

宮原 裕二

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授

機能化ナノ構造ゲートバイオトランジスタの創製

## §1. 研究実施体制

### (1) 東京医科歯科大学グループ

- ① 研究代表者: 宮原 裕二 (東京医科歯科大学 生体材料工学研究所、教授)
- ② 研究項目
  - ・DNA 解析用トランジスタの高性能化
  - ・フェニルボロン酸自己組織化膜ゲートトランジスタによる細胞表面糖鎖解析
  - ・蛋白質・ペプチド解析トランジスタのゲート界面創製

### (2) NIMS グループ

- ① 主たる共同研究者: 片岡 知歩 (物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点 生体機能材料ユニット、研究員)
- ② 研究項目
  - ・生体膜及び遺伝子解析バイオトランジスタの創製

### (3) 東大グループ

- ① 主たる共同研究者: 坂田 利弥 (東京大学大学院工学系研究科、准教授)
- ② 研究項目
  - ・半導体原理による細胞機能計測

### (4) 東京理科大グループ

- ① 主たる共同研究者: 大塚 英典 (東京理科大学総合化学研究科、准教授)
- ② 生体反応性分子インターフェイスの形成
  - (1) 細胞培養基盤の構築
  - (2) 自己組織化高分子膜の形成

(5) 日立グループ

- ① 主たる共同研究者: 神原 秀記 ((株)日立製作所中央研究所、フェロー)
- ② 研究項目
  - ・ FET 応用バイオチップの開発
  - ・ 酵素等の基板固定化法の確立および FET による生体反応計測系の構築
  - ・ DNA シーケンシングおよび遺伝子発現解析

(6) 慶應グループ

- ① 主たる共同研究者: 鈴木孝治 (慶應義塾大学理工学部、教授)
- ② 研究項目
  - ・ 高輝度蛍光プローブ分子候補の設計・合成
  - ・ 電荷付与型核酸プローブ分子候補の設計・合成

## § 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

### (1) 機能性界面ゲートの構築(東京理科大グループ)

#### (1-1) 細胞培養基盤の構築

FETによる細胞機能のその場計測を検討している。東京理科大グループでは、3次元的に細胞を培養(スフェロイド培養)することで細胞の高機能化培養に成功している。本年度は、金基板上にキトサン層を形成し、この表面に形成させるゼラチン層の安定化を図ることによってスフェロイドをパターンニングすることを試みた。特に、FET測定基板としての足場の最適化を目指し、金表面に形成する細胞足場としての薄膜状態を詳細に解析した。金スパッタリングしたガラス上に、キトサンコート、ゼラチンコートをそれぞれ施し、2層構造を作製した。この際、それぞれの濃度を変化させ、表面電位と成膜性の濃度依存性を調べた。さらに、その2層構造上に光重合型PEG(poly(ethylene glycol))をスピコートし、フォトリソグラフィ法により細胞接着面と非接着面を有するスフェロイドパターンニング基板を作製した<sup>(11-12)</sup>。この基板上で細胞を長期間スフェロイド培養することで、細胞足場の経時的変化を追跡した。また、同様にして2層構造上にPEGをスピコートして全面にUV照射することで、PEG層を作製した。これをリン酸緩衝液に浸し、37°C、5%CO<sub>2</sub>で約2週間インキュベートした。この際に、表面電位、膜厚を測定することで表面のPEG層の経時的変化を追跡した。キトサンコートの表面電位はプラス側に、ゼラチンコートの表面電位はマイナス側に傾くことが確認された。これにより、各層が静電的相互作用で安定化されていることが示唆された。また、キトサン層、ゼラチン層共に、濃度依存的に厚く成膜されていることが分かった。これは、濃度が濃いほど2層間に静電的相互作用が強く働いたためだと考えられる。そして、PEG層の時間維持性については、ゼラチン層が厚いほどPEG層が維持されていた。これは、ゼラチン層が厚いほどPEGと反応する界面層に存在するアミノ基が多く、PEG層が安定化した結果と考えられる。このような製膜状態と細胞接着挙動の相関解析をさらに検討することによって、安定なFET計測系の構築を目指す。

#### (1-2) 自己組織化高分子膜の形成

Fフェニルボロン酸(PBA)は、糖などのcis-ジオールを有する物質と可逆的な共有結合を形成するため、新規分子認識素子としての応用が種々検討されている。PBAと糖の結合定数は溶液のpHに大きく依存しており、塩基性ほど結合定数は高くなるが、癌細胞表面で過剰発現することが知られているシアル酸(Neu5Ac)に対してのみ逆の挙動を示す。本研究ではこの特性を利用し、癌細胞表面のシアル酸を高感度に認識する界面の創製を目的としている<sup>(10)</sup>。非特異吸着抑制能を有するポリエチレングリコール(PEG)と、クリックケミストリーにより表面固定化が可能なAlkyne鎖を重合してブロック共重合体を合成し、PEG末端にアミノフェニルボロン酸(APBA)を導入した。これにより水溶性の高いAPBA安定界面を構築し、そのNeu5Ac認識能について検討した。PEG-macroCTA、Alkyne monomer、Acetol

monomerをそれぞれ合成しRAFT重合を行った。さらに末端にAPBAを修飾し、ブロック共重合体 APBA-PEG-b-(Alkyne-co-Acetol)を合成した。このポリマーを表面に修飾することでAPBA表面を作製し、表面構造解析を行った。Alkyne 8連鎖、Acetol 18連鎖、APBA修飾率75%のAPBA-BCの合成にも成功した。現在、各APBA表面のNeu5Acに対する認識能について、pH変化に伴う電位測定やSPR測定による評価を進めている。

## (2) バイオトランジスタ機能の検証

### (2-1) バイオトランジスタによる遺伝子解析

#### (2-1-1) 機能性核酸プローブの開発(慶應グループ)

高輝度マルチカラー蛍光プローブおよび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している。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。

#### [1] 高輝度マルチカラー蛍光プローブの設計・合成

機能性核酸プローブとしての高輝度蛍光核酸プローブには、蛍光色素として本研究室で開発されたボロンジピロメテン誘導体高輝度蛍光色素KFLを合成して用いることで、蛍光・電位同時検出によるDNAの伸長反応現象解明を目的とした。KFLは高量子収率と鋭い蛍光スペクトル特性を持つため、高感度な検出に適している。合成した蛍光核酸プローブKFL-11-dUTPの評価として、DNA(オリゴヌクレオチド)の3'末端への導入を行った。Terminal Deoxynucleotidyl Transferase(TdT)は反応に鋳型を必要とせず、一本鎖または二本鎖DNAの3'-OH末端にデオキシヌクレオチドを重合する反応を触媒する酵素である。TdT反応で得られたKFLがラベル化されたオリゴヌクレオチドを電気泳動によって検出した。その結果、KFLおよび比較とした代表的蛍光色素Cy3ともに、酵素反応でDNAの色素の取り込まれたことを確認できた。また、TdT反応で得られたKFLがラベル化されたオリゴヌクレオチドを市販のDNAチップによって検出した。その結果、現在用いられているCy3標識と同様に、KFLでも蛍光検出を行うことができた。この時のスキャン画像を数値化したところ、KFLの蛍光強度は固相オリゴ濃度に比例し、Cy3の場合と同様の応答がみられた。

#### [2]電荷付与型核酸プローブの設計・合成

金(Au)電極表面上で固定化したDNA伸長反応の電気化学的測定を行うために、dTTPと電荷をもつ既存の蛍光プローブを用い、電荷により発生する界面電位の変化量の違いを測定した。電荷を持つ蛍光プローブのAlexa-546-dUTPあるいはFluorescein-aha-dUTPを鋳型DNAである5'-AAAAAAAAAATTCAGAGGACG-3'の伸長反応時にdTTPまたは用いたプローブのみが結合するようにし、金電極で電位測定を行った。Alexa-546-dUTPをプローブとした場合で、DNA伸長反応にdTTPを用いた際の電位変化について調べたところ、フルマッチと一塩基ミスマッチDNAのハイブリタイゼーションでは、伸長反応時にシグ

ナルの差がみられ、一塩基ミスマッチの検出を行うことができた。Fluorescein-aha-dUTP では、dTTP を用いた場合に比べ伸長反応時(フルマッチ)のシグナルに増加がみられた。これは Fluorescein のもつカルボン酸によって電荷が増加したためであると考えられる。Alexa-546-dUTPとFluorescein-aha-dUTPの比較では、dTTPを用いた場合に比べ伸長反応時(フルマッチ)のシグナルに増加において、Alexa-546のもつカルボン酸及びスルホン酸によって電荷増加の大きいシグナルであった。これ以外は、両プローブともに電荷の量に比例して伸長反応シグナルの増大がみられ、シグナルがプローブの持つ電荷量によるものであることが確かめられた。このことから、電荷を付与するタイプのプローブがバイオトランジスタ検出に有用であることが認められた。

#### (2-1-2) 酵素等の基板固定化法の確立および FET による生体反応計測系の構築 (日立グループと東大グループとの共同)

ピロリン酸は生体内に普遍的に存在するが、酵素反応、例えば DNA ポリメラーゼによる遺伝子合成反応の副産物でもある。我々は、今回新たにフェニルボロン酸基が自発的にピロリン酸と反応し、その際 FET で十分検出可能な電位変化を誘起する性質を見いだした。さらに、同じくフェニルボロン酸基に特異的に結合するペプチドタグ配列を開発し、これを酵素に導入する事でフェニルボロン酸修飾基板上に任意の酵素を固定化する技術を開発した。フェニルボロン酸修飾基板によるピロリン酸の検出技術と同基板上への酵素固定化技術を併用する事で DNA ポリメラーゼが DNA 合成を行う際に放出するピロリン酸の即時計測系の端緒を開いた。

#### (2-1-3) フェニルボロン酸修飾基板によるピロリン酸検出を企図したバイオチップの開発 (日立グループと東京医科歯科大学グループとの共同)

ペプチドタグにより固定した酵素から放出されたピロリン酸をより効率的に検出できる、酵素反応/ピロリン酸検出用バイオチップとして、様々なゲート電極口径、反応ウェルの組合せを検討している。ピロリン酸検出については数 $\mu\text{M}$  の濃度までのピロリン酸を再現性よく検出する事に成功しているが、酵素反応系においては基質として添加するヌクレオチド三リン酸の信号によりピロリン酸信号がブロックされる事があり、現在マイクロ流路系を新規設計するなどして、この問題の解決を図っている。

#### (2-1-4) 固体表面上での DNA 伸長反応の基本的性質(NIMS グループ)

固相化 DNA 二重らせんの安定性は塩基配列に強く依存するため、解析する配列がセンサーの性能を変化させることになる。この状況は、ハイブリダイゼーション後に固層 PCR などの酵素反応を行うことにより改善できると考えられる。遺伝子トランジスタはゲート近傍の電荷を検出するため、ゲート表面に非常に近い場所で酵素反応を発生させなければならない。すなわち、適切な反応効率を与える DNA/ゲート界面構造を設計するためには、固体表面近傍での酵素活性を理解することが不可欠である<sup>(4)</sup>。固体表面近傍で、DNA ポリメラーゼを介した DNA 伸長反応を行い、伸長反応効率を決定する因子を調べた。固体表面モデルとして、流動性を持たない脂質膜を選択した。その結果、反応効率はプライマー長および脂質組成

に大きく依存することが分かった。これらの結果は、立体効果と、酵素-表面間および DNA-表面間の静電相互作用から説明することができる。

## (2-2) 細胞機能の評価技術

### (2-2-1) スフェロイドゲートトランジスタによる 3D 細胞機能の計測 (東大グループと東京理科大学グループとの共同)

トランジスタのゲート表面で細胞を培養し、細胞機能の評価する技術を開発している<sup>(5-6)</sup>。FET ゲート基板上に軟骨細胞(chondrocyte)からなるスフェロイドアレイを作製し、その電気特性を計測した。長期間培養の計測が可能となったことで、軟骨スフェロイドに対するアスコロビン酸添加の影響を簡便に計測できるようになった。呼吸や増殖活性に基づく pH 変化、軟骨分化により分泌される GAG(硫酸化糖)などの電荷変化をモニタリングに成功した。

### (2-2-2) 移植前診断(IVD-T)を目指した ART on a Semiconductor (東大グループ)

受精卵をゲート絶縁膜表面に静地し、良好胚選別のためのプラットフォームとして検討している。移植実験のプロトコルを確立し、将来的には、ヒト体外受精卵の「移植前診断(IVD-T)」への応用を目指している。体外受精により得られたマウス受精卵をゲート上で培養し、移植に十分な胚盤胞到達率をペトリディッシュ上と同程度まで実現した。また、胚盤胞到達までのリアルタイムでの電気測定を実施するため、単一胚培養可能なチャンバーを電界効果バイオセンシングデバイス上に作製したところ、受精卵の位置を固定し安定な電気計測が可能となった。特に、マウス受精卵の胚活性に応じて電気シグナルに違いが見出された<sup>(7-9)</sup>。この電気シグナルは受精後の呼吸活性に基づく pH 変化に起因するものと考えられる。今回、さらに、半導体上で培養した胚盤胞受精卵をレシピエントマウスに移植実験したところ、培養皿上でのコントロール培養と同程度の産子率が得られ、また、奇形などは見つからなかった。

### (2-2-3) マウス軟骨膜の初代培養細胞を用いた単一細胞解析 (日立グループ)

胎児の骨格形成で、軟骨膜内の細胞が骨細胞へ置き換わるという現象が報告されている。しかし複数細胞の平均値評価による従来法では、軟骨膜細胞が骨・軟骨前駆細胞であるのか、骨前駆細胞と軟骨前駆細胞の混在なのかを見極める事ができず、そのメカニズムは未だ不明。そこで私達が開発した単一細胞解析法を用い、6種の分化マーカーの発現量を定量する事により、本細胞の分化能を検討したところ、マウス軟骨膜細胞は、骨・軟骨前駆細胞であり、分化能を持ち合わせている細胞である事が分かった。

## (2-3) 新規フェニルボロン酸誘導体の合成と糖応答性材料創出 (東京医科歯科大グループ)

フェニルボロン酸(PBA)誘導体は水中において多価水酸化化合物と可逆的に結合する性質を持ち、様々な糖応答材料やセンサーとして用いられてきた。この結合は PBA の pKa 以上の pH において強固となるが、通常のそれは 8-9 と生体条件に比べて高く、しばしば生体応用の妨げとなってきた。最近我々は、pKa を 7 付近に有し、かつ比較的高い水溶性を

呈するアクリルアミド誘導体を開発した。これをトランジスタ界面に導入した糖センサーの構築に取り組んでいる。また、派生技術として、高分子ゲルと組み合わせた糖尿病治療のための自律型インスリン投与システムとしての検討も開始している。23年度、これを生理的な温度、pH、イオン強度ならびに正常-高血糖領域のグルコースに応答するように最適化した、いわば”完全合成型(タンパクを用いない)の人工膵臓”の開発に成功した<sup>(2)</sup>。

#### (2-4) FET バイオセンサによるタンパク質の検出

##### (2-4-1) ヘアピン型ナノ構造を有する DNA アプタマーを用いた生体分子検出 FET(東京医科歯科大グループ)

カチオン性の DNA バインダーをあらかじめ搭載した閉ループヘアピン DNA アプタマーを、FET のゲート表面に修飾し、標的分子であるアデノシン三リン酸(ATP)の認識に伴い、ヘアピンが開いて、DNA バインダー(DAPI)が溶液中に放出されるような系を設計した。これは、延長金ゲートの表面近傍に位置するヘアピンアプタマーの幹に結合した DNA バインダーの解離に依存する電荷密度の変化を検出することから、標的分子自身の電荷や、溶液のデバイ長(~2.5 nm)にまつわる遮蔽効果に影響されない方法である。その結果、電氣的に中性であるアデノシン分子の特異的検出にも成功した<sup>(3)</sup>。さらに、このヘアピンアプタマーによる分子認識は幹ループ構造にともなう熱エネルギー障壁に依存しており、相転移温度以上で分子結合能を示すという温度応答性を有することが明らかとなった<sup>(4)</sup>。ヘアピン DNA アプタマーの温度応答性はスマート分子スイッチとしての応用も期待される。

##### (2-4-2) バイオトランジスタへの膜タンパク質固定化法の開発 (NIMS グループ)

#### (2-5) 電位計測方式によるマイクロ流体診断デバイスの開発(東京医科歯科大グループ:同領域藤井グループとの共同研究)

藤井グループと連携し、マイクロ流体デバイスと融合した電位計測デバイスを検討している。マイクロ流体デバイス中で生体分子、細胞の接着評価を行うことの利点には、生体試料の大幅な削減、測定の迅速化(試料精製から測定までの一体化等)、多項目化、流体パラメータ側の制御によるシグナル/ノイズ比の最大化、また、循環型の流路配置として理論段数を増やすことによるシグナル増幅などが挙げられる。具体的な対象として、Thrombin、前立腺癌マーカーであるPSAなどをターゲットとした核酸系アプタマーを利用した検出デバイスへの展開を予定しているが、本年度は、電位計測系の構築において既の実績のある PBA を用いたグルコース検出(未発表)との組み合わせを検討した。10チャンネル同時計測可能な金エクステンデッドゲートに装着可能な PDMS 流路をいくつか試作し、参照電極のデザインや配置、流速変化に対する電位安定性を検討した。現在のところ、金電極の電位安定性が課題であり、これを解決すべく電極表面の化学的改変や材料変更などの検討を鋭意進めている。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. Tatsuro Goda and Yuji Miyahara, "Thermo-Responsive Molecular Switches for ATP using Hairpin DNA Aptamers", *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, *26*, 3949-3952. DOI: [10.1016/j.bios.2011.02.041](https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.02.041)
2. Akira Matsumoto, Takehiko Ishii, Junko Nishida, Hiroko Matsumoto, Kazunori Kataoka and Yuji Miyahara, "A Synthetic Approach Toward Self-regulated Insulin Delivery System", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 2124-2128. DOI: [10.1002/anie.201106252](https://doi.org/10.1002/anie.201106252) **Selected as 'Inside Cover'**
3. Tatsuro Goda and Yuji Miyahara, "A Hairpin DNA Aptamer Coupled with Groove Binders as a Smart Switch for a Field-Effect Transistor Biosensor", *Biosens. Bioelectron.*, **2012**, *32*, 244-249. DOI: [10.1016/j.bios.2011.12.022](https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.12.022)
4. Chiho Kataoka-Hamai and Yuji Miyahara, "Label-Free Detection of DNA by Field-Effect Devices", *IEEE Sens. J.*, vol. 11, pp. 3153-3160. DOI:[10.1109/JSEN.2011.2167143](https://doi.org/10.1109/JSEN.2011.2167143)
5. Toshiya Sakata, Izumi Makino, Haruyo Sugimoto, "Real-time monitoring of potassium ion release due to apoptosis with cell-based transparent-gate transistor", *Applied Physics Express*, **5**, 017001, 2012.(DOI: [10.1143/APEX.5.017001](https://doi.org/10.1143/APEX.5.017001))
6. Toshiya Sakata, Haruyo Sugimoto, "Continuous monitoring of electrical activity of pancreatic  $\beta$ -cells using semiconductor-based biosensing devices", *Japanese Journal Applied Physics*, **50**, 020216, 2011. (DOI: [10.1143/JJAP.50.020216](https://doi.org/10.1143/JJAP.50.020216))
7. Toshiya Sakata, Izumi Makino, Sayaka Kita, "Real-time and noninvasive monitoring of respiration activity of fertilized ova using semiconductor-based biosensing devices", *European Biophysics Journal*, **40**, 699, 2011. (DOI: [10.1007/s00249-010-0653-4](https://doi.org/10.1007/s00249-010-0653-4))
8. 坂田利弥, "半導体バイオセンシング技術による胚の評価法", *産科と婦人科*, **78**, 952, 2011.
9. 坂田利弥、水野仁二、杉本東代、喜多清、野口香里、菊池瑛子、乾裕昭, "半導体バイオセンシング技術による胚クオリティーの評価", *日本受精着床学会誌*, **28**, 329, 2011.
10. Yusuke Ikenaga, Hidenori Otsuka. Surface functionalization of nanoparticle for biomedical applications. *J. Jpn. Soc. Colour Mater.*, accepted.
11. K. Kutsuzawa, Fabrication of spheroids on micro-patterned surface. *Sci. Technol. Adv. Mat.* Accepted.

12. Koichi Kutsuzawa, Toshihiro Suzuki, E. H. Chowdhury, Ryo Abe, Hidenori Otsuka, Highly efficient production of therapeutic proteins by CHO spheroid array overlaid with feeder cells in serum free medium. *Biochem Biophys Res Commun.* in press.

**(3-2) 知財出願**

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 2 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 11 件)