

# 蛍光性金ナノクラスタの調製

[研究代表者] 釘宮慎一 (工学部応用化学科)

## 研究成果の概要

金ナノ粒子は表面プラズモン共鳴により赤紫色を呈し、また 20~50nm サイズであることを利用しバイオマーカーとして広く利用されている。蛍光顕微鏡で使用する蛍光マーカーとしてはフルオレセインなどの有機化合物や緑色蛍光蛋白質 (GFP) が知られている。近年半導体原料から作製された蛍光性量子ドット (数 nm) もバイオマーカーとしての研究が始まっている。毒性の無い金ナノクラスタは蛍光の量子収率が低いことが欠点であった。2009 年ウシ血清アルブミン (BSA) に結合した金ナノクラスタは量子収率 6% の高輝度赤色蛍光を示すことが報告されその有用性が確かめられている。今回金ナノ粒子の金原子数を数十個に減らす蛍光性金ナノクラスタの作製条件を、BSA を使って検討した。

**研究分野:** 超分子化学、生体関連化学、分子認識化学

**キーワード:** 金ナノクラスタ、蛍光性、蛋白質、ウシ血清アルブミン

## 1. 研究開始当初の背景

蛍光顕微鏡で使用する蛍光マーカーとしてフルオレセインなどや緑色蛍光蛋白質 (GFP) などの有機化合物が使われている。また蛍光性の量子ドットも研究が始まっている。量子ドットは毒性の高い元素が使われている。また有機化合物由来の蛍光物質は一般的に退色しやすい。毒性の無い金ナノ粒子 (直径 20~ nm) は昔から透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察の際のマーカーとして利用されてきた。そこで蛍光性金ナノ粒子が合成できれば、同じマーカーで TEM も蛍光顕微鏡も使えることになるが、まだ現状ではよいシステムが発見されておらず、手探りの状態である。

## 2. 研究の目的

粒子サイズの大きい金ナノ粒子は表面プラズモン共鳴によるワインカラーの鮮やかな吸収が見られるが蛍光は示さない。直径数十 nm ではバルクの金の性質を示すが、粒子サイズを減少させていくと、量子閉じ込め効果により、原子のようにエネルギー準位はバンドギャップを持つようになり、金ナノ粒子の場合も蛍光を示すことが指摘されていたが、蛍光の量子収率が低かった。2009 年ウシ血清

アルブミン (BSA) に結合した金ナノクラスタが量子収率 6% の高輝度赤色蛍光を示すことが報告されその有用性が確かめられている。今回蛍光性金ナノクラスタの作製条件を、BSA を使って検討した。

## 3. 研究の方法

(1) BSA に保持された金ナノクラスタ BSA-AuNC は論文記載方法に従って調製した<sup>1</sup>。典型的には BSA(50 mg/mL) と塩化金酸をモル比 BSA : HAuCl<sub>4</sub> = 1 : 13 で混合し、pH12 に調整後、37°C で反応させることにより合成した。論文には記載されていないが、未反応の金イオンや生成する塩、残存する NaOH などを繰り返し透析することにより除き、凍結乾燥により透析液を粉末化させた。BSA-AuNC の質量分析は MALDI-TOFMS AXIMA (島津製作所) を使用した。

(2) AuNC 合成に用いた BSA 以外の蛋白質は、エステラーゼ、トリプシン、レクチンコンカナバリン A (ConA)、エンドウ豆蛋白質などを用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 合成された BSA-AuNC の構造

合成された BSA-AuNC の MALDI-TOF 質量分析を行ったところ、71,250 に 1 本のピークのみが得られた。この結果は報告されている 71,000 のピークと 0.3% の誤差で一致した。論文では元の BSA の分子量 66,000 と比較して、その増分 5,000 と金原子の原子量 196 を使って金ナノクラスターの金原子数を 25 個と算出している。今回の実験でも増分 5,250 から金ナノクラスターの原子数は 26 個となった (図 1)。金ナノクラスターの生成後の BSA の構造については論文で CD や FT-IR で元の BSA とほぼ一致し、pH12 にしたことによる大きな 2 次構造の変化は起こっていないことが指摘されている。また TEM や DLS 測定から均一な分散している金ナノクラスター (~0.8 nm) が得られていると推定されている。

ここで論文と今回の実験結果の両方の矛盾を指摘する。質量分析の結果から 1 つの BSA 蛋白質につき 1 個の金ナノクラスターが 2 次構造に影響を与えることなく結合しており、金原子数は 25-26 個と計算される。ここで合成反応時にはモル比 BSA : HAuCl<sub>4</sub> = 1 : 13 で反応させているわけなので、マスペクトルではフリーの BSA のピークは観測されず、BSA-Au<sub>25</sub>CN のみのピークが得られたのは矛盾する。Au<sub>25</sub>CN が BSA 中で生成するためには、等量のフリーの BSA が反応終了後に存在するはずである。透析でもフリーの蛋白質 BSA は除けない。この問題は論文では指摘されておらず説明もされていない。現時点では我々のところでも原因がわかっていないが、今後解決されるべきである。

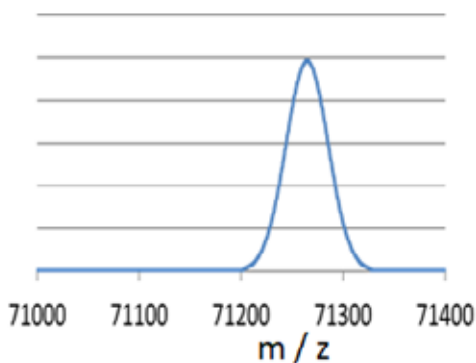


図1 BSA-AuNCのMALDI-TOF マスペクトル

### (2) 合成された BSA-AuNC の蛍光

合成された BSA-AuNC は論文同様特徴的な明るい赤色蛍光を与えた。論文では量子収率 6% と報告されている。この蛍光は凍結乾燥して得た固体でも観測された。固体の

BSA-AuNC は室温暗所で 6 カ月安定であった。

### (3) 赤色蛍光 BSA-AuNC の用途

BSA-AuNC の赤色蛍光は Cu<sup>2+</sup>イオンにより消光される (図 2)。各種遷移金属イオンを BSA-AuNC 溶液に添加したところ、Cu<sup>2+</sup>イオンが選択的に赤色蛍光を消光した。一度消光した BSA-AuNC 溶液に EDTA あるいはグリシンを加えると赤色蛍光は回復することから、Cu<sup>2+</sup>イオンによる BSA-AuNC 赤色蛍光の消光は可逆的であることがわかった。

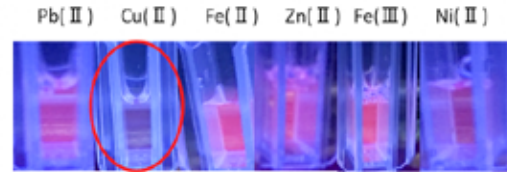


図2. 0.1 mM 金属イオン存在時の BSA-AuNC 蛍光

また Cu<sup>2+</sup>イオン濃度を変えて BSA-AuNC 赤色蛍光の消光実験を行い、シュテルンフォルマープロットを行ったところ 2 段階の過程が存在する可能性が示唆された (図 3)。

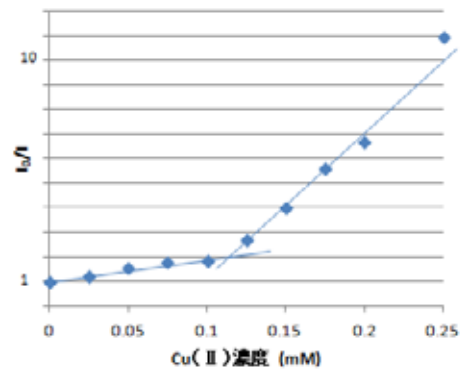


図3. BSA-AuNC 蛍光の Cu<sup>2+</sup>イオンによる消光過程のシュテルンフォルマープロット

### (4) BSA 以外の蛋白質を使った金ナノクラスター形成

BSA 以外の各種蛋白質を使って蛍光性金ナノクラスター合成反応を実施した。現在までのところ BSA 同様赤色蛍光を示す蛋白質や蛍光性を示さずワインカラー発色を示す蛋白質も得られている。

## 5. 参考文献

- Jian ping, Xie Yuangang, Zheng Jackie, and Y. Ying, Protein-Directed Synthesis of Highly Fluorescent Gold Nanoclusters, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 3, 888-889, 2009.