

令和元年6月14日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05824

研究課題名(和文) ナノ積層構造を有した機能性バイオチップによる高感度バイオセンシング法の開発

研究課題名(英文) Development of sensitive biosensing methods by functional biochips with nano-scale layered structure

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ガラス基板上に、金属膜としてAg薄膜を、光干渉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順次積層させたナノ積層構造を構築した。この上で蛍光物質Cy5で標識したDNA鎖からの蛍光シグナルを6倍増強することに成功した。またこのナノ積層基板にグルタルアルデヒドを介してプローブDNAを固定化し、ターゲットDNAとの認識に由来する蛍光シグナルの増強を確認した。さらにその膜の物性をフーリエ変換赤外分光法(FT-IR)により評価した結果、固定化に重要なアミノ基が存在している可能性を確認した。

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、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)：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. It was shown that fluorescence intensity of Cy5-labeled target DNA was enhanced 6-fold on the modified glass slide compared with the unmodified one, resulting in highly sensitive detection. Amino group-modified probe DNA was immobilized on the surface of acetonitrile film via glutaraldehyde and successfully hybridized to Cy5-labeled target DNA, which was confirmed by enhanced fluorescence intensity. Furthermore, it was confirmed by fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) that amino group was present on the surface of plasma-polymerized film.

研究分野：分析化学

キーワード：プロテオミクス アプタマー プラズマ重合 分析化学 薄膜 蛍光増強

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質を網羅的に解析するプロテオミクス的重要性は、近年ますます高まっている。特に、ガン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、プロテオミクスのような基礎科学分野にとどまらず、創薬、臨床検査、また環境・食品分析などの産業界においても極めて強く望まれていた。

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、プラズマ下で基板上に有機薄膜を形成するプラズマ重合法を駆使し、タンパク質をその機能を保持したまま重合膜に固定化・アレイ化することに成功していた (*Anal. Chem.* (2003) **75**, 1116)。また平成 25-27 年度科研費 (基盤研究 C) においては、基板上に金属膜と、光透過膜としてヘキサメチルジシロキサン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。一方で、抗体に代わる安定な分子認識素子として注目されている核酸アプタマーの探索とその応用にも精力的に取り組んできた (*Nucleic Acids Res.* (2000) **28**, 1963)。

### 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、微量な疾病マーカー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) その上に置かれた蛍光標識タンパク質などから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、抗体や核酸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目指した。

具体的には、まず抗体や核酸アプタマーなどの分子認識素子を強固にナノ積層構造に固定化するため、プラズマ重合膜を作製するためのモノマーを、これまでのヘキサメチルジシロキサンからアセトニトリルに変更した。後者を用いることで、プラズマ重合膜表面にアミノ基が形成され、共有結合による固定化が期待された。このナノ積層構造に蛍光増強の効果があるかを評価した。次にこのナノ積層構造を用いて、実際にプローブ DNA や抗原タンパク質を共有結合により固定化し、高感度なバイオセンシングが行えるかを評価した。最後に、アセトニトリルを用いたプラズマ重合膜の表面分析を行い、固定化に必要なアミノ基が形成されているかを検証した。

### 3. 研究の方法

#### (1) ナノ積層構造の構築と蛍光増強現象の検証

まずスライドガラス (76×26 mm) を超音波洗浄機で 30 分間洗浄、乾燥させた後、スパッタリング装置で Ag 膜を約 200 nm 製膜した。その上にプラズマ重合装置 (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様々な重合時間で製膜した。膜厚は針型表面形状解析装置 (Dektak8 stylus profiler、Veeco) を用いて測定した。

蛍光強度を測定するための試料として、薬物代謝や解毒反応を行う酵素シトクロム P450 の遺伝子の一部 17 ヌクレオチドの 3' 末端側を蛍光物質 Cy5 で修飾したもの (ターゲット DNA) を使用した。なお、以降の実験では、これに相補的な塩基配列を持つ 17 ヌクレオチドで、3' 末端側がアミノ基で修飾されているものをプローブ DNA として使用した。1 μM のターゲット DNA 溶液を 2 μl ずつ 3 スポット、それぞれの基板上に滴下し、遮光しながら風乾させた。その後、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た。蛍光強度を算出する際には、スポットの蛍光強度から、同一領域のバックグラウンドの蛍光強度を引いた。

#### (2) ナノ積層基板上でのハイブリダイゼーション

まずナノ積層基板を含む様々な製膜条件の基板をシャーレに入れ、基板が浸るように 2.5% グルタルアルデヒドを入れて 1 時間振とうした。超純水で洗浄、風乾させた後、滅菌水で 1 μM に希釈したプローブ DNA を基板上に 80 μl 滴下し、ギャップカバーガラスをかぶせて 1 時間静置した。これにより、グルタルアルデヒドを介して基板上のアセトニトリル膜のアミノ基とプローブ DNA のアミノ基を架橋させることで固定化した。20×SSC (3 M NaCl、0.3 M クエン酸三ナトリウム二水和物、pH 7.0) を用いて、終濃度 1 μM、5×SSC ターゲット DNA 溶液を調製し、これを基板上に 80 μl 滴下し、ギャップカバーガラスをかぶせて、遮光しながら 1 時間室温で静置した。2×SSC、0.2×SSC で順次洗浄、風乾させた後、二次元蛍光検出装置で蛍光像を検出した。

#### (3) アセトニトリルをモノマーとしたプラズマ重合膜の表面分析

アセトニトリル膜の表面に、DNA の固定化に重要なアミノ基が存在するかを検証するために、真空下での測定が可能なフーリエ変換赤外分光 (FT-IR) 測定装置 (FT/IR-670 Plus、日本分光株式会社) を用いた分析を行った。段階ごとの処理後の基板を測定して各段階でどのような影響が膜に起きているのかを観察するため、Ag 基板を 1 枚、ナノ積層基板を 3 枚用意し、

ナノ積層基板のうち2枚には、さらにグルタルアルデヒド処理した。これらの基板に対してそれぞれ FT-IR 測定装置を用いて IR スペクトルを測定し、それぞれを比較することで表面分析した。測定する際はチャンパー内に高感度反射測定装置 (RAS-400/H、日本分光株式会社) を設置し、その上に基板を裏向きに置いて行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ナノ積層構造の構築と蛍光増強現象の検証

様々な膜厚のプラズマ重合膜を持ったナノ積層基板上に蛍光標識ターゲット DNA を滴下し、風乾させた後、二次元蛍光検出装置で蛍光像を検出した。その結果を図 1 に示す。これより、未修飾のガラス基板を用いたときと比べて、アセトニトリル膜を持つナノ積層基板上で蛍光が増強され、かつその増強の程度は膜厚に依存することが示された。最も蛍光増強の度合いが高かったのが膜厚 58 nm のときで、未修飾のガラス基板と比べて蛍光が約 6 倍増強されていることが確認できた。なお、膜厚 58 nm をピークに蛍光強度が減少していることから、この蛍光増強現象は光の干渉作用によって起こっていることが示唆された。

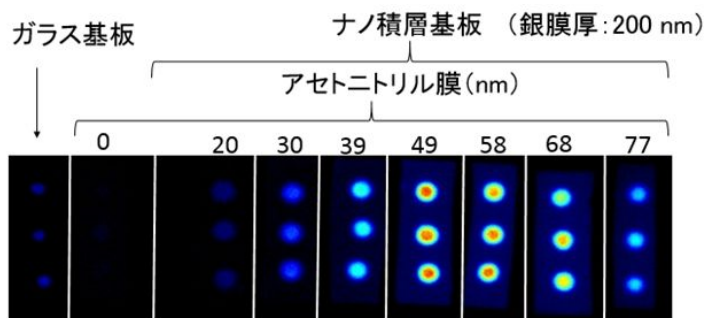


図 1 蛍光標識 DNA を滴下したナノ積層基板の二次元蛍光像

##### (2) ナノ積層基板上でのハイブリダイゼーション

DNA アプタマーを用いたアッセイのモデル実験系として、より簡便な評価が行える DNA ハイブリダイゼーションを行った。すなわち、グルタルアルデヒドを介してアミノ基を有したアセトニトリル膜とアミノ基標識プローブ DNA を架橋させ、そこで Cy5 標識ターゲット DNA をハイブリダイゼーションさせることを目指した。この反応系の模式図を図 2 に示す。なおナノ積層基板においては、この図 2 のガラス基板とアセトニトリル膜の間に Ag 膜が入ることになる。

当初基板上でのハイブリダイゼーションは純水中で行っていたが、基板からの蛍光像は観察されず、ハイブリダイゼーションが行われていないことが示唆された。これは、DNA 中のリン酸基が水中で負の電荷を帯び、プローブ DNA とターゲット DNA が反発したためであると考えた。そこでカウンターイオンとなる Na<sup>+</sup>を含む SSC を使用することで、DNA の負の電荷同士の反発を抑制することとした。SSC を使用したナノ積層基板上でのプローブ DNA とターゲット DNA のハイブリダイゼーションを行った結果を図 3 に示す。なお、図 3 中の白い点線の枠は反応に用いたギャップカバーガラスの大きさを示し、この枠内でプローブ DNA の固定化やハイブリダイゼーションなどの反応が行われたことを示している。

実験の結果、滅菌水の代わりに SSC を使用することで、ナノ積層基板(一番右)から極めて強い蛍光シグナルが観察された。また、アセトニトリル膜とグルタルアルデヒドがあるときの基板(右から2番目)からは、弱い蛍光しか観察されなかったことから、Ag 膜による蛍光増強の

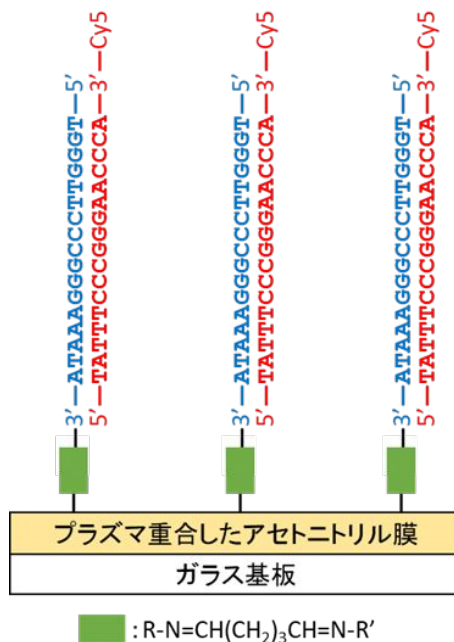


図 2 DNA の固定化と検出の模式図

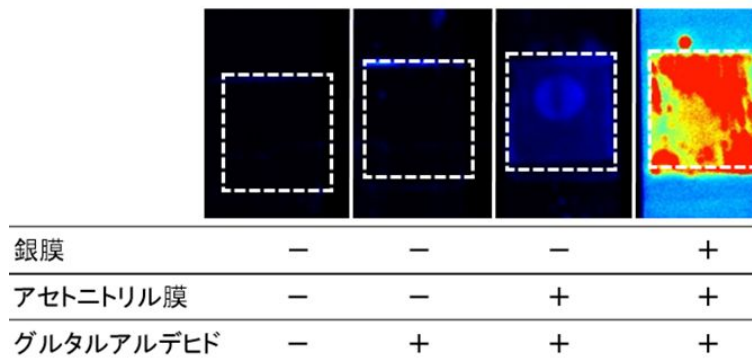


図 3 ナノ積層基板上でのハイブリダイゼーション

効果が確認された。これらの蛍光強度を定量化した結果、ナノ積層基板を用いることで、アセトニトリル膜とグルタルアルデヒドを用いた基板と比較し蛍光が約 3.2 倍増強されることが確認できた。さらにアセトニトリル膜のみを有したガラス基板において、抗原タンパク質の固定化と蛍光標識抗体による認識も確認した。

### (3) アセトニトリルをモノマーとしたプラズマ重合膜の表面分析

さまざまな条件で作製、表面処理した基板について、FT-IR 測定装置を用いて真空中で測定した IR スペクトルを図 4 に示す。

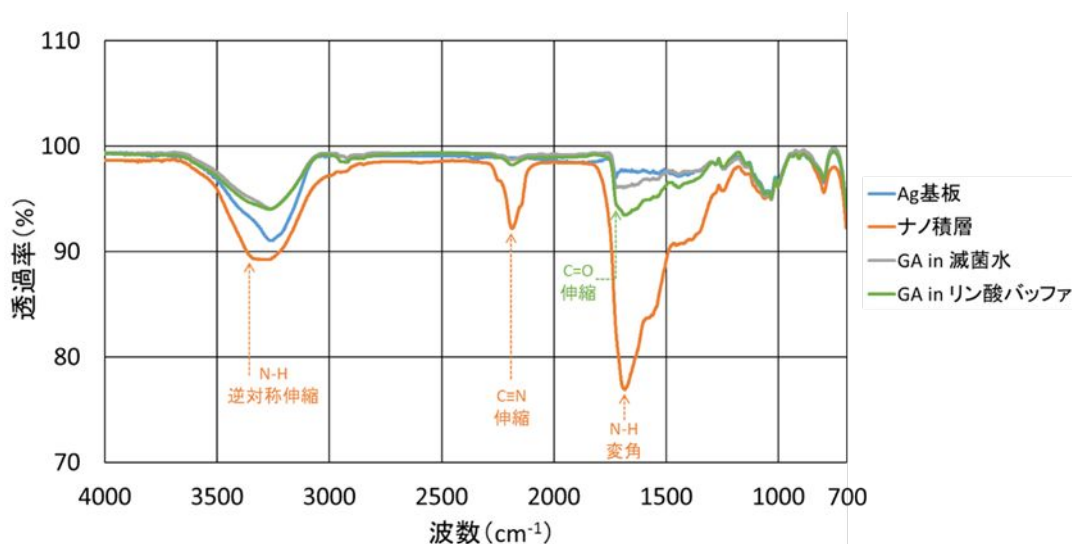


図 4 様々な製膜・表面処理条件での基板表面の IR スペクトル

これより、ナノ積層基板では  $3400\text{ cm}^{-1}$  付近と  $1700\sim 1400\text{ cm}^{-1}$  付近でアミノ基に由来すると思われるピークが認められたため、アミノ基の存在が示唆された。一方、グルタルアルデヒド処理後の基板では、ピークが減少した。これはグルタルアルデヒド処理によってアセトニトリル膜が流されてしまっている可能性を示唆した。一方で、リン酸バッファを用いてグルタルアルデヒド処理した条件では  $1800\text{ cm}^{-1}$  付近にスペクトルが見られた。これは  $\text{C}=\text{O}$  の伸縮のスペクトルと波数が一致するため、グルタルアルデヒド処理によってグルタルアルデヒドが一部残存した膜上のアミノ基と反応し、膜に結合した可能性が示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

K. Yano and A. Iwasaki, Enhancement of Fluorescence-Based Sandwich Immunoassay Using Multilayered Microplates Modified with Plasma-Polymerized Films, *Sensors* 査読有, **17** (2017) 37-46, DOI:10.3390/s17010037

〔学会発表〕(計 1 件)

松家祐太郎、岡田麻衣子、杉本岩雄、矢野和義、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、第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。