

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32685

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26286018

研究課題名(和文) 誘導体グラフェンへのエネルギー移動反応の定量評価

研究課題名(英文) Quantitative evaluation of energy transfer efficiency to graphene and its derivatives

研究代表者

古川 一暁 (Furukawa, Kazuaki)

明星大学・理工学部・教授

研究者番号：40393748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：グラフェンが光エネルギー移動反応(FRET)の高効率なアクセプタであることを利用し、特定のタンパク質を検出した際に発光するバイオセンサを新規に作製した。このバイオセンサが、酸化グラフェンを基材とする既存のバイオセンサと比較して、タンパク質検出時の発光強度が3倍以上であることを定量的に示した。さらにマイクロフリューイディクスの適用により、内部標準を備えたシステムを作製した。前立腺ガンマーカであるタンパク質(PSA)の検出限界が数百ng/mLであることを定量的に示した。電子移動反応に関して、グラフェン電極の電気化学反応は維持したまま基板とグラフェンとの接着性を上げる基板表面処理法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Graphene is an excellent acceptor in fluorescence resonance energy transfer (FRET) process in visible light region. Using this characteristics, we developed a biosensor (graphene FRET aptasensor) that emit fluorescence when the target protein exists in a sample. We showed that the graphene FRET aptasensor yields more than 3 times greater fluorescence than GO sensor. We designed the sensor array with internal reference for quantitative detections by combining microfluidics technology to the graphene FRET aptasensor. We showed the limit of detection of the graphene FRET aptasensor is several hundred ng/mL. For the electron transfer reaction of graphene, we built a new surface modification for a substrate to strengthen adhesion between graphene and substrate though the electrochemical properties of graphene is remained.

研究分野：総合理工

キーワード：表面・界面科学 グラフェン 光エネルギー移動反応 電子移動反応 バイオセンサ

### 1. 研究開始当初の背景

本研究では、酸化グラフェンやその還元体にグラフェンも含めた物質群を総称して「グラフェン誘導体」と呼ぶ(図1)。グラフェンの単離手法が確立されその特異な物性が明らかにされて以降 [K. S. Novoselov et al., Science 306, 666 (2004)]、グラフェン誘導体全体が新規な2次元系物質群として注目を集めた。このうち酸化グラフェン(Graphene Oxide, GO)は、グラフェンを構成する炭素のsp<sup>2</sup>軌道が一部切断され、酸素と結合した構造を有する(図1)。GOの特長のひとつに、その高効率な蛍光消光機能が挙げられる。例えば蛍光色素で被覆されたSiO<sub>2</sub>表面にGO単一層を吸着させると、GOが存在する部位からは蛍光が観察されない [E. Treossi et al., J. Am. Chem. Soc. 131, 15576 (2009)]。GO単一層は厚さが1nm程度で、その可視光吸収係数はグラフェン同様の数%と考えられる。それにもかかわらず、著しい蛍光強度の減少が観察されるのは、GO-蛍光色素間の高効率な蛍光共鳴エネルギー移動(FRET、Fluorescence Resonance Energy Transfer)反応のためである。

2種の蛍光色素分子(一方はドナー、他方はアクセプタ)間に生じるFRET効率は、一般に

$$E_{FRET} = \frac{1}{1 + (r/r_0)^6} \quad (\text{式1})$$

で与えられる。ここで、 $E_{FRET}$ はFRETによる蛍光消光率、 $r$ はドナー-アクセプタ間の距離である。 $r_0$ はフェルスター半径と呼ばれるドナー-アクセプタの組み合わせに固有の距離であり、 $r=r_0$ の時に $E_{FRET}=0.5$ 、すなわち蛍光消光率が50%になることで定義される。上述のGOと蛍光色素との間に生じるFRETは、しかしながら、GOの2次元性に起因して、式1に従うとは限らない。理論的には、式1の分母の6乗の項が4乗になると指摘されている [R. S. Swanthi et al., J. Chem. Phys. 130, 086101 (2009)]。一方、実験的な研究は乏しく、 $E_{FRET}$ と距離との関係は明確にされていない。その一因は、蛍光強度を定量的に比較する実験が困難なためと推測される。

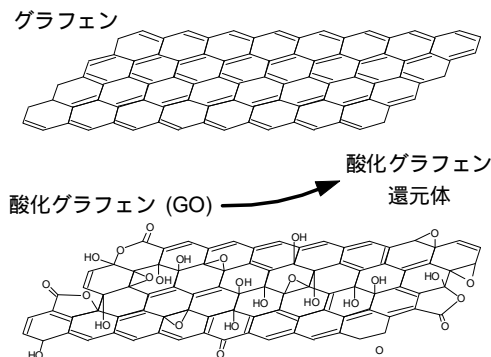


図1. グラフェン誘導体の模式図

基礎的な理解が不十分な中、GOの高効率なFRETを利用した応用研究はすでに立ち上がりはじめていた。本提案研究と関連の深い研究として、GOを利用したDNA [H. Dong et al., Anal. Chem. 82, 5511 (2010)] やタンパク質 [C.-H. Lu et al., Angew. Chem., Int. Ed. 48, 4785 (2009)] の検出が報告されていた。これらの例では、GOが水によく分散する性質を利用して、検出がGO分散水溶液中で行われる。DNAを例に検出原理を述べる。まず末端に蛍光色素を導入した1本鎖DNAをGOに吸着させる。この初期状態ではGOをアクセプタとする高効率なFRETにより色素蛍光は観測されない。ここに相補鎖DNAが添加され2本鎖DNAを形成すると、蛍光色素はDNAとともにGO表面から脱離し、FRETを免れた蛍光が観察される。実験上の問題点として、水分散液中では1本鎖DNAの確率的な脱離があり、バックグラウンド蛍光が過剰に生じることが挙げられていた。

一方、研究開始当初、本研究の提案者はGO表面で生じている反応過程をより直接的に検証する手法として、GOを固体表面に固定した試料を用いた実験に取り組み、成果をあげていた。固定化GOを用いることで、蛍光回復は共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡、膜厚は原子間力顕微鏡といった、表面にセンシティブな測定手法が適用でき、バックグラウンド蛍光の問題を回避することができる。結果、GO単一片を対象として、タンパク質の選択的吸着および蛍光回復の観察に成功していた [K. Furukawa et al., J. Meter. Chem. B 1, 1119 (2013)]。この研究においてわれわれは、固体表面に固定したGOを表面選択的に化学修飾する手法を獲得した。固定化GOを用いる優位性は、マイクロ流路デバイスの搭載が可能なことである。これにより複数の異なる試料の同時分析が可能となり、さらには異なる修飾分子による蛍光回復の定量的な比較が可能になった [Y. Ueno et al., Chem. Comm. 49, 10346 (2013)]。これらはGOを固体表面に固定してはじめて実現できた実験であり、他の研究グループが現在主に取り組んでいるGO分散水溶液を用いた実験では実現不可能であった。このようにわれわれは、2013年までに定量性を担保するいくつかの独自手法を考案し、その原理確認を終え、本研究課題に挑戦する技術を獲得していた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、「グラフェン誘導体」とその表面に近接した分子との間のエネルギー移動反応機構を解明することである。本提案におけるグラフェン誘導体とは、グラフェンや酸化グラフェンおよびその還元体を総称した物質群を指す。これら2次元系の物質とその表面近傍にある0次元系の分子との間の距離とエネルギー移動反応効率とを定量的に評価し、両者の相関を実験によって総合的に、すなわちさまざまなグラフェン誘導体

- 分子の組み合わせについて、明らかにすることが本提案の中心課題である。対象とするエネルギー移動反応は、光エネルギー移動反応と電子移動反応の2つである。

本研究ではまた、上述の基礎学問としての興味に加え、そこから派生する高効率な生体分子検出技術や電子移動反応を利用した触媒等の新規機能発現などの応用技術としての価値を見極めることも目的とした。本提案の知見は、随時生体分子検出応用へフィードバックしていく計画である。本研究の目的達成によりもたらされる効果には、タンパク質をはじめとする生体分子の高感度な光検出や電気化学イムノアッセイが含まれる。

### 3. 研究の方法

本研究の実施には、固体表面に支持したグラフェン誘導体を共通基盤として用いる。またグラフェンは市販の CVD グラフェンを基板上に転写して利用する。

光エネルギー移動反応の研究には、これまでにわれわれが GO で蓄積した技術を、グラフェンに適用することから開始する。すなわち GO を基盤に作製した FRET アプタセンサをグラフェンで実現することから開始し、さらにグラフェン誘導体 (GO 還元体など) に展開する。DNA2 重鎖構造をスペーサに用いて、グラフェン誘導体色素間の距離を制御して、この距離に応じた FRET 効率を測定することにより、目的の達成を狙う。

異なるグラフェン誘導体間の光エネルギー移動反応効率を定量的に比較するためには、同一の基板上に複数のグラフェン誘導体を配置することや、マイクロフルイディクス技術を融合する必要がある。後者は、マイクロ流路を用いて濃度の異なる検体を同時に計測したり、マイクロ流路内で化学反応を生じさせて同一基板上に異なる修飾部位を作製することを含む。

電子移動反応の研究には、電気化学反応を用いる。したがって導電性を有するグラフェンを対象に、本研究を推進する。グラフェンでは basal plain と edge とで電子移動反応が異なると考えられるので、この差異を明らかにすることに取り組む。さらに上述の光エネルギー移動反応の例と同様に、DNA2 重鎖構造をスペーサに用いてグラフェン酸化還元種間の距離を制御した試料を作製する。これを用いてサイクリックボルタモグラムを測定し、電気化学反応量を距離の関数として表す。

### 4. 研究成果

(1) グラフェン表面での光エネルギー移動反応を用いたバイオセンサの新規作製

本研究の計画では、グラフェン表面を DNA で修飾した試料の作製が必須である。そこで、SiO<sub>2</sub> 基板上に転写した CVD グラフェンを用いて、グラフェン表面をピレン-DNA アプタマ-色素の順で修飾したグラフェンアプタセ

ンサを構築した。

新規作製したグラフェンアプタセンサは、前立腺ガンマーカーである PSA の存在下で蛍光を発し、PSA を検出できることを明らかにした。一連の実験により、私たちがこれまでに開発してきた酸化グラフェン表面の修飾法が、グラフェン表面にも拡張できることが明らかになった。

(2) 光エネルギー移動反応の定量評価 - グラフェンと酸化グラフェンの差異

グラフェンと酸化グラフェンを基材にしたバイオセンサを同一基板上に作製し、両者の FRET 効率の差異を議論した。PSA 検出に関して、グラフェンアプタセンサがより強い蛍光回復 (酸化グラフェンを用いたアプタセンサのおよそ 3 倍) を示すことを実験により定量的に明らかにした。

(3) 光エネルギー移動反応の定量評価 - グラフェンバイオセンサの検出限界

グラフェンアプタセンサとマイクロフルイディクス技術を融合して、一つのセンサ上に複数の流路を作製し、そのうちのひとつを内部標準として利用するシステムを構築した。これによって、グラフェンアプタセンサの PSA に対する検出限界が 500 ng/mL 未満であることを定量的に示した。これは、本研究計画の特徴である、マイクロフルイディクス技術の融合により初めて得られる、典型的な結果である。

(4) グラフェン色素間光エネルギー移動反応の距離依存性

グラフェン表面をピレン-DNA2 重鎖-色素の順で修飾した試料を作製した。塩基対の数を 12、24、36、48 とした剛直な DNA2 重鎖により、グラフェン-色素間距離を系統的に変化させた試料とした。塩基対数の増加により、試料の蛍光強度が増大することを予備的に示した。なおこの時点ではそれぞれが独立な試料であり、蛍光強度観察も個別の試料を独立に計測したものである。したがってこの結果からは、2 次元 (グラフェン) - 0 次元 (色素) 物質間での FRET 効率を表す式 1 で分母に現れる  $(r/r_0)$  の項のべき数が 6 なのか 4 なのかを明確にすることはできない。

定量性を持った議論を行うために、同一基板上に異なる鎖長を持つ DNA2 重鎖パターンを作製する必要がある。この課題に対して、マイクロ流路内で DNA2 重鎖の修飾を行い、解決を図った。現在、タンパク質検出前後における蛍光強度変化が十分でなく、定量的な比較のためにはさらに条件の検討が必要であることが課題として明らかになった。

(5) グラフェン表面での電子移動反応

作用電極に用いるグラフェンの basal plain と edge との電子移動反応の差異を明らかにすることに取り組んだ。具体的には、転写した CVD グラフェンをピッチの異なるくし形電極に加工する技術の最適化に取り組み、あわせて電気化学測定を開始した。

電気化学反応を行うために必要な cm<sup>2</sup> スケ

ールのグラフェン電極は、基板に転写すること自体は問題なく行えるが、その後の表面修飾反応によって部分々々で剥離する問題があった。転写基板側の表面修飾によりグラフェンとの密着性を向上させ、これを解決した。この表面修飾は、グラフェン電極の電気化学特性を変化させないことを確認した。実際、 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 、 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4+}$  や  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ 、 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  の電気化学反応において、表面修飾の有無によるサイクリックボルタモグラムの差異は観察されなかった。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Y. Ueno, K. Furukawa, On-chip FRET Graphene Aptasensor, *Int. J. Automation Technol.*, 2018, 12, 37-44. (査読あり)  
DOI:10.20965/ijat.2018.p0037

2. 古川一暎, 上野祐子, 「グラフェン表面へのバイオインターフェース構築と発光型バイオセンサへの応用」, 光技術コンタクト, 2016, 54, 17-26. (査読あり)

3. 上野祐子, 古川一暎, 「グラフェンを生体分子インターフェースに用いたオンチップ型 FRET バイオセンサ」, 炭素, 2016, 275, 199-207. (査読あり)  
DOI:10.7209/tanso.2016.199

4. Y. Ueno, On-chip Graphene Biosensor, *NTT Technical Review*, 14, 2016, 1-5. (査読あり)  
[https://www.ntt-review.jp/archive/ntttechnical.php?contents=ntr201608fa6.pdf&mode=show\\_pdf](https://www.ntt-review.jp/archive/ntttechnical.php?contents=ntr201608fa6.pdf&mode=show_pdf)

5. 上野祐子, 「オンチップ型グラフェンアプタセンサ」, *NTT 技術ジャーナル*, 28 巻, 2016, 31-35. (査読あり)  
<http://www.ntt.co.jp/journal/1606/files/jn20160631.pdf>

6. 古川一暎, 上野祐子, 「グラフェンを用いた発光型バイオセンサ」, *応用物理*, 85 巻, 2016, 496-500. (査読あり)  
<https://www.jsap.or.jp/ap/2016/06/ob850496.xml>

7. K. Furukawa, Y. Ueno, M. Takamura, H. Hibino, Graphene FRET aptasensor, *ACS Sens.*, 2016, 6b00191. (査読あり)  
DOI: 10.1021/acssensors.6b00191

8. Y. Ueno, K. Furukawa, K. Matsuo, S. Inoue, K. Hayashi, H. Hibino, On-chip FRET Graphene Oxide Aptasensor: Quantitative Evaluation of Enhanced Sensitivity by Aptamer with a Double-stranded DNA Spacer, *Anal. Sci.*, 2015, 31, 875-879. (査読あり)  
DOI: 10.2116/analsci.31.875

〔学会発表〕(計 25 件)

1. Y. Ueno, Fabrication and Characterization of Graphene Microelectrode, 16th The International Symposium on Electroanalytical Chemistry, 2017.8.17-20, Changchun, China

2. 古川一暎, 上野祐子, 「グラフェンと DNA のハイブリッド: タンパク質検出センサの構築」, 2017 年電子情報通信学会ソサイエティ大会 (招待講演), 2017.9.12, 東京都市大学

3. 上野祐子, 古川一暎, 櫻村吉晃, 「ベシクル内部から放出された化学物質のグラフェンアプタセンサによる検出」, 日本分析化学会第 66 年会, 2017.9.12, 東京理科大学

4. 上野祐子, 手島哲彦, Ziyang Xu, 古川一暎, 「グラフェン微小電極の作製および電気化学特性の評価」, 第 76 回分析化学討論会, 2016.5.28-29, 岐阜大学

5. 上野祐子, 手島哲彦, 古川一暎, 「パリレン層に支持されたグラフェンくし形電極の作製および電気化学特性」, 第 33 回化学とナノ・マイクロシステム学会, 2016.4.25-26, 東京大学

6. Y. Ueno, K. Furukawa, On-chip FRET biosensor build on graphene-biomolecular-interface, 29th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2016.11.8-11, Kyoto, Japan

7. Y. Ueno, K. Furukawa, On-chip FRET Aptasensor Built on the Graphene-biomolecular-interface, RSC Tokyo International Conference 2016, 2016.9.8-9, Makuhari, Japan

8. Y. Ueno, Z. Xu, K. Furukawa, Electrochemistry at the Edge and the Basal Plane of Graphene Microelectrode: Fabrication and Characterization, The 67th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2016.8.21-26, The Hague, Netherland

9. 上野祐子, 古川一暎, 「オンチップ型グラフェンアプタセンサを用いたタンパク質の検出」, 日本分析化学会第 65 年会 (招待講演), 2016.9.14-16, 北海道大学

10. 古川一暎, 上野祐子, 「グラフェンへのバイオインターフェース構築とタンパク質検出応用」, 第 77 回 応用物理学会秋季学術講演会 (招待講演), 2016.9.13-16, 朱鷺メッセ

11. Y. Ueno, K. Furukawa, On-chip Graphene FRET Biosensor for Protein Detection, 3rd Asian Symposium for Analytical Sciences (Invited), 2016.9.14, Sapporo, Japan

12. 上野祐子, 古川一暎, 「グラフェンを利用した蛍光検出型オンチップバイオセンサ」, 日本化学会第 96 春季年会 (招待講演), 2016.3.24-27, 同志社大学

13. Y. Ueno, K. Furukawa, T. Teshima, M. Takamura, H. Hibino, Fabrication of patterned graphene electrode with a transfer process assisted by a parylene thin film, Pacificchem 2015 (Invited), 2015.12.15-20, Honolulu, USA

14. 古川一暎, 上野祐子, 「タンパク質を検出する! グラフェンを用いたバイオセンシング」, 化学フェスタ (招待講演), 2015.10.13-15, タワーホール船堀

15. Y. Ueno, K. Furukawa, On-chip Graphene FRET Biosensor, iCeMS International Symposium, 2015.9.23-26, Kyoto, Japan

16. Y. Ueno, K. Furukawa, Protein Detection by Using Graphene FRET Aptasensor, RSC Tokyo International Conference 2015, 2015.9.3-4, Makuhari, Japan

17. Y. Ueno, K. Furukawa, On-chip graphene FRET biosensor Symposium on Novel sensor and its application in environmental field, Symposium on Novel sensor and its application in environmental field (Invited), 2015.8.18, China University of Geoscience, Beijing, China

18. Y. Ueno, K. Furukawa, On-chip Graphene FRET Biosensor for Protein Detection, 15th ISEAC (Invited), 2015.8.13-16, Changchun, China

19. 上野祐子, 古川一暎, 「酸化グラフェンを用いたオンチップ型 FRET バイオセンサ」酸化グラフェン研究会シンポジウム (招待講演), 2015.6.26, 熊本大学

20. 上野祐子, 古川一暎, 「グラフェンを利用した蛍光検出型オンチップ酸化グラフェン aptasensor」, 次世代センサ協議会シンポジウム (招待講演), 2015.6.17, 日本化学会館

21. 古川一暎, 上野祐子, 「グラフェン表面へのタンパク質認識機構の構築」, 東北大学高分子・ハイブリッド材料研究センター 2015 PHyM シンポジウム (招待講演), 2015.6.17, 東北大学

22. 上野祐子, 古川一暎, 高村真琴, 日比野浩樹, 「グラフェン aptasensor 表面における分子吸着特性の QCM-D による評価」, 分析化学討論会, 2015.5.23-24, 山梨大学

23. 古川一暎, 上野祐子, 高村真琴, 日比野浩樹, 「グラフェン - 色素間の蛍光共鳴エネルギー移動の距離依存性」, 第 62 回応用物理学会春季学術講演会, 2015.3.11-14, 東海大学

24. K. Furukawa, Y. Ueno, M. Takamura, H. Hibino, Protein Recognition on Graphene Surface Modified by DNA Aptamer 7th International Symposium on Surface Science, Matsue, Japan

25. 古川一暎, 上野祐子, 高村真琴, 日比野浩樹, 「グラフェン表面に構築した FRET aptasensor」, 第 75 回応用物理学会秋季学術講演会, 2014.9.17-20, 北海道大学

〔その他〕  
ホームページ等

<https://kenkyu.hino.meisei-u.ac.jp/softmatter/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古川 一暎 (FURUKAWA KAZUAKI)  
明星大学・理工学部・教授  
研究者番号: 40393748

### (2) 研究分担者

上野 祐子 (UENO YUKO)  
日本電信電話株式会社 NTT 物性科学基礎研究所・機能物質科学研究部・主幹研究員  
研究者番号: 30589627

日比野 浩樹 (HIBINO HIROKI)  
日本電信電話株式会社 NTT 物性科学基礎研究所・機能物質科学研究部・部長  
研究者番号: 60393740  
(平成 26 年度まで研究分担者)