

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02539

研究課題名(和文) 酵素-カーボンナノチューブ複合体の発光と応用

研究課題名(英文) Luminescence of carbon nanotube-enzyme complex and its application

研究代表者

田中 丈士 (Takaka, Takeshi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・研究グループ長

研究者番号：30415707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：酵素反応を利用したカーボンナノチューブの近赤外発光に関する研究を推進した。近赤外光は生体組織に対して高い透過性と低い散乱性を有しており、医療応用に非常に適しているが、蛍光を利用する場合には励起光自体の透過性が低いことや生体分子由来の自家発光が問題となっている。本研究の酵素反応によるカーボンナノチューブの発光は励起光が不要なためこれら問題を回避することが可能である。ホタルの発光酵素(ルシフェラーゼ)を用いて、カーボンナノチューブを発光させることに成功した。複数種のカーボンナノチューブの構造に対応した発光波長を確認できた。今後、更なる発光の高効率化を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果は、酵素反応の発光を用いることで、外部からの励起光なしに、生体組織の透過性の高い近赤外光をカーボンナノチューブから発することを可能とするものである。このような報告はこれまでになく、学術的に重要なだけでなく、新たな診断法などの新規用途の開発にも繋がる、社会的意義も有するものである。

研究成果の概要(英文)：Research on near-infrared emission of carbon nanotubes by enzymatic reactions was conducted. Near-infrared light has high transparency and low scattering property for living tissues and is very suitable for medical applications, but when fluorescence is used, there are problems of low permeability of the excitation light and autofluorescence derived from biomolecules. Since the emission of carbon nanotubes by the enzymatic reaction in this study does not require external excitation light, it is possible to avoid these problems. In this study near infrared emission from carbon nanotubes by enzymatic reaction from firefly (luciferase). It was confirmed that the emission wavelengths corresponded to the structures of multiple types of carbon nanotubes. Further, improvement for the efficiency of light emission is going on.

研究分野：ナノ材料科学

キーワード：カーボンナノチューブ 酵素 発光 近赤外光

1. 研究開始当初の背景

単層カーボンナノチューブは炭素原子の配列のしかた（グラフェンシートを丸めたときの六方格子のねじれ度合い、カイラリティ）によって金属的にも半導体的にもなり、優れた機械的・電氣的・光学的な特性を示す。特に半導体型カーボンナノチューブは近赤外波長における蛍光を示し、当該波長の光は生体透過性が高いため医療への応用が期待されているほか、量子暗号通信などといった多様な応用へと期待されている。カーボンナノチューブの発光は、光で励起する蛍光の報告が数多くあるが、ほかには、電界で励起する電界発光に関する報告が少ないながらもある。しかしながら、これまでに化学反応のエネルギーを元にした発光の報告は存在しなかった。これは、カーボンナノチューブ自体が化学的に非常に安定なため、化学反応性が低く、カーボンナノチューブに対する化学反応を元に発光させるというアイデア自体が無かったためによると考えられる。申請者は現在の所属となってからカーボンナノチューブの分離に関する研究と分離カーボンナノチューブを用いた応用開発に関する研究に10年以上取り組んできた。またそれ以前の現所属となる前には、大学の学部生から修士課程、博士課程、博士研究員の8年間の間、生体分子である酵素による反応の研究をおこなってきた。

2. 研究の目的

本研究課題では、酵素反応を利用することによって、カーボンナノチューブの近赤外発光をえることを目的に研究を推進する。そのために、ホタルの発光酵素（ルシフェラーゼ）を用いた系を検討する。本研究は、上述したように申請者のこれまでの研究経験、つまり、生体分子である酵素に関する研究と、カーボンナノチューブの分離と応用に関する研究の知識と技術があるからこそ実施可能な研究である。これまでにカーボンナノチューブとルシフェラーゼを用いた研究としては、カーボンナノチューブを担体に用いて、マウス体内でのルシフェラーゼ反応の発光を可視化した研究（R. El-Sayed et al., Nano Letters, 13 (2013) 1393）と、ルシフェラーゼ反応の産物である酸化ルシフェリンによるカーボンナノチューブの蛍光の消光を検出したもの（J. Kim et al., Angewandte Chemie, Int. Ed., 49 (2010) 1456）の2件の報告があった。しかしながら、本研究課題の様な、ルシフェラーゼ反応をもちいてカーボンナノチューブの近赤外の発光を得ようとした報告はなく、前例のない独自性の高い研究であり、新たな物理現象の発見など学術的にも重要な知見が得られることが期待できる。

3. 研究の方法

ホタルのルシフェラーゼは、アデノシン三リン酸（ATP）酸素分子、ルシフェリンを基質とする反応を触媒し、ルシフェリンを酸化して、励起状態の酸化ルシフェリンを生じる（図1）。そして、励起酸化ルシフェリンが基底状態に戻る際に、562nmにピークをもつ黄緑色の光を発する。この光を励起光として、カーボンナノチューブの近赤外発光を得ることを目指す。実験に使用するカーボンナノチューブには、はじめ CoMoCat 法で合成された（6,5）のカイラリティをメインプロダクトとして含むものを使用した。合成されたカーボンナノチューブは数百本程度のカーボンナノチューブがファンデルワールス力によって、強固なバンドル（束）を形成しているが、界面活性剤の水溶液に懸濁したのち、超音波破砕機で処理することによりバンドルをほどいた。次いで、超遠心分離を行うことにより、触媒やアモルファスカーボン、ほどけなかったバンドルなどを取り除き、カーボンナノチューブの孤立分散液を得た。また、実験の後半では、ゲルカラムクロマトグラフィーにより、単一構造にまで分離・精製したカーボンナノチューブを実験に使用した。

4. 研究成果

2019年度は、まず、ホタルの発光酵素（ルシフェラーゼ）の発光反応を利用したカーボンナノチューブの近赤外発光を得ることを目的に研究を進めた。カーボンナノチューブとルシフェラーゼ共存下での発光実験を行った。発光の計測は、近赤外の発光スペクトル測定装置を用いて行ったが、発光を検出することが出来なかった。

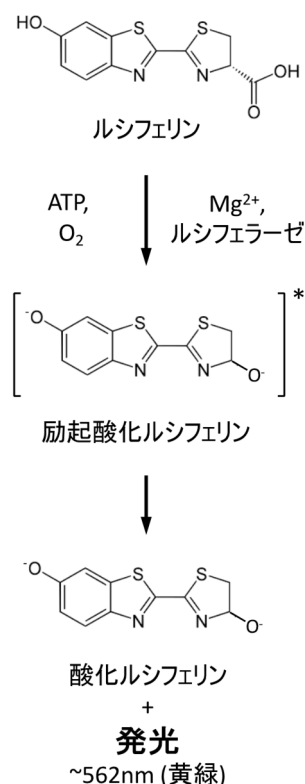


図1 ホタル由来ルシフェラーゼの発光反応

そこで、より感度の高い発光検出系として、近赤外カメラを用いた新たな検出系を構築した。CoMoCAT 法で合成したカーボンナノチューブの分散液を用いて、ルシフェラーゼ共存下で近赤外発光を検出することに成功した(図2上段)。図3に、ルシフェラーゼ反応の発光スペクトル(可視、緑線)とCoMoCat カーボンナノチューブの光吸収スペクトル(紫外-可視-近赤外、黒線)を示す。ルシフェラーゼ反応による562nmにピークを持つ発光が、CoMoCat カーボンナノチューブの主成分である(6,5)カーボンナノチューブのS₂₂ピーク(～570nm)を励起し、当該カーボンナノチューブのS₁₁ピーク(984nm)で発光しているものと考えられる。ルシフェラーゼ反応によるカーボンナノチューブの発光を観測することに成功すると、より強い発光を示す条件検討を行うことが可能となる。実際に、基質濃度や、酵素濃度、pH、カーボンナノチューブ濃度、分散剤濃度、積算時間、フィルターの種類などといった様々な条件を検討・最適化することによって、より強い発光を得るに至った(図2、下段)。次いで、本発光がカーボンナノチューブに由来することを明らかにすることを目的に、近赤外領域に対応する分光器(ポリクロメーター)を新たに導入し、近赤外分光測定装置を組み上げた。本分光装置を用いて近赤外発光スペクトルを測定した結果、当該発光波長がカーボンナノチューブのものと同じで、カーボンナノチューブによる発光であることが強く示唆された。本研究の最大のハードルは、カーボンナノチューブの近赤外発光が検出できるか否かに掛かっているところ、初年度より酵素反応を利用したカーボンナノチューブの近赤外発光を検出することに成功した。

2020年度は、前年度に得られた結果を補強すべく、さらに複数の異なる構造を持つカーボンナノチューブを調製した。ゲルクロマトグラフィーによるカーボンナノチューブの分離では、カーボンナノチューブの励起波長がルシフェラーゼ反応の発光波長と重なるような構造を持つカーボンナノチューブに焦点を絞り、当該ナノチューブを分離・調製した。得られた複数の構造分離半導体型カーボンナノチューブを用いて、ルシフェラーゼ反応による発光スペクトル測定を行った。その結果、当該構造分離カーボンナノチューブの発光波長に対応した発光スペクトルが得られ、当該発光がカーボンナノチューブに由来することが確かめられた。しかしながら、その発光強度は高くないことが明らかとなった。また、より高感度な測定系を得るために、前年度に導入した近赤外領域に対応する分光器(ポリクロメーター)の試料室に新たな集光系を導入する改造を加えた。

2021年度は、前年度に明らかになったルシフェラーゼ反応によるカーボンナノチューブの発光の強度が低い原因が何に由来するのかについて調べた。その結果、当該酵素(ホタル由来のルシフェラーゼ)の反応機構が低い発光強度の原因の一つとなっていることが考察された。また、前年度導入した新たな集光系を導入した測定装置の高感度化については、集光系の精度が十分でなく、想定していた高感度化を実現するには精度が不十分であることが明らかとなった。一方で、異なる反応系による新たな発光系を構築することを目的に実験を行い、条件検討を進めたが、現在までに顕著な結果を得ることはできていない。こちらについては今後も研究を継続してすぐれた条件を探索していく予定にしている。現在、これまでに得られた結果をまとめ、論文投稿に向けた準備を進めているところである。

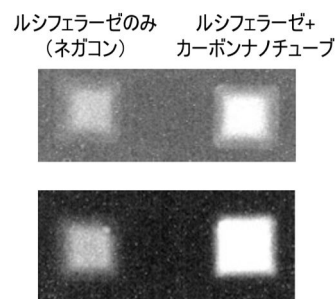


図2 カーボンナノチューブとルシフェラーゼ共存下での近赤外発光。(左)ネガティブコントロール(ルシフェラーゼのみ)、(右)ルシフェラーゼ+カーボンナノチューブ。(上段)反応条件最適化前。(下段)反応条件最適化後。

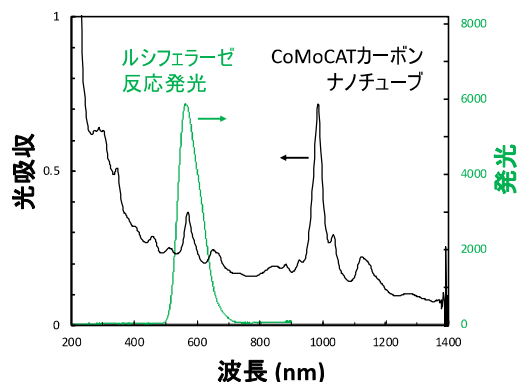


図3 ルシフェラーゼ反応による発光スペクトル(緑線、右軸)とCoMoCat カーボンナノチューブの光吸収スペクトル(黒線、左軸)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Masako Yudasaka, Yuko Okamatsu-Ogura, Takeshi Tanaka, Kumiko Saeki and Hiromichi Kataura	4. 巻 54
2. 論文標題 Cold-induced Conversion of Connective Tissue Skeleton in Brown Adipose Tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Histochem. Cytochem.	6. 最初と最後の頁 131-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1267/ahc.21-00030	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 -

1. 著者名 Ryosuke Fukuda, Tomokazu Umeyam, Masahiko Tsujimoto, Fumiyoshi Ishidate, Takeshi Tanaka, Hiromichi Kataura, Hiroshi Imahori, Tatsuya Murakami	4. 巻 161
2. 論文標題 Sustained photodynamic effect of single chirality-enriched single-walled carbon nanotubes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carbon	6. 最初と最後の頁 718-725
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.carbon.2020.02.002	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3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takeshi Tanaka
2. 発表標題 Separation of single-wall carbon nanotubes by gel and their applications
3. 学会等名 第61回 フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中丈士
2. 発表標題 ホタルの発光酵素を用いたカーボンナノチューブの近赤外発光
3. 学会等名 2019 年度第二回ナノカーボン研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Tanaka, Mahoko Higuchi, Atsunori Hiratsuka, Hiromichi Kataura
2. 発表標題 Luminescence of CNTs by luciferin/luciferase reaction from firefly
3. 学会等名 第58回 フラールン・ナノチューブ・グラフェン総合シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	片浦 弘道 (Kataura Hiromichi) (30194757)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・ナノ材料研究部門・ 招聘研究員 (82626)	
研究分担者	平塚 淳典 (Hiratsuka Atsunori) (70392652)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・ナノ材料研究部門・ 研究グループ長 (82626)	

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
---------	---------