

平成30年6月25日現在

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14022

研究課題名(和文) プラズモン電場加熱によるPCR反応を応用する表面プラズモンセンサの感度増強

研究課題名(英文) PCR based on Surface Plasmon Enhanced Site-selective Heating

研究代表者

石田 昭人 (Ishida, Akito)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：20184525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：検体中の極少数の病原体を迅速に検出・同定できる分析デバイスの開発を目的として、金基板上の抗体マイクロアレイに捉えられた病原体を表面プラズモン共鳴(SPR)の原理によって近赤外光励起プラズモン電場の緩和熱で位置選択的に加熱し、その周囲でDNA合成酵素を駆動してRCA(環状鋳型によるDNA伸長)により、病原体とは無関係のDNAを急速に伸長させ、これを蛍光検出することで病原体の検出を可能にした。

研究成果の概要(英文)：In this study, site-selective enzymatic DNA elongation from gold surface at 25 °C was induced by the damping heat of propagating surface plasmon (SP), using an 808 nm laser. A multispot immunoassay, based on this concept, has been demonstrated. The primer-immobilized analyte-bound ligand spot was selectively heated by the SP field, and effective DNA elongation on the surface using rolling circle amplification produced an intense fluorescence spot on the surface after staining. The key feature of this method is the temperature contrast on the surface. We have estimated the surface temperature by comparison of the yield and chain length of the amplicons from SP heating to those from controlled thermal reactions at a series of temperatures.

研究分野：蛍光分光化学

キーワード：表面プラズモン共鳴 プラズモン増強加熱 光PCR 等温連続DNA増幅反応 1分子加熱 蛍光免疫分析
病原体計数 新興感染症対策

1. 研究開始当初の背景

食中毒や新型インフルエンザなどの新興感染症は社会にとって大きな脅威である。特に O157 やノロウイルスはわずか数個～数十個の病原体でも発症してしまうため、感染の予防や制御には極微量の病原体を現場で迅速に検出・同定できる検査法が不可欠である。しかし、現在用いられている培養法や免疫クロマトなどの検査法は感度や迅速性の点で医療、検疫、食品業界といった現場のニーズには全く見合っていない。現在、最も迅速で高感度な分析が可能な最新技術であるデジタル PCR であっても分析には 15 分程度かかるうえ、装置は持ち歩ける大きさではなく、しかも、検体中に含まれる夾雑 DNA に弱いという弱点があるため、とくに食品加工・流通業界では適用に限界がある。このような背景から、新たな概念に基づく画期的な分析方法の開発が渴望されていた。

2. 研究の目的

表面プラズモン共鳴 (SPR) 現象は高感度分析法として広く応用されてきた。可視～近赤外光で励起された表面プラズモン (SP) 電場のエネルギーは最終的には熱緩和される。この緩和熱は精密分析には妨害要素だが、積極的に利用すれば局所加熱に利用できる。本研究代表者はこの点に着目し、先に、SP の緩和熱で耐熱性酵素を駆動することを発案し、SPR センサチップ上で PCR 酵素を駆動して DNA 鎖を伸長させることに成功した。SPR センサはリガンド-アナライトの結合による誘電率の増加を共鳴角シフトで検出するが、リガンドスポットの SPR 角より高角側で光を照射すると、アナライトが結合して共鳴条件に達したスポットのみが光を吸収して加熱され、スポット上の DNA 鎖が伸長するのでアナライトのサイズが大きくなり、SPR センサの感度を劇的に向上できると期待される。この原理を応用し、本研究では病原性大腸菌やノロウイルスのような病原体微粒子について、抗体マイクロアレイによる捕捉と DNA 伸張を利用した蛍光検出による同定・計数分析を実証し、新規な分析法として確立することを目的とする (図 1)。

病原体を捕らえた抗体だけを加熱する

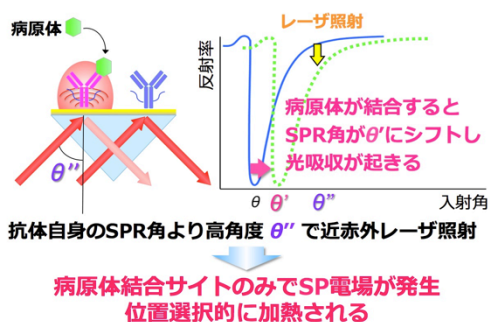


図 1 位置選択的な SP 加熱による DNA 伸張反応を利用した病原体検出法の概念

3. 研究の方法

本研究では環状 DNA をテンプレートとする RCA (Rolling Circle Amplification) と呼ばれる等温連続 DNA 増幅反応を用い、DNA 増幅の基になるプライマーを基板表面上または抗体分子の表面上に修飾しておき、SP の緩和熱で溶液中の DNA 合成酵素を駆動して、基板あるいは抗体表面上から DNA を伸長させる。基板表面上で病原体微粒子が捉えられている部分だけが SPR 条件にあるので、SP の緩和熱によって位置選択的に加熱される。その結果、抗体に捉えられた病原体微粒子は DNA 産物によって包み込まれて巨大な DNA のボールとなり、これを蛍光染色することで、低倍率の蛍光イメージングにより計数しようというものである (図 1)。

研究は以下、①～③のような方法で段階的に実行した。

①SP 電場の緩和熱の精密評価

金基板表面近傍の温度上昇を評価するために、マイクロ Pt100 センサで基板表面の温度を測定するとともに、プライマーを修飾した金基板上で SP 加熱 RCA 反応を行い、産物 DNA を電解還元で金膜から剥離して単離し、これを電気泳動して分子量を測定し、入射パワーと分子量の相関を解明した。

具体的には、照射部位表面の温度分布を均一にするため、高パワー (1.2 W) の 808 nm 半導体レーザーのビームをトップハットに整形し、シリコンゴム製ウェルより大きな直径にして金基板全体に照射した。1*1.2 mm² の超小型 Pt100 センサをマイクロメータ付の XYZ ステージを用いて金基板に接触させ、レーザー光照射開始後の温度変化を測定した。また、基板表面や溶液中の熱拡散を評価するために、ウェルの半分を照射し、Pt100 センサの位置をずらせながら温度変化を測定し、表面温度のマッピングを行った。

もう一つの表面温度評価法である DNA の分子量測定については、金基板表面にスクシンイミジルエステル交換法でアミノ化 M13 プライマーを修飾し、反応液 (96-7 DNA ポリメラーゼ、M13mp18 鋳型 DNA、dNTP) に浸して一連のパワーで SP 加熱を行い、産物 DNA を SYBR GREEN I で蛍光修飾してその蛍光強度から収量を測定した。別途、同じ反応を一連の温度のヒータ加熱でも行い、産物 DNA の収量を蛍光強度で定量して検量線を作成し、これと SP 加熱における DNA 収量を比較することで、金基板表面の温度を決定した。

②SP 加熱による DNA 伸張を利用する病原体モデル粒子検出の実証

病原体モデル粒子として、直径 10, 3, および 1 μ m の表面アミノ化ラテックス粒子をグルタルアルデヒドで活性化し、IgG を反応させて表面修飾したものを作製した。

金基板表面を末端にチオール基をもつスクシンイミジルリンカー試薬で修飾した後、あらかじめプライマーを修飾したリガンド

(二次抗体用抗 IgG)および対照リガンド(二次抗体用抗 BSA) をスクシンイミジルエステル交換法で直径 1 mm のスポット状にそれぞれ修飾してアレイを形成し、アレイが底面中央部に位置するように直径 6 mm のシリコンゴム製ウェルを圧着した。

病原体モデルをリン酸緩衝溶液に分散させ、ウェル内に注入し、反応させた後、RCA 液を注入して SPR 角近傍の特定の角度で近赤外光を照射した。

照射後、SYBR-GREEN I をウェルに注入して産物 DNA を染色し、蛍光イメージャまたは共焦点顕微鏡でアレイ表面を観測した。

③SP 加熱による病原体モデル粒子検出における照射条件 (SPR 条件) の最適化

リガンドスポット表面において、抗原である病原体モデルを捕捉した部位だけが SPR 条件に達し、近赤外光励起によって位置選択的に加熱されることを利用するのが本研究の基本概念である。したがって、励起光の入射角度の設定が選択性の鍵となる。そこで、SP 加熱の実験における一連の操作、すなわち、アレイ表面への病原体モデルの吸着、RCA 液の注入、SP 加熱に至るまでの全過程について、SPR 角の変化をその場で観測し、SP 加熱のレーザ照射角度を最適化した。

成果の項で後述するように、SPR 角はスポット全体のマクロな情報であり、実際に実験を行ってみると、吸着されている病原体モデルの近傍の共鳴条件こそが位置選択的な SP 加熱の条件となることが明らかになった。そこで、長作動距離対物レンズの顕微鏡を用いて病原体モデル粒子の発する散乱光を検出し、それが最も強くなる角度を探することで、病原体粒子を捉えた抗体の SP 共鳴条件を探索することにした。これによって、マクロな SPR 角の検出では不可能な、リガンドスポット表面に捉えられた病原体モデル粒子の共鳴角を検出し、効率よく RCA を起こして DNA を伸長させ、病原体微粒子を個別に蛍光検出・計数することが可能となった。

4. 研究成果

①SP 電場の緩和熱の精密評価

1) 超小型 Pt100 センサによる直接温度測定

カバーガラス表面に蒸着した膜厚 50 nm の平滑無修飾金基板を BK7 分散プリズムにマッチングオイルで貼り付け、直径 6 mm のシリコンゴム製ウェルを貼り付けて、内部に 40 μ L の緩衝溶液を注入し、Pt100 センサを底面に密着させた。裏面から SPR 角で 808 nm 0.8 W レーザ光を照射し、温度変化を測定したところ、照射開始 0.5 秒以内に温度は 23°C から 40°C にジャンプし、そのまま上昇を続けて、約 3 分間で最高温度である 56°C に達した。また、一連の照射角度で到達平衡温度を測定したところ、到達温度と照射角の関係は SPR 曲線と良好な一致を示した。このことから、この方法で発生する熱は SP 電場の緩和熱であることが明らかにされた。SP 電場による加

熱の時間応答は非常に速く、また、RCA に用いる PCR 酵素は 40~60°C で DNA 合成活性を示すので、SP 電場による加熱は DNA 合成に十分な熱量を供給できるうえに、高速応答が期待できることが明らかになった。

2) DNA 産物の分子量による温度評価

実際に環状テンプレートと DNA 合成酵素を用いて SP 加熱による RCA を行わせ、単離した産物 DNA の収量を別途、一連の温度で行った熱反応と比較することによる温度評価では、産物 DNA の蛍光強度が検量線上の 40°C の温度に対応したことから、実効温度は SP 加熱による平衡温度よりもやや低い約 45°C 程度であることが明らかになった。この温度差の原因として、SP 加熱では表面上の実際の温度が PT100 センサによる測定温度よりもさらに高温となっており、用いた酵素の至適温度以上になっている可能性が示唆された。そこで、次項の免疫分析においては、レーザパワーをやや絞って 0.6 W とすることにした。

②SP 加熱による DNA 伸張を利用する病原体モデル粒子検出の実証

抗体スポットと対照スポットを形成した金基板表面に各サイズの病原体モデル微粒子を分散させ、RCA 液を注入して SPR 角よりも +2° のオフセットをつけてレーザ光を照射した。+側にオフセットしたのは、病原体モデル微粒子が抗体スポットに吸着し、DNA が伸張すると、SPR 角が吸着前や DNA 伸張前の SPR 角より高角側へ大幅にシフトするので、吸着されている病原体モデル微粒子だけを認識する選択性がより高まることを期待したためである。この条件で、3 μ m の病原体モデル微粒子について、抗体スポット上のみで明瞭な蛍光スポットとして検出することに成功した (図 2)。また、3 μ m と 10 μ m の病原体モデル微粒子を混合して吸着させたところ、照射角度によって、サイズを分別して検出できることも明らかになった。

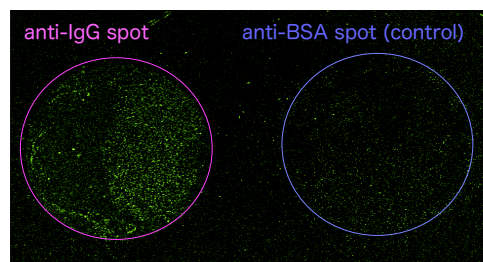


図 2. 金基板上に修飾した直径 1 mm の抗体スポット表面に捉えられた 3 μ m 病原体モデル微粒子の SP 加熱による RCA で伸張した DNA 産物の蛍光顕微鏡像 (左: 抗 IgG 抗体、右: 抗 BSA 抗体 (対照))

しかし、特にサイズを分別する場合には蛍光スポットの強度、すなわち、DNA 伸張の収率がオフセット角に対して極めて敏感に応答し、照射角度の設定が非常に難しいことが明らかになった。この角度依存性こそが SP 電場による選択的な加熱を応用しようとい

う本研究の基本概念であることから、より精密かつ容易に照射角度を設定する方法を新たに考える必要があることがわかった。

そこで、その場で、すなわち、病原体モデル微粒子を吸着させる過程で SPR 角の変化を測定し、これをもとに照射角度を設定することを考え、装置を作製した。この装置を用い、抗 IgG 抗体を全面に修飾した金基板上に $3\mu\text{m}$ の病原体モデル微粒子が吸着された時の SPR 角の変化を測定すると、抗体への病原体モデル微粒子の吸着によって SPR 角が高角側にシフトすることがわかった (図 3)。

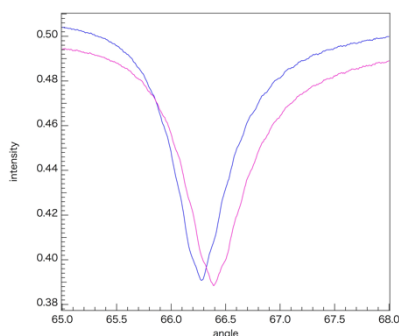


図 3. 抗 IgG 抗体修飾金基板上に $3\mu\text{m}$ の病原体モデル微粒子が吸着されたことによる SPR 角の高角側へのシフト。

そこで、この SPR 角で照射して SP 加熱を行ったが、期待に反して明瞭な病原体モデル微粒子の位置に対応した蛍光スポットは得られなかった。すなわち、抗体修飾金基板上に吸着された病原体モデル微粒子の周囲だけでなく、基板全体で DNA がある程度成長してしまい、基板全体が弱い蛍光を示してしまう結果となった。

この原因を考察した結果、上記の方法で基板全体の SPR 角を測定し、それが病原体モデル微粒子の吸着によって高角側にシフトしたとしても、その SPR 角はあくまで基板全体のバルクの誘電率の平均値を反映するものであり、病原体モデル微粒子が吸着されている直径数 μm の局所的な部位に対応する SPR 角ではないことが示唆された。そこで、この「局所的な SPR 角」を評価・観測できる方法を考えた結果、長作動距離の顕微鏡対物レンズを用いて、基板上面から励起用レーザー光の散乱光を観測することにした。SPR 条件では病原体モデル微粒子は SP 電場と強く結合しているので、散乱光が観測できるはずだからである。期待通り、バルクの SPR 角よりもかなり低角側において、個別の微粒子から強い散乱光が観測される特定の角度があることがわかった。

そこで、その角度において SP 加熱による RCA を行ったところ、高いコントラストで病原体モデル微粒子の蛍光像を観測することが出来るようになった。

このようにして、抗体スポットに吸着された異なるサイズの病原体モデル微粒子について、再現性よく SP 加熱による DNA 伸張

と蛍光検出による計数を行うことが可能になった。

本研究では非病原性の大腸菌もしくは死菌を用いた分析の実証については計画していなかったが、 $3\mu\text{m}$ のモデル微粒子を用いた実証実験に成功したことから、実現性は高いと考えられる。今後は夾雑物を含む系など、より現実的な条件において実験を重ね、照射光強度や照射時間などの条件を最適化し、実用化に近づけていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Yuki Kawahara and Akito Ishida, Proceedings 2017, 1, 812; doi:10.3390/proceedings1080812, 査読無, “Ultra-Sensitive Immunofluorescence Assay Based on DNA Elongation by Surface Plasmon Heating” .

② Yuki Kawahara and Akito Ishida, ECS Transactions, 2016, Vol.75, No.16, pp.199-207, 査読有, “Surface plasmon resonance (SPR) sensing based on DNA elongation by site-selective surface plasmon (SP) field heating toward ultra-high sensitive detection of single pathogenic particles” .

[学会発表] (計 6 件)

① Yuki Kawahara and Akito Ishida, NFO-14, Hamamatsu, Japan, 4-8 September, 2016.

② Yuki Kawahara and Akito Ishida, PRiME 2016, 2-7 October, Honolulu, Hawaii.

③ 川原佑貴, 石田昭人, 第 6 回化学フェスタ, 11 月 14~16 日, 2016, 東京.

④ 川原佑貴, 石田昭人, 日本化学会第 97 春期年会, 3 月 16~19 日, 2017, 東京.

⑤ Yuki Kawahara and Akito Ishida, the 5th International Symposium on Sensor Science (I3S 2017), Barcelona, Spain, 27-29 September 2017.

⑥ 川原佑貴, 石田昭人, 第 2 回フォトニクス研究会, 11 月 31 日-12 月 1 日, 2017, 那覇.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 昭人 (Ishida, Akito)

京都府立大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号: 20184525

(4) 研究協力者

川原 佑貴 (Kawahara, Yuki)

京都府立大学・大学院生命科学研究科・応用生命科学専攻・大学院生