

# 分子シャペロンを利用した ATP 応答性ナノデバイスの創製

Fabrication of ATP-Responsive Nanodevice Utilizing Molecular Chaperons

研究代表者 東京大学大学院工学系研究科 講師 金原 数

Lecturer, School of Engineering, The University of Tokyo

## 和文アブストラクト

分子シャペロンと呼ばれる ATP 応答性タンパク質が、発光性を有する CdS ナノクラスターを空孔に取り込み、安定化なシャペロニン/ナノクラスター複合体を形成することを見出した。この複合体中では、ナノクラスターはタンパク質の包接によって外部環境から保護されており、熱的な刺激、消光剤に対する耐性が非常に強いことが分かった。さらに内包されたナノクラスターが ATP の添加により速やかに放出されることが分かった。このように、分子シャペロンを利用することにより、安定でありながら ATP という外部刺激に速やかに応答する、刺激応答性のナノクラスター複合体の創製に成功した。

## Abstract

Molecular chaperons, such as GroEL and *T.th* cpn were found to form stable complexes with cadmium sulfide nanoparticles. In the resulting chaperonin/nanoparticle complexes, nanoparticles were protected from the external environment by encapsulation with thick protein walls. On the other hand, by the action of ATP, the included nanoparticles were thoroughly thrown out and coagulate to lose their unique fluorescence. When the chaperonin from thermophilic bacterium (*T.th* cpn) was used as a host protein assembly, the stability of the chaperonin/nanoparticle complex was considerably enhanced from that of the corresponding GroEL complex.

## 1. 研究目的

生体物質と無機材料とのナノスケールの複合体は、医療をはじめとする幅広い分野において大いに注目を集めている。この中で半導体ナノ粒子は特異な発光挙動を示

すことから、生体物質との複合化により標識材料としての応用がすでに始まっている。本研究では、内部に筒状の空孔を有する巨大タンパク質であるシャペロニンをを用いた、これまでに報告例のない刺激応答性ハイブ

リッド材料の構築を目標として検討を行った。シャペロニン、天然ではタンパク質のリフォールディングを補助している。即ち、自己の空孔内に変性タンパク質を取り込み、そこでリフォールディングを促進させ、ATP に応答して自己の構造を変化させ、内包タンパク質を吐き出すことが知られている。本研究ではタンパク質の空孔内に半導体ナノクラスター (CdS) を導入した複合体を調製し、シャペロニンの ATP 応答性を利用して、ナノクラスターに刺激応答性を付与した新しい複合体を創製することを目的としている (図1)。

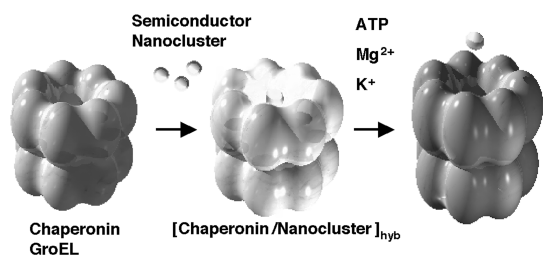


図1 ATP 応答性シャペロニン/ナノクラスター複合体

## 2. 研究経過

### 2.1 シャペロニン/ナノクラスター複合体の調製

文献法<sup>1</sup>に従い、DMF 溶液中で調製した CdS ナノクラスター (直径 2.2 nm) 及び、Tris-HCl 水溶液中で精製した大腸菌由来並びに高度好熱菌由来シャペロニン (GroEL, *T.th* cpn) を適当な条件下にて混合、精製した後に蛍光スペクトル ( $E_x = 370 \text{ nm}$ ,  $E_m = 400\text{-}720\text{nm}$ )・UV スペクト

ル・CD スペクトルによりハイブリッド化を確認した。ハイブリッド化された CdS ナノクラスターは、Tris-HCl 溶液中でナノクラスターの存在を示唆する短波長側へシフトした UV-Vis スペクトルを示した。同様に、蛍光スペクトルではナノクラスター特有の発光バンドを示すことが分かった (図2)。一方で、ハイブリッド化されていない CdS ナノクラスターではこのような特徴的スペクトルは観測されず、セル中でナノクラスターが即座に凝集し、沈殿が生じた。ま

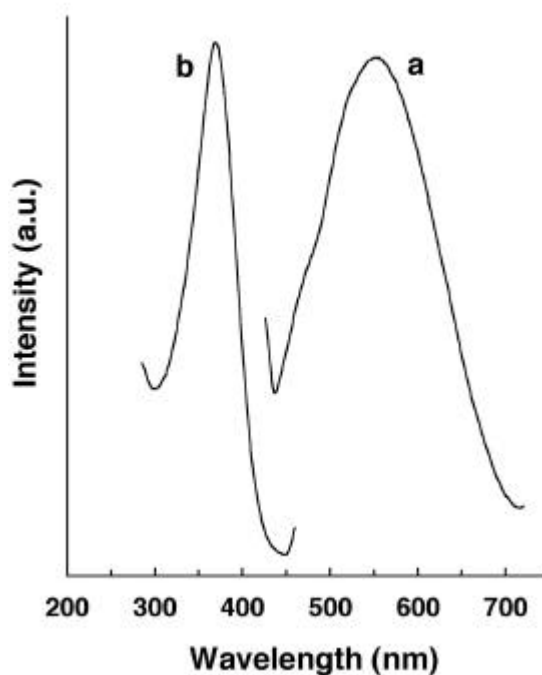


図2 シャペロニン/CdS ナノクラスター複合体の(a)蛍光、(b)励起スペクトル

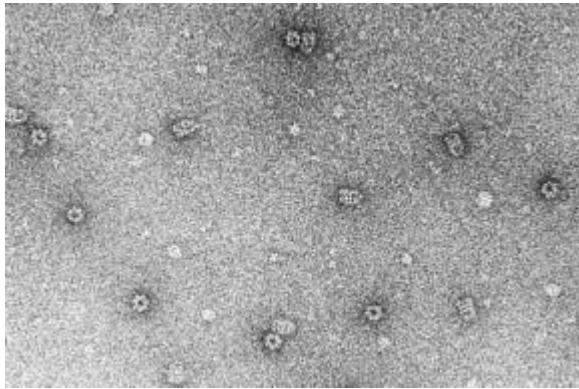


図3 シャペロニン/ナノクラスター複合体のTEM像

た、シャペロニン/CdS ナノクラスター複合体をTEMにより観察したところ、シャペロニン中心部に、ナノクラスターと思われる暗点が観測され、複合体中ではナノクラスターがシャペロニンの空孔に取り込まれていることが強く示唆された(図3)。

## 2.2 複合体の安定性およびATP応答性

調製したシャペロニン/CdS ナノクラスター複合体について、その安定性ならびにATP応答性について以下のような物性評価を行った。まず、タンパク質空孔内へのCdSナノクラスターの内包による電子移動障害の効果を評価するため、メチルビオロゲンによる蛍光消光実験を行った。この結果、複合体のCdSナノクラスター由来の蛍光は、CdSナノクラスター単体の蛍光に比べて、20倍消光されにくいことが分かった。

続いて、加熱による蛍光強度の変化につ

いても評価した。即ち、複合体を4から90まで加熱冷却を繰り返し、それぞれの温度での蛍光強度を測定し、複合体の熱安定性を検討した。その結果、大腸菌由来のGroELとの複合体では40以上になると複合体が損壊し始めるのに対し、高度好熱菌由来*T.th* cpnとの複合体では80まで安定に存在し、蛍光性を維持することが分かった(図4)。両者の耐熱温度の違いは、シャペロニン

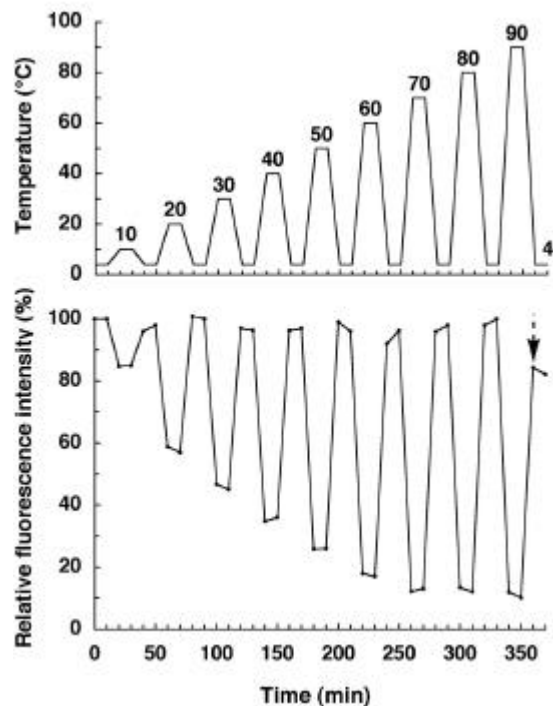


図4 *T.th* cpn / CdS ナノクラスター複合体の蛍光強度の温度変化。上のグラフは温度、下のグラフは蛍光強度を示している。の由来する菌の生存可能温度に相当している。

以上のように、今回調製したシャペロニン/半導体ナノクラスター複合体は様々な環

境において安定であることが確認された。一方で、ATP、 $Mg^{2+}$ イオン、 $K^+$ イオンを複合体の溶液に添加すると、蛍光性の消失が確認された。即ち、ATP に応答してシャペロニンが構造変化することにより内包ナノクラスターを放出し、ナノクラスターが Tris-HCl 水溶液中で凝集したことが示唆された (図5)。このような応答は、ATP 単独、あるいは、 $ADP+Mg^{2+}$ などを加えた場合には全く起こらなかった。このことから、生体系と同様の機構により、内包されたナノクラ

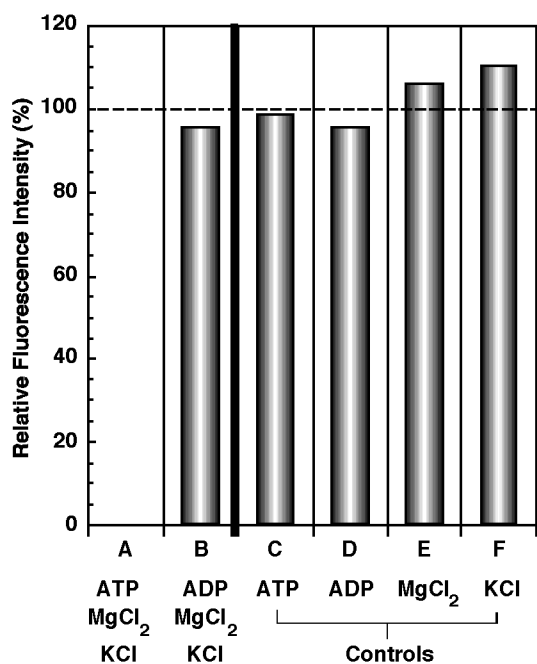


図5 シャペロニン/ナノクラスター複合体の ATP 応答性  
スターが放出されたものと考えられる。

### 3 . 研究成果

以上のように、分子シャペロンと呼ばれるシャペロニンタンパク質の空孔に CdS ナノク

ラスターを取り込ませることに成功し、安定なシャペロニン/CdS ナノクラスター複合体を得ることに成功した。さらに、この複合体が ATP に応答し、内包したナノクラスターを放出することを見出した。この複合体は ATP の加水分解によって起こるタンパク質の運動 (構造変化) を利用した機能性材料の最初の例である。

### 4 . 今後の課題と発展

シャペロニンを初めとする ATP 加水分解性タンパク質の多くは、機械的な運動を通して生体機能を実現していることが知られている。このようなタンパク質の生物学的機能を利用することにより、これまででない概念の機能性材料の開発が可能になると考えられる。

### 5 . 発表論文リスト

1. Chaperonins mediated stabilization and ATP-triggered release of semiconductor nanoparticles, D. Ishii, K. Kinbara, Y. Ishida, N. Ishii, M. Okochi, M. Yohda, and T. Aida, *Nature* in press.

[1] K. Murakoshi et. al., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **94**, 579 (1998).