

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05354

研究課題名(和文) qSERS法の開発とキラーアプリケーションへの展開

研究課題名(英文) Development of quantitative SERS and their applications

研究代表者

小堀 哲生 (Kobori, Akio)

京都工芸繊維大学・分子化学系・教授

研究者番号：00397605

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)：これまでのSERS測定は、シグナル強度の揺らぎや再現性の低さから、これまでその利用は生体分子の定性分析にしか利用されていなかったが、本研究期間において我々は、内標と生体分子応答部位とが同一分子内に組み込まれたラマンタグを利用した定量SERS法を開発することで、SERS現象発見以来の課題であったSERSシグナルの定量化・規格化を実現した。開発した核酸測定系を利用することにより、極低濃度の標的核酸の検出に成功している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サイレント領域にラマンシグナルを発するラマンタグを2つ導入したSERSプローブを開発したことで、簡便かつ高感度な核酸測定系の実現に成功した。本手法における核酸検出感度は、蛍光タグを利用した従来の核酸測定法と同程度であることを示すことに成功している。また、ラマン顕微鏡を利用したマッピング測定にSERS測定系を融合可能であることも実験から証明しているため、ラマン分光測定の新たな可能性を示す結果として大いに評価できる。

研究成果の概要(英文)：Quantification of trace amounts of nucleic acids in bio-samples is a promising way for diagnosis of virus-induced diseases. Although qPCR is the gold standard for quantification of nucleic acids, development of facile and accurate methods for diagnosis are quite important. One of the answers are the methods using surface-enhanced Raman scattering, SERS. Sensitivity of SERS is dramatically increased over the last two decades and almost outstripped that of fluorescent measurements. However significant improvements for reproducibility of SERS measurements have been required from a practical application. In this study, we newly designed a ratiometric SERS-based assay of nucleic acids. This assay uses two Raman tags as an internal standard and Raman reporter. By this method, sub-nanomolar of the target DNAs were automatically detected with small standard deviations.

研究分野：核酸化学

キーワード：表面増強ラマン散乱 DNA RNA

## 1. 研究開始当初の背景

クラスター状の金属ナノ粒子や異方性を持つ金属ナノ粒子表面では、表面プラズモン共鳴が生じ、 $10^{12}$  倍程度に増幅されたラマンシグナル(増強ラマン散乱光：SERS)が得られる。この SERS を利用した測定法は、単一分子レベルの感度を持つ；非侵襲的かつリアルタイムに測定結果が得られる；シグナルの分解能が高い(多種類のラマンタグを一度に測定可能)；蛍光測定で問題になるような色素の褪色に伴うシグナル強度の減少が見られない等、様々な優れた性質を持つ。そのため、SERS を生体分子の検出に応用した研究が近年報告されてきている。これまでに我々も、血中や尿中に存在する微量の核酸成分を、PCR による増幅操作なしに検出することを目指したサンドイッチ型検出法(図 1a)を開発している。この手法では、生体分子由来のラマンシグナルとは異なる領域に強いラマンシグナルを与える生体直行型 SERS タグを標的に結合させることで、微量標的核酸の検出を可能としている。一方で、SERS 測定は、金ナノ粒子の凝集度や異方性変化に由来するシグナル強度の揺らぎ、再現性の低さ、巨大な標準偏差という問題を抱えている。そのため SERS を利用した生体分子の測定は定性的な解析に終始している。今後、極微量生体分子の定量解析、リアルタイム測定などに SERS を利用していくためには、SERS シグナルの揺らぎを補正することのできる革新技术の開発が必要となる。

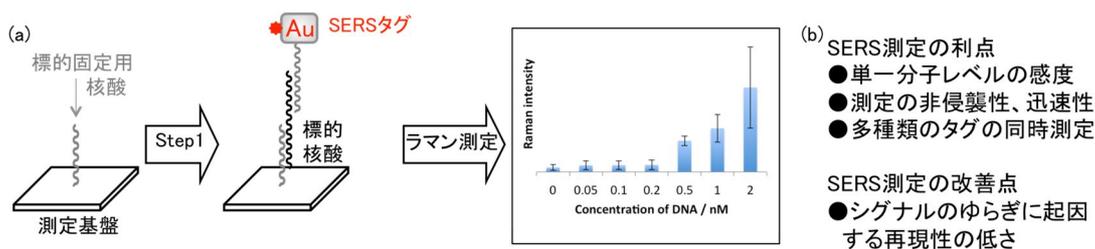


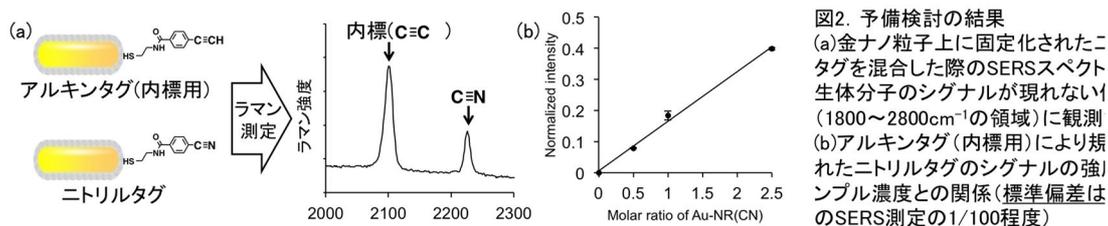
図 1 (a)サンドイッチ型ラマン測定を利用した核酸検出 (b) SERS 測定の特徴

## 2. 研究の目的

### 目的 1：定量 SERS 測定(quantitative SERS: qSERS)の基本原理解構築

これまで我々は、金ナノ粒子上に様々な置換基が導入された生体直行型 SERS タグを開発してきている。その中で、アルキンタグとニトリルタグが導入された金ナノ粒子を同時測定した場合、一方のタグをもとに他方のタグの強度を補正可能であるという知見を得ている(図 2)。

この知見は、「金ナノ粒子の状態と標的の濃度に応答して強度を変化させる生体直行型



SERS タグ」と、「金ナノ粒子の状態のみに応答して強度を変化させる生体直行型 SERS タグ」の二種類の SERS タグを用いれば、標的由来の SERS シグナルを定量可能であることを意味する。そこで本研究期間において我々は、二種類の生体直行型 SERS タグを利用することにより、生体分子を高感度かつ定量的に測定する定量 SERS(qSERS)測定を世界で初めて報告する。

### 目的 2 : qSERS を利用した生体分子測定法の開発

qSERS 測定を蛍光測定に続く次世代の生体分子測定法に昇華していくためには、qSERS の測定原理を確立するとともに、qSERS が有用な測定法であることを自ら示す必要がある。そこで本研究期間に我々は、2つの生体分子測定技術( 体液中 miRNA をバイオマーカーとして用いた疾患診断 ; 高解像度ラマン顕微鏡を利用した生体分子自動測定)に qSERS が応用可能であることを示す。

### 3 . 研究の方法

検出系には最も高感度に標的核酸を検出できているサンドイッチ型核酸検出法を採用した。サンドイッチ型核酸検出法は、標的核酸と金ナノ粒子プローブを固相上に濃縮することができるため、高感度に検出することが可能である。また、SERS による増強度は距離に依存し、近いほど増強度が大きくなるため、ラマンタグには金表面から近い距離にサイレント領域にシグナルを発する官能基が存在できるような小分子を用いることが望ましい。そこで我々は、4-Cyanobenzoic acid と Cystamine 組み合わせた新たなラマンタグ(CN タグ)、ならびに 4ethynylphenyl 基(PE)と 4-(phenylehynyl)phenyl 基(PEP)を利用した2つの核酸測定系を構築した。(図 3)

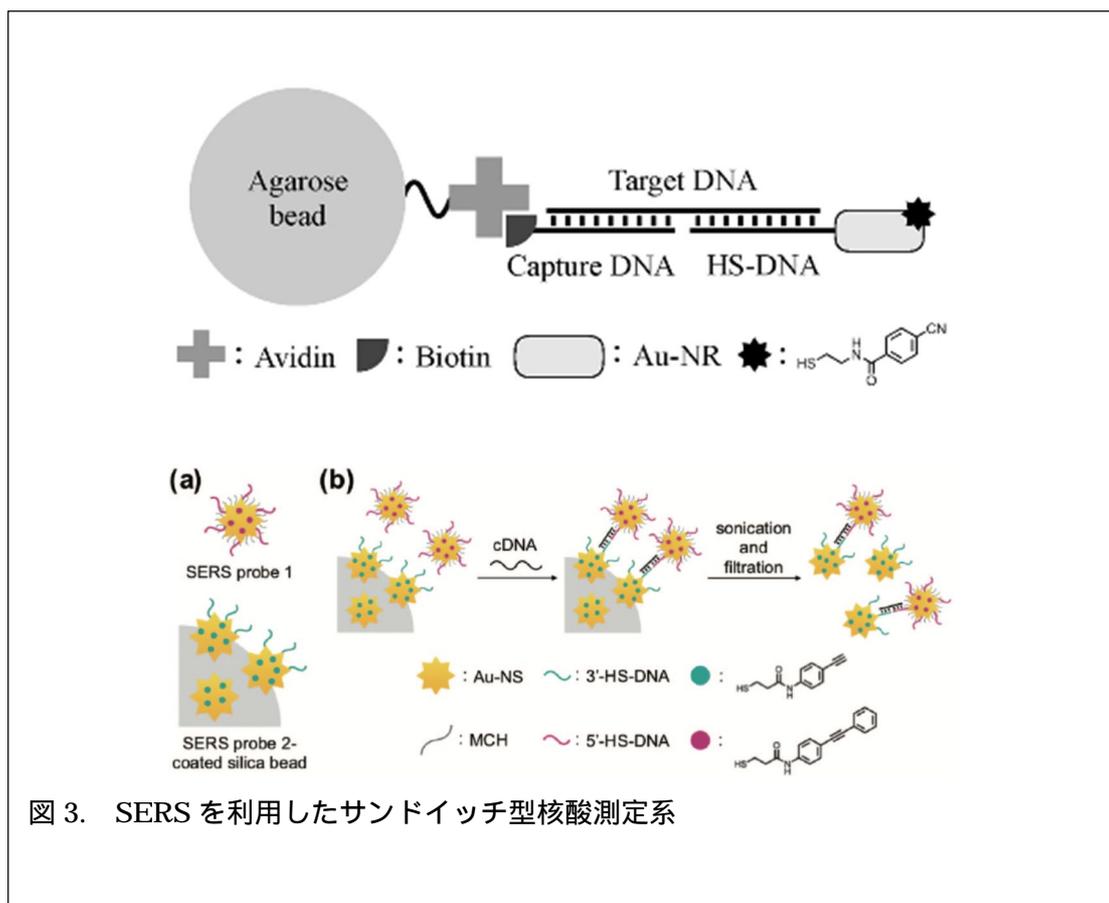


図 3. SERS を利用したサンドイッチ型核酸測定系

#### 4 . 研究成果

##### CN タグを利用した核酸測定結果について

分子内にニトリル基を有するラマンタグとして CN タグを設計した。4-cyanobenzoic acid を出発原料として 2 ステップを経て、収率 24% で CN タグの 2 量体である *N,N'*-bis-(4-cyanobenzamido)-cystamine を得ることに成功した。*N,N'*-bis-(4-cyanobenzamido)-cystamine のラマンスペクトル測定を行ったところ、ニトリル基由来のシグナルが  $2237\text{ cm}^{-1}$  (サイレント領域) に観測された。さらに、CN タグを金ナノロッドに修飾を行い、ラマンスペクトル測定を行ったところ、ニトリル基由来のシグナルが  $2237\text{ cm}^{-1}$  に観測された。このことから、金ナノロッドに CN タグが修飾されたことが示唆された。HS DNA が 240 本導入された金ナノロッドに CN タグを導入し、SERS probe を作製した。SERS probe のラマンスペクトル測定を行ったところ、ニトリル基由来のシグナルが  $2237\text{ cm}^{-1}$  に観測されことから、HS DNA を導入した金ナノロッドに CN タグが導入されたことが確認できた。

次に、サンドイッチ型核酸検出に用いる固相単体の準備を行った。固相には、アビジンが修飾されたアガロースビーズを採用した。アビジン修飾アガロースビーズにビオチンが修飾された Capture DNA を反応させ、アビジン-ビオチン結合により、Capture DNA をアガロースビーズに導入した。反応前後の上清の UV スペクトルを測定し、アガロースビーズへの Capture DNA の導入量を算出したところ、アガロースビーズ一粒あたり、約 26 fmol の Capture DNA が導入されたことが明らかとなった。

最後に、Capture DNA を導入したアガロースビーズと SERS probe を用いてサンドイッチ型核酸検出法を用いて標的核酸の検出を行った。まず、配列選択性の評価を行ったところ、2 種類の標的核酸 (target DNA (EV) と target DNA (HVA) ) を配列選択的に検出することに成功した。また、検出限界の調査を行ったところ、target DNA (EV) を検出するセットでは 500 pM、target DNA (HVA) を検出するセットでは 1 nM が検出限界であった。

##### (関連報文)

R. Ota, N. Takagi, Y. Imaizumi, T. Waku, A. Kobori

“ Sandwich-typed detection of nucleic acids by bioorthogonal SERS probes ”

*Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 40, 166-177 (2021).

##### PE と PEP を利用した核酸測定結果について

研究項目 において我々は、生体成分のラマンスペクトルにおいてシグナルの現れない領域にシグナルを有するラマンタグと surface-enhanced Raman scattering (SERS) 基質である金ナノ粒子を組み合わせた SERS プローブを作製し、高感度な核酸検出法の構築に成功している。しかしながら、SERS の増強度に起因するシグナル強度のバラツキが大きいため、核酸の定量に熟練した技術を必要としていた。そこで項目 では、シグナル強度の再現性向上を目指し、核酸の両末端に内部標準となる官能基と標的核酸に応答してシグナル強度が変化する官能基の二種類の官能基を修飾したサンドイッチ型核酸測定系を構築した。その結果、86pM の標的核酸の検出に成功している。さらに、ガラス表面

に滴下したサンプル溶液に含まれる標的核酸を顕微ラマンのマッピング測定で検出することにも成功した。これらの結果は、生体サンプル中に含まれる核酸の新しい測定法として、SERS と生体直交型ラマンタグを組み合わせた検出系が利用可能であることを示す研究成果であると認められる。

(関連報文)

R. Ota, Y. Fukushima, Y. Araki, K. Sasaki, T. Waku, A. Kobori

“Ratiometric SERS assays for reliable and automatic quantification of nucleic acids”

*Chemistry Letters*, 2021, 50, 513-517. <https://doi.org/10.1246/cl.200798>

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 Ota Ryo, Fukushima Yuki, Araki Yuta, Sasaki Kenta, Waku Tomonori, Kobori Akio	4. 巻 50
2. 論文標題 Ratiometric SERS Assays for Reliable and Automatic Quantification of Nucleic Acids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 513 ~ 517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.200798	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 R. Ota, N. Takagi, Y. Imaizumi, T. Waku, A. Kobori	4. 巻 40
2. 論文標題 Sandwich-typed detection of nucleic acids by bioorthogonal SERS probes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 166 ~ 177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15257770.2020.1849718	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 A.Yamayoshi, M.Higuchi, Y.Sakai, A.Kobori, T.Yamamoto, T. Shibata, A. Murakami	4. 巻 39
2. 論文標題 Selective cross-linking behavior of oligodeoxyribonucleotides containing 2'-O-[N-(4,5',8-trimethylpsoralen-4'-ylmethylcarbonyl)]adenosine to mutant H-ras DNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES AND NUCLEIC ACIDS	6. 最初と最後の頁 119-130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15257770.2019.1677912	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 Kobori Akio, Arai Taichiro, Sakata Yuya, Sugita Takayuki, Yamayoshi Asako, Murakami Akira	4. 巻 59
2. 論文標題 Photochromic DNA having fluorescent protein-inspired nucleosides	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 3690 ~ 3693
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2018.08.064	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 太田良
2. 発表標題 Development of SERS-active nanoparticles for sensitive detection of nucleic acids
3. 学会等名 ISNAC2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田良
2. 発表標題 ステムループ型SERSプローブを利用したmiRNA定量法の開発
3. 学会等名 2019年度日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田良
2. 発表標題 高感度核酸検出を志向した生体直行型SERSプローブの開発
3. 学会等名 第28回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryo Ota, Akio Kobori
2. 発表標題 Development of a sandwich-typed assay for nucleic acids using surface-enhanced Raman scattering
3. 学会等名 256th ACS national meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福島雄基、太田良、小堀哲生
2. 発表標題 PEG-核酸複合体を導入した金ナノロッドの調製と機能評価
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会第13回関西若手研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田良、福島雄基、小堀哲生
2. 発表標題 生体直行型ラマンタグを鎖中に導入した核酸の合成と機能評価
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学合同シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kizuki Ichimi, Yu Watari, Akio Kobori
2. 発表標題 Facile quantification of miRNAs in biological samples
3. 学会等名 2018ISNAC (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	和久 友則  (WAKU TOMONORI)  (30548699)	京都工芸繊維大学・分子化学系・助教    (14303)	

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