

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04831

研究課題名(和文) バイオナノ粒子による炭素材料中の欠陥探査と定量化のための研究

研究課題名(英文) Bionanoparticles for Defect Detection and Quantification in Carbon Materials

研究代表者

岩堀 健治 (Iwahori, Kenji)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：90467689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、炭素材料表面に特異的に結合するペプチド(DS-pep)を選択し、フェリチンタンパク質の外表面に修飾することで、炭素材料表面の欠陥の迅速な検出・定量システムのための欠陥探索バイオナノ粒子(DS-BNP)を作製を行った。DS-BNPのCNT等への結合は透過型電子顕微鏡(TEM)で観察していたが、我々はQCMを用いたより迅速で簡便な結合力を測定する方法を検討した。さらに作製したDS-BNPの空洞内に蛍光CdSナノ粒子を合成に成功し結合状態の可視化への道を開いた。今後、本システムを用いた「炭素材料の欠陥検出・定量化システム」の構築を目指して研究を継続する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではペプチドの特異的な結合能力を活用し、球殻状タンパク質内部に蛍光ナノ粒子を合成することで、炭素表面に結合することができる欠陥探索バイオナノ粒子(DS-BNP)の作製を行った。本研究より得られた知見は、今まで大型装置の使用やサンプル調整に時間と手間が必須であった、炭素材料の形状や欠陥状態の把握が簡単に可視化できるプロセスへの道筋を付けたと考えられる。さらなる研究の推進により、従来の問題であった市販炭素材料の不均一性、欠陥量や形状の多様性から引き起こされていた、特性変化や炭素材料を用いて作製した電子デバイスの性能低下等の原因をより早く解明する事が可能になるはずである。

研究成果の概要(英文)：In this research, we selected peptides that bind specifically to defects or surface of carbon materials (DS-pep) and we modified them to the outer surface of ferritin proteins to fabricate defect-seeking bio-nanoparticles (DS-BNPs) for a rapid detection and quantification system of defects on the surface of carbon materials. Binding of DS-BNPs to carbon surface of CNT had been observed by transmission electron microscopy (TEM), but we investigated a faster and easier method to measure the binding strength of peptides using QCM. Furthermore, fluorescent CdS nanoparticles were successfully synthesized in the cavities of the fabricated DS-BNPs, paving the way for visualization of defects. We are continuing our research to construct a "defect detection and quantification system for carbon materials" using this system.

研究分野：生体機能利用

キーワード：フェリチンタンパク質 カーボンナノチューブ ペプチド ナノ粒子 部位特異的結合

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

現在までカーボンナノチューブ (CNT) やグラフェンに代表される炭素材料はその構造的、電気的な特長である電気伝導度、バンドギャップ特性、高い熱伝導特性、高機械強度、半導体特性等の様々な特性について様々な解明され、また、その特性を有効活用した各種デバイスの作製を目指して多くの研究がなされてきた。さらに、これらの炭素材料は電子デバイスのみならず、触媒、建築、医療、環境関連分野など幅広い分野で活用できるため、欠陥の少ない炭素材料を大量生産するための生産技術やプロセス開発も急速に進められている。

現在、様々な製造方法を用いて、様々な種類の形態と特長を持つ炭素材料が生産されているが、今後の需要増加を見越した生産方法を考慮すると、化学法、CVD 法などが炭素材料を低コストで大量に生産する方法として向いているのではないかと考えもあり、多くの研究成果も存在する。一方、化学法の大きなデメリットの一つとして材料内の欠陥の不均一性があげられる。過酸化水素による酸化剥離過程やヒドラジン水和物による還元過程が含まれ、さらに溶液中での作製ということもあり、反応時に炭素結合を切断された欠陥部分が水素、水酸基、水分子やカルボキシル基等に修飾されやすい。このように生成した炭素欠陥部位が炭素材料の性能やそれらを用いて作製するデバイスの性能を低下させる一つの大きな原因になっていると言われている。

カーボンナノチューブ (CNT) 等の炭素材料を用いて電子デバイスを作製する場合、できるだけ品質が揃った炭素材料を用いて研究や作製を行う事が製品の歩留まり率の上昇や性能を發揮するために非常に重要であるが、大量生産した安価な炭素材料には様々な形状や欠陥を持つ物が混在している事も多く、均一な欠陥状態を持つ炭素材料を大量に揃えるのは困難である。また、炭素材料欠陥の把握には大型装置や多量のサンプルが必要となり、測定のための材料形状の加工等も必要となるため、非常に手間と時間がかかる。このような背景により、炭素材料に存在する欠陥量を簡単に把握する事、均一な欠陥を持つ炭素材料を安価に大量に揃える事はどちらも非常に困難な問題であるのが現状であった。

2. 研究の目的

申請者は現在まで、カーボンナノチューブ等の炭素材料を用いて電子デバイス素子の作製を行ってきたが、購入した市販のカーボンナノチューブのメーカーの違いや製造ロットの違いで材料の特性がばらつくことがありこれを問題視していた。また、ラマンスペクトルや CV 測定等による炭素材料の特性評価や欠陥量の把握を行うためには、大型測定装置が必要で、粉体や針状、綿状等の様々な形状の炭素材料は、シート状や固形状等の測定可能な形状にする必要もあり、測定や材料調整に手間と時間が必要であった。

本研究では、これらの諸問題を解決するため、申請者が今まで研究材料として利用してきた生体バイオ分子の精密な分子認識機能を活用することにより、炭素材料と生体バイオ分子を混ぜるだけで、炭素材料の欠陥状態と欠陥量の測定を、実験室レベルで簡単に実現する事を目的としている。本研究は、炭素材料中の微少な欠陥 (酸化や水酸化等) を、スピーディーにナノメートルオーダーで探査し、定量化を実現する「バイオナノ粒子による炭素材料の欠陥探査、定量システム」の創製を目指すための基礎研究である。

本研究の推進により、炭素材料中の欠陥量や状態の把握が簡単に可能となれば、炭素材料を用いたデバイスの安定化や歩留まりの向上、将来的には欠陥制御による新機能発現、新デバイス創成等にも結びつくと考えられ、本研究で得られる知見は今後、益々重要になると考えられる。

3. 研究の方法

本研究は、下記の研究ステップに従って実施した。

(1)、欠陥認識結合ペプチド DS-pep の作製と欠陥探査バイオナノ粒子 (DS-BNPs) の作製

まず DS-BNPs が炭素材料の欠陥部分 (-CO, -COOH, -OH 基) に選択的に結合するために重要な「欠陥認識結合ペプチド (DS-pep)」を人工合成する。CNT や -CO, -COOH に結合するペプチドは既に数種類が報告されており、また申請者が近年、検討していた CNT 結合ペプチド (8 残基アミノ酸) は、溶液中で超音波破碎した CNT 表面によく結合するため、実は欠陥付近の水酸基に結合しているのではないかと考えている。そこで、まずこれら既存ペプチド (各 8~20 残基) を DS-pep 候補として人工合成する。人工合成された各ペプチドについて、等電点やアミノ酸配列等を整理したライブラリーを作成する。また DS-pep が炭素欠陥部分へ結合状態を直接、透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察する。さらに TEM で観察しやすいように、直径 12 nm 内部に直径 7 nm の空洞を持つ 480kDa の大型球殻状タンパク質の外部表面に遺伝子工学的技術により目的の DS-pep を結合させた DS-BNPs を作成する。

(2)、DS-pep と DS-BNPs の機能測定

上記 (1) で人工合成された各ペプチドに対して、炭素材料表面部分への結合状態を TEM

によって観察し、また結合力を測定するために水晶振動子マイクロバランス (QCM・Quartz Crystal Microbalance) によって炭素材料表面へのペプチドの結合力を測定することで、各結合ペプチドの特性と結合力の違いについてまとめる。QCM 電極は市販のカーボンコート QCM 電極を用いて測定を行い、各候補ペプチドの結合力と電子顕微鏡観察や QCM の解離結合定数等を参考にして、候補ペプチドの違いを明らかにするとともに、欠陥に結合しやすいペプチド、しにくいペプチドをセレクションし、炭素欠陥への結合メカニズムの解明を進める。

(3) 蛍光ナノ粒子への DS-pep の修飾による DS-BNPs 作製と機能測定

DS-BNPs を作製するため、直径 12 nm 内部に直径 7 nm の空洞を持つ球殻状タンパク質であるフェリチンタンパク質内部に、まずは蛍光発光ナノ粒子の一つである CdS ナノ粒子を合成し、フェリチン外部表面に上記でセレクションされた DS-pep を修飾することで炭素欠陥部位に任意的に結合して蛍光発光する DS-DNPs の作製を行う。

4. 研究成果

本研究において特に重要な点は、炭素材料の欠陥部位を認識し結合する欠陥結合ペプチドの取得と性質検討、及びペプチドとナノ粒子を融合した欠陥探索用のバイオナノ粒子 (DS-BNP) の作製である。DS-BNP の作製には欠陥認識ペプチドのセレクションプロセスの確立が非常に重要であるため、まずこの部分を中心に検討を行いながら並行して DS-BNP の作成を進めた。

(1) 欠陥認識結合ペプチド (DS-pep) の作製と欠陥探索バイオナノ粒子 (DS-BNPs) の作製

DS-BNPs が炭素材料の欠陥部分 (-CO, -COOH, -OH 基等) に選択的に結合するために最も重要な「欠陥認識結合ペプチド (DS-pep)」を人工合成した。カーボンナノチューブ (CNT) 表面や -CO, -COOH に結合するペプチドは既に数種類報告されており、また申請者が近年取得した新規 CNT 結合ペプチド (8 残基アミノ酸) は、今までの実験より溶液中で超音波破碎した CNT 表面によく結合する様子が観察されるため欠陥付近の水酸基等に結合している可能性が考えられている。そこで、まず、これらの既存ペプチド (各 8~20 残基) 数種類の大量合成を行い、各ペプチド鎖を DS-pep 候補ペプチドサンプルとした。

(2) 透過型電子顕微鏡 (TEM) による作製したペプチドの結合状態の観察と結合力測定

次に作製した候補ペプチドに関して、デバイス作製に利用されている炭素材料の一つであり、特性や形状、合成、加工等の研究も詳細に行われているカーボンナノチューブ (CNT) に対してどのように結合しているのかを透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察し、候補ペプチドと CNT との結合状態の観察と比較を行った。TEM による CNT の観察条件や染色法、サンプル作製条件等は既に決定済であったので、まず、これらの方法に従い TEM 観察用の親水化したカーボングリッド (Cu メッシュ; 応研商事) 上に CNT をのせ、酸化タングステンからなる染色剤を添加して染色後、数回洗浄し TEM で観察したところ、きれいに観察することができた。

次に CNT と候補ペプチドの結合状態を観察するために、CNT に界面活性剤を添加し超音波処理をした溶液中に候補ペプチドを一定量ずつ混合、懸濁することで CNT とペプチドを結合させたサンプルを作成し、同様に TEM で観察した。その結果 CNT の周りに白くもやもやしたものが多数観察された。これは大量の候補ペプチドに覆われた CNT と考えられたため、再度、洗浄し染色後、観察したが非常に観察しにくく、候補ペプチドと CNT が結合しているのかあるいは集合しているだけなのかの判断が難しく、結合状態を詳細に観察することが困難であった。

(3) QCM を用いた炭素材料表面と DS-pep の結合力の測定

そこで CNT と候補ペプチドの結合状態の TEM による観察と並行して、候補ペプチドの炭素材料表面への結合力を測定するために、水晶振動子マイクロバランス (QCM) を用いて測定を行った。以前 QCM の Au 電極を用いて、球殻状タンパク質 (フェリチンタンパク質等) の結合力測定を行った経験があり、QCM による測定技術に関しては全く問題はなかったが、今回の実験には通常の QCM 測定で用いられている汎用 Au 電極ではなく、電極表面に炭素材料を積層した市販品のカーボン電極を利用することで炭素材料表面への結合力を測定する予定であった。しかし残念ながら本研究課題を始めて間もなく、このカーボン電極の製造、販売が中止となってしまい手に入れることができなくなった。そこで、研究協力者のお力を借り、通常の Au 電極表面上に炭素を蒸着する方法で炭素材料電極 (C-QCM 電極) を作製し、これを用いて候補ペプチドの結合力を測定することとした。

電極表面上へのカーボン蒸着条件の検討や完成した C-QCM 電極の振動数の安定性試験などを行い、C-QCM 電極を作成するプロセスが確立し、これにより QCM による候補ペプチドの結合力を測定する事が可能となった (*Biophysica*, 2024, *in press*)。

次に、候補ペプチド中で申請者が最も可能性が高いと考えており、合成が安易な候補ペプチド (A-pep8) について QCM による結合力の測定を行った。ウエル型セルを使用したバッチ法及びフローセルを使用したフロー法、それぞれの方法で、まず Au 電極を用いて、合成したペプチドを緩衝液等を満たしたセル内に添加して振動数変化を測定したが、ほとんど変化がみられず Frequency の値は数 Hz 以下となった。測定時の温度制御や微振動などの影響もあり、またペプチド鎖が短く (8 残基) 合成したペプチド量では測定には足りないこと等もあり、本機 (QCM 934, SEIKO EG&G) ではペプチド単体での測定が難しいことが明らかになった。

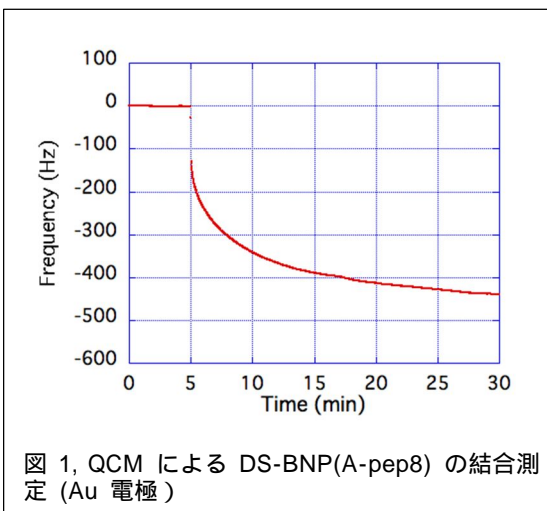


図 1, QCM による DS-BNP(A-pep8) の結合測定 (Au 電極)

(4), DS-BNPs の作製と性質検討

QCM による DS-pep の結合力の測定には大量のペプチドが必要な事が明らかになったため、先に DS-BNP の作製を行い、これを利用して結合状態の観察や結合力の測定をすることにしました。申請者が長年研究を行ってきた分子量 480 kDa の球殻状タンパク質の外側表面に DS-pep を遺伝子工学的に修飾することで DS-BNP を作製し、この DS-pep を保持する DS-BNP の吸着力を QCM の振動数変化で測定する。具体的には、フェリチンタンパク質の L-サブユニットをコードする遺伝子の 5' 末端側に A-pep8 の遺伝子配列を結合したベクタープラスミドを作製し、これを大腸菌内で大量発現させることでフェリチンの外殻に 24 本の A-pep8 が修飾された DS-BNP(A-pep8) の作製を行った。大量発現させた DS-BNP(A-pep8) はイオン交換クロマトグラフィ (Sephacryl S-300, SIGMA Aldrich) とゲル濾過カラム (SWG4, 東ソー) によって精製したものを DS-BNP(A-pep8) サンプルとして QCM 測定を行った。その結果、Au 電極とフローセルを用いた QCM 測定により約 440Hz の振動数変化を測定することができた。ペプチドを球殻状タンパク質に修飾して質量を増加させることで QCM によるペプチドの結合測定方法が確立した(図 1)。

(5), DS-BNPs への蛍光発光ナノ粒子の合成と観察

(4) で作製した DS-BNPs の炭素材料への結合量を見積もるために、フェリチンタンパク質内部空洞部分に蛍光ナノ粒子の合成を行った。まずは DS-BNP(A-pep8) に対して化合物半導体である CdS ナノ粒子の合成を行った。フェリチンへの CdS ナノ粒子の合成は、以前から市販フェリチン等で既に合成条件が検討済みであったため、この条件を参考にして作製した。当初 DS-BNP(A-pep8) はタンパク質の N 末端側 (タンパク質外殻部) に 24 本の DS-pep がつきた構造となっているため、CdS ナノ粒子の合成が難しいかもしれないと思われていたが、溶液条件等を詳細に検討することにより DS-pep が修飾されたフェリチンタンパク質内にも CdS ナノ粒子の合成に成功した (図 2)。ただ、CdS の蛍光発光測定をおこなったが、蛍光発光がかなり弱いという問題が浮上し、現在は、合成条件や組成等を変えてこの蛍光強度を上昇させる工夫をするともに、市販の蛍光ナノ粒子に DS-pep を化学修飾することで DS-BNPs を作成する方法も別途検討している。

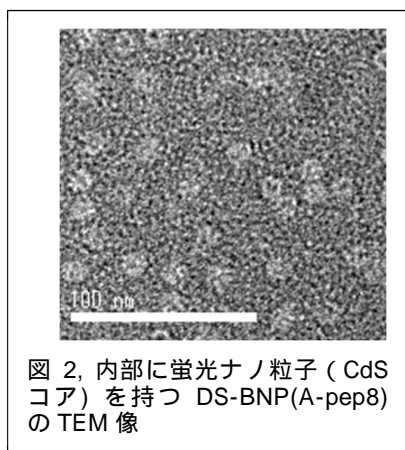


図 2, 内部に蛍光ナノ粒子 (CdS コア) を持つ DS-BNP(A-pep8) の TEM 像

まとめ

今回、本研究で実施した炭素材料表面に結合する候補ペプチドのセレクションと合成については、元々、炭素に結合するペプチドが幾つか報告されていたことや、申請者の以前の実験においても可能性のあるペプチド配列を検討していたため問題なく実施できた。しかし、カーボン表面とのペプチドの結合状態の測定を行うにあたり、使用予定であった市販品のカーボン QCM 電極の製造、販売が中止されてしまったことは想定外であった。再度カーボン電極の作製を行う必要性が生じ大変時間と手間がかかったが、研究協力者のお力添えでカーボン電極を作製するプロセスが構築され、これを用いて実際に QCM で候補ペプチドの結合力を測定することができるようになった。この QCM によるペプチドの結合力測定方法は、電子顕微鏡による観察よりも短時間で実施可能で解離結合定数等も算出できるので、ペプチドのスクリーニングや結合力評価の精度や速度が大幅に向上するはずである。

また、各候補ペプチドのみで QCM 結合力測定を行う事ができれば、非常に簡単に精密なペプチドスクリーニングを実施できるが、低分子量のポリペプチドでは共鳴振動数が非常に低くなるため測定が困難であり、ペプチドの大量合成には手間と費用がかかるため、直径 12 nm のフェリチンタンパク質外部表面に候補ペプチドを修飾した DS-BNP を先に作製し、これを測定サンプルとして QCM 測定することで安定した振動数変化を観察することができるようになった。また作製した DS-BNP(A-pep8) の内部に蛍光ナノ粒子を化学合成することができ、欠陥探査バイオナノ粒子(DS-BNPs)の原型の作製に成功した。

今回、ペプチドと炭素材料との結合力を測定するプロセスが構築されたので、このシステムを活用し、TEM 観察とも併用しながら、候補ペプチドのアミノ酸配列を変化させたものもデザインし、候補ペプチドの結合の違いや結合力、結合部位の違い等についてさらに検討を重ねていく予定である。また、残念ながら DS-BNP 中に作製した CdS 蛍光ナノ粒子の蛍光強度が低いという問題がまだ残っているため、このナノ粒子の蛍光強度を上昇させるとともに、フェリチン以外の市販の蛍光ナノ粒子等への DS-pep の修飾、あるいは金ナノ粒子のプラズモン利用等も検討し、より簡便に精度よく検出できるためのマーカの検討も進めていく予定である。

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 1件）

1. 著者名 Narangerel Ganbaatar, Ting-Chieh Chu, Naofumi Okamoto, Kenji Iwahori, Masakazu Nakamura and Ichiro Yamashita	4. 巻 4
2. 論文標題 Enhanced Adsorption of Cage-Shaped Proteins on Carbon Surfaces by Carbon Nanotube (CNT)-Binding Peptide Aptamers	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 biophysica	6. 最初と最後の頁 256-266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biophysica4020018	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0件

〔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
研究協力者	山下 一郎 (Yamashita Ichiro)	大阪大学・工学研究科・特任教授 (14401)	

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