

「プロセスインテグレーションによる
機能発現ナノシステムの創製」
平成 20 年度採択研究代表者

平成 21 年度
実績報告

宮原裕二

(独)物質・材料研究機構 生体材料センター センター長

機能化ナノ構造ゲートバイオトランジスタの創製

§ 1. 研究実施の概要

本年度はバイオトランジスタ研究を下記の項目に分けて、自己組織化膜、機能性分子の創製、及びバイオトランジスタの基本機能の検証を中心に検討を進めている。

(1) ゲート固/液界面構造の解明と制御

脂質二重膜をゲート表面に形成する際、共存イオンの種類により脂質二重膜の電荷検出の大きさが変化することを見出した。これはゲート材料表面と各種イオンとの親和性の違いにより、イオン分布が再構成されるためであると考えられた。また、現在広く用いられているベシクルフュージョン法では、電界効果デバイスのゲート表面に様々な組成の脂質膜を固定化することが困難である。そこで、ベシクルフュージョンに変わる脂質膜固定化法を開発した。基板材料をアミノシラン処理後、分子ポストを構築し、その支柱を利用して流動脂質膜を形成した。

(2) 自己組織化生体材料ゲートの構築

生体分子認識に基づく電位変化を高精度に計測するために、バイオトランジスタのゲート材料及び生体分子固定化方法の検討を行った。延長ゲート型トランジスタのゲート材料として金電極を用いて金とチオールとの親和性を利用して生体分子を固定化した。20 年度に引き続き、自己組織化膜におけるリンカーの長さ、残留官能基、フェニルボロン酸の構造、密度などの材料物性評価を行い、末端感応基を CH₃, OH などに変えたときの蛋白質の吸着特性、及びフェニルボロン酸末端とした時のシアル酸定量性などを明らかにした。

(3) 高分子膜ゲートの形成

糖鎖と対象たんぱく質間の結合（相互作用）に有利な界面合成を検討した。糖鎖の集積化に加えて運動性を上げ、先行研究を凌駕する機能発現を狙うことを目的として分子設計を行った。基板材料に対してブラシ状に固定化できる構造を有する楕形のグリコポリマー

を種々合成し、その効果の検証を行った。また、細胞スフェロイドをトランジスタゲート部に作製するための手法を検討した。材料表面に金表面を選択し、この表面に細胞非接着性マトリックスをマイクロパターニングし、スフェロイドの形成メカニズムを検討した。

(4) バイオトランジスタ機能の検証

(4.1) バイオトランジスタによる遺伝子解析

バイオトランジスタを用いた遺伝子解析において、前処理を含めた反応システムの構築および特性の検証を行っている。今までに繰り返し利用可能な微小反応セル(チップホルダー)を試作し、微量サンプルでの反応でも高い再現性が得られることを確認した。また、DNA 塩基配列解析を目指し、上記微小反応系と核酸試薬注入システムのインターフェースの開発を行った。

(4.2) 細胞トランジスタによる細胞機能の非侵襲モニタリング

細胞トランジスタでは、細胞の機能を非標識・非侵襲・リアルタイムで計測するためのデバイス創製および細胞応答の検出メカニズムを調査した。その結果、細胞/ゲートセンシング界面への細胞接着因子の導入により安定した培養を電気計測しながら実施することに成功した。また、種々の細胞機能の応答をゲートセンシング表面で設計することが可能となり、今後は細胞/ゲート間のシグナル変換界面の創製および細胞応答のアレンジをすることで半導体バイオセンシング技術による様々な細胞機能計測を実現できると想定している。

(4.3) 自己組織化ゲート表面を用いた糖鎖解析トランジスタの創製

フェニルボロン酸化合物の自己組織化単分子膜を表面に形成した金電極を検出ゲートとした「シアル酸認識トランジスタ」を開発した。このシアル酸認識トランジスタを用いて、転移癌モデルとしてマウス黒色腫細胞を用いた肺癌モデルにおける癌転移度定量的の評価を行った。高転移性の癌細胞表面ではシアル酸発現が亢進しており、これを指標として、当該「シアル酸認識トランジスタ」により検出することで、ラベルフリーかつリアルタイムに癌転移度が定量的に求められることが確認された。

§ 2. 研究実施体制

(1) NIMS グループ

- ① 研究分担グループ長： 宮原 裕二 ((独)物質・材料研究機構、センター長)
- ② 研究項目
 1. ゲート固/液界面構造の解明と制御
 2. 脂質膜及び遺伝子解析バイオトランジスタの創製

(2) 東大坂田グループ

- ① 研究分担グループ長： 坂田 利弥 (東京大学、講師)
- ② 研究項目

1. 半導体バイオセンシング技術による細胞機能の非標識・非侵襲・リアルタイム計測

(3) 東大松元グループ

- ① 研究分担グループ長：松元 亮（東京大学、特任助教）
- ② 研究項目
 - 1. 自己組織化膜ゲートバイオトランジスタによる糖鎖解析
 - 2. 糖鎖分子を検出するための表面デザイン、表面の評価、デバイスの評価、生物学的評価

(4) 東京理科大グループ

- ① 研究分担グループ長：大塚 英典（東京理科大学、准教授）
- ② 研究項目
 - 1. 細胞接着を促進させる機能性分子の基板への化学修飾
 - 2. 細胞スフェロイドアレイの作成
 - 3. ボロン酸基含有ブロック共重合体表面の作成

(5) 日立グループ

- ① 研究分担グループ長：神原 秀記（(株)日立製作所中央研究所、フェロー）
- ② 研究項目
 - 1. 前処理を含めたバイオトランジスタ反応システムの構築および特性の検証
 - 2. 生体反応のチップ上での安定的再現を企図した生体高分子固定化システムの構築
 - 3. 応用研究:1細胞遺伝子発現解析

(6) 慶応グループ

- ① 研究分担グループ長：鈴木 孝治（慶應義塾大学理工学部、教授）
- ② 研究項目
 - 1. 高輝度蛍光標識プローブの開発
 - ・ 蛍光プローブ分子候補の設計・合成
 - 2. 電荷付与型核酸プローブの開発
 - ・ 核酸プローブ分子候補の設計・合成

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

(1) ゲート固/液界面構造の解明と制御

脂質二重膜を窒化シリコンのゲート表面に形成する際、共存イオンの種類により脂質二重膜の

電荷検出の大きさが変化することを見出した。測定溶液中の陽イオンに関していうと、分子量が大きくなると電位変化は次の順番 $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$ で小さくなることを明らかにした。これはゲート材料表面と各種イオンとの親和性の違いにより、イオン分布が再構成されるためであると考えられた⁸⁾。一方、現在広く用いられているベシクルフュージョン法では、電界効果デバイスのゲート表面に様々な組成の脂質膜を固定化することが困難である。例えば、これまで用いてきた窒化シリコンゲートは、生理的条件下でその表面に負電荷を持つため、負電荷を持つ脂質膜を固定化することができなかった。また、脂質膜と電界効果デバイスを組み合わせた系をバイオセンサーとして利用する際、膜たんぱく質を用いて脂質膜を機能化する方法が期待される。しかしながら、既存の膜固定化法では膜たんぱく質を脂質膜に再構成することは大変困難である。そこで、既存の手法に変わる脂質膜固定化法を開発した。プロトコルを確立するため、表面の反応性がよく分かっているガラス基板を用いた。様々な表面分析手法を用い、流動性を保持した膜をガラス表面に固定化できることが明らかとなった。

(2) 自己組織化生体材料ゲートの構築

生体分子認識に基づく電位変化を高精度に計測するために、図1に示すようにトランジスタ部と反応部を分離した延長ゲート型トランジスタ構造とし、ゲート材料として金電極を用いて金とチオールの親和性を利用して生体分子を固定化した。アルカンチオールの末端感応基を変えて、蛋白質分子の吸着特性を調べた。

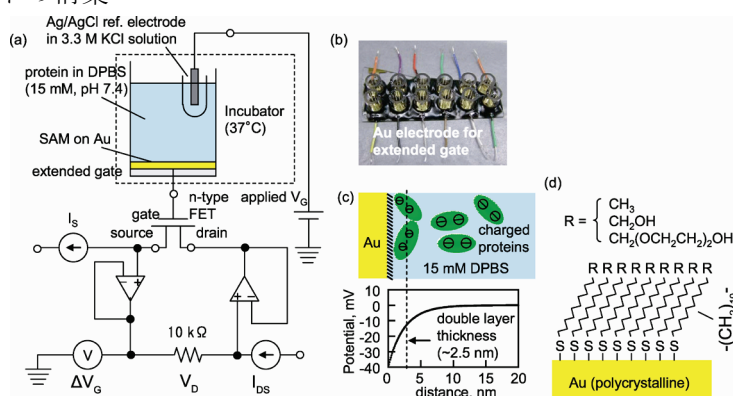


図1 延長ゲート型トランジスタと自己組織化膜の形成

その結果、アルブミンなどの蛋白質のゲート材料への吸着特性を定量的に評価できること、測定感度は表面プラズモン共鳴や水晶振動子マイクロバランス法と同等であることがわかった。また、電極材料としてカーボンナノチューブを検討した結果、CNT 形成時に混入する不純物が電気化学的活性に影響を及ぼすことを明らかにした⁹⁻¹²⁾。

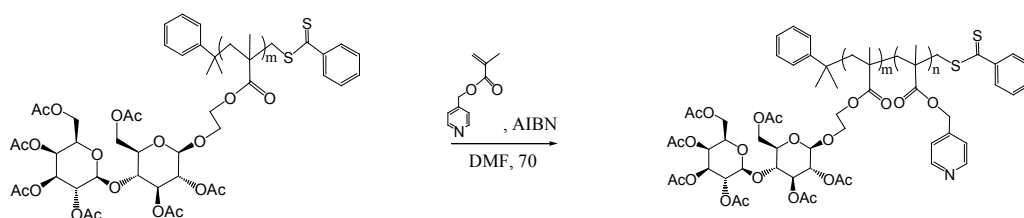
また、同様に延長ゲート型トランジスタ方式により、フェニルボロン酸化合物の自己組織化単分子膜を表面に形成した金電極を検出ゲートとした「糖認識トランジスタ」を開発した^{14), 16)}。金スパッタ薄膜基板を作成し、ここへ 10-carboxy-1-decanethiol による自己組織化単分子膜 (SAM) を形成、続いてこの表面に 3-acrylamidophenylboronic acid を導入したものを FET エクステンデドゲートとして用いた。形成した電極表面の SAM 膜およびフェニルボロン酸分子層の密度、膜厚、表面モーフロジーの評価を、それぞれ水晶振動子微量天秤法 (QCM)、エリプソメトリー、SEM 観察から確認した。

(3) 高分子膜ゲートの形成

[1]細胞接着を促進させる機能性分子の基板への化学修飾:

糖鎖は生体分子を特異的に認識し、その機能は糖鎖が集積化することで高められる(クラスター効果)。また、ピリジン(Py)は様々な遷移金属と親和性があることが知られている。昨年度に引き続き、クラスター効果により高い生体分子認識能が期待されるラクトースの糖鎖高分子と、これを材料表面に安定に修飾可能とするピリジンとのブロック共重合体を精密重合であるRAFT 重合法により合成し(表 1)、糖-タンパク質特異的相互作用を高感度に認識する界面を設計した。

まずラクトースモノマーをRAFT 剤であるCDBによって重合させ、次いでピリジンモノマーとのブロック共重合体を合成した。このブロック共重合体の物理化学的特性を界面化学的手法によって評価した。



^1H NMR、GPC により目的のブロック共重合体が合成できたことを表 1 のように確定した。この表面に対する生体分子認識能を評価するため、糖鎖に対応するレクチンの認識をQCMを用いて測定した結果、この認識は表面に対するブロック共重合体の固定化密度に強く依存し、固定化密度が高い表面 (Glycopolymer(12)-b-Py(8)) の方が低い表面 (Glycopolymer(12)-b-Py(27)) よりレクチン認識が高いことが明らかとなった。さらに、BSA の非特異吸着抑制の程度を調べた結果、高密度の表面の方が高い抑制能を有することも明らかとなった。グリココポリマー糖鎖の集積した表面ほど、非特異性は低く、特異性は高い表面であることが明らかとなった¹⁹⁾。一方、生理的条件下で糖(特にグルコース)に高い親和性を有する完全合成型フェニルボロン酸ゲルを開発した⁴⁾。

表 1. ブロック共重合体の精密重合解析結果

	※1 Conversion	※2 Py の unit 数	※3 $M_{n,cal}$	
①	84%	n=8	10782	Glycopolymer(12)-b-Py(8)
②	82%	n=27	14148	Glycopolymer(12)-b-Py(27)

※1 反応液の ^1H NMR から計算した値

※2 仕込み比と Conversion から計算した値

※3 Glycopolymer の分子量とピリジンユニット分の分子量を足した値

[2]金表面を用いた細胞アレイのための材料設計の詳細検討

前年度に引き続き、表面として精密なブラシ構造の制御が可能である金表面をモデルとして選択し、細胞スフェロイドアレイを効率的に形成させるための高分子表面設計手法について詳細な検討を行った。

QCM 基板表面に、末端にメルカプト基を有する PEG を反応させることにより PEG ブラシを構築した。PEG 固定化方法として、分子量 5kDa と 2kDa の 2 種類の PEG を使い、PEG5k を 3 回 (PEG5k (3))、PEG5k を 1 回と 2k を 3 回 (PEG5k (1)+2k(3))、PEG5k を 2 回と 2k を 4 回 (PEG5k (2)+2k(4)) 反応させた表面をそれぞれ作製した。その結果、PEG5k を 3 回繰り返し固定することでブラシ密度は増大することが分かった。次に、PEG5k を導入後、PEG2k 溶液を表面に流すことによって、表面固定化量が増大していることから、PEG2k が表面に導入されたと考えられた。作製した 3 種類の PEG 表面は、QCM の測定により (Table1 参照)、PEG5k (3) < PEG5k (1)/2k (3) < PEG5k (2)/2k (4) の順に表面の PEG ブラシ密度が高くなっていることが明らかとなった⁵⁻⁷⁾。

Table 1 Comparison of 3 types of PEG immobilization measured by QCM: Γ and Γ_{total} ($\times 10^{-15} \text{nmol nm}^{-2}$) represent amount of immobilized PEG chains.

PEG5k(3)			PEG5k(1)/ 2k(3)			PEG 5k(2)/ 2k(4)		
PEG	$\Delta f(\text{Hz})$	Γ_{total}	PEG	$\Delta f(\text{Hz})$	Γ_{total}	PEG	$\Delta f(\text{Hz})$	Γ_{total}
5k(1)	184.0	2.54	5k(1)	173.5	3.92	5k(1)	169.8	4.28
5k(2)	12.0		2k(1)	57.1		5k(2)	20.8	
5k(3)	7.0		2k(2)	1.2		2k(1)	50.6	
			2k(3)	0.3		2k(2)	8.3	
						2k(3)	1.1	
						2k(4)	1.1	

内皮細胞用培地からのタンパク質吸着を測定した。PEG 固定化表面は未修飾の金チップ表面と比較して、大幅にタンパク質吸着量が減少した。PEG 鎖導入による非特異的吸着抑制効果が現れたためと思われる。また、PEG 鎖導入量の増加に伴いタンパク質の吸着量は減少した。特に、PEG5000 と 2000 の複合表面において、PEG の固定化量の増加に伴い、タンパク質吸着量が減少しているのが分かった。その後、パターン状のメタルマスクを介しプラズマ処理することにより、パターン化 PEG 基盤を作製した。細胞は、フィーダーレイヤーとして、ヒト正常血管内皮細胞 (HUVEC) を播種し、1 日後、ウシ関節軟骨細胞 (Chondrocytes) を播種し、経時的変化を顕微鏡観察した。物理化学的評価において最も PEG ブラシ密度が高く、その結果、非特異的タンパク吸着が最小であった表面で、最も高度にかつ長期にわたり、スフェロイド形態を制御することに成功した¹⁸⁾。

(4) バイオトランジスタ機能の検証

(4.1) バイオトランジスタによる遺伝子解析

[1] 遺伝子検出の高感度化の検討

ハイブリダイゼーションに伴う電荷密度変化を大きくするために、金ナノ粒子にレポーターオリゴヌクレオチドを固定化し、大きな負の電荷を有する複合体を作製し、サンドイッチアッセイを行った。その結果、ハイブリダイゼーションのみの電位変化に比べて約4倍の高感度化を実証した²⁾。また、オープンサンドイッチ法とトランジスタを組み合わせることにより、低分子量の抗原を定量的に検出できることを確認した¹⁾。

[2] 前処理を含めたバイオトランジスタ反応システムの構築および特性の検証

高精度な測定を目指して、バイオトランジスタ評価システムの構築を進めている。バイオトランジスタのゲート表面のみに試料溶液が送付されるように図2に示す反応セルを開発した。

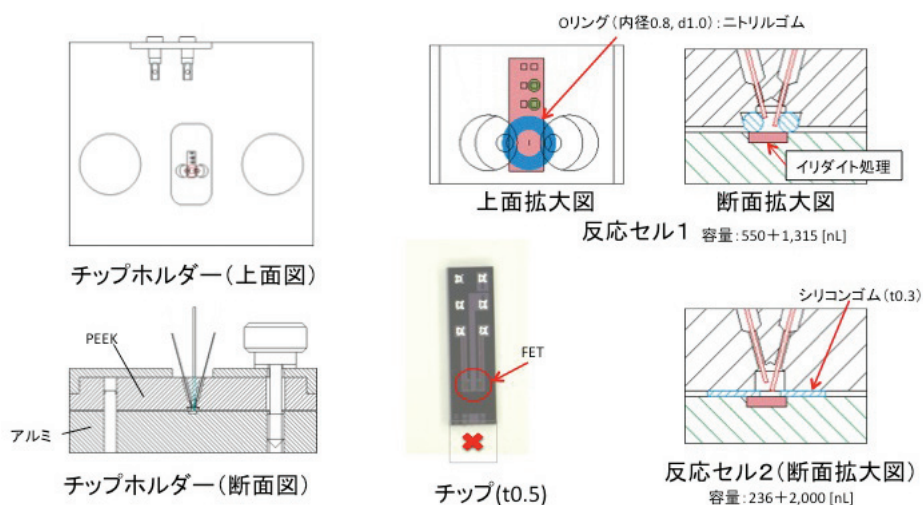


図2 バイオトランジスタ用フローセル

チップの電極部にはスプリングを用いた接触型の針状端子を開発し、トランジスタチップを組み込んだ、繰り返し利用可能な微小反応セル(チップホルダー)を試作し、微量サンプルでの反応でも高い再現性が得られることを確認した。

上記反応セルに4種類の核酸伸長試薬溶液、洗浄液、測定溶液などを送付して、DNA塩基配列解析を実施できるようにするために、図3に示すような核酸試薬注入システムを開発した。

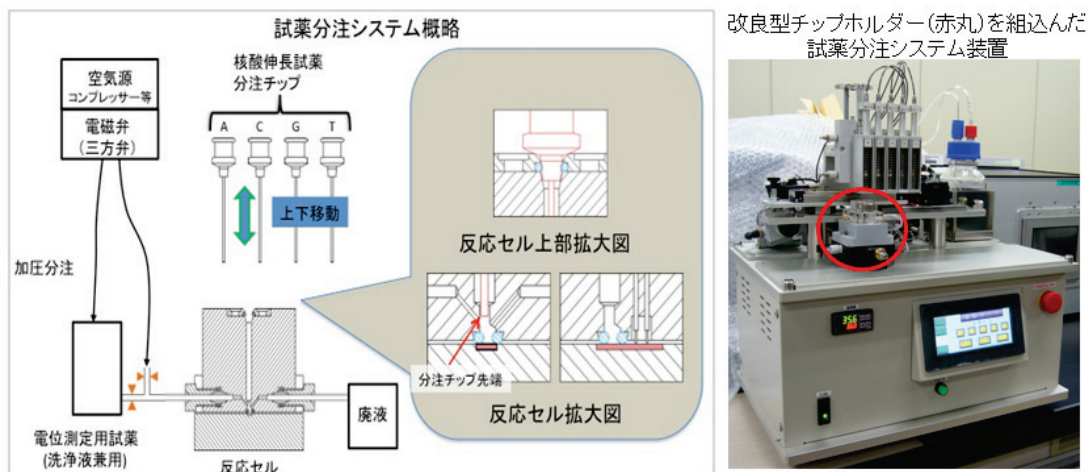


図3 試作した核酸試薬注入システムの外観

4 種類の核酸伸長試薬を反応セルの中央から順次導入し、電位測定試薬を加圧方式により反応セルに送液する構造とした。このバイオトランジスタ評価システムの開発(図3)により、自動で試薬の導入・電位計測のサイクルを行えるようになり、測定の高精度化が期待される。

[3] 生体反応のチップ上での安定的再現を企図した生体高分子固定化システムの構築

ゲル被覆等と相性の良い方法で、かつ常温中性 pH で自発的に共有結合する、[ボロン酸]-[特異的ペプチド配列]固定化システムを構築している(図4)。

現在までに、5-7残基の特定のアミノ酸配列により、ボロン酸を特異的に認識結合することを、ボロン酸特異的結合色素の阻害実験及び SPR により確認、consistent な結果を得ている。

現在、実際にタンパク質分子の末端にこの配列を導入し、ボロン酸含有高分子フィルム(or ゲル)にタンパク固定できるか確認実験を行っている。

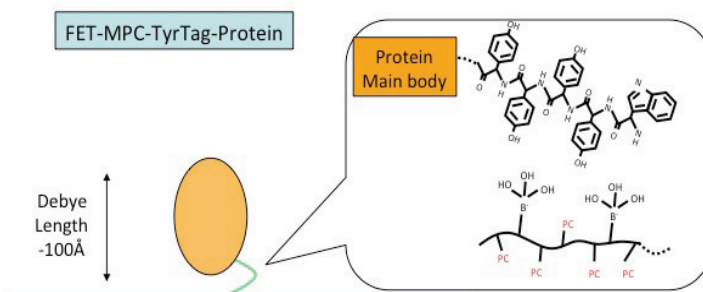


図4 タンパク質固定化方法の概要

[4] 高輝度蛍光標識プローブの開発

・蛍光プローブ分子候補の設計・合成

近年、この技術を用いた新たなDNAシーケンシング装置としてバイオトランジスタ装置が宮原らにより考案された。これは電位の変化によりDNAを検出する装置であり、DNAは水溶液中でリン酸基が負電荷をもつことから、DNA合成反応を電位変化によって検出することができる。バイオトランジスタは高集積であり、小型、また安価であるため、従来のシーケンシング法に代わる安価・高感度・高速のシーケンシング法として期待される。しかし、現在のバイオトランジスタでのDNA検出では、i) 低感度、ii) 多塩基(特に10塩基以上)の読み取りが困難、iii) 電位変化と伸長反応との真の関係が未解明、といった問題点が挙げられる。

本研究では上記の問題を解決するため、1. 高輝度マルチカラー蛍光プローブ、2. 電荷付与型プローブの2つの機能性核酸プローブを開発する。高輝度な蛍光色素を導入したプローブと大きな電荷を付加したプローブを用いることにより、バイオトランジスタ上でのDNAシーケンシングの i) 感度の向上, ii) DNA読み取り長の拡大, iii) 電位/蛍光の同時測定による合成現象の解明を試みるのが目的である。

本年度の研究では、上記1の目的のため、蛍光プローブ分子候補の設計および合成を試みた。まずは、基質としてのヌクレオチド(dNTP)に、側鎖(Linker)を介して、蛍光色

素または電荷をもつ部位 (Probe) を導入した機能性プローブとすることとし、以下の3つのユニットから成る分子を設計した。



蛍光色素としては、これまでに本研究室で開発された高輝度ボロンジピロメテン誘導体蛍光色素 KFL に COOH 基を導入した分子設計を行った。KFL を用いることにより、既存の DNA 蛍光プローブよりシャープなスペクトル高輝度の蛍光が得られる。その目的のため、KFL 7C を合成した。6 工程から合成を達成した。

[5] 電荷付与型核酸プローブの開発

・核酸プローブ分子候補の設計・合成

基質としてのヌクレオチド (dNTP) の合成は、リン酸付加体の生成物が少量しかできないうえ、不安定であり、かなりの労力と時間を要した。特に3工程目のdNTP中にリン酸を3つ導入する場合の合成には4ヶ月以上の時間を要したが、無水反応の徹底と溶媒の精製の徹底により成功した。この生成物は、室温では分解するため、冷凍でないと安定な保存はできないことがわかった。

次に電荷をもつ部位として、スルホン酸基を持つSHAを設計、合成した。現在、リンカーは一端がアルキル基、もう一端がアミノ基をもつ分子を設計している。さらに、dNTPの塩基と蛍光部位(KFL 7C)あるいは電荷部位(SHA)とをつなぐリンカーの合成を検討しているが、リンカー部はソノガシラカップリングによって結合させ、KFL 7CあるいはSHAとはアミド結合によって結合させる合成経路を検討している。

(4.2) 細胞トランジスタによる細胞機能の非侵襲モニタリング

細胞の機能を非標識、非侵襲、リアルタイムで計測するためのデバイス創製および生体機能計測の可能性を探索している。平成21年度は、細胞応答の基本特性を半導体バイオセンシング技術により計測可能であることを実証した。細胞機能として、細胞死(アポトーシス)、マウス受精卵の胚分割、血管内皮細胞上での転移癌挙動、幹細胞の分化挙動などが挙げられる。いずれも、各細胞のゲートセンシング表面において安定した培養を確認し、そのためのプロトコルを本課題により確立した。具体的には、細胞/ゲート界面における細胞接着因子(マトリゲル、コラーゲン、ゼラチン、RGD ペプチドなど)の導入により各細胞の接着およびその後の培養を通常の培養皿と同様に実施することが可能となった。また、受精卵などの外部環境(温度、pH など)に敏感な細胞の培養には、デバイス作製時の材料選択に気を配り、PDMSなどの細胞毒性の低い材料を培養チャンバの接着などに使用することにより数週間にわたる長期間の培養および半導体デバイスによる同時計測がリアルタイムで実現可能であることを実証した。特に、細胞培養環境を整備したインキュベータ内に顕微鏡を内蔵し、その観察ステージに半導体デバイスを設置することにより、顕微鏡による動画観察と同時に電気計測が可能となり、細胞挙動と電気シグナルの相関を明らかにすること

が可能となった(図 5)。また、カリウムイオン選択性クラウンエーテル分子をゲート表面に修飾し、アポトースに伴うカリウムイオンの放出をトランジスタで検出可能であることを確認した³⁾。さらに、キャパシターを用いて細胞膜表面のトランスポーターと基質の相互作用を検出可能であることを確認した¹³⁾。

以上より、細胞応答の基本的な電気特性、細胞/ゲート界面の構築、細胞機能センシングの最適な培養環境の整備を実現し、細胞機能計測を行う基礎的知見を得ることができた。

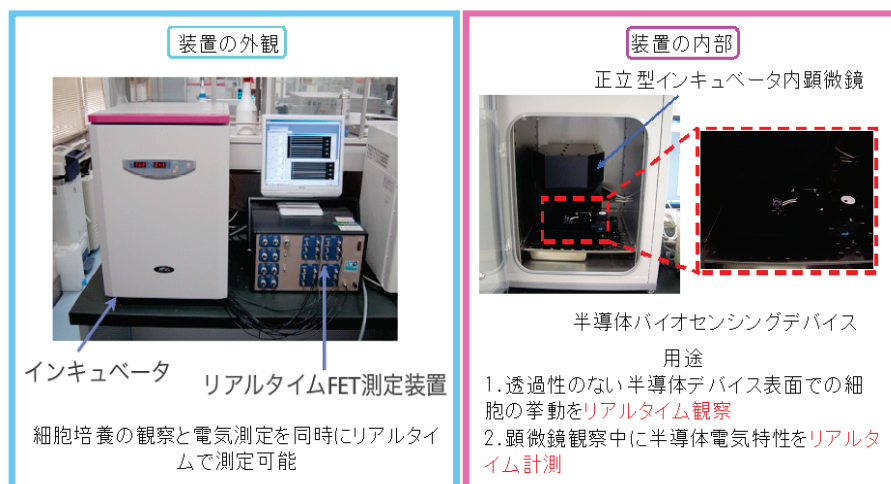


図5 細胞機能センシングシステム

(4.3) 自己組織化ゲート表面を用いた糖鎖解析トランジスタの創製

種々の単糖を添加して生理的条件下でのシアル酸に対する特異性を確認したうえで、細胞表面糖鎖中のシアル酸を遊離せずに直接に検出できるかを調べるため、ウサギ赤血球を用いた評価を行った。赤血球表面のシアル酸発現量変化は I 型糖尿病との関連が報告されている。したがって、簡便に行える赤血球表面のシアル酸定量は糖尿病診断の目的においても重要である。今日、シアル酸定量のための多種多様なキットが市販されているが、これらは例外なく、多段階の酵素反応に加えて蛍光分子などによる標識操作を伴うものであり、非常に高価であるうえに判定までに 1 日程度を要するのが常である。さらには、シアリダーゼや強酸処理によって糖鎖中のシアル酸をフリーの状態に遊離させる前処理が必要なため、細胞にとっては完全に致命的な操作を含むものである。検討の結果、あらかじめ正常な細胞についての濃度- V_T プロファイルが得られれば、以後、既知濃度の赤血球をゲート上に播種するだけで、そのシアル酸発現量がリアルタイムに求められることが明らかとなった¹⁵⁾。さらに、転移癌モデルとして、マウス黒色腫細胞を用いた肺癌モデルにおける癌転移度定量の評価を行った。図6にその結果をまとめた。高転移性の癌細胞表面ではシアル酸発現が亢進しており、これを指標として、当該「シアル酸認識トランジスタ」により検出することで、前例と同様、ラベルフリーかつリアルタイムに癌転移度が定量的に求められることが確認された。以上の検討結果から、これら疾病(糖尿病、癌)の新規な診断技術展開への良好な見通しを得るに至った。一方、ゲート表面に高分子ゲルを形成したトランジスタを製作し、基本特性を評価した。その結果、カルシウムイオン濃度に依存し

た高分子ゲルの収縮、膨張に伴い、トランジスタの出力が変化することを見出した¹⁷⁾。

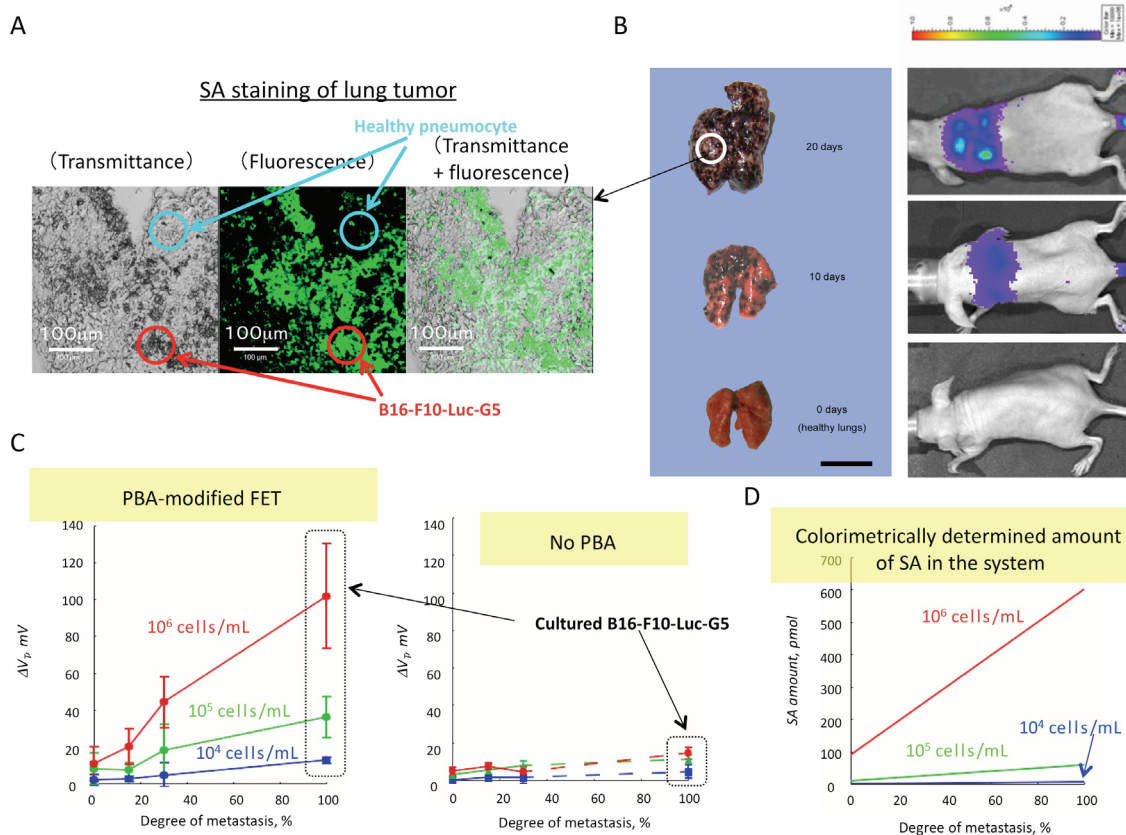


図6 (A)マウス黒色腫細胞 (B16-F10-Luc-G5,) をマウス肺に転移させた組織切片のシアル酸染色画像 (緑色部分が腫瘍) . (B)種々転移度の肺癌組織およびその *in vivo* バイオルミネセンス画像. (C)「シアル酸認識トランジスタ」による癌転移度の定量結果.

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Toshiya Sakata, Masaki Ihara, Izumi Makino, Hiroshi Ueda and Yuji Miyahara, “Open sandwich-based immuno-transistor for label-free and highly sensitive detection of low molecular weight antigen”, *Analytical Chemistry*, 81, 7532–7537 (2009). DOI: 10.1021/ac900457m
2. Toshiya Sakata and Yuji Miyahara, “Charged-Nanosphere-Coupled Biotransistor for Highly Sensitive Genetic Analysis”, *Current Applied Physics*, 9, e210-e213 (2009). DOI:

10.1016/j.cap.2009.05.034

3. T. Murakami, T. Sakata, A. Matsumoto, M. Takai, K. Ishihara, Y. Miyahara, "Development of cell/transistor interface for real-time and noninvasive monitoring of potassium ion release based on apoptosis using biologically-coupled field effect transistor", *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, in press.
4. Akira Matsumoto; Kazuya Yamamoto; Ryo Yoshida; Kazunori Kataoka; Takao Aoyagi; Yuji Miyahara, "A totally synthetic glucose responsive gel operating in physiological aqueous conditions", *Chem. Commun.*, 46, 2203-2205 (2010). DOI: 10.1039/b920319b
5. Hidenori Otsuka, Self-assembly of PEG-based polymers for biomedical applications, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, in press.
6. 藤田洋平, 上野耕治, 大塚英典, 高分子を用いた界面制御とナノ粒子の分散特性, *J. Jpn. Soc. Colour Mater.*, in press.
7. 大塚英典, 機能性高分子表面, *J. Jpn. Soc. Colour Mater.*, in press.
8. Chiho Kataoka-Hamai and Yuji Miyahara, "Mechanisms of Supported Bilayer Detection Using Field-Effect Devices", *Analyst*, 135, 189-194 (2010). DOI: 10.1039/b905197j
9. Roberto Scipioni, Martin Pumera, Mauro Boero, Yuji Miyahara, and Takahisa Ohno, Investigation of the Mechanism of Adsorption of β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide on Single-Walled Carbon Nanotubes, *J. Phys. Chem. Lett.* 1, 122-125 (2010). DOI: 10.1021/jz9000714
10. Martin Pumera and Yuji Miyahara, What amount of metallic impurities in carbon nanotubes is small enough not to dominate their redox properties?, *Nanoscale*, 1, 260-265 (2009). DOI: 10.1039/b9nr00071b
11. Martin Pumera, Roberto Scipioni, Hideo Iwai, Takahisa Ohno, Yuji Miyahara, and Mauro Boero, A Mechanism of Adsorption of β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide on Graphene Sheets: Experiment and Theory, *Chem. Eur. J.*, 15, 10851-10856 (2009). DOI: 10.1002/chem.200900399
12. Martin Pumera, Hideo Iwai, and Yuji Miyahara, Bimetallic Nickel-Iron Impurities within Single-Walled Carbon Nanotubes Exhibit Redox Activity towards the Oxidation of Amino Acids, *ChemPhysChem*, 10, 1770 -1773 (2009). DOI: 10.1002/cphc.200900355
13. Toshiya Sakata and Yuji Miyahara, "Capacitance-Voltage Measurement of Transporting Function at Cell Membrane", *IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines*, 129, 242-244 (2009). DOI: 10.1541/ieejsmas.129.242
14. Akira Matsumoto; Naoko Sato; Yuji Miyahara, " Label Free Carbohydrate Detection By Using Phenylboronic Acid Gate-Modified Field Effect Transistor ", *Curr. Appl. Phys.*, 9, 214-217 (2009). DOI: doi:10.1016/j.cap.2009.06.012
15. Akira Matsumoto; Naoko Sato; Kazunori Kataoka; Yuji Miyahara, "Noninvasive Sialic Acid Detection at Cell Membrane by Using Phenylboronic Acid Modified Self-Assembled

- Monolayer Gold Electrode", *J. Am. Chem. Soc.*, 131 (34), 12022-12023 (2009). DOI: 10.1021/ja902964m
16. Akira Matsumoto, Naoko Sato, Toshiya Sakata, Kazunori Kataoka and Yuji Miyahara, "Glucose-sensitive field effect transistor using totally synthetic compounds", *J. Solid State Chem.*, 13, 165-170 (2009). DOI: 10.1007/s10008-008-0610-7
17. Akira Matsumoto; Takashi Endo; Ryo Yoshida; Yuji Miyahara, "Electrical Visualization of Chemo-mechanical Signal Transduction Using a Smart Gel Gate-modified Field Effect Transistor", *Chem. Commun*, 37, 5609-5611 (2009). DOI: 10.1039/b911689c
18. H. Otsuka, Y. Nakasone, M. Yamamoto, Nanofabrication of PEG layer to control protein and cell functions. *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.*, 34(3), (2009).
19. T. Ishizuka, Y. Saito, H. Otsuka, Highly Sensitive Detection of Cell and Protein at PEG-modified Interface for Diagnosis. *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.*, 34(3), (2009).

(4-2) 知財出願

- ① 平成21年度特許出願件数 (国内 3 件)
- ② CREST 研究期間累積件数 (国内 3 件)