2P309

球状タンパク質フェリチンによるインジウムナノ粒子作製

○奥田 充宏¹、山下一郎²、吉村 英恭¹ (¹ 明大院・基礎理工・物理、² 松下電器・先端研)

球状タンパク質フェリチンは直径約12nm、中心部に直径約7 nmの空洞があり、生体内ではこの空洞に酸化鉄もしくは水酸化鉄のコアを形成し、鉄の貯蔵を行っている。フェリチンの鉄取り込み機構は、概ね解明されているが完全ではない。そこでフェリチン空洞内に鉄以外の無機物を内包することにより、このバイオミネラリゼーションの機構を明らかにすることを目指している。また同時に、ナノ粒子作成技術は物理、化学的方法で主に試みられているが、我々は生物学的方法、空洞を持つタンパク質を用いたナノ粒子作製技術の確立を目指すことにより工学的応用を考えている。前回までにニッケル、コバルト、マンガン、クロム、銅、タングステン等をフェリチン空洞内に取りこむ条件を示した。今回は、インジウムコア作製に試み成功した。インジウム作製条件は最終濃度を0.1mg/mL馬脾臓apoferritin、1mM 硫酸インジウム(III)、200mMりん酸ナトリウム二水和物、40mM塩酸の条件で、24時間放置しコア形成を透過型電子顕微鏡(TEM)で確認した。TEM観察の結果、80%のフェリチン空洞内にコアを確認した。このことにより、インジウムのコアが形成されることがわかった。また、アンモニアを添加することによりコアの形成率が上昇し、溶液中に存在するほぼ全てのフェリチン空洞内にインジウムのコア形成に成功した。アンモニア添加することによる効果として考えられることは、インジウムイオンにアンモニアが配位することで、フェリチン外側のインジウムの沈殿が抑制され、フェリチン空洞内が優先的にコア形成を起こしていると考えられる。今後、インジウムナノ粒子を形成したアポフェリチンを精製し二次元結晶を作製することにより、デバイスに応用することを考えている。

M.Okuda, I.Yamashita, H.Yoshimura : Fabrication of indium nano particles using ferritin

2P311

完全に均一な鉄コアを有するフェリチンの作製

○近藤 哲郎¹、奥田 充宏²、小林 悠作¹、園田 克久¹、吉村 英恭¹ (¹ 明治大学物理、² 科学技術振興事業団)

我々は殻状タンパク質フェリチンを用いてナノオーダーの超微粒子を作成し、その配列化を試みている。フェリチンは中心部の空洞内に鉄のコアを酸化物の形で蓄えることができる。鉄のコアを持ったフェリチンを結晶化することにより鉄のナノ粒子の規則正しい配列を得ることができるが、配列に欠損ができないようにするためには、全ての空洞内に鉄のコアを形成することが必要となる。これまでにタンパク濃度、鉄の濃度、pH、温度などをパラメータとして実験を繰り返してきた。その際コアの形成はpHに大きく依存することが分かった(図参照)。0.3mg/mlのフェリチンを3mM 硫酸アンモニウム(II)六水和物、100mM HEPES(pH7.6)中で4℃、24時間放置したときコア形成率が最良(96%)となることがわかった。これを結晶化させると4%の格子欠陥となるため、全てのフェリチンがコアを持つようにさらに精製する方法を試みている。両者には質量の違いがあることから、15%シュクロースで比重をかけた溶液に入れ、50000rpmの超遠心を1時間かけることで質量の大きいコアありフェリチンを沈殿として得る。この方法によりコア形成約100%が得られた。しかしながら、鉄の含有量にはまだ多少のばらつきが見られ、さらなる改良を試みている。

T.Kondo, M.Okuda, Y.Kobayashi, K.Sonoda, H.Yoshimura : Fabrication of perfect and uniform iron-core in ferritin

2P310

Dpsの二次元結晶化

○園田 克久¹、奥田 充宏¹、鈴木 一臣¹、慶澤 景子²、山下一郎²、吉村 英恭¹ (¹ 明治大学物理、² 松下電器先端研)

我々はタンパク質の機能を利用して、無機物のナノ粒子を生成させることを試みている。球状タンパク質フェリチンを用いた実験では鉄、ニッケル、クロムなどの6nm程度の粒子を生成する方法を報告した。ここではそれに変わるタンパク質としてDpsを用いて、フェリチンより小さなナノ粒子(直径約4.5nm)を作り、それを六方格子状に配列させることを試みた。Dpsは生体内のストレスによりDNAが損傷を受けるような環境になった時、DNAを保護するように結合することが知られている。フェリチンは生理的条件下で鉄を取りこむことが知られているが、Dpsは特にそのような生理的機能は知られていない。しかしながら、試験管内では0.5mg/ml Dps、5mM 硫酸アンモニウム鉄(II)六水和物、100mM HEPES pH7.0、400mM NaClの条件下で鉄ナノ粒子を形成することを確認した(第49回応物学会)。この鉄入りDpsを配列させる目的で、Dpsを二次元に結晶化させる方法を確立させた。Dpsの二次元結晶の作製方法; 36.96mg/ml Dps、100mM MES pH6.5、400mM NaCl溶液を10倍に希釈すると白色の沈殿が生じる。その白色の沈殿を100mM MES pH6.5、400mM NaCl溶液で溶かしながら2000回転、20分間の遠心を2回行い、その結果7.96mg/ml Dpsの溶液を得た。その溶液を蒸留水で8倍に希釈し23℃で5分間放置してTEMで観察すると多層構造を持つ結晶を観察した。さらに蒸留水で4倍に希釈し23℃で1分間放置してTEMで観察すると最大で550×550nm程度の二次元結晶を多数観察できた。今後、鉄入りDpsの二次元結晶を作製してナノ粒子のデバイスに応用していきたいと思っている。

K.Sonoda, M.Okuda, K.Suzuki, K.Yoshizawa, I.Yamashita, H.Yoshimura : Two-dimensional crystallization of Dps

2P312

蛋白質を用いた酸化鉄ナノ粒子の二次元配列化

○小林 悠作¹、奥田 充宏²、近藤 哲郎¹、吉村 英恭¹ (¹ 明治大学物理、² 科学技術振興事業団)

ナノスケールの微粒子は様々な方法で作製され、今後も重要視される分野である。我々は蛋白質フェリチンを用いてナノ粒子を作製し、二次元に配列させることで工学的応用を目指している。籠状の形態を持った蛋白質フェリチンは外径約13nm、内径約6nmで、空洞内に酸化鉄を蓄える性質を持っている。空洞内に酸化鉄を含むものをフェリチン、空のものをアポフェリチンと呼ぶ。また、空洞内の鉄酸化物の大きさは蛋白質外壁に制限され、直径約6nmとなる。ここではL-サブユニットを持つアポフェリチンを遺伝子工学により大腸菌に発現させ、ホモポリマーであるL-アポフェリチンを作り、試験管内で鉄酸化物のナノ粒子を生成させた。さらにナノ粒子を含むフェリチンを変性膜法(*)により二次元配列化することにより、ナノ粒子を格子間隔約11nmの六方格子状に配列させることに成功した。現状で最も効率よく酸化鉄ナノ粒子を生成する条件は、0.3mg/ml apoferritinを100mM HEPES pH7.5、3.0mM AIS中で4℃、24時間放置することである。その結果、90%のフェリチンに酸化鉄の形成が確認された。空洞内に酸化鉄が生成されたフェリチンを精製した後、変性膜法により二次元配列化を行う。10mM MES pH5.8、150mM NaCl、2% Glucose、10mM CdSO₄の展開層溶液500μlに3.0mg/ml Fe-ferritinを1μl注入し、界面に形成した二次元結晶を透過型電子顕微鏡(TEM)用グリッドに転写した後、TEMで観察を行う。最大面積で1.6μm×1.7μmの二次元配列を確認した。今後、二次元結晶のSi基盤への転写や、鉄以外の金属酸化物を生成したフェリチンの二次元配列化を行っていく予定である。

(*) H.Yoshimura *et al.* Langmuir, 10, 3290. (1994)

Y.Kobayashi, M.Okuda, T.Kondo and H.Yoshimura : Two-dimensional array of ferri-oxide nano-particles using protein function