

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05542

研究課題名(和文) 無機ナノシートを応用した生体分子光検出法の創製

研究課題名(英文) Development of optical detection method for biomolecules by utilizing inorganic nanosheets

研究代表者

宗 伸明 (SOH, Nobuaki)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：90336008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、無機ナノシートを応用した生体分子の蛍光検出法の開発を行った。まず、ユウロピウムを含むチタン酸無機ナノシート(Eu-TiO_x)と西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)から成るEu-TiO_x/HRP複合体を作製し、この複合体を用いた過酸化水素の蛍光検出法を開発した。次に、Eu-TiO_x、HRP、グルコースオキシダーゼ(GOx)から成るEu-TiO_x/HRP/GOx複合体を作製し、この複合体を用いたグルコースの蛍光検出法を開発した。以上のことから、無機ナノシートであるEu-TiO_xが、生体分子の一種でもある過酸化水素とグルコースの蛍光検出に応用可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to develop fluorescence detection method for biomolecules by utilizing inorganic nanosheets. First, we developed a fluorescence detection method for hydrogen peroxide using a complex composed of europium-doped titanate nanosheets (Eu-TiO_x) and horseradish peroxidase (HRP). Next, we developed a fluorescence detection method for glucose using a complex composed of Eu-TiO_x, HRP, and glucose oxidase (GOx). Therefore, Eu-TiO_x nanosheets were successfully applied to the development of fluorescence detection method for biomolecules.

研究分野：分析化学

キーワード：無機ナノシート 酵素 蛍光 バイオ材料

1. 研究開始当初の背景

生体分子の検出法は、生命現象の基礎的な解析から医学における臨床応用に至るまで幅広い分野で重要な技法である。これまで、様々な生体分子検出法が報告されてきたが、その中でも光検出法は非常に重要なものの一つである。特に蛍光に基づく光検出法は、高感度であり、細胞内などにおける生体分子の動的挙動をも捉えることができるという利点があることから、近年では、蛍光イメージング法と呼ばれる検出法も大きな発展を遂げている。生体分子光検出法のための材料として、現在、有機化合物や量子ドット (Quantum dot, QD) が広く使われている。一方で、興味深い二次元ナノ材料として注目されている無機ナノシートは、分析化学分野への応用自体が、前述の材料と比較すると大きく立ち遅れている。

2. 研究の目的

上述した背景から、本研究では無機ナノシートを応用した生体分子光検出法の開発を目的とした。より具体的には、蛍光性無機ナノシートと酵素から成るハイブリッド材料を構築し、これを用いることで、生体分子の一種である過酸化水素、あるいはグルコースをターゲットとした蛍光検出系の開発を試みた。

3. 研究の方法

まず、液相法により、希土類であるユウロピウムをドープしたチタン酸無機ナノシート (Eu-TiO_x) を合成した。次に、静電的相互作用を利用することで、酵素である西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) と Eu-TiO_x から成る複合体を作製した。HRP の基質であるグアイアコールの存在下、Eu-TiO_x/HRP 複合体に過酸化水素を添加し、蛍光分析を行うことで、Eu-TiO_x/HRP 複合体が過酸化水素の検出に適用可能であるかを検討した。

続いて、酵素であるグルコースオキシダーゼ (GOx) を HRP と共に Eu-TiO_x と複合させた Eu-TiO_x/HRP/GOx 複合体を作製した。グアイアコールの存在下、Eu-TiO_x/HRP/GOx 複合体にグルコースを添加し、蛍光分析を行うことで、Eu-TiO_x/HRP/GOx 複合体がグルコースの検出に適用可能であるかを検討した。この際、分光蛍光光度計の燐光モードの使用についても検討した。また、Eu-TiO_x/HRP/GOx 複合体が、マイクロプレートリーダーを使用した時間分解蛍光測定に基づくグルコース検出に適用可能であるかを検討した。

4. 研究成果

(1) Eu-TiO_x/HRP 複合体の作製と過酸化水素蛍光検出への適用

まず、液相法に基づき Eu-TiO_x の合成を行った。水酸化テトラブチルアンモニウム (TBAOH) の溶液に対し、塩化ユウロピウムとチタンイソプロポキシドの混合溶液を添

加し、60 で2時間振盪させ、生成したアルカリ性コロイド溶液を限外濾過することにより、目的とした Eu-TiO_x を得た。次に、得られた Eu-TiO_x と HRP を弱酸性 (pH4) の酢酸緩衝液中で混合し、Eu-TiO_x/HRP 複合体を形成させた。複合体の形成は、酢酸緩衝液中における Eu-TiO_x と HRP 間の静電的相互作用に基づくものと考えられる。得られた Eu-TiO_x/HRP 複合体の蛍光スペクトルを分光蛍光光度計 (日立 F-7000) により測定したところ、500 ~ 600 nm 付近に、特徴的な蛍光ピークが認められた。

次に、Eu-TiO_x/HRP 複合体に対し、発色基質の存在下、過酸化水素を添加した時の蛍光変化を、分光蛍光光度計を用いて測定した。HRP の発色基質としてグアイアコールを選択し、この物質の共存下において Eu-TiO_x/HRP 複合体に過酸化水素を添加したところ、添加に伴い 500 ~ 600 nm 付近における蛍光ピークの強度が減少した。567 nm における蛍光強度の過酸化水素濃度依存性の結果を図1に示す。ここに示すように、当該波長における蛍光強度は、過酸化水素濃度の増大に伴い減少した。このことから、Eu-TiO_x/HRP 複合体は過酸化水素を検出するための新規材料として有用であることが確認できた。

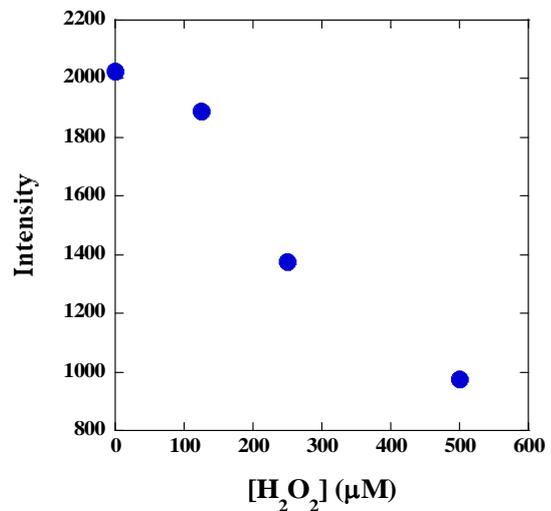


図1 Eu-TiO_x/HRP 複合体の蛍光強度の過酸化水素濃度依存性

(2) Eu-TiO_x/HRP/GOx 複合体の作製とグルコース蛍光検出への適用

前述のように、Eu-TiO_x/HRP 複合体が過酸化水素の検出に有用であることが確認できた。そこで、次に Eu-TiO_x に HRP と GOx を複合させた Eu-TiO_x/HRP/GOx 複合体を作製し、これをグルコースの検出に適用することを試みることにした。まず、Eu-TiO_x、HRP、GOx を弱酸性 (pH4) の酢酸緩衝液中において混合したところ、粉末が析出し、Eu-TiO_x/HRP/GOx 複合体が形成されたことが確認できた。Eu-TiO_x と Eu-TiO_x/HRP/GOx 複

合体の X 線回折分析の結果を図 2 に示す。Eu-TiO_x で観測された 2 theta = 4.4°、9.3° のピークから、Eu-TiO_x はテトラブチルアンモニウムイオン (TBA⁺) を層間に挿入して規則的に積み重なっていると考えられる。一方で、Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体では、特徴的なピークは見られなかったことから、Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体中の Eu-TiO_x は不規則な配置で存在していると考えられる。動的な光散乱測定により求めた Eu-TiO_x の粒径は 3 nm と小さく、これが Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体中の Eu-TiO_x が不規則な配置で存在する原因ではないかと思われる。

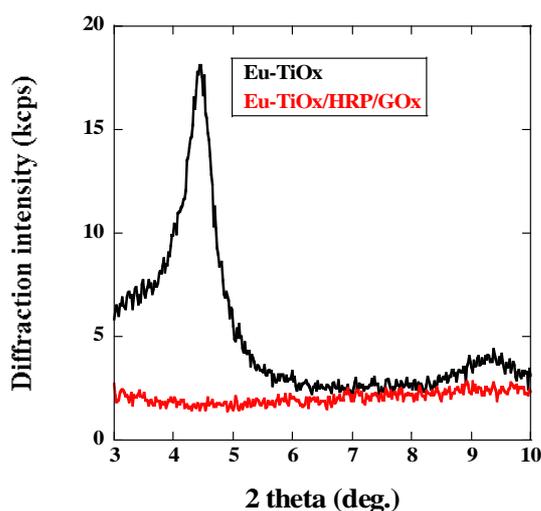


図 2 Eu-TiO_x と Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体の X 線回折分析

次に得られた Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体に対し、グアイアコールの存在下でグルコースを添加し、分光蛍光光度計 (日立 F-7000) を用いて蛍光分析を行った。その結果、グルコースの添加に伴い 500 ~ 600 nm 付近における蛍光ピークの強度が減少した。また、この蛍光強度の減少は、添加したグルコース濃度と相関があった。このことから、Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体をグルコースの蛍光検出に適用可能であることが確認できた。

一方、Eu-TiO_x を上記の分光蛍光光度計の燐光モードを用いて計測したところ、580 ~ 640 nm 付近に特徴的なピークが観測された (図 3)。燐光モードを用いることで、短い蛍光寿命を持つ、Eu-TiO_x 以外の成分に由来する蛍光を除去できることが期待できる。そこで、この燐光モードにより、Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体を用いたグルコース検出が行えるかどうかを検討した。Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体に対し、グアイアコールの存在下でグルコースを添加し、燐光モードによる発光強度測定を行った。その結果、添加したグルコース濃度と発光強度の減少率との間には相関関係が見い出され、本手法のグルコース検出における有用性が示された。

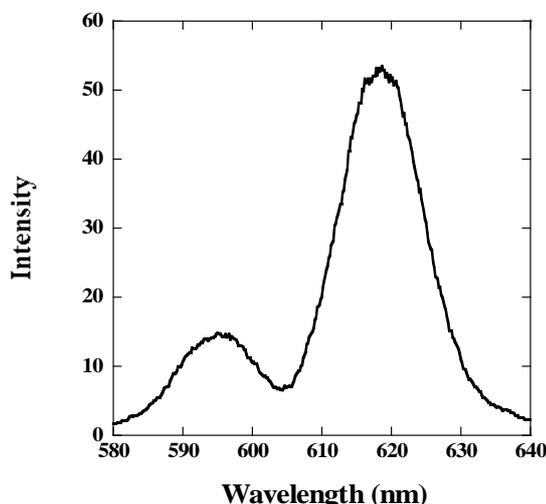


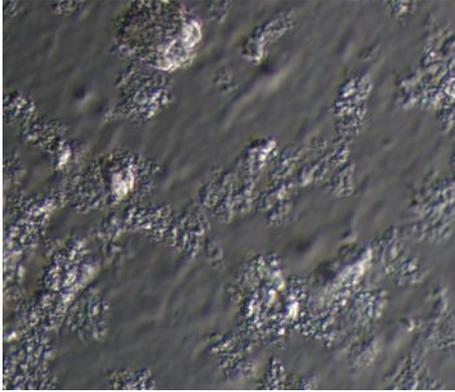
図 3 分光蛍光光度計の燐光モードを用いて計測した Eu-TiO_x の発光スペクトル

次に、より発展的な検討として、マイクロプレートリーダーを使用し、時間分解蛍光測定に基づくグルコース検出法を構築することを試みた。時間分解蛍光測定を行うことで、短い蛍光寿命を持つ、Eu-TiO_x 以外の成分に由来する蛍光を除去し、効率的に Eu-TiO_x のユウロピウム由来の蛍光を捉えることができると考えられる。また、マイクロプレートリーダーによる測定は、多検体処理に優れるという特長も有している。

図 4 (a) は、96 穴プレート中に存在する Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体を光学顕微鏡により観察した時の顕微鏡像を示している。図 4 (a) に示すように、溶液中において半透明の複合体が観測された。次に、グアイアコール共存下、グルコースを添加した時の Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体の 616 nm における蛍光強度の時間変化を図 5 に示す。図 5 に示すように、グルコースの添加に伴い Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体の 616 nm における蛍光強度は減少した。図 4 (b) には、グルコース添加後の顕微鏡像を示している。図 4 (b) に示すように、Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体は茶色に染色されていた。図 6 は、Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体を用いた時間分解蛍光測定に基づくグルコース検出の検量曲線を示している。図 6 に示すように、グルコース濃度の増大に伴い、Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体の蛍光強度は減少した。検出限界は、3.1 μM であった。

Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体の顕微鏡像の結果も考慮すると、本検出系における蛍光強度の減少は、次のような過程で生じると考えられる (図 7)。第 1 段階: Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体に含まれる GO_x が添加されたグルコースから過酸化水素を生じる。第 2 段階: Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体に含まれる HRP が、第 1 段階で生成した過酸化水素と共存するグアイアコールを用いて発色反応を進行させ、茶色の発色体が生じる。第 3 段階: 生成した

(a)



(b)

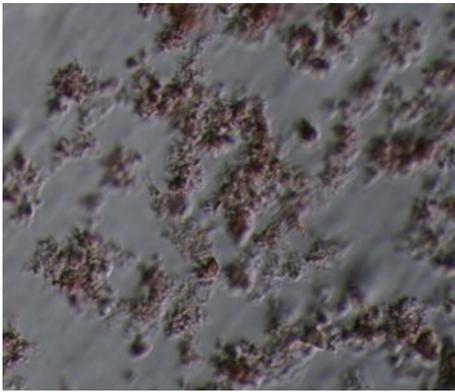


図4 Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体を光学顕微鏡により観察した時の顕微鏡像 (a) Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体 (b) Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体にグアイアコール共存下でグルコースを添加した時の顕微鏡像

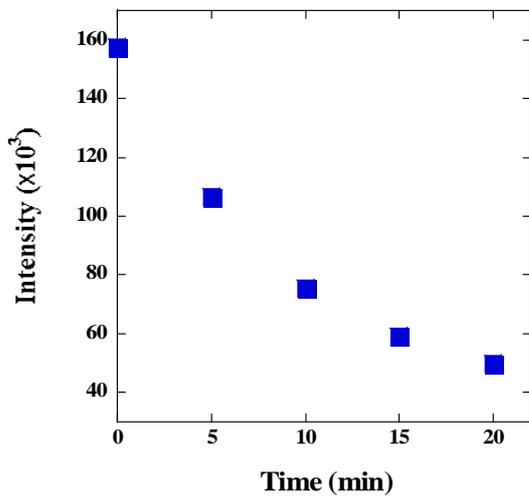


図5 グアイアコール共存下、グルコースを添加した時の Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体の 616 nm における蛍光強度の時間変化

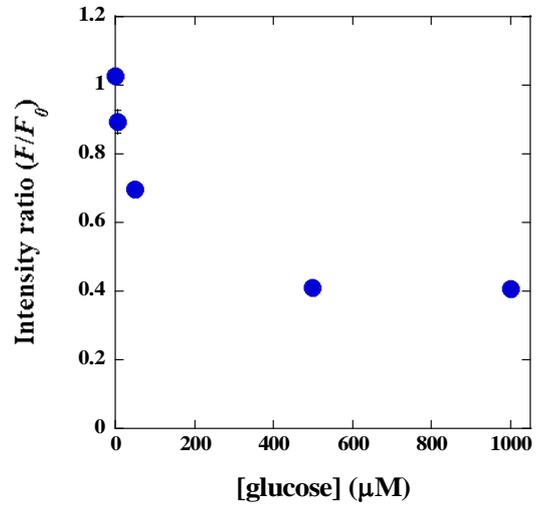


図6 Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体を用いた時間分解蛍光測定に基づくグルコース検出の検量曲線

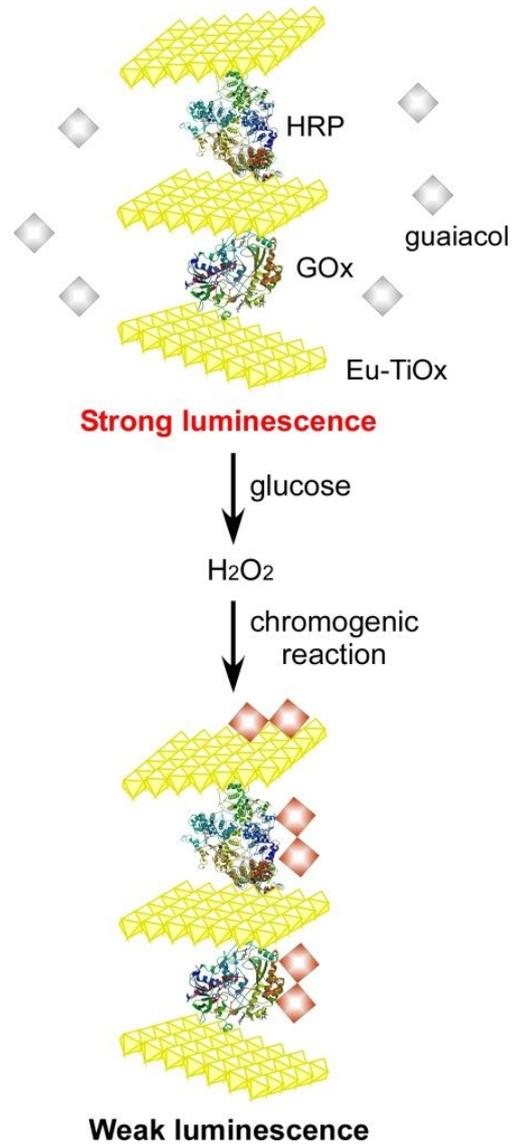


図7 Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体を用いたグルコース検出系の検出概念図

茶色の発色体が Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体に吸着し、蛍光強度が減少する。第3段階における蛍光強度の減少には、次の二つの因子が関与すると予測される。一つ目は、幅広い吸収帯(330~800 nm)を持つ茶色発色体により、励起光が一部吸収されるというものである。二つ目は、616 nm の蛍光を発する Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体から茶色発色体へのエネルギー移動が生じるというものである。以上が、本検出系における蛍光強度減少のメカニズムであると考えられる。

以上より、Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体が時間分解蛍光測定に基づくグルコース検出にも有用であることが確認できた。GO_x 以外にもターゲットとする基質を酸化して過酸化水素を発生する酵素は複数存在する(例えば、乳酸オキシダーゼやアルコールオキシダーゼ等)。従って、今後、これらの酵素を GO_x の代わりに用いることにより、別のターゲット物質(乳酸やアルコール等)を検出する新たな材料を作製できる可能性もある。

(3) まとめ

研究期間全体を通じた成果のまとめとして、まず液相法により Eu-TiO_x を合成し、これと HRP から成る Eu-TiO_x/HRP 複合体が、過酸化水素の蛍光検出系の構築に有用であることを明らかとした。また、HRP と GO_x を Eu-TiO_x に複合させた Eu-TiO_x/HRP/GO_x 複合体が、グルコースの蛍光検出系の構築に有用であることを明らかとした。以上のことから、無機ナノシートである Eu-TiO_x を、生体分子の一種でもある過酸化水素とグルコースの蛍光検出に応用可能であることが示された。本研究は、無機ナノシートの分析化学分野への新しい応用法を示した点で特に意義深いと考えられる。また、今後、二種の酵素を Eu-TiO_x に複合化する場合に、使用する酵素の組み合わせを変えることで、本手法を様々な別のターゲットの検出に拡張することも期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Yuki Sakaguchi, Tomoka Minamikawa, Mayuko Yamamuro, Tadayuki Tsujita, Toshihisa Ueda, Kai Kamada, Nobuaki Soh, "Time-resolved fluorescent detection for glucose using a complex of luminescent layered titanates and enzymes", Anal. Sci., 33, 989-991 (2017). 査読有
DOI: 10.2116/analsci.33.989

Kai Kamada, Daiki Ito, Nobuaki Soh, "Visible-light-induced activity control of peroxidase bound to

Fe-doped titanate nanosheets with nanometric lateral dimensions", Bioconjugate Chem., 26, 2161-2166 (2015). 査読有
DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00464

[学会発表](計8件)

Nobuaki Soh, "Fluorescent detection of biomolecules based on organic compounds and nanobiohybrids", Joint-Seminar of Yonsei University and National Universities in Kyushu, Nagasaki, Japan, 2017

坂口優紀・山室麻由子・上田敏久・鎌田海・宗 伸明 "ユウロピウムをドーブした無機ナノシートと酵素の複合体による燐光モードでのグルコース検出に関する検討" 第54回化学関連支部合同九州大会 福岡県北九州市 2017年

山下舞美・上田敏久・鎌田海・宗 伸明 "無機ナノシート/酵素/磁気ビーズ複合体によるコリン検出系の開発と磁気ビーズの粒径が及ぼす影響の検討" 第54回化学関連支部合同九州大会 福岡県北九州市 2017年

南川朋花・坂口優紀・上田敏久・鎌田海・宗 伸明 "酵素を複合化した蛍光性無機ナノシートによるグルコースの検出" 日本分析化学会第65年会 北海道札幌市 2016年

南川朋花・坂口優紀・上田敏久・鎌田海・宗 伸明 "蛍光性無機ナノシート/酵素複合体を用いた過酸化水素並びにグルコース検出系の開発" 第53回化学関連支部合同九州大会 福岡県北九州市 2016年

牟田典恵・山下舞美・上田敏久・鎌田海・宗 伸明 "無機ナノシート/酵素/磁気ビーズ複合体によるコリン検出系の開発" 第53回化学関連支部合同九州大会 福岡県北九州市 2016年

Nobuaki Soh, "Development of bioanalytical method based on titanate nanosheets", Rare Earths 2016 in Sapporo, Hokkaido, Japan, 2016

南川朋花・牟田典恵・藤島 稜・上田敏久・宗 伸明・鎌田海 "無機ナノシートに二種の酵素と磁気ビーズを複合化したハイブリッド体の開発と酵素の繰り返し利用" 日本分析化学会第64年会 福岡県福岡市 2015年

[図書](計1件)

Kai Kamada, Akane Yamada, Misato Kamiuchi, Motoko Tokunaga, Daiki Ito, Nobuaki Soh, "Synergistic functions of enzymes bound to semiconducting layers", In Rational Design of Enzyme-Nanomaterials; Challa Vijaya Kumar, Ed.; Academic Press (UK), Methods in Enzymology., 2016, Vol. 571, pp.113-134.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宗 伸明 (SOH, Nobuaki)
佐賀大学・農学部・教授
研究者番号：90336008

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

鎌田 海 (KAMADA, Kai)
長崎大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：90315284

(4) 研究協力者

なし ()