

酒石酸を用いた金ナノ粒子の合成と アミノ酸の色調変化によるキラル識別

山梨大学 大学院総合研究部

生命環境学域 生命農学系（生命工学科）

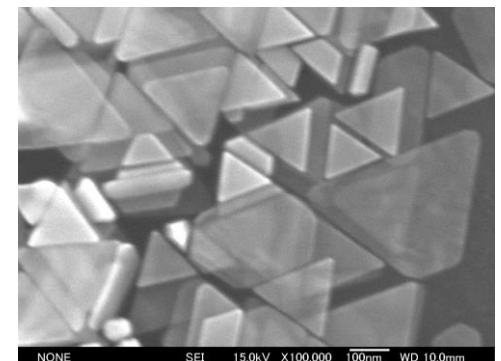
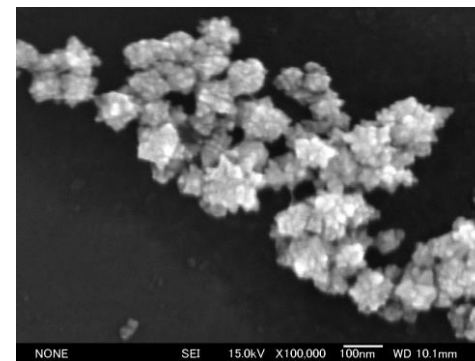
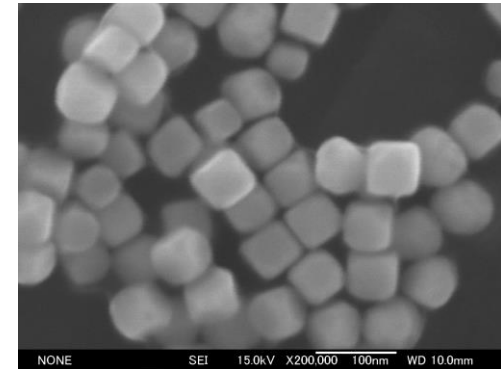
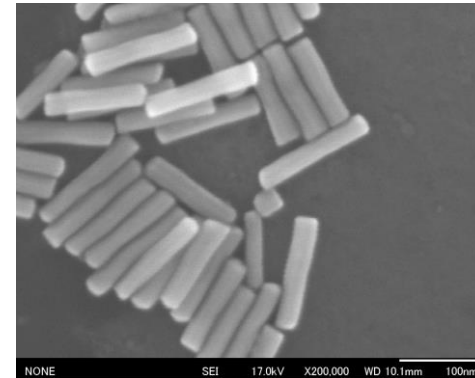
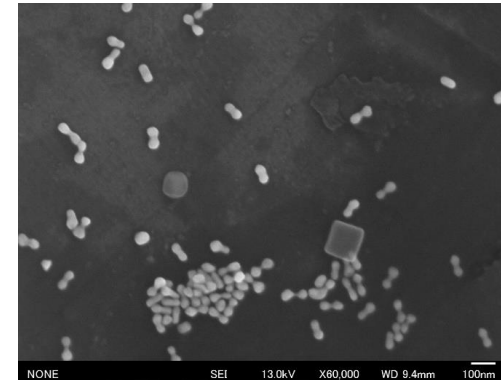
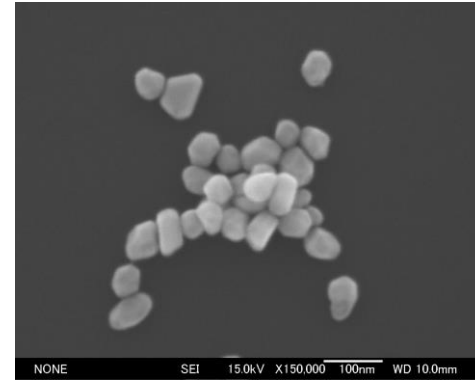
准教授 新森 英之

2019年12月19日

金のナノ粒子化

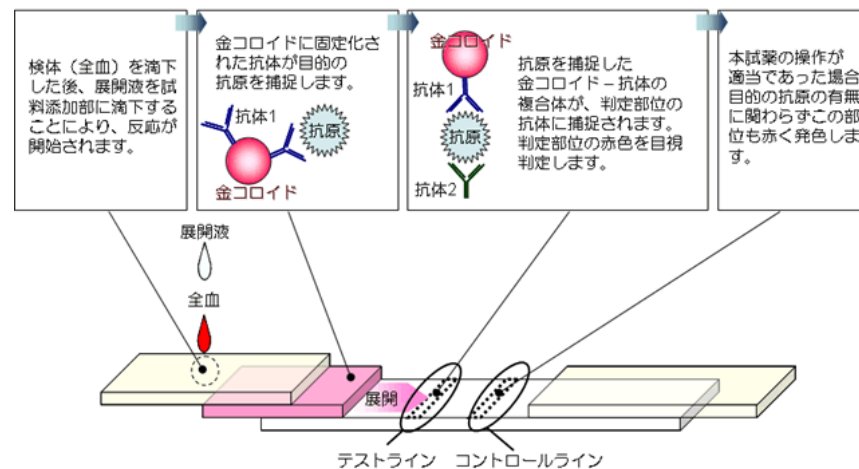
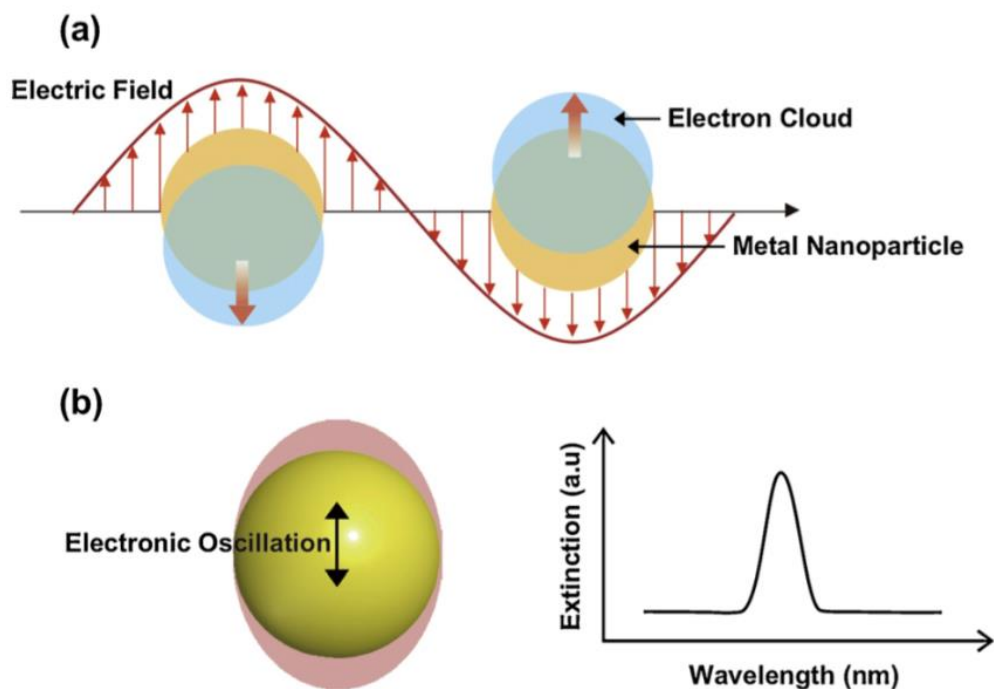


金 (Au; Gold)



金ナノ粒子

金ナノ粒子の光学特性と応用



イムノクロマト法による診断キット

K. Okamoto *J. Vac. Soc. Jpn.* **2008**, *51*, 727-730.



バイオセンサー

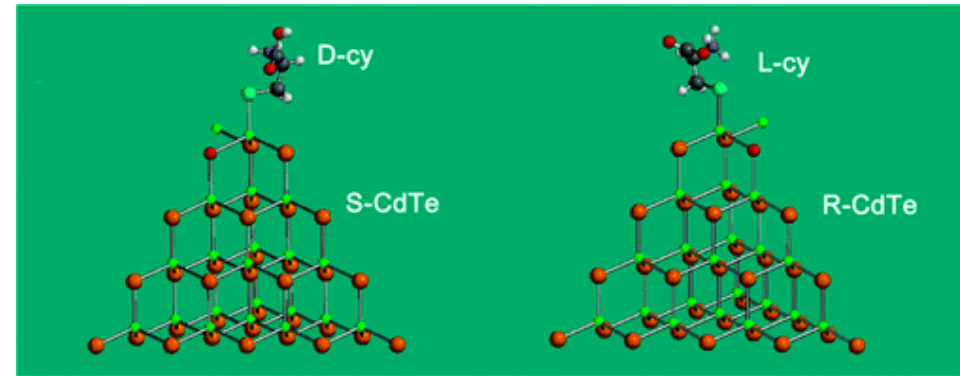
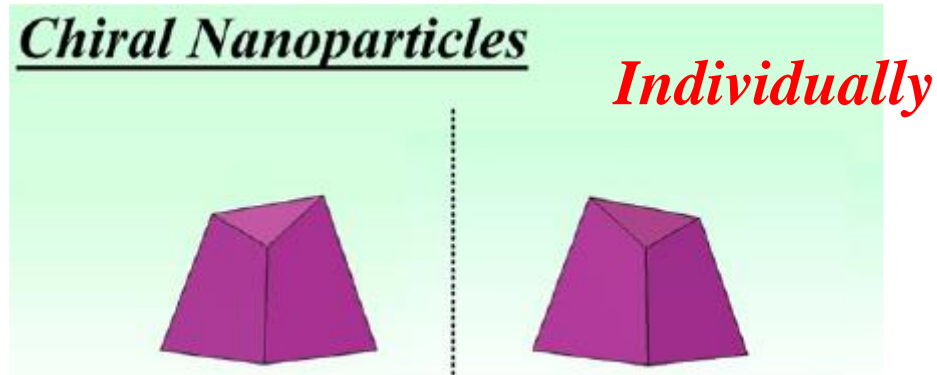
T. Kinoshita *et al. Anal. Chem.* **2018**, *90*, 4098-4103.

局在表面プラズモン共鳴

(LSPR: Localized Surface Plasmon Resonance)

Takonami *et al. Anal. Chim. Acta*, **2012**, *716*, 76-91.

金属ナノ粒子のキラリティー



Y. Zhou *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 6006–6013 (2010).

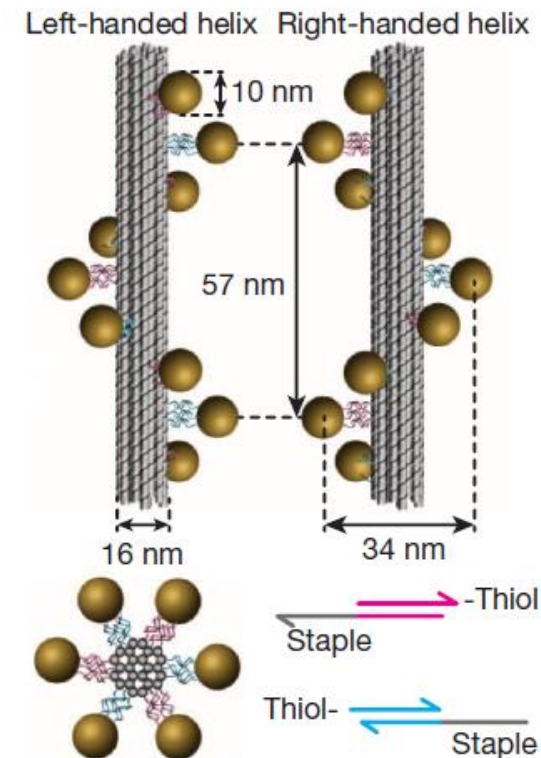
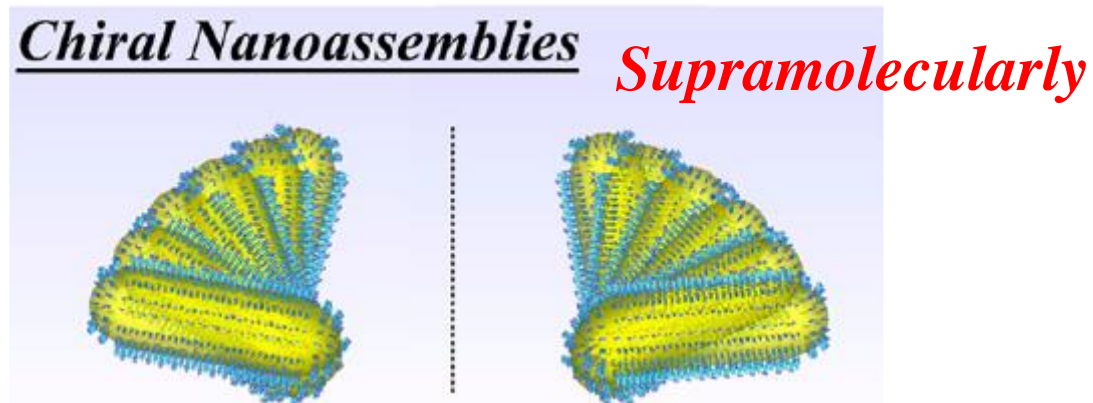


Fig. Chiral inorganic nanostructures.

N. A. Kotov *et al.* *Chem. Rev*, **117**, 8041-8093 (2017).

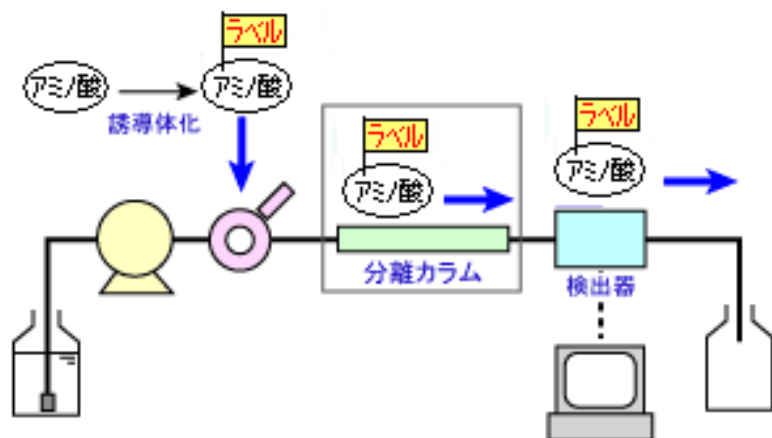
A. Kuzyk *et al.* *Nature*, **483**, 311-314 (2012).

アミノ酸検出

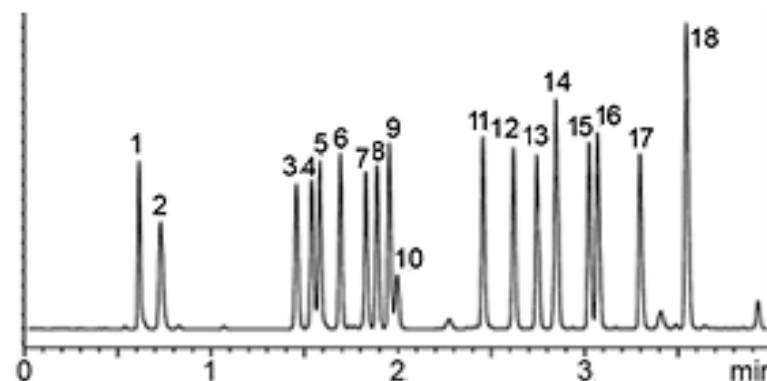
- ・ニンヒドリン反応
- ・ビウレット反応
- ・キサントプロテイン反応
- ・硫黄反応

「アミノインデックス技術」

血漿中の遊離アミノ酸の濃度バランスにより、身体の状態を統計的に解析・指標化する技術



ラベル化剤: o-フタルアルデヒド, イソチオシア
ン酸フェニル(フェニルイソチオシアネート:
PITC), フルオレサミン, ダンシルクロライド等



1.L-アスパラギン酸, 2.L-グルタミン酸, 3.L-セリン, 4.グリシン, 5.L-ヒスチジン, 6.L-アルギニン, 7.L-スレオニン, 8.L-アラニン, 9.L-プロリン, 10.アンモニア, 11.L-チロシン, 12.L-バリン, 13.L-メチオニン, 14.L-シスチン, 15.L-イソロイシン, 16.L-ロイシン, 17.L-フェニルアラニン, 18.L-リジン

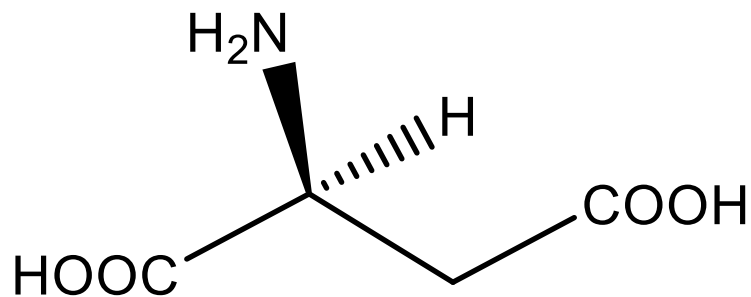
HPLCによるアミノ酸検出

【デメリット】

誘導化反応(前・後処理)が必要、高価な装置が必要 etc.

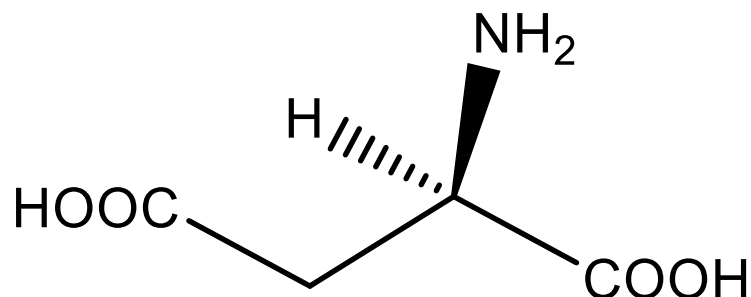
島津, *LC talk*, 2004, vol.53より

アミノ酸の不斉



L-グルタミン酸

うま味



D-グルタミン酸

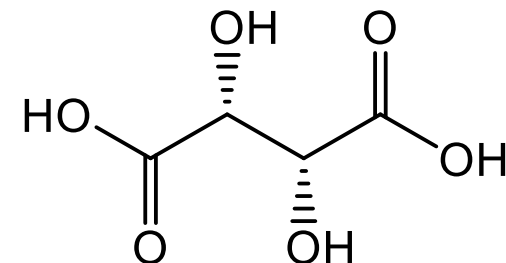
苦味

L体は酵素やタンパク質の構成要素や栄養源として体内や食品に多量に存在する。近年、食品が熟成したり、体の老化が進むとその一部がD体に変化することが知られてきている。従って、バイオマーカ、食品、美容、健康分野等で注目されている。

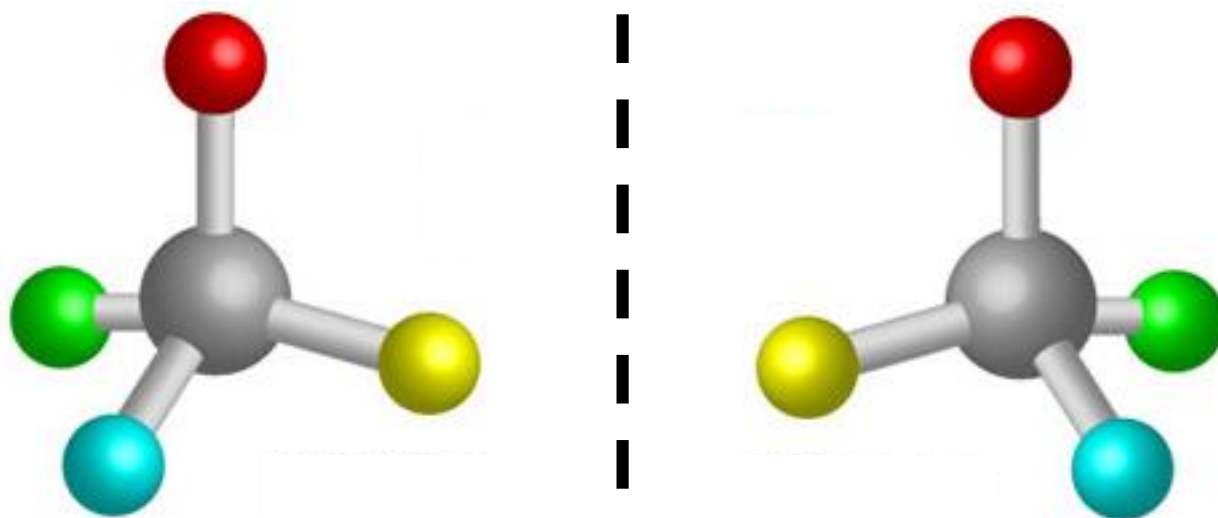
最近では、
選択的アミノ酸検知に加えて、キラル識別も併せて求められている。

本技術の概要

本技術では、キラル炭素を有するヒドロキシ有機酸の一種である酒石酸を利用して金ナノ粒子を構築する簡便法を開発した。また、そのナノ粒子は色変化による選択的かつキラル識別能を有しており、付加価値の高いキラルなナノ材料と成り得る。



L-(+)-酒石酸
(2R, 3R)



従来技術とその問題点

最も一般に利用されている金ナノ粒子はクエン酸を使用して合成が成されている。

しかしながら、

- ・クエン酸にはキラル炭素が存在しないため、キラル識別は不可能である。
- ・硫黄原子を含むアミノ酸分子以外を認識対象とした例が殆どない。

金ナノ粒子のキラル源としての価値を有効利用できていない。

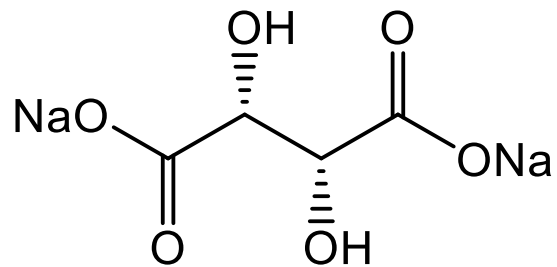
新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の問題点であった、Au親和性を有する硫黄原子を含む物質のみの分子識別を改良することに成功した。即ち、硫黄原子を持たない分子の識別を可能とした。
- 従来では、キラルなナノ粒子を構築するために煩雑な手法が用いられている場合が多いが、本技術では簡便なキラルナノ粒子の合成に成功した。
- 本技術では目視レベルで識別できる(色変化)選択的アミノ酸検出及びキラル識別が可能であった。

L-酒石酸を用いた金ナノ粒子合成



+



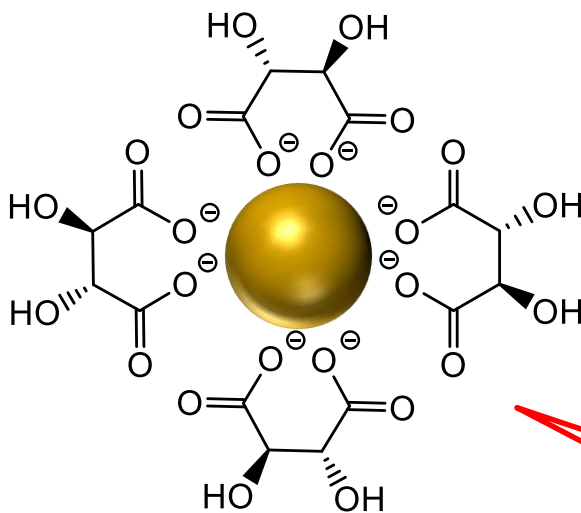
Disodium L-tartrate



reflux, 30 min



in water



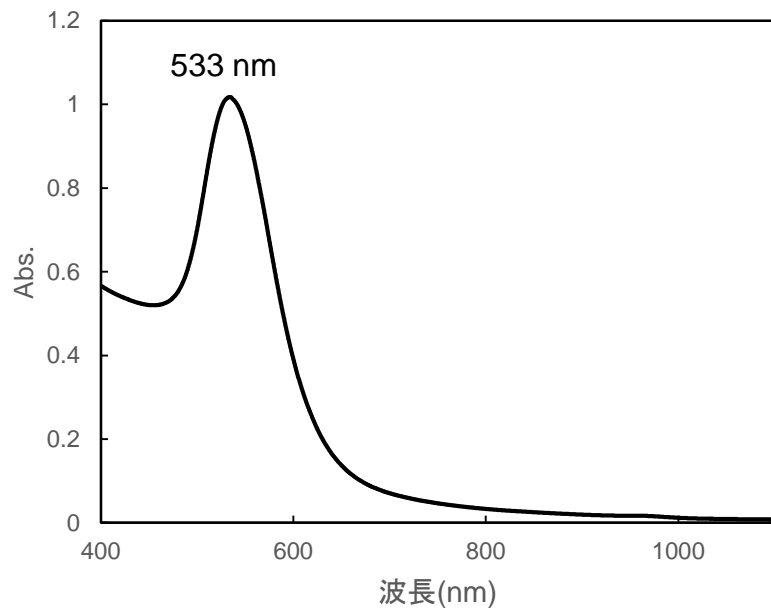
TAAuNPs

天然に存在するキラルな
ヒドロキシ有機酸

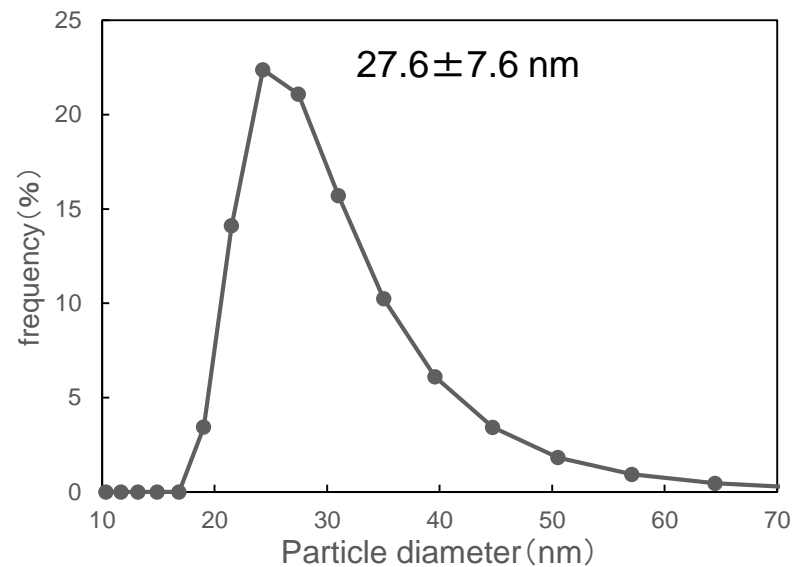
殆どの果物はクエン酸を生成する
が、ブドウは酒石酸を生成する。

キラルな金ナノ粒子

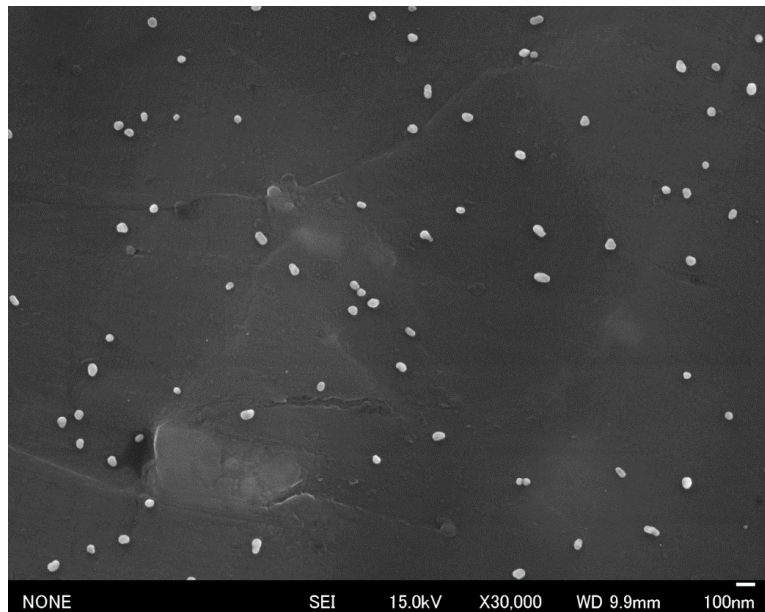
L-酒石酸を用いた金ナノ粒子の物性



TAAuNPs水溶液の吸収スペクトル

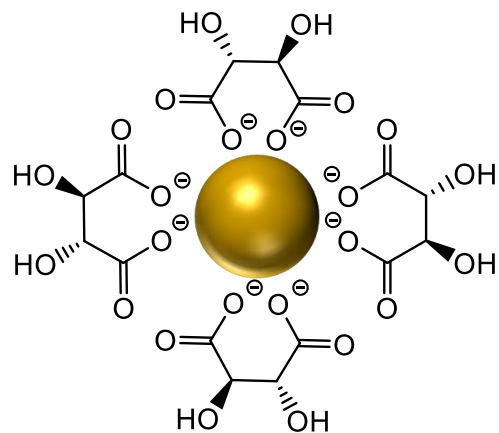


TAAuNPs水溶液のDLS測定



TAAuNPsのSEM像

L-酒石酸還元金ナノ粒子へのアミノ酸 (L-リシン) 添加



TAAuN
Ps

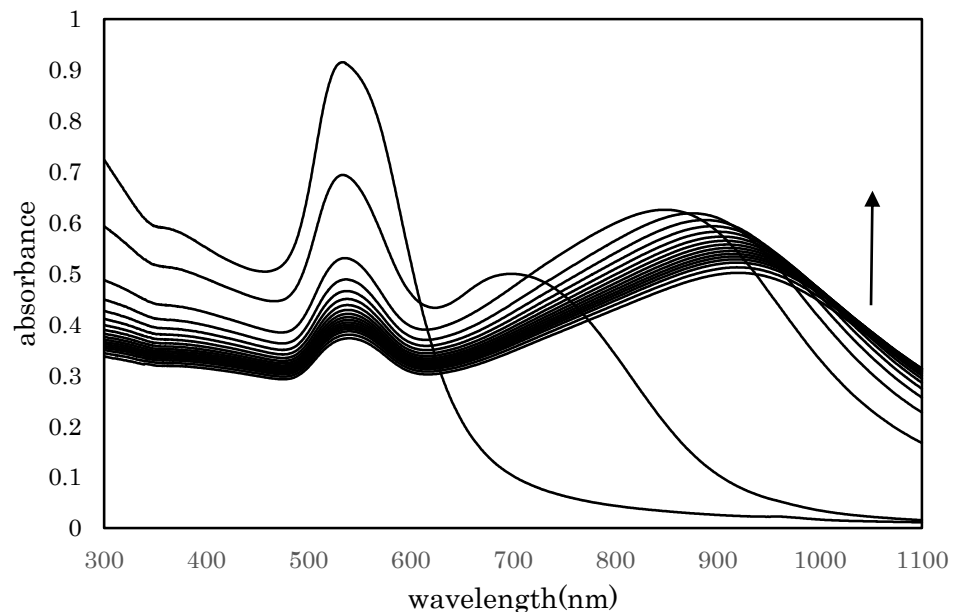
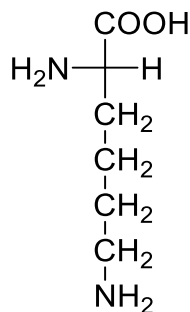


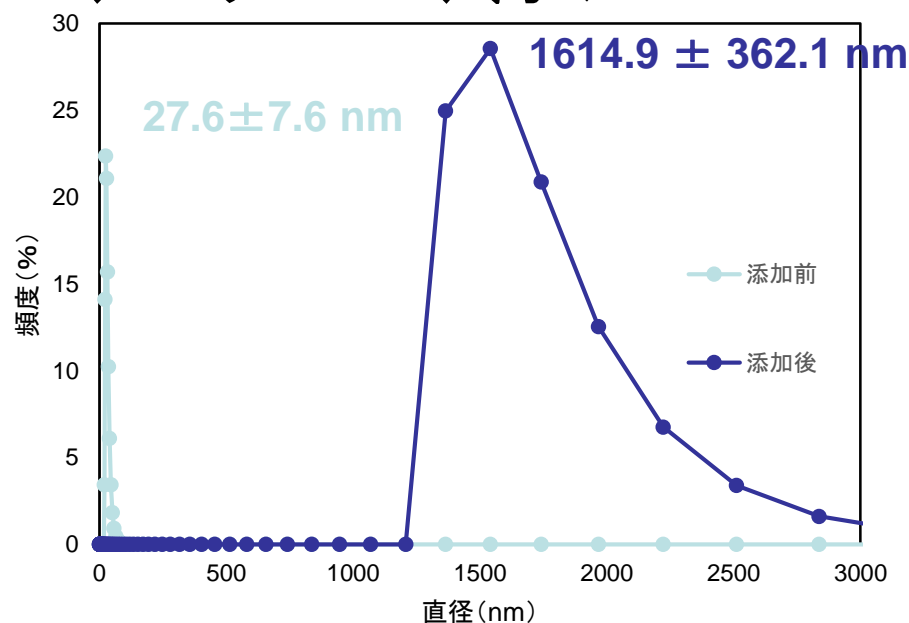
図. TAAuNPsに5 mM L-リシン溶液20 μ L (終濃度100 μ M) を添加し80分間経時変化測定



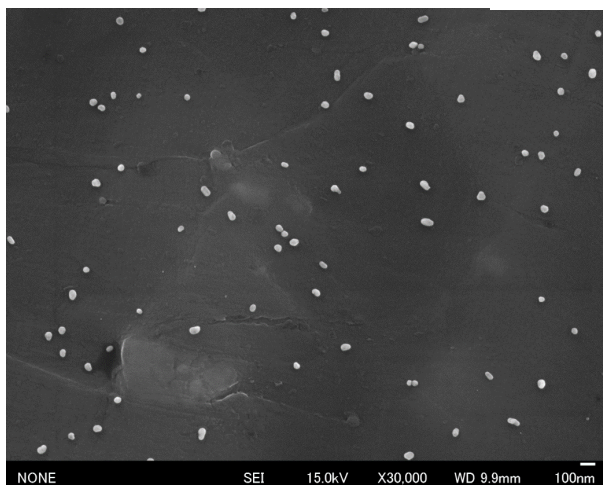
80分後

明らかな色変化で検
知可能

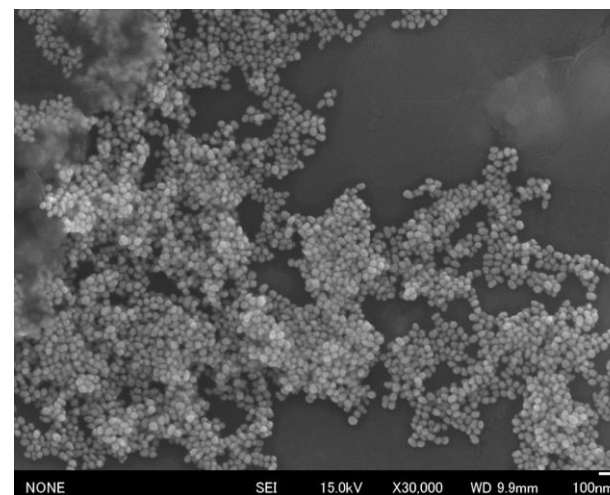
L-酒石酸還元金ナノ粒子へのアミノ酸 (L-リシン) 添加



TAAuNPsへ5 mM L-リシン溶液20 μ L (終濃度100 μ M)を添加し80 min後DLS測定

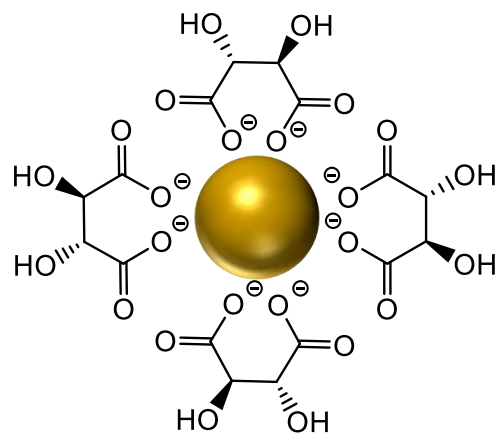


L-Lys



100 μ M L-Lys添加80min後のSEM像

L-酒石酸還元金ナノ粒子へのアミノ酸 (L-システイン) 添加



TAAuN
Ps

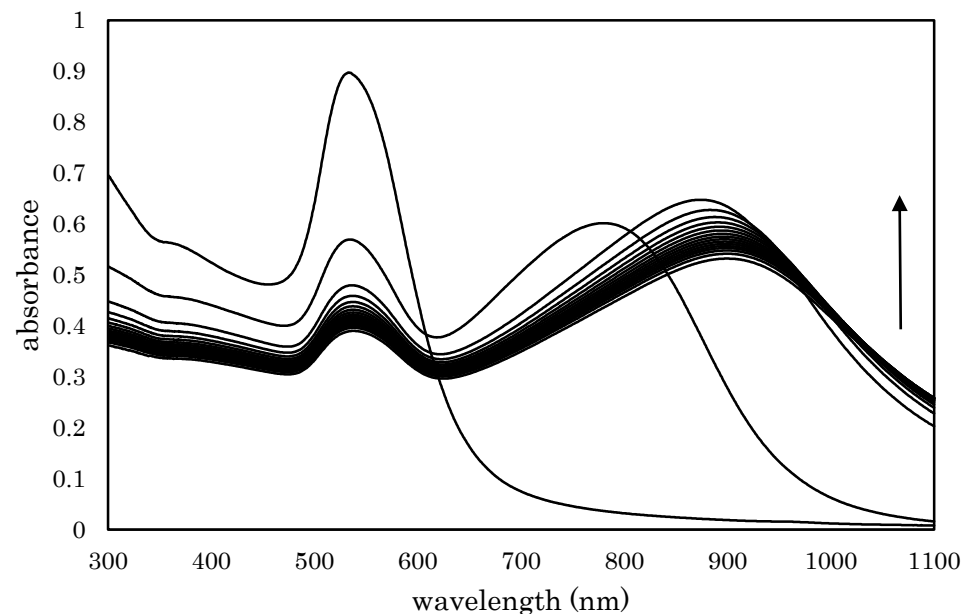
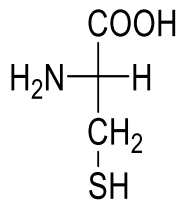
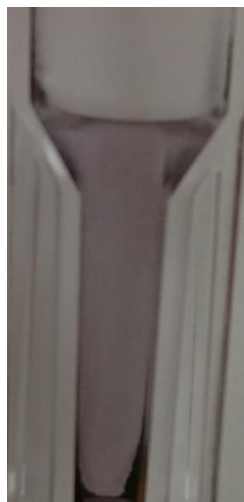


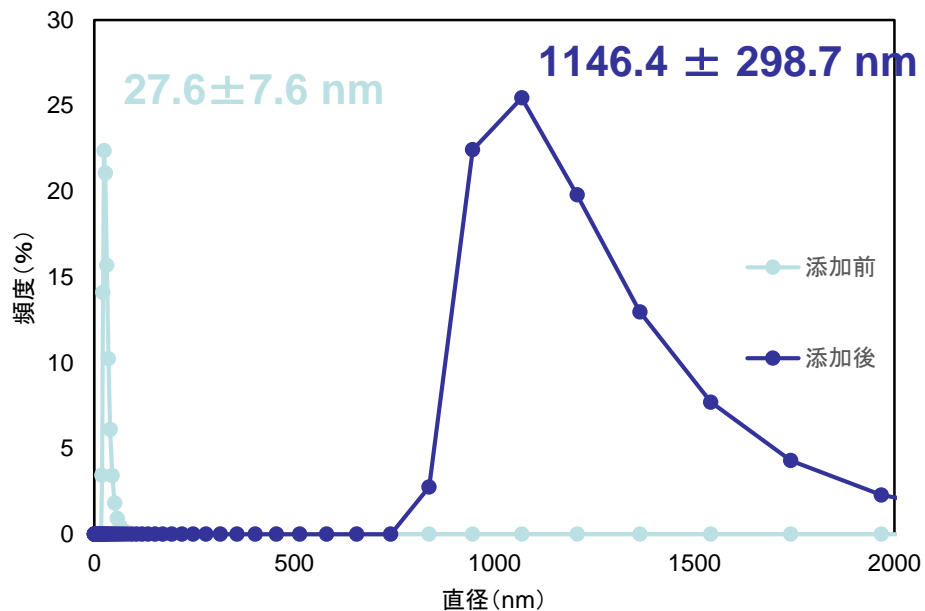
図. TAAuNPsに5 mM L-システイン溶液20 μL (終濃度 100 μM) を添加し80分間経時変化測定



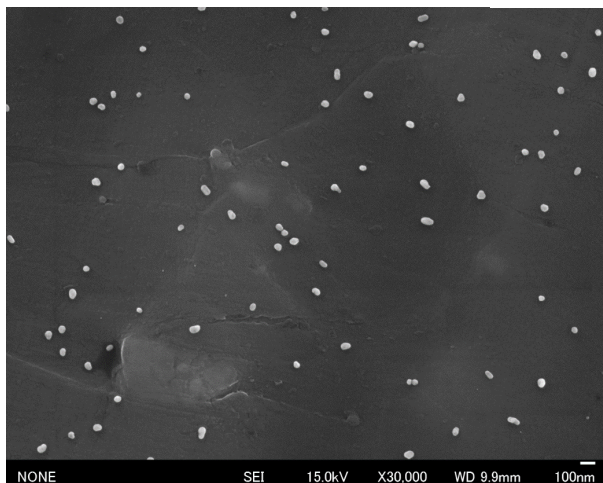
80分後

明らかな色変化で検知可能

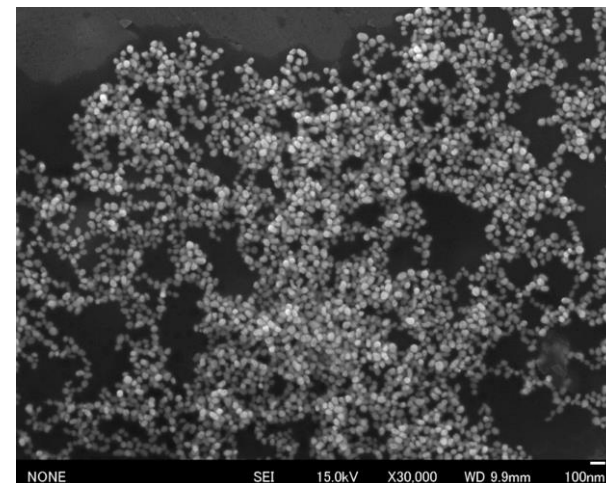
L-酒石酸還元金ナノ粒子へのアミノ酸 (L-システイン) 添加



TAAuNPsへ5 mM L-システイン溶液20 μ L (終濃度100 μ M)を添加し80 min後のDLS測定

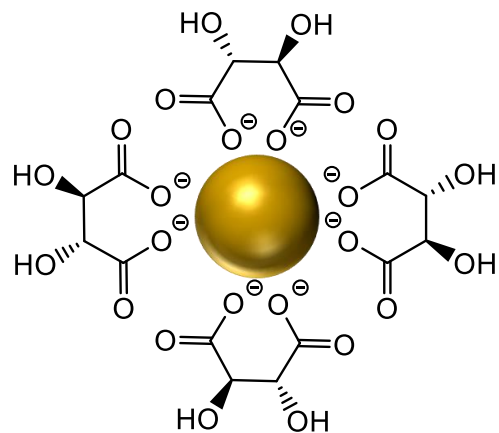


L-Cys



100 μ M L-Cys添加80min後のSEM像

L-酒石酸還元金ナノ粒子へのアミノ酸 (L-グルタミン酸)添加



TAAuN
Ps

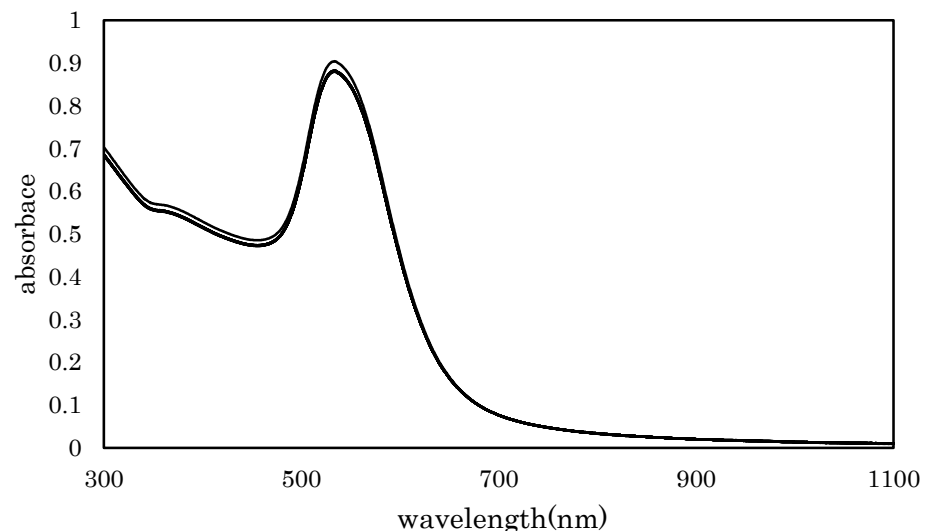
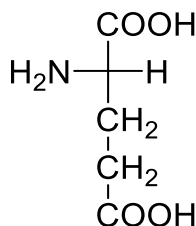
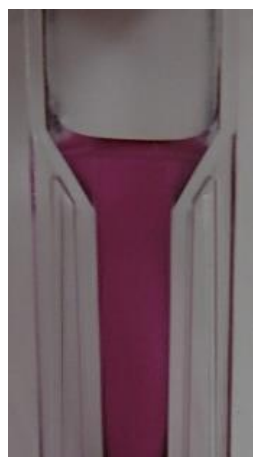


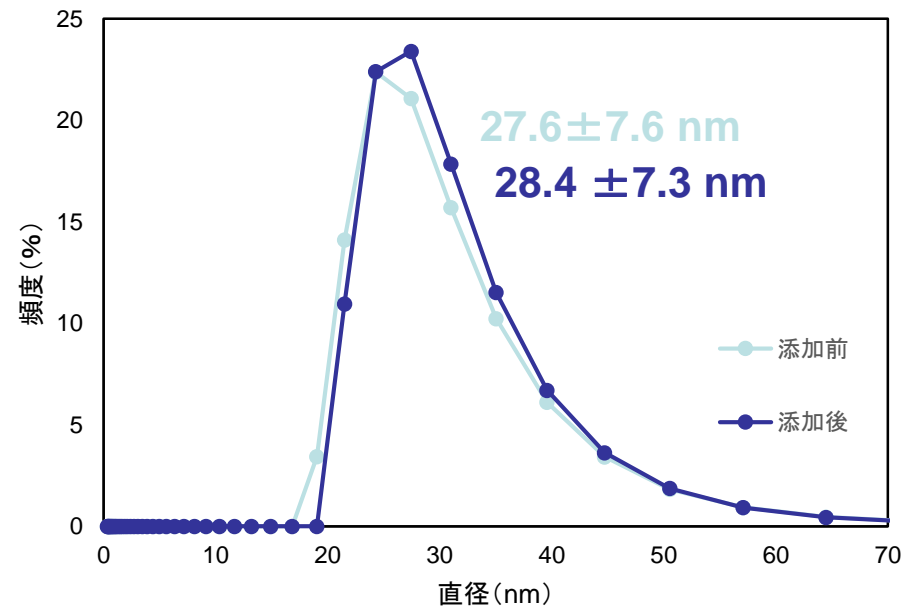
図. TAAuNPsに5 mM L-グルタミン酸溶液20 μL (終濃度100 μM) を添加し80分間経時変化測定



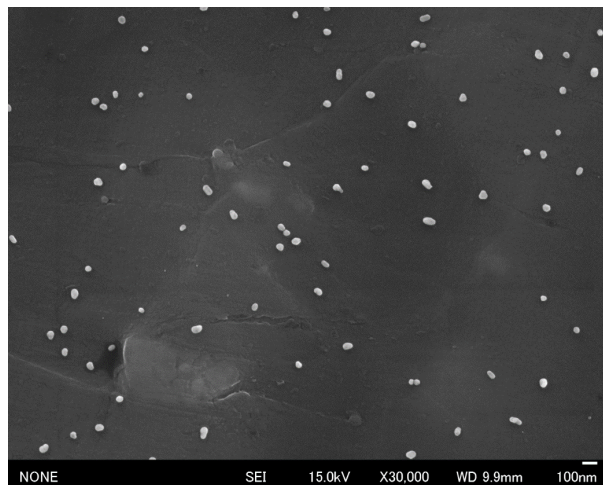
80分後

明らかな色変化無し

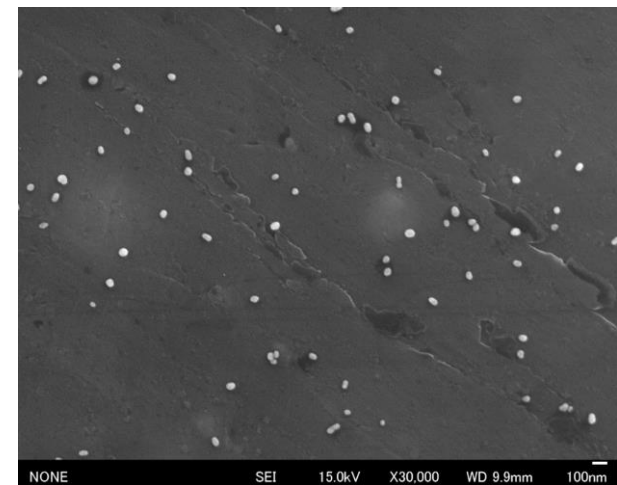
L-酒石酸還元金ナノ粒子へのアミノ酸 (L-グルタミン酸) 添加



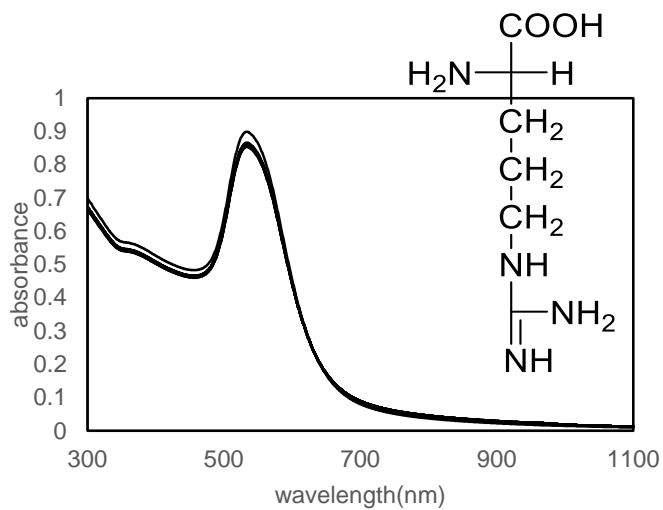
TAAuNPsへ5 mM L-グルタミン酸溶液20 μ L (終濃度100 μ M)を添加し80 min後のDLS測定



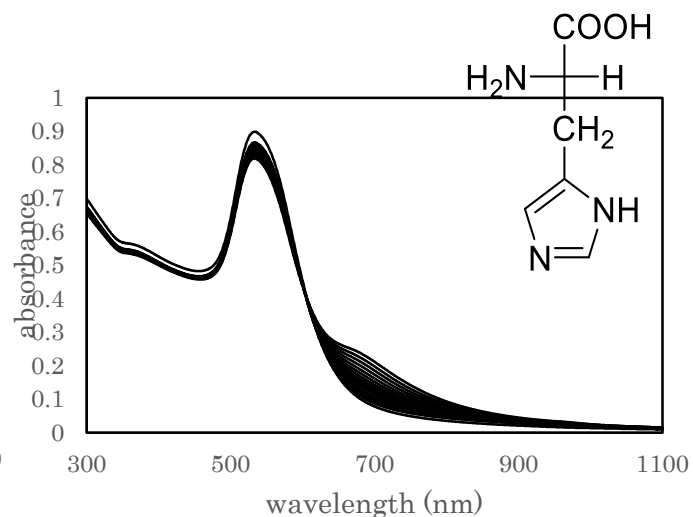
L-Glu



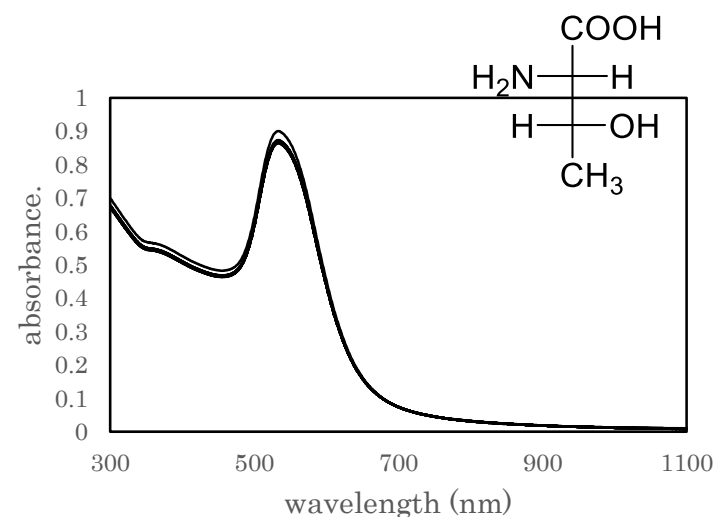
100 μ M L-Glu添加80min後のSEM像



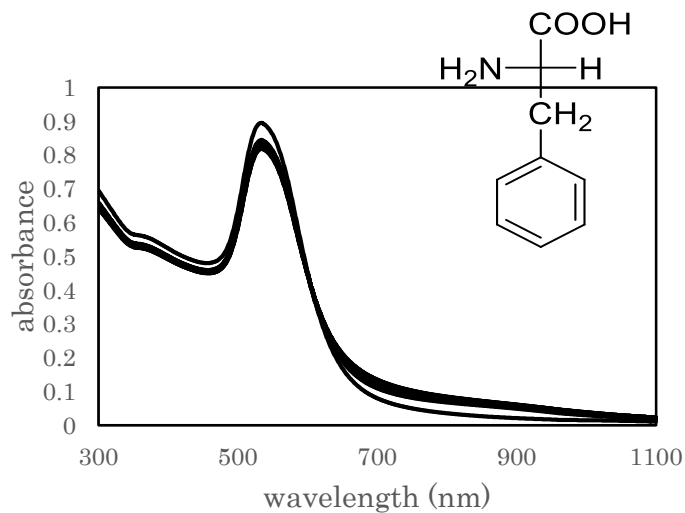
L-Arg(L-アルギニン)



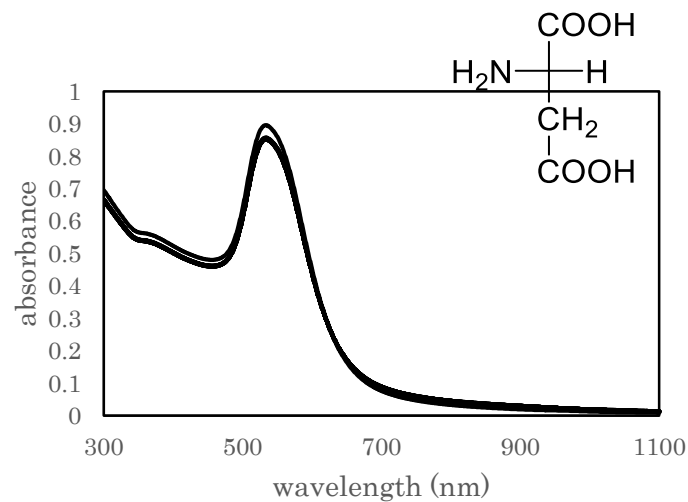
L-His(L-ヒスチジン)



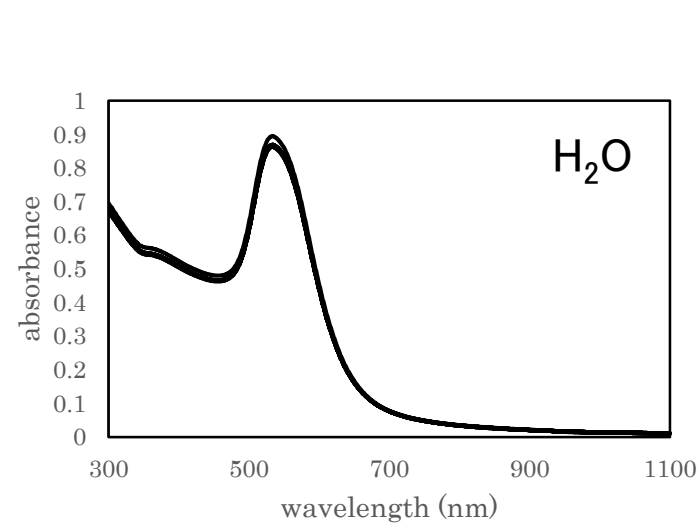
L-Thr(L-トレオニン)



L-Phe(L-フェニルアラニン)



L-Asp(L-アスパラギン酸)



水

[アミノ酸] = 100 μ M

L-酒石酸還元金ナノ粒子への 様々なアミノ酸添加

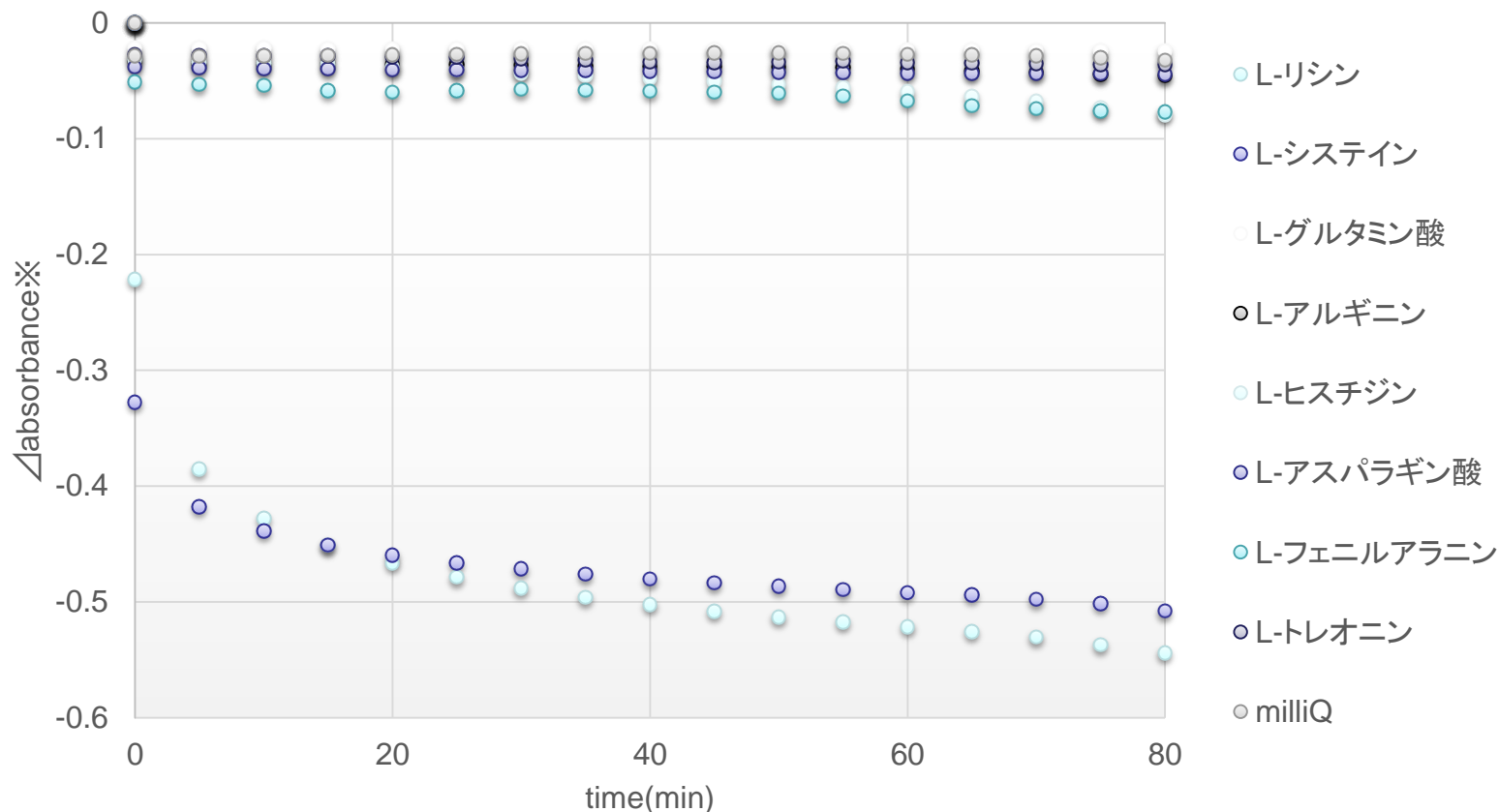


図. TAAuNPにアミノ酸溶液とmilliQを添加した(終濃度100 μM)時の533 nmのλmaxのプロット変化 ※添加前と吸光度差

*L-Lys*と*L-Cys*の選択的検知が可能

アミノ酸(Lys)の不斉識別

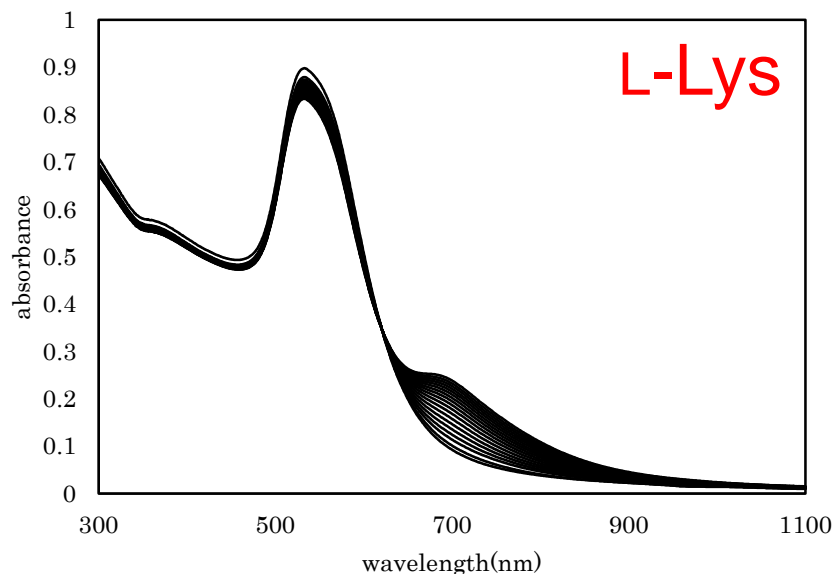


図. TAAuNPsに5 mM L-リシン溶液5 μ L (終濃度25 μ M) を添加し80分間経時変化測定

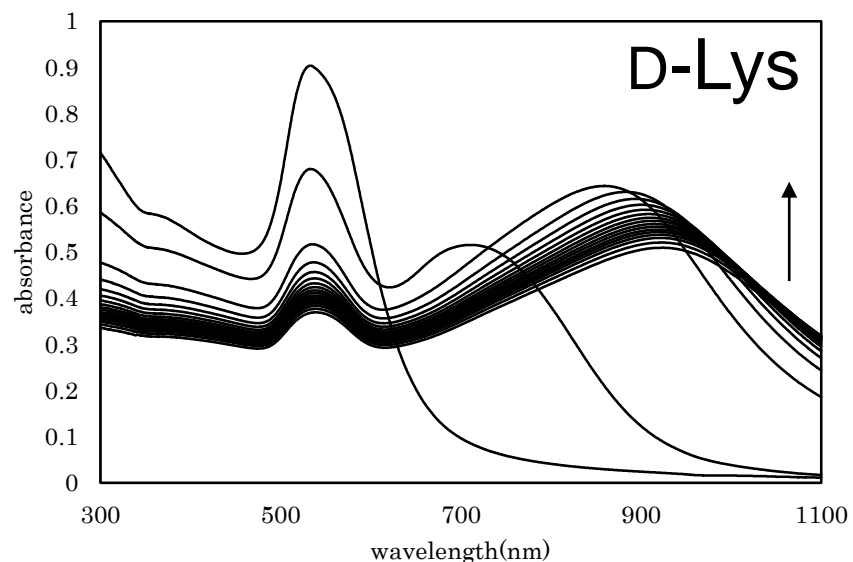


図 3-1-5. TAAuNPsに5 mM D-リシン溶液5 μ L (終濃度25 μ M) を添加し80分間経時変化測定

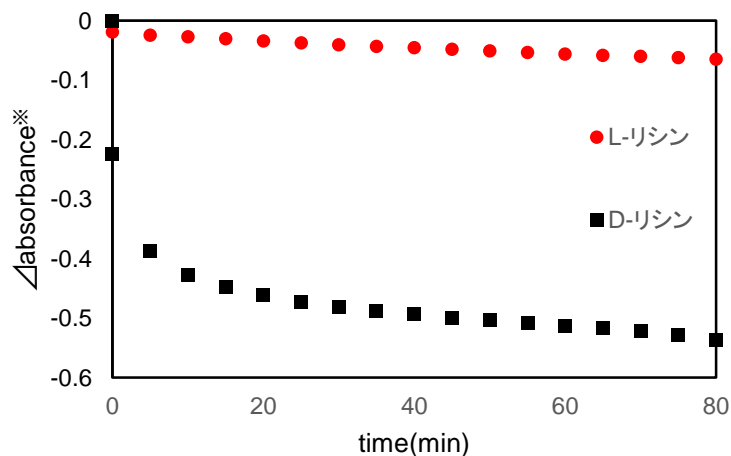
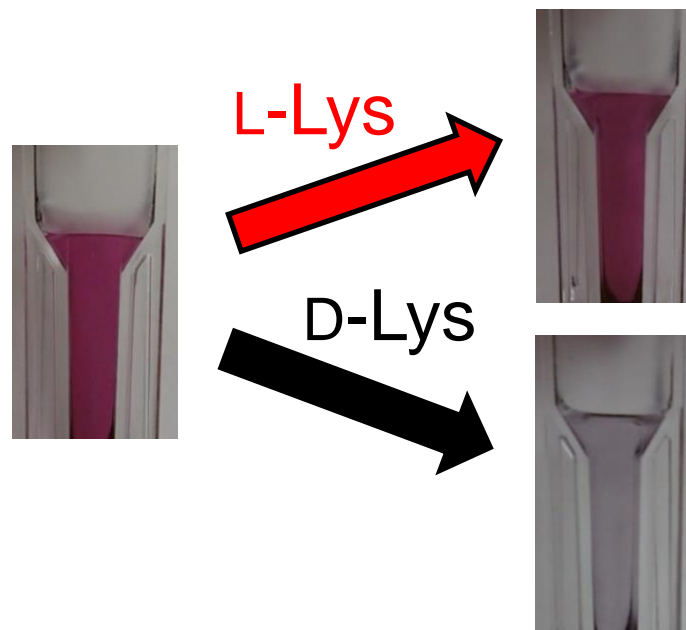
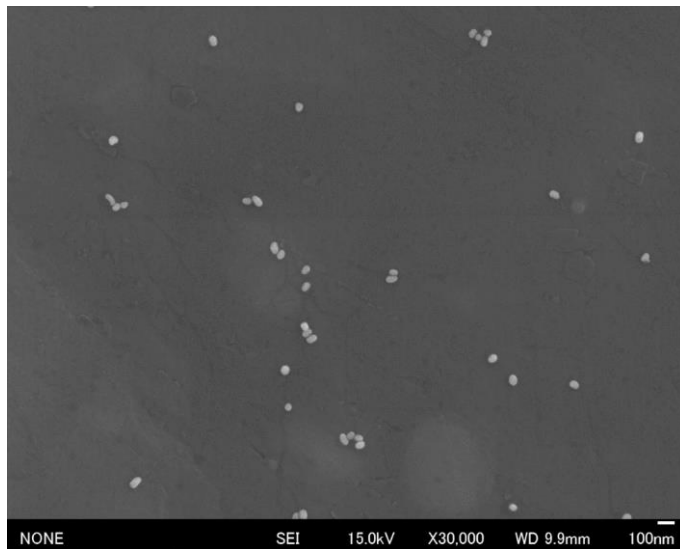
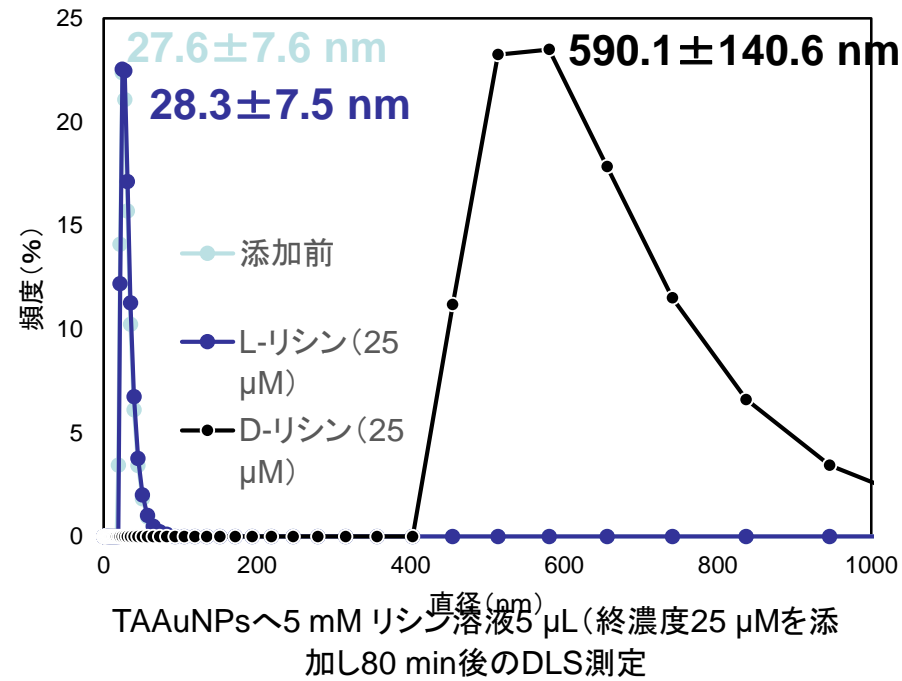


図. TAAuNPに5 mM リシン溶液 5 μ L (終濃度25 μ M) 添加した時の533 nmの λ_{\max} のプロット変化
※添加前との吸光度差

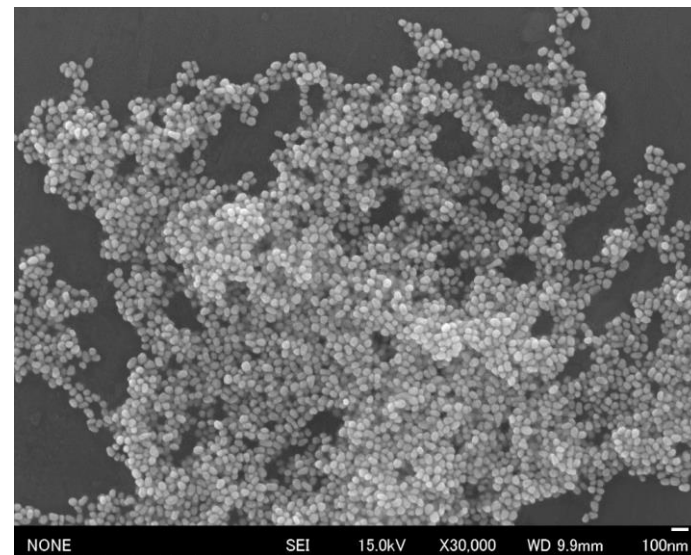


80分後

アミノ酸(Lys)の不斉識別



25μM L-Lys添加80min後のSEM像



25μM D-Lys添加80min後のSEM像

アミノ酸 (Cys) の不斉識別

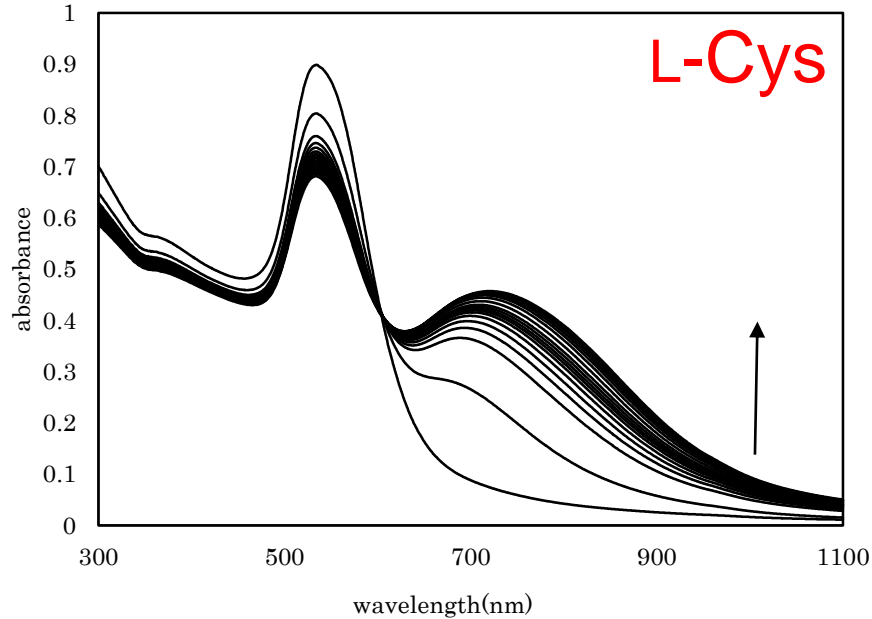


図. TAAuNPsに0.1 mM L-システイン溶液5 μ L (終濃度0.5 μ M) を添加し80分間経時変化測定

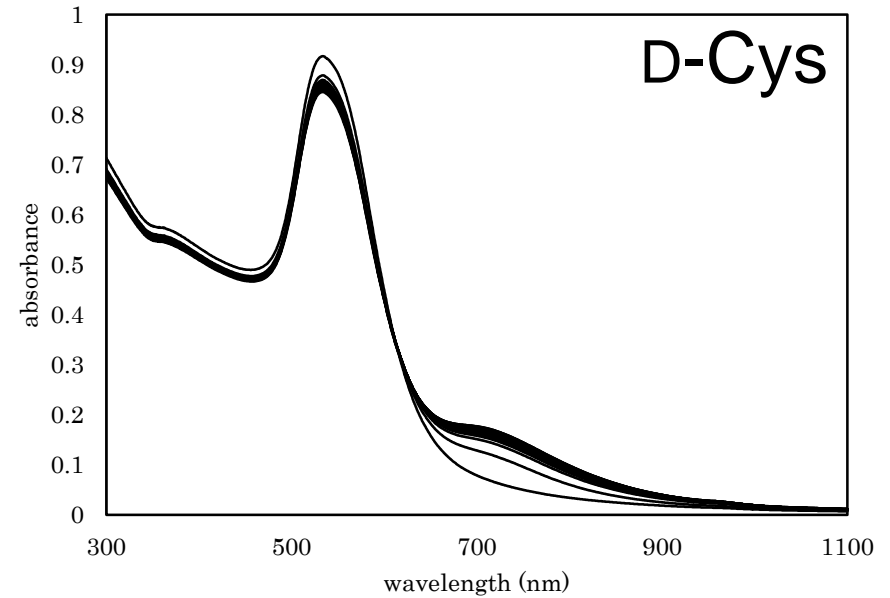


図. TAAuNPsに0.1 mM D-システイン溶液5 μ L (終濃度0.5 μ M) を添加し80分間経時変化測定

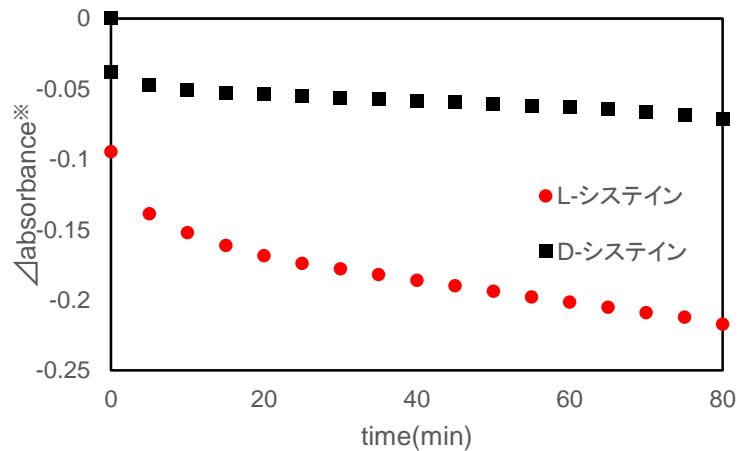
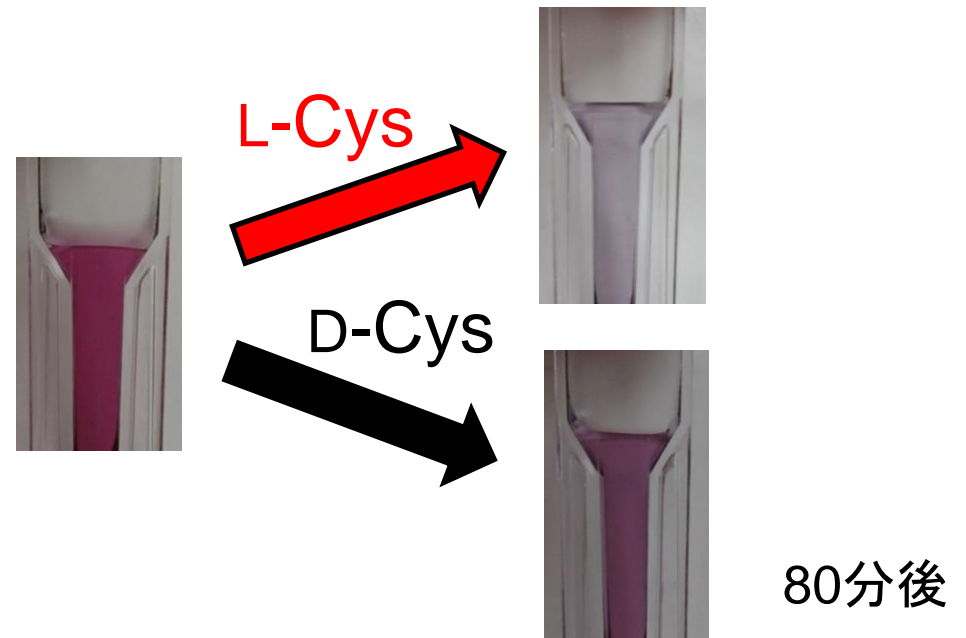
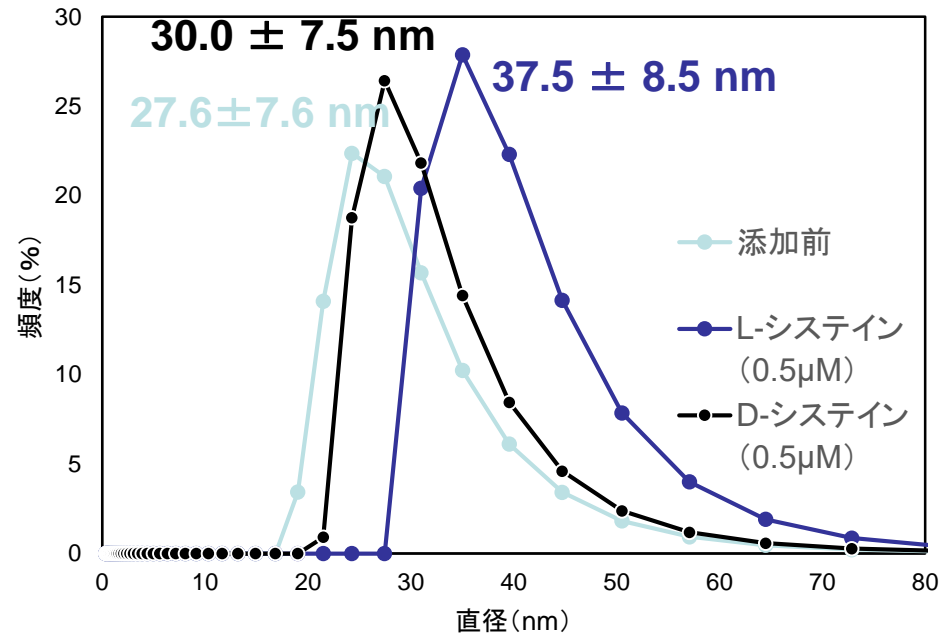


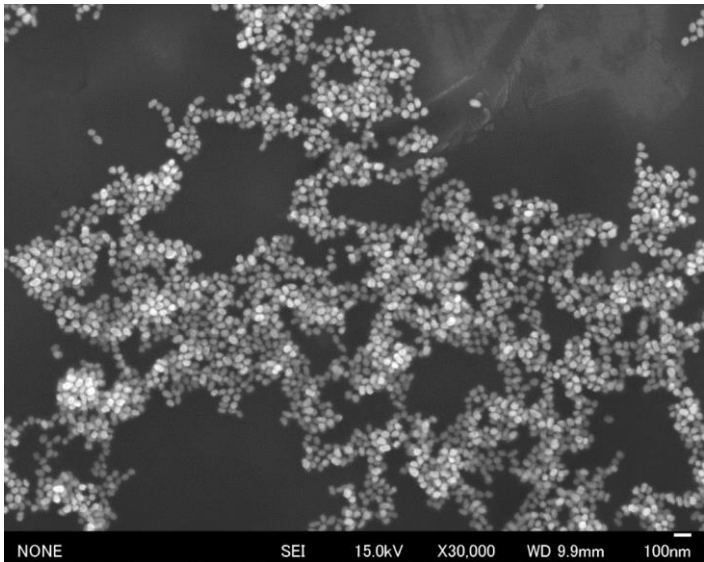
図. TAAuNPsに0.1 mM システイン溶液 5 μ L (終濃度0.5 μ M) 添加した時の533 nmの λ_{max} のプロット変化
※添加前との吸光度差



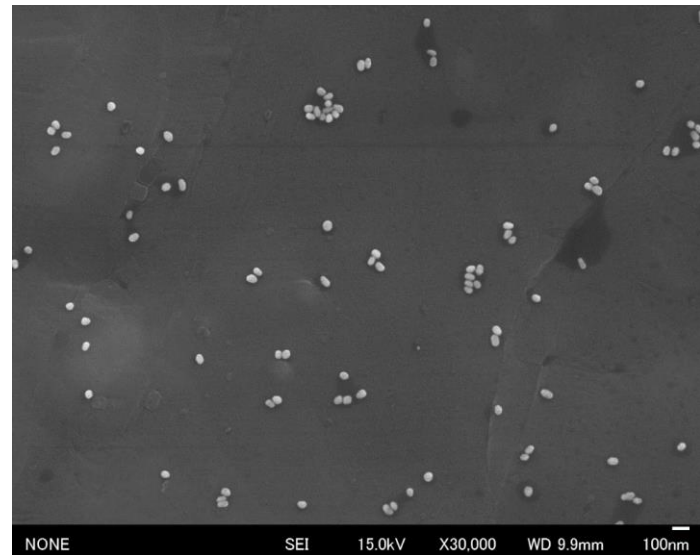
アミノ酸 (Cys) の不斉識別



TAAuNPsへ0.1 mM システイン溶液5 μL (終濃度0.5 μM)を添加し80 min後のDLS測定



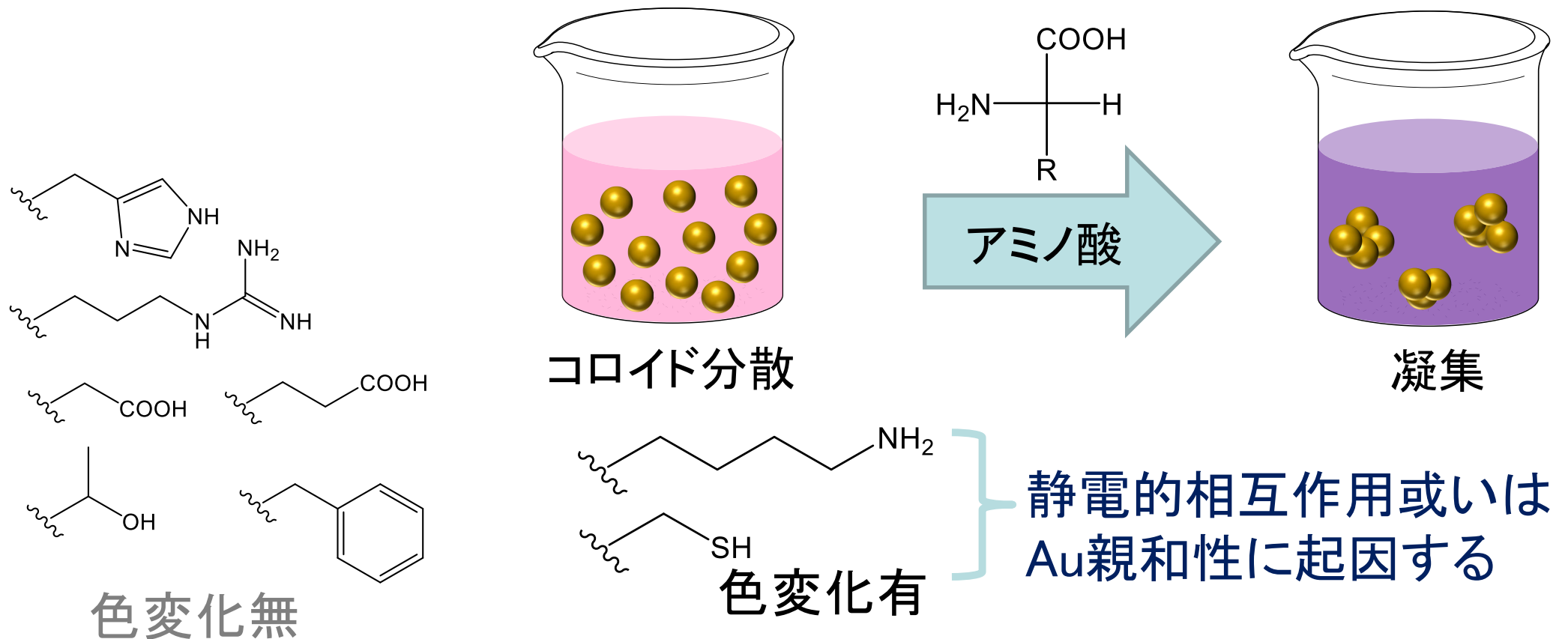
0.5μM L-Cys添加80min後のSEM像



0.5μM D-Cys添加80min後のSEM像

結論

- 天然有機酸の酒石酸を用いて、簡便な手法でキラルなナノ材料を構築できた。
- コロイド凝集を伴う色調変化によって選択的アミノ酸検出が可能となった。
- 更に、アミノ酸のキラル識別も可能であった。



想定される用途

- ・ 本技術により、簡単な手法で**付加価値の高い微粒子系ナノ材料の構築**が可能となる。このことは、ナノテクノロジーやナノバイオ分野でメリットが大きい。
- ・ 天然に豊富に存在する有機酸を利用するため、副産物等の有効利用やリサイクルに繋がると思われる。
- ・ バイオセンサーとしての素材は勿論のこと、凝集現象による特定の生体物質の除去剤として期待が持てる。
(食品分野において特定成分の除去剤に応用可能)
- ・ 上記以外に、生体適合型デバイスや微粒子系薬剤としての利用に期待できる。(美容や健康分野での微粒子系材料として機能できる)

実用化に向けた課題

- 現在、一定濃度範囲および特定アミノ酸において選択的かつキラル識別が色判別によって行える金ナノ粒子の開発が済んでいる。しかし、選択性の多様化の点が未解決である。
- 今後、多様なヒドロキシ有機酸を用いて金ナノ粒子を合成する手法を開拓し、それらの分子認識能について実験データの取得を行っていく。
- 実用化に向けて、色変化の高感度化や認識対象物質の拡張ができるよう技術を確立する必要もあり。

企業への期待

- 未解決の認識対象分子の拡張については天然に多様に存在するヒドロキシ有機酸の活用により克服できると考えている。
- バイオセンサーやバイオ染色・ラベリング及び微粒子分散の技術を持つ、企業との共同研究を希望。
- また、生体イメージング剤を開発中の企業、微粒子を活用したバイオサイエンス分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : ヒドロキシ酸還元型金ナノ粒子を用いたアミノ酸の色調変化による選択的検出と不斉識別
- 出願番号 : 特願2018-178008
- 出願人 : 山梨大学
- 発明者 : 新森英之、酒井皓大

お問い合わせ先

山梨大学

研究推進・社会連携機構

社会連携・知財管理センター

TEL 055-220-8759

FAX 055-220-8757

e-mail renkei-as@yamanashi.ac.jp