

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 17 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24750072

研究課題名(和文)自己発光型無機ナノシート/酵素複合体による高精度バイオイメージング法の創製

研究課題名(英文)Development of self-luminescent inorganic nanosheet/enzyme complex for bioimaging

研究代表者

宗 伸明(SOH, Nobuaki)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：90336008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、蛍光性を付与した無機ナノシートと酵素から成るハイブリッド材料、及び蛍光物質と無蛍光性無機ナノシートと酵素から成る三元型ハイブリッド材料を開発し、そのイメージング用材料としての性能を検討した。まず、ユウロピウムを含有するチタン酸無機ナノシートを合成し、ユウロピウム含有量が増大するに従い、蛍光強度が増大することを確認した。また、蛍光ビーズ/西洋ワサビペルオキシダーゼ/チタン酸無機ナノシートの複合体を作製し、この複合体に対して化学発光基質であるルミノール誘導体を利用することで、期待した化学発光共鳴エネルギー移動現象に由来する蛍光を観測することができた。

研究成果の概要(英文)：Novel hybrid materials ((i) a hybrid material composed of fluorescent inorganic nanosheet and enzyme (ii) a hybrid material composed of fluorescent compound, non-fluorescent inorganic nanosheet, and enzyme) were developed for imaging application. Europium-doped layered titanates show fluorescent properties and the fluorescence intensity increased with an increase in the concentration of doped europium. Fluorescence derived from chemiluminescent resonance energy transfer (CRET) was observed when luminol derivative was applied to a hybrid material composed of fluorescent beads, horseradish peroxidase (HRP), layered titanates.

研究分野：分析化学

キーワード：無機ナノシート 酵素 発光 蛍光 バイオ材料

1. 研究開始当初の背景

バイオイメージング技術は、生きた細胞や生物個体に関する時空間的な情報を得ることができる魅力的な分析法である。特に蛍光現象を利用した蛍光イメージング法は、細胞等の微小領域、あるいは細胞内における生体分子の動的挙動に関する詳細な理解の促進に貢献するため、近年、大きな注目を集めている。2008年のノーベル賞が、緑色蛍光タンパク質 GFP の発見と開発に対する貢献により、下村脩博士、Martin Chalfie 博士、Roger Tsien 博士の3名に授与されたことは記憶に新しい。現在では、蛍光タンパク質あるいは有機化合物を主構造とした各種生体分子計測用センサー(蛍光プローブ)の開発が盛んに行われている。これまでに、カルシウムイオンや亜鉛イオンなどの金属イオンに加え、各種活性酸素種などを計測対象とした蛍光プローブなどが数多く開発され、生物機能の解析に応用されてきた。しかしながら、このように有用性が実証されている蛍光イメージング法においても、難点は存在する。その重要な点の一つが、通常の蛍光イメージング法は原理的に外部からの励起光を必要とする、という点である。このため、測定には外部光励起と最終的にこの励起光を除去して蛍光のみを選別する仕組みが必要であり、結果、例えば細胞測定の際には複雑な蛍光顕微鏡画像解析システムが必要となる。また、現在、蛍光イメージング法は、個体イメージングへの応用展開が期待されているが、蛍光でのイメージングに必要な外部可視光が透過できる距離は短く、自家蛍光や光散乱による影響も大きい。また、強力な外部光励起に伴う生物個体への光損傷、不均一な光励起による測定誤差の発生などの問題も回避が困難である。これらの問題が、生物個体における蛍光イメージングの応用展開を妨げる一因となっている。そこで、既存の問題点を克服する新たなイメージング方法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

上述したように、蛍光イメージング、特に個体における蛍光イメージングの応用展開を妨げる一因となっているのは、外部光源による効率的な光励起にある。そこで、本研究ではこの問題を解決する新しい方法論として、外部励起光を必要としない新規蛍光イメージング法を構築するための基礎的知見を得ることを目的とした。より具体的には、蛍光性を付与した無機ナノシートと酵素から成る新規ハイブリッド材料(あるいは、蛍光物質と無機ナノシートと酵素の新規三元型ハイブリッド材料)を開発し、そのイメージング用材料としての性能を評価することを試みた。この場合、ハイブリッド材料と共に基質を加えると、ハイブリッド材料に保持された発光性酵素と基質との反応によって発光が生じる。ここで、この発光が蛍光性を付

与した無機ナノシート(あるいはハイブリッド材料の構成成分である蛍光物質)にエネルギー移動を起こせば、元の発光よりもより長波長における蛍光が観測されることが期待できる。また、本系では発光反応を利用しているため、外部励起光も必要としない。このような、新しい光シグナル発生系を構築するための基礎的検討を行った。

3. 研究の方法

まず、酵素を保持する担体となる無機ナノシートの合成について検討した。無機ナノシートの合成の際には、固相法と液相法の二種の異なる方法を用いることとした。液相法で無機ナノシートを合成する際には、希土類金属であるユウロピウムをドーピングした無機ナノシートも合成した。得られた無機ナノシートを酵素と混合することにより無機ナノシートと酵素の複合体を得た。酵素としては、化学発光反応を触媒できる酵素として、西洋ワサビペルオキシダーゼを選択した。無機ナノシートへの酵素の固定化率については、西洋ワサビペルオキシダーゼの特徴的吸収である402nmにおける吸光度に着目して、吸光測定から算出した。また、化学発光基質としては、ルミノール、ルミノール誘導体であるL-012、及び過酸化水素を用い、必要に応じて増感剤であるp-ヨードフェノールも使用した。三元型ハイブリッド材料を構築するための蛍光物質としては、量子ドット並びに蛍光ビーズを選択した。

4. 研究成果

(1) 無機ナノシートの合成

固相法によるチタン酸無機ナノシートの合成

炭酸セシウムとチタン酸を混合して800で20時間焼成した後、焼成粉を乳鉢ですりつぶして混合し、同条件で再度焼成して粉末化した。粉末の一部を塩酸溶液に分散させて室温で振盪させた後、遠心分離により上澄みを除去するという操作を4回行うことによりプロトン交換処理を行った。次に、テトラブチルアンモニウムヒドロキシドを適量加えて分散液の剥離処理を行った後、酢酸水溶液の添加によりpH調整を行うことで、目的の無機ナノシートの合成を行った。

液相法によるチタン酸無機ナノシートの合成

テトラブチルアンモニウムヒドロキシドに対してチタンテトライソプロポキシドを添加した後、60で2時間振盪させた。その後、得られたコロイド溶液を限外濾過により生成することで、目的とした無機ナノシートの合成を行った。蛍光性のチタン酸無機ナノシートの合成に際しては、テトラブチルアンモニウムヒドロキシドに対して、塩化ユウロピウムとチタンテトライソプロポキシドの混合溶液を添加して同様の操作を行うこと

で、目的とした蛍光性チタン酸無機ナノシートを得た。この際、塩化ユウロピウムとチタンテトライソプロポキシドの量比を調節することにより、ユウロピウム含有量を変化させた蛍光性チタン酸無機ナノシートの合成も行った。

(2) 蛍光性無機ナノシート/酵素複合体の作製と評価

液相法により合成した蛍光性無機ナノシート(5mol%ユウロピウム)の励起スペクトル並びに蛍光スペクトルの例を図1に示した。図に示すように、極大励起波長:395nm付近、極大蛍光波長:615nm付近を含む複数のピークが観測され、合成時に塩化ユウロピウムを使用して得られた無機ナノシートが蛍光性を有していることが確認できた。次に、得られた蛍光性無機ナノシートをpH4の酢酸緩衝液中で西洋ワサビペルオキシダーゼと混合し、振盪を行った。その結果、薄褐色の凝集物が生成し、遠心することにより凝集物を回収することが可能であった。このことから、蛍光性無機ナノシート/西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体の形成を目視により確認することが可能であった(図2)。遠心分離した上澄みを分取し、紫外可視吸光測定を行ったときの結果を図3に示す。西洋ワサビペルオキシダーゼに由来する402nmにおける吸光度からナノシートへの酵素の固定化率を算出すると、本実験条件下で98%という値が得られた。この複合体形成は、pH4中で負に帯電した無機ナノシートと正に帯電した西洋ワサビペルオキシダーゼの静電的相互作用に基づき進行したものと考えられる。

次に、作成した蛍光性無機ナノシート/西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体に基質を導入し、発光特性について検討を行うことを試みた。まず、予備的な検討として、西洋ワサビペルオキシダーゼに対し、基質であるル

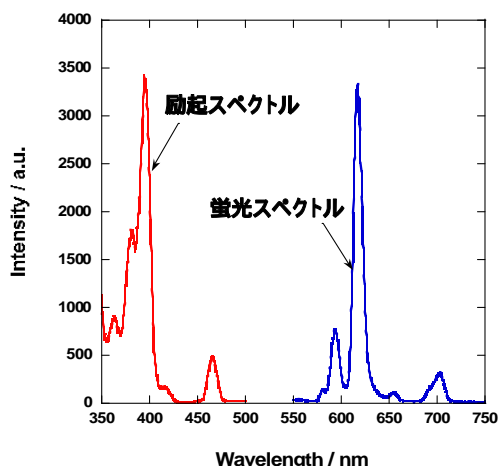


図1 蛍光性チタン酸無機ナノシートの励起蛍光スペクトルの例

ミノールと過酸化水素を加えると化学発光反応が生じることを確認し、またこの発光反応が、増感剤として知られるp-ヨードフェノールの添加によって増強されることを確認した。そこで、蛍光性無機ナノシート(ユウロピウム5mol%)/西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体に対し、ルミノール、過酸化水素、p-ヨードフェノールを添加して化学発光反応を行ったところ、ルミノール由来の発光が観測され、蛍光性無機ナノシートに挟み込まれた西洋ワサビペルオキシダーゼの活性が保持されていることが確認できた(図4)。しかし、ルミノール由来の発光が蛍光性無機ナノシートに移動する化学発光共鳴エネルギー移動現象は観測されなかった。そこで、ナノシートに導入するユウロピウムの量を変化させた蛍光性無機ナノシートを、新たに合成することにした。その結果、ユウロピウム含有量が増大するに従い(1mol%、5mol%、10mol%)、蛍光強度が増大することを確認することができた(図5)。しかしながら、これらの新たな蛍光性無機ナノシートを用いても、複合体形成時に化学発光共鳴エネルギー移動現象を引き起こすことは困難であり、目的とした化学発光共鳴エネルギー移動現象を引き起こすには外部からの蛍光物質の導入も重要であることが示唆された。

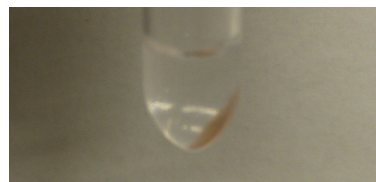


図2 蛍光性チタン酸無機ナノシート/西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体形成の目視による確認

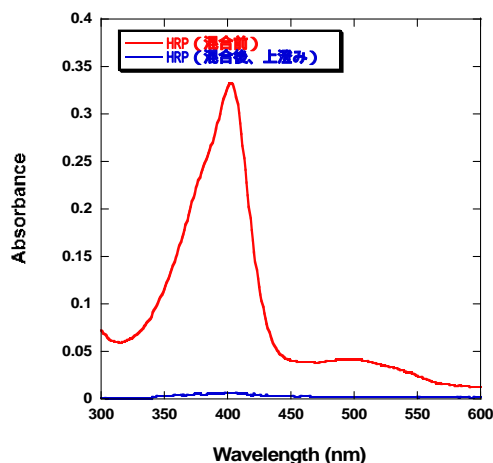


図3 蛍光性チタン酸無機ナノシート/西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体形成の紫外可視吸光スペクトルによる確認

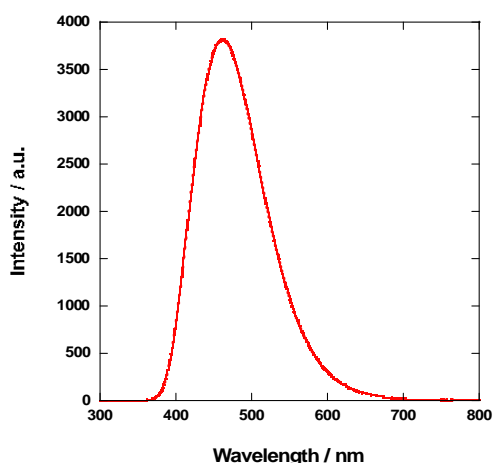


図 4 蛍光性チタン酸無機ナノシート/西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体に過酸化水素、p-ヨードフェノール、ルミノールを添加した時の発光スペクトル

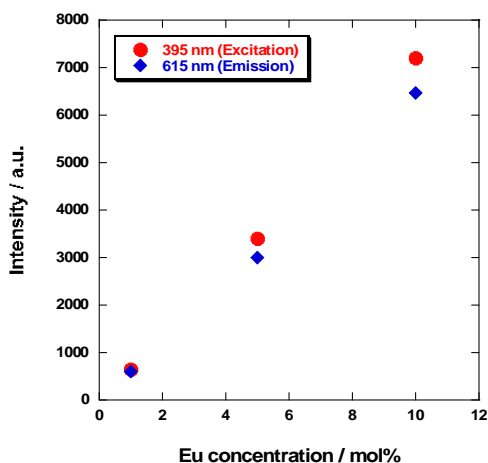


図 5 蛍光性チタン酸無機ナノシートの蛍光強度のユウロピウム含有量依存性

(3) 無機ナノシート/酵素/蛍光物質複合体の作製と評価

これまでの検討により、目的とした化学発光共鳴エネルギー移動現象を引き起こすには外部からの蛍光物質の導入も重要であることが示唆された。そこで、次に、無蛍光性無機ナノシート/酵素/蛍光物質複合体の作製に取り組むこととした。まず、固相法で作製した無蛍光性無機ナノシートに、西洋ワサビペルオキシダーゼと量子ドットを導入して、化学発光共鳴エネルギー移動現象を観測することを試みたが、量子ドットの無機ナノシートへの複合化を確認することが困難であった。そこで、外部からの有機蛍光色素の導入を考えることにした。まず、有機蛍光色素であるフルオレセインイソチオシアネートに着目し、無蛍光性の無機ナノシートに固定化された西洋ワサビペルオキシダーゼの触媒反応によって、ルミノールからフルオレセインイソチオシアネートへの化学発光共

鳴エネルギー移動が生じるかを検討した。最初に、フルオレセインイソチオシアネートと西洋ワサビペルオキシダーゼを炭酸ナトリウム水溶液中において反応させ、反応溶液を遠心式限外濾過フィルターにて精製した。得られたイソチオシアネート標識西洋ワサビペルオキシダーゼを液相法で合成したチタン酸無機ナノシートと複合化し、ルミノールを基質とした化学発光反応を行ったが、期待した化学発光共鳴エネルギー移動は起こらなかった。

そこで次に、フルオレセインイソチオシアネートと近い励起蛍光波長を有するアミン修飾蛍光ビーズに着目した。本蛍光ビーズを西洋ワサビペルオキシダーゼの存在下、チタン酸無機ナノシートと酢酸緩衝液中で混合すると、蛍光ビーズ/西洋ワサビペルオキシダーゼ/チタン酸無機ナノシート複合体が形成された。これは、実験条件下で正に帯電した西洋ワサビペルオキシダーゼとアミン修飾蛍光ビーズ、負に帯電したチタン酸無機ナノシートとの静電相互作用に基づくものと考えられる。複合体形成時には黄色の凝集物が観測され、目視からも複合体の形成を確認することができた。この複合体に対して、化学発光基質であるL-012と過酸化水素を添加すると、期待した化学発光共鳴エネルギー移動現象に由来する蛍光ビーズの蛍光を観測することができた(図6)。

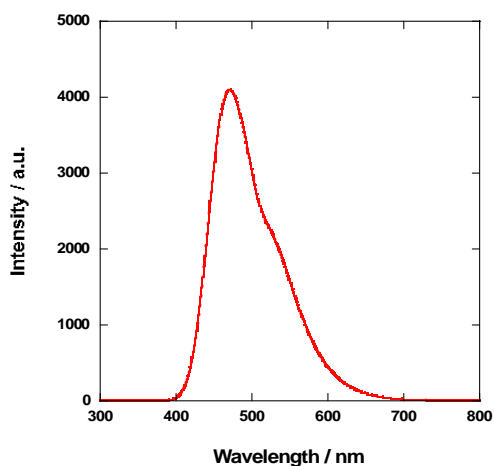


図 6 蛍光ビーズ/チタン酸無機ナノシート/西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体に過酸化水素、L-012 を添加した時の発光スペクトル

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6件)

Kai Kamada, Nobuaki Soh, "Enhanced visible-light-induced photocatalytic activity of α - Fe_2O_3 adsorbing redox enzymes", J. Asian Ceram. Soc., 3,

18-21 (2015). 査読有
DOI: 10.1016/j.jascr.2014.10.004

Nobuaki Soh, Shunsuke Kaneko, Kazuhiro Uozumi, Toshihisa Ueda, Kai Kamada, "Preparation of an enzyme/inorganic nanosheet/magnetic bead complex and its enzymatic activity", *J. Mater. Sci.*, 49, 8010-8015 (2014). 査読有
DOI: 10.1007/s10853-014-8508-5

Kai Kamada, Nobuaki Soh, "Temperature-controlled reversible exfoliation/stacking of titanate nanosheets in an aqueous solution containing tetraalkylammonium ions", *RSC Adv.*, 4, 8682-8685 (2014). 査読有
DOI: 10.1039/c3ra47233g

鎌田 海, 宗 伸明, "酵素 - 層状セラミックス複合体の合成と融合機能", *化学工業*, **10**, 39-42 (2012). 査読無

Kai Kamada, Ayano Moriyasu, Nobuaki Soh, "Visible-light-driven enzymatic reaction of peroxidase adsorbed on doped hematite thin films" *J. Phys. Chem. C*, 116, 20694-20699 (2012). 査読有
DOI: 10.1021/jp3046559

Suguru Tsukahara, Nobuaki Soh, Kai Kamada, "Soft surface modification of layered titanate for biorecognition", *J. Phys. Chem. C*, 116, 19285-19289 (2012). 査読有
DOI: 10.1021/jp304107b

[学会発表](計 11 件)

伊藤 大樹、鎌田 海、宗 伸明 "層状鉄チタン酸と結合したペルオキシダーゼの可視光誘起酵素反応" 日本セラミックス協会 2015 年年会 岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市) 平成 27 年 3 月 18 日

徳永 素子、鎌田 海、宗 伸明 "蛍光性チタン酸ナノシートを用いた特定細胞認識" 日本セラミックス協会 2015 年年会 岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市) 平成 27 年 3 月 18 日

大島 亮太、上田 敏久、宗 伸明、鎌田 海 "無機ナノシートあるいはメソポーラス炭素材料を利用したグルコースバイオセンサーの開発" 2014 年度日本農芸化学会西日本支部大会 佐賀大学本庄キャンパス(佐賀県・佐賀市) 平成 26 年 9 月 19 日

後藤 大輝、八尋 和也、上田 敏久、宗 伸明、鎌田 海 "無機ナノシートに固定化された酵素を利用した化学発光共鳴エネルギー移動" 第 51 回化学関連支部合同九州大会 北九州国際会議場(福岡県・北九州市) 平成 26 年 6 月 28 日

藤井 佐保、上田 敏久、宗 伸明、鎌田 海 "イメージング応用を指向した発光性を有する無機ナノシート/酵素複合体の開発" 第 50 回化学関連支部合同九州大会 北九州国際会議場(福岡県・北九州市) 平成 25 年 7 月 6 日

魚住 和弘、上田 敏久、宗 伸明、鎌田 海 "無機ナノシート/酵素/磁気ビーズ複合体の開発と機能評価" 第 50 回化学関連支部合同九州大会 北九州国際会議場(福岡県・北九州市) 平成 25 年 7 月 6 日

大島 亮太、上田 敏久、宗 伸明、鎌田 海 "酵素固定化材料として無機ナノシートを利用したグルコースバイオセンサーの開発" 第 50 回化学関連支部合同九州大会 北九州国際会議場(福岡県・北九州市) 平成 25 年 7 月 6 日

宗 伸明 "生体分子を計測する機能性蛍光化合物" 長崎大学未来工学研究センターキックオフ研究発表会 長崎大学文教キャンパス(長崎県・長崎市) 平成 24 年 12 月 21 日

Nobuaki Soh, "Fluorescent compounds for sensing biomolecules" Joint symposium of Saga University and Chonnam National University, Saga (Japan), December 12, 2012

Kai Kamada, Suguru Tsukahara, Nobuaki Soh, "Fluorescent inorganic titanate layers as bioaffinity reaction markers", International symposium on rare earths 2012 in Okinawa for the 30th anniversary of the Rare Earth Society of Japan, Okinawa (Japan), November 8, 2012

Takaharu Ikeda, Suguru Tsukahara, Nobuaki Soh, Kai Kamada, "Layered iron-titanate as a physicochemically stable support for hydrolase" 4th international congress on ceramics, Chicago (USA), July 18, 2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宗 伸明 (SOH, Nobuaki)

佐賀大学・農学部・准教授
研究者番号：90336008

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4)研究協力者

鎌田 海 (KAMADA, Kai)
長崎大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：90315284