し、一方で gp5C はその C 末端で三回対称軸を有しているので、gp5C の C 末端にリステリアフェリチンの N 末端を遺伝子的に融合した新規のサブユニット (BSPS) を作製し、大腸菌発現系により発現・精製した。結合部分のリンカーを種々検討した結果、図 2 に示すような円筒状の構造体と球状構造体を組織化させた超分子構造体の作製に成功した。TEM により球状構造体の周辺に筒状構造体が四本突起した構造、及び角度により三本突起に見える構造が確認できた (図 3)。また CD 測定や DLS 測定からも、期待した構造体が形成していることが確認された。さらに、自己組織化した BSPS のリステリアフェリチン内部にナノ粒子の形成も確認された。

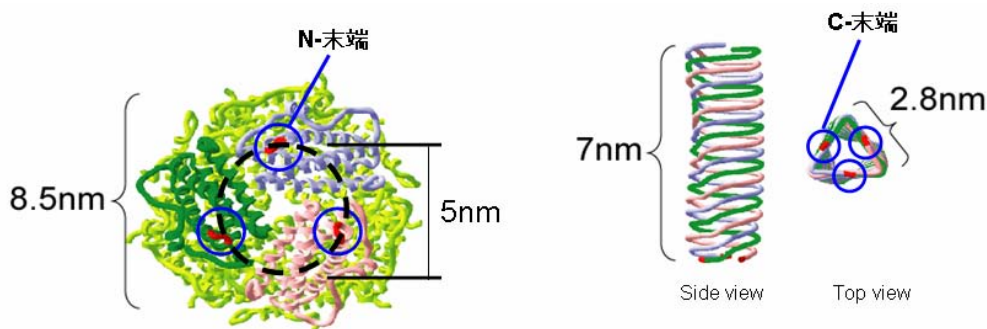


図1 球状タンパク質と筒状タンパク質の候補
A; リステリアフェリチンの構造 B; gp5C の構造

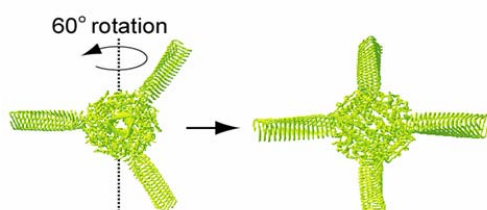


図2 自己組織化した BSPS のモデル構造

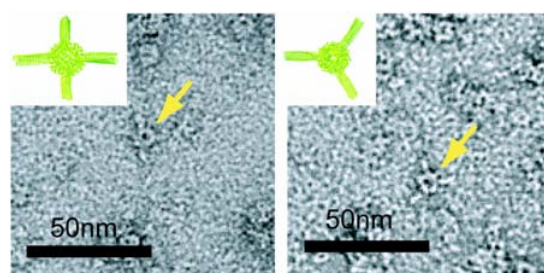


図3 BSPS の TEM 画像

他の超分子構造の構築として、リング状タンパク質 TRAP の遺伝子工学的改質を行い、サブユニットを 3 個又は 4 個つなげたタンデム構造をつくることにより、自然界には無い 12 量体のリング構造の構築が行われた。また X 線構造解析により結晶内ではこの TRAP がチューブ状に結合していることも明らかになった。

[フェリチンタンパク質の修飾・2次元配列化]

フェリチンタンパク質のアミノ末端にカーボンナノホーン吸着ペプチドを付加し、その挙動を電子顕微鏡にて観察したところ小型の 2 次元結晶・配列化が確認された。この性質を利用して、親水性カーボン膜をシリコン基板上に作製し、ここにカーボンナノホーン吸着ペプチド修飾フェリチンを吸着させ、遠心乾燥させた。その結果基板上に 2 次元配列化が直接実現できることが示された。吸着条件の検討から、配列規則性の実現には、精製純度の確保や経時劣化の排除が必要であること確認した。この 2 次元配列化は少なくとも 2 種類のコアで作製可能となった。またフェリチンの表面に PEG を修飾する手法を開発し、TOF-MASS、ゲルろ過により修飾を確認した。

交互吸着法によりフェリチンもしくはアポフェリチンとカルボキシル基を有するランダム共重合体 (poly(NIPAAm-co-CIPAAm)) を静電相互作用により積層化させ、さらに安定性向上のため共有結合を導入した積層薄膜の内部構造およびフェリチン内部金属の酸化・還元反応について評価した。QCM および原子間力顕微鏡により表面形態や膜厚をモニター

しながら、フェリチン、アポフェリチン、poly-(NIPAAm-co-CIPAAm)を逐次的な積層化を行った後、縮合剤溶液による積層薄膜の安定化した。サイクリックボルタンメトリー測定を行うと、フェリチン/poly(NIPAAm-co-CIPAAm)積層膜ではフェリチンの含有量に比例した酸化還元に伴うピークが観察された。これにより構造安定な積層薄膜の電気化学的特性をナノレベルで制御可能であることが示唆された。また高分子薄膜上へフェリチンと酸化チタンとの交互積層膜を作製し、酸化チタン薄膜を焼成して、フェロセニウムイオンの光還元反応に成功した。

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、主幹研究員）
- ②研究項目：球殻状・チューブ状タンパク質超分子の変異株の作製と新規材料のバイオミネラル化の実現およびバイオミネラル化メカニズムの解明
キメラタンパク質を中核とする超分子ナノ構造の作製
遺伝子的、化学的改質によるタンパク質や基板間の相互作用を用いたナノ構造の構築
DNA 吸着タンパク質の構造解析と安定性の考察およびナノ構造構築

「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：J. Tame（横浜市立大学、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遺伝子的、化学的修飾、またはそれらの組み合わせによるナノ粒子の固定、ナノ構造の構築
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（原著論文）発表

- Yoshitsugi Fukusige, Masahiro Muraoka, Ichiro Yamashita, ; “Synthesis and Characterization of Ferritin-Polymer Hybrid”, Transactions of the Materials Research Society of Japan, Vol.30[2],549-552(2005)
- Kenji Iwahori, Keiko Yoshizawa, Masahiro Muraoka, Ichiro Yamashita,; “Fabrication of semiconductor Nano-particles in the Protein Cage of Apoferritin”, Mater. Res. Soc. Proc., Vol,873E.K.3.1(2005)
- Mitsuhiro Okuda, Ichiro Yamashita, Kenji Iwahori, Hideyuki Yoshimura, ; “Fabrication of In2O3 oxide semiconductor nano-particles using apoferritin”, Mater. Res. Soc. Proc., Vol,873E.K3.13(2005)

- Shinya Kumagai, Shigeo Yoshii, Kiyohito Yamada, Isamu Fujiwara, Nozomu Matsukawa, Ichiro Yamashita,; “Nanopatterning of Vapor-deposited Aminosilane Film using EB Lithography for Ferritin Protein Adsorption”, Journal of Photopolymer Science and Technology, Vol.18,495-500(2005)
- Ken-Ichi Sano, Kumiko Ajima, Kenji Iwahori, Masako Yudasaka, Sumio Iijima, Ichiro Yamashita, Kiyotaka Shiba,; “Endowing a Ferritin-Like Cage Protein with High Affinity and Selectivity for Certain Inorganic Materials”, Small, 1.No8-9 826-832(2005)
- Kenji Iwahori, Keiko Yoshizawa, Masahiro Muraoka, Ichiro Yamashita, ; “Fabrication of ZnSe Nanoparticles in the Apoferritin Cavity by Designing a Slow Chemical Reaction System” Inorganic Chemistry, 44.6393-6400(2005)
- Ichiro Yamashita,; “Biological path to nanoelectronics devices”, Proc. of SPIE, Vol.5650 1-8 (2005)
- Tomohiro Hayashi, Masahiko Hara,; “Long-Ranged and Short Ranged Electrostatic Interaction Between Modified Silicon Surfaces and Recombinant Ferritin Molecules”, The Japan Society of Applied Physics, The Japan Society of Applied Physics, Vol.44,No.7B, 5374-5377(2005)
- Rikako Tsukamoto, Kenji Iwahori, Masahiro Muraoka, Ichiro Yamashita,; “Synthesis of Co₃O₄ Nanoparticles Using the Cage-Shaped Protein, Apoferritin” The Chemical Society of Japan, Vol.78,No.11, 2075-2081(2005)
- Atsushi Miura, Takio Hikono, Takashi Matsumura, Hiroshi Yano, Tomoaki Hatayama, Yukiharu Uraoka, Takashi Fuyuki, Shigeo Yoshii, Ichiro Yamashita,; “Floating Nanodot Gate Memory Devices Based in Biomineralized Inorganic Nanodot Array as a Storage Node” Japanese Journal of Applied Physics, Vol.45,No.1,L1-L3(2006)
- Takio Hikono, Takashi Matsumura, Atsushi Miura, Yukiharu Uraoka, Takashi Fuyuki, Masaki Takeguchi, Shigeo Yoshii, Ichiro Yamashita,; “Electron confinement in a metal nanodot monolayer embedded in silicon dioxide produced using ferritin protein” Applied Physics Letters, Vol.88,023108 (2006)
- Tomohiro Hayashi, Ken-Ichi Sano, Kiyotaka Shiba, Yoshikazu Kumashiro, Kenji Iwahori, Ichiro Yamashita, Masahiko Hara,; “Mechanism Underlying Specificity of Proteins Targeting Inorganic Materials” NANO LETTERS, Vol.6, No.3, 515-519

(2) 特許出願

H17 年度出願件数：2 件（CREST 研究期間累積件数：2 件）