

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25390020

研究課題名(和文)単結晶ナノ粒子生成容器としてのタンパク質構造の最適化

研究課題名(英文)Optimization of the protein structure for synthesis of single crystal nanoparticles

研究代表者

吉村 英恭 (Yoshimura, Hideyuki)

明治大学・理工学部・専任教授

研究者番号：70281441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：フェリチンの空洞中にマグネタイトの結晶を成長させて均一な単結晶のナノ粒子を作製することを目的として、(A) 酸化活性部位を持たないLサブユニットに鉄酸化活性部位を加える。(B) Lサブユニットと鉄酸化活性部位を持つHサブユニットまたは(B)の変異株を適当な割合で発現させることを試みた。鉄酸化活性部位を導入した変異株の酸化鉄の生成速度は野生株と同じ程度であった。また、HL混合フェリチンは発現させることができなかった。しかしながら、Lサブユニットだけを持つリコンビナントフェリチンを用いて高温(60℃)でpHを8.5に保ちながら合成すると単結晶のマグネタイトのナノ粒子を効率よく合成できることがわかった。

研究成果の概要(英文)：To synthesize uniform single nano-crystal in the protein (ferritin) cavity, we have tried mutagenesis of the ferritin subunit. Ferritin molecule is consisted in 24 of H and L subunits. H-subunit has an iron oxidation site and H-ferritin which has 24 H-subunits rapidly produces magnetite nanoparticle in the cavity and thus nanoparticles are polycrystalline. H-ferritin is easy to make coagulation during synthesis. L-ferritin which has 24 L-subunits can also produce magnetite nanoparticles even it has no iron oxidation site, whereas efficiency is lower than H-ferritin. Then we have introduced iron oxidation site in the L-subunit and tried to express this mutant with L subunits simultaneously and construct a chimera-ferritin molecule. However, the oxidation activity was similar as the wild type. Then, we have tried to optimize synthesis condition using L-ferritin and found single nano-crystal can be obtained effectively by incubating L-ferritin at 60 degrees with keeping pH at 8.5.

研究分野：生物物理学

キーワード：ナノ粒子 強磁性体 フェリチン

## 1. 研究開始当初の背景

フェリチンは多くの生物に存在する球状タンパク質で、特に脊椎動物では鉄を酸化鉄のナノ粒子として蓄え、体内の鉄イオン濃度を保つ働きをしている。フェリチンは、体内では鉄を主に取り込むが、試験管内では鉄以外にもニッケル、コバルト、インジウム、カルシウムなど様々な無機物を取り込みナノ粒子とすることを我々や他の研究グループが報告してきた。フェリチンは外径が 13nm の球状タンパク質で中心に内径 8nm の空洞が存在する。空洞は 8 カ所の親水的な通路でタンパク質外部と通じており、そこをイオンが通過できる。適当な溶液条件にすることで空洞内部に無機物のナノ粒子を形成することができる。ナノ粒子の成長は空洞の大きさで制限され、最終的に粒径のそろった粒子となる。また外側をタンパク質に囲まれているのでナノ粒子同士の凝集を防ぐことができ、水溶液中で安定に分散する。このような特徴を生かして分子標識や記憶媒体の素子とする応用を目指してきたが、ナノ粒子の多くは数個のドメインを持つ多結晶体となり、単結晶のナノ粒子は全体の数%に止まっていた。大きな飽和磁化や量子効率のよい蛍光粒子とするためには結晶性の改良が必要となった。フェリチンは 24 個のサブユニットからできており、生体内では H 型と L 型の 2 種類のサブユニットが任意に組み合わせられてキメラ構造をしている。L 型は 2 次元配列を作り易く、高濃度の金属イオン存在下でも凝集しにくいことから、我々は L 型だけからなるリコンビナント（遺伝子より合成した人工的なフェリチン）を使用してナノ粒子を作製してきた。ナノ粒子の形成状況は、空洞いっぱい成長した粒子を持つフェリチンと全く粒子を持たないフェリチンの 2 状態となることから、結晶核の形成が律速になっていると予想した。フェリチンの L 型サブユニットで最初に金属イオンが結合する部位はわかっており、この場合同等の部位が 24 カ所存在することになる。したがって各部から結晶が成長すると考えられ必然的に多結晶となる。H 型サブユニットには特に鉄酸化活性部位という L 型には存在しない部位があり、この部分で L 型より早く鉄を酸化し酸化鉄の結晶核となることがわかっている。そこで L 型で形成されるフェリチンに 1-2 個の H 型サブユニットを入れ、たとえば 23/24 が L 型で 1/24 が H 型であるフェリチンを作れば、まず最初に H 型のサブユニットで結晶核が形成されることになり、結晶核形成が律速であることから単結晶のナノ粒子を作り易くなると考える。このような作業仮説をもとに、フェリチン分子をどのように設計すれば単結晶のナノ粒子を形成できるかを明らかにすることを目的とする。

## 2. 研究の目的

中空構造のタンパク質の空洞中に無機物

の結晶を成長させることにより、大きさがそろったナノ粒子を作ることができる。このようにして作製したナノ粒子はタンパク質が外側を覆っていることにより水溶液中で安定に分散する。これまでフェリチンと呼ばれるタンパク質を用いて半導体、金属、磁性体のナノ粒子を作製してきたが、ナノ粒子の結晶構造を制御することは困難であった。当該研究では、フェリチン分子中の L 型と H 型サブユニットの数を制御したり、サブユニットのアミノ酸配列を改変したりすることにより、結晶核の生成を制御し単結晶のナノ粒子を多く合成できるようにすることを目指す。タンパク質の内部を反応容器としたとき、電位分布や金属イオンに対する結合部位が結晶成長とどのように関係するかを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

目的に示したように、フェリチンの構造を変えることにより単結晶ナノ粒子を効率よく生成させる方法を検討した。具体的には以下の様なフェリチン変異体を作製し、発現と機能を確認した。

- A) L サブユニットに H サブユニットの鉄酸化活性部位を導入したフェリチン
- B) L 型野生株と変異体の混合サブユニットを持つキメラフェリチン分子の生成
- C) リコンビナント H フェリチン
- D) H 型と L 型サブユニットの同時発現と HL キメラフェリチン分子の作製
- E) L フェリチンを用いた単結晶ナノ粒子の作製条件の最適化

上記のフェリチンについてそれぞれ酸化鉄(ferrihydroxide)のナノ粒子形成速度をビピリジンの吸収変化より計測した。また、マグネタイト(magnetite)ナノ粒子をもつフェリチン(マグネトフェリチン)の結晶性を透過型電子顕微鏡(TEM)観察および電子線回折により評価した。

## 4. 研究成果

- A) L サブユニットに H サブユニットの鉄酸化活性部位を導入

H サブユニットの鉄酸化活性部位は 27 番グルタミン酸(E27)、62 番グルタミン酸(E62)、67 番ヒスチジン(H67)であることがわかっている。この部位は L サブユニットでは 24 番チロシン(Y24)、59 番リジン(K59)、62 番グリシン(G62)に対応している。これらのアミノ酸を変異させたサブユニットを作製した。変異は Y24E、K59E、G62H、Y24E+K59E、K59E+G62H、K59E+L131A の 6 種類に関して発現を行ったところ、K59E を含む変異体はすべて不溶画分に含まれフェリチン分子を得ることができなかった。得られた Y24E、G62H の変異体について鉄酸

化速度をピブリジンの529nmの吸収を計測することでおこなったが、 $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ への変化はいずれの変異体も野生株のLフェリチンと同じ程度であった。最適pHは変異体の方がやや低かった。K59

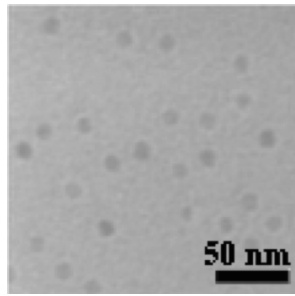


図1. G62Hによるマグネタイトナノ粒子の形成(TEM像)

の amino 酸はLフェリチンの構造を保つ上で重要な役割をはたしていることがわかった。嫌気的な条件でマグネタイト粒子をもつマグネトフェリチンを合成させたが、TEMにより評価した。図1に示すように均一な大きさのナノ粒子を作製できたが、形成率、結晶性ともL型野生株と同じ程度であった。

#### B) L野生株と変異体のキメラサブユニットを持つ混合フェリチン分子の生成

前述の実験によりHサブユニットの酸化活性部位を導入したLサブユニットの鉄酸化能力は野生株とかわらないことがわかったので混合フェリチンを作製してもメリットがないことはわかっていたが、HフェリチンとLフェリチンのキメラフェリチンを作製する上での参考になるので、発現試験をおこなった。プラスミド上にLフェリチン野生株(fer0)とY24Eの遺伝子を組み込み発現させた。発現効率は低くなるが同時発現は実現できた。鉄酸化速度は野生株と同程度であった。等電点電気泳動で2つのサブユニットが発現しているのはわかったが、フェリチン1分子に同時に組み込まれているかどうかは確認できなかった。図2にHPLCのサイズ排除クロマトグラフィー-TSKgelSWxLG4000による各種フェリチンの分離を示すが、わずかな分子量の違いが検出できることが確認できたので、今後キメラフェリチンにも応用できるか試験を行う予定である。

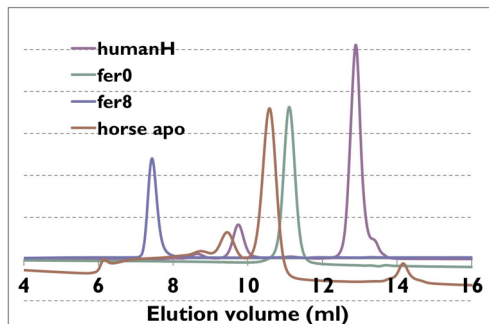


図2. ゲル濾過による分離

humanH (ヒトHフェリチン)、fer0 (ウマLフェリチン野生株)、fer8 (LフェリチンN端短縮型、ウマ・アポフェリチン (ウマ天然フェリチン))

#### C) ウマHフェリチンを発現させる

ウマのHフェリチンのアミノ酸配列は知られているが、遺伝子は手持ちがなかったので、合成により作成した。プラスミドに組み込み大腸菌で発現させることはできたが、図3に示すようにイオン交換クロマトグラム流出のフェリチン画分が野生株では単一ピークになるところが、2つのピークとなった。

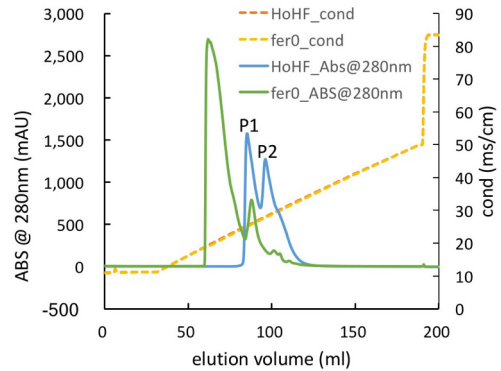


図3. 各種フェリチン陰イオン交換クロマトグラフィーの流出図

それぞれのピークのフェリチンを使って鉄の酸化速度を計測したところ、図4のようにどちらの画分もLフェリチンと比べて2桁ぐらい早く鉄を酸化することがわかった。ただし、後のピークのフェリチンは鉄の酸化とともにほとんどが沈殿してしまった。

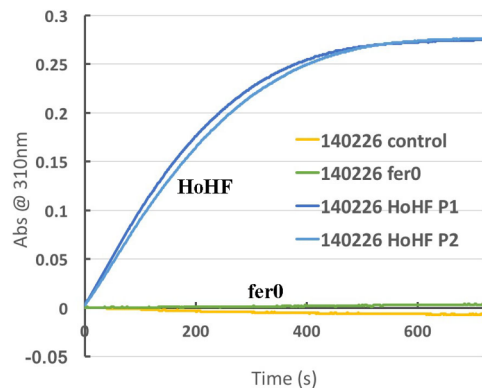


図4. 鉄酸化速度の測定

HoHF (ウマHフェリチン P1前ピーク、P2後ピーク)、fer0 (ウマLフェリチン)

図5にLフェリチンおよびHフェリチンで作製した酸化鉄(ferrihydrate)ナノ粒子のTEM像を示す。ナノ粒子の形成はどちらのフェリチンも違いはないが、Hフェリチンは図5Bのように会合しやすい。合成中にフェリチンが沈殿することは、Hフェリチンの外側の構造によるためと考えられる。また、得られたナノ粒子もほとんどが多結

晶であることがわかった。これは鉄酸化部位が 24 個存在することで、多くの結晶核が形成されたためと考えられる。ヒト H フェリチンが会合しやすいのは予備実験でわかっていたが、ウマ H フェリチンも同様であった。このため L フェリチンの内部に H フェリチンに存在する鉄酸化活性部位の導入を試みたが前述のようにうまくいかなかった。

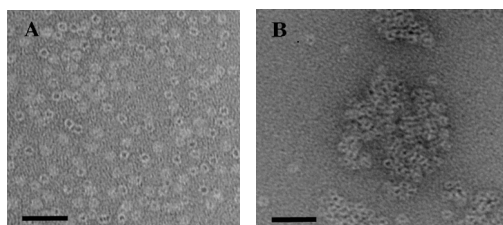


図 5. フェリチンにより作製した酸化鉄ナノ粒子の TEM 像 (負染色)

A: ウマ L フェリチン、B: ウマ H フェリチン

D) H サブユニットと L サブユニットの同時発現と HL キメラフェリチン分子の作製  
ウマ H フェリチンとウマ L フェリチンのサブユニットの遺伝子を同時にプラスミドに組み込み HL キメラフェリチンの発現を試みた。L 型変異体と野生株で作製したプラスミドと同じプラスミドを使用した。H フェリチンサブユニットが発現していないことがわかった。大腸菌の育成温度や発現誘剤 IPTG を加えるタイミングを変えてみたが、うまく発現させることができなかった。今後はプラスミドを変えるなどして混合フェリチンの発現試験を続ける予定である。

E) L フェリチンを用いた単結晶ナノ粒子の作製条件の最適化

HL キメラフェリチンの作製がうまくいかなかったので、L フェリチンでマグネタイトナノ粒子を生成する際の合成条件を最適化することで、結晶性の良いナノ粒子を作製を試みた。従来、嫌気的かつ高温 (50–65°C) の条件でフェリチンと 2 価の鉄イオンを反応

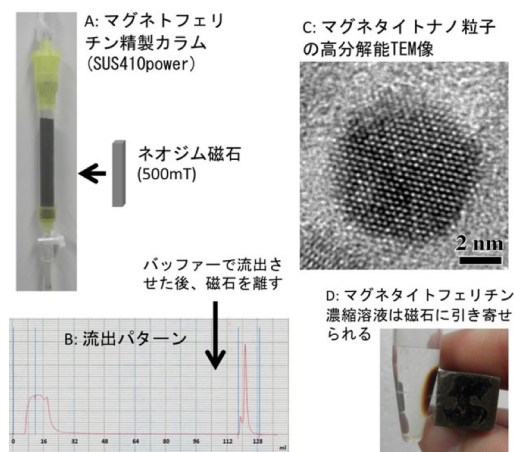


図 6. マグネタイトフェリチンの精製と高分解能 TEM 像

させることでマグネタイトナノ粒子を合成していたが、この条件をさらに詳しく調べて単結晶のナノ粒子を効率よく生成する条件を調べた。その結果、窒素雰囲気中 60°C で pH を 8.5 に調整しながら合成すると効率よく単結晶マグネタイトナノ粒子を生成できることがわかった。図 6A のように作製したマグネタイトフェリチンを磁性体カラムを通すことにより、より結晶性のよいナノ粒子を精製できるようになった。図 6C のような単結晶のナノ粒子を多く得られるようになった。また、このフェリチンを濃縮すると磁石に引き寄せられることもわかった。今後はマグネタイトフェリチンの磁気的性質を測定する予定である。

当初の目的では単結晶ナノ粒子生成を最適化するためのタンパク質構造を電位計算により調べる予定であったが、野生株より優れた変異株を得ることができなかったため、計算は変異株および HL キメラフェリチンの作製に成功した後行うことにした。

## 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 4 件)

- (1) H. Yoshimura, E. Edwards, M. Uchida, K. McCoy, R. Roychoudhury, B. Schwarz, D. Patterson and T. Douglas, Two-Dimensional Crystallization of P22 Virus-Like Particles, *J. Phys. Chem. B*, **120**, 5938-5944 (2016).
- (2) E. Valcheva, G. Yordanov, H. Yoshimura, T. Ivanov, K. Kirilov, Low temperature studies of the photoluminescence from colloidal CdSe nanocrystals prepared by the hot injection method in liquid paraffin, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **461**, 158-166 (2014).
- (3) T. Harada, H. Yoshimura, Synthesis of Rare Earth Doped Yttrium-Vanadate nanoparticles Encapsulated with Apoferritin, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 14947--14952 (2014).
- (4) T. Harada, H. Yoshimura, Ferritin protein encapsulated photoluminescent rare earth nanoparticle, *J. Appl. Phys.*, **114**, 044309(1-8) (2013).

[学会発表] (計 12 件)

- (5) H. Yoshimura, Two-dimensional crystallization of Proteins, IGER International Symposium on Physics of Life, Nagoya Univ., 25-26, March, 2017.

(Invited)

- (6) K. Kontani and H. Yoshimura, Synthesis of rare earth hybrid nanoparticles in the apoferritin cavity, 第 54 回日本生物物理学会、つくば国際会議場、2016 年 11 月 25-27
- (7) H. Yohimura, D. P. Patterson, M. Uchida, B. Schwarz, K. McCoy, E. J. Edwards, R. Roychoudhury and T. Douglas, Two-dimensional crystallization of P22, 第 53 回日本生物物理学会、金沢大学、2015 年 9 月 13-15
- (8) H. Yohimura, D. P. Patterson, M. Uchida, B. Schwarz, K. McCoy, E. J. Edwards, R. Roychoudhury and T. Douglas, Two-dimensional crystallization of P22, Microscopy Conference, September 6-11 2015, Göttingen, Germany
- (9) H. Yohimura, D. P. Patterson, M. Uchida, B. Schwarz, K. McCoy, E. J. Edwards, R. Roychoudhury and T. Douglas, Two-dimensional crystallization of P22, Gordon Research Conference: Physical Virology, January 25-30, 2014, Ventura, CA USA.
- (10) H. Yohimura, Apoferritin Encapsulated Rare Earth Luminescent Nanoparticles, MRS FALL MEETING & EXHIBIT, November 30 - December 5, 2014, Boston, Massachusetts USA.
- (11) H. Yoshimura, Synthesis of Protein Encapsulated Rear Earth Nanoparticles, 3<sup>rd</sup> International Conference on Nanotek & Expo, December 02-04, 2013, Las Vegas, NV, USA, (Invited).
- (12) H. Yoshimura, Synthesis of Protein Encapsulated Nanoparticles, Annual World Congress of Nanomedicine 2013, Suzhou, China, June 3-5, 2013 (Invited)
- (13) M. Nemoto, T. Harada, H. Yoshimura, Insertion of ferroxidase center in horse L ferritin subunit, 第 51 回日本生物物理学会、京都国際会館、2013 年 10 月 28-30
- (14) T. Harada, H. Yoshimura, Photoluminescence Property of Eu and Tb Doped Y Based Nano-phosphor synthesized in an Apoferritin Cavity, 第 51 回日本生物物理学会、京都国際会館、2013 年 10 月 28-30
- (15) 荻村史佳、引地祐介、吉村英恭、フェリチンを用いて作製した磁性体ナノ粒子の二次元配列化、第 74 回応用物理学会、京

都 (同志社大)、2013 年 9 月 16-20 日

- (16) 原田知明、吉村英恭、アポフェリチンを利用したランタニド添加型  $YVO_4$  ナノ粒子の作製、第 74 回応用物理学会、京都 (同志社大)、2013 年 9 月 16-20 日

6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
吉村英恭 (YOSHIMURA, Hideyuki)  
明治大学・理工学部・教授  
研究者番号 : 70281441
- (2) 研究分担者  
なし ( )  
研究者番号 :
- (3) 連携研究者  
高橋卓也 (TAKAHASHI, Takuya)  
立命館大学・生命科学部・教授  
研究者番号 : 70262102