

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18988

研究課題名（和文）水中ピコキャビティのアクティブ形成と分子分解能ダイナミック分光への応用

研究課題名（英文）Active formation of picocavities in water and its application to molecular-resolution dynamic spectroscopy

研究代表者

齋木 敏治（Saiki, Toshiharu）

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・教授

研究者番号：70261196

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：金ナノ粒子表面に塩基分子を吸着させ、低pH下での塩基のプロトン化により二量体形成効率の向上を確認した。さらに、一塩基置換オリゴヌクレオチドを用いた水中一粒子ラマン計測により、二量体ホットスポット（ピコキャビティ）による一塩基分解能を実証した。続いて、ピコキャビティの力学的制御を目的として、相変化ナノポアを作製し、金ナノ粒子のナノポアへの誘導と捕捉を試みた。交流電界下での電熱流と電気浸透流により誘導の高効率化を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体一分子の捕捉、マニピュレーション、サブナノ分光分析を精密なチューニング機構のもとで実現するためのツール開発を目指した研究である。アダトムがDNA塩基と相互作用しながら相対位置を一方にシフトする機構を考案できれば、光学的DNAシークエンサーとして完成し、プロテインシークエンサーも現実的となる。細胞内の混雑環境下にてタンパク分子の構造変化の分光的可視化や構造力学的作用と機能発現との相関の解明などに寄与する新たなツールとしての可能性も秘めている。

研究成果の概要（英文）：Adsorption of base molecules on the surface of gold nanoparticles and protonation of the base at low pH enhanced the dimer formation. Furthermore, single-base resolution using dimer hot spots (picocavities) was demonstrated by single-particle Raman measurements in water using single-base-substituted oligonucleotides. Subsequently, phase-change nanopores were fabricated to mechanistically control the picocavities, and the attraction and trapping of gold nanoparticles in the nanopores was attempted. High efficiency of induction was achieved by electrothermal and electroosmotic flow under an AC electric field.

研究分野：ナノフォトニクス ナノバイオフィotonics 相変化フォトニクス

キーワード：DNA アミノ酸 表面増強ラマン散乱 ナノポア 相変化材料

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

ナノポア DNA シークエンサーの著しい技術進展を受け、修飾 RNA の網羅的解析やアミノ酸配列解読への展開に期待が寄せられている。しかし、イオン電流変化を信号とする現状のナノポアシークエンサーでは多種の修飾 RNA やアミノ酸の識別は容易ではない。この課題克服に対しては、単一塩基・アミノ酸分解能ラマン分光によるスペクトル情報の取得が有望である。ただし、ラマン信号は微弱であり、金属ナノ構造のギャッププラズモンを利用した電場増強効果による高分解能・高感度化が必須である。短鎖 DNA ラマン計測において一塩基分解能の達成を主張する研究報告が数例あるが、高分解能の起源については十分な理解に至っていない。金属ナノ粒子表面のアダトム(吸着原子)が形成するいわゆる「ピコキャビティ」の寄与がその可能性として挙げられるが(図1) 具体的な原子スケールのモフォロジーや DNA のアダトムへの吸着配置の解明と最適化が必要である。

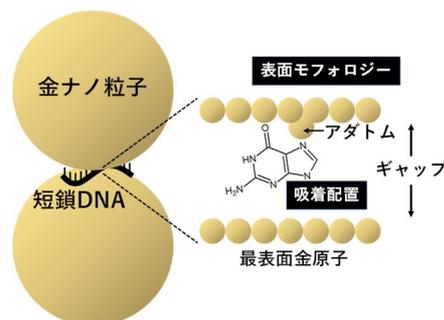


図1 ピコキャビティ

## 2. 研究の目的

本研究では、水中にて金ナノ粒子二量体ギャップにピコキャビティをアクティブに形成し、一塩基分解能の再現性とラマン増強度の最大化を図る。アダトムの発生・移動と DNA の吸着配置は相互作用を通して最適化されると考え、溶液の pH 調整のもと二量体形成温度を高温化することにより分子を捕捉しつつアダトムの発生・移動を促進する。さらに、相変化材料を成膜したナノポアに二量体をトラップし、捕捉分子へ力学的摂動を与え、理想的なピコキャビティ形成をアシストすることを目指した。さらにその結果から、最大の分解能と感度を達成する金表面モフォロジーと DNA 吸着配置解明の足掛かりとすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 金ナノ粒子二量体ピコキャビティ形成と一塩基分解能ラマン計測

金ナノ粒子と塩基を混合し、塩による粒子間反発の低減と加温インキュベーションにより二量体ピコキャビティを効率良く形成する。その際、低 pH 下にてアデニン、シトシンをプロトン化し、金ナノ粒子への吸着率を高めておく。インキュベーション温度をパラメータとして、水中でブラウン運動する単一の二量体に対してラマン分光を行い、ラマン信号強度を評価する。続いて塩基と同様にヌクレオチドを介して二量体を形成し、一塩基分解能を実証する。さらに二量体形成の方法論をアミノ酸に拡張する。

### (2) 金ナノ粒子二量体のナノポアへの誘導とピコキャビティ制御

窒化シリコンメンブレンに対して収束イオンビームを用いてナノポアを作製し、金ナノ粒子二量体をトラップする。ピコキャビティの力学的制御を目的とし、体積変化をともなう相変化材料を被覆したナノポアへのトラップを試みる。また、トラップ効率の向上のために、電熱流、電気浸透流の発生とその活用を試みる。

## 4. 研究成果

### (1) 金ナノ粒子二量体ピコキャビティ形成と一塩基分解能ラマン計測

直径 40 nm の金ナノ粒子とアデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)、チミン(T)塩基を pH3.5、ならびに pH7.0 下でそれぞれ混合し、さらに塩の添加により金ナノ粒子二量体を形成した。塩基の濃度の関数として、ゼータ電位と二量体形成効率を測定した結果を図2に示す。二量体の形成効率は、ゲル電気泳動により単量体、二量体、・・・を分離することにより評価した。塩基の吸着にともない、ゼータ電位が低下し、粒子間反発が抑制される結果、適切なゼータ電位領域において二量体が効率よく形成されることが確認された。酸性下でプロトン化し、金への吸着性の高いアデニンでは、低塩基濃度でゼータ電位の低下が確認された。また、グアニンにおいては、広いゼータ電位領域において安定的に二量体が形成されることが確認された。

いくつかのグアニン濃度に対して、水中にて測定した顕微ラマンスペクトルと吸光度スペクトルを図3に示す。吸光度スペクトルにおける長波長側のピークは二量体の粒子間距離(ギャップ)を反映しており、ギャップの拡大とともに短波長側にシフトする。pH3.5、7.0 のいずれにおいても、ギャップ拡大にともなって、ラマンスペクトルにおける呼吸モードピークが相対的に増強していることがわかる。この結果は、グアニンの吸着量が増大するにともない、グアニン分子が金表面に対して垂直に配置し、高密度での吸着を達成していると解釈される。アデニンに対しても同様の結果を得た。

これらの実験と並行して、一塩基置換オリゴヌクレオチドを対象として同様の実験を実施した。例えば 25 塩基長のシトシンオリゴヌクレオチドの中央のみをグアニンに置き換えたもの(C...CGC...C)を使用し、塩基分解能の実証を試みた。二量体形成時に 90 まで加温し、金原子の移動を促進した。水中でブラウン運動する単一の二量体からのラマン測定を行ったところ、100 ms の測定時間で十分な S/N のスペクトルを得ることができた。単一二量体に対する測定を多数

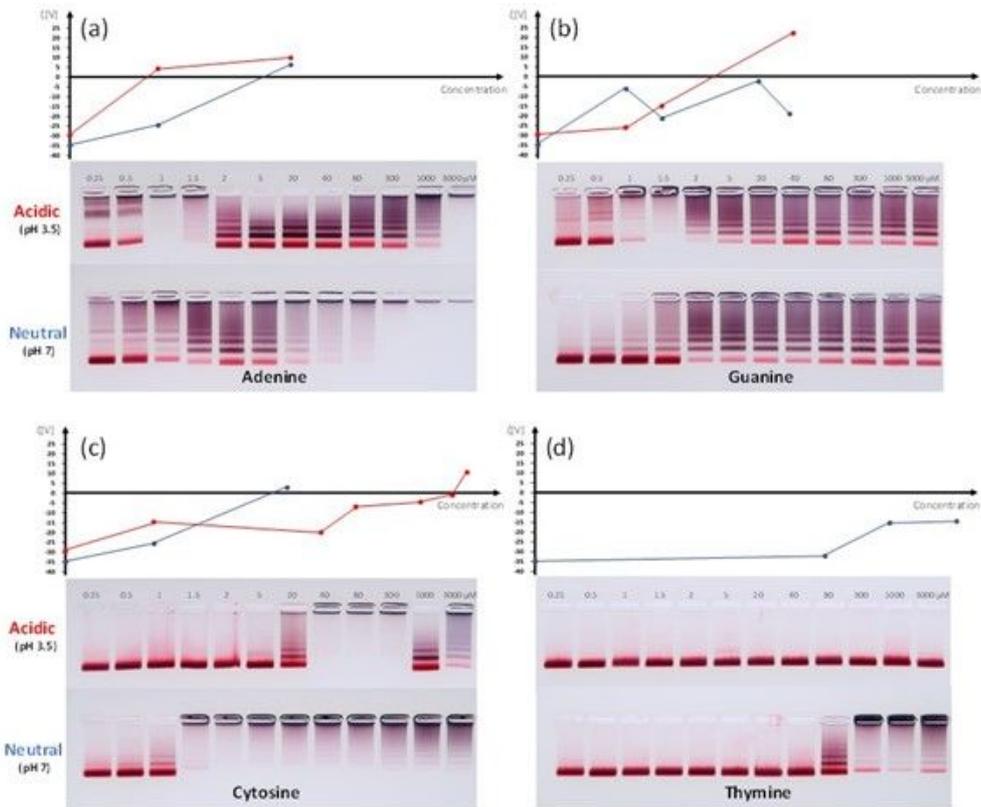


図2 (a)アデニン、(b)グアニン、(c)シトシン、(d)チミンを吸着させた金ナノ粒子のゼータ電位とゲル電気泳動の塩基濃度依存性

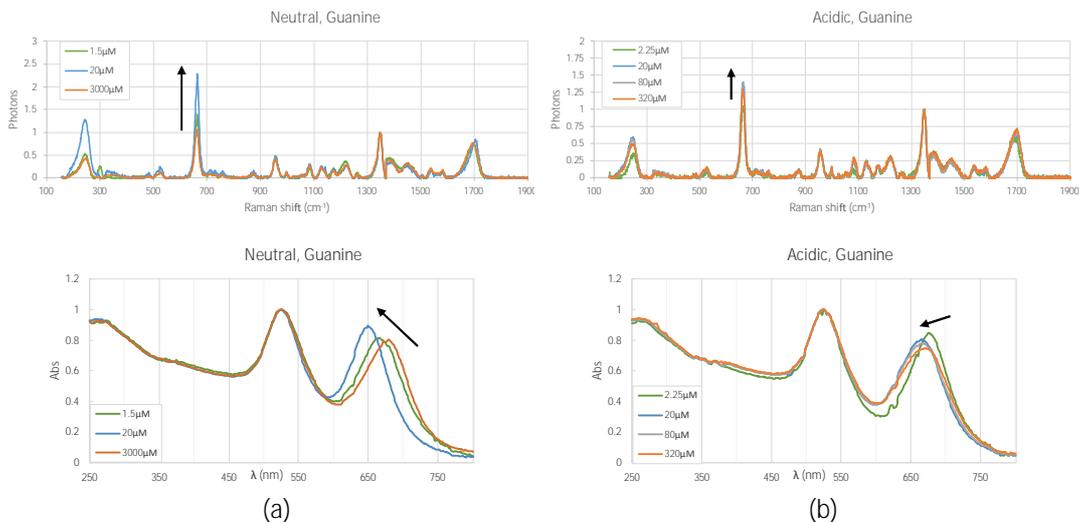


図3 (a) PH7.0、(b)pH3.5におけるグアニンを捕捉した金ナノ粒子二量体のラマンスペクトル(上)と吸光度スペクトル(下)

の二量体に対して実施したところ、その多くはシトシンのみ、あるいはシトシンとグアニンのピークを含むものであったが、一定の頻度でグアニンのみのピークが出現するスペクトルが得られた(図4)。C...CAC...C に対しても同様の結果を得ることができた。これらの結果は、金原子スケールで光が局在し、一塩基分解能が実現していることを示唆するものである。

続いて、アミノ酸としてチオール基を有するシステインを主たる対象とし、上記 DNA 二量体化の経験を活かしながら、広範囲にわたる pH 下での二量体の形成を検証し、その機構を議論した。金ナノ粒子表面をチオール結合によってシステイン分子で修飾し、酸性～中性条件下にて二量体を形成し、吸光度測定とラマン測定を行った。吸光度スペクトルより、システインが双性イオンとなる pH 領域と陽イオンとなる pH 領域では、前者の方が後者よりもギャップが大きいことが確認された。後者のギャップを、アルカンチオール(HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH)で架橋した場合の結果と比較すると、n=2~3 の長さに対応しており、システインが一分子で二量体を架橋していると予想される。システインが双性イオンとなる中性近傍ではギャップがシステイン二分子の長さ

に相当し、カルボキシ基とアミノ基が対向した結合であると考えられる。

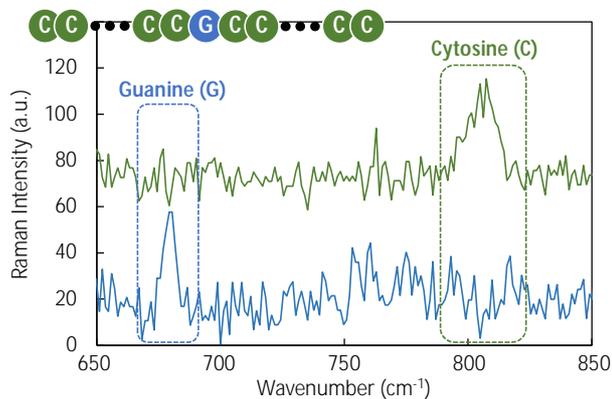


図4 一塩基置換オリゴヌクレオチドを捕捉した単一金ナノ粒子二量体からのラマンスペクトル



図5 ナノポアに捕捉された金ナノ粒子の光学顕微鏡像

## (2) 金ナノ粒子二量体のナノポアへの誘導とピコキャビティ制御

ナノメンブレンに穿孔したナノポアに相変化材料である GeSbTe を成膜し、金ナノ粒子のナノポアへの誘導と捕捉を試みた。直流電界のもとでレーザー光を照射しながら粒子のナノポア通過過程を観察すると、ある頻度で金ナノ粒子の捕捉を確認できた(図5)。新たな捕捉機構を探索する中、GeSbTe 薄膜をレーザー加熱しつつ、交流電界を印加すると、水の誘電率の温度依存性に起因した電熱流を誘起することができ、これによって金ナノ粒子を遠方から効率的に光照射部へ誘導できることを見出した。さらに GeSbTe がレーザー照射加熱によって結晶化した領域は導電性となり、局所電極として交流電界の集中にともなう電気浸透流が新たに発生することを確認した。電熱流、電気浸透流ともに交流周波数に対する依存性を示し、設定周波数により両者の流速の比を制御することが可能である。この制御機構がナノポア捕捉効率向上に寄与する可能性を議論した。図6は交流周波数を変えることにより(a) 30 kHz、(b) 100 kHz、(c) 500kHz、サイズ選択的にポリスチレン粒子を回収しているようすである。夾雑物を含む試料への応用が期待される。

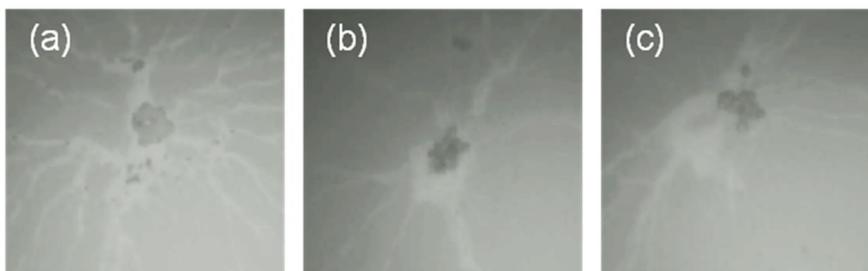


図6 相変化薄膜へのレーザー照射によるポリスチレン粒子の選択的回収

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Martin Kasavetov, Keiko Esashika, Paul Fons, Toshiharu Saiki
2. 発表標題 SERS-based detection and interaction of DNA bases with gold nanoparticles
3. 学会等名 第70回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安谷 錦之介, 長瀬 暉, 畑山 祥吾, 牧野 孝太郎, 斎木 敏治
2. 発表標題 相変化基板上的交流電界誘起流によるサイズ選択的微粒子収集
3. 学会等名 第23回レーザー学会東京支部研究会
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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