様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月　 １ 日現在

機関番号：１４５０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2015～2017
課題番号：１５Ｋ０４５９２

研究課題名（和文）1分子検出高感度表面増強ラマン分光による多成分化学分析技術

研究課題名（英文）Multi-components chemical analysis using surface-enhanced Raman spectroscopy with single-molecule sensitivity

研究代表者
菅野　公二（Sugano, Koji）
神戸大学・工学研究科・准教授
研究者番号：２０３７２５６８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：巨大な表面増強ラマン散乱（SERS）を生み出す金ナノ粒子二量体アレイの高効率生成技術および高速高感度SERS分光分析技術を基盤として，1分子ずつ多成分をラマン分光検出する分子同定技術の構築を目的とした。その中で，単独の金ナノ粒子二量体を用いてDNAオリゴマーの検出が可能であることを確認した。局所的なラマン散乱光増強場から１つのDNAオリゴマーを検出したと考えられる。さらに，構成要素であるアデニンやグアニン，骨格要素に由来するラマンピークを検出したことから，多成分を同定できることを示した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this project was to develop the analytical method for multi-component identification of molecules based on surface-enhanced Raman spectroscopy using a gold nanoparticle dimer with single molecule sensitivity. Due to the Raman enhancing hotspot with 1 nm nanogap in the single dimer, for the first time, the single oligomer detection and analysis was demonstrated. The dimer identified the several bases and backbone components of the single DNA oligomer. The dynamics of the single oligomer could be analyzed. The oligomer was trapped and stayed at the nanogap hotspot, and fluctuated with rotation.

研究分野： マイクロ・ナノシステム

キーワード： 表面増強ラマン分光　1分子計測　金ナノ粒子　プラズモニクス　プラズモニクス

## １．研究開始当初の背景

DNA（deoxyribonucleic acid）の塩基配列における一塩基の差異は，各個人の特徴に様々な違いを引き起こし，これらは SNP（Single Nucleotide Polymorphism）と呼ばれる。例として，投薬治療に対する副作用の程度は患者によって変化するが，これは SNP に由来することが明らかとなっている。また，癌は DNA 塩基のメチル化といった遺伝子欠陥が存在することで引き起こされる。よって，DNA 塩基配列の識別および同定は個人に適した投薬・治療を行うオーダーメイド医療の実現や遺伝子疾患の早期発見に重要であることがわかる。

現在広く普及している DNA シーケンシンサは蛍光分子を用いることで解析を行っている。しかし，PCR（polymerase chain reaction）による DNA の大量増幅や複雑な化学反応による前処理が必要であるため，長時間を要する。近年，ナノポア及びナノ電極間を DNA が通過する際の電流値変化を読み取ることで，ラベルフリーで一塩基ずつ解析を行う技術が研究されている。しかし，各塩基の電流値分布の重なりが大きいため，信頼性に問題があると考えられる。

信頼性の高い新たな DNA シーケンシング技術として，表面増強ラマン分光法（SERS: Surface-enhanced Raman spectroscopy）に着目した。物質に光を照射した際，入射光と波数が異なるラマン散乱光が放出される。波数の変化量（ラマンシフト）は分子の構造や結合状態を反映するため，ラマン散乱光のスペクトルを計測することにより信頼性の高い分子の同定・識別が可能となっている。一般的にラマン散乱断面積は非常に微弱であるため，ラマン散乱光の計測は困難である。しかし，金属ナノ粒子の表面近傍に物質が存在するとき，局在プラズモン共鳴（LSPR: Localized-surface plasmon resonance）と呼ばれる電磁場増強効果によってラマン散乱光を増強することが可能である。SERS はこれらの手法を用いてラマン散乱光を計測する手法である。金属ナノ粒子間の 1 nm 程度のギャップにおいて特に高い電磁場増強効果が得ることができ，ホットスポットと呼ばれる。単一の金属ナノ粒子二量体において，粒子の配列方向と入射光の偏光方向を一致させた際，ホットスポットの電磁場増強効果は最も高くなることが知られている。従来の研究では，基板上に金属ナノ粒子がランダムに配列された状態であったため効果的な SERS 増強が引き起こされず，報告されている最下限検出濃度は $10^{-8}$ M と一分子検出には不十分であった。

新たな超高感度 SERS 構造として，ナノトレンチセルフアセンブル粒子配列手法により作製される金ナノ粒子二量体を提案している（図１）。本基板では，金ナノ粒子二量体を一方向に配列しており，全ての基板において効果的な SERS 増強を引き起こすことが可能である。図２の解析結果が示すように，金ナノ粒子二量体のホットスポットにおいて $10^{11}$ 倍の SERS 増強効果が得られることが分かり，これは一分子検出に十分であると考えられる。先行研究では，計測範囲内に複数の二量体が存在する配列構造を用いて，$10^{-11}$ M という極低濃度溶液において 4 種 DNA 塩基の同定・識別に成功した。また，計測範囲内に二量体が単独で存在する単独構造を用いて，一つのホットスポットに由来するアデニンのラマンスペクトルの検出に成功している。

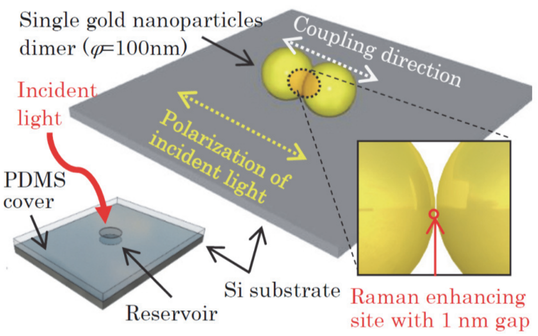


図 1　単一金ナノ粒子二量体を用いた表面増強ラマン分光法(SERS)の概要。

## ２．研究の目的

本研究では，金ナノ粒子二量体単独構造において DNA オリゴマーを計測することにより，一本鎖 DNA の検出および塩基配列の識別が可能であるか検証する。

## ３．研究の方法

（1）金ナノ粒子二量体配列方法

金ナノ粒子二量体はナノトレンチセルフアセンブル粒子配列手法により作製される。プロセスの概要を図 3 に示す。金ナノ粒子コロイド溶液をガラス基板とナノトレンチを有したシリコン基板の間に満たす。ガラス基板及びシリコン基板表面は硫酸加水洗浄により親水化されており，基板間には図 3 に示すようなメニスカスが形成される。乾燥過程において，メニスカスの端にある金ナノ粒子は界面

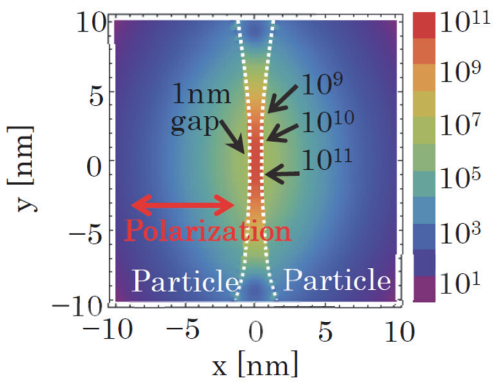


図 2　単一金ナノ粒子二量体ナノギャップ部におけるラマン増強度の FDTD（finite differential time domain）解析結果。粒子径は 100 nm. 入射光偏光方向と粒子連結方向は一致させている。

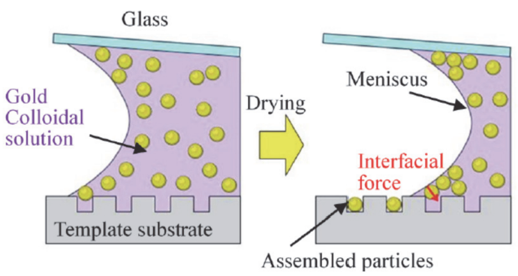

図 3　ナノトレンチセルフアセンブル粒子配列手法の概要。

張力によりトレンチに捕捉される。この手法によって，金ナノ粒子を指定した位置に一方向で配列することが可能となる。トレンチに捕捉されたナノ粒子は粒子間コロイド液の表面張力によって互いに引き付けられる。金ナノ粒子表面には，コロイド溶液に含まれる長さ 0.5　nm のアセトンジカルボン酸分子が一様に付着している。よって，UV オゾンプロセスでアセトンジカルボン酸を除去することで粒子間に 1 nm のギャップが形成され，ホットスポットとして機能すると考えられる。本研究では，平均直径 100 nm の金ナノ粒子コロイド溶液（EMGC100, BBI Solutions）を使用した。配列する際の金ナノ粒子コロイド溶液濃度は 0.002　wt%とした。

（2）DNA オリゴマーの構造

本研究では，8 鎖長 DNA オリゴマー（Fasmac Co., Ltd）を計測対象として用いた。DNA オリゴマーの構造を図 4 に示す。リン酸と五炭糖

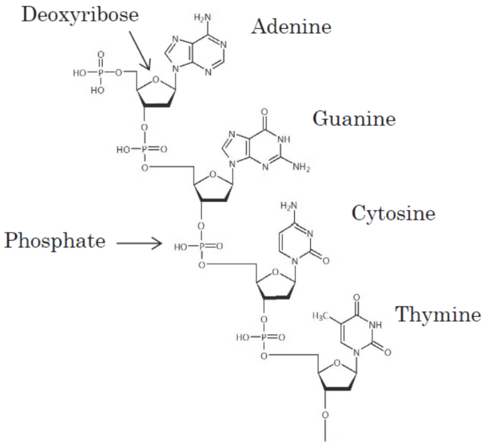

図 4　DNA オリゴマー（AGCTAGCT）半鎖長部分(AGCT）の構造。

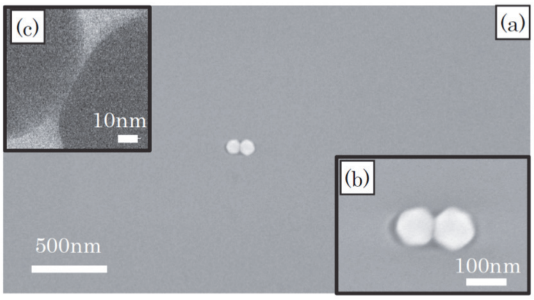

図 5　作製した単一金ナノ粒子二量体の SEM 及び TEM 画像。(a)単独で存在する二量体と(b)拡大した SEM 画像。(c)二量体の TEM 画像。

（デオキシリボース）で構成された骨格に DNA 塩基が結合した構造となっている。4 種の DNA 塩基（アデニン，グアニン，チトシン及びチミン）の配列が遺伝情報を伝達する。本実験で用いるオリゴマーの塩基配列は AGCTAGCT とし，濃度は 10　μM とした。一本鎖 DNA の幅はおよそ 1　nm であるため，ホットスポットは DNA オリゴマーが一つだけ入る限られた空間であると考えられる。

（3）ラマン分光計測

ラマン分光計測実験では，顕微ラマン分光装置（LabRAM ARAMIS, Horiba Co., Inc.）を使用した。グレーティングは 1200 /nm，ホール・スリットサイズは 500　μm とした。顕微鏡レンズは N.A.　0.5 の倍率×50 を用いた。レーザー強度及びレーザー径はそれぞれ 8.2 mW，2　μm とした。レーザー波長については，100 nm 金ナノ粒子二量体の解析結果において増強効果が高くなる 632.8 nm を使用した。

図 1 に示すように，二量体の位置にリザーバを有する PDMS をシリコン基板に貼り付けた。リザーバに DNA オリゴマー溶液を満たし，上からカバーガラスを置いた。レーザーの照射位置を金ナノ粒子二量体に合わせ，金ナノ粒子二量体からのラマンスペクトルを計測した。

## 4．研究成果

作製した単一金ナノ粒子二量体の SEM 画像を図 5 に示す。レーザー径範囲内に複数の金ナノ粒子二量体が存在しないことから，単一の金ナノ粒子二量体に由来したラマンスペクトルの計測が可能となっている。

本実験では計測回数を 50 回とし，インターバル 1.5　s，積算時間 0.5　s でラマン計測を行った。図 6 に得られたラマンスペクトルの一部を示す。図 7 に全てのラマンスペクトルのコンタープロットで示す。

表 1 に DNA 塩基，リン酸部（PO$^{2-}$）及びデオキシリボースのラマンシフトを示す。得られたラマンスペクトルにおいて，アデニン，グアニン，PO2-及びデオキリリボースのラマンピークが確認される。ホットスポットは DNA オリゴマーが一つだけ入る限られた空間であることから，金ナノ粒子二量体を用いて一つの DNA オリゴマーの一部を検出していると考えられる。また，アデニンのラマンピークが常に検出されることから，DNA オリゴマーがホットスポット付近にトラップされ，留まり続けていると考えられる。

図 8 にアデニン，グアニン及び PO$^{2-}$のラマンシフトにおける時間推移を示す。各ラマン強度が時間とともに変化している様子が分かる。アデニン（734　cm$^{-1}$）のラマン強度は 45 秒からは低くなるが，常に検出されていることがわかる。グアニン（656 cm$^{-1}$）のラマン強度について，最初はピークが確認されるが，45 秒を境に消えた。PO$^{2-}$（1094　cm$^{-1}$）及びデオキリリボース（1010，1052　cm$^{-1}$）のラマン強度について，最初はピークが確認されない

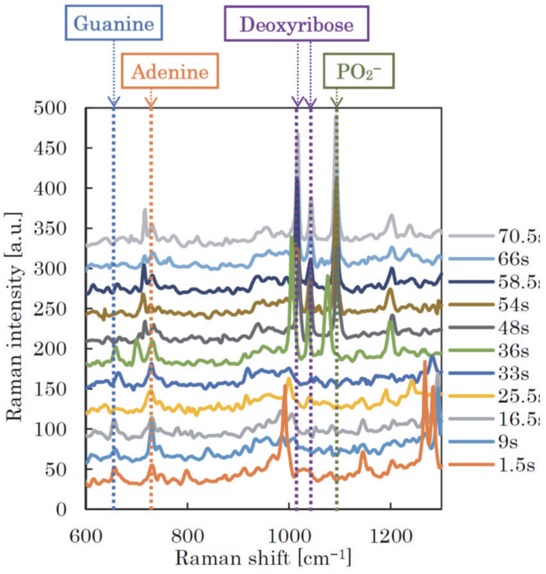


図 6　連続計測で得られたラマンスペクトルの一部。インターバルは 1.5 秒，積算時間は 0.5 秒。

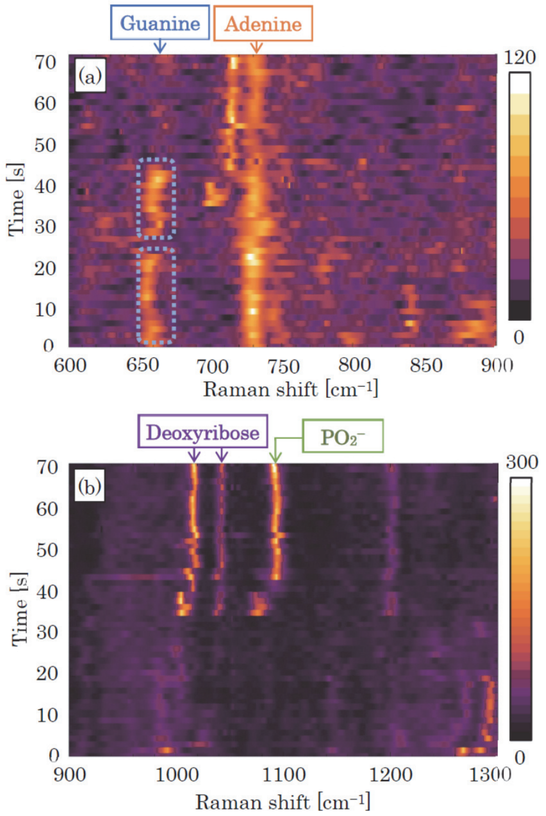


図 7　連続計測で得られた全てのラマンスペクトルのコンタープロット。(a)　600～900 cm$^{-1}$，(b) 900～1300 cm$^{-1}$。

が，40 秒付近から急激に強く検出されており，グアニンと異なる傾向を示した。このようなラマン強度の変化は，ブラウン運動や電磁場の影響により，ホットスポット付近にトラップされた DNA オリゴマーが回転および移動しているためと考えられる。これらはホットスポットが一塩基もしくは二塩基の空間分解能を有し，DNA オリゴマーの微小運動が検出可能であることを示唆している。

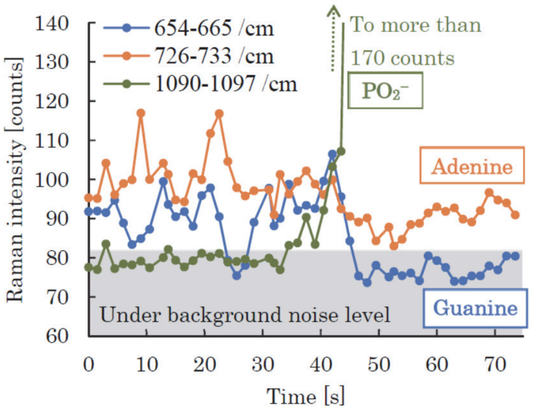


図 8　連続計測における各ラマン強度の 0 秒から 73.5 秒の時間推移。各ラマンシフト周辺の最大値を示している。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計１０件）

① Koji Sugano, Nanotemplate-guided self-assembly of gold nanoparticles and its application to plasmonic bio/chemical sensing. International Journal of Automation Technology, Vol. 12, No. 1, pp. 79-86 (2018)

② Koji Sugano, Kohei Ikegami, Yoshitada Isono, Characterization method of relative Raman enhancement for surface enhanced Raman spectroscopy using gold nanoparticle dimer array, Japanese Journal of Applied Physics, Vol. 56, No. 6S1, 06GK03 (5p) (2017)

③ Koji Sugano, Kiyohito Aiba, Kohei Ikegami, Yoshitada Isono, Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy of 4,4'-bipyridine on a prefabricated substrate with directionally arrayed gold nanoparticle dimers, Japanese Journal of Applied Physics, Vol. 56, No. 6S1, 06GK01 (5p) (2017)

④ Toshimitsu Takeshita, Keisuke Suekuni, Kiyohito Aiba, Koji Sugano, Yoshitada Isono, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Analysis Device with Gold Nanoparticle Arranged Nanochannel, Electronics and Communications in Japan, Vol. 100, No. 4, pp. 33-41 (2017)

⑤ 饗庭清仁， 池上晃平， 山崎真之亮， 菅野公二， 磯野吉正， 金ナノ粒子二量体配列を用いたアデニン分子の高感度表面増強ラマン分光検出， 電気学会論文誌（センサ・マイクロマシン部門誌），Vol. 136, No. 6, pp. 256-260 (2016)

⑥ 菅野公二， 片山拓， 土屋智由， 田畑修， 高感度表面増強ラマン分光分析に向けたマイクロ流路内粒子凝集反応解析， 電気学会論文誌（センサ・マイクロマシン部門誌）， Vol. 135-E, No. 11, pp. 433-438 (2015)

⑦ 菅野公二， 平岡亮二， 土屋智由， 田畑修，

ナノテンプレートを用いた金ナノ粒子直鎖配列の作製と光学特性評価, 電気学会論文誌（センサ・マイクロマシン部門誌）, Vol. 135-E, No. 11, pp. 474-475 (2015)
⑧ Koji Sugano, Akihiro Nakata, Toshiyuki Tsuchiya, Osamu Tabata, High-speed Pulsed Mixing in a Short Distance with High-frequency Switching of Pumping from Three Inlets, Journal of Micromechanics and Microengineering, Vol. 25, No. 8, 084003 (9p) (2015)
⑨ Koji Sugano, Keisuke Suekuni, Toshimitsu Takeshita, Kiyohito Aiba, Yoshitada Isono, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy using Linearly Arranged Gold Nanoparticles Embedded in Nanochannels, Japanese Journal of Applied Physics, Vol. 54, No. 6S1, 06FL03 (6p) (2015)
⑩ 竹下俊光, 末國啓輔, 饗庭清仁, 菅野公二, 磯野吉正, 金粒子配列ナノチャネルを用いた表面増強ラマン分光分析デバイス, 電気学会論文誌（センサ・マイクロマシン部門誌）, Vol. 135-E, No. 6, pp. 214-220 (2015)

〔学会発表〕（計１４件）
① Katsunari Maruoka, Kohei Ikegami, Koji Sugano, Yoshitada Isono, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Adenine Molecule Using Single Dimer of Gold Nanoparticles, 30th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2017), 2017.
② Koji Sugano, Shuji Joya, Naoyuki Arai, Yuki Tanaka, Etsuo Maeda, Reo Kometani, Yoshitada Isono, Laser Wavelength Measurement Using Gold Nanoparticle Aggregate Integrated Microresonator, 30th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2017), 2017.
③ Katsunari Maruoka, Kohei Ikegami, Koji Sugano, Yoshitada Isono, SERS Detection and Analysis of a Single Oligomer using a Single Gold Nanoparticle Dimer, The 19th International Conference onSolid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers2017), 2017.
④ Kohei Ikegami, Koji Sugano, Yoshitada Isono, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Analysis of DNA bases using Arrayed and Single Dimer of Gold Nanoparticle, The 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2017), 2017.
⑤ Koji Sugano, Yuki Tanaka, Etsuo Maeda, Reo Kometani, Yoshitada Isono, Microresonator with gold nanorod array for laser wavelength measurement by photo-thermal conversion, The 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2017), 2017.
⑥ Kohei Ikegami, Koji Sugano, Yoshitada Isono, Highly-Sensitive and Rapid Detection of DNA bases using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy with Gold Nanoparticle Dimer Array, International Symposium on Micro-Nano Science and Technology2016, 2016.
⑦ Shuji Joya, Naoyuki Arai, Yuki Tanaka, Koji Sugano, Yoshitada Isono, Near Infrared Optical Absorption Property of Gold Nanoparticle Aggregates for Laser Wavelength Measurement, International Symposium on Micro-Nano Science and Technology2016, 2016.
⑧ Kensuke Yamamoto, Satoshi Nakata, Koji Sugano, Yoshitada Isono, High temperature creep forming technique of single crystal silicon thin film for 3D MEMS tactile sensors, International Symposium on Micro-Nano Science and Technology2016, 2016.
⑨ Koji Sugano, Yuki Tanaka, Etsuo Maeda, Reo Kometani, Yoshitada Isono, Optimization of Gold Nanorod Array Structure on Microresonator for Resonant-Based Laser Wavelength Measurement Using Photothermal Conversion, 29th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2016), 2016.
⑩ Koji Sugano, Kiyohito Aiba, Kohei Ikegami, Yoshitada Isono, Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of 4,4'-bipyridine on Fabricated Substrates with Directionally Arrayed Gold Nanoparticle Dimers, 29th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2016), 2016.
⑪ Kohei Ikegami, Koji Sugano, Yoshitada Isono, Characterization Method of Relative Raman Enhancement for Surface Enhanced Raman Spectroscopy Using Gold Nanoparticle Dimer Array, 29th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2016), 2016.
⑫ Koji Sugano, Single Molecule SERS with Directionally Arrayed Gold Nanoparticle Dimers on Substrate, Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-state Science 2016 (PRiME2016), 2016.
⑬ Koji Sugano, Plasmonic Nanostructure based on Self-Assembled Gold Nanoparticles for Highly Sensitive Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, The 11th Annual IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (IEEE-NEMS2016), 2016.
⑭ Koji Sugano, Ayumi Maedomari, Yuki Tanaka, Yoshitada Isono, Gold Nanoparticle Synthesis Using High-Speed Pulsed Mixing Microfluidic Device, 28th International Microprocesses and

Nanotechnology Conference (MNC2015), 2015.

〔図書〕(計０件)

〔産業財産権〕
○出願状況 (計０件)
○取得状況 (計０件)

〔その他〕
ホームページ等
http://www.research.kobe-u.ac.jp/eng-isonolab/

６．研究組織
(1)研究代表者
菅野 公二 (SUGANO, Koji)
神戸大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：20372568