

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13641

研究課題名(和文)電子デバイスにおけるナノ破壊探査・修復システムの創製

研究課題名(英文) Construction of a search and repair system for metal defect part on the 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)： 詳細なナノ粒子形成条件の検討により、直径 7 nm のフェリチンの内空に蛍光発光する CdS, ZnS と金ナノ粒子の高効率作製に成功した。特に CdS, ZnS ナノ粒子は従来の 2 倍以上の蛍光発光を示した。さらに、金に特異的に結合する新規の金結合ペプチドの取得にも成功し、QCM による解離結合力の測定により従来ペプチドよりも Au に対する親和性が非常に高い事が明らかになった。上記フェリチンの外表面に金結合ペプチドを修飾する事で金結合バイオナノ粒子の作製を行い、これが電子デバイス上の配線や電極の欠陥を認識し結合するバイオナノ粒子となり得ることを示した。

研究成果の概要(英文)： In this experiment, we succeeded in the synthesis of CdS, ZnS semiconductor nano-particle (NP)s and Au NPs in the apoferritin cavity with high efficiency. The CdS and ZnS NPs showed the strong red or blue luminescences better than that of some previous reports. We also succeeded in the construction and selection of new Au binding peptide for our search and repair system for a metal defect part on the electric devices. This Au binding peptide could strong bind to the Au electrode of QCM and it showed the high affinity to Au better than that of previous reports. We constructed a Au-binding Bio-NPs by using the ferritin including Au NPs and the Au-binding peptides. The Au-binding Bio-NPs could bind densely to the Au artificial particles with assistance of light irradiation. These results show that the Au-binding bio-NPs can be used to search and repair of a damaged point on Au wiring or electrode of electric devices.

研究分野： バイオマテリアル

キーワード： バイオナノ粒子 タンパク質 バイオナノデバイス フェリチン 金属回収 バイオマテリアル

## 1. 研究開始当初の背景

現在までの、ナノテクノロジー技術研究の継続と発展により、ナノキャパシター、シングルエレクトロントランジスタ(SET)、微小液晶、ナノカラム、ナノ電極などの様々なナノ構造体が作製されるようになってきた。さらにこのようなナノ構造体を統合することにより、ピコモル濃度を測定できる血糖値センサーなどの超小型デバイスや、遺伝子診断用 SNIP センサー等の作製も積極的に行われている。これらの電子デバイス中の配線や電極等はナノメートルの精度で作製されているが FBI や EB 等の超精密描写装置による作製も多く、研究段階や試作品作製段階では、これらの精密装置の各種設定値の決定や技術者の熟練度などに製品の歩留まりが左右される。特に研究用や試作中の新型デバイスの作製には製造方法もまだ確立されていないため、デバイスの接合不良、ナノクラックや破損等でデバイス特性が測定できない問題が頻発する。さらに、デバイス特性を再測定するためにはデバイスを再作製しなければならず、非常にコストと時間がかかり研究開発スピードを低下させている。

デバイス作製中の欠陥確認は従来 TEM, SEM, AFM, 元素分析装置、膜厚測定計等の大型装置により行われているため迅速に破損箇所を探索することができず、欠陥の確認に使用したデバイスを再利用することは困難であるという矛盾点も存在している。

## 2. 研究の目的

上記のような背景を踏まえ、本申請研究では、直径 12 nm で内部に 7 nm の空洞を保持するフェリチンタンパク質の外部表面に、電子デバイス基板上的金属配線等の金属部分の特異的に認識する金属結合ペプチドを修飾し、さらに内部空洞内に蛍光発光するナノ粒子(セレン化カドミウム(CdSe), 硫化カドミウム(CdS), セレン化亜鉛(ZnSe), 硫化亜鉛(ZnS)等)や配線材料となる金(Au), 白金(Pt), アルミニウム(Al)等のナノ粒子を保持したバイオナノ粒子を作製する。このバイオナノ粒子を用いて、電子デバイス上の実験や試作時に発生する欠陥部分を可視化することで、迅速に認識し、内部の金属ナノ粒子によって簡単に修復することができる「電子デバイス修復システムの構築」を目的としている。

申請者は、今まで直径 12 nm の球殻状タンパク質であるフェリチンの内部空洞に 15 種類以上の金属あるいは化合物半導体ナノ粒子を作製してきた(図 1)。また、フェリチン外表面には、遺伝子工学技術やクロスリンカーを用いた化学修飾により DNA やペプチドを結合させた温度応答性バイオナノ粒子を作製してきた。

本研究では、これらの技術を応用すること

で、電子デバイス上の金属に特異的に結合する金属結合ペプチドの選抜、修飾を行い、さらにフェリチン内部空洞には、

フェリチン内部に蛍光を発するナノ粒子(CdSe, CdS, ZnS, ZnSe など)

フェリチン内部に電子材料となるナノ粒子(Au, Pt 等)

をそれぞれ、フェリチンのバイオミネラリゼーション能力によって作製し、さらにフェリチン外表面に Au, Pt などの電子デバイス上に存在する金属の欠陥部分に結合する金属結合ペプチドを修飾した探索・修復用バイオナノ粒子の作製を行い、電子デバイス上の欠陥部分を認識と修復を迅速に行うシステムの創成を目指す。

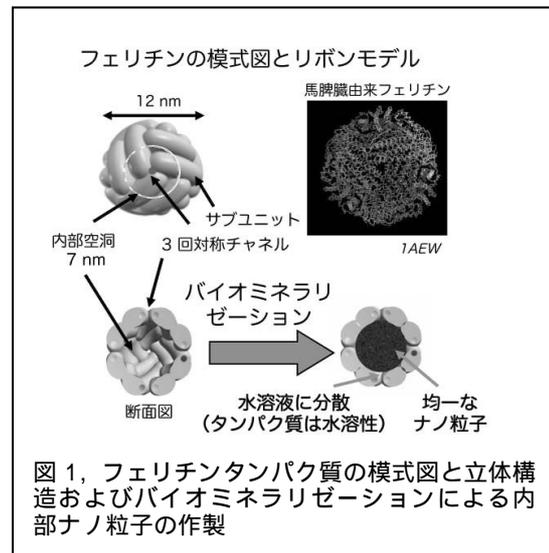


図 1, フェリチンタンパク質の模式図と立体構造およびバイオミネラリゼーションによる内部ナノ粒子の作製

## 3. 研究の方法

申請者はすでに、遺伝子工学技術により 100 種類以上のフェリチン変異体を作製済みであり、また多種類の金属結合ペプチドをフェリチンに修飾しているため、バイオナノ粒子作製の基礎技術は既に確立している。しかし、本申請研究目的を達成するためには下記の 2 つの課題の解決が非常に重要である。

・探索、修復、接着の各バイオナノ粒子の作製と基板上破損部分へのナノ結合方法の開発

・破損箇所における吸着、剥離機構のメカニズム解明と制御

これらの課題に対して、研究ステップを下記の 5 つに分け、これらを段階的に達成することで最終的に「電子デバイスにおけるナノ破壊探査・修復システムの創成」を目指した。

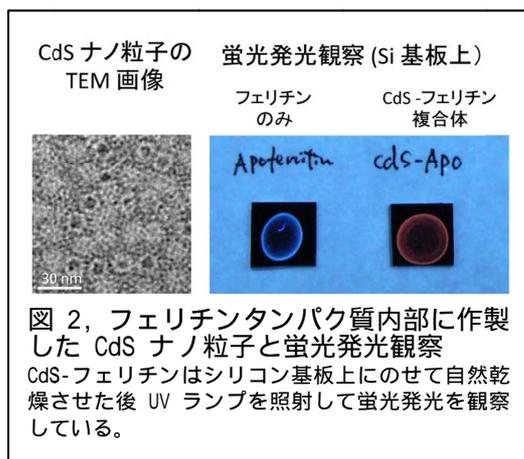
- 1; フェリチン内部空洞への探索用、修復用ナノ粒子の作製と特性評価
- 2; 金属結合ペプチドの修飾による探索、修復用ナノ粒子の作製と特性評価

- 3 ; バイオナノ粒子の結合・剥離機構の解明と制御
- 4 ; 溶接用バイオナノ粒子の作製と発熱量の測定とコントロール
- 5 ; バイオナノ粒子を使用した実証実験

まず 50 種類以上既に報告されている金属結合ペプチドの中から電子デバイスによく利用されている各金属に対して効率よく結合する金属結合ペプチドをセレクションするためにそれぞれのペプチドの結合力を QCM によって測定し、最も結合力が強く、さらに、バイオミネラリゼーション能力が高いものを選抜した。その後、遺伝子工学的手法により、選抜された金属結合ペプチドを外殻表面に修飾した変異フェリチンに対してそれぞれの内部空洞内に蛍光発光ナノ粒子、Au 等の貴金属ナノ粒子等を作製する事で、上記の探索用、修復用、接着用バイオナノ粒子の作製を試みた。作製したバイオナノ粒子は電子顕微鏡による観察や、結合力、バイオミネラリゼーションによって作製された内部ナノ粒子の各種性質検討と機能測定を行いながら、実際にデバイス探索・修理に利用可能なバイオナノ粒子の作製と選抜を行った。

#### 4 . 研究成果

本研究においてまず重点的に研究を行った部分は、破壊部分を認識し結合する金属結合ペプチドの取得と性質検討、及びペプチドとナノ粒子を融合した探索、修復、接着用のバイオナノ粒子の作製である。特に、蛍光ナノ粒子の作製と、電子デバイスの配線や電極に非常によく使われている Au に強力に結合するペプチドと Au ナノ粒子の作製について精力的に研究を進めた。以下に研究結果をまとめる。



#### 、 蛍光発光ナノ粒子の作製と観察

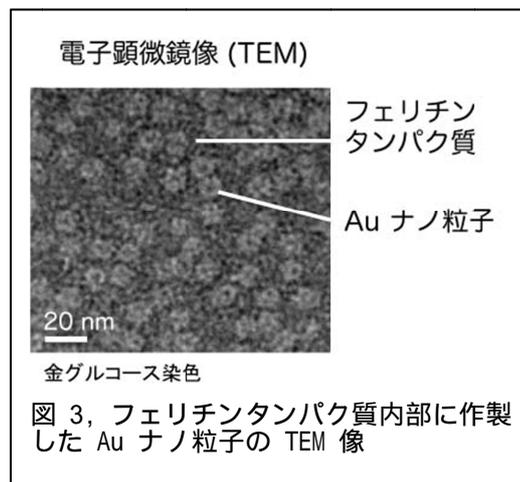
まず認識用バイオナノ粒子の作製のために蛍光発光ナノ粒子の作製を行った。直径 12 nm のウマ由来の球殻状タンパク質フェリチンタンパク質の内部空洞を利用して、内部

に蛍光発光するナノ粒子 (CdS, ZnS 等の化合物半導体ナノ粒子) を作製することで、蛍光発光による可視化を行った (図 2)。

以前の申請者の研究において、CdS や ZnS 等の化合物半導体ナノ粒子は、既にフェリチン内部空洞に合成が可能となっていたが、それぞれのコア形成率が思ったよりも低く、それが原因で蛍光発光が弱いという問題点があった。そのためより効率良く可視化が実現するために、さらに蛍光発光を強力にし、ナノ粒子合成の効率も上昇させることを目的として CdS と ZnS ナノ粒子の作製プロトコルの見直しを行った。フェリチン外部での副反応をできるだけ押さえるために、反応溶液の温度を低温にしてナノ粒子形成を行った。

その結果、CdS ナノ粒子の場合、1 mM Cd 溶液、5 mM チオ硫酸および 0.3 mg / mL のアポフェリチンを添加しながら、低温で長時間かけてゆっくり合成することで、80% 以上の収率でフェリチン内部に均一な CdS ナノ粒子を作製することに成功した。作製したナノ粒子を高分解能透過型電子顕微鏡観察と XRD による元素分析を行った結果、直径 12 nm の殻が存在し、さらに内部に 7 nm のナノ粒子が形成されており、このナノ粒子は従来と同じ立方晶の多結晶体であることが確認された。さらに 360 nm の励起波長による蛍光発光波長の測定により、700 nm 付近にピークを持つ蛍光発光を観察することができた。

一方、ZnS ナノ粒子も低温でゆっくり作製すると、CdS と同じように 80% 以上の収率で立方晶の ZnS ナノ粒子を得ることに成功した。こちらは 420 nm 付近にピークをもつ蛍光発光が観察された。両者とも室温で作製したものより蛍光発光強度が 2 倍以上となり、フェリチン内部への化合物半導体ナノ粒子の作製には、低温で行う事が重要であることが明らかになった。



#### 、 Au<sub>2</sub>S ナノ粒子の還元による Au ナノ粒子の作製と諸性質の検討

また、破損した Au 配線や Au 電極を修復するための修復用バイオナノ粒子として、フェリチン内部に Au ナノ粒子を保持する Au

バイオナノ粒子の作製を行った (図 3)。

既に、フェリチン空洞内部には Au<sub>2</sub>S のナノ粒子を作製することが可能となっていたため、まずフェリチン内部空洞にこの Au<sub>2</sub>S ナノ粒子を作製した後、還元条件下に放置あるいは NaBH<sub>4</sub> 等の還元剤を反応溶液中に添加する事でフェリチン内部でのダイレクト還元によって Au ナノ粒子の作製を試みたが、全ての Au<sub>2</sub>S ナノ粒子を完全に Au にすることが難しかった。

そこで次の方法として、従来のウマ由来フェリチンとは異なる植物由来のケイ藻由来フェリチン (Fer A) の内部空間を用いてバイオミネラル化による Au ナノ粒子の作製を試みた。塩化金酸を原料として種々の pH の緩衝液と FerA を混合し、ナノ粒子形成のために最適な反応溶液条件の検討を行った結果、フェリチン内部空洞に Au ナノ粒子を作製することに成功した (図 3)。しかし、直径 7 nm の内部コアいっぱいにはナノ粒子を作製することはできず、電子顕微鏡観察では小さくて薄いナノ粒子しか観察できなかったため、現在、反応溶液条件の再検討を行いながらナノ粒子の改良を行うとともに、原因を探索中である。しかし、フェリチンの内部空洞のキャパシティのおよそ 1/3 量の Au ナノ粒子はできていると見積もられるため、現在、このコア形成量を上昇させる反応条件の検討を行うとともに、これを修復用バイオナノ粒子のコアとして用いて次の実験を進めている。

### Au を認識する新規 Au 結合ペプチドの取得と性質検討

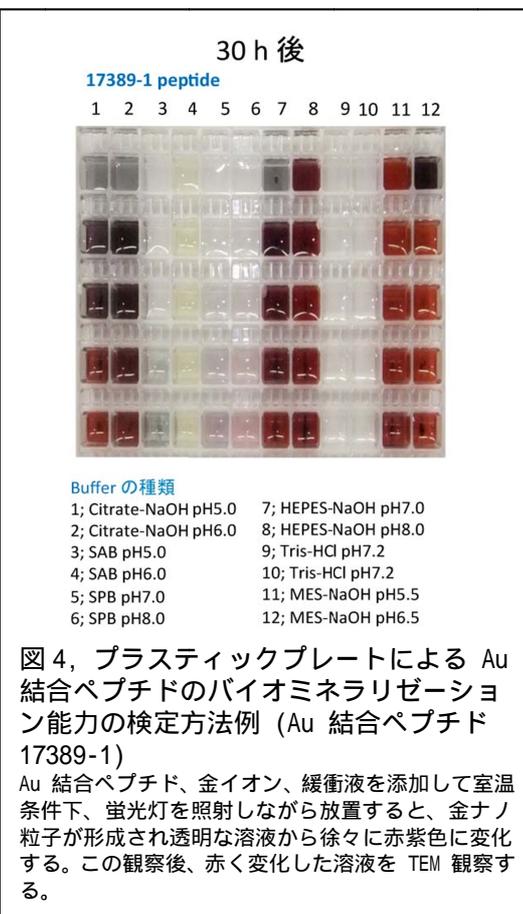
本研究における当初の予定では、Au 等の金属破損部分を認識し結合するペプチドは既に数種類報告されている Au 結合ペプチドを利用する予定であった。しかしこれらの Au 結合ペプチドに対して QCM の Au 電極表面を用いた吸着力測定を行ったところ Kd (解離結合定数) の値が少し悪かったため、まず、より Kd 値のよい (親和性の高い) Au 結合ペプチドの取得を行った。

新規 Au 結合ペプチドの取得は、ファージディスプレイ法やランダムペプチド法等によって行い、10 種類の候補ペプチド配列を得ることができた。この候補ペプチドを人工合成し、上記と同様に QCM の金電極表面を利用した Kd 値測定を行い最も Kd が良い物を選抜した。さらに結合力が高くてモノ粒子形成能力 (ミネラル化能力) が低い物もあるため、次にバイオミネラル化能力の検定を行った。

このバイオミネラル化能力の検定は 96 穴のプラスチックプレートを用いて、各ウエルに候補ペプチド、1 mM 金溶液、pH 調整のための緩衝液を添加した後、室温で蛍光灯の光を照射しながら放置する事で、光照射によって還元され生成する Au ナノ粒子の生成速度を観察した (プラスチック

プレート法) (図 4)。これらの選抜の結果、従来の Au 結合ペプチドの 2 倍以上の高い親和性を持ち、さらにバイオミネラル化能力も高い、新しい Au 結合ペプチドの取得に成功した (Au ペプチド)。

さらに、新しく取得した Au 結合ペプチドの Au 表面への結合メカニズムを解明するために、Au ペプチドのアミノ酸配列のアラニン置換を行い、ランダムペプチドを 8 種類人工合成した。これらのペプチドの Au 表面に対する結合力測定 (QCM 測定) とバイオミネラル化能力 (プラスチックプレート法) を検討した。その結果、Au ペプチドの内部に存在しているアミノ酸の一つであるグルタミン酸が特に親和性の向上に非常に重要な役割をしていることが明らかになってきた。現在、ペプチドの分子モデリングによる立体構造と結合力の増強の関係解明を進めている。

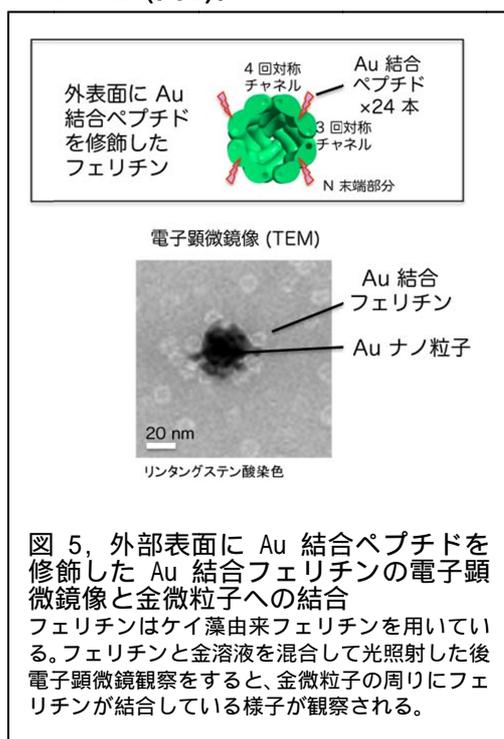


### Au 結合ペプチドを修飾した探索用、修復用バイオナノ粒子の作製と性質検討

上記において新規に取得された Au 結合ペプチドを外部表面に修飾した遺伝子変異フェリチンを作製し、実際に修復用バイオナノ粒子の作製を試みた。フェリチンの遺伝子変異体作製は、従来のフェリチンの改良に多用されており実績のある pMK-2 プラスミドを用いた。上記で取得した Au 結合ペプチドの配列をコードする DNA を pMK-2 プラスミドに導入した fer a プラスミドを作製

し、これを宿主である大腸菌に形質転換して Au に特異的に結合する Au 結合フェリチンの作製を行った。フェリチンの N 末端部分はフェリチンタンパク質の外表面に突出した構造となるため、N 末端に結合させた新規 Au 結合ペプチドも外表面に突出した形となる。また Au 結合ペプチドを修飾したフェリチン (FerA-oAu) は 24 個のサブユニットで構成されているため、フェリチン 1 分子あたり上記の Au 結合ペプチドを外表面に 24 本保持する事となる。これらの Au 結合ペプチドにより Au 基板部分を認識し、結合する事が可能となる。

fer a 遺伝子を含む大腸菌の形質転換体の培養を従来法によって行った後、通常フェリチンで行われているタンパク質精製方法によってフェリチン変異体を単離精製した。精製されたフェリチンは電子顕微鏡で観察した (K. Iwahori, et. al. *Inorg. Chem* 44, 6393-6400, (2005))。その結果、FerA-oAu フェリチンは、従来の哺乳類由来フェリチンと同様に高い収量でフェリチンを発現すると共に、従来のカラムクロマトグラフィーによる方法で精製する事が可能であることが明らかになった。また TEM 観察では直径 12 nm のきれいな球殻状のタンパク質が観察され、外部に金属結合ペプチドを導入した FerA 変異フェリチンの作製でも、今までの遺伝子操作技術や精製法が十分適応できることが明らかになった (図 5)。



次に、作製した FerA-oAu フェリチンの機能を調べるために FerA-oAu フェリチン溶液、塩化硝酸溶液と緩衝液を混合後、光照射しながら室温で放置し、Au の結合能力とバイオミネラリゼーション能力の検討を行った。光照射しながら室温で放置すると反応溶液が徐々に赤紫に変化し、その溶液の上清

を TEM で観察すると光照射によって形成された直径 50-100 nm の Au ナノ粒子とその周りにフェリチンがびっしり結合している様子が観察された (図 5)。Au 結合ペプチドを修飾していないコントロールの FerA は全く Au ナノ粒子に結合しなかったことより、Au 結合ペプチドはフェリチンに修飾された状態でも十分機能していることが明らかになった。

以上の結果より、外部に新規の Au 結合ペプチドを保持し、内部に Au ナノ粒子を保持している金電極及び、金配線修復用のバイオナノ粒子の作製に成功した。現在、この修復用バイオナノ粒子を使用して実際のデバイス上における欠陥を修復する実証実験を行っている。また、Au バイオナノ粒子の方法を用いて探査バイオナノ粒子の作製も進めており、で作製したウマ由来フェリチン内部に CdS ナノ粒子を作製したものに Au 結合ペプチドを修飾した変異フェリチンの作製にも成功しつつある。

## まとめ

本研究では、蛍光発光する化合物半導体ナノ粒子の効率的バイオ合成法の確立、新規の Au 結合ペプチドの取得、さらにフェリチンへの修飾法の確立により、Au を認識し、結合するバイオナノ粒子の作製に成功した。この Au バイオナノ粒子には内部に Au ナノ粒子も含まれているため、電子デバイス上の欠陥部分を認識し修復することができるはずである。Au 結合ペプチドのような金属結合ペプチドやフェリチン内部へのバイオミネラリゼーションによるナノ粒子形成は、世界中で研究、報告されており現在までに、50 種類以上の金属結合ペプチドと 30 種類以上フェリチン内部に合成されている金属あるいは化合物半導体ナノ粒子が報告されているため、本研究で開発したバイオナノ粒子の作製方法をベースとすれば、多様な組み合わせにより、様々なデバイス表面上の欠陥に結合し可視化による認識や修復等が可能となると考えられる。

今後は、実際のデバイス上におけるバイオナノ粒子の機能を検証すると共に、計画にあったアルミニウムナノ粒子を持つ溶接用バイオナノ粒子の作製と性能評価、界面制御による発熱量のコントロールを早急に行い、実証実験を完成させる予定である。

## 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)

岩堀健治,「バイオミネラリゼーションを利用した化合物半導体材料の合成とその利用」化学と生物, 55, 2017, 166-173 (査読有), <https://katosei.jsbba.or.jp/>

index.php?aid=748

Kazuyuki Nobusawa, Naofumi Okamoto,  
Karen Siew Ling Chong, XiLin, Kenji  
Iwahori, Ichiro Yamashita, "Dispersed  
gold nanoparticle array produced by  
apoferritins utilizing  
biomineralization and chemical  
conversion" ACS Nano, 2, 2017,  
1424-1430 (査読有),  
DOI: 10.1021/acsomega.6b00550

[学会発表](計 1 件)

Kenji Iwahori, Midori Yamane, Ichiro  
Yamashita, The diversity utilization  
of cage shaped proteins and peptides  
for making bio-materials, The first  
International Workshop by the 174th  
Committee JSPS "Symbiosis of Biology  
and Nanodevices" Kyoto, Japan,  
December, 21, 2017

## 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