

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 4 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26286035

研究課題名(和文) ナノ構造物のフォノン輸送を用いた革新的バイオセンサーの創成

研究課題名(英文) Development of innovative biosensors using phonon transport in nanostructures

研究代表者

平尾 雅彦 (Hirao, Masahiko)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：80112027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：ガラス基板上に電子線リソグラフィにより作成したナノ構造体に対し、フェムト秒レーザーによって超高周波のフォノンを励起し、伝播したフォノンを用いた別フェムト秒パルスレーザーによって受信するシステムを構築した。構造体として、ナノ薄膜、ナノワイヤ、ナノプレート等を作成した。また数マイクロメートルピッチにおいて、励起したフォノンを検出することのできる顕微鏡システムを確立し、ナノ構造体におけるフォノン輸送現象を捉えることに成功した。さらに、このシステムを用いて、抗原抗体反応をリアルタイムにモニタリングすることのできる新たなバイオセンサーの概念を構築した。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in developing the measurement system for monitoring the phonon-transport process in nanostructures, such as ultra-thin films, nanowires, and nanoplates, using the pump-probe technique with the femtosecond pulse lasers. We then incorporated this system into a microscopic system for achieving the phonon measurements at a localized region. We further applied this system as a multichannel biosensor for monitoring antigen-antibody binding reactions.

研究分野：材料力学

キーワード：フォノン バイオセンサー

### 1. 研究開始当初の背景

バイオセンサーは、血清中の特定のタンパク質の検出やタンパク質間の相互作用を評価することができるため、疾患診断や創薬における貢献が期待されている。標的物質に対する薬剤候補物質の親和性が高くなければ治療効果は望めないため、創薬においては生体分子間の親和性を評価することが重要であり、これには、生体分子間反応をリアルタイムにモニタリングする必要がある。一般にバイオセンサーの応答量の時間変化率が親和性を表すために、リアルタイムに計測することにより親和性の評価が可能となる。

これまでも様々な原理のバイオセンサーが提案されてきたが、タンパク質に標識(目印)を付加する手法がほとんどであり、このためには、標的を捕捉した後にも、標識を付加した検出抗体を反応させ、さらに、標識を検出するための試薬を添加・反応させる必要があり、非常に多くの反応過程と洗浄過程が含まれることになり、計測時間が大幅に増加してしまうという問題があった。したがって、リアルタイムにタンパク質間の相互作用を計測することができ、かつ、標識を用いることのないバイオセンサーが望まれている。

代表的な無標識バイオセンサーには、表面プラズモン共鳴バイオセンサーと水晶振動子バイオセンサーが存在する。前者は光のエバネッセント場を用いるため、大きな生体物質へのタンパク質の反応においては、反応場がエバネッセント場から出てしまい、検出が困難となるという欠点を有する。また、エバネッセント場に侵入する物質全てに応答してしまうため、相互作用しない物質に対する応答ノイズが問題となり、この除去は原理的に難しい。後者は、水晶振動子に吸着する生体分子を、質量付加として振動子の共振周波数の変化から検出する。大きな生体物質が固定化されていたとしても、そこへの質量付加として吸着物を検出することができるという利点を有する。定量性は表面プラズモン共鳴バイオセンサーよりも高く、振動子の薄型化(軽量化)による高感度化も可能である。しかし、大規模な多チャンネル化は容易ではなく、ハイスループットスクリーニングが要求される創薬分野においては対応が難しい。

以上より、診断・創薬イノベーションを実現するためには、

- (1) 高感度化が可能であり、極微量の診断マーカーを検出することができる、
- (2) 無標識計測が可能であり、正確な親和性を評価することができる、
- (3) 大規模な多チャンネル化が可能である、

という3課題を解決することのできる新しいバイオセンサーの出現が熱望されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、基板上に作製した多数のマイクロドットやドット結合するナノブリッジ内に超高周波フォノンを励起し、このフォノンが輸送される過程をモニタリングすることにより、タンパク質間の相互作用を評価するという、新しい無標識バイオセンサーの基礎概念を確立することを目的とする。レーザー光によりフォノンを励起・検出することができるため、数マイクロメートル程度の領域があれば計測可能であり、大規模多チャンネル化にも対応することができる。

### 3. 研究の方法

基板を透明な石英ガラスとし、ナノ構造体の材料として、生体物質に親和性の高い Au を用いる。Au 薄膜の密着性を上げるために、基板表面に最初、高温状況下において Cr を成膜し、その上に Au 薄膜を成膜する。Cr の厚さを数ナノメートルとし、Au の厚さを数十ナノメートルとする。成膜には RF マグネトロンスパッタリング法を用いた。そして、電子線リソグラフィにより、ナノプレートを作成した。1つのプレートの寸法は、厚さ約 30 ナノメートル、面内寸法が約 5 マイクロメートル角である。また、ナノワイヤーを伝播するフォノンモードを励起・検出するためのナノワイヤー試料も同様の手法により作成した。

フォノン計測を行うために、ファイバーレーザーを用いた光学系を開発した。

ファイバーレーザーの出力は赤外線であるが、第二次高調波発生結晶により可視光に変換した。その後、ダイクロイックミラーをもちいて赤外光を遮断した。この光源を半波長板に通過させ、その後、偏光ビームスプリッターによって P 偏光と S 偏光に分離した。本研究ではポンプ光として S 偏光、プローブ光として P 偏光を使用した。S 偏光成分はステッピングモータを内蔵するコーナリフレクターを介して音響光学変調器に入射して強度変調を与えた。これを通過した光にピンホールを用いて 1 次回折光を取り出し、対物レンズを介してナノ構造体へ照射した。フォノンを励起するためだけに使用するポンプ光はノイズの原因となりうるため、ナノ構造体から反射したポンプ光は、偏光フィルターによりカットした。

プローブ光についてはビームスプリッターを使用することで反射光をバランス検出器へ参照光として入射させた。透過光は PBS、対物レンズを通過した後、試料表面で反射した戻り光をバランス検出器へシグナル光として入射させた。そしてバランス検出器で検出した信号において 1MHz の成分のみを高速ロックインアンプによって取り出すことでポンプ光により励起した振動のみを得た。以上のような光路を組み、コーナリフレクターを動かすことによりポンプ光の光路をマイクロメートルオーダーで制御した。この時、試料表面において光路長の違いによりプロ

ーブ光はポンプ光に比べて到達時間が遅れる。この時間差は光路長差をレーザー光が通過する時間に等しく、ピコ秒オーダーの現象を計測することが可能となる。

バイオセンサー実験については、ナノ構造体上で抗原抗体反応のモニタリングを行なった。抗原抗体反応のモデルとして広く一般的に使用される免疫グロブリン G (Immunoglobulin G: IgG) を用いた。検体には rabbit-IgG (rIgG) を、受容体には抗 Anti-rIgG 抗体 (Goat) を使用し、ナノ構造体への固定化は特異結合によって行った。まず、受容体を基板に固定するため、UV クリーナーを用いてナノプレート表面の有機物を除去した。次に末端にチオール基 (-SH) とカルボキシル基をもつ自己組織化単分子膜を形成した。ここで自己組織化単分子膜末端のカルボキシル基とタンパク質末端のアミノ基は結合させる際、共存するだけでは反応が起こらないため、カルボキシル基を NHS と EDC を用いて活性化させることにより結合させた。その後、受容体と結合しなかった未反応のカルボキシル基と不純物が反応しないよう、牛血清アルブミンでブロッキングした。そして、検体溶液をフローしながら、1 つのナノ構造体上での抗原抗体反応の様子を、フォノン輸送現象からモニタリングした。

#### 4. 研究成果

総じて、ガラス基板上に電子線リフォグラフィにより作成したナノ構造体に対し、フェムト秒レーザーによって超高周波のフォノンを励起し、伝播したフォノンを別のフェムト秒パルスレーザーによって受信するシステムを構築した。構造体として、ナノ薄膜、ナノワイヤ、ナノプレート等を作成した。また数マイクロメートルピッチにおいて、励起したフォノンを検出することのできる顕微鏡システムを確立し、ナノ構造体におけるフォノン輸送現象を捉えることに成功した。さらに、このシステムを用いて、抗原抗体反応をリアルタイムにモニタリングすることのできる新たなバイオセンサーの概念を構築した。

バイオセンサー実験においての主な研究成果は以下のとおりである。フォノンのリアルタイムモニタリングを実現するにあたり、ナノ構造体センサーセルとポンプを使用したフローインジェクション実験系を構築した。このセンサーセルは 2 ピースのセンサーチップ固定用ケースとシリコンゴム 1 枚と締結用ボルト 4 本によって構成される。ケースのうち、一方はセンサーチップの型と溶液の流路を形成してある。この流路を通過する溶液はナノ構造体エリアに接触する。もう一方のケースはレーザー光のみを通す蓋となっている。シリコンゴムは溶液の漏えいを防止する目的で使用した。センサーセル使用時はセンサーチップを型にはめ込みシリコンゴムをケースの間に挟んだ後、蓋をボルトで

締め付けた。

多チャンネルにおいて計測することが可能であることを証明することにも成功した。例えば、標的タンパク質を rIgG (1 µg/ml) とし、レセプタタンパク質として、標的に結合することのできる抗 rIgG 抗体、黄色ブドウ球菌プロテイン A を選択し、また、標的と結合しないタンパク質として、抗ヒト IgG 抗体と牛血清アルブミンとし、これら 4 種類のレセプタを、それぞれ、異なるナノプレート上に固定化した。そして、検体溶液をフローし、各プレート上で起こる相互作用反応をモニタリングした。

rIgG に対して活性のある抗 rIgG 抗体のチャンネルと黄色ブドウ球菌プロテイン A のチャンネルにおいては、プレートで励起されたフォノンが、結合した標的タンパク質を介して溶液側へ輸送されるため、プレート温度が減少する様子が観測された。一方、標的と特異結合を示さない抗ヒト IgG 抗体のチャンネルとウシ血清アルブミンのチャンネルでは、プレートのフォノンの輸送が鈍く、プレート温度が急激に変化することはなかった。

また、理論計算法を開発し、超高速フォノン計測によるバイオセンシングがタンパク質の熱伝導率や分子量の影響を受けにくいこともわかった。

リアルタイムモニタリングにおいて、生体分子吸着前後の瞬間温度変化に対してナノプレートにパルス加熱与えた後の時間を調整することにより高感度化に貢献できる時間が存在することを見出した。

分子量の小さいバイオマーカーである前立腺特異抗原を用いたフローアッセイも行った結果、本研究において考案したフォノン計測法により検出可能であることがわかった。

さらに、ナノワイヤー内を輸送されるフォノンの検出にも成功した。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

荻 博次、極短光を用いた超高周波力学共振スペクトロスコーピー：ナノ材料の弾性定数計測および超高感度バイオセンサーへの応用、第 53 回光波センシング技術研究会講演会「光パルス技術と光波センシング」(2014 年 6 月 19 日(火) 於東京理科大学 森戸記念館)

岩上慈、荻博次、長久保白、中村暢伴、平尾雅彦、平松亮、小野輝男、ピコ秒フォノン計測によるマイクロドットを用いた大規模多チャンネルバイオセンサーの開発、第 75 回応用物理学会秋季学術講演会(平成 26 年 9 月 17 日(火) ~ 20 日(土))

於 北海道大学札幌キャンパス)  
荻 博次、音響バイオセンサーの最前線、  
化学とマイクロ・ナノシステム学会第 30  
回研究会 (CHEMINAS 30) (平成 26 年 10  
月 2 日 (木) ~ 3 日 (金) 於 北海道大  
学フロンティア応用科学研究棟 鈴木章  
ホール)

H. Ogi, S. Iwagami, H. Ishida, A.  
Nagakubo, and M. Hirao, Ultrafast Heat  
Transport Across Protein Layer: The  
Microdot Biosensor Array, The 15th  
International Conference on Phonon  
Scattering in Condensed Matter,  
Phonons 2015 (平成 27 年 7 月 12 日 (日)  
~ 17 日 (木) 於 the University of  
Nottingham, Nottingham, United  
Kingdom)

岩上慈、荻博次、長久保白、平尾雅彦、  
谷口卓也、小野輝男、タンパク質を横切  
るフォノン輸送を利用したマイクロドッ  
ト大規模多チャンネルバイオセンサー、  
第 76 回応用物理学会秋季学術講演会(平  
成 27 年 9 月 13 日 (日) ~ 16 日 (水) 於  
名古屋国際会議場)

岩上 慈, 荻 博次, 長久保 白, 平尾 雅  
彦, 谷口 卓也, 小野 輝男、タンパク質  
を介するフォノン輸送を利用したマイク  
ロドット大規模多チャンネルバイオセン  
サー、日本機械学会 熱工学カンファレン  
ス 2015 (平成 27 年 10 月 24 日 (土) ~  
25 日 (日) 於 大阪大学コンベンショ  
ンセンター

草部 浩一 (KUSAKABE, Koichi)  
大阪大学 大学院基礎工学研究科・准教授  
研究者番号: 10262164

(3) 連携研究者

小野 輝男 (ONO, Teruo)  
京都大学 化学研究所・教授  
研究者番号: 90296749

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
とくになし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平尾 雅彦 (HIRAO, Masahiko)  
大阪大学 大学院基礎工学研究科・教授  
研究者番号: 80112027

(2) 研究分担者

荻 博次 (OGI, Hirotugu)  
大阪大学 大学院基礎工学研究科・准教授  
研究者番号: 90252626

中村 暢伴 (NAKAMURA, Nobutomo)  
大阪大学 大学院基礎工学研究科・助教  
研究者番号: 50452404