(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3588602号
(P3588602)
(45)発行日　平成16年11月17日(2004.11.17)　(24)登録日　平成16年8月20日(2004.8.20)

(51)Int.Cl.[7]	F I	
B82B 3/00	B82B 3/00	
C07K 1/02	C07K 1/02	
C07K 14/435	C07K 14/435	
H01L 21/8247	H01L 29/06	601D
H01L 27/115	H01L 27/10	434

請求項の数 8　(全 16 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2001-305273(P2001-305273)
(22)出願日　平成13年10月1日(2001.10.1)
(65)公開番号　特開2003-113198(P2003-113198A)
(43)公開日　平成15年4月18日(2003.4.18)
審査請求日　平成14年9月25日(2002.9.25)

(73)特許権者　000005821
松下電器産業株式会社
大阪府門真市大字門真１００６番地
(74)代理人　100077931
弁理士　前田　弘
(74)代理人　100094134
弁理士　小山　廣毅
(74)代理人　100110939
弁理士　竹内　宏
(74)代理人　100110940
弁理士　嶋田　高久
(74)代理人　100113262
弁理士　竹内　祐二
(74)代理人　100115059
弁理士　今江　克実

最終頁に続く

(54)【発明の名称】コバルト－タンパク質複合体の作製方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

Co^{2+}イオンと、タンパク質と、ＨＥＰＥＳ緩衝剤とを含み、ｐＨが８．０以上８．８以下である溶液を調製するステップ（ａ）と、

上記溶液中に酸化剤を加えることによって、上記タンパク質にコバルトを含む微粒子を内包させるステップ（ｂ）と、

を含むコバルト－タンパク質複合体の作製方法。

【請求項２】

請求項１に記載のコバルト－タンパク質複合体の作製方法において、

上記タンパク質は、アポフェリチンであることを特徴とするコバルト－タンパク質複合体の作製方法。

【請求項３】

請求項１に記載のコバルト－タンパク質複合体の作製方法において、

上記酸化剤は、H_2O_2であることを特徴とするコバルト－タンパク質複合体の作製方法。

【請求項４】

請求項１に記載のコバルト－タンパク質複合体の作製方法において、

前記ステップ（ｂ）が７０℃以下の温度で行われる、コバルト－タンパク質複合体の作製方法。

【請求項５】

請求項１に記載のコバルト－タンパク質複合体の作製方法において、

前記ステップ（ｂ）が４０℃以上７０℃以下の温度で行われる、コバルト－タンパク質複合体の作製方法。
【請求項６】
請求項５に記載のコバルト－タンパク質複合体の作製方法において、
前記ステップ（ｂ）が５０℃以上６０℃以下の温度で行われる、コバルト－タンパク質複合体の作製方法。
【請求項７】
請求項１に記載のコバルト－タンパク質複合体の作製方法において、
前記タンパク質が好熱菌のアポフェリチンであって、
前記ステップ（ｂ）が８０℃以上１００℃以下の温度で行われる、コバルト－タンパク質複合体の作製方法。
【請求項８】
請求項１に記載のコバルト－タンパク質複合体の作製方法において、
前記コバルトの微粒子がＣｏＯ（ＯＨ）からなる、コバルト－タンパク質複合体の作製方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、微粒子の作製方法に関し、特に、コバルト微粒子を内包するコバルト－タンパク質複合体の作製方法、およびその関連技術に関する。
【０００２】
【従来の技術】
近年、バイオテクノロジーとエレクトロニクスを融合させたバイオエレクトロニクスの研究が活発に行なわれ、酵素等のタンパク質を用いたバイオセンサー等、すでに実用化されているものもある。
【０００３】
バイオテクノロジーを他分野に応用する試みの１つとして、金属化合物を保持する機能を有するタンパク質であるアポフェリチンに金属または金属化合物からなる微粒子を取り込ませ、ナノオーダーの均一なサイズの微粒子を作製しようという研究がある。微粒子の用途に応じて種々の金属あるいは金属化合物等をアポフェリチンに導入すべく研究が進められている。
【０００４】
ここで、アポフェリチンについて説明する。アポフェリチンは、生物界に広く存在するタンパク質であり、生体内では必須微量元素である鉄の量を調節する役割を担っている。鉄または鉄化合物とアポフェリチンとの複合体はフェリチンと呼ばれる。鉄は必要以上に体内に存在すると生体にとって有害であるため、余剰の鉄分はフェリチンの形で体内に貯蔵される。そして、フェリチンは必要に応じて鉄イオンを放出し、アポフェリチンに戻る。
【０００５】
図１は、アポフェリチンの構造を示す模式図である。図１に示すように、アポフェリチン１は、１本のポリペプチド鎖から形成されるモノマーサブユニットが非共有結合により２４個集合した分子量約４６万の球状タンパク質であり、その直径は約１２ｎｍで、通常のタンパク質に比べ高い熱安定性と高いｐＨ安定性を示す。アポフェリチン１の中心には直径約６ｎｍの空洞状の保持部４があり，外部と保持部４とはチャネル３を介してつながっている。例えば、アポフェリチン１に２価の鉄イオンが取り込まれる際、鉄イオンはチャネル３から入り、一部のサブユニット内にあるｆｅｒｒｏｏｘｉｄａｓｅ　ｃｅｎｔｅｒ（鉄酸化活性中心）と呼ばれる場所で酸化された後、保持部４に到達し、保持部４の内表面の負電荷領域で濃縮される。そして、鉄原子は３０００～４０００個集合し、フェリハイドライト（$5Fe_2O_3 \cdot 9H_2O$）結晶の形で保持部４に保持される。保持部４に保持された金属原子を含む微粒子の直径は、保持部４の直径とほぼ等しく、約６ｎｍとなっている。

【０００６】
このアポフェリチンを用いて、人工的に鉄以外の金属や金属化合物を担持させた微粒子－アポフェリチン複合体が作製されている。
【０００７】
現在までに、マンガン（Ｐ．Ｍａｃｋｌｅ，１９９３，Ｊ．Ａｍｅｒ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１１５，８４７１－８４７２；Ｆ．Ｃ．Ｍｅｌｄｒｕｍら，１９９５，Ｊ．Ｉｎｏｒｇ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．５８，５９－６８），ウラン（Ｊ．Ｆ．Ｈａｉｎｆｅｌｄ，１９９２，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８９，１１０６４－１１０６８），ベリリウム（Ｄ．Ｊ．Ｐｒｉｃｅ，１９８３，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５８，１０８７３－１０８８０），アルミニウム（Ｊ．Ｆｌｅｍｉｎｇ，１９８７，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８４，７８６６－７８７０），亜鉛（Ｄ．Ｐｒｉｃｅ ａｎｄ Ｊ．Ｇ．Ｊｏｓｈｉ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，１９８２，７９，３１１６－３１１９）といった金属あるいは金属化合物のアポフェリチンへの導入が報告されている。これらの金属あるいは金属化合物からなる微粒子の直径も、アポフェリチンの保持部４の直径とほぼ等しく、約６ｎｍとなる。
【０００８】
自然界において、鉄原子を含む微粒子がアポフェリチン内に形成される過程の概略は次の通りである。
【０００９】
アポフェリチン１の外部と内部とを結ぶチャネル３（図１参照）の表面には、ｐＨ７～８の条件下でマイナス電荷を持つアミノ酸が露出しており、プラス電荷を持っているFe^{2+}イオンは静電相互作用によりチャネル３に取り込まれる。
【００１０】
アポフェリチン１の保持部４の内表面には、チャネル３の内表面と同じく，ｐＨ７～８でマイナス電荷を持つアミノ酸残基であるグルタミン酸残基が多く露出しており、チャネル３から取り込まれたFe^{2+}イオンはｆｅｒｒｏｘｉｄａｓｅ ｃｅｎｔｅｒで酸化され、内部の保持部４へと導かれる。そして、静電相互作用により鉄イオンは濃縮されて、フェリハイドライト（$5Fe_2O_3 \cdot 9H_2O$）結晶の核形成が起こる。
【００１１】
その後、順次取り込まれる鉄イオンがこの結晶の核に付着して酸化鉄からなる核が成長し、直径６ｎｍの微粒子が保持部４内に形成される。以上が、鉄イオンの取り込みと酸化鉄からなる微粒子形成の概略である。
【００１２】
なお、ここまで鉄イオンのアポフェリチンへの取り込みメカニズムについて述べたが、これまでに導入が報告されている他の金属イオンは、いずれもプラスイオンであることから、これらの金属イオンのアポフェリチンへの取り込みは、鉄イオンとほぼ同じメカニズムで進むと考えられる。
【００１３】
【発明が解決しようとする課題】
これまでに、コバルトの導入に関しては、Ｄｏｕｇｌａｓらによる水酸化コバルト（ＣｏＯ（ＯＨ））の導入の報告がある（Ｔ．Ｄｏｕｇｌａｓ ａｎｄ Ｖ．Ｔ．Ｓｔａｒｋ，”Ｎａｎｏｐｈａｓｅ Ｃｏｂａｌｔ Ｏｘｙｈｙｄｒｏｘｉｄｅ Ｍｉｎｅｒａｌ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ ｗｉｔｈｉｎ ｔｈｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｃａｇｅ ｏｆ Ｆｅｒｒｉｔｉｎ”，Ｉｎｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．，３９，２０００，１８２８－１８３０）。上記Ｄｏｕｇｌａｓらの方法によりコバルト微粒子を内包するコバルト－アポフェリチン複合体を作製することができる。
【００１４】
しかしながら、上記Ｄｏｕｇｌａｓらの方法では緩衝液を用いていないため、コバルト微粒子を内包するコバルト－アポフェリチン複合体が形成された溶液のｐＨが変化（低下）

し、その溶液を数日間放置すると、内包されているコバルト微粒子が溶液中に溶け出してしまう。このため、コバルト－アポフェリチン複合体に内包されるコバルト微粒子の粒径を維持することが難しい。従って、均一な粒径を有するコバルト微粒子を内包するコバルト－アポフェリチン複合体を得ることが困難であるという不具合がある。

【００１５】

本発明は、上記不具合を解決するためになされたものであり、均一な粒径を有するコバルト微粒子を内包するコバルト－タンパク質複合体を得るための方法を提供することを目的とする。

【００１６】

【課題を解決するための手段】

本発明のコバルト－タンパク質複合体の作製方法は、Co^{2+}イオンと、タンパク質と、ｐＨ緩衝剤と、Co^{2+}会合剤とを含む溶液を調製するステップ（ａ）と、上記溶液中に酸化剤を加えることによって、上記タンパク質にコバルトを含む微粒子を内包させるステップ（ｂ）とを含む。

【００１７】

Co^{2+}会合剤を用いることによって、Co^{2+}イオンがタンパク質内部に濃縮される。このため、Co^{2+}イオンと酸化剤との反応がタンパク質内部で優先的に生じる。このとき、ｐＨ緩衝剤を用いて溶液を所望のｐＨに調整することによって、Co^{2+}イオンと酸化剤との反応が逆方向に進行することを防止し、タンパク質に内包されるコバルト微粒子が溶液中に溶け出すことを防止する。従って、均一な粒径を有するコバルト微粒子を内包するコバルト－タンパク質複合体を得ることができる。

【００１８】

上記ｐＨ緩衝剤と上記Co^{2+}会合剤とは、共にＨＥＰＥＳであることが好ましい。

【００１９】

ＨＥＰＥＳは、ｐＨ緩衝剤としての機能と、Co^{2+}イオンの会合剤としての機能とを備える。このため、ｐＨ緩衝剤とCo^{2+}会合剤とを別々に準備する必要がない。

【００２０】

上記タンパク質は、アポフェリチンである構成としてもよい。

【００２１】

上記酸化剤は、H_2O_2である構成としてもよい。

【００２２】

本発明のコバルト－タンパク質複合体の作製方法は、Co^{2+}イオンと、アポフェリチンと、ＨＥＰＥＳとを含む溶液を調製するステップ（ａ）と、上記溶液中にH_2O_2を加えることによって、上記アポフェリチンにコバルトを含む微粒子を内包させるステップ（ｂ）とを含む。

【００２３】

本発明によれば、Co^{2+}イオンとH_2O_2との反応がＨＥＰＥＳ緩衝液中で行なわれるため、ｐＨが一定となり、アポフェリチンに内包されるコバルト微粒子が溶液中に溶け出すことが防止される。従って、均一な粒径を有するコバルト微粒子を内包するコバルト－タンパク質複合体を得ることができる。

【００２４】

【発明の実施の形態】

上記Ｄｏｕｇｌａｓらの方法では、下記化学反応式１に示す反応を利用する。

【００２５】

【化１】

$$Co^{2+}+H_2O_2 \rightleftharpoons CoO(OH)+H^+$$

【００２６】

上記化学反応式１からわかるように、反応が進行するほど反応溶液が酸性になる。反応溶

液のｐＨが８付近では、図１に示すアポフェリチン１の保持部４の内表面にはマイナス電荷を持つアミノ酸残基が多く露出しているので、Co^{2+}イオンは保持部４へと導かれる。このため、アポフェリチン１の保持部４に水酸化コバルトからなる微粒子が形成されやすい。従って、反応溶液のｐＨを８付近に維持しながら、反応の進行に伴って生成するH^{+}を中和する。このため、上記Ｄｏｕｇｌａｓらの方法では、具体的には、アポフェリチン溶液に、硝酸コバルト溶液と過酸化水素水とを極微量ずつ加え、ｐＨ調整のためにアポフェリチン溶液をスターラーで激しく攪拌しながらＮａＯＨを滴下する。

【００２７】

上述したように、上記Ｄｏｕｇｌａｓらの方法では、コバルト－アポフェリチン複合体の形成において、コバルト微粒子の粒径を維持することが難しい。そこで本発明者は、上記Ｄｏｕｇｌａｓらの方法の見直しを行ない、上記Ｄｏｕｇｌａｓらの方法には次の問題点があると考えた。

【００２８】

第１の問題点は、緩衝液を用いずに、アポフェリチン溶液にＮａＯＨを滴下することによって、ｐＨ調整を行なっている点である。アポフェリチン溶液のＮａＯＨが滴下された部分は、局所的にＮａＯＨ濃度が急上昇し、ｐＨが増大する。このため、ｐＨを調整する働きが十分ではない可能性がある。従って、上記化学反応式１の反応が逆方向に進行し、コバルト－アポフェリチン複合体に内包されるコバルト微粒子が溶液中に溶け出すと考えられる。

【００２９】

第２の問題点は、ＮａＯＨを用いている点である。ＮａＯＨは強力なタンパク質変性剤である。従って、アポフェリチン溶液のＮａＯＨが滴下された部分は、局所的にＮａＯＨ濃度が急上昇し、アポフェリチンが変性してしまうおそれがある。このため、アポフェリチンが本来の性質を発揮できない状態、つまり、アポフェリチンがコバルト微粒子を十分に保持できない状態になり得る。

【００３０】

第３の問題点は、工業的規模で行なうことが難しい点である。上記Ｄｏｕｇｌａｓらの方法では、アポフェリチン溶液に硝酸コバルト溶液と過酸化水素水とを極微量ずつ加えながらＮａＯＨを滴下する。この方法では、反応溶液の全容量が２０～５０ｍｌ程度ならば反応させることは容易であるが、反応スケールを工業的規模まで大きくすると、硝酸コバルト、過酸化水素およびＮａＯＨをそれぞれアポフェリチン溶液に添加するために要する時間が非常に大きくなる。また、硝酸コバルト、過酸化水素およびＮａＯＨを、大量のアポフェリチン溶液中にそれぞれ均一に拡散させることは非常に困難である。従って、実用的ではない。

【００３１】

（実施形態１）

以下に記載する本発明の実施形態は、上記考察に基づいて実施したものである。以下、図１～図３を参照しながら本実施形態のコバルト－アポフェリチン複合体の作製方法を説明する。

【００３２】

図２は、本実施形態のコバルト－アポフェリチン複合体の作製方法を表すフローチャートである。

【００３３】

まず、図２に示すように、ステップＳｔ１において、ＨＥＰＥＳ緩衝液、アポフェリチン溶液およびCo^{2+}イオン溶液（例えば、硝酸コバルト溶液）の順に各溶液を混合することによって、反応溶液を調製する。

【００３４】

次に、図２に示すように、ステップＳｔ２において、反応溶液に酸化剤（例えばH_2O_2）を添加する。この操作によって、アポフェリチン１の保持部４に水酸化コバルト（ＣｏＯ（ＯＨ））が導入され、コバルト－アポフェリチン複合体が生成される。

【００３５】
なお、以上に説明したコバルト－アポフェリチン複合体を作製するための操作は、すべて室温、もしくはタンパク質が変性しない温度範囲にて、スターラーで攪拌しながら行なう。

【００３６】
次に、各ステップについて詳細に説明する。

【００３７】
まず、ステップＳｔ１では、反応溶液のｐＨを７．５～９．０程度の範囲に調製しておく。特に、反応溶液のｐＨをｐＨ８．０～８．８程度の範囲に調製しておくことが好ましい。反応溶液のｐＨがｐＨ８．０～８．８程度の範囲では、アポフェリチン１の保持部４の内表面にはマイナス電荷を持つアミノ酸残基が多く露出しているので、Co^{2+}イオンは保持部４へと導かれる。このため、アポフェリチン１の保持部４に水酸化コバルト（ＣｏＯ（ＯＨ））からなる微粒子が形成されやすい。各ｐＨにおけるコバルト微粒子の形成状態を以下の表１に示す。

【００３８】
【表１】

反応溶液のｐＨ / Co^{2+}イオンの濃度	ｐＨ8.0	ｐＨ8.2	ｐＨ8.3	ｐＨ8.4	ｐＨ8.6	ｐＨ8.8
2.0ｍＭ	×	×	×	△	△	△
2.5ｍＭ	－	○	○	○	－	－
3.0ｍＭ	○	◎	◎	◎	○	△
3.5ｍＭ	－	◎	◎	◎	－	－
4.0ｍＭ	○	◎	○	○	×	×
5.0ｍＭ	◎	◎	－	×	×	×

（”◎”は特に良好、”○”は良好”、”△”は可能、”×”は不適当、”－”は、未検査を表す。）

【００３９】
なお、ｐＨが８．０～８．８の範囲では、ＨＥＰＥＳの緩衝能力が高い範囲を外れているが、ＨＥＰＥＳ濃度を高くしておけばよい。反応溶液中のＨＥＰＥＳ濃度は、水酸化コバルト（ＣｏＯ（ＯＨ））の沈殿が生じてもｐＨ変化が十分小さければどのような濃度でも良い。例えば、反応溶液中のコバルトイオンの濃度が３ｍＭの場合は、９０ｍＭ以上の濃度のＨＥＰＥＳ緩衝液を用いればよい。

【００４０】
アポフェリチンの反応溶液中での濃度は、０．１～１ｍｇ／ｍｌ（約０．２～２μＭ）の範囲内となるように調製する。特に、０．５ｍｇ／ｍｌ（１μＭ）程度が好ましい。

【００４１】
Co^{2+}イオンの濃度は、アポフェリチン濃度に応じて調節する。Co^{2+}イオンの濃度は、アポフェリチン濃度の１０００倍～５０００倍程度がよいが、特に２０００～３０００倍程度が好ましい。なお、Co^{2+}イオンを上記濃度よりも高濃度で加えてもかまわないが、高濃度で添加した場合、アポフェリチンの保持部外でのＣｏＯ（ＯＨ）の形成が激しくなり、この沈殿にコバルト－アポフェリチン複合体が巻き込まれる可能性があり、回収率が低下するおそれがある。

【００４２】
例えば、アポフェリチン濃度が０．５ｍｇ／ｍｌ（約１μＭ）の場合では、２～３ｍＭの濃度のCo^{2+}イオンを加える。Co^{2+}イオンを加えるためにはどのような化合物を用いてもよいが、硫酸アンモニウムコバルトまたは硝酸コバルトが特によい。硫酸アンモニウムコバルトまたは硝酸コバルトを用いると、後述するCo^{2+}－ＨＥＰＥＳ会合体を形成しやすく、反応が急速に進行しない（爆発的に反応しない）からである。

【００４３】
なお、本実施形態では、ステップＳｔ１において、ＨＥＰＥＳの最終濃度が３０ｍＭ（ｐＨ８．８）に、アポフェリチンの最終濃度が０．５ｍｇ／ｍｌ（１μＭ）に、Co^{2+}イオンの最終濃度が５ｍＭになるように反応溶液を調製している。
【００４４】
次に、ステップＳｔ２では、０．０１～３％の過酸化水素水を、コバルトイオンの１／２～１等量程度加える。例えば、Co^{2+}イオンが２ｍＭの場合、H_2O_2の最終濃度が１ｍＭ～２ｍＭの範囲内になるように添加する。
【００４５】
なお、過酸化水素水の添加によってアポフェリチンが変性することがある。このため、アポフェリチンを安定化するために塩を加えることが有効である。塩としては、例えばNa_2SO_4などが挙げられるが、それ以外の塩であっても良い。なお、コバルト－アポフェリチン複合体を作製する場合にはCl^-イオンの存在が障害となる（Cl^-イオンは、Co^{2+}イオンを安定化し、ＣｏＯ（ＯＨ）の形成を阻害する）ため、Ｃｌを含まない塩を用いることが好ましい。
【００４６】
塩濃度は、１０ｍＭ以上で加えても良いが、Na_2SO_4の場合では、実験結果から３０ｍＭ～１５０ｍＭ程度で安定化するためには十分である。
【００４７】
以上の溶液条件をまとめた結果を表２に示す。
【００４８】
【表２】

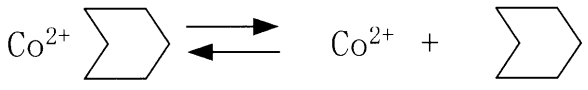
	アポフェリチン	Co^{2+}イオン	ＨＥＰＥＳ	H_2O_2
数量比	1	2000～5000	10000～100000	1000～5000
濃度	0.5mg/ml（１μＭ）	2ｍＭ～5ｍＭ	10ｍＭ～100ｍＭ	1ｍＭ～5ｍＭ

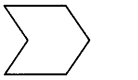
【００４９】
また、これまでの溶液調整中にCl^-イオンが入らないようにする。さらに望ましくは窒素をバブリングするなどの手段で溶液中の酸素を抜いておくのが良い。
【００５０】
以上の条件において、ステップＳｔ１では、反応溶液は、Co^{2+}イオンが呈するピンク色の溶液となっている。
【００５１】
ステップＳｔ２において、過酸化水素水の添加によりＣｏＯ（ＯＨ）が生成すると、Co^{3+}イオンが呈する茶色と緑色との中間色に変化する。分光光度計で計測したところ、３５０ｎｍ付近に吸収のピークがある水酸化物となっている。
【００５２】
通常、上記の条件において、室温で反応させると、数時間から数日かかる。しかしながら、反応を速やかに進めるために、反応溶液を４０℃から７０℃程度に加温してもよい。このことによって、数時間から一晩で反応を終了させることができる。７０℃以上ではアポフェリチン粒子が不安定になるので、室温～７０℃程度に加温することが好ましい。特に、反応溶液を５０～６０℃程度に加温することが好ましい。あるいは、好熱菌のアポフェリチンを用いれば、８０～１００℃程度に加温してもよい。これは、上記の温度条件において、生成するＣｏＯ（ＯＨ）の結晶性が良くなるからである。
【００５３】
なお、本実施形態では、ステップＳｔ２において、H_2O_2の最終濃度が２ｍＭに、Na_2SO_4の最終濃度が７５ｍＭになるように反応溶液を添加し、反応溶液を５０℃に加温している。
【００５４】

一般に、緩衝液は溶液中の化学物質に影響を及ぼさない。しかしながら、本実施形態で使用するＨＥＰＥＳ緩衝液の場合、ＨＥＰＥＳとＣｏ$^{2+}$イオンとの間で相互作用して、Ｃｏ$^{2+}$－ＨＥＰＥＳ会合体を形成すると考えられる。このときの反応溶液中の状態は、下記化学反応式２に示す平衡状態であると考えられる。

【００５５】

【化２】



（但し、  はHEPES）

【００５６】

このときの反応溶液の状態を図３に模式的に表す。

【００５７】

上記化学反応式２および図３に示すように、Ｃｏ$^{2+}$－ＨＥＰＥＳ会合体と、ＨＥＰＥＳ単体と、Ｃｏ$^{2+}$イオン単体とが平衡状態で存在するようになっている。

【００５８】

上記ステップＳｔ１において、ＨＥＰＥＳ緩衝液の代わりに水を用いた反応溶液を用いる場合、過酸化水素水の添加が行なわれると、上記化学反応式１に示すように、Ｃｏ$^{2+}$イオンは直ちに反応し、Ｃｏ$^{3+}$イオンの化合物ＣｏＯ（ＯＨ）が形成される。ＣｏＯ（ＯＨ）は不溶性なので直ちに沈殿し、その結果すべてのＣｏ$^{2+}$イオンはＣｏＯ（ＯＨ）沈殿となる。

【００５９】

しかしながら、本実施形態の場合、過酸化水素水を添加すると、H_2O_2は、Ｃｏ$^{2+}$イオンとＨＥＰＥＳとが会合した状態であるＣｏ$^{2+}$－ＨＥＰＥＳ会合体を酸化することができないと考えられる。従って、アポフェリチンの外部では、わずかに水溶液中にあるＣｏ$^{2+}$イオンがH_2O_2により酸化されて、ＣｏＯ（ＯＨ）の沈殿となっていく。

【００６０】

それに対してアポフェリチン１の保持部４は、ｐＨが８付近ではマイナスとなっているので、図３に示すように、アポフェリチン１の外部に比べてＣｏ$^{2+}$イオンの濃度が高くなっている。この結果、アポフェリチン１の保持部４内でＣｏＯ（ＯＨ）が優先的に形成されるようになる。さらに、ＣｏＯ（ＯＨ）の表面が触媒作用を有するので、反応は保持部４内で急速に加速される。

【００６１】

溶液全体にあるＣｏ$^{2+}$イオンは、H_2O_2の添加によりＣｏＯ（ＯＨ）沈殿となって量が減少するが、上記化学反応式２の反応は化学平衡であるので、Ｃｏ$^{2+}$－ＨＥＰＥＳ会合体が解離してＣｏ$^{2+}$イオンは供給される。従って、反応溶液中のＣｏ$^{2+}$イオンの濃度は、低濃度であるがほぼ一定に維持される。

【００６２】

このようなメカニズムの結果、Ｃｏ$^{2+}$－ＨＥＰＥＳ会合体からＣｏ$^{2+}$イオンが供給され、アポフェリチン１の保持部４のマイナス電荷により濃縮される。このことによって、保持部４でＣｏＯ（ＯＨ）の形成が進行し、コバルト－アポフェリチン複合体が形成される。

【００６３】

次に、ステップＳｔ２以降の操作について説明する。

【００６４】

まず、ステップＳｔ２で得られた反応溶液を容器に入れ、遠心分離機を用いて毎分３，０

００回転、１５～３０分の条件で遠心分離し、沈殿を除去する。続いて、沈殿を除去した後の上澄み液をさらに毎分１０，０００回転、３０分の条件で遠心分離し、コバルト－アポフェリチン複合体が凝集した不要な集合体を沈殿させてから除去する。このとき、上澄み液中には、コバルト－アポフェリチン複合体が分散された状態で存在している。

【００６５】

次に、この上澄み液の溶媒をｐＨ７．０、１００ｍＭのＨＥＰＥＳ緩衝液から１５０ｍＭのＮａＣｌ溶液へと透析により置換して、新たなコバルト－アポフェリチン複合体溶液を作製する。ここでのｐＨ調整は、特に行なわなくてよい。

【００６６】

続いて、コバルト－アポフェリチン複合体溶液を１～１０ｍｇ／ｍｌの任意の濃度に透析により濃縮した後、この溶液に最終濃度が１０ｍＭとなるように$CdSO_4$を加え、コバルト－アポフェリチン複合体を凝集させる。

【００６７】

次に、コバルト－アポフェリチン複合体溶液を毎分３，０００回転、２０分の条件で遠心分離し、溶液中のフェリチン凝集体を沈殿させる。その後、溶液の緩衝成分を１５０ｍＭのＮａＣｌが入ったｐＨ８．０、１０～５０ｍＭのＴｒｉｓ緩衝液へと透析により置換する。

【００６８】

次に、コバルト－アポフェリチン複合体溶液を濃縮後、ゲルろ過カラムによりコバルト－アポフェリチン複合体溶液をろ過することにより、コバルト－アポフェリチン複合体が得られる。この後、コバルト－アポフェリチン複合体は、適切な溶液中で保存される。

【００６９】

以上に示したように、本実施形態では、緩衝液を用いてｐＨ調整を行なうことによって、アポフェリチン溶液を所望のｐＨに調整することができる。従って、上記化学反応式１の反応が逆方向に進行することを防止でき、コバルト－アポフェリチン複合体に内包されるコバルト微粒子が溶液中に溶け出すことが防止される。従って、本実施形態によれば、均一な粒径を有するコバルト微粒子を内包するコバルト－アポフェリチン複合体を得ることができる。

【００７０】

特に本実施形態ではＮａＯＨを用いないので、アポフェリチンが変性してしまうおそれがない。このため、アポフェリチンが本来の性質を発揮できる状態、つまり、アポフェリチンがコバルト微粒子を十分に保持できる状態に維持することができる。

【００７１】

また、本実施形態のコバルト－アポフェリチン複合体の作製方法では、溶液全体にあるCo^{2+}イオンは、H_2O_2の添加によりＣｏＯ（ＯＨ）沈殿となって量が減少するが、上記化学反応式２の平行反応により、Co^{2+}－ＨＥＰＥＳ会合体が解離してCo^{2+}イオンは供給される。Co^{2+}イオンは、アポフェリチン１の保持部４のマイナス電荷により濃縮され、保持部４でＣｏＯ（ＯＨ）の形成が進行し、コバルト－アポフェリチン複合体が形成される。このため、反応スケールを工業的規模まで大きくした場合に、酸化剤（本実施形態ではH_2O_2）を均一に拡散させることに特別注意を払わなくとも、酸化剤を添加するだけでコバルト－アポフェリチン複合体が形成される。従って、本実施形態のコバルト－アポフェリチン複合体の作製方法では、工業的規模で行なうことが比較的容易である。

【００７２】

図４は、本実施形態により得られたコバルト－アポフェリチン複合体の電子顕微鏡写真である。図４には、代表的に矢印で示すように、アポフェリチンの内部（保持部）にＣｏＯ（ＯＨ）が取り込まれている様子が示されている。

【００７３】

一方、図５は、ＨＥＰＥＳ緩衝液の代わりにリン酸緩衝液またはＴＡＰＳ緩衝液を用いて本実施形態の方法を実施して得られたアポフェリチンの電子顕微鏡写真である。図５と図

４とを比較してみると、図５では、代表的に矢印で示すようにアポフェリチンの内部（保持部）にＣｏＯ（ＯＨ）が取り込まれていないことがわかる。つまり、リン酸緩衝液を用いた場合には、アポフェリチンの保持部でＣｏＯ（ＯＨ）の形成が起こらない。本発明者は、他の緩衝液（例えば、Ｔｒｉｓ緩衝液、ＴＡＰＳ緩衝液、酢酸緩衝液など）でも、アポフェリチンの保持部でＣｏＯ（ＯＨ）の形成が起こらないことも確認している。この結果から、Co^{2+}イオンは、アポフェリチンの保持部に濃縮される前にすべてアポフェリチンの外部の溶液中でＣｏＯ（ＯＨ）の沈殿となっているものと考えられる。つまり、ＴＡＰＳ緩衝液、Ｔｒｉｓ緩衝液、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液などの場合には、Co^{2+}イオンとリン酸、酢酸、またはＴｒｉｓとの間では、上記化学反応式２および図３のような平行状態が成り立っていないと考えられる。

【００７４】

以上のことから、本実施形態では用いているＨＥＰＥＳは、緩衝剤であり、且つ、Co^{2+}イオンと会合する会合剤として機能していると考えられる。従って、本実施形態で用いるＨＥＰＥＳ緩衝液の代わりに、緩衝液および会合剤としてそれぞれ別の試薬を用いれば、本実施形態と同様に、均一な粒径を有するコバルト微粒子を内包するコバルト－アポフェリチン複合体が得られる。つまり、緩衝液として、例えば、ＴＡＰＳ緩衝液、Ｔｒｉｓ緩衝液、リン酸緩衝液などを、会合剤としては、シクロデキストラン、クラウンエーテル、カリックスアーレンなどをそれぞれ用いれば、本実施形態と同様の効果が得られる。

【００７５】

また、本実施形態では、コバルトを導入するタンパク質としてアポフェリチンを用いたが、内部に金属粒子を保持することが可能な他のタンパク質（例えば、Ｄｐｓタンパク質、ＣＣＭＶタンパク質など）を代わりに用いてもよい。

【００７６】

またさらに、本実施形態では、酸化剤としてH_2O_2を用いたが、他の公知の酸化剤を代わりに用いてもよい。例えば、$KMnO_4$、$K_2Cr_2O_7$、HNO_3
などを酸化剤としてH_2O_2の代わりに用いることができる。

【００７７】

（実施形態２）

本実施形態では、上記実施形態１において作製されたコバルト－アポフェリチン複合体を利用して形成されるドット体をフローティングゲートとして含む不揮発メモリセルについて説明する。

【００７８】

図６（ａ）～図６（ｄ）は、本実施形態の不揮発性メモリセルの製造方法を示す工程断面図である。

【００７９】

まず、図６（ａ）に示す工程で、ｐ型Ｓｉ基板１０１上に、ＬＯＣＯＳ法により、活性領域を取り囲む素子分離酸化膜１０２を形成した後、基板上にトンネル絶縁膜として機能するゲート酸化膜１０３を熱酸化法によって形成する。その後、６ｎｍ程度の粒径を有する金属または半導体の微粒子からなるドット体１０４を基板上に形成する。なお、ドット体１０４を基板上に形成する方法については、後述する。

【００８０】

次に、図６（ｂ）に示す工程で、基板上に、スパッタ法またはＣＶＤ法により、ドット体１０４を埋めるSiO_2膜を堆積する。

【００８１】

次に、図６（ｃ）に示す工程で、基板上にＡｌ膜を堆積する。続いて、フォトレジストマスクＰｒ１を用いて、SiO_2膜およびＡｌ膜のパターニングを行なって電極間絶縁膜となるシリコン酸化膜１０５及び制御ゲート電極となるＡｌ電極１０６を形成する。このとき、ゲート酸化膜１０３のうちフォトレジストマスクＰｒ１で覆われていない部分は除去されるので、その上のドット体１０４も同時に除去される。その後、フォトレジストマスク及びＡｌ電極１０６をマスクとして不純物イオンの注入を行なって、第１、第２ｎ型拡

散層１０７ａ、１０７ｂを形成する。

【００８２】

その後、図６（ｄ）に示す工程で、周知の方法により、層間絶縁膜１０８の形成と、層間絶縁膜１０８へのコンタクトホール１０９の開口と、コンタクトホール１０９内へのタングステンの埋め込みによるタングステンプラグ１１０の形成と、第１、第２アルミニウム配線１１１ａ、１１１ｂの形成とを行なう。

【００８３】

本実施形態では、基板としてｐ型Ｓｉ基板を用いたが、ｎ型Ｓｉ基板を用いてもよく、さらに、ＧａＡｓをはじめとする化合物半導体その他の半導体により構成される基板を用いてもよい。

【００８４】

次に、図６（ａ）に示す工程において、ドット体１０４を基板上に形成する方法を、図７および図８を参照しながら以下に説明する。なお、本発明は、以下に説明する方法には限定されず、他の公知の方法を適用することも可能である。

【００８５】

まず、図７（ａ）に示す工程で、上記実施形態１で得られたコバルト－アポフェリチン複合体（以下、本明細書中では複合体と略す）１５０を用意し、この複合体１５０を基板１３０の表面上に配置する。このことによって、複合体１５０が基板１３０の表面上に高密度、且つ高精度で配置された複合体膜が形成される。なお、基板１３０とは、図６（ａ）に示す工程で、ｐ型Ｓｉ基板１０１上に、ＬＯＣＯＳ法により、活性領域を取り囲む素子分離酸化膜１０２を形成した後、基板上にトンネル絶縁膜として機能するゲート酸化膜１０３が熱酸化法によって形成されたものを指す。以下の説明においても同様である。

【００８６】

次に、図７（ｂ）に示す工程で、複合体１５０のうちのタンパク質分子１４０を除去して、コバルト微粒子１０４ａのみを残存させることによって、基板１３０上にドット体１０４を形成する。

【００８７】

ここで、図７（ａ）に示す工程において、複合体１５０を基板１３０の表面上に高密度、且つ高精度で配置する、すなわち、基板１３０の表面上に２次元状に配列および固定する方法について説明する。本実施形態では、以下に、特開平１１－４５９９０号公報に記載の方法を図８を参照しながら説明する。

【００８８】

まず、図８（ａ）に示すように、複合体１５０を分散した液体１６０（本実施形態では、濃度４０ｍＭ、ｐＨ５．３のリン酸バッファ溶液と、濃度４０ｍＭの塩化ナトリウム水溶液との等量混合溶液にコバルト－アポフェリチン複合体を分散したもの）を用意する。

【００８９】

続いて、図８（ｂ）に示すように、ＰＢＬＨ（Ｐｏｌｙ－１－Ｂｅｎｚｉｌ－Ｌ－Ｈｉｓｔｉｄｉｎｅ）を注射器などで静かに液体１６０の表面に展開する。このことによって、液体１６０の表面にＰＢＬＨからなるポリペプチド膜１７００が形成される。この後、液体１６０のｐＨを調節しておく。

【００９０】

次に、図８（ｃ）に示すように、時間の経過に伴って複合体１５０がポリペプチド膜１７０に付着し、複合体１５０の２次元結晶ができる。これは、ポリペプチド膜１７０が正電荷を帯びているのに対し、複合体１５０は負電荷を帯びているからである。

【００９１】

次に、図８（ｄ）に示すように、ポリペプチド膜１７０上に基板１３０を載置して（浮かべて）、ポリペプチド膜１７０を基板１３０に付着させる。

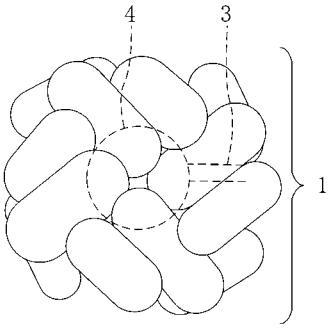
【００９２】

次に、図８（ｅ）に示すように、基板１３０を取り出せば、ポリペプチド膜１７０を介して、複合体１５０の２次元結晶が付着した基板１３０を得ることができる。

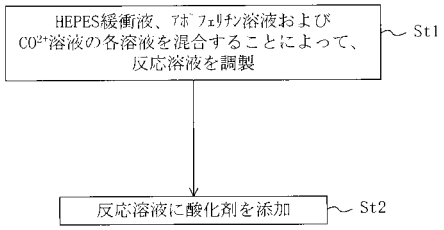
【００９３】
次に、図７（ｂ）に示す工程をさらに詳細に説明する。
【００９４】
タンパク質分子は一般に熱に弱いため、複合体１５０のうちのタンパク質分子１４０の除去は、熱処理によって行なう。例えば、窒素等の不活性ガス中において、４００～５００℃にて、約１時間静置すると、タンパク質分子１４０、および方法１の場合のポリペプチド膜１７０が焼失し、基板１３０上にはコバルト微粒子１０４ａが２次元状に、高密度で、且つ高精度で規則正しく配列したドット体１０４として残存する。
【００９５】
以上のようにして、図７（ｂ）に示すように、複合体１５０に保持させたコバルト微粒子１０４ａを、基板１３０上に２次元状に出現させ、高密度且つ高精度に配列したドット体１０４を形成することができる。
【００９６】
図６（ｄ）に示すように、本実施形態のメモリセル１００は、制御ゲートとして機能するＡｌ電極１０６と、ソースまたはドレインとして機能する第１、第２ｎ型拡散層１０７ａ、１０７ｂとからなるＭＯＳトランジスタ（メモリセルトランジスタ）を備え、フローティングゲートとして機能するドット体１０４に蓄えられた電荷の量で上記メモリトランジスタの閾値電圧が変化することを利用した不揮発性メモリセルである。
【００９７】
この不揮発性メモリセルは、二値を記憶するメモリとしての機能が得られるが、ドット体１０４に蓄えられる電荷の有無のみだけでなく電荷の蓄積量を制御することで、三値以上の多値メモリを実現することもできる。
【００９８】
データの消去の際には、酸化膜を介したＦＮ（Ｆｏｗｌｅｒ－Ｎｏｒｄｈｅｉｍ）電流や直接トンネリング電流を利用する。
【００９９】
また、データの書き込みには、酸化膜を介したＦＮ電流や直接トンネリング電流あるいはチャネルホットエレクトロン（ＣＨＥ）注入を用いる。
【０１００】
本実施形態の不揮発性メモリセルでは、フローティングゲートが量子ドットとして機能できる程度に粒径の小さいコバルト微粒子により構成されているので、電荷の蓄積量がわずかである。したがって、書き込み、消去の際の電流量を小さくでき、低消費電力の不揮発性メモリセルを構成することができる。
【０１０１】
また、本実施形態の不揮発性メモリセルでは、フローティングゲートを構成するコバルト微粒子のサイズが均一であるため、電荷の注入、引き抜きの際の特性が各コバルト微粒子間で揃っており、これらの操作において制御が容易に行なえる。
【０１０２】
【発明の効果】
本発明によれば、均一な粒径を有するコバルト微粒子を内包するコバルト－タンパク質複合体を得ることができる。
【図面の簡単な説明】
【図１】図１は、アポフェリチンの構造を示す模式図である。
【図２】図２は、実施形態１のコバルト－アポフェリチン複合体の作製方法を表すフローチャートである。
【図３】図３は、反応溶液の状態を模式的に表す図である。
【図４】図４は、実施形態１により得られたコバルト－アポフェリチン複合体の電子顕微鏡写真である。
【図５】図５は、ＨＥＰＥＳ緩衝液の代わりにＴＡＰＳ緩衝液を用いて実施形態１の方法を実施して得られたアポフェリチンの電子顕微鏡写真である。

【図６】図６（ａ）～図６（ｄ）は、本実施形態の不揮発性メモリセルの製造方法を示す工程断面図である。
【図７】図７は、ドット体を基板の表面上に２次元状に配列および固定する方法を示す工程断面図である。
【図８】図８は、複合体を基板の表面上に２次元状に配列および固定する方法について説明する図である。
【符号の説明】
１　アポフェリチン
３　チャネル
４　保持部
１００　メモリセル
１０１　ｐ型Ｓｉ基板
１０２　素子分離酸化膜
１０３　ゲート酸化膜
１０４　ドット体
１０４ａ　コバルト微粒子
１０５　シリコン酸化膜
１０６　Ａｌ電極
１０７ａ　第１ｎ型拡散層
１０７ｂ　第２ｎ型拡散層
１０８　層間絶縁膜
１０９　コンタクトホール
１１０　タングステンプラグ
１１１ａ　第１アルミニウム配線
１１１ｂ　第２アルミニウム配線
１３０　基板
１４０　タンパク質分子
１５０　コバルト－アポフェリチン複合体
１６０　液体
１７０　ポリペプチド膜

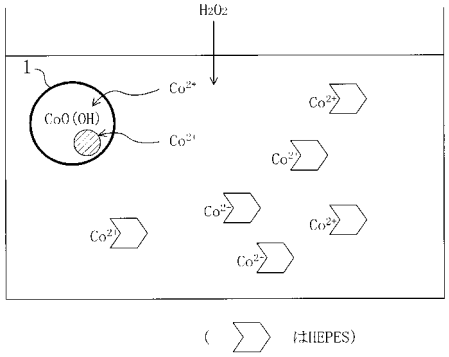
【図１】


4
3
1

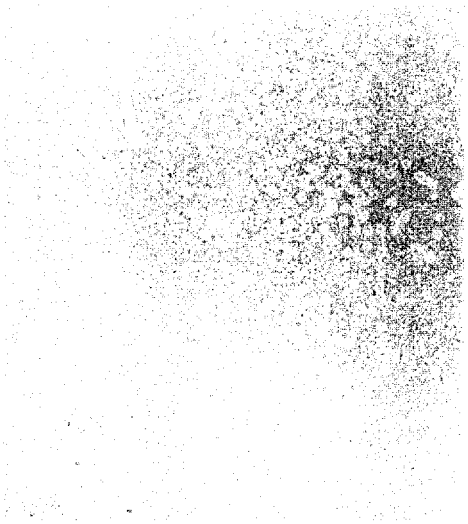
【図２】


HEPES緩衝液、ｱﾎﾟﾌｪﾘﾁﾝ溶液および
CO²⁺溶液の各溶液を混合することによって、
反応溶液を調製
St1
反応溶液に酸化剤を添加
St2

【図３】

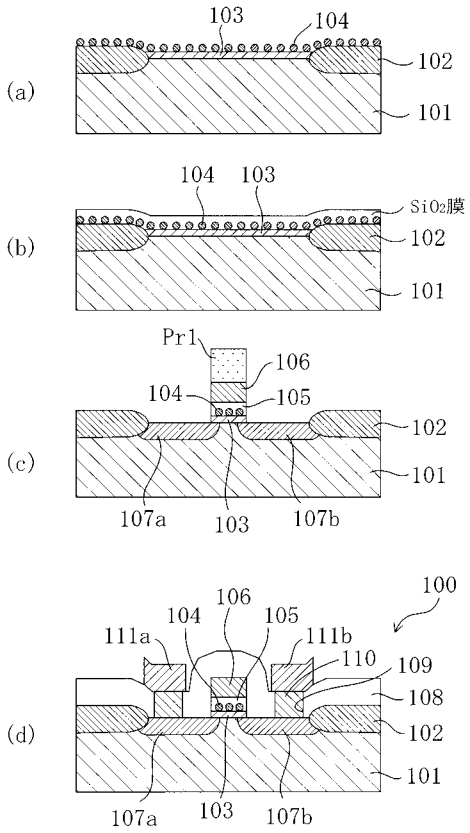

H2O2
1
Co2+
CoO(OH)
Co2+
Co2+
Co2+
Co2+
Co2+
Co2+
Co2+
(は HEPES)

【図４】

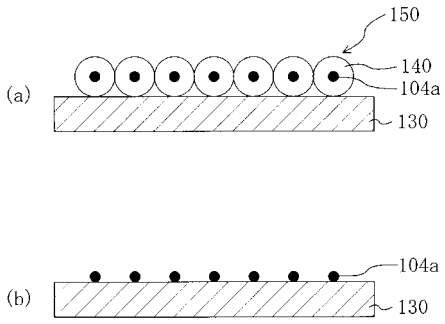


【図５】

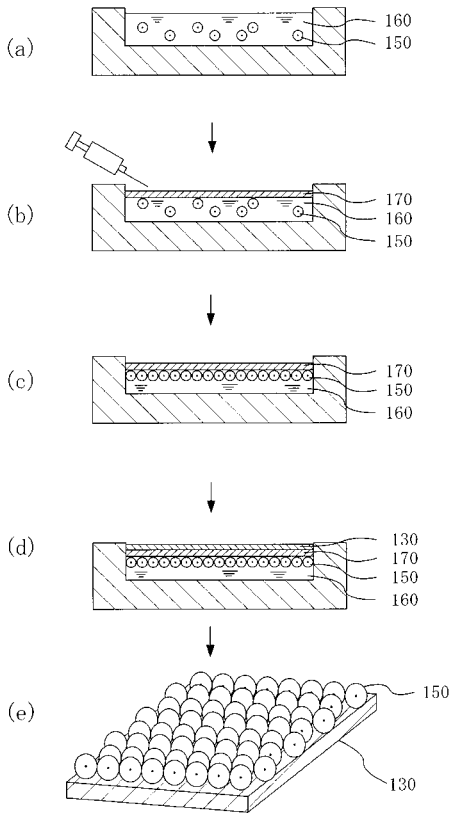
【図６】


(a)
103
104
102
101
(b)
104
103
SiO2膜
102
101
(c)
Pr1
106
104
105
102
101
107a
103
107b
(d)
100
106
104
105
111a
111b
110
109
108
102
101
107a
103
107b

【図７】


(a)
150
140
104a
130
(b)
104a
130

【図８】


(a)
160
150
(b)
170
160
150
(c)
170
150
160
(d)
130
170
150
160
(e)
150
130

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7] F I
H01L 29/06 H01L 29/78 371
H01L 29/788
H01L 29/792

(74)代理人 100115510
弁理士 手島 勝
(74)代理人 100115691
弁理士 藤田 篤史
(72)発明者 山下 一郎
大阪府門真市大字門真１００６番地 松下電器産業株式会社内

審査官 佐藤 秀樹

(56)参考文献 T.Douglas and V.T.Stark, Nanophase Cobalt Oxyhydroxide Mineral Synthesized within the Protein Cage of Ferritin, Inorganic Chemistry, 米国, American Chemical Society, ２０００年 4月１７日, Vol.39, No.8, p.1828-1830
X.Yang and N.D.Chasteen, Ferroxidase activity of ferritin: effects of pH, buffer and Fe(II) and Fe(III) concentrasions on Fe , Biochemical Journal, 英国, The Biochemical Society, London, １９９９年 3月１５日, Vol.338, No.3, p.615-618
F.C.Meldrum et.al., Magnetoferritin : In Vitro Synthesis of a Novel Magnetic Protein, Science, 米国, １９９２年 7月２４日, Vol.257, p.522-523

(58)調査した分野(Int.Cl.[7], ＤＢ名)
B82B 1/00-3/00
C07K 1/00-123:00