

研究報告書

「温度制御自己組織化システムの設計とナノ粒子高次構造による機能発現」

研究期間：平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

研究者：岩堀 健治

1, 研究のねらい

ナノ粒子はナノテクノロジーの基本的コンポーネントとして、電子デバイスを始め、光機能素子、触媒、環境、化学、化粧品、薬品、医療等、様々な分野で積極的な研究が行われている。ナノ粒子はバルク体に比べ比表面積が大きく、触媒活性や反応性が飛躍的に高いという理由からバルク体とは全く異なった興味深い現象（蛍光発光、トンネル効果、量子効果、触媒活性の増大等）を引き起こすため多くのナノ粒子が作製され、その機能開発に凌ぎが削られている。さらに、ナノ粒子は規則的に並べて精密な高次構造を作製したり、あるいは精密に配置する事で、蛍光増強作用やラマン増強作用といった今までにはない優れた機能を発揮し、様々な材料やデバイス創成への展開と新機能発現が期待される。

ナノ粒子の二次元、三次元構造の構築は、トップダウン技術を中心にナノエッチング、静電噴霧法、インクジェットナノプリンティング、収束電子ビーム、リソグラフィー、EB等を用いて、基板上にパターンを作製した後 DNA やポリマーを仲介にナノ粒子配列を作製したり、直接ナノ粒子を配置する方法がよく研究されている。一方、生体超分子のウイルスやタンパク質等のバイオテンプレートを用いた配列制御法も数少ないが報告されている。シリコン基板上へバクテリオファージの自己集合能を利用した半導体・磁性ナノ粒子の二次元、三次元構造化の研究も進められているが完全配列化が難しく、ナノ粒子集合体としてナノ配線及びリチウムイオン電池のパーツとして利用するにとどまっている。また、Bio Layer by Layer (Bio-LBL) 法によってポリマー上にナノ粒子を積み上げる方法もある。しかし、これらのどの方法にも一長一短あり、現在の技術では多大な手間と時間を要し、高価な設備が必要であり、ナノ粒子の精密高次構造とナノ配置を簡単に実現するのは難しい。

本研究の目的は、耐熱性があり直径 7 nm の内部空洞内に多種多様な 20 種類以上のナノ粒子を作製する事が可能なフェリチンタンパク質-ナノ粒子複合体に、温度応答付与を目的としてデザインされた DNA の非対称修飾を実現することにより、溶液の温度変化のみで簡単に自動でナノ粒子の高次構造構築とナノ粒子配置コントロールが可能となる、ナノ粒子ハンドリングシステムの構築である。この技術により様々なナノ粒子の高次構造が可能となり、デバイス作製に応用する事で今までのものを凌駕する新機能ナノ電子デバイスの創出が期待される。

2, 研究成果

本研究は下記の研究ステップにおける課題を達成することにより研究を推進し、作製した温度応答性を持つ DNA 非対称修飾フェリチンを用いる事で最終的に温度応答自己組織化によるナノ粒子の積層構造構築を試みた。

- (1) フェリチンタンパク質への DNA 非対称修飾法の確立
- (2) DNA 修飾フェリチン機能化のためのナノ粒子ライブラリー作製
- (3) 温度応答性 DNA タグのデザインと温度応答性フェリチンタンパク質の作製
- (4) 温度制御自己組織化によるナノ粒子三次元構造作製

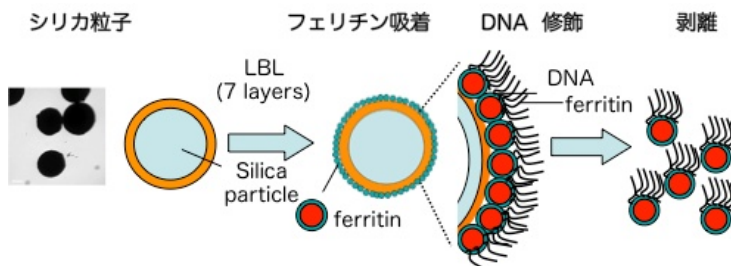


図1 DNA 非対称修飾フェリチン作製法（シリカビーズ法）

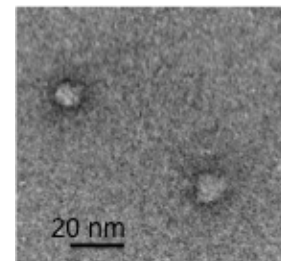


図2 DNA 非対称修飾フェリチン TEM 像

(1) フェリチンタンパク質への DNA 非対称修飾法の確立

フェリチンタンパク質を三次元に積層化するためにはフェリチンタンパク質外表面に異方性表面を作製することが必要であった。そこで、まず異なる温度で応答する 2 種類の DNA をフェリチン表面に非対称修飾するための方法の確立を行った。フェリチンタンパク質に温度応答性を持たせるためにマレイミド基を持つ DNA 鎖をデザインした(1)。次に、フェリチン外表面には通常 SH 基は存在していないため、遺伝子工学技術によりシステイン残基を 1 フェリチン分子あたり 24 個導入した遺伝子変異フェリチン (SH- フェリチン) を作製した(2)。(1)と(2)を反応溶液中 55 で混合し、DNA のマレイミド基と SH 基を反応させることで簡単にフェリチンへの DNA 修飾ができた。さらに、表面に LBL 膜を持つ直径 5 μm のシリカ微粒子上でこの DNA 修飾反応を行う事で、フェリチン同士の立体障害を利用してフェリチンの片面のみに DNA を非対称修飾するシリカビーズ法を開発した。この方法により最終的に大量の DNA 修飾フェリチンを得ることができる DNA 非対称修飾法の確立に成功した(図 1)。作製した DNA 非対称修飾フェリチンは TEM 観察によって平均直径が 14 nm と DNA 非修飾フェリチンよりも約 2 nm 大きくなり SDS-PAGE 等により DNA の修飾も確認できている (図 2)。

(2) DNA 修飾フェリチン機能化のためのナノ粒子ライブラリー作製

DNA 修飾フェリチンに機能性を付与するために、フェリチン空洞内に種々のナノ粒子を作製し、フェリチンのナノ粒子ライブラリー作製を行った。当初の計画ではフェリチンに DNA 修飾をした後バイオミネラリゼーションによりフェリチン内部に多くのナノ

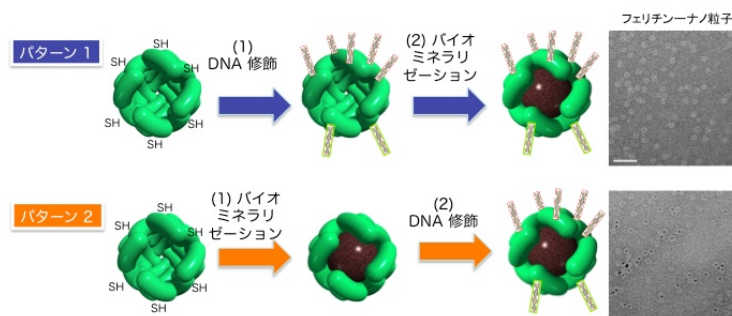


図3 フェリチン-ナノ粒子ライブラリー作製方法

粒子を作製する予定だったが(図3 パターン1)、表面に結合した DNA がフェリチンの表面電荷に影響を与え、ナノ粒子形成が阻害されるという知見が得られたため、方針を転換してバイオミネ랄化後、DNA の修飾を行いフェリチン内部にナノ粒子を作製することに成功した(図3 パターン2)。

既に作製されているナノ粒子の条件を参考に、フェリチン内部にナノ粒子を作製する最適条件を再検討し形成率を上昇させた。また、太陽電池やバイオマーカー等にも重要であると考えられる新規の蛍光及び近赤外蛍光発光ナノ粒子は詳細な条件検討を行う事で最適条件を決定し作製に成功した。その結果 Fe, Co 等の金属ナノ粒子や可視域及び近赤外域に蛍光発光する化合物半導体ナノ粒子である CdS, CuS, ZnS 等の計 6 種類以上のナノ粒子をフェリチン内部に作製することに成功した(図4)。CdS ナノ粒子を内部に保持する CdS-フェリチンは直径 7.1 nm で外側にタンパク質殻を保持しているにもかかわらず、励起波長 350 nm で 640 nm にピークを持つ赤色蛍光発光する。高分解能 TEM 観察より内部の CdS ナノ粒子は多結晶状態であることが確認され、この赤色蛍光発光は欠陥順位による発光であることも明らかにした。CuS-フェリチン複合体は直径 $5.5\text{ nm} \pm 0.7\text{ nm}$ の非常に均一なナノ粒子であり、作製したナノ粒子は XRD や EDX 及び高分解能 TEM 観察等の解析により hexagonal の CuS 結晶であった。また、ZnS-フェリチン複合体は直径 $6.7\text{ nm} \pm 0.4\text{ nm}$ の Hexagonal ZnS ナノ粒子であることを確認している。この ZnS-フェリチン複合体は近紫外側 440 nm に青色の蛍光発光する初めてのナノ粒子-フェリチン複合体である。

さらに同じ「ナノシステムと機能創発」領域のさきがけ研究者、内藤昌信博士との共同研究を行い、フェリチンタンパク質内表面の結晶核形成部位のアミノ酸の配列と立体配置を有効に利用して CdS ナノ粒子を結晶成長させることにより、化合物半導体ナノ粒子から世界で初めて円偏光性蛍光発光の測定に成功した。本成果は日本経済産業新聞等に掲載され特許取得済みである。

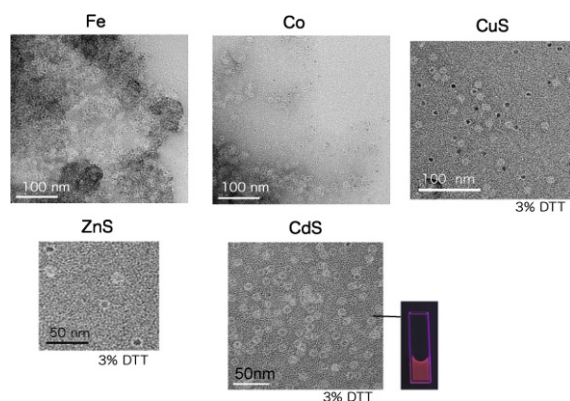


図4 作製したフェリチン-ナノ粒子複合体

(3)温度応答性 DNA タグのデザインと温度応答性フェリチンタンパク質の作製

フェリチンタンパク質に温度応答性を持たせるために末端にマレイミド基を持ち 40 、50 、60 で解離結合する 6 種類の DNA 鎖(40F, 40C, 50F, 50C, 60F, 60C DNA ; F;DNA 主鎖 C; DNA 相補鎖配列、F と C はハイブリダイズによって結合することができる DNA)をデザインした。作製したこれら 6 種類の DNA を一溶液中に混合し、溶液の温度を変化させながら 260 nm の吸光度を測定することで作製した DNA の温度応答性を確認した。その結果、温度を 20 から 70 の範囲で変化させた場合、39 、47 、57 の 3 種類の T_m 値が確認されたため、混合した 6 本の DNA がそれぞれ独立したハイブリダイゼーションを行っている事を確認した。これらの DNA を研究成果 (1) で開発した DNA 修飾法により、研

研究成果(2) で作製した SH 基を持つアポフェリチン或いは鉄コアを持つフェリチン (Fe-フェリチン)に結合させることにより 40,50,60 のそれぞれの温度で解離結合する 6 種類の DNA 修飾フェリチン作製を行った。この 6 種類の DNA 修飾フェリチン (40F, 40C, 50F, 50C, 60F, 60C-フェリチン)の温度応答性の確認を行った所、 上記と同様に 37、46、55 の 3 種類の T_m 値が確認されたため、DNA を結合させたフェリチンにも同様に温度応答性があることを確認した (図 5)。さらに TEM 観察による DNA 修飾フェリチンの温度応答性観察も行い、6 種類の温度応答性フェリチンを混合して 30 及び 60 で熱処理したものをそれぞれ TEM 観察した結果、60 でフェリチンタンパク質が分散しているのが観察されたのに対し、30 では大きなアグリーゲーションが確認された。以上の結果より、6 種類の DNA を修飾した温度応答性フェリチンの作製が完了し、同時に温度応答性の確認が完了した。

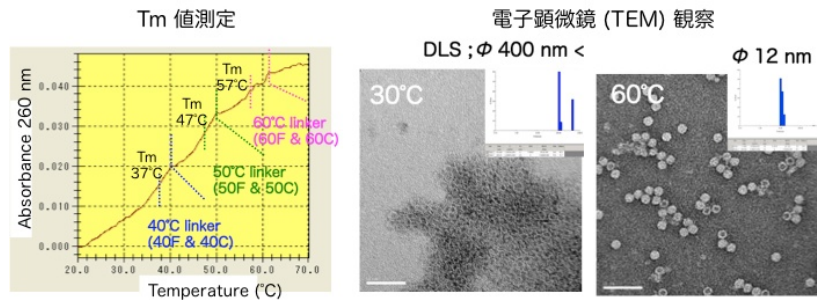


図 5 DNA 修飾フェリチンの T_m 値測定と電子顕微鏡による直接観察

(4)温度制御自己組織化によるナノ粒子三次元構造作製

(1) ~ (3) の研究ステップを通して作製した 6 種類の DNA 修飾温度応答フェリチンを用いて、温度制御自己組織化によるナノ粒子積層構造の構築を試みた。シリコン基板及び QCM 電極金基板上に LBL 膜を作製し、反応溶液を 55 に保ち、その表面に 60 で応答する DNA を持つフェリチン (60F-フェリチン) を結合させる。その後 60C-50F 非対称修飾フェリチンと 50C-40F 非対称修飾フェリチンを混合した溶液の温度を 20 度まで低下させることによって積層化した。この積層化は QCM 基板電極上及びシリコン基板上で行い、ナノ粒子の積層化の状態は SEM と QCM 測定で行った。QCM 測定では温度変化に伴ったナノ粒子の結合量に応じた 3 段のステップが確認され、ナノ粒子が 3 層に積層されていることが示された。また、SEM 観察によりナノ粒子が重なっている様子が観察されたので、温度変化によるナノ粒子の自動積層が確認され、温度応答自己組織化システムの基礎を確立することができたと考えられる。QCM 測定により、フェリチンの各層の積層率を計算すると 1 層目、2 層目、3 層目とそれぞれ、41%、36%、30% と積層化はしているが積層率が若干低い状態であった。これは各層の二次元方向に空間があり、精密な三次元積層構造になっていないことを示唆している。原因として 1 層目が 41% ときれいな二次元結晶が完成していないため、精密積層が達成できていないのではないかと考えている。

本研究を通して、フェリチンタンパク質への DNA 非対称修飾法を確立したことにより、フェリチンタンパク質をバイオテンプレートとして利用し均一ナノ粒子を作製するだけではなく、これに温度応答性というバイオ機能分子に発展させることができ利用範囲がさらに広がったと考えられる。また、可視領域だけではなく、近赤外域に蛍光発光するナノ粒子の開発にも成功した。さらに、さきがけ共同研究による CPL を持つフェリチン-

ナノ粒子複合体の作製にも成功し、共同研究の重要性を改めて感じる事となった。

3, 今後の展開

本研究において DNA タグを有効にデザインし、非対称修飾を行う方法を開発することで温度応答性タンパク質-ナノ粒子複合体の作製と温度応答性自己組織化システムによるナノ粒子ハンドリングの基本システムは完成したと考えている。今後の展開としては以下の3つの課題を中心に研究を進めたい。

(1) ナノ粒子積層構造構築の精密化

温度応答性自己組織化システムによるナノ粒子積層は成功したが、研究成果(4)で示したようにフェリチン-ナノ粒子複合体の1層目の吸着率が低いため(約41%)、ナノメートルオーダーでの精密な三次元積層構造の作製が難しいことが明らかになった。そこで、一層目のナノ粒子の吸着率を上昇させ、正確なナノ粒子の精密構造を作製するために、フェリチン分子間の静電相互電荷のコントロールや吸着方法、基板表面の改善を行い、精密積層構造の構築とナノ配置のために1層目の作製をコントロールする。この達成にともない、積層構造構築において未達成であるフェリチン-ナノ粒子間距離の制御を温度応答性DNA タグの長さを変えることによって達成を目指す。

(2) 作製されたナノ粒子三次元構造の利用と応用

本システムを用いて作製された三次元ナノ粒子構造を利用して、実際に多値メモリや太陽電池モジュール等の積層構造を含んだ電子デバイスの構築を行い、電子デバイスの特性評価を行い、本システムの有効性とナノ粒子の精密ナノ配置によるデバイスの性能改善効果と新機能の判定を行う予定である。

また、DNA 修飾したフェリチン-ナノ粒子複合体はナノ粒子の三次元構造構築のみならず、基板上に作製したDNA 配線やDNA 折り紙等を設計図として用いることで、フェリチン-ナノ粒子複合体のシリコン基板上へのナノ配置や、選択配置を行うことで、DNA のハイブリダイズを利用した電流値の変化を検出するバイオセンサーやアモルファスシリコン結晶作製技術による低温液晶作製技術、グラフェンナノデバイスへの展開も予定している。

(3) バイオミネラリゼーションを生かした新規ナノ粒子の作製と応用

研究成果(2)においてDNA 修飾フェリチンを機能化するために、多くの興味深い新規のナノ粒子-フェリチン複合体の作製を行った。作製した新規の化合物半導体ナノ粒子やCPL 蛍光発光をするCdS ナノ粒子、近赤外蛍光ナノ粒子等の新規ナノ粒子の特徴をより詳細に検討し、電子デバイス分野はもちろん、化学触媒、医療、バイオ等を含めた異分野への展開を行うとともに、解明が進んだナノ粒子作製メカニズム(バイオミネラリゼーション機構)に基づき、磁性ナノ粒子、バイメタルナノ粒子、ドーピングナノ粒子等の新規ナノ粒子の作製および結晶制御ナノ粒子への発展を通じた新機能ナノ粒子の作製を行いたいと考えている。

4, 自己評価

本研究を通して、フェリチンタンパク質に DNA を非対称修飾する技術は確立し、種々のナノ粒子を持つ DNA 修飾フェリチン作製が可能となった。計画していたこれらの技術の達成により、ナノ粒子の三次元構造を作製することが可能となり、本研究の大きな目標であった温度制御自己組織化システムの設計とナノ粒子高次構造作製についてはほぼ実現できたと考えている。

DNA 修飾フェリチン内部への新ナノ粒子を作製研究では、研究全体を通してバイオミメタリゼーションのメカニズム解明が進んだ。さらに改良 SCRY (slow chemical reaction system) により、溶液条件（特に S イオンの濃度と溶液 pH）をコントロールすることで、6 種類以上の新規ナノ粒子の作製が可能となり本法の汎用性が証明されるとともに、蛍光発光ナノ粒子や CPL 発光ナノ粒子、近赤外発光ナノ粒子などの予想以上の多様なナノ粒子の作製に成功した。これらの成果は今後、電子デバイス、医療、触媒化学などの分野へのタンパク質-ナノ粒子複合体の活用とさらなる発展が期待されるはずである。

また、当初の研究計画では考えられなかったいくつかの問題点も明らかになった。例えば、研究成果 (2) において、当初はフェリチンに DNA を修飾した後、内部にナノ粒子を作製する予定であったが、この方法ではフェリチン表面電荷の違いが原因で難しい事がわかり、ナノ粒子を作製後 DNA を修飾する方法に変更した。このような研究途中で発生した予想外の問題点はアプローチ方法の工夫を行う事で問題の解決を行い、同時に有益な知見を得ることができた。

残された今後の課題としては、ナノ粒子の積層構造の構築において、現段階ではナノ粒子積層の精密性があまりよくないため、当初の計画にあった DNA リンカーの長さによるナノ粒子間隔の制御とナノ粒子積層構造構築による機能測定の部分が未達成である。しかし精密性の改善点と対処法が明らかになってきたので、今後の研究により未達成部分を早急に進めることが可能になるはずである。また、研究全般を通して DNA 修飾フェリチンの回収量がまだ少なく実験の律速段階になることがあったため、今後、回収方法のスケールアップとシステム改良の余地もあると考えている。

また、本さがけ研究「ナノシステムと機能創発」における領域会議がきっかけとなり、全く分野が異なる研究者と共同研究を行う機会に恵まれた。その結果 CPL 蛍光発光する世界初のフェリチン-CdS ナノ粒子複合体の作製に成功したことは想定外の素晴らしい成果である。この成果によりタンパク質-ナノ粒子と光化学の融合というあたらしい研究分野への更なる発展が期待され、さがけ研究における共同研究の重要性を改めて感じる成果となった。

本研究の実施により得られた、タンパク質への DNA 修飾方法、温度制御自己組織化システムやナノ粒子積層構造、多くの新規フェリチン-ナノ粒子複合体等の成果は、タンパク質-無機物の複合体に温度応答性のような有用な機能性を保持させるための重要な指針となり、今後、バイオ融合マテリアルが多くの分野において研究利用されるための礎を築くとともに、新機能創成に結びつくと考えられる重要な基礎的研究成果であると考えている。今後、本研究成果の益々の発展が期待される。

5. 研究総括の見解

DNA を非対称修飾することにより、温度変化によるフェリチンナノ粒子の高次構造形成

と配置制御可能なシステム構築、およびその応用を目指した。

岩堀氏はシリカビーズ上における立体障害を利用して、フェリチンの片面のみに DNA を非対称修飾するという新技術を確立し、この DNA 非対称フェリチンを大量に合成することにも成功した。この研究成果を通して 6 種類の DNA 修飾温度応答フェリチンを作製し、目的とする温度制御ナノ粒子積層構造構築にも成功した。

また、フェリチン内部に Fe, Co 等の金属ナノ粒子や蛍光発光化合物半導体ナノ粒子 (CdS, CuS, ZnS 等) を作製することに成功した。同氏はこの結果を発展させ、CPL 蛍光発光する世界初のフェリチン-CdS ナノ粒子複合体を本領域さきがけメンバーとの共同研究により作製した。この成果は、タンパク質ナノ粒子と光化学の融合という新しい分野への発展が期待され、高く評価されよう。

今後、本研究を発展させて、多層構造を含んだメモリや太陽電池モジュール等、電子デバイスの構築と制御、デバイス化への可能性を引き続き検討してほしい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kenji Iwahori, Rie Takagi, Naoko Kishimoto, Ichiro Yamashita, A size controlled synthesis of CuS nano-particles in the protein cage, apoferritin, *Mater. Lett.*, **65**, pp.3245-3247 (2011)
2. Bin Zheng, Mutsunori Uenuma, Kenji Iwahori, Naoya Okamoto, Y. Ishikawa, Yuki Haru Uraoka and Ichiro Yamashita, Sterically controlled docking of gold nanoparticles on ferritin surface by DNA hybridization, *Nanotechnology*, **21**(4), pp.045305 (2010)
3. Naito Masahiro*, Kenji Iwahori*, Atsushi Miura, Midori Yamane, Ichiro Yamashita, Circularly Polarized Luminescent CdS Quantum Dots Prepared in Protein Nanocage, *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, pp.7006-7009 (2010)
*equal corresponding author
4. Ichiro Yamashita, Kenji Iwahori, Kumagaya Shinya, Ferritin in the Field of Nano-Devices, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1800**, pp.846-857 (2010)
5. Kenji Iwahori, Ichiro Yamashita, Size-controlled one-pot synthesis of fluorescent semiconductor nanoparticle, cadmium sulfide, in an apoferritin cavity, *Nanotechnology*, **19**, pp.495601 (2008)

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 2 件

PCT/JP2009/56060

発明者: 岩堀健治、内藤昌信

発明の名称: 円偏光発光性ナノ微粒子

出願人: 科学技術振興機構 (JST)

国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学

出願日: 2009 年 3 月 26 日

特願 2008-088945

発明者: 岩堀健治、内藤昌信



発明の名称: 円偏光発光性ナノ微粒子
出 願 人: 科学技術振興機構 (JST)
国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学
出 願 日: 2008 年 3 月 29 日

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

招待講演

岩堀健治

タンパク質-ナノ粒子複合体による新機能発現とナノ電子デバイス作製

Characterization of protein-nano-particles and fabrication of nano-electronic devices

第 63 回日本生物工学会大会(2011.9.26) 東京 他

著作物

岩堀健治、山下一郎

生体物質を用いた金属ナノドット形成(現代表面科学シリーズ第 4 巻)表面新物質創成

共立出版(株) pp.125-139 (2011)

岩堀健治、村岡雅弘、山下一郎

バイオナノプロセスによるデバイス作製

ナノバイオテクノロジー新しいマテリアル、プロセスとデバイスー

シーエムシー出版, pp.194-204 (2009)

岩堀健治、山下一郎

タンパク質ナノテンプレートを用いた蛍光発光ナノ粒子の作製と特徴

メタルバイオテクノロジーによる環境保全と資源回収

～新元素戦略の新しいキーテクノロジー～

シーエムシー出版, pp.166-174 (2009)

他

新聞発表/プレスリリース

岩堀健治、内藤昌信

奈良先端科学技術大学院大学・科学技術振興機構

「ナノ粒子をタンパク質内部で合成」

2010 年 8 月 30 日 日本経済産業新聞 12 面 他