

# フェリチンタンパク質の ナノスペース電気化学反応とナノ構造体創製

熊本大学大学院自然科学研究科  
富永 昌人

## 1. はじめに

シリコン大規模集積回路の集積度は、ムーアの法則として良く知られているように、3年に4倍の割合で進展してきた。今日の微細加工の代表的なものは半導体リソグラフィ技術である。しかし、この技術も近い将来には加工限界に到達すると言われている。そのため新しい微細加工手法の開発が望まれる。そこで注目されるのが生体分子である。タンパク質は自己集合する規格品であり、タンパク質を利用したナノ構造体の構築が半導体リソグラフィ技術の限界を破るひとつの回答であると考えられる。ナノ構造を削り出すだけでなく、タンパク質＝ナノ規格品の自己集合でナノ構造を作るのである。このようなバイオ分子を用いた微細加工技術をバイオナノプロセスと呼ぶようになった。現在、要求度が大きいものとして、ナノレベルでの無機材料が挙げられる。タンパク質のバイオミネラリゼーションを利用すれば無機材料とタンパク質の複合ナノ規格品を作ることが可能である。すなわち、タンパク質のバイオミネラリゼーションによって、タンパク質内に無機ナノ粒子を合成し、熱処理やオゾン処理によってタンパク質部分だけを取り除くことでその無機ナノ粒子を獲得できる。このバイオナノプロセスは、凝集作用の傾向があるため難しいと考えられていた無機ナノ粒子を規則的に格子点に配列させることを可能にする<sup>1-3)</sup>。

バイオミネラリゼーションの特性を持つタンパク質にフェリチンがある(図1)。フェリチンは24個のサブユニット(分子量約18.5 kDと約21 kDのサブユニット)から構成されていて、外径約12 nm、内径約7 nmの巨大球状タンパク質である。その内部には約4500個の $\text{Fe}^{3+}$ を収容できる空間を有する。フェリチンコアは $\text{Fe}^{2+}$ の酸化と加水分解、さらにリン酸イオン( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ )を取り込んでつくるフェリハイドライト・リン酸塩( $\text{Fe}(\text{O})\text{OH})_8(\text{FeOPO}_3\text{H}_2)$ 結晶からできている。鉄の酸化還元反応によって、鉄を貯蔵・放出する能力を持ち、このコアは人工的に除去、再構築することも可能である<sup>4,5)</sup>。一般に無機コアをもたないフェリチンをアポフェリチンと呼ぶ。その空洞の空間的制約に

よって、無機材料の合成、ナノ粒子生産の鋳型としてフェリチンを用いることができる。実際に、バイオミネラリゼーションを用いて、アポフェリチンのタンパク質のかごの中に、いくつかの種類は無機材料を収容する研究が行われた<sup>3,5,6)</sup>。それぞれのサブユニットは同じ遺伝子から作られているため、フェリチンのもつ空洞のサイズは不変である。得られるナノ粒子も同じサイズであり、得られたナノ粒子をデバイスに応用できる<sup>4,7)</sup>。実際に、コバルトをコアにもつフェリチンを用いて MOS キャパシタが試作されている<sup>7,8)</sup>。

フェリチンのミネラリゼーションには金属の酸化還元反応が関与する。体内での鉄イオンの貯蔵・放出には、鉄イオン ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ) の酸化還元反応による溶解度の変化に起因する。電気化学的手法は、タンパク質のバイオミネラリゼーションを連続的に自由に制御できる可能性がある。本稿では、固定化フェリチンの電極反応の詳細とフェリチンを用いたナノ構造体の創製について著者らの最近の成果について紹介する。

## 2. フェリチンの電極反応

### 2. 1. 自己組織化膜修飾金電極上へのフェリチン固定化<sup>9-11)</sup>

馬脾臓由来のフェリチンの等電点は 4.1 ~ 5.1 であることが知られており、中性溶液中ではフェリチン分子全体としてマイナスチャージを有する<sup>12)</sup>。そこで、静電的にフェリチンを電極上に固定化することを試みた。図 2 に示すような末端に種々の官能基を有するチオール系有機小分子を単結晶金(111)電極上に修飾した。電極上に目的の修飾剤が単分子膜で修飾されたことを電気化学的還元脱離法による評価から確認した。単分子膜修飾電極をフェリチンの中性溶液中に浸漬した後、電極を緩衝溶液中に移してサイクリックボルタモグラムを測定すると、AHT 修飾電極を用いた場合に、-0.3 V 付近にフェリチンに基づく酸化還元ピークが最も大きく観測された (図 3)。AHT 末端のプラスチャージを有するアミノ基とフェリチンが静電的に結合したことがわかる。また、フェリチン分子全体としてはマイナスチャージを有するが、局所的にはプラスチャージのアミノ酸残基も分子表面に存在する。フェリチン分子の局所的に存在するプラスチャージのアミノ酸残基と CPT 末端のマイナスチャージのカルボキシ基との静電結合のため、フェリチンは CPT 修飾電極上にも吸着したと考えられる。未修飾金電極、荷電を有しない HHT および HT 修飾金電極を用いた場合には、フェリチンの吸着は起こらず明確な酸化還元応答も観測されなかった。このことは、AHT および CPT 修飾電極上にフェリチンが静電的に吸着していることを支持する。原子間力顕微鏡 (AFM) で AHT 修飾電極上のフェリチンを観察したところ、フェリチン分子同士の凝集体は全く観察されず、電極表面全体に均一に吸着していることが解った (図 4)。水晶振動子を用いたマイク

ロバランス測定によっても、フェリチンは単分子層レベルの吸着量であることが解った。

AHT 修飾電極上に吸着したフェリチンの電極応答は、電位掃引のサイクルと共に減少した。電極電位を 0 V に保持した直後のボルタモグラムのピーク電流値には特に変化は見られないが、電極電位を -0.4 V に保持した場合には電流値は急激に減少し、次第にフェリチンによる電極応答は観測されなくなった。これは還元されたフェリチンのコアの鉄イオン ( $\text{Fe}^{2+}$ ) がフェリチンのシェル内から放出されたことを示す。また逆に、フェリチンの応答がなくなった電極を希薄な  $\text{FeSO}_4$  の中性溶液中に浸漬し、0.0 V の電位印加後、緩衝溶液中に移して測定を行うと再びフェリチンの酸化還元波が観測された (図 5)。このことは、チオール単分子膜修飾電極上に固定化されたフェリチンの鉄の貯蔵・放出の機能を電気化学的に制御可能であることを示す。

## 2. 2. ポリカチオン修飾 ITO 電極上へのフェリチン固定化<sup>13)</sup>

ITO 電極表面は、中性溶液中ではネガティブチャージしているものの、ポリカチオンで表面修飾することでプラスチャージの表面に機能化できる。実際、ポリ(L-リジン)修飾 ITO 電極をフェリチン溶液に浸漬し、緩衝溶液中でサイクリックボルタモグラムの測定したところ、フェリチンの酸化還元波が観測された (図 6)。ポリ(L-アルギニン)を修飾した電極でも、ポリ(L-リジン)を用いた場合と同様なフェリチンの酸化還元波を観測した。ポリペプチド修飾電極上のフェリチンの吸着量を検討したところ、 $9\sim 13 \times 10^{11}$  molecules/cm<sup>2</sup> の値が得られた。電極表面のラフネスファクターを考慮すると、この値はフェリチン分子が電極上にほぼ単層で密に吸着していることを示す。実際に AFM 測定からも電極表面に一樣にフェリチンが吸着していることが確認できた (図 7)。また、3-アミノプロピルトリメトキシシラン (3-APMS) を修飾してプラスチャージを導入した修飾 ITO 電極上にもフェリチンを静電的に固定化可能であり、その酸化還元波を観測できる。

## 2. 3. フェリチンのナノスペース空間での電気化学反応<sup>14)</sup>

前述したように、フェリチンは内部に直径約 7 nm の空間を有する。フェリチンのコア鉄の酸化還元反応はそのシェル内のナノ空間で起こるため、その反応はバルク溶液とナノ空間がイオンチャンネルで結ばれた特異的な反応場モデルとしても考えられる。電極上に固定化されたフェリチンのサイクリックボルタモグラムの酸化還元ピーク電流値は、電位掃引速度に比例したことから酸化還元ピークの面積から反応した鉄イオン量を算出できる。フェリチンの還元電流から見積もられた反応した鉄イオン数は、 $7.7 \times 10^{-11}$  mol/cm<sup>2</sup> と評価された。電極上に吸着したフェリチン量から算出されたフェリチン

1分子あたりの反応した鉄イオンは、約45個であった。この値は、フェリチンのコアを形成する鉄イオン数から予想されるものよりも極めて小さい。さらに、1秒あたりのフェリチン1分子の鉄イオンの反応量はおおよそ3個と見積もられる。このようにコア鉄イオンの反応量が極めて小さいのは、ナノ空間内ではその酸化還元反応に伴うチャージ補償の影響が大きく、イオンチャンネルを通したイオンの出入りがフェリチンのコア鉄イオンの反応律速であることを示す(図8)。

#### 2. 4. フェリチンの微細構造変化に及ぼす固定化状態の影響

タンパク質は温度により構造変化を起こす。フェリチンの構造は極めて安定であり、高温(約80℃)までその構造を保つことが知られる。著者らは、中性溶液中に存在するフェリチンは約25℃を境に可逆な微細な構造変化を起こすことを蛍光スペクトル測定、円偏光二色性スペクトル測定により見いだした(図9)。また、この構造変化は電極上に固定化されたフェリチンの電極反応にも影響を及ぼし、その電流値が**biphasic**に変化した(図10)。この電流値の変化は、フェリチンの電極上からの脱離に由来するものではなかった。酸化還元反応ではフェリチンシェル内のチャージ補償のため、フェリチンのイオンチャンネルを通したシェル内外間でのイオンの移動が起こると考えられる。フェリチンの構造変化により、イオンがイオンチャンネルを通過する際にタンパク質壁面より受けるエネルギーが高くなり、約25℃付近で**biphasic**な電気化学的挙動が観測されたと考えられる。さらに、タンパク質の微細な構造変化は、固定化基板表面に大きく依存した。すなわち、AHT単分子膜修飾金電極上に固定化されたフェリチンの場合では、フェリチンと修飾電極との結合は0次元的であり、溶液中に存在するフェリチンと同じ状態であると考えられる。一方、ポリカチオン修飾ITO電極に固定化されたフェリチンは、AFM測定結果から長鎖のポリカチオン分子がフェリチン分子を包むように結合していると考えられ、その結合は2次元的であると考えられる。フェリチンの微細な構造変化が及ぼす反応電流値への影響は、単分子膜修飾金電極上に固定化されたフェリチンの方が、ポリカチオン修飾ITO電極に固定化されたそれよりも極めて大きかった(図10)。この結果は、蛍光測定結果からも支持された。すなわち、フェリチンにポリカチオンを共存させた系では、非共存系に比べてフェリチンの微細な構造変化がほとんど観測されなかった。このことから、フェリチンの微細な構造変化の度合いは、電極上でのフェリチンの状態に大きく依存し、電気化学的に高感度に観測できることが明らかとなった。

#### 3. フェリチンを用いたナノ構造体創製

### 3. 1. 金属ナノドット創製<sup>15,16)</sup>

3-アミノプロピルトリメトキシシラン (3-APMS) 修飾シリコン基板上にフェリチン分子を単分子層で修飾固定化後、キレート剤であるニトリロ三酢酸 (NTA) 溶液に浸漬後、400°C、60 分間の熱処理を行ってフェリチンのタンパク質部分を除去した後、その表面の AFM 測定を行った。NTA 未処理の場合は 5 nm 程度のフェリチンコア由来の酸化鉄ナノ粒子を基板表面に観測した (図 1 1)。NTA で 20 分間処理したものは 1 nm 程度のナノ粒子が観測できた。30 分間の浸漬後では、大部分のコア鉄イオンがキレートされて溶液中にとけ込んだためにナノ粒子はほとんど観測されなかった。フェリチン固定化基板をキレート剤溶液に浸漬することで、触媒粒子サイズを容易にかつ効果的に制御できる (図 1 2)。

電気化学法を用いてフェリチンとの電極反応を制御すると同一基板上にサイズの異なった金属ナノ粒子のパターンニングが可能である。前述したように AHT 修飾金電極上に固定化したフェリチンは電気化学的に活性である。一方、11-amino-1-undecanethiol(AUT)修飾金電極上のフェリチンの酸化還元波は観測されない。これは、有機薄膜修飾剤のアルキル鎖長が長くなったことで金電極とフェリチンコアとの電子移動反応が起こりにくくなったためである (図 1 3)。そこで、スタンプ法を用いて AHT と AUT をパターンニング修飾した金電極上にフェリチンを固定化した (図 1 4)。その後、フェリチンのコア鉄イオンが還元される電位の -0.5 V で 30 分間定電位電解し、続けて大気中で 400 °C、1 時間の熱処理によりタンパク質を除去した。走査型電子顕微鏡でその表面を観察すると、スタンプと同じパターンが基板上で観測できた。これは、AHT が修飾された部分の電極上では、電解によってフェリチン内部の鉄(III)イオンが還元され、外部へ放出されたため、コアサイズが直径 1 nm 程度に小さくなったためである。一方、AUT で修飾された部分の電極上では、フェリチンのコア鉄の還元反応は起こらず、粒子サイズは電解処理を施していない場合と同じ約 5 nm のサイズを保持したままである。以上のことから、単分子膜の膜厚の変化によるフェリチンの電気化学反応の相違を利用して、金属ナノ粒子サイズを自在に同一基板上で制御可能である。また、同じ手法は鉄コアのフェリチンに限定されることなく、異種金属をコアに持つフェリチンにも適用可能である。

### 3. 2. カーボンナノチューブの合成<sup>17-19)</sup>

フェリチン由来の酸化鉄ナノドットを触媒として、カーボンナノチューブを合成できる。蒸着金 (111) 基板では触媒粒子とほぼ同サイズの直径を有するカーボンナノチューブが基板に対して平行に成長した (図 1 5)。その成長方向は、金 (111) 結晶面の影

響を受け、金原子の配列に沿った成長であった。シリコン基板では、我々の合成法によりカーボンナノチューブは基板に対して垂直配向して成長することが解った。

#### 4. おわりに

バイオミネラリゼーションを電位という手法で自在にコントロール可能な電気化学的手法は、ナノ構造体構築にも大いに貢献できるばかりでなく、一般的なバイオミネラリゼーションのメカニズムの本質を明らかにできる可能性も有する。バイオミネラリゼーションの応用に対して、基礎研究的なアプローチが少ない。今回紹介した研究の発展を通じて、電気化学法が基礎と応用研究に広く用いられ、新たな知見が得られることを期待したい。

#### 謝辞

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金、および新世代研究所研究助成、池谷科学技術振興財団研究助成、旭硝子財団自然科学系研究助成、日本板硝子材料工学研究助成によって遂行されたものであり、ご援助に対し心より謝意を表する。

#### 参考文献

- 1) I. Yamashita, *Thin Solid Films*, **393**, 12 (2001).
- 2) T. Hikono, Y. Uraoka, T. Fuyuki, I. Yamashita, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **42**, L398 (2003).
- 3) M. Okuda, Y. Kobayashi, K. Suzuki, K. Sonoda, T. Kondoh, A. Wagawa, H. Yoshimura, *Nano Lett.*, **5**, 991(2005).
- 4) M. Okuda, K. Iwahori, I. Yamashita, H. Yoshimura, *Biotechnol. Bioeng.*, **84**, 187 (2003).
- 5) T. Douglas, V. T. Strark, *Inorg. Chem.*, **39**, 1828 (2000).
- 6) R. Tsukamoto, K. Iwahori, M. Muraoka, and I. Yamashita, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **78**, 2075 (2005).
- 7) S. Tiwari, F. Rana, H. Hanafi, A. Hartstein, E. F. Crabbé, K. Chan, *Appl. Phys. Lett.*, **68**, 1377 (1996).
- 8) T. Hikono, T. Matsumura, A. Miura, Y. Uraoka, and T. Fuyuki, M. Takeguchi, S. Yoshii, I. Yamashita, *Appl. Phys. Lett.*, **88**, 023108 (2006).
- 9) M. Tominaga, I. Taniguchi, *Chem. Lett.*, 704 (2001).
- 10) M. Tominaga, I. Taniguchi, *Chem. Lett.*, **32**, 954 (2003).
- 11) M. Tominaga, A. Ohira, Y. Yamaguchi, M. Kunitake, *J. Electroanal. Chem.*, **566**, 323 (2004).

- 12) P. Arosio, T. G. Adellman, J. W. Drysdale, *J. Biol. Chem.*, **253**, 4451 (1987).
- 13) M. Tominaga, K. Soejima, M. Matsumoto, I. Taniguchi, *J. Electroanal. Chem.*, **579**, 51 (2005).
- 14) M. Tominaga, K. Soejima, I. Taniguchi, *J. Electroanal. Chem.*, **617**, 78 (2008).
- 15) M. Tominaga, M. Matsumoto, K. Soejima, I. Taniguchi, *J. Colloid Interface Sci.*, **299**, 761 (2006).
- 16) M. Tominaga, K. Miyahara, K. Soejima, S. Nomura, M. Matsumoto, I. Taniguchi, *J. Colloid Interface Sci.*, **313**, 135 (2007).
- 17) M. Tominaga, A. Ohira, A. Kubo, I. Taniguchi, M. Kunitake, *Chem Commun.*, 1518 (2004).
- 18) M. Tominaga, S. Nomura, I. Taniguchi, *Electrochem. Commun.*, **10**, 888 (2008).
- 19) M. Tominaga, S. Nomura, I. Taniguchi, *Biosens. Bioelectron.*, in press.

図とキャプション

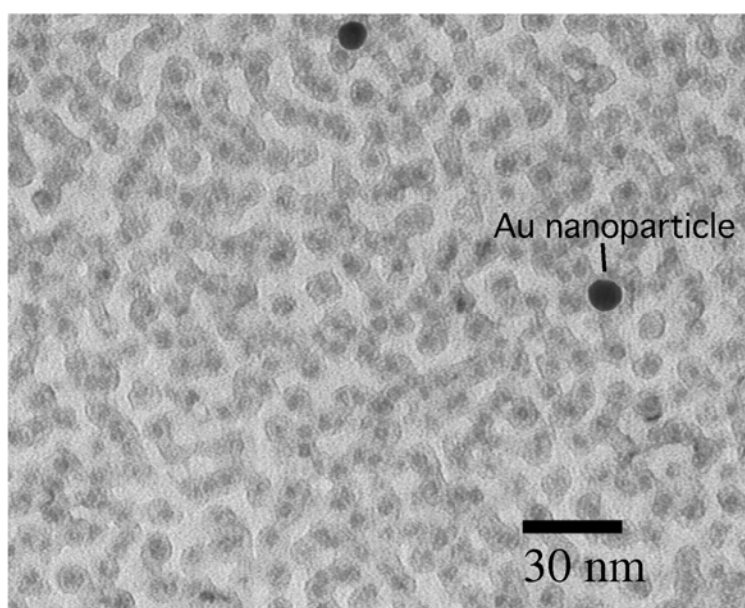


図1 フェリチンの透過型電子顕微鏡写真。同視野内の金ナノ粒子のサイズは13 nm。

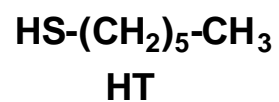
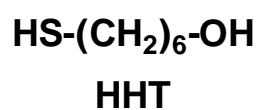
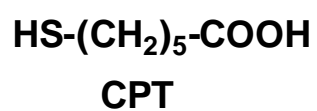
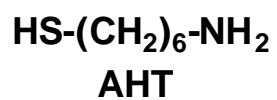


図2 単結晶金(111)電極の単分子膜修飾に用いた種々の官能基を有するチオール系有機小分子。



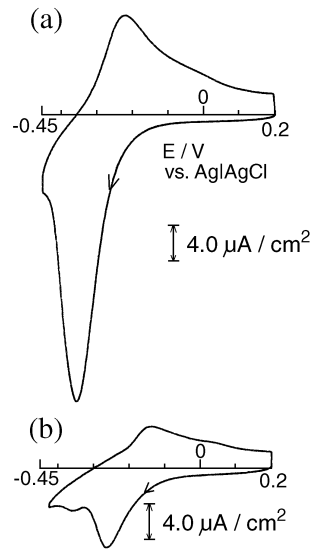


図3 (a) AHT および (b) CPT 修飾単結晶金(111)電極上に吸着したフェリチンに基づく酸化還元波。25°Cのリン酸緩衝溶液(pH 7)；電位掃引速度：50 mV/s。

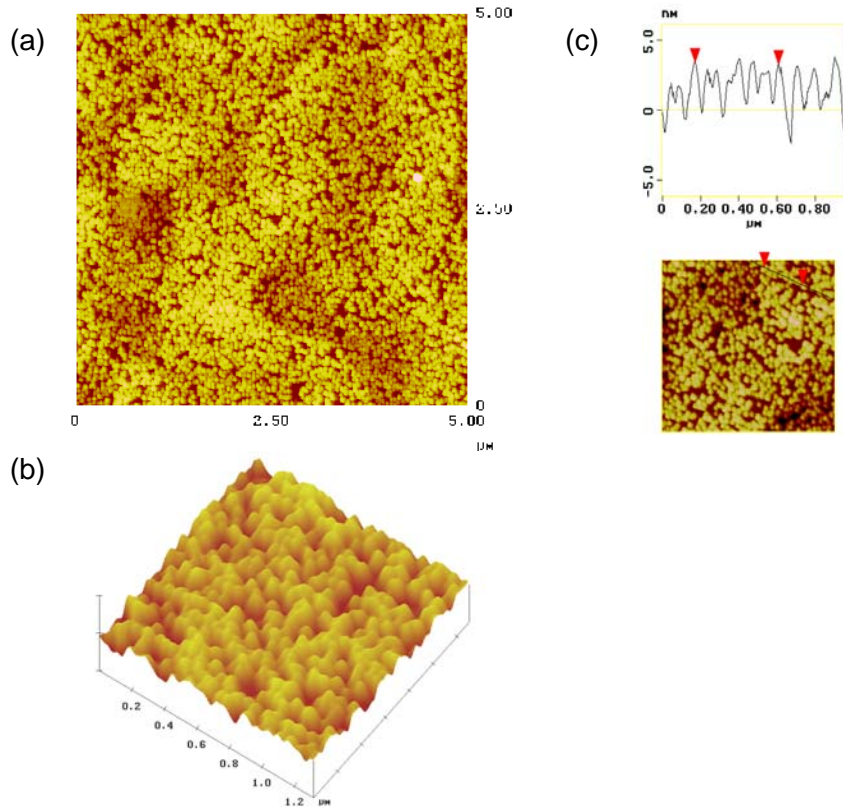


図4 AHT 修飾金基板電極に吸着したフェリチン分子の原子間力顕微鏡 (AFM) 像。(a) トップビュー、(b) サイドビューおよび(c) クロスセクションビュー。

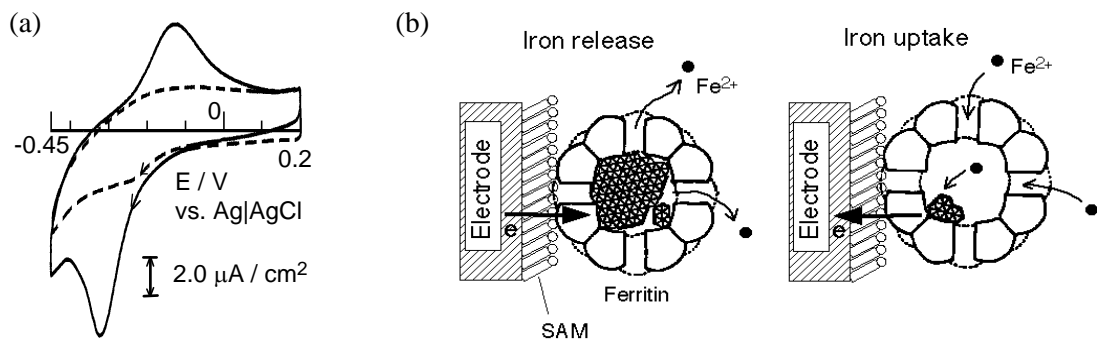


図5 (a)AHT修飾金電極上に固定化されたフェリチンの酸化還元波。 $-0.4\text{ V}$ に電位を保持した(点線)後、 $10\text{ }\mu\text{M FeSO}_4$ のリン酸緩衝溶液(pH 7)中で $0\text{ V}$ に電位を30分間保持した後の酸化還元波(実線)。測定は、 $25^\circ\text{C}$ 、リン酸緩衝溶液(pH 7)で行った。電位掃引速度： $50\text{ mV/s}$ 。(b)電極電位による酸化還元に伴う鉄の貯蔵および放出の模式図。

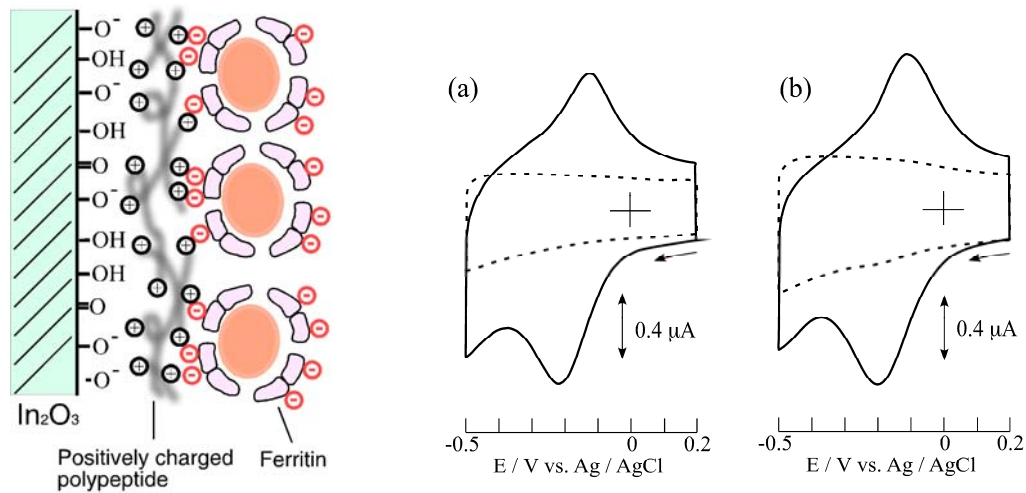


図6 ポリペプチド修飾ITO電極上に静電的に固定化されたフェリチンの模式図。(a)ポリ-L-リジンおよび(b)ポリ-L-アルギニン修飾ITO電極上に固定化されたフェリチンに基づく酸化還元波(実線)およびそのバックグラウンド(点線)。 $25^\circ\text{C}$ のリン酸緩衝溶液(pH 7)；電極面積： $0.25\text{ cm}^2$ ；電位掃引速度： $50\text{ mV/s}$ 。

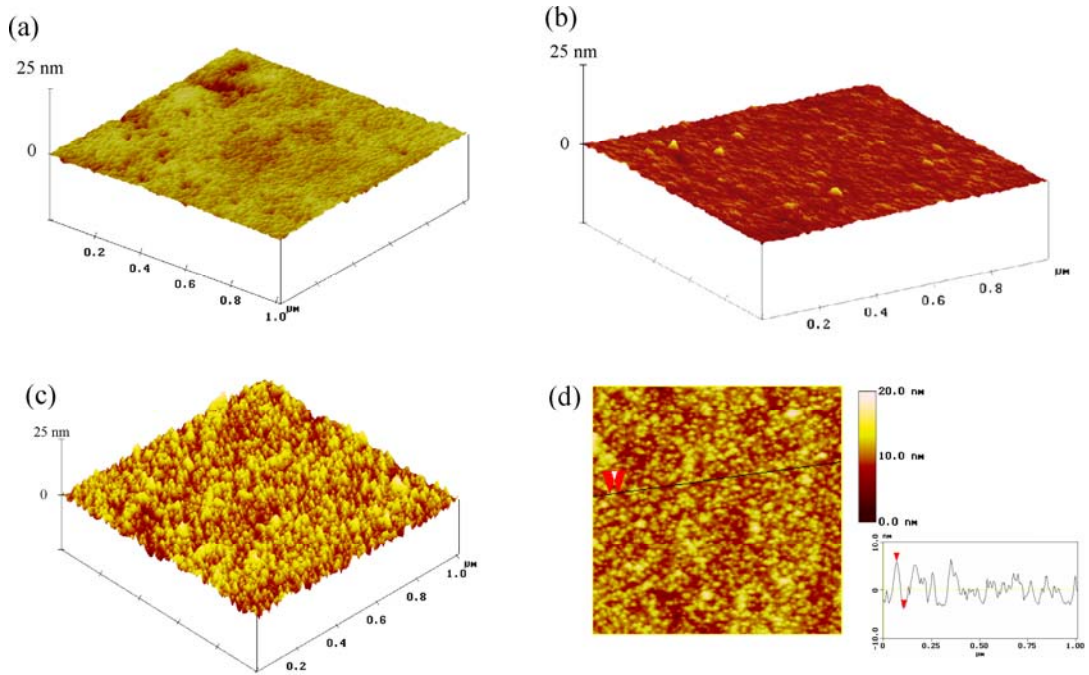


図7 原子間力顕微鏡 (AFM) による表面観察像。(a)平滑 ITO 表面、(b) ポリ-L-リジン修飾した ITO 表面、(c) ポリ-L-リジン修飾 ITO 表面上に吸着したフェリチンのサイドビューおよび(d)トップビューとクロスセクション。

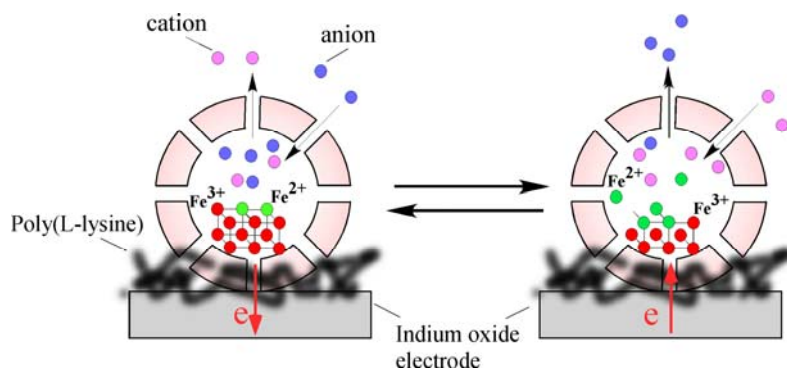


図8 フェリチンのコア鉄イオンの酸化還元反応に伴うチャージ補償のためのイオンの出入りの模式図。

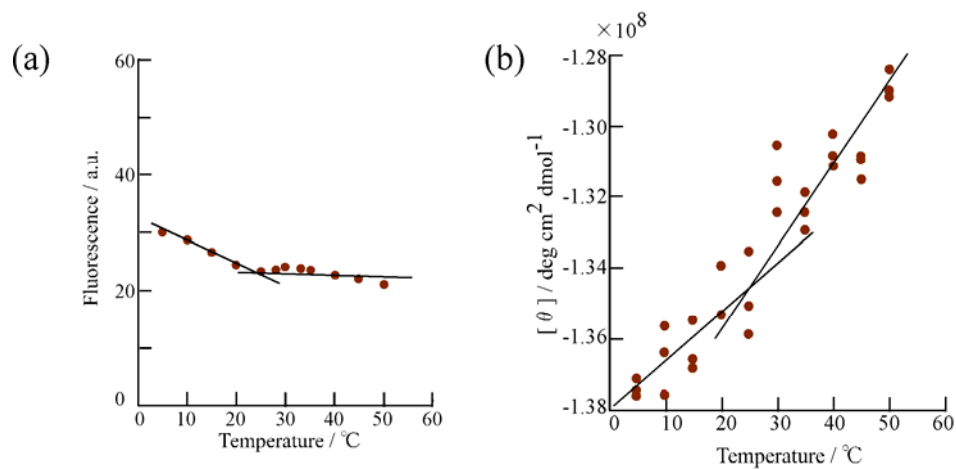


図9 (a)フェリチンの蛍光スペクトルのピーク強度 (at 325 nm) および(b)円偏光二色性スペクトルの $\alpha$ -ヘリックス由来のピーク強度(at 210 nm)の温度依存性。測定はリン酸緩衝溶液(pH 7)中で行った。蛍光測定の励起光：280 nm。

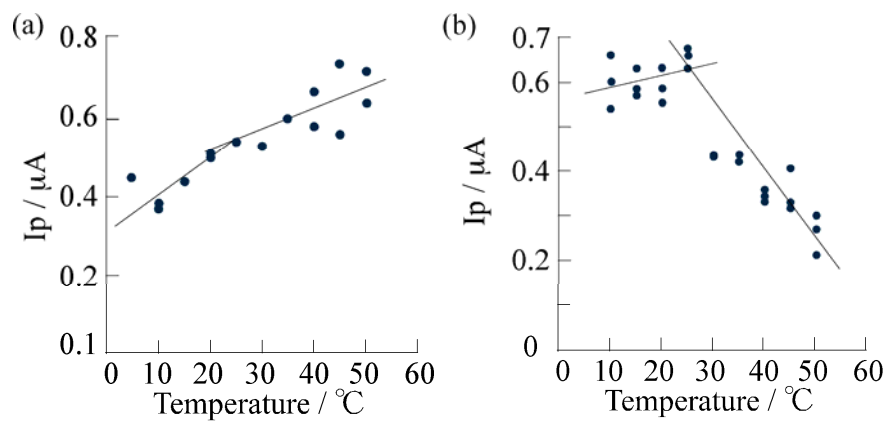


図10 (a) ポリ-L-リジン修飾ITO電極および(b) AHT修飾金電極上に吸着したフェリチンの酸化還元波のピーク還元電流値と温度の関係。酸化還元波はリン酸緩衝溶液(pH 7)で測定した。電位掃引速度：50 mV/s。電極面積：0.25 cm<sup>2</sup>。

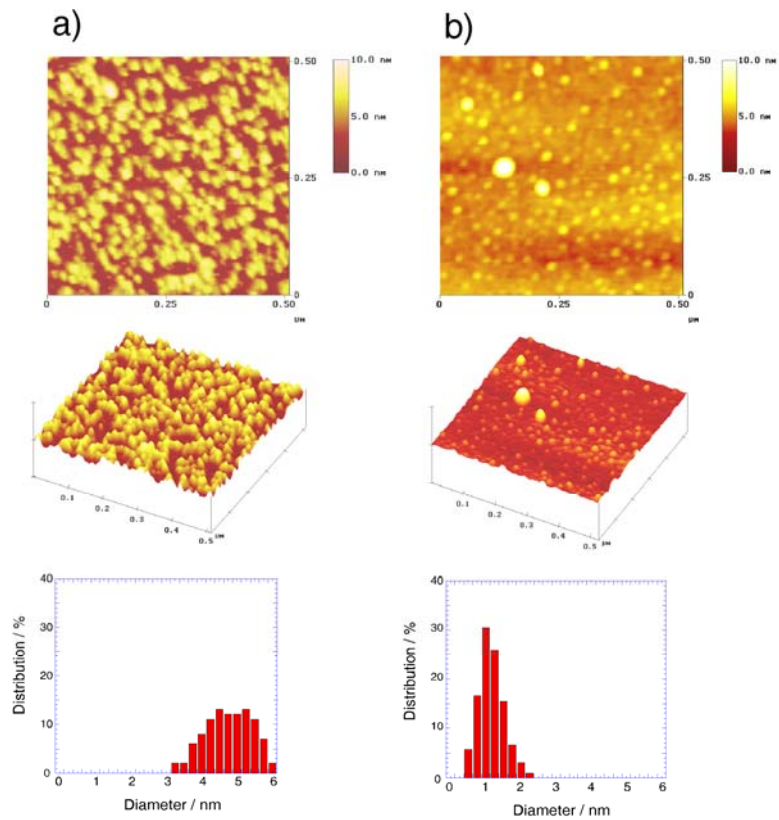


図1-1 フェリチンを固定化した3-アミノプロピルメトキシシラン修飾シリコン基板を10  $\mu\text{M}$  ニトリロ三酢酸(NTA)を含むリン酸緩衝溶液(pH 7)に(a) 0分および(b) 20分浸漬後、400°Cで60分間加熱処理後の表面のAFM像(トップビューおよびサイドビュー)および表面の鉄ナノ粒子のサイズ分布。

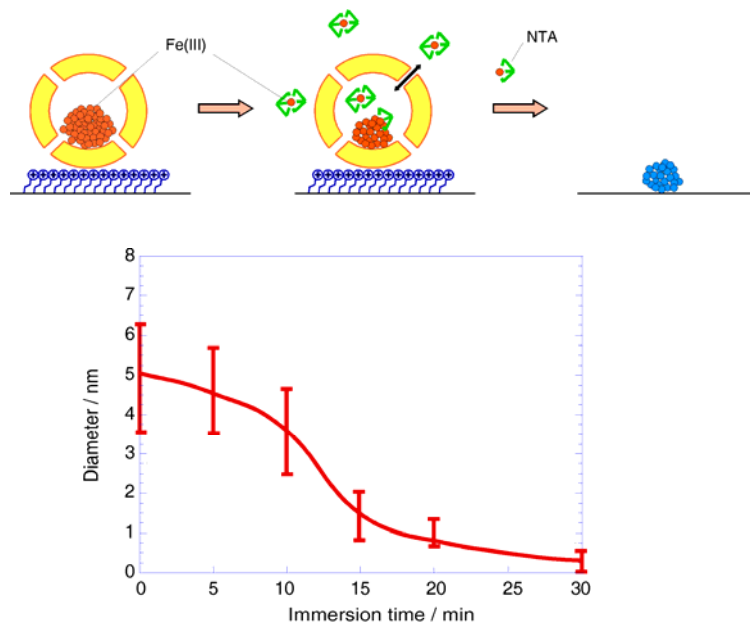


図 1.2 キレート剤ニトリロ三酢酸(NTA)によるフェリチンコアサイズの変化の模式図。10  $\mu\text{M}$  NTA を含むリン酸緩衝溶液(pH 7)への浸漬時間と熱処理後に得られた鉄ナノ粒子のサイズの関係。

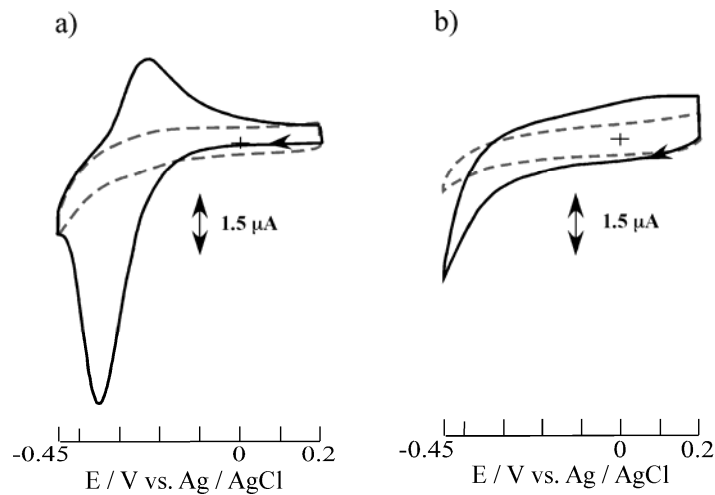


図 1.3 (a)AHT および(b)AUT 修飾金電極上に固定化されたフェリチンの酸化還元波測定。25°Cのリン酸緩衝溶液(pH 7)；電極面積：0.25  $\text{cm}^2$ ；電位掃引速度：50  $\text{mV/s}$ 。

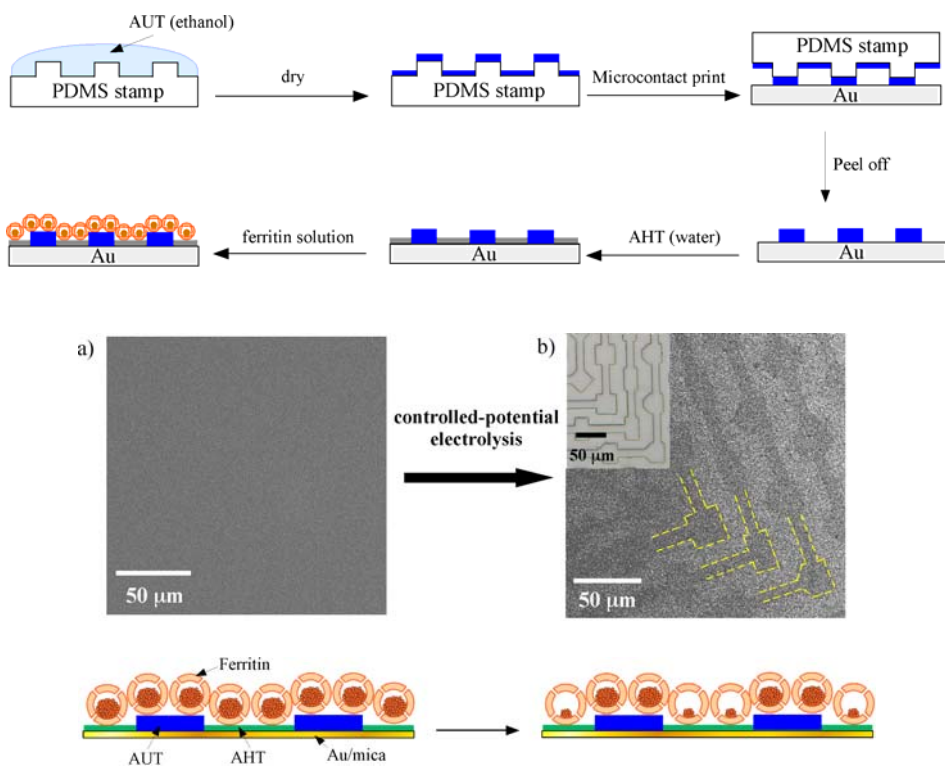


図 1 4 PDMS スタンプ法を用いた AHT および AUT のパターンニング修飾した金基板電極上へのフェリチン固定化。-0.5 V で 30 分間の定電位電解の(a)前(b)後でのフェリチンのパターンニング固定化電極表面の走査型顕微鏡写真像。定電位電解は 25°C のリン酸緩衝溶液(pH 7)中で行った。

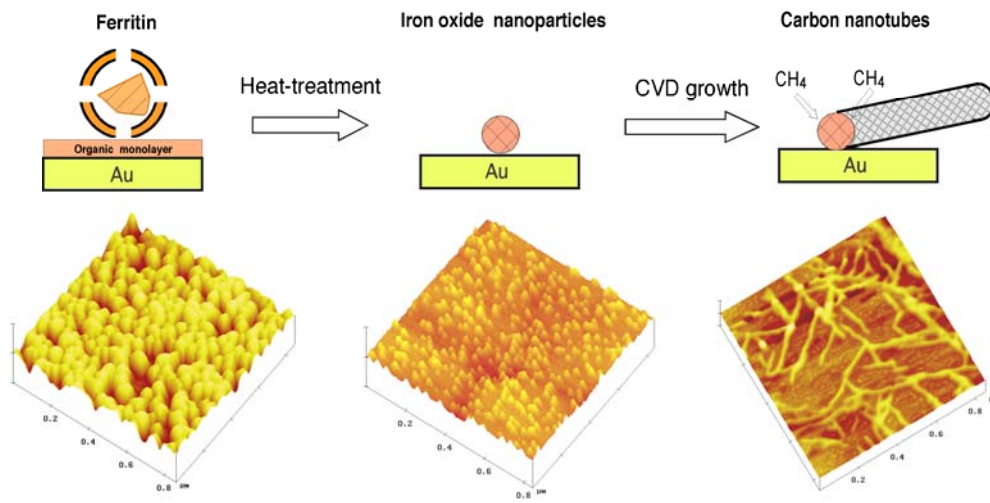


図15 フェリチン由来の鉄ナノ粒子を触媒として金(111)結晶面で成長したカーボンナノチューブのAFM像と模式図。