

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05269

研究課題名(和文) タンパク質結晶細孔をテンプレートとした三次元組織化複合ナノ構造材料の創生

研究課題名(英文) Three dimensional nanostructure fabrication by using protein crystals as the template

研究代表者

宇和田 貴之 (UWADA, Takayuki)

城西大学・理学部・准教授

研究者番号：30455448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質結晶は溶媒チャンネルと呼ばれる三次元ナノ細孔構造を有し、かつその細孔は表面のタンパク質に由来するキラル空間であるため、タンパク質結晶は新規かつ高機能な多孔質材料である。本研究ではニワトリ卵白由来リゾチーム結晶の細孔に発光性の機能性分子を高密度に集積することで共鳴エネルギー移動や三重項-三重項消滅フォトンアップコンバージョンなど希薄溶液では生じない現象を見出した。また結晶細孔内に導入した金・銀錯体がタンパク質の働きにより還元され金・銀ナノ粒子を形成すること、その成長をレーザー照射で迅速化できることを示した。タンパク質結晶を多孔性材料・ミクロ反応容器として活用する方法を切り開いた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質が三次元的に集積して作る結晶がもつ三次元的なnmサイズの穴(細孔)に着目し、ゼオライトやメソポラスシリカ、最近注目のMOF(金属有機構造体)と同様の多孔質材料として活用できるのではと考えた。多孔質材料であるためそこには細孔よりも小さな分子を導入できる。単に導入できるだけでなく、細孔内に機能性分子を高密度に集積することで分子がバラバラな状態ではありえない現象が発現すると明らかにした。また、細孔内で化学反応を起こしナノ粒子を作った。これもまた細孔内でナノ粒子の原材料が高密度に集積しているからこそであり、すなわちタンパク質結晶が新たな多孔質材料であると示した。

研究成果の概要(英文)：Protein crystals possess distinguished three-dimensional structures that contain well ordered nanoporous solvent channels that are typically 0.5-10 nm in diameter. From this viewpoint, structural similarities to nanoporous materials, such as zeolite, mesoporous silica, and metal organic frameworks (MOF), are noteworthy. It is expected that similarly to such nanoporous materials, protein crystals will be employed in a broader range of applications. In this project, we aim to fabricate novel three-dimensional nanostructured materials by exploiting the function of protein crystals. We have found that resonant energy transfer and triplet-triplet annihilation photon upconversion in the nanopores of protein crystals by loading functional molecules in high density. In addition, we have fabricated gold/silver nanoparticles in the nanopores, which can be accelerated by photo-irradiation. Such findings are based on the characteristics of the protein crystals.

研究分野：ナノ材料科学

キーワード：タンパク質結晶 多孔質材料 プラズモニクナノ粒子 フォトンアップコンバージョン 共鳴エネルギー移動 マイクロレーザー 光還元 ナノ粒子パターニング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

我々は現在、タンパク質結晶の多孔質材料/反応容器としての側面に注目し研究を進めている。一般に多孔質材料として想起されるゼオライトやメソポーラスシリカ、MOF(metal organic framework)などのナノサイズの細孔(ポーラス)を持つ無機もしくはハイブリッド多孔質材料は、高い比表面積をもとにした分子間相互作用および分子-界面相互作用により細孔内に分子を吸着・保持できる。このため触媒や分子ふるい、イオン交換材等に應用され研究が進んでいるが、それと同時にマイクロ反応容器としての活用も検討されている。細孔のナノ空間内における分子運動の抑制、分子対称性の破れ、細孔表面に修飾された官能基の作用などにより、液相や気相の均一分散系とは異なった反応が生じうると期待されている。

一方、我々が着目するタンパク質が形成する結晶、タンパク質結晶は、巨大分子であるタンパク質が秩序だった三次元構造となることで配列した溶媒チャンネルと呼ばれる細孔を持ち、その直径はタンパク質の種類に応じて0.5~10 nmとなることから、一種の多孔質材料と捉えることができる。細孔は結晶の体積の大部分を占める水分子で満たされ、そこへ周辺溶液からの分子のとりこみが可能である。ゼオライト等の無機多孔質材料と大きく異なる点として細孔サイズが一般的な無機のものよりも大きく比較的大きな分子でも担持できる。結晶が柔軟なため分子導入後も構造を変化させやすい。細孔表面のアミノ酸がホスト-ゲスト相互作用を生じ分子選択性を持つと同時に官能基としても働き化学反応を促進しうる。タンパク質そのものがキラル分子であるため細孔はキラル空間となる、などが挙げられ反応容器としても大きな可能性を持った材料であるといえる。そもそもタンパク質は金属イオンを担持できるアミノ酸(ヒスチジン、システイン)と還元性を有するアミノ酸(チロシン、トリプトファン)を同時に持っているため、タンパク質単体で金イオンの取り込みから固定、還元、クラスター形成までを完結することから、金属ナノクラスターの調製に既に利用されており、これをタンパク質結晶スケールまで拡大することは可能であろうと考える。タンパク質結晶は材料というには柔軟すぎる欠点もあったが、それも化学的な架橋による堅固化により解決されつつあり、今後の展開が強く期待できる。

我々はこのタンパク質結晶の多孔性材料・マイクロ反応容器としての可能性に着目し、ニワトリ卵白由来リゾチームの結晶を蛍光分子溶液に浸漬することでの溶液から細孔への分子導入過程、その際の細孔表面と分子の相互作用(ホスト-ゲスト効果)、および結晶細孔内での金イオン還元からナノ粒子・クラスター形成過程を *in situ* での分光イメージングにより単一結晶レベルで明らかにしている。つまりタンパク質結晶の材料/反応場としての検証は既に行っており、これからは従来の無機/ハイブリッド多孔質材料に伍する、場合によっては超えると実証する段階に進んでいる。このため重要なことは、結晶細孔に分子を導入・細孔で化学反応を起こすことで初めて得られる機能をもった複合材料を創生することだと考えている。

2. 研究の目的

本研究ではタンパク質結晶細孔への分子導入、細孔内でのナノ物質形成を駆使し、タンパク質結晶をテンプレートとすることで初めて得られる新たな光学特性を発現する三次元複合ナノ構造材料を作り出すことを目的とする。

まず、これまでおこなってきた結晶細孔への分子導入を元にして結晶細孔内部へ任意の機能性分子を高密度に充填させる。三次元かつ高秩序に配列したタンパク質結晶細孔をテンプレートとしてそこへ主に発光性の機能性分子を導入し高秩序で配列させることで、タンパク質結晶は新たな光学特性を発現する三次元複合ナノ構造材料となりうる。蛍光分子の導入によりレーザーでのポンプにより結晶内で色素の誘導放出が発生しレーザー作用が生じるマイクロ色素レーザーの実現、三重項-三重項消滅フォトンアップコンバージョンを示す増感剤・発光剤の同時導入による結晶内フォトンアップコンバージョン発現を目指す。いずれも細孔内で分子凝集を抑えつつ高濃度での導入が重要であり、基盤として我々が明らかにしてきた結晶細孔のホスト-ゲスト効果への理解が欠かせない。

次いで、金属イオンを分子と同様に導入し、細孔内化学反応を元に結晶内で金・銀ナノ粒子を形成する。透明媒質であるタンパク質結晶内に金・銀ナノ粒子が高密度に含まれた新規光学材料となると同時に表面増強ラマン散乱に基づく微量分析プラットフォームとなると考えられる。より期待しているのは、粒子が細孔のキラル空間を鋳型として成長し、キラル粒子が三次元上に配列した μm オーダーのキラルメタマテリアルが得られることである。この金ナノ粒子成長をレーザー照射による光還元法で能動的に制御する。

これら複合ナノ材料調製時、結晶内でどのように分子・イオンが拡散してゆくのか、反応が結晶内で均等に生じるのか偏りがあるのかなど形成過程を顕微分光イメージング技術を駆使して *in situ* 観察することで明らかにし材料創生へフィードバックする。この点に顕微分光計測を得意とする本研究グループの強み、独自性がある。

3. 研究の方法

まず多孔質材料にしてマイクロ反応容器となるタンパク質結晶の素材として結晶化条件がよく調べられているニワトリ卵白由来リゾチームを選び、その結晶を結晶化プレートを用いた蒸気拡散法(シッティングドロップ)により調製した。母液として 50 mg/mL のリゾチーム酢酸バッファ溶液(pH4.5)、リザーバーとして酢酸バッファ、沈殿剤として塩化ナトリウムを用い、25°C に設定したインキュベータに静置した。2~3 日後に無色透明のリゾチームの正方晶系結晶が得られ、長さ 400 μm 程度のものがプレート 1 つのウェルに 5~20 個得られた。結晶が十分に成長した後結晶母液をマイクロピペットで取り除き、1 M 塩化ナトリウム酢酸バッファ溶液で結晶を数回洗浄した後に 1% グルタルアルデヒド溶液を加え 1 日以上静置した。これにより結晶はグルタルアルデヒドにより架橋・固定化される。

結晶を結晶化プレートごと倒立型光学顕微鏡ステージに置き、結晶周辺の溶液を分子溶液へと置き換えることでその分子の結晶細孔への導入を試みた。細孔への分子導入過程の観察および導入された分子の状態の確認は光学顕微鏡による透過光および 405, 488, 532 nm ダイオードもしくは DPSS レーザー照明による発光イメージング測定、任意箇所空間分解分光スペクトル測定により行った。

4. 研究成果

(1) 架橋リゾチーム結晶細孔への機能性分子の集積

まず、リゾチーム結晶の多孔質材料としての強固さを確認するため、ネイティブ及び固定化リゾチーム結晶周辺の溶液を結晶材料であるリゾチームおよび沈殿剤である塩化ナトリウムを含むものから、含まないものへと交換した。ネイティブな結晶は溶液交換により溶解度が低下したため数分間のうちに崩れてしまったが、固定化した結晶には変化が見られない。このリゾチームをグルタルアルデヒドにより架橋し固定化した結晶は物理的及び化学的刺激に強いものとなることがわかり、分子導入に際しての溶媒の選択肢が広がると同時に分子導入された結晶を取り出して活用することも可能となると示した。

この架橋リゾチーム結晶をプラットフォームとして機能性分子導入を試みた。単一種類の分子の導入については論文で報告したため、ついで二種類の分子の同時導入を企図して 400 μM フルオレセイン-ローダミン 6G 混合炭酸バッファ溶液に結晶を浸漬し経過を蛍光分光イメージングで調べた。発光励起には 488 nm ダイオードレーザーを用いた。浸漬直後はフルオレセインに由来する 520 nm 近傍の発光が像全体に広がっていたが時間の経過と共に結晶は明るく、周辺は暗くなり蛍光強度の差が開き始め、およそ 2 時間で変化は飽和した。つまり導入は 2 時間ほどで終了した。同時に結晶表面の発光は緑色から赤みがかった色へと変化していった。蛍光スペクトルを測定したところ、結晶表面および内部ではローダミン 6G に由来する 560 nm 近傍の発光が強くなっていることがわかった。つまりリゾチーム結晶が高濃度にフルオレセインとローダミン 6G という二種類の分子が同時に集積することで効率的なエネルギー移動が生じているものと考えられる。これは溶液では無論観察されない現象であり、nm オーダーの結晶細孔に分子運動が制限された条件下でこれらの分子が集積したことで初めて生じる現象である。

結晶細孔への更なる機能性分子導入を試みるには、機能性分子のほとんどが非水溶性であることから有機溶媒溶液からの分子導入を実現せねばならない。そこでグルタルアルデヒド架橋リゾチーム結晶を DMSO(ジメチルスルホキシド)に浸漬した。他のエタノール、アセトン、DMF などの有機溶媒に浸してもリゾチーム結晶は何らの変化も示さなかったが、DMSO に浸した場合のみ結晶は直後から次第に膨張し、数分後に膨張が完全に止まってから再び結晶を酢酸バッファに浸したところおおよそ元通りに収縮した。これは DMSO のみが結晶細孔内の水分子と置き換わり細孔表面のリゾチームと水和しつつその構造を変化させていると示唆している。つまり細孔内に浸透する有機溶媒は現状 DMSO のみであり、この溶媒からであれば分子が導入できるのではないかと考えた。

この架橋リゾチーム結晶の性質を利用し我々は DMSO 溶液からの結晶内への機能性分子導入を様々試みており、例えばペリレンのような水に不溶な分子の導入に成功している。そこでリゾチーム結晶が固体フォトンアップコンバージョンのテンプレートとなると考え、三重項-三重項消滅フォトンアップコンバージョンを結晶内で生じさせるべくこの発光剤である 9,10-ジフェニルアントラセンと増感剤である白金オクタエチルポルフィリンの細孔への同時導入を試みた。架橋リゾチーム結晶をこの 2 種類の分子の DMF 溶液へと浸漬した上で結晶全体に 532 nm CW レーザー光を照射したところ、浸漬直後から結晶は膨張し同時に青みがかった発光を示した。その発光スペクトルは励起光よりも短波長の 400~500 nm に発光を示しており、これは 9,10-ジフェニルアントラセンの蛍光に帰属される。つまり結晶内部に二種の分子が同時に導入され三重項-三重項消滅が生じている。ただし結晶周辺溶媒を酢酸バッファに再置換するとこのフォトンアップコンバージョンは失われてしまった。すなわち再置換に伴い結晶内に導入されていた分子が脱離してしまった。この理由として結晶細孔表面のアミノ酸と導入分子との間の相互作用が弱く分子が導入はされど固定されていないと考えられる。

上記のようにタンパク質結晶細孔をテンプレートとした機能性分子の集積により細孔内出始

めて発現する光学特性をもった三次元複合ナノ構造材料を調製する目的は大まかには成功したといえる。ただし、発光性分子の高密度集積によるマイクロ色素レーザーの調製に関しては励起用のパルスレーザーがなかったので実現を確認できなかった。引き続き共同研究による実証を行ってゆきたい。

(2) リゾチーム結晶細孔内での金・銀ナノ構造体形成

架橋リゾチーム結晶の機械的・化学的な強固さはマイクロ反応容器として有効であると考え、この細孔内に金もしくは銀ナノ構造体を形成する研究を行った。結晶周辺にまず金錯体(四塩化金酸)溶液を導入し静置し光学顕微鏡による透過光観察を行ったところ、結晶は次第に赤く色づき完全に変化が終わるのに6日を要することがわかった。この赤色は金ナノ粒子の局在プラズモン共鳴に由来するものであると吸収スペクトルから明らかにした。すなわち結晶内に金ナノ粒子が形成したことは明らかである。これはリゾチーム結晶細孔の大きな表面積が金錯体を引き込んだ上で細孔表面のアミノ酸の働きにより高密度に担持された結果と考えられる。更に留意すべきは、この際に液中に金イオンの還元剤となるものを加えていないことである。すなわち、金イオンはリゾチーム結晶によって還元されたと考えられる。金イオンは結晶内のリゾチームが持つチロシンおよびトリプトファン残基により次第に還元され金原子となり、結晶内の制限された空間内で融合しナノ粒子を形成すると考えられる。

この得られたリゾチーム結晶担持金ナノ粒子を東京大学大学院農学研究科 井ノ口蘭先生の協力により透過型電子顕微鏡観察した。結晶をエタノール脱水の上で樹脂に包埋し厚さ5 μm の切片とした上で観察したところ、金ナノ粒子は主に球形で粒径 $9.8 \pm 3.3 \text{ nm}$ であり、細孔サイズ(2.2 \times 4.0 nm)よりも大きくまた細孔に沿って配列していないことがわかった。細孔内での金ナノ粒子の生成はランダムなものでありオストワルド成長によって大きな粒子に統合されてゆき、細孔の柔軟性もあって細孔サイズを超えた大きさとなるのだと考えられる。同様に銀ナノ粒子も結晶内に形成できたが金よりも長時間を要し20日必要であった。銀の場合は導入した溶液が硝酸銀溶液であり、銀は水との錯体を形成している。その電荷が正でありリゾチーム結晶細孔表面の正電荷と反発するために導入される量が負電荷である金錯体よりも低いためであると考えられる。いずれにしても金および銀ナノ粒子を結晶細孔内で形成することに成功しており、タンパク質結晶はプラズモニック材料形成のテンプレートとして利用できることを実証した。

この金・銀イオン還元に必要な時間は405 nm レーザー光照射による光還元で短縮できることを明らかにした。金もしくは銀錯体を担持した架橋リゾチーム結晶に405 nm レーザー光を結晶全体をカバーするよう広域照射したところ、結晶は即座に色づき始め、およそ1分以内に反応は完了すると顕微吸収分光により示した。金および銀錯体は405 nm に吸収を示し、吸収の結果としての光還元により金・銀ナノ粒子を形成することはよく知られている。しかしこの状況で結晶外の金・銀錯体溶液の領域には粒子は形成していないことから、両錯体が結晶細孔内にあることが重要な要素となっていると考えられる。細孔内および表面で錯体が担持され溶液よりも高濃度かつ運動の制限された環境にあること、リゾチームのもつアミノ酸に405 nm の光を吸収するものがあり、それが光励起によって電子励起状態となることで金イオンの還元能が高くなることが理由として考えられる。この機構の解明は今後も引き続き行う予定である。

レーザー光照射により結晶細孔内における金・銀ナノ粒子形成を飛躍的に早めることに成功したため、レーザー光を結晶全体への広域照射ではなく集光照射することで結晶内にピンポイントでの光還元を試みた。レーザー光のビーム径を顕微鏡導入直前でアパーチャーにより大きく絞った上で対物レンズで金錯体を含む結晶内およそ10 μm の円形に照射したところ、その照射範囲のみが金ナノ粒子由来の赤色に色づいた。そこで顕微鏡ステージを走査しながら結晶にレーザー光を照射することで、結晶内に金ナノ粒子の赤色による文字を描くことに成功した。すなわち金ナノ粒子の結晶内パターンニングに成功した。これは透明媒質中に金ナノ粒子をパターンニングしたということであり、新規光学材料としての可能性を示すものである。今後、高開口数レンズやより短波長のレーザー光、あるいはパルスレーザー光の活用によりより高密度・より高精細な金ナノ粒子パターンニングが実現できるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takayuki Uwada, Kohei Kouno, and Mitsuru Ishikawa	4. 巻 5
2. 論文標題 In Situ Absorption and Fluorescence Microspectroscopy Investigation of the Molecular Incorporation Process into Single Nanoporous Protein Crystals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 9605-9613
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.0c01038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宇和田貴之, 本間結衣, 田主和花
2. 発表標題 架橋タンパク質結晶への分子導入による高機能化
3. 学会等名 2022年光化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宇和田貴之, 田主和花, 竹下遼馬, 石川満
2. 発表標題 タンパク質結晶のナノ細孔をプラットフォームとした機能性分子の集積
3. 学会等名 2021年光化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 単一金ナノ粒子のレーザー加熱に伴う局所対流の発生とそれを用いた物質輸送
2. 発表標題 宇和田貴之
3. 学会等名 COMSOL Simulations Week by KESCO 2021（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇和田貴之、久保典孝、石川満、橋本雅司
2. 発表標題 分子結晶フォトンアップコンバージョンナノ粒子の調製と分光測定
3. 学会等名 2020年光化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇和田貴之
2. 発表標題 タンパク質結晶のナノ細孔材料・ナノ反応容器への展開
3. 学会等名 有機分子有機結晶セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 S. Hashimoto, T. Uwada	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 18
3. 書名 High-Energy Chemistry and Processing in Liquids (うちChapter 1を担当)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

城西大学理学部化学科 ナノ機能化学研究室 https://www.josai.ac.jp/~uwada/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	鍋谷 悠 (NABETANI Yu) (50457826)	宮崎大学・工学部・准教授 (17601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関