

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550102

研究課題名(和文)色素-金属ナノ粒子共鳴現象を使用した超高感度ナノアレイセンサーの開発

研究課題名(英文)Development of Highly Sensitive Plasmonic Sensors

研究代表者

渡辺 茂(Watanabe, Shigeru)

高知大学・教育研究部総合科学系・教授

研究者番号：70253333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：新規な金ナノ粒子の設計・合成および修飾方法について検討し、プラズモニクセンサーへの応用を図った。また、高分子が自発的に形成する数nm～数十nmレベルの規則構造を“ナノ構造テンプレート”として、金ナノ粒子を簡便に自己組織化する方法を確立し、粒子表面で進行する分子認識現象をナノ粒子の光学特性変化を通じて検出する局在表面プラズモンセンサーを開発した。さらに、蛍光色素をナノ粒子の増強電場下に配置し、分子認識現象を表面増強蛍光を通じて検出するナノアレイセンサーを開発した。

研究成果の概要(英文)：Preparation and surface modification of gold nanoparticles has been studied to develop a plasmonic sensor. A facile 2D self-assembly method was developed for the preparation of gold nanoparticle array on substrates using block copolymer nanotemplates. Well-ordered gold nanoparticle array was applied to a local surface plasmon resonance (LSPR) sensor. We also have developed a novel sensor combined surface plasmon- and fluorescence spectroscopy. The gold nanoparticle array was formed on a SiO₂ layer containing fluorescence dyes. The resonant excitation of local surface plasmon resonance provides an enhanced intensity of fluorescence of dyes, which is directly translated to changes of fluorescence intensity measured upon the capture of target analyte at the surface of gold nanoparticles.

研究分野：ナノバイオテクノロジー

キーワード：金ナノ粒子 表面プラズモン 高分子ミセル 自己組織化 テンプレート

1. 研究開始当初の背景

細胞アレイや DAN アレイなどアレイセンサーの発展はめざましく、ターゲットの多様化に加え、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高密度・多機能なアレイセンサーの開発が求められている。しかし、ナノスケールのアレイセンサーの作製には、高額な装置を必要とするなど、ナノアレイセンサーを手軽に作製・活用できる状況にはない。これまでに研究代表者は新規な金ナノ粒子の合成法について検討するとともに、高分子ミセルが自発的に形成する二次元六方最密充填構造に着目し、これを“自己組織化ナノ構造テンプレート”として金ナノ粒子を配列させる“ミセルテンプレート法”を開発し、簡便にナノ粒子アレイを作製する方法について検討してきた。これをナノ粒子のみならず分子にも適用できれば、有機/無機複合ナノアレイの作製が可能となり、新たなナノアレイセンサーとしての応用が期待できる。

2. 研究の目的

新規な金ナノ粒子の設計・合成および修飾方法について検討し、プラズモニクセンサーへの応用を図る。またポリマーが自己組織化する数 nm ~ 数十 nm レベルの規則構造を“ナノ構造テンプレート”として、色素や金ナノ粒子を簡単な操作でナノパターンニングする集積化技術を開発する。さらに、金属ナノ粒子の局所電場に着目し、色素-プラズモン間に働く表面増強効果を利用した“ナノアレイセンサー”を開発する。

3. 研究の方法

(1) 金ナノ粒子の設計・合成

ミセルテンプレート法に適した金ナノ粒子を設計し、その合成方法を検討した。また、粒子表面に各種生体分子を担持させる修飾条件について最適化した。

(2) 金ナノ粒子の機能評価

標的分子との結合(分子認識現象)をトリガーにナノ粒子の環境変化(屈折率変化)を誘起し、ナノ粒子の光学特性変化を通じて標的分子を検出するセンシング原理について検証した。

(3) ミセルテンプレートの作製

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共重合体(PS_m-b-P4VP_n)のミセル溶液を調製した後、その溶液を基板上にスピコートし、自己組織化膜を作製した。

(4) 有機/無機複合ナノアレイの作製

ガラス基板上に蛍光色素を含むシリカ層(発光層)を形成した後、シリカ層を積層させた。続いてミセルテンプレートを用いて金ナノ粒子を規則正しく配列させ、有機/無機複合ナノアレイを作製した。

(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ー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)吸収スペクトルおよび発光層の蛍光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) ミセルテンプレート法では、正電荷を帯びた高分子ミセル上に静電引力を介して、負電荷を帯びた金ナノ粒子を組織化する。一般的な金ナノ粒子の合成法(クエン酸還元法)に加え、独自に開発したチオグルコース還元法を用いて、単分散な金ナノ粒子が得られるように合成条件を最適化した。

チオグルコース還元金ナノ粒子は、その表面に反応活性なカルボキシル基(-COOH)を有しており、共有結合を介した生体分子の修飾およびミセルテンプレートへの固定化が期待できる。そこで、スクシンイミド法を用いて、カルボキシル基を活性エステルへと変換した後、アミノカップリング法を用いてラクトフェリンなど生体高分子を粒子表面に固定化した。

(2) 粒子表面に担持させた生体分子は、構造変化にともない、その生体機能を失うことが多い。そこで、生体分子修飾金ナノ粒子を標的分子と混合した後、誘起される金ナノ粒子のスペクトル変化を観察することで、生体機能の保持および標的分子の分光センシングの可能性について検討した。

ラクトフェリン(Lf)は、牛乳から赤色タンパク質として発見された鉄結合性糖タンパク質であり、高マンノースタイプやハイブリッドタイプの糖鎖が結合している。Lf修飾金ナノ粒子にマンノースと特異的に結合する糖鎖結合タンパク質(“コンカナバリンA”)を添加すると溶液の色が赤色から赤紫色へと変化し、散乱光強度が増加することがわかった。これは粒子表面に固定化されたLfの糖鎖とコンカナバリンAが結合することで金ナノ粒子がクロスリンクされ、凝集体を形成することで見かけの粒径が増大し、散乱光強度が増したと考えられる。また、近接した金ナノ粒子間のプラズモンカップリングによって、金ナノ粒子のプラズモンバンドが長波長シフトしたと考えられる。これは、粒子表面に固定化されたLfの生体機能が保持されていることを示すとともに、糖鎖-タンパク質間の相互作用を金ナノ粒子のスペクトル変化を介してセンシングできることを示している。さらに、粒子表面に担持させる生体分子を変えることで、レクチン以外のタンパク質の検出にも利用可能であり、多種多様な生体分子を標的とした高感度なプラズモニクセンサーへの応用が期待できる。

(3) これまでに開発した高分子ミセル (PS_n - b - $P4VP_n$; $m = 50000$, $n = 1300$) のナノ構造テンプレートは、最大 50 nm 程度の構造周期を有しており、物理的に粒径が 50 nm 以下の金ナノ粒子しか組織することが出来ない。しかし、粒径が大きくなる程、粒子間に作用する凝集力は増大し、テンプレート効果は失われてしまう。従って、実際に組織化できる金ナノ粒子の粒径は、最大 20 nm 程度であった。そこで、より重合度の大きなブロック共重合体 ($m = 75000$, $n = 25000$) を用いて、構造周期を増大させることを試みた。しかし、分子量が大きくなると溶媒アニーリングが機能せず、規則性に優れたミセルテンプレートを作製することができなかった。また、先に開発したチオグルコース還元法では、粒径が 20 nm 以下の単分散な金ナノ粒子を合成することが難しく、チオグルコース還元金ナノ粒子を活用するミセルテンプレートの開発は今後の課題として残された。

(4) ガラス基板上にローダミン B ヘキシルエステルとポリシラザンのキシレン溶液をスピコートした後、加熱処理することによって、ローダミン B を含むシリカ層(発光層)を作製した。次に、スピコートの回転数を変えながら色素を含まないポリシラザンを同様に処理し、膜厚の異なるシリカ層(中間層)を形成した。その上に両親媒性ブロック共重合体 (PS_{50000} - b - $P4VP_{13000}$) の自己組織化膜を作製し、金ナノ粒子(粒径 16 nm)を基板上に規則正しく配列させた(図 1)。

中間層の膜厚が異なる有機/無機複合ナノアレイの発光スペクトルを観察した。発光層の発光スペクトルは、金ナノ粒子アレイを積層させることで、発光強度が著しく減少(-24%)することがわかった。しかし、中間層の膜厚が増加し、発光層と金ナノ粒子アレイ間の距離が大きくなるに従って蛍光強度は増加し、膜厚が 60 nm のとき、本来の発光スペクトルが観察されるようになった。さらに中間層の膜厚を増加させると、大変興味深いことに発光強度も増大し、膜厚が 65 nm のとき、最大値(+12%)に到達し、“表面プラズモン励起増強蛍光”が観察された。さらに中間層の膜厚を大きくすると、蛍光強度は減少し、膜厚が 95 nm のとき、増強効果は観察されなくなった。

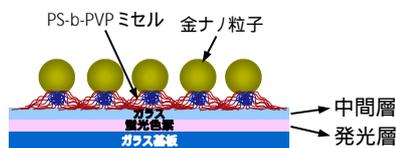


図 1. 有機/無機複合ナノアレイの模式図

(5) 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-(OCH_2CH_2) $_3NH_2$)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、 $H(OCH_2CH_2)_3NH_2$ (TEGMA)を用いて未反応の活性化エステル部位をブロッキングした。

ビオチンを固定化した金ナノ粒子アレイを HEPES 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。このようなスペクトル変化は、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ことから、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。

一方、発光層の蛍光スペクトルにも興味深いスペクトル変化が観察され、ストレプトアビジンの濃度が増すにつれて蛍光強度が減少した(図 2)。以上の結果は、ストレプトアビジン-ビオチン間の結合によって引き起こされた金ナノ粒子近傍の屈折率変化が、金ナノ粒子自身の光学特性変化を誘起させるとともに、その局所電場の影響下にある色素の蛍光特性にも影響を及ぼすことがわかった。つまり LSPR センサーとして生体情報を金ナノ粒子の吸収スペクトル変化のみならず、表面増強蛍光効果を利用すれば、色素の蛍光スペクトル変化としてもセンシングできることがわかった。

添加したストレプトアビジンの濃度と LSPR スペクトルや蛍光スペクトルの相対強度変化をプロットした。これらのデータを Langmuir および Langmuir-Freundlich の吸着等温式にフィッティングしたところ、いずれの場合も Langmuir-Freundlich の吸着等温式によりよくフィットすることがわかった。

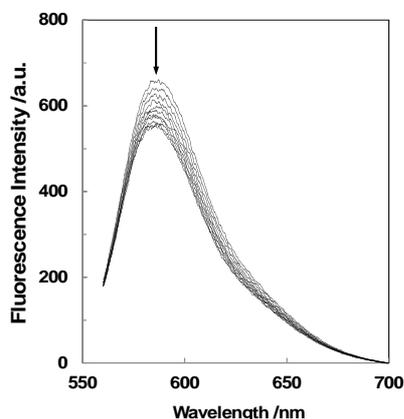


図 2. ストレプトアビジンの蛍光スペクトル検出実験

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1件)

1. 藤本 彩, 清岡千尋, 波多野慎悟, 渡辺 茂, レクチン修飾金ナノ粒子を利用した糖タンパク質“ラクトフェリン”の凝集比色・光散乱分光分析, 分析化学, 印刷中 (2015)

〔学会発表〕(計22件)

国際会議

1. Hadano, S., Shimomoto, H., Matsuo, A., Watanabe, S., Komura, M., Iyoda, T., Tethering Effect on Thermal Properties of Poly(ethylene oxide) in Microphase-Separated Liquid Crystalline Amphiphilic Triblock Copolymer, The 10th SPSJ International Polymer Conference (IPC2014), Tsukuba (2014/12/2-5).
2. (Invitation) Watanabe, S., Sensitive and Selective Optical Nanosensors Based on Gold Nanoparticles, 1st Asian Symposium on Analytical Sciences, Hiroshima (2014/9/17-19)
3. Watanabe, S., Takemura, K., Template-Directed Self-Assembly of Gold Nanoparticle Arrays for Local Surface Plasmon Resonance Sensors, GOLD 2012, Tokyo (2012/9/5-8)
4. Iwaizako, T., Hadano, S., Watanabe, S., Fabrication of Ordered Arrays of Gold Nanoparticles Using Self-Assembled Nanostructure of Diblock Copolymer Micelles and Their Application to Biosensors, The 9th SPSJ International Polymer Conference (IPC2012), Kobe (2012/12/11-14)
5. Hadano, S., Watanabe, S., Komura, M., Iyoda, T., Zhang, F., Yang, W., Synthesis and Microphase Separation Structure of ABA-type Amphiphilic Triblock Copolymer Having a Liquid Crystalline Mesogene Pendant Group in the Monomer Unit of A-block, The 9th SPSJ International Polymer Conference (IPC2012), Kobe (2012/12/11-14)

国内会議

6. 清岡千尋, 三根滉平, 友成はるな, 波多野慎悟, 渡辺 茂, 生体分子修飾ナノ粒子を利用したバイオセンサーの開発, 第8回バイオ関連化学シンポジウム, 岡山 (2014/9/11-13)
7. 波多野慎悟, 下元彬裕, 松尾綾乃, 渡辺 茂, 小村元憲, 彌田智一, 側鎖液晶型両親媒性トリブロックコポリマー中のポリエチレンオキシドの熱物性, 第63回高分子討論会, 長崎 (2014/9/24-26)
8. 清岡千尋, 三根滉平, 友成はるな, 波多野慎悟, 渡辺 茂, 金ナノ粒子の凝集色調変化を利用した細菌検出薬の開発, 2014年色材研究発表会, 名古屋 (2014/10/23-24)
9. 長谷川愛佑美, 松下 萌, 波多野慎悟, 渡辺 茂, ブロックコポリマーテンプレートを用いた金ナノ粒子オリゴマーアレイの作製, 第29回高分子学会中国四国支部高分子若手研究会, 高松 (2014/10/30-31)
10. 清岡千尋, 三根滉平, 友成はるな, 波多野慎悟, 渡辺 茂, ラクトフェリン修飾金ナノ粒子を利用したバイオセンサーの開発, 2014年日本化学会中国四国支部大会, 山口 (2014/11/8-9)
11. 清岡千尋, 波多野慎悟, 渡辺 茂, 糖タンパク質修飾金ナノ粒子を用いた糖鎖-タンパク質相互作用の分光分析, 日本化学会第93春季年

会, 滋賀 (2013/3/22-25)

12. 祝迫 佑, 波多野慎悟, 渡辺 茂, 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93春季年会, 滋賀 (2013/3/22-25)
13. 波多野慎悟, 渡辺 茂, 小村元憲, 彌田智一, 側鎖液晶型両親媒性トリブロックコポリマーのミクロ相分離構造中における液晶性ポリメタクリレートおよびポリエチレンオキシドの熱物性, 第62回高分子学会年次会, 京都 (2013/5/29-31).
14. 清岡千尋, 波多野慎悟, 渡辺 茂, 糖鎖修飾金ナノ粒子を用いた糖鎖-タンパク質相互作用の高感度分光分析, 2013年光化学討論会, 愛媛 (2013/9/11-13)
15. 清岡千尋, 波多野慎悟, 渡辺 茂, 糖タンパク質ラクトフェリン修飾金ナノ粒子を利用したレクチンの凝集比色・光散乱検出, 第64回コロイドおよび界面化学討論会, 愛知 (2013/9/18-20)
16. 清岡千尋, 波多野慎悟, 渡辺 茂, 金ナノ粒子を利用した糖タンパク質-レクチン相互作用の分光分析, 第7回バイオ関連化学シンポジウム, 愛知 (2013/9/27-29)
17. (招待講演) 渡辺 茂, シンプルで汎用性に優れたナノバイオセンシングをめざして, 第22回ポリマー材料フォーラム, 東京 (2013/11/28-29)
18. 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, 横浜 (2012/3/25-28)
19. 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合成, 日本化学会第92春季年会, 横浜 (2012/3/25-28)
20. 竹村晃一, 祝迫 佑, 波多野慎悟, 渡辺 茂, 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アレイの作製とプラズモンセンサーへの応用, 日本分析化学会第61年会, 金沢 (2012/9/19-21)
21. 波多野慎悟, 渡辺 茂, 半田浩卯, 長井圭治, 彌田智一, Li Zingze, ブロックコポリマーテンプレート法で作製した金ナノ粒子アレイの表面増強ラマン効果と分子センシングへの応用, 第61回高分子討論会, 名古屋 (2012/9/19-21)
22. 清岡千尋, 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な凝集比色・光散乱検出, 西日本大会, 佐賀 (2012/11/10-11)

〔図書〕(計3件)

1. 渡辺 茂, バイオセンシング用金ナノ粒子の開発 - 何でも固定化金ナノ粒子をめざして -, バイオセンサの先端科学技術と新製品への応用開, 技術情報協会, 204-212 (2014)
2. 渡辺 茂, 自己組織化材料を利用したナノ集積化, 微細構造制御, 精密加工と微細構造の形成技術, 技術情報協会, 377-384 (2013)
3. 渡辺 茂, 各種生体分子の固定化に適した糖還元金ナノ粒子, ケミカルエンジニアリング, 57, 63-69 (2012)

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・教授
研究者番号: 70253333