

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：93903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510141

研究課題名(和文) 金属微粒子を集積化したカラークリスタルの成長過程の単一微粒子検出によるその場観察

研究課題名(英文) in-situ Observation of Growth of Metal Nanoparticle-assembled Protein Crystal by Single Nanoparticle Detection

研究代表者

武田 佳宏 (TAKEDA, Yoshihiro)

株式会社コンポン研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：80557744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ゼータ電位が1mVと-3 mVの白金および白金'微粒子を作製し、結晶への集積化を行った結果、白金'微粒子より白金微粒子の方が結晶に集積化しやすいことがわかった。これは微粒子、リゾチーム、塩化ナトリウムの相互作用で説明できた。また白金微粒子が核形成促進することを見出した。白金微粒子とリゾチーム分子の複合体形成によるリゾチーム分子の濃度の高い領域の形成と複体内でのリゾチームの表面電位の低下により結晶核形成が促進されたと考えられる。また金属微粒子のタンパク質結晶への集積化のダイナミクスを調べる光学顕微鏡システムを構築した。数日にわたって単一蛍光微粒子からの蛍光観察ができる顕微鏡システムを作成した。

研究成果の概要(英文)：Assembling mechanism of platinum nanoparticle (PtNP) into a lysozyme crystal was examined for two different types of the PtNPs which have either positive or negative zeta potential. The distribution coefficient of the positive ones inside the crystal is much higher than that of the negative ones. Dispersivity of the PtNPs before interaction with the lysozyme crystal surface causes a profound difference on the assembly of the PtNPs into the crystal. Moreover, an effect of PtNP as additive on protein crystal nucleation was investigated. The presence of the PtNPs increased number of crystals per drop. PtNPs have two roles in the nucleation of lysozyme, condensation and charge delocalization of lysozyme.

Fluorescence microscope for investigation of the dynamics of protein crystallization was manufactured. Process of crystallization can be observed for several days by using this optical system, which can detect fluorescence of single nanoparticles.

研究分野：ナノ材料化学

キーワード：結晶 微粒子 集積化 リゾチーム タンパク質 単一微粒子検出

1. 研究開始当初の背景

これまでタンパク質結晶中に金属微粒子を集積化したタンパク質カラークリスタルを作製する技術を開発してきた。このカラークリスタルは、集積化した金属微粒子の表面プラズモン吸収波長により様々な色を呈している。金(ワインレッド色)、銀(黄色)、白金(黒色)微粒子が集積した場合はそれぞれの微粒子の色のクリスタルとなる。これらはタンパク質の結晶化条件下で金属微粒子共存させて結晶成長を行い、金属微粒子を自己組織化で結晶中に集積化させて作製する。カラークリスタルの作成は様々な元素の微粒子の集積化が同一手順で可能である。この利点を使って、金、銀、白金以外の磁場感受性を有する酸化鉄、ニッケルなどの微粒子を集積化してカラークリスタルを磁性結晶化した。さらにこの結晶の磁場によるマニピュレーションにも成功した。

さらにリゾチームの正方晶結晶の{101}セクターに金微粒子が取り込まれることを明らかにした(セクター効果)。また、リゾチーム結晶の中心部ほど金微粒子が高い濃度で取り込まれていることがわかった(濃度勾配効果)。さらに粒径の異なる金微粒子を含む集団を用いた場合、粒径の小さな金微粒子の方がリゾチーム結晶への集積化効率が高いことがわかった(篩(ふるい)の効果)。

2. 研究の目的

(1) タンパク質結晶に金属微粒子を包埋した構造体(カラークリスタル)を作製する方法を応用して金属微粒子の集積化と結晶成長のダイナミクスの解明する。

(2) (1)の知見を利用して金属微粒子を用いた結晶化促進法の開発を行い、タンパク質結晶化学へ貢献する。

3. 研究の方法

(1) 表面電位の異なった金属微粒子を用いてタンパク質との相互作用を変化させる。これらの微粒子の集積化を調べることでより結晶化ダイナミクスを解明する。

(2) 種々の金属微粒子を用いて結晶化促進効果について検討する。動的光散乱法やゼータ電位計測を駆使して、結晶化過程での金属微粒子とタンパク質の相互作用を明らかにし、結晶促進のダイナミクスを解明する。またダイナミクス研究のために結晶化過程の観測に適した単一金属微粒子検出可能な光学顕微鏡の開発も行う。

4. 研究成果

(1) タンパク質結晶に金属微粒子を包埋した構造体(カラークリスタル)を作製する方法を開発し、この方法を応用して金属微粒子の集積化のダイナミクスの解明を行った。ゼータ電位の極性の異なる白金微粒子を作製し、結晶への集積化を行った。まず Polyvinyl pyrrolidone (PVP) で被覆され安定化された

白金微粒子をレーザーアブレーションで作製し、さらにこの白金微粒子を水溶液中での3ヶ月間インキュベーションした。この微粒

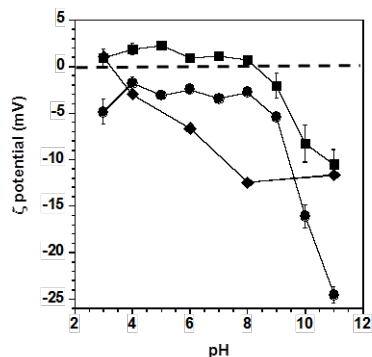


図1 ゼータポテンシャル。
■: 白金微粒子、●: 白金'微粒子、◆: 金微粒子

子を「白金'微粒子」と記す。白金および白金'微粒子のゼータ電位は、pH8以下で、それぞれ1mVと-3mVであった(図1)。リゾチーム分子への集積化効率を測定した結果、白金微粒子は結晶に集積化しやすく、白金'微粒子は、結晶に集積化しにくいことがわかった。図2では、白金微粒子の場合は黒色の白

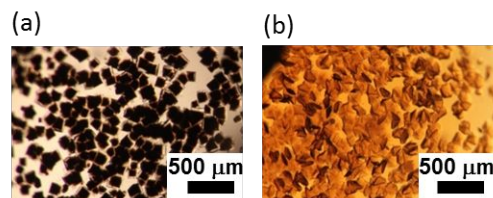


図2 白金微粒子の集積化。
(a): 白金微粒子、(b): 白金'微粒子

金微粒子が集積化しているために結晶が黒くなっている。一方、白金'微粒子の場合は、集積化していないために結晶が透明なままである。図3に集積化効率(分配係数)のpH依存性を示す。白金および白金'微粒子の集積化は以下のように微粒子、リゾチーム、塩

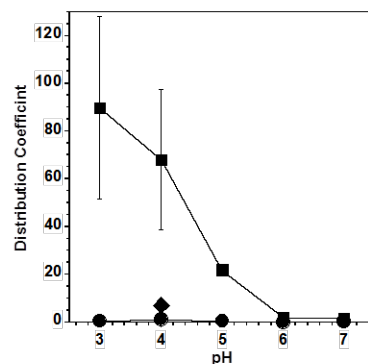


図3 集積化効率のpH依存性
■: 白金微粒子、●: 白金'微粒子、◆: 金微粒子

化ナトリウムの3者の相互作用で説明できることがわかった。酸性溶液中でリゾチーム分

子のゼータ電位は約 12mV である。したがって、塩化ナトリウムの塩化物イオンが正帯電したリゾチーム分子に吸着する。その結果、白金微粒子周囲の塩化物イオンの濃度は減少し、pH8 以下において、塩化物イオンによる白金微粒子のゼータ電位の遮蔽効果は減少する。さらに正に帯電している白金微粒子は数にして 10^5 倍存在する正帯電しているリゾチーム分子に囲まれている。したがって、微粒子とリゾチーム分子の反発力で白金微粒子は溶液中で分散している。この結果、白金微粒子は良く分散した状態で結晶表面と相互作用できる。一方、白金'微粒子は pH8 以下においては負に帯電しており、したがって、塩化ナトリウムのナトリウムイオンによって効率よく遮蔽される。その結果、白金'微粒子は結晶表面と相互作用する前に凝集する傾向を持つ。pH8 以下では、白金微粒子のゼータ電位は pH が増加すると低下する。リゾチーム分子の正電荷も pH が増加すると減少する。よって、リゾチーム吸着していた塩化物イオンが自由になるため、塩化物イオンによる白金微粒子の正電荷を遮蔽する効果は pH が増加すると大きくなる。さらに pH が 8 に近づくとき白金微粒子の正電荷は減少する。したがって、白金微粒子同士や白金微粒子とリゾチーム間の反発力は低下し、白金微粒子の分散性は低下する。その結果、pH が増加すると白金微粒子は凝集しやすくなり、pH が 8 に近づくとき白金微粒子の分配係数は低下する。さらに pH が 8 になると、白金微粒子の分配係数は急速に減少する。これは白金微粒子のゼータ電位が 0 になり、白金微粒子が著しく凝集するためである。pH が 8 から 11 の間では、分配係数は測定できなかった。これは、微粒子の激しい凝集のためである。pH が 8 から 11 の間では、白金微粒子のゼータ電位は負である。したがって、白金微粒子の電荷はナトリウムイオンによって遮蔽される。その結果、白金微粒子は正に帯電したリゾチーム分子と強く結合し凝集する。そのために白金微粒子の分配係数は計測できなかったと同時にリゾチーム結晶も生成しなかった。金微粒子の場合は、pH4 において、ゼータ電位は白金'微粒子よりも小さい。よってナトリウムイオンの遮蔽効果があっても安定に溶液中に分散する。よって、pH4 において金微粒子の分配係数は白金'微粒子よりも大きい。以上をまとめると、以前、金微粒子の結晶への集積化の機構で、負に帯電した金微粒子と正に帯電したリゾチーム分子の静電的相互作用を提唱した。このことと本研究を考え合わせると、微粒子の結晶表面と相互作用前における微粒子の分散性は第一のハードルで、微粒子とリゾチームの相互作用は第二のハードルである。白金と白金'微粒子については第一のハードルの分散性の違いが集積化の効率の違いの原因になっている。

(2)これまでタンパク質結晶中に金属微粒子を集積化したタンパク質結晶を作製する技術を開発してきた。これらはタンパク質の結晶化条件下で金属微粒子共存させて結晶成

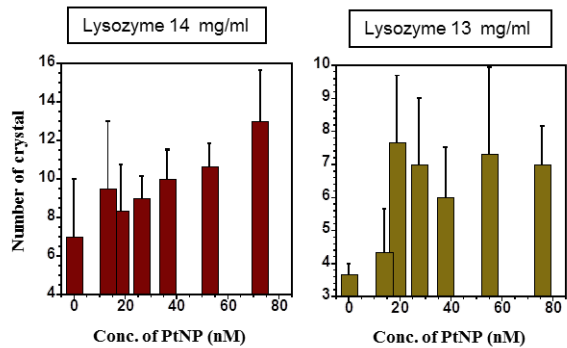


図4 白金微粒子による結晶化の促進

長を行い、金属微粒子を自己組織化で結晶中に集積化させる。このような金属微粒子が集積化したリゾチーム結晶には、結晶成長過程の痕跡が刻印されている。たとえば光学顕微鏡下で金微粒子を集積化したリゾチーム結晶像を拡大すると中心部で金属微粒子の濃度が高くなっており、金微粒子が結晶成長の初期段階、すなわち核形成に強く関与することを示唆していた。そこで様々な金属微粒子についてタンパク質の結晶の核形成の促進効果を探索した。その結果、白金微粒子(直径 9 nm)が核形成を促進することを見出した。具体的な手順は次の通りである。まず安定化剤としての PVP を溶解させた水溶液中に設置した白金プレートに波長 1064 nm 及びパルス幅 10 ns のパルスレーザーを照射することによりアブレーションし、溶液中に白金微粒子を単分散させ、白金微粒子溶液を調製した。

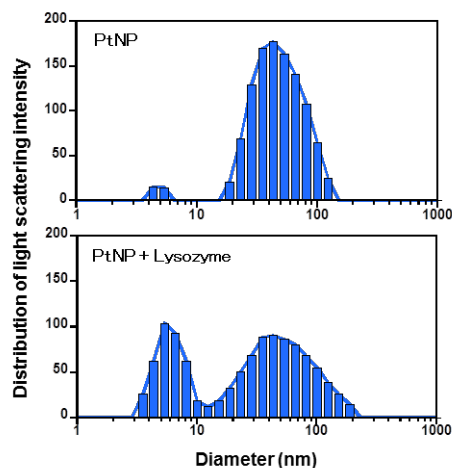


図5 動的散乱によるサイズ分布

上: 白金微粒子のみ 下: 白金微粒子+リゾチーム

次にリゾチーム分散溶液及び白金微粒子分散溶液を混合し、シッティング・ドロップ法でタンパク質の結晶化を行った。その結果、白金微粒子は結晶化の促進効果があることが分かった(図4)。さらに結晶核形成のメカニズムを明らかにするために、白金微粒子と

リゾチーム分子を含む結晶液の動的散乱を計測した結果、白金微粒子がリゾチームと共存していると見かけ上サイズが大きくなることがわかった。これは白金微粒子とリゾチーム分子が複合体を形成しているためである(図5)。この複合体では、白金微粒子の周囲にリゾチーム分子濃度の高い領域が形成され、結晶核形成が促進されると考えられる。またゼータ電位を計測し、表面電位と結晶核形成促進の関係を明らかにした。白金微粒子のみでは1 mV、リゾチーム分子のみでは6 mVであるが、白金微粒子とリゾチーム分子が複合体は2.5 mVであることがわ

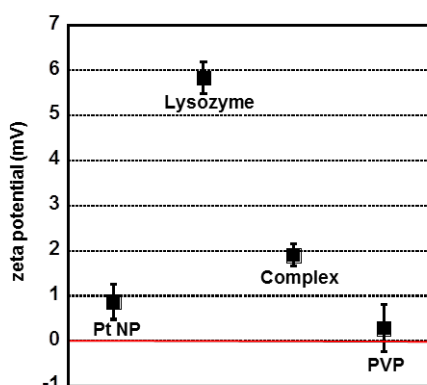


図6 ゼータポテンシャル

かった(図6)。これは、複合体を形成することにより高い表面電位を持つリゾチームの表面電荷が複体内に非局在化し、表面電位が低下しリゾチーム分子同士の反発が抑制される。その結果、結晶核の形成が促進されると考えられる。

(3)光学顕微鏡を用いて金属微粒子の集積化のダイナミクスを調べるシステムを作製した。すでに設置済みの倒立型顕微鏡を元に水銀ランプ光源と光ファイバーによる紫外光の顕微鏡システムへの導入を行い、数日にわたって蛍光観察ができる顕微鏡システムを構築した。さらに、このシステムでガラス表面上に分散させた蛍光微粒子を試験試料として、単一蛍光微粒子からの蛍光検出を行った。また集積させる微粒子として金属微粒子、特に量子ドットを使うことを考え、リゾチーム結晶への量子ドットの取り込みも確認した。量子ドットを使う利点として、色素のような退色現象はなく、長時間のその場観察が可能な点が挙げられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4件)

武田 佳宏、「液相レーザーアブレーションによるナノ粒子の合成とその応用」
0 plus E, 査読無、423、110-114 (2015)

<http://www.adcom-media.co.jp/bn/2015/01/25/20223/>

武田 佳宏、真船 文隆、「Self-assembly of positively charged platinum nanoparticles in lysozyme crystal」、*Chem. Phys. Lett.* 査読有、604、110-115 (2014)
doi:10.1016/j.cplett.2014.04.051

武田 佳宏、真船 文隆、「Formation of wide bandgap cerium oxide nanoparticles by laser ablation in aqueous solution」、*Chem. Phys. Lett.* 査読有、599、110-115 (2014)
doi:10.1016/j.cplett.2014.03.026

武田 佳宏、真船 文隆「液相レーザーアブレーションによるナノ粒子生成」、レーザー研究、査読有、40、77-82 (2012)
http://www.lsj.or.jp/laser/40/40_2.pdf

〔学会発表〕(計 3件)

武田 佳宏、「液相レーザーアブレーションの生体応用」、日本化学会第95春季年会特別企画講演「液相高密度エネルギーナノ反応場の深化」 2015年3月29日 千葉県船橋市

武田 佳宏、真船 文隆、「正に帯電した白金微粒子のタンパク質結晶への集積化」、第8回分子科学討論会、2014年9月24日、広島県東広島市

武田 佳宏、真船 文隆、「Formation of wide bandgap cerium oxide nanoparticles by laser ablation in aqueous solution」、EOS Conference on Advanced Nanoparticle Generation and Excitation by Lasers in Liquids (ANGEL 2014)、2014年5月19日、愛媛県松山市

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：X線結晶構造解析用のタンパク質結晶の製造方法

発明者：武田 佳宏、真船 文隆

権利者：トヨタ自動車株式会社、国立大学法人 東京大学、株式会社コンボン研究所
種類：特願 2014 - 193144

番号：特許

出願年月日：2014年9月22日

国内外の別：日本

取得状況(計 2件)

名称：ナノ物質集積体の製造方法、ナノ物質集積体およびそれを用いたデバイス、ならび

にナノ物質の構造解析方法

発明者：武田佳宏、真船文隆、近藤保

権利者：トヨタ自動車株式会社、国立大学

法人 東京大学、株式会社コンポン研究所

種類：特許

番号：5270486

出願年月日：2009年7月31日

取得年月日：2013年5月17日

国内外の別：日本

名称：三次元DNAネットワーク

発明者：武田佳宏、真船文隆、近藤保

権利者：トヨタ自動車株式会社、株式会社コ

ンポン研究所

種類：特許

番号：5200069

出願年月日：2010年7月27日

取得年月日：2013年2月15日

国内外の別：日本

〔その他〕

ホームページ等

・リゾチーム結晶中への微粒子の集積化

http://www.clusterlab.jp/2012/researchTakeda_j.html

・グリーンナノサイエンスデザイン研究会

<http://www.clusterlab.jp/2012/greennano.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 佳宏 (TAKEDA, Yoshihiro)

株式会社コンポン研究所・その他部局等・
研究員

研究者番号：80557744