

令和 元年 6 月 13 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K13621

研究課題名(和文)糖鎖還元法を用いた病原体検出金ナノ微粒子の大量合成技術

研究課題名(英文) Large-scale synthesis technology of pathogen detection gold nanoparticles using sugar-chain-reduction method

研究代表者

小山 哲夫 (Koyama, Tetsuo)

埼玉大学・研究機構・技師

研究者番号：20375588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は、糖鎖誘導体を用いて塩化金酸水溶液を還元し、当該糖鎖誘導体が表面に導入された金ナノ微粒子を合成することを目的とした。糖鎖誘導体はペロ毒素と選択的に結合するグロボ3糖を用い、金ナノ微粒子が生成することを確認した。本研究本来の目的は『病原体の存在が目に見える形でわかる』微粒子の構築であったが、色調変化が想定よりも乏しいことが判明した。同じ糖鎖誘導体を原料としたポリマーを合成し、金ナノ微粒子と共に溶液中に分散させた結果、溶液中で色調変化が明瞭に現れることが明らかとなった。当初の想定と異なった結果となったが、同様の成果を得ることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は『病原体の存在を色調変化で確認できる』ナノサイズの金微粒子を大量合成することを目的とした。これが実用化できれば、食品工場・学校などでも手軽に病原体の存在を確認できるはずである。当該金微粒子は病原体が認識する『糖鎖』化合物と塩化金酸水溶液を溶液中で混合し、アルカリ条件にすることで簡単に合成できた。実際に合成した金微粒子と糖鎖を認識する分子(レクチン)を溶液中で混合した結果、色の変化は当初想定したほど明瞭で無いことが明らかとなった。しかし同じ糖を持つポリマーを金微粒子と混合したところ、目に見える色の変化が現れた。本研究で見いだした手法は病原体の検出に幅広く応用可能である。

研究成果の概要(英文)： This study was to synthesize gold nanoparticles in which the sugar chain derivative is introduced on the surface. As a sugar chain derivative "Gb3" was used to confirm that gold nano particles were formed. At first, the aim of this study was the construction of fine particles that "the presence of the pathogen can be seen in a visible manner". But the color of the particles was not changed scarce than expected. Synthesizing a polymer using the same sugar chain derivative as a raw material and dropping it into a solution together with gold nanoparticles, it became clear that the color tone change appears clearly. Although the results were different from our initial expectations, we were able to achieve similar results.

研究分野：糖鎖工学

キーワード：金ナノ微粒子 病原体検査キット 糖鎖工学 病原性大腸菌O157

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

金ナノ粒子はその発色性や化学的な安定性からインフルエンザ検査キットをはじめとして広く利用されているが、これらキットの基本的な構造は金ナノ粒子表面にペプチドなどが結合したものである。また最近ではこのような金ナノ粒子を直接医薬品として使用する試みも行われている。このような機能を持った金ナノ粒子は一般的に二段階のプロセスを経て合成されている。第一段階は塩化金酸の水溶液をクエン酸などで還元し、金ナノ粒子そのものを合成するプロセス。第二段階は特定の機能性基をもった化合物を金ナノ粒子表面に導入するというものである。このプロセスを一段階で完結できれば、必要とされる金ナノ粒子を簡単に合成できる。また、金ナノ粒子には『凝集』という『避けては通れない』性質が存在する。凝集が起こると粒子が水に溶けなくなり、状況によっては用途に適さない状態に変化してしまうというものである。

我々は糖鎖の誘導体を塩化金酸と混合し、アルカリ条件にすることで糖鎖誘導体が表面に集積された金ナノ粒子が生成することを見出した。この手法を利用すると、例えば病原体と結合する糖鎖誘導体を使用すれば病原体検査キットに利用可能な金ナノ粒子を簡単に合成できる。また、糖鎖は多くの水酸基を表面に有するため、これらを表面に持つ金ナノ粒子は凝集が起きづらく、水溶液中に於いて長期保存に耐えうるということが期待できる。

このような金ナノ粒子の合成と糖鎖誘導体の導入を同時に行う反応を『糖鎖還元法』と呼称した。

2. 研究の目的

病原体と結合する糖鎖が表面に導入された金ナノ粒子を大量合成する技術の確立と、生理活性評価を行うことを目的とした。このような金ナノ粒子は、病原体と結合して凝集することにより、病原体検査キットとしての利用が期待できる。

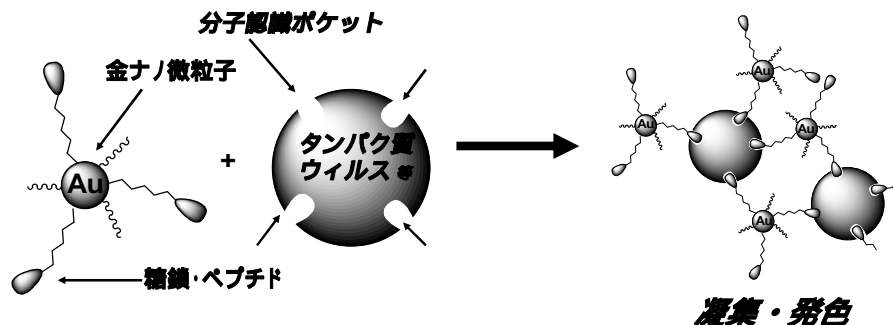


図1. 病原体検査キットの概念図

3. 研究の方法

以下に掲げるプロセスを経て研究を行った。

(1) 糖鎖誘導体の合成

まず、原料となる糖鎖誘導体の合成を行った。合成の最終的なターゲットとしたのは病原性大腸菌 O157:H7 が産生するベロ毒素と結合する「グロボ3糖 (Gb3)」という糖鎖の誘導体である。これは時折毒素の被害者の発生があるため、病原体の検出キットとしての需要が見込まれると判断したためである。当該糖鎖の合成プロセスは、報告者の所属する研究グループに於いてすでに確立されている手法を用いた。また、金ナノ粒子の合成過程を確認するため、より簡単な糖である N-アセチルグルコサミンやラクトースの誘導体も別途合成し、合成過程の検証に使用した。

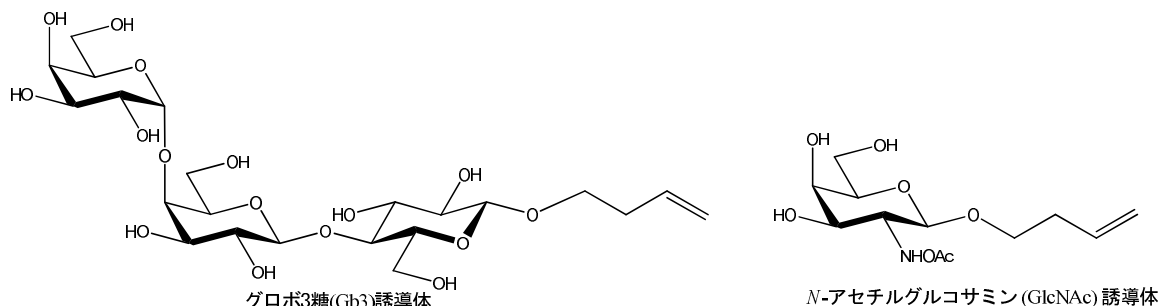


図2. 実験に用いた糖鎖誘導体の例

(2) 金ナノ粒子の合成とその性質の解析

金ナノ粒子の合成

先にも記したように、糖鎖還元法による合成は極めてシンプルである。末端が炭素-炭素2重結合(オレフィン)となっている糖鎖誘導体と塩化金酸水溶液を水中で混合し、アルカリ状態にすることで全体が黄色から赤色の溶液に変化する。この反応の結果、表面に糖鎖誘導体が載っ

た金ナノ微粒子が生成する(図3)。

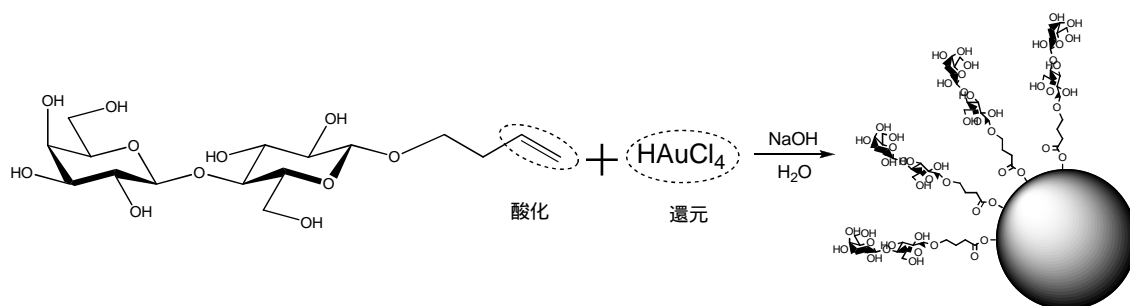


図3. 糖鎖還元法による金ナノ微粒子合成の概念図

まず、透過型電子顕微鏡(TEM)にて生成物の外径を直接観測し、さらに直接光散乱法を用いてサイズの測定を行ったところ、ナノサイズの微粒子が生成していることが確認された(図4)。

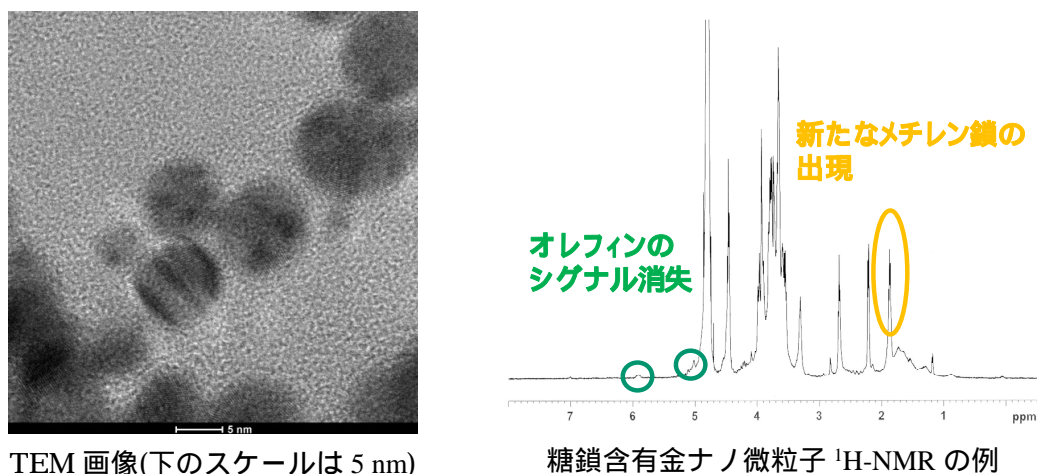


図4. 糖鎖還元法による金ナノ微粒子

続いて、実際に表面に糖鎖誘導体が載っているかの検証は ¹H-NMR を用いて行った。ラクトース誘導体を用いて還元した結果を記載する。¹H-NMR のチャート上ではラクトース誘導体由来の2重結合部分のシグナルが消失し、新たな炭素鎖のシグナルが現れている。このことから糖鎖誘導体の末端が酸化されるとともに、金ナノ微粒子表面上に結合していることが明らかとなった。

以上の一連の結果より、『糖鎖誘導体と塩化金酸数溶液を用いることにより糖鎖が表面に導入された金ナノ微粒子が生成する』ことが確認された。

糖鎖還元法による金ナノ微粒子合成条件の検討

金ナノ微粒子を病原体検出キットとして利用する場合、微粒子のサイズが重要となる。様々な合成条件で金ナノ微粒子のサイズなどを検討した結果、以下のような法則性を明らかにした

- ・ 微粒子の大きさは合成時の「金/糖鎖」の mol 比の影響を受ける
- ・ 糖の濃度のみを上げてても微粒子のサイズへの影響は小さい

糖鎖含有金ナノ微粒子の精製

先に記した合成法においては未反応の糖鎖誘導体があり、また全体がアルカリ溶液ということもあるため、有用な金ナノ微粒子のみを回収するという精製操作が必要となる。

本研究において複数の精製操作を検討した結果、最終的に『遠心分離後に上澄み溶液を除去』を繰り返すのが最も効果的という結論に達した。

表面糖鎖濃度の決定

微粒子表面にどれだけの糖鎖があるかを計測すべく、様々な方法を検討した。糖の濃度分析に一般的に用いられる「フェノール硫酸法」は、酸で分解した糖の代謝物を分光学的に計測する方法であるが、今回の場合は微粒子そのものの吸収スペクトルの関係で使用できなかった。

最終的に HPLC とヒドラジン酸化を用い、その結果生成した蛍光性物質を定量化することにより糖鎖濃度を求めたが、微粒子内部の糖も検出している可能性がある。

(3) 生理活性の検討と改良法の検討

続いて生理活性試験を行った。先の図2左側のグロボ3糖が導入された金ナノ微粒子を合成し、冒頭に示した病原体検査キットを実現することを目指した。糖鎖を認識する「レクチン」と合成した金ナノ微粒子を混合した結果、目でわかる色調変化はごくわずかであることが明らかとなった。このため、当初の予定を変更し、色調変化を強調できるような手法を模索した。

我々は側鎖に糖鎖を含む『糖ポリマー』を別途合成し、その網の目の中に金ナノ微粒子を固定化する方法でさらなる色調変化の発現を試みた。糖鎖誘導体とアクリルアミドの共重合体のポリマーと糖鎖含有金ナノ微粒子を混合し、そのうえで先のレクチンを混合させたところ、目に見えて色調変化が起こった(図5)。さらに検討を重ねた結果、糖ポリマーを併用した場合、取り込まれる金ナノ微粒子上に糖鎖が無くても同様の結果になることが判明した。

この結果から推測するに、金ナノ微粒子上の糖鎖はその密度の高さからかえって病原体と結合しづらくなっており、ポリマー上の糖鎖の方が先に病原体に認識。ポリマー上の糖鎖が引き寄せられるのに従って金ナノ微粒子が凝集し、結果として目に見える色調変化が起こったと推測された(図6)。



図5 . レクチンによる色調変化
(左 : レクチン無し 右 : 有り)

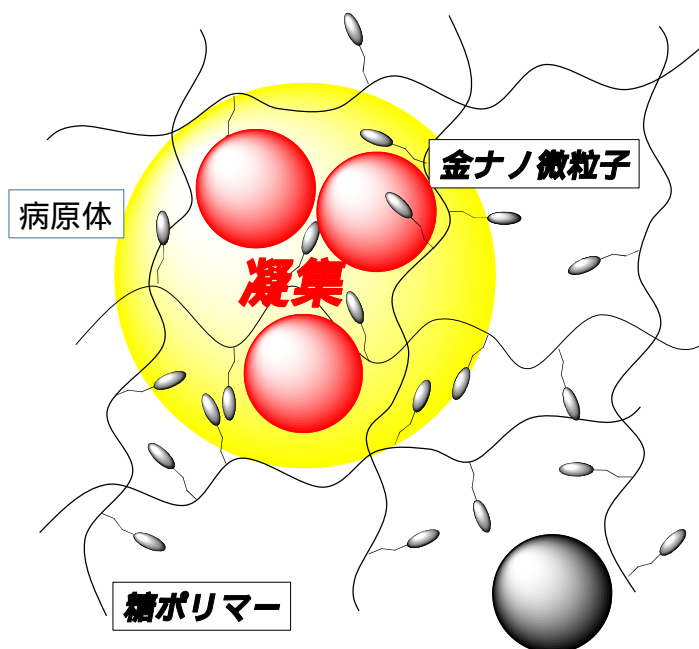


図6 . ポリマーを混合させた系での金ナノ微粒子凝集の模式図

4 . 研究成果

本研究は『病原体の存在を色調変化で確認できる』ナノサイズの金微粒子を大量合成することを目的とした。これが実用化できれば、食品工場・学校などの現場でも手軽に病原体の存在を確認できるはずである。

当該金微粒子は病原体が認識する『糖鎖化合物』と塩化金酸水溶液を溶液中で混合し、アルカリ条件にすることで簡便に合成できた。実際に合成した金微粒子と糖鎖を認識するレクチンを溶液中で混合した結果、色の変化は当初想定したほど明瞭で無いことが明らかとなった。しかし同じ糖を持つポリマーを金微粒子と混合したところ、目に見える色の変化が現れた。

本研究で見いだした手法は病原体の検出に幅広く応用可能である。

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 5件)

発表者名 : 小山哲夫・米内山友希・松下隆彦・幡野健・松岡浩司

標題 : 糖鎖還元法による糖鎖含有金ナノ微粒子の実用的調製

学会等名 : 第36階 日本糖質学会年会

発表年 : 2017年

発表者名 : 米内山友希・松下隆彦・小山哲夫・幡野健・松岡浩司

標題 : 糖修飾型金ナノ微粒子の合成() : 糖誘導体を用いた金の還元

学会等名 : 日本化学会秋季事業 第7回 CSJ化学フェスタ 2017

発表年 : 2017年

発表者名：YONAIYAMA, Tomoki; MATSUSHITA, Takahiko; KOYAMA, Tetsuo;
HATANO, Ken; MATSUOKA, Koji

標 題：Synthesis of gold nanoparticles modified with sugar(III):Investigation of
aggregative conditions

学会等名：日本化学会第 98 春季年会

発表年：2018 年

発表者名：金島崇之・松岡浩司・松下隆彦・幡野 健・小山哲夫

標 題：シアル酸部位を含む糖修飾型金ナノ微粒子の合成 (): 糖鎖骨格の構築と金ナノ微
粒子の作成

学会等名：日本化学会秋季事業 第 8 回 CSJ 科学フェスタ

発表年：2018 年

発表者名：米内山友希・松下隆彦・小山哲夫・幡野 健・松岡浩司

発表標 題：糖修飾型金ナノ微粒子の合成と評価 (): 糖鎖ポリマーを利用した凝集性の
向上

学会等名：日本化学会秋季事業 第 8 回 CSJ 科学フェスタ

発表年：2018 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://md.fms.saitama-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：松岡 浩司

ローマ字氏名：Matsuoka Koji

所属研究機関名：埼玉大学

部局名：理工学研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁): 40272281

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、研究者個人に帰属されます。