

1. 研究題目

フェリチン 2次元結晶の新機能材料への応用
Application of ferritin two-dimensional crystals for
functional materials

2. 代表研究者名等

代表研究者 武田茂樹 Shigeki Takeda, PhD
役職 助教授 Associate Professor
所属 群馬大学大学院 工学研究科 ナノ材料システム工学専攻
376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1
Department of Nano-Material Systems,
Graduate School of Engineering, Gunma University
1-5-1 Tenjin-chyo, Kiryu Gunma 376-8515 JAPAN

3. 和文アブストラクト

新しい材料の開発に繋げる研究を目指したナノサイズの鉄を配列化する技術
を確立するために、鉄を内包する蛋白質であるバクテリオフェリチンの2次元
結晶の作製を試みた。組み換え体バクテリオフェリチンは、T7プロモーターを
含む発現ベクターにより形質転換した大腸菌を培養し、その菌体上清から精製
した。これをDEAE-Toyopearlカラム、Sephacryl S-300ゲルろ過カラムによって
精製した。精製したフェリチンで2次元結晶の作製を試み、透過型電子顕微鏡
で観察したところ小さいながら2次元結晶が作製されたことが確認できた。ま
た、蛋白質定量と鉄の定量の比より精製したバクテリオフェリチン1個あたり
の鉄の含有量は約290原子であった。

4. 英文アブストラクト

Production of 2-dimensional crystals of bacterioferritin was investigated to establish
the technology for nano-size particle array of iron and developing of new nano-
materials. Recombinant bacterioferritin was expressed in E. coli using a T7 promoter
system and purified using an ion-exchange column (DEAE-Toyopearl) and a gel
filtration column (Sephacryl S-300). We obtained small 2-dimensional crystal
domains of the purified bacterioferritin and observed them by electron microscopy. We
also confirmed that the content of the iron per each bacterioferritin particle was about
400 atoms.

5 . 本文

5 - 1 . 研究目的

ナノテクノロジーの一環としての生物素材による「バイオナノテクノロジー」が提案され、期待されているが具体的な工業化を念頭においた成果はまだほとんど報告されていない。一方でナノテクノロジーによって解決できると思われる既存技術の問題点としては、たとえば半導体技術における回路の高密度化がある。半導体回路設計におけるは現在の手法の延長上には、さらなる素子の小型化、高密度化に限界があることが以前から指摘されており（ムーアの法則の破綻）根本的に異なる技術による新しい工作技術が模索されている。本研究により金属粒子を基盤上に配列化することが確立できれば、現在の半導体加工技術の 10 倍以上の密度で単電子トランジスタや多論理素子の開発などが可能になる。本研究は工業化に繋がる本格的なナノテクノロジーの第一歩として考えることができる。

本研究で用いるフェリチンは 24 個のサブユニットが組み合わさって直径約 12 nm の粒子を形成し、その内腔に鉄を酸化物として内包することができる分子量約 45 万の鉄貯蔵タンパク質であり、この内包されている鉄粒子の直径は 4-7 nm である。この程度の大きさの金属粒子は量子効果を発揮することが期待できると考えられている。またフェリチン内腔には鉄だけでなく、人工的には各種の金属粒子を取り込ませることができることがこれまでに報告されており、こうしたナノサイズの金属微粒子は工業的価値が高いはずである。またフェリチンは対称性が高いことも特徴の一つであり、2 回軸、3 回軸、および 4 回軸をもつ。

我々はこれまでに鉄を含まないウマのアポフェリチンについては、2 次元結晶を作成しさらにフェリチン間接触の境界面に変異をもつフェリチンを用いてその結晶系を六方格子から斜方格子に変換することに成功している。このようなフェリチンの性質を用いると基盤上に数 nm の金属粒子を規則正しく配置することができる可能性がある。

本研究では生物化学工学をナノテクノロジーに応用する試みとして蛋白質を利用してナノ粒子を作って配列化することを計画した。これまで 2 次元結晶の作製に用いてきたウマのアポフェリチンは大腸菌で容易に作成できるが培養中に菌体内で鉄を内包させることができない。そこで大腸菌の培養により鉄を内包させることができるバクテリオフェリチンを用いてこれを配列化することにより、同時に内包された鉄を並べ、配列化された鉄粒子の特性を活かした新たなナノ材料の開発に繋げるための研究を行った。

5 - 2 . 研究経過

5 - 2 - 1 . 発現と精製

野生型バクテリオフェリチンのゲノムを PCR 法により増幅し、発現ベクターである pET21a(+) に挿入した。この発現ベクターにより形質転換した大腸菌 BL21(DE3)pLysS を 2.5 L の LB 培地で振盪培養した。濁度が OD₆₀₀ で 0.8 に達したところで IPTG を最終濃度 0.1 mM になるように加えバクテリオフェリチンの発現を誘導し、さらに 3 時間培養した。その後遠心分離により集菌し、培地を除いて菌体を TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) で懸濁して、プロテアーゼ

阻害剤 PM SF を最終濃度 1 mM となるように加えてから超音波破碎した。また大腸菌細胞膜と結合しているフェリチンを解離させるため界面活性剤 Tween-20 を加えた。これを遠心した上清を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で透析し、DEAE-Toyopearl カラムで精製し、その後 Sephacryl S-300 ゲルろ過カラムにより精製した。

5 - 2 - 2 . 二次元結晶の作製

2% グルコース、150 mM NaCl、10 mM CdSO₄、10 mM MES (pH 5.7) の展開液をテフロン製のトラフに入れ、そこに 2 μl のフェリチン溶液 (1.3 mg/ml) を注入した。グルコースとフェリチン溶液との比重差によりフェリチン溶液が浮上し、展開液表面で表面張力により展開する。その際に二次元結晶が作られる。作製された二次元結晶をカーボン蒸着した 200 メッシュの銅製グリッドに転写し、酢酸ウラニウムで負染色して透過型電子顕微鏡 (JEM -2010, 加速電流 200kV) で観察した。

5 - 2 - 3 . 鉄の含有量の決定

蛋白質定量 (Lowry 法) を行い精製したフェリチン溶液 1 ml 中の蛋白濃度を求めた。また、ferrozine-鉄錯体による発色からフェリチン溶液 1 ml 中の鉄の濃度を求めた。それぞれの値の比からフェリチン 1 個当たりの鉄の含有量を求めた。

5 - 3 . 研究成果

5 - 3 - 1 . バクテリオフェリチンの精製

ゲルろ過後の画分を蛋白質の吸収極大である 280 nm, ヘムの吸収極大である 420 nm で吸光度測定し、それぞれのピークが重なることから精製できていることが分かった。

また、ピーク付近の画分を SDS-PAGE したところ単一の精製標品であることが確認できた。

5 - 3 - 2 . 二次元結晶の観察

透過型電子顕微鏡での観察により数十個のバクテリオフェリチンからなる正方格子に配列化された領域が見られた (Fig. 1)。

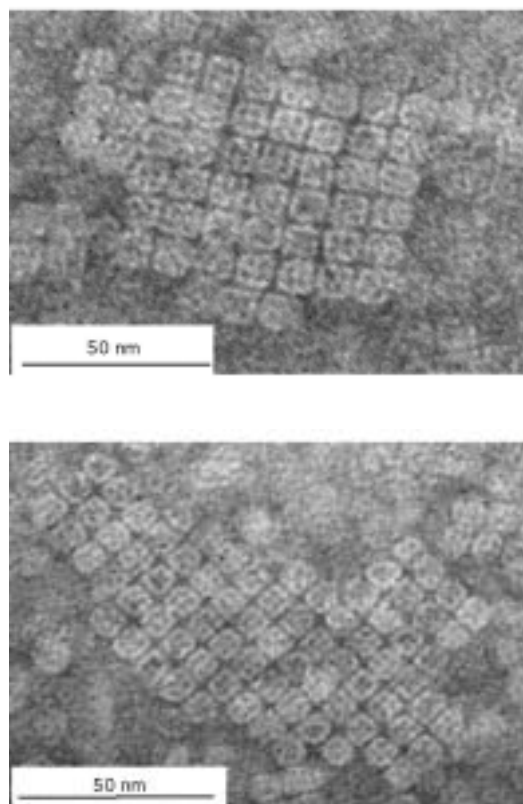


Fig.1 透過型電子顕微鏡観察写真

これまでウマのアポフェリチンで作成された二次元結晶はほとんどが六方格子であったので、両者の比較は多様なフェリチンの2次元的配列化をデザインする上で非常に重要である。おそらくウマのアポフェリチンとバクテリオフェリチンのタンパク質構造の違いおよび粒子間の相互作用の違いが

六方格子に配列化できるか正方格子に配列化できるかを決定していると考えられるため、これを解析すれば自在なフェリチンとそこに内包された鉄粒子の配列化を実現できると考えている。

5 - 3 - 3 . 鉄の含有量の決定

蛋白質定量と鉄の定量から得た値の比から精製したフェリチン 1 個当たりの鉄の含有量は約 290 個であることが分かった。これは約 3500 個程度の鉄を内包する天然ウマ肝臓フェリチンの 1/12 の値となった。

5 - 4 . 今後の課題と発展

5 - 4 - 1 より大きな 2 次元結晶の作製

今回得られた 2 次元結晶は数十個のバクテリオフェリチンが配列化したもので、工業的に利用するには小さすぎると考えられる。2 次元結晶化に用いるバクテリオフェリチンの濃度や結晶化条件をより詳細に検討し、次年度には 100 個 \times 100 個の $1\mu\text{m}^2$ 程度からなる大きさの 2 次元結晶を得られるようにしたい。一方で結晶化したドメインが得られた頻度はかなり高く、電子顕微鏡の視野に容易にみつかる程度であったので結晶化の成功率は高い。このことはバクテリオフェリチンが比較的 2 次元結晶の作製に有利なタンパク質であることを示していると考えられる。

5 - 4 - 2 多様な 2 次元結晶の作製

今回得られた 2 次元結晶は正方格子を作っていて、以前に作成されたウマアポフェリチンが形成する六方格子とは異なっていた。このことはわずかなタンパク質間相互作用の変化で多様な 2 次元結晶を作成する

ことができることを示しており、今後バクテリオフェリチンの表面荷電をアミノ酸変異の導入により調節するなどして、多様な形の 2 次元結晶を作成していきたい。金属粒子の並び方のことなるいくつかの 2 次元結晶が作成できれば材料としての応用範囲がより広がると期待している。

5 - 4 - 3 より多くの鉄を内包したバクテリオフェリチンの調製

今回調製したバクテリオフェリチンは約 290 個の鉄原子を内包しており、量子ドットを形成するには十分と考えられる。しかし内包されている酸化鉄から量子ドットとして利用できるフェライト状態の鉄への変換や具体的な鉄粒子のもつ材料特性の解析にはさらに多数の鉄粒子が含まれている方が有利であると考えられる。そこでバクテリオフェリチンを発現させる時の大腸菌培養条件や発現にもちいる大腸菌の株を検討することにより、より多くの鉄を内包したバクテリオフェリチンの調製が可能かどうか検討していく。

5 - 4 - 4 コア金属間の電子移動の観察や制御 (x - y 軸方向の電子移動)

コア金属間における電子移動の可能性を検討し、その実現を目指す。これらとコア金属 - 基盤間の電子移動とを組み合わせる数百の電子によって作動するトランジスタを実現したい。

5 - 5 . 発表予定

平成 16 年度生物物理学会で発表予定