

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02006/068250

発行日 平成20年8月7日(2008.8.7)

(43) 国際公開日 平成18年6月29日(2006.6.29)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-----------------------------|-----------------|-------------|
| B82B 1/00 (2006.01) | B82B 1/00 ZNA | 4G146 |
| CO1B 31/02 (2006.01) | CO1B 31/02 IO1F | 4HO45 |
| B82B 3/00 (2006.01) | B82B 3/00 | |
| CO7K 1/113 (2006.01) | CO7K 1/113 | |
| CO7K 14/46 (2006.01) | CO7K 14/46 | |

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 23 頁) 最終頁に続く

| | |
|---|---|
| 出願番号 特願2006-549069 (P2006-549069) | (71) 出願人 503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP2005/023675 | |
| (22) 国際出願日 平成17年12月22日(2005.12.22) | |
| (31) 優先権主張番号 特願2004-374093 (P2004-374093) | (74) 代理人 100107984 弁理士 廣田 雅紀 |
| (32) 優先日 平成16年12月24日(2004.12.24) | (72) 発明者 芝 清隆 日本国神奈川県川崎市麻生区千代ヶ丘1-15-15 |
| (33) 優先権主張国 日本国(JP) | (72) 発明者 佐野 健一 日本国東京都品川区東品川3-3-3-506 |
| | (72) 発明者 岩堀 健治 日本国奈良県奈良市中山町1418-1-101 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナノ黒鉛構造体－金属ナノ粒子複合体

(57) 【要約】

無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子形成能をもつフェリチン分子の持つ能力を融合することで、カーボンナノチューブ・カーボンナノホーン、あるいはその修飾体を効率良く、認識し、機能性化合物を担持させることを可能にすること。また、フェリチン分子は界面で二次元結晶形成能を有することから、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドを融合したフェリチンの分子配列能を利用したカーボンナノチューブ・カーボンナノホーンの整列を可能にするものである。フェリチン等のケージタンパク質表面に、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドを融合又は化学的に結合させたタンパク質の内部空間に、無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を保持させ、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドのナノ黒鉛構造体との親和性を利用して、ナノ黒鉛構造体に無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を複数担持させたナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体を作る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ケージタンパク質表面に、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドを融合又は化学的に結合させたタンパク質の内部空間に、無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を保持させ、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドのナノ黒鉛構造体との親和性を利用して、ナノ黒鉛構造体に無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を複数担持させたナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 2】

ケージタンパク質が、フェリチンタンパク質ファミリーであることを特徴とする請求項 1 記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

10

【請求項 3】

フェリチンタンパク質ファミリーが、フェリチンであることを特徴とする請求項 2 記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 4】

フェリチンが、高等真核生物由来のフェリチンであることを特徴とする請求項 3 記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 5】

高等真核生物由来のフェリチンが、ウマ脾臓由来 L タイプのフェリチンであることを特徴とする請求項 4 記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 6】

ケージタンパク質が、細菌に由来することを特徴とする請求項 1 記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

20

【請求項 7】

ケージタンパク質が、ウイルス粒子であることを特徴とする請求項 1 記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 8】

ナノ黒鉛構造体認識ペプチドが、配列番号 1 ~ 20 のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチドであることを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 9】

ナノ黒鉛構造体認識ペプチドが、配列番号 1 ~ 20 のいずれかに示されるアミノ酸配列の全部又はその一部を含むナノ黒鉛構造体に結合能を有するペプチドであることを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

30

【請求項 10】

配列番号 1 ~ 20 のいずれかに示されるアミノ酸配列が、DYFSSPY YEQLF (配列番号 1) であることを特徴とする請求項 8 又は 9 記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 11】

配列番号 1 ~ 20 のいずれかに示されるアミノ酸配列が、YDPFHII (配列番号 2) であることを特徴とする請求項 8 又は 9 記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

40

【請求項 12】

無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子が、金属ナノ粒子であることを特徴とする請求項 1 ~ 11 のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 13】

無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子が、金属化合物ナノ粒子であることを特徴とする請求項 1 ~ 11 のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 14】

金属化合物ナノ粒子が、酸化金属ナノ粒子であることを特徴とする請求項 13 記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 15】

50

金属化合物ナノ粒子が、磁性材料ナノ粒子であることを特徴とする請求項 13 記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 16】

金属が、鉄、ベリリウム、ガリウム、マンガン、リン、ウラン、鉛、コバルト、ニッケル、亜鉛、カドミウム又はクロムであることを特徴とする請求項 1 ~ 15 のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 17】

無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子が、酸化鉄ナノ粒子、セレン化カドミウムナノ粒子、セレン化亜鉛ナノ粒子、硫化亜鉛ナノ粒子、又は硫化カドミウムナノ粒子であることを特徴とする請求項 1 ~ 11 のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

10

【請求項 18】

ナノ黒鉛構造体が、カーボンナノチューブ又はカーボンナノホーンであることを特徴とする請求項 1 ~ 17 のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 19】

カーボンナノチューブ又はカーボンナノホーンが、構成する炭素構造に官能基が付加されていることを特徴とする請求項 18 記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 20】

ナノ黒鉛構造体が基板上で二次元に整列されていることを特徴とする請求項 1 ~ 19 のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

20

【請求項 21】

金属ナノ粒子が基板上で二次元に整列されていることを特徴とする請求項 1 ~ 19 のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 22】

ケージタンパク質が除去されていることを特徴とする請求項 20 記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 23】

ケージタンパク質表面に、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドを融合又は化学的に結合させたタンパク質。

【請求項 24】

ケージタンパク質が、フェリチンタンパク質ファミリーであることを特徴とする請求項 23 記載のタンパク質。

30

【請求項 25】

フェリチンタンパク質ファミリーが、フェリチンであることを特徴とする請求項 24 記載のタンパク質。

【請求項 26】

フェリチンが、高等真核生物由来のフェリチンであることを特徴とする請求項 25 記載のタンパク質。

【請求項 27】

高等真核生物由来のフェリチンが、ウマ脾臓由来Lタイプのフェリチンであることを特徴とする請求項 26 記載のタンパク質。

40

【請求項 28】

フェリチンタンパク質ファミリーが、細菌に由来することを特徴とする請求項 23 記載のタンパク質。

【請求項 29】

ケージタンパク質が、ウイルス粒子であることを特徴とする請求項 23 記載のタンパク質。

【請求項 30】

ナノ黒鉛構造体認識ペプチドが、配列番号 1 ~ 20 のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチドであることを特徴とする請求項 23 ~ 29 のいずれか記載のタンパク質。

50

【請求項 3 1】

ナノ黒鉛構造体認識ペプチドが、配列番号 1 ~ 2 0 のいずれかに示されるアミノ酸配列の全部又はその一部を含むナノ黒鉛構造体に結合能を有するペプチドであることを特徴とする請求項 2 3 ~ 2 9 のいずれか記載のタンパク質。

【請求項 3 2】

配列番号 1 ~ 2 0 のいずれかに示されるアミノ酸配列が、D Y F S S P Y Y E Q L F (配列番号 1) であることを特徴とする請求項 3 0 又は 3 1 記載のタンパク質。

【請求項 3 3】

配列番号 1 ~ 2 0 のいずれかに示されるアミノ酸配列が、Y D P F H I I (配列番号 2) であることを特徴とする請求項 3 0 又は 3 1 記載のタンパク質。

10

【請求項 3 4】

無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子が、金属ナノ粒子であることを特徴とする請求項 2 3 ~ 3 3 のいずれか記載のタンパク質。

【請求項 3 5】

無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子が、金属化合物ナノ粒子であることを特徴とする請求項 2 3 ~ 3 3 のいずれか記載のタンパク質。

【請求項 3 6】

金属化合物のナノ粒子が、酸化金属ナノ粒子であることを特徴とする請求項 3 5 記載のタンパク質。

【請求項 3 7】

金属化合物のナノ粒子が、磁性材料ナノ粒子であることを特徴とする請求項 3 5 記載のタンパク質。

20

【請求項 3 8】

金属が、鉄、ベリリウム、ガリウム、マンガン、リン、ウラン、鉛、コバルト、ニッケル、亜鉛、カドミウム又はクロムであることを特徴とする請求項 2 2 ~ 3 6 のいずれか記載のタンパク質。

【請求項 3 9】

無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子が、酸化鉄ナノ粒子、セレン化カドミウムナノ粒子、セレン化亜鉛ナノ粒子、硫化亜鉛ナノ粒子、又は硫化カドミウムナノ粒子であることを特徴とする請求項 2 3 記載のタンパク質。

30

【請求項 4 0】

ナノ黒鉛構造体が、カーボンナノチューブ又はカーボンナノホーンであることを特徴とする請求項 2 3 ~ 3 9 のいずれか記載のタンパク質。

【請求項 4 1】

カーボンナノチューブ又はカーボンナノホーンが、構成する炭素構造に官能基が付加されていることを特徴とする請求項 4 0 記載のタンパク質。

【請求項 4 2】

請求項 2 3 ~ 4 1 のいずれか記載のタンパク質の内部空間に、無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を保持させ、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドのナノ黒鉛構造体との親和性を利用して、ナノ黒鉛構造体に無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を複数担持させる方法。

40

【請求項 4 3】

請求項 2 3 ~ 4 1 のいずれか記載のタンパク質の内部空間に、無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を保持させ、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドのナノ黒鉛構造体との親和性を利用して、ナノ黒鉛構造体に無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を複数担持させ、加熱処理によりタンパク質部分を取り除き、ナノ黒鉛構造体と無機金属化合物のナノ粒子との複合体を作る方法。

【請求項 4 4】

請求項 2 3 ~ 4 1 のいずれか記載のタンパク質の内部空間に、無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を保持させ、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドのナノ黒鉛構造体との親和性

50

を利用して、ナノ黒鉛構造体に無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を複数担持させ、電子線処理によりタンパク質部分を取り除き、ナノ黒鉛構造体と無機金属化合物のナノ粒子との複合体を作る方法。

【請求項 4 5】

二次元結晶を形成した請求項 2 3 ~ 4 1 のいずれか記載のタンパク質に、ナノ黒鉛構造体を結合させ、ナノ黒鉛構造体を配列させる方法。

【請求項 4 6】

二次元のアレイを形成した請求項 2 3 ~ 4 1 のいずれか記載のタンパク質に、ナノ黒鉛構造体を結合させ、ナノ黒鉛構造体を配列させる方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、フェリチン等のケージタンパク質の表面にナノ黒鉛構造体認識ペプチドを融合又は化学的に結合させたタンパク質や、該タンパク質を用いて作製した、ナノ黒鉛構造体に無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を複数担持させたナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体等に関する。例えば、ナノメートルスケールの微細構造を有する黒鉛構造化合物とこれを特異的に認識する融合フェリチン等のケージタンパク質を介して、ナノ粒子を複数担持させたナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体は、半導体・ナノバイオテクノロジーなどに有利に用いることができる。

【背景技術】

20

【0002】

炭素の結晶構造としてはダイヤモンドとグラファイトが古くから知られているが、1985年にはスモーリー (R.E.Smallley)、カール (R.F.Curl)、クロトー (H.W.Kroto) により (C60) が発見された (例えば、非特許文献 1)。C60 は 12 個の五角形と 20 個の六角形からなるサッカーボール状の構造をしており、C60 のほかにも C70、C76 などの大きな籠状分子が存在し、これら一連の分子は「フラレン」と呼ばれている。また、1991年には飯島澄男により「カーボンナノチューブ」(非特許文献 2、特許文献 1)、1999年には同じく飯島澄男により「カーボンナノホーン」(非特許文献 3、特許文献 1) といった、それまで存在が知られていなかった新しい構造を持った炭素系化合物が相次いで発見された。これら、フラレン、カーボンナノチューブ、カーボンナノホーンはいずれも炭素原子の 6 員環と 5 員環から構成されており、ナノメートルスケールの微細構造体を形成することから、「ナノ黒鉛構造体」として近年大きな注目を集めている。

30

【0003】

ナノ黒鉛構造体が注目を集める理由をいくつか上げてみると、「カーボンナノチューブが、そのカイラリティーの違いにより金属と半導体の両方の性質をもつことができる」(非特許文献 4)、「金属導入フラレンが超電導を示す」(非特許文献 5)、「カーボンナノホーンの示す選択的な気体貯蔵能力」(非特許文献 6)、「カーボンナノホーンのもつ医薬化合物の担持、徐放能力」(特許文献 2、非特許文献 7) などがある。これらの特徴的な性質を利用して、新しい電子材料や触媒、光材料、その他の分野で、より具体的には、半導体配線、蛍光表示管、燃料電池、ガス貯蔵、遺伝子治療ベクター、化粧品、薬品送達システム、バイオセンサーなどへのナノ黒鉛構造体の応用利用が期待されている。

40

【0004】

発明者の一人、芝清隆らはナノ黒鉛構造体の一つであるカーボンナノホーンに結合するペプチドモチーフを、ファージ提示法により単離している (特許文献 3、非特許文献 8)。

【0005】

一方、フェリチンタンパク質は、「必須の金属であるが、毒性も同時に備えもつ『鉄』分子」を生体内で貯蔵するタンパク質として、古くから知られている。フェリチンは動植物からバクテリアまで普遍的に存在していて、生体あるいは細胞中の鉄元素のホメオス

50

タシスに深く関わっている。ヒトやウマなどの高等真核生物のフェリチンは、分子量約 20 kDa のペプチド鎖が直径約 12 nm の 24 量体からなる球核状構造を形成し、内部に 7 - 8 nm の空間を持つ。この内部空間に、ナノ粒子状の酸化鉄のかたまりとして鉄分子を貯蔵している。タンパク質球殻（ケージ）を構成する 24 個のサブユニットには 2 種類のタイプ（Hタイプ、Lタイプ）があり、その組成比は生物種、組織により異なっている。

【0006】

天然には鉄のナノ粒子を内部に貯蔵するフェリチンであるが、しかしながら人工的には、鉄以外にも、ベリリウム、ガリウム、マンガン、リン、ウラン、鉛、コバルト、ニッケル、クロムなどの酸化物、また、セレン化カドミウム、硫化亜鉛、硫化鉄、硫化カドミウムなどの半導体・磁性体などのナノ粒子を貯蔵できることが示されており、半導体材料工学分野や保険医療分野での応用研究が盛んにおこなわれている。

10

【0007】

【特許文献1】特開 2001 - 64004

【特許文献2】特願 2004 - 139247

【特許文献3】特開 2004 - 121154

【非特許文献1】Nature, 318:162-163, 1985

【非特許文献2】Nature, 354:56-58, 1991

【非特許文献3】Chem. Phys. Lett., 309: 165-170, 1999

【非特許文献4】Nature, 391:59-62

20

【非特許文献5】Nature, 350:600-601

【非特許文献6】日経サイエンス、42, 8月号, 2002

【非特許文献7】Mol Pharmaceutics 1: 399

【非特許文献8】Langmuir, 20, 8939-8941, 2004

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

優れた特性をもつナノ黒鉛構造体と、金属内包フェリチン分子を組合せることができると、これまでにない新しい機能をもった複合材料の開発が期待できる。この場合、カーボンナノチューブ、カーボンナノホーンなどのナノ黒鉛構造体をフェリチン分子が効率良く認識し、結合させる技術が必要となる。本発明の課題は、無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子形成能をもつフェリチン分子の持つ能力をナノ黒鉛構造体認識ペプチドに融合することで、カーボンナノチューブ・カーボンナノホーン、あるいはその修飾体を効率良く、認識し、機能性化合物を担持させることを可能にすることにある。また、フェリチン分子は界面で二次元結晶形成能を有し、分子配列能を持つことから、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドを融合したフェリチンの分子配列能を利用したカーボンナノチューブ・カーボンナノホーンの整列を可能にすることにある。

30

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究し、ウマ脾臓由来 Lタイプフェリチン分子のアミノ末端をコードする cDNA に、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなるペプチドをコードする DNA を融合させ、大腸菌を利用して、配列番号 26 に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質を発現し、このタンパク質を精製し、得られた融合タンパク質の内部空間に、酸化金属ナノ粒子を保持させ、ナノ黒鉛構造体上にナノ粒子を複数担持させることができることを確認し、本発明を完成させるに至った。

40

【0010】

すなわち本発明は、(1) ケージタンパク質表面に、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドを融合又は化学的に結合させたタンパク質の内部空間に、無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を保持させ、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドのナノ黒鉛構造体との親和性を利用して、ナノ黒鉛構造体に無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を複数担持させたナノ

50

黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体や、(2) ケージタンパク質が、フェリチンタンパク質ファミリーであることを特徴とする上記(1)記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体や、(3) フェリチンタンパク質ファミリーが、フェリチンであることを特徴とする上記(2)記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体や、(4) フェリチンが、高等真核生物由来のフェリチンであることを特徴とする上記(3)記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体や、(5) 高等真核生物由来のフェリチンが、ウマ脾臓由来Lタイプのフェリチンであることを特徴とする(4)記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体や、(6) ケージタンパク質が、細菌に由来することを特徴とする上記(1)記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体や、(7) ケージタンパク質が、ウイルス粒子であることを特徴とする上記(1)記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体や、(8) ナノ黒鉛構造体認識ペプチドが、配列番号1~20のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチドであることを特徴とする上記(1)~(7)のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体や、(9) ナノ黒鉛構造体認識ペプチドが、配列番号1~20のいずれかに示されるアミノ酸配列の全部又はその一部を含むナノ黒鉛構造体に結合能を有するペプチドであることを特徴とする上記(1)~(7)のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体や、(10) 配列番号1~20のいずれかに示されるアミノ酸配列が、DYFSSPYEQLF(配列番号1)であることを特徴とする上記(8)又は(9)記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体や、(11) 配列番号1~20のいずれかに示されるアミノ酸配列が、YDPFHHII(配列番号2)であることを特徴とする上記(8)又は(9)記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体や、(12) 無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子が、金属ナノ粒子であることを特徴とする上記(1)~(11)のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体や、(13) 無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子が、金属化合物ナノ粒子であることを特徴とする上記(1)~(11)のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体や、(14) 金属化合物ナノ粒子が、酸化金属ナノ粒子であることを特徴とする上記(13)記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体や、(15) 金属化合物ナノ粒子が、磁性材料ナノ粒子であることを特徴とする上記(13)記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体や、(16) 金属が、鉄、ベリリウム、ガリウム、マンガン、リン、ウラン、鉛、コバルト、ニッケル、亜鉛、カドミウム又はクロムであることを特徴とする上記(1)~(15)のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体や、(17) 無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子が、酸化鉄ナノ粒子、セレン化カドミウムナノ粒子、セレン化亜鉛ナノ粒子、硫化亜鉛ナノ粒子、又は硫化カドミウムナノ粒子であることを特徴とする上記(1)~(11)のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体や、(18) ナノ黒鉛構造体が、カーボンナノチューブ又はカーボンナノホーンであることを特徴とする上記(1)~(17)のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体や、(19) カーボンナノチューブ又はカーボンナノホーンが、構成する炭素構造に官能基が付加されていることを特徴とする上記(18)記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体や、(20) ナノ黒鉛構造体が基板上で二次元に整列されていることを特徴とする上記(1)~(19)のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体や、(21) 金属ナノ粒子が基板上で二次元に整列されていることを特徴とする上記(1)~(19)のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体や、(22) ケージタンパク質が除去されていることを特徴とする請求項20記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体に関する。

【0011】

また本発明は、(23) ケージタンパク質表面に、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドを融合又は化学的に結合させたタンパク質や、(24) ケージタンパク質が、フェリチンタンパク質ファミリーであることを特徴とする上記(23)記載のタンパク質や、(25) フェリチンタンパク質ファミリーが、フェリチンであることを特徴とする上記(24)記載のタンパク質や、(26) フェリチンが、高等真核生物由来のフェリチンであることを特徴とする上記(25)記載のタンパク質や、(27) 高等真核生物由来のフェリチンが、ウマ脾臓由来Lタイプのフェリチンであることを特徴とする上記(26)記載のタンパク質

10

20

30

40

50

や、(28)フェリチンタンパク質ファミリーが、細菌に由来することを特徴とする上記(23)記載のタンパク質や、(29)ケージタンパク質が、ウイルス粒子であることを特徴とする上記(23)記載のタンパク質や、(30)ナノ黒鉛構造体認識ペプチドが、配列番号1~20のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチドであることを特徴とする上記(23)~(29)のいずれか記載のタンパク質や、(31)ナノ黒鉛構造体認識ペプチドが、配列番号1~20のいずれかに示されるアミノ酸配列の全部又はその一部を含むナノ黒鉛構造体に結合能を有するペプチドであることを特徴とする上記(23)~(29)のいずれか記載のタンパク質や、(32)配列番号1~20のいずれかに示されるアミノ酸配列が、DYFSSPYQEQLF(配列番号1)であることを特徴とする上記(30)~(31)記載のタンパク質や、(33)配列番号1~20のいずれかに示されるアミノ酸配列が、YDPFHHII(配列番号2)であることを特徴とする上記(30)~(31)記載のタンパク質や、(34)無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子が、金属ナノ粒子であることを特徴とする上記(23)~(33)のいずれか記載のタンパク質や、(35)無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子が、金属化合物ナノ粒子であることを特徴とする上記(23)~(33)のいずれか記載のタンパク質や、(36)金属化合物のナノ粒子が、酸化金属ナノ粒子であることを特徴とする上記(35)記載のタンパク質や、(37)金属化合物のナノ粒子が、磁性材料ナノ粒子であることを特徴とする上記(35)記載のタンパク質や、(38)金属が、鉄、ベリリウム、ガリウム、マンガン、リン、ウラン、鉛、コバルト、ニッケル、亜鉛、カドミウム又はクロムであることを特徴とする上記(22)~(36)のいずれか記載のタンパク質や、(39)無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子が、酸化鉄ナノ粒子、セレン化カドミウムナノ粒子、セレン化亜鉛ナノ粒子、硫化亜鉛ナノ粒子、又は硫化カドミウムナノ粒子であることを特徴とする上記(23)記載のタンパク質や、(40)ナノ黒鉛構造体が、カーボンナノチューブ又はカーボンナノホーンであることを特徴とする上記(23)~(39)のいずれか記載のタンパク質や、(41)カーボンナノチューブ又はカーボンナノホーンが、構成する炭素構造に官能基が付加されていることを特徴とする上記(40)記載のタンパク質に関する。

10

20

30

40

50

【0012】

さらに本発明は、(42)上記(23)~(41)のいずれか記載のタンパク質の内部空間に、無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を保持させ、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドのナノ黒鉛構造体との親和性を利用して、ナノ黒鉛構造体に無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を複数担持させる方法や、(43)上記(23)~(41)のいずれか記載のタンパク質の内部空間に、無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を保持させ、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドのナノ黒鉛構造体との親和性を利用して、ナノ黒鉛構造体に無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を複数担持させ、加熱処理によりタンパク質部分を取り除き、ナノ黒鉛構造体と無機金属化合物のナノ粒子との複合体を作る方法や、(44)上記(23)~(41)のいずれか記載のタンパク質の内部空間に、無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を保持させ、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドのナノ黒鉛構造体との親和性を利用して、ナノ黒鉛構造体に無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を複数担持させ、電子線処理によりタンパク質部分を取り除き、ナノ黒鉛構造体と無機金属化合物のナノ粒子との複合体を作る方法や、(45)二次元結晶を形成した上記(23)~(41)のいずれか記載のタンパク質に、ナノ黒鉛構造体を結合させ、ナノ黒鉛構造体を配列させる方法や、(46)二次元のアレイを形成した上記(23)~(41)のいずれか記載のタンパク質に、ナノ黒鉛構造体を結合させ、ナノ黒鉛構造体を配列させる方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】ウマ脾臓由来のLタイプのフェリチン(LF)の結晶構造とDYFSSPYQEQLF(配列番号1; N1配列)の提示部位を示す図である。ウマ脾臓由来Lフェリチン(LF0)の結晶構造のN末端部位を赤で示した。図1に示されるように、LF0のN末

端は、分子の外側に位置するため、N末端にN1配列を融合することで、N1配列を多重に提示することができる。

【図2】N1-LF発現ベクター-pKIS2構築の模式図である。N1-LF組換えフェリチン発現ベクター-pKIS2は、ウマ脾臓由来Lフェリチン発現ベクターであるpKITOを制限酵素BamHIとSacIで切断し、アニーリングした配列番号22及び23の合成DNAを挿入し、次にBamHIで切断する。そこに、pKITOをBamHIで切断したときに生じる短いDNA断片を挿入し作製した。

【図3】N1-LFの最終精製標品のポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す図である。N1-LF最終精製標品3μgをポリアクリルアミドゲル電気泳動により、その均一性を評価した。15~25%の濃度勾配ゲルにより分離をおこない、クマシーブリリアントブルーによる染色をおこなったところ、目的のN1-LFの分子量に相当する位置にのみタンパク質のバンドが観察されたことから、非常に純度の高い標品であることが確認できた。左のレーンは分子量マーカーで、上から97.4、66.3、42.4、30.0、20.1、14.4kDaに相当する。右のレーンはN1-LF最終精製標品。

【図4】N1-LFの内部空間における酸化鉄ナノ粒子形成を示す図である。N1-LFの内部空間に酸化鉄ナノ粒子を形成させた時の溶液の様子。Controlは、フェリチンタンパク質溶液を含まないもの。溶液の色からフェリチンの内部空間に酸化鉄ナノ粒子が形成されたことが分かる。

【図5】N1-LF内部空間に酸化鉄ナノ粒子が形成されていることを示す透過型電子顕微鏡写真を示す図である。1%金グルコースにより染色したN1-LF像を日本電子JEOL1010, 100kVで観察した。

【図6】LF0内部空間に酸化鉄ナノ粒子が形成されていることを示す透過型電子顕微鏡写真を示す図である。1%金グルコースにより染色したN1-LF像を日本電子JEOL1010, 100kVで観察した。

【図7】カーボンナノホーン上に担持された酸化金属ナノ粒子を示す図である。カーボンナノホーンに結合能を有するペプチドを、フェリチンタンパク質に提示することで、N1-LFはカーボンナノホーン上に金属酸化物ナノ粒子を特異的に複数担持にすることができた(左)。ウマ脾臓由来のLタイプのフェリチン(LF0)ではカーボンナノホーン上に金属酸化物ナノ粒子を担持にすることができない(右)。

【図8】単層カーボンナノチューブ上に担持された酸化金属ナノ粒子を示す図である。カーボンナノホーンに結合能を有するペプチドを、フェリチンタンパク質に提示することで、N1-LFは単層カーボンナノチューブ上に複数の金属酸化物ナノ粒子を担持することができた。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明のナノ黒鉛構造体-金属ナノ粒子複合体としては、ケージタンパク質表面に、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドを融合又は化学的に結合させたタンパク質の内部空間に、無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を保持させ、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドのナノ黒鉛構造体との親和性を利用して、ナノ黒鉛構造体に無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を複数担持させた複合体であれば特に制限されるものではなく、また、タンパク質としては、ケージタンパク質表面に、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドを融合又は化学的に結合させたタンパク質であれば特に制限されるものではなく、ここで、本発明のケージタンパク質とは、内部に空間をもち、物質内包能力のある蛋白質をいう。

【0015】

上記ケージタンパク質としては、フェリチンタンパク質ファミリーや、細菌に由来するものや、ウイルス粒子を挙げることができる。フェリチンタンパク質ファミリーとしては、フェリチンやアポフェリチンを挙げることができ、例えば、ウマ脾臓由来Lタイプのフェリチン等の高等真核生物由来のLタイプやHタイプのフェリチンを好適に例示することができる。細菌に由来するケージタンパク質としては、DpsAタンパク質やMrgAタンパク質を挙げることができる。また、ウイルス粒子としては、例えば、レトロウイルス

10

20

30

40

50

、アデノウィルス、ロタウィルス、ポリオウィルス、サイトメガロウィルス、カリフラワーマイクロウィルス等のウィルス粒子を挙げる事ができる。

【0016】

上記ナノ黒鉛構造体としては、カーボンナノチューブ、カーボンナノホーンその他、カーボンナノチューブやカーボンナノホーンが構成する炭素構造に、アミノ基、水酸基、カルボキシル基等の官能基が付加されているような修飾されたナノ黒鉛構造体も挙げる事ができる。

【0017】

上記ナノ黒鉛構造体認識ペプチドとしては、配列番号1～20に示されるアミノ酸配列からなるペプチド(特許文献3、非特許文献8参照)や、配列番号1～20のいずれかに示されるアミノ酸配列の全部又はその一部を含むナノ黒鉛構造体に結合能を有するペプチドを挙げる事ができるが、中でもDYFSSPYEQLF(配列番号1)やYDPFHII(配列番号2)のペプチドを好適に例示することができる。

10

【0018】

ナノ黒鉛構造体認識ペプチドを融合又は化学的に結合させるケージタンパク質表面の部位としては、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドがナノ黒鉛構造体と結合しうる部位であれば特に制限されないが、例えばフェリチンの場合、アミノ末端以外にも、フェリチン表面に露出したループ構造部位などを例示することができる。

【0019】

フェリチン等のケージタンパク質表面にナノ黒鉛構造体認識ペプチドを融合する方法としては、実施例に記載されているように、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989., Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)等に記載の方法に準じて行うことができる。また、フェリチン等のケージタンパク質表面にナノ黒鉛構造体認識ペプチドを化学的に結合させる方法としては、文献(Proteins second edition, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993. と、G. T. Hermanson, in Bioconjugate Techniques, ed. G. T. Hermanson, Academic Press, San Diego CA, 1996, pp. 169-186.)記載の方法を挙げる事ができる。

20

【0020】

上記無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子としては、鉄、ベリリウム、ガリウム、マンガン、リン、ウラン、鉛、コバルト、ニッケル、亜鉛、カドミウム、クロム等の金属のナノ粒子や、これら金属の酸化物、水酸化物、炭酸塩等のナノ粒子、磁性材料ナノ粒子などの金属化合物ナノ粒子を挙げる事ができるが、酸化鉄ナノ粒子、セレン化カドミウムナノ粒子、セレン化亜鉛ナノ粒子、硫化亜鉛ナノ粒子、硫化カドミウムナノ粒子を好適に例示することができる。

30

【0021】

上記のケージタンパク質表面にナノ黒鉛構造体認識ペプチドを融合又は化学的に結合させたタンパク質に、さらに機能性ペプチド、例えばチタンに結合能を有するペプチドを融合又は化学的に結合させ、チタン基盤上にナノ黒鉛構造体を配列し、尚且つナノ黒鉛構造体にナノ粒子を複数担持させることもできる。

40

【0022】

フェリチン等の二次元結晶形成能を有するケージタンパク質の場合、かかるケージタンパク質を二次元結晶化することで、ナノメータサイズのパターン作製が可能となる。例えば、ケージタンパク質表面に、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドを融合又は化学的に結合させたタンパク質の内部空間に、無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を保持させ、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドのナノ黒鉛構造体との親和性を利用して、ナノ黒鉛構造体に無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を複数担持させ、加熱処理又は電子線処理によりタンパク質部分を取り除くと、ナノ黒鉛構造体が基板上で二次元に整列されているナノ黒鉛構造体-金属ナノ粒子複合体や、金属ナノ粒子が基板上で二次元に整列されているナノ黒鉛構造体-金属ナノ粒子複合体を得ることができる。得られた複合体は、デバイス・

50

メモリーなど、半導体分野における、デバイス・メモリーなどの高集積化の基本技術となりうる。

【0023】

また、ケージタンパク質を、例えば、グルタルアルデヒドのような複数の官能基を有する化合物とタンパク質を構成するアミノ酸の側鎖との間の反応性を利用して、タンパク質同士及び基板との間に架橋結合を形成させることにより、タンパク質を基材上に固定化する方法や、官能基を持つSAM（膜自己形成能力を持つ分子）を基材上に配置し、その官能基とタンパク質を構成するアミノ酸の側鎖との間に結合を形成させてタンパク質を固定化する方法等により、二次元のアレイに構成することによっても、ナノ黒鉛構造体が基板上で二次元に整列されているナノ黒鉛構造体-金属ナノ粒子複合体や、金属ナノ粒子が基板上で二次元に整列されているナノ黒鉛構造体-金属ナノ粒子複合体を得ることができる。得られた複合体は、デバイス・メモリーなど、半導体分野における、デバイス・メモリーなどの高集積化の基本技術となりうる。

10

【0024】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【実施例1】

【0025】

ウマ脾臓由来のLタイプのフェリチン(LF)に配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるナノ黒鉛構造体認識ペプチド(N1)を融合した融合フェリチンタンパク質(N1-LF、図1)発現のためのDNA(pKIS2)の作製は、以下の手順でおこなった。すなわち、互いに相補的で開始コドンであるMetに続いて、配列番号21で示されるアミノ酸配列をコードし、開始コドン側に制限酵素BamHIリンカー配列を、反対側に制限酵素SalIリンカー配列を持つような配列番号22及び配列番号23の合成DNA、各100 pmol/μlを50 mM NaCl、10 mM Tris-HCl、10 mM MgCl₂中で混合し、70℃で10分間加温した後、ゆっくりと室温に戻すことで、アニーリング反応をおこなった。次に、ウマ脾臓由来のLタイプフェリチンcDNAが、tacプロモーター下流にクロニングされたプラスミドpKITO(Okuda et al. 2003, Biotechnology and Bioengineering, Vol 84, No. 2, p187-194)を制限酵素BamHI、SalIで消化、1%アガロースゲル電気泳動により、分離される約6 kbの大きなDNAフラグメントをGene Clean II kit(BIO101社)により精製し、先述のアニールしたDNAと混合し、T4 DNAリガーゼを用いて結合させた。

20

30

【0026】

次に、このDNAとpKITOを、それぞれBamHIで消化し、1%アガロースゲル電気泳動により分離されるDNAフラグメント、前者は約6 kbのフラグメント、後者は約300 bpのフラグメントをGene Clean II kit (BIO101社)により精製し、T4 DNA Ligaseを用いて結合させた。結合したDNAを大腸菌XLI-blue株(hsdR17、supE44、recA1、endA1、gyrA46、thi、relA1、lac/F' [proAB+、lacI^q (lacZ) M15 : : Tn10 (tetR)])に、常法(Molecular Cloning Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press)に従いクローン化し、pKITOの約300 bpのBamHIフラグメント内のプライマー(配列番号24)を用いて、DNAシーケンシングにより、目的の方向に約300 bpのBamHIフラグメントが挿入されているクローンをダイデオキシターミネイト法により決定した(CEQ DTCS Quick start kit、ベックマン社、カルフォルニア)。反応産物の泳動とデータ解析には、オートキャピラリーシーケンサー(CEQ2000、ベックマン)を用いた。(図2)

40

【0027】

ウマ脾臓由来のL型フェリチンにナノ黒鉛構造体認識ペプチドを融合した融合フェリチンタンパク質の発現・精製は以下のおこなった。

【0028】

大腸菌XLI-blue株に、常法に従いpKIS2を形質転換し、コロニーを滅菌した楊枝で

50

拾いあげ、5 ml の LB 培地で 37、16 - 18 時間震盪培養した。つぎに、この培養液を、1 liter の LB 培地に植え継ぎ 37 でさらに 16 - 18 時間震盪培養をおこなった。大腸菌を、遠心分離 (Beckman J2-21M, JA-14 ローター, 5000 rpm, 5 分) により集菌した。集菌した大腸菌を、80 ml の 50 mM Tris - HCl pH 8.0 で洗浄し、再び、遠心分離 (クボタ社、5922, RA410M2 ローター, 4000 rpm, 10 分) により集菌した。30 ml の 50 mM Tris - HCl pH 8.0 に懸濁した後、超音波破碎機 (BRANSON, SONIFIER 250, 微量チップ、出力最大、duty cycle 50%, 2 分を 3 ~ 4 回繰り返す) を用いて、大腸菌破碎液を得た。大腸菌破碎液を、遠心分離 (クボタ社、5922, RA410M2 ローター, 8000 rpm, 30 分) により、可溶性の画分を回収し、65 で 20 分間温浴することで、共雑タンパク質の変性を行った。遠心分離 (クボタ社、5922, RA410M2 ローター, 8000 rpm, 30 分) により、沈澱を形成する変成した共雑タンパク質を取り除き、上清を回収した。

10

【0029】

回収した上清に終濃度 0.5 M になるように 5 M NaCl を添加・攪拌し、室温で 5 ~ 10 分静置した後、遠心分離 (クボタ社、5922, RA410M2 ローター, 5000 rpm, 10 分) により沈澱を回収した。沈澱を 20 ml の 50 mM Tris - HCl (pH 8.0) に溶解し、再び終濃度 0.5 M になるように 5 M NaCl を添加・攪拌し、室温で 5 - 10 分静置した後、遠心分離 (クボタ社、5922, RA410M2 ローター, 5000 rpm, 10 分) により沈澱を回収した。さらに、沈澱を 20 ml の 50 mM Tris - HCl (pH 8.0) に溶解し、今度は終濃度 0.375 M になるように 5 M NaCl を添加・攪拌し、室温で 5 - 10 分静置した後、遠心分離 (クボタ社、5922, RA410M2 ローター, 5000 rpm, 10 分) により沈澱を回収した。回収した沈澱を、10 ml の 50 mM Tris HCl (pH 8.0) に溶解した。

20

【0030】

さらに、必要に応じてゲルろ過クロマトグラフィーによる精製をおこなっている。すなわち、上述の精製標品 200 ~ 500 μ l を 50 mM Tris HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₃N で平衡化した SW4000XL カラム (TOSO) に注入し、流速 1 ml/min でクロマトグラフィーによる分離精製をおこない、フェリチン 24 量体に相当するフラクションを回収した (図 3)。

30

【実施例 2】**【0031】**

実施例 1 で得られた N1 - LF がリコンビナントアポフェリチンと同様に、内部空間に酸化鉄のナノ粒子形成能を有することを、以下の手順で確認した。

50 mM HEPES - NaOH (pH 7.0), 0.5 mg/ml N1 - LF 溶液に、50 mM 硫酸アンモニウム鉄 (II) 6 水和物を 1/10 体積添加 (終濃度 5 mM) し、室温で終夜静置した (図 4)。その後、遠心分離 (クボタ社、5922, RA410M2 ローター, 3000 rpm, 10 分) に余分な酸化鉄を沈澱させ取り除く操作を 2 回繰り返した。次に、超遠心分離器 (ベックマン, TLA 100.4 ローター, 50,000 rpm, 1 時間) による遠心操作により、N1 - LF を沈澱させた。この沈澱を 50 mM Tris HCl (pH 8.0) により溶解し、等量の 15% 蔗糖溶液の上に重層して、再び超遠心分離器 (ベックマン, TLA 100.4 ローター, 50,000 rpm, 1 時間) による遠心操作により蔗糖画分にある N1 - LF を回収した。回収した N1 - LF は、酸化鉄のナノ粒子が形成されていることを透過型電子顕微鏡 (JEOL1010, 100 kV, 1% 金グルコース染色、図 5) により確認し、回収した N1 - LF は、50 mM Tris HCl (pH 8.0) に透析した後、BioRad Protein Assay (バイオラッド社、) により定量し、他の実験に用いた。

40

【0032】**(比較例 1)**

ウマ脾臓由来の L タイプのフェリチン (LF0) も実施例 1 と同様に、組換え体を用いた。組換え体の調製は、以下のおこなった。大腸菌 XLI-blue 株に、常法に従い pK

50

I T O を形質転換し、コロニーを滅菌した楊枝で拾いあげ、5 m l の L B 培地で 37 °C、16 - 18 時間震盪培養した。つぎに、この培養液を、1 l i t e r の L B 培地に植え継ぎ 37 °C でさらに 16 - 18 時間震盪培養をおこなった。大腸菌を、遠心分離 (Beckman J2-21M, JA-14 ローター, 5000 r p m, 5 分) により集菌した。集菌した大腸菌を、80 m l の 50 m M T r i s - H C l (p H 8 . 0) で洗浄し、再び、遠心分離 (クボタ社、5922, RA410M2 ローター, 4000 r p m, 10 分) により集菌した。30 m l の 50 m M T r i s - H C l (p H 8 . 0) に懸濁した後、超音波破砕機 (BRANSON, SONIFIER 250, 微量チップ、出力最大、d u t y c y c l e 50 %, 2 分を 3 ~ 4 回繰り返す) を用いて、大腸菌破砕液を得た。大腸菌破砕液を、遠心分離 (クボタ社、5922, RA410M2 ローター, 8000 r p m, 30 分) により、可溶性の画分を回収し、65 °C で 20 分間温浴することで、共雑タンパク質の変性を行った。遠心分離 (クボタ社、5922, RA410M2 ローター, 8000 r p m, 30 分) により、沈澱を形成する変性した共雑タンパク質を取り除き、上清を回収した。

10

20

30

40

50

【0033】

上清を、50 m M T r i s H C l (p H 8 . 0) で平衡化した陰イオン交換クロマト担体である Q-sepharose HP (アマシャム) に注入し、100 m l の 100 - 500 m M 塩化ナトリウム濃度勾配 (3 m l / m i n) により溶出した。L F 0 を含む画分約 40 m l を、セントリプレップ 10 (アミコン) により 2 . 5 ~ 3 m l に濃縮し、50 m M T r i s H C l (p H 8 . 0) , 150 m M N a C l (以下 T B S) で平衡化した 60 c m 長のゲルろ過クロマトグラフ・セファアクリル S - 400 に注入し、流速 1 . 5 m l / m i n でクロマトグラフィーをおこなった。L F 0 を含む各画分 ~ 100 μ l を 50 m M T r i s H C l p H 7 . 5 , 150 m M N a C l , 1 m M N a N 3 で平衡化した S W 4000 X L カラム、流速 1 m l / m i n でクロマトグラフィーによる分析をおこない、フェリチン 24 量体に相当する画分を確認し、以下の実験に用いた。

【0034】

(比較例 2)

比較例 1 で得られた L F 0 の内部空間への酸化鉄のナノ粒子形成は、実施例 2 と同じ手順でおこなった。ナノ粒子形成の確認も同じく、実施例 2 と同様におこなった (図 6)。

【実施例 3】

【0035】

実施例 2 で得られた酸化鉄のナノ粒子を内部空間に持つ N 1 - L F (配列番号 26) は特異的にナノ黒鉛構造体に結合するが、比較例 2 で得られた酸化鉄のナノ粒子を内部空間に持つ L F 0 (配列番号 25) はナノ黒鉛構造体に結合することができないことを示すために、以下の実験をおこなった。

【0036】

A r ガスの 6×10^4 P a 雰囲気圧内の焼結丸棒状炭素表面に高出力の C O ₂ ガスレーザー光 (出力 100 W、パルス幅 20 m s、連続発振) を照射し、生じたすす状物質をエタノールに懸濁し、超音波攪拌 (周波数 40 k H z、時間 60 分) とデカンテーションとを 4 回繰り返して単層カーボンナノホーンを得た。この単層カーボンナノホーン約 200 m g を、濃度約 70 % の硝酸 40 m l 中に入れ、130 °C で 1 時間還流をおこなった。終了後、イオン交換水でうすめて遠心分離を行い上澄みを捨てることを繰り返して中和洗浄し、官能基 (カルボキシル基を含む) をもつ水溶性の単層カーボンナノホーンを調製した。

【0037】

このカーボンナノホーンを、1 m g / m l になるように 0 . 1 % 牛胎児血清アルブミン・0 . 05 % Polyoxyethylenesorbitan monolaurate [以下 T w e e n - 20 (シグマ社、S t . Louis)] 含有 T B S (以下 T B S - B T) に溶解した。カーボンナノホーンを、遠心操作 (クボタ社、5922, AT-2018M ローター, 15000 r p m, 15 分) により沈澱させ、1 m g / m l になるように T B S - B T で懸濁した。この操作を 3 回繰り返したのち、沈澱したカーボンナノホーンを、1 m g / m l になるように 0 . 1 m g / m l の酸化鉄ナノ粒子をコアに持つ N 1 - L F あるいは L F 0 含有 T B S - B T で懸濁した。12

時間、室温でタイテック社製rotator RT-50を用いて回転撹拌した。結合しなかったフェリチン分子を取り除くために、カーボンナノホーンを遠心操作（クボタ社、5922, AT-2018Mローター, 15000rpm, 15分）により沈澱させ、400 μ lの0.05% Tween 20含有TBSで5回洗浄した後、滅菌水に置換して脱塩したものを、透過型電子顕微鏡（TOPCON EM-002B, 加速電圧120kV）観察をおこない、N1-LFをカーボンナノホーンと混合したとき、酸化鉄ナノ粒子がカーボンナノホーンに複数担持され、一方LF0の場合、酸化鉄ナノ粒子がカーボンナノホーン上に観察されないことから、N1-LFが特異的にカーボンナノホーンに結合能を有しており、この能力を利用したナノ黒鉛構造体上へのナノ粒子担持法の有効性を確認した（図7）。

【実施例4】

【0038】

化学的気相成長法で合成された単層カーボンナノチューブであるHipeco（カーボンナノテクノロジーズ社、テキサス）を1750、 1×10^{-5} Torrで5時間処理したあと、濃度70%の硝酸中、約130で30分還流をおこなった。終了後、水酸化ナトリウムで中和し、蒸留水で洗浄し、官能基（カルボキシル基を含む）をもつ単層カーボンナノチューブを調製した。

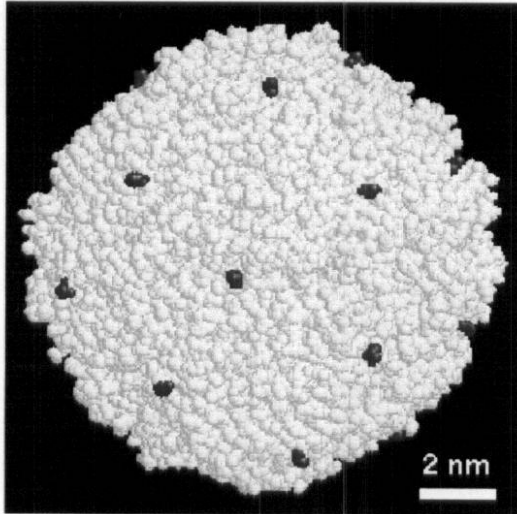
【0039】

この単層カーボンナノチューブを、実施例3と同様に、TBS-BTに溶解した。単層カーボンナノチューブを、遠心操作（クボタ社、5922, AT-2018Mローター, 15000rpm, 15分）により沈澱させ、再びTBS-BTで懸濁した。この操作を3回繰り返したのち、沈澱した単層カーボンナノチューブに実施例3と同様に酸化鉄ナノ粒子をコアに持つN1-LF含有TBS-BTで懸濁した。12時間、室温でタイテック社製rotator RT-50を用いて回転撹拌した。結合しなかったフェリチン分子を取り除くために、単層カーボンナノチューブを遠心操作（クボタ社、5922, AT-2018Mローター, 15000rpm, 15分）により沈澱させ、0.05% Tween 20含有TBSで5回洗浄した後、滅菌水に置換して脱塩したものを、透過型電子顕微鏡（TOPCON EM-002B, 120kV）観察をおこない、N1-LFを単層カーボンナノチューブと混合したとき、酸化鉄ナノ粒子がカーボンナノホーンに複数担持されることを確認した（図8）。

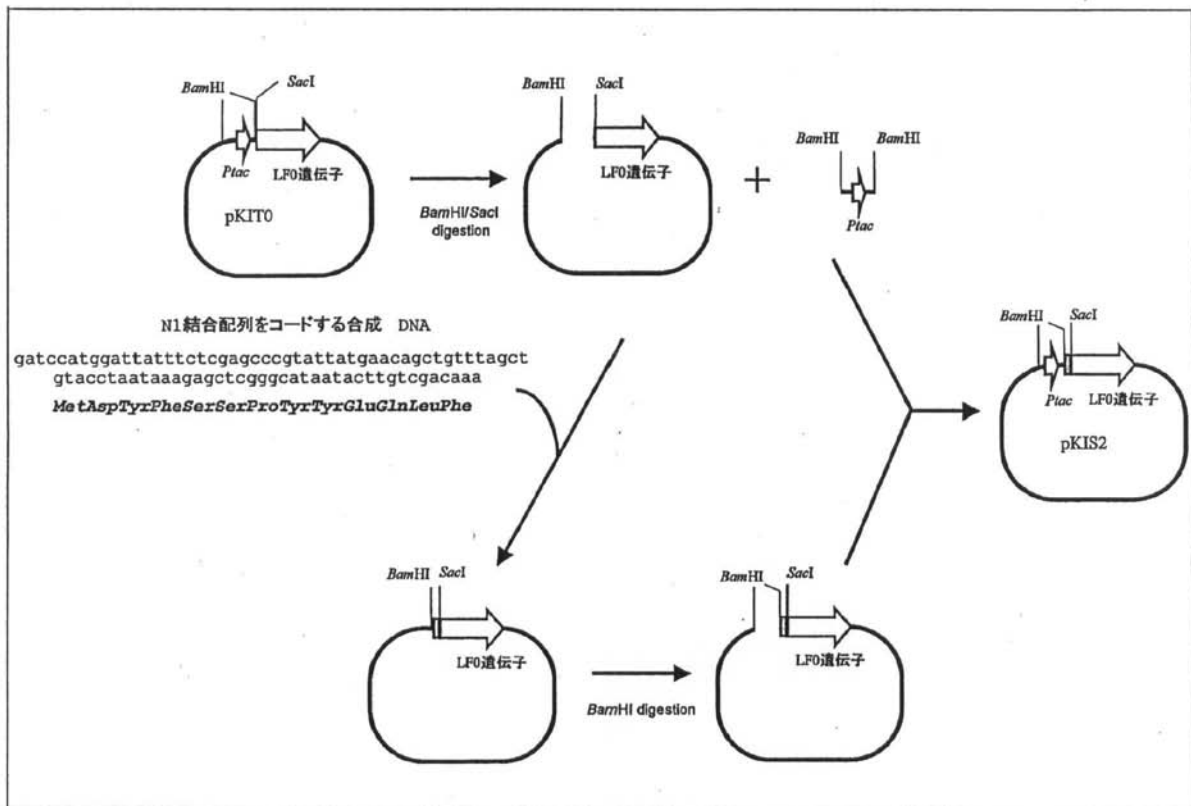
10

20

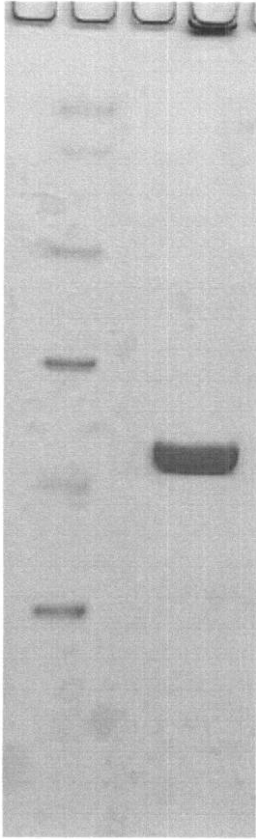
【 図 1 】



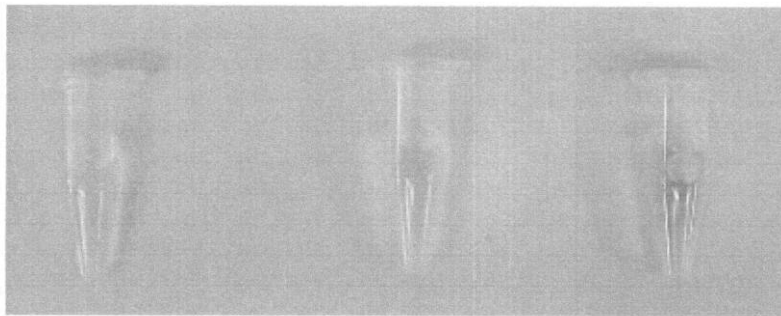
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】

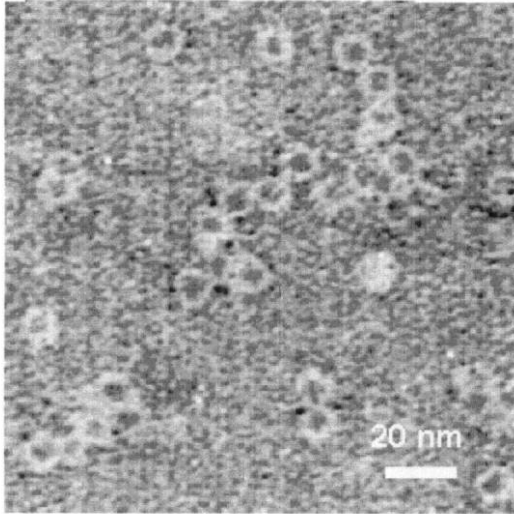


control

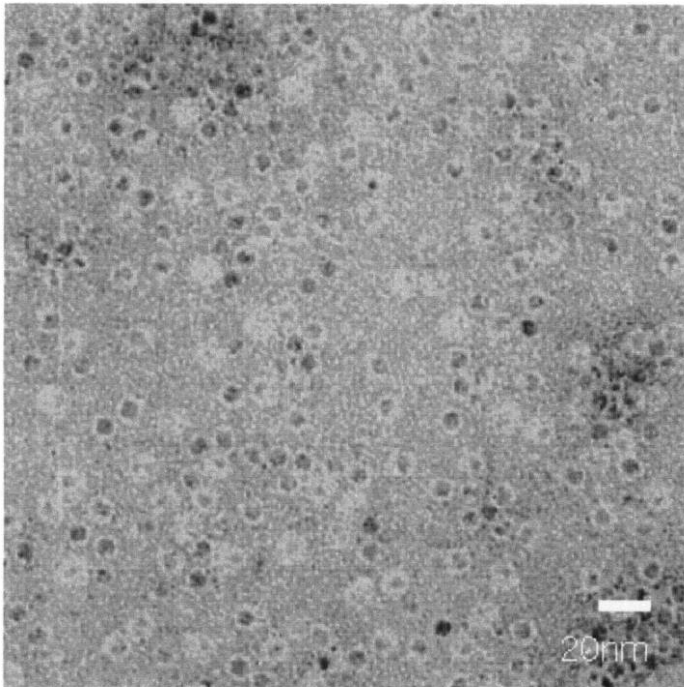
LFO

N1-LF

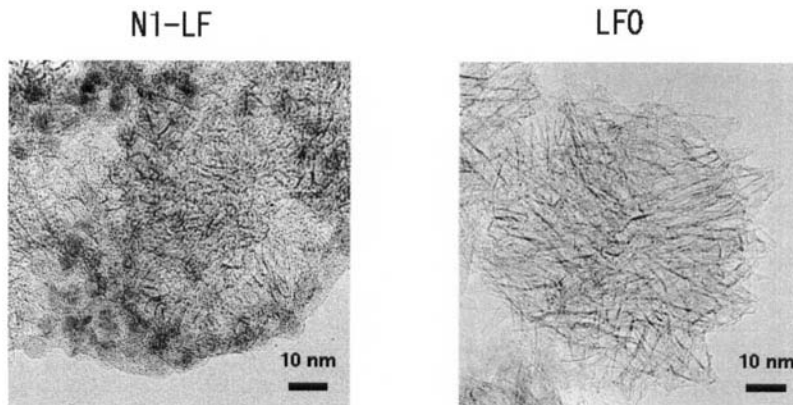
【 図 5 】



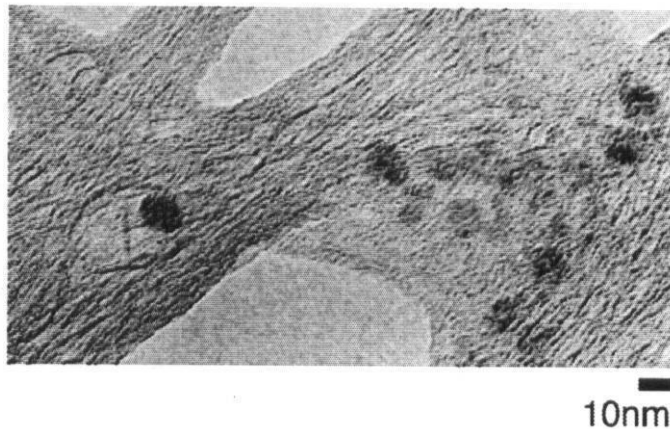
【 図 6 】



【図 7】



【図 8】



【配列表】

[2006068250000001.app](#)

【手続補正書】

【提出日】平成18年10月20日(2006.10.20)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【書類名】請求の範囲

【請求項 1】フェリチンの N 末端又はループ構造部位に、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドを融合させたフェリチンの内部空間に、無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を添加して保持させ、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドのナノ黒鉛構造体との親和性を利用して、ナノ黒鉛構造体に無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を複数担持させたナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 2】(削除)

【請求項 3】(削除)

【請求項 4】フェリチンが、高等真核生物由来のフェリチンであることを特徴とする請求項 1 記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 5】高等真核生物由来のフェリチンが、ウマ脾臓由来 L タイプのフェリチンであることを特徴とする請求項 4 記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 6】(削除)

【請求項 7】(削除)

【請求項 8】ナノ黒鉛構造体認識ペプチドが、配列番号 1 ~ 20 のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチドであることを特徴とする請求項 1、4、5 のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 9】ナノ黒鉛構造体認識ペプチドが、配列番号 1 ~ 20 のいずれかに示されるアミノ酸配列の全部又はその一部を含むナノ黒鉛構造体に結合能を有するペプチドであることを特徴とする請求項 1、4、5、8 のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 10】配列番号 1 ~ 20 のいずれかに示されるアミノ酸配列が、DYFSSPY YEQLF (配列番号 1) であることを特徴とする請求項 8 又は 9 記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 11】配列番号 1 ~ 20 のいずれかに示されるアミノ酸配列が、YDPFHII (配列番号 2) であることを特徴とする請求項 8 又は 9 記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 12】無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子が、金属ナノ粒子であることを特徴とする請求項 1、4、5、8、9、10、11 のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 13】無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子が、金属化合物ナノ粒子であることを特徴とする請求項 1、4、5、8、9、10、11 のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 14】金属化合物ナノ粒子が、酸化金属ナノ粒子であることを特徴とする請求項 13 記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 15】金属化合物ナノ粒子が、磁性材料ナノ粒子であることを特徴とする請求項 13 記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 16】金属が、鉄、ベリリウム、ガリウム、マンガン、リン、ウラン、鉛、コバルト、ニッケル、亜鉛、カドミウム又はクロムであることを特徴とする請求項 1、4、5、8、9、10、11、12、13、14、15 のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 17】無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子が、酸化鉄ナノ粒子、セレン化カドミウムナノ粒子、セレン化亜鉛ナノ粒子、硫化亜鉛ナノ粒子、又は硫化カドミウムナノ粒子であることを特徴とする請求項 1、4、5、8、9、10、11 のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 18】ナノ黒鉛構造体が、カーボンナノチューブ又はカーボンナノホーンであることを特徴とする請求項 1、4、5、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 19】カーボンナノチューブ又はカーボンナノホーンが、構成する炭素構造に官能基が付加されていることを特徴とする請求項 18 記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 20】ナノ黒鉛構造体が基板上で二次元に整列されていることを特徴とする請求項 1、4、5、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 21】金属ナノ粒子が基板上で二次元に整列されていることを特徴とする請求項 1、4、5、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 のいずれか記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 22】ケージタンパク質が除去されていることを特徴とする請求項 20 記載のナノ黒鉛構造体 - 金属ナノ粒子複合体。

【請求項 23】(削除)

- 【請求項 2 4】(削除)
- 【請求項 2 5】(削除)
- 【請求項 2 6】(削除)
- 【請求項 2 7】(削除)
- 【請求項 2 8】(削除)
- 【請求項 2 9】(削除)
- 【請求項 3 0】(削除)
- 【請求項 3 1】(削除)
- 【請求項 3 2】(削除)
- 【請求項 3 3】(削除)
- 【請求項 3 4】(削除)
- 【請求項 3 5】(削除)
- 【請求項 3 6】(削除)
- 【請求項 3 7】(削除)
- 【請求項 3 8】(削除)
- 【請求項 3 9】(削除)
- 【請求項 4 0】(削除)
- 【請求項 4 1】(削除)

【請求項 4 2】フェリチンのN末端又はループ構造部位に、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドを融合させたタンパク質の内部空間に、無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を添加して保持させ、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドのナノ黒鉛構造体との親和性を利用して、ナノ黒鉛構造体に無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を複数担持させる方法。

【請求項 4 3】フェリチンのN末端又はループ構造部位に、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドを融合させたタンパク質の内部空間に、無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を添加して保持させ、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドのナノ黒鉛構造体との親和性を利用して、ナノ黒鉛構造体に無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を複数担持させ、加熱処理によりタンパク質部分を取り除き、ナノ黒鉛構造体と無機金属化合物のナノ粒子との複合体を作る方法。

【請求項 4 4】フェリチンのN末端又はループ構造部位に、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドを融合させたタンパク質の内部空間に、無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を添加して保持させ、ナノ黒鉛構造体認識ペプチドのナノ黒鉛構造体との親和性を利用して、ナノ黒鉛構造体に無機金属原子又は無機金属化合物のナノ粒子を複数担持させ、電子線処理によりタンパク質部分を取り除き、ナノ黒鉛構造体と無機金属化合物のナノ粒子との複合体を作る方法。

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/JP2005/023675 |
|--|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C01B31/02(2006.01), C07K7/06(2006.01), C07K7/08(2006.01), C07K14/195(2006.01), C07K14/47(2006.01), C12N15/00(2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C01B31/00-31/36 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus (JOIS) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | JP 2004-121154 A (Japanese Foundation For Cancer Research), 22 April, 2004 (22.04.04), Claims; Par. No. [0017] & WO 2004/031381 A1 & US 2005/277160 A1 | 1-46 |
| A | JP 2001-181842 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 03 July, 2001 (03.07.01), Claims (Family: none) | 1-46 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 02 March, 2006 (02.03.06) | | Date of mailing of the international search report 14 March, 2006 (14.03.06) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | | Authorized officer |
| Facsimile No. | | Telephone No. |

| 国際調査報告 | | 国際出願番号 PCT/J P 2005/023675 | | | | | | | | | |
|---|--|--|---------|-----------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C01B31/02(2006.01), C07K7/06(2006.01), C07K7/08(2006.01), C07K14/195(2006.01), C07K14/47(2006.01), C12N15/00(2006.01) | | | | | | | | | | | |
| B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C01B31/00-31/36 | | | | | | | | | | | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2006年</td> </tr> </table> | | | | 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 | 日本国公開実用新案公報 | 1971-2006年 | 日本国実用新案登録公報 | 1996-2006年 | 日本国登録実用新案公報 | 1994-2006年 |
| 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 | | | | | | | | | | |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2006年 | | | | | | | | | | |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2006年 | | | | | | | | | | |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2006年 | | | | | | | | | | |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus(JOIS) | | | | | | | | | | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | | | | | | | | | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 | | | | | | | | | |
| X | JP 2004-121154 A(財団法人癌研究会)2004. 04. 22, 請求項, 【0017】 &WO 2004/031381 A1 &US 2005/277160 A1 | 1-46 | | | | | | | | | |
| A | JP 2001-181842 A(松下電器産業株式会社)2001. 07. 03, 請求項(ファミリーなし) | 1-46 | | | | | | | | | |
| <input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 | | <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 | | | | | | | | | |
| * 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献 | | | | | | | | | | | |
| 国際調査を完了した日 02. 03. 2006 | | 国際調査報告の発送日 14. 03. 2006 | | | | | | | | | |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | | 特許庁審査官 (権限のある職員) 西山 義之 電話番号 03-3581-1101 内線 3416 | 4G 3129 | | | | | | | | |

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 C 0 7 K 7/00 (2006.01) C 0 7 K 7/00

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

F ターム(参考) 4G146 AA12 AA15 AA16 AB04 AB06 AB07 AD16 AD17 AD30 AD40
 BA12 BC09 BC15 BC23 BC27 BC34B CB10 CB12 CB13 CB19
 CB22 CB34 CB35 DA03
 4H045 AA10 AA20 BA10 BA14 BA15 BA16 BA41 BA42 BA50 BA60
 CA40 EA50 FA20 FA74 GA01 GA15 GA22

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。