

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 25 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26600065

研究課題名(和文)分子分解能を有する3次元構造センサの開発と細胞固液界面構造解析への応用

研究課題名(英文) Development of 3-dimensional-structure sensors with molecular-level resolution and their application to solid/liquid interface analysis on biocells.

研究代表者

本間 敬之 (HOMMA, Takayuki)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：80238823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、極薄有機膜や固液界面近傍の深さ方向の分子構造変化をナノスケールで観察し、in vivo(生体内)観察・解析をラベルフリーで可能とする革新的なセンシング手法を確立し、分子レベルからの細胞生理機構の研究への応用の可能性を探ることを目的とした。表面増強ラマンを極めて高感度かつ汎用的に適用可能とする透過型プラズモンセンサを用い、自己集積化単分子膜や脂質二重膜、細胞等の表面近傍の化学構造測定に成功した。また膜の深さ方向の構造分布の0.1nmレベルでの測定を実現した。さらに表面修飾によりpH変化の測定にも成功した。本手法は種々の細胞腫の識別や動的測定による代謝の解析など幅広い応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：A novel measurement tool, which is capable to analyze chemical structures of ultra-thin films or interfaces, has been developed, based on surface enhanced Raman scattering with newly developed "plasmon sensors," which enhances local intensity of the Raman signals. Various types of the plasmon sensors have been developed, and as a result, ultra-thin organic films, i.e. self-assembled monolayers, lipid bilayers, cell membranes, were successfully analyzed. Particularly, inner chemical structure of the films was measured with a depth resolution of 0.1nm. Developed methodology is expected to apply wide areas such as diagnostics of various types of cells (e.g., cancer cells) as well as fundamental researches for biomedical field.

研究分野：機能表面化学

キーワード：表面・界面 プラズモニクス 表面増強ラマン散乱 細胞表面 ナノ・マイクロファブリケーション
固液界面

1. 研究開始当初の背景

固液界面の現象は、電池、光触媒、めっき、腐食などの電気化学分野や細胞膜などのバイオ分野で重要な機能発現の場となっているが、これを原子分子レベルの分解能で3次元測定する方法は非常に限られている。チップ増強ラマン散乱法は、原子間力顕微鏡のAuコート探針を用いて10nm程度の面分解能を達成しているが、原理的に深さ分解能の向上は困難である。一方、典型的な固液界面である細胞表面の分子構造を生きたまま解析するには、主として蛍光分子の結合(ラベル化)により研究が進められてきた。しかし、蛍光分子自体が細胞分子に与える影響(分子質量、立体障害など)が懸念される上に、未知分子への対応が困難であるなどの課題を抱えている。本研究者らは、金属粒子をコートした球面石英基板を測定表面に接触させ、これを通して励起光を照射することにより非破壊で表面分析が行える新規な表面増強ラマンセンサを開発し、精密なラマン分光顕微鏡と組合せることにより、深さ分解能0.1nmでグラファイトの層状構造の観察に成功した。まためっき液と金属基板の固液界面について、1nm以下の深さ領域で分子の吸着状態の変化の観察にも成功している。さらに感度についても蛍光ラベル法と同程度の10ppb以下の極微量分子の検出に成功している。このような状況下、本研究者らは、上記のセンサを微小なシリカチューブなどと複合化させることにより、ナノメートル以下の3次元ラマン画像を測定できるセンサを開発すると共に、本センサを用いてラベルフリーで生きた細胞表面の観察を行い、糖鎖などの解析やイオンチャンネル、輸送体、受容体などの代謝に関わる部位の動的変化などの解析の可能性を検討した。

2. 研究の目的

上記を踏まえ、本研究ではサブナノメートルの3次元空間分解能をもって固液界面、特に細胞表面のin vivo(生体内)観察・解析をラベルフリーで可能とする革新的なセンシング手法を確立し、分子レベルからの細胞生理機構の研究への応用の可能性を探ることを目的とした。提案した新規な観察手法は、ナノサイズの金属粒子(Au, Ag等)を配したナノ構造体(シリカチューブ等)を細胞表面に接触させ、金属ナノ粒子近傍の光電界増幅効果による局所電界勾配急峻化を利用し、深さ方向の空間分解能0.1nm、面分解能1nm程度を達成するものであり、細胞表面の糖質、イオンチャンネル、受容体など細胞の生理機能に重要な部位の分子レベルの構造および代謝メカニズムの解明への寄与が期待される。本研究の成果は、バイオ分野全体の基礎研究のみならず、がん化のメカニズム解析や検知などの医療分野への応用も考えられ、極めて大きな波及効果が期待される。

3. 研究の方法

本研究では、表面増強ラマン散乱に着目し、独自開発のプラズモンセンサを用いて細胞表面などの高精度・高分解能解析を可能とする手法の開発を進めた。センサおよび計測手法の開発が主要な目的となるため、詳細は得られた結果と共に次項にまとめて示す。

4. 研究成果

(1) マルチレンズアレイ型(MLA)プラズモンセンサの開発

試作したプラズモンセンサの作製法とSEM像をそれぞれ図1および図2に示す。シリコーン樹脂(PDMS)フィルムを型に押しつけて転写し(a)、プラスチック基板のセンサを作製した(d)。その表面にAuやAgのナノ粒子を被覆することにより、図2のようなマルチアレイ型のセンサを作製した。

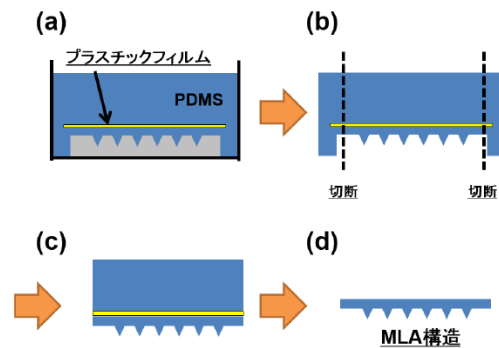


図1 MLA センサの作製プロセス

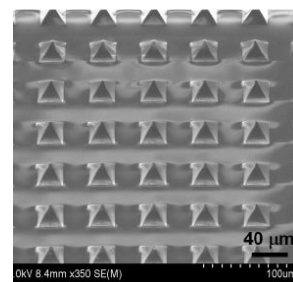


図2 MLA センサのSEM像

本センサをAu表面に吸着させたJGB(ヤスグリーンB)の極薄膜に接触させ、背面から励起光を照射してセンサとDLC膜の界面に焦点を当てることにより、図3に示すように通常のラマン散乱に比べて極めて高い感度でスペクトルを観察することができた。

次に、図4に示すようにシリカチューブ型のMLAセンサをSiの陽極酸化法により作製した。本センサとPDMSを接触させてラマンスキャン測定を行ったところ、図5のようにその先端部位で増強ラマンが観察された。またJGBを吸着させラマンのスキャン測定を行ったところ100nmの面分解能でスペクトルを測定することができた。

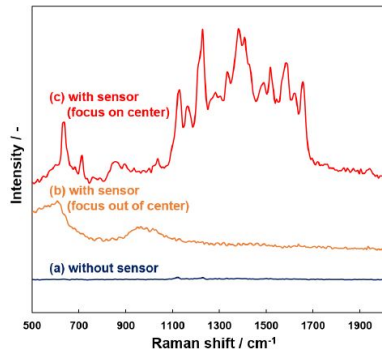


図3 MLA センサによる Au 上に吸着させた極薄 JGB 膜のラマンスペクトル (従来ラマンとの比較)

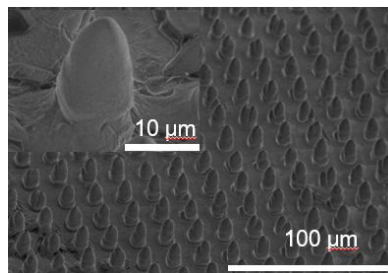


図4 シリカチューブ型 MLA センサ

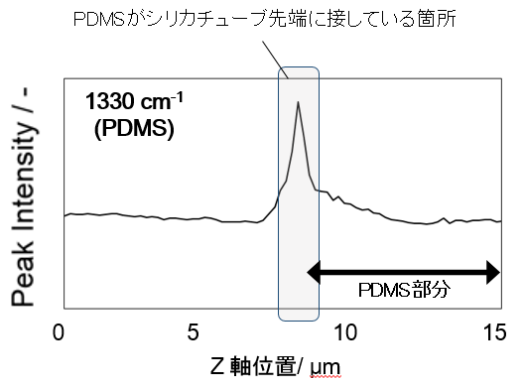


図5 シリカチューブ型 MLA センサによる PDMS のラマンピーク分布

(2) プラズモンセンサによる有機膜表面の測定および構造解析

図6に示すように Au ナノ粒子を被覆させたセンサ上にパラメルカプト安息香酸 (p-MBA) を吸着させ、その COOH 基の pH による変化を利用して pH センサとしての動作を検討した。

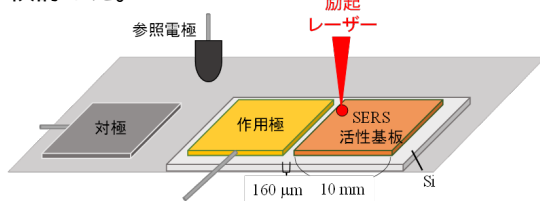


図6 p-MBA 修飾プラズモンセンサ

その結果、図7に示すように、COOH (1700cm^{-1}) と COO^- (1440cm^{-1}) のピーク強度比が pH によって変化することから、pH センサとしての有効性を確認した。

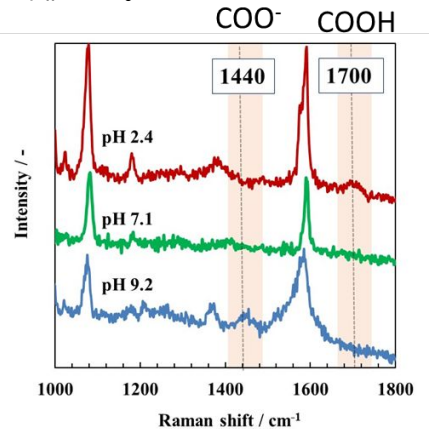


図7 センサ上に修飾した p-MBA スペクトルの pH による変化

次に、図8に示すように SiO_2 基板表面にアミノプロピルテトラエトキシシラン (APTES) の単分子膜を修飾し、その上に Ag ナノ粒子を蒸着したセンサを作製して膜厚 (深さ) 方向にスキャンした。そのときの Ag-N 結合と Si- CH_2 構造の深さプロファイルをそれぞれ図9 (a)および図9 (b)に示す。

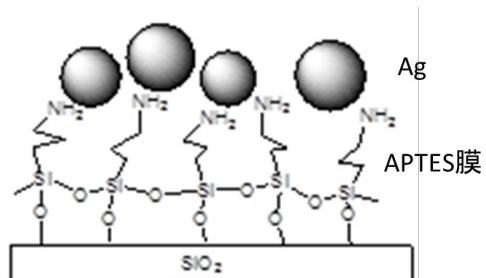
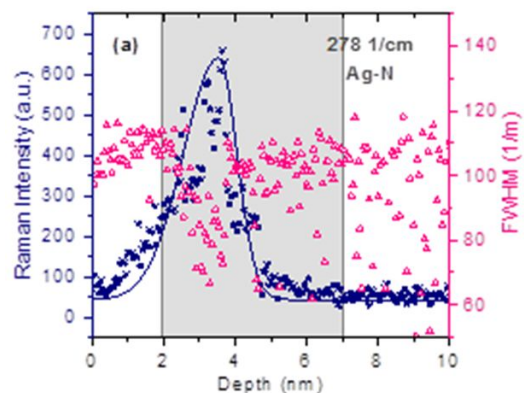
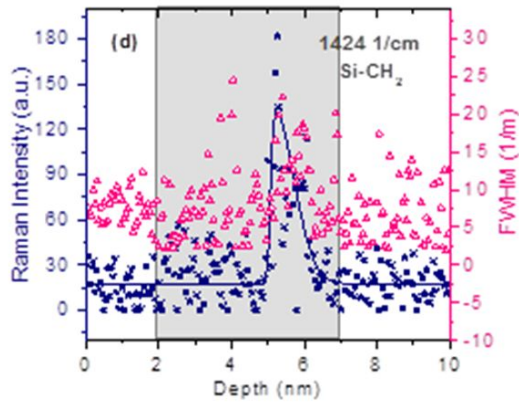


図8 Ag 蒸着 APTES 修飾膜センサ

約 5nm の APTES 膜のうち、表面近傍に Ag-N 結合が存在し、また SiO_2 基板側に Si- CH_2 結合が存在することがわかり、0.1nm レベルでの有機薄膜の深さ方向の測定に成功した。



(a) Ag-N 結合のラマンピーク強度の深さプロファイル



(b) Si-CH₂結合のラマンピーク強度の深さプロファイル

図9 APTES膜のラマン深さプロファイル

(3) 生体膜および細胞膜のラマン測定セルの開発

図10に開発した測定部の全体図を示す。測定装置は、0.1nmの分解能で測定できるように高精度ピエゾステージの上に装着されている。また図11に示すように測定セルはNA1.4の100倍油浸レンズで測定が可能のように試料とレンズの間隔を0.3mm以下に保てる構造となっている。また反射測定以外に透過照明でも測定できるように反射鏡で下部から照明光が入射できるような構造となっている。

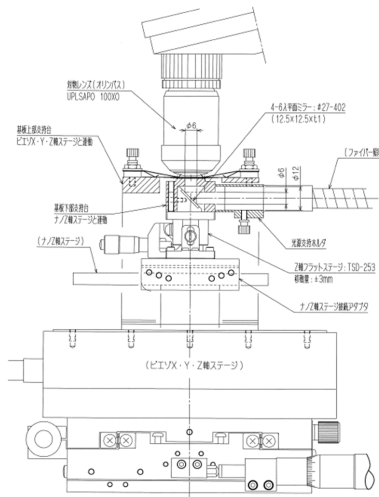


図10 バイオ用ラマンスペクトル測定装置

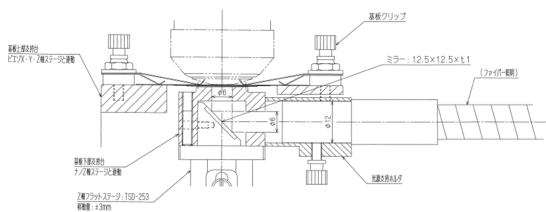


図11 バイオ用測定セル

(4) 生体膜・細胞の測定

図12にセンサを用いた脂質2層膜の測定系の模式図を示す。マイカ基板に展開した脂質2層膜に透過型センサを接触させ深さ方向にスキャンすることにより、膜の深さプロファイルを測定した。

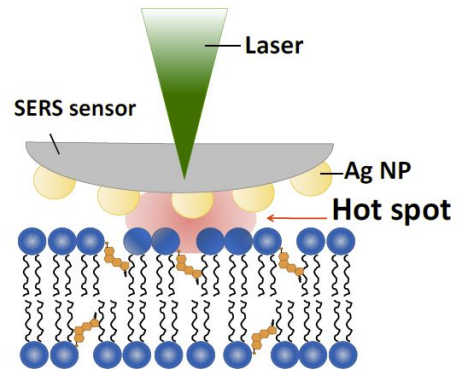


図12 プラズモンセンサを用いた脂質2層膜の測定

図13にセンサを用いたときのラマンスペクトルをセンサなしのものと比較して示す。センサによる表面増強ラマンスペクトルは極めて高感度で測定できることがわかる。

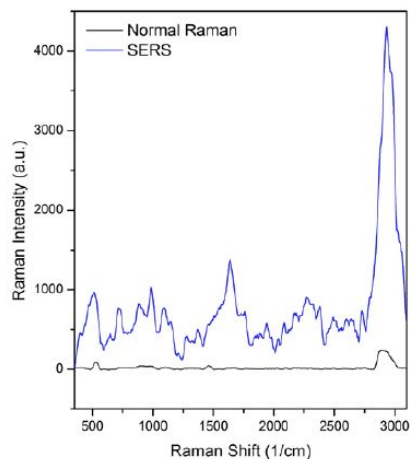


図13 脂質2層膜の表面増強ラマンスペクトル

図14に親水基に存在する1670cm⁻¹のコレステロールおよび1308cm⁻¹の炭化水素鎖の深さプロファイルを示す。これらのラマンピークの強度プロファイルは2層脂質膜構造とよく一致することがわかった。

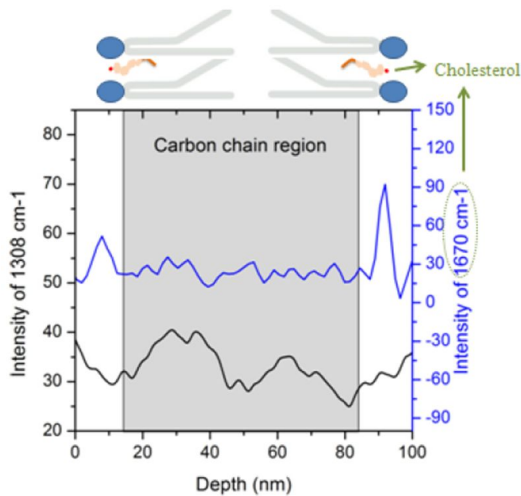


図 1 4 脂質 2 層膜の深さプロファイル

図 1 5 にチャイニーズハムスター卵黄細胞 (CHO-K1) をプラズモンセンサを用いて測定したスペクトルを示す。通常のラマン測定では細胞内部由来のスペクトルまで現れるが、センサを用いた SERS スペクトルでは表面特有のスペクトルが得られた。また図 1 6 に示すようにタンパク質分解酵素 (TrypLE™ Express) 処理により細胞表面の構造変化を極めて明瞭に観察することができた。

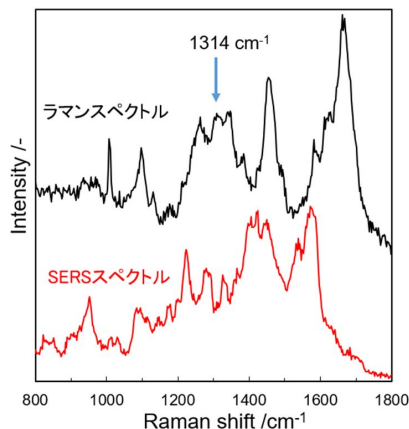


図 1 5 CHO-K1 細胞の SERS スペクトル

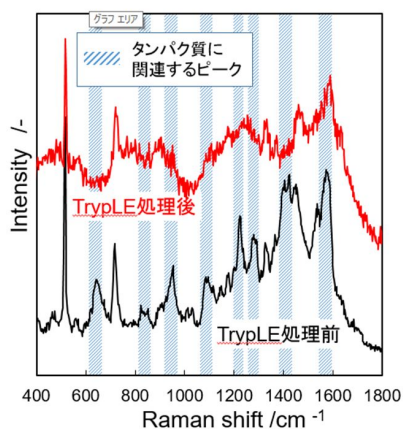


図 1 6 タンパク質分解酵素による細胞表面変化

以上のように、本研究により開発した手法により、脂質 2 層膜や細胞表面など、従来測定が困難であった極薄有機膜の化学構造、特に界面近傍の深さ方向の化学構造の変化の解析に成功した。これは生体膜や細胞の解析への応用という観点から学術的に大きな貢献であると同時に、本手法を動的測定に応用することにより、例えば細胞の代謝やがんのその場識別など、広範な領域に利用されることが期待される。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Y. Sun, M. Yanagisawa, M. Kunimoto, M. Nakamura, T. Homma, “Depth profiling of APTES self-assembled monolayers using surface-enhanced confocal Raman microspectroscopy”, *Spectrochim. Acta A*, 査読有, **184** (2017) pp.1-6.
DOI:10.1016/j.saa.2017.04.036

Y. Sun, M. Yanagisawa, M. Kunimoto, M. Nakamura, T. Homma, “Estimated phase transition and melting temperature of APTES self-assembled monolayer using surface-enhanced anti-stokes and stokes Raman scattering”, *Appl. Surf. Sci.*, 査読有, **363** (2016) pp. 572-577.
DOI:10.1016/j.apsusc.2015.12.035

[学会発表](計 13 件)

荒原涼人, M. Bertz, 柳沢雅広, 本間敬之, “CHO-K1 生細胞の透過型プラズモンセンサを用いた表面増強ラマン分光計測の試み”, 電気化学会第 84 回大会, 2017 年 3 月 25 日, 首都大学東京 (東京, 八王子)

T. Homma, “Theoretical and in situ SERS analysis on the electrochemical micro/nano fabrication processes”, 5th International Symposium on Materials Science and Surface Technology, 2016 年 8 月 3 日, KGU Kannai Media Center (Kanagawa, Yokohama) (国際, 招待講演)

佐藤裕太, 中村雅俊, 柳沢雅広, 本間敬之, “シリカチューブアレイ構造を用いた透過型プラズモンセンサ作製の試み”, 表面技術協会第 133 回講演大会, 2016 年 3 月 22 日, 早稲田大学 (東京, 新宿)

中村雅俊, 佐藤裕太, 柳沢雅広, 本間敬之, “固液界面の in situ ラマン解析を目的とした poly(dimethylsiloxane) 製プラズモンセンサの開発”, 表面技術協会第 133

回講演大会，2016年3月22日，早稲田大学（東京，新宿）

Y. Sun, M. Yanagisawa, M. Kunimoto, M. Nakamura, T. Homma, “Study on chemical structure inside APTES SAMs by using SERS: depth profile and phase transition process”, 第5回CSJ化学フェスタ 2015年10月13日，タワーホール船堀（東京，江戸川）

T. Homma, Y. Sun, M. Kunimoto, M. Saito, M. Yanagisawa, “In situ analysis of electrochemical fabrication process using Raman spectroscopy with plasmonic sensors”, 66th Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2015年10月7日, Taipei (Taiwan) (国際, 招待講演)

M. Yanagisawa, M. Kunimoto, T. Homma, “Nano-contact analysis using plasmonic sensors”, International Tribology Conference 2015, 2015年9月19日, Tokyo University of Science (Tokyo, Katsushika) (国際)

佐々木萌，花井智也，國本雅宏，柳沢雅広，本間敬之，“表面増強ラマン測定による電極界面水素イオン濃度解析の試み”，2015年度電気化学秋季大会，2015年9月11日，埼玉工業大学（埼玉，深谷）

花井智也，佐々木萌，國本雅宏，柳沢雅広，中井浩巳，本間敬之，“電極界面におけるpH測定系の開発に向けた理論的検討”，表面技術協会第132回講演大会，2015年9月10日，信州大学（長野，松本）

本間敬之，“新規な電気化学的ナノ構造形成プロセスの開拓と実践”，電気化学会第82回大会，2015年3月15日，横浜国立大学（神奈川，横浜）（招待講演）

齋藤美紀子，三田正弘，柳沢雅広，本間敬之，“ゾルゲル法と電解析出法による透過型プラズモンセンサの作製”，表面技術協会第131回講演大会，2015年3月4日，関東学院大学（神奈川，横浜）

Y. Sun, M. Yanagisawa, M. Kunimoto, T. Homma, “In-situ temperature measurements on the phase change point of monolayer APTES by surface-enhanced anti-stokes and stokes Raman scattering”, 7th International Symposium on Surface Science (ISSS-7), 2014年11月6日, Kunibiki Messe (Shimane, Matsue) (国際)

T. Homma, T. Yamamoto, M. Nakamura, M. Kunimoto, M. Saito, M. Yanagisawa, “In situ surface enhanced Raman spectroscopy analysis of the electrochemical

deposition process using plasmon antenna sensors”, 2014 ECS & SMEQ Joint International Meeting, 2014年10月8日, Cancun (Mexico) (国際, 招待講演)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間敬之 (HOMMA, Takayuki)
早稲田大学 理工学術院
教授
研究者番号：80238823

(2) 研究分担者

柳沢雅広 (YANAGISAWA, Masahiro)
早稲田大学 ナノ・ライフ創新研究機構
客員上級研究員
研究者番号：20421224

(3) 連携研究者

()

研究者番号：