

令和 6 年 6 月 1 1 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14576

研究課題名（和文）量子計測を用いた単一タンパク質診断プラットフォームの開発

研究課題名（英文）Development of platform for single protein analysis using quantum magnetometry

研究代表者

石綿 整（Ishiwata, Hitoshi）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学研究所・主任研究員

研究者番号：30784897

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究ではダイヤモンド表面に対してカルボキシル基が生成可能な化学処理法を実施し、XPSにてダイヤモンド表面の定量的な検証を行った。ダイヤモンド基板表面において観測されたC1sピークにはsp², sp³, C-Hx, C-O-C, C=O, COOHに対応するピークが確認された。sp², sp³に対応する報告値を基準とし、相対的に結合エネルギーの値を評価することでカルボキシル基の生成を確認した。本研究により開発されたダイヤモンド表面の解析技術は、タンパク質解析だけでなく、量子計測を使用した表面計測技術の理解と応用にも寄与することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内タンパク質の構造とダイナミクスの変化は細胞機能の発現を決定し、人の病気の発生にも大きな影響を及ぼす。例えば、筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、国内に約一万人の患者がいる難病で、原因の解明と治療法の開発には大きな課題が存在する。タンパク質の凝集体が病原性の発現に重要な役割を果たす可能性が示唆されているため、これらの凝集体を形成するタンパク質の単一構造とダイナミクスの解析が必要である。本研究の成果によって確立された高感度量子計測技術とタンパク質と結合する化学修飾法は、単一タンパク質解析技術の進展に寄与し、難病の解明における大きな社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we implemented a chemical treatment on diamond surfaces that facilitates the formation of carboxyl groups, and quantitatively verified the surfaces using X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). Peaks corresponding to sp², sp³, C-Hx, C-O-C, C=O, and COOH were identified in the C1s spectrum observed on the diamond substrate surface. By using the reported values for sp² and sp³ as references, we evaluated the relative binding energy values to confirm the formation of carboxyl groups. The surface analysis technology developed in this study is expected to contribute not only to protein analysis but also to the understanding and application of surface measurement techniques using quantum measurements.

研究分野：量子生命科学

キーワード：量子計測 細胞生物学 タンパク質解析技術 量子生命

1. 研究開始当初の背景

細胞内タンパク質の構造・ダイナミクスの変化は細胞の機能発現を決定しており、人の病気発現にも大きく関与している。例えば、筋萎縮性側索硬化症(ALS)は国内に一万人程度の患者が存在する難病の一つであり原因の解明・治療法に大きな課題が存在する。タンパク質凝集体が病原性の発現に重要な役割を果たす可能性が示唆されており、凝集体を形成するタンパク質の単一構造・ダイナミクス解析が必須である。しかし、現状微小領域解析による単一タンパク質解析は感度の問題から非常に困難であり、特に単一タンパク質におけるラベルフリーダイナミクス解析の目途はたっていない。

ダイヤモンド中の NV センタを用いた量子計測は、高感度な量子センサを計測対象近傍に配置することが可能な次世代量子技術である。特に表面近傍 10nm 以下の領域に存在する NV センタを用いた微小領域量子計測は、室温において高感度な核スピン計測を可能とし $\sim(5\text{nm})^3$ の微小体積から NMR 計測を実現し、単一タンパク質のラベルフリーダイナミクス解析を実現可能である。

2. 研究の目的

単一タンパク質のラベルフリーダイナミクス解析において最も重要なのは NV センタと観測対象の距離であり、NV センタ表面形成技術と観測対象の表面固定の二点が最も重要な要素となる。本研究では表面近傍に形成された NV センタ直上に単一タンパク質固定技術を開発することで単一タンパク質の量子計測を実現し、量子技術を用いた単一タンパク質診断法の開発を実現する。

本研究では、単一タンパク質をダイヤモンド表面に固定する技術の開発において、ダイヤモンド表面の化学結合状態の計測および制御の重要性に焦点を当てる。具体的には、ダイヤモンド表面の化学結合状態を解析するための新しい手法を開発し、その解析結果をもとに定量的なダイヤモンド表面の解析法を構築する。加えて、熱混酸処理を含む複数の化学結合処理法を検証し、その結果をタンパク質の固定方法の改善に活用する。本研究により開発されるダイヤモンド表面の解析技術は、タンパク質解析だけでなく、量子計測を使用した表面計測技術の理解と応用にも寄与することが期待される。これにより、基礎技術のさらなる発展を促進する。

3. 研究の方法

ダイヤモンド基板表面に酸素処理を行い、表面の化学結合を X 線光電子分光法(X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS))を計測することで確認した。ダイヤモンド表面にはグラフファイトに対応する sp^2 成分、ダイヤモンドに対応する sp^3 成分だけでなく、ダイヤモンド表面に存在する炭素、酸素、水素は複雑な結合状態を示し、 C-H 、 C-O-C 等様々な結合状態を取りうる。タンパク質の固定にはカルボキシル基($-\text{COOH}$)の生成が必須である。本研究ではダイヤモンド表面におけるカルボキシル基生成法を複数の化学処理法を用いて行い、表面状態を XPS にて検証することで化学修飾に必要となるカルボキシル基の形成を確認した。

4. 研究成果

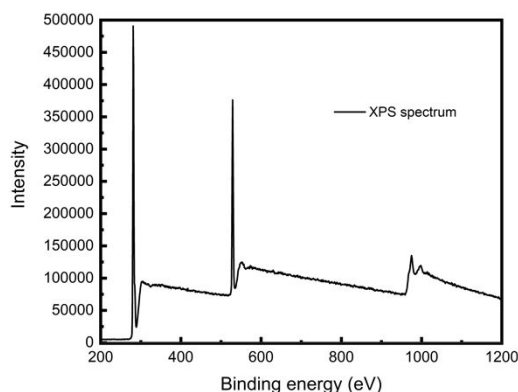


図1 XPS によるダイヤモンド表面の解析結果

本研究ではダイヤモンド表面におけるカルボキシル基生成法の一つである硝酸と硫酸による熱混酸処理を 330°C で 1 時間行い、表面状態を XPS にて検証することで化学修飾に必要となるカルボキシル基の形成を確認した。XPS によるダイヤモンド基板表面に存在する原子の検証をまずは 200-1200eV の広範囲における XPS 計測により検証した結果を図 1 に示す。スペクトラムから炭素に対応する C1s ピークと酸素に対応する O1s ピーク、酸素に対応する Auger ピークの

3つが観測されている。広範囲における XPS 計測の計測結果からダイヤモンド表面が熱混酸処理により酸化していることが確認できる。

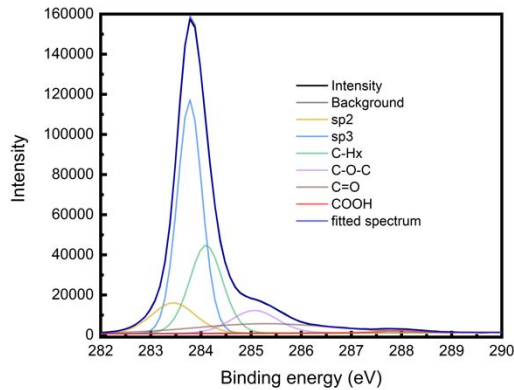


図2 XPS による C1s ピークの解析結果

図2に熱混酸処理を行ったダイヤモンド基板上において検出された XPS の C1s ピーク解析結果を示す。COOH に対応するピークの強度は低いため、COOH 近傍の C1s ピークスペクトラムを図3に示す。ダイヤモンド基板表面において観測された C1s ピークには sp^2 , sp^3 , C-H_x, C-O-C, C=O, COOH に対応するピークが確認された。ピーク成分の対応には X 線によるダイヤモンドサンプルのチャージングの影響が考えられるため計測される結合エネルギーだけでは定量できない。そこで過去の参考文献における報告値を参考に sp^2 , sp^3 に対応するピークを基準に相対的に結合エネルギーの値を評価することで決定している。

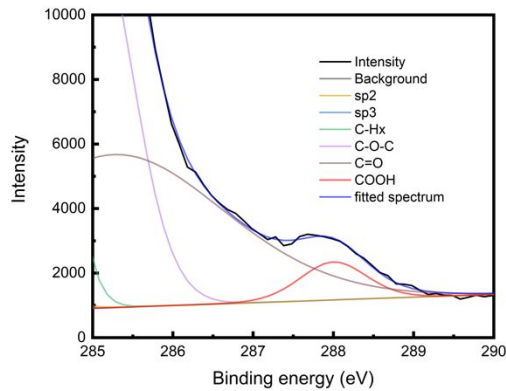


図3 C1s ピーク COOH 近傍の解析結果

ピークフィッティングの結果得られたそれぞれのピーク値に対応する面積比を図4に示す。面積比としては 1%と低い値ではあるが COOH に対応するピークが観測されておりカルボキシル基の生成が確認出来る。このように熱混酸処理後のダイヤモンド基板表面を XPS にて解析することでダイヤモンド表面に分子固定の最初のプロセスとなるカルボキシル基の形成を確認した。

対応ピーク名称	sp^2	sp^3	C-H _x	C-O-C	C=O	COOH
面積比(%)	10.76	46.29	23.23	8.39	10.55	0.78

図4 C1s ピークの解析結果

ダイヤモンド表面に対する酸処理を行い XPS を用いて表面結合状態を解析することで表面へのタンパク質固定に必要なカルボキシル基の形成を確認した。今回の研究によりダイヤモンド表面の化学検証法が確立した。

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 0件）

1. 著者名 ISHIWATA Hitoshi	4. 巻 62
2. 論文標題 Label-free Quantification of Diffusion Constant in Lipid Bilayers Using Diamond Quantum Magnetometry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 190 ~ 191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophys.62.190	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石綿 整
2. 発表標題 ナノスケールスピン操作による細胞量子モニタリング法の開発
3. 学会等名 一般社団法人レーザー学会学術講演会第44回年次大会 シンポジウム：フォトリクスが切り拓く光量子技術（招待講演）
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 石綿 整、神長輝一、五十嵐龍治、山田健一
2. 発表標題 量子計測による脂肪酸ラジカル検出法の開発
3. 学会等名 第5回量子生命科学会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 石綿 整、佐原成彦
2. 発表標題 ダイヤモンド量子計測を用いた生体スピンイメージング応用
3. 学会等名 第31回日本バイオイメーjing学会学術集会
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計1件

1．著者名 石綿 整	4．発行年 2024年
2．出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5．総ページ数 372
3．書名 量子生命科学ハンドブック 第1章 量子センサ 第6節 ダイヤモンド量子センサによるリン脂質ラベルフ リー計測手法の開発	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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