蛋白ナノ集積プロセスと応用

特集 ナノバイオサイエンス

山下 一郎*

A new bottom-up process for the fabrication of inorganic nanostructure and its application

A new bottom-up process for the fabrication of inorganic nanostructure is proposed. A template protein supramolecule for the single electron transistor and a large 2D ferritin crystal were successfully produced. Floating gate memory produced employing this method shows clear memory effect.

無機材料のナノ構造を作製する新しいプロセスとして、蛋白質の同質性、自己組織化、バイオミネラル化を利用する手法を提案した。このプロセスに利用する、単電子トランジスタの鋳型蛋白質を対称性を利用して設計・構築し、大型のフェリチン2次元結晶をフェリチンの特異的相互作用を利用して作製した。また、この手法により作製したフローティングゲートメモリは良好な特性を示し、提案したプロセスの電子デバイス部品作製への有用性が示された。

Ichiro Yamashita*

key words : self-assembly, protein supramolecule, nanofabrication, ferritin, quantum dot

バイオナノテクノロジー

近年、微細構造を作製するための加工技術(トップダウン法)の発展が著しい。その中心はリソグラフィ加工技術で、半導体技術の高密度化・高集積化に大きく寄与してきた。またその関連技術でつくられた製品は、生活のあらゆる場面で利用されている。リソグラフィ技術の基本は、基板表面を光感受性高分子で覆ったあと、写真技術を利用して微細な保護膜を形成して基板部加工するもので、その最小加工単位は現在 60 nm に近づきつつあるが、光を利用するため物理的限界を迎えつつある。さらにこのようなトップダウン加工には、大型の真空装置や超高精細度機器類などが必要で、装置費用が高額になる経済的限界もある。そのため、新たな微細構造を作製する新しい手法の開発が望まれており、自己組織化・自己集積化を利用して、原子・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はじめている。

このような状況下で、これまで関連が薄いと思われていた生物の機能構造作製方法が、ナノメーター

からのボトムアップ技術として見直しが行われている。生物は、遺伝子情報によりつくられたナノメートルから数十ナノメートルサイズのバイオ分子が自己集合し、機能構造体をつくり上げ、さらにはメートルオーダーの個体をつくっており、ウェット系のボトムアップナノテクノロジーとして学ぶべき点は多い。

特に、“蛋白質”は、ボトムアップナノテクノロジーの基盤として有望である。この理由として、蛋白質の持つ均質性、自己組織化能力による高次構造形成能およびバイオミネラル化による無機物質形成能があげられる。生物は同じ構造の蛋白質を遺伝子情報により多量に作製しており、工学的にはきわめて魅力的である。またさまざまな形の蛋白質構造体が、多数の蛋白質(サブユニット)から形成されているが、これらの構造は、原理的にはアミノ酸配列に埋め込まれた情報により自動的に組み上がっている。これはナノ構造構築として理想的である。しかし、工学的なナノテクノロジーでは無機材料の構造構築の要求が圧倒的に多い。この点では、ある種の蛋白質の持つ金属イオンと相互作用することにより、さまざまな形状の無機物質を作製する能力(バイオミネラル化)が使える。生物は

* Graduate School of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology 奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科

貝殻、骨、歯など、バイオミネラリゼーションにより体の内外で無機材料構造をつくり出しているが、この能力を発展させてさまざまな無機材料をつくることにすでにいくつかの研究グループが成功している^{1~6)}。

以上のことは、蛋白質の特徴・能力を利用すれば、無機材料のナノ構造を精密に簡単に作製でき、トップダウン法を越える微細構造構築ができることを意味している。このようなボトムアップ微細構造作製が可能になれば、材料、エレクトロニクス、機械、バイオ、医薬などの幅広い分野に応用され発展すると期待される。特に、電子デバイスの作製に利用することができれば、超小型・超低消費電力のデバイスが作製可能となり、これまで考えられていなかった場面での応用が期待できる。筆者らはこの蛋白質を利用した無機ナノ構造作製手法をバイオナノプロセスと名付け研究を進めている⁷⁾。

対称性と大型蛋白質構造体

バイオナノプロセスでは蛋白質を鋳型として無機材料を析出する。そのため、応用を想定した蛋白質を自然界から選択したり、人工的に創出する必要がある。ここでは筆者らの単電子トランジスタの鋳型となる大型テトラポット状蛋白質超分子の作製を紹介する。

一般に、生物が大型超分子構造をつくる時、対称性を利用した自己集合により機能構造をつくっていることが多い。すなわちサブユニット間の結合対称性を利用して、少ない種類の蛋白質で、より複雑な構造をつくり上げる。生命がこのような戦略をとっているのは、巨大な蛋白質をつくるよりも、小型の蛋白質を組み合わせ、結合して構造体を組み上げるほうが、より多様な構造体形成が可能になるからと考えられる。また蛋白質進化・蛋白質生産の観点からも効率がよい。

サブユニットが同一で同じ結合を繰り返す場合、直線かリング、球体、またはらせんを形成するようになる。まず、リングの変形として簡単な2量体、4量体の例を模式的に図1に示す。図1(左)のような結合領域aとその相補結合領域a'を持つサブ

図1 サブユニット間の相互作用の模式図
相補的結合部位aとa'を持つ一对のサブユニットは、結合部位の配置に応じて2量体、および4量体を形成する。

ユニットは2回対称軸を有する2量体を形成し、サブユニットが増えると図1(右)のような4回対称軸を持つ4量体を形成する。このような構造は全体として閉じた構造をとるか端部になんらかの構造を持ち、蛋白質凝集が抑制され、その構造が安定に維持される。人工蛋白質構造体を作製する場合は、設計段階でこのサブユニット間の結合を閉じた構造にするか端部を固定することが重要で、期待していないサブユニットとの相互作用による、高分子量蛋白質凝集体を抑制する必要がある。

筆者らは、単電子トランジスタの作製に鋳型として利用できる蛋白質超分子構造を、対称性を利用して設計し作製した⁸⁾。単電子トランジスタは、電子を蓄える量子ドットと、その周りに配置されるソース、ドレイン、ゲートの三つの電極とから構成される。量子ドットの大きさは5 nm以下のできるだけ小さな物がよい。また、周りの電極と量子ドットとは正確に一定距離離れて(数nm以下)、その間は絶縁物であることが必要である。このような要求に応える蛋白質構造として、中心部に球殻状蛋白質を持ち、周りに棒状蛋白質を配置させた超分子を設計した。この超分子を鋳型にバイオミネラリゼーションを行って、球殻内に量子ドットを内包させ、棒状蛋白質の外部に導電性材料固定すれば所望の構造となる。その後、蛋白質を選択的に除去すれば単電子トランジスタの基本構造ができる(図2)。

このような蛋白質を作製するためのサブユニットとして、筆者らは、球状構造体を取り、3回・2回対称軸を持つリステリアフェリチンと、三つのア

図2 円筒状蛋白質と球状蛋白質を自己組織化させた新規超分子構造体を鋳型とした単電子トランジスタ構造の作製

図3
球殻状蛋白質リステリアフェリチンと筒状蛋白質 gp5C の構造
a : リステリアフェリチンの構造
b : gp5C の構造

ミノ酸鎖がヘリックスをつくり 3 回対称軸を中心に持つトーチ型蛋白質をつくっている T4 バクテリアファージ由来 gp5 の β ヘリックスドメイン (gp5C) を選択した⁸⁾。

リステリアフェリチンは、12 個のサブユニットモノマーが自己組織化することにより直径 8.5 nm、コア内直径 5 nm の球殻状蛋白質を構築し、見る方向により 3 回対称、2 回対称軸を持っている。図 3a はリステリアフェリチンを 3 回対称軸方向から見たもので、蛋白質を主鎖の線であらわしてあり、対称軸を取り巻く三つのサブユニットが中央部にチャンネルを形成している。リステリアフェリチンは、この三つのサブユニットがさらに四つ集まって、全体として 12 個のサブユニットが球殻構造をつくっている。この構築は自己集合によりリステリアフェリチンのアミノ酸鎖に情報として埋め込まれている。また図に示したように、この 3 回対称軸の近傍に、サブユニットの N 末端が外部に突出している。

一方、gp5C は、トーチ型蛋白質の棒状部分で、3 本のアミノ酸鎖が互いにらせんを描いて 3 量体

化して、長さ 7 nm、直径 3 nm の円筒状蛋白質を形成することが X 線結晶構造解析により明らかになっている (図 3b)。この棒状体の両端はそれぞれのアミノ酸の N 末端と C 末端が露出している。これらのことから、リステリアフェリチンのサブユニットと gp5C のアミノ酸鎖を一つにしたキメラ蛋白質を作製すれば、自動的に図 4 に示した、3 回対称軸を共有する 3 量体が出来上がり、さらにはリステリアフェリチンサブユニットの自己集合により、図 5 に示したような、リステリアフェリチン一つあたり四つの gp5C が突起している超分子ができるはずである。この分子はサブユニットの結合が閉じており安定に存在できる。そこで遺伝的に、gp5C の C 末端とリステリアフェリチンの N 末端を、リンカー部を適切に設計して結合した新規のサブユニット (BSPS) を作製し、大腸菌発現系により発現・精製した。高分解能電子顕微鏡で生成物を調べると、球状構造体の周辺に筒状構造体が 4 本突起した構造 (図 6a) および 3 本突起した構造 (図 6b) が確認できた。観測された筒状構造体の数が 3 または 4 本となるのは、BSPS のグリッドに対する吸着

図4 対称性を利用した蛋白質超分子構造体の作製

図5 自己組織化したBSPPSのモデル構造
観察方向により突出部が3または4本となる。

方向によって見え方が変化するからと考えられる。またCDやDLS測定からも、設計構造体できていることが示されている⁸⁾。さらに、自己組織化したBSPPSのリステリアフェリチン内部に鉄をバイオミネラリゼーションすることにより、中心部に酸化鉄ナノ粒子を作製することにも成功した。今後は棒状部分にバイオミネラリゼーションを行う予定である。

この鋳型蛋白質で単電子トランジスタをつくるためには、基板上的電極位置にこのテトラポット構造を固定する必要がある。この目的のためには無機材料を認識するペプチドが利用できる。すなわちgp5CのN末端部分に無機材料特異的認識ペプチドを遺伝的に付加すれば、テトラポット構造がgp5Cの先端部分で、電極に自動的に固定することが期待できる。すでに筆者らのグループでは、直

図6 テトラポット状蛋白超分子(単電子トランジスタの鋳型蛋白質)のTEM像
a: 球状構造体の周辺に筒状構造体が4本突起した構造
b: 3本突起した構造

径の12 nmの球殻状蛋白質フェリチンを、シリコン基板上的チタンパターンの上に固定することに成功している(図7)⁹⁾。球状構造体と筒状構造体内部に違う金属をミネラリゼーションさせ、UV/オゾン処理により蛋白質を除去すれば^{10,11)}、将来的にナノ粒子の周囲にナノ配線が配列した単電子トランジスタ構造様の構造が作製できることを意味している(図2)。

また筆者らは天然に存在しないリング状の蛋白質超分子の作製にも成功している。この超分子はナノゴールドの固定や基板選択的吸着ができるため、BSPPSと同様の利用ができるものと期待している¹²⁾。

図7 Ti 認識フェリチンの模式図と微細 Ti パターンに選択吸着した Ti 認識フェリチン SEM 像
 a: Ti を認識するペプチドを遺伝子的に球殻上蛋白質(フェリチン)の外表面に提示させたもの
 b: Ti 認識フェリチンが、溶液をのせて純水で洗浄するだけで Ti パターン上に配置された。白いドットは内包された酸化鉄コア

図8 フェリチン粒子の模式図

分子量約 2 万のモノマーサブユニットが非共有結合で 24 個結合しフェリチン分子をつくっている。直径は約 12 nm, コアとよばれる内部の空洞の直径は約 7 nm である。鉄のコアがないものをアポフェリチンとよぶ。

図9 2回対称部位での結合による2次元結晶のつくられ方

三つの直方体が2回対称軸を持つ緩で結合した様子を、a: 平面にはほぼ平行な方向から、b: 斜め上から、c: 真上から見た様子を示してある。
 2回対称部位を白マルで示した。このような結合を平面に沿って繰り返すことで2次元結晶が出来上がる。

図 10 シリコン基板上へ転写されたフェリチンの 2 次元結晶の SEM 像

白い点が酸化鉄のコアである。蛋白質は SEM では観察できない。ドットの抜けはコアのないフェリチン、もしくは転写中に脱落したものと思われる。

フェリチン蛋白質の 2 次元結晶化

つぎに、蛋白質の対称を利用した高次構造の例としてフェリチン蛋白質の 2 次元結晶の例を示す。蛋白質 2 次元結晶は電子顕微鏡による構造解析から興味を持たれているが、最近ではナノ構造作製の基盤として工学的な応用からも注目されはじめています。ここではフェリチン蛋白質の対称性と特異的結合を利用した 2 次元結晶化について紹介する。

フェリチン蛋白質は鉄保存蛋白質で、生体の鉄元素のホメオスタシスに深く関わっている。サブユニット蛋白質が非共有結合で 24 個集まり、分子量約 46 万の球殻状蛋白質をつくっている。その直径は約 12 nm で、2 回、3 回、4 回対称性を持っており、高い熱安定性と pH 安定性を示す。中心の空洞は直径約 7 nm で(図 8)、ferrooxidase center が二価鉄イオンを酸化したあと、4,000 個の鉄をフェリハイドライト($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)結晶コアとして保持している。コアは生体内の鉄が不足すると取り崩され、鉄濃度のバランスを保つ。天然のフェリチンでは分子量が異なる L-chain, H-chain サブユニット

図 11 鉄、CdSe、コバルトのコアを持つフェリチンとシリカの層状構造のEDSマッピング像とその模式図

の 2 種類が存在するが、筆者らは L-chain だけのリコンビナントフェリチンを利用している。

L-フェリチン蛋白質は、対称性からは直方体と同等で、その 2 回対称軸のすぐ近傍の表面に 2 価イオンと結合する二つの酸性アミノ酸残基がある。このアミノ酸を Cd, Ca など塩橋をつくることでフェリチン同士を強く 2 回対称軸付近で回転を許すことなく結合することができる。これは直方体の稜線部分で直方体を結合させることに相当する。ただし、この結合は、通常は 3 次元的に伸張し 3 次元結晶となるが、なんらかの方法で 3 次元方向の成長を抑制すれば、2 次元結晶を作製することが可能となる(図 9)。2 次元フェリチン配列は工学的応用の観点から大変興味深い。すなわち、フェリチンは内部のコアを有したまま 2 次元配列するので、ナノ粒子の 2 次元配列が作製できることになり、工学的応用が広がる。たとえば、後述するフローティングゲートメモリのメモリオードとしての利用やカーボンナノチューブなどの触媒配列などに利用できる。

筆者らは、古野らが開発した PBLH(poly-L-benzyl-L-histidine, 合成ポリペプチド)を 2 次元基板として用いる方法に少し変更を加えて 2 次元結晶を作製した。まず、テフロントラフに、低濃度(20~40 $\mu\text{g/mL}$)のフェリチン蛋白質溶液を満たす。この蛋白質溶液上に PBLH を静かに展開し表面に薄膜を作製する。PBLH は中性および弱酸性条件下では正に帯電しており、フェリチンは負に

帯電しているため、フェリチンはPBLH膜に静電的に吸着する。室温で放置し吸着が完了したあとに、温度を38℃としてアニーリングを行い2次元結晶化を促す。作製された2次元結晶膜をあらかじめHMDS(1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane)によって疎水処理したシリコン基板もしくは電顕メッシュに転写する。図10はシリコン基板上のフェリチンのSEM写真である。SEMでは蛋白質は観察できないため、コアだけが規則配列としてみられる。大型の2次元結晶が作製できていることがわかる。

そのほか、最近筆者らのグループでは、遺伝子工学を利用してフェリチンの外側に無機材料認識ペプチドを配置することで、蛋白質間、蛋白質-基板間相互作用の制御し、シリコン基板上に直接フェリチンの2次元規則性配列を作製している。

さらに、この2次元構造を積み重ねて構造をつくるレイヤーバイレイヤー(LBL)手法により3次元化する方法も、芝らのグループで試みられている。図11はシリカに特異的結合能力を持つペプチドを提示したS-フェリチンにそれぞれ鉄、CdSe、コバルトのコアを内包させておき、まず鉄コアを持つS-フェリチンを金基板に非特異的吸着させ、その後、一層目のフェリチンに提示されたペプチドによりシリカをフェリチンの周囲に形成する。つぎに、CdSeコアを持つS-フェリチンをシリカを標的に単層吸着させ、同じくシリカの層を作製し、最後にコバルトコアのS-フェリチンを吸着させたものである。このような手法で1層ごとの成長が制御可能で、任意の総数の3次元レイヤー構造をつくるのが可能になっている¹³⁾。

2次元配列の応用例

2次元フェリチン配列のデバイス作製の応用として、フローティングゲートメモリを作製した¹⁴⁾。まず、L-フェリチンに人工的に酸化鉄または酸化コバルトコアをバイオミネラリゼーションにより内包させた。つぎに、MOSトランジスタ(10 μ のゲート幅、長さ)を作製したあと、チャネル部分の上にナノドットを内包したフェリチンを吸着させてフェ

図12 フローティングゲートメモリの断面模式図とナノドット配列断面TEM像

フェリチンによりつくられシリコン酸化膜中に埋め込まれたコバルトナノドットを持つフローティングゲートメモリ。(奈良先端科学技術大学院大学、彦野太樹夫、浦岡行治博士、冬木隆博士作製)

図13 フェリチンで作製・配置した量子ドットを電荷保持ドットとして作製したフローティングゲートメモリの動作特性

ゲート電圧をスイープすることでソースドレイン間の電流特性にヒステリシス生じメモリ動作が確認できた。

リチンを配置した。この単層フェリチンを115度で60分間オゾン処理して蛋白質を選択的に完全に除去し、 $6\sim 15\times 10^{11}$ cm^{-2} 程度の密度の単層ナノドット配置を得た¹⁴⁾。つぎにこのナノドットを、化学気相成長法(CVD)により厚み約20 nmの酸化シリコン膜に埋め込み、その後、酸化膜の上にゲート電極を作製し、還元性のガスで450℃1時間のアニール

処理を行った。これにより図 12 の模式図に示すような、MOS トランジスタメモリ(フローティングゲートメモリ)が作製できた。図の下は埋め込まれたコバルトナノドットの断面 TEM 像で、孤立した電荷保存用ナノドットが埋め込まれているのが確認できる。

作製されたフローティングゲートメモリの特性を図 13 に示す。横軸はゲート電圧、縦軸はソースドレイン間電圧 0.1 V で測定したドレイン電流(I_D)である¹⁴⁾。このドレイン電流—ゲート電圧特性(I_D — V_G 特性)を、ゲート電圧 V_G を -10 V から 10 V の間で掃引して測定すると、はっきりとしたヒステリシスが観察された。このヒステリシスはつぎのような現象が起こっている結果と考えられる。ゲート電圧が正に 10 V 印加されると、チャネルからコバルトナノドットに、電子がトンネル酸化膜を通過し、コバルトナノドットに電子が注入される。10 V から -10 V へ向かうゲート電圧掃引では、この閉じ込められた電子のつくる静電界により、あたかもゲート電圧 V_G がマイナス方向にシフトしたようになり、 V_G が 3 V 付近でドレイン電流 I_D が減少をはじめ。逆に、 V_G が -10 V までになると、コバルトナノドット中の電子は追い払われ、あたかもホールが注入されたような状態となる。その結果 -10 V から 10 V へ向かうゲート電圧掃引では、 V_G が -2 V 付近から I_D が流れはじめる。すなわちヒステリシスはバイオナノプロセスで作製されたコバルトナノドットに電子/ホールが注入・保持されたことを示しており、バイオ分子が半導体ナノ構造作製に利用できることを証明している。また耐久性実験では、 10^5 回の書き込み消去で特性の劣化がないことが確認されている。

以上の結果は、バイオミネラリゼーションで作製されたナノ粒子が、電子デバイスのコンポーネントとして利用できることを、世界ではじめて実験的に示したものである。

まとめ

蛋白質がナノ構造を作製する単位、ナノブロックとして有望であることを紹介してきた。今後、人工

蛋白質の創出とあいまって、半導体のナノサイズ構造作製の手法として、生物が築き上げてきたボトムアップ手法が重要な位置を占めるようになると考えられる。さらに、このバイオナノブロックを用いたナノ構造作製では、大型の真空機器や、精密機器、ビーム装置などを必要としないメリットもある。すなわち材料である蛋白質の設計を確実に行うことができる。水溶液中で安価に多量に作製することができる。また基本的に水溶液中のプロセスであり、有機溶媒などを使用することがなく環境負荷の少ないプロセスでもある。

しかしながら問題点もまだ残されている。それは現時点で人工蛋白質の構造設計を自由に行える技術がまだ確立していないことで、蛋白質フォールディングや超分子の自己組織化の早急な理論・手法の発展が望まれる。

以上、対称性を利用した単電子トランジスタ鋳型蛋白質、フェリチンの 2 次元結晶化とその電子デバイス応用を紹介したが、筆者らの提案するバイオナノプロセスはまだ有用性が実証されたばかりで、今後さらに応用例が増え発展すると期待している。

本稿で紹介した研究成果は、科学技術振興機構 CREST の「バイオのナノテクノロジーを用いたナノ集積プロセス」研究チームの研究員・技術員の研究成果や、「プログラマブル人工蛋白質からの組織体構築」研究チームの芝 清隆、佐野健一博士らの研究成果、および奈良先端科学技術大学院大学・物質創成研究科冬木研究室、松下電器先端技術研究所との共同研究成果である。

文 献

- 1) Wong KKW, Mann S : Adv Mater 8 : 928-932, 1997.
- 2) Douglas T, Stark VT : Inorg Chem 39 : 1828-1830, 2000.
- 3) Okuda M, Iwahori K, Yamashita I, Yoshimura H : Biotechnol Bioeng 84 : 187-194, 2003.
- 4) Yamashita I, Hayashi J, Hara M : Chem Lett 33 : 1158-1159, 2004.
- 5) Iwahori K, Yoshizawa K, Muraoka M, Yamashita I : Inorg Chem 44 : 6393-6400, 2005.
- 6) Tsukamoto R, Iwahori K, Muraoka M, Yamashita I : Bull Chem Soc Jpn 78(11) : 2075-2081, 2005.
- 7) Yamashita I : Thin Solid Films 393 : 12-18, 2001.
- 8) Sugimoto S, Kanamaru K, Iwasaki F, Arisaka I, Yamashita I : Angewandte Chem 45(17) : 2725-2728, 2006.
- 9) Yamashita I, Krimura H, Okuda M, Nishio K, Sano K,

- Shiba K, Hayashi T, Hara M, Mishima Y : Small 2(10) : 1148-1152, 2006.
- 10) Hikono T, Uraoka Y, Fuyuki T, Yamashita I : Jpn J Appl Phys 42 : 398-399, 2003.
 - 11) Yoshii S, Yamada K, Matukawa N, Yamashita I : Jpn J Appl Phys 44 : 1518-1523, 2005.
 - 12) Heddle JG, Yokoyama T, Yamashita I, Park SY, Tame JRH : Structure 14 : 923-933, 2006.
 - 13) Sano K, Sasaki H, Shiba K : J Am Chem Soc 128(5) : 1717-1722, 2006.
 - 14) Miura A, Hikono T, Matsumura T, Yano H, Hatayama T, Uraoka Y, Fuyuki T, Yoshii S, Yamashita I : Jpn J Appl Phys 45 : L1-L3, 2006.