

# 金属ナノウェルによる表面プラズモンの局在化と蛍光分析への応用

研究代表者 京都府立大学人間環境学部助教授 石田 昭人

## 1. はじめに

ナノ空間に局在化した光、すなわち近接場と分子の相互作用を明らかにすることは分子光エレクトロニクスデバイスの根幹技術となるばかりでなく、DNA・蛋白分析用マイクロアレイの一層の高密度化など、限界に近づきつつある既存技術にブレークスルーをもたらすと期待される。近接場の中でも表面プラズモン場は光を金属の表面に局在化することができるうえ、特異な電場増強効果をもつので、金属表面に修飾された分子を高効率で光励起しながら、なおかつ分子と表面の間の電気伝導を利用できるなど、デバイスへの応用上特に期待される。このような観点から本研究代表者は金薄膜表面に光応答性分子であるポルフィリンの自己組織化単分子膜を形成し、これを表面プラズモン場で励起して、蛍光特性と光電気化学特性を詳細に検討した結果、期待通り、表面プラズモン場が金表面に修飾した有機分子薄膜の光励起法として極めてすぐれた特性を有していることを明らかにすることができた。<sup>1)</sup>

長波長可視光で励起される表面プラズモンの電場は金属表面から垂直方向には数十nmに強く局在化されているものの、水平方向には数 $\mu\text{m}$ も伝播する。金属表面に修飾した光応答性分子薄膜を高効率で励起できるのはまさにこの特性の利用に他ならないが、金属表面に故意に凹凸を形成した場合、伝播してきた表面プラズモンが散乱され、孔の内部や突起の周囲に電場が強く局在化されると期待される。さらに、最近の研究では金属表面に微小開口を形成しておく、平滑な金属表面の場合には不可欠なプリズムを用いる全反射照明を行うことなく、表面プラズモンを励起できることが示唆されている。これは蛍光分析や分子エレクトロニクスデバイスへの応用の観点から非常に大きな意味を持つ。そこで本研究では金の表面に微小な孔を形成し、その内部に光応答性の分子を修飾して表面プラズモン場による励起を行い、反応場としての基本的な特性を明かにするとともに、蛍光遺伝子分析と免疫分析への応用を試みた。

蛍光を利用した遺伝子分析や免疫分析は高感度かつ高速分析が可能であるため基礎科学から臨床まで幅広く応用されている。通常は96~1536ウェルのマルチウェルプレートが用いられるが、最近ではDNAなどの試料を固定した微小ドットを基板上に数万個も集積したマイクロアレイの発展が著しい。しかし、マイクロアレイとはいうもののドットサイズは100 $\mu\text{m}$ 以上もあるため、近い将来に検体数の増大に対応できなくなることは容易に想像できる。このような背景からナノメータサイズのウェルやドットを集積させたマイクロチップの実現が熱望されているのである。

## 2. 結果と考察

本研究では以下の項目について検討を行った。

ナノウエルの作製

ナノウエルへの蛍光性分子の修飾と表面プラズモン励起

ナノウエル内部における免疫分析

ナノウエル内部における遺伝子分析

### 2.1 金ナノウエルの作製法確立

金薄膜に孔を開ける方法として最も容易かつ安価で実現可能なプロジェクション法を応用した。<sup>2)</sup>これは影絵の原理で、蒸着源と基板の間に物体を置くことでその形状が投影された金薄膜が形成されることを利用するものである。本研究では市販の直径数百 nm～数  $\mu\text{m}$  のポリスチレンラテックスを用いた。ラテックスを含む液を希釈して石英基板上に分散させ、ごくゆっくりと蒸発させた後、金を数十～数百 nm の膜厚で蒸着し、さらに有機溶媒中で超音波洗浄してラテックスを溶解除去した。原子間力顕微鏡で観測したところ、[図 1](#) に示すように、ラテックスの直径と同じ内径をもつ多数のナノウエルが金基板上に形成することができることが明らかになった。

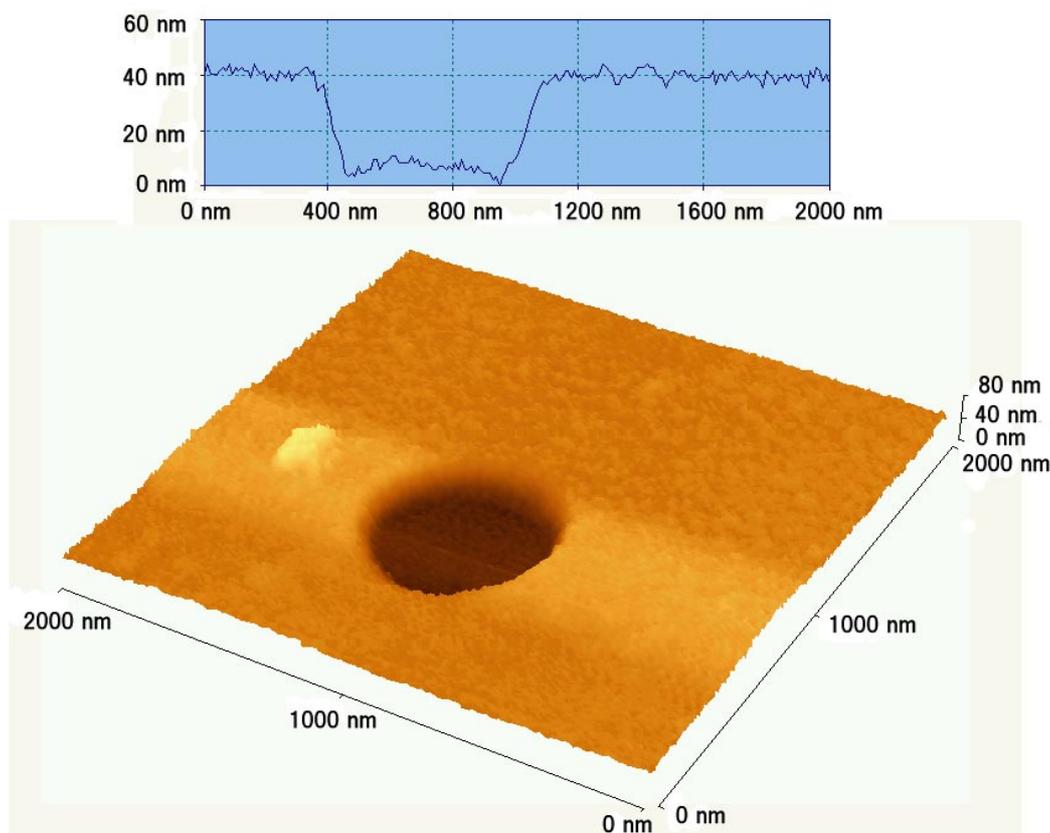


図1 プロジェクション法により作製した口径 400 nm のナノウエルのコンタクトモード原子間力顕微鏡写真。

一連の直径をもつラテックスを混合して蒸着を行えば口径の異なるウェルを同時に作製することも可能であり、これは口径と電場増強効果の相関の検証などの実験には好都合である。但し、このプロジェクション法はきわめて簡便ではあるものの、原理上、ウェルの位置制御が全く出来ないこと、直径 100 nm 以下のラテックス粒子は金薄膜の中に埋もれてしまい、超音波処理では除去され難いため、口径 100 nm 以下のウェルは作製が難しいといった難点もある。

後述するように、基板となるガラス表面をあらかじめアミノ基やチオール基などを末端にもつシランカップリング試薬で処理しておくことで、ウェルの底面にアミノ基やチオール基を修飾することができる。これらはラテックス粒子の除去後もそのまま保全されていた。底面に修飾された置換基は蛍光性分子を始めとする各種の分子により修飾することが可能である。このような修飾反応の容易さはウェルの内部において遺伝子分析や免疫分析を行う応用上、最も重要な要素である。

## 2.2 ウェルの分子修飾と蛍光イメージング

以後の実験においては、ナノウェルは  $22 \times 22 \text{ mm}^2$  カバーガラス上に作製し、表面プラズモン励起は図2に示すように、倒立顕微鏡のステージ上において、カバーガラスを導波路として半導体レーザ励起 Nd-YAG レーザの第二高調波 532 nm の p-偏光を金薄膜の裏面から照射することにより行った。蛍光イメージは冷却 CCD を用いて撮影した。蛍光強度はアバランシェフォトダイオードを用いてフォトンカウンティングにより観測し、蛍光スペクトルは冷却 CCD 分光器を用いて観測した。

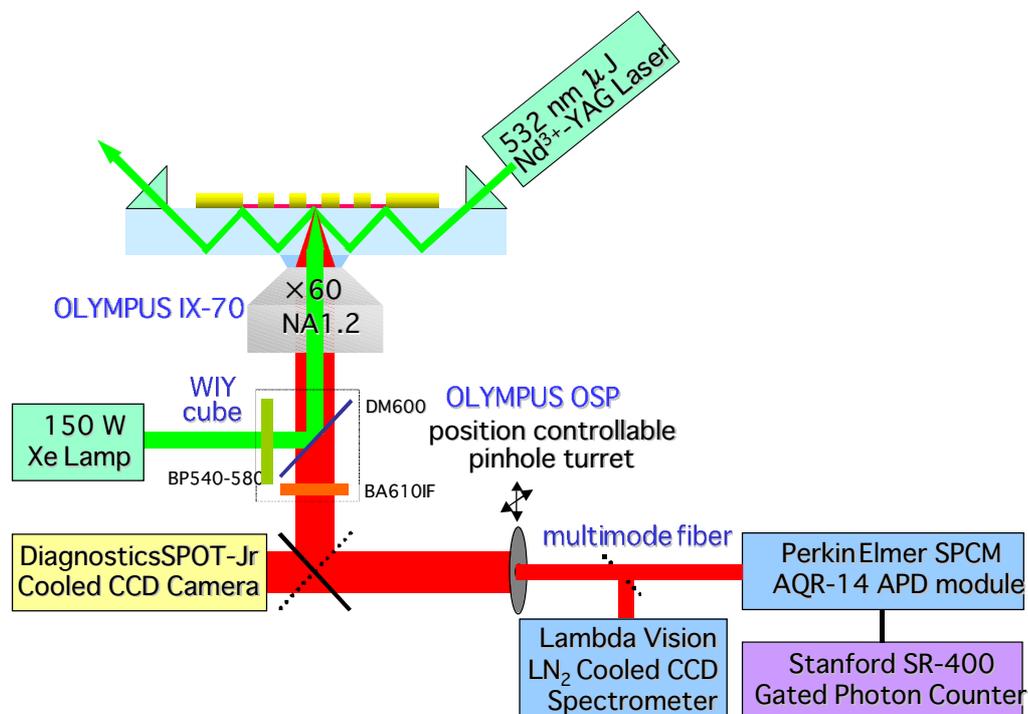
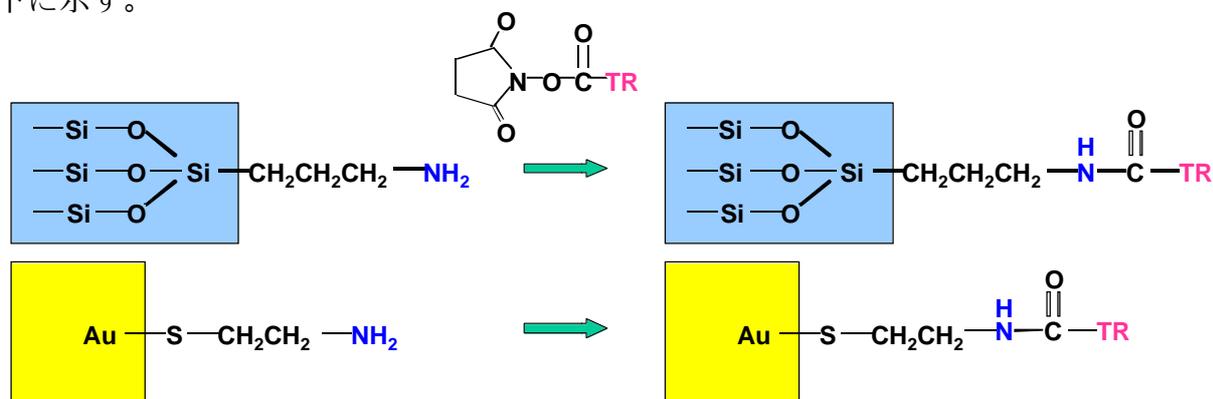


図2 表面プラズモン励起蛍光測定系

## 1) ウェル底面の蛍光性分子修飾

ガラス表面に金薄膜を強力に接着するために、アミノ末端をもつシランカップリング試薬であるアミノプロピルトリメトキシシランを用いてガラス表面にあらかじめアミノ基を修飾しておき、その上から金蒸着を施している。このため、ガラス表面が露出しているナノウェルの底面にはアミノ基が植え込まれている。このアミノ基とコハク酸エステル基の結合反応を利用して、ウェルの底面に蛍光性分子を修飾することができる。一方、金薄膜の表面にシスタミンの単分子膜を形成しておけば、金表面にも同様に蛍光性分子を修飾することができる。この場合、金による消光が避けられない難点はあるものの、ウェルの側面や周縁部分の修飾には適している。反応スキームを下に示す。



スキーム1 ガラスおよび金表面の修飾反応 (TR: テキサスレッド)

本研究では、ウェルの底面のガラス露出部分にテキサスレッドを修飾して蛍光特性を観測した。テキサスレッドを選択した理由は、表面プラズモンの電場増強効果を応用するうえで長波長の赤色発光を示すために有利であり、安定で退色し難く、しかも生化学領域で多用されている色素だからである。ガラスや金の表面に蛍光性分子を修飾して応用する場合、修飾密度が蛍光特性に極めて大きな影響を及ぼす。修飾密度が高すぎると隣接分子間でエネルギーマイグレーションが起きていわゆる濃度消光を起こしてしまう。一方、修飾密度が小さすぎると、蛍光性分子が測定中に劣化し、退色してしまう。どちらも蛍光分析に大きな支障をきたす。そこでまず、バルクのガラス表面において吸収スペクトルおよび蛍光スペクトルを観測し、修飾条件を最適化することにした。この場合の蛍光スペクトルはエバネッセント励起で観測した。

図3aに示すようにテキサスレッドの吸収極大である590 nmの吸収強度をモニタしながらアミノ化したカバーガラスを70 nMのテキサスレッドスクシンイミジルエステル水溶液に浸漬したところ、吸収強度は数分で急激に増大し、わずか5分ほどで頭打ちを示すことがわかった。一方、蛍光スペクトルのほうは図3bに示すように、修

飾分子数が急激に増大しているにもかかわらず、蛍光強度が急激に低下している。これは上述のように、修飾密度が高すぎて濃度消光を起こしていることを示唆する。以上から、退色の影響も考慮して、ナノウェル底面の蛍光試薬による修飾時間を 5 分間とすることにした。

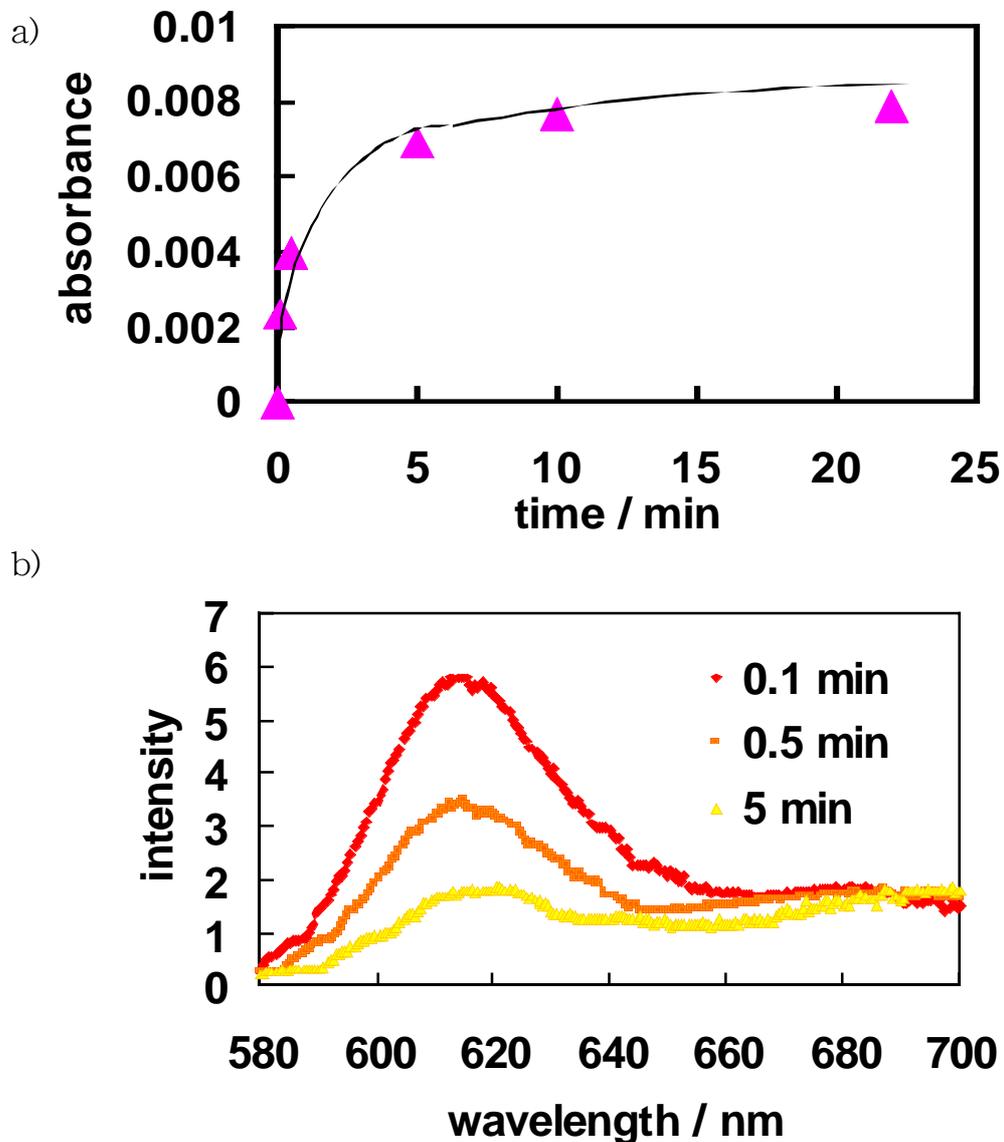


図3 アミノ化したガラス表面へのテキサスレッドの修飾反応：70 nM テキサスレッドスクシンイミジルエステル溶液に浸漬し 590 nm の吸収強度(a)、および蛍光スペクトル(b)の時間変化を追跡した結果

## 2) ウェル底面の蛍光修飾

70 nM テキサスレッドスクシンイミジルエステルを 5 分間修飾した 400 nm のウェルの表面プラズモン励起による蛍光像を図 4 に示す。図 4a に示すように、全てのウ

エルが強い蛍光を示しており、ウェル内部に溶液が浸透して底面の修飾反応が起きていることがわかる。したがって、この程度のサイズのウェルならば、容易に試料溶液を充填可能であることがわかった。さらに、ピンホールを用いて単一のウェルを視野内から切り出し、冷却CCDを用いて蛍光スペクトルの測定を試みたところ、図4bに示すように、数分の露光時間でバルク溶液とほぼ同様の明瞭な蛍光スペクトルが容易に得られた。

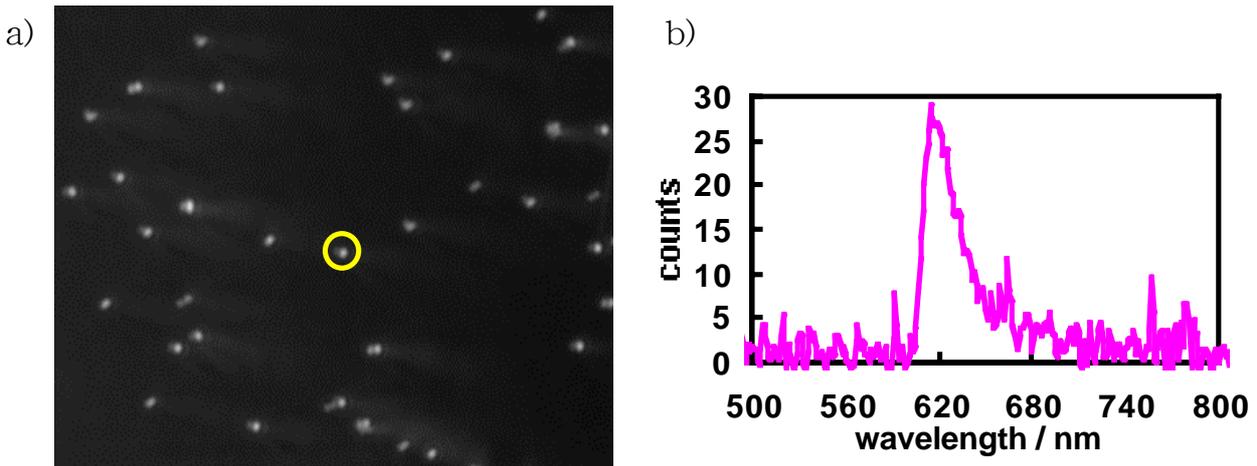


図 4 a) 70 nM テキサスレッド溶液を浸漬した 400 nm ウェルの表面プラズモン励起蛍光像 b) a) の視野中の○内の単一ウェルから得られた蛍光スペクトル

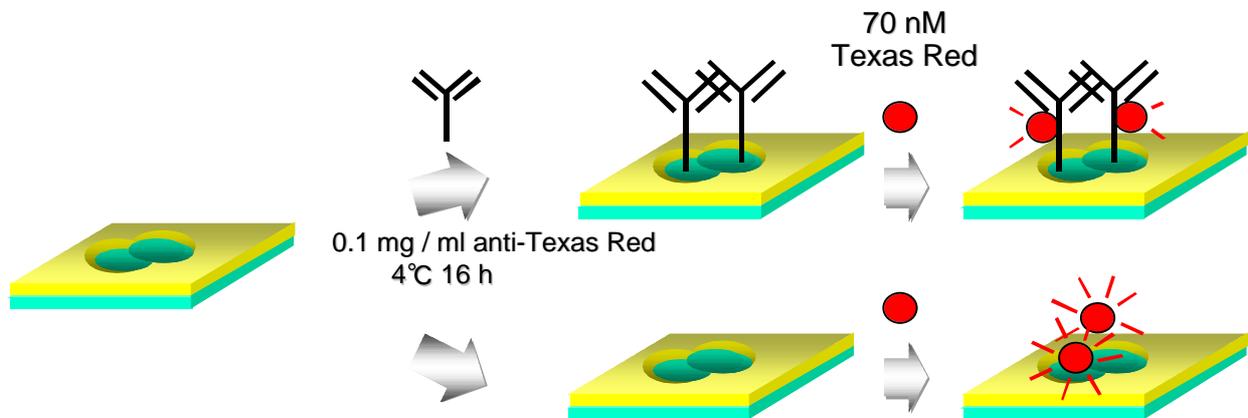
### 3) ウェル内部における免疫反応とその検出

テキサスレッドの修飾がうまく進行することがわかったので、蛍光分析への応用を試みることにした。課題は2つあり、一つは免疫分析、もう一つは遺伝子分析である。ともに、蛍光分析の高密度化に対する要求が極めて強い。そこで、まず最初に免疫分析を行うための予備実験として、蛍光性試薬に対する抗体を用いてウェル内で免疫反応を行い、これを蛍光で検証することを試みた。

蛍光色素にはやはりテキサスレッドを用いた。一般に蛍光色素分子に対する抗体は蛍光色素を取り込んでほとんどその蛍光を消光してしまう性質を持っている。したがって、抗蛍光色素は蛍光試薬を修飾した試料の表面などに付着している過剰の蛍光色素を除去するために主に用いられる。ところが、抗テキサスレッド抗体の場合、抗体によって取り込まれた蛍光は完全には消去されず、40%程度は残存させる性質を持つ。今回はこの抗テキサスレッド分子を 400nm のウェル中に修飾し、テキサスレッドの希薄溶液を浸漬して蛍光特性を観測した。

抗体はタンパク質であるため、種々の方法でガラス表面に化学結合させて修飾固定化できる。今回は、あらかじめアミノプロピルトリメトキシシランによりアミノ化し

た表面を 2% グルタルアルデヒドに 2 h 浸漬し、さらに 0.1% 抗テキサスレッド水溶液に 4°C 16 h 浸漬して抗体をウェルの底面に修飾した。対照系として、ベアのガラス表面が露出しているウェルを用いた。抗体修飾反応と免疫反応のスキームを下に示す。



スキーム 2 ナノウェル底面への抗体修飾と免疫反応

表面プラズモン励起はテキサスレッドを修飾したウェルのイメージングと同様の方法で行ったが、この免疫反応の場合は単一ウェルでは蛍光ゲインが低いため、ウェルが十数个集合化したウェルからの蛍光を収束し、その時間変化をフォトンカウンティングモジュールとゲーテッドフォトンカウンタで観測した。図 5 にその結果を示す。

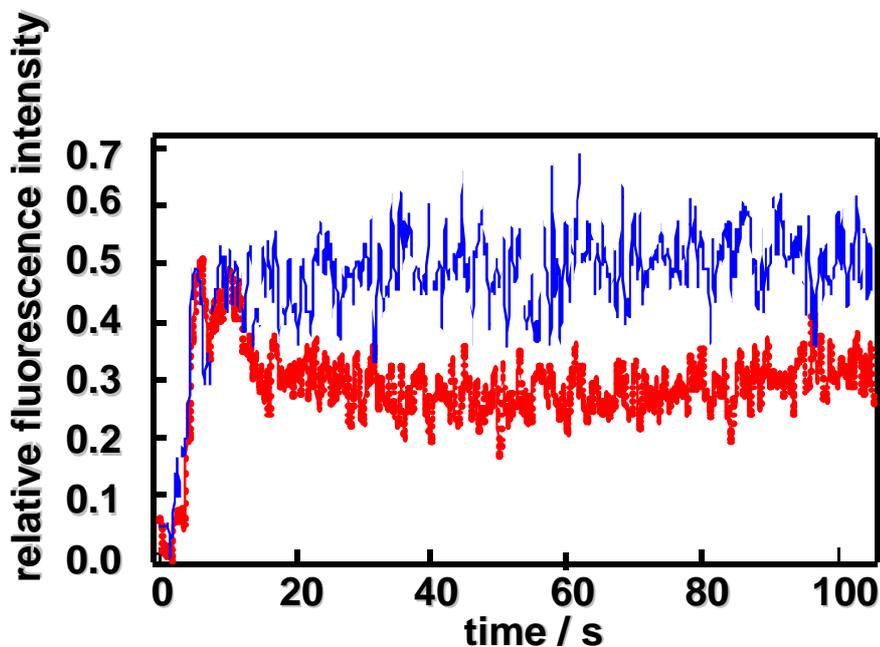
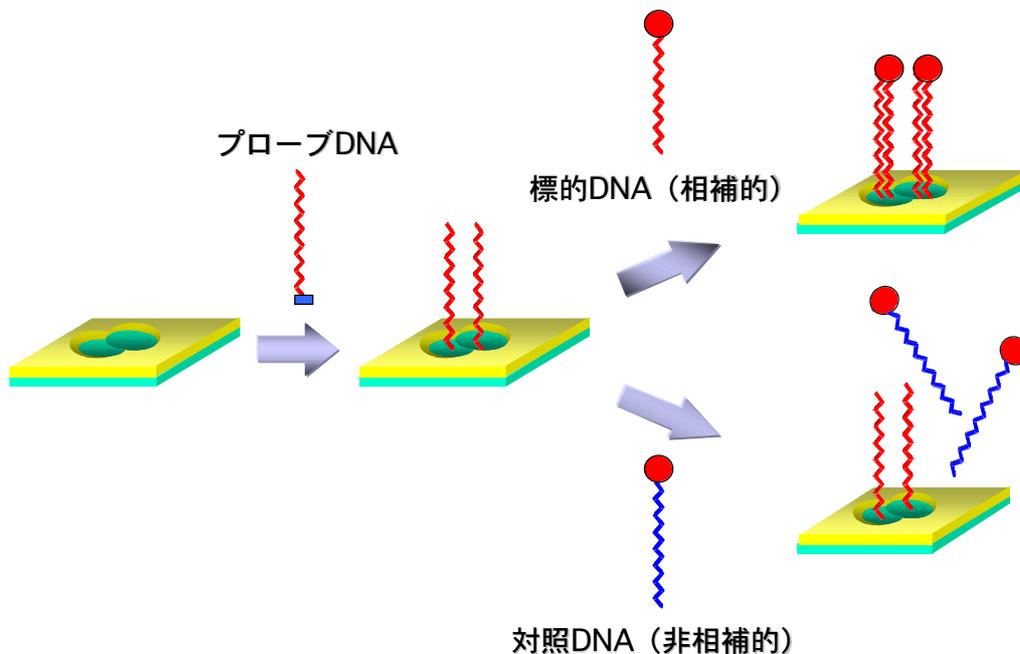


図 5 抗テキサスレッドを修飾したウェル (赤)、対照系無修飾ウェル (青) にそれぞれ 70 nM テキサスレッド水溶液を滴下した時の表面プラズモン励起による蛍光強度変化

抗体を修飾した系と対照系の両方ともテキサスレッドの 70 nM 水溶液を滴下した瞬間に蛍光が観測される。ところが、抗体を修飾した系では蛍光強度がすぐに減衰してしまう。一方、対照系ではほぼ一定に保たれている。上述のように、抗テキサスレッドはテキサスレッド分子を捕らえると、その蛍光を 40%程度にまで消光する。このことから考えて、抗テキサスレッドを修飾したウェルから得られた蛍光信号が急速に減衰したのはウェル内に入ったテキサスレッド分子が抗体に取り込まれる過程が観測されたものと解釈される。対照系の場合は消光されずにそのままウェル内に留まったからであろう。より長時間では抗体を修飾した系において、蛍光信号が回復していくように見える。これは、当初ウェル内にあったテキサスレッド分子が抗体に取り込まれた後、さらにバルク溶液中からテキサスレッド分子が拡散してきたことに対応するのかもしれない。いずれにせよ、ウェル底面への抗体修飾と、ウェル内部における免疫反応を確認することができた。

#### 4) ウェル内部における DNA ハイブリダイゼーションの蛍光検出

次に、ウェル内部における DNA のハイブリダイゼーションの蛍光検出、すなわち、遺伝子分析に挑戦した。5'端にアミノ基を修飾した 15 塩基対のプロープ DNA を抗体と同じくグルタルアルデヒドを用いてウェルの底面に修飾した。標的 DNA はこのプロープ DNA と相補的なシーケンスを持ち、5'末端にテキサスレッドを修飾したものである。一方、対照 DNA はスクランブルしたシーケンスを持ち、5'末端にテキサスレッドを修飾したものである。修飾とハイブリダイゼーションのスキームを下に示す。



スキーム 3 ウェルへのプローブ DNA 修飾とハイブリダイゼーション

プローブ DNA を修飾したウェルを表面プラズモン励起しながら、これらの DNA 溶液をウェルにそれぞれ滴下して両系における蛍光強度の時間変化をフォトンカウンティングモジュールとゲーテッドフォトンカウンタを用いて観測した。図 6 に示すように、標的 DNA の場合には滴下直後に蛍光強度が急速に増大し、ほぼ一定となったが、対照 DNA では蛍光強度の増大は全くみられなかった。このことから、プローブ DNA と相補的なシーケンスをもつ標的 DNA はウェルの内部でプローブ DNA とハイブリダイゼーションを起こし、末端に修飾されているテキサスレッドが表面プラズモン場により励起されて蛍光を発するようになったのに対し、対照 DNA はハイブリダイゼーションできないために底面に近づくことができず、蛍光を示さなかったものと解釈される。このように、ウェル内部において、DNA のハイブリダイゼーションの蛍光検出に成功した。

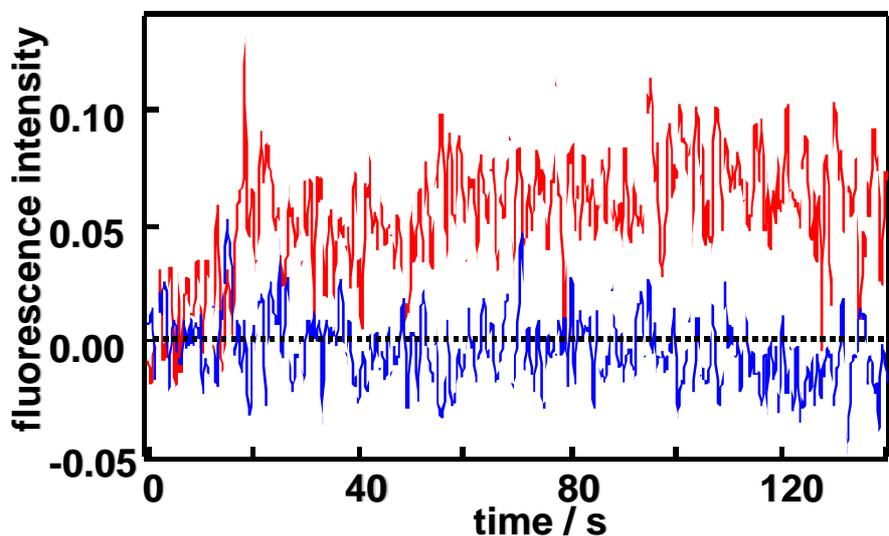


図 6 プローブ DNA を修飾したウェルに標的 DNA (赤)、対照系非相補 DNA (青) をそれぞれ滴下した時に観測された表面プラズモン励起による蛍光強度変化

### 3. まとめ

以上のように、光波長サイズのコイルウェルの作製と蛍光性分子の修飾、さらに、免疫分析と遺伝子分析への応用について一応の結果を得ることができた。今後はより精密な定量的評価を行っていきたい。まず第一の課題は、励起波長、ウェルの口径と蛍光強度の相関からウェル内部に局在化された表面プラズモン電場の強度を評価することである。これによって、ウェル口径の効果を明らかにしたい。第二の課題はウェル内部の環境評価である。このような微小空間においては、修飾されている分子や溶媒の物性はバルクのものとは大きく異なると推定される。したがって、その応用を展

開するには、内部環境を精密に評価しなければならない。pH やイオン濃度に応答する蛍光プローブを用いて、ウェルの内部環境を評価していく予定である。

## 参考文献

- 1) 表面プラズモン増強励起に関する本研究責任者の研究論文 Ishida, A., Sakata, Y.; Majima, T., Surface plasmon excitation of a porphyrin covalently linked to a gold surface, *Chem. Commun.*, 57-58, 1998; Ishida, A., Sakata, Y.; Majima, T., Photocurrent Generation by Surface Plasmon Excitation via Electron Transfer Quenching of Excited Porphyrins Linked Covalently to a Gold Film Electrode, *Chem. Lett.*, 267-268, 1998; Ishida, A.; Majima, T., Surface Plasmon Enhanced Fluorescence Spectroscopy towards Observation of Molecular Exchange in a Self-Assembly Monolayer, *Chem. Comm.*, 1299-1300, 1999; Ishida, A.; Majima, T., Surface Plasmon Excitation of Porphyrin Self-assembly Monolayers on a Gold Surface, *Nanotechnology*, 10, 308-314 (1999); Ishida, A.; Majima, T., Surface Plasmon Enhanced Fluorescence Measurement on Flat and Constructed Gold Surfaces, *Analyst*, 535-540, 2000; Ishida, A.; Majima, T., Photocurrent Generation of a Porphyrin Self-Assembly Monolayer on a Gold Film Electrode by Surface Plasmon Excitation using Near-IR Light, *Chem. Phys. Lett.*, 322, 242-246 (2000).
- 2) Sennichsen, C.; Duch, A. C.; Steininger, G.; Koch, M.; von Plessen, G.; Feldmann, J., *App. Phys. Lett.*, 76 (2000) 140

## 外部発表

### 論文

- 1) 石田昭人, ナノ構造化金表面における光の局在化と光化学への応用;レーザー研究, 29, 739-743 (2001).
- 2) 石田昭人, 構造化金表面における希土類錯体の発光, 希土類, 38, 156-157 (2001).

### 特許

- 1) Akito ISHIDA, "Fluorescent Analysis Element with the Use of Metallic Nanowell and Process for Producing the Same", PCT/JP02/00026, WO 02/056012 A1

### 招待講演

- 1) 石田昭人「金表面における光の局在化と光化学への応用」、日本原子力研究所先端基礎研究センターシンポジウム「ナノ工学応用に向けたレーザーと有機物質の相互作用」(平成13年4月大阪)
- 3) Akito ISHIDA, Molecular Labeling of Gold Nanowells Towards Ultra-high Density "On Tip" Fluorescence Analysis, 9th Foresight Conference (平成13

年11月米国カリフォルニア州サンタクララ)

- 4) Akito ISHIDA, Surface Plasmon Excitation of Photofunctional Molecules on Constructed Gold Surfaces, FRONTIER-SCIENCE RESEARCH CONFERENCES, Science and Technology of LUMINESCENT MATERIALS-2002 (平成14年1月米国カリフォルニア州ラホヤ)
- 5) 石田昭人「光応答性有機分子集合体とプラズモン電場の相互作用」、第63回応用物理学会シンポジウム「表面プラズモン共鳴によるナノ領域光局在」(2002年9月、新潟)