

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：55401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25810100

研究課題名(和文)白金ナノクラスター蛍光・電子顕微鏡両用プローブを利用した生命機能可視化技術の創成

研究課題名(英文) Development of Biocompatible Platinum Nanoclusters as Fluorescence and Electron Microscopic Imaging Probes and Application to Biomedical Imaging

研究代表者

田中 慎一 (Tanaka, Shin-ichi)

呉工業高等専門学校・自然科学系分野・准教授

研究者番号：30455357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では蛍光・電子顕微鏡両用プローブとして『nm』のサイズでかつ『光安定』で『細胞無毒』な白金ナノクラスターを作製し、それを利用した生体1分子計測技術の開発について実施した。さらに、この白金ナノクラスターは毒性が低いため、生細胞や生体観察への応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：Noble-metal (gold (Au), silver (Ag) and platinum (Pt)) nanoclusters consisting of several atoms have been applied for advanced biological application in sensing, cellular imaging, and biomedicine owing to their excellent physicochemical properties and biocompatibility, such as smaller size, less cytotoxicity, tunable fluorescence emission and high photostability. In this study, we have developed the biocompatible Pt nanoclusters as fluorescence and electron microscopic imaging probes, and have applied them to in vitro and in vivo imaging. Since the Pt nanoclusters are less cytotoxic as well as smaller than other nanoparticles such as quantum dots and carbon nanotubes, the fluorescent Pt nanoclusters promises to be a useful fluorescent probes for bio-imaging and long-term in vivo imaging.

研究分野：光化学

キーワード：光化学 生物物理学 蛍光観察 1分子計測 分子プローブ 白金ナノクラスター 生体イメージング
癌診断

1. 研究開始当初の背景

近年、光ナノ計測技術と蛍光プローブ（蛍光タンパク質、有機蛍光分子、半導体量子ドットなど）の進歩によって、目的とする生体分子を選択的に標識し画像化できるようになった。そのため、生細胞や生体組織内で機能する様々な生体分子のダイナミクスや反応の素過程について高分解能でかつ実時間で評価できるようになり、多くの生命機構について理解されるようになってきた。一方で、細胞の分化や増殖（発生）を制御する細胞間シグナル伝達の生理機構は複数の反応が巧みに組み合わされて起こっているため、細胞中で機能する生体分子機構を定量的に理解するには、その局在化や内部で生じている複雑な生体分子会合の分子構造及び各分子の配置についても評価する必要がある。そこで、従来の蛍光観察では分解能に限りがあることから、細胞の情報伝達機構において未だ理解されていない分子ダイナミクスや生体分子複合体について詳細に理解するためには、走査透過型電子顕微鏡 (STEM) の高い空間分解能観察が必要とされ、蛍光顕微鏡観察だけでなく STEM 観察へも併用可能な分子プローブが求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は蛍光・電子顕微鏡 (TEM) 両用プローブとして『nm』のサイズでかつ『光安定』で『細胞無毒』な白金ナノクラスターを作製し、それを利用した生体分子計測技術の開発である。

数個から数十個の原子で構成される金属ナノクラスターは、化学的に安定でかつ STEM で観察可能な金や白金を用いて合成される。そのため、これまでに Au₁₁ ナノクラスター（直径：約 0.5 nm）で標識した生体試料（フィブリノゲン）について、重元素（金や白金など）を高感度で選択的に観察できる高角度散乱暗視野法（HAADF）を利用した STEM 観察が実施されている (M. W. Mosesson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**,

(1998) 10511)。さらに、Jellium の理論モデルより金属ナノクラスターのサイズは電子の Fermi 波長以下であるため、電子軌道が量子化され分子サイズ（構成原子数）に依存した蛍光特性（量子サイズ効果）が期待されている（図1）。この蛍光性金ナノクラスターについては Dickson のグループによって初めて合成され報告されている (J. Zheng et. al., *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 7780)。

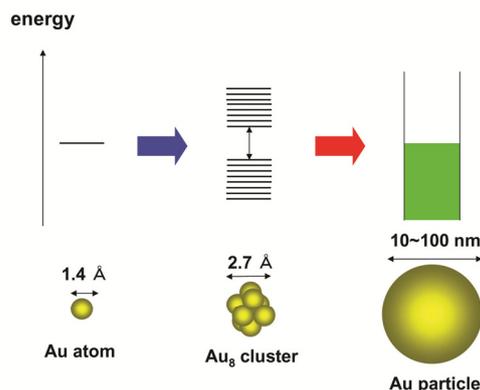


図1 Jellium の理論モデルより求められた金ナノクラスターの分子軌道モデル

そこで、本研究では、多様な発光波長を有する蛍光性白金ナノクラスターの精密合成法と生体分子修飾法を確立し、生体分子機構を実時間で蛍光観察するだけでなく、TEM で細胞内での局在分布や分子会合のナノ構造を評価した。本計測技術を構築することで、細胞の情報伝達機構や未だ理解されていない多くの生命機能について定量的に理解できる。

3. 研究の方法

本研究は以下の順序で遂行した。

(1) 発光波長（構成原子数）を規定した白金ナノクラスターの合成手法を確立する。 銲型分子の構造と作製されるナノクラスター構造との相関について調べ、還元剤の選択も含めて合成条件を最適化する。

(2) 化学活性な低分子を用いて生体分子機構を立体的に阻害する銲型分子から白金ナノクラスターを取り出し、生体分子で修飾し

(前頁からのつづき)

た分子プローブの調製手法を確立する。

(3) 白金ナノクラスター分子プローブを生細胞(乳癌細胞: KPL-4)へ投与し、共焦点蛍光顕微鏡を用いて1分子観察を行う。

①発光波長(構成原子数)を規定した白金ナノクラスターの合成手法の確立

本研究では主に生体適合性の高い近赤外領域に蛍光特性を有する白金ナノクラスターの合成とその光学特性評価について実施した。近赤外蛍光性白金ナノクラスターの合成は、還元性アミン系化合物である PAMAM Dendrimer を鋳型分子として用いて行った。長波長側に蛍光特性を有する金属ナノクラスターを合成するために、まず鋳型分子である PAMAM Dendrimer と金属(白金)イオンを低温化で1~8日間反応させ、PAMAM Dendrimer 内に金属(白金)イオンを取り込ませた。次に、還元剤としてフルクトースを白金イオンに対して20~100倍過剰に加え70~90℃で2週間反応させることで PAMAM Dendrimer 内に白金ナノクラスターを生成させた。白金ナノクラスターの合成後、超遠心分離機及び近赤外蛍光検出器を備えた高速液体クロマトグラフ(HPLC)を使用して不純物を取り除き白金ナノクラスターの単離・精製を行った。

②細胞毒性試験

乳癌細胞である KPL-4 を白金ナノクラスターの濃度が1 nM、10 nM、100 nM になるように調整した培地で48時間培養した。次に、自動セルカウンターを使用して細胞生存率を評価した。

③白金ナノクラスターを利用した生体分子修飾法の構築

PAMAM Dendrimer は非常にかさ高い分子であるため生体分子の動的挙動を妨げることが懸念される。そこで、白金元素がアミノ基

に対して高い親和性を持っていることを利用して、アミノ基を有するグリシン、β-アラニン、4-アミノ酪酸を使用してリガンド交換を行い PAMAM Dendrimer 内から白金ナノクラスターを取り出した。続いて、これらアミン化合物のカルボキシル基と乳癌細胞(KPL-4)に特異的に結合する Herceptin(HER2)抗体のアミノ基との間でカップリング剤(4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Chloride n-Hydrate (DMT-MM))を用いて反応を行い、白金ナノクラスター蛍光プローブを調製した。

4. 研究成果

合成した白金ナノクラスターの光学特性及び細胞毒性について評価した。

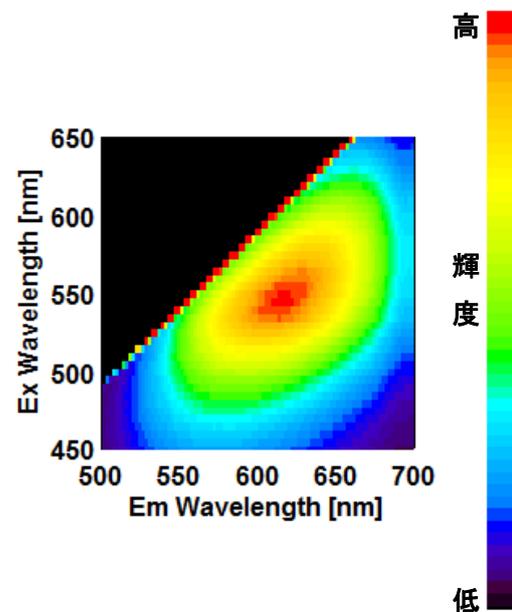


図2 合成した白金ナノクラスターの3D蛍光スペクトル

合成した白金ナノクラスターは発光波長: 600~650 nm、量子収率: 1.0%程度、粒径: 1.1~1.5 nmであり、ナノサイズでかつ近赤外領域に蛍光特性を有することが明らかとなった。(図2)また、合成した白金ナノクラスターの TEM 観察を実施したが、クラスターが凝集してしまうため、その結晶構造について観察できていない。現在、サンプル調整や計測条件について検討している。

さらに、細胞毒性試験を実施したところ、白金ナノクラスター濃度が1 nM、10 nMの条件では80%以上、100 nMの条件では60%以上の生存率が確認されたことから、10 nM以下の濃度であれば細胞毒性が少なく白金ナノクラスターを利用した生細胞観察や生体観察が可能であると期待される。

白金ナノクラスター蛍光プローブを乳癌細胞 (KPL-4) へ投与した。その結果、細胞表面から少ないながらも蛍光が観察された。

最後に、合成した白金ナノクラスターを体毛を持たないヘアレスマウスの皮下に投与し *in vivo* イメージングを行った。その結果、マウスの皮下3 mmから600~700 nmの蛍光が観察された。

本研究成果より白金ナノクラスター蛍光プローブの調整条件の最適化を行うことによって、より選択的に目的の生体分子へ結合・標識させることができれば、本分子プローブを生細胞観察だけでなく生体観察へも応用可能であり、新しい医療診断技術の開発も期待される。

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 5 件) (査読付)

- ① Terutake Hayashi, Yuki Ishizaki, Masaki Michihata, Yasuhiro Takaya, Shin-Ichi Tanaka “Nanoparticle Sizing Method Based on Fluorescence Anisotropy Analysis” *Measurement* **59** (2015) 382-388
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263224114003777>
- ② Terutake Hayashi, Yuki Ishizaki, Masaki Michihata, Yasuhiro Takaya, Shin-Ichi Tanaka “Study on nanoparticle sizing using fluorescent polarization method with DNA fluorescent probe” 11th Laser Metrology for Precision Measurement and Inspection in

Industry 2014, 3-5, September, 2014, EPOCHAL TSUKUBA, Tsukuba, Japan
<http://www.google.co.jp/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&ved=0CCgQFjAD&url=http%3A%2F%2Ftoc.proceedings.com%2F22690webtoc.pdf&ei=sahvVYqMLKXLmAXD24LADQ&usg=AFQjCNGo53DZMdouQ4NzOQ13pB7O33S08g&bvm=bv.94911696,d.dGY>

- ③ 林 照剛、石崎佑樹、道畑正岐、高谷裕浩、田中慎一 「蛍光偏光法を用いたナノ粒子粒径計測に関する研究 (第2報) -DNAプローブの回転拡散係数評価に基づく粒径計測手法の提案-」精密工学会誌 **80** (2014) pp.956-960
http://www.google.co.jp/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0CCqFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww.jspe.or.jp%2Fwp%2Fwp-content%2Fuploads%2Fpublication%2Fj80-10.pdf&ei=XapvVeQ_HcGxmwWsxoHQAQ&usg=AFQjCNFFuGLCLn0sPxCntzpbTyl1YachtA&bvm=bv.94911696,d.dGY
- ④ Hiroyuki Morimura, Shin-Ichi Tanaka, Hidekazu Ishitobi, Tomoyuki Mikami, Yusuke Kamachi, Hisato Kondoh, Yasushi Inouye “Nano-Analysis of DNA Conformation Changes Induced by Transcription Factor Complex Binding Using Plasmonic Nanodimers” *ACS Nano*, **7** (2013) pp 10733–10740
DOI: 10.1021/nn403625s
- ⑤ Shin-ichi Tanaka, Koichi Aoki, Atsushi Muratsugu, Hidekazu Ishitobi, Takashi Jin, Yasushi Inouye “Synthesis of Green-Emitting Pt₈ Nanoclusters for Biomedical Imaging by pre-equilibrated Pt/PAMAM (G4-OH) and Mild Reduction” *Optical Materials Express* **3** (2013) 157–165
DOI: 10.1364/OME.3.000157

[学会発表] (計 3 件)

- ① **田中慎一**、神隆、井上康志 “Preparation of Green-Emitting Pt Nanoclusters for Biomedical Imaging by Pre-equilibrated Pt/PAMAM (G4-OH) and Mild Reduction”
第 52 回日本生物物理学会年会 2014 年 9 月 25 日～27 日, 札幌コンベンションセンター (北海道 札幌市)

- ② **Shin-ichi Tanaka**, Takashi Jin “Synthesis of Green-Emitting Pt Nanoclusters for Cell Imaging by Reducing Pt Ions from Pre-Equilibrated Pt/PAMAM (G4-OH) Complexes” DNA-Based Functional Materials 2014, 15-17, May, 2014, **Institute of Photonic Technology (IPHT), Jena, (Germany)** (招待講演)

- ③ **田中慎一**、神隆、井上康志 日本化学会 第 94 春季年会 2014 年 03 月 27 日～30 日 名古屋大学 (愛知県 名古屋市)

[図書] (計 1 件)

Shin-ichi Tanaka, Yasushi Inouye

Chapter title: Synthesis of Fluorescent Platinum Nanoclusters for Biomedical Imaging

Book title: Functional Nanometer-Sized Clusters of Transition Metals: Synthesis, Properties and Applications

Publisher: The Royal Society of Chemistry

Publication: 2014

総ページ数 450 (chapter13 391-406)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 白金ナノ粒子含有組成物、白金ナノ粒子、及びそれらの製造方法

発明者: 田中慎一

権利者: 独立行政法人国立高等専門学校機構

種類: 特許

番号: 特願 2015-114261

出願年月日: 2015年6月4日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 慎一 (TANAKA Shin-ichi)

呉工業高等専門学校・自然科学系分野・准教授

研究者番号: 30455357