2P233

GFPとcytochrome b562を用いた人工光捕集系の構築

○武田 修治、神谷 典穂、長棟 輝行（東大院・工学系・化学生命）

人工光合成系の構築は科学技術の究極の目標のひとつであり、これまでに行われてきた有機化合物を用いた数々のエネルギー・電子移動に関する研究は、光合成への理解を深める上で大きな役割を果たしてきた。光合成系の初期段階では光捕集系のアンテナ色素から反応中心への効率的なエネルギー移動を起こすことが必要であり、高いエネルギー移動効率を実現するには色素分子の位置と配向の制御が必須である。

我々はタンパク質工学的手法により緑色蛍光タンパク質（GFP）と電子伝達性タンパク質 cytochrome b562 (b562) を結合させたキメラタンパク質、b562-GFP を作成した。b562-GFP においては2種類の発色団が1つずつキメラタンパク質の内部に固定されており、光捕集系の単純なモデル分子になりうると考えられる。

b562-GFP を大腸菌細胞質で発現させたところ、ヘムタンパク質である b562 部分にヘムを結合していないアポ体 (apo-b562-GFP) とヘムを結合したホロ体 (holo-b562-GFP) の混合物として得られ、イオン交換クロマトグラフィーによりこれらの分離に成功した。また apo-b562-GFP にヘムを加えることで、ヘムを b562 部分に再構成することが可能であった。この再構成によって得られた holo-b562-GFP は、apo-b562-GFP に比べ GFP 由来の蛍光強度が減少していた。さらに蛍光寿命測定の結果、holo-b562-GFP の蛍光寿命が減少しており、ヘムと GFP の発色団間の相互作用によって消光が起こっていることが明らかとなった。

蛍光寿命の解析によって算出された消光の時定数のオーダーから、GFP 由来の蛍光の消光はエネルギー移動によって起きた可能性が強く示唆されるため、我々の作成したキメラタンパク質は、複数のタンパク質を用いた人工光捕集系分子の初めての例であると考えられる。

S.Takeda, N.Kamiya and T.Nagamune : Design of artificial light-harvesting unit by protein engineering: Cytochrome b562-green fluorescent protein chimera

2P235

微細粒子を用いた X 線リソグラフィのためのマスク作製

○和川 明俊¹、前田 洋¹、吉村 英恭¹、山下 一郎²（¹明大・理工、²松下電器 先端技術研究所）

【序】超 LSI などの半導体の製作においては微細なマスクパターンを作る必要がある。我々はタンパク質を使って数ナノメートルのパターンを作る技術を目指しており、昨年準備のため配列させた 1.0 μm と 0.5 μm のラテックスビーズをマスクとして、PMMA レジストとしたシリコン基板 (Si) 上にパターンを X 線を用いて焼き付け、光学顕微鏡を使って確認した。今回は 0.1 μm ラテックスビーズをマスクとして使用し、サブミクロンサイズのパターンを形成させた実験について発表する。【実験】0.1 μm のラテックス蒸留水懸濁液を PMMA-Si 基盤に載せて六方細密に配列させたのち、X 線を照射し感光させた。X 線は 10KV の加速電圧の電子線を Al ターゲットに照射して発生させたもので、K α 線 (0.84nm) 強度が一番強いと思われる。現像液はメチルイソブチルケトンとイソプロピルアルコールの 50% 混合液で行った。【結果】ラテックスビーズ懸濁液は、シリコン基板上にパライフィンで固定した内径 3mm のワッシャーに 4 μl 入れた。きれいな配列をつくるために懸濁液濃度は 0.01%~0.1% 程度であることがわかった。また露光後のラテックスビーズを PMMA 上から除去するために、あらかじめ PMMA 上に厚さ約 100nm のコロジオン膜を施した。コロジオン膜とラテックスビーズは酢酸イソアミルで除去した。この行程はパターン形成に影響がないことを確認した。現像後のシリコン基板表面にサブミクロンのパターンが形成されたことを AFM を用いて確認した。

A.Wagawa, H.Maeda, H.Yoshimura, I.Yamashita : X-ray lithography patterned by 0.1 μm latex beads

2P234

アポフェリチンへの水酸化コバルト化合物の導入

○塚本 里加子、山下 一郎（松下電器・先端研）

【背景】私たちは、タンパク質フェリチンを用いて同一直径の無機材料ナノ粒子の作製を試みている。フェリチンは外径 13 nm、内径 6 nm の球殻状タンパク質で生体内では内部空間に水酸化鉄のコアを形成している。このフェリチンに水酸化コバルトのコアを形成できれば工学的応用範囲が広がる。

【実験】最終濃度が 0.5 mg/ml アポフェリチン (シグマ)、2、3、4、5 mM の硫酸コバルトアンモニウム、75 mM 硫酸ナトリウム、100 mM HEPES pH8.0 ~8.8 の溶液を用意した。その後、硫酸コバルトアンモニウムに対して最終濃度が 2 分の 1 になるように 50 mM 過酸化水素水をスターラーで攪拌しながら加え、50 °C で一晩放置後、透過電子顕微鏡 (TEM) で観察を行った。

【結果】おおよそ 2~4 mM、pH8.2~8.4 の時に良好なコア形成が行われていた。特にコバルト濃度を 2 mM から 0.5 mM 刻みで 4 mM まで、pH を 8.2、8.3、8.4 とした詳しい実験から、コバルト濃度 3 mM ~ 3.5 mM、pH8.2~8.4 が最もコア形成の条件に適している事が明らかになった。写真は pH8.4、3.0 mM 硫酸コバルトアンモニウムを用いて得られたコバルトコア入りフェリチンを金グルコース染色した電子顕微鏡写真である。白いフェリチンタンパク質殻の中心にコバルトコアがはっきりと見える。

R.Tsukamoto, I.Yamashita : Introduction of cobalt hydroxy core into apoferritin molecule

2P236

フェリチンによるニッケルナノ粒子の作製

○奥田 充宏¹、山下 一郎²、吉村 英恭¹（¹明大・理工・物理、²松下・先端研）

超分子タンパク質の一つであるフェリチンは外径 13nm の球殻状タンパク質で、内部に内径 6nm 空洞を持つ。生体内では空洞に水酸化鉄のコアを形成し鉄の貯蔵を行っている。このフェリチンの鉄取り込み機能の仕組みは、概ね解明されているが完全ではない。したがって、この機構を明らかにすると同時に、鉄以外の金属を取り込ませることができるようになれば、バイオミネラリゼーション及び、工学的応用の面から見て大変興味深い。前回までに鉄以外の金属としてニッケル、コバルトをフェリチン空洞内に取り込む条件について報告をしたが、コアを安定に形成できなかった。そこで今回はニッケルのコア形成が再現性良く起こる条件の特定をおこなった。その結果、最終濃度が 0.3mg/ml (1 μM) のアポフェリチン (シグマ)、緩衝液 100 mM HEPES pH7.5、170 mM CAPSO pH9.5 の溶液を用意し、その後、硫酸ニッケルアンモニウムを最終濃度 5 mM になるよう、100 mM の溶液を 30 μl ずつ、5 回に分けて一時間おきに加えることが、現在のところ最も効率がよいことがわかった。溶液を一晩放置した後、遠心により不要な沈殿物を除去して、透過型電子顕微鏡 (TEM) によりニッケルコアの有無を確認した結果、約 50 % のフェリチンにニッケルコアの形成を確認できた。今までは緩衝液に HEPES を用いて pH を一定に保っていたが、緩衝能が十分でなく、コア形成が不安定になっていたと思われる。今回は HEPES と CAPSO を使うことにより pH が安定し、再現性よくコア形成することができた。またニッケルコアを持つフェリチンを風乾し、粉末 X 線回折にかけた。その結果水酸化ニッケルと思われる回折ピークを得た。今後、精密なニッケルコアの構造解析をするともに、他の金属のナノ粒子作製を目指す。

M.Okuda, I.Yamashita, H.Yoshimura : Nano-Biomineralization of Nickel using ferritin