

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05322

研究課題名(和文) 近接場光を利用した超高感度DNAセンサーの開発

研究課題名(英文) Development of DNA-based biosensors using evanescent fields

研究代表者

山名 一成 (Yamana, Kazushige)

兵庫県立大学・工学研究科・特任教授

研究者番号：70192408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：DNAの二本鎖形成を利用することで、金ナノ粒子を表面修飾した電極を作製し、近接場光を利用した光電流発生システムを開発した。電極と金ナノ粒子を連結するDNAに間にペリレンジイミド(PDI)を修飾し、プラズモン吸収に対応する光を照射することによって生じる光電気化学応答の観測を行った。金ナノ粒子の存在によって、光電流強度が大幅に増加し、また増強程度がPDIの位置に依存することを見出した。金ナノ粒子による光電流増幅メカニズムは、DNAを利用した光バイオセンサーの発展に有用であると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医療診断への応用を目的として、核酸(DNA, RNA)の分子認識機能を利用したバイオセンサーの開発が広く行われている。本研究では、近接場光を利用した光電流応答型の電気化学DNAセンサーの開発を行った。金ナノ粒子の光励起によって生じる近接場光によって光電流が著しく増強されることを実証した。今後、これらの結果は、光バイオセンサーの開発・性能向上に大きく寄与すると期待できる。

研究成果の概要(英文)：By utilizing duplex formation of DNA, we have prepared gold electrodes modified with gold nanoparticles and developed a photocurrent generation system using near-field light. Perylene diimide (PDI) was introduced between the DNA linking the electrode and the gold nanoparticles, and the photoelectrochemical response generated by irradiating light corresponding to plasmon absorption was observed. We found that the presence of gold nanoparticles significantly increases the photocurrent intensity and that the degree of enhancement depends on the position of the PDI. The mechanism of photocurrent amplification by gold nanoparticles is expected to be useful for the development of DNA-based photobiosensors.

研究分野：生体関連化学

キーワード：DNA バイオセンサー 光電流 電気化学 医療診断

1. 研究開始当初の背景

診断や遺伝子型判定等への応用を目的として、様々な分子に対して認識機能を持つ核酸(DNA, RNA)を利用し、分光測定によって標的となる生体分子や小分子を検出するセンサーの開発が広く行われている。蛍光検出を用いたりリアルタイム PCR や電気泳動法などの多くの基盤技術が確立されているが、検査機関、医療現場への導入やヘルスケア機器への適用が容易な分析デバイスの開発が求められている。DNA の分子認識機能を利用した電気化学センサーの開発が広く行われている。電気化学装置は小型化が容易、かつ安価なことから分析デバイスとして期待されている。通常電気化学測定と比較して、光照射によって生じる電流を検出シグナルとする光電気化学測定は、光による応答制御、極めて低いバックグラウンド電流、照射光波長を変えることによる複数の情報読み出し等に利点がある。サブピコ A の電流を検出することも可能であることから、極微量サンプルの検出が可能である。シグナルを得るために光源が必要であることが欠点として挙げられるが、この問題が解決できれば新しいタイプの電気化学バイオセンサーとしての応用が期待できる。

2. 研究の目的

金ナノ粒子 (AuNP) は、表面プラズモン共鳴により可視領域に特徴的な強い吸収を示す。AuNP は光と相互作用することで、近接場光と呼ばれるナノ粒子表面極近傍に強い局在電場を生じることが知られている。この近接場光を利用することで、光の回折限界を超えた光反応の制御が可能となることから、光エネルギー変換システムやバイオセンサーなどへの応用が広く行われている。

生体分子 DNA の配列特異的かつプログラム可能な二重鎖形成を利用することで、AuNP の組織化が可能である。AuNP は、入射した光子を集め、限られた空間に光を局在化させるナノアンテナとして理想的な材料である。プラズモン増強蛍光は実証されているが、DNA 修飾電極上で増強された光電流を発生させるために金属表面の局所電場を利用した例は限られている。本研究では、核酸の認識特性を利用した光電気化学バイオセンサーの開発により、疾患診断に関連する標的核酸の検出が可能になる可能性を秘めている。本研究では、局所電場による光電流の発生を促進するために、DNA ハイブリッド化により AuNPs の単層で覆われた電極表面を設計し、その評価を行った。

3. 研究の方法

末端にチオール基を修飾した一本鎖 DNA を化学合成した。チオール基と Au の反応を利用して、DNA 修飾金ナノ粒子(DNA/AuNP) および DNA 修飾金電極(DNA-electrode)を作製した。続いて、DNA の二本鎖形成を利用して目的とする AuNP を表面に固定した金電極を作製した (図 2)。表面修飾効率は、脱ハイブリダイゼーション後に回収した AuNP の吸収スペクトルによって同定した。光増感剤分子として水溶性ペリレンジイミド (PDI)の合成を行った。また、DNA の特定の位置に PDI を化学合成によって導入した修飾 DNA を合成した。電極に光を照射することで得られる光電流強度、また照射波長を変化させることで光電流アクションスペクトルの測定を行った。

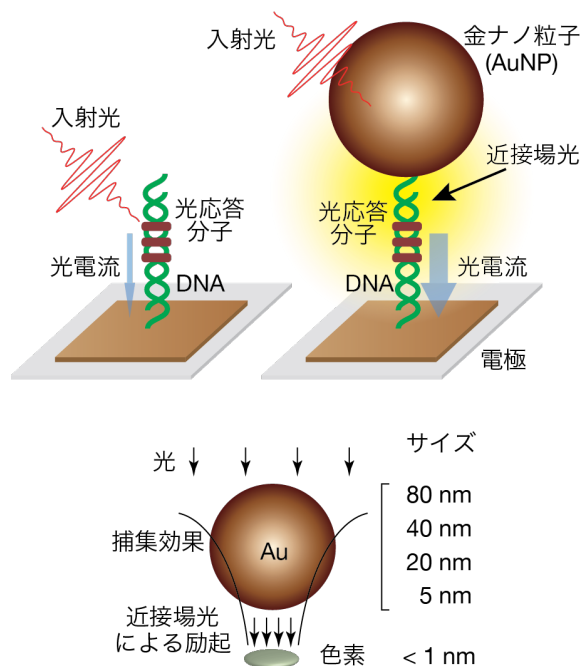


図 1. 近接場光を利用した DNA センサー。金ナノ粒子と電極間に強い近接場光が生じることで、光電流強度が大幅に増強される。

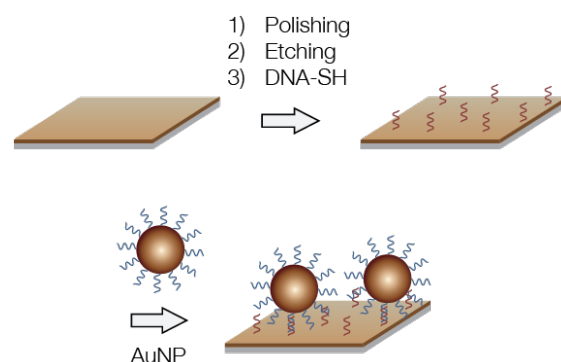


図 2. DNA の二本鎖形成を利用した電極表面修飾スキーム

4. 研究成果

DNA 修飾金ナノ粒子 (AuNP) および電極は、チオール修飾オリゴヌクレオチドを用いて、過去の報告に従って作製した。研磨とエッチングにより調製した新鮮な金表面を用い、チオール修飾 DNA を電極表面に固定化した。6-メルカプト-1-ヘキサノールで表面保護した後、相補的な一本鎖を持つ AuNP を含む溶液で電極表面を処理した。直径 20nm の AuNP を金電極に固定化した (図 3)。12 時間インキュベートすると、プラズモン吸収により電極の色が赤くなり、ハイブリダイゼーションにより AuNPs で表面が覆われたことが示された。高温処理による脱ハイブリダイゼーションによって電極から回収した AuNPs を定量したところ、表面被覆率は約 80% と推定された。光増感剤としては、吸収スペクトルが AuNPs のプラズモン吸収帯と 510 nm 付近で重なるペリレンジイミド (PDI) を選択した。我々は以前、DNA 中の PDI が光増感剤として働き、電子移動とそれに続く光電流の発生を誘導することを報告している。PDI の特性から、図 3 に示したようにプラズモン吸収帯に可視光を照射すると、表面近傍に局所電場を誘起して励起 PDI を生成し、PDI と電子供与体 (D, Asc) 間の電子移動を誘起して、還元 PDI (PDI⁻) を形成する。PDI⁻ の電子が電極へと移動することで光電流が発生すると予想された。

図 4 に光電流測定の結果を示した。ssDNA, dsDNA dsDNA/AuNPs で修飾した電極について、溶液中の PDI 存在下で 520 nm の光照射を行い、光電流応答を測定した。犠牲的電子供与体であるアスコルビン酸ナトリウム (Asc) を PBS buffer に添加した。カチオン性基を持つ光増感剤 PDI は静電相互作用により DNA と結合することができ、励起状態の PDI は電子受容体として働くことができる。DNA のみで修飾した電極に光を照射したところ、弱い光電流応答が見られた。DNA を添加しない場合、光電流は観測されず、溶液中の遊離 PDI の影響は無視され、光電流は DNA 上に結合した cPDI が直接励起され、その後、核酸塩基または Asc から電極表面の励起 PDI に電子が移動することによって発生したと考えられる。電極を AuNP で覆った場合、AuNP のプラズモン吸収帯に対応する 520nm の光を照射すると、高い光電流が発生した。このことは、プラズモン励起により AuNPs と電極の間に強い電場が発生し、光電流が増加したことを示している。プラズモンピーク (510-520 nm)

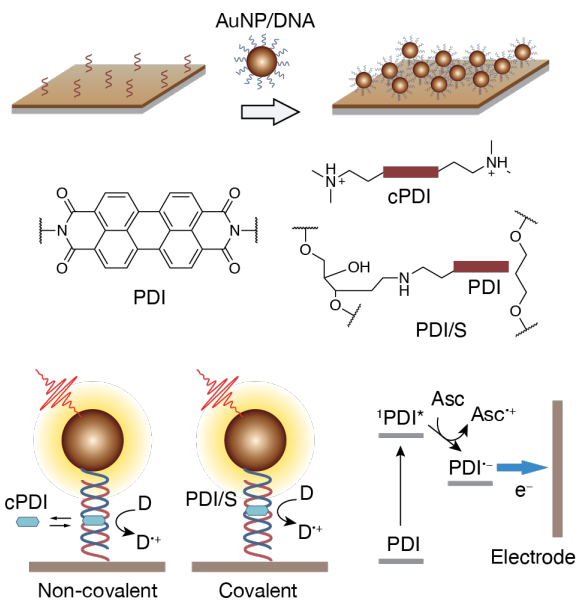


図 3. DNA の二本鎖形成を利用した電極表面修飾スキームと光増感剤ペリレンジイミドの構造。予想された光電流の発生機構。

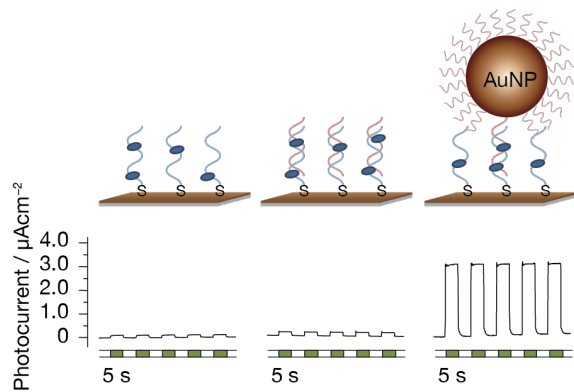


図 4. 520 nm の光を照射したときに観測された光電流シグナル。

よりも長波長側にある 560 nm 付近で照射すると、最も高い光電流が得られました。この結果は、PDI の吸収極大 (550 nm) 付近で AuNPs と PDI の間に強い電子的相互作用があることが示唆された。

AuNPs と電極を連結する DNA 中の PDI の位置を変えることにより、光増感剤と AuNPs 間の距離が光電流に及ぼす影響を調べた (図 5)。プラズモン共鳴による表面近傍の局所電場は距離依存的であることが知られており、分子と表面間の距離が縮まるにつれて励起効率が上がることを期待された。しかし、分子が金属表面に近い場合、分子と金属ナノ粒子との電子的相互作用による非放射エネルギー移動によって励起分子の崩壊が促進されると考えられる。そのため、活性分子を適切な位置に配置することで、効率的な励起と不活性化の抑制を行う必要がある。そのため、活性分子を適切な位置に配置する必要がある。そこで、距離の影響を調べるために、PDI と AuNPs の間の距離を変えた 3 つの電極を設計した。dsDNA と ssDNA のみ低い光電流を示した。一方、AuNP で覆われた電極では、AuNP の周囲の局所電場に起因する高い光電流が観測された。このことは、光増感剤の分子が金属粒子から遠すぎず近すぎず、励起の増強と失活の抑制のために最適な距離が存在することが分かった。

DNA 修飾電極上での光電流発生は、光捕集システムとして機能する AuNP 上の局所電場によって増強されることを実証した。プラズモン吸収に相当する 520nm の光を照射すると、局所的なプラズモン励起により励起された光増感剤が効率的に生成され、AuNP 被覆電極の光電流は AuNP のない電極の 20 倍以上となった。また、AuNP と電極間の PDI の位置による光電流の変化から、DNA を利用して光増感剤分子を適切な距離・位置に配置することで光電流応答を向上させることが可能であることが示唆された。この結果は、局所電場による分子の励起の増強と DNA 上の分子の適切な配置により、光電流ベースのプラズモニックバイオセンサーが開発できることを示唆している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① T. Takada, K. Syunori, M. Nakamura and K. Yamana, "Photocurrent enhancement by a local electric field on DNA-modified electrodes covered with gold nanoparticles" *Analyst*, 144, 6193-6196 (2019). DOI:10.1039/c9an01352k
- ② T. Takada, K. Nishida, Y. Honda, A. Nakano, M. Nakamura, S. Fan, K. Kawai, M. Fujitsuka and K. Yamana, "Stacked thiazole orange dyes in DNA capable of switching emissive behavior in response to structural transitions" *ChemBioChem*, 22, 2729-2735 (2021). 10.1002/cbic.202100309
- ③ T. Takada, N. Shimogaki, M. Naruo, M. Nakamura and K. Yamana, "Photoresponsive porphyrin - DNA complexes constructed through intercalation - like binding" *ChemPhotoChem*, (2022). 10.1002/cptc.202200093

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山名 一成 (YAMANA, Kazushige)
兵庫県立大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：70192408

(2) 研究分担者

高田 忠雄 (TAKADA, Tadao)
兵庫県立大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：60511699

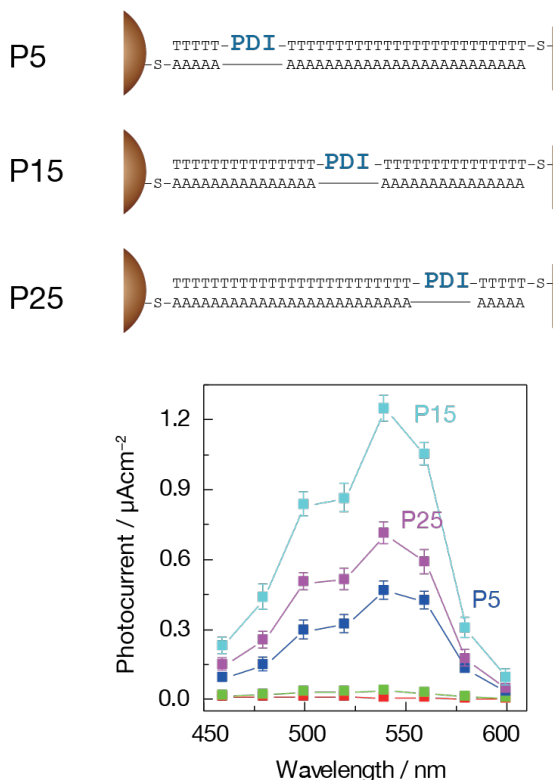


図 5. AuNP と電極をつなぐ DNA に導入した PDI の位置を変化させたときの光電流応答。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takada Tadao, Syunori Kazue, Nakamura Mitsunobu, Yamana Kazushige	4. 巻 144
2. 論文標題 Photocurrent enhancement by a local electric field on DNA-modified electrodes covered with gold nanoparticles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 6193 ~ 6196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c9an01352k	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 Takada Tadao, Nishida Koma, Honda Yurika, Nakano Aoi, Nakamura Mitsunobu, Fan Shuya, Kawai Kiyohiko, Fujitsuka Mamoru, Yamana Kazushige	4. 巻 22
2. 論文標題 Stacked Thiazole Orange Dyes in DNA Capable of Switching Emissive Behavior in Response to Structural Transitions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 2729 ~ 2735
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.202100309	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuuna Yamamoto, Tadao Takada, Ami Takata, Mitsunobu Nakamura, Kazushige Yamana
2. 発表標題 Enzymatic preparation of fluorescent DNA functionalized with perylenediimide derivatives
3. 学会等名 ISNAC2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西田航磨・高田忠雄・本多由理佳・中村光伸・山名一成
2. 発表標題 シアニン色素を構造内部に有する発光性核酸プローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村弘基・高田忠雄・山下智也・中村光伸・山名一成
2. 発表標題 "Signal-On"型電気化学核酸検出プローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Nishimura, Tadao Takada, Tomoya Yamashita, Mitsunobu Nakamura, Kazushige Yamana
2. 発表標題 "Signal-on electrochemical sensors utilizing pillar electrodes modified with nucleic acid redox probes"
3. 学会等名 ISNAC2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	高田 忠雄 (TAKADA TADAO) (60511699)	兵庫県立大学・工学研究科・准教授 (24506)	

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