

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05532

研究課題名(和文) 蛍光増強のためのナノ積層構造を有した高感度バイオチップの創製

研究課題名(英文) Development of sensitive biochips with multilayered structures aiming for fluorescence enhancement

研究代表者

矢野 和義 (YANO, Kazuyoshi)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：40262109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： 蛍光強度を指標に、疾病指標成分を高感度に測定するためのバイオチップ開発を行った。すなわち、ガラス基板上に、金属膜と光干渉膜を順次積層したナノ構造構造を構築し、蛍光シグナルを増強させるための条件検討を詳細に行った。その結果、光干渉膜を形成させるためのプラズマ重合法や振とう洗浄などの最適条件を決定した。これを踏まえて、分子認識能を持った2種類のDNA(アプタマー)を用いて標的分子を挟み込み検出するサンドイッチアッセイを行ったところ、標的分子に由来する蛍光強度を約5倍に増強することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は疾病の早期発見を目指し、従来半導体微細加工に利用されてきたプラズマ重合法をバイオテクノロジーの分野に活用しようとするものである。今回の科研費助成事業により、近年抗体に代わる安定な核酸分子認識素子として注目されているアプタマーを用い、ナノ積層構造を作製するための最適条件を決定したことで、目的物質の検出シグナルを増強させることに成功できた。このため、本技術が医療分野に貢献できる可能性を示すことができた。またプラズマ重合法はドライプロセスによる一括加工が可能で大量生産に適した技術であるため、将来の事業化という観点からも極めて優れたポテンシャルを有しており、大変意義深い。

研究成果の概要(英文)： To aim at sensitive detection of target molecules, nano-scale layered structure was fabricated on glass slides modified with silver layer as a metal mirror and with plasma-polymerized film as an optical interference layer. Acetonitrile was utilized as a monomer aiming for the purpose of creating amino group on the surface of plasma-polymerized film. Conditions for plasma-polymerization and washing were carefully examined by measuring membrane thickness and fourier transform infrared (FT-IR) spectra, and optimized. Finally, aptamer-based sandwich assay was performed on the glass substrate modified with nano-scale layered structure, resulting in about 5-fold enhancement of fluorescence intensity.

研究分野：分析化学

キーワード：プラズマ重合法 ナノ積層構造 蛍光増強 アプタマー サンドイッチアッセイ

## 1. 研究開始当初の背景

がんなどの疾患に関わる極めて微量なマーカータンパク質やその他の創薬ターゲットを高感度に検出する技術の開発は、創薬や臨床検査などの医療分野において、また早期発見・早期治療の観点からも、極めて強く望まれている。そのような疾病マーカーに対して高い親和性と特異性を有する分子認識素子の開発は、臨床分野において極めて重要である。現在、分子認識素子として抗体を用いた免疫測定法(イムノアッセイ)が広く行われているが、抗体は熱や有機溶媒に対して容易に失活する、長時間の安定性に欠ける、などの欠点がある。そこで、近年抗体に代わる分子認識素子として、分子認識能を有する一本鎖核酸であるアプタマーが注目されている。

一方、研究代表者はこれまでにナノメートルサイズの薄膜構造の構築により、高機能な DNA アレイやプロテインアレイの作製と標的分子の高感度な検出に成功してきた。例えば、平成 28-30 年度科研費(基盤研究 C)においては、基板上に金属膜と、光透過膜としてアセトニトリルをモノマーとしたプラズマ重合膜をナノレベルで順次積層させたナノ構造基板により、基板上での抗原抗体反応や DNA ハイブリダイゼーションに由来する蛍光シグナルを著しく増幅することに成功していた(K. Yano and A. Iwasaki, *Sensors* (2017) 17, 37-46)。

## 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が有する機能性ナノ薄膜とバイオセンシングとの融合技術を駆使して、標的タンパク質を高感度に検出することを目的とした。すなわち、ガラス基板の表面に、ナノメートルレベルの膜厚でコントロールされた金属膜と光透過膜を順次積層することにより(ナノ積層構造の創出)、その上で起こるバイオセンシング由来の蛍光シグナルを数十倍に増幅させることを目指した。薄膜表面での光干渉現象を利用して蛍光シグナルを増幅することで、アプタマーを分子認識素子とした高感度なバイオセンシングの実現を最終目標とした。

具体的には、まずプラズマ重合法により作製するアセトニトリル膜を光透過膜として利用するため、膜表面の物性解析を行った。次に、アプタマーをアセトニトリル膜に固定化するための新たな架橋剤を検討し、重合時の電力の最適化も図った。最後に、ナノ積層構造上でアプタマーサンドイッチアッセイを試み、高感度な検出が可能であるか検証した。

## 3. 研究の方法

### (1) 基板の振とう洗浄時間と FT-IR スペクトルとの相関

標的分子の検出操作に不可欠な振とう洗浄操作に対するプラズマ重合膜の物性変化を評価するため、フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) によりスペクトルの変化を観察した。すなわち、ナノ積層基板を各振とう洗浄時間の条件ごとに作製し、FT-IR 測定装置 (FT/IR-670 Plus、日本分光株式会社) を用いて FT-IR スペクトル分析を行った。まず、スライドガラス (76×26 mm、松波硝子工業株式会社) を特級エタノールに浸け、超音波洗浄機で洗浄後、乾燥させた。その基板上に、スパッタリング装置 (CFS-4ES、芝浦エレクトロニクス株式会社) を用いて、接着層として Cr を 15 sec、その上に Ag を 7 min、いずれも 200 W の条件下で製膜した。続けて、プラズマ重合装置 (BP-1、SAMCO) を用いて、アセトニトリルをモノマーとしたプラズマ重合膜を Ag 膜基板上に製膜した。次に、このナノ積層基板を基板用反応槽 (MWB-04MP、4 ウェル、104×169.5×34.9 mm、株式会社イナ・オプティカ) 中に分注した 10 mL の超純水に浸漬し、10、30、60 min 振とうした。乾燥後、FT-IR スペクトルを測定し、各条件間で比較することで表面分析した。

### (2) プラズマ重合時の最適な電力の検討

振とう洗浄により低下した後の膜厚がより制御しやすくなるための最適な電力条件を検討した。洗浄済みのシリコン基板に、プラズマ重合装置により、電力を通常の 100 W に加えて、50、150、200 W の条件も加えてプラズマ重合膜を製膜した。振とう洗浄前後の膜厚の測定は、レーザーエリプソメーター (ESM-1T、ULVAC) を用いて行った。

### (3) ナノ積層基板を用いたアプタマーサンドイッチアッセイ

最適化された条件に従い、モノマーとしてアセトニトリルを用い、200 W でプラズマ重合を行い、架橋剤として *N*-(6-マレイミドカプロイルオキシ) スルホスクシンイミド (Sulfo-EMCS) を用いて、アプタマーサンドイッチアッセイを行った。Sulfo-EMCS は末端のマレイミド基がチオール基と、もう一方の末端にあるスクシンイミド基が NH<sub>2</sub> 基と、それぞれ共有結合できる。まず撥水ガラス基板 (TF2404、76×26 mm、ウェル数: 24 穴、松浪硝子工業株式会社) に、印刷と同じパターンに穴あけパンチで 3.5 mm 径の穴を開けたマスキングテープを貼ってマスキングした。洗浄、乾燥後、Ag 膜とアセトニトリル膜を順次積層することでナノ積層構造を構築した。その後、マスキングテープを剥がすことで、ウェルにのみ各薄膜が製膜された状態とした。

標的分子トロンビンに対する 15 mer のアプタマー-G15D をチオール標識した G15D-SH (一次アプタマー) と、29 mer のアプタマー-60-18[29] を蛍光標識した 60-18[29]-Cy5 (二次アプタマー) を用意し、ともに使用前に熱変性後、徐冷した。一次アプタマー、還元剤としてトリス (2-カル

ボキシエチル) ホスフィン (TCEP)、そして Sulfo-EMSC を反応させ、一次アプタマーと架橋剤を結合させた。この反応液をナノ積層基板のウェルに滴下し、60 min、室温で静置することで一次アプタマーを基板上に共有結合により固定化させた。次に、あらかじめトロンビンと二次アプタマーを相互作用させた反応液を調製し、基板上の一次アプタマーと相互作用させた。洗浄、風乾後、二次元蛍光検出装置 (Pharos FX、Bio-Rad) を用いて蛍光シグナルを測定し、蛍光強度を算出した。以上の実験の模式図を図1に示す。

#### 4. 研究成果

##### (1) 基板の振とう洗浄時間と FT-IR スペクトルとの相関

振とう時間に対する基板表面の変化を観察するために、ナノ積層基板を各振とう洗浄時間の条件ごとに作製し、FT-IR スペクトル分析を行った。その結果 (図2)、アセトニトリル膜を製膜した場合は、FT-IR スペクトルの 1700、2200、3300  $\text{cm}^{-1}$  付近のピークの高さが高くなった。これらのピークは主に、1700  $\text{cm}^{-1}$  付近は C=C、NH<sub>2</sub>、N-H 変角振動、C=N 伸縮振動を、2200  $\text{cm}^{-1}$  付近は C≡N 伸縮振動を、3300  $\text{cm}^{-1}$  付近は NH<sub>2</sub> 対称および非対称伸縮振動にそれぞれ帰属されることが知られている。そのため、アセトニトリル膜中ではこれらの結合が起きており、特に重要なこととして、今後一次アプタマーの固定化に必要な NH<sub>2</sub> 基が含まれていることが示唆された。その一方で、最初の 10 min の振とう洗浄によってピークの高さが大きく下がり、それ以降は変化がほとんど見られなかった。このことから、アセトニトリル膜中の NH<sub>2</sub> 基は 10 min の振とう洗浄でその大部分が失われる一方で、残存した部分はさらなる振とう洗浄によってもほとんど失われないことが示された。これより、アッセイのための最適な膜厚を得るためには、洗浄操作により失われる膜厚の分を考慮した製膜が必要であることが示唆された。

##### (2) プラズマ重合時の最適な電力の検討

振とう洗浄により低下した後の膜厚をより制御しやすくするため、重合時の電力を 50、100、150、200 W で製膜し、振とう洗浄前後の膜厚を測定した。その結果 (図3)、重合時の電力を大きくするほど、時間当たりの製膜速度が遅くなる一方で、振とう洗浄により膜厚が低下する割合は小さくなった。このことから、重合時の電力と振とう洗浄による膜厚の低下の割合には相関があることが示された。これは、重合時の電力を大きくすると、製膜されるプラズマ重合膜がより緻密になり、表面に残るモノマーやオリゴマーネットワークが少なくなるためと考えられた。同様の傾向は、各基板の FT-IR スペクトルの解析によっ

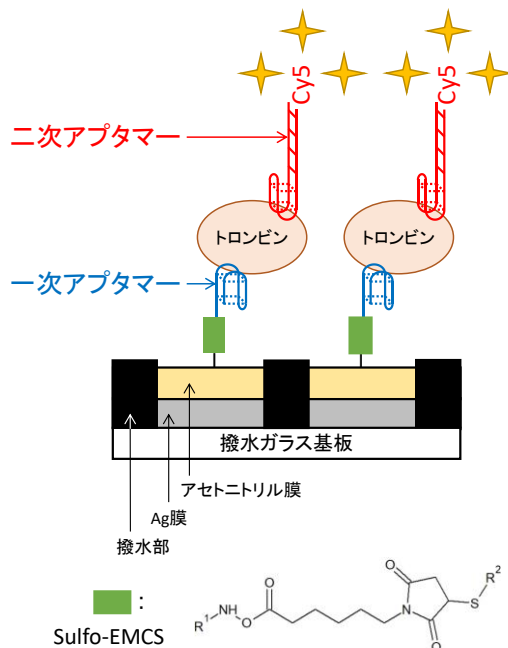


図1 ナノ積層基板上におけるアプタマーサンドイッチアッセイの概念図

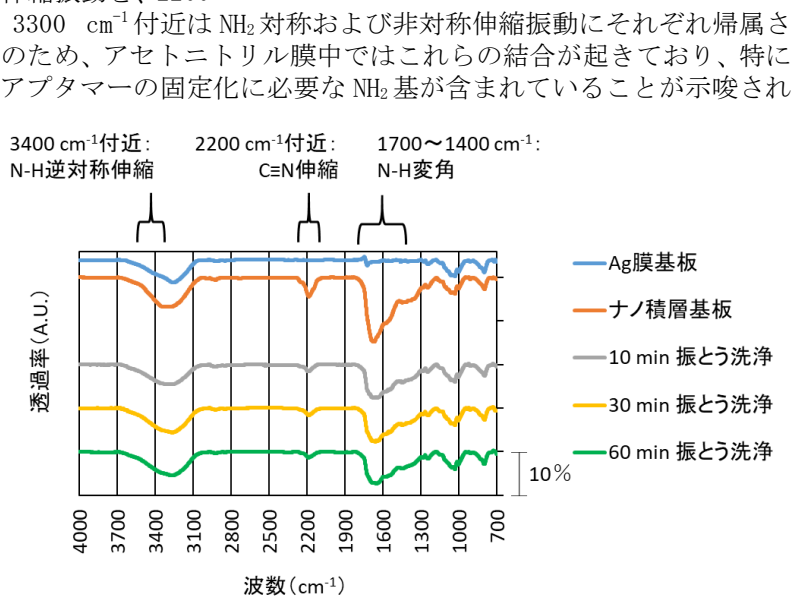


図2 FT-IRスペクトル測定による振とう洗浄の影響評価

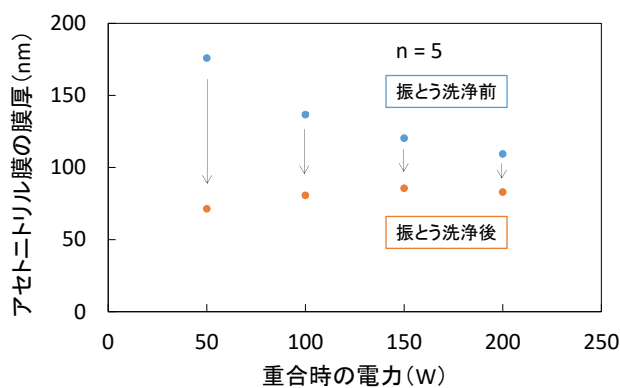


図3 重合時の電力と膜厚の関係

でも確認された。以上のことから、本実験にナノ積層基板を用いる場合は、膜厚の制御可能性が高まるため、プラズマ重合装置の限界値である 200 W で重合することが最適であることが示唆された。

### (3) ナノ積層基板を用いたアプタマーサンドイッチアッセイ

モノマーとしてアセトニトリルを用い、200 W でプラズマ重合を行い、架橋剤として Sulfo-EMCS を用いて、最終的にナノ積層基板におけるアプタマーサンドイッチアッセイの評価を行った。その結果 (図 4)、⑥のナノ積層基板にトロンピンを用いた条件で最も蛍光増強され、その程度は未製膜の①

と比較して5.1倍であった。また、ターゲット物質未使用の④やキモトリプシンを標的とした⑤と比較しても⑥で顕著な差が認められたため、トロンピンへの特異性も確認された。今後は膜厚をさらに最適化して同様の実験を行うことで、蛍光増強の倍率が高くなり、それに伴い特異性もより顕著になると期待された。

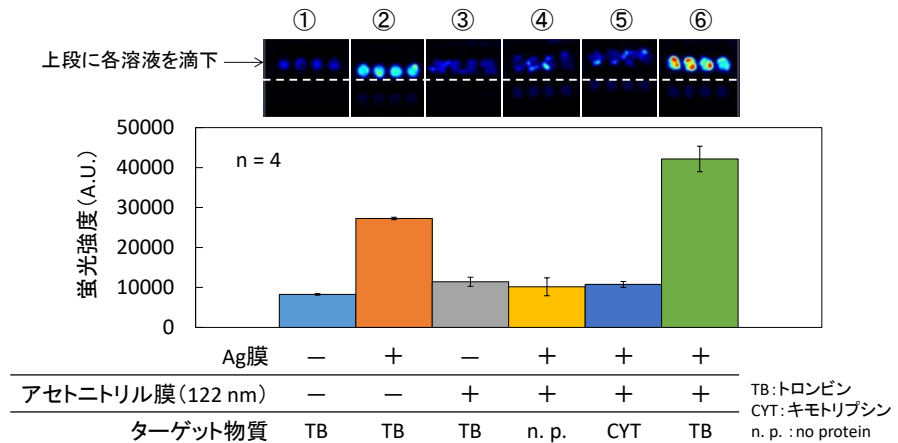


図4 ナノ積層基板上におけるアプタマーサンドイッチアッセイ

以上の結果、ナノ積層基板の作製条件を最適化することによって、バイオアッセイの蛍光強度を増強させ、高感度検出に繋がられる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松家祐太郎、岡田麻衣子、杉本岩雄、矢野和義
2. 発表標題 蛍光増強のためのナノ積層基板の作製と固定化DNAによるバイオアッセイへの応用
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野和義、松家祐太郎、佐藤彩香、岡田麻衣子、杉本岩雄
2. 発表標題 蛍光増強のためのナノ積層基板の作製と高感度アプタマーサンドイッチアッセイへの応用
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------