

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01847

研究課題名(和文) 表面増強ラマン分光を用いた次世代DNAシーケンシング基盤技術

研究課題名(英文) Next generation DNA sequencing using surface-enhanced Raman spectroscopy

研究代表者

菅野 公二 (Sugano, Koji)

神戸大学・工学研究科・准教授

研究者番号：20372568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、金ナノ粒子二量体を用いた表面増強ラマン分光(SERS：surface-enhanced Raman spectroscopy)によるDNAオリゴマーの検出と1塩基同定について報告した。二量体構造は、ナノトレンチを用いたセルフアセンブルプロセスにより作製された。1つのアデニン(その他シトシン)を有する8鎖長DNAオリゴマーに由来するラマンスペクトルが得られ、単一の金ナノ粒子二量体からは単一のDNAオリゴマーのみが検出されると考えられるため、単一のアデニンを検出したと考えられる。また、シトシンピークのないアデニンピークのみが観察され、単一DNA塩基の空間分解能の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

表面増強ラマン分光(SERS：Surface Enhanced Raman Spectroscopy)の高い分子構造同定能力と高い感度を利用した新規なDNAシーケンシングのために、1塩基検出が可能なSERS計測技術を構築した。これによりSERSにおけるナノギャップの光電磁場増強効果の理解が進めるとともに、DNA計測のための基盤技術を構築した。この技術はDNAシーケンシングへ期待できるとともに様々な1分子計測基盤技術としての波及効果をもたらす。

研究成果の概要(英文)：This study reports the detection and the identification of a single base from a single DNA oligomer by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) using a gold nanoparticle dimer. The gold nanoparticle dimer structure was fabricated by a self-assembling process using a nanotrench. A Raman spectrum derived from an 8-chain DNA oligomer with one adenine and seven cytosines was obtained. It was confirmed that a single DNA oligomer was detected from a single gold nanoparticle dimer. It indicates that a single adenine was detected. In addition, only the adenine peak without the cytosine peak was observed, indicating the possibility of spatial resolution with a single DNA base.

研究分野：ナノ・マイクロ科学

キーワード：表面増強ラマン分光法 1分子計測 金ナノ粒子 プラズモニクス セルフアセンブル

1. 研究開始当初の背景

デオキシリボ核酸 (DNA : deoxyribonucleic acid) シーケンシング技術は、個人に合わせた薬物治療及び生命現象の解明に向けて大きな役割を担っている。癌は、DNA 塩基のメチル化など遺伝子欠陥によって誘発されることが知られている。したがって、DNA の塩基配列およびメチル化など異常修飾の同定は、個人医療や遺伝病早期発見などのために非常に重要となる。現在の DNA シーケンシング技術は蛍光分子を使用しているが、これらの方法は複雑な化学反応を必要とするため、DNA 配列の特定に時間がかかるとともに、試薬が高コストの原因となる。また、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR : polymerase chain reaction) による増幅の過程で DNA の断片化が進みシーケンシングの信頼性が低くなる。そのため、DNA 配列を蛍光標識なしで同定するナノポア及びナノ電極を用いた電気的方法は次世代の DNA シーケンシング技術として研究されている。しかしこれらの方法では、電気信号の変動が大きいいため、シーケンシングの信頼性が低いという問題点がある。

表面増強ラマン分光法 (SERS : surface-enhanced Raman spectroscopy) は、ラマン散乱からの高い識別能力のため、DNA 識別実現が期待されてきた。分子からの散乱光には、入射光とは異なる波数を持つラマン散乱が含まれる。この波数の変化、すなわちラマンシフトは分子の構造と結合状態を反映しているため、ラマンスペクトルによって高い信頼性で分子を検出及び識別することができる。通常、少量の分子のラマン散乱断面積は微弱であり検出できないが、分子が金属ナノ粒子の表面にある場合、増強されたラマン散乱が観察される。この現象は、局在表面プラズモン共鳴 (LSPR) と呼ばれる。特に、ホットスポットと呼ばれる 1 nm 未満の金属ナノ粒子間のナノギャップから非常に強い増強を得ることができる。単独のナノ粒子二量体は、粒子の結合方向が入射光の偏光方向に一致している場合、粒子ギャップで巨大な増強が可能となる。しかし、従来の研究では、粒子は基板上でランダムな方向にランダムな形状で形成されるため、検出の下限濃度があることが報告されており、単一分子の検出には不十分である。これは、SERS の DNA シーケンシングが実現されてこなかった理由の一つである。

その問題を解決し、単一分子感度 SERS のために、ナノトレンチへのセルフアセンブリプロセスによって配列された金ナノ粒子二量体を提案している。この方法では、ナノ粒子二量体を偏光方向にそろえて配列できるため、全ての二量体で巨大な SERS の増強が得られる。図 2 のシミュレーション結果は 10^{11} 倍の SERS 増強を示している。以前の研究では、二量体配列構造を使用して 10^{-11} M の超低濃度溶液から 4 種類の DNA 塩基が検出及び同定可能であることが報告されている。また、単独の二量体からアデニンのラマンスペクトルを検出した。

さらに DNA オリゴマーを使用して一本鎖 DNA を検出し、DNA 塩基配列を特定する可能性を示した。その結果、直径 100 nm の二量体単独構造から、単独の DNA オリゴマーが検出された。しかし、単一の DNA オリゴマーの中の単一の DNA 塩基の検出はまだ実証されていない。

2. 研究の目的

本研究では、まず単一の DNA 塩基感度を得るために粒子サイズを最適化した。その後、TE 緩衝液中を溶媒とする濃度 200 μ M の AAAAAAAAA (A8) および CCCCCCCC (C8), CCCCACCC (C7A1) 分散溶液を用いて DNA オリゴマーの SERS 測定を実施し、単一の DNA オリゴマーでの単一 DNA 塩基検出が可能であることを示す。

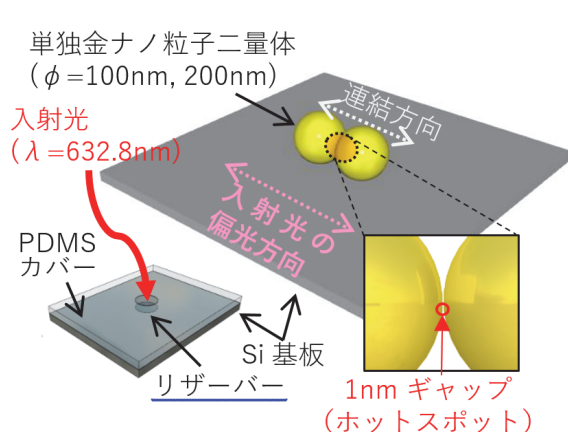


図 1 セルフアセンブリにより作製された金ナノ粒子の単独二量体構造の概略図。ナノ粒子の連結方向と入射光の偏光方向を一致させることができる。

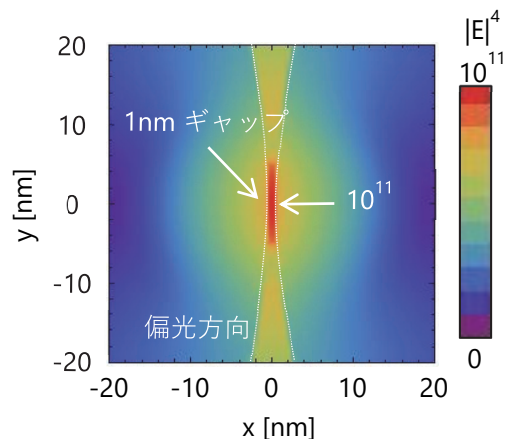


図 2 FDTDシミュレーションによるラマン増強度 $|E|^4$ の計算結果。直径 200 nm の 2 つの金ナノ粒子が Si 基板上に配置され、1 nm のギャップを持つ。

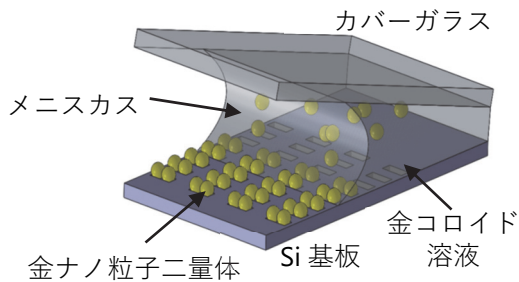


図3 セルフアSEMBルにより作製された金ナノ粒子二量体の作製プロセスの概略図

3. 研究の方法

単独金ナノ粒子二量体は図3に示すセルフアSEMBルプロセスによって作製された。まず、金ナノ粒子のコロイド溶液をカバーガラスとテンプレートシリコン(Si)基板の間に注入する。ナノトレンチ構造は、電子ビームリソグラフィとその後のSiドライエッチングにより作製された。ガラス及びSi基板の表面は、親水性表面処理されている。メニスカスの端にあるナノ粒子は、乾燥プロセス中に界面張力によってナノトレンチに押し付けられる。この手法により、指定の位置と結合方向で二量体を作製および配置できる。コロイド粒子は表面に0.5 nmの厚さの分子層を持つ。二量体形成後、二つの粒子は液架橋力により接触するが、UV (ultraviolet) /O₃ (オゾン) プロセスによって分子層を除去することで、粒子間に局所的なラマン増強ホットスポットとして機能する1 nmのギャップが得られる。本研究では、直径が平均100, 150, 200 nmの金ナノ粒子のコロイド溶液を使用した。

図4に直径100 nmおよび200 nmの金ナノ粒子を用いて作製された単独金ナノ粒子二量体のSEM写真を示す。金ナノ粒子二量体構造がナノトレンチへのセルフアSEMBルにより基板上に作製されていることを確認した。図5は、それぞれ異なる金ナノ粒子直径(100, 150, 200 nm)でのラマン散乱光強度の実験結果を示している。この実験では、ラマン分光のターゲット分子として金ナノ粒子表面に吸着されていた分子層を使用した。図5に示すように200 nmで最も高い増強が得られた。シミュレーションにおいて200 nmの二量体は一分子検出に十分なラマン増強を示している(図2)。

TE緩衝液中を溶媒とする濃度200 μMのAAAAAAAAA (A8) およびCCCCCCCC (C8), CCCCACCC (C7A1)分散溶液を用いてDNAオリゴマーのSERS測定を実施した。単一のオリゴマーの幅は約1 nmであるため、粒子ナノギャップ(SERSホットスポット)には単一のDNAオリゴマーのみが入れると考えられる。

顕微レーザーラマン分光高度計を使用

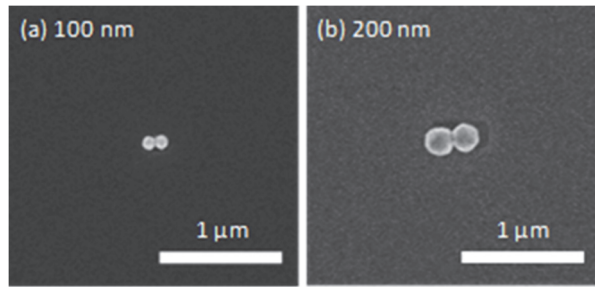


図4 作製した金ナノ粒子二量体のSEM写真。(a)直径100 nm, (b)直径200 nm。直径2 μmのレーザースポットには、二量体が1つだけ存在する。

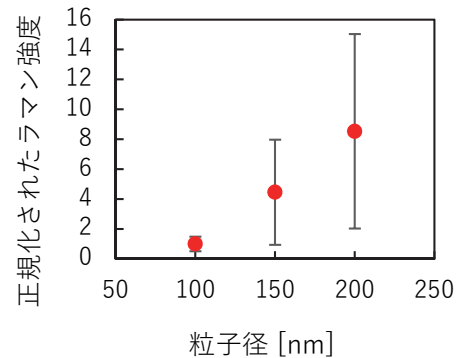


図5 金ナノ粒子表面に吸着されていた分子を使用して実験的に得られた粒子径による正規化ラマン強度。

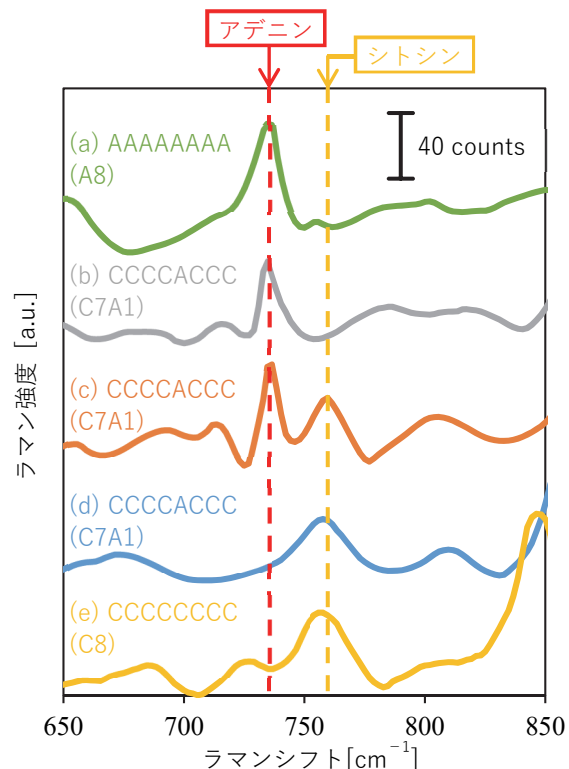


図6 200 nmの金ナノ粒子二量体を用いたDNAオリゴマーのラマンスペクトルの例。(a)CCCCCCCC, (b)-(d)CCCCACCC, および(e)AAAAAAAAAのスペクトルである。点線はアデニンとシトシンのピーク位置を示している。積算時間は1秒。

した。グレーティングは1200/nmに設定し、ホールとスリットのサイズはともに500 μm とした。N.A.が0.5の50倍の対物レンズを使用した。レーザー強度とスポットサイズはそれぞれ8.2 mWと2 μm であり、632.8 nmのレーザー波長を使用した。積算時間は1秒に設定した。図1に示すように、リザーバとなる貫通穴を備えたPDMS (polydimethylsiloxane)を二量体配列領域に位置合わせして貼り付けた。リザーバをDNAオリゴマー溶液で満たし、カバーガラスをリザーバにかぶせる。そして、顕微鏡で金ナノ粒子二量体の位置にレーザースポットを配置し、増強ラマンスペクトルを取得した。

4. 研究成果

図6に得られたSERSスペクトルを示す。A8 (図6(a))およびC8測定 (図6(e))において、それぞれの塩基の環ストレッチングに対応した733 cm^{-1} のアデニンのピークと763 cm^{-1} のシトシンのピークを観察した。図6(b)-(c)に示すC7A1測定では、733 cm^{-1} のアデニンのピークが確認された。ホットスポットには単一のオリゴマーのみのスペースがあり、C7A1にはアデニン分子が一つのみあることから、この結果は単一のオリゴマー内の単一のヌクレオチドが検出できたことを示している。

図6(b)-(c)に示すように、アデニンとシトシンのいずれか、もしくは両方のピークの出現という3つのパターンが確認された。

図7のコンタープロットに示すように、最初はシトシンピークのみが検出され、その後80秒からアデニンピークが出現した (図6(a))。図6(b)の50秒から80秒ではシトシン信号が消失し、アデニン信号のみが検出された。これはアデニンがホットスポットの最も強い位置に到達し、支配的な信号を放出したことを示している。この結果は、ホットスポットがオリゴマーの位置によっては単一のDNA塩基の空間分解能を持っている可能性を示している。

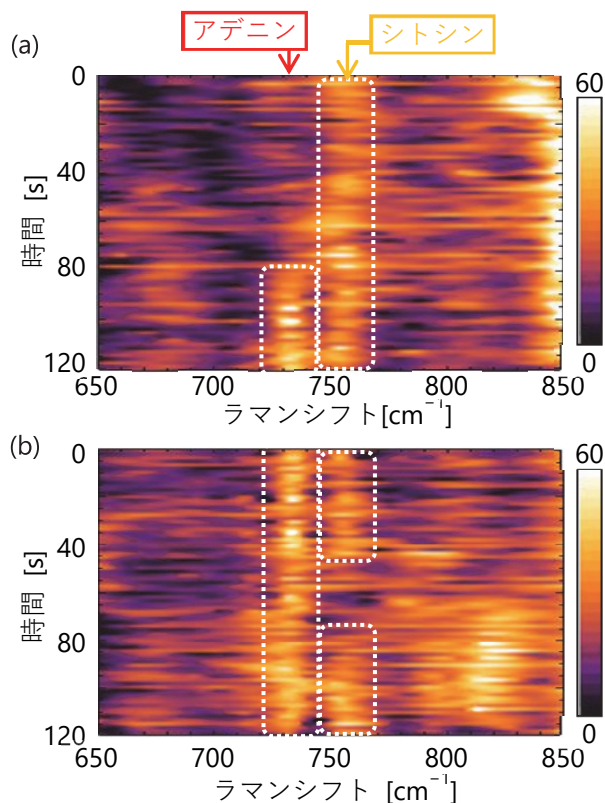


図7 積算時間1秒および間隔時間1.5秒でのCCCCACCC (C7A1)の断続的な測定によるすべてのラマンスペクトルの等高線図。(a)1回目の測定と(b)同じ二量体での2回目の測定を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 新居直之, 上杉晃生, 菅野公二, 磯野吉正	4. 巻 140
2. 論文標題 Si薄膜被覆金ナノグレーティング構造の近赤外域光吸収スペクトル偏光依存性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 電気学会論文誌(センサ・マイクロマシン部門誌)	6. 最初と最後の頁 72~78
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1541/ieejsmas.140.72	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 Kohei Takegami, Kota Nakafuji, Naoyuki Arai, Akio Uesugi, Koji Sugano, and Yoshitada Isono	4. 巻 59
2. 論文標題 Effect of clamped beam pattern on resonant frequency shift of microresonator under near-infrared laser irradiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/ab8412	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 Akihiro Morita, Takayuki Sumitomo, Akio Uesugi, Koji Sugano, Yoshitada Isono	4. 巻 2
2. 論文標題 Dynamic electrical measurement of biomolecule behavior via plasmonically-excited nanogap fabricated by electromigration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nano Express	6. 最初と最後の頁 010032~010032
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/2632-959X/abe9c0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Koji Sugano, Yuki Tanaka, Akio Uesugi, Etsuo Maeda, Reo Kometani, Yoshitada Isono	4. 巻 315
2. 論文標題 Detection of wavelength shift of near-infrared laser using mechanical microresonator-based sensor with Si-covered gold nanorods as optical absorber	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators A: Physical	6. 最初と最後の頁 112337~112337
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.sna.2020.112337	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 Tatsuya Tsubota, Akio Uesugi, Koji Sugano, Yoshitada Isono	4. 巻 27
2. 論文標題 Wavelength-dependent near-infrared microbolometer for short-wavelength infrared light with gold nanowire grating optical absorber	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microsystem Technologies	6. 最初と最後の頁 997 ~ 1005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00542-020-05004-3	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11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Akihiro Morita, Akio Uesugi, Koji Sugano, and Yoshitada Isono
2. 発表標題 Manipulation of Biomolecules Into Nanogap by Plasmonic Optical Excitation for Highly Sensitive Biosensing
3. 学会等名 The 20th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koji Sugano, Katsunari Maruoka, Akio Uesugi, and Yoshitada Isono
2. 発表標題 SERS Detection of a Single Nucleobase in a DNA Oligomer Using a Gold Nanoparticle Dimer
3. 学会等名 The 20th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Murotani, Katsunari Maruoka, Akio Uesugi, Koji Sugano, Yoshitada Isono
2. 発表標題 Effect of Gold Nanoparticle Diameter on Raman Intensity of DNA Oligomers toward Single Nucleobase Detection
3. 学会等名 32nd International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koji Sugano
2. 発表標題 Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of DNA with Single-Molecule Sensitivity Using Gold Nanoparticle Dimer
3. 学会等名 The 19th IEEE International Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO 2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koji Sugano
2. 発表標題 Single-molecule Surface Enhanced Raman Spectroscopy Using Gold Nanoparticle Dimer
3. 学会等名 2019 International Conference on Optical MEMS and Nanophotonics (IEEE OMN 2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金谷恭臣, 丸岡克成, 森田明宏, 上杉晃生, 菅野公二, 磯野吉正
2. 発表標題 金ナノ粒子二量体表面増強ラマン分光によるDNAオリゴマーの1塩基検出
3. 学会等名 第36回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田明宏, 上杉晃生, 菅野公二, 磯野吉正
2. 発表標題 光励起ナノギャップ電極を用いたDNA オリゴマーの光トラップおよび1分子検出
3. 学会等名 第36回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katsunari Maruoka, Kohei Ikegami, Akio Uesugi, Koji Sugano, Yoshitada Isono
2. 発表標題 Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of DNA Bases Using Gold Nanoparticle Dimer Array
3. 学会等名 31st International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新居直之, 上杉晃生, 菅野公二, 磯野吉正
2. 発表標題 Si薄膜被覆金ナノグレーティング構造の近赤外域光吸収スペクトル偏光依存性
3. 学会等名 第34回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayuki Sumitomo, Akihiro Morita, Akio Uesugi, Koji Sugano and Yoshitada Isono
2. 発表標題 Electrical and Optical Characterization of Nanogap Electrodes with an Assembled Gold Nanoparticle Chain
3. 学会等名 33rd International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 住友 孝行, 森田 明宏, 上杉 晃生, 菅野 公二, 磯野 吉正
2. 発表標題 金ナノ粒子二量体を用いたナノギャップ電極の作製とその電氣的・光学的評価
3. 学会等名 第37回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/eng-isonolab/>

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
研究分担者	磯野 吉正 (Isono Yoshitada) (20257819)	神戸大学・工学研究科・教授 (14501)	

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