

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月29日現在

機関番号：14301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23658202
 研究課題名（和文）テラヘルツ波を利用した高付加価値農産物創出のための機能性成分検査技術の開発
 研究課題名（英文）Development of functional ingredient inspection technique for production of high value-added agricultural products using terahertz wave
 研究代表者 近藤 直(Kondo Naoshi)
 京都大学大学院・農学研究科・教授
 研究者番号：20183353

研究成果の概要（和文）：

簡便に農産物中の機能性物質を検出できる技術の開発を目指し、テラヘルツ波による非標識検出法の開発を行った。機能性物質のビオチンを検出するために「金属メッシュ法」と「干渉法」の2つの方法を検討し、その結果、前者では0～1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、後者では0～8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のビオチンの定量可能性が認められた。さらに干渉法を用いて、ホウレンソウからの抽出液中のビオチン検出を行なったところ、夾雑物の影響で感度不足となったが、メンブレンフィルタの最適化による改善が考えられる。

研究成果の概要（英文）：

To realize technology of inspecting the functional ingredient in agricultural products, we demonstrated the unlabeled detecting method with terahertz waves. Two methods, the metallic mesh method and the interference method, were examined for detecting biotin molecular in solution. As a result, we could confirm a quantitative capability of biotin detection in the range of 0 to 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0 to 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. However, because of low sensitivity due to foreign substances, biotin in the extraction liquid from a spinach was not able to be detected using the interference method. From this experiment, it became clear that we should optimize a membrane filter to improve sensitivity.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業工学・農業情報工学

キーワード：バイオプロセッシング、機能性物質、テラヘルツ波、分光計測

1. 研究開始当初の背景

近年、食品や農産物中に含まれる体調調整機能を持った小分子が注目されている。栽培段階でこのような機能性物質の含有量を把握出来れば、栽培管理へのフィードバックが可能となり、高付加価値農産物の創出に繋がる。一般に、食品中の機能性物質の検査には、数 ng ～数 μg の精度が必要とされており、高感度の検査手法が必要とされている。生体中の目的物質を検出する方法には、抗体との結合能力を利用したイムノアッセイ法や、高

速液体クロマトグラフ法などがある。前者は、メンブレンフィルタ上のタンパク質と目的物質の結合を発色や蛍光標識用いて測定する方法であり、後者はカラムとの相互作用時間の違いを利用して目的物質を検出する方法である。共にこれらは数 ng/mL ～数十 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の感度を有するものの、煩雑な誘導体処理や標識化処理が必要となる事や、処理が面倒な廃液などが出るため、正しく利用するには専門的な知識を必要とする。

近年、テラヘルツ (THz) 帯の電磁波が持

つ適度な透過性と物質への吸収特性を利用した応用研究が進められている。我々は、この電磁波がメンブレンフィルタを透過できる事や金属でできた波長と同程度の構造をセンサにすると、タンパク質等の屈折率や吸収に応じてセンシングできる事を明らかにしてきた。そこで本研究では、非標識で農産物中の物質を高感度に検出できる技術を目指し、①金属周期構造体（金属メッシュ）をセンサにしたメンブレン上の微量物質検出、②干渉法を用いたホウレンソウ中のビオチン検出について実施した。

農産物中の機能性物質にはさまざまなものがあるが、ここでは特にビオチンと呼ばれる小分子に着目した研究を実施した。ビオチンは、ストレプトアビジンと強固に結合することが知られており、この特異的な結合を用いることで、我々が提案する手法を検証する事とした。

2. 研究の目的

本研究では、機能性物質の一つであるビオチンに着目し、金属メッシュ法および干渉法を用いたビオチンの特異的な検出の定量性について評価し、本計測手法の有効性と問題点について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

3.1 原理

3.1.1 金属メッシュセンサの原理

図1に金属メッシュの模式図を示す。金属メッシュは、金属の薄膜に周期的に開口を有した構造体であり、厚み (t)、グリッド間隔 (g)、開口幅 (a) によりバンドパス特性が変化する。使用した金属メッシュは、材料がニッケルで、各部のサイズは図のキャプションに示す通りである。右図の透過スペクトルに示すように、入射光の波長が g と等しい時、透過率は開口率 (58.2%) を上回って異常透過特性を示す。この現象の発生は、入射光と表面プラズモンとが共鳴するためと考えられている。このとき、金属メッシュ開口のエッジ部分で電界が局所的に高くなる。また、異

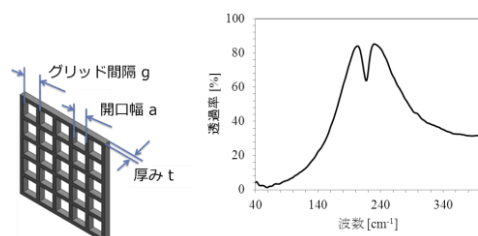


図1 金属メッシュの模式図 (左) と透過スペクトル ($t=20$, $g=76$, $a=56$ (μm)) (右)

常透過のピーク付近で透過率が急激に減少するディップ (谷) が見られる。ディップは、平行光束に対して金属メッシュを傾けた際

に観測されることが知られており、今回測定に使用した分光器がサンプルに対して集光光束になっているため、その斜入射成分によって透過スペクトルに現れていると考えられる。さらに、これらの特性は金属メッシュ上の屈折率の変化に応じて、低周波側へシフトするため、その変化量から定量評価が可能となる。

3.1.2 干渉法の原理

THz波がメンブレンフィルタを透過できることを利用し、目的物質の付着に伴うメンブレンフィルタの屈折率変化を干渉の光路長差の変化として検出する。そのため、図2に示すように、高抵抗シリコンと金属ミラーで挟む3層構造の測定システムを構築し、メンブレンフィルタの上下両面からの反射波の強度を高くし、これらの干渉を THz-TDS (テラヘルツ時間領域分光法) により取得する。

メンブレンフィルタは多孔質構造をしており、疎水性相互作用によりタンパク質が付着すると、メンブレンフィルタの屈折率が増加する。屈折率が増加すると光路長差が増加し、THz波パルスが検出器に届く時間が遅れ、時間波形がシフトし(図3(a))、フーリエ変換後の干渉波形にも変化が見られる(図3(b))。つまり、検出物質によるメンブレンフィルタの屈折率変化を干渉波形シフトとして検出することでターゲットを定量することができる。

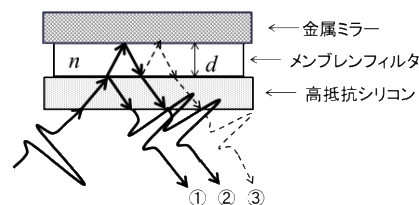


図2 干渉法の模式図。左から来た THz パルスが各界面で反射し、メンブレンフィルタの上下からの反射パルスで干渉する。

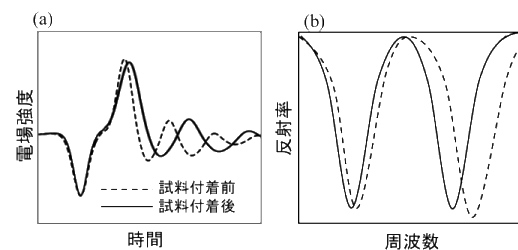


図3 (a) THz-TDS で測定した THz 電場パルス、(b) (a)をフーリエ変換して反射率に変換した様子

3.1.3 特異性を用いたターゲット定量法

分子の特異性を用いたターゲットの定量には、非競合法と競合法が知られている(図4)。一般的に前者はターゲットの分子量が1000以上の場合に、後者は1000未満の場合に用いられる。非競合法ではターゲットが結合タンパク質と反応することによる屈折率変化を検出するため、ターゲット溶液の濃度が増加するほど、基板へのターゲット付着量も増加し屈折率変化も増加する。一方競合法は、ターゲットを分子量の大きな物質の検出に置換して定量するため、ターゲット溶液の濃度が増加するにつれて、基板への結合タンパク質付着量が減少し、屈折率変化は減少する。

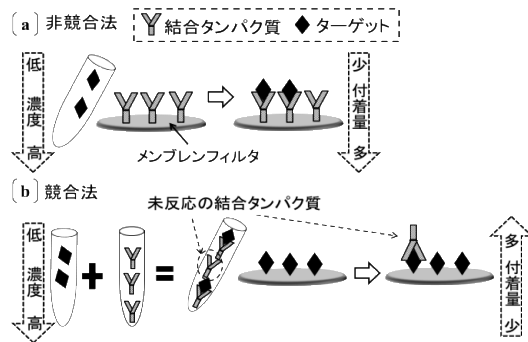


図4 非競合法(a)と競合法(b)の模式図

3. 2 実験方法

3.2.1 金属メッシュ法

本実験では、金属メッシュを用いたタンパク質の検出に阻害測定法を組み合わせ、小分子であるビオチンの定量評価を試みた。

メンブレンフィルタには、厚み=100 μm 、ポアサイズ= 0.45 μm のニトロセルロースメンブレンフィルタを用いた。このメンブレンを直径 13 mm に切り抜き、5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ のビオチン標識牛血清アルブミン(BSA)溶液を 30 μL 滴下し乾燥させた。その後、ブロッキングを行った後、TPBS 緩衝液及び蒸留水で洗浄を行った。乾いた濾紙に挟み 32°C で 1 時間乾燥させた後、ビオチン標識 BSA を塗布した時点で結合前の状態として透過測定を行った。続いて、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のストレプトアビジン溶液とビオチン溶液 (1.0, 0.5, 0.25, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 1 : 1 で混合したサンプル溶液が 1 mL 入ったビニルパック中で 1 時間半振とうし、競合法を使って測定用サンプルを作成した。

透過スペクトルの測定には日本分光社製の FARIS-1S を使い、20~400 cm^{-1} の領域において、周波数分解能 2 cm^{-1} 、積算回数 100 回で測定を行った。また、解析には透過スペクトルのディップ部分を使用した。各濃度において、ビオチン標識 BSA 塗布し、ブロッキング処理を行った後のピーク値とサンプル添加後のピーク値の差を算出しシフト量とし

た。

3.2.2 干渉法

ビオチンは小分子であることから、先と同様に競合法を採用した。ポアサイズ 0.45 μm 、タンパク質吸着能 1.25 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ の PVDF 製のメンブレンフィルタを直径 13 mm に切り抜き、メタノールで親水化処理を施した。ビオチンを直接メンブレンフィルタに吸着させることはできないため、ビオチン標識 BSA 溶液中でメンブレンフィルタを振盪しビオチンを固相化した。その後、非特異吸着を防ぐ目的でメンブレンフィルタをブロッキングし、緩衝液中で洗浄した。300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアビジン溶液と 5 段階に調製したビオチン溶液 0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を体積比 1 : 1 で混合し、ビオチンとアビジンを反応させた。また、ネガティブコントロールとして、ビオチンを含まない BSA 溶液を加えたサンプルを作成した。メンブレンフィルタを混合溶液 1 mL 中で 90 分間振盪し、未反応のアビジンをメンブレンフィルタ中のビオチンと反応させた。緩衝液及び蒸留水で洗浄後、30°C に設定したオーブンで乾燥させ、THz-TDS で干渉波形を得た。

干渉周期から求めたメンブレンフィルタの光路長差とデジタルノギスで測定した厚みを用いて、ビオチン 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を基準としたときの各濃度における屈折率の変化割合を調べた。更に干渉を用いない透過測定からメンブレンフィルタの屈折率を算出し、干渉法による結果と比較することで、干渉による検出感度増加の効果を確認した。再現性を確認するため、各メンブレンフィルタに対して 3 回測定を行い、その平均値を実測値とし、各濃度 5 枚のメンブレンフィルタを用意し、その平均値を評価に用いた。

また、農産物中では大部分のビオチンが高分子のタンパク質と結合した形態で存在することを考慮し、非競合法によるタンパク質結合型ビオチンの定量評価を行った。まず、タンパク質結合型ビオチンの定量可能性を明らかにするために夾雑物を含まない緩衝液(PBS, pH 7.2)中のビオチン標識 BSA の定量評価を行い、その後実際の夾雑物存在下の定量可能性を明らかにするために、ハウレンソウ抽出液中にタンパク質結合型ビオチンを加え、定量評価を行った。一方は溶媒が PBS のビオチン標識 BSA 溶液 0, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、他方は溶媒が抽出液の同濃度のビオチン標識 BSA 溶液 1 mL 中で振盪し、ビオチン標識 BSA をメンブレンフィルタ中のストレプトアビジンに反応させた。洗浄及び乾燥後、メンブレンフィルタの時間波形及び干渉波形を取得し、ビオチン標識 BSA 溶液 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を基準としたときの各濃度における屈折率の変化割合を調べた。再現性を確認する

ため、各メンブレンフィルタに対して3回測定を行い、その平均値を実測値とし、各濃度4枚のメンブレンフィルタを用意してその平均値を評価に用いた。

4. 研究成果

4.1 金属メッシュ法

図5に、透過スペクトルにおけるピークシフト量を示す。ビオチン溶液濃度の増加に伴うシフト量減少の関係が確認出来たため、阻害測定法を組み合わせることで、ビオチンのような小分子も金属メッシュを用いて非標識で検出出来ることが示された。この結果は、添加したビオチン濃度が0、0.25、0.5、1.0 $\mu\text{g/mL}$ に対して、それぞれ 226、170、113、0 ng/mm^2 と見積もることができた。

一方、サンプル間の誤差が大きいことが問題点として挙げられた。これはブロッキング状態や測定時の吸引具合、メンブレンフィルタ間のタンパク質吸着能の差異に起因すると考えられ、治具の改良やプロトコルの検討により改善可能となることが予想される。

4.2 干渉法

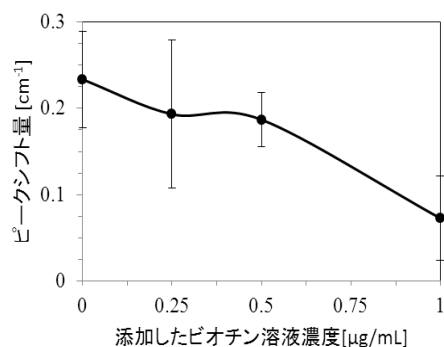


図5 ビオチン濃度によるシフト量の変化

図6に各濃度における屈折率の変化割合をとった結果を示す。0~8 $\mu\text{g/mL}$ において bi 溶液濃度の増加に伴う屈折率の変化割合低下の関係が確認できたことから、競合法を用いた本測定システムによるビオチンの定量可能性が示された。一方、透過測定ではこのような傾向を示さず、ほぼ一定であったことから、干渉による検出感度の増強が確認できた。しかし、ネガティブコントロールの BSA 溶液においても若干の屈折率変化 (干渉波形-BSA) が見られ、サンプル作製過程での非特異吸着の影響が考えられる。また、アビジンとビオチンの混合溶液において、これらの結合モル比は1:4であるため ($K_d = 10^{-13} \sim 10^{-15}$)、理論上 4.3 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度のビオチン溶液では、メンブレンフィルタに付着する未反応のアビジンは存在せず、屈折率変化は飽和すると考えられる。しかし、本実験では 6~8 $\mu\text{g/mL}$ のビオチン溶液においても屈折率の低下が観察された。これは、実際の反応では理

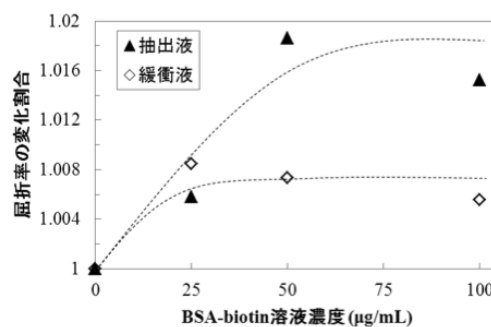


図6 干渉周期から見積られた屈折率変化の割合とビオチン濃度の関係

論よりもやや低い結合割合になったためと考えられる。

図7にタンパク質結合型ビオチンの定量評価の結果を示す。夾雑物の無い緩衝液では 25 $\mu\text{g/mL}$ 、夾雑物を含む抽出液では 50 $\mu\text{g/mL}$ から屈折率の変化割合が一定になる傾向が見られた。これはストレプトアビジンとビオチンの結合モル比は 1:4 から ($K_d = 10^{-13} \sim 10^{-15}$)、メンブレンフィルタに固相化されたストレプトアビジンに結合できる BSA-biotin は約 50 μg と見積もられ、50 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度の BSA-biotin 溶液では付着量が飽和するためと考えられる。よって、タンパク質結合型ビオチンを定量するためには、今回用いたメンブレンフィルタに代わる、より高いタンパク質結合能を持つ基板を用いる必要があることが明らかになった。一方、緩衝液と抽出液で飽和点異なる原因として、今回用いた BSA-biotin の結合モル比が 1:8~16 とばらつきが大きかったことや抽出液中の夾雑物の影響でビオチンとストレプトアビジンの結合能が低下したことが挙げられ、今後これらの影響について検討する必要がある。

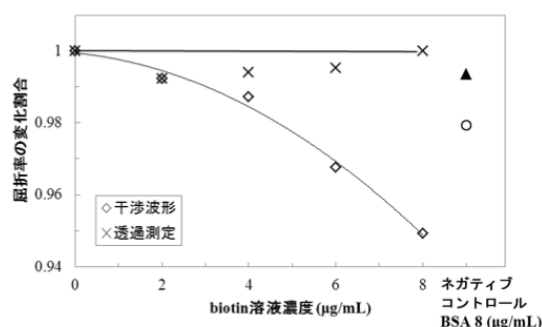


図7 ホウレンソウからの抽出液と夾雑のない緩衝液からのタンパク質結合型ビオチンの検出結果

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5件)

1. 平岡美智子, 小川雄一, 近藤直, 鈴木哲

仁, 近藤孝志, “金属メッシュを用いた小分子の非標識検出,” 第12回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会講演論文集, 査読無, 0698-0701 (2011)

2. 草深裕子, 鈴木哲仁, 小川雄一, 平岡美智子, 近藤直, 近藤孝志, 神波誠治, “金属メッシュを用いた微量物質検出における夾雑物の影響,” 第12回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会講演論文集, 査読無, 0704-0706 (2011)
3. 鈴木哲仁, 小川雄一, 近藤直, 近藤孝志, 神波誠治, “金属メッシュの透過スペクトルによるタンパク質アレイ測定,” 第12回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会講演論文集, 査読無, 0702-0703 (2011)
4. 草深裕子, 鈴木哲仁, 小川雄一, 平岡美智子, 近藤直, 近藤孝志, 神波誠治, “金属メッシュを用いた微量物質検出における夾雑物の影響,” 農業機械学会関西支部報, 査読無, 111, 73-74(2012).
5. 平岡美智子, 小川雄一, 近藤直, 鈴木哲仁, 草深裕子, “金属メッシュを用いた機能性物質の検出及び定量評価 -アビジン-ビオチン結合の検出-,” 農業機械学会関西支部報, 査読無, 111, 71-72(2012).

[学会発表] (計6件)

1. 平岡美智子, 小川雄一, 近藤直, 鈴木哲仁, 近藤孝志, “金属メッシュを用いた小分子の非標識検出,” 第12回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会, 京都大学, 2011/12/23
2. 草深裕子, 鈴木哲仁, 小川雄一, 平岡美智子, 近藤直, 近藤孝志, 神波誠治, “金属メッシュを用いた微量物質検出における夾雑物の影響,” 第12回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会, 京都大学, 2011/12/23
3. 鈴木哲仁, 小川雄一, 近藤直, 近藤孝志, 神波誠治, “金属メッシュの透過スペクトルによるタンパク質アレイ測定,” 第12回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会, 京都大学, 2011/12/23
4. 平岡美智子, 小川雄一, 近藤直, 鈴木哲仁, 草深裕子, “金属メッシュを用いた機能性物質の検出及び定量評価 -アビジン-

ン-ビオチン結合の検出-,” 農業機械学会関西支部例会第126回例会, 和歌山県田辺市ホテルハーヴェスト南紀田辺, 2011/09/16

5. 平岡美智子, 小川雄一, 鈴木哲仁, 近藤直, “テラヘルツ干渉システムによるビオチンの非標識検出,” 農業機械学会関西支部例会第128回例会, 鳥取大学, 2012/08/12
6. 平岡美智子, 小川雄一, 鈴木哲仁, 近藤直, “テラヘルツ波干渉法を用いた農産物中のビオチン検出に関する基礎研究,” 農業機械学会関西支部例会第129回例会, 神戸大学, 2013/03/12

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤 直 (KONDO NAOSHI)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 20183353

(2)研究分担者

小川雄一 (OGAWA YUICHI)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 20373285

(3)連携研究者

なし ()