

平成 21 年 4 月 28 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19750115

研究課題名（和文） 二酸化チタン-DNA ナノ高次構造体の構築と光機能評価

研究課題名（英文） Photofunctions of Highly Ordered TiO₂-DNA Nanostructures

研究代表者

立川 貴士 (TACHIKAWA TAKASHI)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：20432437

研究成果の概要：二酸化チタン(TiO₂)光触媒への紫外光照射によって生じる酸化還元力や超親水性などを医学、医療や関連する周辺領域に応用することは、安全で豊かな社会の創成に役立つ重要な研究課題である。本研究では、分子レベルで TiO₂-DNA ナノ複合体を構築および制御する方法論を確立し、ミスマッチ塩基配列の検出を目的としたナノバイオセンサーの開発を行った。また、TiO₂ ナノ粒子表面における光反応を単一粒子および単一分子レベルで観測する新しい実験手法を確立した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	0	2,400,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,900,000	150,000	3,050,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・機能物質化学

キーワード：光物性、表面・界面、機能触媒

1. 研究開始当初の背景

二酸化チタン(TiO₂)光触媒への紫外光照射によって生じる酸化還元力や超親水性などを医学、医療や関連する周辺領域に応用し、その実用化を検討することは、安全で豊かな社会の創成に役立つ重要な研究課題である。例えば、DNA や抗癌剤などを結合させたナノ複合体を用いたドラッグデリバリーシステムやバイオセンサーの開発は、光触媒のナノバイオ医療への応用という点からも極めて重要である。しかしながら、TiO₂光触媒反応が DNA やタンパクなどの細胞内高分子へ及ぼす影響については未だ明らかになっていない点が多く、TiO₂ナノ粒子と DNA の複合化に関する方法論も十分に確立されていると

はいえない。

また、光触媒反応では、反応活性種の拡散や反応性が時間的および空間的に不均一であり、従来のマクロな分光測定のみでは分子レベルでの機構解明には至らなかった。以上の問題を解決するためには、単一粒子・単一分子レベルでの時間・空間分解分光測定が不可欠である。そこで、本研究では単一の TiO₂-DNA ナノ複合体の光機能性を評価・制御する手法を確立し、ナノバイオ分野への応用展開を行う。このような試みは、国内外においても類を見ず、得られる知見はいずれもバルク系での観測では得ることが困難であり、その学術的意義は大きい。

2. 研究の目的

本研究では、DNA の有する自己組織化能を利用し、球状、チューブ状、ロッド状などのTiO₂ナノ材料を自在に組織化し、光機能性高次構造体を構築することができる基盤技術を確認することを目的とする。また、TiO₂の高い酸化能とDNAにおけるホール移動速度の核酸塩基配列依存性を利用し、TiO₂-DNA ナノ複合体を用いた塩基ミスマッチ検出バイオセンサーを創製する。さらに、光触媒反応を単一粒子および単一分子レベルで観測することによって、界面光反応における不均一性についての知見を得る。特に、様々な活性酸素種を単一分子レベルで選択的に検出する新たな手法の開発を行う。

3. 研究の方法

アルカリ水熱反応などにより、様々な形状やサイズを有するTiO₂ナノ材料を合成する。ポストモディフィケーション法によってドーパミン分子を修飾したDNAを合成し、ジオール部位とチタン部位の化学結合させることにより、バッファー中で安定なTiO₂-DNAナノ複合体を形成させる。電荷分離効率を時間分解拡散反射法により定量的に評価する。

TiO₂-DNA ナノ複合体における光触媒反応を、全反射蛍光顕微鏡により単一分子レベルで直接観測する。ここで、蛍光観察のため、単一の発光性量子ドットをDNAに修飾する。サンプルの作成法としては、カバーガラス上に形成させたTiO₂薄膜にドーパミンを介して修飾DNAを結合させる。蛍光観察用の対物レンズを通してTiO₂-DNAナノ複合体に紫外光を照射することで、時間・空間選択的に電荷分離反応を引き起こす。ナノ複合体の酸化による表面解離までの時間に対するDNA鎖の長さ、塩基ミスマッチ、光照射強度の効果を検討することにより、TiO₂によるDNA光酸化過程の詳細について明らかにする。

光触媒反応によって生成した活性酸素種を検出するための蛍光プローブとして、テリレンジイミド誘導体(TDI、一重項酸素(¹O₂)検出プローブ)、ヒドロキシフェニルフルオレセイン(HPF、ヒドロキシルラジカル([•]OH)検出プローブ)、アミノフェニルフルオレセイン(APF、[•]OH検出プローブ)を用いる。

単一分子蛍光観察は全反射蛍光顕微鏡(Olympus IX71)を用いて行う。蛍光色素およびTiO₂の光励起には、それぞれ連続波レーザー(488 nm もしくは 532 nm)および水銀ランプ(365 nm)を用いる。

4. 研究成果

(1) 吸着部位としてカテコールを化学修飾

したDNAをTiO₂ナノ粒子に結合する手法を確立した。同様の手法で、ナノチューブなど様々な形状を有するTiO₂ナノ材料にDNAを修飾することが可能である。

全反射蛍光顕微鏡を用いて、発光性量子ドットを修飾したTiO₂-DNAナノ複合体を単一分子レベルで蛍光観察することに成功した。図1Aに観測された単一分子蛍光像を示す。30秒間の紫外光照射により、輝点数は著しく減少した。これは、紫外光照射によってドーパミン-TiO₂結合部位が開裂し、DNAがTiO₂薄膜上からバッファー溶液中へ解離したことに起因する。また、紫外光照射によって引き起こされる輝点数変化のDNA塩基配列依存性の実験から、たったひとつのミスマッチ塩基対が反応効率を大きく低下させることがわかった。反応速度論に基づく定量的な解析から、光触媒酸化反応において、DNA鎖内のホール移動過程が重要な役割を果たしていることがわかった。また、捕捉剤添加実験から、[•]OHなど種々の活性酸素種がTiO₂-DNAナノ複合体の開裂反応に関与していることを明らかにした。

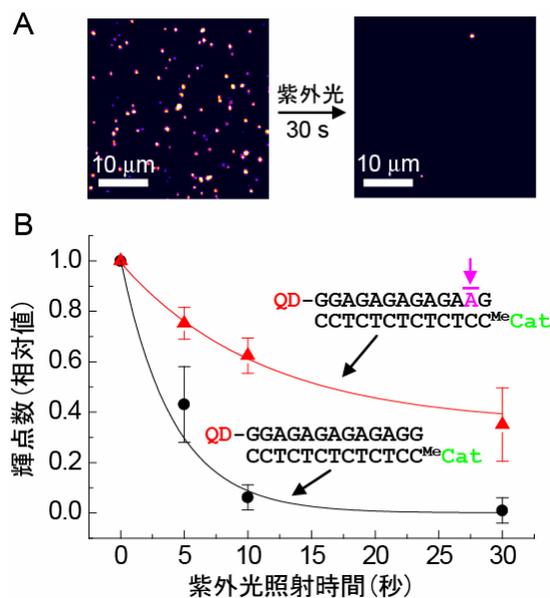


図1. (A) TiO₂-DNAナノ複合体の単一分子蛍光像。(B) 輝点数変化におけるDNA塩基ミスマッチ効果。

(2) 非接触TiO₂光触媒反応において生成する活性酸素種を蛍光プローブによって選択的に検出する測定系を構築し、その時間・空間分布について明らかにした。

図2Aは、TiO₂光触媒反応における重要な活性酸素種である[•]OHの検出に用いたHPFの反応スキームを示している。[•]OHとの反応によって強発光性のフルオレセインを生成する。

図2Bは検出された輝点数の実時間変化を示している。TiO₂への紫外光照射により、観測領域内に10~20程度の輝点が観測された。

これらは、フルオレセインからの単一分子蛍光によるものであり、 $\cdot\text{OH}$ が空気中へ拡散していることを示している。高強度のレーザー光を照射しているため、生成したフルオレセインの大部分は1フレーム(33 ms)内に退色した。検出された総輝点数の時間変化を単一指数関数で解析することにより、定常状態におけるHPFと $\cdot\text{OH}$ との擬一次反応速度 k_{OH} を得ることができた。さらに、 $\ln k_{\text{OH}}$ と TiO_2 薄膜とカバーガラスとの距離 d の二乗との関係から、見かけの $\cdot\text{OH}$ 寿命は170 μs 程度であることがわかった。

また、カバーガラスの端に密着させた TiO_2 薄膜へ紫外光を照射することにより、ガラス表面における $\cdot\text{OH}$ の二次元拡散を観測することに成功した。得られた実験および解析結果から、 $\cdot\text{OH}$ がガラス表面に存在する水分子膜ネットワークを不均一に拡散しているモデルを提案した。ガラス、水、空気の3成分からなる界面における活性酸素種の異常拡散を実験的に観測した例は本研究が最初の例であり、今後より詳細な検討により、基礎的な面からその科学を明らかにすることが望まれる。

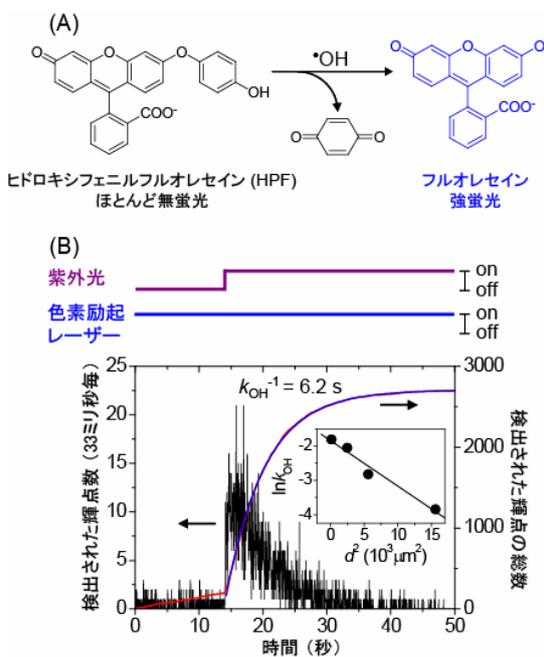


図2. (A) ヒドロキシフェニルフルオレセイン (HPF) によるヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) の単一分子検出。(B) 紫外光照射前後の輝点数変化。挿入図は、 TiO_2 薄膜とカバーガラスとの距離 (d) の二乗と反応速度 (k_{OH}) の対数との関係である。

(3) 一次元構造を有する TiO_2 ナノチューブ内における光触媒反応を単一粒子・単一分子レベルで蛍光観察した。 TiO_2 ナノチューブを固定化した観察用フローセルを作製し、ヒドロキシルラジカル検出蛍光プローブを含む

バッファー溶液を流入することにより、個々のナノチューブ内での光触媒反応をその場観察することに成功した。具体的には、 TiO_2 ナノチューブに紫外光を照射することによって生成したヒドロキシルラジカルと蛍光プローブとの反応によって生成したフルオレセインを超高感度 CCD カメラを用いて単一分子蛍光検出した (図 3A)。

図 3B は蛍光強度の時間変化である。紫外光照射により、蛍光強度の増加が観測された。個々のスパイクが APF と $\cdot\text{OH}$ との反応によって生成したフルオレセインからの蛍光に対応している。 $\cdot\text{OH}$ 捕捉剤である DMSO を添加することで、蛍光強度の増加は著しく抑制された。

また、フルオレセインの分子拡散および細孔における滞在時間の違いから、生成したフルオレセインが TiO_2 ナノチューブのマクロ孔およびメソ孔のどちらに存在しているのかを見分けることができた。その結果、マクロ孔では、メソ孔と比べ、光触媒反応効率が高いことがわかった。これは、基質分子である APF の細孔内分子輸送過程が重要な役割を果たしていることを示している。さらに、フルオレセイン生成の時間・空間分布解析から、 TiO_2 ナノチューブにおける光触媒反応活性が空間的に非常に大きな不均一分布を示すことを見出した。

本手法は、 TiO_2 光触媒のみならず、生体系をはじめ様々な不均一界面における活性酸素種の検出に適応できるため、今後より多くの応用展開が期待される。

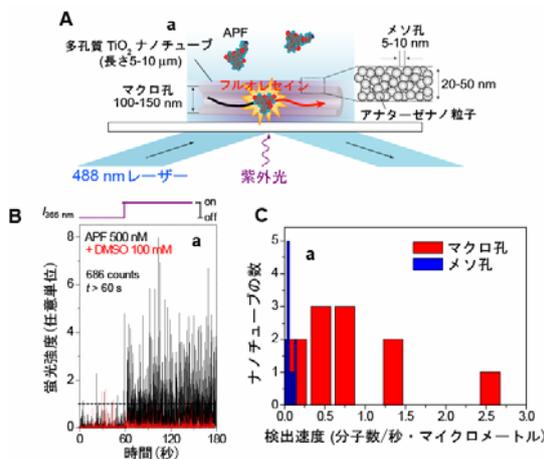


図3. (A) アミノフェニルフルオレセイン (APF) を用いた TiO_2 ナノチューブ内ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) の単一分子検出。(B) 紫外光照射による蛍光強度変化。 $\cdot\text{OH}$ 捕捉剤である DMSO を添加することで、蛍光強度の増加は抑制される。(C) マクロ孔およびメソ孔におけるフルオレセイン検出速度。

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14件)

①K. Naito, T. Tachikawa, M. Fujitsuka, and T. Majima, Single-Molecule Observation of Photocatalytic Reaction in TiO₂ Nanotube: Importance of Molecular Transport through Porous Structures, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**(3), 934-936 (2009).

②K. Naito, T. Tachikawa, M. Fujitsuka, and T. Majima, Real-Time Single-Molecule Imaging of the Spatial and Temporal Distribution of Reactive Oxygen Species with Fluorescent Probes: Applications to TiO₂ Photocatalysts, *J. Phys. Chem. C*, **112**(4), 1048-1059 (2008).

③T. Tachikawa, Y. Asanoi, K. Kawai, S. Tojo, A. Sugimoto, M. Fujitsuka, T. Majima, Photocatalytic Cleavage of Single TiO₂/DNA Nanoconjugates, *Chem. -Eur. J.*, **14**(5), 1492-1498 (2008).

[学会発表] (計6件)

①立川貴士・麻野井祥明・川井清彦・藤塚守・真嶋哲朗、TiO₂-DNA ナノ複合体における光触媒反応の単一分子観測、日本化学会第88春季年会 (2008年3月27日、立教大学池袋キャンパスおよび立教池袋中学校・高等学校)。

②T. Tachikawa, S. Tojo, M. Fujitsuka, T. Sekino, T. Majima, Photoinduced Charge Separation in Titania Nanotubes, The 9th International Symposium on Eco-Materials Processing & Design in conjunction with Core University Program (CUP) Seminar 2008 (January 7-8, 2008, Masan, Korea).

③立川貴士・内藤一也・藤塚守・真嶋哲朗、酸化チタン光触媒表面から拡散した酸素活性種の単一分子検出、2007 光化学討論会 (2007年9月26日、信州大学松本キャンパス)。

[図書] (計1件)

① T. Tachikawa and T. Majima, "Single-Molecule Fluorescence Imaging Techniques for the Detection of Reactive Oxygen Species" in *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*, pp. 651-659, 2007 (FORMATEX, Spain).

[その他]

ホームページ

<http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/mec/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立川 貴士 (TACHIKAWA TAKASHI)
大阪大学・産業科学研究所・助教
研究者番号: 20432437

(2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者

無