

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23241039

研究課題名(和文) 制御されたカーボンナノ空間における生体分子の挙動の解明とナノバイオ材料への応用

研究課題名(英文) Investigation of the behavior of biomolecules in the controlled carbon nanospace and application for the bio-nanomaterials

研究代表者

京谷 隆 (Kyotani, Takashi)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：90153238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,600,000円

研究成果の概要(和文)：ナノ空間における生体分子の挙動を解明することで、その特長的な機能を利用したナノバイオ材料への応用を試みた。規則的なナノチャンネルを持つアルミニウム陽極酸化(AAO)膜に炭素被覆することで作製したカーボンナノ試験管(CNTTs)は、そのナノ空間内に核酸を高濃度に濃縮し、かつ再放出できるナノカプセルになることが示された。アルツハイマー病の原因物質となるアミロイド $\beta$ はCNTTsの添加によって線維化が抑制されることが確認された。炭素被覆したAAO膜のナノ空間内に酸化還元酵素を固定化することで酵素電極が作製され、糖と酸素と反応する電極を組み合わせることでバイオ燃料電池として動作することが示された。

研究成果の概要(英文)：The unique behavior of the biomolecules in the carbon nanospace was investigated, and the application for the bio-nanomaterials was attempted. Carbon nano-test-tubes (CNTTs) were obtained from the carbon-coated aluminum anodic oxidized (CAA0) film which has uniform and tubular nanochannels by the removal of the alumina template. Nucleotide molecules were highly concentrated into the inner nanospace of the CNTTs, and the nucleotide could be released. The observed properties are useful as a nanostorage medium for application of the gene delivery. Fibrillation of the amyloid  $\beta$  peptides (A $\beta$ ) which is a cause of Alzheimer disease was inhibited by adding the CNTTs. Redox enzymes immobilized into the carbon nanospace of the CAA0 film react with fructose or oxygen and the electrons were directly transported in the CAA0 nanochannels. It could be used as an enzymatic electrode. We indeed confirmed that a bio-fuel cell fabricated from the electrodes can work very well.

研究分野：炭素材料

キーワード：ナノ材料 ナノチューブ・フラーレン ナノバイオ 炭素 薬物輸送 酵素電極

## 1. 研究開始当初の背景

ナノ粒子・ナノチューブなどのナノ材料は、遺伝子や薬物の輸送担体、ウィルス検出のための核酸抽出と分離、バイオセンサーなど様々なバイオ応用研究で使用されている。これはナノ材料によって形成されるナノ空間で生体分子がマクロでは見せない特異な挙動を示すためである。したがって、ナノ空間材料と生体分子との相互作用を明らかにできれば、有用な機能性ナノバイオデバイスの開発に繋がり、バイオテクノロジーの進展に大きく貢献する。

しかし、ナノ空間材料と生体分子との相互作用を体系的に調べた研究はほとんどない。これはひとえに適切な材料が今までなかったためである。たとえば代表的なナノ空間材料であるカーボンナノチューブは、精密なサイズ制御が困難な上、両端が閉じており、さらに内部の空間は巨大な生体分子を導入するには小さすぎ、かつ水分散性が低く、適切な材料とは言えない。

規則的かつ細孔径の揃ったナノチャネルを持つアルミニウム陽極酸化(AAO)膜は規則的なナノ細孔を持ち、かつ細孔径と長さを精密に制御することができる。また AAO 膜表面に炭素被覆を施すことでナノ空間サイズが精密制御されたカーボンナノチューブを調製できる。このようにして形成されたカーボンナノ空間は生体分子を導入し、その挙動を観察するのに適しており、更にバイオ分子の機能性を活かしたデバイス応用に用いるためのプラットフォームとして有望である。

## 2. 研究の目的

炭素被覆アルミニウム陽極酸化(CAAO)膜を用いることで、制御されたナノ空間における生体分子の挙動を明らかにし、この性質を生かした高機能ナノバイオ材料を創製する。

本研究では、生体分子として核酸、アミロイドタンパク質、酸化還元酵素を用いて、これらのカーボンナノ空間における特異な挙動を調べるとともに、その応用展開について検討を行う。

### (1)カーボンナノ試験管への核酸濃縮

CAAO 膜からアルミナを除去することで水分散性のカーボンナノ試験管(CNTTs)を得ることができる。CNTTs は内径 25 nm のチューブ状のナノ空間を持つことから、核酸を導入することで遺伝子輸送などの応用が期待できる。そこで本研究では CNTTs 内への核酸の導入とその挙動について調べた。

### (2)CNTTs によるアミロイド線維化の抑制

アミロイド  $\beta$ (A $\beta$ )はアルツハイマー病の原因となるアミロイド線維形成の原因物質として知られている。本研究では、CNTTs のナノ空間への A $\beta$  の内包とそれに伴うアミロイ

ド線維化抑制を試みた。

### (3)CAAO 膜を用いた酵素電極の開発

酵素を触媒として利用するバイオ燃料電池は、コンパクトかつ低環境負荷で安全なエネルギーデバイスとして注目を集めている。

そこで、規則的に垂直配向したナノ細孔を持つ CAAO 膜に二種類の酸化還元酵素、フルクトースデヒドロゲナーゼ(FDH)及びピリルビンオキシダーゼ(BOD)を固定化することで酵素電極を作製し、バイオ燃料電池への応用を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1)カーボンナノ試験管への核酸濃縮

アルミニウム基板を陽極酸化することで内径 35 nm の規則細孔構造を持つ AAO 膜を作製し、アセチレン CVD により炭素被覆した。その後、AAO 膜をアルカリで溶解除去することで、内部にナノ空間を持つ水分散性のカーボンナノ試験管(CNTTs)を回収した。ナノ空間内に導入する核酸として、チミン 20 量体(T20 : 20 塩基)、AGCT の回文配列を持つ 20 量体(AGCT20 : 20 塩基対)、プラスミド DNA(pDNA : 7000 塩基対)の 3 種類を用いた。CNTTs ナノ空間内への核酸導入は透過型電子顕微鏡(TEM)観察により行い、濃縮量は核酸の吸収波長による濃度変化から測定した。

### (2)CNTTs によるアミロイド線維化の抑制

(1)と同様の方法で作製したCNTTsを、A $\beta$ を溶解させたリン酸緩衝液(pH 7.4, A $\beta$ 濃度 : 113  $\mu$ g/mL)中にチオフラビンT(ThT)とともに混合し、ThT蛍光分析とTEM観察によりアミロイド線維化量を調べた。更に、CNTTsに吸着されたA $\beta$ 量を昇温脱離(TPD)法による定量分析を行った。

### (3)CAAO 膜を用いた酵素電極の開発

細孔径 50 nm、厚さ 70  $\mu$ m の貫通孔を持つ 1 $\times$ 1 cm<sup>2</sup>の AAO 膜をアセトニトリル CVD により窒素原子を含むナノ炭素膜で均一に被覆した。得られた CAAO 膜を電極として +0.6 ~ 0.65 V 印可し、負に帯電させた酵素を電気泳動によってナノ細孔内へ誘導させる方法を用いた。FDH は反応基質であるフルクトースを加えることで酵素反応を起こすことで負に帯電させた。BOD は溶液を BOD の等電点 4.1 よりも高い pH5.0 にすることで負に帯電させた。酵素固定化後の電極は三極式セルを用いた電気化学測定によって評価した。

## 4. 研究成果

### (1)カーボンナノ試験管への核酸濃縮

TEM観察により、CNTTsは厚さ5 nmの炭素壁と内径25 nmの均一なナノ空間を持つチューブ状の構造を持っていることが確認された(図1(a))。

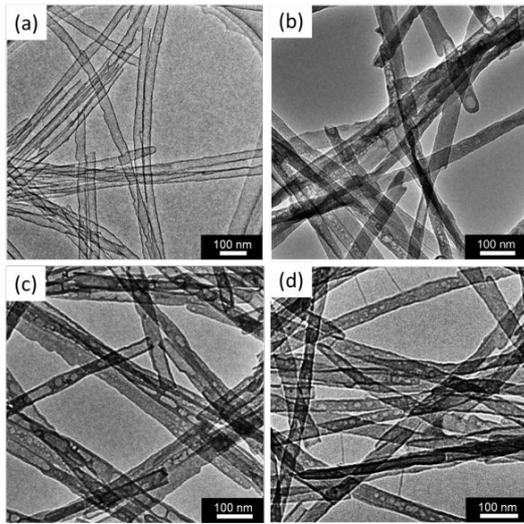


図1 核酸浸漬前後のCNTTsのTEM像。  
(a)：核酸浸漬前(b)：T20、(c)：AGCT20、  
(d)：pDNA

CNTTsを塩化カルシウムが添加されたT20、AGCT20、pDNA各水溶液(およそ50 μg/mL)に分散し、2時間浸漬させた後のTEM像をそれぞれ図1(b),(c),(d)に示す。CNTTsのナノ空間内にそれぞれの核酸物質が充填されている様子が確認できた。吸光度から測定したCNTTs重量あたりのT20、AGCT20、pDNAの吸着量はそれぞれ101.3、106.2、109.8 mg/gであった。これらの3種類の核酸は構造が異なるにもかかわらずCNTTsのナノ空間内への吸着挙動はあまり大きな違いが無いことが分かる。TEM像の観察から核酸は外表面の吸着はあまり見られず、内部のナノ空間内に集中しているように見える。そこで、吸着された核酸が全てナノ空間内に存在すると仮定すると、原液の核酸濃度の4000倍以上に濃縮されている計算になる。

CNTTsのナノ空間内への核酸吸着量(T20)の時間変化を図2に示す。浸漬5 minの段階で急速に吸着し、120 minでほぼ平衡に達して

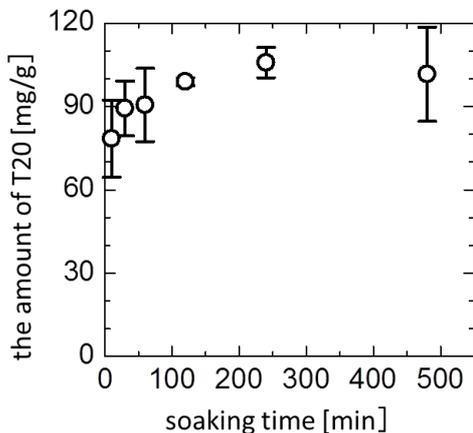


図2 CNTTs添加後のT20の吸着量の時間変化

いることが分かる。このことから、核酸のCNTTsナノ空間内への濃縮は短時間の間に急激に起きていることが分かる。

T20を吸着させたCNTTsは、脱イオン水中に浸漬させることで一部が放出された。例えば、脱イオン水に240 min浸漬後CNTTsから放出されたT20の比率は57%であった。このことから、濃縮された核酸はナノ空間の外に取り出すことができることが示された。一方、脱イオン水中へ放出されなかった核酸はCNTTsの炭素表面上に疎水性相互作用あるいはπ電子相互作用により強く吸着されているものと考えられる。

以上の結果から、CNTTsの内部ナノ空間は核酸を貯蔵できるナノケージとなることが分かった。ナノ空間における核酸の濃縮は、遺伝子輸送担体などの応用が期待できるだけでなく、生体内で起きる核酸のパッケージングのメカニズムを模擬した現象としても興味深い結果であると考えられる。

## (2)CNTTsによるアミロイド線維化の抑制

Aβを溶解させたリン酸緩衝液を2日間静置後、溶液内の形成物をTEMで観察したところ、図3(a)のような無数のアミロイド線維の形成が観察された。一方、Aβ溶液1 mLの中に300 μgのCNTTsを添加後3日間静置したあとのTEM

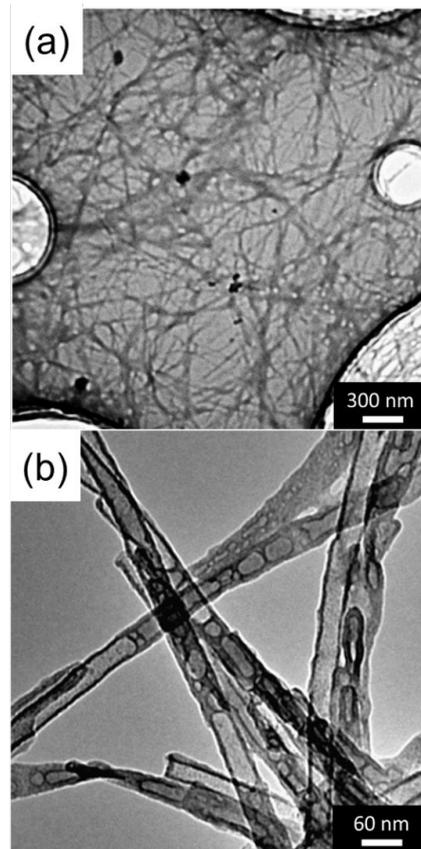


図3 静置2日後のAβ溶液内に形成したアミロイド線維(a)及びCNTTs添加後静置3日間のAβ溶液のTEM像

像では線維形成が観察されなかった。また、CNTTsのナノ空間内部にはAβが内包されていることも確認された(図3(b))。

ThT蛍光分析により、CNTTs添加後のアミロイド線維形成の時間変化を図4に示す。CNTTs無添加のAβ溶液では浸漬2日間の間で急激な蛍光強度の増加があり、線維化の形成が進んでいることが分かる。一方、CNTTsを30 μg添加したAβ溶液では、浸漬2日までは傾向強度の増加は見られず、3日後に上昇が確認された。更に300 μg添加したAβ溶液では、浸漬5日後も傾向強度の増加は見られなかった。以上の結果から、CNTTsの添加により、アミロイド線維の形成が抑制されることが示された。

図5にTPD-MASSプロファイルを示す。Aβはタンパク質の熱分解により700~800付近でHCNガスのピークが確認された。発生したHCN量からCNTTsに吸着したAβ量を計算したところ、1 mLのAβ溶液から300 μgのCNTTsに吸着されたAβ量は24%となった。この24%のろ過により分離したろ液を1日間静置した後、溶液中の形成物をTEMで観察する

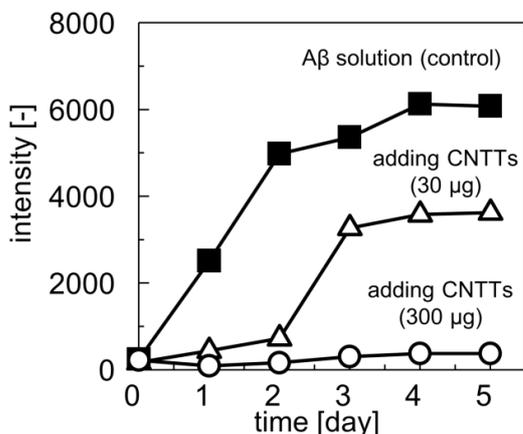


図4 CNTTs添加後のAβ溶液のThT蛍光強度の時間変化

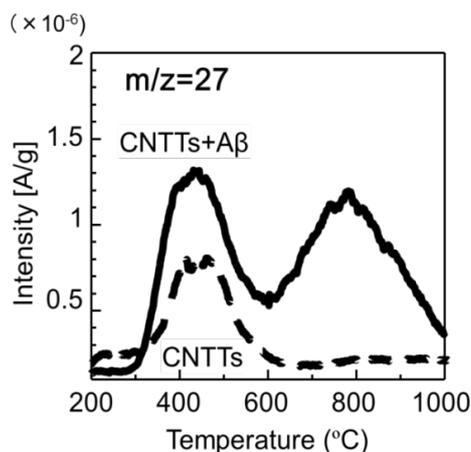


図5 CNTTs及びAβ吸着後のCNTTsのTPD-MASSプロファイル

と、無数の繊維状形成物が確認された。このことから、Aβの線維化抑制は単なるAβのCNTTsへの吸着による濃度低下ではなく、溶液中にCNTTsが存在することによる効果であると考えられる。

以上により、CNTTsが存在することでAβの線維化が抑制されることが確認できた。これはアミロイド線維形成メカニズムを考える上で興味深い現象であり、アルツハイマー病の治療への応用に役立つ知見になると考えられる。

### (3) CAAO膜を用いた酵素電極の開発

図6(a)にFDHを固定化した電極、図6(b)にBODを固定化した電極のサイクリックボルタノグラム(CV)曲線を示す。FDH電極はフルクトース導入後に0.6Vにかけて正の電流強度が上昇し、またBOD電極では酸素バブリングに伴い10V付近で負の電流が流れることが確認された。このことから、CAAOに固定化された各酵素は、バイオ燃料である糖あるいは酸素の基質と反応し、更に炭素膜の集電体への直接電子移動が起きていることが示された。

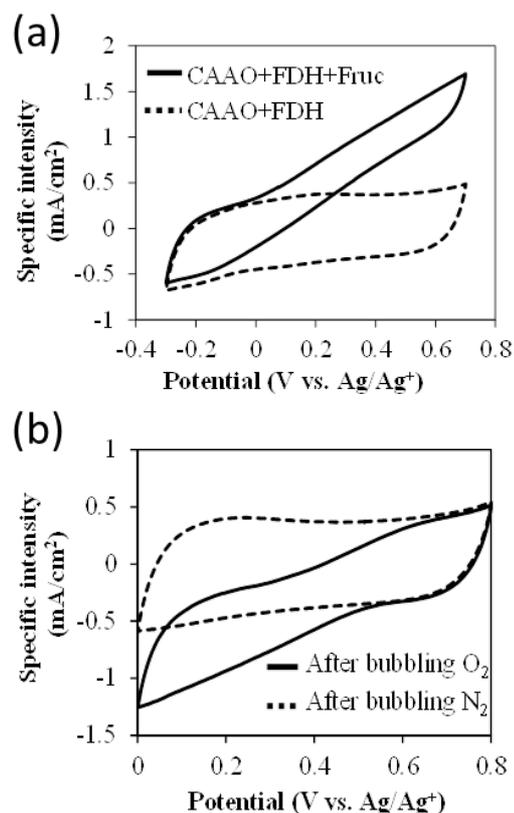


図6 CAAOに酵素を固定化して作製した電極のCV曲線。(a):FDH(アノード)、(b)BOD(カソード)

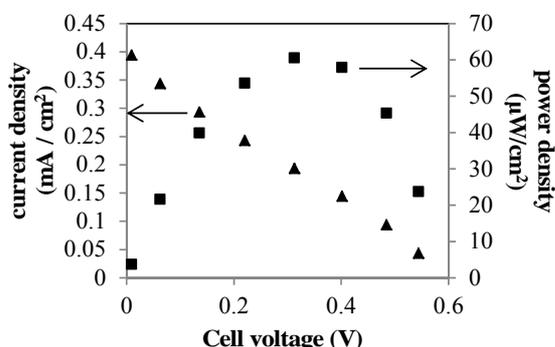


図7 FDH 固定化電極とBOD 固定化電極を組み合わせて作製したバイオ燃料電池の性能評価

次にFDH固定化電極(アノード)及びBOD固定化電極(カソード)を組み合わせて作製した燃料電池の性能を評価した。図7より、酸素を飽和させた200 mM フルクトース溶液中で、0.3 V付近で最大の電流出力(60  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ )を示し、電池として作動することが確認できた。

以上により、CAAOのナノ空間内に酸化還元酵素の固定化することで酵素電極の作製に成功した。CAAOのナノチャンネルの規則構造はバイオ燃料の物質拡散性の優れており、最適なナノ空間を設計することで更なる性能の向上が見込まれ、このような酵素電極を用いることで高性能なバイオ燃料電池への開発が期待できる。

#### 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4件)

1. Takafumi Ishii, Susumu Kashihara, Yasuto Hoshikawa, Jun-ichi Ozaki, Naokatsu Kannari, Kazuyuki Takai, Toshiaki Enoki, Takashi Kyotani, A quantitative analysis of carbon edge sites and an estimation of graphene sheet size in high-temperature treated, non-porous carbons, Carbon, 査読有, 80, 2014, 135-145, DOI:10.1016/j.carbon.2014.08.048
2. Shigeru Kaida, Jun Matsui, Takuya Sagae, Yasuto Hoshikawa, Takashi Kyotani, Tokuji Miyashita, The production of large scale ultrathin aligned CNT films by combining AC electric field with liquid flow, Carbon, 査読有, 59, 2013, 503-511, DOI:10.1016/j.carbon.2013.03.046
3. Tetsuji Itoh, Yasuto Hoshikawa, Shun-ichi Matsuura, Junko Mizuguchi, Hiroyuki Arafune, Taka-aki Hanaoka, Fujio Mizukami, Akari Hayashi, Hiroto Nishihara, Takashi

Kyotani, Production of l-theanine using glutaminase encapsulated in carbon-coated mesoporous silica with high pH stability, Biochemical Engineering Journal, 査読有, 68, 2012, 207-214, DOI: 10.1016/j.bej.2012.07.012

4. 京谷隆, 西原洋知, 干川康人, カーボンのナノ構造制御と機能化、マテリアルインテグレーション、査読無し、24 巻、2011、pp.234-241, [http://www.tic-mi.com/publ/book.cgi?pg\\_1104](http://www.tic-mi.com/publ/book.cgi?pg_1104)

〔学会発表〕(計 36 件)

1. Alberto Castro-Muñiz, Yasuto Hoshikawa, Takashi Kyotani 他, Uniform coating of N-doped carbon on pore walls in mesoporous silica for electrochemical applications、第 41 回炭素材料学会年会、2014.12.8-2014.12.10、大野城まどかぴあ(福岡・大野)
2. 多和田華子, 干川康人, 京谷隆 他, 精製ラッカーゼを担持した炭素被覆アルミニウム陽極酸化皮膜による酵素電極の作製と評価、第 41 回炭素材料学会年会、2014.12.8-2014.12.10、大野城まどかぴあ(福岡・大野)
3. 石井孝文, 干川康人, 京谷隆 他, 黒鉛及び高温処理炭素のエッジ面の分析に基づく構造解析とその応用、平成 26 年度化学系学協会東北大会、2014.9.20-2014.9.21、山形大学(山形・米沢)
4. 干川康人, 京谷隆 他, 水分散性カーボンナノ試験管を用いたアミロイドの線維化抑制、日本セラミックス協会第 27 回秋季シンポジウム、2014.9.9-2014.9.11、鹿児島大学(鹿児島)
5. 京谷隆、炭素被覆無機ナノ多孔体の合成とその応用(招待)、第 113 回黒鉛化合物研究会、2014.10.3、京都
6. Alberto Castro-Muñiz, Yasuto Hoshikawa, Takashi Kyotani et al., A carbon-coated film with parallel and straight nanochannels as a biofuel cell electrode, International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, 2013.9.28-2013.9.30, Sendai(Japan)
7. 石井孝文, 干川康人, 京谷隆 他, 高温処理炭素のエッジ面の分析とそれによる炭素構造の解析(招待)、第 52 回炭素材料夏季セミナー、2014.8.25-2014.8.26、仙台
8. 京谷隆、炭素材料研究の醍醐味と面白さ(招待)、第 52 回炭素材料夏季セミナー、2014.8.25-2014.8.26、仙台
9. Yasuto Hoshikawa, Takashi Kyotani et al., Inhibition Effect of Carbon Nano-Test-Tubes on Amyloid Fibrillation, CARBON2014, 2014.6.29-2014.7.4, Jeju (Korea)
10. Alberto Castro-Muniz, Yasuto Hoshikawa,

- Takashi Kyotani et al., Carbon-Coated Alumina Films with Parallel Nanochannels as Enzymatic Bio-Electrodes, CARBON2014, 2014.6.29-2014.7.4, Jeju (Korea)
11. 後藤圭司, 干川康人, 京谷 隆 他、カーボンナノ試験管に吸着したアミロイドの定量化と線維化抑制機構の解明、第40回炭素材料学会年会、2013.12.3-2013.12.5、京都
  12. A. Castro-Muñoz, Y. Hoshikawa, T. Kyotani 他、Carbon-coated alumina film with a parallel array of straight nanochannels as enzymatic biofuel cell electrodes、第40回炭素材料学会年会、2013.12.3-2013.12.5、京都
  13. 京谷 隆、鋳型カーボン材料と電気化学デバイスへの応用(招待)、第12回燃料電池基盤技術研究懇話会、2013.8.23、静岡(富士)
  14. 京谷 隆、鋳型炭素 -構造制御と機能-(招待)、日本化学会関東支部 講演会「ナノ炭素材料」、2013.8.21、東京
  15. Yasuto Hoshikawa, Takashi Kyotani et al., Preparation of Enzymatic Biofuel-Cell Electrodes from a Carbon-Coated Alumina Film with Straight Nanochannels, CARBON2013, 2013.7.14-2013.7.19, Rio de Janeiro (Brazil)
  16. 込山 拓, 干川康人, 京谷 隆 他、垂直配向した炭素ナノ細孔を用いた酵素電極の作製とバイオ燃料電池への応用、第39回炭素材料学会年会、2012.11.28 ~ 2012.11.30、長野市生涯学習センター(長野)
  17. 後藤圭司, 干川 康人, 京谷 隆 他、カーボンナノ試験管のナノ空間を利用したアミロイド線維化の抑制と促進、第39回炭素材料学会年会、2012.11.28 ~ 2012.11.30、長野市生涯学習センター(長野)
  18. Takashi Kyotani, Templated carbons-structures, properties and applications, the 10th China-Japan-Korea Joint Symposium on Carbon Materials (CSE12) (招待講演)、2012.11.23 ~ 2012.11.26, Guangzhou(China)
  19. Alberto Castro-Miniz, Yasuto Hoshikawa, Takashi Kyotani et al., Carbon-coated anodic aluminum oxide films as direct electron transfer electrodes for biofuel cells, Carbon2012, 2012.06.17 ~ 2012.06.22, Krakow (Poland)
  20. Yasuto Hoshikawa, Takashi Kyotani et al., DNA introduction into carbon nano-test-tubes -Effect of polynucleotide size and sequence-, IACIS2012 (International Association of Colloid and Interface Scientists 2012), 2012.05.13. ~ 2012.05.18, Sendai (Japan)
  21. Yasuto Hoshikawa, Takashi Kyotani et al., Introduction of DNA molecules into carbon nano-test-tubes -effect of base sequence and conformation- (招待)、CARBON2011, 2011.7.25-2011.7.29, Shanghai (China)
  22. 中山 航, 干川康人, 京谷 隆 他、炭素被覆したアルミニウム陽極酸化被膜を使用した直接電子移動型酵素電極の作製および評価、第38回炭素材料学会年会、2011.11.29-2011.12.1、名古屋大学(名古屋)
  23. 寒河江拓也, 干川康人, 京谷 隆 他、プラスミドDNA と mRNA のカーボンナノ試験管への導入と遺伝子輸送への応用、第38回炭素材料学会年会、2011.11.29-2011.12.1、名古屋大学(名古屋)
  24. 干川康人, 京谷 隆 他、酸素あるいは窒素ドーピングしたカーボンナノ試験管へのDNA 導入と放出、第63回コロイドおよび界面化学討論、2011.9.7-2011.9.、京都大学吉田キャンパス(京都)
- 他 12 件
- 〔図書〕(計 1 件)
1. 京谷 隆, 折笠広典, 西原洋知, 干川康人 他、株式会社国際文献社、カーボン材料実験技術(製造・合成編)-クラシックカーボンからナノカーボンまで-, 2013、pp 126-134
- 〔産業財産権〕
- 出願状況(計 0 件)
- 〔その他〕
- 東北大学多元物質科学研究所京谷研究室  
<http://www.tagen.tohoku.ac.jp/labo/kyotani/>
- ## 6 . 研究組織
- (1)研究代表者  
 京谷 隆 (KYOTANI, Takashi)  
 東北大学・多元物質科学研究所・教授  
 研究者番号：90153238
  - (2)研究分担者  
 干川 康人 (HOSHIKAWA, Yasuto)  
 東北大学・多元物質科学研究所・助教  
 研究者番号：90527839