

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：34316

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550200

研究課題名(和文)フェリチンコア金属粒子の基板上への精密配列化におけるペプチド集合体の鋳型効果

研究課題名(英文)Alignment of ferritins and their derivatives along self-assembled peptide nanoarchitecture

研究代表者

富崎 欣也(Tomizaki, Kin-ya)

龍谷大学・理工学部・教授

研究者番号：90397026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円、(間接経費) 1,320,000円

研究成果の概要(和文)：近年、電子デバイス製造工程においてフォトリソグラフィー用光源波長の根本的な技術限界を迎えつつある。これまでに分子内部に酸化鉄コアを有するフェリチンのシリコン基板上への二次元配列化が達成されているが、これら先行技術は従来同様リソグラフィーを必要とするなど更なる技術革新が求められる。そこで、応募者は、ペプチドが自己組織的に線維状のナノ集合体を形成する性質を利用して基板上にペプチド集合体を組織し、それらを鋳型としてフェリチン内部の金属(化合物)粒子を特定領域に精密配列化する一連のバイオナノプロセスの開発を行い、密度に改良の余地はあるものの、約6-7 nmほどの酸化鉄ナノ粒子の配列化に成功した。

研究成果の概要(英文)：Ferritin is a spherical and iron-preservation protein to control iron ion concentration in biosystems. The inner and outer diameters of ferritin shell are about 7 and 12 nm, respectively. In addition, the internal cavity takes various metal particles. Using this property, synthesis of nanoparticles with narrow size distribution is performed to develop a new-type electronic device. However, photolithography is necessary to align ferritins within a nano-scaled area. Meanwhile, peptides form self-assembled nanoarchitectures depending on their amino acid sequences. If ferritins are aligned along self-assembled peptide nanoarchitectures, it is possible to realize low cost, simple and easy production of ferritin-based nanodevices. We designed and synthesized self-assembled beta-sheet-forming peptide fibrous formations and successfully aligned ferritins and their derivatives along the peptide nanofibers even in a low density.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体機能関連化学

キーワード：ペプチド 自己集合化 フェリチン

1. 研究開始当初の背景

現在の半導体デバイス製造はフォトリソグラフィ技術を用いるトップダウンアプローチによって高密度化・高集積化が可能となっている。しかし、近年、フォトマスクの製造限界やリソグラフィ用光源波長等の根本的な技術限界を迎えつつある。

一方、ナノメートルサイズの生体分子(特にタンパク質)の自己組織化能を利用して微細構造を組み上げるボトムアップアプローチが注目されている。これまでに分子内部に酸化鉄コアを有するタンパク質であるフェリチンのシリコン基板上へのサブミクロンサイズでの配列化が達成されており、有機物を除去した後に残る金属粒子アレイを利用する次世代メモリやトランジスタとしての機能が期待されている。また、フェリチンを基板表面一面に二次元最密充填配置することが可能となっている。

しかし、これら先行技術は目的タンパク質を配列する際にフォトリソグラフィによる表面処理が必須であることや、フェリチンの特定領域への配列化が困難であることから、電子デバイス製造におけるトップダウンアプローチからボトムアップアプローチへの完全なパラダイムシフトには至っていない。応募者が解決しようとする課題は、フォトリソグラフィを必要とせずに基板上の特定領域へ金属粒子を配列化する革新的技術へとつながると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、フォトリソグラフィを利用せずとも基板上にフェリチンあるいは再構築フェリチンをナノレベルで配列化する基盤技術の開発に取り組んだ。

具体的には、アポフェリチン内部空孔に金属(化合物)ナノ粒子を生成させた再構築フェリチンを合成し、次いで、ペプチドが自己組織的に線維状のナノ集合体を形成する性質を利用して基板上にペプチド集合体を組織し、それらを鋳型として再構築フェリチン内部の金属粒子を特定領域に精密配列化する一連のバイオナノプロセスの開発を行った。

3. 研究の方法

鋳型となる短鎖ペプチドの設計・合成とそれらの二次構造および集合体形態評価。

リソグラフィ技術不要で、フェリチンを基板上に精密配列化させるために、生物学分野で多用されている選択的アビジン-ビオチン結合を利用した。末端にビオチンを結合したペプチドを設計・合成し、それらの二次構造を円二色性スペクトル(CD)および赤外吸収スペクトル(ATR-FTIR)を用いて評価した。集合体形態については透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて評価した。

合成ハンドルを連結したアポフェリチンおよびフェリチン合成法の開発。

フェリチンを基板上のペプチド集合体を鋳型として選択的に固定化させるために、アポ

フェリチンおよびフェリチンにビオチン基を結合した。未反応のビオチン化試薬を限外ろ過にて取り除いて精製を行った。

アポフェリチンへの金属粒子挿入によるフェリチン再構築法の開発。

粒子径の揃った金属粒子の基板上への精密配列化のために、で調製したビオチン化アポフェリチンを分子フラスコとして利用して粒子径の揃った金属粒子を内包するフェリチン再構築を行った。金属(化合物)ナノ粒子として、先行例のあるZnSeを選択し、再構築フェリチンの獲得を試みた。

基板上へのペプチド集合体の固定化による基板表面の組織化。

基板上に再構築フェリチンを精密配列化するために、で得られたビオチン化ペプチド集合体を透過型電子顕微鏡用グリッドに物理吸着によって固定化した。基板表面を透過型電子顕微鏡を用いて評価した。

ペプチド集合体(鋳型)形態の多様性拡大の検討。

フェリチンを基板上に一次元のみならず二次元にテラーメイド配列化するために、ナノファイバー状ではなく、ディスク状集合体を形成するビオチン化ペプチドの合成と集合化を試みた。

基板上のペプチド集合体を鋳型とするフェリチン類の精密配列化。

研究開発期間中の最終目標を達成するために、および工程で得られたペプチド集合体(鋳型)と、工程で調製したビオチン化再構築フェリチンあるいはビオチン化フェリチンを、抗ビオチン抗体を用いる抗原-抗体反応によって基板上に配列固定化を行った。

4. 研究成果

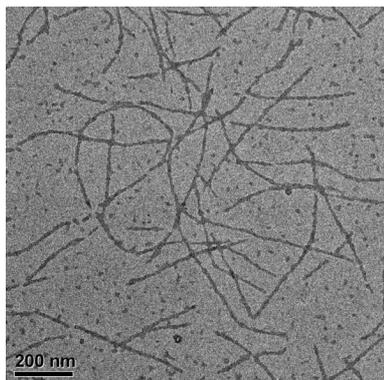
鋳型となる短鎖ペプチドの設計・合成とそれらの二次構造および集合体形態評価。

ペプチドの設計については、水溶液中でβシート構造を形成した際に両親媒性となるように親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸を交互に配置し、また、抗原-抗体反応を利用するためにN末端にビオチンを配置した。疎水性面にフェニルアラニンなど芳香族アミノ酸を配置することによりπ-πスタッキングおよび疎水性相互作用による集合体形成の促進を期待した。ペプチドはFmoc固相法により合成し、HPLCにより精製し、MALDI-TOFMSにより同定した。

得られたペプチドを水溶液中で7日以上インキュベーションすることで集合化させ、CDスペクトルおよびATR-FTIRスペクトルによりペプチドの二次構造評価を行った。まず、CDスペクトルより、195 nm付近に正のシグナルが間作され、またATR-FTIRスペクトルより、1625 cm⁻¹付近にピークが得られたことから、このビオチン化ペプチドは水溶液中でβシート構造を形成していると考えられる。

次いで、集合体形態を評価するために、TEM観察を行ったところ、直径約15 nmほど

のナノファイバー構造体が多数観察された (Fig. 1)。これらより、ビオチン化ペプチドは、水溶液中で β -シート構造を基体として水素結合がファイバー軸方向に伸長したナノファイバー構造を形成することがわかった。



(Fig. 1) ペプチドナノファイバーの TEM イメージ。

合成ハンドルを連結したフェリチン合成法の開発。

フェリチンを試薬として購入し、試料溶液中に存在する塩を除くために限外ろ過を行った。次いで、炭酸水素ナトリウム弱塩基性水溶液中で、ビオチン化試薬 NHS-dPEG₄-Biotin を加え、タンパク質表面のアミノ基とアミド結合によってタンパク質のビオチン化を行った。反応液を遠心分離、限外ろ過することで、ビオチン化したフェリチンを合成した。

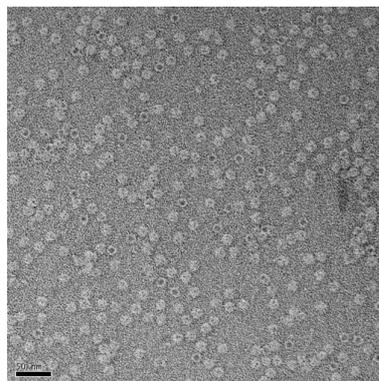
アポフェリチンへの金属粒子挿入によるフェリチン再構築法の開発。

ZnSe-フェリチンの合成は奈良先端科学技術大学院大学山下らの論文に記載された文献法に従い合成を行った。具体的には、試薬で購入した天然型フェリチンに、要時調製した酢酸亜鉛と酢酸アンモニウム、アンモニア水を加え、1 時間インキュベーションした後、要時調製したセレノウレアを加えて、一晚インキュベーションした。

ZnSe-フェリチンの TEM 観察から約 12 nm の球状のフェリチンが多数観察された。また、白い球状のフェリチンと白い球状の内部に黒いコアが取り込まれているフェリチンの両方が観察された。この内部の黒いコアの大きさは約 7-8 nm であった (Fig. 2)。次に、アポフェリチンの TEM 観察から約 12 nm の球状のフェリチンが多数観察されたが、ZnSe-フェリチンのように黒いコアが取り込まれているフェリチンは観察されなかった。このことから白い球状のフェリチンはアポフェリチンであり、白い球状の内部に黒いコアが取り込まれているフェリチンは ZnSe-フェリチンであると考えられる。

今回の実験でアポフェリチン内部の ZnSe 粒子の大きさは約 7~8 nm に統一され、形態も球状に統一された。この結果からアポフェ

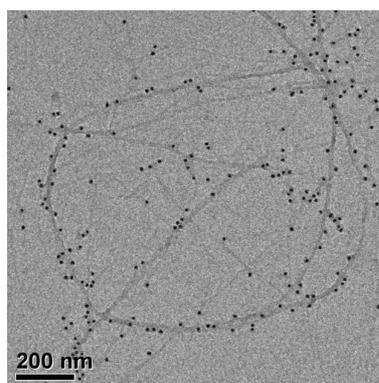
リチン空洞内部に ZnSe 粒子が取り込まれた再構築 ZnSe-フェリチンの合成に成功したと考えられる。また、TEM イメージより、ZnSe 粒子の内包率は 14 %と低い数値であった。



(Fig. 2) 再構築 ZnSe-フェリチンの TEM イメージ。

基板上へのペプチド集合体の固定化による基板表面の組織化。

ペプチドナノファイバー表面のビオチン基の機能評価を行うために、TEM グリッドにペプチドナノファイバーを吸着させ、金コロイド標識抗ビオチン抗体と反応させ、TEM 観察を行った。Figure 3 に示すように、TEM イメージよりペプチドナノファイバーに沿って約 10 nm ほどの金ナノ粒子の配列化が観察された。この結果から、ペプチドナノファイバー表面にビオチン化フェリチン誘導体と結合可能なビオチン基の配向が確認された。このペプチド自己集合体をフェリチン誘導体の配列化に用いる鋳型として実験を行うこととした。



(Fig. 3) ペプチドナノファイバー上への金コロイド標識抗ビオチン抗体配列化の TEM イメージ。

ペプチド集合体 (鋳型) 形態の多様性拡大の検討。

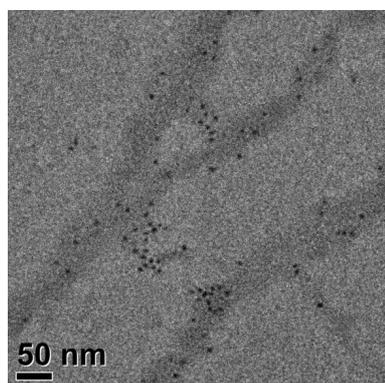
当研究室で見いだしたディスク状に自己集合化するペプチドの N 末端にビオチン基を結合したペプチドを新たに合成した。

基板上のペプチド集合体を鋳型とするフェリチン類の精密配列化。

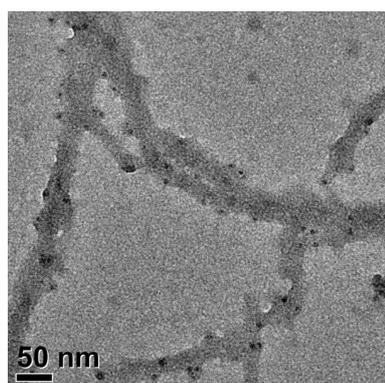
まず、ペプチドナノファイバーを TEM グリッドに吸着させ、抗ビオチン抗体と反応させた。これにビオチン化フェリチンを加え、洗浄後、TEM 観察を行った。

Figure 4 の TEM イメージより、線維状ペプチド集合体と結合した 6~7 nm ほどの酸化鉄ナノ粒子が観察された。このことから、抗ビオチン抗体を介してフェリチンがペプチドナノファイバー上に配列化されたと考えられる。

一方、ストレプトアビジンを介してフェリチンの配列化を行った場合、抗ビオチン抗体を用いたときに比べフェリチンの結合量が少なかった (Fig. 5)。この原因として、抗ビオチン抗体はビオチン基と先端部で結合するのに対してストレプトアビジンはビオチン基を取り込むように結合するためにビオチン化フェリチンの結合量が減少したと考えられる。



(Fig. 4)抗ビオチン抗体を介するフェリチンのペプチドナノファイバー上への配列化の TEM イメージ。

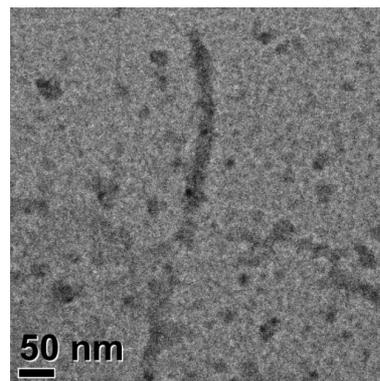


(Fig. 5)ストレプトアビジンを介するフェリチンのペプチドナノファイバー上への配列化の TEM イメージ。

天然型のフェリチンの配列化に加え、再構築 ZnSe-フェリチンのペプチドナノファイバー上への配列化を試みた。TEM 観察結果からわずかであるが線維状ペプチド集合体上に結合した 6-7 nm ほどの ZnSe ナノ粒子が観察されたことから、再構築フェリチンの配列化に成功したと考えられる (Fig. 6)。しかし、天然型フェリチンの配列化の TEM 観察結果と

比較すると ZnSe 粒子の結合量は著しく少なかった。これは ZnSe-フェリチン合成における ZnSe 粒子の内包率が 14 %と低く、内部が空洞のアポフェリチンの状態で結合していたためだと考えられる。

ディスク状ペプチド集合体を鋳型として天然型フェリチンの配列化を試みたが、良好な結果は得られなかった。ペプチドのデザインを再度検討する必要がある。



(Fig. 6)抗ビオチン抗体を介する ZnSe-フェリチンのペプチドナノファイバー上への配列化の TEM イメージ。

以上、ペプチド集合体、特にペプチドナノファイバーを鋳型として、抗原 - 抗体反応を用いたフェリチンおよび ZnSe-フェリチンを配列化する技術基盤の開発を行ってきた。この技術を応用することで、低コストかつ簡便なフェリチンの配列化が可能となり、触媒材料やセンサ、メモリなどへ応用可能であると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

1. Tomizaki, K.-Y.; Wakizaka, S.; Yamaguchi, Y.; Kobayashi, A.; Imai, T. “Ultrathin Gold Nanoribbons Synthesized within the Interior Cavity of a Self-Assembled Peptide Nanoarchitecture” *Langmuir* **2014**, *30*, 846–856. dx.doi.org/10.1021/la4044649 (査読有) .
2. Tomizaki, K.-Y.; Kubo, S.; Ahn, S.-A.; Satake, M.; Imai, T. “Biomimetic Alignment of Zinc Oxide Nanoparticles along a Peptide Nanofiber” *Langmuir* **2012**, *28*, 13459–13466. dx.doi.org/10.1021/la301745x (査読有) .
3. Tomizaki, K.-Y.; Ikawa, T.; Ahn, S.-A.; Yamazoe, S.; Imai, T. “The Effects of Charges at the N- and C-Termini of Short Peptides on Their Secondary and Self-Assembled Structures” *Chem. Lett.* **2012**, *41*, 549–551.

〔学会発表〕（計3件）

1. 小西達也・今井崇人・富崎欣也「ペプチド集合体に沿ったフェリチンの配列化」第7回バイオ関連化学シンポジウム、2013年9月27日、名古屋大学（名古屋市）.
2. 小西達也・今井崇人・富崎欣也「ZnSeナノ粒子を内包する再構築フェリチンの合成とペプチド集合体上への配列化」日本化学会第93回春季年会、2013年3月24日、立命館大学（滋賀県草津市）.
3. 小西達也・今井崇人・富崎欣也「ZnSeナノ粒子を内包する再構築フェリチンの合成とペプチド集合体との相互作用」第6回バイオ関連化学シンポジウム、2012年9月7日、北海道大学（札幌市）.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.ryukoku.ac.jp/tomizaki/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

富崎 欣也 (TOMIZAKI, Kin-ya)

龍谷大学・理工学部・教授

研究者番号：90397026