

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870089

研究課題名(和文) 光ナノアンテナを備えた蛍光相関分光分析デバイスによるプリオン病の早期診断法の開発

研究課題名(英文) Development of early diagnostic method of prion diseases by a fluorescence correlation spectroscopic device with optical nano antenna structures

研究代表者

横川 雅俊 (Yokokawa, Masatoshi)

筑波大学・数理物質系・助教

研究者番号：50447885

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)：プリオン病の指標となる異常型プリオンタンパク質の高精度・迅速・ハイスループット分析を目的に、金属ナノギャップ型光ナノアンテナの光増強効果を利用した超微小光励起空間を蛍光相関分光法に適用し、高感度FCSセンサーシステムの構築を行った。シード法により合成された金ナノロッドを、分子スペーサーを介して互いに連結することで、効率的にONA構造を形成する事が出来た。一方、FCSとの統合においては、構造の表面処理及び励起光強度の最適化に時間を要するが初期的なデータを得ることが出来た。

研究成果の概要(英文)：In order to analyze abnormal-type prion proteins as an index of prion disease with high accuracy, rapid and throughput, we have developed a system of highly sensitive fluorescence correlation spectroscopy using enhancement of electric field in the gap region between metal nano structures. First, we developed the method to efficiently build optical nano antenna structures by connecting gold nano rods synthesized by the seed method via organic linker molecules. We also got preliminary results of FCS based on our integrated system although fine optimization of excitation light source and surface modification of the metal nano structures are required.

研究分野：分析化学

キーワード：表面プラズモン 蛍光相関分光法 バイオセンサー

1. 研究開始当初の背景

ライフサイエンスは、21世紀をリードする主要な技術分野として、世界各国で研究開発が進められている。我が国においても、第四期科学技術基本計画においてライフイノベーションの推進が取り上げられており、「革新的な予防法の開発」・「早期診断法の開発」等が、今後急速な少子高齢化を迎える我が国の緊急の課題と位置付けられている。ここにおいて、従来の画一的な医療ではなく、より個人に対し疾患の早期診断を行い、適切な対応（先制介入治療・予防的治療）を行う「個の医療」を実現することが強く求められている。

こうした中、現在においてなお難治性かつ診断が極めて困難な疾患の一つとしてプリオン病が挙げられる。その病原体とされる異常型プリオンタンパク質 PrP^{Sc} は、シードとして感染能を持ち、正常型プリオンタンパク質 PrP^C の異常型 PrP^{Sc} への変異を触媒し、異常凝集を引き起こす事で組織内に沈着する（シード説）。疾患の診断においては PrP^{Sc} の検出が重要とされるが、その検出の難しさから病理学的所見に依存する部分が多い。プリオン病には、クロイツフェルト・ヤコブ病のように移植患者に多発した例や、狂牛病のように我々の食が感染経路となった例など、感染ルートは様々である。その予防策として行われた狂牛病問題における輸入牛全頭スクリーニング検査の例では、従来の ELISA 法に基づく簡易検査では健康な牛からも偽陽性が得られるトラブルが頻発し、その間、食肉出荷停止の措置がとられるなど、経済的損失を含む大きな社会問題となった。ここに至って、プリオン病の早期発見及び予防につながる検査手法、すなわち、異常プリオンタンパク質の高感度検出及び同定技術の開発は避けて通れない。

このような状況を踏まえ、我々は、生体から採取した極わずかな試料等に対し効果的な生化学分析を行うための実験手法を開発し、各種分析を進めてきている。例えば、シャペロニン GroEL の二次元結晶試料に対し液中高速原子間力顕微鏡および一分子蛍光技術を用いて、その分子構造及びタンパク質凝集抑制機能を分子レベルで解析してきており、また、バイオセンサへの応用を目指し生体関連物質検出用高感度電気化学マイクロデバイス等の開発も行ってきている。

2. 研究の目的

本研究では医療・食品分野の現場において、プリオン病の指標となる異常型プリオンタンパク質の高精度・迅速・同時多項目（ハイスループット）分析を実現する新規分析システムの開発を行う。具体的には、分子同定、分子濃度定量に加え、“分子状態（形状・凝集度）分析”という新たなパラメータを備えた新型バイオセンサを、最先端の光学・バイオ観察技術の融合により実現する。

まず光学からのアプローチとして、金属ナノギャップ型光ナノアンテナの光増強効果を利用した超微小光励起空間の形成を行う。ナノ構造を持つ金属構造体においては、その自由電子が光の電場と結合して集団運動するプラズモン共鳴を示すことが知られている。光がプラズモンと結合することで、金属構造体近傍に局在電場を形成する。特に、本研究で採用する光ナノアンテナ (Optical Nano-Antenna: ONA) の構成では、アンテナ構造中央部で発生する光電場の強大な増強効果（100-1000倍）が見られ、その利用は蛍光分子励起光源の劇的な微小化・効率向上に寄与すると期待される。

バイオ側からのアプローチとしては、微小観察領域を出入りする分子の運動を検出することで、その形状・大きさ・濃度を高感度に分析する蛍光相関分光法を用いて、プリオンタンパク質の凝集状態を高感度に分析する。蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy: FCS) とは、微小領域における分子のゆらぎを一分子レベルで検出・分析する手法であり、分子の有無（数・濃度）に関する情報のみならず、クロマトグラフィー分析のように対象の形状・大きさに関する情報までも解析可能な強力な手法がある。すなわち、同一のアミノ酸配列を持ちながら、異常凝集を引き起こす PrP^{Sc} と、単量体として存在する PrP^C とをわけて検出することが可能である。一般的な FCS においては、コンフォーカル系を利用した微小光励起空間を利用するが、回折限界のためその最小サイズはマイクロメートルオーダーに制限され、領域内に多くの分子が混在した状態で測定せねばならず、データが複雑化し検出感度の低下を招いている。

我々は、こうした技術を融合させ、ONA の効果によりアンテナ中央部に局在化・増強された光電場を FCS の超微小光励起空間として用いることで、その空間体積および必要とする光量をそれぞれ3桁以上縮小し大幅なノイズ低減を図る。これにより、FCS センサーシステムの劇的な機能向上を図る。

3. 研究の方法

(1) 金属ナノギャップ型光アンテナの設計・加工・評価。ONA の基本特性は、用いる金属構造体に固有の表面プラズモンの性質で決まる。そこで、まず単一 ONA に外部より光を照射した際に構造に誘起される光電場の空間分布を、シミュレーションにより求めた。電場分布に於いて、ギャップ距離や構造形状が計算結果に及ぼす影響を明らかにする。構造材料には可視光波長帯で利用可能、かつ、生体試料に対して不活性な金を選択し、検討を行う。ONA を構成する金属ナノロッド (NR) の寸法は、全長 50-200 nm、ギャップ長は 5-50 nm 程度とし、シミュレーションおよび光学実験の結果を元に構造の最適化を図った。構造の作製は、電子線リソ

グラフィ法と集束イオンビームによる加工技術とを組み合わせたトップダウンプロセスと、開発したNR鎖固相合成法によるボトムアッププロセスの両サイドからアプローチを試みた。

(2) 金属ナノロッド(NR)鎖固相合成法の確立。 界面活性剤水溶液中で金ナノ粒子をロッド状に成長させるシード法を用い、長さに揃えたNRを作製する。Au NRにおいては、その両端部のみにAu(111)面が見られることが知られており、そこに選択的に結合する金-チオール反応を利用した化学修飾を施し、NRの連結に用いる。最後に、ペプチド固相合成法を模したNR鎖固相合成法を確立した。合成NR鎖はチオール還元脱離法を用いて回収する。

(3) 光アンテナを利用した蛍光相関分光分析(ONA-FCS)システムの構築。 倒立型光学顕微鏡をベースに、上記ONAを備えたマイクロデバイス、光源(共焦点光学系)及び検出器をマウントした。励起光源に関しては、He-Neレーザーの他、近赤外領域のレーザーを複数用意し、同時多波長励起を実現するシステムとした。

構築したONA-FCSシステムに対して、濃度を振った量子ドット(Q-dot)および蛍光ラベル化されたプリオンタンパク質 PrP をモデル試料に、その性能評価を行った。本システムは、従来のFCS装置と比較して3桁以上小さな超微小光源を利用するため、測定におけるバックグラウンドの軽減にくわえ、単一分子由来の蛍光をより広い濃度範囲で分析する事が可能となる。一方で、光領域内に試料が留まる時間が短くなるため、検出器にはより高い時間分解能が求められる。Q-dotに関しては、表面をストレプトアビジンで修飾したものを用意した。アビジン-ビオチン結合を介して各種抗体をQ-dotでラベル化する事により、多種多様な目的成分の分析にも利用可能であると期待される。また、蛍光ラベル化プリオンタンパク質 PrP についても同様の実験を行った。

4. 研究成果

(1) 金属ナノギャップ型光アンテナの設計・加工・評価。 有限差分時間領域(FDTD)法による電磁理論的解析により、Au NRおよびAu ONA構造近傍における電場増強を評価した。短軸径12 nm、長軸径44 nmのロッド状のAu NRと、それを8 nmのギャップを介して配列したONA構造について、直線偏光近赤外線($\lambda = 880$ nm)を照射した際の計算を行った。その結果、Au NR表面近傍ではその周囲と比べ1,000倍以上の電場増強が認められた。特に8 nmのギャップを介して連結されたONA構造ではより顕著な電場増強が認められ、Au NR単体に比しても5倍以上の電場増強が得られた。

続いて、シード法によるAu NRの合成を行った。硝酸銀の濃度を調整することで、大きさやアスペクト比の異なるAu NRが得られた。また、Au NRの吸収スペクトルを測定した結果、二つの強い吸収ピークをもつスペクトルが得られた。短波長側のピークはAu NRの短軸に、長波長側のピークは長軸に由来する表面プラズモン共鳴を示している。検討の結果、長波長側の吸収極大波長を600-1200 nmの範囲に持つAu NRをそれぞれ合成する事が出来た。一方、電子線リソグラフィ法によるAu NRの形成においては、それに先立つ金属成膜の影響から、表面構造が荒く、多結晶性の構造となっており、得られる吸収スペクトルのデータも計算値から大きくずれたものとなった。

(2) 金属ナノロッド(NR)鎖固相合成法の確立。 まず、合成したAu NR表面のDNA修飾を試みた。カチオン性界面活性剤臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(CTAB)中で合成されたAu NRは、その表面はCTABで覆われている。そこで、負の電荷を持つDNAとCTABとの静電効果による凝集を抑制するために、CTABをアニオン性界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム(SDS)とポリビニルピロリドン(PVP)に置換した。前述したように、シーディング法により形成されるAu NRは、その側面と底面とでそれぞれ異なる結晶面を持つことが知られている。この結晶構造の異方性を利用することにより、Au NRの底面のみにDNA修飾を施した。このようにして互いに相補的なDNA配列をもつDNA修飾Au NRを用いることで、ナノギャップを備えた直鎖状のONA構造の形成が可能となる。しかしながら、溶液中で単純にそれらを混合しただけでは、Au NRの結合数の制御はできず、長さが異なるONA構造が形成され、その光学特性にも差異が生じてしまう。そこで本研究では、マイクロビーズを担体とし、逐次的にAu NRを伸長させることで配列・配向を制御したONA構造を構築し、最後に構造を回収する手法を開発した。現時点では、収率は極めて低い状況ではあるが、目的の数のAu NRが結合したONA構造を構築することに成功した。

(3) 光アンテナを利用した蛍光相関分光分析(ONA-FCS)システムの構築。 作製したAu NR及びAu NR連結型ONA構造の光学特性の評価を行った。まず、前述した方法で作製したDNA修飾Au NRを蛍光色素TO-PRO-3(最大励起波長: 640 nm)でDNA染色し、蛍光顕微鏡下で観察をおこなった。その結果、ONAを形成することで、Au NR(二本鎖DNAにより修飾)単体より強く、ブロードな蛍光シグナルが確認された。ONAの蛍光強度が幅広い理由としては、Au NR同士の結合角度が一定でないことが考えられる。今後、Au NRの結合の角度を揃える

方法を検討する必要がある。以上の結果から、ナノ ONA 構造を構築することで、NR 単体と比しても数倍以上の強い蛍光が得られることが確認できた。

最後に、ONa 構造を利用した FCS 測定を行った。研究当初は、蛍光物質の励起光源となるナノアンテナ構造があまりにも微小であるため、時間分解能の観点から蛍光シグナルのゆらぎの測定が困難であると予想されたが、実際には一度蛍光シグナルが観察されると、それ以降蛍光シグナルを放ち続けるという挙動がくり返し観察された。恐らく、強い電場勾配のため光ピンセットの効果が働き、蛍光物質をトラップしているのではないかと思われる。この点に関しては、励起光強度の最適化や、ONa 構造表面への吸着を抑制するような表面処理、そして検出系の最適化により克服することが出来ると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

Shunsuke Suzuki, Hiroaki Suzuki, Masatoshi Yokokawa, Solid-phase synthesis of gold nanoantenna as a nano-scale fluorescent light source, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, 2015 年 12 月 15-20 日, Honolulu(USA)

鈴木駿介、鈴木博章、横川雅俊、近ナノアンテナ構造の電場増強を用いた高感度光センシング、電気化学秋期大会、2015 年 10 月 28-30 日、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

鈴木駿介、鈴木博章、横川雅俊、近ナノアンテナ構造の電場増強を用いた高感度光センシング、電気化学秋期大会、2015 年 9 月 11-12 日、埼玉工業大学(埼玉県深谷市)

横川雅俊、金属ナノ粒子を用いたバイオマニピュレーションとセンシング、第四回次世代の物質科学・ナノサイエンスを探る、2015 年 1 月 9 日、北海道大学(北海道札幌市)

鈴木駿介、鈴木博章、横川雅俊、金ナノアンテナ構造の電場増強による蛍光増強効果、化学とマイクロ・ナノシステム学会第 30 回研究会、2014 年 10 月 2-3 日、北海道大学(北海道札幌市)

鈴木駿介、鈴木博章、横川雅俊、金ナノロッドの電場増強による蛍光増強効果、第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、2014 年 9 月 11-13 日、岡山大学(岡山県岡山市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

該当なし

取得状況(計 0 件)

該当なし

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横川 雅俊 (YOKOKAWA, Masatoshi)

筑波大学・数理物質系・助教

研究者番号：50447885

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし