

「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

(松下電器産業(株)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

生物の持つ機能で、ナノメートルサイズ分子が機能性ナノ構造を自動的に作製する自己組織化能や、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が注目されている。この生物の能力を活用して、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指している。平成 18 年度は以下のような成果を得た。

同一サイズのナノ粒子・ナノワイヤの作製を目指して、球殻状タンパク質のフェリチンや Dps、さらにチューブ状タンパク質の TMV などのナノ空間でのナノ粒子、ナノワイヤ作製を行った。フェリチンでは化合物半導体のナノ粒子合成を中心に研究を進め、波長の異なる蛍光をもつ CdS ナノ粒子の合成に成功した。TMV では、昨年成功した CoPt 合金の内包のメカニズムを考察した。また、TMV の変異体作製ができるシステムを構築した。

リング状タンパク質 TRAP では、基板吸着と金ナノ粒子捕獲の 2 つの機能を付与して、メモリデバイスの作製に成功した。また脂質チューブにサンプルを内包する電子顕微鏡の新しいサンプル固定法を提案した。

フェリチン表面の遺伝子的改質に取り組み、基板上直接フェリチン 2 次元結晶作製や、基板上へのフェリチン分子配置を行った。タンパク質表面の化学修飾による改質では、フェリチンの PEGylation による、Co₃O₄ ナノ粒子の作成時の溶液中不要沈殿の抑制に成功した。高電解質ポリマーとフェリチンとの相互作用を利用した多層構造については、酸化還元による鉄イオンの挙動を明かにした。

今後は、バイオミネラリゼーションのメカニズムの全過程の詳細解明を行い、内部空間を持つタンパク質に任意の無機材料の内包やヘテロ材料ナノ粒子の作製の指針を取得する。また遺伝子的手法や化学修飾による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を固体基板上に作製する予定である。

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 Dps への化合物半導体の導入と特性評価、ならびに硫化金の導入を行った。

化合物半導体 CdS ナノ粒子の球殻状タンパク質内での合成では、これまでの研究成果であるスロー化学反応機構と2段階合成プロトコルをアポフェリチンに応用して、硫黄原子源の探索を行った後、反応溶液の条件を調整することで粒径の異なる CdS ナノ粒子を得た。

(図1) この CdS ナノ粒子保持フェリチン溶液の蛍光を 310nm で励起したところ、直径に応じて蛍光波長が変化した。(図2) また昨年度初めて成功したリステリア Dps 内での CdS ナノ粒子の作製を進展させ、溶液条件、合成時間を変化させることでリステリア Dps の内部空洞に CdS ナノ粒子の作製にも成功した。アポフェリチン空洞内での硫化金のナノ粒子合成では、金イオンの錯体をチオウレアを利用して作製し、得られた正の電荷を有する金イオン錯体が負に帯電するフェリチンと相互作用することを利用した導入を設計した。その結果 pH8 の溶液で硫化金のナノ粒子を合成した場合 95%以上のコア形成率を得た。これらの知見からナノ粒子合成のメカニズムを議論し、初期過程についてはほぼそのメカニズムが明らかになった。さらに外表面への金吸着ペプチドを付加したフェリチンおよび TMV を遺伝子的に作製した。PEG 分子を化学的に修飾したフェリチンでは、 Co_3O_4 コアの作製時に大幅に不要沈殿がなくなることを確認し、そのメカニズム考察を進めた。

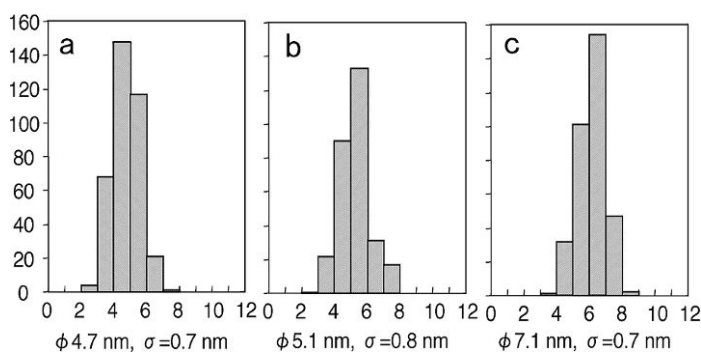


図1. 溶液調整によるナノ粒子直径制御結果

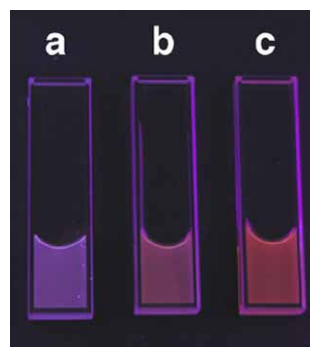


図2. 得られた蛍光発光

TMV を用いたナノワイヤ合成においては、Co-Pt、Fe-Pt のナノワイヤの合成に成功した。TMV を含む溶液に、硫酸アンモニウムコバルト、塩化白金カリウムを加え、還元剤を投入しつつ、超音波を照射すると TMV の内部空洞にナノワイヤの合成が確認できた。(図3) コバルトイオンのみや、白金イオンのみでは TMV 空洞にナノワイヤは合成できず、ナノワイヤの合成には、コバルトイオンと白金イオンが必要であることが確認された。また超音波照射が無いとナノワイヤの長さが短いことから、超音波照射は、TMV 内部のナノワイヤ成長に必要なイオンの拡散を促し材料供給を促進していると推測される。この Co-Pt ナノワイヤ

は、高分解能 TEM による格子像の解析や EDS による分析から、最初のコバルトと白金イオンの量比により CoPt、または CoPt₃ が合成されることがわかった。さらにこれらのワイヤの磁気特性を測定したところ、強磁性体特有のヒステリシスカーブを描いた。(図4) この手法を Fe-Pt ナノワイヤに応用したところ、FePt₃ ナノワイヤが作製できた。また TMV の今後の展開のため、変異体を作製できるシステムを構築した。外表面に材料特異的吸着ペプチドを提示した TMV や、内部空洞の電荷状況を変えた TMV 試作を行った。

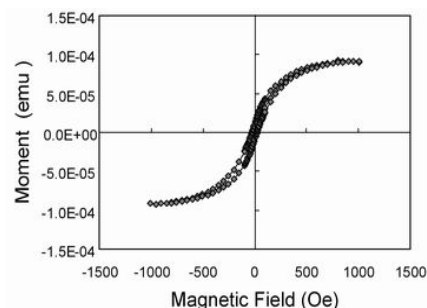
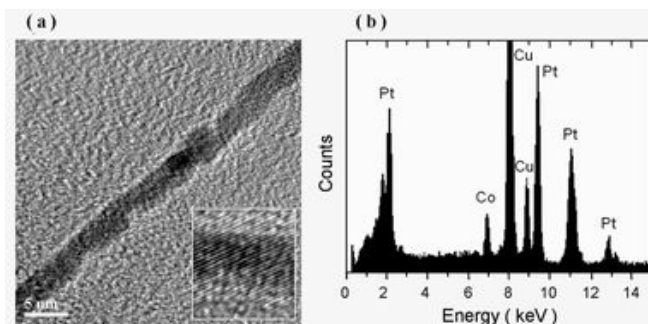


図3. (a)TMV 内部に作製された Co-Pt ナノワイヤ、 (b)ナノワイヤの EDS 測定結果
 図4. TMV 内部空洞に得られた CoPt ナノワイヤの磁気測定結果

[遺伝子工学的超分子構造体の構築]

超分子構造の構築は、昨年に引き続きリング状タンパク質 TRAP の遺伝子工学的改質を行い、チタン結合能力と、金ナノ粒子固定能力を付与した。その結果、基板上に TRAP リングを選択配置し、さらに直径 2nm の金ナノ粒子の固定に成功した。(図5) 基板上に固定された金ナノ粒子はその後フローティングゲートメモリのメモリノードとして働くことが実験的に証明された。これにより TRAP の高い構造安定性を利用した種々のペプチド付与による多機能化が可能であることが明らかになった。昨年度作成した脂質チューブにサンプルを内包する手法を利用して電子顕微鏡の新しいサンプル固定法を提案し、Dps (タンパク質 + ナノドット) の 3 次元像および元素分析に成功した。

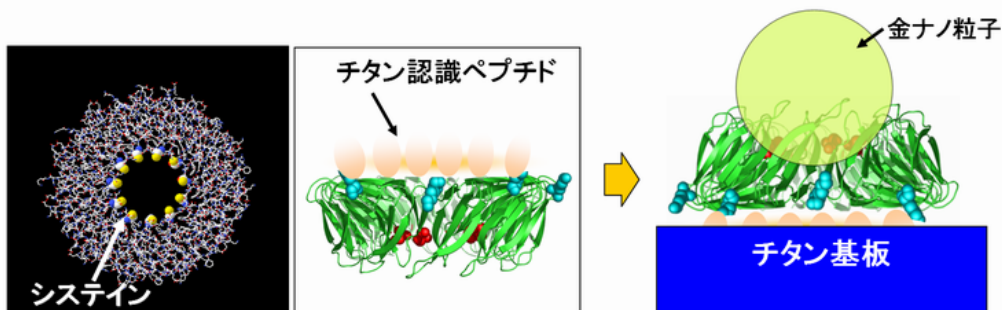


図5 2つの機能を付加した TRAP タンパク質：リング内部にシステイン残基を、端部にチタン認識ペプチドを遺伝子的に導入し、金ナノ粒子の基板固定を行った。

[フェリチンタンパク質の配置]

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たフェリチンによる基板上直接2次元結晶化のメカニズム解明を進め、ペプチド内のアミノ酸の果たす役割を明らかにした。またフェリチン外表面のアミノ酸置換を行い、基板上に配置した正に帯電したパターン上への一分子吸着配置の効率を70%以上に高めた。

交互吸着法により poly(NIPAAm-co-CIPAAm)、または PVAm とフェリチンとの間で静電相互作用を駆動力とした逐次的な積層化を行い、その後縮合剤による架橋反応を実施してフェリハイドライトコアを持つフェリチン粒子の3次元積層構造を実現した。この構造は安定でサイクリックボルタンメトリー測定に耐久性があり、フェリチンコアの酸化還元に伴うピークが観察された。その解析から、3次元積層されたフェリチンコアの酸化還元は、何らかのメディエーターにより、積層されたすべての層の関与が示唆された。またカルボキシル基またはアミノ基を有するポリマーからなる積層薄膜は、積層薄膜内での電子移動メカニズムが異なることが示唆された。

3. 研究実施体制

(1)「バイオミネラルナノ構造」グループ

①研究者名

山下 一郎 (松下電器産業 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リゼーションの実現およびバイオミネラリゼーションメカニズムの解明
- ・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、および脂質ナノチューブとの相互作用を用いたナノ構造の構築

(2)「プロテインナノチューブ構造」グループ

①研究者名

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、ナノ構造の構築とデバイス作製
- ・球殻状、リング状タンパク質のX線構造解析

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Sugimoto Kenji(JST), Kanamaru Shuji, Iwasaki Kenji, Arisaka Fumio, Yamashita Ichiro “Construction of a Ball-and-Spike Protein Supramolecule” *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 2725-2728 (2006)
- Kumagai Shinya(松下電器), Yoshii shigeo, Yamada Kiyohito, Matsukawa Nozomu, Fujiwara Isamu, Iwahori Kenji, Yamashita Ichiro “Electrostatic placement of single ferritin molecules” *Applied Physics Letters*. 88,153103 (2006)
- Jonathan G.Heddle(JST), Yokoyama Takeshi, Yamashita Ichiro, Sam-Yong Park, Jeremy R.H.Tame “Rounding up:Engineering 12-Membered Rings from the Cyclic 11-Mer TRAP” *Structure* 14,925-933(2006)
- Yamada Kiyohito(松下電器), Yoshii Shigeo, Kumagai Shinya, Fujiwara Isamu, Nishio Kazuaki, Okuda Mitsuhiro, Matsukawa Nozomu, Yamashita Ichiro “High-Density and Highly Surface Selective Adsorption of Protein-Nanoparticle Complexes by Controlling Electrostatic Interaction”*Japanese Journal of Applied Physics*45(5A)4259-4264(2006)
- Tsukamoto Rikako(JST), Muraoka Masahiro, Fukushige Yoshitugi, Kawaguchi Tomohiro, Nakatsuji Yohji, Yamashita Ichiro “Co₃O₄nanoparticle synthesis by the PEGylated ferritin” *WSEAS Transaction on Biology and Biomedicine* (6) 3,443-448(2006)
- Iwahori Kenji(JST), Morioka Takuya , Yamashita Ichiro “The optimization of CdSe nano particles synthesis in the apoferritin cavity” *Physica Status Solidi (a)* 203(11)2658-2661(2006)
- Yamashita Ichiro(松下電器), Kirimura Hiroya, Okuda Mitsuhiro, Nishio Kazuaki, Sano Ken-Ichi, Shiba Kiyotaka, Hayashi Tomohiro, Hara Masahiko, Mishima Yumiko “Selective Nanoscale Positioning of Ferritin and Nanoparticles by Means of Target-Specific Peptides” *Small* 2(10), 1148-1152 (2006)
- Kumagai Shinya(松下電器), Yoshii Shigeo, Yamada Kiyohito, Matsukawa Nozomu , Iwahori Kenji, Yamashita Ichiro “Electrostatic placement of nanodots onto silicon substrate using ferritin protein supramolecules with control of electrostatic interaction in solution” *Jpn. J. Appl. Phys.*, 45, 8311-8316 (2006)
- Yoshizawa Keiko(JST), Iwahori Kenji , Sugimoto Kenji, Yamashita Ichiro “Fabrication of gold sulfide nanoparticles using the protein cage of apoferritin” *Chem. Lett.*, 35 (10), 1192-1193 (2006)
- Haku Takeshi(大阪府立大), Hibino Takeshi , Fukada Harumi, Mishima Yumiko , Yamashita Ichiro, Kato Mikio “DNA secondary structure forming at minisatellite

repeat unit sequences” Nucleic Acids Symposium Series, 50, 229-230(2006)

- Matsui Takuro(松下電器) , Matsukawa Nozomu, Iwahori Kenji, Sano Kenichi, Kiyotaka Shiba, Ichiro Yamashita “Realizing a Two-Dimensional Ordered Array of Ferritin Molecules Directly on a Solid Surface Utilizing Carbonaceous Material Affinity Peptides” Langmuir, 23,1615-1618(2007)

(2) 特許出願

平成 18 年度特許出願:0 件(CREST 研究期間累積件数:3 件)