

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01804

研究課題名(和文) 三角形ナノプレートと脂質膜への誘導システムによる超高感度バイオセンサーの創製

研究課題名(英文) Development of a biosensing system with high sensitivity by the application of triangular gold nanoplates and lipid membranes

研究代表者

三友 秀之(Mitomo, Hideyuki)

北海道大学・電子科学研究所・准教授

研究者番号：50564952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ゲルを基材としたナノ構造体の動的構造制御システムに、鋭い頂点を有する三角形プレート状金ナノ粒子と脂質膜を組み込むことで 検出対象物質をナノ構造に誘導する仕組みと 金ナノ構造体の頂点の配置を制御する技術を導入し、超高感度バイオセンシング基材を創製することを目指した。その結果、流動的な脂質膜を導入しなくても、ゲルが収縮してナノ構造体が近接すると、構造体が回転することで自然と頂点付近が近づくようになることが見いだされた。一方で、対象物質の特異的なホットスポットへの導入にはさらなる工夫が必要であることが示唆された。超高感度バイオセンシング基材の開発にとって重要な知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

金属のナノ構造体は表面プラズモン共鳴と呼ばれる特異な光学現象を示す。この表面プラズモン共鳴を利用した光エネルギーの効率的な利用や高感度なセンシング基材の開発などが期待されている。この表面プラズモン共鳴は金属ナノ構造体の大きさや形、構造体周囲の環境など、様々な因子の影響をうけるため、これまでその構造や形状の制御方法が開発されてきた。本研究では、高分子ゲルの体積変化を利用したナノメートルスケールで動的にナノ構造を制御する技術を発展させ、バイオセンシング基材へと展開するための実験を行い、鋭利な頂点を向かい合わせる方法を見いだした。本研究で得られた知見は、実用化に向けた重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：Our previous study showed that actively tunable metal nanogap structures on hydrogels are useful platform for the biosensing. In this study, to improve this system for a highly sensitive biosensing substrate, an application of triangular gold nanoplates with sharp edges and lipid membranes with a fluidity was investigated. As a result, it is indicated that nanostructures on the hydrogel can rotate and simultaneously form sharp edge assembled structures at a point without a fluid membrane, when their distances become closer. On the other hand, the need of further contrivance for the efficient introduction of target molecules into the hot spots is also indicated. These results provided an important insight for the development of ultra-sensitive biosensing substrates.

研究分野：ナノ材料化学

キーワード：金ナノ構造 動的構造制御 表面プラズモン共鳴 ゲル 脂質膜

1. 研究開始当初の背景

バイオセンサーの高度化は、健康・安全を守るために重要である。物質の識別には主に抗体が使われているが、新型ウイルスなどが現れるとパンデミックに陥る危険がある。そのため、抗体を用いずに、細菌やウイルスを迅速に高感度に判別できるシステムが求められている。その手法の一つとして、ラマン散乱法が検討されている。ラマン散乱法は分子構造に応じたスペクトルを与える分光測定であり、抗体を使用しないセンシング技術になる。近年、金属ナノ構造体表面に発生する増強電場によるラマン散乱の増強「表面増強ラマン散乱(SERS)法」により、高感度検出も可能になっている。局在表面プラズモンによる増強電場はナノ構造体の中でも鋭利な箇所でも起こり、隙間の狭いギャップ部分(ホットスポット)で特に強く増強されるため、ナノギャップ構造を有する SERS 測定用基材が有効である。一方で、狭いギャップは高いシグナル増強効果を誘起するが、狭すぎると標的分子がギャップに入らなくなり、逆にラマン散乱が弱くなるというジレンマがあった。この問題は立体障害に由来するため、生体高分子やウイルスなど標的物質が大きいほど深刻になる。そこで、研究代表者らは「ギャップ距離を変えられる金ナノ構造体を作製し、広いギャップに効率よく標的物質を導入し、ギャップを狭めて高いシグナル増強効果を得る」という解決策を提案してきた。これまでに、大きな体積変化が可能な水ゲルに着目し、ゲル表面に金ナノ構造体を展開する手法を開発し、可変ギャップ機構を創成した。可変ギャップ機構を利用することで、ギャップ距離を変化させない場合より 10 倍強い SERS シグナルの観察にも成功した。しかしながら、可変ギャップ機構による高感度化の潜在的可能性は示したが、実用化を視野にいれるとまだ感度が不十分な状態であった。

2. 研究の目的

本研究では、SERS 測定に関係する要素である「金属ナノ構造体の形状」と「ホットスポットへの標的物質を取り込み」の2点に着目し、SERS 測定基材の高感度化への指針を得ることを目的とした。具体的には、下記について明らかにすることを目指した。

(1) 三角形金ナノプレート粒子の適用

以前の研究では、球状金ナノ粒子の自己集合化薄膜を作製し、可変ギャップを用いてラマン散乱を測定してきたが、「金属ナノ構造体の鋭利さ」「ギャップを形成する構造体の数」および「ホットスポットの形成部位と対象物質取り込み位置の一致」の点で適した構造ではなかったと考えられた(図1上)。そのため、本研究では、三角形プレート状金ナノ粒子を用いることで、6つの粒子の鋭利な頂点によりナノギャップを形成させ、ナノ構造の形状により SERS 感度の向上について明らかにすることを目指した。

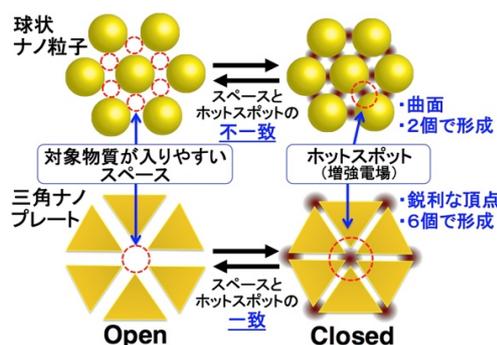


図1 球状ナノ粒子および三角ナノプレート集合体が形成するスペース(Open 状態)とホットスポット(Closed 状態)のイメージ

(2) 脂質膜の導入

頂点を有するナノ構造体を近接させてギャップを形成させるにあたり、頂点同士を適切に向かい合わせて近づけることが望ましい。そのため、プレート状金ナノ粒子の下に脂質膜を導入することで、脂質膜の流動性によりナノプレートの回転運動を可能にし、近接時に必然的に頂点が向き合った構造を形成させることを目指した。また、研究代表者のこれまでの方法では、標的物質(タンパク質)は金ナノ構造体の表面全体に非特異的に吸着していたと考えられる。高感度化には、数少ない標的物質を効率的にホットスポットに取り込むことが重要である。脂質膜に対象物質が特異的に結合する仕組みを導入することで、対象物質を金属ナノ構造体のギャップ部位に積極的に取り込ませることができるとも検討課題とした。

3. 研究の方法

(1) 脂質膜の形成と三角形プレート状金ナノ粒子の固定化

ガラス基板をシランカップリング剤(Chloro(dodecyl)dimethylsilane)で修飾し、疎水化した。クロロホルムで溶解した不飽和脂質(POPC, POPE)を展開した後、緩衝液を流し、脂質膜を得た。カチオン性リガンド分子で被覆した三角形プレート状金ナノ粒子を静電相互作用によって吸着させた。

(2) ゲルの収縮時の金ナノ構造体の近接時の構造変化の評価

電子線リソグラフィーによって基板上に金のナノパターンを形成し、その上でポリアクリル酸ゲルを重合することでゲル表面に転写した。ゲルを収縮させ、ゲル表面の金ナノパターンが十分近接した状態で、金ナノ構造の変化をナノメートルの精度で観察した。

(3) 三角形プレート状金ナノ粒子を配置したゲルの作製

三角形プレート状金ナノ粒子を既報の方法で合成し、粒子の表面をカチオン性を有するアルカンチオール分子で被覆した。水-有機溶媒の2層系において粒子を気液界面に展開させて単粒子薄膜を形成し、基板に移し取った。基板上でゲルを重合し、単粒子薄膜をゲル表面に転写した。

4. 研究成果

(1) 脂質膜を介した三角形プレート状金ナノ粒子の固定化と粒子の流動性の評価

蛍光分子がついた脂質を混合して脂質膜を形成することで、蛍光顕微鏡観察から脂質膜の形成が確認できた。光褪色後蛍光回復 (FRAP) 法により脂質膜の流動性を確認した。三角形プレート状金ナノ粒子の脂質膜への吸着は、スペクトル測定および走査型電子顕微鏡観察により確認した。粒子の表面修飾時にカチオン性とノニオン性のリガンドを混合し、表面のカチオン密度を制御したところ、カチオンリガンドの割合を80%以上にすると粒子の吸着量が低下した。このことは、表面に吸着した粒子のカチオン電荷によって粒子の吸着が妨げられたためであると考えられた。脂質膜上に吸着した金ナノ粒子の流動性は、緩衝液中で電場を印加して電気泳動による評価を試みたが、優位に移動する様子は観察されなかった。脂質膜の安定な維持のためある程度塩濃度を高くしておく必要があり、電気泳動に適切な条件設定との両立が難しかったことが原因ではないかと考えられる。以上より、脂質膜を固定化し、その上に三角形プレート状金ナノ粒子を固定化できることは確認できた。また、脂質膜の安定化には塩濃度を高くする必要があり、金ナノ粒子の静電的相互作用による固定化では、塩濃度を低くしておく必要があり、適切な条件設定が必要であることもわかった。脂質膜上での金ナノ粒子の流動性についてはゲルを用いた金ナノ構造の制御において、力学的な歪みがかかった条件で検討する必要がある。

(2) ゲルの収縮による金ナノ構造体の近接時の構造変化の評価

電子線リソグラフィで作製した金ナノ構造体を転写したゲルを用いて、ゲルの収縮により金ナノ構造体が近接した際の構造の制御性について、電子顕微鏡観察により評価した。その結果、金ナノ構造体が衝突するくらい近接すると、構造体の回転により力学的な歪みを緩和する様子が観察された(図2)。これは、ゲルのやわらさにより、構造体の自律的な調整が可能であることを示唆するものであり、脂質膜の流動性がなくても三角形金ナノプレートの頂点を向き合わせて近接させることを可能にするものであると考えられる。

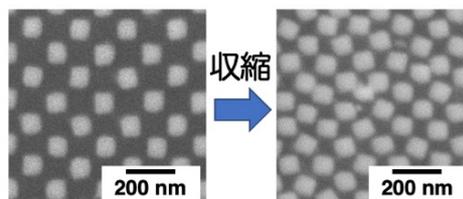


図2 ゲルの収縮による金ナノ構造体の近接時の構造の変化(回転)

(3) 三角形プレート状金ナノ粒子を配置したゲルの作製と評価

合成した三角形プレート状金ナノ粒子の表面をカチオン性を有する表面修飾分子で被覆し、気液界面に展開する方法で単粒子薄膜を形成させた。ガラス基板上に移し取り、その上で温度応答性の高分子ゲル (poly(diethyl acrylamide)gel) を重合することで単粒子薄膜をゲル表面に転写することに成功した。基板上に展開した三角形プレート状金ナノ粒子は、広範囲で密に詰まった単粒子膜を形成していることが電子顕微鏡観察から確認できた(図3)。基板上においては、頂点の位置が必ずしも近接して向き合っているわけではないが、距離は近く、ゲルの収縮時に近接して誘起されるナノ構造の回転による歪みの緩和により、最適なギャップ構造の形成が可能になると予想される結果を得た。温度応答性ゲルの膨潤-収縮による表面プラズモン共鳴現象の変化の観察はできたが、実際のナノ構造の動的な変化については、今後のさらなる確認が必要である。また、ゲルと三角形金ナノプレート粒子の間に脂質膜を導入する方法についても、その有効性も含めて、さらなる検討が必要である。

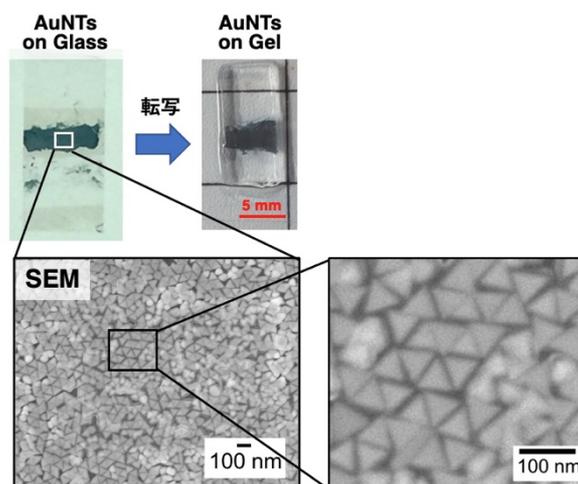


図3 三角形金ナノ粒子ゲルの収縮による金ナノ構造体の近接時の構造の

以上より、三角形金ナノプレートを適用した可変型ナノギャップシステムの構築に成功した。今後は、その性能の評価とギャップへの対象物質の導入技術を構築することにより応用展開が拓けるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Wei Jinjian, Mitomo Hideyuki, Tani Takeharu, Matsuo Yasutaka, Niikura Kenichi, Naya Masayuki, Ijio Kuniharu	4. 巻 34
2. 論文標題 Size-Defined Cracked Vesicle Formation via Self-Assembly of Gold Nanoparticles Covered with Carboxylic Acid-Terminated Surface Ligands	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 12445 ~ 12451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.8b02966	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hamajima Satoru, Mitomo Hideyuki, Tani Takeharu, Matsuo Yasutaka, Niikura Kenichi, Naya Masayuki, Ijio Kuniharu	4. 巻 1
2. 論文標題 Nanoscale uniformity in the active tuning of a plasmonic array by polymer gel volume change	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nanoscale Advances	6. 最初と最後の頁 1731 ~ 1739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8NA00404H	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura Satoshi, Mitomo Hideyuki, Sekizawa Yu, Higuchi Takeshi, Matsuo Yasutaka, Jinnai Hiroshi, Ijio Kuniharu	4. 巻 36
2. 論文標題 Strategy for Finely Aligned Gold Nanorod Arrays Using Polymer Brushes as a Template	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 3590 ~ 3599
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.9b03835	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 濱島 暁、三友秀之、居城邦治	4. 巻 18
2. 論文標題 ハイドロゲル表面に固定化した金ナノドット間距離の動的変化のナノスケール評価	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Bulletin of the Nano Science and Technology (ナノ学会会誌)	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mitomo Hideyuki	4. 巻 2020
2. 論文標題 Fabrication of sophisticated metal nanostructures for actively tunable plasmonic devices	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Impact	6. 最初と最後の頁 54 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21820/23987073.2020.1.54	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Xiong Kun, Mitomo Hideyuki, Su Xueming, Shi Yier, Yonamine Yusuke, Sato Shin-ichiro, Ijio Kuniharu	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular configuration-mediated thermo-responsiveness in oligo(ethylene glycol) derivatives attached on gold nanoparticles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nanoscale Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1NA00187F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sekizawa Yu, Mitomo Hideyuki, Nihei Mizuki, Nakamura Satoshi, Yonamine Yusuke, Kuzuya Akinori, Wada Takehiko, Ijio Kuniharu	4. 巻 2
2. 論文標題 Reversible changes in the orientation of gold nanorod arrays on polymer brushes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nanoscale Advances	6. 最初と最後の頁 3798 ~ 3803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0NA00315H	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Satoshi, Mitomo Hideyuki, Yonamine Yusuke, Ijio Kuniharu	4. 巻 49
2. 論文標題 Salt-triggered Active Plasmonic Systems Based on the Assembly/Disassembly of Gold Nanorods in a DNA Brush Layer on a Solid Substrate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 749 ~ 752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.200185	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Satoshi、Mitomo Hideyuki、Ijiro Kuniharu	4. 巻 50
2. 論文標題 Assembly and Active Control of Nanoparticles using Polymer Brushes as a Scaffold	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 361 ~ 370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.200767	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mitomo Hideyuki、Ijiro Kuniharu	4. 巻 94
2. 論文標題 Controlled Nanostructures Fabricated by the Self-Assembly of Gold Nanoparticles via Simple Surface Modifications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 1300 ~ 1310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20210031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Hideyuki Mitomo, Mizuki Nihei, Satoshi Nakamura, Yasutaka Matsuo, Kuniharu Ijiro
2. 発表標題 Alignment Change of AuNRs on the DNA Brush Substrates by the Applied Electric Field towards Active Plasmonic Control
3. 学会等名 SPIE optics + Photonics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideyuki Mitomo, Ryo Iida, Kenichi Niikura, Kuniharu Ijiro
2. 発表標題 Two-Step Assembly of Gold Nanorods Using Curvature-Dependent Dehydration of the Surface Ligands
3. 学会等名 17th International Conference on Organized Molecular Films (ICOMF17)-LB17 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideyuki Mitomo, Satoru Hamajima, Yasutaka Matsuo, Kenichi Niikura, Kuniharu Ijiro
2. 発表標題 Active Gap Control of Gold Nanodots on the Gel Surface
3. 学会等名 Asian Conference on Nanoscience and Nanotechnology (AsiaNANO 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三友 秀之、飯田 良、新倉 謙一、居城 邦治
2. 発表標題 単一のリガンド分子で修飾した金ナノロッドの二段階温度応答性自己集合
3. 学会等名 第67回高分子学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱島 暁、三友 秀之、松尾 保孝、新倉 謙一、居城 邦治
2. 発表標題 高分子ゲル表面に配置した金ナノドット間のギャップ距離変化の評価
3. 学会等名 日本化学会北海道支部2018年夏季研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱島 暁、三友 秀之、松尾 保孝、新倉 謙一、居城 邦治
2. 発表標題 高分子ゲルを利用した金ナノドット間距離と表面プラズモンの制御
3. 学会等名 第67回高分子討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideyuki Mitomo, Satoru Hamajima, Kuniharu Ijio
2. 発表標題 Active Gap Control of Gold Nanodots using Gels in Nanoscale
3. 学会等名 The 3rd International Symposium for Advanced Gel Materials & Soft Matters (ISAGMSM), Xi'an, China (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideyuki Mitomo, Satoru Hamajima, Kuniharu Ijio
2. 発表標題 Active Tuning of Plasmonic Nanostructures Using Polymer Gels
3. 学会等名 10th International Conference on Materials for Advanced Technologies (ICMAT 2019), Singapore, Singapore (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideyuki Mitomo, Yier Shi, Ryo Iida, Yusuke Yonamine, Kuniharu Ijio
2. 発表標題 Tuning of Thermo-responsive Assembly of Gold Nanoparticles Coated with Oligo(Ethylene Glycol) Derivatives
3. 学会等名 Okinawa Colloids 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三友 秀之、二瓶 瑞生、中村 聡、松尾 保孝、居城 邦治
2. 発表標題 DNAブラシを利用した金ナノロッドの外部環境変化に依存した配向変化
3. 学会等名 ナノ学会 第17回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三友 秀之、濱島 暁、松尾 保孝、新倉 謙一、居城 邦治
2. 発表標題 ポリマーゲル表面に固定化した金ナノドットパターンの動的変化の評価
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三友 秀之、関澤 祐侑、二瓶 瑞生、中村 聡、与那嶺 雄介、松尾 保孝、居城 邦治
2. 発表標題 DNAブラシ基板上に吸着させたカチオン性金ナノロッドのpHに依存した配向変化
3. 学会等名 第68回 高分子学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideyuki Mitomo, Yier Shi, Yusuke Yonamine, and Kuniharu Ijiro
2. 発表標題 Thermo-Responsive Assembly of Gold Nanoparticles Depending on Oligo(ethylene glycol) Density at Their Surfaces
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関澤 祐侑・三友 秀之・中村 聡・与那嶺 雄介・居城 邦治
2. 発表標題 DNAブラシに吸着した金ナノロッドのpH応答型配向変化
3. 学会等名 ナノ学会第18回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三友 秀之・関澤 祐侑・中村 聡・与那嶺 雄介・居城 邦治
2. 発表標題 DNA プラシ基板上での金ナノロッドの pH 応答型配向変化
3. 学会等名 第30回バイオ高分子シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三友 秀之・熊 坤・石 軼尔・与那嶺 雄介・居城 邦治
2. 発表標題 金ナノ粒子表面のオリゴエチエングリコールの 局所密度を利用した温度応答性制御
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関澤祐侑、三友秀之、中村聡、与那嶺雄介、居城邦治
2. 発表標題 DNA高分子プラシを利用したpH依存的な金ナノロッド配向変化
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊 坤、三友秀之、石 イーエル、与那嶺雄介、居城邦治
2. 発表標題 オリゴエチレングリコール系分子での表面修飾による金ナノ粒子集合化の温度応答性の制御
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室HP
<https://chem.es.hokudai.ac.jp>

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
研究分担者	矢野 隆章 (Yano Takaaki) (90600651)	徳島大学・ポストLEDフォトンクス研究所・特任准教授 (16101)	

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
---------	---------