

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21325

研究課題名(和文) タンパク質結晶をナノ反応場とした三次元金クラスター構造体形成過程のその場観察

研究課題名(英文) In situ observation of gold nanoclusters formation process in protein crystals as nanoporous materials and nano-reaction fields

研究代表者

宇和田 貴之(Uwada, Takayuki)

城西大学・理学部・助教

研究者番号：30455448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質結晶は配列したnmサイズの細孔を持つ、一種のナノポーラス材料である。また溶媒チャンネルを通じ溶液から分子をとりこむことが可能であり、新規ナノ反応容器としての展開が期待される。本研究ではモデルタンパク質としてニワトリ卵白由来リゾチームを使用し、結晶内での金ナノ物質の作製を試みた。予め調製したリゾチーム結晶内に四塩化金酸を導入することで、結晶内での金ナノ粒子と発光性の金ナノクラスター形成を確認した。これはタンパク質結晶が多孔質材料かつ反応容器であると明示している。更に、リゾチーム結晶への蛍光分子導入の過程も調べ、結晶内部の電荷が結晶の多孔質材料としての重要な性質であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Protein crystals possess distinguished three-dimensional structures that contain well ordered nanoporous solvent channels. These channels provide a chemically heterogeneous environment. Here, we performed gold nanostructure formation inside the protein crystals and examined the process by in-situ spectroscopic observation under an optical microscopy. We confirmed that not only gold nanoparticle but also photoluminescent gold nanoclusters were formed inside the crystals, suggesting that Au ions can penetrate into the crystals and are reduced by the crystals without reducing agent. Furthermore, diffusion process of fluorescent molecules into the crystals was examined on the basis of fluorescence microspectroscopy. We successfully confirmed that the fluorescent molecules can diffuse into whole the protein crystals probably via the solvent channels. We found that the diffusion process differed depending on the molecular charge.

研究分野：物理化学

キーワード：多孔質材料 タンパク質結晶 金ナノ粒子 局在プラズモン共鳴 金ナノクラスター 顕微イメージング

1. 研究開始当初の背景

20 種類のアミノ酸から構成されるタンパク質は、極めて豊富な多様性と個々としての独自性を併せもつ機能性材料であるといえる。近年、タンパク質を液中での反応容器とした金ナノクラスターの調製が広く研究されている。タンパク質が金属イオンを担持できるアミノ酸(ヒスチジン、システイン)と還元性を有するアミノ酸(チロシン、トリプトファン)を同時に持つ場合、タンパク質単体で金イオンの取り込みから固定、還元、クラスター形成までを完結できる。また、タンパク質はその構造に応じ数 nm 以下の空間を内部にもつため、タンパク質を適宜選択することで構成原子数を調節したクラスターの作り分け可能である。これにより得られた金ナノクラスターは半導体量子ドットと同様サイズ固有の発光特性を示すため、新規発光材料として注目されている。重要な事に、この金クラスターが発光特性を発現する原子数は半導体より少なくサイズにして 1 nm 程度、一般的なタンパク質のもつ空間とほぼ同程度となることもこの手法の優れた点であり、金以外にも貴金属ナノクラスターを調製する方法に適しているとの報告がなされている。私は 2012 年よりこのタンパク質を鋳型とした発光性金ナノクラスター調製のとりわけ調製方法改善に注力しており、主たる研究テーマとして研究を進めてきた。

このように単体で金クラスターを調製しうるタンパク質を結晶としたもの、すなわちタンパク質結晶は、高秩序の三次元構造を形成していると同時に内部に水溶液を保持しているため、ゼオライトのようなナノ多孔質材料と捉えることができる。近年、にわかに注目されているのがこのタンパク質結晶を反応場としたプラズモニックナノ粒子の調製である。Guli らはニワトリ卵白由来リゾチーム結晶をつくり架橋反応により結晶構造を強固にした上で内部に金イオンを取り込ませ金ナノ粒子(粒径: ~20 nm)にまで成長させている(*Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, 49, 520.)。Wei らもリゾチームを用い内部で金ナノ粒子を成長させ、結晶の構造を X 線構造解析により調べている(*Nat. Nanotechnol.*, 2011, 6, 93.)。いずれもタンパク質結晶が金イオンを取り込むのに十分な大きさの細孔をもち、内部でそれを還元できる機能を持つことを示したと言える。しかしながらこれらの研究報告では、金ナノ粒子のサイズを制御すること、結晶内に均一に粒子を分布させることには成功しておらず、また結晶構造にもネイティブと比べて変化が見られる。その理由として、タンパク質として水分含有量が 40% におよび構造の柔軟なリゾチームを用いていることと、金ナノ粒子成長過程とタイムスケールが不明であることが挙げられる。

そこで、私がこれまで培ってきたタンパク質包接金クラスター調製の知見と、このタン

パク質結晶を反応場とするアイデアを融合させれば、金ナノクラスターをタンパク質結晶内で形成することは可能であり、その三次元構造および分布によっては全く新しい発光特性を示すのではないかと、その制御のためにはクラスター成長過程をリアルタイムでその場観察することが重要ではないかと考えた。

2. 研究の目的

私がこれまで行ってきたタンパク質包接金クラスターを調製する方法を進展させ、タンパク質結晶を多孔質材料を捉えてこれを反応場として結晶内に発光性金ナノクラスターを三次元分布した構造を調製する。タンパク質の種類を変数として細孔のサイズや反応場の特性を変化させ、同一サイズのクラスターを均一に分布させる。

一方、タンパク質結晶内部で均一な金ナノクラスターを隙間なく三次元で分布するよう調製を能動的に制御するためには、結晶内でどのように金イオンが拡散してゆくのか、反応が結晶内で均等に生じるのか偏りがあるのかなど多孔質材料・ナノ化学反応場としてのタンパク質結晶の性質を同時に理解する必要がある。このため、タンパク質結晶全体と単一金クラスターを同時に確認し分光測定できる広域レーザー照明発光顕微分光装置を用い三次元構造形成過程をその場観察することで、結晶内でのクラスターの形成・成長とクラスターの空間分布の変化を発光波長の変化からリアルタイムで調べ明らかにする。

3. 研究の方法

タンパク質結晶をナノ細孔およびナノ反応容器と捉え、結晶内部への分子の導入および内部での金ナノ構造体形成過程を顕微分光イメージングによる *in-situ* 測定により調べた。

モデルタンパク質結晶としては、ニワトリ卵白由来リゾチーム結晶を用いた。この結晶は市販の結晶化プレートを用いたシッティングドロップ法により調製した。母液として 50 mg/mL のリゾチーム酢酸バッファ溶液 (pH4.5)、リザーバーとして酢酸バッファ、沈殿剤として塩化ナトリウムをそれぞれ用い、25°C に設定したインキュベータに静置した。2~3 日後にリゾチームの正方晶系結晶が得られ、サイズは 400 μm 程度であった。結晶を調製した後、結晶周辺の酢酸バッファ溶液を金ソースである四塩化金酸およびリゾチーム混合酢酸バッファ溶液へと入れ替えた。この結晶化プレートを倒立顕微鏡ステージに置き、結晶への金イオンの浸透および結晶内での金ナノ物質形成過程を顕微鏡下での透過・蛍光像および位置分解を伴う吸収・蛍光スペクトルの経時測定により調べた。

4. 研究成果

(1) リゾチーム結晶内部での金ナノ構造体形成

リゾチーム内での金ナノ構造形成のため結晶の周辺を四塩化金酸を含むリゾチーム溶液に置き替え数日置くと、結晶は透明から赤紫色を呈するようになり、吸収スペクトルは 550 nm 近傍にピークを示した。これは金ナノ粒子(10 nm<)の局在プラズモン共鳴に由来する吸収と考えられる。つまり、結晶内に金イオンが導入されると同時に還元反応が生じた結果として金ナノ粒子が形成したことになる。つまり、タンパク質結晶は確かに多孔質材料のように分子の導入が可能であり、かつ内部で化学反応の生じる反応容器でもあると実証した。留意すべきは、この際に液中に金イオンの還元剤となるものを加えていないことである。すなわち、金イオンはリゾチーム結晶によって還元されたと考えられる。金イオンは結晶内のリゾチームが持つチロシンおよびトリプトファン残基により次第に還元され金原子となり、結晶内の制限された空間内で融合しナノ粒子を形成すると考えられる。

また、内部に金ナノ粒子の形成したリゾチーム結晶に顕微鏡下で 405 nm のレーザー光を照射したところ、700 nm 近傍に強い発光を示すことを確認した。これは、結晶内部に粒径 10 nm 程度の金ナノ粒子のみならず、それよりも小さな粒径 1~2 nm 程度の発光性金ナノクラスターが形成したことを示唆している。この金ナノ粒子と金ナノクラスターという結晶内部における二峰性を持った金ナノ構造体のサイズ分布は、結晶内の細孔のサイズ分布および結晶の柔軟性に起因するものと考えた。

そこでリゾチーム結晶をグルタルアルデヒドで架橋することで結晶を固定化し、同様の実験を行った。その結果、ネイティブな結晶よりもはるかに早く 1 日以内での金ナノ構造の形成を認めた。これは架橋により結晶が強固となることで金イオンの不均化反応が生じやすくなったためと考えており、タンパク質を反応容器として用いる際の重要な知見と位置づけている。

想定を超えた発見として、上記の内部に金ナノ粒子の形成したリゾチーム結晶に 405 nm のレーザー光を広域照射することで、結晶の呈するプラズモン共鳴由来の赤色が濃くなり、最終的に結晶が割れることおよび 580 nm に新たな発光バンドが現れることを確認した。これはレーザー光により金イオンの還元が促進されることを意味している。この理由としてリゾチームのもつアミノ酸に 405 nm の光を吸収するものがあり、それが光励起によって電子励起状態となることで金イオンの還元能が高くなると考えており、今後も詳細を調べて研究を進展させてゆく予定である。

(2) リゾチーム結晶内部への蛍光色素分子の浸透拡散過程の蛍光分光イメージング

研究計画時に予定していた、タンパク質結晶内部で金ナノクラスターが形成する様子その場観察は、同時に金ナノ粒子が形成してしまうことによりクラスターの濃度が低いこと、クラスターの発光量子収率が低い (~0.1) ために単一レベルでの検出が容易ではないこと、リゾチーム結晶そのものの自家蛍光が強いことから、断念せざるをえなかった。

しかしながら、タンパク質結晶の反応容器としての側面のみならず多孔質材料としての側面を検討する必要は依然としてあった。そこで、結晶へ蛍光分子を導入し、その過程および結晶と分子の相互作用を顕微蛍光分光により調べた。

中性分子のアクリジンイエロー、カチオン性のローダミン 6G、アニオン性のエオシン Y など電荷を持つ蛍光分子を含む溶液を結晶周辺溶液と置換したところ、いずれも結晶内部に分子が導入されていく様子を蛍光イメージングにより示すことができた。つまり結晶は溶媒チャンネルを通して外部から分子を取り込むことができる、多孔質材料として機能することを明らかにした。一方、結晶内部に導入されたカチオン性分子であるローダミン 6G の吸収スペクトルは溶液と比べて幅広くなり、蛍光は長波長へとシフトすることを確認した。これは中性、アニオン性の分子のスペクトルが溶液と結晶内部とで変化がほとんどないことと対照的である。これはチャンネルの電荷と分子の電荷との間での反発が示唆する。これは多孔質材料としてのタンパク質結晶についての重要な知見であると考えられる。

次いで蛍光 pH 指示薬である DND-160 で同様の実験を行ったところ、この分子もリゾチーム結晶内に導入された。導入後に結晶内外で蛍光スペクトルを測定したところ、結晶内の pH は周辺バッファの pH4.5 より低く pH4.0、結晶表面はより低く pH3.6 となるという結果となった。この理由として、先程結晶内部の細孔の表面は正に帯電しており、pH に関してもそれを決める正電荷を持つプロトンが細孔の電荷による反発を受けて拡散しづらくなり、その結果 pH が低くなっているのではと考えている。今後も分子の大きさなど変数として同様の実験を行い、分子選択性などタンパク質結晶が多孔質材料特有の性質を示しうるか調べ、研究をなお発展させてゆく予定である。

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 5 件)

"Localized Phase Separation of Thermo-responsive Polymers Induced by

Plasmonic Heating"
Issei Aibara, Jun-ichi Chikazawa, Takayuki Uwada, and Shuichi Hashimoto
J. Phys. Chem. C, 2017, 121, 22496-22507.
DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b07187
"Preparation and micropatterning of gold nanoparticles by femtosecond laser-induced optical breakdown"
Takayuki Uwada, Shun-Fa Wang, Tsung-Han Liu, Hiroshi Masuhara
J. Photochem. Photobiol. A, 2017, 346, 177-186.
DOI: 10.1016/j.jphotochem.2017.05.051
"Size-Dependent Optical Properties of Grana Inside Chloroplast of Plant Cells"
Takayuki Uwada, Ling-Ting Huang, Ping-Yu Hee, Anwer Usman, Hiroshi Masuhara
J. Phys. Chem. B, 2017, 121, 915-922.
DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b10204
"Laser-driven phase transitions in aqueous colloidal gold nanoparticles under high pressure: picosecond pump-probe study"
Shuichi Hashimoto, Tetsuro Katayama, Kenji Setoura, Michael Strasser, Takayuki Uwada, Hiroshi Miyasaka
Phys. Chem. Chem. Phys., 2016, 18, 4994-5004.
DOI: 10.1039/C5CP07395B
"Plasmonic Nanofabrication through Optical Heating"
Matthias Enders, Shinya Mukai, Takayuki Uwada, and Shuichi Hashimoto
J. Phys. Chem. C, 2016, 120, 6723-6732.
DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b11762

〔学会発表〕(計 4 件)

"タンパク質結晶への分子の浸透拡散過程の蛍光分光イメージング"
宇和田貴之、高橋 郁也、石川満
日本化学会 第 98 春季年会、日本大学船橋キャンパス(千葉)、2018 年 3 月
"ナノ多孔質材料・ナノ反応場としてのタンパク質結晶の光学顕微鏡観察"
宇和田貴之、鈴木千加、高橋 郁也、石川満
2017 年光化学討論会、東北大学青葉山キャンパス(宮城)、2017 年 9 月
"高分子マトリックス中の単一ペリレンナノ粒子の発光分光"
宇和田貴之、佐藤美波、石川満
日本化学会 第 97 春季年会、慶応大学日吉キャンパス(神奈川)、2017 年 3 月
"Polymorphism of perylene nanocrystals in polymer matrices studied by single particle spectroscopy"
宇和田貴之、佐藤美波、石川満
2016 年光化学討論会、東京大学駒場キャンパス(東京)、2016 年 9 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計 0 件)
- 取得状況(計 0 件)

〔その他〕

城西大学・ナノ機能化学研究室(宇和田研究室)ウェブサイト

<https://www.josai.ac.jp/~uwada/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇和田貴之 (UWADA Takayuki)

城西大学理学部化学科・准教授

研究者番号：30455448

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

鈴木千加 (SUZUKI Chika)

城西大学理学部化学科・学部 4 年生

高橋郁也 (TAKAHASHI Ikuya)

城西大学理学部化学科・学部 4 年生