

## 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 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22310076

研究課題名（和文） 周期構造・高屈折率無機界面を有する高感度バイオチップの研究

研究課題名（英文） Study of sensitive biosensor chip including periodic structure coated with silver and zinc oxide

研究代表者

田和 圭子（TAWA KEIKO）

産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号：80344109

研究成果の概要（和文）：金属薄膜でコーティングされた周期構造チップ（＝プラズモニックチップ）では、増強蛍光を検出することにより、結合したターゲット蛋白質の定量的な評価ができる。本研究では、①350nm～500nmの周期構造（ピッチ）を有し、②金属薄膜（銀）を酸化亜鉛でコートし、③酸化亜鉛に特異的に高密度に結合する抗酸化亜鉛抗体を利用する、という特徴をもつバイオチップにおいて、そのプラズモニックチップの構造に依存した光学特性と増強蛍光のメカニズムを明らかにし、高感度蛍光計測技術と ZnO 表面に特異的に結合する抗体断片を利用した抗体固定化技術の融合によって、マーカータンパク質の高感度検出を実現した。

研究成果の概要（英文）：The substrate with a periodic structure coated with metal layers, a plasmonic chip, was applied to a biosensor, because the plasmonic chip can detect the enhanced fluorescence from the labeled-proteins in the assay mainly based on the antigen-antibody interaction. The enhanced fluorescence was based on the resonance between surface plasmon polaritons and the incident light. In this study, the biochip (i) with the pitch of 350 - 500nm, (ii) coating silver layer with zinc oxide layer, (iii) densely immobilized with the anti-ZnO antibody, was studied in the point of the optical properties and mechanism of an enhanced fluorescence depending on the periodic structure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2011 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2012 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：総合理工

科研費の分科・細目：ナノ材料・ナノバイオサイエンス・ナノ・マイクロ科学

キーワード：ナノ界面・表面、周期構造、プラズモニックチップ、蛍光、抗原抗体

1. 研究開始当初の背景

代表者はこれまで、表面プラズモン共鳴によって界面に生じた増強電場を励起場として、結合した蛍光標識化合物からの増強蛍光をセンシングする高感度バイオチップシステムの開発に従事してきた。従来型のクレッチマン配置（プリズム結合型）を用いた表面プラズモン励起増強蛍光（PC-SPF）法を利用して、表面プラズモン共鳴法による反射率計測のみでは得ることのできない独創的な研究を行ってきた。この SPF を用いた計測は、蛍光標識をしない表面プラズモン共鳴法による評価・解析よりも3桁以上高感度であった。しかし、PC-SPF 法では、水中試料における光の入射角（＝共鳴角）が、60度程度の広角になり、装置の大型化や操作の複雑性を招く。そこで、SPF のイメージングへの応用のため、格子カップリング面プラズモン共鳴を使った増強蛍光検出法（GC-SPF）について研究を展開してきた。GC-SPF ではプラズモニックチップと呼んでいる周期構造をもつ基板を金属薄膜でコーティングしたチップを用いる（図1）。ピッチをコントロールすることで、共鳴角を低角にセットすることができ、これまでに増強蛍光を検出するための周期構造の最適化を行い、チップ正面からの照射のみならず、背面からの照射による蛍光検出も可能であることを示すことができた。分担者は、2000年頃から報告がなされはじめた分子進化工学的手法を用いた材料表面結合性ペプチドに関して研究をすすめている。ペプチドの数百倍の結合力を持つ抗体断片に関しては、蛋白質としての取得まで成功しているのは、分担者のグループのみである。よって、本提案では周期構造とカップリングした表面プラズモン共鳴による増強電場創製と無機界面に特異的に結合する抗体（図2）作製との異分野融合によって、さまざまな抗原抗体反応の検出感度を調べ、高感度バイオチップの作製を目指すことができる。

## 2. 研究の目的

金属薄膜でコーティングされた周期構造チップ（＝プラズモニックチップ）では、プラズモンポラリトンと光との共鳴を利用して、抗原抗体相互作用によって結合したターゲット蛋白質から増強蛍光を検出することができることを示してきた。本研究では、①350あるいは500nmの周期構造（ピッチ）を有し、②金属薄膜（＝銀薄膜）を高屈折率の酸化亜鉛薄膜でコートし、③酸化亜鉛に特異的に高密度に結合する二量化抗体断片（図2）を利用する、という特徴をもつバイオチップ（図1）において、その構造に依存した光学特性と増強蛍光のメカニズムを明らかにしながら、従来のバイオチップよりも1-2桁高感度な10pMオーダー以下の高感度で結合を高感度検出できるバイオチップ作製を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、産総研のプラズモニック基板を利用した高感度蛍光計測技術と、東北大学大学院工学研究科の梅津光央准教授の ZnO 表面に特異的に結合する抗体断片を利用した抗体固定化技術の異分野融合によって、簡単な装置および操作でマーカータンパク質の高感度検出を目指した。本研究ではマーカーとして 1) 蛍光性タンパク質 Green

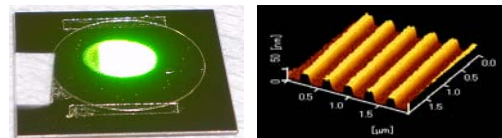


Fig. 1 プラズモニックチップの写真（左）と周期構造部分の AFM 画像（右）

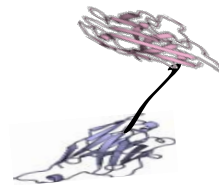


Fig. 2 抗酸化亜鉛 x 抗 EGFR 二重特異抗体の模式図

Fluorescent Protein (GFP), 2) 上皮成長因子受容体(EGFR), 3)脳由来神経栄養因子 (BDNF), 4)炎症性サイトカイン、インターロイキン 6 (IL-6) の検出に取り組んだ。

## 4. 研究成果

1) 抗酸化亜鉛 x 抗 Green Fluorescent Protein (ZnO-GFP) 二重特異性抗体チップによる GFP 検出 基板構造のおよび成膜条件を検討した結果、ピッチ 480nm の周期構造上に銀（膜厚 37nm）と酸化亜鉛（膜厚 17 nm）を成膜したチップを作製した。これを用いて、マーカータンパク質 GFP からの蛍光増強度を 100 倍にすることができた。このプラズモニックチップ上での抗原-抗体相互作用により、従来よりも GFP を高感度（10pM 以下）かつ迅速（10分）に検出することに成功した。

2) 腫瘍マーカー・Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) の二重特異性抗体（図2）による検出 二次元周期構造は、対物レンズによる集光系を用いた顕微鏡による蛍光計測にはより威力を発揮するが、p-偏光を用いた入射系+光電子増倍管を用いた検出系では一次元構造のほうが有利であることがわかった。

ピッチ 350nm の周期構造に銀（膜厚 37nm）と酸化亜鉛（膜厚 17 nm）を成膜したチップ上で、抗酸化亜鉛 x 抗 EGFR 二重特異

性抗体を高密度に固定化し、腫瘍マーカー EGFR の高感度検出を行った。酸化亜鉛をコーティングしたスライドガラス上と比べて蛍光強度は 300 倍に増強しており、10 分で 700 fM の検出に成功した (図 3)。スライドガラスでは EGFR は nM オーダーまでしか計測できず、4桁感度が向上したことがわかった。二重特異性抗体の注入時の溶液濃度を高くしたことにより、EGFR をより低濃度まで検出できたこともわかった。

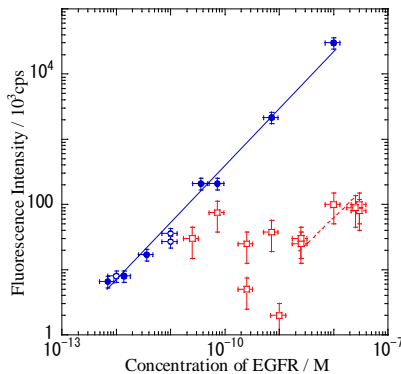


Fig.3 プラズモニックチップ上 (直線●, ○) とスライドガラス上(破線□)での EGFR 検出

3) うつ病マーカー候補・脳由来神経栄養因子 (BDNF) 検出 様々なマーカータンパク質を認識するアッセイを構成するといった多様性を視野に入れた重要なパーツとして、ビオチンタグ抗酸化亜鉛抗体を利用し、従来のバイオチップよりも高感度かつ高精度でマーカー検出できるサンドイッチアッセイシステムの構築を目指した。酸化亜鉛へのビオチンタグ抗酸化亜鉛抗体の結合について、リン酸が酸化亜鉛膜への抗体の結合を阻害し、酸化亜鉛表面への結合が抗体とリン酸との競争反応であることがわかった。そこで高濃度な抗体溶液をチップに加えることで、抗体の選択的な結合が確認できた。サンドイッチアッセイとして脳由来神経栄養因子 (BDNF) をマーカーとするアッセイ【ビオチンタグ抗酸化亜鉛抗体+ストレプトアビジン+ビオチン標識 BDNF プロペプチド+BDNF(=マーカー)+蛍光標識抗 BDNF 抗体】を構築した。これによって 1pM を検出することができたが、再現性と定量性に問題があった。そこで、BDNF 検出においては捕獲分子として BDNF プロドメイン標識抗酸化亜鉛抗体を調製し、BSA をブロッキング剤として用いることで非特異吸着抑制を改善し、再現性を向上させ

たが、10nM までの定量的評価にとどまった。

4) 炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン 6 (IL-6) 検出 マーカータンパク質として炎症性サイトカインの一つである IL-6 を選び、抗酸化亜鉛抗体を利用した高感度検出可能なサンドイッチアッセイの構築を目指した。IL-6 検出においてはビオチン標識抗酸化亜鉛抗体を調製して、ストレプトアビジンを仲介してビオチン標識抗 IL-6 捕獲抗体を結合する方法で計測を行った。蛍光検出は蛍光標識抗 IL-6 検出抗体で行った。高濃度に調製した抗酸化亜鉛抗体を表面に結合させたが、非特異吸着を十分に抑制することができなかった。また、BSA でのブロッキングは酸化亜鉛表面を溶解させると考えられ (表面プラズモン共鳴角の計測で共鳴角の低角シフトという結果より)、BSA は使用しなかった。検出限界が 2pM までの定量計測ができた。更なる高感度計測には、酸化亜鉛表面の検討も重要であることがわかった。

#### 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 13 件)

1. K. Tawa\*, M. Satoh, K. Uegaki, T. Hara, M. Kojima, H. Aota, Y. Yokota, T. Nakaoki, M. Umetsu, H. Nakazawa, I. Kumagai, "Rapid and sensitive detection of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) with a plasmonic chip", Japanese journal of applied physics, 52, 2013, 印刷中
2. Takamitsu Hattori, Mitsuo Umetsu, Takeshi Nakanishi, Satoko Sawai, Shinsuke Kikuchi, Ryutaro Asano, and Izumi Kumagai, "A high-affinity gold-binding camel antibody: Antibody engineering for one-pot functionalization of gold nanoparticles as biointerface molecules", Bioconjugate Chemistry, 23(9), 2012, 1934-1944. DOI: 10.1021/bc300316p
3. M. Mitsuishi\*, S. Morita, T. Miyashita, K. Tawa, and J. Nishii, "Spontaneous Emission Control of CdSe/ZnS Nanoparticle Monolayer in Polymer Nanosheet Waveguide Assembled on a One-Dimensional Silver Grating Surface", Langmuir, 28, 2012, 2313-2317. DOI: DOI: 10.1021/la2042229
4. Keiko Tawa\*, Susumu Haruta, Tetsuo Okutsu, and Junji Nishii, "Photochemically Induced Crystallization of Proteins Accelerated on Two-Dimensional Gold Gratings", Japanese journal of applied physics, 51, 2012, 06FK09. DOI: DOI: 10.1143/JJAP.51.06FK09
5. Chikara Yasui, Keiko Tawa\*, Chie Hosokawa, Junji Nishii, Hiroyuki Aota, and Akira

- Matsumoto, "Sensitive Fluorescence Microscopy of Neurons Cultured on a Plasmonic Chip", Japanese journal of applied physics, 51, 2012, 06FK10.  
DOI: DOI: 10.1143/JJAP.51.06FK10
6. Keiko Tawa\*, Xiaoqiang Cui, Kenji Kintaka, Junji Nishii, Kenichi Morigaki "Sensitive bioimaging in microfluidic channels on the plasmonic substrate: Application of an enhanced fluorescence based on the reverse coupling mode", J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 221, 2011, 261-267.  
DOI: 10.1016/j.jphotochem.2011.04.012
  7. Keiko Tawa\*, Yoshiki Yokota, Kenji Kintaka, Junji Nishii, Takahiko Nakaoki, "An application of a plasmonic chip with enhanced fluorescence to a simple biosensor with extended dynamic range", Sensors and Actuators B: Chemical, 157, 2011, 703-709.  
DOI: 10.1016/j.snb.2011.04.086
  8. K. Tawa\*, T. Hattori, M. Umetsu, and I. Kumagai, "Zinc Oxide-Coated Plasmonic Chip Modified with a Bispecific Antibody for Sensitive Detection of a Fluorescent Labeled-Antigen", Analytical Chemistry, 83, 2011, 5944-5948.  
DOI: 10.1021/ac200898e
  9. Keiko Tawa\*, Xiaoqiang Cui, Kenji Kintaka, Junji Nishii, Kenichi Morigaki, "Sensitive bioimaging in microfluidic channels on the plasmonic substrate: Application of an enhanced fluorescence based on the reverse coupling mode", Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 221, 2011, 261-267.  
DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.07.038
  10. Takanari Togashi, Nozomi Yokoo, Mitsuo Umetsu, Satoshi Ohara, Takashi, Naka, Seiichi Takami, Hiroya Abe, Izumi Kumagai, and Tadafumi Adschiri "Material-binding peptide application -ZnO crystal structure control by means of a ZnO-binding peptide-", Journal of Bioscience and Bioengineering, 111, 2011, 140-145.  
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2010.09.013
  11. Mitsuo Umetsu, Takeshi Nakanishi, Ryutaro Asano, Takamitsu Hattori, and Izumi Kumagai, "Protein-protein interactions and selection: generation of molecule-binding proteins on the basis of tertiary structural information", FEBS Journal, 277, 2010, 2006-2014.  
DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07627.x
  12. Hironobu Hori, Keiko Tawa, Kenji Kintaka, Junji Nishii, Yoshiro Tatsu "Surface profile dependence of the photon coupling efficiency and enhanced fluorescence in the grating-coupled surface plasmon resonance", J. Appl. Phys., 107, 2010, 114702.  
DOI: 10.1063/1.3408446
  13. K. Tawa\* and K. Morigaki\* "In-situ parallel imaging of micropatterned phospholipid membranes by surface plasmon microscopy and surface plasmon fluorescence microscopy", Colloids and Surfaces B: Biointerface, 81, 2010, 447-451.  
DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.07.038
- [学会発表] (計 95 件)
1. 田和圭子, "Application of a Plasmonic Chip to Biosensor", ISNM2012, 2012/11/29, くにびきメッセ, 島根 (招待講演)
  2. 田和圭子, 笹川知里, 梅津光央, 中澤光, 熊谷泉, "Application of the ZnO-coated plasmonic chip immobilized with anti-ZnO antibody to biosensing", MNC2012, 2012/10/31, メリケンパークホテル, 神戸
  3. 佐藤茉莉, 田和圭子, 上垣浩一, 原とも子, 梅津光央, 中澤光, 熊谷泉, 青田浩幸, 小島正己 "Rapid and sensitive BDNF detection with zinc oxide coating plasmonic chip", MNC2012, 2012/10/31, メリケンパークホテル, 神戸
  4. 田和圭子 "Application of a Plasmonic chip to Biosensing and Bioimaging", ANNA- AIST International Seminar on Applications of Light and International Seminar, 2012/10/17, 千里ライフサイエンスセンター, 大阪 (招待講演)
  5. Mitsuo Umetsu, "Smart protein design for interface molecules in nano world", 2012 Northeastern Asian Symposium (北東アジアシンポジウム), 2012/09/20, 仙台 (招待講演)
  6. 田和圭子, "Sensitive Bio-Marker Detection with a Plasmonic Chip" ISSS-6, 2011/12/13, 船堀タワー, 東京 (招待講演)
  7. 田和圭子, "Sensitive Bio-Marker Detection on a Plasmonic Chip", WINPTech (@Kobe university), 2011/12/01, 神戸大学, 兵庫 (招待講演)
  8. 田和圭子, "Bio-Marker Detection with an Enhanced Fluorescence on a Plasmonic Chip", ICTF-15, 2011/11/11, 京都テルサ, 京都 (招待講演)
  9. 田和圭子, 梅津光央, 熊谷泉, "Sensitive Detection of a Tumor Marker with Bispecific Antibody Immobilized on the ZnO-Coated Plasmonic Chip" ICTF-15, 2011/11/09, 京都テルサ, 京都
  10. 田和圭子, 梅津光央, 熊谷泉, "酸化亜鉛コーティングプラズモニックチップを用いた高感度腫瘍マーカー計測", ソフトインターフェースの分子科学, 2011/11/04, パレプラン高志会館, 富山

11. 田和圭子、梅津光央、熊谷泉，“700fM-Tumor-Marker Detection with bispecific antibody immobilized on the ZnO-coated Plasmonic Chip” NNT2011, 2011/10/21, 济州島 (韓国)
  12. Mitsuo Umetsu, Takamitsu Hattori, Takanari Togashi, Tadafumi Adschiri, Izumi Kumagai, “Antibody Engineering as an Interface Molecule for Inorganic Nano-materials”, MRS workshop: Directed Self-Assembly of Materials Workshop, 2011/09/29, Nashville (USA)
  13. 田和圭子、梅津光央、熊谷泉，“酸化亜鉛コーティングプラズモニックチップを用いた高感度マーカー計測”，高分子討論会, 2011/09/29, 岡山大学, 岡山
  14. Mitsuo Umetsu and Izumi Kumagai, “Peptide and Antibody Engineering as Interface Molecules in nano world”, NanoBio Europe 2011, 2011/06/21, Cork (Ireland) (招待講演)
  15. 田和圭子、梅津光央、熊谷泉，“二重特異性抗体と酸化亜鉛コーティングプラズモニックチップを用いた高感度腫瘍マーカー計測”，高分子学会年次大会, 2011/05/26, 大阪国際会議場, 大阪
  16. 田和圭子 “Rapid and Sensitive Detection of Bio-Markers on the Plasmonic Chip”, IUPAC2011 国際分析科学会議 (ICAS2011), 2011/05/24, 京都国際会館, 京都 (招待講演)
  17. 田和圭子、梅津光央、服部峰充、熊谷泉，“ZnO-Coated Plasmonic Chip for Rapid and Sensitive Detection of an Antigen with a Bispecific Antibody”, The 5th international conference on surface plasmon photonics (SPP5), 2011/05/17, 釜山 (韓国)
  18. Keiko Tawa, Mitsuo Umetsu, Takamitsu Hattori, Izumi Kumagai, “Sensitive and rapid detection of antigens on the plasmonic substrate with bispecific antibodies against antigen and ZnO surface”, 20th MRS-Japan Academic Symposium, 2010/12/22, Yokohama, Japan (招待講演)
  19. Keiko Tawa, Mitsuo Umetsu, Takamitsu Hattori, Izumi Kumagai, “10pM-antigen detection on the plasmonic substrate with bispecific antibodies against antigen and ZnO surface”, Pacificchem 2010, 2010/12/16, Honolulu, Hawaii, USA (招待講演)
  20. 田和圭子，“プラズモニックチップ上の増強蛍光を利用した高感度バイオセンシング”，日本分光学会高感度表面・界面部会第3回シンポジウム, 2010/12/02, つくば (招待講演)
  21. 田和圭子、梅津光央、服部峰充、熊谷泉，“プラズモニック基板上での ZnO x GFP 結合二重特異性抗体による GFP の高感度検出”，高分子討論会, 2010/09/16, 札幌
  22. 横田佳樹、田和圭子、西井準治、中沖隆彦，“格子結合型 SPR による増強蛍光センシングバイオチップ 3 - 高感度検出と非特異吸着抑制効果の評価 -”，高分子討論会, 2010/09/15, 札幌
  23. 田和圭子、梅津光央，“東北大-産総研の連携 IP インテグレーションによる高感度バイオセンシング技術の開発”，東北大学/産総研連携公開講演会, 2010/07/28, 東京 (招待講演)
  24. 田和圭子，“表面プラズモン共鳴励起増強蛍光によるバイオセンシング”，10-1 高分子基礎物性研究会, 2010/06/24, 大阪 (招待講演)
  25. Keiko Tawa, Xiaoqiang Cui, Kenji Kintaka, Junji Nishii, “Sensitive Fluorescence Microscopic Imaging with Plasmonic Substrate”, The international conference on nanophotonics 2010, 2010/06/01, Tsukuba, Japan
  26. 田和圭子、Cui Xiaoqiang、西井準治，“格子結合型 SPR による増強蛍光センシングバイオチップ 2”，高分子年次大会, 2010/05/27, 横浜
  27. 横田佳樹、田和圭子、中沖隆彦、西井準治，“格子結合型 SPR による増強蛍光センシングバイオチップ 1” 高分子年次大会, 2010/05/27, 横浜
  28. Keiko Tawa, Junji Nishii, “100 Times-Enhanced Fluorescence Detected on a Metal-coated Grating Biochip”, 7th International Conference on Optics-Photonics Design & Fabrication (ODF'10), 2010/04/20, Yokohama, Japan
- [図書] (計1件)
1. 田和圭子, シーエムシー出版, 「プラズモンナノ材料開発の最前線と応用」(第II編 第7章 格子結合型表面プラズモン励起増強蛍光 (GC-SPF) 法を用いた生体分子検出), 2013, 166-173
- [産業財産権]
- 出願状況 (計1件)
- 名称: 周期構造を有するマイクロプレート及びその製造方法  
 発明者: 田和圭子  
 権利者: 産業技術総合研究所  
 種類: 特許  
 番号: 特願2010-097110  
 出願年月日: 2010/04/20  
 国内外の別: 国内
6. 研究組織  
 (1) 研究代表者  
 田和圭子 (TAWA KEIKO)

産業技術総合研究所・健康工学研究部門・  
主任研究員  
研究者番号：80344109

(2) 研究分担者

梅津光央 (UMETSU MITSUO)  
東北大学・工学研究科・准教授  
研究者番号：70333846