

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6289951号
(P6289951)

(45) 発行日 平成30年3月7日(2018.3.7)

(24) 登録日 平成30年2月16日(2018.2.16)

(51) Int.Cl.		F I			
GO 1 N 21/64	(2006.01)	GO 1 N	21/64		B
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N	33/543	5 9 5	
GO 1 N 33/574	(2006.01)	GO 1 N	33/574		A
C 1 2 N 15/115	(2010.01)	GO 1 N	21/64		F
		C 1 2 N	15/00		H

請求項の数 11 (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2014-57211 (P2014-57211)
 (22) 出願日 平成26年3月19日(2014.3.19)
 (65) 公開番号 特開2015-179048 (P2015-179048A)
 (43) 公開日 平成27年10月8日(2015.10.8)
 審査請求日 平成28年8月29日(2016.8.29)

(73) 特許権者 000003078
 株式会社東芝
 東京都港区芝浦一丁目1番1号
 (74) 代理人 110001634
 特許業務法人 志賀国際特許事務所
 (72) 発明者 岩永 寛規
 東京都港区芝浦一丁目1番1号 株式会社
 東芝内
 審査官 伊藤 裕美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薄膜生体分子検出素子、生体分子検出方法、及び生体分子検出装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

基板と、該基板上に設けられた基板吸着部と、該基板吸着部に、一端を介して接着したリンカーと、該リンカーの他端に結合した希土類錯体とを備え、前記希土類錯体は、下記式(1)で表わされる基と、 Tb^{3+} イオン、 Eu^{3+} イオン、 Dy^{3+} イオン又は Sm^{3+} イオンとの錯体である、薄膜生体分子検出素子。

【化1】



[式(1)中、 R^5 はフッ素原子で置換されていてもよい炭素数1~6のアルキル基を示し、 R^6 は炭素数1~6のアルキル基又は炭素数6~20のアリール基を示す。]

10

【請求項2】

前記希土類錯体が、前記式(1)で表わされる基と Eu^{3+} イオンとの錯体であり、前記式(1)における R^5 が炭素数1~6のパーフルオロアルキル基である、請求項1に記載の薄膜生体分子検出素子。

【請求項3】

前記式(1)における R^5 がトリフルオロメチル基又はヘプタフルオロプロピル基である、請求項1又は2に記載の薄膜生体分子検出素子。

【請求項4】

前記式(1)における R^6 がナフチル基又はt-ブチル基である、請求項1~3のい

20

れか一項に記載の薄膜生体分子検出素子。

【請求項 5】

前記基板の表面の少なくとも一部は、酸化グラフェンが固定されてなる請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の薄膜生体分子検出素子。

【請求項 6】

前記リンカーは、アプタマーからなる請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の薄膜生体分子検出素子。

【請求項 7】

前記アプタマーは、腫瘍関連分子を標的とするものである請求項 6 に記載の薄膜生体分子検出素子。

【請求項 8】

前記アプタマーは、核酸アプタマーである請求項 6 又は 7 に記載の薄膜生体分子検出素子。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の薄膜生体分子検出素子を用いて、発光スペクトル、発光寿命、及びブランチング比からなる群から選ばれる少なくとも一つから生体分子を特定する生体分子検出方法。

【請求項 10】

前記生体分子がアミノ基又は P = O で示される基を有する、請求項 9 に記載の生体分子検出方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の薄膜生体分子検出素子と、二波長同時検出装置とを備える生体分子検出装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の実施形態は、薄膜生体分子検出素子、生体分子検出方法、及び生体分子検出装置に関する。

【背景技術】

【0002】

バイオセンサーとは、酵素、免疫反応系、組織、又は細胞を介する選択的な化学反応で化学物質を電気、熱、光信号として検出する素子である。近年、バイオセンサーの中でも、腫瘍マーカーを高精度で検出する素子が注目を集めている。その中でも特定のタンパク質を蛍光プローブ法で検出する方法は、簡便かつ安価なセンシングが可能であるため、さかんに研究開発が行われている。

しかしながら、従来のバイオセンサーは、認識精度に劣る場合があった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献 1】 N T T 技術ジャーナル (2013 . 6、p 27 ~ p 30)

【非特許文献 2】 Furukawa K., et al., Journal of Materials Chemistry B, vol 1, 11 19-1124, 2013

【非特許文献 3】 CREST 研究領域「医療に向けた化学、生物系分子を利用したバイオ素子、システムの創製」(研究終了報告書 研究期間 平成 14 年 11 月 ~ 平成 18 年 10 月)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明が解決しようとする課題は、生体分子を高精度で検出することができる薄膜生体分子検出素子、生体分子検出方法、及び生体分子検出装置を提供することである。

10

20

30

40

50

【課題を解決するための手段】

【0005】

実施形態の薄膜生体分子検出素子は、基板と、基板吸着部と、リンカーと、希土類錯体とを持つ。基板吸着部は、基板上に設けられている。リンカーは、一端を介して基板吸着部に接着している。希土類錯体は、リンカーの他端に結合している。

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】第1の実施形態の薄膜生体分子検出素子を示す概略構成図。

【図2】第2の実施形態の薄膜生体分子検出素子を示す概略構成図。

【図3】第3の実施形態の薄膜生体分子検出素子を示す概略構成図。

【図4】第1の実施形態の生体分子検出装置を示す概略構成図。

10

【発明を実施するための形態】

【0007】

以下、実施形態の薄膜生体分子検出素子を、図面を参照して説明する。

【0008】

[薄膜生体分子検出素子]

(第1の実施形態)

実施形態の薄膜生体分子検出素子7は、図1に示すように、基板2と、該基板2上に設けられた基板吸着部1と、該基板吸着部1に、一端を介して接着したリンカー6と、該リンカー6の他端に結合した希土類錯体4と、を持つバイオセンサーである。図1(A)は、initialの薄膜生体分子検出素子7を示し、図1(B)は、生体分子5が結合した場合の薄膜生体分子検出素子7を示す。

20

【0009】

希土類錯体4は、アミノ基やリン酸基と配位結合することにより、タンパク質や核酸等の生体分子5と相互作用をする。

希土類錯体4は、以下の特徴を有する。

第一に、一般の有機蛍光体の発光寿命は、ナノ秒オーダーであるのに対して、希土類錯体の発光寿命は、サブミリ秒オーダーと長い。

第二に、一般の有機蛍光体は溶媒が変わるとスペクトルがシフトするのに対して、希土類錯体はf-f遷移に基づく発光を示すことから、様々な波長の光を吸収しても、発する蛍光は一定の波長のものに収束する。

30

第三に、希土類錯体の発光は、磁気双極子遷移及び電気双極子遷移から構成され、磁気双極子遷移に由来する発光スペクトル形状は、常に一定である一方、電気双極子遷移に由来する発光スペクトル形状は配位環境に大きく依存する。この磁気双極子遷移と電気双極子遷移の比をブランチング比という。ブランチング比は、配位子の構造によって変化するため、ブランチング比で配位環境を特定することができる。

希土類錯体4はこれらの特徴を有するため、生体分子と相互作用することにより、希土類錯体の発光強度比、発光寿命、及び発光スペクトルの電気双極子遷移と磁気双極子遷移の発光強度比から算出されるブランチング比からなる群から選ばれる少なくとも一つの情報から生体分子を検出・特定することができる。

40

また、細胞等の生体分子は、紫外線を照射すると、自家蛍光として、ナノ秒オーダーの発光をする。一方、希土類錯体の発光寿命は、サブミリ秒オーダーであるため、時間分解測定により希土類錯体由来の蛍光と自家蛍光を分離することができ、測定時のバックグラウンドを低減することができる。

このように、希土類錯体4を用いることにより、生体分子を高いS/N比で高感度に検出することができる。

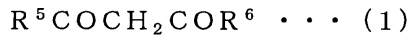
【0010】

希土類錯体としては、例えば、以下の式(1)で表わされる基と、希土類イオンとの錯体が挙げられる。前記希土類イオンとしては、 Tb^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Dy^{3+} 、 Sm^{3+} 等が挙げられ、 Tb^{3+} 、 Eu^{3+} が好ましい。

50

【 0 0 1 1 】

【化 1】



【 0 0 1 2 】

(式中、 R^5 はフッ素原子で置換されていてもよい炭素数 1 ~ 6 のアルキル基を示し、 R^6 は炭素数 1 ~ 6 のアルキル基又は炭素数 6 ~ 20 のアリール基を示す。)

【 0 0 1 3 】

前記 R^5 のフッ素原子で置換されていてもよい炭素数 1 ~ 6 のアルキル基としては、具体的にはメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*t*-ブチル基、*n*-ペンチル基、これらの基の水素原子がフッ素原子で置換された基が挙げられる。検出感度を向上させる観点から、炭素数 1 ~ 6 のパーフルオロアルキル基が好ましく、トリフルオロメチル基、ヘptaフルオロプロピル基がより好ましい。

前記 R^6 の炭素数 1 ~ 6 のアルキル基としては、前記 R^5 と同様のものが挙げられ、溶媒に対する溶解性の観点から、*t*-ブチル基が好ましい。

前記 R^6 の炭素数 6 ~ 20 のアリール基としては、フェニル基、ナフチル基が挙げられ、ナフチル基が好ましい。

長波長側の光を吸収する観点から、前記 R^6 は、炭素数 6 ~ 20 のアリール基が好ましい。

【 0 0 1 4 】

R^5 と R^6 としては、炭素数 1 ~ 6 のパーフルオロアルキル基と炭素数 1 ~ 6 のアルキル基の組み合わせ、炭素数 1 ~ 6 のパーフルオロアルキル基と炭素数 6 ~ 20 のアリール基の組み合わせが好ましく、トリフルオロメチル基とナフチル基の組み合わせ、ヘptaフルオロプロピル基と *t*-ブチル基の組み合わせが挙げられる。これらは、検出対象に合わせて適宜選択できる。

【 0 0 1 5 】

実施形態に用いる希土類錯体は蛍光性のものであり、発光強度が大きいユーロピウム錯体またはテルビウム錯体が好ましい。6 配位の錯体を用い、相互作用時に 7 配位以上になることにより発光強度、発光寿命、ブランチング比が大きく変化するものがより好ましい。

【 0 0 1 6 】

実施形態において、基板 2 の表面の少なくとも一部は、酸化グラフェンが固定されてなる。基板 2 として、例えばガラス基板上に酸化グラフェンを転写したものをを用いることができる。酸化グラフェンは、蛍光クエンチャーであり、希土類錯体 4 から発せられる蛍光が、希土類錯体 4 と基板 2 との距離によって変化する。

即ち、希土類錯体 4 が生体分子 5 を捕捉していない場合には、希土類錯体 4 と基板 2 は近接しており、酸化グラフェンのクエンチング効率は最大となっている。希土類錯体 4 が生体分子 5 を捕捉した場合には、希土類錯体 4 と基板 2 の距離は遠くなり、酸化グラフェンによるクエンチング効率は低下する。

従って、基板 2 に酸化グラフェンを用いることにより、生体分子 5 をより高い S/N 比で検出することができる。

【 0 0 1 7 】

基板吸着部 1 は、基板 2 に物理的に吸着する分子であれば特に限定されず、一例としてピレン骨格を有する分子が挙げられる。図 1 に示すように、酸化グラフェンの一部には、グラフェン構造を維持した領域である *SP*2 ドメイン 3 が点在する。*SP*2 ドメイン 3 には、ベンゼン環 4 個が連結した構造のピレンと呼ばれる分子が強く吸着される。従って、ピレン骨格を有する分子は、酸化グラフェン等の炭素材料との親和性が高い観点から好ましい。

【 0 0 1 8 】

リンカー 6 は、一端に基板吸着部 1 と結合し、他端に希土類錯体 4 と結合して、基板吸着部 1 と希土類錯体 4 を接続するものであれば特に限定されず、核酸、ペプチド等が挙げられる。

【 0 0 1 9 】

実施形態によれば、希土類錯体の発光強度比、発光寿命、及び発光スペクトルの電気双極子遷移と磁気双極子遷移の発光強度比から算出されるブランチング比からなる群から選ばれる少なくとも一つの情報から生体分子を検出・特定することができる。また、基板に酸化グラフェンを用いることにより、生体分子をより高い S / N 比で検出することができる。

10

【 0 0 2 0 】

(第 2 の実施形態)

実施形態の薄膜生体分子検出素子 1 1 は、図 2 に示すように、基板 2 と、該基板 2 上に設けられた基板吸着部 1 と、該基板吸着部 1 に、一端を介して接着したアプタマー 1 4 と、該アプタマー 1 4 の他端に結合した希土類錯体 4 と、を持つバイオセンサーである。図 2 (A) は、i n i t i a l の薄膜生体分子検出素子 1 1 を示し、図 2 (B) は、生体分子 5 が結合した場合の薄膜生体分子検出素子 1 1 を示す。実施形態の薄膜生体分子検出素子 1 1 は、リンカーとしてアプタマー 1 4 を用いている点で、図 1 に示す薄膜生体分子検出素子 7 と相違し、その他の構成は薄膜生体分子検出素子 7 と同じである。

尚、図 2 において、図 1 に示す構成要素と同一のものについては同じ符号を用いている。

20

【 0 0 2 1 】

実施形態において、アプタマー 1 4 は、標的とする生体分子に対する結合活性を有する核酸である。本実施形態のアプタマー 1 4 は、RNA、DNA、修飾ヌクレオチド又はそれらの混合物からなる。アプタマー 1 4 の長さは特に限定されず、16 ~ 200 塩基が好ましく、100 塩基以下がより好ましく、50 塩基以下が特に好ましい。

【 0 0 2 2 】

アプタマー 1 4 が、標的とする生体分子 5 と結合すると、特定の構造へと変化する。この構造変化により、希土類錯体 4 と基板 2 の距離が変化する。

実施形態によれば、アプタマーによる生体分子識別機能により、標的とする生体分子をより特異的に検出することができる。

30

【 0 0 2 3 】

(第 3 の実施形態)

実施形態の薄膜生体分子検出素子 2 1 は、図 3 に示すように、基板 2 と、該基板 2 上に設けられた基板吸着部 1 と、該基板吸着部 1 に、一端を介して接着した、腫瘍関連分子を標的とするアプタマー 2 4 と、該アプタマー 2 4 の他端に結合した希土類錯体 4 と、を持つバイオセンサーである。実施形態の薄膜生体分子検出素子 2 1 は、アプタマー 2 4 として腫瘍関連分子を標的とするものを用いている点で、図 2 に示す薄膜生体分子検出素子 1 1 と相違し、その他の構成は薄膜生体分子検出素子 1 1 と同じである。

尚、図 3 において、図 2 に示す構成要素と同一のものについては同じ符号を用いている。

40

【 0 0 2 4 】

腫瘍関連分子は、がん遺伝子又はがん抑制遺伝子によってコードされるタンパク質であることが好ましい。

がん遺伝子としては、テロメラーゼをコードする遺伝子；s i s 等の増殖因子をコードする遺伝子群；e r b B、f m s、r e t 等のレセプター型チロシンキナーゼをコードする遺伝子群；f e s 等の非レセプター型チロシンキナーゼをコードする遺伝子群；r a s 等の G T P / G D P 結合タンパク質をコードする遺伝子群；s r c、m o s、r a f 等のセリン / スレオニンキナーゼをコードする遺伝子群；m y c、m y b、f o s、j u n、e r b A 等の核内タンパク質をコードする遺伝子群；c r k 等のシグナル伝達アダプター

50

分子をコードする遺伝子群；B c r - A b l等の融合遺伝子が挙げられる。

更に、がん遺伝子として、S h c、G r b 2、S o s、M E K、R h o、R a c 遺伝子等のR a s - M A Pキナーゼ経路関連遺伝子；P L C、P K C等のホスホリパーゼCガンマ-プロテインキナーゼC経路関連遺伝子；P I 3 K、A k t、B a d等のP I 3 K - A k t経路関連遺伝子；J A K、S T A T等のJ A K - S T A T経路関連遺伝子；G A P、p 1 8 0、p 6 2等のG A P系経路関連遺伝子が挙げられる。

【 0 0 2 5 】

がん抑制遺伝子としては、R B、p 5 3、W T 1、N F 1、A P C、V H L、N F 2、p 1 6、p 1 9、B R C A 1、B R C A 2、P T E N、Eカドヘリン遺伝子等が挙げられる。

10

【 0 0 2 6 】

実施形態によれば、アプタマーによる生体分子識別機能により、標的とする生体分子をより特異的に検出することができる。従って、実施形態によれば、複数種類の腫瘍関連分子を標的とするアプタマーを持つ薄膜生体分子検出素子を複数揃えることにより、複数の腫瘍マーカーを高精度で検出できる。

【 0 0 2 7 】

また、アプタマーが認識する腫瘍関連分子は、1種類の癌腫から抽出される複数の腫瘍関連分子であってもよい。即ち、実施形態の薄膜生体分子検出素子21は、癌腫別診断用であってもよい。

【 0 0 2 8 】

癌腫としては、皮膚癌、肺癌、大腸癌、胃癌、乳癌、前立腺癌、甲状腺癌等が挙げられる。上述したがん遺伝子及びがん抑制遺伝子をはじめとして、癌腫特異的な遺伝子の発現/変異パターンが存在することが報告されている。そのため、癌腫ごとの遺伝子発現プロファイル等に基づいて、薄膜生体分子検出素子を作製することにより、検出の精度を高めることができる。

20

【 0 0 2 9 】

以上説明した少なくともひとつの実施形態によれば、希土類錯体を持つことにより、希土類錯体の発光強度比、発光寿命、及び発光スペクトルの電気双極子遷移と磁気双極子遷移の発光強度比から算出されるブランチング比からなる群から選ばれる少なくともひとつの情報から生体分子を、高精度に検出・特定することができる。

30

【 0 0 3 0 】

[生体分子検出方法]

実施形態の生体分子検出方法は、上述した各実施形態の薄膜生体分子検出素子を用いて、発光スペクトル、発光寿命、及びブランチング比からなる群から選ばれる少なくともひとつから生体分子を特定する方法である。実施形態において、検出目的とするタンパク質が希土類錯体と相互作用した時の発光強度、発光寿命、ブランチング比のデータを予めデータベース化しておく。そして、薄膜生体分子検出素子から得られる信号と照合することにより、生体分子を特定することができる。

実施形態によれば、希土類錯体を持つことにより、発光スペクトル、発光寿命、及びブランチング比からなる群から選ばれる少なくともひとつの情報から、相互作用した生体分子を高精度に検出・特定することができる。

40

【 0 0 3 1 】

[生体分子検出装置]

実施形態の生体分子検出装置31は、図4に示すように、薄膜生体分子検出素子32と、二波長同時検出装置33とを持つ。

二波長同時検出装置33は、発光スペクトル、発光寿命、及びブランチング比からなる群から選ばれる少なくともひとつから、薄膜生体分子検出素子32の錯体またはアプタマーに吸着したタンパク質等の生体分子を特定する装置である。

更に、実施形態の生体分子検出装置31は、パソコンなどの制御部34を有する。

実施形態によれば、希土類錯体との相互作用から得られる生体分子の発光スペクトル、

50

発光寿命、及びブランチング比の多数の情報をデータベース化することにより、相互作用した生体分子を高精度に検出・特定することができる。

【実施例】

【0032】

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0033】

[実施例1]

酢酸エチルに下記式(2)に示すユーロピウム錯体溶解液、式(2)に示すユーロピウム錯体、及びトリフェニルホスフィンオキシド(TPPO)溶解液、式(2)に示すユーロピウム錯体、及びトリオクチルホスフィンオキシド(TOPO)溶解液、並びに、式(2)に示すユーロピウム錯体、トリフェニルホスフィンオキシド、及びトリオクチルホスフィンオキシド溶解液を調製し、それぞれの溶液の発光寿命を測定した。結果を表1に示す。表1に示すように、6配位のユーロピウム錯体単独の場合と比較して、これに種類が異なるホスフィンオキシドが配位することにより、発光寿命は鋭敏に変化することが確認された。

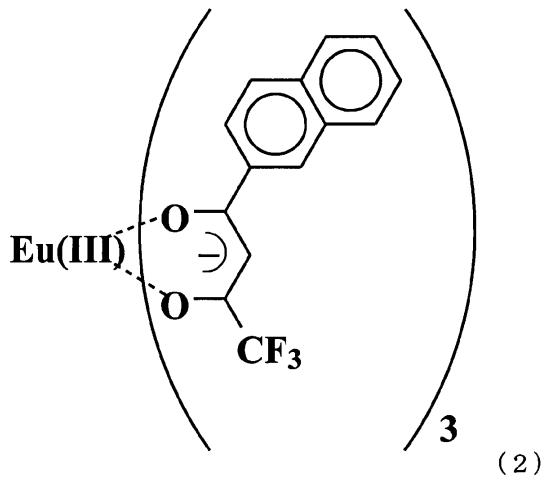
10

即ち、希土類錯体は、配位状況の変化に応じた発光寿命の変化を示す性質があり、生体分子の判別が可能であることが確認された。

【0034】

【化2】

20



30

【0035】

【表1】

発光寿命測定 (300K, AcOEt中、 $2 \times 10^{-4}M$)

錯体	発光寿命 (ms)	χ^2
式(2)	0.2694	0.93
式(2) + TPPO	0.483	0.97
式(2) + TOPO	0.798	0.93
式(2) + TPPO + TOPO	0.956	0.80

40

【0036】

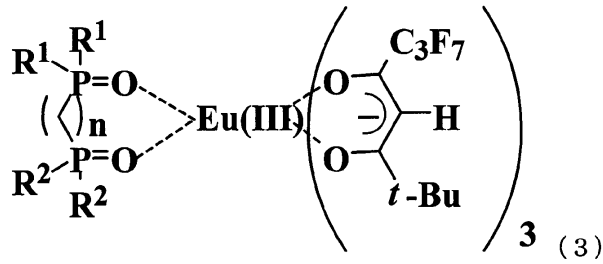
[実施例2]

酢酸エチルに下記式(3)に示す8配位の希土類錯体を溶解し、発光スペクトルからブランチング比の計測を行った。結果を表2に示す。表2に示すように、配位子の分子構造の違いにより、ブランチング比が特異的に変化することが確認された。このことから、ブランチング比により生体分子識別機能があることが確認された。

【0037】

50

【化3】



【0038】

10

【表2】

Eu(III) 錯体の発光スペクトルの比較
 ブランチング比 (300K, AcOEt 中、 $2 \times 10^{-4}M$)

R ¹	R ²	n	ブランチング比
Ph	n-Bu	3	20
Ph	n-Oct	3	21
Ph (m-OMe)	n-Bu	3	22
Ph (m-OMe)	n-Bu	3	21
Ph (m-CF ₃)	n-Bu	3	23

20

【0039】

本発明のいくつかの実施形態を説明したが、これらの実施形態は、例として提示したものであり、発明の範囲を限定することは意図していない。これら実施形態は、その他の様々な形態で実施されることが可能であり、発明の要旨を逸脱しない範囲で、種々の省略、置き換え、変更を行うことができる。これら実施形態やその変形は、発明の範囲や要旨に含まれると同様に、特許請求の範囲に記載された発明とその均等の範囲に含まれるものである。

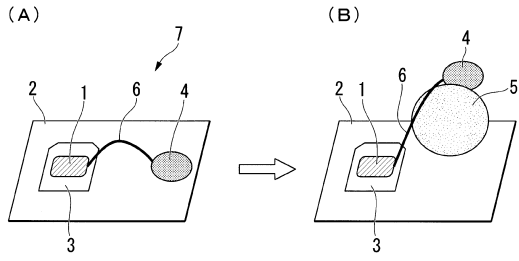
【符号の説明】

【0040】

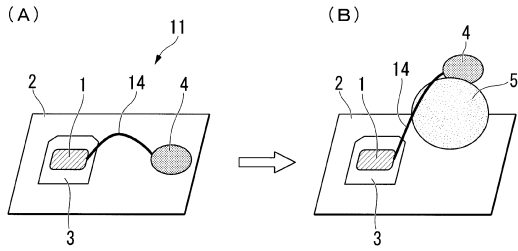
1 ... 基板吸着部、2 ... 基板、3 ... SP2領域、4 ... 希土類錯体、5 ... 生体分子、6 ... リンカー、7 ... 薄膜生体分子検出素子、11 ... 薄膜生体分子検出素子、14 ... アプタマー、21 ... 薄膜生体分子検出素子、24 ... アプタマー、31 ... 生体分子検出装置、32 ... 薄膜生体分子検出素子、33 ... 二波長同時検出装置、34 ... 制御部

30

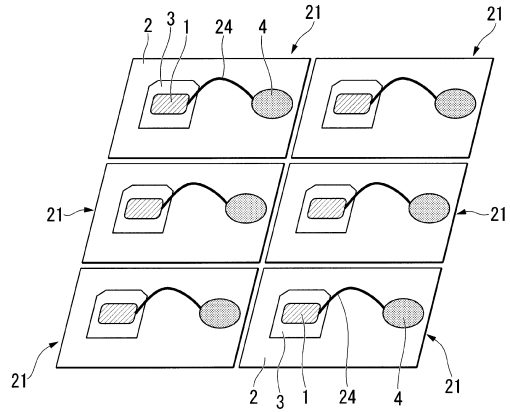
【図1】



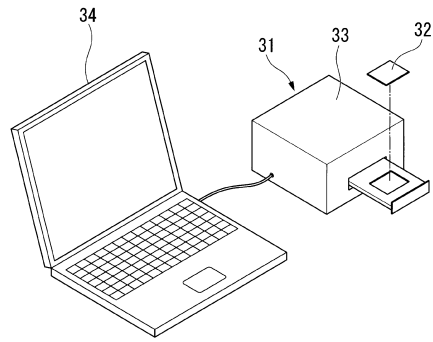
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特開2013-253825(JP,A)
特開2011-128060(JP,A)
特開2012-061794(JP,A)
米国特許出願公開第2009/0224048(US,A1)
米国特許出願公開第2010/0008618(US,A1)
国際公開第2010/147859(WO,A1)
国際公開第2009/014787(WO,A2)
特表2004-500109(JP,A)
国際公開第2010/029735(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

- G01N 21/62 - 21/73
G01N 33/48 - 33/98