

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24360026

研究課題名(和文) 蛍光性金属ナノクラスター科学の開拓研究

研究課題名(英文) Synthesis and evaluation of photoluminescent metal nanoclusters

研究代表者

井上 康志 (INOUE, Yasushi)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：60294047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：極小構造を構成することで、量子性を顕在化し、電子エネルギー状態を離散化することで発光性を獲得する白金ナノクラスターの作製法を確立した。 dendrimersあるいはポリマー内で白金錯体を形成させた後、還元することで緑色発光および黄色発光の白金ナノクラスターを合成し、ナノクラスターの光学特性や分子量、電子状態、サイズなどの計測・評価を行った。また、白金ナノクラスターの表面修飾等を行うことでHeLa細胞に特異的に発現するケモカイン受容体の蛍光顕微イメージングを実現した。さらに、蛍光強度の変化を測定することで、金属イオン濃度の検出センサーやpHセンサーとして白金ナノクラスターが機能することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have established a synthetic method of platinum nanoclusters that acquire luminescent ability due to discretization of electronic states in a limited number of atoms. Green and yellow emitting platinum nanoclusters were synthesized via reduction of platinum ions after formation of complex in dendrimers or polymer. Then, optical properties, molecular weight, electronic states and size of the nanoclusters were measured and evaluated. Bio-imaging of chemokine receptors expressed in HeLa cells was achieved through surface modification of the green-emitting platinum nanoclusters. Finally, we demonstrated that the yellow-emitting platinum nanoclusters work as metal ion sensors and pH sensors via intensity change of photoluminescence.

研究分野：ナノフォトニクス

キーワード：金属ナノクラスター 光物性制御 蛍光プローブ 白金原子 バイオイメージング ナノフォトニクス

1. 研究開始当初の背景

金属光沢や局在表面プラズモンなど金属特有の光学特性は金属内の自由電子と光との相互作用に起因し、連続的なエネルギーを有する自由電子が集団的に振動することで生起する。一方、金属構造がダウンサイジングされ、金属原子数個から数 10 個より構成される金属ナノクラスターでは、量子性が顕在化し、電子エネルギー状態が離散化されることで発光性を有するなど、従来の金属とは異なる特性を発現するようになる。さらに、ナノクラスターサイズは 1 nm 程度以下であり、蛍光性半導体量子ドット (CdSe、CdS など) よりも小さく、標識した生体分子が会合したときなどに立体障害を起こしにくい上、元素自体の毒性も低い。また、有機蛍光色素のような複雑な合成過程が不要で、水溶液中での還元反応で作製でき、配位子交換などによる表面修飾を行うだけで生体プローブとしての機能を発現させることが可能である。申請者らは、白金を用いて青色発光ナノクラスターを合成すること、および金属ナノクラスター合成後、メルカプト酢酸による配位子交換をすることで合成場である dendrimer を除去し、さらにサイズ排除クロマトグラフィーにより蛍光性白金ナノクラスターだけを精製し、抽出できることを世界に先駆けて成功している。

2. 研究の目的

本研究では、dendrimer やポリマーをテンプレート合成場として白金イオン錯体を形成し、還元することで、蛍光性白金ナノクラスターを作製する。このプロセスの中で、白金イオン、dendrimer 等のテンプレート、還元剤のモル比等を変えることで、クラスターサイズ依存した発光波長を制御する技術を確認し、長波長化することで、散乱効果を低減し、生体の深部観察実現を目指す。さらに、蛍光性白金ナノクラスターの構造、合成メカニズム、電子エネルギー状態、発光メカニズムなどの光物性を物理的に解明するとともに、バイオイメージングや医療的な応用へも視野に入れ、蛍光性白金ナノクラスターのサイエンスとテクノロジーを開拓する。これら研究を通して、有機色素、GFP など蛍光性タンパク質、半導体量子ドットに続く第 4 の標識マーカーとしての可能性を探求する。

3. 研究の方法

ナノクラスターという極小構造を構成することで光る特性を獲得する金属ナノ構造体の科学の確立と工学的応用を目指し、発光波長の長波長化を実現する白金ナノクラスター作製法の検討、作製したナノクラスターの光学特性等の計測・評価、機能化に関する検討、構造解析、合成メカニズムの解明およびバイオイメージング等への応用に関する研究を推進する。

4. 研究成果

(1) 緑色発光白金ナノクラスターの合成と物性評価

蛍光性白金ナノクラスターの発光波長を長波長化するため、ナノクラスターの構成原子数の増大を目指し、テンプレートとして用いるポリアミドアミン (PAMAM) dendrimer 内に取込まれる白金イオン数を極大化する条件等を評価した。具体的には、六塩化白金酸 (H_2PtCl_6) と PAMAM を混合した溶液内において、白金イオンが PAMAM 内の窒素原子と錯体形成した際に観察される LMCT (Ligand to Metal Charge Transfer) 遷移による紫外光吸収 ($\lambda = 250nm$) の変化を時系列に計測した (図 1)。その結果、白金イオンと PAMAM dendrimer を溶液内で混合した後、24 時間後に吸光度が極大となることを見出し、その時点で還元剤 (クエン酸ナトリウム) を加え、攪拌することで、白金ナノクラスターを合成することとした。その後、PAMAM をメルカプト酢酸と配位子交換することで、白金ナノクラスターから分離し、サイズ排除高速液体クロマトグラフィーにより精製した (図 2)。HPLC の fraction 1 の励起・蛍光マトリックススペクトルを測定したところ、420nm に吸収ピーク、520nm に発光ピークが観察された (図 3)。さらに、エレクトロスプレーイオン化

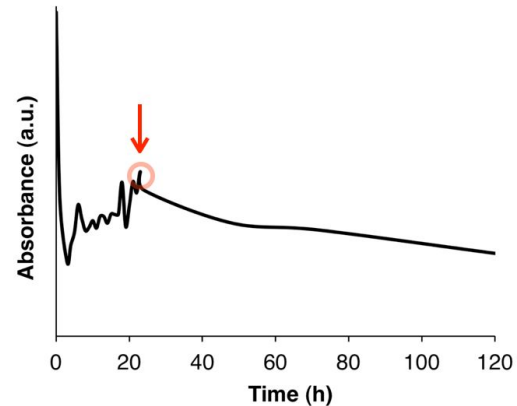


図 1 LMCT 遷移による紫外光吸収

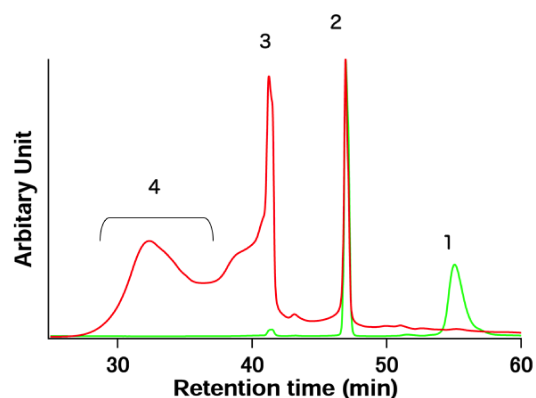


図 2 配位子交換後の HPLC による分離
(緑のラインは蛍光@520nm、赤のラインは吸収@290nm で測定した)

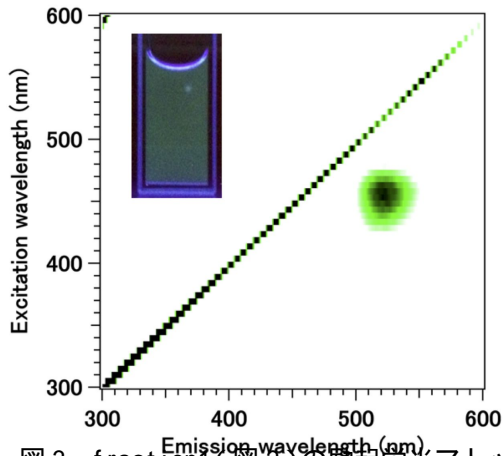


図3 fraction1(図2)の励起蛍光マトリックススペクトル

(ESI)質量分析法により、生成物が8個の白金原子から構成されることを見いだした(図4)。以上の結果から、白金ナノクラスタの原子数を5個から8個に増大させることで、発光波長を長波長化することに成功した。さらに、合成した緑色白金ナノクラスタの絶対量子収率を測定したところ、28%に達することが分かり、これまでに報告されている緑色発光を有する金ナノクラスタや銀ナノクラスタより高い量子収率が実現できることを明らかにした。

次に、合成した緑色発光白金ナノクラスタの拡散定数、濃度を測定するため、蛍光強度揺らぎからそれらパラメータを決定できる蛍光相関分光(FCS)システムを構築した。その結果、拡散定数が $(2.83 \pm 0.79) \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ 、濃度が $0.443 \pm 0.088 \text{ nM}$ となることを示した。さらに、得られた拡散定数から緑色発光白金ナノクラスタの流体力学的半径が $0.87 \pm 0.24 \text{ nm}$ であることを明らかにした。

(2) 黄色発光白金ナノクラスタの合成と物性評価

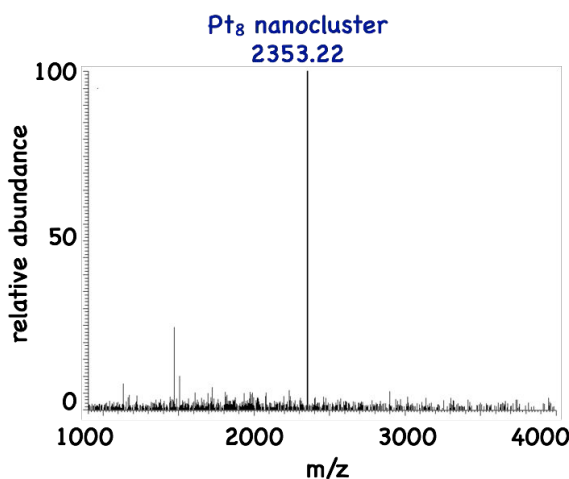


図4 fraction 1(図2)の質量スペクトル

蛍光のさらなる長波長化を目指し、高分子の一種である超分岐ポリエチレンイミン(PEI)をナノクラスタ合成のテンプレートとして用いることで、ナノクラスタ構成原子数の増大を図った。六塩化白金酸(H_2PtCl_6)溶液とPEI溶液を純水中で混合し、白金錯体をPEI内で形成した後、アスコルビン酸により還元し、白金ナノクラスタを合成した。この際、白金イオンと還元剤であるアスコルビン酸のモル比を1:5、1:20、1:25と変えることで、合成後の蛍光ピーク波長が465nm、530nm、560nmと変化することを見出した。これまでのPAMAMをテンプレートとして用いて合成した場合と比べて、黄色の蛍光(560nm)を有する白金ナノクラスタをはじめ合成することに成功した。図5にその励起蛍光スペクトルを示す。さらに、白金ナノクラスタ合成時における錯体形成過程を明らかにするため、フーリエ変換赤外分光・紫外共鳴ラマン散乱分光などの振動分光法を用いて解析を行った。その結果、白金の錯体が形成されるPEI内の部位を解明することができた。

つぎに、PEIをテンプレートとして用いて合成した白金ナノクラスタの電子状態を、X線光電子分光法(XPS)を用いて、解析した。得られたXPSスペクトルでは、 $4f_{7/2}$ のピークが72.4eVに、 $4f_{5/2}$ のピークが75.9eVに観察された。この結果から、合成した白金ナノクラスタの酸化状態は0価であり、十分に還元されていることを見出した。また、透過電子顕微鏡を用いて、青色蛍光性、緑色蛍光性、黄色蛍光性の白金ナノクラスタの構造をそれぞれ観察・解析した。その結果、発光波長が長くなるほど、ナノクラスタサイズが大きくなることを確認した。

(3) バイオイメージング・金属イオンセン

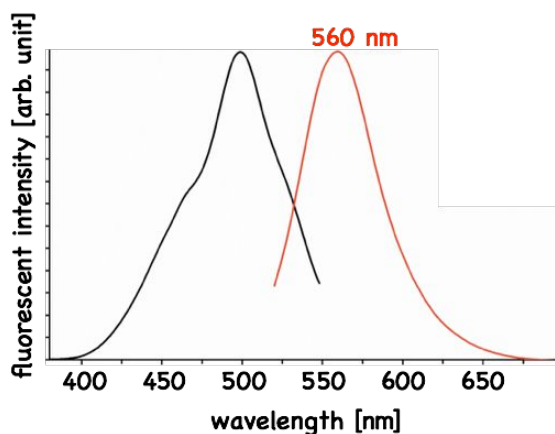


図5 PEIをテンプレートとして合成した黄色発光白金ナノクラスタの励起蛍光スペクトル

サー等への応用

合成した緑色発光白金ナノクラスタの生体分子イメージングへの適用を検討した。具体的には、HeLa 細胞に特異的に発現するケモカイン受容体 CXCR4 に対する抗体 (anti-CXCR4-Ab) を Protein A を介して、メルカプト酢酸で置換された白金ナノクラスタに結合させた。このプローブを HeLa 細胞に投与し、顕微蛍光イメージングを行ったところ、図 6 に示すように HeLa 細胞上のケモカイン受容体を観察できることを見出した。また、白金ナノクラスタの細胞毒性

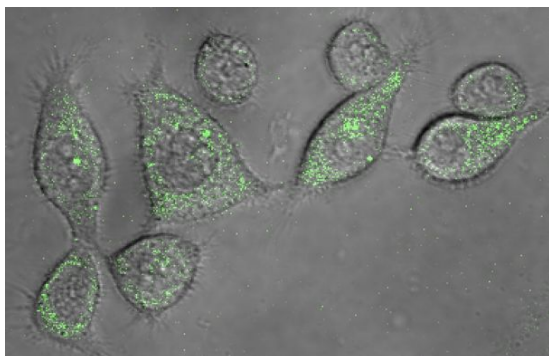


図 6 緑色発光白金ナノクラスタによる HeLa 細胞に発現したケモカイン受容体の生体分子イメージング

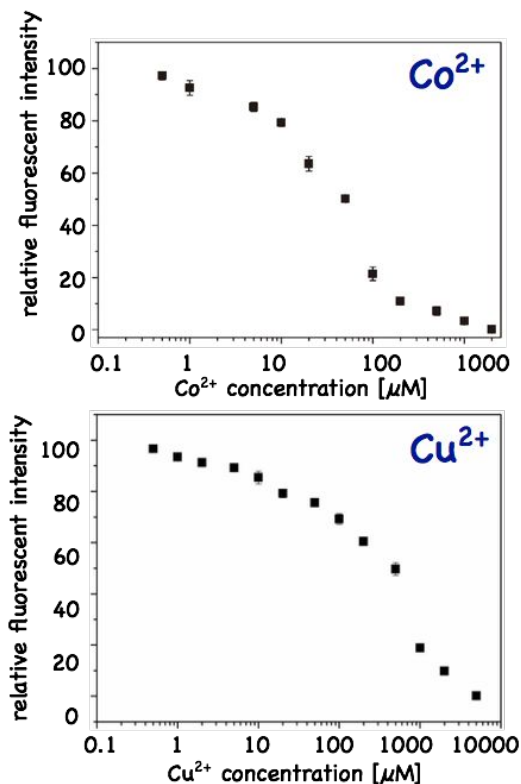


図 7 コバルトイオン (上) および銅イオン (下) 濃度に対する黄色発光白金ナノクラスタの蛍光強度依存性

を評価したところ、白金ナノクラスタ投与後 48 時間後の細胞の生存率は 97% を超え、細胞に対する毒性が低いことを明らかにした。

つぎに、白金ナノクラスタの機能性について検討を行った。黄色発光白金ナノクラスタ溶液の水素イオン指数 (pH) を変化させながら、蛍光スペクトルを測定したところ、発光ピーク波長は pH に依存することなく一定であった。一方、蛍光強度は pH に依存し、pH が低くなると蛍光強度が上昇し、pH が高くなると蛍光強度が減少した。とくに、pH が 4 以下のとき蛍光強度が急峻に上昇したことから、強酸下での pH センサーとしての利用が可能であることを見出した。つづいて、黄色発光白金ナノクラスタ溶液内に各種金属イオンを加えたところ、カルシウムイオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、白金イオン等では蛍光強度に変化がない一方、コバルトイオンおよび銅イオンでは蛍光が減少することを観察した (図 7)。このことから、白金ナノクラスタの蛍光強度の変化からコバルトイオンおよび銅イオンを定量的に検出する試薬として利用できることを見出した。とくに、コバルトイオンでは、500nM の検出限界を実現している。

また、電気化学アナライザーを用いて、PEI を用いて合成した白金ナノクラスタの酸化還元電位をサイクリックボルタメトリー (CV) 法により測定した。その結果、白金ナノクラスタは可逆的な酸化還元反応を有することを見出した。さらに、ナノクラスタサイズが大きいほど、酸化還元ピーク電流が大きく、触媒作用が高いことを明らかにした。

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)

Xin Huang, Koichi Aoki, Hidekazu Ishitobi, and Yasushi Inouye, "Preparation of Pt Nanoclusters with Different Emission Wavelengths and Their Application in Co²⁺ Detection," ChemPhysChem 15, 642-646, DOI: 10.1002/cphc.201301115 (2014). 査読有

James A.J. Fitzpatrick, Yasushi Inouye, Suliana Manley, and W.E. Moerner "From There's Plenty of Room at the Bottom' to Seeing What is Actually There" ChemPhysChem Editorial 15, 547-549, DOI: 10.1002/cphc.201400097 (2014). 査読無

S. Tanaka, K. Aoki, A. Muratsugu, H. Ishitobi, J. Takashi and Y. Inouye, "Synthesis of green-emitting Pt₈

nanoclusters for biomedical imaging by pre-equilibrated Pt/PAMAM (G4-OH) and mild reduction," *Optical Materials Express*, 3, 157-165, DOI: 10.1364/OME.3.000157 (2013). 査読有

[学会発表](計11件)

井上 康志

Nano-Investigation of DNA Conformation Change by using Gold Nano-dimers

Japan-Morocco Handai Project on Functional Nanophotonics Kick-Off Workshop (2015/2/25 - 26 MAScIR, Rabat, Morocco)

井上 康志

Functional nano-metal for bio-sensing and imaging

Japan-Singapore International Workshop on Nanophotonics, Plasmonics and Metamaterials (2014/12/12, Nanyang Technological University, Singapore)

井上 康志, Huang Xin, 石飛 秀和
超分岐ポリマーを用いた蛍光性プラチナ・ナノクラスターの合成

応用物理学会 2014 秋 (2014/09/16-21 北海道大学、北海道)

T. Tokuyama, K. Aoki, X. Huang, H. Ishitobi, and Y. Inouye,
"Photoluminescent Platinum Nanoclusters,"

応用物理学会関西支部平成 25 年度第 3 回講演会 (大阪大学、大阪府、2014 年 2 月 28 日)

Yasushi Inouye,

"Nano-metal for nano- biomedical imaging"

Japan Taiwan Bilateral Conference on Biomedical and Plasmonic Imaging (National Taiwan University, Taipei, Taiwan, Feb. 26, 2014)

X. Huang, K. Aoki, H. Ishitobi, and Y. Inouye,

"Facile preparation of fluorescent platinum nanoclusters with different emission wavelengths using hyperbranched PEI as the stabilizing agent,"

Japan Taiwan Bilateral Conference on Biomedical and Plasmonic Imaging (National Taiwan University, Taipei, Taiwan, Feb. 26, 2014)

X. Huang and Y. Inouye,

"Facile and environment-friendly preparation of the fluorescent platinum nanoclusters with various emission wavelengths,"

平成 25 年度日本分光学会年次講演会 (大阪大学、大阪府 2013 年 11 月 19 日)

K. Aoki, X. Huang, H. Ishitobi, and Y. Inouye,

"Photoluminescent platinum nanoclusters," UV-DUV Plasmonics and Nanophotonics Workshop (UPN2013), (Osaka University, Osaka, Japan Oct. 28, 2013)

Y. Inouye,

"Fluorescent platinum nanoclusters: synthesis and characterization," Asian CORE Workshop in Morocco 2013 (2013/3/7, MAScIR, Rabat, Morocco)

Y. Inouye,

"Metallic nanoclusters for nano-imaging and nano-sensing," AIST-ANNA Symposium (千里ライフサイエンスセンター、大阪府、2012 年 10 月 17 日)

K. Aoki, S. Tanaka, A. Muratsugu, H. Ishitobi, T. Jin, Y. Inouye,

"Synthesis and characterization of green-emitting Pt₈ nanoclusters," The 73rd JSAP Autumn Meeting (愛媛大学、愛媛県、2012 年 9 月 11 日)

[図書](計1件)

Shin-ichi Tanaka, and Yasushi Inouye, 'Synthesis of fluorescent platinum nanoclusters for biomedical imaging' "Functional Nanometer-Sized Clusters of Transition Metals: Synthesis, Properties and Applications" Wei Chen, Shaowei Chen ed., RSC Smart Materials (Royal Society of Chemistry (UK) 2014, 391-406)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 康志 (INOUE, Yasushi)
大阪大学・生命機能研究科・教授
研究者番号: 6 0 2 9 4 0 4 7

(2) 連携研究者

石飛 秀和 (ISHITOBI, Hidekazu)
大阪大学・生命機能研究科・助教
研究者番号: 2 0 3 7 2 6 3 3