

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20710089
 研究課題名 (和文) ナノ電子デバイス用雪だるま型バイオナノパーツの創成と機能評価
 研究課題名 (英文) Fabrication of a functional snow-man model bio-nanoparts for
 nano-electric devices

研究代表者

岩堀 健治 (IWAHORI KENJI)
 奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・研究員
 研究者番号：90467689

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、詳細なナノ粒子作製条件の検討を行い、直径 12 nm 内部空洞 7 nm の球殻状バイオテンプレートであるアポフェリチン内部に、ナノ電子デバイス作製に有用である 3 種類の新規化合物半導体ナノ粒子 (CdS, CuS, ZnS) の作製に成功した。特に、溶液中のアンモニア濃度を調整することにより、異なる粒子径を持ち、異なる蛍光を発する CdS ナノ粒子の作製が可能となった。同時に遺伝子変異フェリチンを作製し、フェリチン内部におけるナノ粒子形成メカニズムを明らかにした。さらにフェリチンタンパク質と直径 9 nm の LisDps タンパク質を QCM 基板上で結合させ雪だるま型バイオナノパーツの試作を行った。

研究成果の概要 (英文)：

I succeeded to synthesize three kinds of semiconductor nano-particles (NPs) (CdS, ZnS, CuS) in a bio-template, apoferritin protein by the detail investigation of reaction conditions. In the synthesis of CdS NPs in the apoferritin, the diameter of CdS NPs could be controlled by the concentration of ammonia water in the reaction solution. The synthesized three kinds of CdS NPs showed the different photo-luminescence due to their CdS NPs. To elucidate the detailed synthesis mechanism of the CdS NPs, CdS NPs were synthesized in some recombinant apoferritin cavities. I tried to fabricate a snow-man model bio-template on the QCM electrode by making use of ferritin and LisDps protein shell. These synthesized semiconductor NPs are promising materials for various nanotechnology applications.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノマイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノテクノロジー、ナノ粒子、フェリチンタンパク質、バイオテンプレート、化合物半導体、バイオナノテクノロジー、蛍光発光微粒子

1. 研究開始当初の背景

近年、ナノ粒子はナノテクノロジーの基本物質として、医療、化学、電子デバイス、バイオ等の分野において大変注目されており、物理法、化学合成法、生物学的方法等の多くの方法で多種多様なナノ粒子が作製されている。それらのナノ粒子作製法の中で、生物学的手法の一つであり、タンパク質構造体を鋳型（バイオテンプレート）として用いてナノ粒子を作製する方法（バイオテンプレート法）は、作製するナノ粒子のサイズがテンプレートサイズに制限されるため、非常に均一なサイズのナノ粒子が簡単に作製可能である。さらに、外側にタンパク質殻を保持しているため水溶液に簡単に分散し、タンパク質外表面にアミノ酸、DNA、抗体、高分子化合物等を簡単に修飾することができるという多くの利点があり大変注目されてきた。

しかし、バイオテンプレート法によるナノ粒子作製の歴史は浅く、作製されているナノ粒子の種類も金属酸化物等の限られた物である。特に電子デバイス作製に有用とされる化合物半導体ナノ粒子は、プラス電荷とマイナス電荷の両方のイオンの化合物であるためバイオテンプレート内での作製が難しかった。さらに、バイオテンプレートとなるタンパク質構造も球殻状やロッド状といった簡単な構造のタンパク質しか研究されていないのが現状であった。

バイオテンプレートの種々の特徴とそれを用いて作製したナノ粒子をナノ電子デバイス等に利用し、より高度に応用発展させるためには、種々の興味深い特徴を持つ新規化合物半導体ナノ粒子の作製と、球殻状やロッド状だけではなく、より複雑な構造を持つバイオテンプレートの構築が必須であった。

2. 研究の目的

ナノテクノロジー分野に用いることが可能なより有用なナノ粒子を作製し、種々の分野へ応用可能なバイオテンプレートナノ粒子複合体を作製するために、本研究ではバイオテンプレートとして現在最も研究がすすんでいる直径 12 nm 内部空洞 7 nm の球殻状タンパク質であるフェリチンタンパク質 (Fer) と直径 9 nm、内部空洞 4.5 nm の Fer よりもさらに小さな球殻状のバイオテンプレートであるリステリア Dps タンパク質 (LisDps) (図 1) の異なるサイズのタンパク質内部空洞に (1) それぞれ大きさの異なる新規化合物半導体ナノ粒子を作製すること、及び (2) これらの大きさが異なる球殻状バイオテンプレートを結合する事で多値メ

モリ等のナノ電子デバイスに使用可能な雪だるま型バイオナノパーツの作製と機能発現を目的として研究を進めた。

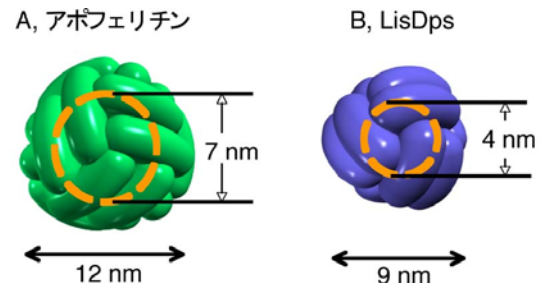


図 1 アポフェリチン (A) と LisDps (B) の模式図

3. 研究の方法

まず始めに、ナノ電子デバイスに有用である新規、化合物半導体ナノ粒子の作製条件の探索と決定を行い、その後さらに作製したナノ粒子の性質検討を行った。

直径 12 nm 内部空洞 7 nm の 24 量体タンパク質であるフェリチンタンパク質内部空洞に新規化合物半導体ナノ粒子である CdS ナノ粒子の作製を試みた。CdS ナノ粒子作製条件に関しては、以前に開発した反応溶液中にアンモニウムイオンを過剰添加することにより、フェリチン内部に導入させるカチオンのテトラアンミン鎖体を形成させ安定化させる ” slow chemical reaction system ” の条件を改良することで CdS ナノ粒子作製を試みた。ナノ粒子の観察は 200 KV の加速電圧の透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて、タンパク質内部のナノ粒子を負染色することで直接観察を行い評価した。ナノ粒子形成率の算出には市販の粒子解析ソフトを用いた。作製された新規の化合物半導体ナノ粒子は高分解能透過型電子顕微鏡 (HR-TEM) によるナノ粒子の結晶格子像観察、粉末 X 線回折装置 (XRD) 及び Electron Energy-Loss Spectroscopy (EELS) によるナノ粒子構成成分分析により、空洞内部に形成されたナノ粒子の物質評価を行った。また化合物半導体ナノ粒子は蛍光発光することが知られているため、蛍光吸光度計による蛍光波長観察を行うことで作製されたナノ粒子の蛍光発光特性の検討を行った。

フェリチン内部空洞における CdS ナノ粒子作製メカニズムとタンパク質のバイオミネラリゼーションメカニズムを明らかにするために、遺伝子工学的手法を用いてフェリ

チン内部空洞のアミノ酸を変異させることでフェリチン空洞内部の電荷を変化させた4種類の変異型フェリチンを作製し、コア形成率の違いを比較検討した。変異フェリチンの作製は、*E. coli*. (*Novablue*) をコンピテントセルとする通常の遺伝子工学的手法により、変異フェリチンタンパク質の遺伝子発現系の構築を行い、フェリチン変異株を取得した。その後、フェリチンを大量に得るためにこの変異株をジャーファーマンターによる3L大量培養、イオン交換及びゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いたタンパク質精製を行い、変異フェリチンの大量作製と精製を行った。このようにして得られた変異フェリチンに対して上記で検討されたナノ粒子形成条件を用いてナノ粒子形成率の比較を行った。

小型球殻状タンパク質の LisDps に関しても、フェリチンで行った研究と同様に化合物半導体ナノ粒子の作製を検討すると共に、同じ遺伝子工学的手法を用いて、内部空洞のアミノ酸を変異させた変異 LisDps を作製し、よりナノ粒子を作製しやすい LisDps の構築も目指した。

ナノ電子デバイス用雪だるま型バイオテンプレートの作製は、大きさ1cm角のシリコン基板上に、直径12nmのフェリチンタンパク質をのせスピコートで二次元結晶を作製し、さらにその上に直径9nmのLisDpsを結合させることにより、雪だるま型バイオテンプレートの作製を目指した。また、水晶振動子(QCM)の金電極上でも上記タンパク質の結合を行い、フェリチン及びLisDpsの結合量の測定と二次元結晶の作製を試みた。

4. 研究成果

新規化合物半導体ナノ粒子、CdS ナノ粒子をフェリチンタンパク質内へ作製するために、反応溶液条件を詳細に検討した。作製条件は slow chemical reaction system において以前成功している CdSe ナノ粒子作製の反応溶液組成を参考にし、CdS ナノ粒子を作製するための S 源の検討を行った。その結果、弱酸性で少しずつ S イオンを溶液中に放出する事が可能なチオ酢酸が最も適していることが明らかになった。さらにカドミウム濃度、アンモニア水濃度、緩衝液の種類を変化させ、TEM 観察によりコア形成率を詳細に検討することより、アポフェリチン空洞内への CdS ナノ粒子の一溶液中合成 (one-pot 合成) に成功した。1 mM cadmium acetate, 7.5 mM ammonia water, 40 mM sodium acetate, 1 mM thioacetate を含んだ反応溶液を用いて室温で一晩攪拌する事で CdS ナノ粒子の形成率 70% を達成した。

さらに作製したナノ粒子について詳細な

分析を行った。XRD、 ELLS 解析および HR-TEM による結晶格子像観察により、本ナノ粒子は直径 7 nm の CdS 立方晶 (cubic crystal) で多結晶体である事が確認された。さらに蛍光吸光度計により 350 nm 励起波長を照射し蛍光観察した結果、外側にタンパク質殻を保持するにもかかわらず CdS ナノ粒子由来の赤色蛍光発光が初めて確認された。蛍光強度及び寿命の測定より、これらの発光はナノ粒子内部の結晶欠陥に由来しているのではないかと推測している。

また、ナノ粒子合成時における反応溶液中のアンモニウムイオンの濃度を変化させると低アンモニア濃度 (7.5 mM) では直径 4.7 nm、高アンモニア濃度 (75 mM) では直径 7.1 nm の粒子直径が異なる CdS ナノ粒子を作製することが明らかになり、世界で初めて one-pot 合成におけるフェリチン内部でのナノ粒子粒径制御が可能となった。この粒径制御により作製された3種類の直径が異なる CdS ナノ粒子 (直径 4.7, 5.1 及び 7.1 nm) は蛍光観察の結果、それぞれ異なった蛍光を発する事が確認された (図2)。この簡便なアポフェリチン内ナノ粒子サイズ調整法により種々の蛍光を発生するナノ粒子が作製可能となり、今後の電子デバイス分野における応用展開に非常に重要な技術となると考えられる。これらの成果は学会で発表され、さらに国際論文 (下記、主な発表論文等 ②) に発表済みである。

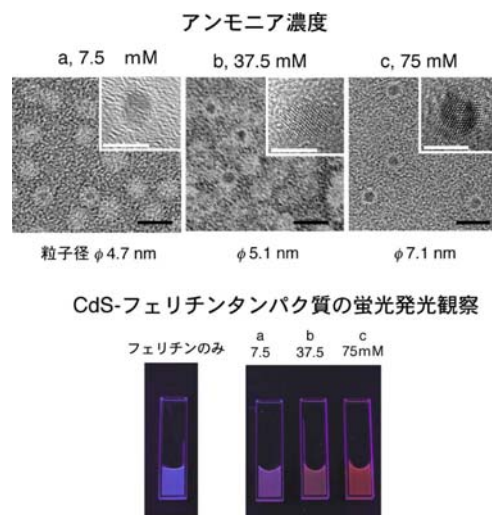
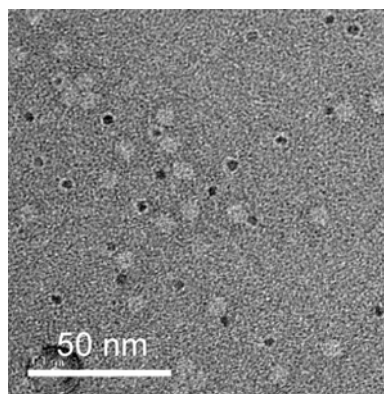


図2 CdS ナノ粒子と蛍光発光観察

また、バイオミネラリゼーションメカニズムの解明を目指して、遺伝子工学的手法により作製した4種類の変異型フェリチンを用いて CdS ナノ粒子のコア形成率の比較を行った。フェリチン外部から内部へのイオンの通路であると考えられている3回対称チャンネル部分の負電荷アミノ酸であるグルタミン

酸をアラニン変異させた変異フェリチンにおいて、コア形成率が劇的に減少したことより、フェリチン内部のCdS のナノ粒子の形成には3回対称チャンネル部分の負電荷が大変重要な事が明らかになった。おそらく3回対称チャンネルはフェリチン内部にCd²⁺ や Fe²⁺ といったプラス電荷を持つカチオンを導入するために非常に重要な役割をしている事が考えられる。

さらに上記 CdS で検討されたナノ粒子合成方法及び条件を参考に、反応溶液条件の改良を行った結果、アポフェリチン空洞内へCuS ナノ粒子及び ZnS ナノ粒子の作製も可能になりつつある。CuS ナノ粒子は、3mM のテトラアンミン銅イオンと10 mM のチオ酢酸を用いることによりコア形成率約 40% を達成し (図 3)、ZnS の場合は 1 mM の酢酸亜鉛と 10 mM チオ酢酸を用いることでコア形成が可能であった。作製されたナノ粒子に関しては、同時に性質検討も進めている。作製された ZnS ナノ粒子は XRD 等による元素分析より直径 7 nm の ZnS 立方晶であり、さらに励起波長照射 (350nm) により 440 nm に極大をもつ強い青色蛍光が確認された。一方、作製された CuS ナノ粒子は直径 4.5 nm の CuS 立方晶である事が明らかになり、さらに溶液中の S イオンの濃度により粒子径及び結晶性が左右される事を発見した。CuS ナノ粒子は近赤外域発光や電磁波遮断等の特徴が期待されるため引き続き結晶性の検討を行っている。



粒子径 ϕ 4.5 nm

図 3 アポフェリチン中に作製された CuS ナノ粒子の電子顕微鏡像

フェリチンタンパク質と LisDps を用いた電子デバイス用雪だるま型バイオテンプレートの作製については、水晶振動子 (QCM) の金電極上へのフェリチンタンパク質の結合と高密度吸着化を行い、その後、小型球殻状タンパク質である LisDps を結合することで、両タンパク質を結合させ雪だるま型バ

イオテンプレートの作製を目指した。まず、フェリチンタンパク質の QCM 電極に対する吸着を行い、その結果 $0.9 \times 10^{12}/\text{cm}^2$ の高密度吸着に成功した。さらに QCM 電極を用いたフェリチンの吸着量の測定にも成功した。さらに QCM の振動数変化の測定により、その上部への LisDps の積層にも成功している事が明らかになったが、作製した積層タンパク質の回収率が低いため、現在、この回収率及び作製効率の上昇のために条件検討を引き続き行っている。収量さえ確保されれば、作製したナノ電子デバイス用雪だるま型バイオテンプレートとして多値メモリの作製と応用展開を随時行っていく予定である。

以上の結果より、改変された slow chemical reaction system において反応溶液条件を検討することにより新規の化合物半導体ナノ粒子である CdS、CuS 及び ZnS ナノ粒子をフェリチン内部に作製することに成功し slow chemical reaction system の普遍性を証明することができた。さらにフェリチン内部におけるバイオミネラルゼーションにおいて 3 回対称部位の負電荷アミノ酸が非常に重要であることを明らかにした。詳細なナノ粒子作製条件の結果より、フェリチン内部において種々の大きさの異なる化合物半導体ナノ粒子を作製するためには反応溶液中のアンモニア濃度のコントロールが非常に重要であることを明らかにした。また、2 つの異なる球殻状バイオテンプレートを基板上に吸着させ、結合させることに成功し、この方法を発展させることでより複雑な構造を持つ新規のバイオテンプレートの作製方法と測定法を構築することができた。これらの成果は下記に示した論文、学会で発表され、現在研究進行中のナノ粒子研究に関しては学会発表及び論文投稿準備中である。

本研究で開発した新規の化合物半導体ナノ粒子及びタンパク質-ナノ粒子複合体はバイオナノプロセスによるナノ電子デバイス作製の重要なナノパーツとなるとともに、今後、医療、化学触媒、バイオセンサー等のバイオナノテクノロジー分野における種々の応用利用のための基本パーツとしての十分な発展が期待されるはずである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Ichiro Yamashita, Kenji Iwahori, Shinya Kumagai (2 番目), Ferritin in the Field of Nano-Devices, Biophys. Biochem. Acta., in press, 2010, 査読有

② Kenji Iwahori, Ichiro Yamashita, (1番
目) Size-controlled one-pot synthesis
of fluorescent semiconductor
nanoparticle, cadmium sulfide, in an ap
oferritin cavity, Nanotechnology, 19, 4
95601, 1-7, 2008, 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 岩堀健治, 他, Synthesis of new
semiconductor nano-particles by a tetra
ammine complex and cage-shaped protein,
apoferritin, 第47回日本生物物理学会年会
生物物理学会, 2009. 10. 31, 徳島
- ② 岩堀健治, 他, 球殻状タンパク質を鋳型
として合成された硫化銅ナノ粒子の作製方
法とナノ粒子の特徴, 第 61 回日本生物工学
会, 2009. 09. 23, 名古屋
- ③ Kenji Iwahori, Fabrication of Various
Nano-particles Using Biological Template,
Cage Shaped protein, The IUMRS
International Conference in Asia 2008,
2008. 12. 11, 名古屋
- ④ 岩堀健治, 他, Synthesis of ZnS compound
semiconductor nano-particles in the
cage-shaped protein, apoferritin, 第 46
回生物物理学会, 2008. 12. 03, 福岡
- ⑤ 岩堀健治, 他, 球殻状タンパク質を用いた
蛍光発光ナノ粒子の作製とバイオミネラ
リゼーション機構の解明, 2008 年度日本生
物工学会, 2008. 08. 29, 仙台

[図書] (計 2 件)

- ① 岩堀健治, 他, シーエムシー出版, 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, 2009, 194-204
- ② 岩堀健治, 他, シーエムシ出版, メタル
バイオテクノロジーによる環境保全と資源
回収, 2009, 166-174

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩堀 健治 (IWAHORI KENJI)
奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科
学研究科・研究員
研究者番号：90467689