

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410161

研究課題名(和文) ペプチドを介した配位子固定化金ナノ粒子のワンポット合成と有害金属の高感度比色検出

研究課題名(英文) One-pot fabrication of ligand-decorated gold nanoparticles using peptide and high-sensitive colorimetric detection of toxic metal ions

研究代表者

下条 晃司郎 (SHIMOJO, Kojiro)

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 原子力基礎工学研究センター・研究副主幹

研究者番号：50414587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では有害金属イオンの1種である水銀イオンに対して応答性を有する金ナノ粒子を簡便に合成し、水銀イオンを選択的かつ高感度に検出する比色センサーの開発を目的としている。その結果、金結合能を有するペプチドと水銀イオンに対して選択性を有するジグリコールアミド酸を融合し、これを金イオンと混ぜることで、金ナノ粒子の合成と配位子の固定化を同時に行い、ワンポットで配位子固定化金ナノ粒子を合成する手法を開発した。さらに、得られた金ナノ粒子は水銀イオンと反応することで凝集し、赤色から青紫色への色変化によって水銀イオンを検出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：This study focuses on the development of facile fabrication of gold nanoparticles (AuNPs) that can enable selective and high-sensitive colorimetric detection of toxic mercury Hg(II) ions. We prepared a peptide-substituted ligand (DGAA-A3) consisting of gold-binding peptide (A3) fused to diglycolamic acid framework (DGAA) with selectivity for Hg(II) ions. We have developed a simple one-pot strategy to fabricate DGAA-decorated AuNPs using the DGAA-A3 that can simultaneously direct both the synthesis of AuNPs and the immobilization of DGAA on the AuNPs in a single step. In addition, DGAA-decorated AuNPs can detect Hg(II) ions by simple color change from red to blue, based on cross-linkage of AuNPs by binding between Hg(II) ions and DGAA on the AuNPs.

研究分野：分析化学

キーワード：金ナノ粒子 ペプチド 配位子 有害金属 比色センサー

### 1. 研究開始当初の背景

有害金属イオンは生物の体内に濃縮されやすい特徴をもつため、微量濃度でも環境に放出されれば人体に悪影響を及ぼす可能性がある。そのため、有害金属イオンを選択的かつ高感度に検出するシステムの開発が望まれている。一般的に有害金属イオンの測定は原子吸光法やICP発光分光法といった分析装置を用いて高感度かつ定量的に測定することができる。しかし、(1)非常に高価であり、設備を必要とする。(2)on-siteでの測定ができないといった問題を抱えている。

従来法に代わる有力な手法として、特定の金属イオンを識別可能な化学センサーが注目されている。一般的な化学センサーは、金属イオンに反応して発色・発光を示し、環境試料をその場で迅速に目視によって観測できる利点がある。これまでの研究例として、金属イオン認識部位を組み込んだ蛍光プローブが開発されているが、(1)水に難溶性である。(2)蛍光プローブ自体が有害である。(3)劣化・分解が起こりやすく、安定性が低いといった問題を抱えている。

一方、金ナノ粒子は可視光領域に表面プラズモン共鳴が生じ、その粒子の大きさや形状に依存して色が変化する分光学的性質(粒径小:赤 粒径大:青)を有している。また、金ナノ粒子は毒性が低く、劣化や耐蝕に対して安定性が高いため、蛍光プローブより優れた化学センサーとして期待できる。これまでに金ナノ粒子表面に、特定の金属イオンに対してのみ結合する配位子を固定化することで、金属イオン応答性の比色センサーが開発されている。しかしながら、配位子固定化金ナノ粒子の合成法には次のような改善の余地がある。(1)クエン酸等の還元剤による金ナノ粒子の合成とチオール基を介した配位子の固定化の2ステップが最低必要であり、操作が煩雑で時間を要する。(2)配位子の固定化の過程で、金ナノ粒子表面を保護しているクエン酸が完全に除去できず、配位子の固定化率の低下や金属イオンの選択性へ悪影響を及ぼす。(3)ソフト性金属や還元剤が共存する場合、固定化した配位子が解離する可能性がある。従って、従来法より簡便・迅速・高効率な合成法が望まれている。

### 2. 研究の目的

本研究では有害金属イオンの1種である水銀イオン( $Hg^{2+}$ )に対して応答性を有する金ナノ粒子を簡便に合成し、水銀イオンを選択的かつ高感度に検出する比色センサーの開発を目的としている。具体的には金結合能を有するペプチドに水銀イオンに対して選択性を有する配位子を融合し、金イオンと反応させることで、金ナノ粒子の合成と配位子の固定化を同時に行い、ワンポットで配位子固定化金ナノ粒子を合成する手法を開発する。さらに、配位子と水銀イオンの結合により金ナノ粒子の凝集を誘発することで、色変化に

基づく水銀イオン応答センサーを開発する。

### 3. 研究の方法

本研究では配位子融合ペプチドを用いて簡便に金ナノ粒子を合成し、同時に金ナノ粒子表面へ効率的に配位子を固定する。さらに、金ナノ粒子に固定化した配位子と水銀イオン間の相互作用を介して金ナノ粒子の凝集を誘発し、色変化によって水銀イオンを検出する比色センサーを開発する。

検討した内容は以下のとおりである。

- (1) 水銀イオンに高い選択性を有する配位子の合成
- (2) 金結合性ペプチドと水銀イオン選択性配位子の融合
- (3) 配位子固定化金ナノ粒子のワンポット合成
- (4) 金ナノ粒子を用いた水銀イオンの比色検出

### 4. 研究成果

- (1) 水銀イオンに高い選択性を有する配位子の合成

我々はこれまでに、カルボン酸とアミド基をエーテル鎖で連結したジグリコールアミド酸(DGAA)型キレート配位子を開発し、種々の金属イオンに対する結合性について検討を重ねてきた。これにオクチル基を導入した疎水性配位子  $C_8$ DGAA を合成し、溶媒抽出法を用いて水銀イオンに対する選択性を検討した(図1)。その結果、 $C_8$ DGAA は一般的な金属イオンの中で水銀イオンに対して高い選択性を有していることを明らかにした。

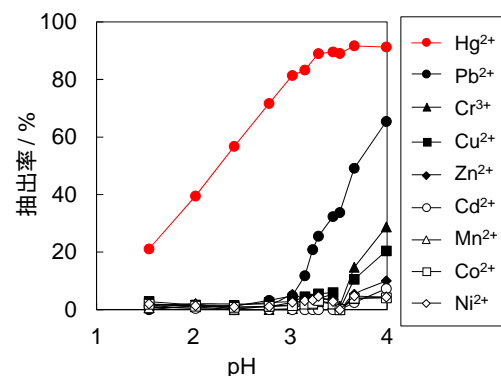
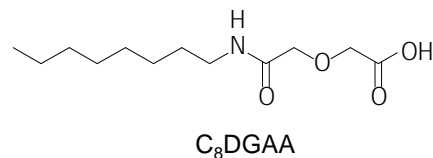
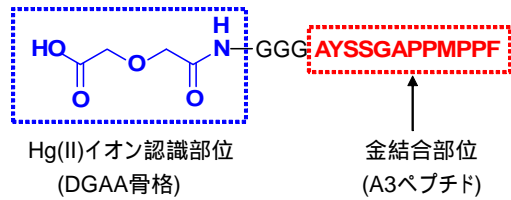


図1  $C_8$ DGAA の構造と水銀イオンに対する選択性

- (2) 金結合性ペプチドと水銀イオン選択性配位子の融合

バルクの金に対して高い結合性を示すペプチドとしてA3ペプチド(A<sub>3</sub>ペプチド(AYSSGAPPMPFF))が知られている。そこで、前述の結果を踏まえ

て、A3 ペプチドと DGAA 配位子を融合した配位子融合ペプチド(DGAA-A3)を固相合成法により合成し、分取用 HPLC により精製を行った。また MALDI-TOF MS により目的物であることを確認した(図2)。



### DGAA-A3ペプチド

図2 DGAA-A3 ペプチドの分子構造

### (3) 配位子固定化金ナノ粒子のワンポット合成

合成した DGAA-A3 ペプチドを金イオンと混ぜ合わせたところ、赤色の金ナノ粒子水溶液が得られ、524 nm 付近に金ナノ粒子特有の表面プラズモン共鳴 (SPR) バンドを示すピークが観測された(図3)。その粒子径は  $12.9 \pm 3.2$  nm と単分散であり、金ナノ粒子の合成と DGAA 配位子の固定化を1ステップで行うことに成功した。さらに、配位子融合ペプチド濃度を変化させることで粒子径を 10 nm から 35 nm まで任意に制御可能であり、1年以上経過しても安定であることを確認した。

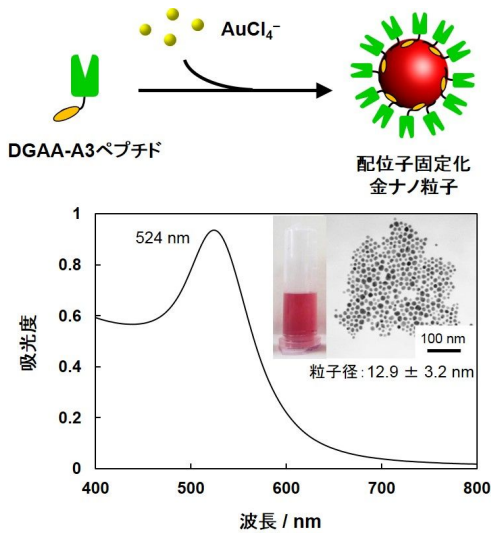


図3 DGAA-A3 ペプチドによる配位子固定化金ナノ粒子のワンポット合成

### (4) 金ナノ粒子を用いた水銀イオンの比色検出

得られた配位子固定化金ナノ粒子に水銀イオンを添加し、その比色検出能を評価した。その結果、水銀イオン添加後わずか2分間で SPR バンドが 590 nm 付近にシフトし、水溶液の色が赤色から青紫色へと変化した(図4)。この現象は DGAA 部位と  $Hg^{2+}$  の結合を介して

金ナノ粒子の架橋・凝集が誘発されたことに起因する。また、 $Hg^{2+}$  以外の 13 種類の金属イオンを用いて選択性を検討したところ、全く応答を示さなかった。 $Hg^{2+}$  に 10 倍量のお他金属を共存させても、水溶液の色は赤色から青紫色に変化し、他金属イオンによる阻害・干渉は起こらず、 $Hg^{2+}$  に対して高い選択性を示すことが明らかとなった。さらに、 $Hg^{2+}$  に対する検出限界は 1.5 nM (= 0.3 ppb) と極めて高い検出感度を示すと共に、水道水や河川水のような環境試料にも応用できることを確認した。

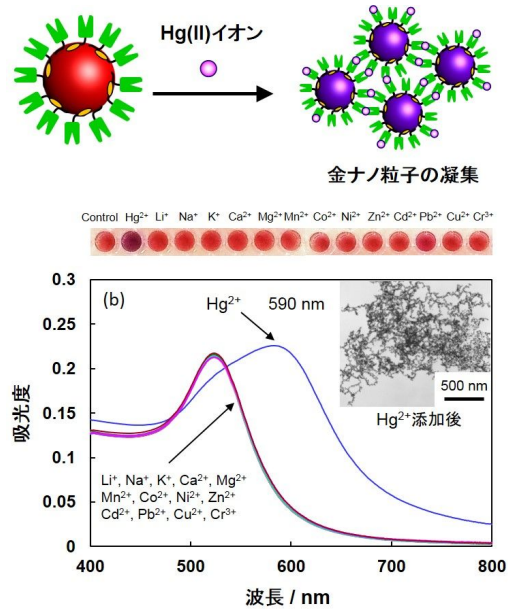


図4 金ナノ粒子による水銀イオンの比色検出

以上の結果から DGAA と金結合性ペプチドを融合することで、配位子固定化金ナノ粒子を簡単にワンポットで合成することが可能となり、また、水銀イオンのような有害金属を目視による色の変化で検出することに成功した。

### 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5件)

K. Shimojo, I. Fujiwara, K. Fujisawa, H. Okamura, T. Sugita, T. Oshima, Y. Baba, H. Naganawa

“Extraction Behavior of Rare-earth Elements Using a Mono-alkylated Diglycolamic Acid Extractant”

*Solvent Extr. Res. Dev., Jpn*, 23, 151-159 (2016), 査読有,

DOI:10.15261/serdj.23.151

K. Shimojo, H. Naganawa

“Comprehensive extraction separation

study of metal ions using *N,N*-dioctyldiglycolamic acid DODGAA”  
*Proceedings of the 20th International Solvent Extraction Conference*, 1052-1057 (2014), 査読有, DOI:無し

K. Shimojo, A. Nakai, H. Okamura, T. Saito, A. Ohashi, H. Naganawa  
“Comprehensive Extraction Study using *N,N*-Dioctyldiglycolamic Acid”  
*Anal. Sci.*, 30, 513-517 (2014), 査読有, DOI:10.2116/analsci.30.513

K. Shimojo, N. Aoyagi, T. Saito, H. Okamura, F. Kubota, M. Goto, H. Naganawa  
“Highly Efficient Extraction Separation of Lanthanides Using a Diglycolamic Acid Extractant”  
*Anal. Sci.*, 30, 263-269 (2014), 査読有, DOI:10.2116/analsci.30.263

T. Niide, K. Shimojo, R. Wakabayashi, M. Goto, N. Kamiya  
“Enzymatic Fabrication of Protein-Decorated Gold Nanoparticles by the Aid of Artificial Peptides with Gold-Binding Affinity”  
*Langmuir*, 29, 15596-15605 (2013), 査読有, DOI:10.1012/la401327h

〔学会発表〕(計10件)

下条晃司郎 “新規酸解離型ジアミド配位子を用いたレアメタルの回収と網羅的抽出特性の検討”  
日本化学会第96春季年会、2016年3月24日～27日、同志社大学京田辺キャンパス(京都府・京田辺市)

下条晃司郎 “酸解離型ジアミド系配位子を用いた金属イオンの網羅的抽出特性の検討”  
化学工学会第81年会、2016年3月13日～15日、関西大学千里山キャンパス(大阪府・吹田市)

下条晃司郎 “ジグリコールアミド酸型抽出剤：置換基と抽出分離能の相関関係”  
日本分析化学会第64年会、2015年9月9日～11日九州大学伊都キャンパス(福岡県・福岡市)

下条晃司郎 “環境化学分野における新たな分離分析システムの開発”  
平成27年度日本分析化学会関東支部若手交流会、2015年6月26日～27日、晴海グランドホテル(東京都・中央区)

下条晃司郎 “ジグリコールアミド酸を基本骨格とした抽出剤の改良と抽出特性の網羅的検討”  
第33回溶媒抽出討論会、2014年12月11日～12日、ホテルプラザ神戸(兵庫県・神戸市)

K. Shimojo “Comprehensive extraction separation study of metal ions using *N,N*-dioctyldiglycolamic acid DODGAA”  
20th International Solvent Extraction Conference (ISEC 2014), 2014年9月7日～11日、ヴェルツブルク(ドイツ)

下条晃司郎 “金結合性ペプチドを用いた水銀イオン応答性金ナノ粒子のワンポット合成”

日本化学会第94春季年会、2014年3月27日～30日、名古屋大学(愛知県・名古屋市)

下条晃司郎 “金結合性ペプチドを用いた金ナノ粒子への配位子や抗体の簡便固定化法”  
日本化学会第94春季年会、2014年3月27日～30日、名古屋大学(愛知県・名古屋市)

下条晃司郎 “ペプチド融合ジグリコールアミド酸型配位子を修飾した金ナノ粒子による水銀イオンの比色検出”  
第29回日本イオン交換研究発表会、2013年10月17日～18日、東北大学青葉山キャンパス(宮城県・仙台市)

下条晃司郎 “金結合性ペプチドを融合した配位子による水銀イオン応答性金ナノ粒子のワンポット合成”  
日本分析化学会第62年会、2013年9月10日～12日、近畿大学東大阪キャンパス(大阪府・東大阪市)

〔産業財産権〕  
出願状況(計4件)

名称：ニトリロ酢酸ジアセトアミド化合物、抽出剤、及び抽出方法  
発明者：下条晃司郎、長縄弘親、岡村浩之  
権利者：日本原子力研究開発機構  
種類：特許  
番号：特願2015-229662  
出願年月日：2015年11月25日  
国内外の別：国内

名称：金属元素の分離方法  
発明者：下条晃司郎、長縄弘親、岡村浩之  
権利者：日本原子力研究開発機構  
種類：特許  
番号：特願2015-229968  
出願年月日：2015年11月25日  
国内外の別：国内

名称：ニッケル元素の回収方法  
発明者：下条晃司郎、長縄弘親、岡村浩之  
権利者：日本原子力研究開発機構  
種類：特許  
番号：特願2015-229553  
出願年月日：2015年11月25日  
国内外の別：国内

名称：アミド化リン酸エステル化合物、抽出剤、及び抽出方法  
発明者：下条晃司郎、長縄弘親、岡村浩之、杉田剛  
権利者：日本原子力研究開発機構  
種類：特許  
番号：特願2015-229570  
出願年月日：2015年11月25日  
国内外の別：国内

取得状況（計0件）

6．研究組織

(1)研究代表者

下条 晃司郎（SHIMOJO, Kojiro）

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構  
原子力科学研究部門 原子力基礎工  
学研究センター 研究副主幹

研究者番号：50414587