

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14650

研究課題名(和文) 細孔性粒子内の濃縮反応場を利用した微量計測

研究課題名(英文) Trace detection based on concentrated reaction field in porous particle

研究代表者

宮川 晃尚 (Miyagawa, Akihisa)

筑波大学・数理物質系・助教

研究者番号：80881599

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)：シリカ粒子には西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)が数百倍、一本鎖および二重鎖DNAが千倍程度濃縮されることを明らかにした。この濃縮反応場を利用し、単一粒子系で980 nMの過酸化水素を定量できることを明らかにした。また、一本鎖および二重鎖DNAのシリカ粒子の細孔内拡散挙動を明らかにした。一本鎖DNAは凝集体として粒子内に分配されやすく、二重鎖DNAは粒子内では解離しやすいことを明らかにした。ヘアピン型DNAを粒子内に濃縮し、ターゲットDNAの分配による計測を行ったところ、単一粒子系で10 nMのターゲットDNAを定量できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、シリカ粒子内に濃縮された分子を利用した計測原理を確立させた。その濃縮倍率などを定量的に議論している研究例はなく、学術的に意義深い。また、単一粒子系で顕微分光法によって計測を行うことにより、高感度な計測が可能となる。本計測法はレーザートラップやマイクロデバイスと親和性が高く、組み合わせることで簡便な検出システムを構築できるため、社会的貢献も見込める。また、DNAの粒子内の拡散挙動はクロマトグラフィーの分離機構を明らかにするための基礎知見となり、当該分野での学術的寄与を期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that horseradish peroxidase (HRP) is concentrated several hundred-fold in silica particles, and single-stranded and duplex DNA are concentrated by approximately a thousand-fold. Using this concentration reaction field, we have shown the ability to quantify hydrogen peroxide at a concentration of 980 nM in a single-particle system. Additionally, we have elucidated the diffusion behavior of single-stranded and duplex DNA within the pores of silica particles. Single-stranded DNA tends to be distributed as aggregates within the particles, while duplex DNA readily dissociates inside the particles. By concentrating hairpin-type DNA within the particles and detecting target DNA based on the cleavage reaction of hairpin DNA, we have demonstrated the quantification of target DNA at a concentration of 10 nM in a single-particle system.

研究分野：分析化学

キーワード：微量計測 顕微分光 マイクロ粒子 DNA 細孔性粒子 タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マイクロ粒子はその大きさから pL-fL の反応空間を有している。この微小空間内で起きる反応を計測することで、微量計測が可能である。例えば、Whitesidesらは粒子の磁場浮揚法を開発し、反応による粒子の密度変化が浮揚位置変化として検出できることを利用し、油滴内ラジカル反応の反応速度を評価した(G. M. Whitesides et. al., J. Am. Chem. Soc. 2017, 139, 18688)。また、馬渡らは、ナノ流体デバイスと光熱効果を利用し、aL-fL の溶液中に存在する 500 分子の計測を可能にした(K. Mawatari et. al., Anal. Chem. 2019, 91, 9741)。申請者自身も超音波 - 重力複合場を用いたマイクロ粒子表面反応の計測(A. Miyagawa et. al., Anal. Chem. 2018, 90, 2310 など)や、水溶液を共晶点以上で凍結することで形成される、 μL オーダーの凍結濃縮溶液を利用した有機分子凝集体の計測を行った(A. Miyagawa et. al., J. Phys. Chem. B 2020, 124, 2209)。これらの研究から微小空間の反応場は微量計測に適していることがわかる。

中谷らは単一の細孔性シリカゲル粒子内の物質移動現象を顕微分光により解明した(K. Nakatani et. al., Langmuir 2002, 18, 694 など)。この過程で、ローダミン 6G のような有機分子が粒子細孔内に分配・吸着することがわかった。細孔内の大きさは pL-fL 程度のため、粒子細孔内に数百倍-数千倍濃縮することが示された。また、pH やイオン強度により、シリカゲル表面のシラノール解離度や電気二重層厚さを変えられるため、この濃縮倍率を制御できる。この濃縮反応場を計測に利用した場合、同様の倍率での感度向上が見込める。

2. 研究の目的

本申請では、単一細孔性粒子内の濃縮反応場を計測場として利用し、高感度な微量計測法として確立することを目的としている。そこで主に二つの研究に着手する。細孔内反応に関する多くの報告例がある酵素反応を利用して微量計測を行うことで本計測原理を実証する。その後、DNA の触媒増幅反応による計測法を確立することで、本計測原理の汎用性・応用性を証明する。

3. 研究の方法

(1) 酵素反応を利用した微量計測法の開発

西洋わさびペルオキシターゼ(HRP)を細孔性シリカ粒子内に濃縮した。その後、一粒子のみを反応基質と過酸化水素の含まれた溶液に、マイクロマニピュレーション/インジェクションシステムを用いて導入した。共焦点蛍光顕微鏡を用いて、単一粒子内の生成色素の蛍光強度分布を測定し、粒子内蛍光強度と過酸化水素の濃度の関係を検討した。

(2) DNA 触媒増幅反応による微量計測

細孔性シリカ粒子内に一本鎖 DNA と二重鎖 DNA を濃縮した。上記の手法と同様にして、単一粒子内の DNA の拡散挙動を共焦点蛍光顕微鏡により明らかにした。また、hairpin DNA をシリカ粒子内に濃縮した。その後、一粒子のみをターゲット DNA の含まれる溶液に導入し、粒子内蛍光強度を測定した。

4. 研究成果

(1) 酵素反応を利用した微量計測法の開発

HRP のシリカ粒子内への濃縮倍率を決定するために、顕微吸収法を用いて Langmuir の吸着等温挙動を評価した。その結果、細孔径 30 nm のシリカ粒子に対して吸着平衡定数は $2.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、飽和吸着量は $180 \mu\text{M}$ という結果を得た。このパラメータから、10 mM PBS 緩衝液(pH 6.97)、 $1 \mu\text{M}$ HRP 水溶液を用いた場合、シリカ粒子には 940 倍濃縮されることがわかった。シリカ粒子に HRP を濃縮させ、単一粒子を反応溶液に導入する際に、HRP は共有結合をしておらず、吸着しているだけであるため、HRP の溶出が起こる。この溶出の速度を評価するために、HRP に FITC を修飾し、溶出速度を評価した。その結果、見かけの溶出速度定数は $3.8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ であり、3 h 程度で、粒子内の HRP 濃度が半分になることがわかった。

反応基質は o-フェニレンジアミンやローダミン 123、amplex red などを検討したが、それぞれの吸収および蛍光波長などの観点から amplex red を用いることにした。粒子内に $980 \mu\text{M}$ の HRP を濃縮させ、 $1 \mu\text{M}$ amplex red、 $98 \mu\text{M}$ H_2O_2 の水溶液に導入したときの粒子内蛍光強度の経時変化を図 1 に示す。急激に蛍光強度が増加し、20 min 以降で蛍光強度が減少した。上述の通り、測定した 2 時間で HRP はまだ粒子内に入り、反応は十分に行えると考えられる。したがって、amplex red が HRP と H_2O_2 の反応によりレゾルフィンが生成し、蛍光強度が急激に増加した。しかし、粒子内のレゾルフィン濃度が増加すると、粒子内外で濃度勾配を生じ、粒子外へ放出されたものと考えられる。 H_2O_2 濃度を減少させると、蛍光強度の増加が短時間で現れるようになり、やがて観測できなくなり、蛍光強度の減少のみが観測されるようになった。また、 98 nM H_2O_2 の溶液では、蛍光強度は観測されなくなった。以上のことから、本計測系では 980 nM の H_2O_2 を単一粒子によって計測できることが明らかとなった。(論文投稿中)

(2) DNA 触媒増幅反応による微量計測

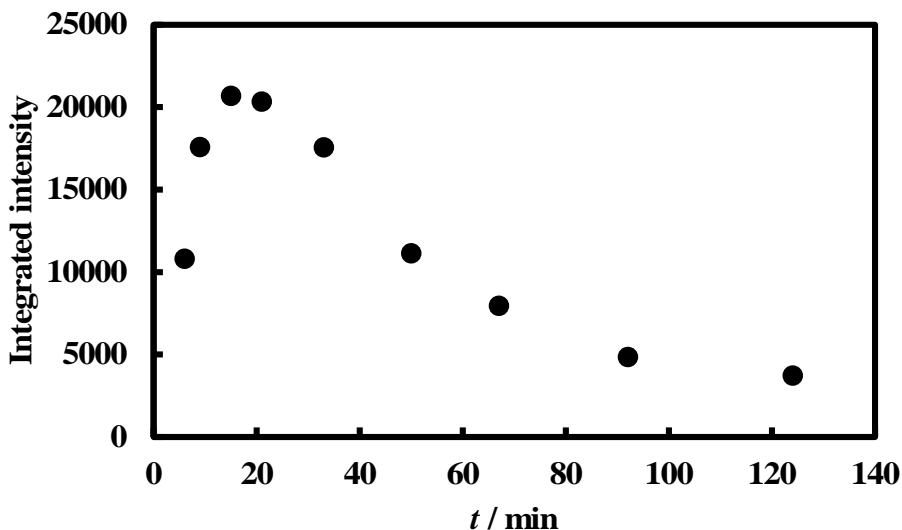


図 1 HRP 濃縮シリカゲル内蛍光強度変化

シリカ粒子内に DNA を濃縮させるためにアミノ修飾シリカ粒子(細孔径 30, 50 nm)を用いた。1 本鎖の DNA および 2 重鎖の DNA がどれだけ濃縮されるのかを調べるために、顕微吸収および共焦点蛍光顕微鏡を用いて、粒子内の拡散挙動について検討した。1 本鎖の DNA は 20 塩基で単一の塩基(アデニン、チミン、シトシン、グアニン)で構成されたものを用いた。それぞれの DNA に対して濃縮倍率は 1000 倍以上となった。これは、センシングにおいて同程度の高感度化が期待できる。計測原理上、粒子内拡散が重要となるため、1 本鎖 DNA の拡散挙動について検討を行った。その結果、図 2 に示すように、シグモイド型の分配挙動が観測された。これは、粒子内拡散では初めて観測された現象である。これは、核形成やタンパク質凝集で観測される速度論的挙動である。したがって、DNA がシリカに吸着し、表面上で凝集し、凝集体が細孔内に分配するというモデルで解析を行ったところ、曲線のように分配挙動を説明することができた。しかし、グアニンのみ 4 重鎖形成の影響により、他の塩基とは異なる挙動を示した。粒子内の拡散係数をポア-表面拡散モデルにより解析を行ったところ、1 本鎖 DNA は表面拡散のみで粒子内を拡散していることが明らかとなった。また、粒子内の拡散係数は塩基配列などには大きく依存せず、 $10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ オーダーであることがわかった。¹

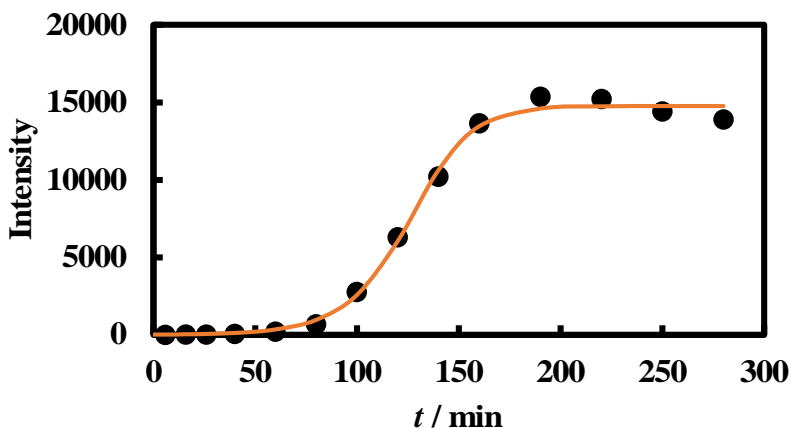


図 2 1 本鎖 DNA の粒子内蛍光強度変化

次に二重鎖 DNA の分配挙動に関して見当を行った。二重鎖 DNA も粒子に数百倍から千倍程度濃縮されることを明らかにした。図 3 に二重鎖 DNA の粒子内拡散挙動の結果を示す。HRP のときと同様に蛍光強度が増加し、減少していくことがわかった。これは高濃度の DNA 濃度のときに顕著であった。種々の検討を行ったところ、これはシリカ粒子内で二重鎖 DNA が解離し、1 本鎖 DNA になっていることが示唆された。また、溶液濃度が低濃度の場合、溶液中で 1 本鎖 DNA への解離が起き、複雑な分配挙動を取ることも明らかになった。二重鎖 DNA の拡散係数は $10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ オーダーであることがわかった。この結果は、この後のセンシングに影響を与える可能性がある。

つまり、二重鎖 DNA を濃縮させた場合、塩基数や濃度によって、解離した 1 本鎖 DNA が存在する可能性がある。50 塩基対の二重鎖 DNA では解離が起こらないことを確かめた。(論文投稿中)

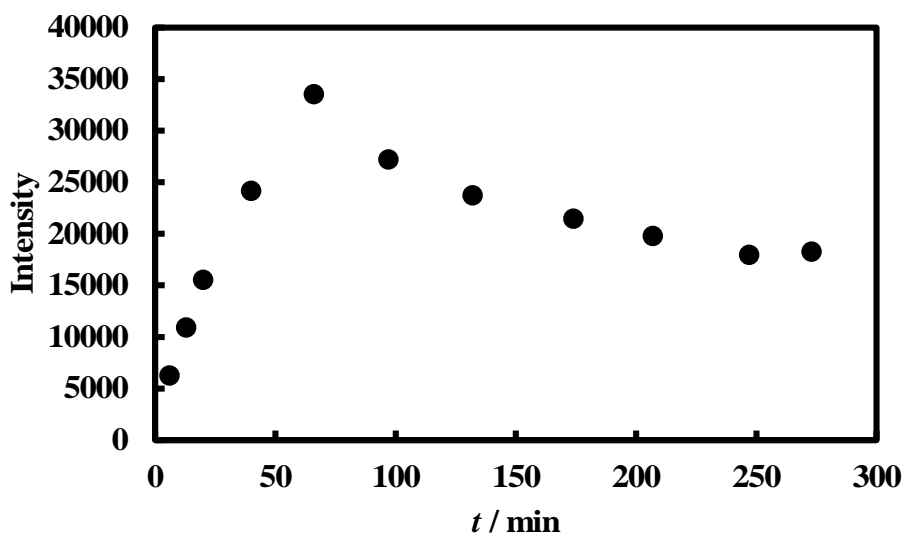


図 3 二重鎖 DNA の粒子内蛍光強度変化

最後に hairpin DNA の開裂に伴う、粒子内濃縮反応場を利用したセンシングを行った。Hairpin DNA は 43 塩基のものを用いた。Hairpin DNA はこれまでの測定と同様に数千倍程度粒子内に濃縮されることを明らかにした。図 4 に 1 μ M のターゲット DNA と反応させたときの蛍光強度変化を示す。蛍光強度が徐々に増加し、やがて平衡に達したことがわかる。この測定では蛍光強度の減少は確認されず、センシング原理を達成した。しかし、検討を進めるうちに上述の解離した 1 本鎖 DNA が蛍光を発してしまっていることがわかった。したがって、DNA の配列を調整する必要がある。

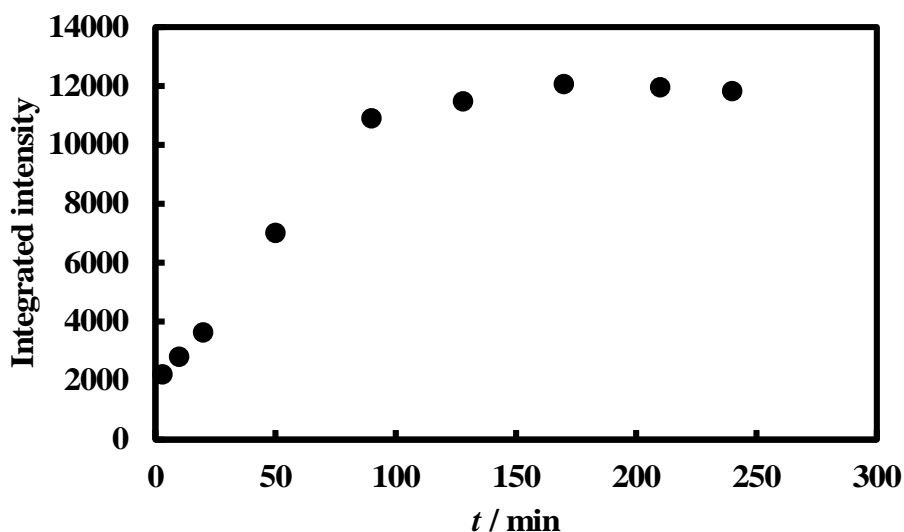


図 3 二重鎖 DNA の粒子内蛍光強度変化

引用文献

1. [A. Miyagawa*](#), R. Ide, S. Nagatomo, K. Nakatani, Distribution Behavior of Single-Stranded DNA Molecules in an Amino Group-Functionalized Silica Microparticle., *Langmuir*, **2022**, *38*, 8462-8468.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hagiya Kenta, Miyagawa Akihisa, Nagatomo Shigenori, Nakatani Kiyoharu	4. 巻 94
2. 論文標題 Direct Quantification of Proteins Modified on a Polystyrene Microparticle Surface Based on Potential Change	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 6304 ~ 6310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.2c00457	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 Miyagawa Akihisa, Komatsu Hiroyuki, Nagatomo Shigenori, Nakatani Kiyoharu	4. 巻 125
2. 論文標題 Effect of Molecular Crowding on Complexation of Metal Ions and 8-Quinolino1-5-Sulfonic Acid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 9853 ~ 9859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.1c05851	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 Miyagawa Akihisa, Komatsu Hiroyuki, Nagatomo Shigenori, Nakatani Kiyoharu	4. 巻 360
2. 論文標題 Acid Dissociation Behavior of 8-Hydroxyquinoline-5-Sulfonic Acid in Molecular Crowding Environment Modeled Using Polyethylene Glycol	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Liquids	6. 最初と最後の頁 119526 ~ 119526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molliq.2022.119526	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 Miyagawa Akihisa, Nakatani Kiyoharu	4. 巻 38
2. 論文標題 J-aggregation of 5, 10, 15, 20-tetraphenyl-21H, 23H-porphinetetrasulfonic acid in a molecular crowding environment simulated using dextran	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 1505 ~ 1512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s44211-022-00185-5	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 Miyagawa Akihisa, Ide Ryosuke, Nagatomo Shigenori, Nakatani Kiyoharu	4. 巻 38
2. 論文標題 Distribution Behavior of Single-Stranded DNA Molecules in an Amino-Group-Functionalized Silica Microparticle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 8462 ~ 8468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.2c01062	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 Miyagawa Akihisa, Ueda Yasuyuki, Hagiya Kenta, Nagatomo Shigenori, Nakatani Kiyoharu	4. 巻 96
2. 論文標題 Two-Step Modification of Proteins onto Microparticle Surface Using DMT-MM Condensation Agent	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 95 ~ 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20220315	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 Miyagawa Akihisa, Komatsu Hiroyuki, Nagatomo Shigenori, Nakatani Kiyoharu	4. 巻 372
2. 論文標題 Thermodynamic complexation mechanism of zinc ion with 8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid in molecular crowding environment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Liquids	6. 最初と最後の頁 121181 ~ 121181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molliq.2022.121181	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 秋谷 健太; 宮川 晃尚; 長友 重紀; 中谷 清治
2. 発表標題 ポリスチレン粒子表面修飾によるゼータ電位変化に基づいたタンパク質の微量計測
3. 学会等名 第82回分析化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小松弘幸; 宮川 晃尚; 長友重紀; 中谷清治
2. 発表標題 分子クラウディング環境下でのオキシ錯形成反応の熱力学的評価
3. 学会等名 第82回分析化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮川 晃尚; 井手亮佑; 長友重紀; 中谷清治
2. 発表標題 DNAのアミノ修飾シリカ粒子細孔内における拡散挙動の評価
3. 学会等名 第82回分析化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小松弘幸; 宮川 晃尚; 長友重紀; 中谷清治
2. 発表標題 オキシ錯形成反応における分子クラウディング効果の熱力学的評価
3. 学会等名 日本分析化学会第71年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 萩谷健太; 宮川 晃尚; 長友重紀; 中谷清治
2. 発表標題 ゼータ電位計測による粒子表面へのタンパク質吸着挙動の評価
3. 学会等名 日本分析化学会第71年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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