

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410142

研究課題名(和文) 金属ナノ粒子の表面状態とサイズに対応した高精度分離分析法の開発

研究課題名(英文) Development of Gel Filtration Chromatography technique for the Purification of Surface-functionalized Gold Nanoparticles

研究代表者

小川 信明 (OGAWA, NOBUAKI)

秋田大学・その他部局等・理事

研究者番号：80169193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：金ナノ粒子(AuNPs)は、粒子サイズやその構成元素に応じた光特性や電気特性が得られるうえ、その表面へ特定の化合物が保持可能であることから、分析化学、生物学、医学など幅広い分野での応用が期待されている。余剰の修飾分子からの表面修飾AuNPsの分離には、一般的に遠心分離を用いられているが、遠心分離による粒子の過度な密集により不可逆な粒子の凝集を引き起こす場合が多い。本研究は、ゲルろ過クロマトグラフィーを基盤とする分離法が、従来の遠心分離法よりも表面修飾AuNPsの精製に有用であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Surface functionality of gold nanoparticles (AuNPs) with small organic compounds such as thiols and surfactants or biomolecules allows to control their surface properties. Thus, the surface functionalization and purification of the functionalized AuNPs from residual modification reagents are key processes in biological and therapeutic applications. Here, we devise a novel versatile methodology for surface functionalization of AuNPs through a purification of functionalized-AuNPs by using a gel filtration chromatography (GFC). We tested purification of a surface-functionalized AuNPs by bovine serum albumin (BSA)-and three different charged thiols (11-mercapto-1-undecanoic acid, 11-amino-1-undecane thiol and 1-undecane thiol), respectively. The surface-functionalized AuNPs were successfully separated with high recovery rates of more over than 90% for BSA and 85% for thiols.

研究分野：分析化学

キーワード：金属ナノ粒子 サイズ排除クロマトグラフィー 表面修飾

1. 研究開始当初の背景

金ナノ粒子 (AuNPs) は、局在化表面プラズモン共鳴 (Localized Surface Plasmon Resonance)、表面増強ラマン散乱 (Surface Enhanced Raman Scattering) などのユニークな光学特性を示し、粒子サイズやその形状に応じた光学特性や電気化学特性が得られることから、化学センシング、生体センシングにおける新たな検出プローブとしての応用が期待されている。さらに、細胞毒性が低く、細胞膜透過性があり、表面修飾によってペプチド鎖、タンパク質、オリゴヌクレオチド、抗体、その他薬剤分子など様々な物質を保持することが可能であることから、バイオイメージングのための退色のない染色剤、ドラッグデリバリー担体などへ応用など幅広い分野で研究が進められている。

これまでの多くの研究では、AuNPs の表面修飾後、液中に残存する余剰な修飾分子を除去し、表面修飾 AuNPs を精製する手段として、一般に遠心分離による精製法が用いられてきた。しかしながら、遠心分離法での精製は、ナノ粒子の過度な密集による不可逆な粒子の凝集を引き起こす場合が多く、AuNPs の分散状態の変化は特有の局在化表面プラズモン共鳴に影響を及ぼすため、AuNPs を利用する際の問題点の1つとなっていた。表面修飾後の AuNPs の精密分離、精製方法の確立は、AuNPs の用途拡大において極めて重要な課題であるといえる。

サンプルへの影響が少ない精製法として、ゲルろ過クロマトグラフィー (GFC) が挙げられる。しかし、これまでの国内外の先行研究における GFC を利用した精製法は、形状、大きさの異なる AuNPs に対する単離、精製に留まっており、表面修飾後の混合物からの表面修飾 AuNPs の単離を試みた例はこれまでに報告されていなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、以下の研究を遂行することにより、従来の遠心分離による精製法に代えて、GFC を基盤とする AuNPs の表面状態に対応した高精度分離技術の開発を目的とした。

(1) AuNPs の合成と表面修飾ナノ粒子の効率的な分離を可能とする GFC 担体の作製

本研究は、表面修飾 AuNPs の医学分野への応用を前提として考え、最も効率良く AuNPs の細胞内導入が起こると報告がある直径 50 nm 付近を目標として AuNPs の合成を行う。GFC のゲル担体素材として、代表的にデキストラン、ポリアクリルアミド、アガロース、ポリビニルクロリドなどが挙げられる。本研究では、まず分画範囲、回収率の観点から、ナノ粒子の分離に適したゲル担体の選抜を行い、GFC カラムの作製を行う。

(2) タンパク質を修飾剤として用いた表面修飾 AuNPs の分離・精製

修飾剤として用いるタンパク質モデルと

して、ウシ血清アルブミン (BSA) を用いた表面修飾 AuNPs を作製し、GFC により表面修飾 AuNPs と残存 BSA の分離を試みる。

(3) 自己組織化単分子膜 (SAM) 修飾 AuNPs の分離・精製

チオール基 (-SH 基) を有する化合物は、金と反応して Au-S 結合を形成し、金表面に SAM を形成することが知られている。この性質を利用して、末端に異なる官能基を有するアルカンチオールを用いることで、AuNPs の表面状態を制御することができる。修飾剤としてチオール化合物を用いて、表面修飾 AuNPs を作製し、GFC により表面修飾 AuNPs と残存チオール化合物の分離を試みる。

3. 研究の方法

(1) AuNPs の合成と表面修飾ナノ粒子の効率的な分離を可能とする GFC 担体の作製

クエン酸還元法により、直径約 50 nm の AuNPs の合成を行った。沸騰させたテトラクロロ金 (III) 酸水溶液にクエン酸水溶液を加え、溶液の色が黄～透明～黒～赤 (紫) 色と変化し、肉眼で観察できる色の変化が止まってから加熱を停止し、攪拌は継続したまま室温に冷めるまで自然に放熱した。室温に冷めた金ナノ粒子分散液は再び細孔径 0.22 μm のシリンジフィルターでろ過し、4°C の冷蔵庫で保存した。GFC 担体として、TOYOPEARL HW-65F を充填したカラム (GE ヘルスケア製 XK カラム : 内径 16 mm ϕ \times 長さ 13 cm)、もしくは HW-65S を充填したカラム (メルクミリポア製 Vantage L : 内径 11 mm ϕ \times 長さ 24 cm) を作製した (どちらの担体も分画範囲 40,000 ~ 5,000,000 Da)。高速液体クロマトグラフィー装置 LaChrom Elite L-2000 シリーズ (オーガナイザ、ダイオードアレイ型検出器 L-2455、ポンプ L-2130) を使用し、検出波長は 200 nm と AuNPs の表面プラズモンに起因する 530 nm とした。移動相には、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) を用いた。アセトンを用いて各 GFC カラムの理論段数 N を求めた。クエン酸還元法により合成した AuNPs を用いて GFC 分離を行い、AuNPs の回収率を検討した。

(2) タンパク質を修飾剤として用いた表面修飾 AuNPs の分離・精製

高分子量の修飾剤モデルとして、BSA (分子量: 約 66,000 Da) を用いた。表面プラズモン共鳴由来のスペクトル変化をもとに、AuNPs の表面修飾に用いる BSA の濃度を決定した。BSA 修飾 AuNPs を用いて、GFC による分離を行った。

(3) SAM 修飾 AuNPs の分離・精製

チオール化合物には、電荷状態の異なる 3 種類のアルカンチオール (メルカプトウンデカン酸 (MUA)、ウンデカンチオール (UT)、アミノウンデカンチオール (AUT)) を用いた。BSA 修飾と同様に表面プラズモン共鳴由来のスペクトル変化をもとに、修飾に用いる各種チオール分子の濃度を決定した。各アルカン

チオール修飾 AuNPs を用いて、GFC による分離を行った。GFC 分離精製の前後における AuNPs の分散状態は、表面プラズモンに起因する UV-vis スペクトルのピーク波長変化の測定、及び動的光散乱法(DLS)による流体力学的直径の測定により評価した。

4. 研究成果

(1) AuNPs の合成と表面修飾ナノ粒子の効率的な分離を可能とする GFC 担体の選抜

クエン酸還元法によって合成した AuNPs の透過型電子顕微鏡(TEM)測定を行い、Image J を用いて粒子像から粒径を算出したところ、約 46.3 ± 6.2 nm であった (図 1)。

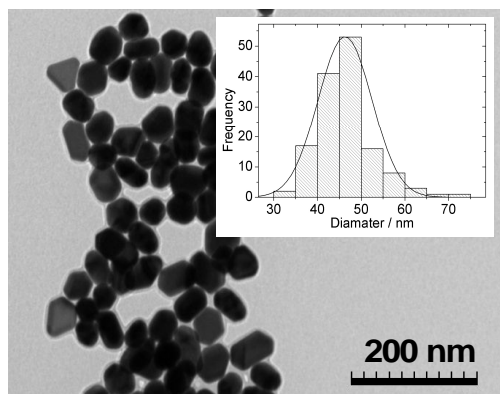


図 1 クエン酸還元法によって合成した AuNPs の TEM 像。挿図: TEM 像の解析から得られた粒径分布

次に、アセトンを用いて各 GFC カラムの理論段数 N を求めたところ、HW-65F を充填したカラムの理論段数 N は、494.6 であり、HW-65S を充填したカラムの理論段数 N は、1479.6 であった。

(2) タンパク質を修飾剤として用いた表面修飾 AuNPs の分離・精製

はじめに、AuNPs を修飾するために必要な BSA 濃度について、表面プラズモン共鳴由来のスペクトル変化をもとに検討した。図 2 に示すように、0.05 nM の AuNPs に対して、1.3 μ M 以上の BSA を用いた際に最大値が得られることが明らかとなった。従って、AuNPs 濃度 0.05 nM、BSA 濃度 1.3 μ M、反応時間 30 分間を AuNPs の BSA 修飾条件とした。

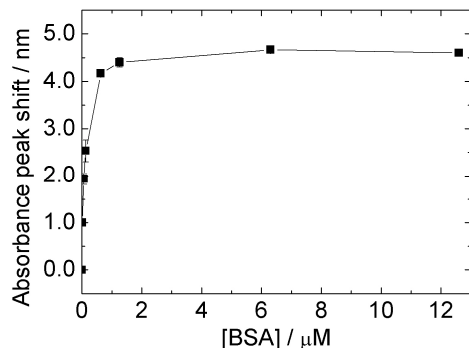


図 2 BSA 濃度に対する AuNPs のスペクトルのピーク波長変化

BSA 修飾 AuNPs と残存 BSA の分離を、HW-65F カラムまたは HW-65S カラムを用いた GFC により行った。

はじめに、HW-65F カラムを用いて精製を行ったところ、BSA 修飾 AuNPs と遊離 BSA の分離には成功したが、その分離度は $R = 1.27$ であり、収率は 69% と低い値であった。HW-65S カラムを用いた場合、図 3 に示すように明瞭なピークの見分けがされた。200 nm の検出波長において 28 min と 38 min にピークが観測され、530 nm の検出波長においてのみ、28 min のピークがみられたことから、28 min のピークは BSA 修飾 AuNPs、38 min のピークは遊離 BSA とそれぞれ帰属することができた。この 2 つのピークの見分け度は、 $R = 1.66$ であり、収率は 93% と改善がみられた。

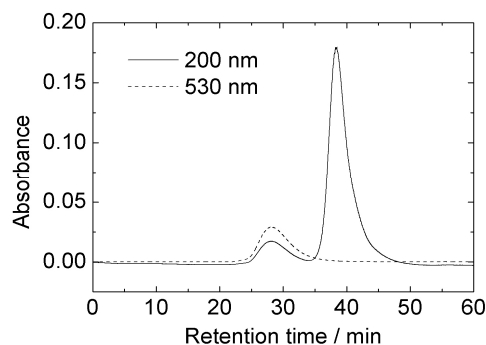


図 3 HW-65S カラムで BSA 修飾 AuNPs を精製したクロマトグラム

GFC 分離前後の BSA 修飾 AuNPs の UV-vis スペクトルの比較を行ったところ、表面プラズモン共鳴に起因するピークのシフトはみられず、280 nm の BSA 由来のピークの減少が確認された。また、遠心分離法を用いて精製した BSA 修飾 AuNPs との UV-vis スペクトル比較から、遠心分離法では表面プラズモン共鳴に起因するピークのレッドシフトがみられており、GFC による精製では表面修飾 AuNPs の凝集が起こりにくいことがわかった。

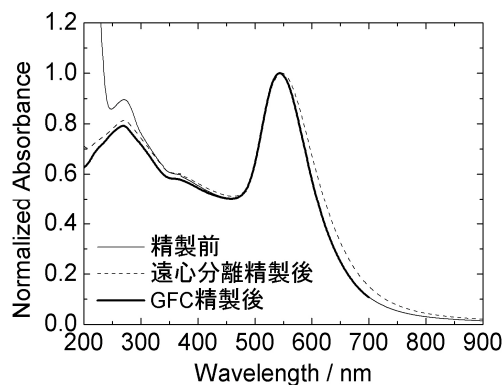


図 4 精製前、遠心分離精製後、GFC 精製後の BSA 修飾 AuNPs の UV-vis スペクトル比較

(3) SAM 修飾 AuNPs の分離・精製

チオール分子を修飾剤として用いた表面

修飾 AuNPs も、BSA 修飾 AuNPs と同様に修飾条件を検討後、GFC による精製を行った。MUA、UT、AUT 修飾 AuNPs のいずれにおいても、GFC を用いて表面修飾 AuNPs とその余剰のチオール分子を分離することが可能であり、MUA、UT、AUT 修飾 AuNPs に対する収率は、それぞれ 86%、88%、86% で得られた。

また、DLS 測定により遠心分離、または GFC によりそれぞれ精製した表面修飾 AuNPs の流体力学的直径の比較を行った。その結果、GFC を用いることで遠心分離を用いて精製を行うよりも、AuNPs が凝集させずに精製が行えることが明らかとなった(表 1)。

表 1 DLS 測定による表面修飾 AuNPs の遠心分離後、GFC 精製後の流体力学的直径比較 (単位は nm)

| | 精製前 | 遠心分離 | GFC |
|--------------|------------|-------------|------------|
| 未修飾 AuNPs | 53.9±15.2 | - | - |
| BSA 修飾 AuNPs | 68.9± 14.9 | 75.1± 25.7 | 65.7± 17.6 |
| UT 修飾 AuNPs | 67.2±24.2 | 60.5± 17.4 | 59.9± 14.9 |
| MUA 修飾 AuNPs | 55.1± 12.9 | 60.1± 15.3 | 54.3± 12.2 |
| AUT 修飾 AuNPs | 75.3±24.1 | 100.4± 32.4 | 66.7± 17.7 |

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 2 件)

1. Takasaki, F., Fujiwara, K., Nakajima, Y., Nishikawa, T., Masu, H., Imanari, M., Hidaka, Y., Ogawa, N., Monometric $[Zr(CO_3)_4]^{4-}$ complex in an ammonium zirconium carbonate aqueous solution studied by extended X-ray absorption fine structure, Raman and nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Dalton Trans.*, 査読有, Vol. 44, 2015, 645-662 DOI: 10.1039/c4dt02022g
2. Grave, E., Yokota, S., Yamamoto, S., Tamura, A., Ohtaki-Mizoguchi, T., Yokota, K., Oguma, K., Fujiwara, K., Ogawa, N., Okamoto, T., Otaka, M., Itoh, H., Geranylgeranylacetone selectively binds to the HSP70 of *Helicobacter pylori* and alters its coccoid morphology, *Sci. Rep.*, 査読有, Vol. 5, Article number: 13738, 2015, DOI:10.1038/srep13738

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 田村 周士・松村 洋寿・尾高 雅文・小川 信明, ゲル濾過クロマトグラフィー

を用いた表面修飾金ナノ粒子の精製, 第 77 回分析化学討論会 (龍谷大学, 2017 年 5 月 28 日)

2. Tanno, T., Terahertz vibrational spectroscopy of organic crystals, International Conference on Material Processing and Applications 2016 (Vellore, Tamil Nadu, India, 2016 年 12 月 14-16 日)
3. 田口 健・大内 圭祐・淀川 信一・倉林 徹・丹野 剛紀, ジベンゾフラン単結晶のテラヘルツ振動の異方性, 第 25 回有機結晶シンポジウム (京都大学, 2016 年 9 月 18-19 日)
4. 坂本 貴大・橋間 清香・斎藤 綾乃・堂前 直・佐藤 晶子・林 英輝・松村 洋寿・尾高 雅文・小川 信明・小松田 敦・涌井 秀樹, ラット腎臓組織のイメージング質量分析, 日本分析化学会第 65 年会 (北海道大学, 2016 年 9 月 16 日)
5. 松岡 忠文・松村 洋寿・尾高 雅文・小川 信明・丹野 剛紀, テラヘルツ分光法を用いたガス吸着 ZIF-8 の解析, 日本分析化学会第 65 年会 (北海道大学, 2016 年 9 月 14 日)
6. 松村 洋寿・土居 優梨子・本間 陽名・五十嵐 圭日子・鮫島 正浩・尾高 雅文・小川 信明, イネいもち病菌の抗菌法開発を目指したセロピオース脱水素酵素ヘムドメイン含有プロテインの発現, 第 76 回分析化学討論会 (岐阜薬科大学・岐阜大学, 2016 年 5 月 29 日)
7. 田村 周士・松村 洋寿・尾高 雅文・小川 信明, ゲルろ過クロマトグラフィーによる表面修飾金ナノ粒子の簡易な精製法の提案, 第 76 回分析化学討論会 (岐阜薬科大学・岐阜大学, 2016 年 5 月 28 日)
8. Tamura, S., Fujiwara, K., Matsumura, H., Odaka, M., Ogawa, N., Gel-filtration separation of protein-coated gold nanoparticles, 2nd Asian Symposium for Analytical Sciences (Fukuoka, Japan, 2015 年 9 月 9-11 日)
9. Nagano, Y., Fujiwara, K., Matsumura, H., Odaka, M., Ogawa, N., Effect of a chemical functionalization for cytotoxicity of gold nanoparticle, 2nd Asian Symposium for Analytical Sciences (Fukuoka, Japan, 2015 年 9 月 9-11 日)
10. Umeno, K., Fujiwara, K., Ogawa, N., Tanno, T., Change in the terahertz spectra of plastic crystals due to phase transition, The 22nd International Conference on the Chemistry of the Organic Solid State (Niigata, Japan, 2015 年 7 月)
11. Umeno, K., Fujiwara, K., Ogawa, N.,

Tanno, T., Chiral discrimination using terahertz spectroscopy and chiral MOF, 8th Asian Cyclodextrin Conference (Kumamoto, Japan, 2015年5月)

12. Kuwabara, S., Fujiwara, K., Ogawa, N., Preparation of reduced immunoglobulin G fragments for specific labeling of gold nanoparticle, RSC Tokyo International Conference (Chiba, Japan, 2014年9月3-5日)
13. Umeno, K., Tanno, T., Fujiwara, K., Ogawa, N., Terahertz spectra of plastic crystals and its alteration caused by phase transition, RSC Tokyo International Conference (Chiba, Japan, 2014年9月3-5日)
14. Umeno, K., Ide, E., Tanno, T., Fujiwara, K., Ogawa, N., Terahertz spectroscopic analysis of ZIF-8, 11th International workshop on Crystal Growth of Organic Materials (Nara, Japan, 2014年6月)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.gipc.akita-u.ac.jp/~bioanal-str-chem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 信明 (OGAWA, NOBUAKI)

秋田大学・その他部局等・理事

研究者番号：80169193

(2) 研究分担者

丹野 剛紀 (TANNO, TAKENORI)

秋田大学・学内共同利用施設等・准教授

研究者番号：70390721

松村 洋寿 (MATSUMURA, HIROTOSHI)

秋田大学・理工学研究科・講師

研究者番号：60741824

藤原 一彦 (FUJIWARA, KAZUHIKO)

秋田大学・工学資源学研究科・准教授

研究者番号：10375222

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし