

生体分子の分離技術を利用したカーボンナノチューブの分離

田中 丈士

はじめに

単層カーボンナノチューブ (CNT) は直径やらせん度の違いによって多様な構造をとる (図1)。たとえば、直径0.7~1.3 nmの分布を持つCNTは約70種類、鏡像体も考慮すると約120種類の異なる構造を取りうる。CNTは構造の違いによって異なる電気特性 (金属型と半導体型) や光学特性を示すため、これらの特性を利用するためには、多様な構造の中から特定の構造のCNTを選択的に得る必要がある。1993年の飯島による単層CNTの発見¹⁾から10年弱が経過した2002年に、界面活性剤存在下での超音波照射と超遠心分離によるCNTの孤立分散液 (CNT一本一本が孤立に分散した液) の調製法がSmalleyらによって報告された²⁾。この報告以降、多様な構造を含むCNT分散液の中から特定の構造のCNTを分離する本格的な研究が進み始めた。そして、2006年のHersamらによる、密度勾配超遠心法によるCNTの分離の報告が大きな転換期となり、後を追ってさまざまな優れた分離法が報告されるようになった。直径分離、金属型・半導体型分離、単一構造分離、さらに現在では、右巻きと左巻き (エナンチオマー) も分離された真に単一構造のCNTが得られるまでになっている。興味深い点は、密度勾配超遠心分離法、アガロースゲル電気泳動法、カラムクロマトグラフィー法、水性二相分

離法といった、生体分子の分離に汎用されている手法がCNTの分離に非常に有効であることである。以下に、これらCNTの分離法の詳細について説明する。

密度勾配超遠心分離

密度勾配超遠心分離法はバイオテクノロジー分野において、染色体DNAとプラスミドDNA、細胞内小器官、細胞などの分離分画に用いられる手法である。密度を連続的、あるいは段階的に変化させた媒体中で遠心分離を行うことにより、分析物は対応する密度の領域に層をなして濃縮され、分離される。2006年にHersamらはこの密度勾配超遠心分離法をCNTの分離に適用し、CNTの直径に応じた分離 (直径分離) あるいは金属型と半導体型というCNTの電気的性質に応じた分離 (金属型・半導体型分離) (図2) に成功した³⁾。

コール酸ナトリウム (SC) を分散剤に用いて密度勾配超遠心を行うと、直径の違いで分離された。一方、分散剤にSCとドデシル硫酸ナトリウム (SDS) の混合物を用いて密度勾配超遠心を行うと、鮮やかなオレンジ色を呈する半導体型CNTが上層に、緑色を呈する金属型CNTが下層に分離された (金属型と半導体型では可視光領域での光吸収波長帯が互いに異なるため色が異なる。また、CNTが太くなるにつれて吸収波長が長波長側にシフトするため、直径によっても色が異なる)。CNTは炭素からなる黒い「すす」であるが、高純度に分離精製すると鮮やかな色彩を放つのを目にして、多くの研究者は衝撃を受けた。分離原理については、金属型と半導体型のCNTで密度が異なるわけではなく、それぞれのCNTに吸着する界面活性剤の組成が異なり、界面活性

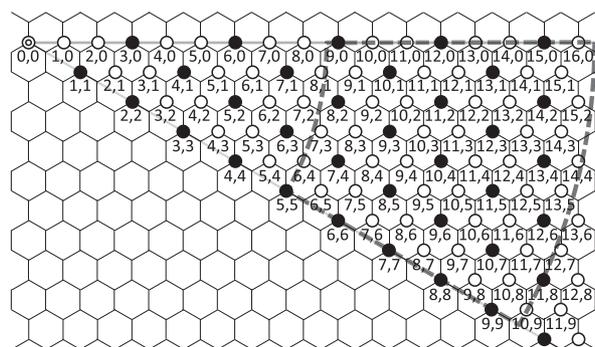


図1. CNTの構造は (n,m) の2つの自然数で規定される。図中のグラフェンシート (六角形が並んだシート) を、◎で示す $(0,0)$ と●を重ねると丸めた構造は金属型CNTに、◎と○を重ねると半導体型CNTになる。同じ (n,m) でもシートを丸める方向が表か裏かで鏡像関係となる。点線で囲った領域に含まれるものは直径0.7~1.3 nmのCNT。

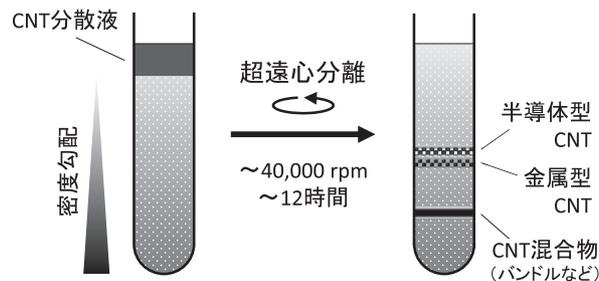


図2. 密度勾配超遠心による金属型・半導体型CNTの分離

剤の「ころも」を含めた密度が金属型と半導体型のCNTで異なる結果、分離されると考えられる。実際、混合する界面活性剤の組成を変化させると、遠心管中の半導体型と金属型のCNTの位置が上下逆転することもあり、これはCNT自体の密度が分離の主因ではないことを示している。Weismanらは、密度勾配を精密に調整することにより、単一構造の半導体型CNTの分離、さらには、右巻きと左巻きのCNTの光学分割（エナンチオマー分離）にも成功した⁴⁾。エナンチオマー分離は、光学活性な界面活性剤であるSCの右巻き・左巻きCNTに対する認識能力の違いによる結果であると考えられる。

アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動は、生物系の学部・学科であれば学生実験でもよく行われる、おなじみのDNAの分離法である。ゲルの網目が分子ふるいとなり、DNAを長さで分離するものである。筆者らのグループは、先の密度勾配超遠心法による分離の成功に触発され、アガロースゲル電気泳動を用いたCNTの分離を試みた⁵⁾。ただし、DNAの分離で用いられるサブマリン型の泳動装置ではなく、ガラス管中でアガロースゲルを調製し、垂直方向に電気泳動を行う装置を用いた(図3)。

SDSで分散したCNTをアガロース電気泳動に供すると、電気泳動の先端と後端で色味が違いが認められ、金属型CNTがゲル先端に、半導体型CNTがゲル後端に分離されることが判明した(図3a)。さらに条件検討を重ねた結果、あらかじめCNT分散液とアガロースを混合し、ゲル中に固めた状態のもの(CNT含有ゲル)を電気泳動に供すると、半導体型CNTは始めの位置から移動せず、金属型CNTのみが泳動した(図3b)。30分程度の短時間で分離され、高価な装置も必要としない点が本法の優れた点である。当初、金属型と半導体型という電気的性質の異なるものが分離されるため、電場が重要な役割を果たすと考えられたが、実際には電場は必要ではな

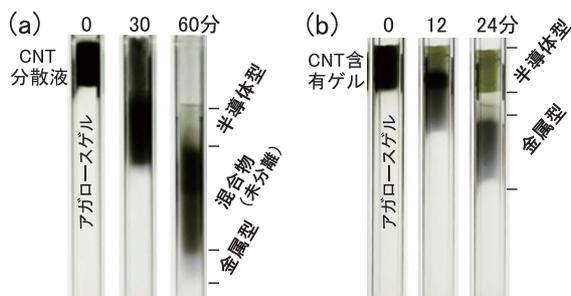


図3. アガロースゲル電気泳動による金属型・半導体型CNTの分離。試料にCNT分散液 (a)、CNT含有ゲル (b) を使用。

いことが判明した。たとえば、アガロースゲル電気泳動後にゲルからDNAを回収する簡易的な手法として、ゲルを凍結・融解後に圧搾する方法があるが、これをCNT含有ゲルに対して行うと、半導体型CNTはゲル固形中に残り、金属型CNTのみが搾り出された⁶⁾。この結果は、分離に電場が必要ないことを示している。

カラムクロマトグラフィー

筆者らのグループはアガロースゲル電気泳動の成果をもとに、カラムクロマトグラフィーによるCNTの分離技術の開発を行った。生化学分野では、タンパク質のカラム精製に、アガロースからなるSepharoseゲルやアガロースと同様に多糖であるデキストランをベースにしたSephacrylゲルが広く用いられている。これらのゲルは、元々はサイズ排除クロマトグラフィー用の担体として開発されたものであるが、CNTの分離にも適用可能である(図4)。ただし、CNTの分離においては、吸着クロマトグラフィーの担体として機能する。

Sepharoseゲルを充填したオープンカラムに、SDSで

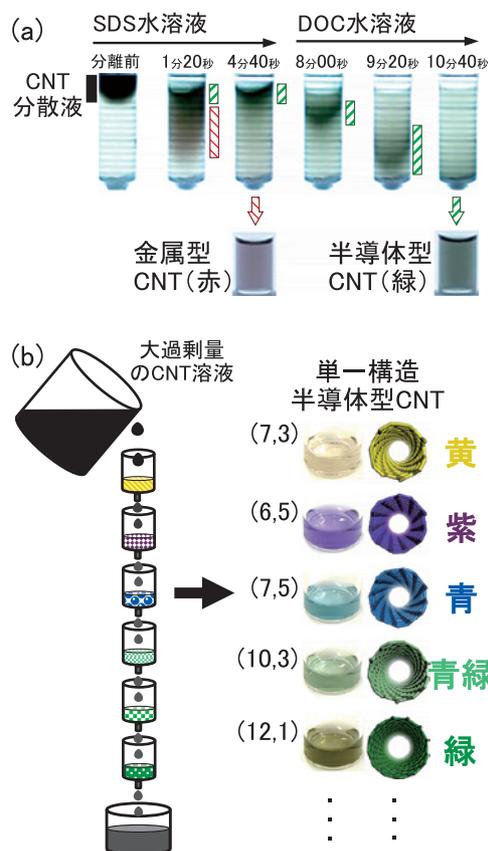


図4. カラムクロマトグラフィーによるCNTの分離。(a) アガロースゲルを用いた金属型・半導体型CNT分離。(b) デキストラン系ゲルを用いたオープンカラムによる単一構造半導体型CNT分離と得られた単一構造半導体型CNT分散液。

分散したCNTを注入すると、金属型CNTがフロースルー液として回収され、半導体型CNTはゲルに吸着する。その後、半導体型CNTはデオキシコール酸ナトリウム(DOC)など別の界面活性剤で溶出して回収される(図4a)⁷⁾。一般に、クロマトグラフィーは分析だけでなく製造プロセスにも実用されている手法であり、スケールアップやポンプ送液による高速化と自動化などによる、スループットの向上や低コスト化に適した手法である。実際に、直径20 cmで容量約9 Lのパイロットスケールのカラムを用いた際には、日産2 gのスループットで金属型と半導体型のCNTの大量分離が可能である(2 g/日を少ないと感じられるかもしれないが、組換えタンパク質を2 g精製する大変さと同様のイメージをしていただきたい)。

Sephacrylゲルを用いたカラム分離では様子が少々異なり、特に、少量のゲルに対して吸着容量の数10倍程度の大過剰のCNTを投入(オーバーロード)すると、特定の単一構造の半導体型CNTがゲル吸着成分として得られることが分かった⁸⁾。これは、吸着力のもっとも大きいCNTが競合的に吸着した結果である。さらに複数のカラムを直列に配置しオーバーロードすると、複数種の単一構造の半導体型CNTが同時に得られる(図4b)。半導体型CNTも単一構造にまで精製されると、黄、紫、青、青緑、緑と鮮やかな色を呈する。最近では、SDS/SC/DOCの三種の混合界面活性剤系でDOCの濃度のみを段階的に上げていく溶出法により、より再現性や制御性の高い分離が実現されている⁹⁾。さらに、DOC濃度を0.005%刻みで変化させる非常に細かい段階溶出を行うことによって、単一構造の半導体型CNTのエナンチオマー分離に成功した¹⁰⁾。12種類のエナンチオマーが得られており、既存の手法と比較しても、高いエナンチオマー純度が得られる手法となっている。光学活性を持たないSDSのみを用いたオーバーロード法でもCNTのエナンチオマーの分離がある程度起こることがわかっているため、エナンチオマーの認識は光学活性を持つデキストラン(カラム担体)が担っているものと考えられる。ただし、上述のようにSCとDOCの共存下では、より高純度のものが得られていることから、これら光学活性な分散剤もエナンチオマー分離において重要な働きをしていると予想される。

一方、Zhengらは、DNAがCNTの分散剤として機能することを見だし、DNAで分散したCNTをイオン交換クロマトグラフィーで分離した。本法では、DNAの塩基部分が疎水基として働き、リン酸エステル結合部が親水基として働くと考えられる。シトシンまたはチミン

をランダムに含む一本鎖オリゴDNA(60 mer)を用いてCNTを分散し、陰イオン交換カラムにかけることで、純度が低いながらも金属型と半導体型のCNTの分離に成功したのが2003年のことである¹¹⁾。その後、同グループは約350種類のさまざまな配列(長さが10~30 merで、2~4塩基の繰り返し配列)の一本鎖オリゴDNAを検討し、特定のDNAで特定の単一構造のCNTを分離することに成功した¹²⁾。本分離では、カラム担体に吸着したCNTは塩のグラジエントで溶出されるが、目的のCNT/DNA複合体が他のCNTよりも早く溶出されるため、CNTを分離することが可能である。この現象は、特定の構造のCNTには特定のDNAが規則正しく巻き付き、CNTの表面が均質に負電荷を帯びるのに対し、他のCNTにはDNAがランダムに張り付くことでCNTの表面が一部むき出しになり、その部分がゲルのイオン交換基以外の部分と相互作用して溶出が遅れることに起因すると考察されている。本法は、らせん構造を持つCNTの分離に、DNAのらせん度と配列の多様性を巧みに利用したものであり、10種類を超える単一構造半導体型CNTの分離を報告した初めてのものである。

水性二相分離

水と油が混和せず二相に分かれるように、特定の2種類の高分子を含む水溶液はある条件で互いに水溶液でありながら二相に分かれる。この二つの相への溶質の分配を利用して分離を行うのが、水性二相分離法である。バイオテクノロジーの分野では、タンパク質や細胞小器官、細胞の分離に使用されている。溶液を混和し、静置するだけという非常に簡単な操作で、短時間のうちに溶液は上下に相分離する。先述のZhengらのグループは、この水性二相分離法をCNTの分離に応用した。

ポリエチレングリコール(PEG)とデキストランを用いた系では、上相のPEG相に半導体型CNT、下相のデキストラン層に金属型CNTが分離された¹³⁾。CNTの分散に使用する界面活性剤の種類や濃度により上下相へのCNTの分配が変化する。また、煩雑な分離操作を必要としないため、分離操作の繰り返しが容易である。実際、4、5回分離操作を繰り返すことにより、半導体型のみならず、金属型の単一構造CNTの分離にも成功している¹⁴⁾。さらに最近では、水性二相分離法の分散剤にDNAを適用し、単一構造分離とエナンチオマー分離も実現している¹⁵⁾。本分離のためにZhengらは改めて300種以上の一本鎖オリゴDNA(長さが12 merで、2種類の塩基からなるパ lindローム(回文配列))をスクリーニングし、最終的に20種類以上の金属型CNTと半導体

型CNTに対する単一構造あるいはエナンチオマーの分離に成功している。

おわりに

生体分子の分離法がCNTに対して有効な理由に、生体分子もCNTも共に水系で行う分離である、という点あげられる。生体分子の多くは水溶液中に存在するため、その構造や機能を保ったまま分離精製するには生体分子を水溶液中で取り扱うことが基本となる。一方、CNTでは、分離に先立って界面活性剤を用いてCNTを水溶液中に孤立分散させる必要があるため、その後の分離も水系で行う必要がある。この水系で分離を行う必要性という共通性が、CNTの分離に生体分子の分離法が有効になる理由となっている。また、CNTのサイズが生体分子のサイズと似通っている点も、ゲルを用いて電気泳動やクロマトグラフィーで分離するうえで重要な要因の一つとなっていると考えられる。

CNTの分離における残された課題として、より太いCNTの分離がある。図1からも分かるように、直径が大きくなるにつれて、CNTの取りうる構造の多様性が広がり、加えて金属型と半導体型CNTの電気的性質の違いが小さくなっていくため、分離の難度が増す。別の課題として、ハイスループットで良質の孤立分散液を調製する手法の確立も重要である。本稿で紹介したCNTの分離は、いずれも分離に先立つ孤立分散液の調製のために、超音波照射と超遠心分離の過程を必要とする。前者はCNTに欠陥を導入して性能を劣化させ、また両者とも大量処理を行ううえでのボトルネックとなっており、これらを解決する必要がある。

本稿の対象外である「生体分子の分離法以外の方法」を用いたCNTの分離例はあまり多くはないが、ポリフルオレンなどの半導体性芳香族性高分子を分散剤に用いて有機溶媒中で半導体型CNTを選択的に抽出する手法や¹⁶⁾、アルキルアミンを分散剤に用いて有機溶媒中で金属型CNTを抽出する手法¹⁷⁾などがある。前者では、数種類にまで絞られた半導体型CNTの混合物や単一構造の半導体型CNTが得られている。また、合成後の分離ではなく、単一構造のCNTを選択的に合成することに成功した報告もあるが^{18,19)}、量や純度や採算性が十分で

ないなど解決すべき課題が存在する。したがって、CNTを産業応用するには、現状では本稿で紹介したようなCNTの分離法によって単一構造のCNTを得るほうが現実的である。

最後に、分離したCNTの活用について触れる。単一構造半導体型CNTは、近赤外蛍光を利用した血管造影(本特集、蓬田)⁹⁾や、量子暗号通信の実現に重要な室温単一光子源²⁰⁾などに利用可能で、CNTのエナンチオマーはCNTのバンド構造解析に利用可能である¹⁰⁾。このように、分離したCNTはこれまで純粋な試料がなかったために進まなかった基礎研究や応用開発の進展に大いに貢献している。生体分子の分離法はその縁の下の力持ちとして、これからも活躍するに違いない。

謝 辞

本稿で紹介したゲルを用いたCNTの分離に関する研究は、(国研)産業技術総合研究所の片浦弘道首席研究員をはじめ共同研究者の方々との成果であり、この場を借りて深謝致します。また、日本学術振興会 科学研究費助成事業、および新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 産業技術研究助成事業などの支援を受けてなされた。

文 献

- 1) Iijima, S.: *Nature*, **354**, 56 (1993).
- 2) O'Connell, M. J. *et al.*: *Science*, **297**, 593 (2003).
- 3) Arnold, M. S. *et al.*: *Nat. Nanotechnol.*, **1**, 60 (2006).
- 4) Ghosh, S. *et al.*: *Nat. Nanotechnol.*, **4**, 443 (2010).
- 5) Tanaka, T. *et al.*: *Appl. Phys. Express*, **1**, 114001 (2008).
- 6) Tanaka, T. *et al.*: *Nano Lett.*, **9**, 1497 (2009).
- 7) Tanaka, T. *et al.*: *Appl. Phys. Express*, **2**, 125002 (2009).
- 8) Liu, H. P. *et al.*: *Nat. Commun.*, **2**, 309 (2011).
- 9) Yomogida, Y. *et al.*: *Nat. Commun.*, **7**, 12056 (2016).
- 10) Wei, X. *et al.*: *Nat. Commun.*, **7**, 12899 (2016).
- 11) Zheng, M. *et al.*: *Nat. Mater.*, **2**, 338 (2003).
- 12) Tu, X. *et al.*: *Nature*, **460**, 250 (2009).
- 13) Khripin, C. Y. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 6822 (2013).
- 14) Fagan, J. A. *et al.*: *Adv. Mater.*, **26**, 2800 (2014).
- 15) Ao, G. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 16677 (2016).
- 16) Nicholas, R. *et al.*: *Nat. Nanotechnol.*, **2**, 640 (2007).
- 17) Maeda, Y. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 10287 (2005).
- 18) Yang, F. *et al.*: *Nature*, **510**, 522 (2014).
- 19) Sanchez-Valencia, J. R. *et al.*: *Nature*, **512**, 61 (2014).
- 20) He, X. *et al.*: *Nat. Photon.*, **11**, 577 (2017).