

機関番号：12201  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20550071  
 研究課題名（和文）  
 熱応答性高分子を複合化した金ナノ粒子を用いるチオール化合物のセンシング  
 研究課題名（英文）  
 Chemical sensing of thiol compounds with gold nanoparticles conjugated with  
 thermoresponsive polymer  
 研究代表者：  
 上原 伸夫 (UEHARA NOBUO)  
 宇都宮大学・工学研究科・准教授  
 研究者番号：50203469

## 研究成果の概要（和文）：

熱応答性高分子を金ナノ粒子に複合化させた熱応答性金ナノ複合体を創製し、チオール化合物のセンシング機能について検討した。ポリアミノ基を共重合させたポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)-co-(ポリアミン)を複合化した金ナノ複合体では、加熱冷却といった熱刺激により、ナノ複合体中の金ナノ粒子が凝集状態から分散状態に戻るという「再分散」現象を示す。この再分散現象への阻害効果に基づいて、システインの簡易目視計測法を開発することができた。また、グルタチオンの再分散現象に及ぼす促進効果は熱刺激を与えない条件でも発現することを見出し、これに基づいたグルタチオンおよび $\gamma$ -GPTの簡易目視計測法を開発した。

## 研究成果の概要（英文）：

Thermoresponsive gold nanocomposites have been fabricated by conjunction of gold nanoparticles with thermoresponsive polymers and their colorimetric functions to sense sulfhydryl compounds have been also examined. The thermoresponsive gold nanocomposites exhibit disassembly by thermal stimuli, heating followed by cooling. Cysteine and homocysteine, sulfhydryl mono-peptide, inhibit the disassembly while cysteinylglycine, sulfhydryl di-peptide, and glutathione, sulfhydryl tri-peptides, promote the disassembly. Colorimetric quantification methods of cysteine, glutathione and  $\gamma$ -GPT are exploited based on the inhibition and promotion of the disassembly.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	4,000,000	1,200,000	5,200,000

研究分野：ナノ・マイクロ科学

科研費の分科・細目：ナノ材料・ナノバイオサイエンス A [ナノ材料] (A)ナノ材料創製

キーワード：金ナノ粒子, 化学センサー, バイオ分析, チオール化合物, 色彩計測

## 1. 研究開始当初の背景

金ナノ粒子はその形状に応じた安定した発色や触媒機能から、ナノエンジニアリングや生化学においてキーマテリアルとして用いられてきた。金ナノ粒子の発色はその表面プラズモンバンドにより生じ、粒径が 10 数 nm の粒子の場合分散状態では赤色を凝集状態では青色を示す。この色調の変化はきわめて鋭敏であることから、目視による簡易分析手段として有効である。

熱応答性高分子は外部からの熱刺激により、そのコンフォメーションを可逆的に変化させる高分子の総称であり、代表的な熱応答性高分子であるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)の場合、相転移温度以上に溶液の温度が上昇するとポリマー鎖の親水部に水和している水分子が脱離する。これにより、ポリマー鎖の構造がランダムなコイル状態からグロビュール(糸まり状態)に変化する。見方を変えると、温度コントロールという外部刺激を通して高分子鎖の構造を制御できる機能を熱応答性高分子は有しているということになる。

我々は熱応答性高分子を複合化した金ナノ粒子の機能開発について検討してきた。熱応答性高分子を複合化した金ナノ粒子については、他にも研究例があるが、熱刺激によるモルフロジーの変化を検討しているものや、触媒活性の変化を検討しているものなどあまり多くない。そして、生化学的なアプリケーションを目指した研究は知る限りない。

## 2. 研究の目的

本研究では、生理活性物質のセンシングシステムの構築を目指して、新規の熱応答性高分子の合成、合成した熱応答性高分子を複合化した金ナノ粒子の相転移挙動、我々がこれまでに見出した再分散現象の解明、および、 $\gamma$ -GTP の活性測定を行った。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 熱応答性高分子の合成

熱応答性高分子として、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド-co-メタクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチル) (p-NIP-DMAEMA) とポリ(N-イソプロピルアクリルアミド-co-アクリロイルトリエチレンテトン) (p-NIP-TETA) を合成した。これらの構造式を図 1a, b に示す。p-NIP-DMAEMA は、メタノールに N-イソプロピルアクリルアミドとメタクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルをそれぞれ適量溶解し、ラジカル重合により合成し、ジエチルエーテルを用いる沈殿法により精製した。p-NIP-TETA は、トリエチレンテトラミンと塩化アクリロイルとを反応させたビニル

化トリエチレンテトラミンを前もって合成し、これと N-イソプロピルアクリルアミドとをラジカル共重合させた。ジエチルエーテルを用いる沈殿法と透析を行い得られたポリマーを生成した。

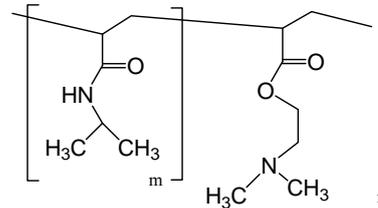


図 1a

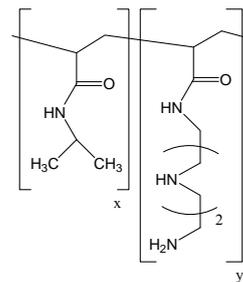


図 1b

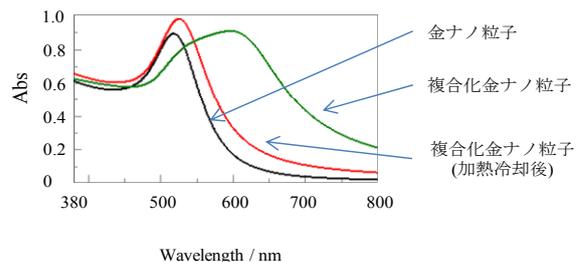


図 2 p-NIP-DMAEMA を被覆した金ナノ粒子のスペクトル

### 3-2. 熱応答性高分子を複合化した金ナノ粒子の調製と再分散

金ナノ粒子にはクエン酸還元法により調製した粒径約 13 nm のものと、 $\text{NaBH}_4$ 還元法により調製した粒径 7 nm のものを用いた。再分散現象に関する検討については、粒径約 13 nm の金ナノ粒子を用いた。

0.048g-Au/L 金ナノ粒子 3mL に 1wt% 熱応答性高分子溶液を 5mL 添加したのち、10mL とした。この溶液を加熱(90°C)、冷却(4°C)したのちに可視吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルの測定を行った。

### 3-3. 生理活性物質のセンシングシステムの構築

本研究では、生理活性物質としてホモシステインと  $\gamma$ -GTP の計測法について検討した。ホモシステインの計測手順を以下に示す。0.090 g/L 金ナノ粒子 6.0 mL を遠心沈殿管

にとり、0.5 wt% p-NIP-DMAEMA (90 : 10) を 1.0 mL 加える。さらに、ホモシステインを含む試料溶液を加えて全量を 10 mL としたのちに、60°C で 30 分間加熱し、60 分間冷却し可視吸収スペクトルおよび  $L^*a^*b^*$  値を測定した。 $\gamma$ -GTP 活性の測定は以下の手順で行った。0.18 g-Au/L 金ナノ粒子溶液 3.0 mL に、2 wt% p-NIP-TETA 溶液 1.0 mL、グリシンおよびグルタチオンを加える。最後に  $\gamma$ -GTP を含む試料溶液を適当量加えて全量を 10 mL にしたのち、37 °C で 40 分間インキュベートする。可視吸収スペクトルおよび  $L^*a^*b^*$  値を測定した。

#### 4. 研究成果

##### 4-1. 熱応答性高分子を複合化した金ナノ粒子の調製と再分散

p-NIP-DMAEMA も p-NIP-TETA も官能基として、アミノ基を有する。このアミノ基により金ナノ粒子が凝集する。結果として金ナノ粒子は青色を呈する。この溶液を加熱冷却すると熱応答性高分子の相転移に伴い金ナノ粒子は再度分散状態に戻り、その溶液は赤色に戻る。このときのスペクトル変化を図 2 に示す。この再分散現象に影響する因子として、pH、加熱温度、金ナノ粒子濃度、ポリマー濃度、反応時間、熱応答性高分子の濃度がある。加熱温度はポリマーの相転移に影響するため重要な因子である。p-NIP-TETA の場合では加熱温度が高いほど再分散が進み、溶液の赤みは強くなる。これに対して、p-NIP-DMAEMA の場合には加熱温度 60°C で最も再分散が進行した。p-NIP-DMAEMA が加熱により加水分解することがその原因であると考えられる。

##### 4-2. p-NIP-DMAEMA を被覆した金ナノ粒子によるホモシステインの計測

p-NIP-DMAEMA を複合化した金ナノ粒子の再分散は、チオール化合物の添加によって影響を受ける。 $1 \times 10^{-6}$  mol / L となるようにチオール化合物を添加した金ナノ粒子では、チオール化合物による再分散に対する影響はなかった。 $1 \times 10^{-5}$  mol / L になると、ホモシステイン、ペニシラミン及びアミノエタンチオールなどが金ナノ粒子の再分散に対して阻害剤として作用し、グルタチオン、3-メルカプトプロピオン酸などが促進剤として作用した。

L-システインを添加した金ナノ粒子は再分散に対して影響を与えなかった。メチレン鎖 1 つしか違わないホモシステインが再分散を著しく阻害することを考慮すると、この金ナノ粒子は非常に高い識別能を有しているものと推測される。そこで L-システインとホモシステインの濃度が金ナノ粒子に与える影響について検討を行った (図. 3)。その結果、L-システイン共存下でホモシステイ

ンを選択的に計測できることが明らかになった。

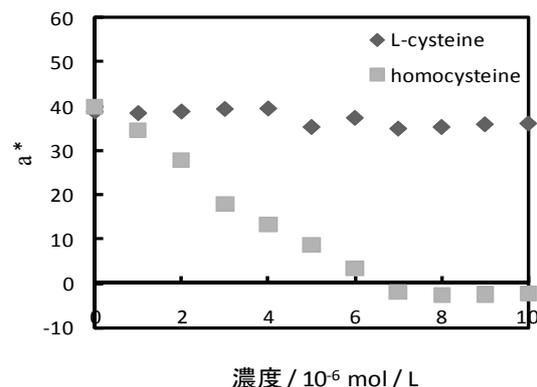


図 3 チオール化合物濃度と金ナノ粒子溶液の  $a^*$  値との関係

##### 4-3. p-NIP-TETA を被覆した金ナノ粒子による $\gamma$ -GTP の計測

ポリイソプロピルアクリルアミドにポリアミノ基を導入した高分子を金ナノ粒子と複合化した金ナノ複合体が、グルタチオンやシステニルグリシンの存在により、自発的に再分散することを見いだした。この再分散を促進させる効果はシステニルグリシンの方がグルタチオンに比べはるかに大きい。すなわち、グルタチオンを添加した場合には、金ナノ複合体の溶液の色調はゆっくりと青から赤へと変化するが、システニルグリシンを添加した場合には、赤色への変化が速やかに起こる。

$\gamma$ -GTP は、グルタチオンをシステニルグリシンとグルタミン酸に分解する酵素である。開発した手順は金ナノ複合体の溶液とグルタチオンの溶液 (補酵素のグリシルグリシン) をそして  $\gamma$ -GTP を含む酵素溶液を混合するだけである。 $\gamma$ -GTP の作用により、グルタチオンの量が減り、システニルグリシンの量が増えることで、赤色への変化が促進された。この原理に基づき、一定時間後の溶液の色調を目視で判断することにより、 $\gamma$ -GTP の活性が測定された。

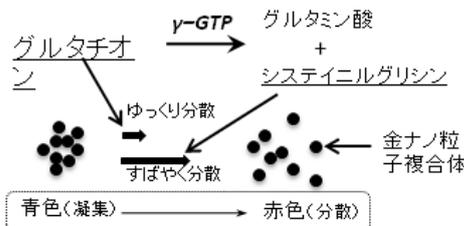


図 4 金ナノ粒子複合体の色調変化を

利用する  $\gamma$ -GTP の目視計測

P-NIP 共存下において熱刺激を加えると 540nm 付近の吸光度が上昇した。このとき金ナノ粒子の粒径が成長していることが TEM により確認された。これは熱刺激による P-NIP の収縮によって金ナノ粒子が成長したことを示唆している。このことは熱刺激により、金ナノ粒子の成長を制御できる(以後、ナノプロセッシングと呼ぶ)可能性を示している。また、ナノプロセッシングはチオール化合物の共存により阻害される。このことにより、チオール化合物のセンシングシステムへの応用の可能性が見出せた。

一方、蛍光特性と熱刺激との間に明確な違いが見られなかった。TEM によって加熱後に成長した粒子とともに成長していない粒子が残存していることが確認された。成長していない粒子による蛍光が、その原因と推測される。

#### 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 3 件)

- ① N. Uehara, M. Fujita, and T. Shimizu  
Thermal-induced Growth of Gold Nanoparticles Conjugated with Thermoresponsive Polymer without Chemical Reduction  
J. Coll. Int. Sci., 359, pp. 142-147 (2011).
- ② N. Uehara, K. Ookubo, T. Shimizu  
Colorimetric Assay of Glutathione Based on Spontaneous Disassembly of Aggregated Gold Nanocomposites Conjugated with Water-Soluble Polymer  
Langmuir, 26(9), pp. 6818-6825 (2010).
- ③ N. Uehara, M. Fujita, T. Shimizu  
Colorimetric Assay of Aminopeptidase N Activity Based on Inhibition of the Disassembly of gold nano-composites conjugated with a Thermo-responsive Copolymer  
Anal. Sci., 25, 267-273(2009).

[学会発表] (計 13 件, うち主要なもの 9 件を以下に示す)

- ① N. Uehara Invited  
Synthesis of Gold Nanoparticles from Gold Nanoclusters Conjugated with Thermoresponsive Polymer by Thermal Stimuli  
Pacifichem 2010 (2010, Honolulu, Hawaii) 2010/12/17
- ② 上原伸夫, 藤田牧, 清水得夫  
熱応答性高分子を被覆した金ナノクラ

スターからの熱刺激による金ナノ粒子の創製

日本分析化学会第 59 年会講演要旨集 P2090, p. 270 (2010) 2010/9/16

- ③ 上原伸夫, 吉田蔵, 清水得夫  
熱応答性高分子を被覆した金ナノ粒子の分析化学的利用  
分析化学東京カンファレンス 2010 講演要旨集 p. 294 (2010) 2010/9/3
- ④ 上原伸夫, 藤田牧, 清水得夫  
熱応答性高分子被覆型金ナノ粒子の吸光・蛍光特性に基づくチオール化合物のセンシング  
日本分析化学会第 58 年会講演要旨集 P3053, p. 330 (2009) 2009/9/26
- ⑤ 上原伸夫, 藤田牧, 清水得夫  
熱応答性高分子: 金微粒子のナノプロセッシング用マテリアル  
分析化学東京カンファレンス 2009 講演要旨集 P091 p. 354 (2009) 2009/9/4
- ⑥ 上原伸夫  
高分子を被覆した金ナノ粒子を用いる生理活性物質の簡易計測法  
日本化学会 第 3 回関東支部大会 2B4-11 (2009) (招待講演) 2009/9/4
- ⑦ 上原伸夫, 矢野雄志, 清水得夫  
熱応答性高分子を複合化した金ナノ粒子を用いるホモシテインの色彩計測  
第 70 回分析化学討論会講演要旨集 E1015, p. 90 (2009) 2009/5/16
- ⑧ 上原伸夫, 藤田牧, 野呂純二, 清水得夫  
熱応答性高分子を被覆した金ナノ粒子の凝集/分散挙動に及ぼすチオール化合物の効果  
日本分析化学会第 57 年会講演要旨集 I3021, p. 185 (2008) 2008/9/12
- ⑨ 上原伸夫, 大久保光揮, 野呂純二, 清水得夫  
熱応答性高分子を複合化した金ナノ粒子を用いる  $\gamma$ -GTP 活性の測定  
第 69 回分析化学討論会講演要旨集 F1006, p. 107 (2008) 2008/5/15

[図書] (計 1 件)

Nobuo Uehara and Tsutomu Nagaoka, "Nanomaterials for the Life Sciences Vol. 8 Nanocomposites" Edited by Challa Kumar, Chapter 6 "Gold - polymer Nanocomposites " p.199-240, Wiley-Vch (2010).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 金ナノ粒子及びその調製方法  
発明者: 上原伸夫

権利者：国立大学法人 宇都宮大学  
種類：  
番号：特願 2010-44792  
出願年月日：2010年3月1日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.chem.utsunomiya-u.ac.jp/lab/bunseki/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上原伸夫 (UEHARA NOBUO)  
宇都宮大学・工学研究科・准教授  
研究者番号：50203469

### (3) 連携研究者

早下隆士 (HAYASHITA TAKASHI)  
上智大学・理工学部・教授  
研究者番号：70183564