

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 現在

機関番号： 16401
 研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2009～2011
 課題番号： 21550084
 研究課題名（和文）自己組織化ナノ規則構造を利用したナノアレイ作製法の開発とセンサ応用
 研究課題名（英文）Fabrication of Highly Ordered Nanoparticle Arrays Using Block Copolymer Nanotemplate
 研究代表者
 渡辺 茂（WATANABE SHIGERU）
 高知大学・教育研究部総合科学系・准教授
 研究者番号：70253333

研究成果の概要（和文）： 両親媒性ブロックコポリマーが自発的に形成するナノ規則構造をテンプレートとして、ナノ粒子を簡便にパターンニングするナノ微細加工プロセスを開発した。金ナノ粒子の二次元アレイを作製し、粒子表面にビオチンを固定化した金ナノ粒子アレイが、その光学的特性変化を通じてアビジンを検出できることを実証した。これは、固定化する生体分子を変えることで、各種生体分子を標的としたプラズモンセンサへの応用が期待できることを示している。

研究成果の概要（英文）： We report a simple, convenient, and inexpensive self-assembly method for nanopatterning gold nanoparticles (AuNPs) on substrates using block copolymer nanotemplates. Well-ordered monolayer films of block copolymer micelles (BCMs) were prepared by self-assembly of polystyrene-*block*-poly(4-vinylpyridine) (PS-*b*-P4VP). The films were immersed in a solution of citrate stabilized AuNPs. After immersion, the AuNPs showed hexagonal ordering on individual BCMs. In order to evaluate the possible application of these AuNP arrays in local surface plasmon resonance (LSPR) sensors, we investigated their optical response to molecular recognition phenomena at the surface of the AuNPs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：ブロックコポリマー、ミセル、テンプレート、自己組織化、金ナノ粒子、局在表面プラズモン、アレイセンサ

1. 研究開始当初の背景

DNA チップに代表されるアレイセンサ技術の発展はめざましく、今後ターゲットの多様化および高速・高感度・高精度化に向け、新しいセンシング概念の創出やセンサの高機

能化・多機能化が求められている。しかし、現状ではナノレベルのパターン形成はリソグラフィ技術に頼らざるを得ず、大学の研究室レベルで新奇なアレイセンサを手軽に作製し、その原理を実証するような状況にはな

い。このような状況下、基板表面に機能構造を自己組織化によって発現させる“*Smart Surface*”への志向が強まっている。

2 種類の成分からなるブロックコポリマーは、数十～数百 nm 周期のナノ規則構造を自然発生的に形成することが知られている。この自己組織化によって形成されるナノ規則構造を巨視的に制御できれば、これをマスクやテンプレートとして各種ナノ粒子を所望の構造体へ自在に導くことが可能となり、複雑な機能を簡便にかつナノレベルの空間分解能をもって発現できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、両親媒性ブロックコポリマーが自発的に形成する数 nm～数十 nm レベルの規則構造をナノパターン（“自己組織化ナノ構造テンプレート”）として、金ナノ粒子を基板上にパターン転写し、リソグラフィ技術を使うことなく金ナノ粒子をナノレベルでパターン制御しながら迅速かつ簡便に配列するナノ微細加工プロセスを開発する。さらに、高密度・高規則金属ナノ粒子アレイに固有の光学的特性を活かして、高感度なナノアレイセンサの開発をめざす。

3. 研究の方法

(1) 反応性金ナノ粒子の作製

金ナノ粒子をテンプレート上に組織化するためには、テンプレートとの間にイオン結合や共有結合など有用な結合を形成する必要がある。塩化金酸をクエン酸で還元するクエン酸還元法を利用して、イオン結合の形成に有効な負電荷を帯びた金ナノ粒子を作製した。また、チオグルコースを還元剤および表面保護剤とする糖還元法を独自に開発し、粒子表面に反応活性なカルボキシル基 (-COOH) や水酸基 (-OH) を導入した金ナノ粒子を作製した。

(2) ナノ構造テンプレートの作製

テンプレートの形成には、疎水性のポリスチレン (PS) と親水性のポリビニルピリジン (PVP) からなる両親媒性ブロックコポリマー (PS_n-*b*-PVP_n) を選択した。PS_n-*b*-PVP_n は、トルエン溶液中 PVP をコア、PS をコロナとするコア-コロナ型の球状ミセルを形成することが知られており、その 0.5wt%トルエン溶液を基板上にスピコートし、ミセルの自己組織化膜を形成した。続いて THF の蒸気に暴露することでミセルの再配列を促し、六方晶構造を形成する PS_n-*b*-PVP_n ミセルの自己組織化単層膜を作製した。

(3) 金ナノ粒子のナノパターンニング

PS_n-*b*-PVP_n ミセルの自己組織化膜を金ナノ粒子の水溶液に数分間浸漬させ、ミセルが形

成するナノパターンに沿って金ナノ粒子を組織化し、金ナノ粒子アレイを作製した。

(4) 表面改質効果の検討

標的分子と特異的に結合するリガンド分子を粒子表面に固定化するに先立ち、金ナノ粒子アレイに 172 nm の真空紫外光 (VUV) を照射し、粒子表面の清浄化やミセルテンプレートの表面改質を行うことで、リガンド分子の高密度化および非特異的吸着の低減など VUV 照射効果 (表面改質効果) について検討した。

(5) 局在表面プラズモン共鳴センサの構築

ビオチン-アビジン系を用いて金ナノ粒子アレイのセンサ機能について評価した。粒子表面にビオチンを固定化し、ストレプトアビジンの存在下、金ナノ粒子の局在表面プラズモン共鳴 (LSPR) 吸収スペクトルを観察し、そのスペクトル変化を通じてストレプトアビジンを検出できるか検討した。

4. 研究成果

(1) 反応性金ナノ粒子の開発

クエン酸還元法を用いて作製した金ナノ粒子は、粒子表面がクエン酸で被覆され負電荷を帯びており、テンプレートとのイオン結合の形成には極めて有用なものである。しかし、粒子表面に存在するクエン酸は、反応性に乏しく共有結合の形成には向かないことがわかった。

一方、チオグルコース還元法を用いて作製した金ナノ粒子は、合成時に形成されたカルボキシル基 (-COOH) が粒子表面に存在しており、その反応性について比色検出等の応用研究を通じて検討した。その結果、これらのカルボキシル基は、スクシンイミド活性化法を用いて活性エステルへと導いた後、アミノカップリング法を用いてアミノ基 (-NH₂) を含む分子であれば何でも結合できることをつきとめた。これによってチオグルコース還元法は、共有結合の形成に有用な金ナノ粒子を与えることが分かった。

(2) ナノ構造テンプレートの開発

図 1a は、PS_{50,000}-*b*-PVP_{13,000} の 0.5wt%トルエン溶液をガラス基板上にスピコートした後、基板表面を原子間力顕微鏡で観察した結果を示している。スピコート直後のミセルの自己組織化膜は、やや規則性に乏しいこと (図 1a) から THF の蒸気に暴露し、ミセルを再配向させることで規則性を向上させた (図 1b)。

(3) 金ナノ粒子のナノパターンニング

テンプレートを金ナノ粒子 (粒径 16 nm) の水溶液に 1 分、5 分、10 分と時間を変えな

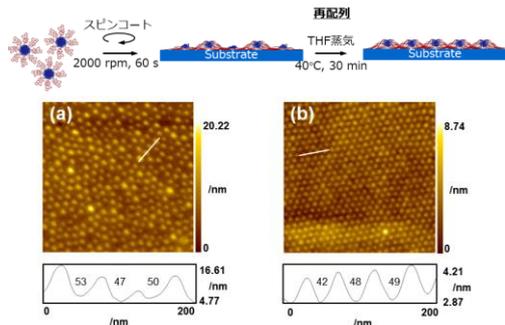


図 1 ガラス基板上に作製した PS₅₀₀₀₀-*b*-PMA(Az)₁₃₀₀₀ ミセルの自己組織化膜の原子間力顕微鏡図 (2000×2000 nm²) : (a) THF アニーリング前, (b) THF アニーリング後.

がら浸漬し、ミセルテンプレート上に組織化される金ナノ粒子の様子を原子間力顕微鏡で観察した (図 2)。各ミセル上に 1 個の金ナノ粒子が組織化されており、浸漬時間が長くなるにつれて組織化率が向上し、およそ 5 分程度で 100% に達することがわかった (図 2b)。しかし、浸漬時間を長くしすぎると一部に凝集する金ナノ粒子が観察されるようになり (図 2c)、浸漬時間の最適化が必要ながわかった。

水溶液中、PVP 部のピリジンがプロトン化によって正に帯電している。また金ナノ粒子は表面が負の電荷を帯びており、これらの静電的引力を介して、金ナノ粒子がミセル上に結合したと考えられる。一方、金ナノ粒子の間には凝集力が働いており、浸漬時間を長くしすぎると、ミセルのみならずテンプレート上に配列している金ナノ粒子にも新たな金ナノ粒子が結合したと考えられる。

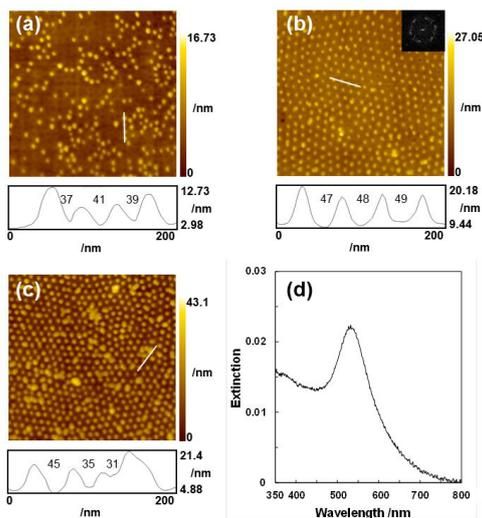
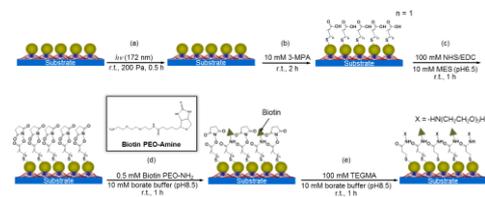


図 2 ミセルテンプレート上に組織化された金ナノ粒子の原子間力顕微鏡図 (1000×1000 nm²): 浸漬時間 (a) 1 min, (b) 5 min, (c) 10 min. (d) 5 分間浸漬して作製した金ナノ粒子アレイの紫外可視吸収スペクトル.

利用したミセルテンプレートは、50 nm の構造周期を有しており、原理的には 50 nm 近い粒径の金ナノ粒子を組織化することが可能である。しかし、実際には粒径が 20 nm を超える金ナノ粒子は、凝集のため組織化することができなかった。これは金ナノ粒子の粒径が大きくなるほど、金ナノ粒子とミセルテンプレート間に作用する静電引力よりも粒子間に働く結合力 (凝集力) が強くなることが原因である。テンプレートのナノパターンに沿って組織化できる金ナノ粒子の粒径は、20 nm 程度が限界であることがわかった。

(4) 局在表面プラズモンセンサの構築

スキーム 1 に示す方法に従って、金ナノ粒子表面にビオチンを固定化した。金ナノ粒子アレイを 3-メルカプトプロピオン酸 (MPA) の水溶液に 2 時間浸漬させ、Au-S 結合を介して粒子表面に導入した。粒子表面のカルボキシル基を *N*-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) と 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) の反応液と処理することによって活性化した。次に、ビオチン (Biotin-(OCH₂CH₂)₃NH₂) と室温で 1 時間反応させ、アミド結合を介して粒子表面にビオチンを固定化した。さらに、H(OCH₂CH₂)₃NH₂ (TEGMA) を用いて未反応の活性化エステル部位をブロックした。



スキーム 1.

ビオチンを固定化した金ナノ粒子アレイを 10 mM HEPS 緩衝液 (pH 7.5) に浸漬させた後、ストレプトアビジンを滴下し、金ナノ粒子の吸収スペクトル変化を観察した。アビジンの添加量が増すに従い、局在表面プラズモン (LSPR) バンドの強度が増加する様子が観察された (図 3a, 図 4)。一方、同様のス

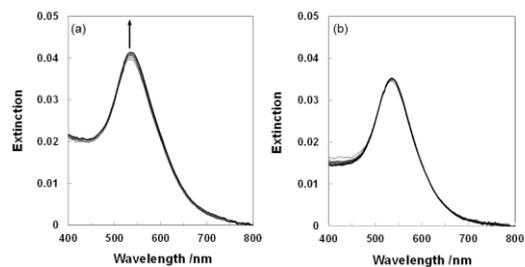


図 3 ストレプトアビジンの紫外可視吸収スペクトル検出実験: (a) ビオチンあり, (b) ビオチンなし

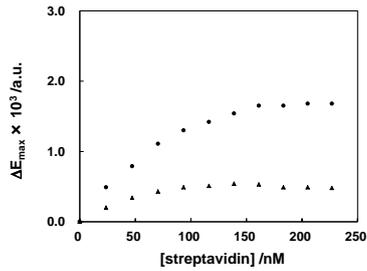


図 4 ストレプトアビジンの滴定曲線：ビオチンあり (●)，ビオチンなし (▲)

ペクトル変化は、粒子表面にビオチンを固定化していない金ナノ粒子アレイでは観察されなかった (図 3b, 図 4)。これらの実験結果は、観察されたスペクトル変化が、ストレプトアビジンの非特異的な吸着によるものではなく、粒子表面に固定化したビオチンとストレプトアビジン間の特異的な結合に因るものであることを示している。

また、集積化した金ナノ粒子に真空紫外光 ($\lambda_{\max} = 172 \text{ nm}$) を短時間照射した後、粒子表面にリガンドの固定化処理を行うとビオチン-アビジン間の特異的結合が促進されるとともに、非特異的結合が抑制され、センサ機能が向上することを見出した (図 5, 図 6)。このように作製した金ナノ粒子アレイセンサでは、50 – 160 nM の濃度範囲内で相関係数が 0.97 の直線関係が得られ、定性のみならず定量分析用アレイセンサとして応用できることがわかった (Figure 7)。さらに、 $3.3\sigma/S$ (σ : 空試験の標準偏差, S : 検量線の勾配) から求めた検出限界は 30 nM になることがわかった。

添加したストレプトアビジンの濃度と LSPR スペクトルの相対強度変化をプロットし、吸着等温線を求めた。その結果を Figure 8 に示す。これらのデータを Langmuir および

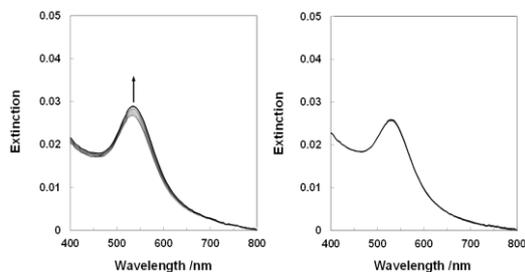


図 5 VUV 前処理を施した金ナノ粒子アレイセンサを使ったストレプトアビジンの紫外可視吸収スペクトル検出実験: (a) 粒子表面にビオチンを固定化した金ナノ粒子アレイ, (b) 粒子表面にビオチンを固定化していない金ナノ粒子アレイ

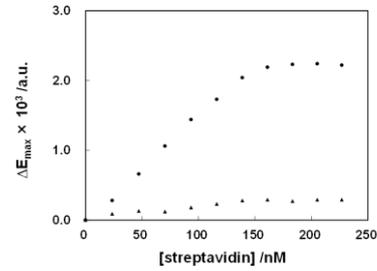


図 6 ストレプトアビジンの滴定曲線：ビオチンあり (●)，ビオチンなし (▲)

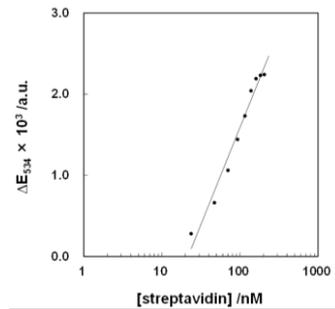


図 7 ストレプトアビジンの検量線

Langmuir-Freundlich の吸着等温式に当てはめた。Langmuir-Freundlich プロットにはよくフィットするが、Langmuir プロットにはあまりよくフィットしなかった。表面の吸着点が均一な吸着熱をもつと考えると導き出されてきた Langmuir 式に適合しないということは、金ナノ粒子表面に固定化されたビオチン (= 吸着点) が、ストレプトアビジンに対して同等な結合力を示すように固定化されていないのかもしれない。今後、近傍分子との立体障害を避けながらビオチンを最表面に露出させるなど、ビオチンの配向や固定化密度を最適化する必要がある。

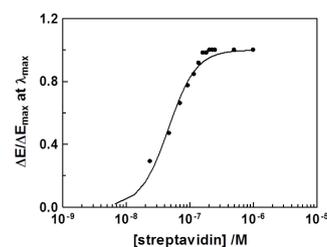


図 8 ストレプトアビジンの結合等温線。実線は、Langmuir-Freundlich 式で得られたベストフィットカーブ

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 6 件)

- ① 渡辺 茂, 山本修司, 合田愛理, 東 優磨, “糖鎖集積化金ナノ粒子を用いる糖鎖-タンパク質相互作用の高感度分光分析”, *分析化学*, 16, 49-56 (2012) 査読[有]
- ② 渡辺 茂, “生体分子の固定化に最適な金ナノ粒子の開発”, *BioIndustry*, 28, 42-48 (2011) 査読[なし]
- ③ S. Watanabe, S. Yamamoto, K. Yoshida, K. Shinkawa, D. Kumagawa, and H. Seguchi “Surface plasmon resonance scattering and absorption sensing of Concanavalin A using glycoconjugated gold nanoparticles” *Supramol. Chem.*, 23, 297-303 (2011) 査読[有]
- ④ S. Watanabe, K. Yoshida, K. Shinkawa, D. Kumagawa, and H. Seguchi, “Thioglucose-Stabilized Gold Nanoparticles as a Novel Platform for Colorimetric Bioassay Based on Nanoparticle Aggregation” *Colloids Surf. B*, **81**, 570-577 (2010) 査読[有]
- ⑤ S. Watanabe, S. Nakano, C. Imai, I. R. Laskar, T. Komura, S. Hadano, and T. Iyoda “A Simple and Convenient Method to Fabricate Hexagonally Ordered Gold Nanoparticle Arrays Using Diblock Copolymer Micelle Template” *Chem. Lett.*, 902-904 (2010) 査読[有].
- ⑥ I. R. Laskar, S. Watanabe, M. Hada, H. Yoshida, J. Li, T. Iyoda “Tuning Surface Interactions to Control Shape and Array Behavior of Diblock Copolymer Micelles on a Silicon Substrate” *Surf. Sci.*, 603, 625-631 (2009) 査読[有].

[学会発表] (計 15 件)

国際会議

- ① K. Takemura, S. Watanabe, “Fabrication of Gold Nanoparticles Using Diblock Copolymer Micelle Template and Their Application” International Symposium on Green Science 2011, Sept. 20, 2011, Kochi Univ., Japan
- ② S. Watanabe, K. Yoshida, D. Kumagawa, H. Seguchi, and K. Shinkawa, “Surface Plasmon Resonance and Absorption Sensing of Saccharide-Protein Interactions Based on Glycoconjugated

Gold Nanoparticles” Fifth International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry (ISMSC), June 9. 2010, Nara, Japan

国内会議

- ① 東 優磨, 渡辺 茂, “ラクトフェリン修飾金ナノ粒子のレクチン検出薬への応用” 日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 27 日, 慶応義塾大学 (神奈川)
- ② 竹村晃一, 渡辺 茂, “ミセルテンプレート法を利用した金ナノ粒子アレイの作製とプラズモンセンサーへの応用” 日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 27 日, 慶応義塾大学 (神奈川)
- ③ 竹村晃一, 渡辺 茂, “ブロックポリマーテンプレートによる金ナノ粒子アレイの作製とプラズモンセンサーへの応用” 2011 年日本化学会西日本大会, 2011 年 11 月 12 日, 徳島大学
- ④ 東 優磨, 渡辺 茂, “ラクトフェリン修飾金ナノ粒子を利用したレクチンの高感度検出” 2011 年日本化学会西日本大会, 2011 年 11 月 12 日, 徳島大学
- ⑤ 渡辺 茂, 竹村晃一, “高分子自己組織化ナノ構造テンプレートを利用したナノ粒子の集積化と応用” 第 60 回高分子討論会, 2011 年 9 月 28 日, 岡山大学
- ⑥ 渡辺 茂, 矢羽田達也, 小村元憲, 波多野慎悟, 彌田智一, “両親媒性ブロック共重合体の自己組織化ナノ構造テンプレートを利用した金ナノ粒子の精密配列とプラズモンセンサーへの応用” 第 60 回高分子学会年次大会, 2011 年 5 月 26 日, 大阪国際会議場
- ⑦ 山本修司, 渡辺 茂, “糖修飾金ナノ粒子を利用したレクチンの高感度検出” 日本化学会第 91 春季年会, 2011 年 3 月 11 日 (講演予稿集発行日), 日本化学会第 91 春季年会 (2011) 講演予稿集
- ⑧ 矢羽田達也, 渡辺 茂, “指向性自己組織化法を利用した金ナノ粒子アレイの作製とプラズモンセンサーへの応用” 日本化学会第 91 春季年会, 2011 年 3 月 11 日 (講演予稿集発行日), 日本化学会第 91 春季年会 (2011) 講演予稿集
- ⑨ 吉田和真, 熊川大輔, 新川桂太郎, 渡辺 茂, “バイオセンシング用糖修飾金ナノ粒子の研究開発” 日本化学会西日本大会 2009, 2009 年 11 月 8 日, 愛媛大学
- ⑩ 松永奈美穂, 渡辺 茂, 彌田智一, “高分子ナノ相分離構造をテンプレートとした金ナノ粒子の組織化に関する研究” 日本化学会西日本大会 2009, 2009 年 11 月 8 日, 愛媛大学

- ⑪ 魚谷祐樹, 渡辺 茂, “集積化金ナノ粒子の合成とセンシング機能評価” 日本化学会西日本大会 2009, 2009年11月7日, 愛媛大学
- ⑫ 吉田和真, 渡辺 茂, “グルコース修飾金ナノ粒子の合成と機能化およびレクチンの比色検出” 日本化学会西日本大会 2009, 2009年11月7日, 愛媛大学
- ⑬ 渡辺 茂, “金ナノ粒子を利用した高感度化学センサーの開発” 第51回中国四国産学連携化学フォーラム, 2009年8月29日, 高知大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.cc.kochi-u.ac.jp/~watanabe/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 茂 (WATANABE SHIGERU)

高知大学・教育研究部総合科学系・准教授
研究者番号：70253333