

タンパク質を用いたナノ粒子・ナノワイヤ作製と その機構解明

博士学位論文

2008 年 9 月

奈良先端科学技術大学院大学
物質創成科学研究科

塚本里加子

目次

第1章 序論

1-1. 研究背景	1
1-2. これまでのバイオミネ랄化の研究	2
1-3. 本研究の目的とその位置づけ	2
1-4. 本論文の構成	3
参考文献	4

第2章 アポフェリチンを用いた酸化コバルトナノ粒子作製

2-1. はじめに	6
2-2. 本研究で用いたアポフェリチン	6
2-2-1 アポフェリチンについて	
2-2-2 リコンビナントアポフェリチンについて	
2-3. 過酸化水素水に対する安定性と熱安定性	10
2-3-1 円偏光二色性測定による天然アポフェリチンの熱安定性測定	
2-3-2 示差走査熱量計による天然アポフェリチンと リコンビナントアポフェリチンの熱安定性測定	
2-3-3 天然アポフェリチンの過酸化水素水に対する安定性	
2-4. アポフェリチンへの酸化コバルト導入実験に用いる緩衝液の探索	18
2-5. 透過型電子顕微鏡観察とコア形成率について	21
2-6. 最適溶液条件の探索	22
2-7. 作製した酸化コバルトナノ粒子の高分解能透過型電子顕微鏡による 結晶格子像と粒径分布	28
2-8. 作製した酸化コバルトナノ粒子の XRD による組成同定	31
2-9. リコンビナントアポフェリチン(Fer8)を用いた酸化コバルト ナノ粒子の作製	33
2-9-1 Fer8 を用いた酸化コバルトナノ粒子作製の最適溶液条件探索	
2-9-2 作製した酸化コバルトナノ粒子の透過型電子顕微鏡観察	
2-9-3 加熱による粒径への影響	
2-10. アポフェリチンを用いて作製した酸化コバルトナノ粒子を用いた デバイス作製	39
2-11. まとめ	40
参考文献	41

第3章 アポフェリチンの外表面化学修飾が酸化コバルトナノ粒子作製に与える影響

3-1. はじめに	42
3-2. アポフェリチン外表面へのポリエチレングリコール修飾	43
3-3. ポリエチレングリコールの修飾の確認	45
3-3-1 MALDI-TOF/MS による PEG 修飾数の確認	
3-3-2 ゲル濾過カラムクロマトグラフィー	
3-4. ポリエチレングリコール修飾アポフェリチンへの酸化コバルト導入	50
3-4-1 反応溶液の状態	
3-4-2 コア形成率	
3-4-3 上澄みに残存するフェリチン濃度	
3-4-4 コア形成フェリチンの回収率	
3-5. コントロール実験：ポリエチレングリコール混合実験	55
3-6. まとめ	57
参考文献	58

第4章 アポフェリチンへの酸化コバルト導入メカニズム

4-1. はじめに	59
4-2. 反応溶液混合 20 分後の溶液状態	61
4-3. レーザーラマン分光測定によるアポフェリチンの周囲に存在するコバルトイオンの解析	63
4-4. 紫外可視分光光度計による溶液混合後の時間経過と吸収スペクトルの関係	65
4-5. アポフェリチンを添加していない混合溶液で生じた沈澱の XRD 測定	68
4-6. アポフェリチン・ポリエチレングリコール修飾アポフェリチンへの酸化コバルト導入初期過程の考察	70
4-7. まとめ	74
参考文献	75

第5章 タバコモザイクウィルス(TMV)を用いたコバルト白金ナノワイヤの作製

5-1. はじめに	76
5-2. 本研究で用いた TMV	76
5-3. 攪拌方法の検討	79
5-4. コバルトイオン源と白金イオン源の選択	82
5-5. TMV へのコバルト白金ナノワイヤ作製の最適作製法	85
5-6. 作製したナノワイヤの透過型電子顕微鏡像とワイヤ長さ分布	86

5-7. TMV とコバルトイオンと還元剤のみ/TMV と白金イオンと還元剤のみ でのコバルト白金ナノワイヤ作製実験	89
5-8. 高分解能透過型電子顕微鏡とエネルギー分散型 X 線分析(EDX)測定	91
5-9. 作製したナノワイヤの磁化測定	94
5-10. 遺伝子的に内部空洞表面のチャージを改変した TMV を用いた コバルト白金ナノワイヤ作製	96
5-10-1 野生型 ToMV を用いたナノワイヤ作製 (U1-TMV との差異の確認)	
5-10-2 内部空洞にプラスチャージのアミノ酸を導入した ToMV (プラスチャージ導入 ToMV)でのナノワイヤ作製	
5-10-3 内部空洞にマイナスチャージのアミノ酸を導入した ToMV (マイナスチャージ導入 ToMV)でのナノワイヤ作成	
5-11. まとめ	106
参考文献	108

第 6 章 結論

6-1. タンパク質への金属析出機構について	109
6-2. 本論文の主要結果	109
6-3. 今後の課題と指針	110

研究業績	111
謝辞	115

第1章 序論

1-1 研究背景

半導体デバイスでは、約二年で性能が二倍になるという高性能化が続けられてきたが、この半導体デバイスの高性能化の源は微細加工技術による素子の小型化である。しかし、微細構造を作製するためのリソグラフィー技術は光を利用するため物理的限界に近づきつつある^{1,2}。そのため、近年では、これらのようなトップダウン加工ではなく、原子や分子を積み上げてナノ構造を作製するボトムアップ手法が活発に研究されている。その中で、生物は、ナノメートルサイズの構造体を自己組織化により作り上げている巨大なナノマシンであり、この仕組みを模倣することは、全く新しいナノ構造の作製手法を可能にする。タンパク質は、細胞の中で多種多様なものが相互作用しながら働いているが、その中で特定のタンパク質に着目すると、体中のどの細胞中にあっても全く同一である特徴を持っている。この理由は、タンパク質が同じ遺伝子情報により合成されることによる。すなわち、タンパク質は大量の規格品として考えられ、テンプレートとしてその形状と特徴を生かすことができれば、種々のナノテクノロジー分野に必要とされるナノ構造の作製が可能になると考えられる。バイオテクノロジー研究の進展に伴い、現在では、各種のタンパク質の立体構造が解明されており、遺伝子的な改変により新たな機能を付与したり³、新たなナノ構造を有する人工タンパク質を合成することが可能になっている。また、タンパク質に無機材料の析出を促進する機能性ペプチドを導入することも可能になってきた⁴。そこで、自由に改変したタンパク質に無機材料を担持させてナノブロックとして利用し、ナノ構造を作製してタンパク質を除去すれば、非常に精密な無機材料のナノ構造が作製できる可能性がある。この手法を用いたナノ構造構築技術として「バイオナノプロセス」があり、これは従来の半導体プロセス技術とバイオテクノロジーを融合した新たなデバイス作製プロセスである⁵。これまでに、かご状タンパク質フェリチンを用いて作製した均一なナノ粒子を利用したフローティングゲートメモリの作製に成功しているが⁶⁻⁹、今後、複雑なナノ構造の構築のためには、さまざまな金属ナノ粒子やナノワイヤの作製が必要とされ、これらの実現のためには、任意のタンパク質に任意の金属の導入が求められる。そのため、さまざまな金属をタンパク質に導入し、比較検討を行う事でタンパク質での金属析出機構の解明が進められている。

1-2 これまでのアポフェリチンへのバイオミネラリゼーションの研究

アポフェリチン内への酸化鉄の取り込み機構については、生体での鉄濃度の保持という本来の役割が必須の機能であるため、よく研究されている。自然界のフェリチンの鉄コアには、不純物としてリン酸を含み鉄コアの結晶成長を促す作用があるとされている¹⁰。アポフェリチンの三回対称チャネルは、アスパラギン酸とグルタミン酸の酸性アミノ酸が存在するため、親水性となっており、空洞内のマイナスチャージにより Fe(II) が引き込まれ、このチャネルを通して内部に入る。そして、内部に存在するマイナスチャージを持つアミノ酸の集まった鉄酸化活性中心において取り込んだ Fe(II) を Fe(III) に酸化した後、内部空洞内のマイナスチャージ領域で核形成を行いフェリハイドライト結晶にして貯蔵していることが明らかになっている^{11, 12}。

1-3 本研究の目的とその位置づけ

ナノ粒子、ナノワイヤを作製する方法は数多くあり、CVD 法、噴霧法、液相法、レーザー照射など、物理的・化学的な合成法が主流であるが、形状の制御と作製したナノ構造の選択的配置には、多大な労力が必要とされている。一方、タンパク質の内部空洞を用いたナノ粒子、ナノワイヤ作製には以下のような利点がある。大きさがテンプレートの大きさ以上には大きくなり、均一な形状のナノ構造の作製が可能であり、自己組織化能により二次元構造が容易に作製できる¹³⁻¹⁵。また、タンパク質に覆われているため、タンパク質の表面を利用した修飾により、新たな機能を付与し、特定の物質のみに吸着できるナノ粒子やナノ粒子の積層構造作製を可能にする¹⁶⁻¹⁸。また、ナノデバイスの素子としてだけでなく、ナノ粒子の周囲にタンパク質が存在するため、生体に優しいドラッグデリバリーシステムとしても応用できる。現在までに、がご状タンパク質アポフェリチンを用いて種々のナノ粒子の合成が行なわれており、ニッケル、インジウム、亜鉛などの酸化物や化合物半導体の内包が可能になっている¹⁹⁻²³。しかしながら、バイオミネラリゼーションのメカニズムは完全に解明されておらず、作りたいナノ粒子を作製することができず、作ることが可能なナノ粒子を作製して応用に用いているのが現状である。また、ナノデバイスなどの三次元構造物への応用を行なうためには、材料として大量のナノ粒子を必要とするため、テンプレートタンパク質への金属析出機構を知り、効率良く大量のナノ粒子の作製を行うことが求められる。

本研究では、フローティングゲートメモリのキーコンポーネントとしての電荷保持ナノドット作製のために、アポフェリチンの内部空洞を用いた酸化コバルトナノ粒子の作製と、今後、必要と見込まれるナノワイヤをチューブ状タンパク質・TMVを用いて作製を行った。そして、これらの実験から得られた知見を基に、タンパク質の持つ内部空洞への金属析出機構の解明を行うことを目的とした。

1-4 本論文の構成

第2章では、かご状タンパク質のアポフェリチン説明と安定性について述べた後、デバイス作製に向けた大量の半導体ナノ粒子作製のため、緩衝液を用いて行うアポフェリチン内部空洞での酸化コバルトナノ粒子作製条件の検討と、作製したナノ粒子の評価について述べる。

第3章では、外表面をポリエチレングリコールで修飾したアポフェリチンを用いて、酸化コバルトナノ粒子作製を行ない、ポリエチレングリコールの修飾効果について述べる。

第4章では、酸化コバルトナノ粒子作製の初期過程におけるメカニズムを紫外可視分光測定とラマン分光測定より述べ、第1～3章までの結果とあわせてミネラリゼーションの初期過程でアポフェリチン外表面において生じている現象について考察する。

第5章では、チューブ状タンパク質・TMVの内部空洞を用いたコバルト白金ナノワイヤ作製から、金属析出の初期過程の機構について考察を述べる。

第6章では、以上をまとめて結論とする。

第1章 参考文献

1. R. H. Dennard, *IEEE J. Solid-State Circuits*, 1974, SC-9, 5, 256.
2. International Technology Roadmap for Semiconductors 2006 update, ITRS, 2006.
3. K. Sugimoto, S. Kanamaru, K. Iwahori, F. Arisaka, I. Yamashita, *Angew. Chem.*, 2006, 4, 2725.
4. K. Sano, K. Shiba, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 14234.
5. I. Yamashita, *Thin Solid Films*, 2001, 393, 12.
6. T. Hikono, Y. Uraoka, T. Fuyuki, I. Yamashita, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 2003, 42, L398.
7. A. Miura, T. Hikono, T. Matsumura, H. Yano, T. Hatayama, Y. Uraoka, T. Fuyuki, S. Yoshii, I. Yamashita, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 2006, 45, L1.
8. A. Miura, Y. Uraoka, T. Fuyuki, S. Yoshii, I. Yamashita, 2008, *J. Appl. Phys.*, 103, 074503.
9. A. Miura, R. Tsukamoto, S. Yoshii, I. Yamashita, Y. Uraoka, T. Fuyuki, *Nanotechnology*, 2008, 19, 255201.
10. A. Treffry, P. M. Harrison, M. I. Cleton, W. C. DeBruijn, S. Mann, J. Inorg. Biochem., 1987, 31, 1.
11. H. A. Hosein, D. R. Strongin, M. Allen, T. Douglas, *Langmuir*, 2004, 20, 10283.
12. T. Douglas, R. P. Ripoll, *Protein Science*, 1998, 7, 1083.
13. R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckman, K. H. Downing, *J. Mol. Biol.*, 1990, 213, 899.
14. T. Furuno, H. Sasabe, K. M. Ulmer, *Thin Solid Films*, 1989, 180, 23.
15. A. Sato, T. Furuno, C. Toyoshima, H. Sasabe, *Biochim. et. Biophys. Acta.*, 1993, 1162, 54.
16. T. Matsui, N. Matsukawa, K. Iwahori, K. Sano, K. Shiba, I. Yamashita, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 2007, 46, L713.
17. K. Sano, S. Yoshii, I. Yamashita, K. Shiba, *Nano Lett.*, 2007, 7, 10, 3200.
18. I. Yamashita, H. Kirimura, M. Okuda, N. Nishio, K. Sano, K. Shiba, T. Hayashi, M. Hara, Y. Mishima, *Small*, 2006, 2, 10, 1148.
19. I. Yamashita, J. Hayashi, M. Hara, *Chem. Lett.*, 2004, 33, 1158.
20. M. Okuda, K. Iwahori, I. Yamashita, H. Yoshimura, *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, 84, 187.
21. K. Iwahori, K. Yoshizawa, M. Muraoka, I. Yamashita, *Inorg. Chem.*, 2005, 44, 6393.

22. M. Okuda, H. Yoshimura, K. Iwahori, I. Yamashita, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, 2005, 873E.
23. K. Yoshizawa, K. Iwahori, K. Sugimoto, I. Yamashita, *Chemi. Lett.*, 2006, 35, 10, 1192.

第2章 アポフェリチンを用いた酸化コバルトナノ粒子作製

2-1 はじめに

現在までに、モンタナ大学の Douglas 博士らにより、アポフェリチンへの酸化コバルトナノ粒子の作製が報告されている。その方法は、NaOH を使って pH を一定に調整しつつ、コバルトイオンと過酸化水素水を同時に少量ずつマイクロシリンジを使って添加する方法で¹、大量の酸化コバルトナノ粒子の作製には不向きである。更に、この方法の問題点としては、コバルトイオンを添加することで反応溶液の pH に変化が起こり、アポフェリチンが水酸化コバルトを内包することが挙げられる。一方、反応溶液の加熱温度を調整することで、異なる結晶形の酸化コバルトができる利点も報告されている。

山下らは、「バイオナノプロセス」によるフローティングナノドットメモリ実現のために、アポフェリチンを用いて半導体の酸化コバルトナノ粒子を作製し、ナノデバイスのキーコンポーネントであるナノドット配列を作製することを目的としている^{2,3}。そのために、安定した物性を持つ、大量の酸化コバルトナノ粒子を作る必要がある。そこで、緩衝液を用いて pH を調整しながら、簡単に大量にアポフェリチンの空洞内に酸化コバルトナノ粒子を作製する方法の開発を目指した。

2-2 本研究で用いたアポフェリチン

2-2-1 アポフェリチンについて

フェリチンは、生物界に広く存在しているかご状タンパク質で、通常、生体内では、内部空洞にフェリハイドライト ($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) のコアを内包し、体内の鉄濃度を一定に保つように調節を行なっている^{4,5}。フェリチンは、1つのサブユニット(分子量約 20000)が 24 個自己集合し球状タンパク質を形成している。この空洞に鉄を内包しているものをフェリチン、空洞に鉄を持たないタンパク質をアポフェリチンと呼ぶ。本研究で用いたアポフェリチンは、主としてシグマ社から市販されているウマ脾臓由来のアポフェリチンである。この天然アポフェリチンは、直径約 12 nm、内部空洞直径約 7 nm で、サブユニットは、L 型サブユニットと H 型サブユニットの二種類で構成されている。模式図を図 2-1 に示す。H 型サブユニットと L 型サブユニットにはそれぞれ特徴があり、H 型サブユニットには鉄酸化活性中心が、L

型サブユニットにはカドミウム結合部位がある。鉄酸化活性部位とは内部空洞表面にマイナスチャージが集まっている部分であり、Fe(Ⅱ)をFe(Ⅲ)に酸化させる機能を持つ部位である。鉄イオンは、マイナスチャージを持つグルタミン酸とアスパラギン酸から成る三回対称チャネルを通過して空洞内部に入り、H型サブユニットに存在する鉄酸化部位にて酸化され空洞内の内側表面のマイナスチャージ領域で核形成を行って約4000～4500個の鉄イオンをフェリハイドライト ($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) の結晶として貯蔵している。カドミウム結合部位とは、二回対称部位に存在するアスパラギン酸とグルタミン酸がカドミウムイオンと塩橋を作り、アポフェリチン同士が二次元結晶を作る機能を持つ部位である⁶⁻⁸。この自己組織化能を用いることで、フェリチンの二次元結晶、すなわち大きさの揃ったナノ粒子の二次元配列を作製することが可能になる。

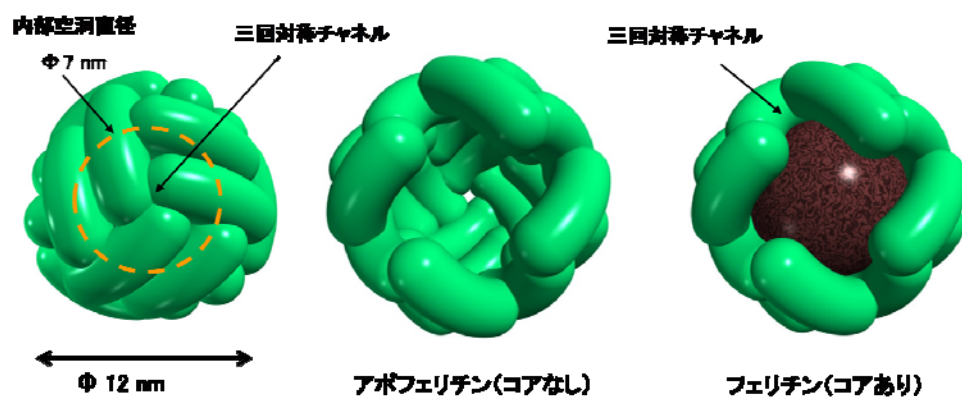


図 2-1 アポフェリチンとコア形成フェリチン模式図

(左) 全体像 (中) アポフェリチンの内部空洞 (右) 内部空洞にナノ粒子を形成したフェリチン

2-2-2 リコンビナントアポフェリチンについて

本研究では、一部にL型、H型リコンビナントアポフェリチンを使用した。L型、H型リコンビナントアポフェリチンとは、L型サブユニットのみ、もしくはH型サブユニットのみで構成されたアポフェリチンである。L型リコンビナントアポフェリチンでは、2種類のアポフェリチン(Fer0、Fer8)を使用した。このリコンビナントアポフェリチンは、ウマ肝臓フェリチンの遺伝子配列をプラスミド pMK2 に制限酵素サイトを用いて挿入して、大腸菌 (Nova Blue) を使って大量に作らせたものである⁹。

Fer8 は、サブユニットのアミノ酸の N 末端から 8 残基削ったもので、Fer0 は削っていないものである（図 2-2）。リコンビナントアポフェリチンは、N 末端が隣接するサブユニットと水素結合を作っているため、熱に強く安定な構造をしている。天然アポフェリチンのサブユニットの N 末端近傍の構造は N 末端より 1～5 残基目までが溶液中に露出し、不安定である。6～8 残基目は、アポフェリチンの外表面上に位置しており、近傍のサブユニットと水素結合を形成し 24 量体の安定な形成に関与しているとされている¹⁰。図 2-3 に天然アポフェリチンの X 線構造解析により明らかになった N 末端近傍の分子模型を示す。白い棒がアポフェリチンを構成するアミノ酸の主鎖で、赤色部分は 6～8 残基目、黄色部分は 1～5 残基目は不安定で動いているため、構造を決定できない。図 2-4 にリコンビナントアポフェリチン Fer0、Fer8 のアミノ酸配列とウマの H 型アポフェリチンの配列がまだ不明のため代わりにヒト H 型アポフェリチンのアミノ酸配列を示す。

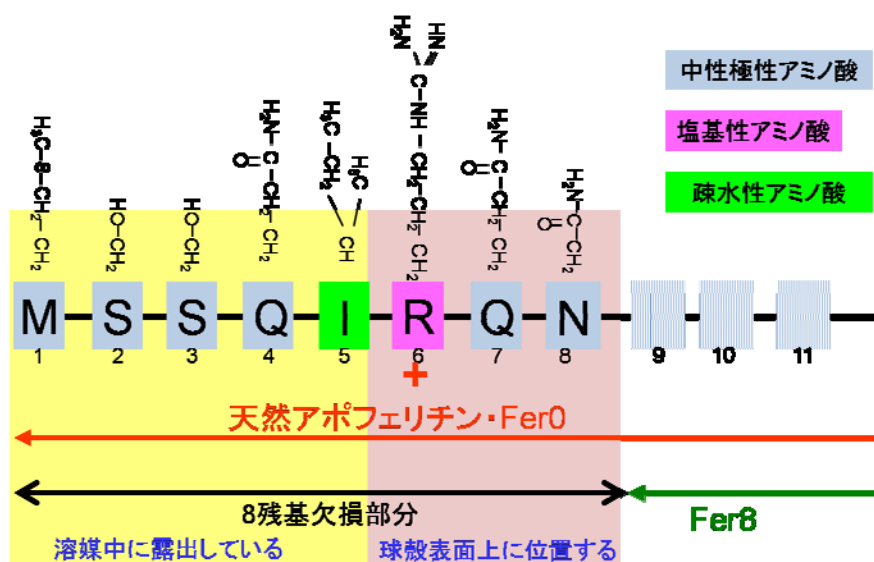
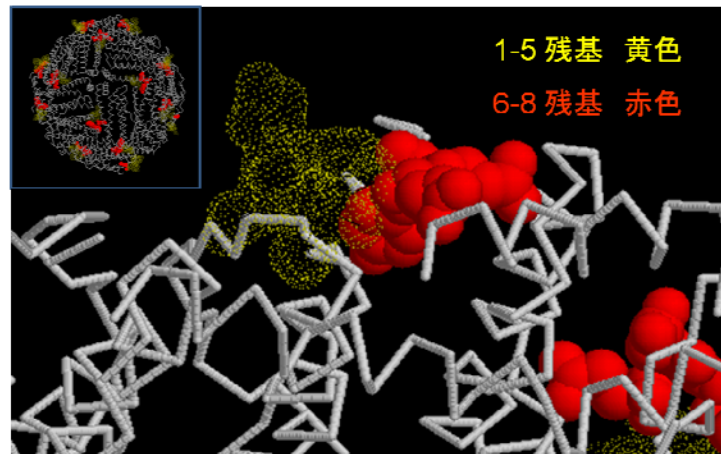


図2-2 天然アポフェリチンのLサブユニットとリコンビナントアポフェリチンのN末端のアミノ酸配列の比較



* N末端アミノ酸5残基は不安定

* 6残基目から8残基目まで24量体の形成に参与している

図 2-3 天然アポフェリチン N 末端近傍の分子模型

	1	31
Fer0	MISSQIRQNYSTEVAAVNRLVNLYLRASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVCHFFRELAEER	
Fer8	YS TEVEAAVNRLVNLYLRASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVCHFFRELAEER	
ヒト・H 型 アポフェリチン	MITTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYYYLSMSY YFDRDDVALK NFAKYFLHQS	
	61	91
Fer0	EGAERLLKMQNQRGGRALFQDLQKPSQDEN GTTPDAMKAA MLEKSLNQA LLDLHALGSA	
Fer8	EGAERLLKMQNQRGGRALFQDLQKPSQDEN GTTPDAMKAA MLEKSLNQA LLDLHALGSA	
ヒト・H 型 アポフェリチン	HEEREHAERL MQLQNRGGRIFLQDQKPD CDDWESGLNA MEGALHLEKN VNQSLLELHK	
	121	151
Fer0	QADPHLCDFLESHFLDEEVK LIKKMGDHLT NQRLVGSQA GLGEYLFERL TLKHD	
Fer8	QADPHLCDFLESHFLDEEVK LIKKMGDHLT NQRLVGSQA GLGEYLFERL TLKHD	
ヒト・H 型 アポフェリチン	LATDNDPHL CDFIETHYLN EQVKAKELG DHVTNLRKMG APESGLAEYL FDKHTLGDSQ NES	

図 2-4 リコンビナントアポフェリチン Fer0、Fer8、ヒト・H 型アポフェリチンのアミノ酸配列

<リコンビナントアポフェリチン作製方法>

1. 馬肝臓アポフェリチンの遺伝子配列をEcoR I とHindIIIの制限酵素を用いて切り出し、プラスミド pMK2 に挿入する。
2. 大腸菌 (Nova Blue) に馬肝臓プラスミドを入れ形質転換させる。
3. 大腸菌を LB 培地で約 16 時間培養する。
4. 菌体を集めて細胞膜を破碎し、60 °Cの加熱により、不溶なタンパク質を変性させ遠心処理により沈殿物を取り除く。

5. 遠心後の上澄み溶液を濃縮して、陰イオン交換カラム (Q-sepharose, GE ヘルスケアバイオサイエンス(株)/溶出バッファー: 50 mM Tris-HCl pH8.0 + 0~1M NaCl) にかけて、フェリチン画分を集める。
6. 集めたフェリチン画分を濃縮し、ゲル濾過カラム (Hiprep Sephacryl S300, GE ヘルスケアバイオサイエンス(株)/溶出バッファー: 50 mM Tris-HCl pH8.0 + 150 mM NaCl) にかけて、アポフェリチン部分を濃縮する。
7. 150 mM NaCl で置換し、4 °Cで保存する。

2-3 過酸化水素に対する安定性と熱安定性

本研究では酸化コバルトのナノ粒子合成を目指すため、合成温度を室温以上にしたり、過酸化水素水の添加を行う必要がある。タンパク質を用いる実験では、タンパク質の構造が不安定になったり、変性が起こる事を考慮し、生体内の温度以上の加熱は行わないのが一般的である。また、過酸化水素は不安定で酸素を放出しやすく、非常に強力な酸化力を持つヒドロキシラジカルを生成しやすい。このため、消毒剤や触媒としての工業的な応用が主であり、タンパク質を用いた実験には用いる事は一般的でない。アポフェリチンに酸化コバルト導入するための条件は、タンパク質にとっては苛酷な条件と予想され、アポフェリチンの変性が考えられる。そのため、熱と過酸化水素水に対する安定性をまず確認した。また、遺伝子操作を用いてN末端のアミノ酸を欠損させたリコンビナントアポフェリチン (Fer8) の熱安定性も調査した。

2-3-1 円偏光二色性測定による天然アポフェリチンの熱安定性測定

円偏光二色性測定は、測定試料の左右円偏光に対する吸収の違いを利用した光学的な測定方法であり、分子の立体構造を決定する有力な測定法のひとつである。タンパク質の円偏光二色性測定では、二次構造の α ヘリックスと β シートから特徴的なスペクトルが得られる。特に α ヘリックスは208 nmと222 nmに特徴的な吸収を持つことが知られている。アポフェリチンのサブユニットはすでにX線構造解析により90%以上が α ヘリックス構造で構成されていることが分かっており、実際に、アポフェリチンの吸収スペクトルは α ヘリックスのものとほぼ同じプロファイルが

得られる。このプロファイルの変化を追うことで、アポフェリチンの二次構造の安定性を調べることができる。

150 mM NaCl に天然アポフェリチンを混合した溶液を各 20 °C から 90 °C まで加熱を行い、それぞれの 190 nm から 260 nm の円偏光二色性スペクトルを測定した。結果を図 2-5 に示す。20 °C から 40 °C までのスペクトルでは、プロファイルに変化は見られなかったが、50 °C 以上で大きな変化が見られる。この結果は、50 °C 以上の加熱で α ヘリックスの構造が壊れ、アポフェリチンの二次構造が壊れていることを示している。リコンビナントアポフェリチン Fer8 の円偏光二色性測定は、松下電器産業株式会社 西尾和晃博士らにより行われている。図 2-6 に測定スペクトルを示す。Fer8 は、90 °C の加熱を行ってもプロファイルに変化が見られず、二次構造を保っていることが分かる。

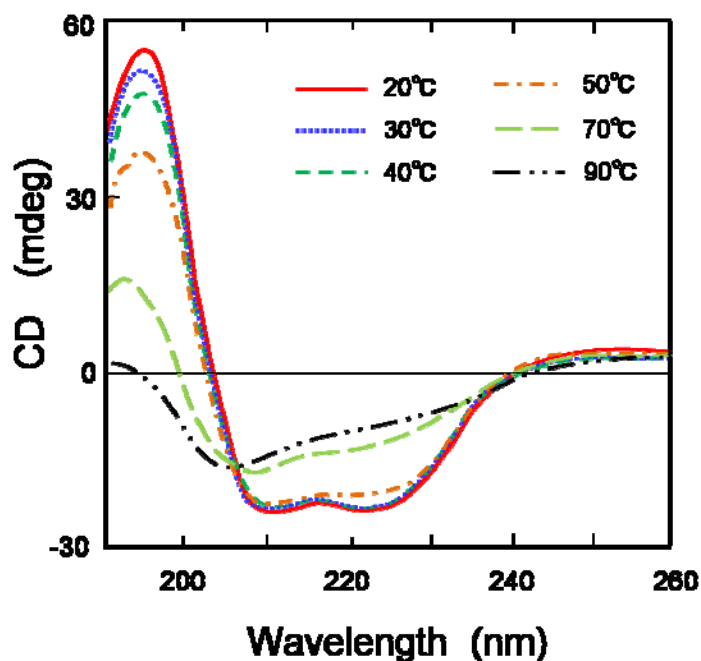


図 2-5 天然アポフェリチンの円偏光二色性スペクトル

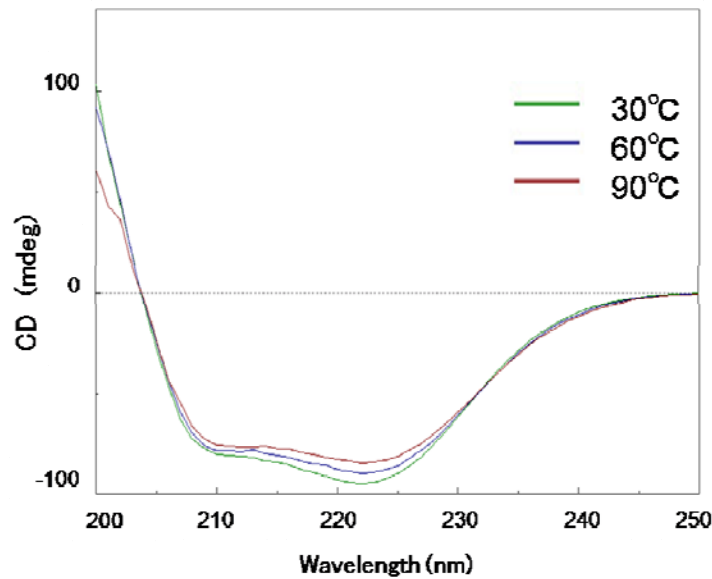


図 2-6 Fer8 の円偏光二色性スペクトル（測定：松下電器産業株式会社 西尾和晃博士）

<実験方法>

天然アポフェリチンを 150 mM NaCl に置換し、20 °C から 90 °C の溶液条件で 190 nm から 260 nm の偏光を測定した。

<測定手順>

1. 透析膜を使用して天然アポフェリチン 150 mM NaCl に置換する
2. 280 nm 吸光度が約 0.2 になるように天然アポフェリチンの濃度を調整する
3. 石英セルに封入し、空気を抜くために軽く脱気する
4. 温度制御装置により 20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、70 °C、90 °C に溶液温度を調整する。
5. 加熱温度に到達したのを確認後、190 nm～260 nm の偏光を測定する。

<測定条件>

測定サンプル：天然アポフェリチン

測定装置：Jasco-J720 （日本分光）

測定雰囲気：窒素雰囲気

測定波長：190～260 nm

測定温度：20 °C から 90 °C （10 °C 刻み）

2-3-2 示差走査熱量計による天然アポフェリチンとリコンビナントアポフェリチンの熱安定性測定

先に行った円偏光二色性測定では、アポフェリチンの二次構造の安定性に関する知見を得ることができた。アポフェリチンの二次構造というのは、ペプチドの折りたたみ構造のことであり、アポフェリチンの場合は、 α ヘリックス構造が90%以上を占めている。この α ヘリックスの二次構造が折りたたまれて、三次構造のサブユニットを形成している。さらに三次構造のサブユニットが24個自己集合することにより、四次構造であるアポフェリチン1個を形成している。 α ヘリックスの崩壊はアポフェリチンの24量体を構成するサブユニットの構造変化、すなわちサブユニットの乖離による球殻構造の崩壊を示唆するが、直接的な証拠とはならない。そこで、四次構造の崩壊、各サブユニットの乖離・安定性について示差走査熱量計で検討を行った。示差走査熱量計は、試料セルと参照セルを同時に一定速度で昇温させ参照セルとの熱量の入力差を測定する装置で、加熱や冷却による物理的変化や化学的変化を検出する装置である。本研究においては、アポフェリチンが変性する時に生じる熱容量の変化からアポフェリチンの熱安定性を評価した。

測定試料は、天然アポフェリチンと、L型サブユニットのみで構成されたアポフェリチンの表面付近のN末端のアミノ酸を、遺伝子操作を用いて欠損させたリコンビナントアポフェリチン Fer0、Fer8 と H型サブユニットのみで形成された H-アポフェリチンである。

図 2-7 に天然アポフェリチンとリコンビナントアポフェリチンの示差走査熱量計による測定結果を示す。横軸が温度、縦軸が変性に伴う吸熱反応の熱量を示している。天然アポフェリチンでは、50～60℃付近より吸熱反応を示し、熱変性が始まっている。しかし、L型サブユニットのみでできているリコンビナントアポフェリチン Fer0 では100℃付近まで、Fer8 では、90℃付近まで吸熱反応はみられず、熱変性は起こらないことが分かる。円偏光二色性測定の結果と合わせて考えると、アポフェリチンの α ヘリックスである二次構造が崩れる温度と24量体の四次構造が壊れる温度は、ほぼ同じであることが分かる。Fer8 はL型サブユニットのみから構成されているのに対し、天然アポフェリチンは、H型サブユニットとL型サブユニットの混合である。ヘテロな天然アポフェリチンのみが熱に対して弱いことより、H型サブユニットとL型サブユニット同士の結合の境目でひずみが生じ、水素結合が不完全になり、弱くなっている可能性が考えられる。また、アミノ酸のN末端から8残基欠損した Fer8 よりもアミノ酸を削っていない Fer0の方が、より高温の条件でも安定性を示したことは、アポフェリチンの外表面に露出している8残基は、ア

ポフェリチンの四次構造の安定化に寄与しているためと考えられる。アポフェリチンのサブユニットはダイマーを形成して、このダイマーが12個集まり、24量体を形成しているが、慶澤らの研究により、Fer0は、ダイマー間で水素結合を4つ持ち、隣のダイマーとの間にも水素結合を5つ持っているが、N末端の8残基を欠損することにより（Fer8）、ダイマー間の水素結合を2つ失い、隣接するダイマーとの水素結合が無くなり、四次構造が不安定になる事が示されている（図2-8）¹⁰。アポフェリチンでは、N末端に存在する隣接するサブユニットとの水素結合が熱安定性に大きく寄与しており、この水素結合が切れて四次構造が崩れると同時に二次構造も崩れると考えられる。円偏光二色性測定の結果と示差走査熱量計の測定結果から、天然アポフェリチンへの酸化コバルト導入実験では、50℃以上の加熱はできないことが明らかになった。

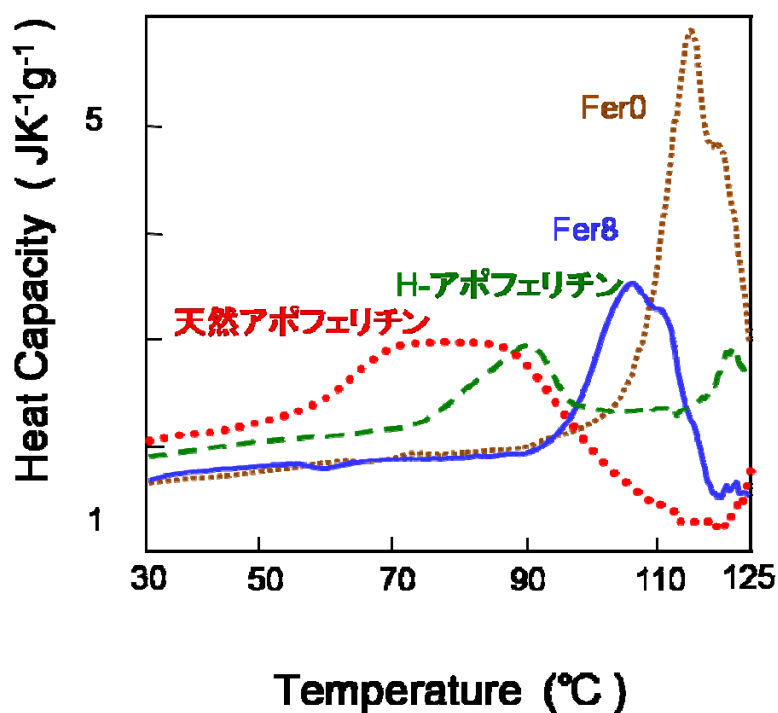


図 2-7 各アポフェリチンの示差走査熱量計での測定結果

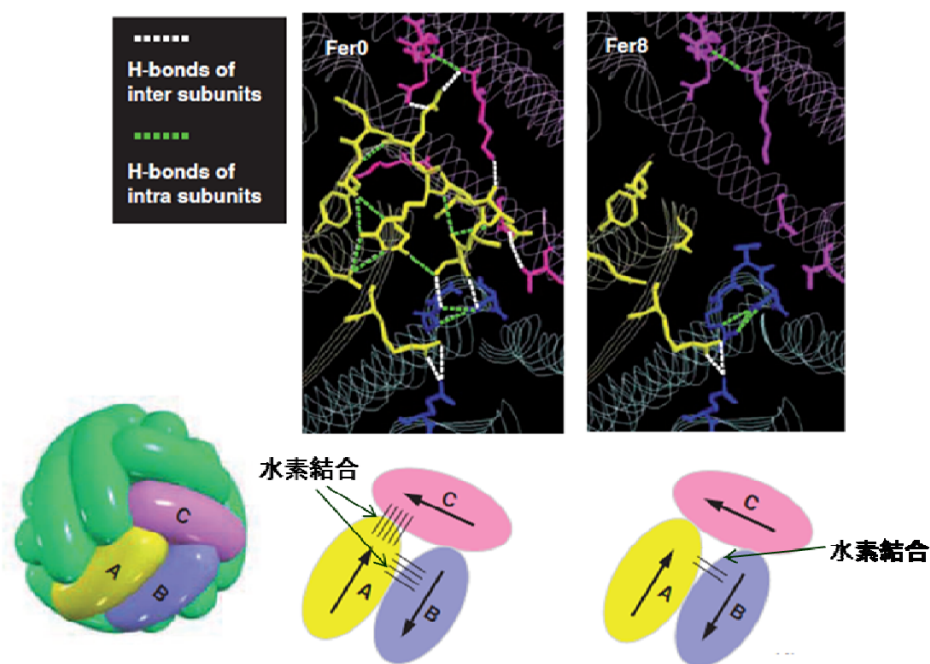


図 2-8 リコンビナントアポフェリチン Fer0 と Fer8 の N 末端の構造
 (サブユニット A とサブユニット B でダイマーを形成している。サブユニット C は隣接するサブユニット Fer8 ではサブユニット A と B の間に水素結合が存在するが、サブユニット C と A、サブユニット C と B 間には水素結合が無い)
 (上) N 末端付近のアミノ酸側鎖、点線は水素結合を示す (下) サブユニット間の水素結合の様子 黄色、青色、ピンク色はそれぞれのサブユニットに対応する

<実験方法>

各サンプルを 150 mM NaCl に置換し、3 mg/ml に調整した。1 ml のサンプルを試料セルに、150 mM NaCl を基準物質セルに入れ測定した。

<手順>

1. 天然アポフェリチン、又はリコンビナントアポフェリチンを透析膜を使用して 150 mM NaCl に置換する。
2. タンパク質濃度が 3 mg/ml になるように調節する。
3. 1 ml のサンプルを試料セルに、150 mM NaCl を基準物質セルに入れ測定を行う。

測定サンプル：

- ① Fer0・・・・・・N 末端を削っていない。L 型サブユニットのみで形成
- ② Fer8・・・・・・N 末端から 8 残基が欠損。L 型サブユニットのみで形成
- ③ H-fer・・・・・・H 型サブユニットのみで形成

- ④ 天然アポフェリチン・・・N末端を削っていない。H型サブユニットとL型サブユニットの混合

<測定条件>

測定装置：Nano DSC II 6100 CSC, (Calorimetry Sciences Corp)

測定条件：30～125 °C, 1 °C/min の昇温

参照溶液：150 mM NaCl

2-3-3 天然アポフェリチンの過酸化水素水に対する安定性

本研究では、酸化コバルトの作製には加熱条件だけでなく、Co(II)をCo(III)に酸化するため、過酸化水素水の添加を行う。そのため、過酸化水素水に対するアポフェリチンの24量体の安定性についてもあらかじめ調べる必要がある。0.5 mg/mlの天然アポフェリチンに過酸化水素水を3 mMまで添加し約5分後、ゲルろ過カラムを用いてアポフェリチンの四次構造が崩れているかを確認した液体クロマトグラフチャートを図2-9に示す。

溶出溶媒量 10.5 ml 付近に見られるピークは天然アポフェリチン(24量体)のモノマー、それよりも少ない溶出溶媒量で観測されたピークは天然アポフェリチンが2個から3個凝集したダイマーやトライマーである。溶出溶媒量 10.5 ml 以上で見られるピークはアポフェリチンよりも小さな体積を持つものである。購入アポフェリチンにおける液体クロマトグラフィーでもこのようなピークが見られるため、購入したアポフェリチン溶液に含まれていたものと考えられ、アポフェリチンを形成するサブユニットが乖離・分解したもの、又は元々混在している不純物であると考えられる。

天然アポフェリチンに1.5 mM過酸化水素水を添加したサンプルのピーク形状と天然アポフェリチンのみのチャートの形状には大きな変化は見られず、アポフェリチンが乖離・分解し体積が小さくなったものの確認はできなかった。更に、天然アポフェリチンに3 mM過酸化水素水を添加したものでも、ピーク形状に変化は見られず、天然アポフェリチンの四次構造が壊れた様子は見られなかった。データには示さないが、天然アポフェリチンに6 mMまで過酸化水素水を添加した溶液を調べたが、四次構造の崩れた様子は見られなかった。

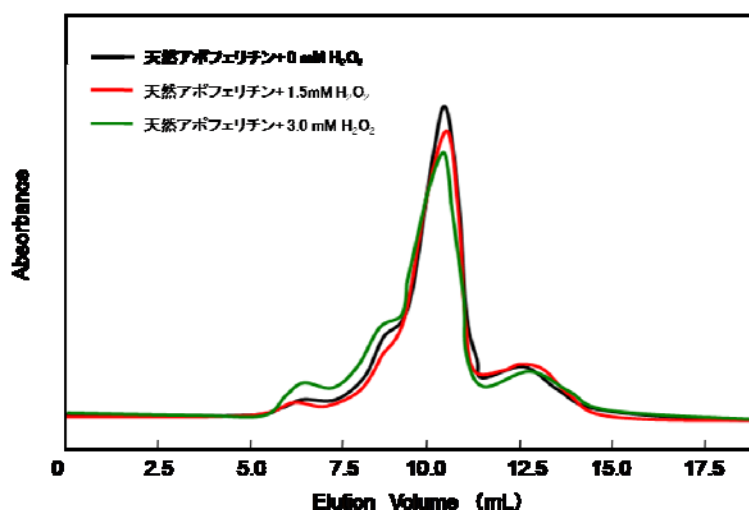


図 2-9 天然アポフェリチンに過酸化水素水を添加した溶液のゲル濾過クロマトグラフチャート

(黒)天然アポフェリチンのみ (赤) 天然アポフェリチンに 1.5 mM 過酸化水素水添加 (緑) 天然アポフェリチンに 3 mM 過酸化水素水添加

<実験方法>

0.5 mg/ml の天然アポフェリチンに過酸化水素水を 0-3 mM まで添加し、ゲルろ過クロマトグラフの測定を行った。

<測定手順>

1. 50 mM Tris (pH8.0) に 0.5 mg/ml の天然アポフェリチンを添加する。
2. 過酸化水素水を 0~3 mM まで添加する。
3. 約 5 分後、平衡化が済みの SW4000 ゲルろ過カラムを用いて測定する。
4. 溶出ピークを確認する。

<測定条件>

測定サンプル：天然アポフェリチンのみ、天然アポフェリチンに 1.5 mM 過酸化水素添加溶液、天然アポフェリチンに 3 mM 過酸化水素添加溶液

測定装置：HPLC システム (日立)

使用カラム：TSKgel G4000SWXL PEEK (東ソー)

流速：1 ml/min

溶出バッファー：50 mM Tris (pH8.0)

2-4 アポフェリチンへの酸化コバルト導入実験に用いる緩衝液の探索

アポフェリチンによる酸化コバルトのナノ粒子合成では、コバルトイオンが錯イオンを形成しやすいことが予想された。

2 価のコバルトイオンは水に溶解した場合、コバルトの周囲に 6 個の水を配位した 6 配位 8 面体構造を形成する。この水和コバルト (図 2-10) は、2 価の錯体で、ピンク色を呈し、構造は非常に安定で、室温で放置しても変化を起こさない。この構造は、一般的に良く知られているシリカゲルのインジケータの青色ゲルが吸湿したときと同じものである。しかし、この水和コバルトに官能基を持つ物質が近づくと、分子はコバルトイオンに配位結合した状態になり、高い安定化状態を形成する。そのため、過酸化水素水によるコバルトイオンの酸化を行うことができなくなる。

以上の理由から、アポフェリチンへの酸化コバルト導入で用いる反応溶液は、コバルトイオンと強く錯形成を起こすものは避け、効率良くアポフェリチンの内部空洞内に金属を析出させる条件を持つものを使用する必要がある¹¹⁻¹⁴。これらの状況をふまえて使用する緩衝液の選択を行った。検討を行う緩衝液としては中性から弱アルカリ性で反応溶液の調整を行うことを考慮して、Tris、Bis-Tris、TES、phosphate、CHES、MOPS、HEPES を選択した (表 2-1) 図 2-11 は、各緩衝液を用い、0.5 mg/ml 天然アポフェリチンを添加した条件下でのコバルトイオンを添加後、過酸化水素水を添加して 50 °C・一晩インキュベート後の反応溶液状態を示している。

Tris	tris-(hydroxymethyl) aminomethane
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methane
TES	N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid
CHES	N-Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid
MOPS	3-Morpholinopropanesulfonic acid
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
Phosphate Buffer	Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄

表 2-1 検討を行った緩衝液

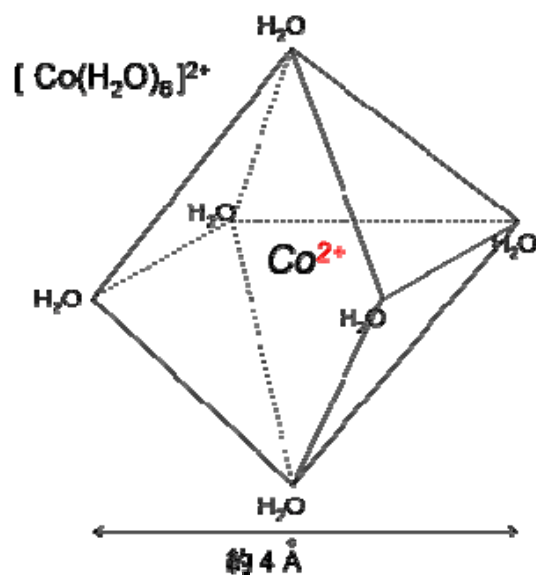


図 2-10 水和コバルトの構造

	Co ²⁺ 添加後	H ₂ O ₂ 添加後	50℃一晩放置後
Tris			
TES			
Bis-Tris			
Phosphate			
CHES			
MOPS			
HEPES			

0.5mg/ml アポフェリチン添加済

図 2-11 各緩衝液の溶液状態 (0.5 mg/ml 天然アポフェリチン添加)

(左) コバルトイオンを添加した溶液 (中) コバルトイオンと過酸化水素水を添加した溶液 (右) コバルトイオンと過酸化水素水を添加し 50℃で一晩インキュベート後の溶液

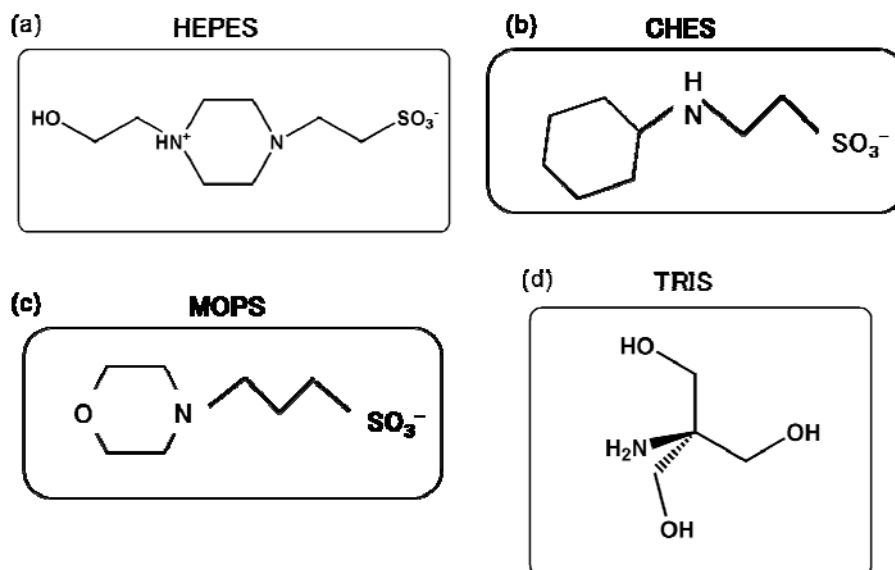


図 2-12 各緩衝剤の構造

Tris、TES、Bis-Tris では、コバルトイオンと混合すると緩衝液の構成成分と速やかに錯体を形成し、青や紫のコバルト錯体独特の色を呈している。これらの溶液に過酸化水素水を添加しても、緩衝液の構成分子が外れることはなく、コバルトイオンと緩衝液の結合したものをから酸化を進めることができない。リン酸バッファーはリン酸とコバルトが結合して不溶性のリン酸コバルト $\text{Co}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ となり紫色の沈殿を形成する¹⁵。HEPES、CHES、MOPS（図 2-12）は直鎖状で官能基を 1～2 つしか持たないので、強くコバルトイオンと配位することはない、過酸化水素水による酸化反応を進めることが可能である¹⁶⁻¹⁷。HEPES、MOPS、CHES では、緩衝液との混合のみでは変化を示さず（図 2-11 左）、過酸化水素水の添加により酸化され、コバルトイオンの配位状態に変化がみられる（図 2-11 中央）。この過酸化水素水を添加した試料はコア形成していないが、50 °Cで一晩インキュベートした試料（図 2-11 右）では、コア形成が確認できた。HEPES（最適 pH 範囲 pH6.8～8.2）、MOPS（最適 pH 範囲 pH6.5～7.9）、CHES（最適 pH 範囲 pH8.6～10.0）のうち中性から弱アルカリ性で緩衝能を持つ HEPES をアポフェリチンへのコバルト導入実験の溶液として用いることにし、以降の実験を進めた。

<実験方法>

各種緩衝液に 0.5 mg/ml 天然アポフェリチン、37.5 mM 硫酸アンモニウム、3 mM 硫酸アンモニウムコバルトと 1.5 mM の過酸化水素水の添加を行い、室温で約 20 分インキュベート後の溶液と 50 °Cで一晩インキュベートの溶液状態を観察した。

<実験手順>

1. 各緩衝液（pH8.3）に 0.5 mg/ml 天然アポフェリチン、37.5 mM 硫酸アンモニウム、3 mM 硫酸アンモニウムコバルトを添加する。
2. 溶液状態を観察する。
3. 1.5 mM の過酸化水素水の添加を行いコバルトイオンの酸化を行う。
4. 20 分後の溶液状態を観察する
5. コバルトイオンは非常に安定とされるため、酸化の促進を目的として 50 °Cで一晩の加熱を行う。
6. 溶液状態を観察する。

<実験条件>

検討緩衝液：Tris、Bis-Tris、TES、phosphate、CHES、MOPS、HEPES

緩衝液 pH：pH 8.3

溶液濃度：0.5 mg/ml 天然アポフェリチン、37.5 mM 硫酸アンモニウム、3 mM 硫酸アンモニウムコバルト、1.5 mM の過酸化水素水

2-5 透過型電子顕微鏡観察とコア形成率について

アポフェリチンへの酸化コバルト導入の評価方法として透過型電子顕微鏡での観察から算出されるコア形成率を採用した。アポフェリチンは、透過型電子顕微鏡の負染色法では、白い像として観察でき、形成されたナノ粒子は、電子線を通さないため、黒いドットとして確認できる。透過型電子顕微鏡観察でのタンパク質染色には、酢酸ウラニル染色を用いるのが一般的であるが、アポフェリチンを染色すると、染色液がアポフェリチンの空洞内部まで入り、コア形成の有無が確認できない。そのため、アポフェリチンの内部空洞へ通じるチャネルの 3 オングストロームよりも大きな分子を持つ金グルコースを染色液に用いている¹⁸。金グルコースは、透過型電子顕微鏡観察時に電子線を照射することで金を析出する。そのため、電子顕微鏡像には金ナノ粒子が観察され、バックグラウンドが荒くなる現象がみられる。コア形成率とは、一枚の透過型電子顕微鏡像に写っている全てのフェリチン（アポフェリチンとコア形成したフェリチン）を数え、そのうち何パーセントがコア形成していたかを示す値で、約 500 個のフェリチン（アポフェリチン含む）を数えて求めている。

$$\text{コア形成率} = \frac{\text{コア形成フェリチンの個数}}{\text{全てのフェリチンの個数(アポフェリチン+コア形成フェリチン)}} \times 100$$

<透過型電子顕微鏡観察サンプル作製方法>

観察用グリッドは銅メッシュ基板にカーボン支持膜を30～50 nm堆積させたもので、サンプル作製前に親水化処理を行ったものを用いた。1 %金グルコースを用いて染色を行った。

<透過型電子顕微鏡観察サンプル作製手順>

1. カーボンコートした TEM グリッドを親水化処理する。
2. サンプルを4 μ l 載せて1分後濾紙で吸い取る
3. 1%金グルコースを4 μ l を載せて、1分後濾紙で吸い取る。
4. 自然乾燥させ、透過型電子顕微鏡で観察する。

<測定条件>

測定装置： 透過型電子顕微鏡 JEM1010, JEM2200FS (日本電子)

加速電圧：100 kV、200 kV

染色液：1%金グルコース

2-6 最適溶液条件の探索

前節で緩衝液検討の結果、アポフェリチンへの酸化コバルト導入に使用する緩衝液が決定できた。次に、反応溶液の pH とコバルト濃度の最適溶液条件を探索して決定した。

アポフェリチン内部空洞への酸化コバルト導入では、内部空洞での酸化コバルト析出と溶液側での沈殿形成反応の競合が生じる。しかし、反応条件を整える事で、フェリチンの内部空洞でのコア形成を優先的に起こすことができると考えられる。すなわち、不溶性のコバルト酸化物を形成する化学反応がアポフェリチンの空洞内と空洞の外の溶液側で生じるが、アポフェリチンの内部空洞のマイナスチャージを持つアミノ酸の作る静電的ポテンシャルによるコバルトイオンの濃縮や核形成能などを利用することで、内部空洞での酸化コバルトの析出が優勢になる条件を作り出すことができる。アポフェリチンの内部空洞での析出を、反応溶液側で生じる析出よりも早く起こし、溶液側での沈殿形成を抑えることでコア形成したフェリチンを多く回収することができると考えられる。この想定される様子を図 2-13 に模式図で示した。

まず、pH に関して予想されるのは、pH が低い場合は、コバルトイオンの酸化反応は穏やかで、アポフェリチンの内部空洞でのコア形成が十分でない。また、pH が高すぎるコバルトイオンの酸化反応が速く進み、アポフェリチンの空洞内だけの優先

的な酸化反応だけでなく、溶液側での沈殿形成も進み、その結果、コア形成はしているものの沈殿に巻き込まれてしまうアポフェリチンが増加する。すなわち、適当な pH を選択することで、上澄みに残存する多くのコア形成フェリチンの回収が可能になる。コバルトイオン濃度も同様に、アポフェリチンの内部空洞での酸化コバルトナノ粒子の形成と上澄みに残存するコア形成フェリチンの濃度に影響を与える。コバルト濃度が低い時は、空洞内でコア形成するための材料であるコバルトイオンが不足するため、コア形成率は低い。コバルト濃度が高すぎると、コバルトイオンが過剰に存在するため、空洞に入る速度よりも溶液側での沈殿形成反応の速度が速くなり、沈殿に巻き込まれてコア形成したフェリチンとアポフェリチンが供沈する。

そこで、コア形成率は高く、溶液側での沈殿形成が少なく、上澄みに多くのコア形成フェリチンが残存する最適溶液条件（pH およびコバルトイオン濃度）を探索した。

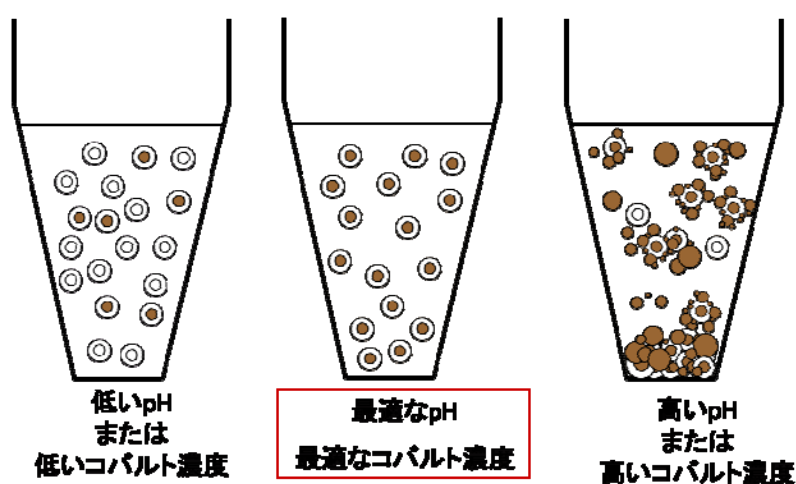


図 2-13 アポフェリチンへの酸化コバルト導入の最適溶液状態の模式図

はじめに予備実験として、アポフェリチンの内部空洞で酸化コバルトナノ粒子が形成される時に必要とするコバルト原子数の理論値、酸化反応の pH 依存性を考慮して、100 mM HEPES (pH7~8.6) に、37.5 mM 硫酸ナトリウムと 0.5 mg/ml 天然アポフェリチンを混合し、2~4 mM 硫酸アンモニウムコバルト、コバルト濃度の半分濃度の過酸化水素水を加え、50 °C で一晩インキュベートする実験を行った。目視による溶液の変化は図 2-13 で予想された通り、pH8.0 より低い pH では反応が極めて遅く、pH8.6 より高いと溶液側で沈殿反応が速く、上澄みは透明となった。また、コバルト濃度 2 mM 以下 では、コバルトイオンの酸化による溶液の色の変化は少なく、5 mM

以上では、全ての pH で溶液側での沈殿を形成した。以上の予備実験の結果、pH8.0～8.6 に最適点があると判断される。

以下では、この pH8.0～8.6、コバルトイオン濃度 2～4 mM の範囲で、透過型電子顕微鏡によるコア形成率と上澄みに残存するフェリチン濃度を測定して詳細を検討し、pH とコバルトイオン濃度の最適溶液条件を決定した。

まず、50 °Cで一晩インキュベートした後の反応溶液状態の写真を図 2-14 に示す。予備実験でも記述したが、pH が低く、コバルトイオン濃度が低い場合は反応が遅く、コバルトイオンの酸化に伴う溶液の色の変化もわずかである。一方、pH が高く、コバルトイオン濃度が高い場合では沈殿が激しく、溶液は透明になっている。

次に、それぞれの溶液を透過型電子顕微鏡で観察を行い、コア形成率を計算した。コア形成率は、透過電子顕微鏡像の一枚の写真に写っている全フェリチンのうちの何パーセントがナノ粒子を形成しているかを示す値である。図 2-15 に典型的なアポフェリチンの内部空洞で作製した酸化コバルトナノ粒子の透過型電子顕微鏡像を示す。白く見える部分が天然アポフェリチンのタンパク質部分で、その中に見られる黒いドットが作製した酸化コバルトナノ粒子である。天然アポフェリチンの内部空洞以上の大きさを持つ粒子は見られず、天然アポフェリチンの内部空洞を反応場としたナノ粒子が形成できた。染色液に金グルコースを用いているため、電子線の照射により金ナノ粒子析出し、電子顕微鏡像のバックグラウンドが荒くなっている現象が観察された。

コア形成は、pH8.6・コバルトイオン濃度 4 mM を除き確認できた。2 mM コバルト濃度では、コア形成率は最高でも 33% (pH8.4) であり全体的に低い値である。これはアポフェリチンの空洞に形成される酸化コバルトコアを形成するのに十分な量のコバルトイオンが存在しないことと、酸化反応そのものも遅くなっているためと考えられる。4 mM のコバルトイオン濃度は、pH8.0、8.2 では、コア形成率が予想通りコバルトイオンの増加に伴い増加した。しかしながら pH8.3、8.4 ではコア形成率はコバルトイオン濃度 3 mM とほとんど変わらない。このことはコバルトイオン濃度が 3 mM あればほぼ全てのフェリチンにコア形成ができることを示唆している。また、pH が高い pH8.6 では、溶液での沈殿形成が速く、フェリチンが上澄みに見られなくなる。以上から判断して、コバルト濃度は 0.5 mg/ml のアポフェリチン濃度に対して 3 mM が最適と判断される。アポフェリチン 1 個の内部空洞に入るコバルトイオンは約 2000～3000 個とされており、天然アポフェリチンの添加量 1 μ M (0.5 mg/ml) に対し、最適コバルトイオン量が 3 mM という値は、予想されるコバルトイオン量と一致する結果であった。

次に最適 pH の検討を行った。図 2-16 に最適コバルト濃度である 3 mM の使用時のコア形成率、上澄みに残存するフェリチン濃度、回収可能なコア形成フェリチン濃度の pH 依存性を示す。コア形成率は pH が高くなるにつれて上昇する。上澄みに残存するフェリチン濃度は pH8.2 までは、約 0.35 mg/ml（初期添加量は 0.5 mg/ml）で、およそ 70% のアポフェリチンを回収することができた。しかし、pH 8.2 以降は上澄みに残存するフェリチン濃度は徐々に減少し、pH8.6 では、約 0.05 mg/ml となり、およそ 10% の回収率になった。この現象は、アポフェリチンの空洞での析出と溶液側での沈殿形成のバランスが pH8.2 付近から崩れ始め、アポフェリチンの空洞での析出速度より、溶液側での沈殿形成の速度が上回り共沈している状態を示す。一方、コア形成率は pH8.4 まで徐々に上がり続けているため、pH8.4 で生じた沈殿にはコア形成したフェリチンが多く含まれていると考えられる。

pH8.4 のコア形成が 100% であるが、pH8.6 では 86% に下がる現象は、アポフェリチンの空洞での析出が始まる前に溶液側での沈殿形成反応が起こり、コア形成に利用するコバルトイオンが無くなるためであると考えられる。この時の沈殿には空洞内での析出を起こすことができなかったコアを形成していないアポフェリチンが多いと考えられる。

これらの結果から、アポフェリチンへのコバルト導入最適溶液条件は、天然アポフェリチン 0.5 mg/ml、コバルトイオン濃度 3 mM、100 mM HEPES (pH8.3) と決定した。天然アポフェリチンへの酸化コバルト導入最適溶液条件を図 2-17 に示す。

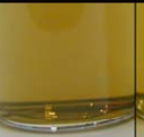
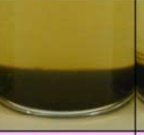
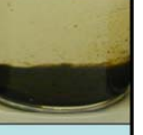
	pH8.0	pH8.2	pH8.3	pH8.4	pH8.6
2.0mM Co					
コア形成率	2%	7%	25%	33%	12%
3.0mM Co					
コア形成率	15%	45%	94%	100%	86%
4.0mM Co					
コア形成率	55%	84%	86%	100%	—

図 2-14 50 °C ・ 一晚インキュベート後の溶液状態

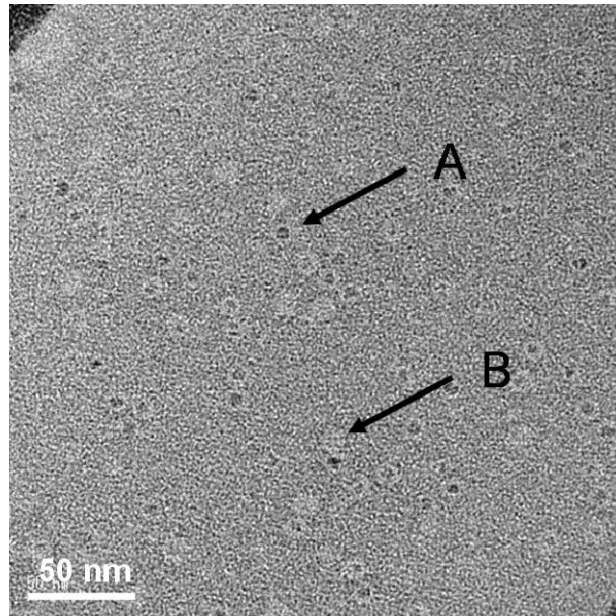


図 2-15 天然アポフェリチンの内部空洞に形成した酸化コバルトナノ粒子の透過型電子顕微鏡像 染色：1%金グルコース
矢印 A 酸化コバルトナノ粒子を形成したフェリチン、矢印 B アポフェリチン

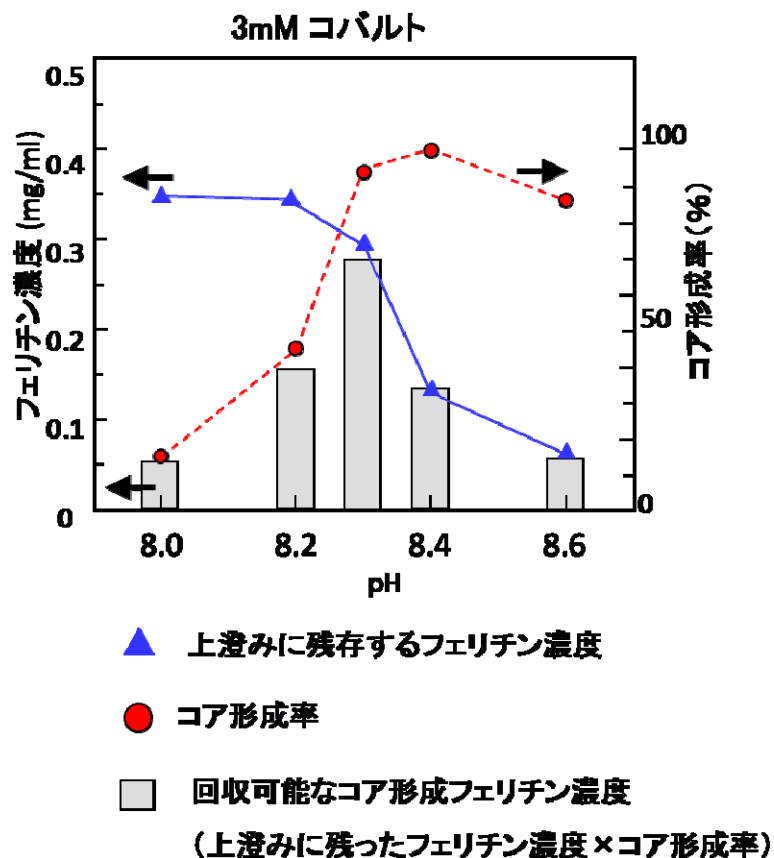


図 2-16 コバルト濃度 3 mM での pH 依存性
(右縦軸) フェリチン濃度 (左縦軸) コア形成率

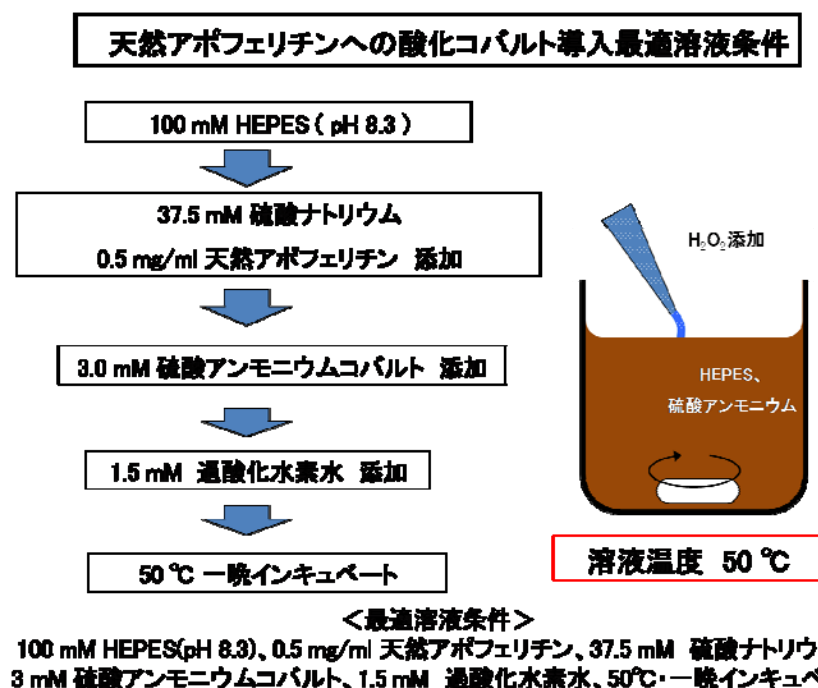


図 2-17 天然アポフェリチンへの酸化コバルト導入最適溶液条件

<実験方法>

100 mM HEPES (pH8.0~8.6) に 37.5 mM 硫酸ナトリウム、0.5 mg/ml 天然アポフェリチンを添加し、硫酸アンモニウムコバルト濃度 (2~4 mM) 、コバルト濃度の半分濃度の過酸化水素水を添加した。約 20 分間室温で攪拌後、50 °Cで一晩インキュベートした。反応後の溶液を透過型電子顕微鏡で観察を行い、コア形成率を算出した。上澄みに残存するフェリチン濃度を測定した。

<実験手順>

1. 各 pH の HEPES に 0.5 mg/ml の天然アポフェリチンと 37.5mM 硫酸ナトリウムを混合する。
2. 各濃度の硫酸アンモニウムコバルトを添加する。
3. 硫酸アンモニウムコバルト濃度の半分濃度の過酸化水素水を混合する。
4. 約 20 分間室温で攪拌し、その後、50 °Cのヒートブロックで一晩インキュベートする。
5. 反応溶液を TEM グリッドに載せて、1%金グルコースで染色を行う。
6. 透過電子顕微鏡観察を行い、コア形成率を算出する。
7. 上澄みに残存するフェリチン濃度をブラッドフォード法により定量した。

<実験条件>

溶液濃度：100 mM HEPES (pH8.0～8.6)、37.5 mM 硫酸ナトリウム、0.5 mg/ml 天然アポフェリチン、硫酸アンモニウムコバルト濃度 (2～4 mM)、コバルト濃度の半分濃度の過酸化水素水

検討条件：硫酸アンモニウムコバルト濃度 2～4 mM

検討 pH： pH8.2～8.6

2-7 作製した酸化コバルトナノ粒子の高分解能透過型電子顕微鏡による結晶格子像と粒径分布

天然アポフェリチンを用いて作製した酸化コバルトナノ粒子の結晶性と形成したナノ粒子のサイズ分布を調べるために、高分解能透過型電子顕微鏡を使用して観察を行った。高分解能透過型電子顕微鏡像を図 2-18 に示す。この観察は、無染色のため、電子顕微鏡像では作製したナノ粒子部分のみでタンパク質部分は確認できない。はっきりとした結晶格子が観察でき、結晶格子幅は、2.81～2.88 Åであった。この結晶格子間隔は、Co₃O₄ の立方晶系-単結晶 220 面の結晶格子と一致した (表 2-2)。

この無染色のナノ粒子の長径と短径を測定した粒径分布を図 2-19 に示す。アポフェリチンの内部空洞の大きさが約 6-7 nm と一定であるのに対し、作製したナノ粒子の平均粒径は約 4.3 nm で粒径は揃っていない。これは、十分にナノ粒子が成長していない事と、アポフェリチン空洞内部の数か所の核形成部位から核形成がスタートするため、限られた球形の空間で結晶が球状に成長できず、多結晶のナノ粒子になっていることが原因と考えられる (図 2-20)。高分解能透過型電子顕微鏡像でも、ところどころに結晶格子を 2 個以上持つ多結晶と思われるナノ粒子を見ることができる (図 2-21)。

Co3O4 立方晶系 PDF#00-042-1467				
$d(\text{\AA})$	2θ	Kv	hkl	$1/(2d)$
4.667	19.000	10.0	1.1.1.	0.1071
2.858	31.272	29.0	2.2.0	0.1749
2.437	36.852	100.0	3.1.1.	0.2052
2.334	38.541	9.0	2.2.2.	0.2142
2.021	44.809	23.0	4.0.0	0.2474
1.850	55.656	12.0	4.2.2	0.303
1.555	59.358	45.0	5.1.1	0.3214

表 2-2 Co3O4 の結晶格子幅を示す XRD スペクトルデータ

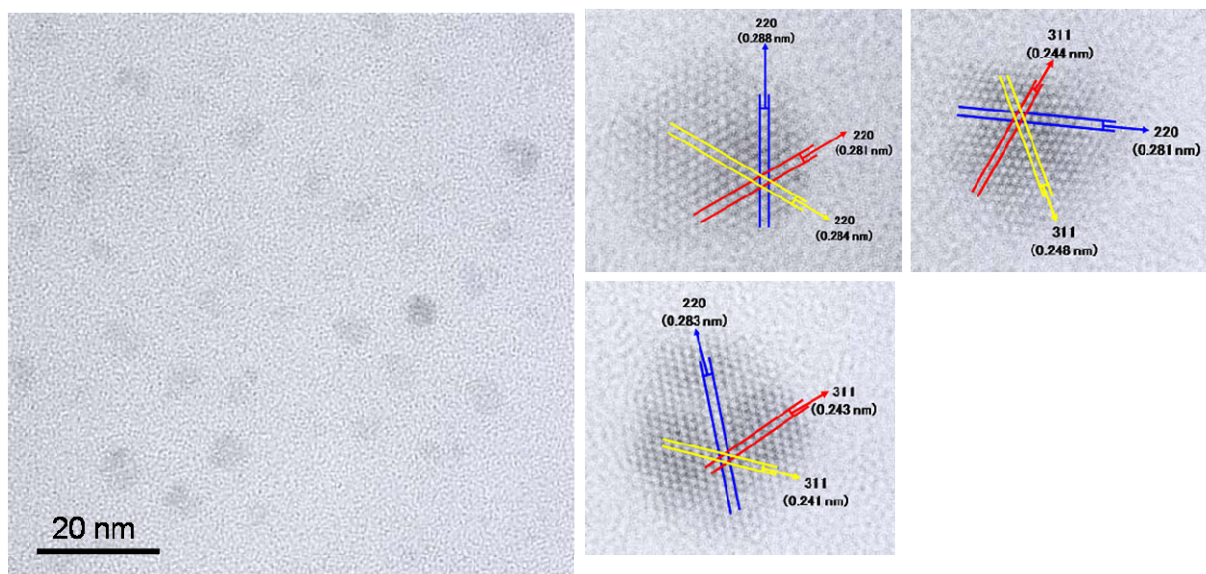


図 2-18 天然アポフェリチンの内部空洞に作製した酸化コバルトナノ粒子の高分解能透過型電子顕微鏡像 無染色
(左) 酸化コバルトナノ粒子 (右 3 つ) 結晶格子像、

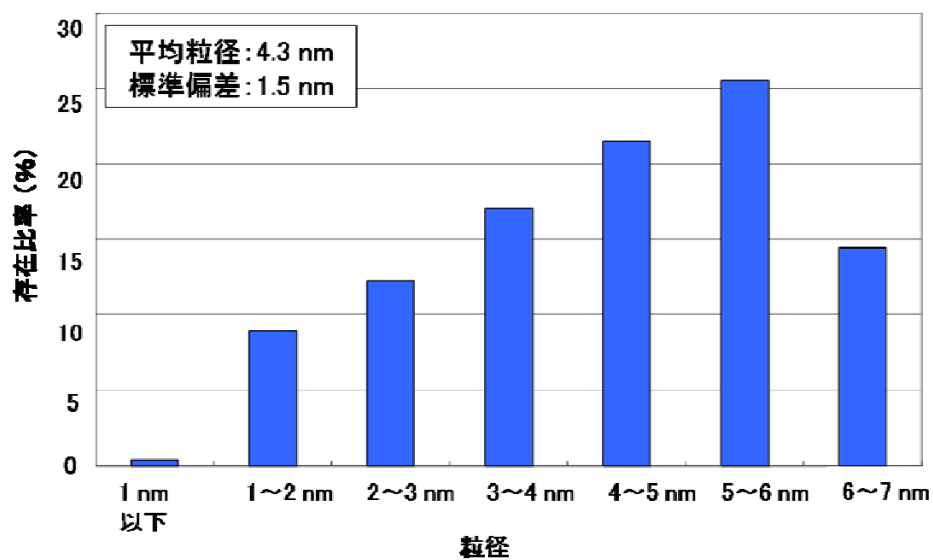


図 2-19 天然アポフェリチンの内部空洞に作製した酸化コバルトナノ粒子の粒径分布図

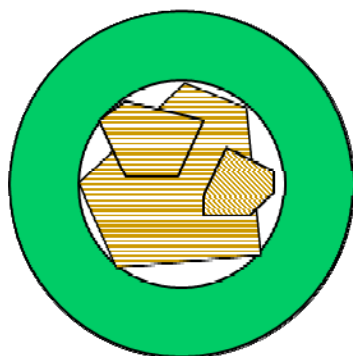


図 2-20 天然アポフェリチンの内部空洞に形成した酸化コバルトの結晶の模式図

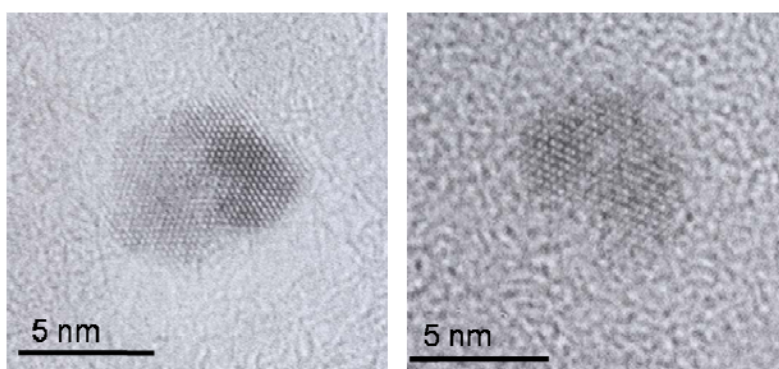


図 2-21 アポフェリチンの内部空洞で作製した多結晶と思われるの Co_3O_4 ナノ粒子

<実験方法>

天然アポフェリチンへの酸化コバルト導入最適溶液条件を用いて溶液を混合し、約 20 分間室温で攪拌後、50 °Cで一晩インキュベートした。反応溶液を透過型電子顕微鏡で観察を行った。

<実験手順>

1. 緩衝液の 100 mM HEPES (pH8.3) に最終濃度が 0.5 mg/ml になるように天然アポフェリチンを混合する。
2. 最終濃度が 37.5 mM になるように硫酸ナトリウムを、最終濃度が 3 mM になるように硫酸アンモニウムコバルトを添加・混合する。
3. 最終濃度が 1.5 mM になるように過酸化水素水を添加・混合する。
4. 室温で約 20 分間混合した後に 50 °C ヒートブロックで一晩インキュベートする。
5. TEM グリットに 4 μ l 載せ、1 分後濾紙で吸い取り、4 μ l の 1% 金グルコースを載せ、1 分後濾紙で吸い取る。
6. 十分に乾燥させ透過型電子顕微鏡観察を行う。

<実験条件>

溶液濃度：100 mM HEPES (pH8.3)、37.5 mM 硫酸ナトリウム、0.5 mg/ml 天然アポフェリチン、3 mM 硫酸アンモニウムコバルト、1.5 mM 過酸化水素水

測定装置：EM-002B (Topcon)

染色：なし

2-8 作製した酸化コバルトナノ粒子の XRD による組成同定

天然アポフェリチンを用いて作製した酸化コバルトナノ粒子を X 線回折解析法により組成・結晶系の同定を試みた。

最適溶液条件を用いて酸化コバルトナノ粒子を作製した。50 °Cで一晩放置すると溶液側で少量の沈殿が形成している。この沈殿を低速遠心で取り除いた後に、40000 rpm/60 min の超遠心でコア形成したフェリチンのみ（沈殿画分）を集めた。コア形成したフェリチンを純水に懸濁し、超遠心を数回繰り返し洗浄し、純水に置換させ、更に超遠心し沈殿画分を集めて窒素乾燥させた。乾燥した沈殿物をメノールのすり鉢とすり棒で粉状にした。この粉末をXRDサンプル台に乗せ、測定を行った。図2-22にX線回折解析結果を示す。X線回折のバックグラウンドは手動により差し引いてある。粒子がナノサイズであることに起因するピークのブロードニングが観察されたが、ピーク位置ははっきりと決定できた。この決定されたピーク位置は、全て Co_3O_4 からのものと一致した。また、このピークの半値幅から、作製されたナノ粒子の直径をシェーラーの式を用いて計算すると、平均粒径は4~5 nmの単結晶と推定することができた。前節の高分解能透過型電子顕微鏡での粒径測定結果では、5 nm以上の大きさの粒子が存在するが、XRDの結果より5 nm以上の単結晶の粒子は少ないと考えられる。電子顕微鏡像でも多結晶に見える像が確認されていることから考察すると、電子顕微鏡像より直径5 nm以上と判断された粒子は、アポフェリチンの内部空洞で4 nm以下の単結晶ナノ粒子が数個形成された多結晶で、見かけの粒径が大きく見えていると考えられる。

ここで、ナノ粒子粒径の計算に用いたシェーラーの式は以下のものである。

$$D = \frac{K \lambda}{\beta \cos \theta}$$

$K=0.9$ （シェーラ一定数）、 $\lambda=1.5418$ （波長 $\text{CuK}\alpha$ ）、 $\beta=1$ 、 $2\theta=36.8$

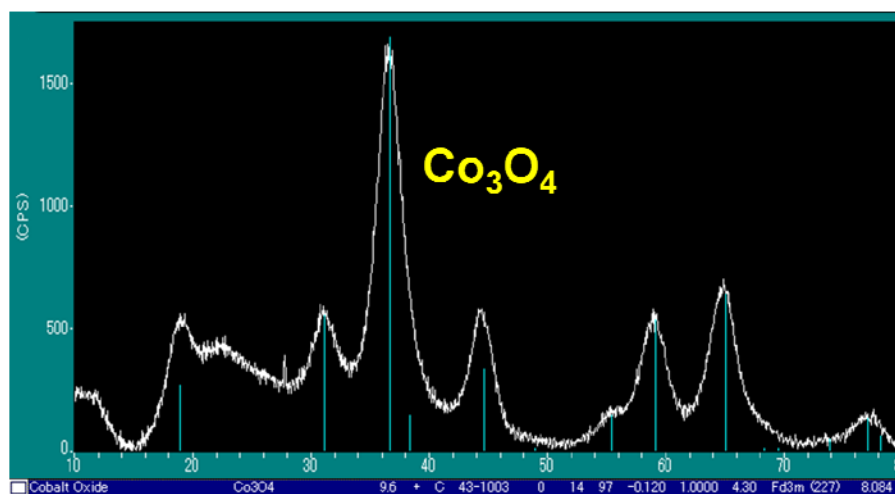


図 2-22 天然アポフェリチンを用いて作製した酸化コバルトナノ粒子の XRD スペクトル（図中の下から伸びる緑色の線は、 Co_3O_4 のピーク位置を示す）

<実験方法>

天然アポフェリチンへの酸化コバルト導入最適溶液条件で溶液を混合し、50 °Cで一晩インキュベート後、上澄みに残存するコア形成したアポフェリチンのみ回収して XRD 測定を行った。

<実験手順>

1. 100 mM HEPES (pH8.3) に 37.5 mM 硫酸ナトリウム、0.5 mg/ml 天然アポフェリチンを添加し、3 mM 硫酸アンモニウムコバルト、1.5 mM 過酸化水素水を添加し、約 20 分間室温で攪拌する。
2. 50 °Cで一晩インキュベートする。
3. 2000 rpm/15 分間 低速遠心機を用いて遠心を行い上澄みのみを回収する。
40000 rpm/60 分間 超遠心を行い、沈殿画分を回収する。
4. 沈殿画分を純粋で懸濁する。
5. 4 と 5 を数回繰り返す。
6. 沈殿画分を窒素で十分乾燥させる。
7. メノールのすり鉢とすり棒で粉状にする。
8. XRD サンプル台に乗せる。
9. 測定を行う。

<測定条件>

測定手法：2θ－θ法

2θ＝10～80°

ステップ角幅：0.02°

固定時間：5 秒

入射 X 線：CuK α 1：1.5418 Å

管電圧：50 kV、管電流：200 mA

使用機器：RIGAKU 社製；RENT2500/PC

2-9 リコンビナントアポフェリチン(Fer8)を用いた酸化コバルトナノ粒子の作製

天然アポフェリチンでの酸化コバルトナノ粒子作製では、平均粒径が 4.3 nm であり、天然アポフェリチンの本来持つ空洞よりも小さな粒子を形成している。天然アポフェリチンが本来持つ空洞の大きさである直径 7~9 nm のナノ粒子を得るために、酸化コバルトナノ粒子作製の反応溶液のインキュベート温度を上げることでアポフェリチン又はコバルトイオンの分子運動が活性化し、本来の内部空洞の大きさの粒径を持つナノ粒子が得られるのではないかと考えた。しかし、H 型サブユニットと L 型サブユニットの混合で構成されている天然アポフェリチンは、50 °C 以上の加熱で変性することが分かっているため、この実験を行うことはできない。そこで、前章で述べた 100 °C の加熱でも変性せずに安定とされるリコンビナントアポフェリチンを用いることにした。使用したリコンビナントアポフェリチンは、L 型サブユニットのみで構成され、N 末端部分は 8 残基欠失した Fer8 である。まず、天然アポフェリチンへの酸化コバルト導入最適条件を参考に、リコンビナントアポフェリチンへの酸化コバルト導入最適溶液条件の検討を行った。

2-9-1 Fer8 を用いた酸化コバルトナノ粒子作製の最適溶液条件探索

天然アポフェリチンを用いた酸化コバルトナノ粒子作製の最適溶液条件とする 3 mM のコバルトを用いて、まず、リコンビナントアポフェリチン (Fer8) を用いた時の酸化コバルトナノ粒子作製における最適溶液 pH を調べた。実験方法は、天然アポフェリチンを用いたときと同様で、pH8.0~8.6 の 100 mM HEPES を用いた。結果を図 2-23 に示す。天然アポフェリチンを用いた時と比較してコア形成率には大きな差は見られなかった。Fer8 は、L 型サブユニットしか持っておらず、鉄酸化活性部位を持っていないが、空洞内にコア形成することができる。この事より、必ずしもコア形成に H 型サブユニットの鉄酸化活性中心が必要ではないことが分かった。大きく異なる点は、溶液側での沈澱反応が抑えられたことである。この沈澱抑制により、

上澄みに残存するフェリチン濃度が 0.35 mg/ml を下回ることにはなかった。pH8.4 では、天然アポフェリチンのコア形成率とほぼ同じであるが、沈殿形成が抑えられたことで上澄みに残存する回収可能なフェリチン（実際にコア形成したアポフェリチン）濃度が高くなった。Fer8 を用いた酸化コバルト導入の最適溶液条件は、pH8.4（3 mM コバルト濃度）である。

Fer8を用いた時に上澄みに多くのフェリチンが残存することができた理由として考えられることは、アポフェリチンのN末端のアミノ酸が考えられる。図2-2、図2-3で示した様に、天然アポフェリチンのN末端のアミノ酸の5番目までは溶液中で自由に動き回っており、不安定な状態になっている。Fer8は、N末端を8残基まで欠損しているため、溶液に露出しているアミノ酸部分を持っていない。溶液側で形成された沈澱とフェリチンの共沈現象は、不安定なN末端に溶液中のコバルトイオンやコバルト酸化物が相互作用して生じており、不安定なN末端を持たないFer8は、溶液中のコバルトイオンやコバルト酸化物が相互作用しないため共沈現象を抑えることができ、上澄みに多くのフェリチンが残存したと考えられる。

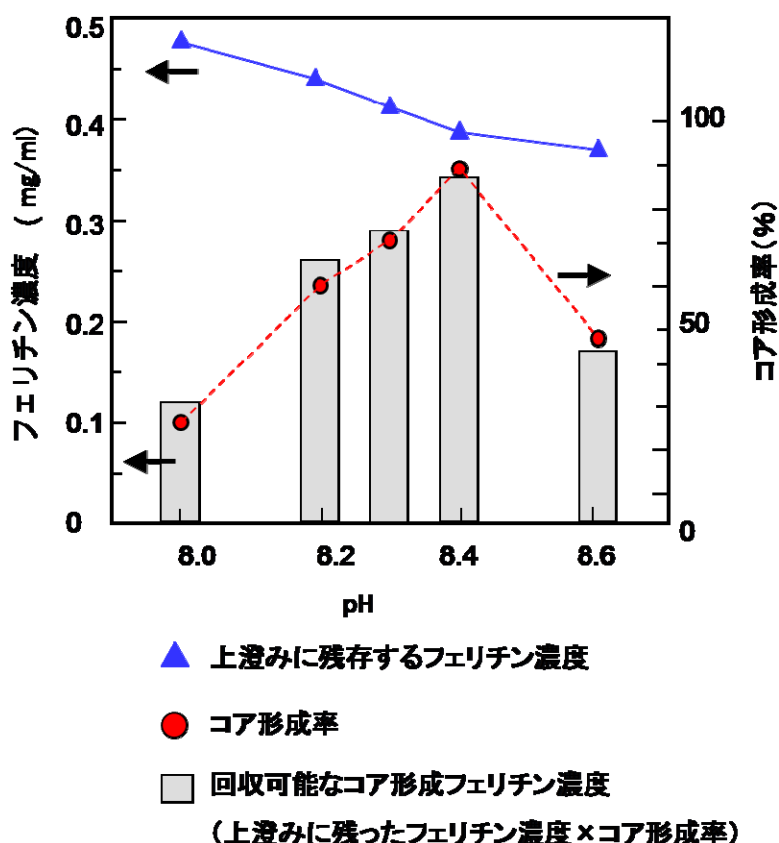


図 2-23 Fer8 のコバルト濃度 3 mM での pH 依存性
(右縦軸) フェリチン濃度 (左縦軸) コア形成率

＜実験方法＞

天然アポフェリチンへの酸化コバルト導入最適溶液条件を参考にし、100 mM HEPES (pH 8.0～8.6) で各溶液を混合した。50 °Cで一晩インキュベートした後、それぞれの上澄み溶液を透過型電子顕微鏡で観察し、上澄みの残存するフェリチン濃度を測定した。

＜実験手順＞

1. 各 pH の 100 mM HEPES に 0.5 mg/ml の Fer8 と 37.5 mM 硫酸ナトリウムを混合する。
2. 3 mM 硫酸アンモニウムコバルトを添加する。
3. 1.5 mM 過酸化水素水を混合する。
4. 約 20 分間室温で攪拌し、その後、50 °Cのヒートブロックで一晩インキュベートする。
5. 各反応溶液を TEM グリッドに載せて、1%金グルコースで染色を行う。
6. 透過電子顕微鏡観察を行い、コア形成率を算出する。
7. 各上澄みに残存するフェリチン濃度をブラッドフォード法（ブラッドフォード法はコバルトイオンがタンパク質の発色を阻害しない）により定量する。

＜実験条件＞

溶液濃度：100 mM HEPES (pH8.0～8.6) 、3 mM 硫酸アンモニウムコバルト、1.5 mM 過酸化水素水、37.5 mM 硫酸ナトリウム、
使用アポフェリチン：0.5 mg/ml Fer8

2-9-2 作製した酸化コバルトナノ粒子の透過型電子顕微鏡観察

Fer8 を用いて作製した酸化コバルトナノ粒子の透過型電子顕微鏡像を図 2-24 に示す。アポフェリチンを用いた時と同様で、1%金グルコース染色を用いている。アポフェリチンのタンパク質部分は白く、作製したナノ粒子部分は黒いドットとして確認できる。Fer8 でも天然アポフェリチンと同様に酸化コバルトナノ粒子が作製できる事を確認した。

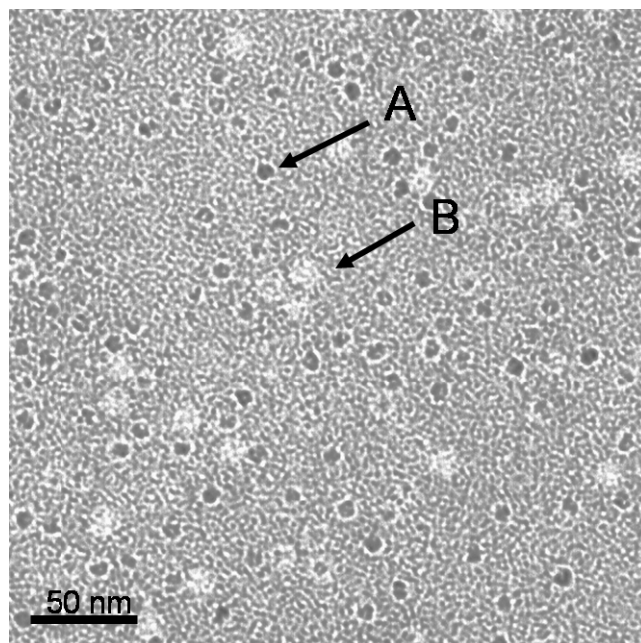


図 2-24 Fer8 の内部空洞に形成した酸化コバルトナノ粒子の透過型電子顕微鏡像
染色：1%金グルコース

矢印 A 酸化コバルトナノ粒子を形成したフェリチン、矢印 B アポフェリチン

<実験方法>

天然アポフェリチンへの酸化コバルト導入最適溶液条件を用いて 0.5 mg/ml Fer8 を使用して溶液を作製した。50 °Cで一晩インキュベートした後、上澄み溶液を透過型電子顕微鏡で観察した。

<実験手順>

1. 100 mM HEPES (pH8.3) に 0.5 mg/ml Fer8 と 37.5 mM 硫酸ナトリウムを混合する。
2. 3 mM 硫酸アンモニウムコバルトを添加する。
3. 1.5 mM 過酸化水素水を混合する。
4. 約 20 分間室温で攪拌し、その後、50 °Cのヒートブロックで一晩インキュベートする。
5. 反応終了後の上澄み溶液を 4 μ l 載せて 1 分後濾紙で吸い取る。
6. 1%金グルコースを 4 μ l を載せて、1 分後濾紙で吸い取る。
7. 自然乾燥させ、透過型電子顕微鏡で観察する。

<測定条件>

測定装置：透過型電子顕微鏡 JEM1010（日本電子）

加速電圧：100 kV

染色液：1%金グルコース

2-9-3 加熱による粒径への影響

Fer8を用いた酸化コバルトナノ粒子形成実験を、インキュベーション温度30 °C、50 °C、70 °Cで行った。各温度で一晩インキュベートした後、酸化コバルトナノ粒子を形成したフェリチンを純水に置換し、十分に乾燥させて粉末状態にし、XRD測定に使用した。図2-25に結果を示す。

得られたピークの半値幅からシェラーの式を用いて直径を計算すると、70 °Cインキュベートで作製したナノ粒子は、直径約7 nmの単結晶の酸化コバルトであることが分かった。また、50 °Cインキュベートで作製したナノ粒子の直径は、約5 nmだった。30 °Cインキュベートで作製したナノ粒子のXRDスペクトルは、ピークがブロードで半値幅を決めることができなかったが、ピーク位置は、 Co_3O_4 と一致したため、非常に小さな直径のナノ粒子が形成されていると予想できる。この結果から、加熱を行うと粒径の大きな単結晶ナノ粒子を作製することができると分かる。これは、コア形成速度が速くなりアポフェリチンの内部空洞での核形成が一か所から早く進むため、単結晶の大きな粒径を持つ酸化コバルトが作製できたと考えられる。

しかしながら、70 °Cインキュベート溶液では、溶液側での沈澱形成反応がアポフェリチンの内部空洞での析出速度より上回ってしまうため、沈澱形成が激しくコア形成しているフェリチンを集めることが困難であった。そのため、大量の酸化コバルトナノ粒子を必要とする半導体デバイス作製の材料として用いるには適当ではない。この問題を解決するための試みは第3章に示す。

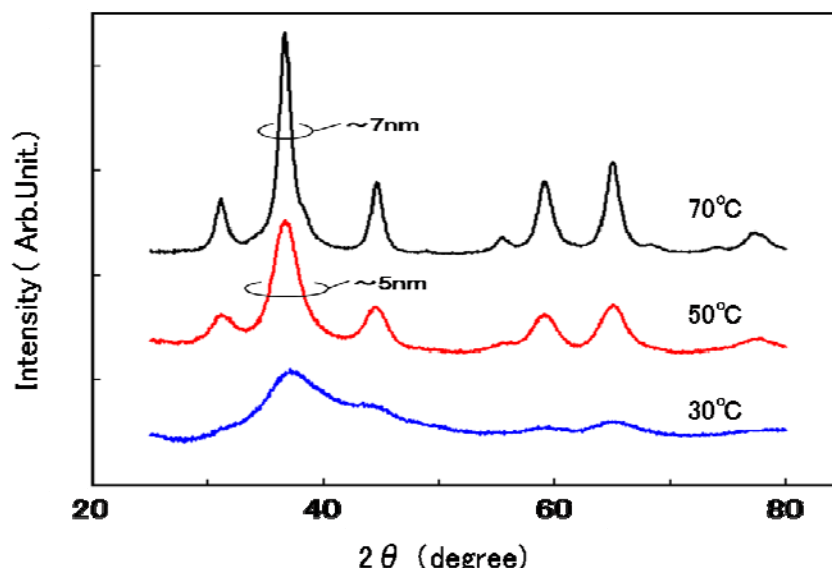


図 2-25 Fer8 を用いて 30 °C、50 °C、70 °C で作製した酸化コバルトナノ粒子の XRD スペクトル

<実験方法>

天然アポフェリチンへの酸化コバルト導入最適溶液条件を用い、0.5 mg/mlFer8 を使用して溶液を混合した。約 20 分間室温でインキュベート後、各 30 °C、50 °C、70 °Cで一晩インキュベートした。その後、上澄みに残存しているコア形成したフェリチンのみを回収し、XRD 測定した。

<実験手順>

1. 100 mM HEPES (pH 8.3) に 37.5 mM 硫酸ナトリウム、0.5 mg/mlFer8 を添加し、3 mM 硫酸アンモニウムコバルト、1.5 mM 過酸化水素水を添加・攪拌する。
2. 約 20 分間室温でインキュベート後、30 °C、50 °C、70 °Cで一晩インキュベートする。
3. 2000 rpm/15 分間 低速遠心機を用いて遠心を行い上澄みのみを回収する。
4. 40000 rpm/60 分間 超遠心を行い、沈殿画分を回収する。
5. 沈殿画分を純水で懸濁する。
6. 4 と 5 を数回繰り返す。
7. 沈殿画分を窒素で十分乾燥させる。
8. メノールのすり鉢とすり棒で粉状にする。
9. XRD サンプル台に乗せ、装置に入れて測定を開始する。

<測定条件>

測定手法 : $2\theta - \theta$ 法

$2\theta = 10 \sim 80^\circ$

ステップ角幅 : 0.02°

固定時間 : 5 秒

入射 X 線 : $\text{CuK}\alpha$ 1 : 1.5418 Å

管電圧 : 50 kV、管電流 : 200 mA

使用機器 : RIGAKU 社製 ; RENT2500/PC

2-10 アポフェリチンを用いて作製した酸化コバルトナノ粒子を用いたデバイス作製

本研究で確立した方法により作られた、酸化コバルトナノ粒子は、奈良先端科学技術大学院大学、微細素子科学研究室の三浦篤志博士らによってフローティングゲートメモリ作製に利用され、動作の確認が行われている^{19,20}。図 2-26 (a) (b) に作製されたフローティングゲートメモリの模式図と断面 TEM 像 (c) に作製されたフローティングゲートメモリの電荷保持特性を示す。横軸がゲート電圧で縦軸がソース-ドレイン間電圧 0.1 V で測定したドレイン電流である。低いゲート電圧の掃引幅 (-1 V から +4 V) では、ヒステリシスが見られず、メモリ特性がなかったが、高い掃引幅 (-10 V ~ +10 V) では、はっきりとしたヒステリシスが観察されメモリ特性がみられた。メモリーウィンドウの大きさは約 3 V であった。このメモリの耐久性実験では、10 万回の書き込み読み出しで劣化がないことが確認されている。また、電荷保持時間もシリコンナノドットと同等であることが示された。この結果は、バイオ分子により作製されたナノ粒子が電子デバイスの素子として利用できることを世界で初めて実験的に示したものであり、バイオナノプロセスの半導体応用を実証したものである。

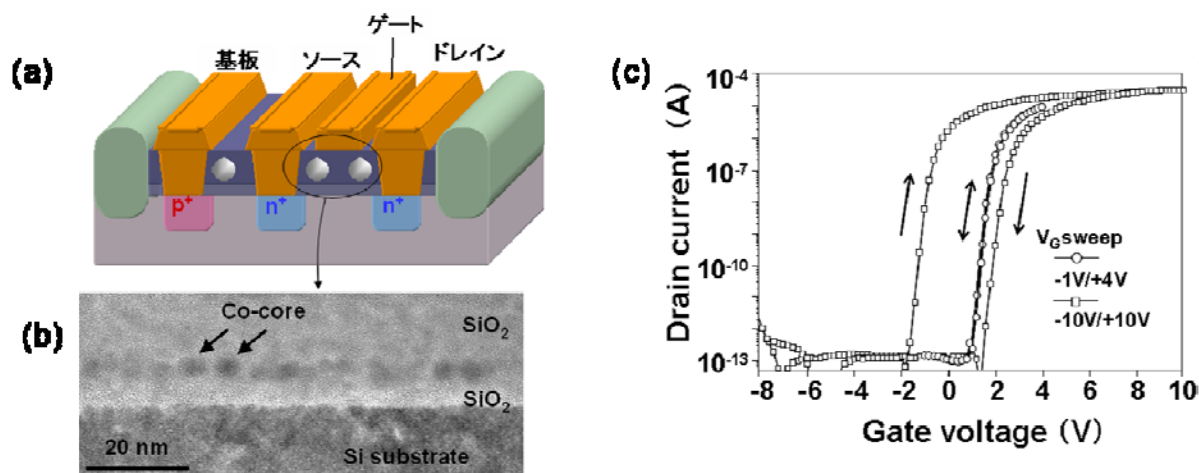


図 2-26 アポフェリチンに内包された酸化コバルトナノ粒子を利用したバイオナノドットフローティングゲートメモリ (a) フローティングゲートメモリの模式図 (b) 断面 TEM 像 (c) 電荷保持ノードとして用いたフローティングゲートメモリの特性

2-11 まとめ

本章では、緩衝液を用いてアポフェリチンの内部空洞での酸化コバルトナノ粒子の作製を試みた。この方法は、従来の方法とは異なり、一度の操作で簡単に大量のナノ粒子の合成が可能になり、デバイス作製の素子として利用することが可能である。

ここで明らかになった主な知見をまとめる。

- ① 天然アポフェリチンへの酸化コバルト導入最適溶液条件は、100 mM HEPES (pH8.3)、0.5 mg/ml アポフェリチン、37.5 mM 硫酸ナトリウム、3 mM 硫酸アンモニウムコバルト、1.5 mM 過酸化水素水、50 °C一晩インキュベート、である。この条件で作製したナノ粒子の構造は Co_3O_4 であり、多結晶である。しかし、デバイス作製において、タンパク質除去のための加熱により、単結晶化する。
- ② 天然アポフェリチンへの酸化コバルト導入最適条件である 50 °Cの加熱、1.5 mM 過酸化水素水添加は、天然アポフェリチンの構造を崩すような条件ではないことが明らかになった。
- ③ リコンビナントアポフェリチン (Fer8) を用いても天然アポフェリチンと同様に酸化コバルトナノ粒子の作製が可能である。加熱を行うことにより、粒径が大きいものが得られるが、溶液側での沈殿形成反応が激しく、粒子を形成した Fer8 の回収率が低い。

第2章 参考文献

1. T. Douglas, V. T. Stark, *Inorganic. Chemistry*, 2000, 39, 8, 1828.
2. 山下一郎, 芝清隆, バイオナノ・プロセス—溶液中でナノ構造を作るウェット・ナノテクノロジーの薦め, シーエムシー出版, 2008.
3. I. Yamashita, *Thin Solid Films*, 2001, 393, 12.
4. P. M. Harrison, P. Arosio, *Biochim et Biophys. Acta*, 1996, 161, 1275.
5. W. H. Massover, *Micron*, 1993, 24, 389.
6. S. Takeda, H. Yoshimura, S. Endo, T. Takahashi, K. Nagayama, *Protein*, 1995, 23, 548.
7. H. Yoshimura, T. Scheybani, W. baumwister, K. Nagayama, *Langmuir*, 1994, 10, 3290.
8. I. Yamashita, *Thin. Solid. Films*, 2001, 393, 12
9. S. Takeda, M. Ohta, S. Ebina, K. Nagayama, *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, 1174, 218.
10. K. Yoshizawa, Y. Mishima, S. Y. Park, J.G. Heddle, J. R. H. Tame, M. Kobayashi, I. Yamashita, *J. Biochem*, 2007, 142, 6, 707.
11. D. D.ペリン, B. デンプシー, 辻啓一, 緩衝液の選択と応用, 講談社, 1981
12. E. A. Lance, C. W. Rhodes, R. Kakon, *Analytical Biochemistry*, 1983, 133, 492.
13. J. L. Hall, J. A. Sw isher, D.G. Brannon, T. M. Linden, *Inorg. Chem*, 1962, 1, 40.
14. X. Yang, N. D. Chasteen, *Biochem. J*, 1999, 338, 615.
15. 化学辞典, 東京化学同人.1994
16. 斎藤一夫, 新しい錯体の化学, 大日本図書, 1986
17. 基礎錯体工学研究会/編, 新版 錯体化学 基礎と最新の展開, 講談社, 2002
18. M. Okuda, K. Iwahori, I. Yamashita, H. Yoshimura, *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, 84, 187
19. A. Miura, R. Tsukamoto, S. Yoshii, I. Yamashita, Y. Uraoka, T. Fuyuki, *Nanotechnology*, 2008, 19, 255201.
20. A. Miura, Y. Uraoka, T. Fuyuki, S. Yoshii, I. Yamashita, *J. Appl. Phys.* 2008, 103, 074503.

第3章 アポフェリチン外表面化学修飾の酸化コバルトナノ粒子作製への影響

3-1 はじめに

アポフェリチンは、硫酸アンモニア鉄溶液からの鉄ナノ粒子作製においては、溶液側での酸化鉄の生成を抑制し、空洞内での酸化鉄ナノ粒子の生成を促進するという2面性を持っている。酸化コバルトナノ粒子作製においても、アポフェリチンを含まない同条件の反応溶液ではコバルト酸化物と見られる沈殿が急速に生成されることが確認されており、アポフェリチン外表面がナノ粒子作製時に溶液側で生じる沈澱を抑制していることは間違いない。しかしながら、酸化コバルトナノ粒子作製の場合には、酸化鉄ナノ粒子作製時とは異なり、アポフェリチン外表面による沈澱抑制力が十分でなく、ナノ粒子を内包したフェリチンと共沈を引き起こし、上澄みに残存するコア形成フェリチン濃度を低下させている。この様子は図3-1に示すように描くことができる。この現象を起こす原因の検討を行うため、アポフェリチンの外表面に、非特異的吸着・結合を抑制するとして知られている親水性高分子のポリエチレングリコールを修飾して表面を改質し、その表面の性質の変化が反応溶液中での沈澱抑制にどのように作用するのかを調べることにした。

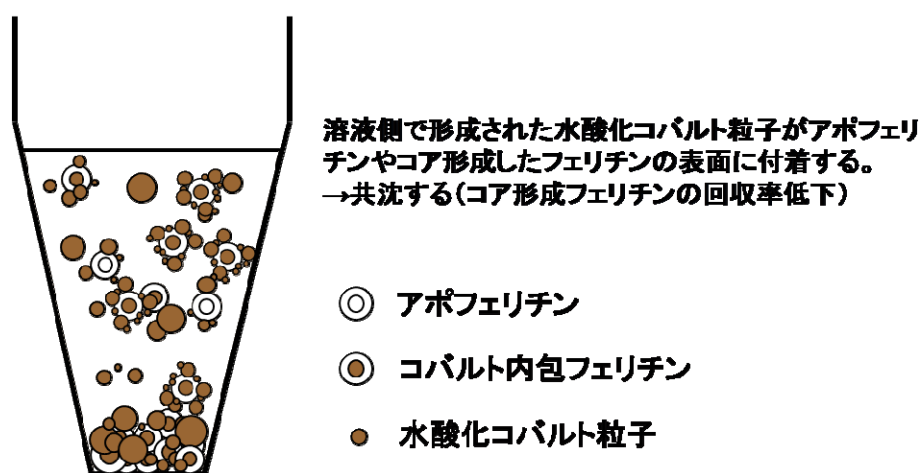


図3-1 酸化コバルトナノ粒子形成時に問題となる溶液状態の模式図

ポリエチレングリコールは、(i) 高い水和性、(ii) 単結合周りの回転運動が容易なため、極めて柔軟な構造骨格を有する、(iii) 分子の熱運動により溶液中できわめ

て高い運動性を有する、(iv) 非イオン性高分子であるため材料表面にコートすると、物質表面の親水性は向上し、同時に表面電荷も抑えられるという物性を持つため、タンパク質安定化技術としてさまざまなタンパク質にPEG修飾が行われ、体内での吸収効率や安定性向上の研究に用いられている¹⁻⁴。ポリエチレングリコール鎖はタンパク質同士の吸着を抑制する効果が高いと言われており、ポリエチレングリコールを修飾した薬剤は、血中や体液中に含まれるタンパク質と結合をすることなく必要な部位に運ぶことができるため、ドラッグデリバリーシステムとしても研究が行われている。また、薬剤の周りにポリエチレングリコールを修飾することで分子量が大きくなり体内での吸収を遅らせ、タンパク質分解酵素の接近を防ぎ体内での半減期を延長させる効果があり、インターフェロンに応用されている⁵。近年では、ナノテクノロジーの発展により、ナノ粒子の分散化を目的とした修飾も行われている⁶。

図 3-2 に天然アポフェリチンのサブユニットの外表面に存在するアミノ酸を示す。プラスチャージを持つリジンが 3 個、ヒスチジンが 4 個、マイナスチャージを持つアスパラギン酸が 5 個、グルタミン酸が 3 個存在している。

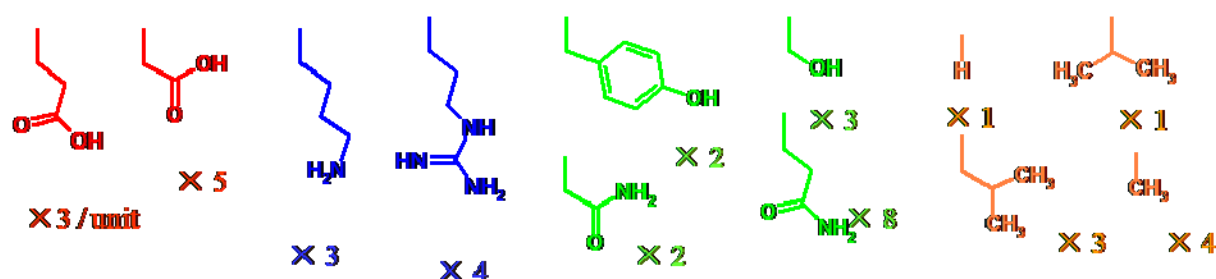


図 3-2 アポフェリチンのサブユニットの外表面に存在するアミノ酸側鎖

3-2 アポフェリチン外表面へのポリエチレングリコール修飾

アポフェリチンの外表面に露出しているアミノ酸のリジンが持つアミノ基を利用してN-ヒドロキシスクシンイミドを介してポリエチレングリコール誘導体

(MeO-PEG-NHS) の修飾を行った。修飾するポリエチレングリコール鎖の長さは平均分子量 300、2000、5000 の 3 種類を用い、アポフェリチン外表面への PEG 固定方法については、福重慶次氏により報告されている手法を採用した⁷ (図 3-3)。

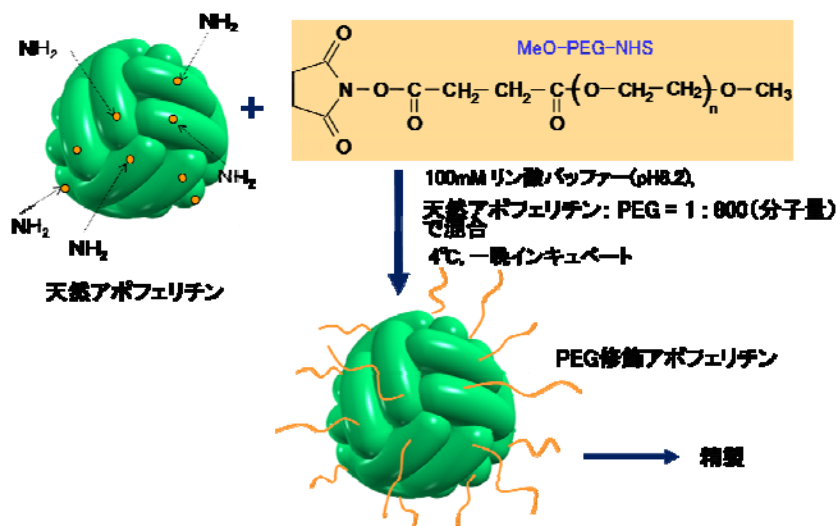


図 3-3 アポフェリチン外表面へのポリエチレングリコール修飾方法

<実験方法>

天然アポフェリチンのモノマー画分とポリエチレングリコール誘導体を 1:800 になるように混合し、4 °Cで一晩インキュベートし、外表面のリジンのアミノ基に修飾反応を行った。外表面に修飾されなかった余分なポリエチレングリコール誘導体を取り除き、濃縮し濃度を定量した。

<実験手順>

1. 天然アポフェリチンをリサイクル HPLC システムを用い、ゲル濾過カラムでモノマー部分のみを分取する。
2. モノマー画分を 150 kDa 限外濾過膜を用いて 100 mM リン酸バッファー (pH8.2) に置換する。
3. 100 mM リン酸バッファー (pH8.2) に天然アポフェリチンとポリエチレングリコール誘導体 (MeO-PEG-NHS) を 1:800 (分子量) になるように混合する。
4. 4 °Cで一晩インキュベートする。
5. 天然アポフェリチンの表面に付着しなかった余分なポリエチレングリコール誘導体を 150 kDa 限外濾過膜を用いて取り除く。
6. ポリエチレングリコールが修飾された天然アポフェリチンを 150 kDa 限外濾過膜を用いて 150 mM NaCl に置換し、濃縮する。
7. ブラッドフォード法を用いてポリエチレングリコールが修飾された天然アポフェリチンの濃度を定量する。

<実験条件>

使用カラム：JAIGEL-GS710 (日本分光)

使用装置：LC-908W-G10（日本分光）

溶出バッファー：100 mM リン酸バッファー(pH7.4)

流速：5 ml/min

使用試薬(ポリエチレングリコール)：SUNBRIGHT Me-200CS, SUNBRIGHT Me-500CS
(日油)

3-3 ポリエチレングリコールの修飾の確認

3-3-1 MALDI-TOF/MS による PEG 修飾数の確認

MALDI-TOF/MS とは、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法（MALDI：Matrix Assisted Laser Desorption Ionization）と飛行時間型（TOF：Time Of Flight）質量分析計（MS）の組み合わせにより、主として生体高分子の質量を決定する装置である。この MALDI は、分析試料にマトリックスを混合し、数ナノ秒という短時間のレーザー光を照射することで分析試料をイオン化する。TOF/MS は、イオン化した試料を高電圧の電極間で加速し、高真空無電場領域のフライトチューブと呼ばれる管中へ導入して等速度飛行させ、一定距離を飛行するのに要する時間を測定して質量を算出する。原理的に高分子の分析に適した質量分析計である。

MALDI-TOF/MS により、天然アポフェリチンのサブユニットへのポリエチレングリコールの修飾の確認を行った。図 3-4 に結果を示す。

まず天然アポフェリチンの MALDI-TOF/MS の 20 kDa 付近のピークは、天然アポフェリチンのサブユニット分子量が約 20 kDa であることから、本来はサブユニット 24 個で構成された分子量約 480 kDa の球状タンパク質が、レーザー照射により一つ一つのサブユニットに分解してイオン化し検出されたものと思われる。すなわち個々のサブユニットが検出されている。またピークがブロードなのは天然フェリチンでは L 型と H 型の 2 つの種類のサブユニットがあることが関係していると考えられる。一方、PEG2000 を修飾した天然アポフェリチンでは、約 20 kDa に微小なピークが見られ、約 22 kDa と 24 kDa にブロードではあるがはっきりとしたピークが確認できる。20 kDa の微小ピークは、天然アポフェリチンのピーク位置と同じであり、未修飾サブユニットがわずかにあることを示している。これは、本化学反応で修飾されなかったか、表面に修飾されたポリエチレングリコール鎖がレーザー照射時に外れてしまったことが原因と考えられる。約 22 kDa と 24 kDa のはっきりとしたピークは、20 kDa から、それぞれ約 2 kDa 増加しており、PEG2000 の分子量と一致す

る。このことから、これらのピークは、サブユニット 1 個あたり PEG2000 が 1 つ修飾できたものと 2 つ修飾できたものと考えられる。また、ピークが天然アポフェリチンのピークに比べて大きくブロードになっているのも PEG2000 の分子量に分布があることを反映していると思われ、ポリエチレングリコール修飾が行われたことを支持している。この結果、サブユニットの外表面に露出しているリジンの 1 または 2 か所に PEG2000 が修飾できたと判断される。図 3-2 で示したように修飾に利用しているプラスチャージのリジンは天然アポフェリチンの外表面に 3 個存在する。天然アポフェリチンでは、サブユニットあたり 2 個まで修飾されるが、リコンビナントアポフェリチン Fer8 ではサブユニットあたり 3 個のまで修飾することができる。この違いは、天然アポフェリチンはウマ脾臓から精製してきたものであり、生体内でリジンが修飾を受け、アミノ基が無くなっていることが推測される。同じく PEG5000 でも分子量 25 kDa と 30 kDa 付近に 2 つのピークが確認でき、サブユニット 1 個あたり最大 2 か所に修飾できたことを示している。PEG300 による修飾では、分子量の増加が分かりにくいため、未修飾の天然アポフェリチンを混合したサンプルの結果を示している。分子量 20 kDa 付近のはっきりしたピークは未修飾の天然アポフェリチンである。このピーク形状を見ると分子量 20 kDa より大きい分子量の部分にピークが見られブロードになっている。これは、PEG300 が天然アポフェリチンのサブユニットに修飾されたものと判断さえる。このピーク形状からは判断できないが、PEG2000、PEG5000 の結果を考慮すると、サブユニットに PEG300 は 1 つまたは 2 つ修飾されていると思われる。

これらの結果から本研究に用いたポリエチレングリコール修飾の化学反応では、サブユニットあたり 1 個から 2 個、つまり 24 量体の天然アポフェリチンの外表面に、24 個から 48 個のポリエチレングリコール鎖を修飾することができると示された。

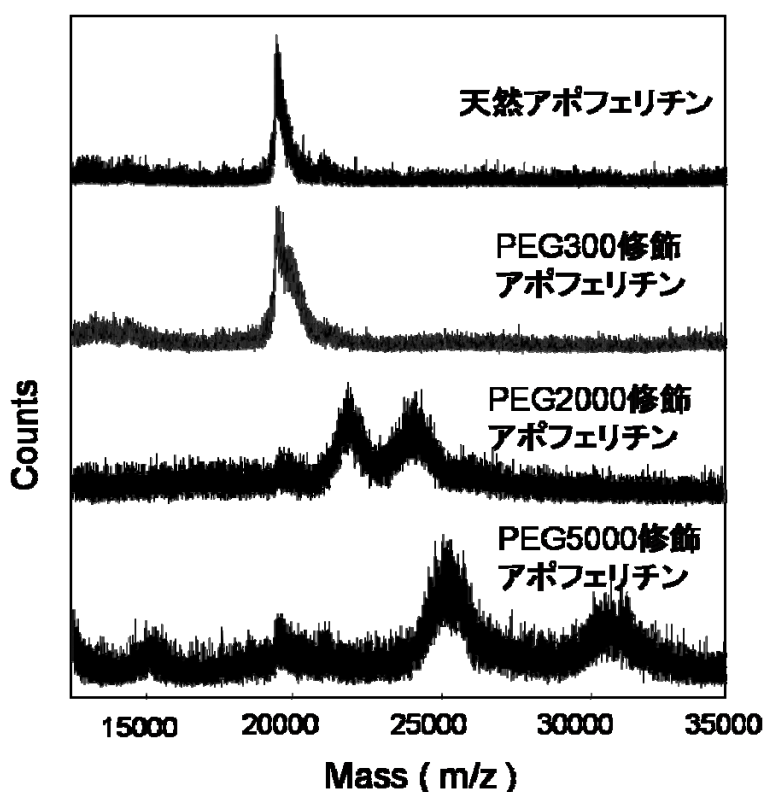


図 3-4 ポリエチレングリコール修飾アポフェリチンの MALDI-TOF/MS チャート
上から天然アポフェリチン、PEG300 修飾アポフェリチン、PEG2000 修飾アポフェリチン、PEG5000 修飾アポフェリチン

<実験方法>

各アポフェリチンを 0.5 mg/ml に希釈し、アポフェリチンとマトリックスを 1:1 の割合になるように試料台上で混合し、測定した。

<測定手順>

1. 測定する各アポフェリチンを 150 mM NaCl で希釈し、0.5 mg/ml に調整する。
2. 各アポフェリチンを試料台に載せる。
3. マトリックスをアポフェリチンと等量試料台上に載せ、試料台上にてよく混合する。
4. 室温で十分に乾燥させる。
5. 測定する。

<測定条件>

測定試料：天然アポフェリチン、PEG300 修飾した天然アポフェリチン、PEG2000 修飾した天然アポフェリチン、PEG5000 修飾した天然アポフェリチン、

測定装置：Voyager-DE STR (Applied Biosystem)

マトリックス：Sinapic acid

3-3-2 ゲル濾過カラムクロマトグラフ

MALDI-TOF/MS により天然アポフェリチンの外表面に 1~2 個のポリエチレングリコール鎖の修飾が確認できたが、このポリエチレングリコールの修飾により天然アポフェリチンのもつ体積がどのように変化したのかを調べた。

ポリエチレングリコール修飾アポフェリチンの液体クロマトグラフチャートを図 3-5 に示す。ゲル濾過カラムによる液体クロマトグラフィーでは、体積の大きいものは、より少ない溶媒量で溶出される。アポフェリチンは 450 kDa と大型の分子であるため、分子量が 30 万以上の高分子タンパク質でも高い分離能を持っている 5 ミクロン親水性シリカを充填したカラムを使用した。

未修飾の天然アポフェリチンの溶出溶媒量が約 10.3 ml (黒線) であった。溶出ピークは、PEG2000 修飾アポフェリチンでは、溶出溶媒量 10.0 ml (緑線)、PEG5000 修飾アポフェリチンでは溶出溶媒量 9.0 ml (赤線) であり、溶出に必要な溶媒量が少なくなっている。これは、ポリエチレングリコールを修飾したことにより、天然アポフェリチンの周りに排除体積が生まれ、アポフェリチンの体積が増加していることを示している。PEG300 修飾アポフェリチンは、未修飾の天然アポフェリチンとの差異がが少ないことと、測定に使用した濃度が異なるため、別図で示した(図 3-6)。分子量 300 のポリエチレングリコール修飾した天然アポフェリチンの溶出時間は、未修飾の天然アポフェリチンよりわずかに早くなっており、修飾の効果と思われる。しかしながら PEG2000、PEG5000 と比較して明らかにその変化は少なく、PEG 分子量の差を反映しており、体積を大きく増加させる効果はなかった。

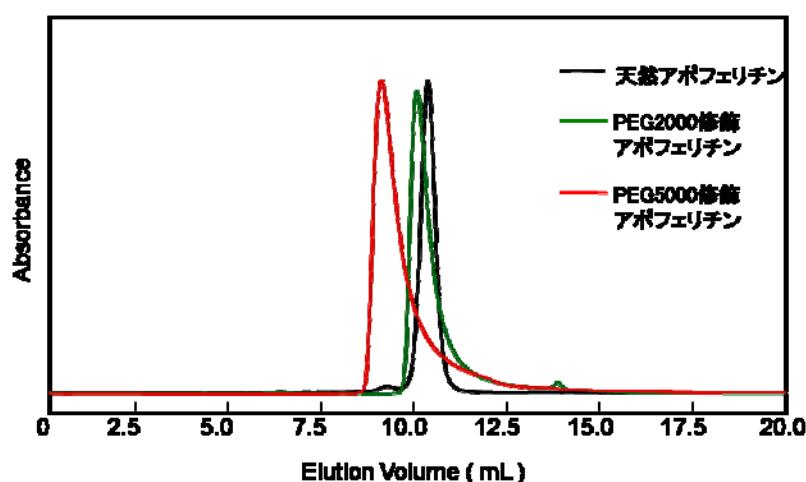


図 3-5 ゲル濾過カラムクロマトグラフチャート (黒) 天然アポフェリチン (緑) PEG2000 修飾アポフェリチン (赤) PEG5000 修飾アポフェリチン

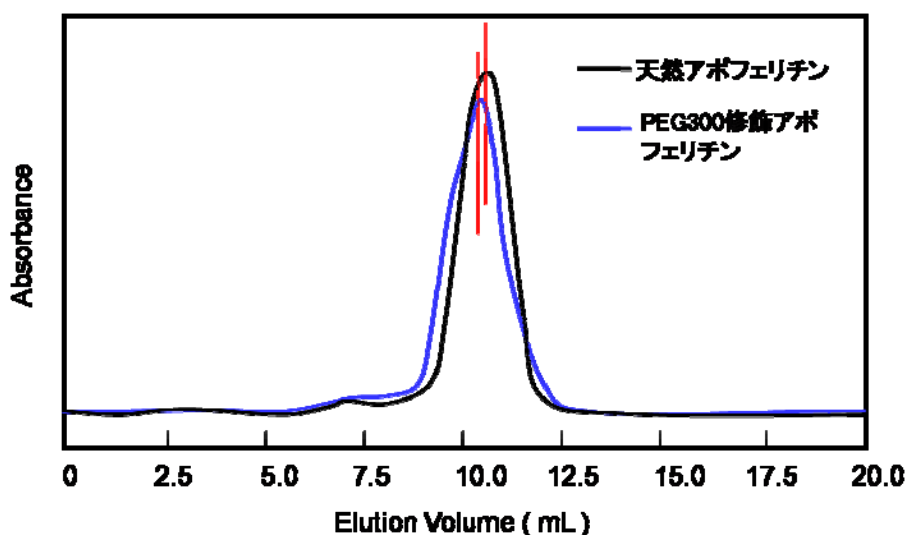


図 3-6 ゲル濾過カラムクロマトグラフチャート
 (黒) 天然アポフェリチン (青) PEG300 修飾アポフェリチン
 各ピーク位置を赤線で示している

<実験方法>

各ポリエチレングリコール修飾アポフェリチンを 50 mM Tris(pH8.0) で約 1 mg/ml に調整し、ゲルろ過クロマトグラフの測定を行った。

<測定手順>

1. 各ポリエチレングリコール修飾アポフェリチンを 50 mM Tris (pH8.0) を用いて約 1 mg/ml に希釈する。
2. SW4000 ゲル濾過カラムを流速 1 ml/min で平衡化しておき、ベースラインが一定になったのを確認後、サンプルをインジェクトする。
3. ピーク位置を確認する。

<実験条件>

使用カラム：TSKgel G4000 SWXL PEEK (東ソー)

流速：1ml/min

溶出バッファー：50 mM Tris (pH8.0)

検出波長：280 nm

使用装置：UV8020 (紫外可視検出器) DP8020 (デュアルポンプ) (東ソー)

3-4 ポリエチレングリコール修飾アポフェリチンへの酸化コバルト導入

前節で作製したポリエチレングリコール修飾アポフェリチンを用いてコバルト導入実験を行った。酸化コバルト導入の反応溶液の状態とコア形成率と上澄みに残存するフェリチン濃度について詳しく調べた。

3-4-1 反応溶液の状態

PEG 修飾アポフェリチンに天然アポフェリチンへの酸化コバルト導入最適溶液条件を用いて酸化コバルトナノ粒子を作製させた。反応溶液を混合してから 20 分後、50 °C 一晩インキュベート後の溶液状態の写真を図 3-7 に示す。

混合 20 分後の溶液は、フェリチンを添加していないもの（一番右）は、沈殿形成が進み溶液が濁っているが、それ以外の溶液は PEG 鎖の長さに関係なくどれも透明な茶色に変化している。50 °C で一晩インキュベートした溶液（写真は軽く遠心後のもの）では、天然アポフェリチンと PEG300 修飾アポフェリチンでは、沈殿形成が起きているが、PEG2000 修飾アポフェリチンと PEG5000 修飾アポフェリチンでは、溶液側での沈殿形成は確認できなかった。

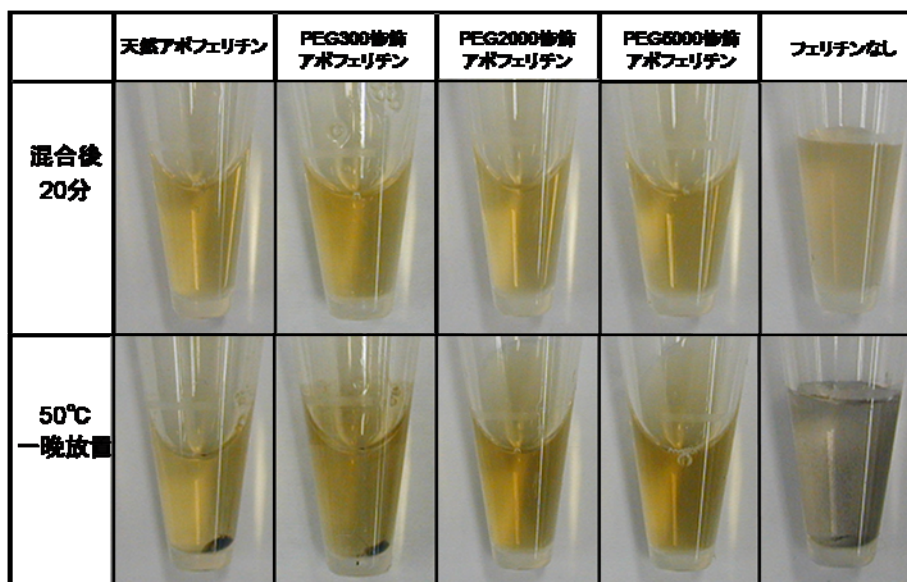


図 3-7 天然アポフェリチンとポリエチレングリコール修飾アポフェリチンへの酸化コバルト導入の溶液状態 （上）溶液混合 20 分後 （下）50 °C ・一晩インキュベート後

3-4-2 コア形成率

天然アポフェリチンまたは各ポリエチレングリコール修飾アポフェリチンを用いた時の2~9 mM コバルト濃度でのコア形成率を図3-8に示す。天然アポフェリチンでは3 mMで、PEG300修飾アポフェリチンでは5 mMで、PEG2000修飾アポフェリチンでは6 mMで、PEG5000修飾アポフェリチンでは7 mMで、コア形成率が最大値をとった。ポリエチレングリコールの分子量、すなわちポリエチレングリコール鎖が長くなるほど、コバルト濃度が高いところでコア形成率の最大値を示す傾向が見られた。2 mM コバルト濃度でコア形成率が低い事は、アポフェリチンの内部空洞に入ることができるコバルトイオンの数に比べて、添加したコバルトイオンの濃度が少なく、不足しているためである。また、どのアポフェリチンでもコア形成率の最大値が80%以上を示す。修飾されたポリエチレングリコール鎖がコバルトイオンの導入を阻害することが考えられたが、コア形成率は天然アポフェリチンと同程度であった。これらの結果から、ポリエチレングリコール鎖は構造が十分にフレキシブルであり、コバルトイオンはPEG鎖を通過することが可能で、酸化コバルトナノ粒子の形成を阻害するものではないことが分かった。

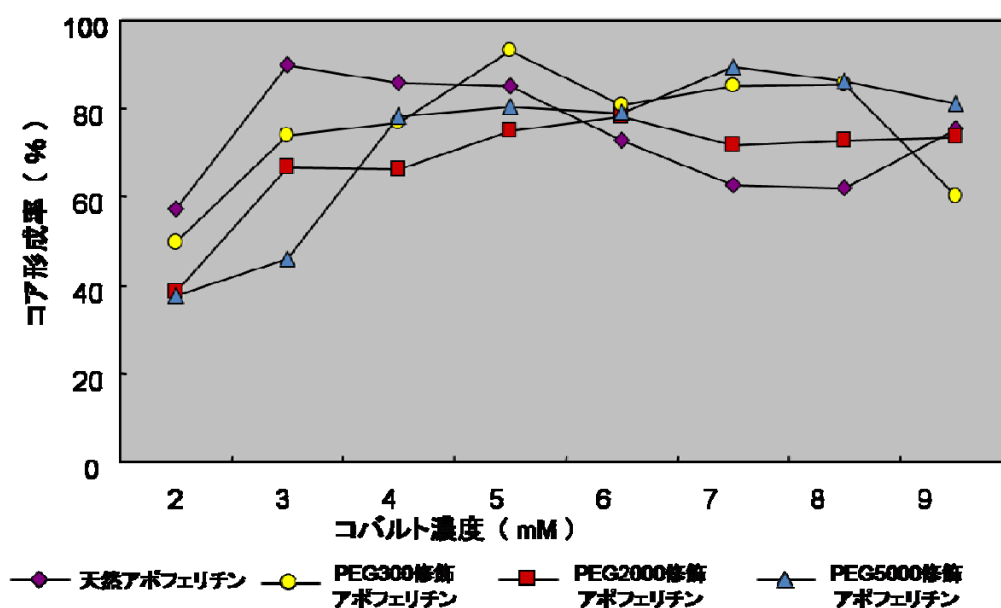


図3-8 各アポフェリチンの50℃・一晩インキュベート後のコア形成率

3-4-3 上澄みに残存するフェリチン濃度

天然アポフェリチンまたは各ポリエチレングリコール修飾アポフェリチンを用いた時の2~9 mM コバルト濃度での上澄みに残存するフェリチン濃度を図3-9に示す。天然アポフェリチンと PEG300 修飾アポフェリチンでは、3 mM 以上で上澄みに残存するフェリチン濃度は急激に減少し、6 mM 以上ではほとんど上澄みにフェリチンは残っていない。しかし、PEG2000, PEG5000 修飾アポフェリチンでは、コバルト濃度が上昇しても上澄みに残存するフェリチン濃度は高い値を保っている。前節で示した図3-7の写真は、3 mM 硫酸アンモニウムコバルトを使用した時のものであるが、この写真からも天然アポフェリチンと PEG300 修飾アポフェリチンの50 °C一晩放置後の溶液では沈澱が生じ、コア形成したフェリチンやアポフェリチンが共沈して上澄みに残存するフェリチン濃度が少なくなっている様子が確認できる。

PEG5000 修飾アポフェリチンでは、9 mM コバルト濃度でも、初期添加量が0.5 mg/ml に対して約半分のフェリチンが反応溶液の上澄みに残存している。ポリエチレングリコール鎖はより長い方が沈澱抑制効果を示し、上澄みに多くのフェリチンを残存させる効果があることが分かった。図3-7の3 mM コバルト使用時の写真でも明らかであるが、PEG2000 修飾アポフェリチンと PEG5000 修飾アポフェリチンでは、沈澱は見られず、濃い茶色を呈している。アポフェリチン1個の内部空洞に導入されるコバルトイオンは、2000~3000 個と言われており、本実験で使用している0.5 mg/ml アポフェリチン (1 μ M) の内部空洞を満たすコバルト濃度は2 mM~3 mM と考えられる。9 mM のコバルト濃度は、内部空洞に入るとされるコバルトイオンの約3倍量であり、過剰のコバルトイオンを溶液中加入している状態である。この実験結果から、PEG2000 修飾アポフェリチンと PEG5000 修飾アポフェリチンでは、明らかな沈澱抑制効果があり上澄みに多くのフェリチンを残存させることが分かった。しかしながら、PEG300 修飾アポフェリチンでは、沈澱抑制効果は見られなかった。

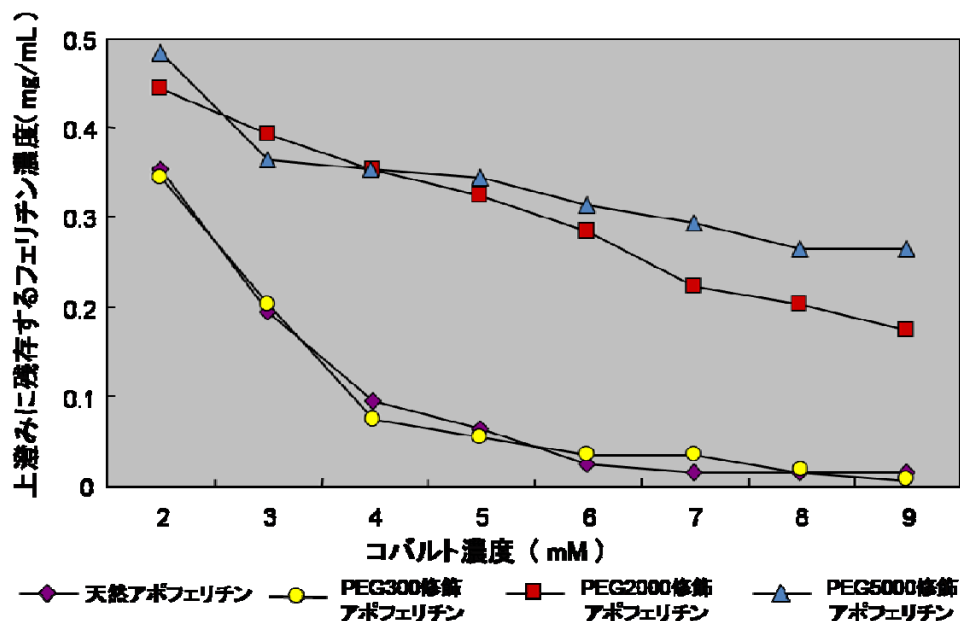


図 3-9 各アポフェリチンの 50℃・一晩インキュベート後の上澄みに残存するフェリチン濃度

3-4-4 コア形成フェリチンの回収率

コア形成率と上澄み残存フェリチン濃度より算出した実際に回収することができるコア形成フェリチンの割合を図 3-10 に示す。天然アポフェリチンでは、2 mM コバルト濃度で約 40%のコア形成フェリチン回収率を示すが、コバルト濃度が上昇するにつれて回収率は低下する。PEG300 修飾アポフェリチンも 2 mM コバルト濃度でコア形成フェリチン回収率の最大値を示すが、コバルト濃度上昇にしたがい回収率は減少し、天然アポフェリチンと同じ傾向を示した。しかし、PEG2000 修飾アポフェリチンと PEG5000 修飾アポフェリチンでは、コバルト濃度が上昇してもコア形成フェリチン回収率の大幅な低下は見られず、十分な量が上澄みに残存し、PEG2000 修飾アポフェリチンでは、30～50%前後の回収率を、PEG5000 修飾アポフェリチンでは 40～50%前後の回収率を示した。これらの結果から、ポリエチレングリコール鎖の持つ特性や非特異的吸着抑制効果が反応溶液側で生じる沈澱を抑制することが明らかになった。また、PEG300 修飾アポフェリチンは、分子量が小さいポリエチレングリコール鎖であり、結果的に外表面のプラスチャージ（リジン）をキャップしたことになるが、天然アポフェリチンのコア形成率や沈澱抑制効果と大きな差が見

られなかったため、外表面のプラスチャージは、酸化コバルトのナノ粒子形成には影響を及ぼさないということが明らかになった。

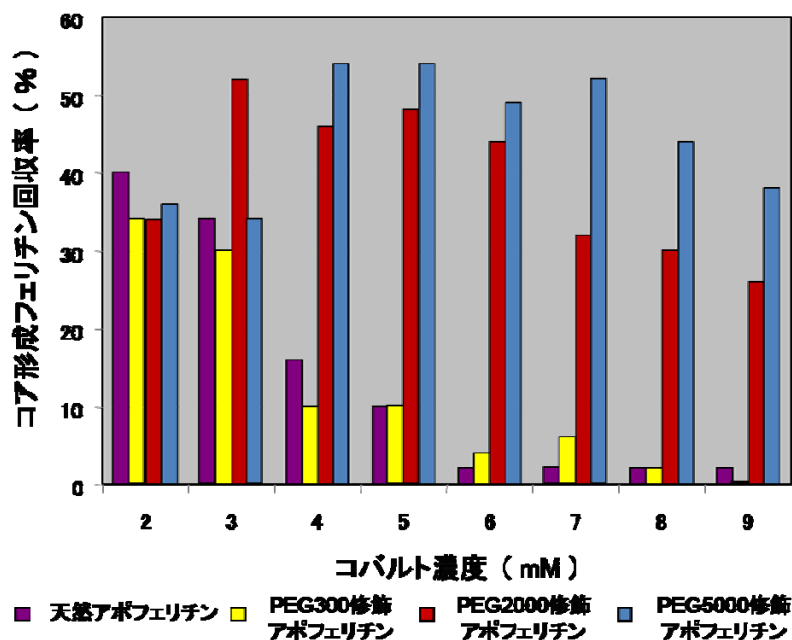


図 3-10 各アポフェリチンの 50 °C一晩インキュベート後のコア形成フェリチン回収率

<実験方法>

100 mM HEPES (pH8.3)、0.5 mg/ml 各ポリエチレングリコール修飾アポフェリチン、または天然アポフェリチンを用いて、コバルト濃度 2~9 mM でのコア形成率と上澄みに残存するフェリチン濃度を測定した。

<実験手順>

1. 100 mM HEPES (pH8.3) に 0.5 mg/ml の各ポリエチレングリコール修飾アポフェリチン、または天然アポフェリチンと 37.5mM 硫酸ナトリウムを混合する。
2. 各濃度のコバルトを添加する。コバルト濃度の半分濃度の過酸化水素水を混合する。
3. 約 20 分間室温で攪拌し、その後、50 °Cのヒートブロックで一晩インキュベートする。
4. 反応溶液を TEM グリッドに載せて、1%金グルコースで染色を行う。
5. 透過電子顕微鏡観察を行い、コア形成率を算出する。
6. 50 °C・一晩インキュベート後の溶液の上澄みに残存するフェリチン濃度をブラッドフォード法により測定する。

<実験条件>

検討条件：2～9 mM 硫酸アンモニウムコバルト

使用アポフェリチン：PEG300 修飾アポフェリチン、PEG2000 修飾アポフェリチン、PEG5000 修飾アポフェリチンと天然アポフェリチン

溶液濃度：100 mM HEPES (pH8.3)、2～9 mM 硫酸アンモニウムコバルト、硫酸アンモニウムコバルト濃度の半分濃度の過酸化水素水、37.5 mM 硫酸ナトリウム、0.5 mg/ml 各ポリエチレングリコール修飾アポフェリチン、または天然アポフェリチン

3-5 コントロール実験：ポリエチレングリコール混合実験

アポフェリチンへの酸化コバルト導入時に、ポリエチレングリコール鎖の存在が反応溶液側で形成する沈澱の抑制に重要であるということが明らかになったが、ポリエチレングリコール鎖が溶液中に存在するだけで、沈殿抑制効果がみられる可能性がある。この可能性を検討するため、天然アポフェリチンにポリエチレングリコール鎖を固定せず、溶液にポリエチレングリコール鎖を混合しただけ実験を実施し、ポリエチレングリコール鎖が溶液側で生じる沈澱を抑制できるのかどうかを調査した。調査を行ったのは、コバルト濃度 4～6 mM の条件である。4～6 mM のコバルトを用いて酸化コバルト導入実験を行い、上澄みに残存するフェリチン濃度を測定した。アポフェリチンの外表面には 24～48 個のポリエチレングリコール鎖を修飾することが可能であったが、本実験では、効果を明確にするためにポリエチレングリコール鎖は、天然アポフェリチン 1 個に対して 100 本になるように過剰量混合した。この状態は、添加したポリエチレングリコール鎖が溶液中に浮遊し、天然アポフェリチンと相互作用はしていないと考えられる。図 3-11 に天然アポフェリチンとポリエチレングリコール鎖の関係のイメージ図を、図 3-12 に実験結果を示す。

コバルト濃度 4～6 mM の上澄みに残存するフェリチン濃度は、天然アポフェリチンを用いた時の結果と同じであり、PEG2000 が溶液中に存在しているだけでは沈殿を抑制する効果は見られなかった。このことより、ポリエチレングリコール鎖がアポフェリチンの外表面に固定されることで沈殿抑制効果が表れたことが明らかになった。

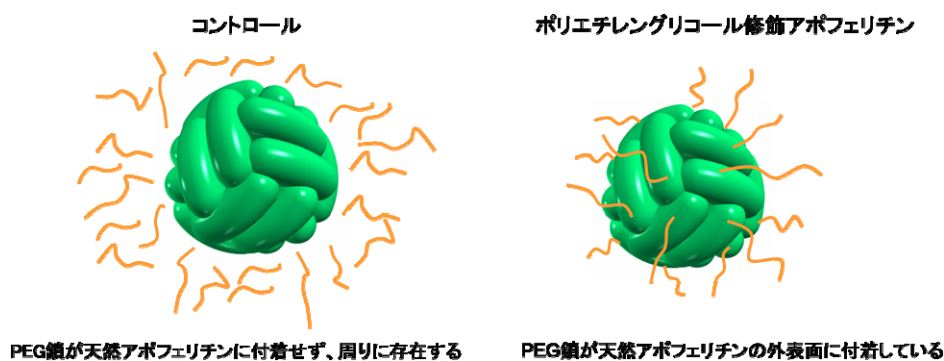


図 3-11 コントロール実験に用いるアポフェリチンのイメージ図
 (左) コントロール：天然アポフェリチンと PEG を混合しただけで溶液中に浮遊している状態 (右) ポリエチレングリコール修飾アポフェリチン：PEG の片方の端がアポフェリチンの外表面に付着している状態

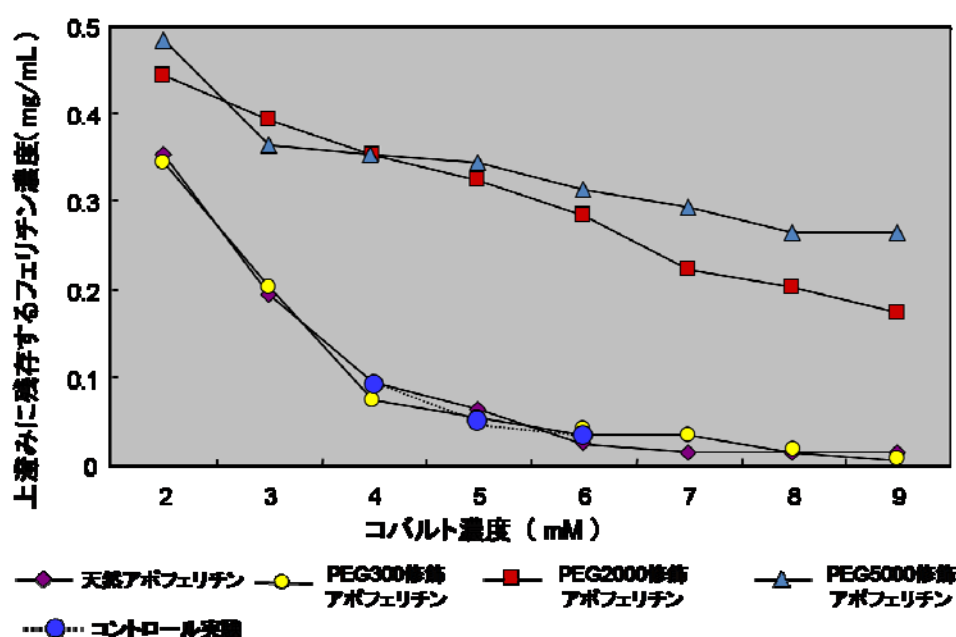


図 3-12 コントロール（天然アポフェリチンに PEG を混合）の 50 °C・一晩放置後の上澄みに残存したフェリチン濃度 各 PEG 修飾アポフェリチンの結果との比較

<実験方法>

4～6 mM 硫酸アンモニウムコバルト濃度の条件で、PEG 修飾アポフェリチンの代わりに天然アポフェリチン 1 個に対して 100 個のポリエチレングリコール鎖を加えた溶液を作成した。50 °C・一晩インキュベートした後、コア形成率と上澄みに残存するフェリチン濃度を測定した。

<実験手順>

1. 100 mM HEPES (pH8.3) に 1 μ M 天然アポフェリチンと 37.5 mM 硫酸ナトリウム、200 mM の PEG2000 を混合する。
2. 各濃度の硫酸アンモニウムコバルトを添加する。
3. 硫酸アンモニウムコバルト濃度の半分量の過酸化水素水を添加し、50 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートする。
4. 上澄みに残存するフェリチン濃度をブラッドフォード法により測定する。

<実験条件>

検討条件：4～6 mM 硫酸アンモニウムコバルト

使用アポフェリチン：天然アポフェリチン

使用ポリエチレングリコール：PEG2000（分子量 2000）

溶液濃度：100 mM HEPES（pH8.3）、4～6 mM 硫酸アンモニウムコバルト、硫酸アンモニウムコバルト濃度の半分濃度の過酸化水素水、37.5 mM 硫酸ナトリウム、0.5 mg/ml 天然アポフェリチン

3-6 まとめ

本章では、天然アポフェリチンの外表面が反応溶液側で生じる沈澱形成に及ぼす影響について、アポフェリチンの外表面にポリエチレングリコールを修飾することにより考察を行った。

ここで明らかになった知見をまとめる。

- ① 天然アポフェリチン外表面にサブユニットあたり 1～2 個存在するリジンのプラスチャージは、酸化コバルトナノ粒子形成や反応溶液で生じる沈澱形成には無関係である。
- ② 反応溶液側で生じる沈澱形成の抑制効果は、ポリエチレングリコール鎖が、天然アポフェリチンの外表面に付着している時のみ観察できる。
- ③ ポリエチレングリコールは、天然アポフェリチンへの酸化コバルト導入を阻害せず、反応溶液側での沈澱形成反応のみを抑制する。

第3章 参考文献

1. S. Zalipsky, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 1995, 16, 157.
2. A. Abuchowski, T. Van Es, N. C. Palcank, F. F. Davis, *J. Biol. Chem*, 2003, 14, 38.
3. Q. Wang, K. S. Raja, K. D. Janda, T. Lin, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem*, 2003, 14, 38.
4. K. S. Raja, Q. Wang, M. J. Gonzalez, M. Manchester, J. E. Johnson, M. G. Finn, *Biomacromolecules*, 2003, 4, 472.
5. M. P. Manns, J. G. Mchutchison, S. C. Gordon, V. K. Rustgi, M. Shiffman, R. Reindollar, Z. D. Goodman, K. Koury, M. Ling, J. K. Albrecht, *Lancet*, 2001, 358, 9286, 958.
6. H. Otsuka, Y. Akiyama, Y. Nagasaki, K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc*, 2001, 123, 8226.
7. Y. Fukushige, M. Muraoka, I. Yamashita, *Mater. Res. Soc. Jpn*, 2005, 30, 549.

第4章 アポフェリチン内部空洞への酸化コバルト析出機構について

4-1 はじめに

本章では、前章までの実験結果や確認された現象と追加実験により、アポフェリチンの内部空洞に酸化コバルトが析出するまでの機構について考察を行う。

前章でも示したが、溶液混合後 20 分ではコバルトの酸化反応が起こり、反応溶液の色が茶色に変化している（図 3-7）。しかし、この反応溶液を透過型電子顕微鏡で観察を行ったところ、コア形成は確認できなかった（図 4-1）。その後、この反応溶液を 50 °C で一晩インキュベートするとコア形成の確認ができる。これらの事より、反応溶液に過酸化水素水を添加するだけでは、アポフェリチンの空洞内にナノ粒子の形成はできず、50 °C に加熱を行うことが重要な条件であることが明らかになった。また、50 °C でインキュベートを始めてから 6 時間後のアポフェリチンの状態を透過型電子顕微鏡で観察を行ったところ、小さなナノ粒子を内包したアポフェリチンを確認することができた。これは、内部空洞にナノ粒子ができ始めたところを観察したものだと考えられる。更に、50 °C でのインキュベートを行わず、室温で一晩インキュベートした溶液の状態は、沈殿が生じておらず、透過型電子顕微鏡観察では、コア形成は確認できなかった。これらの実験結果や現象から、

- ① 過酸化水素水を添加したときに生じる反応
- ② 50 °C でインキュベートした時に生じる反応

2 段階があることが示唆された。そこで、この反応について詳細を調べることにした。

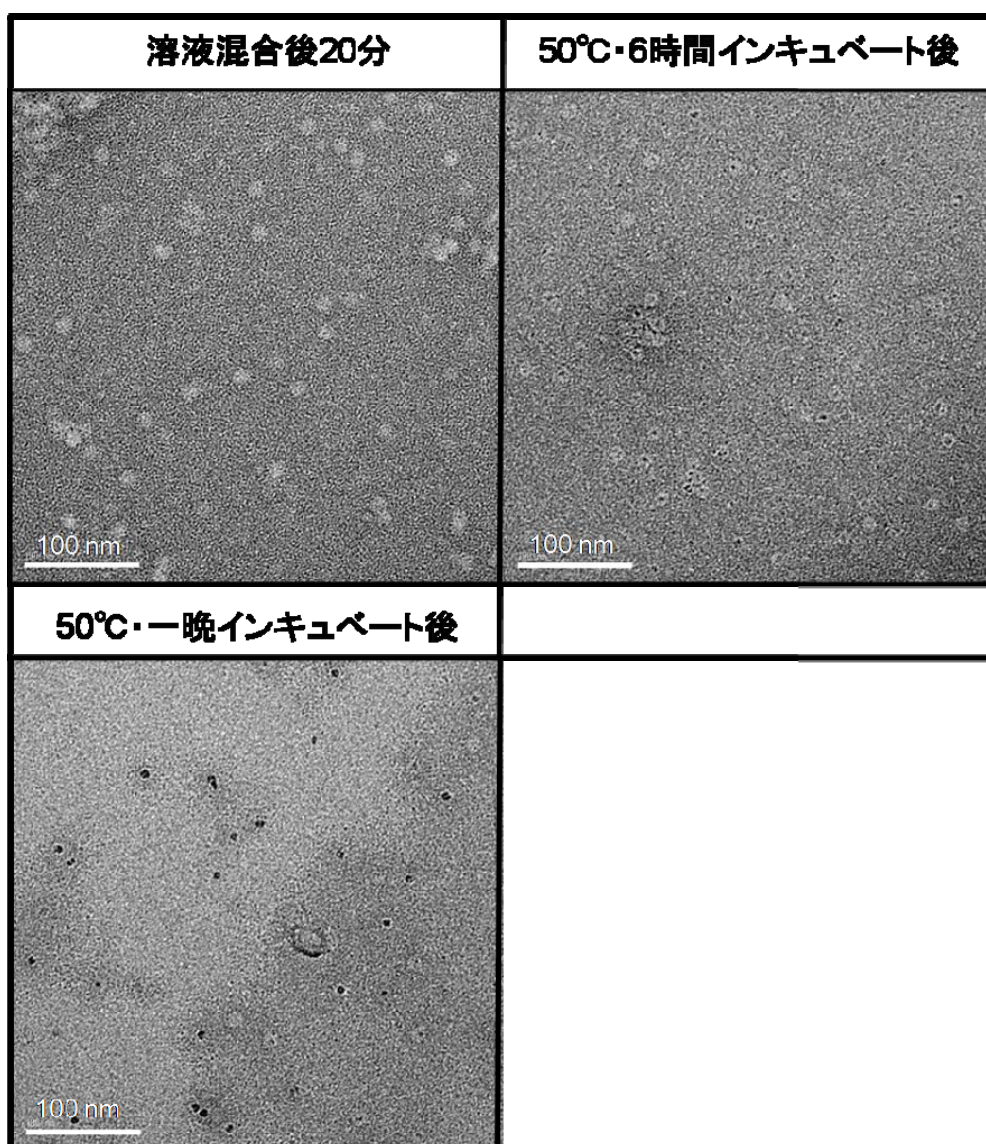


図 4-1 天然アポフェリチンを用いて作成した各溶液の透過型電子顕微鏡像
 (右上) 溶液混合後 20 分、(左上) 50℃・6 時間インキュベート後、(右下) 50℃・
 一晩インキュベート後、染色：1% 金グルコース

<実験方法>

天然アポフェリチンへの酸化コバルト導入最適溶液条件を用いて溶液を混合後、約 20 分間室温でインキュベートし、その後、50℃で一晩インキュベートした。
 室温で 20 分インキュベート後の溶液と 50℃・6 時間、50℃一晩インキュベート
 の溶液をそれぞれ透過型電子顕微鏡で観察を行った。

<実験手順>

1. 100 mM HEPES (pH8.3) に 0.5 mg/ml のポリエチレングリコール修飾アポフェリチン、または天然アポフェリチンと 37.5mM 硫酸ナトリウムを混合する。
2. 3 mM 硫酸アンモニウムコバルトを添加する。
3. 1.5 mM 過酸化水素水を添加し混合する。
4. 約 20 分間室温で攪拌し、溶液の一部を取り、透過型電子顕微鏡で観察を行う。
5. 50 °C のヒートブロックで 6 時間後インキュベート後、溶液の一部を取り、透過型電子顕微鏡で観察を行う。
6. 50 °C で、インキュベートする。
7. 透過型電子顕微鏡で観察を行う

<実験条件>

溶液濃度：100 mM HEPES (pH8.3) 、3 mM 硫酸アンモニウムコバルト、1.5 mM 過酸化水素水、37.5 mM 硫酸ナトリウム、0.5 mg/ml 天然アポフェリチン

測定装置：JEM-2200FS (日本電子)

染色：1%金グルコース

4-2 反応溶液混合 20 分後の溶液状態

反応溶液を混合して 20 分後の溶液は、溶液の色が茶色を呈している。しかし、透過型電子顕微鏡の観察により、空洞内でコア形成はしておらず、50 °C に加熱を行うと小さなナノ粒子ができて始めることが分かった。過酸化水素の添加により、酸化コバルトコアの形成が起こるのではなく、50 °C の加熱によりコア形成が始まることが分かった。これらの結果から、①過酸化水素水を添加したときに生じる反応、②50 °C でインキュベートした時に生じる反応の 2 段階があることが示唆された。そこで、反応溶液混合 20 分後の溶液の色が茶色に変化する現象に着目し、この反応について詳細を調べた。

水和コバルト溶液 (薄いピンク色) から茶色に変化を起こすということは、過酸化水素水の添加によりコバルトイオンが酸化されていることが示しており、溶液の呈している茶色は、コバルト酸化物に由来する。溶液混合後 20 分の溶液を 50 kDa の限外濾過膜 (セントリコン/ミリポア) にて、分子量 50 kDa 以上のアポフェリチン (約 480 kDa) を含む溶液と、50 kDa 以下のアポフェリチンを含まない溶液に分離した。分子量 50 kDa 以上の溶液は、濃縮されて濃い茶色溶液、50 kDa 以下の無色透明溶液をそれぞれ得た (図 4-2)。この 50 kDa 以下の溶液は、しばらく放置しても

溶液の色に変化は見られなかった。濃い茶色を呈しているコバルト酸化物は、分子量 50 kDa 以上のアポフェリチンの存在する溶液側にのみ存在していることになる。しかし、50 kDa 以上の溶液の透過型電子顕微鏡観察ではコア形成したフェリチンは確認できず、空洞内に何も内包していないアポフェリチンのみであった。この事より、この茶色のコバルト酸化物は、アポフェリチンの内部空洞に存在するものではなく、アポフェリチンの周囲に存在していることが示唆された。

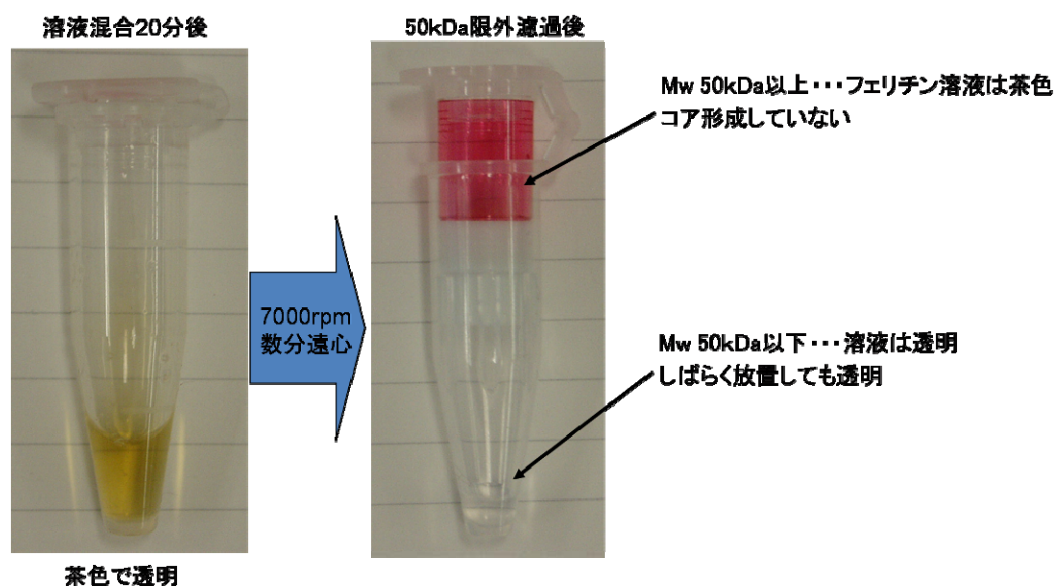


図 4-2 反応溶液混合後 20 分の溶液状態と限外濾過後の溶液状態

<実験方法>

天然アポフェリチンへの酸化コバルト導入最適溶液条件で溶液を混合後、約 20 分間室温でインキュベートした。この溶液を 50 kDa 限外濾過膜で 50 kDa 以上の溶液と 50 kDa 以下の溶液に分けた。

<実験手順>

1. 100 mM HEPES (pH8.3)、0.5 mg/ml 天然アポフェリチン、37.5 mM 硫酸ナトリウム 3 mM 硫酸アンモニウムコバルトを混合し、最後に 1.5 mM 過酸化水素水添加する。
2. 混合溶液を室温で 20 分間インキュベートする。
3. 50 kDa 限外濾過膜（セントリコン）に入れ卓上遠心機で数分間遠心する。
4. 50 kDa 以上と 50 kDa 以下の溶液を分けて溶液状態を観察する。

<実験条件>

溶液濃度：100 mM HEPES (pH8.3)、0.5 mg/ml 天然アポフェリチン、37.5 mM 硫酸ナトリウム、3 mM 硫酸アンモニウムコバルト、1.5 mM 過酸化水素水

4-3 レーザーラマン分光測定によるアポフェリチンの周囲に存在するコバルトイオンの解析

前節でアポフェリチンの周囲に存在するコバルト酸化物の存在が示唆された。そこで、このコバルト酸化物のコバルトイオンと配位子の間に形成される結合の状態をラマン分光測定を用いて調べ、アポフェリチン外表面付近で起きている現象について詳細な解析を進めた。

使用レーザーはAr イオンレーザー：514.5 nm で、4 分間の励起を行った。図 4-3 にレーザーラマン分光スペクトルを示す。純水置換したアポフェリチン（コントロール）では、ピークが確認できなかったが、天然アポフェリチンへの酸化コバルトナノ粒子作製最適溶液条件を用いて溶液を混合し、20 分後の溶液を限外濾過を行い得た 50 kDa 以上の濃縮溶液では、500～650 cm^{-1} でピークがみられた。このピークは、620 cm^{-1} に最大強度を持っており、Co-O の振動に帰属するものである。アルゴンイオンレーザーの照射時間が長く、レーザー照射によるタンパク質の変性が考えられるが、レーザー照射前と照射後にゲル濾過カラムによりアポフェリチンの四次構造を調べた結果、変化は見られず、変性が起こっていないことを確認している。しかし、Kr イオンレーザー：413 nm を用いた実験では、アポフェリチンが変性したため、測定ができなかった。この結果より、反応溶液混合後 20 分の状態の時にアポフェリチンの周囲に存在するコバルトは、Co-O の結合を持つ錯体であることが分かった¹⁻⁴。

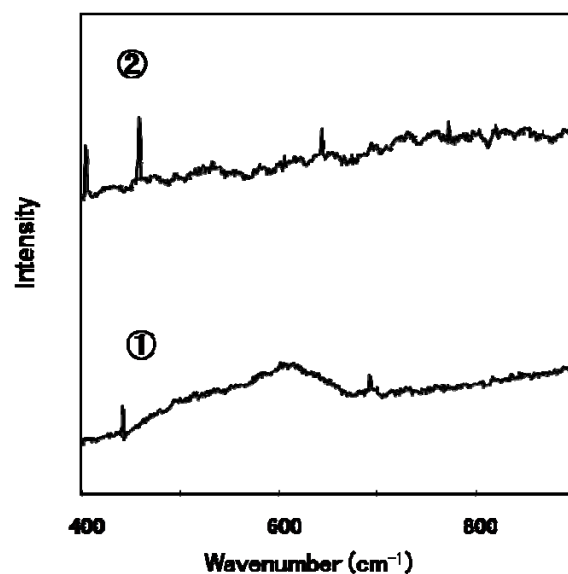


図 4-3 レーザーラマン分光スペクトル ①溶液混合 20 分後の 50 kDa 以上の濃縮
溶液・純水置換 ②コントロール：Fer8・純水置換

<実験方法>

天然アポフェリチンへの酸化コバルト導入最適溶液条件で溶液を混合後、約 20 分間室温でインキュベートし、限外濾過膜で濃縮・純水置換を行った。その後、この溶液のレーザーラマン分光測定を行った。

<実験方法>

1. 緩衝液の 100 mM HEPES (pH8.3) に最終濃度が 0.5 mg/ml になるように天然アポフェリチンを混合する。
2. 最終濃度が 37.5 mM になるように硫酸ナトリウムを、最終濃度が 3 mM になるように硫酸アンモニウムコバルトを添加・混合する。
3. 最終濃度が 1.5 mM になるように過酸化水素水を添加・混合する。
4. 室温で約 20 分間混合する。
5. 50 kDa 限外濾過膜を用いて純水に置換する。
6. 150 kDa 限外濾過膜を用いて更に濃縮する。
7. 石英セルに入れて、測定する。

<測定条件>

測定装置：NRS-2100（日本分光）

使用レーザー：Ar イオン（514.5 nm）疑似後方散乱

露光時間・積算回数：4 分・3 回

測定サンプル：

- 溶液混合後 20 分の溶液を限外濾過膜（50 kDa）で分離した 50 kDa 以上の茶色の溶液を純水で置換・濃縮
- アポフェリチン（Fer8）を純水置換・濃縮（コントロール）

4-4 紫外可視分光光度計による溶液混合後の時間経過と吸収スペクトルの関係

過酸化水素を添加後の反応溶液は、混合後 20 分で溶液の色がピンク色から茶色に変化を起こす。このピンク色は、配位子に水がついた構造をしている。このピンク色から茶色への変遷を紫外可視分光光度計により測定し、天然アポフェリチンを添加した状態と添加していない状態のスペクトル変化を調べた。

天然アポフェリチンへの酸化コバルトナノ粒子作製最適溶液条件で溶液を作製し、溶液混合1 分後から20 分後までの溶液の紫外可視光吸収スペクトルを1 分間隔で測定した結果を図4-4に示す。また、溶液混合後3 分、5 分、10 分、15 分後の溶液状態を図4-6に示す。天然アポフェリチンを添加した溶液では、時間経過につれて370 nm 付近の吸収のみが強くなり、極大吸収波長は移動せず、370 nm 付近の吸収を保っている（図4-4）。この吸収は、コバルトの d 軌道の電荷移動遷移に起因するものである。ラマン分光測定の結果から、アポフェリチンを添加した溶液で見られる370 nm 付近の吸収は、Co-O錯体を示すものであると考えられる。しかし、天然アポフェリチンを添加していない溶液では、時間経過とともに370 nm から450 nm 付近に極大吸収波長が移動することが分かる（図4-5）。また、混合3 分後では、天然アポフェリチンを添加した溶液も、添加していない溶液も透明度を保っている。しかしながら、5 分後以降は、天然アポフェリチンを添加した溶液では常に透明な茶色であるのに対し、天然アポフェリチンを添加していない溶液では、少しずつ沈殿形成が激しくなり濁り始める。この濁りが激しくなるにつれて、スペクトルの極大吸収波長が450 nm 付近に移動している。このことより、450 nm 付近の吸収は、溶液側での沈殿形成に由来しているものであることが考えられる。

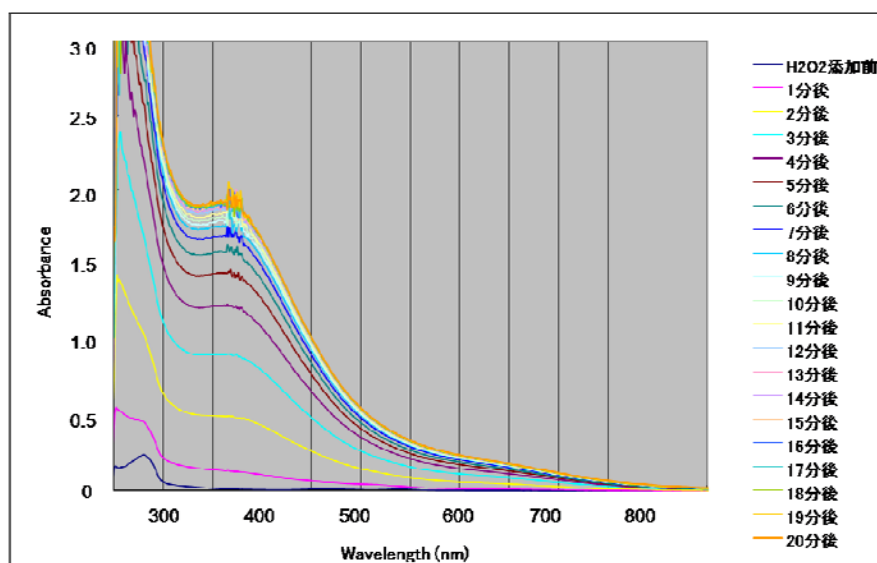


図 4-4 天然アポフェリチンを添加した時の溶液混合 1 分後から 20 分後までの溶液の紫外可視光吸収スペクトル

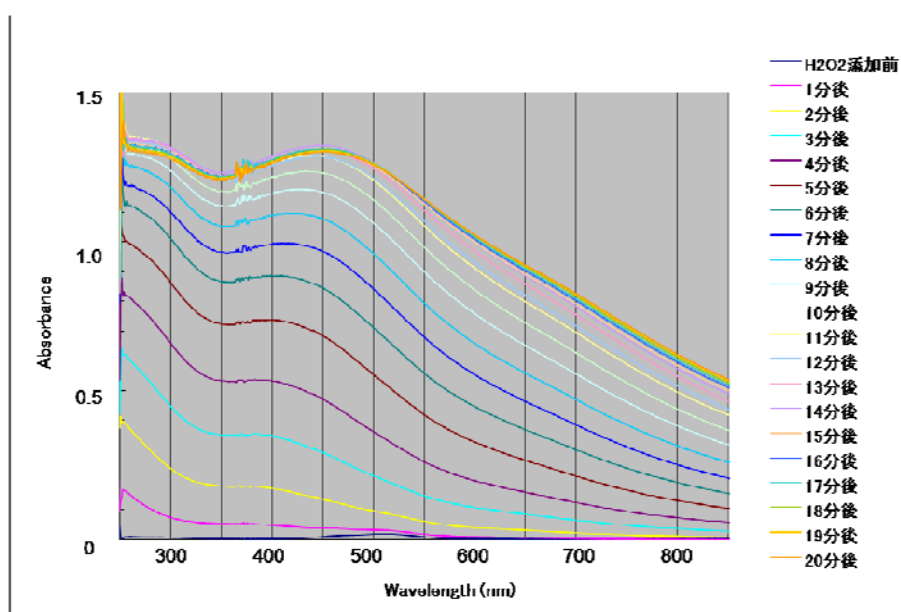


図 4-5 天然アポフェリチンを添加していない時の溶液混合 1 分後から 20 分後までの溶液の紫外可視光吸収スペクトル

	3分後	5分後	10分後	15分後	20分後
天然 アポフェリチン 有り					
天然 アポフェリチン 無し					

図 4-6 反応溶液混合 3 分後、5 分後、10 分後、15 分後、20 分後の溶液の状態
(上) 天然アポフェリチン添加あり (下) 天然アポフェリチン添加なし

<実験方法>

天然アポフェリチンへの酸化コバルト導入最適溶液条件で溶液を混合後、1 分後から 20 分後まで 1 分間隔で紫外可視光吸収スペクトルを測定した。また、天然アポフェリチンを添加していない溶液を同様の方法で作製し測定した。

<実験手順>

1. 100 mM HEPES (pH8.3) に最終濃度が 0.5 mg/ml になるように天然アポフェリチンを混合する。(天然アポフェリチンなしには、100mM HEPES を混合)
2. 最終濃度が 37.5 mM になるように硫酸ナトリウムを、3 mM になるように硫酸アンモニウムコバルトを添加・混合する。
3. 最終濃度が 1.5 mM になるように過酸化水素水を添加・混合する。
4. 溶液混合後、1 分から 20 分まで 1 分間隔で紫外可視分光光度計で吸収スペクトルの測定を行う。

<測定条件>

測定装置 : Ultrospec 3300 pro (アマシャムバイオサイエンス)

測定波長 : 250~900 nm

参照試料 : 100 mM HEPES (pH8.3)

測定サンプル : 天然アポフェリチンを添加あり、天然アポフェリチン添加なし

4-5 アポフェリチンを添加していない混合溶液で生じた沈殿の XRD 測定

天然アポフェリチンを添加していない反応溶液の混合 20 分後の溶液の紫外可視光吸収スペクトル測定では、アポフェリチンを添加した溶液のものとは異なる 470 nm 付近に極大吸収波長を持つ分光スペクトルを得た。この沈殿組成を XRD により測定を行った。しかし、結晶構造がアモルファスなため 1 つのピークとして観察できず、組成を知ることができなかった。そこで、天然アポフェリチンを添加していない反応溶液で 50 °C・一晚インキュベート後に生成している沈殿を使って XRD 測定を行った。

天然アポフェリチンへの酸化コバルト導入最適条件を用いて、天然アポフェリチンを添加せずに溶液を混合し、50 °Cで一晚インキュベートした。低速遠心機で生成した沈殿物を集め、純水で十分に洗浄し、乾燥後に粉末にしたサンプルの XRD スペクトルを測定した。図 4-7 に XRD 測定結果を示す。ピークはブロードで沈殿が微小結晶からなっていることを示している。このスペクトルでは、アポフェリチンの空洞で形成される Co_3O_4 の XRD スペクトルには無いピークが $2\theta = 50$ 度付近に観測された。このピーク及び他のピーク位置から判断すると、沈殿の微結晶は水酸化コバルト $\text{CoO}(\text{OH})$ と判断される。すなわち前章で示した紫外可視光吸収スペクトル測定で 450 nm 付近に吸収を持つ沈殿は、50 °Cに加熱することで水酸化コバルトになるものである。この吸収は、アポフェリチンの存在する反応溶液では見られない。アポフェリチンの内部空洞で析出するコバルトは、酸化コバルト Co_3O_4 であるが、アポフェリチンを含まない混合溶液で生じた沈殿は、水酸化コバルト $\text{CoO}(\text{OH})$ である。この結果は、アポフェリチンの空洞内で析出する酸化コバルト結晶形成反応と外溶液で起こっている反応とが異なることを示している。これまでのフェリチンの酸化鉄のコア形成のメカニズムの解析結果から、グルタミン酸などのマイナスチャージを持つアミノ酸が高密度に集まる内表面部分が、結晶核を生成してコアを作るとされている。酸化コバルトのナノ粒子作製においても内部空洞表面に存在するグルタミン酸などのマイナスチャージを持つアミノ酸が関与し、ナノ粒子の結晶核の生成が起きていると類推される。

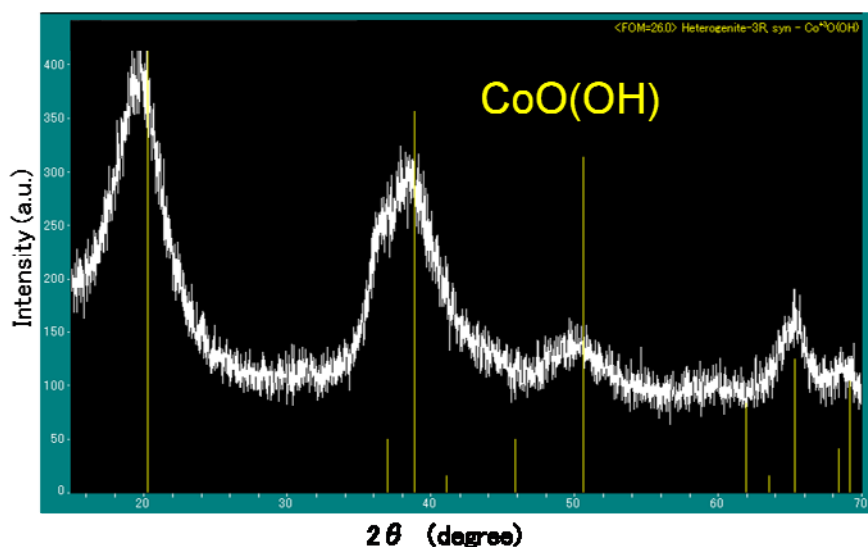


図 4-7 天然アポフェリチンへの酸化コバルト導入最適溶液条件にアポフェリチンを添加せず一晩インキュベートした時に生じた沈殿物の XRD スペクトル
下から伸びる黄色の線は、 $\text{CoO}(\text{OH})$ のピーク位置を示す。

<実験方法>

天然アポフェリチンへの酸化コバルト導入最適溶液条件で、天然アポフェリチンを抜いて溶液を作製した。50 °Cで一晩インキュベート後、沈殿を集めて純水で洗浄したものを XRD 測定した。

<実験手順>

1. 緩衝液の 100 mM HEPES (pH8.3) に 37.5 mM 硫酸ナトリウムを、3 mM 硫酸アンモニウムコバルト、1.5 mM 過酸化水素水を添加・混合する。
2. 室温で約 20 分間混合する。
3. 50 °Cで一晩インキュベートする。
4. 遠心機で生成した不要な沈殿物を取り除く。
5. 純水で懸濁し、遠心機で沈殿物を集める作業を数回繰り返して洗浄する。
6. 沈殿物を窒素で乾燥させる。
7. メノールのすり鉢とすり棒を用いて粉状にする。
8. XRD サンプル台に載せ、測定する。

<測定条件>

測定手法：2θ - θ 法

2θ = 10~80°

ステップ角幅：0.02°

固定時間：5 秒

入射 X 線：CuK α 1 : 1.5418 Å

管電圧：50 kV、管電流：200 mA

使用機器：RIGAKU 社製；RENT2500/PC

4-6 アポフェリチン・ポリエチレングリコール修飾アポフェリチンへの酸化コバルト導入初期過程の考察

アポフェリチンへの酸化コバルト導入の初期段階において、反応溶液混合 20 分後の段階でアポフェリチンの周囲に存在している茶色のコバルト酸化物は、Co-O 錯体である。反応溶液を室温でインキュベートを行ってもコア形成は起こらず、溶液の状態にも変化が見られないことより、この Co-O 錯体は、室温では安定であることが明らかになった。しかし、アポフェリチンを添加していない溶液では、反応溶液を混合後、時間が経過するに伴い水酸化コバルト CoO(OH) の前駆体の形成が進み、沈殿が生じる。この水酸化コバルト前駆体を生じる反応溶液の初期段階の紫外可視光吸収スペクトルでも、350 nm 付近の Co-O 錯体のスペクトルが見られることより、一旦は、Co-O 錯体が生じ、次に CoO(OH) 前駆体を形成する反応が起きていると考えられる。アポフェリチンを添加している溶液では、CoO(OH) 前駆体を示す 450 nm への極大吸収の移動は見られないことより、アポフェリチンの外表面は、Co-O 錯体の水酸化を防ぐ、又は、Co-O 錯体の安定化を行っていることが示された。

前章で示したポリエチレングリコール修飾アポフェリチンへの酸化コバルト導入実験の結果と、本章で明らかになった反応溶液混合 20 分後のアポフェリチンの周囲に存在する Co-O 錯体について考察すると、以下の様なコア形成のプロセスが生じていると考えられる。

まず溶液に加えた硫酸アンモニウムコバルトから、コバルトに 6 つの水が配位した水和コバルト（薄いピンク色）が作られる。この水和コバルトに過酸化水素水を添加するとコバルトの酸化が起こり、Co-O 錯体が生じる。この Co-O 錯体はプラスチャージを持っており、弱アルカリ性溶液条件下のアポフェリチンは、マイナスチャージを帯びているため、Co-O 錯体は、アポフェリチンの周囲に静電相互作用により集まる。集まった Co-O 錯体は、室温においてはアポフェリチンの外表面と何らかの相互作用を生じ安定化されて Co-O 錯体のまま保持される。一方、アポフェリチンが存在しない時は、Co-O 錯体は不溶性の CoO(OH) 前駆体の生成へ化学反応が進み

CoO(OH) 前駆体の微結晶沈殿を生じる。図 4-8 に推測される過酸化水素水添加直後のアポフェリチンの周りの様子の模式図を示す。

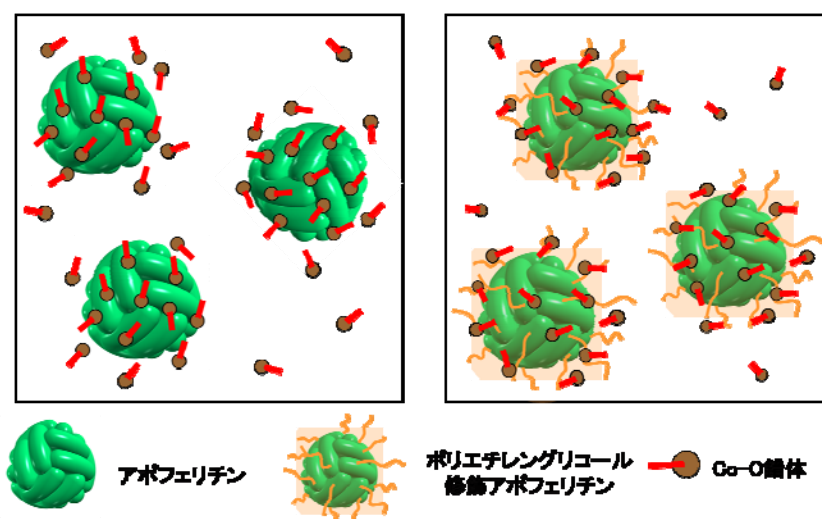


図 4-8 過酸化水素水添加直後のアポフェリチンの周りの様子の模式図

アポフェリチンの周囲に集り安定化されている Co-O 錯体は、反応溶液が 50 °C に加熱されると不安定になり、コバルトイオンを遊離する。この遊離されたプラスチャージのコバルトイオンは十分にイオン半径が小さいため、三回対称チャネルからアポフェリチンの内部空洞に入ることができる。この駆動力は、内部空洞表面にある核形成部位のアミノ酸のマイナスチャージであり、アポフェリチンの内表面と外表面の静電的ポテンシャルの差は 200 mV と計算されている。そして、内部空洞に入ったコバルトイオンは静電相互作用で核形成部位に高濃度に集まり、酸化され酸化コバルトナノ粒子 (Co_3O_4) を形成する。

ポリエチレングリコール鎖が存在する時は、アポフェリチンの外表面での安定化以上に、ポリエチレングリコール鎖の間で Co-O 錯体が安定に保持される。実験結果から判断すると、ポリエチレングリコール鎖が長い時は、より多くの Co-O 錯体を溶液側で生じる沈殿との接触から守りながら保持することができ、Co-O 錯体の密度がアポフェリチン近傍で局所的に高くなる。すなわち、PEG2000、PEG5000 を修飾したアポフェリチンで 5 mM コバルトを用いた時の 50 °C 一晚インキュベート後の溶液では、PEG2000 修飾アポフェリチンでは少しの沈殿が見られるが、PEG5000 修飾アポフェリチンでは沈殿形成が見られず、溶液の茶色がより濃くなっていることがこの推論を支持する (図 4-9)。おそらく、ポリエチレングリコール鎖の O 部位に Co-O 錯体が配位し、安定化されていると考えられる。そのため、長いポリエチレングリコール鎖を修飾しているアポフェリチンがより多く Co-O 錯体を配位させることがで

きると考えられる。PEG2000、PEG5000 を修飾したアポフェリチンを用いた実験における 50 ℃・一晚インキュベート後のアポフェリチンの周囲の状態は、酸化コバルトナノ粒子を形成したフェリチンの周りにポリエチレングリコール鎖と配位した Co-O 錯体が残存している状態と考えられる。

ポリエチレングリコール鎖が無い時は、50 ℃の加熱により溶液側で生じる水酸化コバルトの沈殿とアポフェリチン外表面が接触する機会が増加する。コバルト濃度が上昇するにつれて沈殿形成が激しくなる本反応系では、コア形成したフェリチンの外表面と形成された沈殿が接触し、共沈現象が激しくなる。

ポリエチレングリコール修飾アポフェリチンでは、ポリエチレングリコール鎖中で、Co-O 錯体を保持でき、溶液側で生じる水酸化コバルトの沈殿とのアポフェリチンの外表面の相互作用を抑制することができる。そのため、溶液側で生じた沈殿とアポフェリチンの共沈現象を防ぎ、効率良く内部空洞にコバルトイオンの供給ができ、コア形成が行われたと考えられる。図 4-10 に 50 ℃加熱によるコア形成反応開始後のアポフェリチンの周りの様子の模式図を示す。

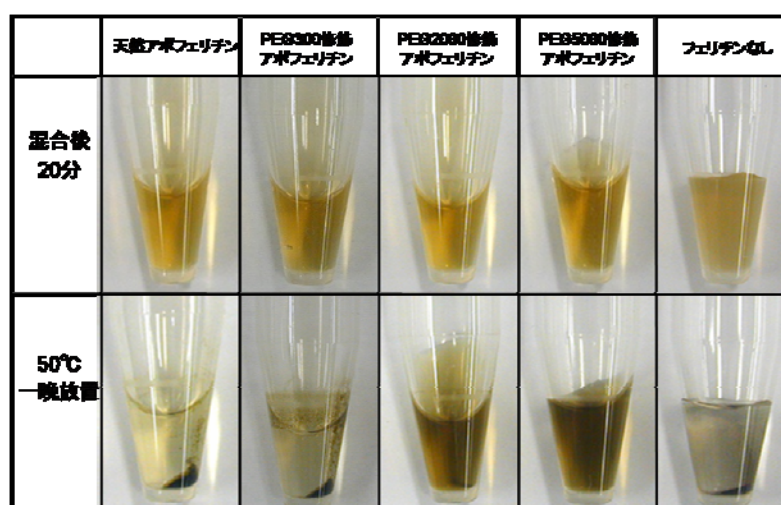


図 4-9 5 mM コバルト濃度 (2.5 mM 過酸化水素) で酸化コバルト導入実験を行った時の天然アポフェリチンとポリエチレングリコール修飾アポフェリチンへの酸化コバルト導入の溶液状態 (上) 溶液混合 20 分後 (下) 50 ℃・一晚インキュベート後

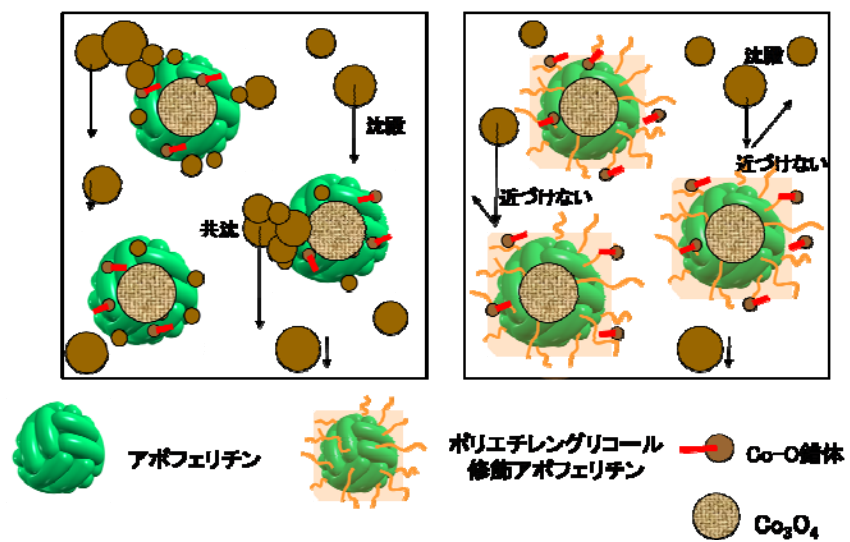


図 4-10 50 °C加熱によるコア形成開始後のアポフェリチンの周りの様子の模式図

4-7 まとめ

以上の結果をまとめると、アポフェリチンへの酸化コバルトナノ粒子の形成においては、以下の様な現象が起こっていると考えられる。

反応溶液が中性からアルカリ性ではアポフェリチン外表面は全体としてマイナスチャージを帯びているため、過酸化水素水の添加によって生じたプラスチャージを帯びた Co-O 錯体は、静電相互作用によりアポフェリチンの外表面付近に集まる。

その後、50 °Cに加熱することで Co-O 錯体の構造に変化起こり、コバルトイオンを遊離し、内部表面のチャージの影響を受けて三回対称チャネルを通り、アポフェリチン内部空洞に入る。空洞内に入ったコバルトイオンは、酸化活性中心や内表面のマイナスチャージによりコア形成を開始する。図 4-11 に模式図を示す。

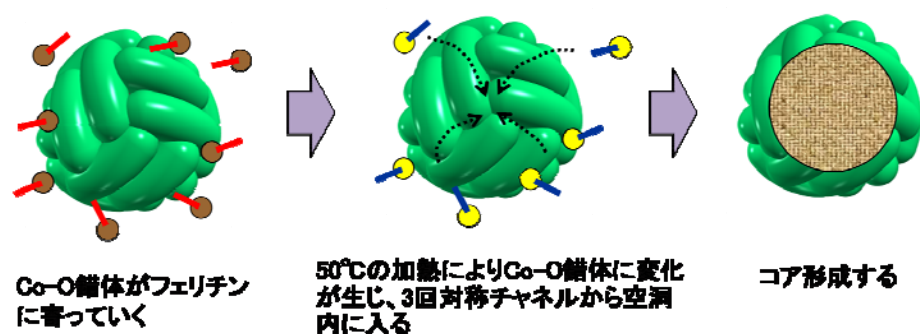


図 4-11 アポフェリチンへの酸化コバルト導入初期段階に生じていると示唆される現象の模式図

第 4 章 参考文献

1. S. Hikichi, H. Komatsuzawa, N. Kitajima, M. Akita, M. Mukai, T. Kitagawa, Y. Morooka, *Inorg. Chem.*, 1997, 36, 266.
2. V. M. Miskowski, *Comments Inorg. Chem.*, 1987, 6, 4, 193.
3. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Kazuo Makamoto, Wiley-Interscience., 1997
4. 増田秀樹, 福住俊一, 生物無機化学, 三共出版, 2005

第5章 タバコモザイクウイルス (TMV) を用いたコバルト白金ナノワイヤの作製

5-1 はじめに

現在までに、チューブ状タンパク質のタバコモザイクウイルス (TMV) のコートタンパク質 (TMV) をバイオテンプレートとして用いたナノ構造の作製が報告されている¹⁻⁴。Mann 博士らの研究では、反応溶液の pH を酸性に調整し、TMV の外表面存在するアミノ酸のリジンとアルギニン残基にプラスチャージを持たせることで、マイナスチャージを持つ白金と金の錯イオンを利用して、TMV の外表面に白金と金の析出に成功している。また、反応溶液を中性にすることで TMV の内部空洞を全体としてマイナスチャージにして銀イオンを導入し、光還元で TMV の空洞内にナノ粒子を作製している⁵。Stowell 博士は、TMV のコートタンパク質のサブユニットの C 末端にリジン残基を導入し、光励起を行う物質を修飾することで、TMV の外表面に銅を析出させた⁶。Knez 博士らは、TMV の内部空洞にパラジウムまたは白金イオンのマイナスチャージの錯体イオンを導入し、触媒として機能する程度の微量の析出に成功し、この微小触媒を用いて無電解メッキを行うことで、コバルトワイヤとニッケルワイヤの作製に成功している⁷。しかし以上のような報告はあるが、TMV をテンプレートとする無機材料の析出報告総数は少なく、析出メカニズムも分かっていない。また TMV 内部空間での金属ナノワイヤ作製においては、単体金属 (ニッケル、コバルト) の報告はあるが、二元金属間化合物の作製の報告は全くない。本研究では、二元金属間化合物であり高保磁力を有した磁性材料として注目されているコバルト白金のナノワイヤを TMV の内部空洞を用いて作製することを試みた。この研究では、導入する白金イオンがマイナスチャージを持ち、コバルトイオンはプラスチャージを持つため、同時に異なるチャージを持つイオンを導入することが重要となることが予想された。

5-2 本研究で用いた TMV

TMV は、タバコモザイク病などの病原体であり、発見以来、植物病理学のみならず、構造化学、生化学、分子生物学、ウイルス学などの分野で常に先駆的な役割を果たし続けてきた。TMV のコートタンパク質は同一の 158 アミノ酸残基から成るサブユニットがらせん状に一周あたり 16.3 個が積み重なり、合計 2130 個で一つのチューブ状構造を形成している^{8,9}。TMV の長さは、約 300nm、直径 18nm、内部空洞の

直径約 4nm で、一本鎖 RNA1 分子 (6400base) をサブユニットの 90 番目と 92 番目のアルギニンとイオン結合で、37 番目のスレオニンとは水素結合でサブユニットの間に挟み込んだ構造を作り、細胞の持つ酵素による分解から守っている^{9,10}。TMV は 90 °C の加熱にも耐え、pH3.5 から 9 で安定な構造を保つことができ、有機溶媒にも耐性を持つ強靱なタンパク質である。TMV は、主として宿主植物や病徴の違いを基準にして名前が付けられており、いくつかの系統に分けられている。

本研究では、U1 (タバコモザイクウィルス・タバコの葉から単離) と ToMV (トマモザイクウィルス・トマトの葉から単離) の 2 種類の TMV コートタンパク質を用いた。TMV の内部空洞へのコバルト白金ナノワイヤ作製における最適溶液条件の探索には U1 を用い、遺伝子的にアミノ酸を改変した TMV へのコバルト白金ナノワイヤ作製実験には、TMV と非常に近縁の ToMV を用いている。U1 は、アメリカからコートタンパク質の状態で購入した。この U1 と ToMV のコートタンパク質のアミノ酸組成は、84% の相同性があり、ほぼ同じ性質や物性をもつものとして扱うことができる¹¹。ToMV は、東京大学大学院総合文化研究科 渡辺雄一郎教授に遺伝子を頂き、本研究室でタバコに感染させて作製したコートタンパク質である。図 5-1 に U1 と ToMV のアミノ酸配列を示す。TMV の内部空洞の表面には、グルタミン酸が多く存在し、溶液条件が中性の時は、マイナスチャージを帯びていると予想される。一方、外表面には、チャージを持つアミノ酸は存在していない。

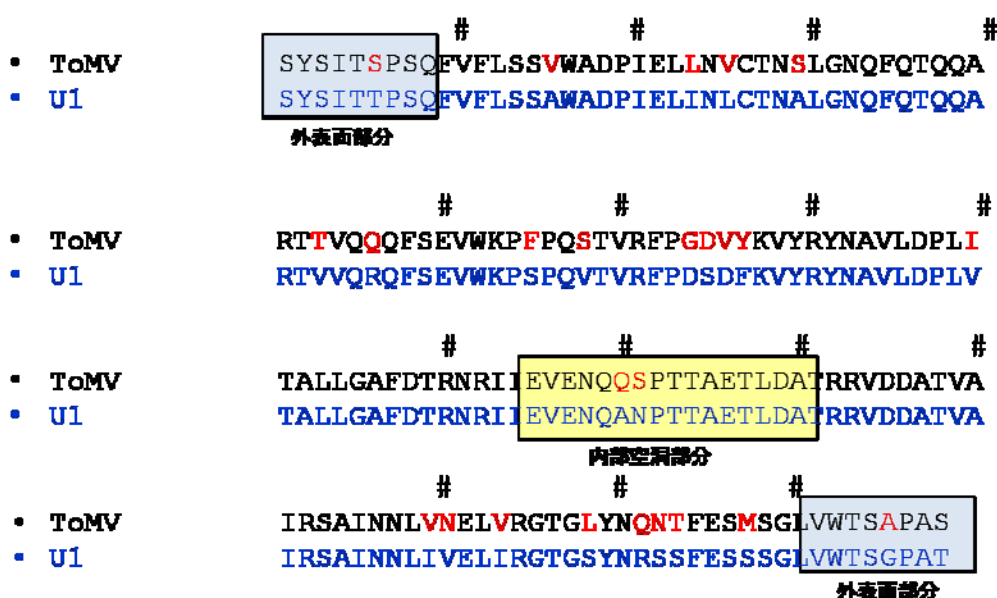


図 5-1 TMV を構成しているアミノの配列
(黒) ToMV のアミノ酸配列 (青) U1 のアミノ酸配列

図 5-2 は、TMV の内部空洞を含む断面図を模式的にリボンモデルで描いたものである。TMV のコートタンパク質のアミノ酸残基 90 番目から 113 番目の領域は、固定した構造を取っておらず、中心の穴に向かって大きく開いているような構造をしており、RNA の結合部位になっている^{12,13}。RNA は、上下 2 つのサブユニットの間に挟まれた状態で存在し、1 つのサブユニットに RNA の 3 塩基が結合している。2 つのリン酸基は、90 番目と 92 番目のアルギニンとイオン結合で、1 つのリン酸基は 37 番目のスレオニンと水素結合のペアを作っている。C 末端と N 末端は、外側に突き出しており、C 末端の 155 番目から 158 番目のアミノ酸は不安定である。

先述したように、本研究では異なるチャージを持つイオンを導入するため、TMV の内部表面でのアミノ酸のチャージの状態がコバルト白金の析出の重要な要素となると考えられた。そこで、本研究では用いた ToMV に遺伝子的改変を加えて以下の 2 種類の遺伝子的改変体を作製した。

- プラスチャージ導入 ToMV・・・97 番目と 106 番目のグルタミン酸をリジンに置き換え、空洞内にプラスチャージを増加した TMV
- マイナスチャージ導入 ToMV・・・・・・・・100 番目のグルタミンをグルタミン酸に置き換え、空洞内にマイナスチャージを増加した TMV

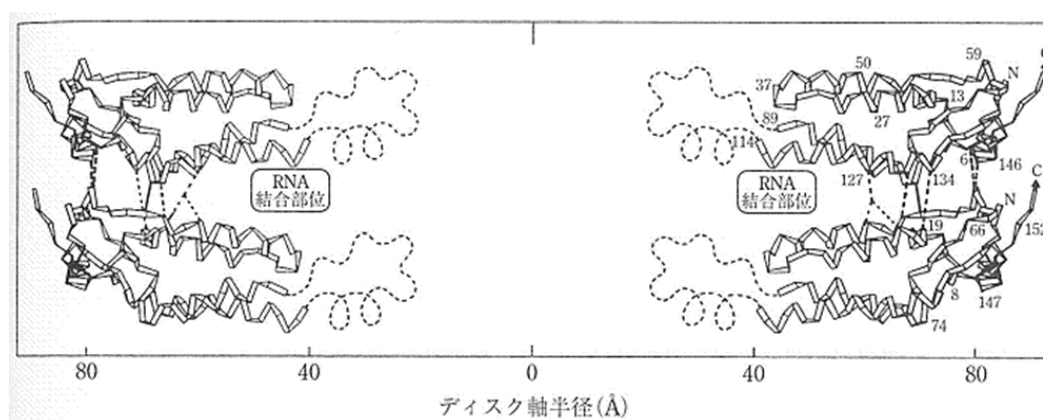


図 5-2 TMV のコートタンパク質の X 線回折により得られた立体構造 (内部空洞を含む断面図)

5-3 攪拌方法の検討

アポフェリチンでは、プラスイオンを通過しやすい構造を持つ3回対称部位に存在する8つのチャンネルから、金属イオンが導入され、内部空洞そのものも直径が7 nmの微小空洞である。そのため、内部空洞へのイオンの供給は迅速に均等に行われると思われる。一方、TMVでは、300 nmの両端に開口部を持つ筒状のため、中心孔は、直径が4 nmで長さが300 nm、アスペクト比（長さ/直径）が75という構造である。そのため、ナノワイヤを構成する材料となる金属イオンが十分に拡散して供給されることが課題となる。この問題を解決するため反応溶液の攪拌方法の検討を行った。検討する方法として、溶液全体を振動させるという点から水平偏芯振動式の振とう攪拌装置を、溶液全体の振動ではなく各金属イオンや還元剤やTMVの分子の振動を目的とする点から超音波照射を採用した。この方法は、超音波の出るチップの先端を直接反応溶液に浸す方法である。ワイヤ形成の確認は透過型電子顕微鏡観察により行った。染色液は、金グルコース染色を採用した。この金グルコースは、理由は明白ではないが、内部空洞を染めることができない。図5-3に金グルコースでTMVの内部空洞が染色できない様子を示す。白く見える部分がTMVのコートタンパク質部分である。電子顕微鏡像のバックグラウンドが荒いが、これは染色液として使用している金グルコースに電子線が照射されることによって形成された金ナノ粒子の影響である。

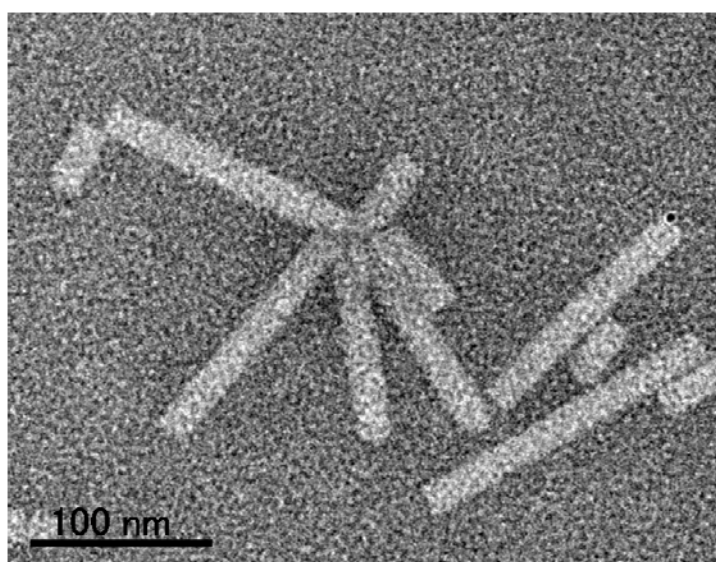


図 5-3 1%金グルコース染色で TMV の内部空洞が染まらない様子

振とう攪拌、または超音波照射を採用した時のナノワイヤ作製実験の反応溶液の透過型電子顕微鏡像を図 5-4 に示す。白く見える部分がタンパク質部分で黒く見えるドットや黒い線状の構造は作製されたナノ粒子・ナノワイヤである。水平偏芯震動式の振とう攪拌装置を用いてワイヤ作製実験を行った場合、10~20 nm のワイヤが形成された。しかし、それ以上の長さのワイヤは確認できなかった。超音波照射を用いてワイヤ作成実験を行った時は、TMV の内部空洞に 50~70 nm のワイヤが形成されているのが確認できた。さらに、ウォーターバス式の超音波洗浄機での超音波照射を行ったが、効果は見られずワイヤ形成は確認できなかった。振とう攪拌では、溶液全体が動くことになり、金属イオンの拡散は行えていないと考えられる。一般的に、超音波の出るチップを直接溶液に浸漬して超音波照射を行った際にできる気泡は、局所的に高温高压条件を形成し水分子を分解してラジカル形成が起こっているとされる。今回の実験では、発生した気泡やラジカルの影響は明瞭ではないが、TMV の内部空洞での金属イオンの拡散に超音波エネルギーが寄与したことは明らかである。

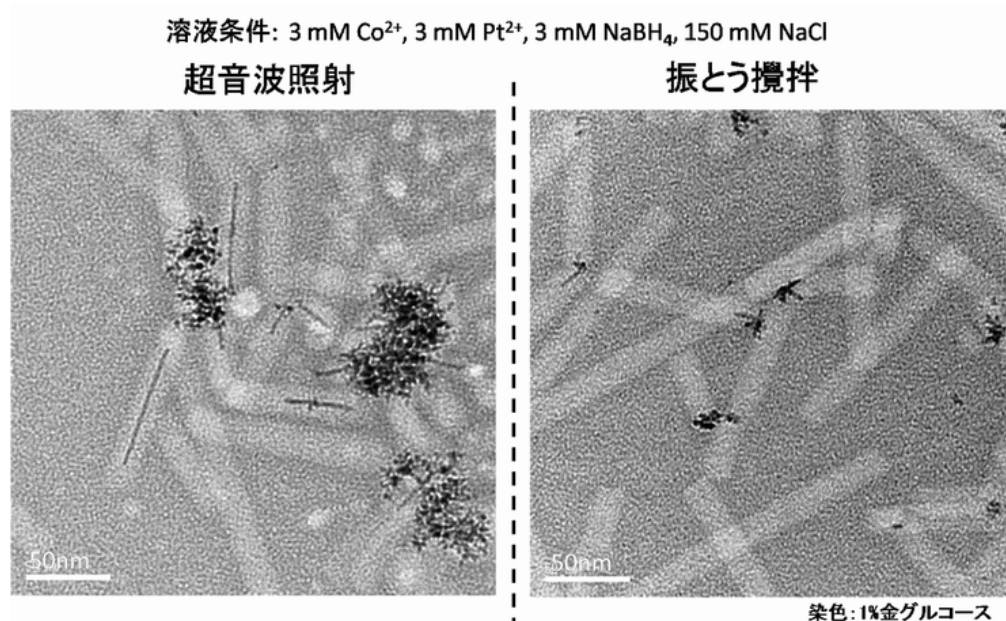


図 5-4 反応溶液の攪拌方法の検討

(左) 超音波照射で攪拌 (右) 振とう攪拌

染色: 1%金グルコース

<実験方法>

0.3 mg/ml TMV に数回に分け硫酸アンモニウムコバルト・塩化白金カリウムと水素化ホウ素ナトリウムを、最終濃度 3mM になるまで添加した。攪拌は超音波の出るチ

ップの先端を溶液に浸し、5 秒間隔で 1 秒間の超音波照射を行った。反応終了後の溶液を透過型電子顕微鏡で観察を行った。

<実験手順>

1. 150 mM NaCl に TMV 濃度が 0.3 mg/ml になるように混合する。混合は振とう攪拌または超音波照射を行う。
2. 0.5 mM 硫酸アンモニウムコバルトと 0.5 mM 塩化白金カリウムをを添加し、攪拌する。
3. 0.5 mM 硫酸アンモニウムコバルトと 0.5 mM 塩化白金カリウムをを添加し、攪拌する。
4. 0.5 mM 水素化ホウ素ナトリウムを添加し、攪拌する。
5. 0.5 mM 水素化ホウ素ナトリウムを添加し、攪拌する。
6. 2～5 の操作を 3 mM になるまで、この操作を繰り返す。

＊ すべての操作は水中で行う

7. 透過型電子顕微鏡で観察する

<実験条件>

溶液濃度：3 mM 硫酸アンモニウムコバルト、3 mM 塩化白金カリウム、3 mM 水素化ホウ素ナトリウム

比較攪拌方法：超音波照射と水平偏芯振動式振とう攪拌

使用 TMV：0.3 mg/ml U1-TMV

測定装置：JEM-2200FS(日本電子)

染色：1%金グルコース

5-4 コバルトイオン源と白金イオン源の選択

前節で、硫酸アンモニウムコバルトと塩化白金カリウムで TMV の内部空洞でのナノワイヤ作製実験を行い、ワイヤ形成が確認できたが、他の試薬でもワイヤの形成ができるかどうかを確かめた。

さまざまなコバルト化合物や白金化合物が試薬として市販されているが、水溶液中でタンパク質を用いたミネラルリゼーションを行うために、まず有機溶媒を必要とする化合物を除外し、コバルトイオン源には、水溶性の試薬として一般的に使用される硫酸アンモニウムコバルト、塩化コバルト、白金イオン源としては、塩化白金酸、塩化白金カリウムを選択し、比較を行った。試薬の検討は、金属イオン濃度と還元剤濃度を 3 mM に固定してナノワイヤ作製実験を行い、透過型電子顕微鏡で観察を行いその結果を考察することで行った。

各試薬を用いて行ったナノワイヤ作製実験の反応溶液の透過型電子顕微鏡像を図 5-4 に示す。白く見える部分が TMV のコートタンパク質部分、黒い線状のものが作製されたナノワイヤ、ドット状のものが作製されたナノ粒子である。

塩化白金酸を用いると、TMV 内部空洞よりも TMV 側面でのナノ粒子の形成速度が速く、TMV 全体がナノ粒子で覆われている様子が観察され、TMV の内部空洞での析出は観察できなかった。この様子は、塩化コバルト、硫酸アンモニウムコバルトの両方で同じ傾向を示した。一方、塩化白金カリウムを使用すると、TMV 側面がナノ粒子で覆われている様子は見られず、TMV の端への金属析出が目立った。塩化コバルト、硫酸アンモニウムコバルトの両方で内部空洞での金属析出が確認できた。特に、硫酸アンモニウムコバルトを用いた時は、20~30 nm のワイヤ形成が確認された。塩化白金カリウムを用いた時には TMV 側面でのナノ粒子形成は見られず、塩化白金酸を用いた時に TMV 側面でのナノ粒子形成がみられた現象は、塩化白金酸を加えると溶液の pH が下がり、金属析出の速度が速くなったためと考えられる。

これらの結果より、塩化白金カリウムと硫酸アンモニウムコバルトを最適な金属イオン源として以降の実験を進めた。

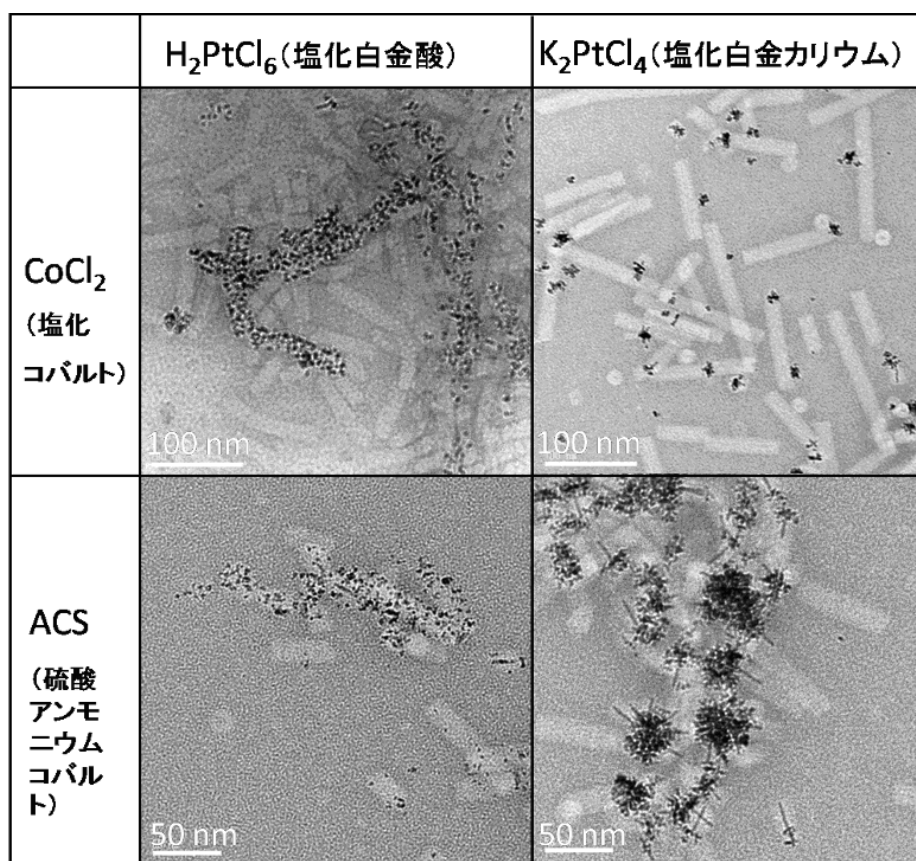


図 5-4 コバルトイオン源と白金イオン源の組み合わせの検討

染色：1%金グルコース

<実験方法>

0.3 mg/ml TMV に数回に分けコバルトイオン源と白金イオン源と水素化ホウ素ナトリウムを混合した。最終濃度 3mM になるまで添加を行った。攪拌は、超音波の出るチップの先端を溶液に浸し、5 秒間隔で 1 秒間の超音波照射を行った。反応終了後の溶液を透過型電子顕微鏡で観察を行った。

<実験手順>

1. 150 mM NaCl に TMV 濃度が 0.3 mg/ml になるように混合する。混合は振とう攪拌または超音波照射を行う。
2. 各コバルトイオン源 0.5 mM と各白金イオン源を 0.5 mM を添加し、攪拌する。
3. 各コバルトイオン源 0.5 mM と各白金イオン源を 0.5 mM を添加し、攪拌する。
4. 0.5 mM 水素化ホウ素ナトリウムを添加し、攪拌する。
5. 0.5 mM 水素化ホウ素ナトリウムを添加し、攪拌する。
6. 2～5 の操作を 3 mM になるまで、この操作を繰り返す。

*すべての操作は氷中で行う

7. 透過型電子顕微鏡で観察する

＜実験条件＞

検討金属イオン

コバルトイオン：塩化コバルト， 硫酸アンモニウムコバルト

白金イオン：塩化白金酸， 塩化白金カリウム

イオン濃度：各 3 mM

使用還元剤：水素化ホウ素ナトリウム

攪拌方法：超音波照射 (Digital Sonifier, BRANSON)

染色：1%金グルコース

使用 TMV：0.3 mg/ml U1-TMV

測定装置：JEM-2200FS (日本電子)

5-5 TMV へのコバルト白金ナノワイヤ作製の最適作製法

前節までの結果を基に、TMV へのコバルト白金ナノワイヤ最適作製法を決定した。手順を図 5-5 に示す。

150 mM NaCl に TMV 濃度が 0.3 mg/ml になるように混合し、0.5 mM 硫酸アンモニウムコバルトと 0.5 mM 塩化白金カリウムをを添加する。反応中は溶液に超音波の出るチップの先端を直接溶液に浸漬し 5 分間、1 秒オン・5 秒オフのプログラムで超音波照射を行うことで溶液を混合する。更に 0.5 mM 硫酸アンモニウムコバルトと 0.5 mM 塩化白金カリウムを添加する。次に 0.5 mM 水素化ホウ素ナトリウムを添加し 5 分後に再び 0.5 mM 水素化ホウ素ナトリウムを添加する。この操作を目的の金属イオン濃度になるまで繰り返す。超音波照射により溶液温度が上昇するため、すべての操作は氷中で行う。なお、添加する金属イオンの濃度比を変えてもナノワイヤの形成は可能であり、組成比の異なるコバルト白金ナノワイヤを得ることができる。

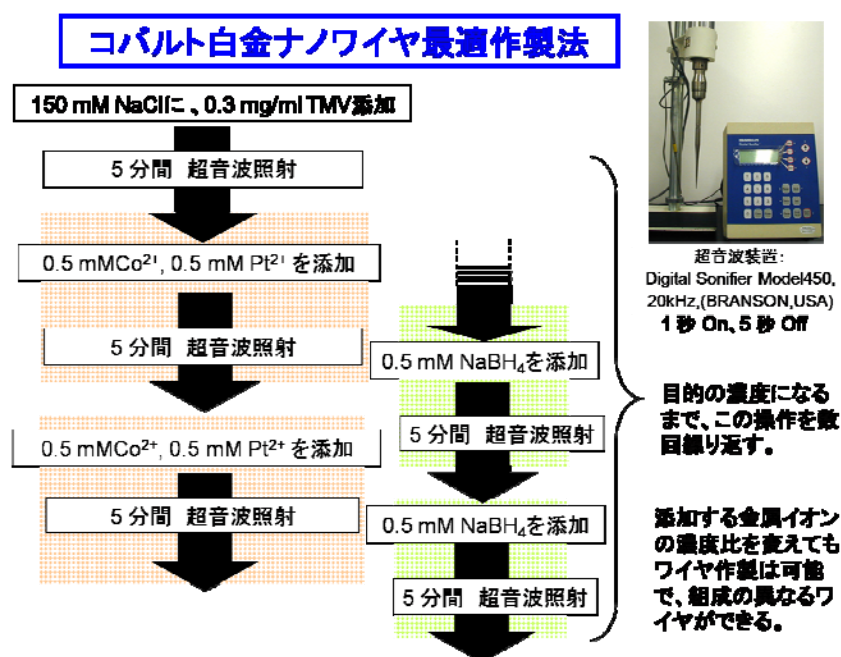


図 5-5 TMV の内部空洞を用いたコバルト白金ナノワイヤ作製の最適作製法

5-6 作製したナノワイヤの透過型電子顕微鏡像とワイヤ長さ分布

TMV の内部空洞でのコバルト白金ナノワイヤ最適作製法で、3 mM 硫酸アンモニウムコバルト、3 mM 塩化白金カリウム、3 mM 水素化ホウ素ナトリウムを用いて、超音波を照射しながら作製したナノワイヤの透過型電子顕微鏡観察を行った。透過型電子顕微鏡像を図 5-6、図 5-7 に示す。

TMV の内部空洞に 40~60 nm の長さのワイヤが形成されていた。。観察視野に見られる TMV へのナノワイヤ形成率は、約 34%である。図 5-8 に作製したナノワイヤの長さ分布を示す。30 nm 前後のワイヤが多く、全体の約 3 割を占める。しかし、100 nm を超えるものも 1 割存在する。作製したナノワイヤの平均長は、42 nmであった。全くワイヤを形成しない TMV と長いワイヤを形成する TMV が存在することより、内部空洞に金属イオンが入りやすい TMV と入りにくい TMV があることが示された。一旦、TMV の内部空洞に金属イオンが析出しはじめると内部環境に変化が生じ、金属イオンが入りやすくなり、ワイヤ形成が促進されることが考えられる。

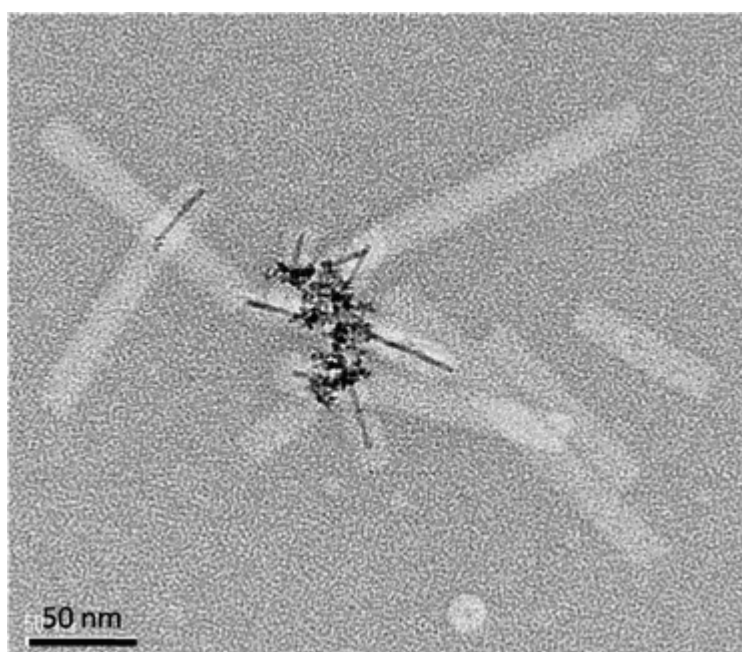


図 5-6 TMV の内部空洞に作製したコバルト白金ナノワイヤの透過型電子顕微鏡像 1
染色：1%金グルコース

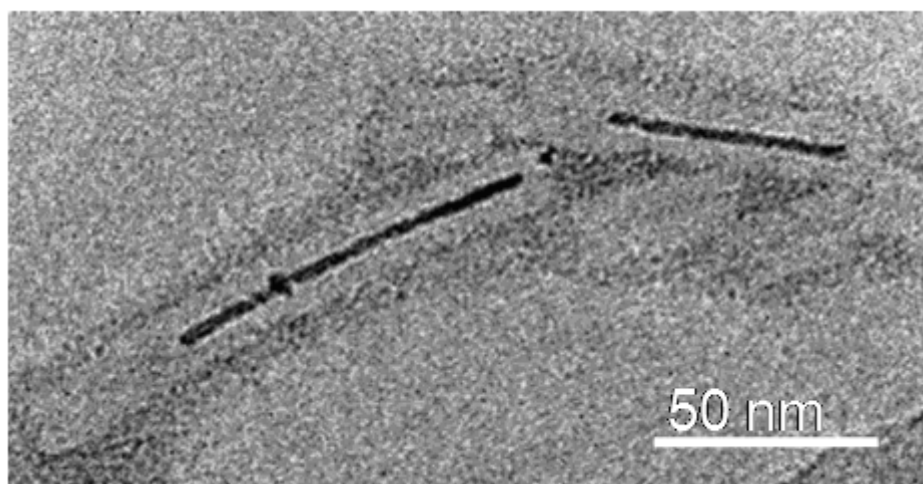


図 5-7 TMV の内部空洞に作製したコバルト白金ナノワイヤの透過型電子顕微鏡像 2
染色：1 %金グルコース

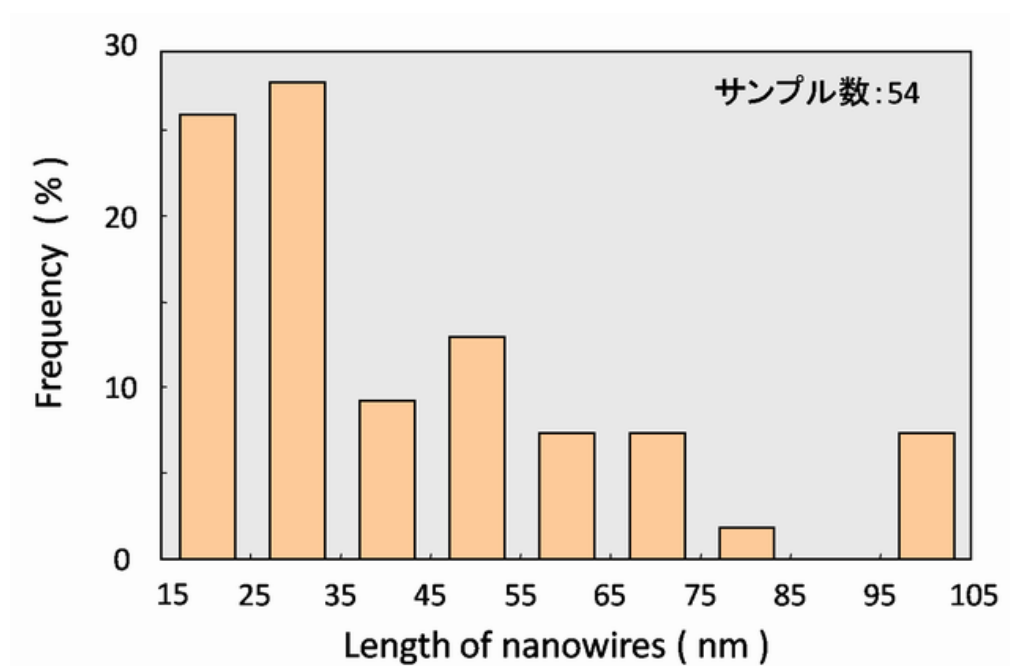


図 5-8 TMV の内部空洞で作製したコバルト白金ナノワイヤの長さ分布

<実験方法>

コバルト白金ナノワイヤ最適作製法を用いて 3 mM 硫酸アンモニウムコバルト、3 mM 塩化白金カリウム、3 mM 水素化ホウ素ナトリウムを用いて、超音波を照射しながらナノワイヤを作製した。反応終了後の溶液を透過型電子顕微鏡で観察し作製したワイヤの長さを測定した。

<実験手順>

1. 150 mM NaCl に TMV 濃度が 0.3 mg/ml になるように混合する。混合は超音波照射で行う。
2. 0.5 mM 硫酸アンモニウムコバルトと 0.5 mM 塩化白金カリウムをを添加する。
3. 5 分間、1 秒オン・5 秒オフのプログラムで超音波を照射する。
4. 0.5 mM 硫酸アンモニウムコバルトと 0.5 mM 塩化白金カリウムをを添加する。
5. 5 分間、1 秒オン・5 秒オフのプログラムで超音波を照射する。
6. 0.5 mM 水素化ホウ素ナトリウムを添加する。
7. 5 分間、1 秒オン・5 秒オフのプログラムで超音波を照射する。
8. 0.5 mM 水素化ホウ素ナトリウムを添加する。
9. 5 分間、1 秒オン・5 秒オフのプログラムで超音波を照射する。
10. 2～9 の操作を 3 mM になるまで、この操作を繰り返す。

＊すべての操作は水中で行う

7. 透過型電子顕微鏡で観察する。

<実験条件>

溶液濃度：3 mM 硫酸アンモニウムコバルト、3 mM 塩化白金カリウム、3 mM 水素化ホウ素ナトリウム

攪拌方法：超音波照射 (Digital Sonifier, BRANSON)

使用 TMV：0.3 mg/ml U1-TMV

測定装置：JEM-2200FS (日本電子)

染色：1%金グルコース

5-7 TMV とコバルトイオンと還元剤のみ/ TMV と白金イオンと還元剤のみでのコバルト白金ナノワイヤ作製実験

ここまで白金イオンと、コバルトイオンを導入したナノワイヤ作製を記述してきたが、ワイヤの構成成分は不明である。すなわち TMV の内部空洞でのコバルト白金ナノワイヤ作製では、2 種類の金属を混合して還元剤を添加しているため、考えられる可能性として、一方の金属のみが還元されてワイヤを形成していることが考えられる。そこで、片方の金属イオンと還元剤を別々に混合してワイヤ形成の有無を確かめた。TMV の溶液に超音波照射を行いながら数回に分けてコバルトイオン又は白金イオンと還元剤を添加した後の TMV の透過型電子顕微鏡像と溶液状態を図 5-9 に示す。還元剤は水素化ホウ素ナトリウムを使用した。

コバルトイオン（硫酸アンモニウムコバルト）と還元剤では、TMV は存在するが、ナノ粒子、ナノワイヤは形成されていない。コバルトイオンは還元されにくいということが分かる。一方、白金イオン（塩化白金カリウム）と還元剤では、ナノ粒子が形成され、溶液の色も黒く変化し沈澱を形成した。しかしながら、TMV の内部空洞でのワイヤ形成は全く見られなかった。すなわち、コバルトイオン、白金イオン、どちらかだけではナノワイヤの形成は行われず、TMV の内部空洞でのナノワイヤ形成には、コバルトイオンと白金イオンと還元剤の 3 種が同時に溶液中に存在する必要があることが明らかになった。

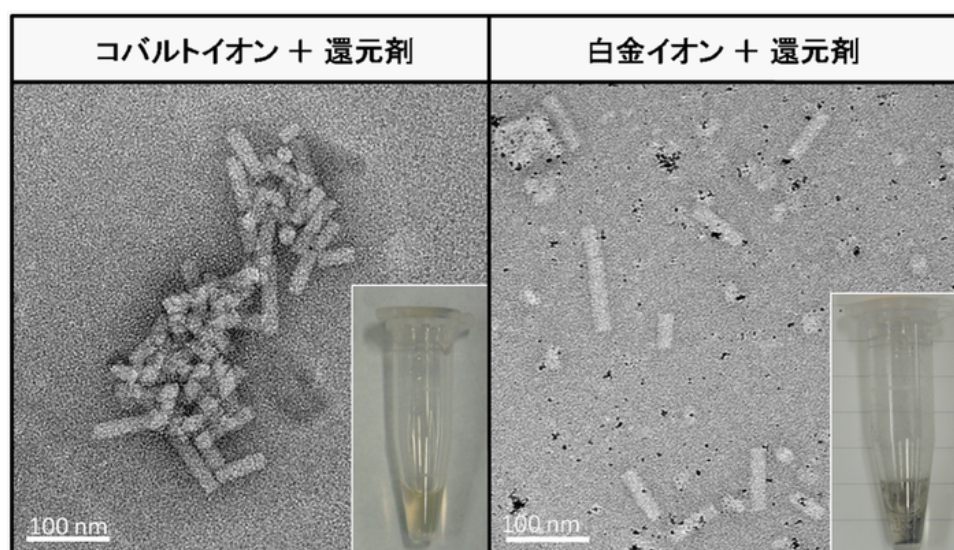


図 5-9 コバルトイオンと還元剤のみ、白金イオンと還元剤のみで行ったワイヤ作製実験後の透過型電子顕微鏡像 染色：1%金グルコース
(挿入図) 各溶液の状態

<実験方法>

(コバルトイオン+還元剤)

0.3 mg/ml TMV に数回に分けて最終濃度 9 mM 硫酸アンモニウムコバルトと 3 mM 水素化ホウ素ナトリウムを添加した。攪拌は超音波の出るチップの先端を溶液に浸し、5 秒間隔で 1 秒間の超音波照射を行った。反応終了後の溶液を透過型電子顕微鏡で観察を行った。

(白金イオン+還元剤)

0.3 mg/ml TMV に数回に分けて最終濃度 3 mM 塩化白金カリウムと 3 mM 水素化ホウ素ナトリウムを添加した。攪拌は超音波の出るチップの先端を溶液に浸し、5 秒間隔で 1 秒間の超音波照射を行った。反応終了後の溶液を透過型電子顕微鏡で観察を行った。

<実験手順>

(コバルトイオン+還元剤)

1. 150 mM NaCl に 0.3 mg/ml TMV を添加する。
2. 1.5mM 硫酸アンモニウムコバルトを添加し、超音波を 5 秒間隔で 1 秒間照射を 5 分間行った。この操作を二回繰り返す。
3. 0.5 mM 水素化ホウ素ナトリウムを添加し、超音波照射を 5 秒間隔で 1 秒間照射を 5 分間行い、この操作を二回繰り返す。
4. 酸アンモニウムコバルトの最終濃度が 9 mM になるまで、2 と 3 の操作を繰り返す。＊以上の操作は水中で行う
5. 反応溶液の上澄みを透過型電子顕微鏡で観察を行う。

(白金イオン+還元剤)

1. 150 mM NaCl に 0.3 mg/ml TMV を添加する。
2. 0.5mM 塩化白金カリウムを添加し、超音波を 5 秒間隔で 1 秒間照射を 5 分間行った。この操作を二回繰り返す。
3. 0.5 mM 水素化ホウ素ナトリウムを添加し、超音波照射を 5 秒間隔で 1 秒間照射を 5 分間行い、この操作を二回繰り返す。
4. 塩化白金カリウムの最終濃度が 3 mM になるまで、2 と 3 の操作を繰り返す。
＊以上の操作は水中で行う
5. 反応溶液の上澄みを透過型電子顕微鏡で観察を行う。

<実験条件>

溶液濃度：

コバルトイオン+還元剤：0.3 mg/ml TMV, 9mM 硫酸アンモニウムコバルト, 3 mM 水素化ホウ素ナトリウム

白金イオン+還元剤：0.3 mg/ml TMV, 3 mM 塩化白金カリウム, 3 mM 水素化ホウ素ナトリウム

攪拌方法：超音波照射 (Digital Sonifier, BRANSON)

使用 TMV： 0.3 mg/ml U1-TMV

測定装置：JEM-2200FS (日本電子)

染色：1%金グルコース

5-8 高分解能透過型電子顕微鏡像とエネルギー分散型 X 線分析 (EDX) 測定

9 mM 硫酸アンモニウムコバルト、3 mM 塩化白金カリウム、3 mM 水素化ホウ素ナトリウムの条件で超音波を照射しながら作製したナノワイヤの結晶構造、格子像の確認、EDX 測定による元素分析を行うため、無染色で高分解能透過型電子顕微鏡観察を行った。高分解能透過型電子顕微鏡像を図 5-10 に示す。TMV の内部空洞直径は約 4 nm であり、高分解能電子顕微鏡像のワイヤの直径と一致する。また、はっきりとした結晶格子が観察でき、結晶格子幅を測定したところ、2.1~2.2 Å あった。Co の結晶格子幅は 1.9~2.0 Å である。CoPt または CoPt₃ の結晶格子幅は、2.1~2.2 Å である。CoPt と CoPt₃ の結晶格子幅の値が非常に近く CoPt か CoPt₃ であるのかの判断は、結晶格子幅からは判断できないが、本実験で TMV の内部空洞に作製したナノワイヤの結晶格子幅は、CoPt または、CoPt₃ の結晶格子幅と一致すると考えられる。表 5-1 に各金属の結晶格子幅を示す XRD スペクトルデータを示す。

しかし、結晶格子ドメインは、一本のナノワイヤ中に数種類見られ、作製したワイヤは、多結晶であることが分かる。このことより、核形成は数か所で始まっていることが示唆される。図 5-11 に作製したナノワイヤの EDX 測定データを示す。コバルトと白金元素の存在が確認できる。存在比はコバルト：白金=45：55 であった。Co-Pt の二元金属間化合物では、CoPt、CoPt₃ しか結晶として存在しないため、このワイヤは、CoPt と判断される。この存在比は添加するコバルトイオンと白金イオンの混合の比率により変化することが分かった (表 5-2)。なお EDX における Cu のピークは透過型電子顕微鏡観察用の銅グリッドからのものである。

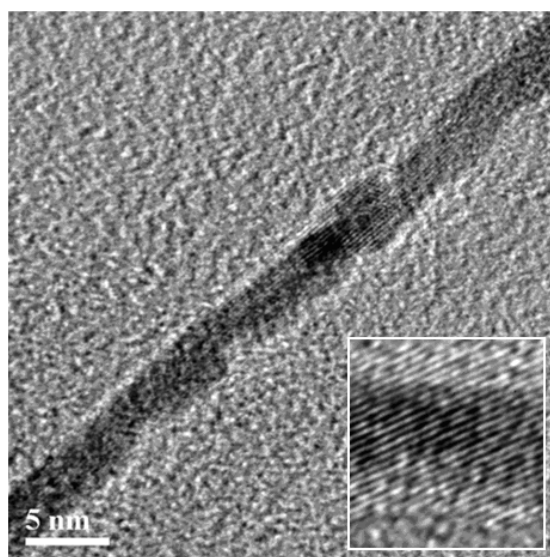


図 5-10 TMV の内部空洞で作成したコバルト白金ナノワイヤの高分解能透過型電子顕微鏡像 (挿入図) 結晶格子の拡大写真 結晶格子幅: 2.1~2.2 オングストローム 無染色

CoPt 正方晶系 PDF#43-1358

$d(\text{\AA})$	2θ	$I(v)$	$h.k.l$	$1/(2d)$
3.710	24.025	36.0	0.0.1	0.1351
2.691	33.266	25.0	1.1.0	0.1858
2.176	41.463	100.0	1.1.1	0.2298
1.908	47.621	36.0	2.0.0	0.2621
1.848	49.268	28.0	0.0.2	0.2706
1.692	54.162	18.0	2.0.1	0.2955
1.523	60.764	17.0	1.1.2	0.3283

CoPt3 立方晶系 PDF#29-0499

$d(\text{\AA})$	2θ	$I(v)$	$h.k.l$	$1/(2d)$
3.854	23.058	15.0	1.0.0	0.1297
2.725	32.839	10.0	1.1.0	0.1835
2.224	40.528	100.0	1.1.1	0.2248
1.927	47.123	45.0	2.0.0	0.2595
1.723	53.110	5.0	2.1.0	0.2902
1.574	58.599	5.0	2.1.1	0.3177
1.362	68.841	25.0	2.2.0	0.3669

Co 六方晶系 PDF#05-0727

$d(\text{\AA})$	2θ	$I(f)$	$h.k.l$	$1/(2d)$
2.165	41.683	20.0	1.0.0	0.2309
2.023	44.762	60.0	0.0.2	0.2472
1.910	47.568	100.0	1.0.1	0.2618
1.480	62.726	1.0	1.0.2	0.3378
1.252	75.939	80.0	1.1.0	0.3994
1.149	84.195	80.0	1.0.3	0.4352
1.084	90.619	20.0	2.0.0	0.4615

Co 立方晶系 PDF#15-0806

$d(\text{\AA})$	2θ	$I(f)$	$h.k.l$	$1/(2d)$
2.047	44.216	100.0	1.1.1	0.2443
1.772	51.522	40.0	2.0.0	0.2821
1.253	75.853	25.0	2.2.0	0.399
1.069	92.224	30.0	3.1.1	0.4678
1.023	87.657	12.0	2.2.2	0.4886

Pt 立方晶系 PDF#04-0802

$d(\text{\AA})$	2θ	$I(f)$	$h.k.l$	$1/(2d)$
2.265	39.763	100.0	1.1.1	0.2208
1.962	46.243	53.0	2.0.0	0.2549
1.387	67.454	31.0	2.2.0	0.3604
1.183	81.266	33.0	3.1.1	0.4228
1.133	85.712	12.0	2.2.2	0.4415
0.981	103.508	6.0	4.0.0	0.5098
0.900	117.711	22.0	3.3.1	0.5556

表 5-1 各金属の結晶格子幅を示す XRD スペクトルデータ

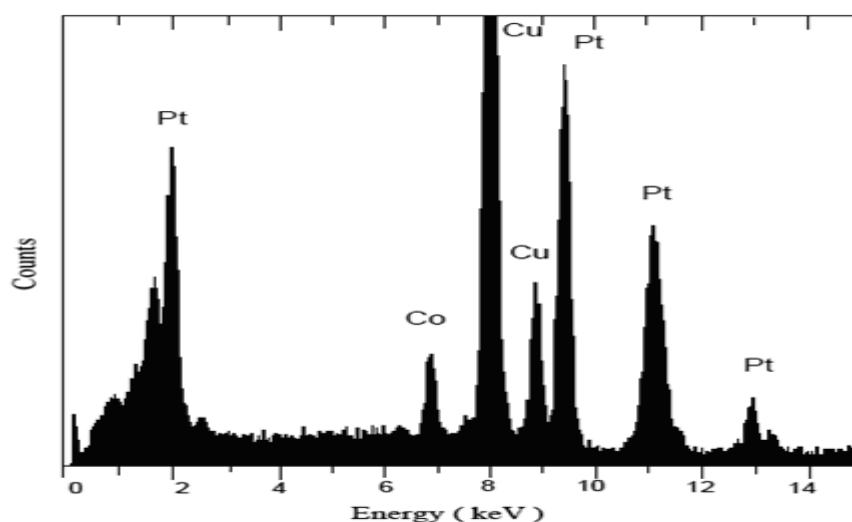


図 5-11 作製したコバルト白金ナノワイヤの EDX スペクトル (Cu グリッド使用)

reaction conditions ^a	Co or Fe (atomic %)	Pt (atomic %)
Co 0 mM + Pt 3 mM	nb ^b	nb ^b
Co 3 mM + Pt 6 mM	10	90
Co 3 mM + Pt 3 mM	17	83
Co 9 mM + Pt 3 mM	45	55
Co 3 mM + Pt 0 mM	nb ^b	nb ^b
Fe 3 mM + Pt 3 mM	25	75

表 5-2 添加するコバルトイオンと白金イオンの比率を変えて作製したコバルト白金ナノワイヤの元素組成

(nb^b は、ワイヤ形成が起こらなかったことを意味している)

<実験方法>

硫酸アンモニウムコバルト、塩化白金カリウム添加濃度の組み合わせ変え、3mM 水素化ホウ素ナトリウムを用で還元し、さまざまな溶液組成でナノワイヤを作製した。高分解能透過型電子顕微鏡で観察を行い、EDX で組成比を測定した。

<実験手順>

1. コバルト白金ナノワイヤ最適作製法を用いて 0～9 mM 硫酸アンモニウムコバルト、0～6 mM 塩化白金カリウム、3 mM 水素化ホウ素ナトリウムを用いて、ナノワイヤを作製する。
2. TEM グリッドに反応溶液を 4 μ l 載せ、1 分後濾紙で吸い取る。
3. 純水 4 μ l 載せ、1 分後濾紙で吸い取る。

4. 自然乾燥させ、高分解能透過型電子顕微鏡で観察を行い、EDX 測定も行う。

＜測定条件＞

溶液濃度：0～9 mM 硫酸アンモニウムコバルト、0～6 mM 塩化白金カリウム、3 mM 水素化ホウ素ナトリウム

攪拌方法：超音波照射 (Digital Sonifier, BRANSON)

測定装置：JEM-3100FEF (日本電子)

加速電圧：300 kV

染色：無染色

使用 TMV：0.3 mg/ml U1-TMV

5-9 作製したナノワイヤの磁化測定

コバルト白金は強磁性体として知られている。TMV の内部空洞で作製したナノワイヤがコバルト白金であれば磁性を持っていると考えられるため、作製した溶液の磁化測定を行った。

9 mM 硫酸アンモニウムコバルト、3 mM 塩化白金カリウム、3 mM 水素化ホウ素ナトリウムの条件で作製したナノワイヤの磁化測定結果を図 5-12 に示す。測定温度は 300 K で行った。TMV の内部空洞ではなく溶液側で析出したナノ粒子を取り除くことが困難であったため、作製したナノワイヤとナノ粒子の混合物の測定を行った結果である。

強磁性体特有のヒステリシスループが観測でき、保持力は、25 0e であった。保磁力が低い原因としては、室温・溶液中での測定であり、磁気モーメントがブラウン運動によって安定しないことと、透過電子顕微鏡像からも作製したワイヤが単結晶ではなく、多結晶であることから、さまざまな方向の磁気モーメントをもった磁区が存在することも一因であると考えている。

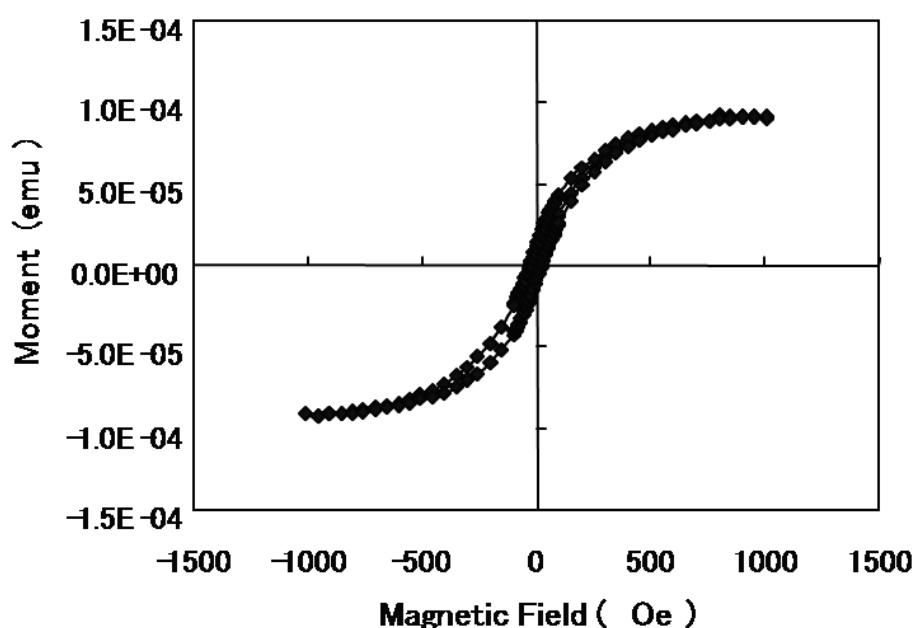


図 5-12 作製したコバルト白金ナノワイヤの磁化測定データ

<実験方法>

コバルト白金最適作製法を用いて 9 mM 硫酸アンモニウムコバルト、3 mM 塩化白金カリウム、3 mM 水素化ホウ素ナトリウムで超音波を照射しながらナノワイヤを作製した。反応終了後の溶液を 70 °C に加熱したサファイア基板の上に滴下して乾燥させた。滴下と乾燥を何度か繰り返した。十分に乾燥を行い、測定した。

<実験手順>

1. 150 mM NaCl に TMV 濃度が 0.3 mg/ml になるように混合する。超音波の出るチップの先端を直接溶液に浸漬し 5 分間、1 秒オン・5 秒オフのプログラムで超音波を照射する。
2. 硫酸アンモニウムコバルト 1.5 mM と塩化白金カリウムを 0.5 mM を添加する。
3. 5 分間、1 秒オン・5 秒オフのプログラムで超音波を照射する。
4. 硫酸アンモニウムコバルト 1.5 mM と塩化白金カリウムを 0.5 mM を添加する。
5. 5 分間、1 秒オン・5 秒オフのプログラムで超音波を照射する。
6. 0.5 mM 水素化ホウ素ナトリウムを添加する。
7. 5 分間、1 秒オン・5 秒オフのプログラムで超音波を照射する。
8. 0.5 mM 水素化ホウ素ナトリウムを添加する。
9. 5 分間、1 秒オン・5 秒オフのプログラムで超音波を照射する。

10. 2～9 の操作を硫酸アンモニウムコバルトが 9 mM になるまで、繰り返す。
11. 70 °C に加熱したヒートブロックでサファイア基板を加熱する。
12. サファイア基板の上に作製した反応溶液を滴下し、乾燥させる。
13. 8 を数回繰り返した後、完全に乾燥させる。
14. 測定を行う。

＜測定条件＞

測定サンプル：9 mM 硫酸アンモニウムコバルト、3 mM 塩化白金カリウム、3 mM 水素化ホウ素ナトリウム、超音波照射ありの条件で作製した溶液（TMV の内部空洞で作製したナノワイヤと TMV の外側に付着したナノ粒子、溶液側で生じた沈殿物も含む）

攪拌方法：超音波照射（Dogital Sonifier, BRANSON）

測定装置：MPMS-5S（Quantum Design）

測定温度：300 K

印加磁場：-1000～1000 Oe

5-10 遺伝子的に内部空洞表面のチャージを改変した TMV を用いたコバルト白金ナノワイヤ作製

これまでの研究で、U1-TMV を用いたコバルト白金ナノワイヤの作製には、コバルトイオンと白金イオンと還元剤の 3 種が同時に溶液中に存在することが必要であるということを示した。コバルトイオン源には、硫酸アンモニウムコバルトを、白金イオン源には塩化白金カリウムを用いている。コバルトイオンは、水分子が 6 個配位した 6 配位 8 面体構造の錯体で 2 価のプラスチャージ帯びており、白金イオンは、4 配位の錯体 $K_2[PtCl_4]^{2-}$ で、2 価のマイナスチャージを帯びている。このことから、コバルト白金ナノワイヤの作製には、どちらかの金属が先に TMV の空洞内に入り、触媒作用を行っている可能性が考えられる。

TMV の内部空洞のアミノ酸のチャージを遺伝子操作により改変した TMV を用いてワイヤ作製実験を行うことで、どちらの金属イオンが先に内部空洞に入り、ワイヤ形成が開始されるのかについての知見を得ることができる。

そこで、以下の実験では U1 株に換えて国内で遺伝子改変の実績がある ToMV 株を用い、TMV のコートタンパク質に遺伝子的に変異を加えて使用した。

5-10-1 野生型 ToMV を用いたナノワイヤ作製 (U1-TMV との差異の確認)

前節まで用いていた U1-TMV と野生型 ToMV での内部空洞でのコバルト白金ナノワイヤ作製の差異を確認するため、前節までに決定したコバルト白金ナノワイヤ最適作製法で野生型 ToMV を用いてワイヤ形成実験を行った。U1 と ToMV の全体のアミノ酸配列の相同性は 84% である。さらに、内部空洞を作るアミノ酸 17 残基のうち 101 番目と 102 番目のアミノ酸の 2 残基が U1-TMV では、アラニン、アスパラギン、ToMV では、グルタミン、セリンと異なっているが相同性が高い。図 5-13 に得られた透過型電子顕微鏡像を示す。ToMV の内部空洞に約 40~50 nm 程度のワイヤが作製できしており、U1-TMV を用いた時と同様の結果であることを確認した。

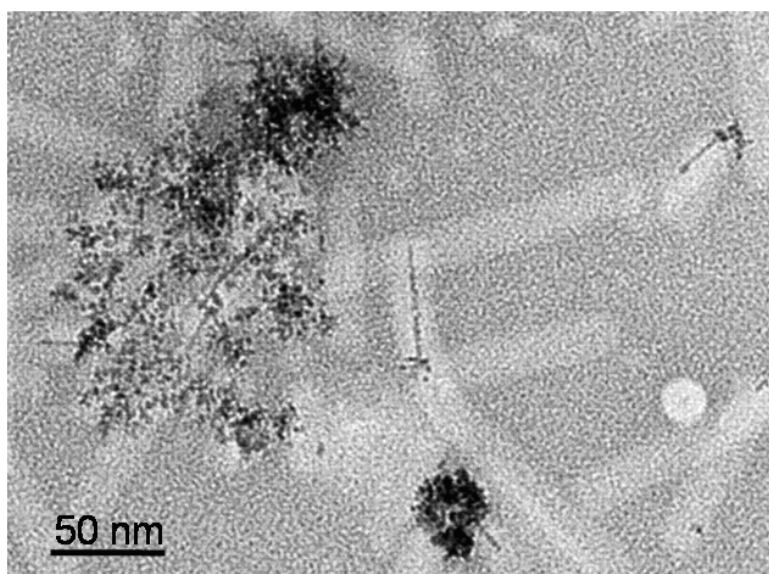


図 5-13 ToMV の内部空洞に作製したコバルト白金ナノワイヤの透過型電子顕微鏡像 染色：1%金グルコース

<実験方法>

コバルト白金ナノワイヤ最適作製法を用いて、0.3 mg/ml ToMV、9 mM 硫酸アンモニウムコバルト、3 mM 塩化白金カリウム、3 mM 水素化ホウ素ナトリウムのワイヤを超音波照射しながら作製した。反応終了後の溶液を透過型電子顕微鏡で観察を行った。

<実験手順>

1. 150 mM NaCl に TMV 濃度が 0.3 mg/ml になるように混合する。超音波の出るチップの先端を直接溶液に浸漬し 5 分間、1 秒オン・5 秒オフのプログラムで超音波を照射する。

2. 1.5 mM 硫酸アンモニウムコバルトと 0.5 mM 塩化白金カリウムをを添加する。
3. 5 分間、1 秒オン・5 秒オフのプログラムで超音波を照射する。
4. 1.5 mM 硫酸アンモニウムコバルトと 0.5 mM 塩化白金カリウムをを添加する。
5. 5 分間、1 秒オン・5 秒オフのプログラムで超音波を照射する。
6. 0.5 mM 水素化ホウ素ナトリウムを添加する。
7. 5 分間、1 秒オン・5 秒オフのプログラムで超音波を照射する。
8. 0.5 mM 水素化ホウ素ナトリウムを添加する。
9. 5 分間、1 秒オン・5 秒オフのプログラムで超音波を照射する。
10. 2～9 の操作を硫酸アンモニウムコバルトが 9 mM になるまで、この操作を繰り返す。

＊すべての操作は水中で行う

11. 透過型電子顕微鏡で観察する

<実験条件>

溶液濃度：9 mM 硫酸アンモニウムコバルト、3 mM 塩化白金カリウム、3 mM 水素化ホウ素ナトリウム

攪拌方法：超音波照射 (Digital Sonifier, BRANSON)

使用 TMV：0.3 mg/ml ToMV

測定装置：JEM-2200FS (日本電子)

染色：1%金グルコース

5-10-2 内部空洞にプラスチャージのアミノ酸を導入した ToMV (プラスチャージ導入 ToMV) でのナノワイヤ作製

野生型 ToMV の内部空洞に存在する 2ヶ所のグルタミン酸をプラスチャージを持つアミノ酸・リジンに置き換えたプラスチャージ導入 ToMV を作製した。

図 5-15 にリントングステン酸で染色を行ったプラスチャージ導入 ToMV の透過型電子顕微鏡像を示す。リントングステン酸はマイナスチャージを帯びており、内部空洞にプラスチャージを増やしたプラスチャージ導入 ToMV の空洞は、野生型 ToMV の空洞より染色されやすいと考えられたが、内部空洞は、はっきりと染色されなかった。また、本来の 4 nm の内部空洞が若干狭くなっている様子が観察できる。このプラスチャージ導入 ToMV を用いて、コバルト白金ナノワイヤ作製を野生型 ToMV 使用時と同じ条件で行った。溶液条件は、9 mM 硫酸アンモニウムコバルト、3 mM 塩化白金カリウム、3 mM 水素化ホウ素ナトリウム、攪拌は超音波照射を使用した。図

5-14 に実験結果の透過型電子顕微鏡像を示す。プラスチャージ導入 ToMV の外側でナノ粒子の形成が確認できたが、内部空洞でのワイヤ形成は確認できなかった。

プラスチャージ導入 ToMV の内部空洞は、コートタンパク質 1 個当たり 1 つのグルタミン酸がマイナスチャージを、2 つのリジンがプラスチャージを持つ設計になっている。よって全体として、内部空洞表面がややプラスチャージになっていると考ええると、初期段階では TMV の内部空洞に白金イオンは導入されやすく、コバルトイオンは導入されにくいことになる。しかしマイナスチャージを帯びている白金イオンが内部空洞に導入されて、リジン残基の周囲に集まり、電気二重層が形成されプラスチャージが打ち消されれば、コバルトイオンも拡散により導入されることが考えられる。すなわち、このプラスチャージ導入 ToMV においては、内部空洞の表面はまず白金イオンで覆われ、その残り空間に、両イオンが存在する状態であったと考えられる。

一方、野生型 ToMV の内部空洞では、コートタンパク質 1 個当たり 3 つのグルタミン酸のマイナスチャージを持ち、初期段階では TMV の内部空洞にプラスチャージのコバルトイオンが導入されやすく、白金イオンは導入されにくい。そして、コバルトイオンが先に内部空洞に導入されてグルタミン酸残基の周囲に集まり、電気二重層が形成されてマイナスチャージが打ち消され、白金イオンが拡散により導入される。すなわち内部空洞の表面はまずコバルトイオンで覆われ、その残り空間に、両イオンが存在する状態になる。すなわち、プラスチャージ導入 ToMV も野生型 ToMV もコバルトイオンと白金イオンの両方のイオンが内部空洞に入っていると考えられるため、ToMV の内部空洞の最表面近傍に存在するイオンの種類の差が、ナノワイヤ作製の差異を起こしている可能性がある。

しかし、その他にも TMV のリンタングステン酸染色の透過型電子顕微鏡像から判断して、実際に内部空洞が狭くなったことが原因で、コバルト白金ナノワイヤの形成が起こらなかった可能性も考えられ、正確な原因の特定のためには今後の詳細な検討と実験が必要である。精製直後のプラスチャージ導入 ToMV は 300 nm 以上の長さを持つものが多く観察できるが、ワイヤ作製実験終了後は、折れて短くなっている。これは、TMV の強度が弱いため、超音波照射による衝撃に耐えることができず、折れてしまったためであると考えられる。

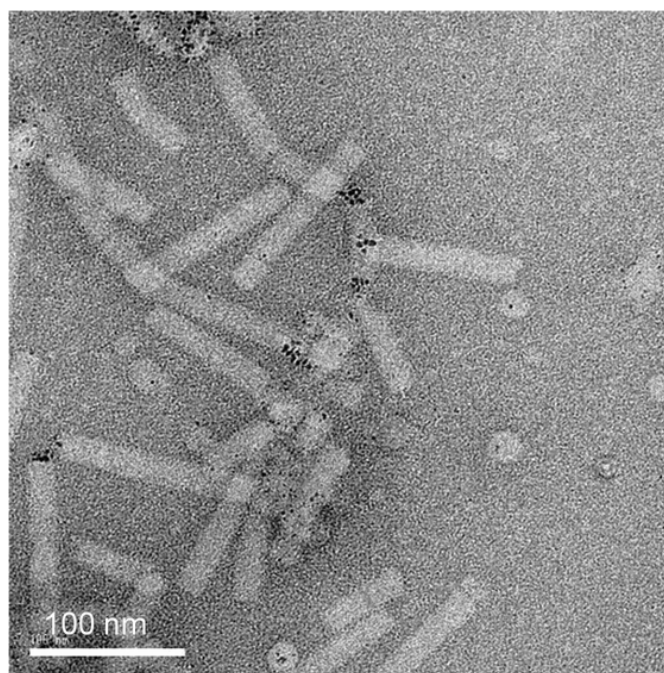


図5-14 プラスチャージ導入 ToMVにU1-TMVのコバルト白金ナノワイヤ作製法でナノワイヤ作製を試みた時の透過型電子顕微鏡像
染色：1 %金グルコース

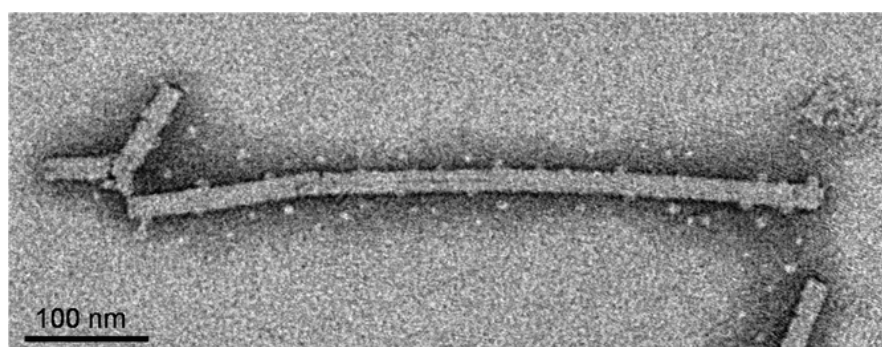


図 5-15 コバルト白金ナノワイヤ作製実験を行う前のプラスチャージ導入 ToMV
染色：3%リンタンゲステン酸

<実験方法>

コバルト白金ナノワイヤ最適作製法を用いて 9 mM 硫酸アンモニウムコバルト、3 mM 塩化白金カリウム、3 mM 水素化ホウ素ナトリウムで超音波を照射しながらナノワイヤを作製した。反応溶液を透過型電子顕微鏡で観察を行った。

<実験手順>

1. 150 mM NaCl に TMV 濃度が 0.3 mg/ml になるように混合する。超音波の出るチップの先端を直接溶液に浸漬し 5 分間、1 秒オン・5 秒オフのプログラムで超音波を照射する。

2. 1.5 mM 硫酸アンモニウムコバルトと 0.5 mM 塩化白金カリウムをを添加する。
3. 5 分間、1 秒オン・5 秒オフのプログラムで超音波を照射する。
4. 1.5 mM 硫酸アンモニウムコバルトと 0.5 mM 塩化白金カリウムをを添加する。
5. 5 分間、1 秒オン・5 秒オフのプログラムで超音波を照射する。
6. 0.5 mM 水素化ホウ素ナトリウムを添加する。
7. 5 分間、1 秒オン・5 秒オフのプログラムで超音波を照射する。
8. 0.5 mM 水素化ホウ素ナトリウムを添加する。
9. 5 分間、1 秒オン・5 秒オフのプログラムで超音波を照射する。
10. 2～9 の操作を硫酸アンモニウムコバルトが 9 mM になるまで、この操作を繰り返す。 *すべての操作は水中で行う

11. 透過型電子顕微鏡で観察する

<実験条件>

溶液濃度：9 mM 硫酸アンモニウムコバルト、3 mM 塩化白金カリウム、3 mM 水素化ホウ素ナトリウム

攪拌方法：超音波照射 (Digital Sonifier, BRANSON)

使用 TMV：0.3 mg/ml プラスチャージ導入 ToMV

測定装置：JEM-2200FS (日本電子)

染色：1%金グルコース

5-10-3 内部空洞にマイナスチャージのアミノ酸を導入した ToMV (マイナスチャージ導入 ToMV) でのナノワイヤ合成

野生型 ToMV の内部空洞に存在するグルタミンをマイナスチャージを持つアミノ酸・グルタミン酸に置き換え、さらに内部空洞にマイナスチャージを増やしたマイナスチャージ導入 ToMV を作製した。作製したマイナスチャージ導入 ToMV を用いてコバルト白金ナノワイヤ作製実験を行った。実験手順は、前節のプラスチャージ導入 ToMV を用いたナノワイヤ作製実験で用いたものと同じである。図 5-16 に得られたサンプルの透過型電子顕微鏡像を示す。透過型電子顕微鏡像では、白く見えるマイナスチャージ導入 ToMV コートタンパク質部分の中心部に多数のナノ粒子が形成されている様子が確認できる。また、マイナスチャージ導入 ToMV の外側面にナノ粒子が付着している様子は見られなかった。

しかしながら、マイナスチャージ導入 ToMV は、内部空洞のアミノ酸を遺伝子的に置き換える操作を行ったため、本来は 4 nm の内部空洞直径が約 2 倍大きくなってい

ることが、コートタンパク質精製直後で実験を行う前のリンタングステン酸染色の透過電子顕微鏡像から明らかになった(図 5-17)。また、遺伝子的改変を行った ToMV は、300 nm のコートタンパク質が数個つながった長いチューブ状タンパク質が数多くできる傾向がみられる。しかし全体は歪んでおり、構造は強固ではないことが明らかになった。構造が弱くなった理由として考えられることは、アミノ酸がフレキシブルな構造をとっている内部空洞部にマイナスチャージを増加したことにより、中心部から約 4 nm のところに挟み込まれている RNA のマイナスチャージと静電的な反発を起こし、構造を保てなくなっていることが考えられる。また、空洞直径が大きくなった原因も、RNA とフレキシブルなアミノ酸の相互作用が関係していると考えられる^{9,14}。空洞内部のマイナスチャージが増加するように改変しているにもかかわらず、マイナスチャージのリンタングステン酸で空洞内が染色されやすい事は、内部空洞のチャージに関係なく金属イオンが出入りしていることを示している。図 5-16 の透過型電子顕微鏡像では、図 5-17 の精製直後のマイナスチャージ導入 ToMV のリンタングステン酸染色で示す内部空洞の直径以上の領域でナノ粒子が析出している様子が確認できる。この時の作製法では、超音波照射で攪拌を行っており、構造が強固でないマイナスチャージ導入 ToMV にさらに超音波で衝撃を与えている。元々、内部空洞はフレキシブルな構造を取っており、更に上下のサブユニット同士の結合が緩くなり、この緩んだの空間にも金属が入り込んでいる可能性が考えられる。そこで、U1-TMV ではワイヤ形成が起こらなかった振とう攪拌を用いて、マイナスチャージ導入 ToMV でコバルト白金ナノワイヤ作製実験を行った。図 5-18 に透過型電子顕微鏡像を示す。マイナスチャージ導入 ToMV のタンパク質精製直後のリンタングステン酸による透過型電子顕微鏡像(図 5-17)で見られる内部空洞の直径以上に広い領域での金属析出は見られなかった。これらより、図 5-16 に見られる内部空洞直径以上の領域でナノ粒子の析出が起こった現象は、超音波照射による影響と考えられる。さらに、野生型 ToMV のコバルト白金ナノワイヤ作製実験では、超音波照射下で片方の ToMV の内部空洞の端から中心に向かって 100 nm くらいのワイヤを作製するのが限界であったが(図 5-13)、マイナスチャージ導入 ToMV では、振とう攪拌でも端から 500 nm 以上の離れた空間に金属の析出が確認できる(図 5-18)。超音波照射で金属イオンの拡散を行っていないにもかかわらず、内部空洞の奥深い空間に金属イオンを拡散させ析出させることができた。マイナスチャージのリンタングステン酸で内部空洞が染色されやすいことより、内部空洞のチャージに関係なく金属イオンが出入りしている事と併せて考えると、この内部空洞の奥深くでの金属の析出は、空洞が広がり、金属イオンが入りやすくなったためと考えられる。

マイナスチャージ導入 ToMV が、マイナスチャージのリンタングステン酸でも良く染色される事は、内部空洞のチャージの影響で金属イオンが入っているのではなく、空洞が広がって金属イオンが入りやすくなったことが直接の原因であると考えられる。しかしながら、コバルト白金ナノワイヤ作製においては、コバルトイオンと白金イオンと還元剤の3種が存在しなければ、空洞内での金属の析出が起こらないことが明らかになっている。最近の本研究室の研究より、内部空洞のアミノ酸をマイナスチャージに改変し、直径の広がった空洞に析出しているナノ粒子は白金であるが、コバルトイオンの存在が必須であることが明らかになっている。なお、この時のコバルトイオンの添加量はわずかでも構わないことより、コバルトイオンが先に空洞内に入り、金属析出の第一段階を始めていると予想できる。これらの結果から、以下のような見解が得られた。

まず、TMV 内部空洞表面のマイナスチャージにプラスチャージを持つコバルトイオンが近づき、マイナスチャージを打ち消す。マイナスチャージを増加させて構造を保てなくなり RNA が露出している場合は、RNA のマイナスチャージもコバルトイオンにより打ち消される。そして、マイナスチャージが打ち消されると内部空洞に金属イオンが入りやすくなる。コバルトおよび白金の標準還元電位差は 1.4 V 以上であり、($\text{Co}^{2+} + 2\text{e}^- = \text{Co}$ $E^0 = -0.28$ V、 $\text{Pt}^{2+} + 2\text{e}^- = \text{Pt}$ $E^0 = +1.2$ V) 圧倒的に白金イオンの方が還元されやすい。空洞直径が大きい時は多くの金属イオンが入り、コバルトイオンは還元されにくいのに対し、白金イオンは還元されやすく、あらゆる場所で核形成が始まるため、ナノワイヤではなく、多数の白金ナノ粒子が形成される。超音波を照射した時に TMV の内部空洞の直径以上の広い領域で白金ナノ粒子が析出する現象は、超音波照射により分子運動が活発化することで、TMV のサブユニット間のゆるんだ空間にも白金イオンが入り込み、核形成が始まり析出が起こったためと考えられる。空洞直径が小さい時は、金属イオンは入りにくく、ゆっくりした速度で還元が進む。また、内部空洞のアミノ酸の影響を受け、白金イオンが安定化されていると考えられ、白金の析出速度が遅くなり、コバルトの触媒として働くことができ、コバルト白金ナノワイヤが形成されると推測される。TMV 持つ直径 4 nm の内部空洞が外部表面とは異なる反応場として働いていると考えられる。

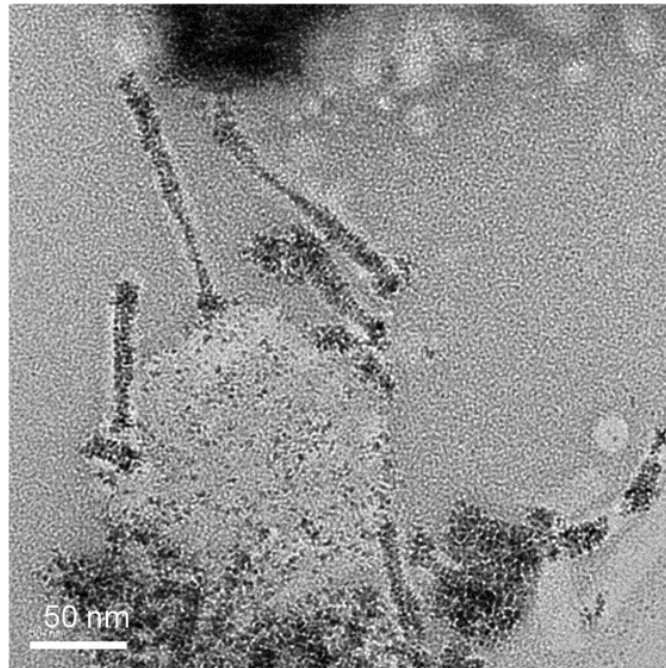


図5-16 マイナスチャージ導入ToMVに U1-TMVのコバルト白金ナノワイヤ作製方法
（攪拌は超音波照射）でナノワイヤ作製を試みた時の透過型電子顕微鏡像
染色：1%金グルコース

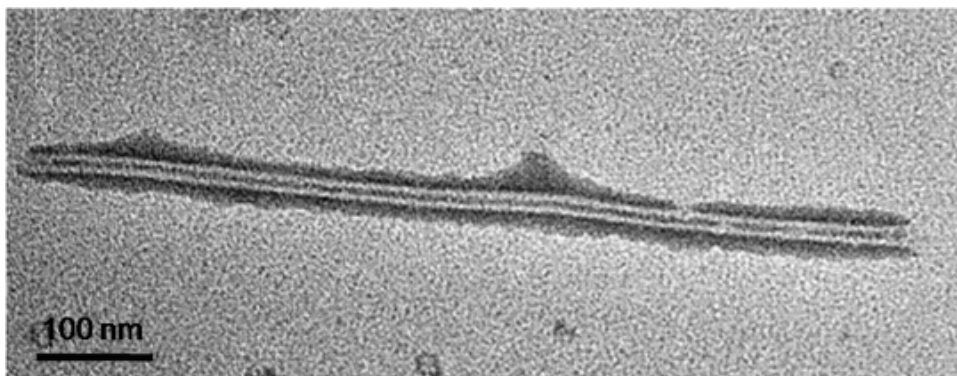


図5-17 精製直後でコバルト白金ナノワイヤ作製実験を行う前のマイナスチャージ導入 ToMV
染色：3%リンタングステン酸



図 5-18 マイナスチャージ導入 ToMV に振とう攪拌法でコバルト白金ナノワイヤ作製を試みた時の透過型電子顕微鏡像 染色：1%金グルコース

<実験方法>

コバルト白金ナノワイヤ最適作製法を用いて 9 mM 硫酸アンモニウムコバルト、3 mM 塩化白金カリウム、3 mM 水素化ホウ素ナトリウムで超音波照射または振とう攪拌を行いながらナノワイヤを作製した。反応溶液を透過型電子顕微鏡で観察を行った。

<実験手順>

1. 150 mM NaCl に TMV 濃度が 0.3 mg/ml になるように混合する。超音波の出るチップの先端を直接溶液に浸漬し 5 分間、1 秒オン・5 秒オフのプログラムで超音波を照射または振とう攪拌を行う。
2. 1.5 mM 硫酸アンモニウムコバルトと 0.5 mM 塩化白金カリウムをを添加する。
3. 5 分間攪拌する。
4. 1.5 mM 硫酸アンモニウムコバルトと 0.5 mM 塩化白金カリウムをを添加し、5 分間攪拌する。
5. 5 分間攪拌する。
6. 0.5 mM 水素化ホウ素ナトリウムを添加する。
7. 5 分間攪拌する。
8. 0.5 mM 水素化ホウ素ナトリウムを添加する。
9. 5 分間攪拌する。
10. 2～9 の操作を硫酸アンモニウムコバルトが 9mM になるまで、この操作を繰り返す。 *すべての操作は水中で行う
11. 透過型電子顕微鏡で観察する。

<実験条件>

溶液濃度：9 mM 硫酸アンモニウムコバルト、3 mM 塩化白金カリウム、3 mM 水素化ホウ素ナトリウム

攪拌方法：超音波照射または振とう攪拌

使用 TMV : 0.3 mg/ml マイナスチャージ導入 ToMV

測定装置 : JEM-2200FS (日本電子)

染色 : 1%金グルコース

5-11 まとめ

本研究では、チューブ状タンパク質の TMV の内部空洞にコバルト白金を導入することに成功した。

ここで得られた知見をまとめる。

- ① TMV の持つナノメートルサイズの空洞内への金属イオンの拡散には、超音波照射が有効である。
- ② TMV の内部空洞で作製したナノワイヤは磁性材料のコバルト白金で、コバルトイオン、白金イオンの混合比を変えることで異なった組成のナノワイヤを得ることができる。
- ③ TMV の内部空洞でのコバルト白金ナノワイヤ作製には、コバルトイオンと白金イオンと還元剤の 3 種が同時に存在することが必須である。
- ④ TMV 内部空洞への金属析出過程の第一段階では、マイナスチャージに引き寄せられてプラスチャージのコバルトイオンが空洞内に入り、マイナスチャージを打ち消すことで金属イオンが入りやすくなり、析出が始まっていることが示唆された。内部空洞のチャージが打ち消されると、コバルトイオンも白金イオンも自由に内部空洞に入ることができるが、空洞の大きさにより金属イオンの入りやすさが異なるため、以下のように異なる反応が起こると考えられる。

➤ 空洞直径が大きい時

内部空洞のチャージが打ち消されるとプラスチャージのコバルトイオンもマイナスチャージの白金イオンも空洞内に入ることができ、TMV の外側の溶液中と同様の状況になっていると考えられる。コバルトイオンは還元されにくいのにに対し、白金イオンは還元されやすく、空洞内のあらゆる場所で核形成が始まる。

白金の析出速度が速いために、コバルト析出のための触媒として働かず、多数の白金ナノ粒子が形成される。

➤ 空洞直径が小さい時

内部空洞のチャージが打ち消されても空洞が狭いため、金属イオンは入りにくく、内部空洞のアミノ酸により白金が安定化されるため、ゆっくりした速度で白金イオンの還元が進む。そのため、白金だけで析出して粒子を形成することではなく、還元された白金がコバルト析出の触媒として働き、コバルトを析出することができる。金属イオンが還元される速度とコバルト析出の速度のバランスが取れていると、コバルト白金ナノワイヤが形成される。

- ⑤ 問題点としては、TMV 全長のワイヤ形成はできていない点が挙げられる。また、溶液側で生じた沈澱との分離が困難であり、今後の改善が求められる。

第5章 参考文献

1. M. Knez, A. M. Bittner, C. Wege, H. Jeske, T. P. Martin, K. Kern, 2004, *Adv. Funct. Mater.*, 2004, 14. 2. 116.
2. W. Shenton, T. Douglas, M. Young, G. Stubbs, *Adv. Matter*, 1999, 11, 253.
3. M. Knez, M. Sumser, A. M. Bittner, C. Wege, H. Jeske, S. Kooi, M. Burghard, K. Kern, *J. Electroanal. Chem.*, 2002, 522, 70.
4. G.A. Kaushe, H. Ruska, *Kolloid-Z.*, 1939, 89, 21.
5. C. Dujardin, G. Peet, J. Syubbs, N. Culver, S. Mann, *Nano Lett.*, 2003, 3, 413.
6. M. Demir, M.H.B. Stowell, *Nanotechnology*, 2002, 13, 541.
7. M. Knez, A. M. Bittner, F. Boes, C. Wege, H. Jeske, E. Maiß, K. Kern, *Nano Lett.*, 2003, 3, 1079.
8. R. Pattanayek, G. Stubbs, *J. Mol. Biol.*, 1992, 228, 516.
9. K. Namba, G. Stubbs, *Science*, 1986, 231, 1401.
10. K. Namba, D. L. D. Casper, G. Stubbs, *Science*, 1985, 227, 773.
11. B. Wittmann-Liebold, H. G. Wittman, *Molec. Gen. Genetics*, 1967, 100, 358.
12. A. C. Bloomer, J. N. Champass, G. Bricogne, R. Staden, A. Klug, *Nature*, 1978, 276, 362.
13. 岡田吉美, タバコモザイクウイルス研究の100年, 東京大学出版会, 2004.
14. K. C. Holmes, *Ciba Found. Symp.*, 1983, 93, 116.

第6章 結論

6-1 タンパク質への金属析出機構について

本研究では、かご状タンパク質・アポフェリチンでの酸化コバルトの析出機構の初期過程を明らかにした。また、チューブ状タンパク質・タバコモザイクウィルス (TMV) の内部空洞でのコバルト白金ナノワイヤ作製を通して、金属イオンの拡散と内部空洞チャージと金属析出の関係について一定の知見を得ることができた。

以下に主要結果をまとめる。

6-2 本論文の主要結果

- ① かご状タンパク質・アポフェリチンを用いた大量の酸化コバルトナノ粒子作製に成功し、フローティングゲートメモリ作製の素子として使用することができた。
- ② アポフェリチン内部空洞での金属析出では、内部空洞のチャージだけではなく外表面のチャージも重要であることが分かった。外表面に存在するマイナスチャージが、過酸化水素水の添加によって形成されたプラスチャージを持つ Co-0 錯体を静電的にアポフェリチンの周囲に寄せ集めていることが明らかになった。
- ③ Co-0 錯体は、アポフェリチンの外表面付近で安定化され、加熱によって変化を起こし内部空洞に入るといふ初期過程が存在することを明らかにした。
- ④ チューブ状タンパク質・タバコモザイクウィルス (TMV) を用いて、二元金属間化合物で強磁性体のコバルト白金ナノワイヤの作製に成功した。
- ⑤ TMV のように核形成部位を持たず、金属イオンの入り口が2か所に限定されたチューブ状のテンプレートタンパク質を用いる場合、金属イオンをより遠くまで拡散させるために局所的に超音波などのエネルギーを与える必要がある。

これらの結果から、タンパク質の持つ空洞内での金属析出に共通する重要事項は、タンパク質の持つ表面チャージであると考えられる。アポフェリチンのように金属を取

り込む機能を持つタンパク質は、必要とする金属イオンを周囲に集めて効率良く内部空洞で析出させる機構を備えていると考えられる。材料となる金属イオンをテンプレートタンパク質の周囲に集めて、効率の良い拡散を起こす事がタンパク質の空洞内部での金属析出の初期過程で必要であることを示した。

6-3 今後の課題と指針

アポフェリチンについては、本研究での結果は酸化コバルトのみを対象としたものであるが、他の金属でも同様に錯形成した金属イオンがアポフェリチンの外表面に静電的に引き寄せられ、安定化される現象が起きるのかを調査する必要がある。また、アポフェリチンの周囲で安定している Co-O 錯体の形状は分かっておらず、詳細な化学構造を知る必要がある。

TMV については、遺伝子的にアミノ酸の改変を行った TMV はタンパク質の構造に変化が生じ、内部空洞の直径を揃えることができなかった。今後、遺伝子的改変を行う部位や置換アミノ酸について検討を行い、内部空洞の直径に変化が生じないような TMV を作製し、比較実験を行うことで、表面電荷と金属析出の関係を明確に示すことができるのではないかと考えている。

最後に、内部空洞を持つタンパク質に自由自在に金属析出が可能になり、作製したナノ粒子・ナノワイヤが新しい原理や構造を持ったデバイス作製や次世代の医療に役立つ素材として利用できる日が近い将来に来ることを願い、本論文の結びとする。

研究業績

(原著論文)

R. Tsukamoto, M. Muraoka, Y. Fukushige, H. Nakagawa, T. Kawaguchi, Y. Nakatsuji, I. Yamashita

“Improvement of Co_3O_4 nanoparticle synthesis in apoferritin cavity by outer surface PEGylation”

(Bull. Chem. Soc. Jpn., accepted)

R. Tsukamoto, M. Muraoka, M. Seki, H. Tabata, I. Yamashita

“Synthesis of CoPt and FePt Nanowires Using the Central Channel of Tobacco Mosaic Virus as a Biotemplate”

Chem. Mater., 19, 2389–2391, (2007)

R. Tsukamoto, M. Muraoka, Y. Fukushige, T. Kawaguchi, Y. Nakatsuji, I. Yamashita

“ Co_3O_4 nanoparticle synthesis by the PEGylated ferritin”

Wseas Transaction on Biology and Biomedicine, Issue6, 3, (2006)

R. Tsukamoto, K. Iwahori, M. Muraoka, I. Yamashita

“Synthesis of Co_3O_4 Nanoparticles Using the cage-shaped Protein Apoferritin”

Bull. Chem. Soc. Jpn., 78 (11), 2075–2081, (2005)

(共著論文)

A. Miura, R. Tsukamoto, S. Yoshii, I. Yamashita, Y. Uraoka, T. Fuyuki

“Non-volatile flash memory with discrete bionanodot floating gate assembled by protein template”

Nanotechnology, 19, 255201, (2008)

学会発表
(国際学会)

R. Tsukamoto, M. Muraoka, M. Seki, H. Tabata, I. Yamashita

“Biotemplated Co-Pt nanowire synthesis in TMV”

TNT2007 Trend in Nanotechnology, San Sebastian, (2007)

R. Tsukamoto, M. Muraoka, Y. Fukushige, T. Kawaguchi, Y. Nakatsuji,
I. Yamashita

“The effect of PEGylation of ferritin on the biomineralization of Co_3O_4 core”

10th WSEAS Conference, Athenes/Greece, (2006)

R. Tsukamoto, K. Iwahori, M. Muraoka, I. Yamashita

“Cobalt oxide nanoparticle synthesis using cage-shaped protein cavity”

229th ACS National Meeting, Sandiego/USA, (2005)

R. Tsukamoto, K. Iwahori, I. Yamashita

“Nanostructure Fabricated By Bio-Nano-Process”

ICCE10, New Orleans/USA, (2003)

K. Iwahori, R. Tsukamoto, M. Okuda, H. Yoshimura, I. Yamashita

“Nanometer-size structures fabricated by Bio-Nano-Process”

The 9th Foresight Conference, SANTA CLARA/USA, (2001)

(国内学会)

塚本里加子, 山下一郎

“フェリチンを用いたコバルトナノ粒子のバイオミネラリゼーション”

第 57 回 錯体化学討論会 (2007)

塚本里加子, 山下一郎

“タバコモザイクウィルスへの二元金属 (Co-Pt, FePt₃) の導入”

第 53 回 高分子夏季大学 (2007)

塚本里加子, 村岡雅弘, 山下一郎

“タバコモザイクウィルス内部空洞での二元金属 (Co-Pt) 合成”

第 45 回 応用物理学関係連合講演会 (2007)

塚本里加子, 村岡雅弘, 福重慶次, 川口智宏, 中辻洋司, 山下一郎

“PEG 修飾フェリチンによる酸化コバルトナノドット形成”

第 67 回 応用物理学会学術講演会 (2006)

永瀬隆、鈴木仁、大友明、蒲生健次、野口裕、照井通文、上田里永子、久保田徹、
益子信郎、塚本里加子、岩堀健治、山下一郎

“ナノギャップ電極による CdSe フェリチン分子の電気伝導特性評価”

第 44 回 応用物理学関係連合講演会 (2006)

山下一郎、塚本里加子、原正彦、林純子

“かご状タンパク質を用いた CdSe ナノ粒子合成”

第 65 回 応用物理学会学術講演会 (2004)

山下一郎、塚本里加子

“コバルトナノ粒子作製におけるフェリチン外表面の影響”

第 64 回 応用物理学会学術講演会 (2003)

山下一郎、塚本里加子、Trevor Douglas

“リコンビナントフェリチンへのコバルトイオン導入時における緩衝液依存性”

第 50 回 応用物理学関係連合講演会 (2003)

山下一郎、塚本里加子

“バイオナノプロセス～バイオナノテクノロジーを用いたナノ集積プロセス”

第1回 ナノテクノロジー総合シンポジウム (2003)

山下一郎、塚本里加子

“アポフェリチンの安定性測定の試み”

第63回 応用物理学会学術講演会 (2002)

山下一郎、塚本里加子、Trevor Douglas

“小型ケーシタンパク質による無機材料内包”

第49回 応用物理学関係連合講演会 (2002)

塚本里加子、山下一郎

“アポフェリチンへの水酸化コバルト化合物の導入”

日本生物物理学会 第39回 年会 (2001)

山下一郎、塚本里加子

“ナノデバイス作製のためのフェリチンによるコバルトナノドット粒子作製”

第62回 応用物理学会学術講演会 (2001)

謝辞

本研究は、著者が奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 メゾスコピック物質科学講座において、山下一郎教授のご指導を賜ることでここに博士論文としてまとめることができたものです。山下一郎教授には、本研究を進める過程において、多大なる御支援と激励をいただきました。また、日々の研究に関する議論は非常に有益で、多くのことを学ばせていただきました。ここに深く感謝いたします。

本学、バイオミメティック科学講座 菊池純一教授には、本研究の論理構成や課題への取り組みについて多くのご助言と有意義なご指導を賜りました。ここに深く感謝いたします。

本学、量子物性科学講座 柳久雄教授には、本研究に対し多くのご助言と有意義かつ適切なご指導を賜りました。ここに深く感謝いたします。

本学、生体適合性物質科学講座 谷原正夫教授には、本研究に対し多くのご指導と論文構成についてのご助言を賜りました。ここに深く感謝いたします。

本学、ナノ構造磁気科学講座 細糸信好准教授、児玉謙司氏には、コバルト白金ナノワイヤの磁気測定と多くの有意義な助言を頂きました。ここに深く感謝いたします。

本学、超分子集合体科学講座 廣田俊教授には、レーザーラマン分光測定方法のご助言を頂きました。ここに深く感謝いたします。

本学、微細素子科学講座 冬木隆教授、浦岡行治准教授、東北大学流体科学研究所 寒川誠二教授には、研究開始当初から有意義な議論とご提言と励ましを頂き、整った研究環境を提供していただきました。ここに深く感謝いたします。

大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 深田はるみ准教授には、アポフェリチンの熱安定性の測定をして頂き、多くの有意義なご助言を頂きました。ここに深く感謝いたします。

東京大学大学院 工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 田畑仁教授、関宗俊助教には、コバルト白金ナノワイヤの磁気測定をして頂きました。ここに深く感謝いたします。

東京大学大学院 総合文化研究科 渡辺雄一郎教授には、TMV の遺伝子的変異を行うために ToMV の遺伝子を頂きました。ここに深く感謝いたします。

本学、微細素子科学講座 三浦篤志博士、河北あゆみ女史には、作製した酸化コバルトナノ粒子を用いてフローティングゲートメモリの作製を行って頂き、多くの有益な議論とご提言とご協力を頂きました。ここに厚くお礼申し上げます。

奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 メゾスコピック物質科学講座の小林未明博士、山根みどり女史には、遺伝子的改変を行った ToMV を提供して頂き、多数のご助言を頂きました。ここに深く感謝いたします。

独立行政法人 科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業の岩堀健治博士、三島由美子博士、杉本健二博士、村岡雅弘博士、中川博道博士、福重慶次氏、慶澤景子女史、岸本直子女史、門谷文子女史には、日頃より有益なご指導と多くのご支援を賜りました。厚くお礼申し上げます。

奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 メゾスコピック物質科学講座の巽紀子女子、白坂雅子女史には、様々な事務面でのサポートをして頂き円滑に研究を進めることができました。本学学生、福田めぐみ女史には多大な励ましをいただきました。ここに深く感謝いたします。

松下電器産業株式会社 先端技術研究所の瀬恒謙太郎博士、上田路人博士、吉井重雄博士、田中英行博士、西尾和晃博士、熊谷慎也博士、松井拓郎博士、奥田充宏博士、山田聖人博士、松川望氏、田中秀典氏、鈴木容子女史、小原麻実女史には、有意義な議論とご協力を賜りました。ここに深く感謝いたします。

理化学研究所 基幹研究所 長田義仁副所長、北海道大学 電子科学研究所 分子認識素子研究分野 居城邦治教授、東京工業大学大学院 総合理工学研究科 原正彦教授、理化学研究所 分子情報生命科学特別研究ユニット 佐野健一博士、お

よび分子情報生命科学特別研究ユニットのメンバーには、学位取得にご理解をいただき、多大なご協力をいただきました。ここに厚くお礼申し上げます。

最後に、精神的に支えてくれた両親と友人に心から感謝いたします。

2008 年 9 月

塚本里加子